

党女,卢延华,管博文,等.白消安对 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠外周血细胞及骨髓细胞的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (1): 45-50.

Dang N, Lu YH, Guan BW, et al. Effects of busulfan on the hematopoietic system of KKA^y mice with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 45-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.008

白消安对 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠外周血细胞及骨髓细胞的影响

党 女,卢延华,管博文,孟爱民*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 观察白消安(busulfan)对 2 型糖尿病模型 KK/upj-Ay/J(KKA^y)小鼠的造血系统功能的损伤作用,并与对照 C57BL/6 J(B6)小鼠进行比较。**方法** 雄性 KKA^y 小鼠,随机分为白消安给药组和溶剂对照组,前者腹腔注射白消安,剂量 40 mg/kg,后者注射同等剂量的 5%的 DMSO,B6 小鼠进行相同处理分组。给药后 15 d 称重、计算免疫脏器系数,检测小鼠的外周血计数和分类,流式细胞术检测骨髓中造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell,HPC)、造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)和长期造血干细胞(long term-hematopoietic stem cell,LT-HSC)的比例。通过粒细胞巨噬细胞集落形成单位(colony-forming unit-granulocyte and macrophage,CFU-GM)测定实验评价小鼠造血祖细胞的功能。**结果** 白消安给药后 15 d,KKA^y 小鼠的体重、白细胞(white blood cell,WBC)、红细胞(red blood cell,RBC)、血红蛋白(hemoglobin,HGB)、血小板(blood platelet,PLT)、淋巴细胞(lymphocyte,LYM)、中性粒细胞(neutrophil,NEU)、骨髓中 HPC、HSC 和 LT-HSC 的比例均显著降低,CFU-GM 数目明显降低,脾和胸腺细胞的比例未见明显变化。白消安给药后,KKA^y 小鼠的 WBC、RBC、HGB 和 LYM 明显低于 B6 小鼠,但 PLT 和 HSC 的比例明显高于 B6 小鼠。KKA^y 小鼠的 PLT 和 HSC 的降低幅度显著低于 B6 小鼠,而 HPC 的降低幅度明显高于 B6 小鼠。**结论** 40 mg/kg 白消安给药能损伤小鼠的造血系统功能。白消安给药后,KKA^y 小鼠的 WBC、RBC、HGB 和 LYM 损伤较重,但 PLT 和 HSC 损伤较轻且耐受性更强,而造血祖细胞的耐受性低于 B6 小鼠。

【关键词】 白消安;KKA^y 小鼠;2 型糖尿病;造血系统;化疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 01-0045-06

Effects of busulfan on the hematopoietic system of KKA^y mice with type 2 diabetes mellitus

DANG Nv, LU Yanhua, GUAN Bowen, MENG Aimin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To explore the damaging effect of busulfan on hematopoiesis and immune functions of KK/upj-Ay/J (KKA^y) mice with type 2 diabetes mellitus. **Methods** Male KKA^y mice were randomly divided into busulfan

【基金项目】国家自然科学基金(81372928,81573094);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-3-015);国家重点研发计划(2017YFA0105204)。

【作者简介】党女(1995—),女,硕士研究生,专业:放射医学。E-mail: dangnv1995@qq.com

【通信作者】孟爱民(1963—),女,研究员,研究方向:造血干细胞损伤机制和干细胞衰老研究。E-mail: ai_min_meng@126.com

treatment and vehicle control groups. The former was intraperitoneally injected with busulfan at a dose of 40 mg/kg, while the latter was injected with an identical volume of 5% dimethyl sulfoxide; B6 mice were grouped and treated in the same way. Fifteen days after administration, all mice were euthanized for peripheral blood count and classification of hematopoietic progenitor cell (HPC), hematopoietic stem cell (HSC), and long-term hematopoietic stem cell (LT-HSC) frequencies. The function of HPCs was assessed by colony-forming unit-granulocyte and macrophage (CFU-GM) assay.

Results Fifteen days after busulfan treatment, weight, white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), blood platelet (PLT), lymphocyte (LYM), and neutrophil (NEU), as well as percentages of HPC, HSC, and LT-HSC in the bone marrow of KKA^y mice were significantly reduced. In addition, the number of CFU-GM was significantly reduced, although proportions of spleen and thymus cells were not significantly changed. After busulfan treatment, WBC, RBC, HGB, and LYM of KKA^y mice were significantly reduced compared with B6 mice, but proportions of PLT and HSC were significantly increased. PLT and HSC were significantly reduced in KKA^y mice compared with B6 mice, while the decrease of HPC in KKA^y mice was significantly enhanced compared with B6 mice. **Conclusions** Busulfan (40 mg/kg) impaired function of the hematopoietic system in mice. After busulfan was administered, WBC, RBC, HGB, and LYM of KKA^y mice were severely damaged, PLT and HSC were less damaged and more tolerant, and the tolerance of HPC was reduced compared with B6 mice.

[Keywords] busulfan; KKA^y mouse; type 2 diabetes mellitus; hemopoietic system; chemotherapy

目前,心脑血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤及慢性呼吸系统疾病等慢性非传染性疾病(noninfectious chronic disease, NCD)成为威胁我国人民健康的主要疾病,其中 2 型糖尿病是恶性肿瘤的独立危险因素之一^[1-3]。2 型糖尿病除了对肿瘤的发生存在促进作用,同时合并 2 型糖尿病的恶性肿瘤在发生发展的过程中可能有更多的基因和表观遗传变化,导致恶性肿瘤发展演变成为恶性程度更高、进展更快的状态^[4]。

应用以细胞毒为主的抗肿瘤药(antineoplastic drugs)进行化学治疗仍然是肿瘤综合治疗的重要手段之一。骨髓抑制是肿瘤化疗主要毒副作用。近年来,在鼠、大鼠和人类中的研究和临床研究表明,糖尿病可导致骨髓微环境受损,如微血管病变、神经末梢病变和干细胞动员受损等^[5-6]。骨髓造血功能受损也被认为是糖尿病的并发症之一^[7]。化疗药物的毒副反应也可能与 2 型糖尿病并发症合并,产生严重的预后不良。此外,2 型糖尿病还可能加重化疗的毒性^[8]。恶性肿瘤合并 2 型糖尿病的患者化疗可能面临更大挑战。由此,我们推测 2 型糖尿病患者对化疗的耐受性及损伤程度可能与非 2 型糖尿病患者不同。本研究利用白消安化疗损伤模型来探讨化疗对 2 型糖尿病小鼠和健康小鼠的造血系统损伤的差异。

本课题组目前已成功构建了白消安诱导造血干细胞损伤模型^[9]。我们采用自发性 2 型糖尿病动物 KK/upj-Ay/J(KKA^y)小鼠^[10],KKA^y小鼠在 8 周龄时血糖水平显著升高^[10]。国内外多采用 C57

小鼠作为 KKA^y小鼠实验的对照鼠^[11]。本研究拟建立白消安化疗损伤模型,比较 KKA^y小鼠与对照 C57BL/6 J 小鼠造血免疫功能反应性的差异,为临床相应情况安全用药提供资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

KK/upj-Ay/J 小鼠(以下简称为 KKA^y小鼠)雄性 20 只,SPF 级,10~12 周龄,体重 28~35 g, C57BL/6 J 小鼠(以下简称为 B6 小鼠)雄性 20 只, SPF 级,10~12 周龄,体重 25~30 g。两种小鼠均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[SCXK(京)2014-0004]。小鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2015-0035]。动物实验研究符合动物福利,遵循中国医学实验动物研究所制定的实验动物保护和使用的指南,实验动物饲养和实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验方案通过医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会批准(IACUC 号:MAM18002)。

1.2 主要试剂与仪器

白消安(busulfan)购自 Sigma-Aldrich;DMSO 购自北京索莱宝科技有限公司;其他试剂与仪器同参考文献^[12]。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及给药

将 C57BL/6 J 小鼠分为对照组(B6 组)和给药组(B6 BUS 组),KK/upj-Ay/J 小鼠分为对照组

(KKA^y 组)和给药组(KKA^y BUS 组)。给药组小鼠腹腔注射白消安,剂量 40 mg/kg,分两天连续给药,每次剂量 20 mg/kg。对照组腹腔注射等剂量 5% DMSO。给药 15 d 后取材,检测相应指标。

1.3.2 外周血细胞计数和分类

白消安给药后 15 d,进行外周血计数及分类检测^[12]。

1.3.3 造血干细胞和造血祖细胞比例测定

实验操作同参考文献^[12]。

1.3.4 粒细胞巨噬细胞集落形成单位(colony-forming unit-granulocyte and macrophage, CFU-GM)测定

实验操作同参考文献^[12]。

1.4 统计学方法

计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,组间差异用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey 多重比较法(Tukey's multiple comparison test),重复测量数据采用重复测量数据方差分析方法。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 白消安对小鼠外周血计数和分型的影响

白消安对 B6 和 KKA^y 小鼠外周血细胞计数和分类的影响的实验结果如图 1 所示。与 B6 溶剂对照组相比,KKA^y 溶剂对照组的 WBC、HGB 及 LYM%显著低于 B6 小鼠;NEU%显著高于 B6 小鼠,其余指标未见统计学差异。与 B6 溶剂对照组相比,B6 给药组的 WBC、RBC、HGB、PLT、LYM 及 NEU 均显著降低;其中 WBC、PLT 和 NEU 下降比例较多,分别为 40.21%、56.5%和 55.4%。与 KKA^y 溶剂对照组相比,KKA^y 给药组的 WBC、RBC、PLT、LYM 及 NEU 均显著降低,而 HGB 和 LYM%有下降趋势,但无统计学差异;其中 WBC、PLT 和 NEU 下降比例较多,分别为 36.9%、38.8%和 63.7%。KKA^y 给药组的 WBC、RBC、HGB 以及 LYM 明显低于 B6 给药组,提示在上述 4 个指标上,KKA^y 小鼠的损伤可能更为严重。而 KKA^y 给药组的 PLT 明显高于 B6 给药组,且给药后 KKA^y 小鼠的 PLT 的下降幅度则明显低于 B6 小鼠,提示在 PLT 这一指标上,KKA^y 小鼠的损伤更轻,且耐受性更高。

2.2 白消安对小鼠造血干细胞和造血祖细胞比例

的影响

为探究白消安对 KKA^y 和 B6 小鼠的造血系统的影响,我们通过流式细胞术检测了小鼠骨髓中造血祖细胞 HPC、造血干细胞 HSC 以及长期造血干细胞 LT-HSC 在骨髓细胞中所占比例。

实验结果如图 2 所示,与 B6 溶剂对照组相比,KKA^y 溶剂对照组的 HSC 比例明显较低。给药后,与 B6 溶剂对照组相比,B6 给药组的 HPC、HSC、LT-HSC 的比例均明显降低;与 KKA^y 溶剂对照组相比,KKA^y 给药组的 HPC、HSC、LT-HSC 的比例均明显降低。对比变化幅度可发现,给药后,KKA^y 小鼠的 HPC 下降幅度明显高于 B6 小鼠($P < 0.05$),而 HSC 的变化幅度明显低于 B6 小鼠($P < 0.05$),提示 KKA^y 小鼠在 HSC 这一指标上表现出较强的耐受性。

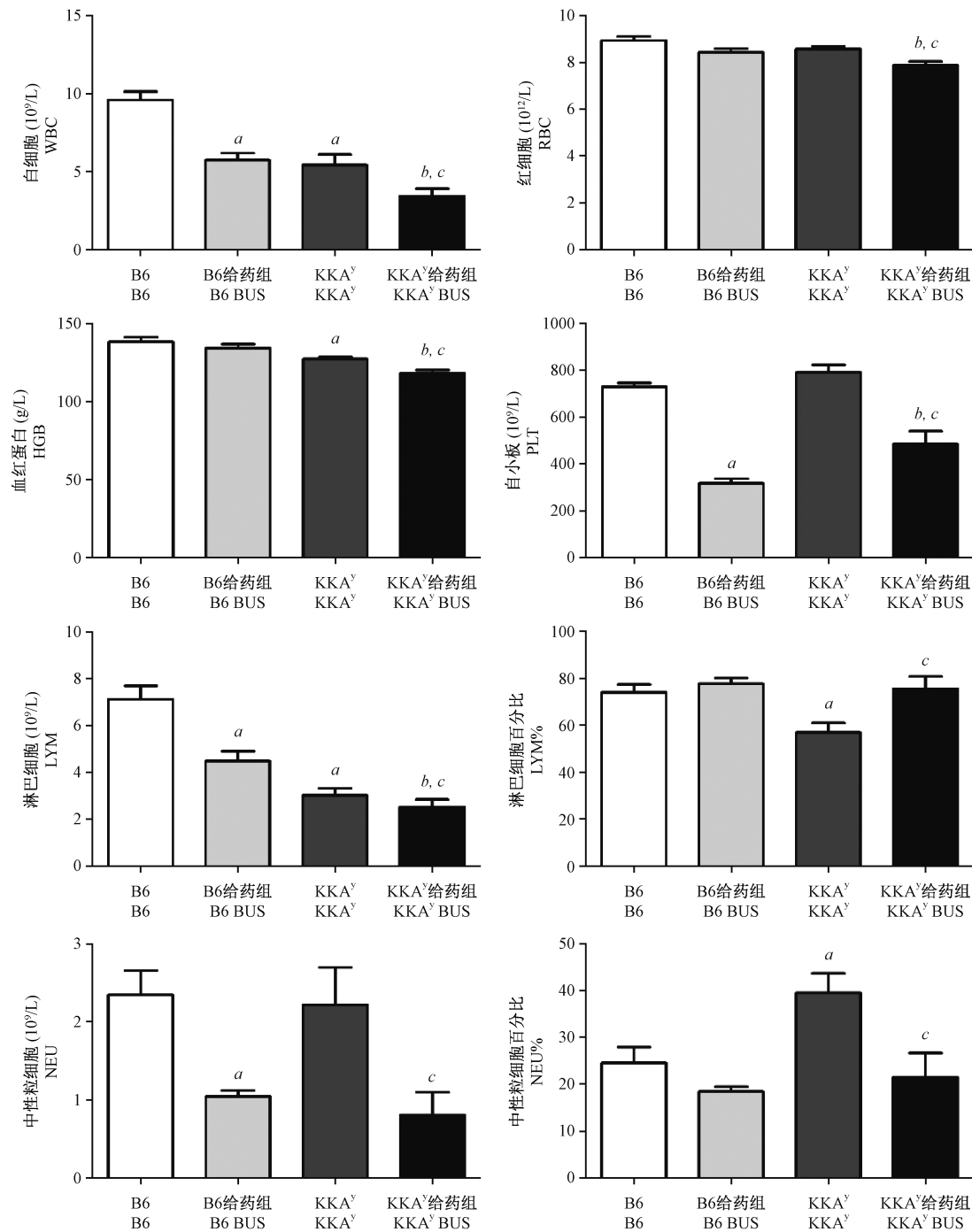
2.3 白消安对小鼠 CFU-GM 的影响

CFU-GM 可以反映骨髓中 HPC 的增殖能力,实验结果显示白消安抑制骨髓中造血祖细胞的功能,显著降低 B6 和 KKA^y 小鼠的 CFU-GM,但给药前后,两种小鼠者的造血祖细胞功能未见差异(见图 3)。

3 讨论

本研究参考课题组之前发表的文献,采用 40 mg/kg 白消安腹腔注射小鼠作为实验组,5%的 DMSO 腹腔注射小鼠作为溶剂对照^[10]。一般认为,雌激素对小鼠放疗化疗损伤有保护作用,因此采用了雄性小鼠研究。

与 B6 溶剂对照组相比,KKA^y 溶剂对照组小鼠的体重明显较高,WBC、HGB、LYM%明显较低,NEU%则处于较高水平,骨髓中 HSC 的比例明显较低,脾的 B 细胞的比例较高,脾中 T 细胞的比例较低。此结果提示 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠与 B6 小鼠在造血免疫功能上可能存在一定差异。KKA^y 小鼠的 NEU%明显高于 B6 小鼠。中性粒细胞从骨髓中动员起来,在急性环境中引发炎症反应,研究发现 NEU 在慢性病如 2 型糖尿病中增高,导致慢性持续的炎症反应^[13]。2 型糖尿病中的长期慢性炎症状态可通过多种途径引起组织损伤,包括活性氧增加、免疫系统持续激活、诱导细胞凋亡和组织微环境改变等^[14]。KKA^y 小鼠的 HSC 在骨髓细胞中的比例明显低于 B6 小鼠,提示 KKA^y 小鼠的造血系统功能可能有损伤。HSC 受损可能与上述慢性炎症状态影响造血微环境有关。



注:与 B6 溶剂对照组相比, ^a $P<0.05$;与 B6 给药组相比, ^b $P<0.05$;与 KKA^y 溶剂对照组相比, ^c $P<0.05$ 。“BUS”为白消安 (busulfan) 的英文缩写。下图同。

图 1 白消安给药对小鼠外周血细胞的影响

Note. Compared with the B6 control group, ^a $P<0.05$. Compared with the B6 BUS group, ^b $P<0.05$. Compared with the KKA^y BUS group, ^c $P<0.05$. “BUS” is short for busulfan. The same in the following figures.

Figure 1 Effect of busulfan on peripheral blood cells in mice

实验结果可见 40 mg/kg 的白消安对小鼠明显的骨髓抑制作用,说明白消安诱导小鼠骨髓造血系统损伤模型造模成功。

白消安能够诱导骨髓中分裂旺盛的造血细胞

凋亡,并导致不同功能分化阶段的血细胞降低外周血象,给药后,B6 小鼠和 KKA^y 小鼠的 WBC 和 PLT 下降明显。

一般来说,细胞毒类药物白消安能够诱导肿瘤

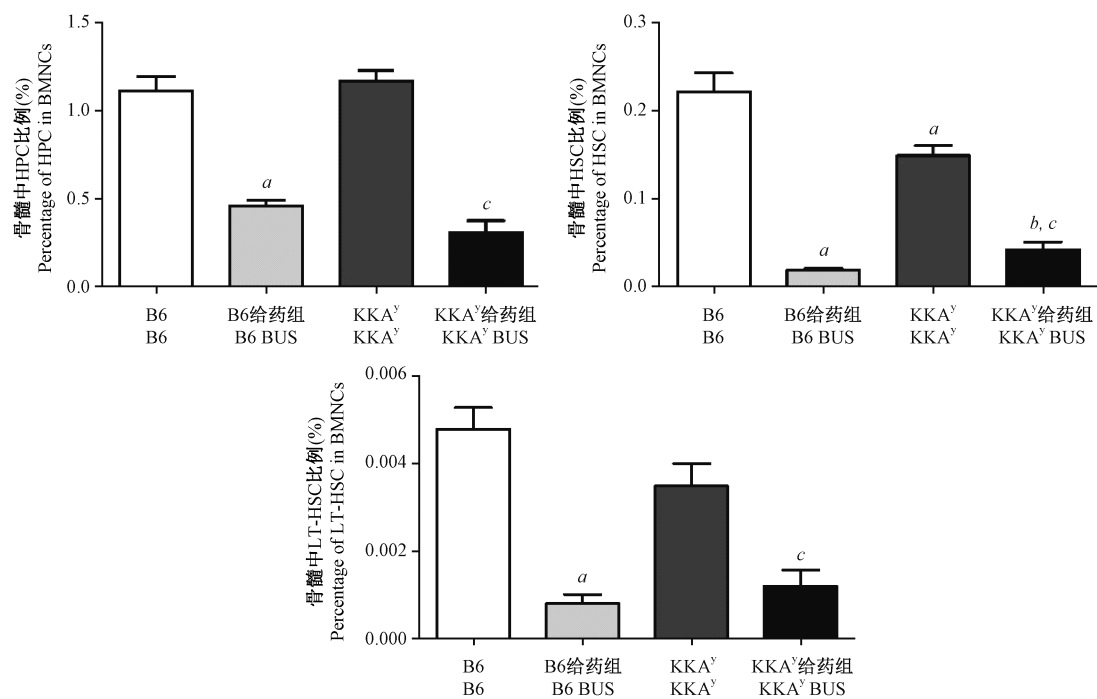


图 2 白消安对小鼠造血干/祖细胞比例的影响

Figure 2 Effect of busulfan on percentages of HPC, HSC, and LT-HSC in bone marrow

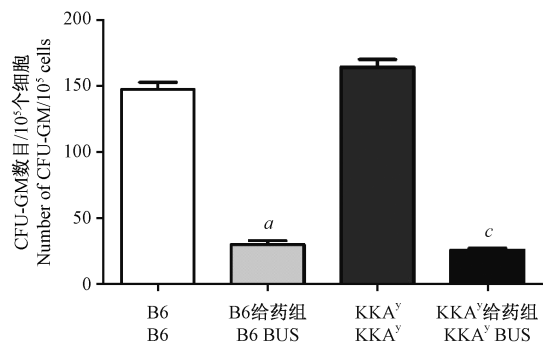


图 3 白消安对小鼠 CFU-GM 的影响

Figure 3 Effect of busulfan on CFU-GM of C57 and KKA^y mice

细胞凋亡,主要副作用是造血祖细胞功能受损,当剂量较高时也会损伤造血干细胞功能^[10]。40 mg/kg 的白消安给药剂量可明显降低 HPC 和 HSC 比例,损伤 HPC 功能。白消安给药后,KKA^y 小鼠的 HSC 的下降比例明显低于 B6 小鼠,其耐受性明显高于 B6 小鼠。有研究报道小鼠的 HSC 对氟尿嘧啶 (5-FU) 或羟基脲等抗增殖化疗药物表现出耐受性^[15],其原因可能在于小鼠体内休眠干细胞 (dormant Mouse HSCs, d-HSCs,表型 Lin-Sca1⁺e-Kit⁺CD150⁺CD48⁻CD34⁻) 处于相对静止即休眠状态,这一特性被认为可以保护造血干细胞免受功能衰竭和细胞损伤以保持造血细胞终生产生,这一机制可以解释 HSC 对抗增殖化疗药物产生的耐受性^[16]。

而 KKA^y 小鼠的 HSC 对放化疗的耐受性更高,可能是 KKA^y 和 B6 小鼠的 d-HSC 存在差异,从而表现出对放化疗较强的耐受性,仍需要进一步研究。

白消安给药后,KKA^y 小鼠的 HPC 的比例下降得更为明显。之前研究发现卡铂能显著降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠的 HPC 功能,卡铂在 db/db 小鼠中骨髓毒性增加^[17]。Geresi 等人^[18]发现肥胖的 Zucker 大鼠和非肥胖但胰岛素抵抗的 Goto-Kakizaki 大鼠都存在造血祖细胞损伤,提示胰岛素抵抗可能影响骨髓造血系统功能,影响化疗药物的骨髓毒性。此次研究并未检测 KKA^y 小鼠的糖耐量,但就之前的研究结果来看,KKA^y 小鼠中存在明显的胰岛素抵抗,这可能与 KKA^y 小鼠对白消安的造血祖细胞损伤耐受性降低有关^[18]。

KKA^y 小鼠是自发性肥胖的 2 型糖尿病动物模型,2 型糖尿病会对造血系统造成损伤,肥胖还可能慢性炎症以及药物的药代动力学改变^[19]。在肿瘤治疗中,通常不会考虑患者体重等因素。然而 2 型糖尿病患者常伴有肥胖,化疗药物可能在脂肪组织内蓄积而改变药物的药代动力学进而影响药效,另一方面肥胖也可能通过药效学机制影响化疗药物的骨髓毒性。

恶性肿瘤合并糖尿病的患者愈来愈多,因此需要更多的实验数据研究恶性肿瘤合并糖尿病患者

的耐受性,以便给临床医生提供更多的循证医学证据,给患者带来更大的受益。随着有效化疗药物和治疗方案的不断更新,新的预后评价手段和指标的引进、放疗的调整发展,医生根据病人的个人情况推荐不同的具有针对性的疗法,才能给病人带来治疗的最大受益。

参考文献:

[1] 刘子琪,刘爱萍,王培玉.中国糖尿病患病率的流行病学调查研究状况[J].中华老年多器官疾病杂志,2015,14(7):547-550.

[2] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.

[3] 陈竺.全国第三次死因回顾抽样调查报告[M].北京:中国协和医科大学出版社,2008.

[4] 毛景涛,任宏.2型糖尿病与肿瘤相关性的探索[J].药物与临床,2015,12(13):39-45.

[5] Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(3): 498-508.

[6] Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, et al. Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration [J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(8): 949-957.

[7] Fujimiya M, Nagaishi K, Yamashita T, et al. Bone marrow stem cell abnormality and diabetic complications [J]. Anat Rec, 2012, 295(6): 917-921.

[8] 陶翠云.乳腺癌与代谢综合征关系的研究进展[D].蚌埠:蚌埠医学院,2015.

[9] 李程程,管博文,苏路,等.白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(2):26-32.

[10] 陈薇宇,李双蕾,谢婧,等.2型糖尿病 KKAy 小鼠动物模型的研究进展[J].临床医药文献电子杂志,2017(54):195-196.

[11] 陈其明,史顺娣,申竹芳,等.糖尿病 KK 小鼠生物特性的研究[J].中国医学科学院学报,1988,10(6):416-420.

[12] 党女,卢延华,管博文,等.X线全身照射对2型糖尿病 KKAy 小鼠造血免疫系统功能的影响[J].中国实验动物学报,2019,27(3):298-304.

[13] Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond [J]. J Exp Med, 2013, 210(7): 1283-1299.

[14] 党女,孟爱民.细胞衰老与2型糖尿病的相关性研究进展[J].生命科学,2019,31(6):589-595.

[15] Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1106: 41-53.

[16] Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair [J]. Cell, 2008, 135(6): 1118-1129.

[17] Kashiwabara K, Yamane H, Tanaka H. Toxicity and prognosis in overweight and obese women with lung cancer receiving carboplatin-paclitaxel doublet chemotherapy [J]. Cancer Invest, 2013, 31(4): 251-257.

[18] Geresi K, Benko K, Szabo B, et al. Toxicity of cytotoxic agents to granulocyte-macrophage progenitors is increased in obese Zucker and non-obese but insulin resistant Goto-Kakizaki rats [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 696(1-3): 172-178.

[19] Tan Y, Wei S, Zhang W, et al. Type 2 diabetes mellitus increases the risk of hepatocellular carcinoma in subjects with chronic hepatitis B virus infection: a meta-analysis and systematic review [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 705-713.

[收稿日期]2019-05-27