

# 环磷酰胺预处理脐血移植小鼠模型的建立 及其对骨髓龛位的影响

徐宏贵<sup>1</sup>, 方建培<sup>1</sup>, 黄绍良<sup>1</sup>, 黄文革<sup>2</sup>, 魏 菁<sup>3</sup>, 陈凤英<sup>2</sup>

(中山大学 1. 附属第二医院儿科, 广东 广州 510120; 2. 中山医学院实验动物中心, 广东 广州 51080;

3. 附属第二医院医学研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:** 【目的】建立环磷酰胺(CTX)预处理脐血移植(UCBT)小鼠模型, 并探讨预处理后骨髓龛位腾出的特点和机制。【方法】分别以100, 200, 380 mg/kg 3种剂量CTX腹腔注射BALB/c小鼠, 检测注射后1周内外周血象、骨髓及外周血CD34<sup>+</sup>细胞含量、骨髓细胞凋亡及病理学改变。用C57BL/6鼠脐血(FNPB)作供体移植经“致死量”CTX预处理的BALB/c鼠, 动态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移植宿主病(GVHD)情况。【结果】在CTX处理后3~4 d内, 骨髓造血细胞损伤渐加重, 血窦结构紊乱, 细胞碎屑弥漫分布, 外周血与骨髓CD34<sup>+</sup>细胞水平进行性降低至最低值, 下降的速度和程度与CTX剂量呈正比。骨髓细胞凋亡发生率的峰值出现在第1天, 第3天恢复正常。FNPB移植能明显提高受鼠存活率, 重建部分造血与免疫功能, 未见明显GVHD表现, 并在受体内检出供体细胞的植入。【结论】成功建立CTX化疗预处理小鼠脐血移植模型。干细胞占据的龛位是在化疗预处理后4 d逐渐完成腾空, 凋亡是参与此过程的机制之一。

**关键词:** 环磷酰胺; 小鼠; 造血干细胞移植; 脐血

中图分类号: R556 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0414-05

**Establishment of a Murine Model of Umbilical Cord Blood Transplantation with Cyclophosphamide as Conditioning Regimen and Vacation of Bone Marrow Niches** XU Hong-gui<sup>1</sup>, FANG Jian-pai<sup>1</sup>, HAUNG Shao-liang<sup>1</sup>, HUANG Wen-ge<sup>2</sup>, WEI Jing<sup>3</sup>, CHENG Feng-ying<sup>2</sup>. (1. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Experimental Animal Center, Zhongshan Medical College Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Experimental Research Center, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract** 【Objective】To establish a murine model of umbilical cord blood transplantation(UCBT) using cyclophosphamide (CTX) as conditioning regimen and investigate the characterization and possible mechanisms of vacation in bone marrow niches. 【Methods】BALB/c(H-2<sup>d</sup>) mice were treated intraperitoneally with three dosages of CTX 100, 200, 380 mg/kg respectively, and the dysfunction of hematopoiesis, apoptosis of bone marrow cells, distribution of hematopoietic stem/progenitor cells were all examined. Furthermore, near-term fetal and neonatal murine peripheral blood (FNPB) from C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) mice was transfused intravenously into BALB/c(H-2<sup>d</sup>) recipients after chemotherapy with high dose of CTX, and hematopoietic and immune recovery, graft versus host disease (GVHD), engraftment and survival rate were observed after transplantation. 【Results】Within 3~4 days after CTX treatment, significant dosage-time effect of CTX-injured hematopoiesis was observed. By inducing apoptosis of bone marrow hematopoietic cells, CTX 380 mg/kg resulted in marrow CD34<sup>+</sup> cells dying during 4 days after treatment. FNPB transplantation improved survival rate and reconstitute hematopoietic and immune function in recipients. There was no evidence of GVHD. 【Conclusion】A murine model (C57BL/6→BALB/C) for UCBT with chemotherapy regimen is successfully established. Niches occupied by hematopoietic stem cells and progenitor cells are gradually vacated within 4 days after lethal dosage of CTX therapy, and apoptosis may be one of important mechanisms for it.

**Key words:** cyclophosphamide; mice; hematopoietic stem cell transplantation; umbilical cord blood

造血干细胞移植(HSCT)前需进行放/化疗预处理的重要作用之一, 在于清除受者的造血干细胞(HSC), 腾出其赖以生存的造血微环境即龛位(Niches), 以利于供者HSC的植入。体外及体内研究发现, 射线照射诱导小鼠造血细胞凋亡, 在预处

理后一周内连续腾出龛位<sup>[1, 2]</sup>。而化疗预处理后造血干细胞损伤和龛位腾出特点, 目前未见报道。鉴于儿童HSCT少用放疗, 本实验选择临床常用的化疗预处理药物环磷酰胺(CTX), 探讨化疗预处理对造血细胞损伤的作用机制和骨髓龛位腾出的特

收稿日期: 2002-06-10

基金项目: 美国中华医学基金会(CMB)资助项目(96630)

作者简介: 徐宏贵(1972-), 男, 安徽东至人, 硕士, 研究方向小儿造血干细胞移植。

点,并采用小鼠脐血移植,建立化疗预处理脐血移植(UCBT)小鼠模型,为指导临床如何针对化疗预处理后龛位腾出的特点,采取行之有效的策略改善UCBT效果提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及试剂

1.1.1 实验动物 清洁级 BALB/c(H-2<sup>d</sup>)小鼠,雌雄各半,8~12 周龄,体质量 18~22 g,由中山大学中山医学院实验动物中心提供并饲养。清洁级 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)小鼠,8~12 周龄,体质量 22~26 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 环磷酰胺(200 mg/支,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 0011292),IMDM 培养液、Hoechst33342 染液、碘化丙啶(PI)染液(Sigma 公司),FITC 标记大鼠抗小鼠 CD34、CD3、CD19、H-2D<sup>b</sup> 及 IgG 单抗(Pharmingen 公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验动物饲养及分组 CTX 处理前 3 d 将 BALB/C 鼠放入层流柜中饲养,饲料、饮用水及垫料均经高压灭菌处理。处理后继续层流柜中饲养,不予口服抗生素。CTX 以无菌生理盐水溶解,按 CTX 处理剂量每批 84 只小鼠随机分为 4 组,每组 21 只,共 3 批:①大剂量组:一次性腹腔注射 CTX 380 mg/kg;②中剂量组:一次性腹腔注射 CTX 200 mg/kg;③小剂量组:一次性腹腔注射 CTX 100 mg/kg;④正常对照组:不予 CTX。处理后观察小鼠一般情况,并分别于第 1 天至第 7 天(d 1~d 7),每组随机取 2~3 只鼠,采外周血行血细胞计数及造血干/祖细胞(CD34<sup>+</sup> 细胞)含量测定,取左侧股骨制备单个核细胞悬液计数有核细胞、测 CD34<sup>+</sup> 细胞含量以及作凋亡检测,另右侧股骨行病理学检查。

1.2.2 外周血血细胞计数 摘眼球法采血,ED-TA 抗凝,F-820 血细胞仪检测细胞数。

1.2.3 骨髓单个核细胞(BMNC)悬液的制备及有核细胞计数 颈椎脱臼法处死小鼠,取左侧股骨,按本室方法<sup>[3]</sup>制成 BMNC,显微镜下计数有核细胞备用。

1.2.4 造血细胞凋亡检测 ①Hoechst 33342 荧光染色法:IMDM 液调上述 BMNC 悬液,使细胞浓度为 10<sup>9</sup>/L,取 100 μL 细胞悬液均匀涂于载玻片上,4 ℃固定 5~10 min,室温点加 Hoechst 33342

染液,10~20 min,蒸馏水洗片,干燥后封片,在荧光显微镜下观察;②流式细胞术(FACS)检测凋亡:取 1×10<sup>6</sup> BMNC 悬液,参照文献[4]方法,流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测亚二倍体细胞群百分比(Sub-G<sub>1</sub>%)。

1.2.5 骨髓及外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞含量分析 取上述 BMNC 悬液,有核细胞浓度≥1×10<sup>6</sup>/L,标记抗体为大鼠抗小鼠 CD34-FITC,阴性对照为小鼠 IgG1-FITC,抗体按 1:10 的 BMNC 稀释,4 ℃孵育 30 min,用标准缓冲液(PBS)洗涤,重新悬浮,加固定液 450 μL,4 ℃冰箱中保存待机检测。根据 FITC 的荧光激发特性进行单标记参数分析。上法取小鼠的外周血,用氯化胺裂解红细胞后制成有核细胞悬液,同骨髓细胞方法标记抗体上机检测。

1.2.6 骨髓病理学检查 上法处死的小鼠,取右侧股骨,经脱钙和石蜡包埋,切片行 HE 染色,显微镜下观察。

1.2.7 建立 CTX 预处理 UCBT 小鼠模型 ①小鼠脐血的制备:以 FNPB 作为小鼠脐血移植物<sup>[3]</sup>。取孕 18~20 d C57BL/6 鼠,无菌下剖宫产取出胎鼠或生后 24 h 内新生鼠,快速断头处死,吸取外周血,无菌肝素抗凝,即为 FNPB。平均每只胎/新生鼠取血 40~60 μL,有核细胞数(NC)(2~6)×10<sup>5</sup>。用 IMDM 液调整细胞密度为 5×10<sup>9</sup>/L 的细胞悬液。②CTX 预处理 UCBT 与移植后检测:以 BALB/C 鼠为受鼠,CTX 380 mg/kg 一次性腹腔注射,注后 24 h 经尾静脉一次输注 0.2 mL 细胞悬液(NC 数为 1×10<sup>6</sup>),设立化疗对照(仅注射 CTX)和正常对照组(不作任何处理)。实验组每批每组 15 只,对照组每组每批 5 只,共 3 批。动态观察受鼠存活状况,于移植后第 11 天(d 11)、d 17、d 21 检测外周血细胞计数,FACS 检测骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞、CD3<sup>+</sup> 细胞、CD19<sup>+</sup> 细胞含量及供体来源 H-2D<sup>b</sup> 细胞表达(方法同上),d 35 检查皮肤、肝脏、肠管移植抗宿主病(GVHD)病理改变。

### 1.3 统计学分析

计量资料均以均数±标准差表示,应用 SPSS 10.0 统计软件包处理,各实验组间比较采用随机区组方差分析及 Student-Newman-Keals 两两组间比较。

## 2 结 果

### 2.1 CTX 处理后小鼠的一般情况

d 1 起,各组小鼠出现体质量下降,活动迟缓,

反应迟钝, 至 d 3~5 表现最严重, 各组小鼠抑制严重程度和持续的时间与化疗剂量成正比。380 mg/kg 组小鼠 21 d 内全部死亡, 1 周死亡占 80%, 平均生存 11.5 d(3~21 d), 另两组未见死亡。

## 2.2 CTX 对小鼠外周血细胞和骨髓有核细胞的影响

白细胞(WBC)于注射后 1 d 均开始下降, 380 mg/kg、200 mg/kg、100 mg/kg 组水平分别为正常组 73.5%、59.3%、42.2% ( $P < 0.05$ ), 4 d 降至最低值, 抑制率分别为 95.1%、78.3%、62.5% ( $P < 0.05$ ), WBC 受抑程度与 CTX 剂量呈显著正相关 ( $r = 0.67$ ,  $P < 0.05$ ); 血红蛋白(Hb)受影响不大, 仅 380 mg/kg 组在注后 1 d 略低于正常, 随后回升, 5 d 再次下降, 7 d 与正常组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 血小板(PLT)在 380 mg/kg 与 200 mg/kg 组注射后分别 d 4、d 5 降至低值, 随后开始恢复, 至 d 7 恢复达正常组 20.4% ( $P < 0.01$ ),

94.0%, 100 mg/kg 组变化不大。骨髓有核细胞数的变化与 WBC 变化基本一致。

## 2.3 CTX 对小鼠骨髓和外周血造血干/祖细胞的影响

外周血与骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞水平变化趋势基本相同, 在处理 3~4 d 内, CD34<sup>+</sup> 细胞比例均进行性降低, 与正常对照组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 其中 380 mg/kg 组骨髓和外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞数在 4 d 降至最低值, 分别为正常组的 2.0%、11.9%。随后各组骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞逐渐增加, 伴随着外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞含量也相应回升, 200 mg/kg、100 mg/kg 组骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞增加的速率显著快于 380 mg/kg 组。至 d 7, 前两组的骨髓及外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞水平分别已达正常组值的 111.7% 和 109.4%、112.4% 和 115.3% ( $P > 0.05$ ), 380 mg/kg 组仅为 23.3%、25.9% ( $P < 0.05$ , 表 1, 表 2)。

表 1 CTX 处理后对小鼠骨髓造血干/祖细胞比率的变化

Table 1 The change of BM CD34<sup>+</sup> cells after CTX treatment

(%)

Groups	n	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7
380 mg/kg	5	2.4±1.1 <sup>1)</sup>	0.8±0.2 <sup>2)</sup>	0.3±0.2 <sup>2)</sup>	0.2±0.1 <sup>2)</sup>	1.2±0.2 <sup>2)</sup>	1.7±0.7 <sup>2)</sup>	2.1±1.3 <sup>2)</sup>
200 mg/kg	5	5.9±2.5	3.9±2.8 <sup>1)</sup>	1.2±1.1 <sup>2)</sup>	3.3±1.4 <sup>1)</sup>	5.9±1.4	7.8±1.3	10.1±1.0
100 mg/kg	5	6.7±2.5	4.4±1.7 <sup>1)</sup>	2.7±0.8 <sup>2)</sup>	6.0±0.8 <sup>1)</sup>	8.6±1.9	9.0±1.3	10.2±1.1
Control	5	9.1±3.4	7.1±2.8	8.5±4.2	8.2±2.3	9.1±3.0	8.0±2.7	9.1±2.2

Note: d 1 to d 7; the 1st day to the 7th day; Compared with control, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

表 2 CTX 处理后对小鼠外周血造血干/祖细胞比率的变化

Table 2 The change of PB CD34<sup>+</sup> cells after CTX treatment

(%)

Groups	n	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7
380 mg/kg	5	0.34±0.06 <sup>1)</sup>	0.19±0.05 <sup>1)</sup>	0.16±0.04 <sup>2)</sup>	0.10±0.07 <sup>2)</sup>	0.13±0.06 <sup>2)</sup>	0.15±0.04 <sup>2)</sup>	0.22±0.08 <sup>1)</sup>
200 mg/kg	5	0.39±0.12 <sup>1)</sup>	0.39±0.19 <sup>1)</sup>	0.20±0.09 <sup>2)</sup>	0.37±0.30 <sup>1)</sup>	0.45±0.24	0.80±0.17	0.93±0.17
100 mg/kg	5	0.67±0.10 <sup>1)</sup>	0.47±0.11 <sup>1)</sup>	0.23±0.06 <sup>2)</sup>	0.44±0.09	0.60±0.24	0.95±0.25	0.98±0.29
Control	5	0.80±0.44	0.83±0.45	0.81±0.12	0.84±0.31	0.79±0.71	0.85±0.31	0.85±0.23

Compared with control, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

## 2.4 CTX 对小鼠骨髓造血细胞凋亡的影响

CTX 可诱发骨髓细胞凋亡明显增加, 在荧光显微镜下见凋亡小体生成。CTX 诱导的造血细胞凋亡有明显的量效关系: 分别采用 380, 200, 100 mg/kg 诱导凋亡发生率的峰值均出现在注射后 1 d, 分别为 (7.0±2.0)%、(3.2±0.5)% 和 (1.8±0.8)%, 显著高于正常对照组的 (0.14±0.03)% ( $P < 0.01$ ), 3 组间比较, 也有差异 ( $P < 0.05$ ),

d 2 后凋亡有所减少, d 3 时, 除 380 mg/kg 组稍高外 ( $P > 0.05$ ), 另两组已趋于正常, 可见 CTX 380 mg/kg 使小鼠骨髓细胞在化疗后 3 d 内发生了连续性凋亡(表 3)。

## 2.5 CTX 处理后小鼠骨髓的病理学改变

CTX 注射后 d 1 起, 各组造血细胞急剧减低, 血窦结构紊乱, 细胞碎屑弥漫分布, 细胞吞噬活跃, 随化疗剂量增加, 骨髓造血细胞损伤渐加重, 造血

表3 CTX 诱导骨髓细胞凋亡的量时效关系

Table 3 The dose-time effects of CTX treatment on apoptosis of BM cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Groups	n	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7
380 mg/kg	5	7.0±2.0 <sup>2)</sup>	4.5±1.1 <sup>2)</sup>	0.27±0.08	0.17±0.07	0.17±0.07	0.13±0.04	0.13±0.02
200 mg/kg	5	3.2±0.5 <sup>2)</sup>	1.9±0.2 <sup>1)</sup>	0.15±0.05	0.16±0.01	0.14±0.06	0.13±0.05	0.14±0.02
100 mg/kg	5	1.8±0.8 <sup>2)</sup>	1.8±0.3 <sup>1)</sup>	0.14±0.04	0.16±0.06	0.12±0.07	0.15±0.02	0.12±0.05
Control	5	0.14±0.03	0.15±0.02	0.13±0.01	0.15±0.03	0.14±0.06	0.14±0.04	0.12±0.03

Compared with control, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

恢复明显延缓。380 mg/kg 注射后 4 d 骨髓造血损伤达极度,髓腔内血窦极度扩张、充血,呈血湖状,造血细胞增生度 $< 10\%$ ,少许纤维组织增生伴纤维网格形成,残留的少数巨核细胞散在于纤维网格中,偶见少数细胞碎片。而此时 200 mg/kg、100 mg/kg 组的骨髓造血细胞已显著增生,约 $30\% \sim 50\%$ 。至 d 7,380 mg/kg 的存活小鼠骨髓增生度恢复至 $10\% \sim 20\%$ ,见各系造血细胞散在分布于骨髓腔中,另两组的骨髓增生度已明显高于正常,大量各系造血细胞密布骨髓腔。

## 2.6 FNPB 移植后小鼠存活率、造血与免疫重建

移植组小鼠 30 d 存活率为 $30.0\%$ ,60 d 存活率为 $25.0\%$ ,与化疗对照组(d 30 全部死亡)比较差异显著( $P < 0.01$ )。从 d 11~d 21 内,受鼠外周血 WBC 从 $(1.55 \pm 0.41) \times 10^9/L$ 增至 $(3.98 \pm 0.92) \times 10^9/L$ ;骨髓 NC( $\times 10^6/支股骨$ )从 $9.55 \pm 0.76$ 增至 $15.20 \pm 0.94$ ;骨髓 CD34<sup>+</sup>细胞从 $(1.61 \pm 0.99)\%$ 增加至正常了;骨髓 CD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>细胞分别从 $(0.41 \pm 0.34)\%$ 、 $(3.06 \pm 0.77)\%$ 增加至 $(3.18 \pm 1.54)\%$ 、 $(8.16 \pm 2.51)\%$ ;供体来源的骨髓 H-2D<sup>b+</sup>细胞从 $(8.51 \pm 1.76)\%$ 增加至 $(27.94 \pm 1.95)\%$ ;未见明显 GVHD 表现。

## 3 讨论

### 3.1 化疗预处理移植动物模型建立的意义

HSCT 前的预处理方案由放疗或/和化疗组成,放疗(TBI)预处理的优点在于破坏造血较彻底,龛位充分腾空,利于移植物的植入,且免疫抑制作用较完全,从而可保持终生性的免疫耐受。因此,TBI 被认为是经典的移植预处理方法。但其技术要求高,一般医疗单位难以开展,患者经济负担重,近期毒副作用如严重黏膜损伤、感染、出血,及远期毒副作用如性腺、神经和内分泌腺损伤导致不孕不育和生长障碍、智力低下等,已引起临床重视。近年来,由于 HSC 来源由过去单一的骨髓发展到

骨髓、脐血和外周血,使 HSCT 受益人群(尤儿童和老年人)扩大和 HSCT 病种迅速增多,采用放疗预处理的移植例数逐年减少,相应化疗预处理的报道逐年增加,尤其在小儿和非恶性疾病中应用较广泛。在前者可避免由于放疗导致的远期毒副作用,提高移植后受者生存质量。在后者 HSCT 的目的是替代“旧”HSC 或呈嵌合状态,建立正常造血和代谢等。

近年的研究表明放疗对骨髓龛位腾空作用的机制是通过诱导造血细胞凋亡,使造血干细胞在射线照射后一周内发生了以凋亡为主的连续性增殖期死亡过程,提示造血干细胞所占据的龛位是在放疗预处理后一周内连续性腾空的。化疗预处理后龛位腾空是否具有相同的特点?其机制及对 HSC 植入的影响如何?目前未有报道。CTX 是临床 HSCT 化疗预处理方案中常用的药物,对骨髓有杀灭作用,且有免疫抑制作用,是研究化疗预处理对造血损伤和龛位腾空作用的理想药物。故本研究选用 CTX,通过小鼠体内研究对此进行探讨,以寻求达到最佳预处理效果的 CTX 剂量,建立化疗预处理小鼠 UCBT 模型。

### 3.2 CTX 预处理小鼠脐血移植模型建立的依据

建立 CTX 预处理模型,关键是选择合适的 CTX 剂量,以达到腾出骨髓龛位及明显抑制宿主免疫功能的目的是。本实验同时选用大(380 mg/kg)、中(200 mg/kg)、小(100 mg/kg)三种剂量 CTX,对化疗后 1 周内小鼠的外周血象、骨髓造血组织及 CD34<sup>+</sup>细胞(造血干/祖细胞)进行动态观察。结果显示,在一定剂量范围内,随着 CTX 剂量增加,造血损伤程度加重。骨髓造血干/祖细胞的数量和恢复程度是反应造血功能状态的一个直接特征。实验中,CTX 200 mg/kg 和 100 mg/kg 组骨髓 CD34<sup>+</sup>细胞含量于第 3 天降至最低随后回升且速度较快,第 7 天已高于正常,表明此两剂量 CTX 对造血功能损伤及抑制程度轻,对 G0 期 HSC 杀灭

作用弱, 由于对负反馈调控的抑制减弱, 骨髓内残存的造血干/祖细胞迅速代偿性增生, 使其数量短时间内增加, 提示该两剂量 CTX 只起到了造血干细胞“动员”作用<sup>[6,7]</sup>, 实验证实此两组小鼠无一死亡也表明该剂量不适合作预处理。

而 CTX 380 mg/kg 注射后 d 4 天 WBC、PLT、BMNC 及骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞含量均降至低峰值, 骨髓腔呈“血湖状”, 骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞仅为正常对照组的 2%, 尽管随后也出现骨髓造血的恢复, 但恢复速度缓慢, 各项指标一直维持在显著低下水平, 1 周内 80% 受鼠死亡, 表明大剂量 CTX 明显增加了包括 G0 期 HSC 在内的血细胞杀灭作用, 是致死性的化疗剂量, 腾出了一定量的 HSC 所占据的龛位。进一步 FNPB 移植显示, 供体 HSC 在 CTX 380 mg/kg 预处理的受鼠体内植入, 其嵌合率达 27.94%, 并增殖分化, 重建受体部分造血和免疫功能, 表明选择此剂量 CTX 作预处理是合理和恰当的。但达到供体细胞优势或完全嵌合的 CTX 预处理剂量仍需进一步探索。

### 3.3 化疗预处理后龛位腾空的特点及可能机制

本研究采用荧光染色形态学和流式细胞仪观察骨髓有核细胞凋亡的发生, 结果显示, 化疗后 24 h 细胞凋亡达高峰, 之后逐渐下降, 72 h 恢复正常, 且凋亡发生与 CTX 有一定的剂量-时效关系。与文献报道照射观察结果相似<sup>[3]</sup>。提示 CTX 诱导细胞凋亡是参与造血损伤的机制之一。本实验未见凋亡的持续“平台值”, 这与体外实验所见凋亡发生率持续上升或维持在高“平台值”表现不同<sup>[8,9]</sup>, 我们认为, 这种差异可能与在体实验中机体的清除机制有关, 实验中骨髓病理检查发现细胞吞噬活跃, 48 h 后细胞碎片已基本被清除。

CTX 380 mg/kg 预处理后, 骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞在注射后 4 d 内降至最低值, 外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞变化与其基本一致, 结合骨髓组织学改变, 表明骨髓造血干/祖细胞在 CTX 化疗损伤后 4 d 内发生了连续性死亡过程, 细胞凋亡能是参与造血干/祖细胞死亡机制之一, 提示 HSC 占据的龛位是在化疗预处理后 4 d 内逐渐腾空。本实验仅对 CTX 预处

理后造血细胞的损伤进行了初步的探讨。随着 HSC 分离纯化方法的进展和应用, CTX 等化疗预处理对 HSC 的作用机制有望得到深入研究。

以上研究表明, CTX 380 mg/kg 剂量化疗对小鼠造血系统损伤重, 恢复慢, 是适合的化疗预处理剂量。部分通过凋亡机制, HSC 占据的龛位是在预处理后 4 d 逐渐完成腾空。针对此特点, 在化疗预处理后 4 d 内每天进行小量 UCBT 是否能充分利用每次腾出的龛位, 减少干细胞体内“丢失”, 增加植入, 从而降低移植所需干细胞数, 提高移植效率, 值得进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 项莺松, 杨如俊, 孟祥顺, 等. 小鼠骨髓程序移植的研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(12): 634.
- [2] Radford I R, Murphy T K, Radley J M, *et al.* Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. part II. Apoptotic death is shown by all lines examined[J]. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65(2): 217.
- [3] 黄绍良, 周敦华, 李树浓, 等. HGFs 联合对体外人脐血造血干细胞及 SCID 小鼠体内扩增作用的研究[J]. 临床儿科杂志, 1998, 16(5): 258.
- [4] 董秀珍, 洪文得, 罗绍凯, 等. 鬼臼噻吩武、高温联用体外诱导白血病细胞 HL-60 的凋亡及净化[J]. 中山医科大学学报, 2000, 12(1): 40.
- [5] Harrison D E, Asfak C M. Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood[J]. *Blood*, 1997, 90(1): 174.
- [6] Craddock C F, Apperley J F, Wright E G, *et al.* Circulating stem cells in mice treated with cyclophosphamide[J]. *Blood*, 1992, 80(1): 264.
- [7] Verma U N, van der Blink V, Pillai R, *et al.* Paclitaxel vs cyclophosphamide in peripheral blood stem cell mobilization: comparative studies in a murine model[J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(3): 553.
- [8] Ramirez C D, Sleiman R J, Catchpole D R, *et al.* Morphological and molecular evidence of differentiation during etoposide-induced apoptosis in human lymphoblastoid cells[J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(6): 548.
- [9] Lee J H, Park J H, Yang M H. The effect of cyclophosphamide on Fas-mediated apoptosis[J]. *J Korean Med Sci*, 1997, 12(3): 185.

(编辑 张恩健)