

白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用

李程程, 管博文, 苏路, 党女, 王玉全, 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, 国家卫生和计划生育委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 检测不同给药方式对小鼠造血干细胞功能的影响。方法 C57 小鼠, 白消安腹腔给药, 分为高剂量组(40 mg/kg)和低剂量组(20 mg/kg), 低剂量组给药一次, 高剂量给药组分两天给药, 每天给予 20 mg/kg。给药后 15 d 和 30 d 分别检测小鼠外周血和骨髓细胞计数, 造血干细胞, 造血祖细胞和长期造血干细胞比例, 通过 CFU-GM 实验评价小鼠造血祖细胞增殖能力, 流式分选长期造血干细胞体外培养, 通过单细胞集落实验检测造血干细胞功能。结果 高剂量组和低剂量组白消安均可以降低 C57 小鼠外周血中白细胞和血小板数目, 降低造血干、祖细胞和长期造血干细胞的比例, 降低 CFU-GM 和单细胞集落形成能力。高剂量组比低剂量组损伤作用进一步加重。小鼠体重和对照组相比差异无显著性。结论 高剂量组白消安给药 15 d 后可以诱导造血干细胞损伤, 为造血干细胞损伤机制的探讨和损伤防护的研究提供模型和基础。

【关键词】 白消安; 造血干细胞; 骨髓抑制; 化疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0026-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2018. 02. 005

Hematopoietic stem cell injury in mice induced by busulfan

LI Chengcheng, GUAN Bowen, SU Lu, DANG Nv, WANG Yuquan, MENG Aimin*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the hematopoietic stem cell injury (HSC) induced by busulfan. **Methods** C57BL/6 mice were treated with i. p. injection of 20 mg/kg or 40 mg/kg busulfan. All mice were euthanized at 15 days and 30 days after busulfan treatment for analysis of the peripheral blood cell counts, bone marrow cellularity and HPC (LKS⁻, lineage-sca1⁻ c-kit⁺), HSC (LSK, lineage-sca1⁺ c-kit⁺) and long-term HSC (CD34⁻ LSK, CD34⁻ lineage-sca1⁺ c-kit⁺) frequency. The colony-forming unit-granulocyte and macrophage (CFU-GM) ability of HPC was measured by colony-forming cell (CFC) assay, and the HSC self-renewal capacity was analyzed by single-cell colony-forming assay.

Results The busulfan administration decreased the WBC, RBC and PLT compared with control mice. The HPC function (CFU-GM) was impaired ($P < 0.05$), and the HSC colony forming ability was decreased at 15 days after busulfan treatment ($P < 0.05$), whereas the body weight of the mice didn't change significantly after busulfan treatment.

Conclusions Our findings suggest that busulfan can induce hematopoietic stem cell injury, and provide a support for the study of hematopoietic stem cell injury mechanism.

【Key words】 busulfan; hematopoietic stem cell; bone marrow suppression; chemotherapy; mouse

[基金项目] 国家自然科学基金(81703170); 协和青年基金(2017310015); 中央科研院所基本业务费(2016ZX310042)。

[作者简介] 李程程(1988—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 造血干细胞损伤机制。E-mail: stachengxiaoxi@hotmail.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

骨髓抑制是肿瘤化疗导致的剂量限制性毒副作用,表现为造血障碍,其中以白细胞特别是中性粒细胞减少最常见,其次是血小板减少。严重骨髓抑制时可合并感染、出血,危及生命安全^[1]。骨髓抑制分为急性骨髓抑制和长期骨髓抑制,急性骨髓抑制主要是电离辐射或化疗药物引起的造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs)和少量的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)凋亡,以及诱导 HPCs 增殖障碍。临床上,可以给予造血细胞因子缓解症状^[2]。长期骨髓抑制主要是 HSC 的损伤,长期骨髓抑制具有迟发性、隐匿性,在临床上容易被忽视,目前尚无有效治疗手段^[3]。前期的研究表明,电离辐射可以诱导造血干细胞损伤,诱导长期骨髓抑制,诱导氧化应激增加,提高磷酸化 p38 MAPK 表达,进一步诱导造血干细胞衰老^[4]。电离辐射诱导的急性和长期造血系统损伤模型广泛应用与造血辐射损伤机制的研究中。白消安目前临床上被用作慢性粒细胞白血病的缓解性治疗,或联合其他药物作为慢性髓性白血病同种异体的造血祖细胞移植前的预处理方案,清除受体体内的造血干细胞。其主要的副作用即为骨髓抑制^[5]。相较于电离辐射诱导损伤模型需要特定的设备和专业人员操作,利用化疗药物白消安诱导造血干细胞损伤模型,操作简便,小鼠耐受性好^[6],本实验利用流式技术测定骨髓造血干细胞,造血祖细胞和长其造血干细胞的比例;体外单细胞培养技术评价造血干细胞功能。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57 小鼠 35 只,体重 18~20 g,6~8 周龄,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [SCXK(京)2014-0004]。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],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(IACUC)审批, IACUC 号为: MAM16003。

1.2 主要试剂及仪器

白消安(busulfan)购自于 Sigma 公司;流式所需 CD4、CD8、B220、Ter119、Gr1、CD11b、Streptavidin、scal-1、ckit、CD34 抗体均购自 BD Bioscience 公司;甲基纤维素培养基(MAM HS001)购自 Gibco 公司;甲基纤维素半固体培养基 MethoCult GF (M3534)购

自 Stem Cell 公司。

BD 流式细胞仪(BD FACS Aria TMII);全自动血细胞计数仪(ABX Pentra DX 120,法国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药

观察不同给药剂量对小鼠造血系统影响,分为对照组,低剂量给药组(20 mg/kg)和高剂量给药组(40 mg/kg),每组 5 只。观察不同给药时间对小鼠造血系统影响,分为对照组,高剂量给药组(40 mg/kg),每组 10 只。白消安粉末由 DMSO 配置为 80 mg/mL 作为母液贮存,使用时用 PBS 稀释为所需浓度。腹腔注射,高剂量给药组分两天给药,每天给予 20 mg/kg。对照组小鼠给予等体积含 5% DMSO 的 PBS 作为对照。

1.3.2 造血干细胞和造血祖细胞比例测定

分离的骨髓细胞,调整细胞浓度到 1×10^7 /mL,每只小鼠取 100 μ L 细胞用于后续染色。按体积比 1:50 加入 biotin 标记的混合一抗抗体 CD4、CD8、B220、Ter119、Gr1、CD11b, 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min, PBS 洗涤一次,离心条件为 1400 r/min 5 min。离心后弃去上清,保持 100 μ L 体积,加入混合抗体 streptavidin(percp 标记),scal-1(PE 标记),ckit(APC 标记),CD34(FITC 标记)。4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h。之后 PBS 洗涤两次,离心条件如上。BD 流式细胞仪检测造血祖细胞(Lin-c-kit⁺ Scal⁻ or LKS-cells),造血干细胞(Lin-c-kit⁺ Scal⁺ or LKS⁺ cells),长期造血干细胞(CD34⁻ Lin-c-kit⁺ Scal⁺) 在骨髓中所占的比例。

1.3.3 骨髓细胞计数

小鼠分组和给药方式如上述,白消安给药后 15 d 小鼠二氧化碳安乐死,75% 酒精浸泡消毒,之后在无菌的条件下取小鼠单侧股骨,用含 2% FBS 的 PBS 缓冲液冲洗骨髓,将单侧股骨冲洗至 2 mL EP 管中,保持体积为 1 mL,每只小鼠取 10 μ L 用于骨髓细胞计数。

1.3.4 粒细胞集落形成能力测定(colony forming unit-granulocyte and macrophage, CFU-GM)

CFU-GM 实验参考前期发表文献^[7], CFU-GM 实验通过检测粒细胞巨噬系细胞的集落形成能力,用来检测造血祖细胞分化为粒细胞巨噬细胞的能力。无菌取小鼠骨髓细胞,用 PBS 将小鼠骨髓浓度调整至 4×10^5 /mL,每个样加 0.2 mL 细胞至事先分装好的 2 mL M3534 培养基中,振荡器充分混匀,静

置 2~5 min,待气泡消失。加入 24 孔板,每孔 0.5 mL。轻摇培养板,使培养基均匀分布。将培养板放入湿盒,置入 37℃,5% CO₂ 培养箱中。培养第 7 天在倒置显微镜下观察。低倍观察集落形成情况,细胞数 ≥50 为阳性集落。

1.3.5 外周血计数

小鼠的分组和给药方式如上,给药 15 d 后小鼠二氧化碳安乐死,摘眼球取血,用抗凝管收集外周血。自动血细胞计数仪测定外周血中白细胞数(WBC)、红细胞数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)和血小板(PLT)等指标。

1.3.6 单细胞集落能力检测

本方法依据前期发表文章^[8-9],分离的骨髓细胞,调整细胞浓度到 $1 \times 10^7/\text{mL}$,每只小鼠取 100 μL 细胞用于后续染色。按体积比 1:50 加入 biotin 标记的混合一抗抗体 CD4、CD8、B220、Ter119、Gr1、cd11b,4℃ 条件下孵育 30 min,PBS 洗涤一次,离心条件为 1400 r/min,4℃,5 min。离心后弃去上清,保持 100 μL 体积,加入混合抗体 Streptavidin(percp 标记),scal-1(PE 标记),ckit(APC 标记),CD34(FITC 标记)。4℃ 条件下孵育 1 h。之后 PBS 洗涤两次,离心条件如上。流式细胞仪分选长期造血干

细胞(CD34⁻Lin-c-kit⁺Scal⁺)到提前加了 100 μL 甲基纤维素培养基的 96 孔板中。每个孔两个细胞,待接种分选造血干细胞,37℃,5% CO₂ 培养箱培养 15 d,低倍观察集落形成情况,细胞数 ≥50 为阳性集落,结果计算每组阳性孔比例。

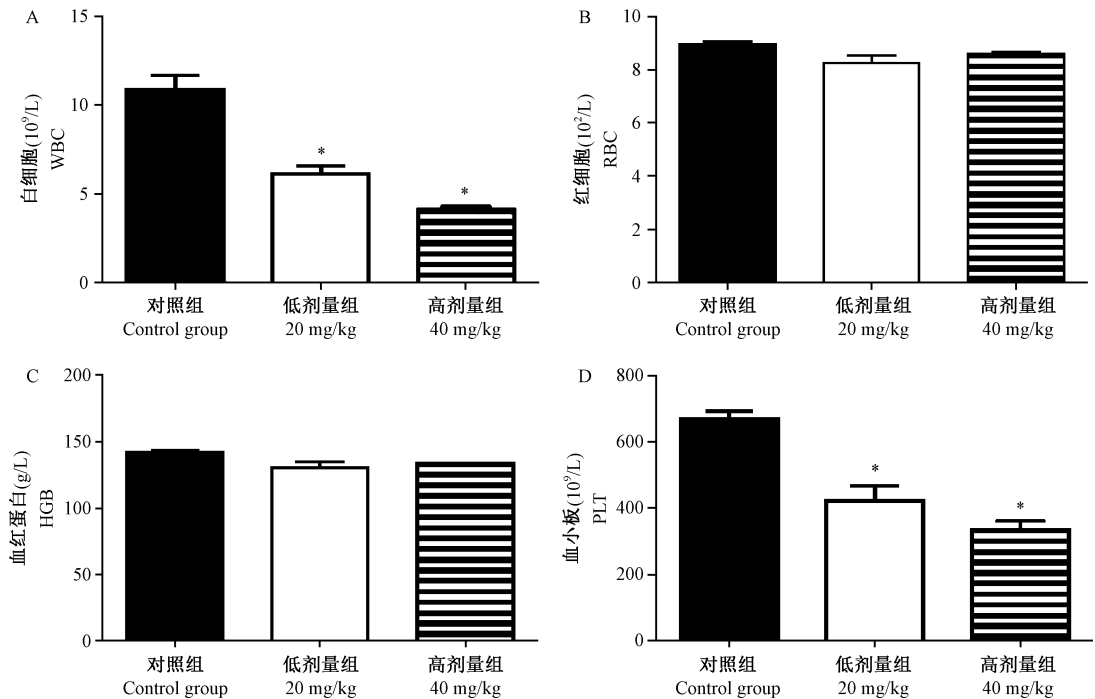
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。计量数据以平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *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 白消安降低小鼠外周血计数

给药后 15 d,检测小鼠的外周血计数。实验结果如图 1 所示,给予白消安的小鼠外周血中 WBC,PLT 的数目与对照组小鼠相比显著降低($P < 0.05$),40 mg/kg 白消安给药组比 20 mg/kg 白消安给药组小鼠 WBC 和 PLT 数目降低更多。外周血中的红细胞和血红蛋白数目各组间差异无显著性。实验结果表明,高剂量白消安和低剂量白消安均引



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 白消安对 C57 小鼠外周血计数的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Fig. 1 Busulfan decreased the number of peripheral blood

起 C57 小鼠外周血中白细胞和血小板数目降低, 损伤造血系统功能。高剂量组损伤程度更严重。

2.2 白消安对小鼠骨髓计数和体重的影响

结果显示, 与对照组相比, 白消安给药组小鼠的体重差异无显著性。小鼠体态正常, 未发现弓背和萎靡的症状。小鼠骨髓细胞计数结果显示, 给药后 15 d, 给药组小鼠的骨髓有核细胞计数与对照组相比, 未见明显变化 ($P > 0.05$)。结果表明白消安对骨髓有核细胞数目无明显影响。(见图 2)

2.3 白消安降低 C57 小鼠造血干细胞比例

为探究白消安对 C57 小鼠造血系统损伤作用,

小鼠给药后 15 d, 用流式细胞仪检测小鼠的骨髓细胞, 流式细胞仪分析时门的设置如图 3 所示。我们检测了造血祖细胞 (lineage-scal-1⁻ckit⁺, HPC), 造血干细胞细胞 (lineage-scal-1⁺ckit⁺, HSC), 长期造血干细胞 (lineage-scal-1⁺ckit⁺CD34⁺, LT-HSC) 的比例和数目。实验结果如图 3 所示, 给予低剂量白消安小鼠 HPC, HSC, LT-HSC 的比例与对照组小鼠相比分别下降 20.84% (1.084 ± 0.182 vs 0.858 ± 0.122), 47.05% (0.340 ± 0.054 vs 0.180 ± 0.044) 和 49.80% (0.038 ± 0.009 vs 0.019 ± 0.008); 给予高剂量白消安小鼠 HPC、LSK、HSC 的

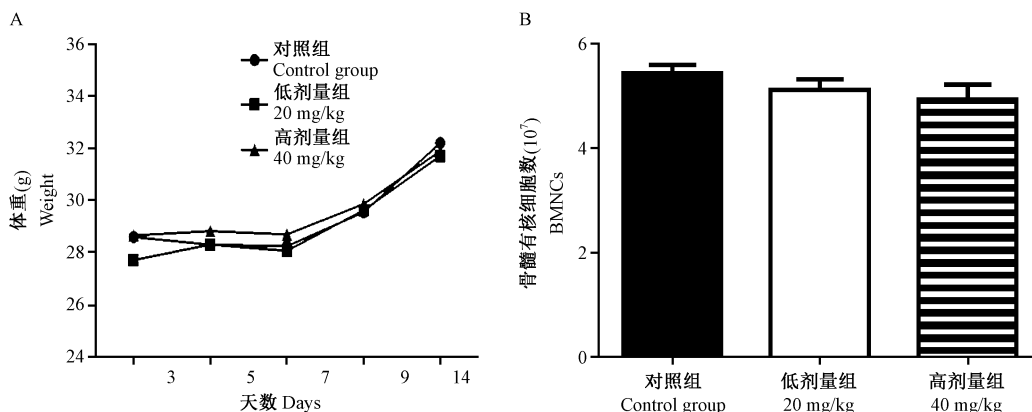
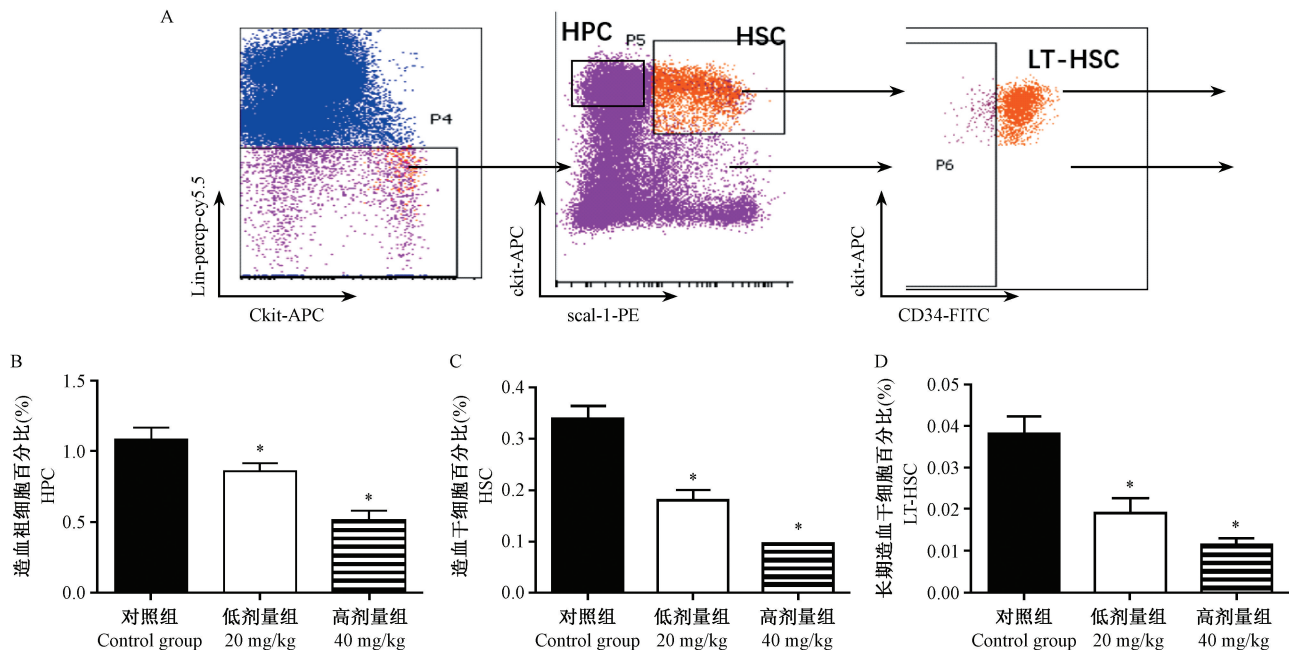


图 2 白消安对 C57 小鼠外周血和骨髓细胞计数的影响

Fig. 2 Effect of busulfan on the mouse body weight and bone marrow nucleated cells



注: (A) 流式细胞仪分析时门的设置; 与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

图 3 白消安对造血干细胞比例的影响

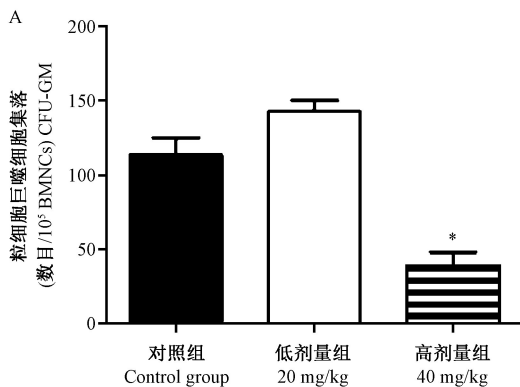
Note. (A) A representative gating strategy of HSC and LT-HSC was analyzed by flow cytometry. Compared with the control group, $*P < 0.05$.

Fig. 3 Busulfan decreased the percentage of bone marrow stem cells

数目与对照小鼠相比分别下降 51.84% (1.084 ± 0.181 vs 0.522 ± 0.132), 70.59% (0.340 ± 0.054 vs 0.100 ± 0.001) 和 69.38% (0.038 ± 0.009 vs 0.011 ± 0.002) ($P < 0.05$); 以上的实验结果表明, 白消安降低造血干细胞, 造血祖细胞比例和数目, 高剂量组与低剂量组相比损伤程度更加明显。

2.4 白消安损伤小鼠造血细胞功能

为了检测白消安对 C57 小鼠造血系统功能的影响, 分组和给药方式如上述, 白消安给药后 15 d,



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 白消安诱导 C57 小鼠造血干细胞和造血祖细胞增殖抑制

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Fig. 4 Busulfan induced the proliferation inhibition in HPC and HSC

单细胞集落形成能力实验结果显示, 给与低剂量白消安的小鼠单细胞集落形成能力与对照组相比降低 33.81% (0.62 ± 0.13 vs 0.41 ± 0.23 , $P > 0.05$); 而给与高剂量组白消安的小鼠单细胞集落形成能力与对照组相比降低 58.06% (0.62 ± 0.13 vs 0.26 ± 0.15 , $P < 0.05$), 表明 40 mg/kg 白消安可以明显降低造血干细胞功能, 高剂量组与对照组相比具有显著性差异。(见图 4B)

为了进一步确定白消安诱导造血干细胞损伤

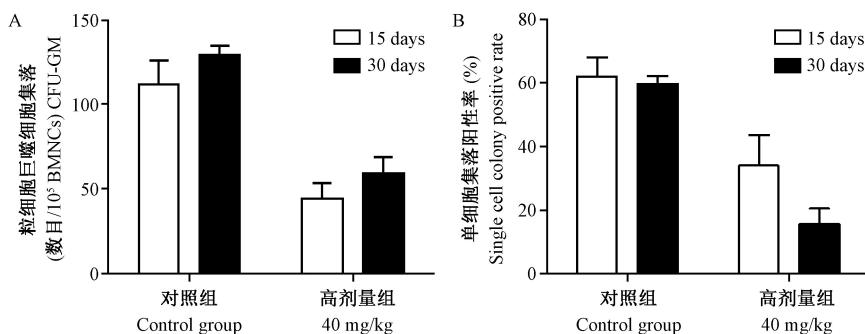
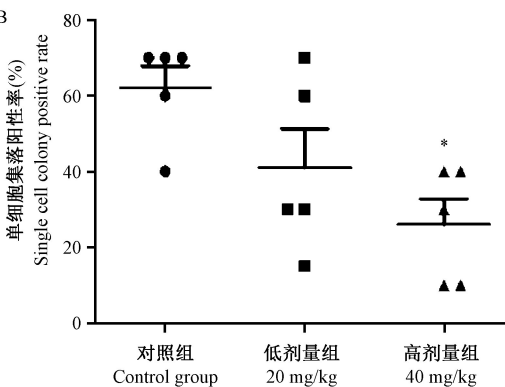


图 5 给药后不同时间检测白消安对 C57 小鼠造血干细胞和祖细胞集落形成能力的影响

Fig. 5 Effect of busulfan on the proliferation ability of HPC and HSC at different time points

检测粒细胞巨噬细胞集落形成能力 (CFU-GM)。实验结果显示, 小鼠接受低剂量白消安给药后, 骨髓细胞的 CFU-GM 集落形成数与对照组相比没有统计学差异 (113.3 ± 28.05 vs 142.5 ± 18.64 , $P > 0.05$)。而当小鼠接受高剂量白消安给药后, 骨髓细胞的 CFU-GM 集落形成数较对照组下降 65.42% (113.3 ± 28.05 vs 39.17 ± 8.89 , $P < 0.05$)。差异均有显著性。说明 40 mg/kg 白消安可以诱导造血祖细胞增殖抑制。(见图 4A)



模型, 我们检测了给药 15 d 和给药 30 d 后造血祖细胞和造血干细胞的功能。实验结果显示, 小鼠给予 40 mg/kg 白消安, 30 d 后外周血象和 HSC 和 HPC 的比例都有所恢复, CFU-GM 的降低百分比与 15 d 相比有所恢复 (60.71% vs 54.26%), 然而单细胞集落形成能力进一步降低 (45.16% vs 73.80%)。说明随着时间的延长, 白消安对骨髓造血干细胞的损伤进一步加剧。(见图 5)

3 讨论

实验结果显示,40 mg/kg 白消安可以降低外周血中白细胞数目,降低造血干细胞,造血祖细胞和长期造血干细胞的比例和数目,进一步损伤造血干、祖细胞的功能,说明白消安可以诱导 C57 小鼠造血系统损伤,降低造血干细胞的功能,但是小鼠体重在给药周期内未出现明显变化,给药后 30 d 小鼠均存活,表明该给药方案可以用于诱导造血干细胞损伤模型。

小鼠给予 80 mg/kg 白消安,实验周期内小鼠出现弓背,体重减轻明显或死亡。本实验中利用两个剂量白消安给药,高剂量组(40 mg/kg)比低剂量组(20 mg/kg)造血系统损伤表型更加严重,表现为外周血细胞下降更加明显,造血干细胞和祖细胞比例和数目降低,以及造血干细胞和造血祖细胞功能的损伤加剧。低剂量组(20 mg/kg)白消安给药后,小鼠的 CFU-GM 和单细胞集落形成能力与对照组相比,未见显著性差异,因为白消安主要损伤的是造血干细胞功能^[10],当剂量较高时也会影响造血祖细胞功能,但是造血祖细胞恢复较快。而高剂量组(40 mg/kg)白消安可以明显地抑制造血祖细胞和造血干细胞增殖能力,因而 40 mg/kg 的给药剂量可以满足实验需求。为了确定最佳检测时间,实验对比了高剂量组白消安给药 15 d 和 30 d 对小鼠造血损伤表型的影响。实验结果显示,给药 30 d 后外周血象、HSC 和 HPC 的比例都有所恢复(结果未给出),造血祖细胞增殖抑制有所缓解,但是造血干细胞功能进一步损伤,说明造血干细胞损伤持续存在,应用白消安有进一步诱发造血干细胞耗竭的风险。本实验采用的给药方案,试验周期内小鼠未死亡,状态良好,小鼠体重与对照组小鼠相比差异无显著性,说明 40 mg/kg 的给药剂量和 15 d 的实验周期可以成功诱导小鼠造血干细胞损伤模型的建立。

本实验利用单细胞集落形成能力体外检测 HSC 功能,对比以往体外检测造血干细胞功能的“鹅卵石样集落形成细胞(cobblestone area-forming cell, CAFC)”实验^[11],简便易行,时间更短。与体内移植实验有很好的相关性,可以有效地评价造血干细胞功能^[8-9]。但是造血干细胞移植仍然是评价造血干细胞功能的黄金标准,本实验中采用体外单细胞集落形成实验,对评价造血干细胞功能起到很好

的补充作用。在给药剂量和周期内,小鼠造血干细胞和祖细胞的比例明显降低,干细胞和祖细胞的功能受到了明显的抑制,但是对小鼠的体重和状态没有明显的改变,为后期的治疗干预提供便捷,可以有效地评价造血系统损伤,为造血干细胞损伤机制的探讨和损伤防护的研究提供模型和基础。

造血干细胞损伤是长期骨髓抑制的主要诱因^[13],而造血干细胞衰老是造血干细胞损伤的一个重要机制^[3, 14],针对于造血干细胞衰老的研究也有许多突破性的进展^[15]。Wang 等^[16]、Xu 等^[17]研究显示 4 Gy 或 6 Gy 全身照射,可以诱导造血干细胞衰老,电离辐射可以通过激活 p53-p21 (Cip1/Waf1) 通路诱导造血干细胞衰老,除此外,电离辐射还可以诱导造血干细胞的凋亡^[18]。而白消安则主要是通过诱导氧化自由基升高和促进 DNA 损伤从而引起造血干细胞早老性改变(premature),但是不引起 p53-p21 Cip1/Waf1) 通路的表达变化,并且对造血细胞的凋亡影响较小^[19-20]。因而,白消安诱导的造血干细胞损伤模型与电离辐射诱导的造血干细胞损伤模型机制上有所差异,互为补充。但是本研究并没有进一步检测 40 mg/kg 白消安给药后 15 d,造血干细胞衰老的相关指标,主要是因为模型建立时间为 15 d,主要是通过增加细胞氧化应激和 DNA 损伤从而诱导造血干细胞损伤,所以本模型是否可以应用与造血干细胞衰老研究有待于进一步验证。

参考文献:

- [1] Lu H, Zhu S, Qian L, et al. Activated expression of the chemokine Mig after chemotherapy contributes to chemotherapy-induced bone marrow suppression and lethal toxicity [J]. *Blood*, 2012, 119(21): 4868-4877.
- [2] Mauch P, Constine L, Greenberger J, et al. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, 31(5): 1319-1339.
- [3] Wang Y, Schulte BA, Zhou D. Hematopoietic stem cell senescence and long-term bone marrow injury[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(1): 35-38.
- [4] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation[J]. *Antioxid Redox Signal* [J]. 2014, 20(9): 1447-1462.
- [5] Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, et al. Therapeutic drug monitoring-guided dosing of busulfan differs from weight-based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients [J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2017, 10(2): 70-78.

- [6] Peake K, Manning J, Lewis CA, et al. Busulfan as a myelosuppressive agent for generating stable high-level bone marrow chimerism in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, (98): e52553.
- [7] Li C, Lu L, Zhang J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 65.
- [8] Chen Z, Yi W, Morita Y, et al. Wip1 deficiency impairs haematopoietic stem cell function via p53 and mTORC1 pathways [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6808.
- [9] Chen Y, Ma X, Zhang M, et al. Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress responses in mice [J]. *Blood*, 2014, 123(6): 851–862.
- [10] Down JD, White-Scharf ME. White-Scharf. Reprogramming immune responses; enabling cellular therapies and regenerative medicine [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 21–32.
- [11] Chang J, Luo Y, Wang Y, et al. Low doses of oxygen ion irradiation cause acute damage to hematopoietic cells in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158097.
- [12] 杨斌, 周玥, 王亚平. 造血干细胞衰老模型的建立及其评价 [J]. *解剖科学进展*, 2009, 15(3): 315–317.
- [13] Shao L, Wang Y, Chang J, et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury [J]. *Transl Cancer Res*, 2013, 2(5): 397–411.
- [14] Li C, Lu L, Zhang J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 65.
- [15] Chang J, Wang Y, Shao L, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice [J]. *Nat Med*, 2016, 22(1): 78–83.
- [16] Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence [J]. *Blood*, 2006, 107(1): 358–366.
- [17] Xu G, Wu H, Zhang J, et al. Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 15–25.
- [18] Meng A, Wang Y, Brown SA, et al. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(12): 1348–1356.
- [19] Probin V, Wang Y, Zhou D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(12): 1858–1865.
- [20] Meng A, Wang Y, Van Zant G, et al. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5414–5419.

[收稿日期]2017-09-08

(上接第 11 页)

参考文献:

- [1] 武汀, 张硕峰, 董世芬, 等. 血栓通胶囊抗急性心肌缺血和抗血栓形成的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(12): 10–14.
- [2] Hervé JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, et al. Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZO) on membrane channels [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(2): 595–604.
- [3] Tornavaca O, Chia M, Dufton N, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation [J]. *J Cell Biol*, 2015, 208(6): 821–838.
- [4] Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(45): 29745–29753.
- [5] Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1 [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1835–1837.
- [6] Shimotake J, Derugin N, Wendland M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke [J]. *Stroke*, 2010, 41(2): 343–349.
- [7] Morozumi J, Mishima S, Ohta S, et al. The role of edaravone on the impairment of endothelial barrier function induced by acute oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cell monolayer [J]. *J Trauma*, 2005, 59(3): 570–574.
- [8] 杨丽鹃, 玛娜璐璐, 朱海燕, 等. 三七总皂苷对 β -淀粉样蛋白 42 损伤脑微血管内皮细胞 ZO-1 表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(8): 57–59.
- [9] Chen W, Guo Y, Yang W, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 on integrity of blood-brain barrier following cerebral ischemia [J]. *Exp Brain Res*, 2015, 233(10): 2823–2831.

[收稿日期]2017-08-01