

# 同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型的建立及其对造血干细胞植入的影响

蔡耘<sup>1</sup>, 黄绍良<sup>1</sup>, 陈凤英<sup>2</sup>, 黄文革<sup>2</sup>, 魏菁<sup>3</sup>, 车丽洪<sup>4</sup>

(中山大学 1. 附属第二医院儿科, 2. 实验动物中心, 3. 附属第二医院医学研究中心, 4. 病理教研室, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】建立同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型, 研究该技术对造血干细胞(HSC)归巢、植入率、移植后免疫造血重建、移植体抗宿主病(GVHD)等方面的影响。【方法】用 C57BL/6 胎鼠及新生鼠外周血(FNPB)作供体, 以单侧胫骨骨髓腔内注射(IBM)和尾静脉注射(IV)两种途径移植经亚致死量<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线辐照处理的 BALB/c 鼠。200 只受鼠随机分为 4 组: 骨髓腔内注射组(IBM 组); 尾静脉注射组(IV 组); 放疗对照组; 正常对照组, 每组 50 只。用组织冰冻切片和流式细胞术动态了解 CFSE 标记 FNPB 在受体内的分布变化, 并观察移植后受鼠存活状况、植入水平、造血与免疫功能恢复及 GVHD 情况。【结果】①荧光标记 FNPB 体内动力学显示直至输注后 72 h, 供体 FNPB 经 IBM 后主要积聚于注射侧骨髓腔内, 肺部滞留很少。而 IV 组及 IBM 组非注射侧骨髓中的 FNPB 细胞数显著少于 IBM 组注射侧, IV 组非造血组织器官如肺部有明显供体细胞滞留。②同种异基因小鼠 CBT 模型中 IBM 组造血、免疫功能的恢复明显快于 IV 组, 无 GVHD, 移植后 90 d 存活率达到 90%, 注射侧胫骨植入水平(29.53 $\pm$ 6.64)%, 较 IV 组有显著改善。③IBM 输注侧骨髓中供体 HSCs 植入水平及造血重建速度明显优于非注射侧骨髓。【结论】成功建立同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型, 并证实 IBM 途径对促进 HSCs 植入, 造血免疫功能重建, 提高 UCBT 效果方面优于 IV 途径, 多部位 IBM 可能更有利于 HSC 归巢骨髓。

**关键词:** 骨髓; 脐血移植; 动物模型; 造血干细胞

中图分类号: R457

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0644-07

## Establishment of a Murine Model for Allogeneic Umbilical Cord Blood Transplantation by Intra-bone Marrow Injection and Its Effects on the Engraftment of HSCs

CAI Yun<sup>1</sup>, HUANG Shao-liang<sup>1</sup>, CHEN Feng-ying<sup>2</sup>, HUANG Wen-ge<sup>2</sup>, WEI Jing<sup>3</sup>, CHE Li-hong<sup>4</sup>

(1. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, 2. Experimental Animal Center, 3. Medical Research Center, 4. Department of Pathology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To establish a murine model for allogeneic umbilical cord blood transplantation by intra-bone marrow injection, investigate its effects on the homing and engraftment of HSCs, hematopoietic and immunological reconstruction and GVHD of recipient mice after transplantation. 【Methods】BALB/C recipient mice conditioned with sublethal dose <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray radiotherapy were transplanted with FNPB from C57BL/6 mice by intra-bone marrow injection or via the tail vein. Two hundred recipient mice were divided into four groups at random: intra-bone marrow injection group (IBM group), intravenous injection group (IV group), irradiated control group, normal group. There were 50 recipient mice in every group. The distribution of CFSE-labeled FNPB inside the recipients was observed in frozen sections of different organs or by flow cytometry. The survival rate, engraftment level, recovery of hematopoietic and immunological function and GVHD of recipient mice were studied. 【Results】(1) Tracing of the CFSE-labeled FNPB showed that by 72 hours after infusion the IBM-injected FNPB mainly accumulated in the BM cavity of the injected side tibia and few was trapped in the lung, but the amount of FNPB inside the noninjected side tibia or the tibia of IV group was significantly less than that of the injected side tibia. Lots of FNPB were obviously sequestered by other nonhematopoietic organs like the lungs by IV injection. (2) The recovery of hematopoietic and

收稿日期: 2005-06-15

基金项目: 卫生部临床学科重点基金资助项目(2004468)

作者简介: 蔡耘(1974-), 女, 广东广州人, 博士生, 主治医师; 黄绍良, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: hshl@gzsums.edu.cn

immunological function of IBM group was remarkably faster than IV group and its engraftment level and survival rate were improved without GVHD. By +90 d, the survival rate was 90% and the level of H-2D<sup>b</sup> cells in the injected side tibia BMNCs of IBM group was(29.53±6.64)%.(3)The engraftment level of HSCs and the hematopoietic reconstruction of the IBM-injected side tibia were much better than the noninjected side.【Conclusion】 The murine model for allogeneic umbilical cord blood transplantation by intra-bone marrow injection was established successfully. It was confirmed that IBM-injection was better than IV-injection on facilitating the engraftment of HSCs, accelerating hemopoietic and immune recovery of recipients, and promoting the effect of UCBT. IBM-injection on multiple loci is probably more efficient to the noning of HSCs.

**Key word:** bone marrow; umbilical cord blood transplantation; animal model; hematopoietic stem cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci). 2005, 26(6):644-650]

脐血(umbilical cord blood,UCB)是造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)移植的重要来源,但单份UCB所含HSCs数量有限并更为幼稚,免疫效应细胞功能不成熟,以致移植后造血、免疫重建延迟,感染率、移植相关死亡率较高,从而影响和限制了脐血移植(umbilical cord blood transplantation,UCBT)的发展应用。如何促进脐血HSCs归巢并植入骨髓是当前研究的热点。本研究通过同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型的建立,探讨骨髓腔内注射(intra-bone marrow injection,IBMI)对脐血HSCs归巢、植入率、移植后免疫造血重建等方面的影响,为其临床应用提供实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与主要试剂

无特定病原体(SPF级)BALB/c(H-2D<sup>d</sup>)雌性小鼠为移植受体,7~8周龄,体质量16~18g,由中山大学实验动物中心提供;SPF级C57BL/6(H-2D<sup>b</sup>)小鼠为移植供体,10~12周龄,体质量22~25g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。所有实验小鼠均饲养于中山大学实验动物中心无菌层流室动物洁净饲养柜中,饲料、饮水及垫料经高压灭菌处理,移植前后不予抗生素或抗排斥反应药物。羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)购自美国Molecular Probes公司,藻红蛋白(phycoerythrin, PE)或异硫氰酸荧光素(fluorescein-isothiocyanate, FITC)标记大鼠抗小鼠CD3、CD19、NK1.1、CD11b、H-2D<sup>b</sup>单抗购自美国PharMingen公司,甲基纤维素半固体培养基(Methocult™CFM3434)购自美国Stem Cell公司。

### 1.2 胎鼠及新生鼠外周血制备

按本室方法<sup>[4]</sup>,将胎龄18~19d胎鼠或出生后24h内新生鼠断头后吸取外周血于灭菌肝素(50U/mL)离心管内,即为胎鼠及新生鼠外周血(near-term fetal and neonatal murine peripheral blood, FNPB)。平均每只胎/新生鼠取血25~40μL,有核细胞(1.5~6)×10<sup>5</sup>,台盼蓝计数细胞存活率95%以上,用IMDM培养液调整细胞浓度为5×10<sup>6</sup>/mL和30×10<sup>6</sup>/mL备用。

部分FNPB以磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞浓度为(1~5)×10<sup>7</sup>/mL,加入终浓度10μmol/L的CFSE,于37℃孵育10min,再与5倍体积的1640完全培养液于-20℃孵育5min,PBS洗涤细胞,IMDM培养液调整细胞浓度,移植受鼠行体内示踪检查。

### 1.3 实验分组与FNPB移植方法

BALB/C雌鼠随机分为4组,每组50只:骨髓腔内注射组(IBM组);尾静脉注射组(IV组);放疗对照组;正常对照组。前3组小鼠均给予总量6Gy的<sup>60</sup>Coγ射线全身一次性辐照,剂量率1.3Gy/min,照射深度为2.5cm,IBM组及IV组辐照后8h内接受FNPB移植,移植前以43g/L水合氯醛430mg/kg腹腔麻醉。IBM组参照文献[2],剪开皮肤,用1mL胰岛素注射器自右膝关节表面插入胫骨骨髓腔,迅速推注FNPB1×10<sup>6</sup>细胞数后缝合切口;IV组由尾静脉一次性注射FNPB1×10<sup>6</sup>细胞数;放疗对照组、正常对照组以同样方法麻醉后骨髓腔内注射0.03mLIMDM培养液。

### 1.4 FNPB移植后检测指标

1.4.1 CFSE标记FNPB体内示踪 分别于CFSE标记FNPB输注后5min、24h、72h处死受鼠,取其眼静脉血涂片,注射侧及非注射侧胫骨、肝、脾、肺、胸腺行冰冻切片(每个器官切片5~10张,片厚5μm),荧光显微镜下每张切片连续取5~10个非

重叠视野,计数每个视野中荧光细胞数( $\times 100$ )。结果判定标准为:(-)未发现绿色或橙色荧光;(+)每个视野中仅发现 1~5 个阳性细胞;(++)每个视野中发现 5~10 个阳性细胞;(+++每个视野发现 10 个以上阳性细胞;(++++)切片中阳性细胞聚集成团块或云絮状,数量多而无法计数。另于上述时点制备受鼠脾脏、注射侧及非注射侧胫骨细胞悬液和眼静脉血,以 tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶液溶解红细胞,FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测绿色荧光(激发光波长 488 nm)。

1.4.2 FNPB 移植后受鼠一般情况观察 每日观察 FNPB 移植后受鼠生存状况、体质量、伤口愈合情况、下肢运动能力、被毛、食欲、大便等,绘制生存曲线。

1.4.3 移植后受鼠重建造血免疫功能的检测 分别于移植后第 10 天(d10,下同)、d14、d21、d30 断尾,用 KX-21 血细胞计数仪(日本 Sysmex 公司)检测各组存活小鼠外周血 WBC、Hb、PLT;注射侧及非注射侧胫骨骨髓有核细胞(BMNCs) $2 \times 10^4$ 以 1 mL 甲基纤维素半固体培养体系在 37℃、体积分数 5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中行 CFU-GM、BFU-E、CFU-GEMM 集落培养。按照文献[3]方法于培养后 d7 计数 CFU-GM,d14 计数 BFU-E、CFU-GEMM;移植后 d21 处死存活受鼠,取注射侧、非注射侧胫骨行石蜡包埋切片、HE 染色,光镜检查骨髓增生情况;移植后 d30 取外周血以流式细胞仪检测 PE 或 FITC 标记大鼠抗小鼠 CD3、CD19、NK1.1、CD11b 单抗,对照为 IgG1-PE、IgG1-FITC。

1.4.4 移植后受鼠移植抗宿主病检查 每日观察受鼠有无脱毛、腹泻、出血、皮肤黏膜溃烂等情况,并取移植后 d28 存活受鼠足垫皮肤、肝脏、肠管行移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)组织病理学检查。

1.4.5 植入证据与植入水平检测 分别取移植后 d14、d30、d90 小鼠的注射侧及非注射侧胫骨细胞悬液,用 FITC 标记的大鼠抗小鼠 H-2D<sup>b</sup> 单抗行流式检测,对照为 IgG1-FITC。

## 1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验或单因素方差分析;绘制 Kaplan-Meier 生存函数曲线并对其进行 Log-rank 检验,检验水准设  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同途径输注 FNPB 体内分布情况

CFSE 标记 FNPB 输注后 5 min,IBM 组注射侧胫骨骨髓腔内可见大量绿色荧光细胞聚集成云絮状(++++),其它部位未见明显荧光细胞。IV 组外周血涂片中阳性细胞(+++),胫骨、肝、脾、肺、胸腺已可见极少量荧光细胞(+);移植后 24 h,IBM 组注射侧胫骨骨髓腔中阳性细胞仍呈团块状(++++),难以计数,而其它部位出现少量绿色荧光细胞,以肝、脾、胸腺等造血免疫器官较为明显(++)。IV 组小鼠胫骨骨髓腔内可见少量阳性细胞归巢(+~++),肺、肝、脾、胸腺切片阳性细胞较前明显增加(++~+++),而外周血涂片中阳性细胞已极少;72 h 后,IBM 组注射侧、非注射侧胫骨骨髓腔均可见绿色或橙色荧光细胞,但仍以注射侧为多(+++),其它部位荧光细胞已不明显。IV 组胫骨、肝、脾切片中则有少量阳性细胞,而肺部切片仍易见荧光细胞(++)(图 1)。

移植后 5 min,IBM 组注射侧胫骨骨髓细胞中有  $(1.537 \pm 0.136)\%$  来自 CFSE 标记供体 FNPB,与其非注射侧和 IV 组相应数值  $(0.012 \pm 0.016)\%$ 、 $(0.107 \pm 0.077)\%$  比较,差异具统计学意义(非注射侧: $t=27.212, P=0.000$ ;IV 组: $t=22.345, P=0.000$ )。而 IBM 组非注射侧胫骨骨髓细胞供体源者明显少于 IV 组( $t=2.945, P=0.029$ ),且比较两个移植组外周血、脾脏中的阳性细胞数,均以 IV 组为多(血: $t=6.553, P=0.000$ ;脾: $t=4.530, P=0.005$ ),说明骨髓腔内注射的 FNPB 即刻渗漏至外周血或其它组织器官的比例极少;移植后 24 h,IBM 组注射侧胫骨骨髓细胞中荧光细胞所占比例降至  $(1.0 \pm 0.217)\%$ ,但仍显著高于非注射侧和 IV 组(非注射侧: $t=8.190, P=0.000$ ;IV 组: $t=7.931, P=0.000$ ),而后两者比较无明显差异( $P>0.05$ ),并且 IBM 组与 IV 组脾脏、外周血中荧光细胞比例亦无差异( $P>0.05$ ),提示骨髓腔内注射的 FNPB 在该时点已进入血液循环并可到达其它器官组织,但大部分仍是“定居”于注射侧骨髓腔;移植后 72 h,两实验组中各相应数值均有所下降,但其统计分析结果与移植后 24 h 的情况一致(表 1)。

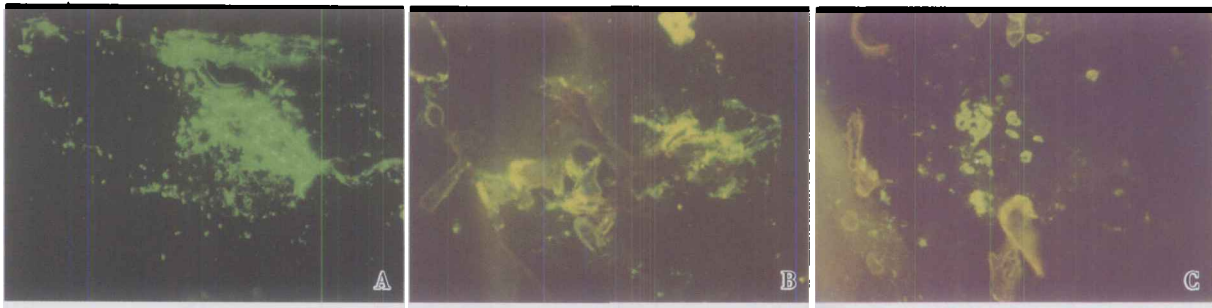


图1 CFSE 标记 FNPB 注射后 IBM 组注射侧胫骨骨髓示踪

Fig. 1 Tracing of IBM-injected CFSE-labeled FNPB in BM of the injected side tibia ( $\times 100$ )

A: 5 minutes after injection; B: 24 h after injection; C: 72 h after injection

表1 流式细胞仪检测 CFSE 标记 FNPB 骨髓腔内或尾静脉注射后体内分布

Table 1 Flow cytometric analysis of the distribution of CFSE-labeled FNPB inside the recipients after IBM or IV injection ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Locations	n	5 min		24 h		72 h	
		IBM	IV	IBM	IV	IBM	IV
Injected tibia	6	1.537 $\pm$ 0.136 <sup>1)</sup>		1.0 $\pm$ 0.217 <sup>1)</sup>		0.888 $\pm$ 0.234 <sup>1)</sup>	
Noninjected tibia	6	0.012 $\pm$ 0.016 <sup>2)</sup>	0.107 $\pm$ 0.077	0.25 $\pm$ 0.058	0.208 $\pm$ 0.113	0.090 $\pm$ 0.013	0.093 $\pm$ 0.12
Spleen	6	0.008 $\pm$ 0.010 <sup>3)</sup>	0.1 $\pm$ 0.049	0.362 $\pm$ 0.230	0.317 $\pm$ 0.200	0.117 $\pm$ 0.043	0.148 $\pm$ 0.043
Peripheral blood	6	0.145 $\pm$ 0.186 <sup>3)</sup>	1.238 $\pm$ 0.364	0.048 $\pm$ 0.071	0.05 $\pm$ 0.051	0.020 $\pm$ 0.021	0.025 $\pm$ 0.030

IBM: intra-bone marrow injection group; IV: intravenous injection group.

1) Compared with IV group and noninjected side tibia,  $P < 0.01$ ; 2) Compared with IV group,  $P < 0.05$ ; 3) Compared with IV group,  $P < 0.01$ 

## 2.2 FNPB 移植后受鼠生存状况

放疗对照组部分小鼠于移植后 14~18 d 死亡, 中位生存时间 15.5 d, 移植后 90 d 存活率 40%; 10 只 IBM 组小鼠注射侧下肢活动自如, 术后 6~7 d 缝线自行脱落, 伤口完全愈合。仅有 1 只于移植后 19 d 死亡, 移植后 90 d 存活率 90%; IV 组的生存率为 50%, 小鼠死亡时间为辐照后 15~18 d。死亡小鼠病理检查提示死因为骨髓造血衰竭, 未见感染征象。各组 Kaplan-Meier 生存函数曲线如图 2 所示, Log-rank 检验 IBM 组与放疗对照组、IV 组生存率

的差别有统计学意义 (放疗对照组:  $Q_{PH}=6.06, P=0.0138$ ; IV 组:  $Q_{PH}=4.17, P=0.0412, P < 0.05$ ), 而放疗对照组与 IV 组的生存曲线无明显差异 ( $Q_{PH}=0.22, P=0.6405, P > 0.05$ )。

## 2.3 移植后受鼠造血免疫功能重建

2.3.1 受鼠外周血象恢复情况 辐照后 IBM 组外周血血红蛋白回升较快, 移植后 14 d 已接近正常水平, 为 (152 $\pm$ 11)g/L, 21 d 基本恢复, 而白细胞、血小板则于 21 d 明显升高, 分别达到 (7.40 $\pm$ 0.76) $\times 10^9$ /L、(387 $\pm$ 29) $\times 10^9$ /L, 移植后 30 d 达正常水平。IBM 组在移植后 10、14、21 d 3 个时点上述细胞计数值都显著高于 IV 组及放疗对照组 ( $P < 0.05$ )。IV 组、放疗对照组外周血常规多于移植后 30 d 恢复, IV 组在各个时点的血细胞计数值均略高于后者, 但其差异尚无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.3.2 受鼠骨髓造血干祖细胞集落变化 移植后不同时点各组小鼠胫骨骨髓造血干/祖细胞集落培养的变化情况与外周血细胞计数的变化基本一致。IBM 组注射侧于移植后 21 d 已趋于正常, 其恢复时间明显早于 IV 组和放疗对照组 ( $P < 0.05$ ), 后两者于移植后 30 d 恢复。而 IBM 组非注射侧也在移植后 30 d 达到正常水平, 其在各时点的计数值与 IV 组相仿 (表 2)。

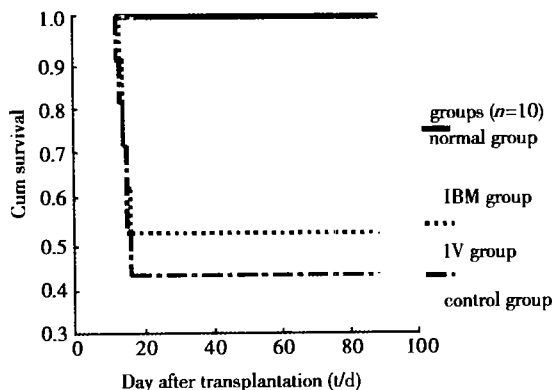


图2 FNPB 移植后小鼠生存函数曲线

Fig.2 Survival plots of recipient mice after FNPB transplantation

2.3.3 受鼠胫骨骨髓增生情况 移植后 21 d 可见 IBM 组注射侧骨髓腔内有核细胞增生极度活跃,分布密集。其非注射侧增生明显活跃,有核细胞数量少于注射侧;IV 组胫骨骨髓增生亦活跃,但有少量纤维组织伴纤维网格形成(图 3)。放疗对照组存活小鼠此时的胫骨组织切片表现与 IV 组基本相同。

2.3.4 受鼠免疫细胞的恢复 本研究中正常 BALB/C 鼠外周血 CD3 (代表 T 淋巴细胞)、CD19

(代表 B 淋巴细胞)、NK1.1 (代表自然杀伤细胞)、CD11b(代表单核巨噬细胞/粒细胞)阳性细胞的比例分别为 (60.18±7.46)%、(14.90±2.88)%、(22.65±9.76)%、(43.21±6.37)%。移植后 30 d 各组小鼠相应检测值已与正常对照组无显著差异,但 IBM 组的检测值略高于 IV 组和放疗对照组,分别达到 (61.18±10.12)%、(15.46±5.65)%、(18.15±4.76)%、(46.33±12.66)%。

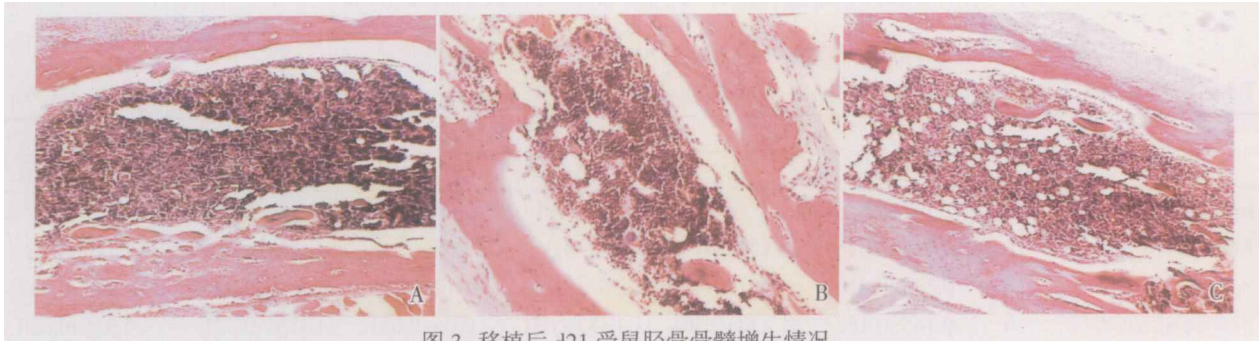


图 3 移植后 d21 受鼠胫骨骨髓增生情况

Fig. 3 Histologic findings in tibias of the recipient mice by Day 21(d21) after transplantation (HE×100)

A:Injected side of IBM group; B:noninjected side of IBM group C: IV group

表 2 移植后小鼠胫骨骨髓造血干/祖细胞集落培养计数

Table 2 Counts of the BM hematopoietic stem/progenitor cell colonies of the tibias after transplantation ( $\bar{x}\pm s$ , colonies)

Colonies	n	After transplantation	IBM		IV	Control	Normal
			Injected side	Noninjected side			
CFU-GM	5	10	21.0±5.1	9.6±2.9 <sup>1)</sup>	12.4±4.0	1.6±0.9 <sup>2)</sup>	190.8±12.2
	5	14	74.0±14.4	26.0±7.3 <sup>2)</sup>	40.8±12.9 <sup>1)</sup>	12.2±3.3 <sup>2)</sup>	193.8±13.7
	5	21	180.6±15.1	127.8±22.2 <sup>2)</sup>	156.4±30.7	89.2±10.1 <sup>2)</sup>	189.4±22.6
	5	30	199.0±21.0	188.6±9.3	194.2±16.2	174.4±29.6	191.0±11.2
BFU-E	5	10	7.2±1.6	3.2±1.3 <sup>2)</sup>	4.6±1.5 <sup>2)</sup>	0.2±0.4 <sup>2)</sup>	24.2±4.0
	5	14	11.0±2.2	5.2±1.5 <sup>2)</sup>	7.2±1.9 <sup>2)</sup>	3.8±2.3 <sup>2)</sup>	24.6±3.8
	5	21	21.4±3.0	16.6±2.5	16.6±7.2	17.6±2.3	23.8±4.2
	5	30	29.4±4.0	28.6±5.4	29.0±3.2	27.0±5.6	25.2±3.1
CFU-GEMM	5	10	4.4±1.1	2.0±1.0 <sup>1)</sup>	3.2±1.3	0.0±0.0 <sup>2)</sup>	15.8±1.5
	5	14	8.0±1.6	4.0±1.2 <sup>2)</sup>	5.0±1.6 <sup>2)</sup>	1.6±1.1 <sup>2)</sup>	15.4±1.1
	5	21	12.6±1.5	9.8±1.9	9.6±6.0	6.2±1.3 <sup>2)</sup>	14.6±1.1
	5	30	22.4±2.7	18.2±3.5 <sup>1)</sup>	21.2±1.6	17.0±1.9 <sup>2)</sup>	16.2±0.8

IBM: intra-bone marrow injection group; IV: intravenous injection group. 1) Compared with injected side of IBM group,  $P < 0.05$ ; 2) Compared with injected side of IBM group,  $P < 0.01$

2.4 移植后受鼠 GVHD

IBM 组及 IV 组小鼠移植 FNPB 后未见明显皮肤溃烂、出血等表现。IV 组有 1 只受鼠于移植后

13 d 始排黄色水样便,移植后 15 d 死亡,其小肠病理切片检查发现肠黏膜层上皮细胞坏死,肠腺坏死或脱落。移植后 28 d 取两组存活受鼠足垫皮肤、肝

脏、肠管行 GVHD 组织病理学检查,均未见正常组织结构破坏、出血或淋巴细胞浸润等表现。

### 2.5 移植后供体 HSC 植入水平

本研究中正常 BALB/C 鼠和 C57BL/6 鼠骨髓细胞 H-2D<sup>b</sup>+ 细胞水平分别为 (0.13±0.03)%、(99.71±0.28)%。如表 3 所示,IBM 组注射侧移植后 14~90 d H-2D<sup>b</sup>+ 细胞逐渐增多,至 90 d 阳性细胞水平达到 (22.16~38.47)%,提示供体细胞可稳定植入,呈嵌合状态。在三个不同时间,该组 H-2D<sup>b</sup>+ 细胞检测值都明显高于 IV 组 (移植后 14 d 时  $F=129.122, P=0.000$ , 根据 Dunnett- $t$  检验,IBM 组注射侧与 IV 组比较,  $P=0.001$ ; 30 d 时  $F=32.762, P=0.000$ , IBM 组注射侧与 IV 组比较,  $P=0.000$ ; 90 d 时  $F=35.152, P=0.000$ , IBM 组注射侧与 IV 组比较,  $P=0.004$ ), IV 组移植后 90 d 的植入水平仅为 (2.86~6.92)%。与 IBM 组非注射侧比较,注射侧的 H-2D<sup>b</sup> 阳性细胞比例也高于前者,其中移植后 14 d 时较之有显著性差异 ( $P=0.001$ )。

表 3 移植后受鼠胫骨 BMNCs 中 H-2D<sup>b</sup> 水平

Table 3 The level of H-2D<sup>b</sup> in tibia BMNCs of recipient mice after transplantation

Group	n	d14	d30	d90
IBM Injected side	5	7.23±1.34	20.38±3.01	29.53±6.64
Noninjected side	5	0.34±0.16 <sup>1)</sup>	12.32±6.30	19.33±7.49
IV	5	0.44±0.18 <sup>1)</sup>	3.47±1.41 <sup>1)</sup>	4.91±1.70 <sup>1)</sup>
Control	5	0.12±0.04 <sup>1)</sup>	0.13±0.02 <sup>1)</sup>	0.12±0.03 <sup>1)</sup>

1) Compared with the Injected side tibia of IBM group,  $P<0.01$

## 3 讨论

2001 年 Kushida 等<sup>[2]</sup>首次建立同种异基因小鼠骨髓腔内骨髓移植模型,并发现 IBMI 途径较外周静脉或门静脉注射有更高的归巢效率和植入水平。Yahata 等<sup>[4]</sup>将人脐血 CD34+ 细胞注入 NOD/SCID 小鼠胫骨骨髓腔中并以限制性稀释法测得其供体细胞的植入频率为 IV 组的 15 倍。本研究成功建立了同种异基因小鼠骨髓腔内输注脐血移植模型,发现 IBMI 可通过促进 HSC 归巢而明显改善其造血免疫重建能力,提高受体存活率。

### 3.1 IBMI 和 IV 途径 HSCs 输注后体内动力学变化

任何途径输注的 HSCs 必须归巢、定居于骨髓造血微环境中合适“龕位”(niche) 才能进一步增

殖、分化和重建造血。经外周静脉输注的 HSCs 很大部分滞留于肺部,仅少量能在某些细胞因子(如 SDF-1 及其受体 CXCR4 等)影响下识别相应的血管位点并穿越基底层到达骨髓腔,此过程一般在移植后 12~36 h 内完成。国内外学者曾尝试 HSC 的其他输注途径,如经卵黄囊途径的宫内移植、门静脉注射等<sup>[5,6]</sup>,均因技术操作难度大、设备条件限制不易于临床应用推广。IBMI 途径则旨在直接增加 HSC 归巢,减少其在受体骨髓外器官组织的滞留。CFSE 为适用于淋巴细胞、造血前体细胞的胞浆荧光染料,荧光强度最长可维持 8 个分裂周期。本研究通过输注后不同时间点组织器官冰冻切片观察和细胞悬液流式检测,了解 CFSE 标记 FNPB 经 IBMI、IV 两种途径输注后在受体内的迁徙、分布变化。结合文献及本结果分析,直至移植后 72h,经 IBMI 的供体 FNPB 主要积聚于注射侧骨髓腔内,少量 FNPB 可经血循环到达外周血、肝、脾、其它长/扁骨骨髓腔等部位,非注射侧与 IV 组骨髓腔内荧光细胞量相当,肺部滞留很少。而以尾静脉注射的 FNPB 归巢骨髓的数量显著少于 IBMI 组,肺部有明显供体细胞滞留。以上说明 IBMI 较 IV 途径有利于 HSC 归巢骨髓,减少体内丢失,对于移植细胞数有限的 UCBT 更具有应用价值;单侧胫骨 IBMI 时少量 HSC 亦可通过循环到达其它造血、免疫器官,进行再次的归巢和种植,提示若双侧甚至多部位 IBMI 可能会进一步提高 HSC 总的归巢数量。

### 3.2 同种异基因小鼠骨髓腔内输注脐血移植模型建立的意义

目前已建立了以骨髓<sup>[2]</sup>、人脐血细胞<sup>[4,7,8]</sup>、小鼠胚胎干细胞 R1 诱导分化的 HSCs 等<sup>[9]</sup>为供体来源的 IBMI 移植动物模型,但现有的 IBMI 脐血移植模型均为人—鼠异种移植,尚未见相关同种异基因脐血移植动物模型报道。本研究成功建立了鼠—鼠同种异基因骨髓腔内注射 FNPB 移植模型,以模拟临床 UCBT 模式,动态观察 FNPB 在受体内的分布、定居、发育增殖情况,有利于评价 IBMI 途径对脐血 HSCs 归巢、植入效率、造血免疫重建能力等的影响。从植入水平来看,本研究 IBMI 组在移植后 14、30、90 d 注射侧骨髓中供体来源细胞的比例分别达到 (7.23±1.34)、(20.38±3.01) 和 (29.53±6.64)%;Castello S 等<sup>[9]</sup>建立的人—鼠异种脐血移植在移植后 30、60、90 d 长骨骨髓细胞中人 CD45+ 细胞的平均比例为 4.4%、1.4%、2.3%;而本室所建立

的 IV 途径同种异基因脐血(FNPB)移植小鼠模型<sup>[1]</sup> 30 d 受鼠骨髓中供体细胞比例为 (27.94±1.95)%。比较以上移植实验结果,提示本研究建立的移植模型比人—鼠异种 UCBT 具有更高的植入水平,并且亚致死量放疗预处理 IBMI 移植可达到致死量化疗 IV 移植相似的植入水平。

### 3.3 IBMI 途径脐血移植促进植入和造血重建,提高受体存活率

CBT 主要问题是造血恢复延迟。除了脐血 HSCs 更为原始外,输入造血干/祖细胞细胞量受限是一关键因素,已证实造血恢复速度与输入脐血 NC 及 CD34+ 细胞量密切相关。在已有的人—鼠异种移植模型及本研究建立的同种 UCBT 模型中均发现 IBMI 途径可以明显促进 HSCs 植入和受体造血功能的恢复,IBM 组在各时点供体来源细胞的比例均明显高于 IV 组,且未发现 GVHD,受体生存率明显提高。从本文不同途径输注 HSCs 的示踪动力学证实,IBM 组注射侧与非注射侧骨髓内荧光细胞量具有明显差异,移植模型中供体植入水平及造血干/祖细胞集落(CFU-GM、BFU-E、CFU-GEMM)量进一步显示上述差异,提示 IBMI 途径使供体 HSCs 直接进入骨髓腔并归巢“龕位”,仅少量进入血循环归巢非注射侧骨髓。我们推测多部位 IBMI 可能有利于更多供体 HSCs 归巢骨髓,促进造血重建,值得深入研究。

综上所述,我们对同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型的成功建立和深入研究证实 IBMI 途径对促进 HSC 植入,造血免疫功能重建,提高 UCBT 效果方面优于 IV 途径,这一技术有望进一步进入临床 UCBT 方面的探讨。

#### 参考文献:

[1] 徐宏贵,方建培,黄绍良,等. 环磷酰胺预处理脐血移

植小鼠模型的建立及其对骨髓龕位的影响[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(6):414-8.

- [2] Kushida T, Inaba M, Hisha H, *et al.* Intra - bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: A powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice[J]. *Blood*, 2001, 97(10):3292-9.
- [3] 郑德先,吴克复,褚建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999.36-59.
- [4] Yahata T, Ando K, Sato T, *et al.* A highly sensitive strategy for SCID -repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2905-13.
- [5] 刘英,庄广伦,游泽山,等. 人脐血造血干细胞经鼠卵黄囊途径进行宫内移植的实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(1): 60-2.
- [6] Fan TX, Hisha H, Jin TN, *et al.* Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT -facilitating cells[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(2):144-50.
- [7] 孙爱红,冯四洲,刘斌,等. NOD/SCID 小鼠脐血单个核细胞骨髓腔内移植的实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(5):261-4.
- [8] Castello S, Podesta M, Menditto VG, *et al.* Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency[J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(8): 782-7.
- [9] Burt RK, Verda L, Kim DA, *et al.* Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(7): 895-904.

(编辑 张恩健)