

网络出版时间: 2020-12-9 15:07 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201208.0843.015.html>

人红白血病斑马鱼异种模型的建立

王一慧^{1,2}, 刘庆³, 杨小燕^{1,2}, 王念雪^{1,4}, 王猛¹, 舒莉萍^{1,4}, 何志旭^{1,5}, 吴西军^{1,4}

摘要 目的 利用斑马鱼胚胎建立人红白血病(HEL)细胞异种移植瘤模型,提供研究血液肿瘤的体内行为和实用药物测试的模型。方法 将HEL细胞分为空白组和CM-DiI组,CM-DiI组用活细胞示踪剂进行标记;取野生型斑马鱼培育繁殖,产卵后将胚胎置于28℃孵育48h至破膜,将破膜后斑马鱼分为空白对照组、PBS实验组、HEL实验组,将CM-DiI组细胞通过显微注射方式移植到HEL实验组斑马鱼卵黄囊中,PBS实验组注射PBS,再将三组斑马鱼置于34℃温箱培养,通过体内外增殖实验及体内荧光观察等鉴定模型是否建立成功;将鉴定成功的斑马鱼进行阿糖胞苷药物暴露,分为50、100、200 nmol/L组及模型对照组,观察各组浓度药物暴露后异种移植瘤模型中白血病细胞的增殖及迁移情况。结果 CM-DiI组与空白组HEL细胞增殖状态相近,差异无统计学意义($P>0.05$);通过体内外增殖实验证实了HEL细胞在斑马鱼体内出现了增殖,而HEL实验组斑马鱼存活量相对于空白对照组和PBS实验组降低($P<0.05$);三个浓度的阿糖胞苷药物暴露组相对于模型对照组细胞增殖降低($P<0.05$)。结论 人急性红白血病HEL细胞移植入斑马鱼胚胎后可进行增殖,且增殖活动可被阿糖胞苷干预,证实异种移植瘤模型建立成功。

关键词 斑马鱼;急性红白血病;异种移植;人红白血病细胞;阿糖胞苷

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0077-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.015

2020-09-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760025); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(编号: 黔教合KY字(2018)192号); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费2018年项目(编号: 2018PT31048)

作者单位: 贵州医科大学¹ 组织工程与干细胞实验中心(中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室)、² 儿科学教研室、⁴ 免疫学教研室, 贵阳 550004

³ 贵州医科大学附属医院呼吸与危重症医学科, 贵阳 550004

⁵ 遵义医科大学附属医院儿科学教研室, 遵义 563003

作者简介: 王一慧,女,硕士研究生;

何志旭,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: hzx@gmc.edu.cn;

吴西军,男,硕士,讲师,责任作者, E-mail: 498682999@qq.com

急性红白血病(acute erythroid leukemia, AEL)属于急性髓性白血病的M6型,其特征为发育异常的红细胞数量增多与增多的原始粒细胞共存^[1-2],导致造血功能降低、血小板减少、贫血和出血^[3]。目前临床没有针对AEL的特异性治疗药物,亟需研发新型药物对AEL进行有效治疗。

药物的研发离不开理想的动物模型。斑马鱼因易于繁殖、胚胎透明^[4]、免疫系统成熟较晚等特点,在异种移植方面拥有天然优势。2011年,Privot et al^[5] 研究组构建斑马鱼K562模型用于药物研发,目前斑马鱼异种移植模型的研究领域已从最初的白血病领域覆盖至黑色素瘤、神经胶质细胞瘤等多个领域^[6]。但既往研究中关于建立AEL高通量药物筛选模型的研究依然欠缺。该研究旨在以人红白血病(human erythroleukemia, HEL)细胞建立斑马鱼白血病模型,同时使用阿糖胞苷药物暴露进行干预为之后的新型药物筛选及临床化疗方案比选提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 本实验中选取野生型Tubingen品系斑马鱼作为实验用鱼,由贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心实验室繁殖。人红白血病HEL细胞由本实验室传代冻存,复苏后传代备用。活细胞示踪剂CM-DiI购自美国Thermo Fisher Scientific公司; RPIM 1640培养基与新鲜牛血清购自美国Gibco公司; 3-乙氧酰基苯胺甲磺酸盐购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 2-苯硫脲、甲基纤维素购自美国Sigma公司; 阿糖胞苷购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 实验仪器 生化培养箱(常州市科迈公司); 体视显微镜(日本Nikon公司); 活细胞工作站(日本Olympus公司); HC-3018R高速冷冻离心机(安徽中佳科技有限公司); 显微注射仪(美国Harvard公司); 拉针仪(日本Narishige公司); 斑马鱼养殖系统(北京爱生公司)。

1.3 方法

1.3.1 斑马鱼的饲养及胚胎获取 选用性成熟的野生型 Tubingen 品系斑马鱼进行繁殖,于次日收集受精卵,收集后培养于斑马鱼胚胎培养用水中,受精后 12 h (12 hours post-fertilization, 12 hpf) 加入含有 0.003% 的 2-苯硫脲的胚胎培养液并置于 28 °C 生化培养箱中培养,实验过程中遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.3.2 细胞培养 复苏冻存的 HEL 细胞,在 RPMI 1640 加入 10% 的胎牛血清及 1% 的双抗,将细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中培养,选择对数生长期细胞用于实验。

1.3.3 活细胞示踪剂 CM-DiI 标记 HEL 细胞 将处于对数生长期的 HEL 细胞平均分为空白组和 CM-DiI 组,CM-DiI 组细胞进行 CM-DiI 染色,先用复温的 PBS 清洗细胞 3 遍,弃上清液,再加入 1 ml PBS 混匀,加入 20 μl CM-DiI,放入 37 °C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱 5 min,再放入 4 °C 15 min,取出后加入磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗细胞 3 遍,吸取少量细胞在荧光显微镜下检查染色是否成功,通过细胞计数检测 CM-DiI 对 HEL 细胞增殖抑制曲线,连续计数 5 d,每组重复 3 次。

1.3.4 HEL 细胞显微移植 收集 48 hpf 的 Tubingen 系野生型斑马鱼胚胎,分为空白对照组、PBS 实验组和 HEL 实验组,3 组孵育温度、光照、数量等均一致。在注射前,使用 HARVARD(C-13410) 注射仪记录从注射针内打出的液滴直径,计数包括注射前及注射后的 50 个液滴内的细胞数,计算其平均值作为实验注射的细胞数量;在注射时,PBS 注射组和 HEL 细胞注射组斑马鱼用 0.05% 的 3-乙氧基苯胺甲磺酸盐麻醉,然后将其置于琼脂糖针板上,使用拨针将斑马鱼摆放为腹部面向针头体位,将经 CM-DiI 标记好的 HEL 细胞注入卵黄囊中,经计算,每条斑马鱼约注射 50 个细胞左右;PBS 组斑马鱼胚胎仅注射 PBS,且除注射样品外实验条件各组均一致。注射完成后先在 28 °C 温箱中恢复 1 h,再将各组斑马鱼放在含有 0.003% 的 2-苯硫脲的胚胎培养液中 34 °C 孵育。通过体视显微镜和荧光显微镜对移植后斑马鱼体内的细胞的增殖扩散进行观察。

1.3.5 HEL 细胞在斑马鱼体内外增殖检测

1.3.5.1 体内增殖与迁移情况检测 随机选取移植后的斑马鱼,利用荧光显微镜观察带红色荧光的 HEL 细胞在斑马鱼体内荧光分布情况。

1.3.5.2 体外增殖检测 在注射 HEL 细胞后的第 1 天(1 days post-injection, 1 dpi)、第 3 天(3 dpi)、第

5 天(5 dpi) 从培养皿中随机选择 PBS 注射组、HEL 细胞注射组和空白对照组各 6 条,将其置于 96 孔微量培养板中匀浆化,每组 1 条,做好标记,每孔滴加 25 μl 胶原酶(2 U/ml) 和 25 μl 中性蛋白酶(60 U/ml),均用基础培养液配制,37 °C 孵育 2 h,然后用 20 μl 枪头将整条消化后的斑马鱼吹打成单个细胞,再将 50 μl 液体用 60 目细胞筛进行过滤,最后吸取 10% 过滤后的细胞悬液滴于血球计数板上,在荧光显微镜下对带红色荧光的细胞进行计数并记录,比较实验组第 1、3、5 天的荧光细胞数,同时利用活细胞工作站拍照,在斑马鱼体外明确 HEL 细胞是否发生增殖。

1.3.6 斑马鱼红白血病模型的生存情况检测 观察 HEL 植入后斑马鱼的生长情况及存活状况等。

1.3.7 人红白血病移植模型阿糖胞苷药物暴露 荧光显微镜下选取荧光强度大致相同的 HEL 实验组斑马鱼,将其随机平分到 6 孔板中,分为阿糖胞苷 50 nmol/L 组、阿糖胞苷 100 nmol/L 组、阿糖胞苷 200 nmol/L 组、模型对照组。吸干液体,在对应分组中再加入配制完成的 50、100、200 nmol/L 的阿糖胞苷溶液 6 ml,模型对照组加 6 ml 含 0.003% 的 2-苯硫脲的胚胎培养液,将 6 孔板置于铝盒中 34 °C 温箱中培养。并通过活细胞工作站观察药物暴露第 0、1、3、5 天四个组中斑马鱼体内的 HEL 细胞增殖情况,同时在药物暴露的第 0、1、3、5 天每组各取 1 尾制作单细胞悬液,在荧光显微镜下计数荧光细胞数量,每组重复 3 次。

1.4 统计学处理 该实验中的所有实验均使用 GraphPad Prism 8.0 进行 3 次重复分析和数据分析。测试数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活细胞示踪剂 CM-DiI 标记 HEL 细胞 通过 CM-DiI 标记 HEL 细胞,统计分析显示,CM-DiI 组与空白组之间的细胞生长差异无统计学意义(*t* = 1.642, *P* > 0.05) (图 1A);而活细胞工作站观察显示红色荧光细胞的数量随着细胞数量的增加而增加,并且荧光强度在 7 d 内几乎无变化(图 1B)。结果提示 CM-DiI 可用于活细胞标记且对细胞增殖无明显影响。

2.2 植入的 HEL 细胞在斑马鱼体内增殖及迁移 在活细胞工作站观察时,注射 HEL 细胞的斑马鱼卵黄囊内有红色的荧光细胞簇,但在其他两组未出

现。1~5 d 后,在 HEL 细胞组中出现了斑马鱼卵黄囊中发出红色荧光的细胞,随着时间的增加逐渐扩散充满腹腔并部分到达尾部(图 2)。

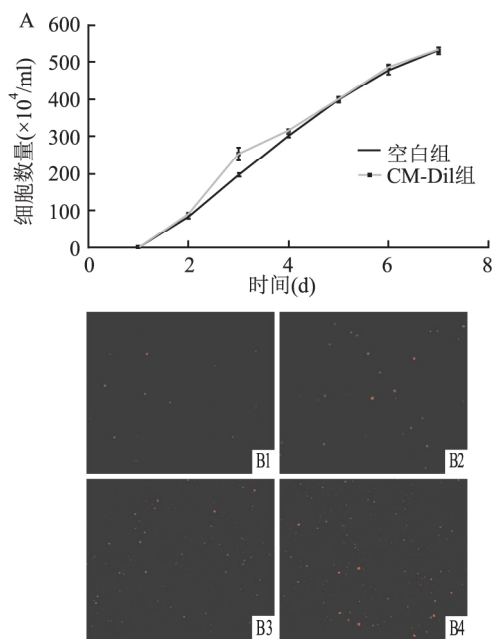


图1 CM-Dil 标记 HEL 细胞后增殖情况

A: HEL 细胞增殖曲线图; B: 经 CM-Dil 标记 HEL 细胞荧光图;

B1 ~ B4: CM-Dil 标记后第 1、3、5、7 天

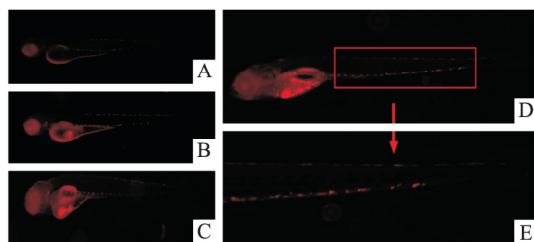


图2 HEL 细胞在斑马鱼体内增殖及迁移情况

红色荧光代表 HEL 细胞团; A: 空白对照组; B: HEL 1 dpi; C:

HEL 3 dpi; D: HEL 5 dpi; E: 5 dpi 尾部迁移放大图

2.3 体外定量计数移植组斑马鱼体内 HEL 细胞的增殖 在斑马鱼体内对移植的 HEL 细胞的增殖情况进行分析,并对其进行量化检测。结果表明,注射后的第 1 天,斑马鱼荧光细胞的数量为(200 ± 8) 个/条,第 5 天为(420 ± 5) 个/条,细胞数目增加约为 1.1 倍(图 3A)。在荧光显微镜下对单细胞悬液进行观察并计数,可见红色荧光细胞数目增多(图 3B)。

2.4 HEL 细胞植入后斑马鱼的行为状态 空白对照组、PBS 注射实验组、HEL 注射实验组每组取 290 条进行实验。在斑马鱼接种 HEL 细胞后,实验组斑马鱼出现游动减少现象。另外分别在 1 dpi 和 5 dpi

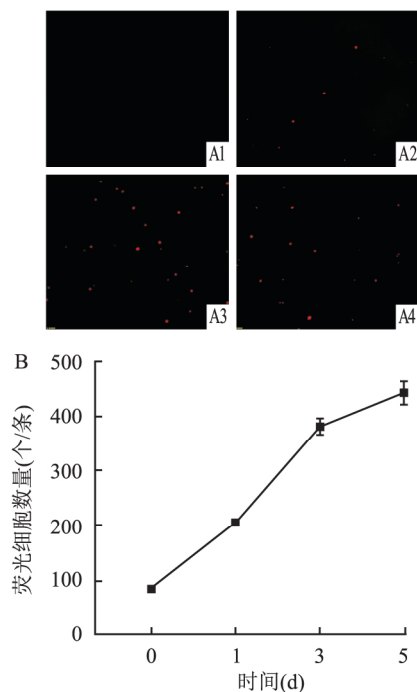


图3 HEL 细胞体外增殖检测

A: 斑马鱼单细胞悬液中 HEL 细胞荧光分布图; 1: 空白对照组; 2~4: HEL 注射后第 1、3、5 天; B: HEL 注射组斑马鱼单细胞悬液中荧光细胞增殖曲线图

观察并分析了上述 3 组中存活的斑马鱼。在 1 dpi 时,HEL 注射实验组有(249 ± 5) 条存活,PBS 注射实验组和空白对照组有(269 ± 4) 条存活,前者与后两组之间差异无统计学意义($t = 3.584$, $t = 4.022$, $P > 0.05$)。在 5 dpi 时,HEL 注射实验组的斑马鱼数量(67 ± 3 条),明显少于空白对照组(237 ± 5) 条和 PBS 注射实验组(230 ± 5) 条,差异有统计学意义($t = 14.72$, $t = 18.5$, $P < 0.05$)。空白对照组和 PBS 注射实验组在 5 d 后斑马鱼的存活率之间差异无统计学意义($t = 2.333$, $P > 0.05$)。结果表明 PBS 及注射引起的机械操作对斑马鱼的存活率没有显著影响。斑马鱼用 HEL 细胞接种 7 d 后全部死亡(图 4)。

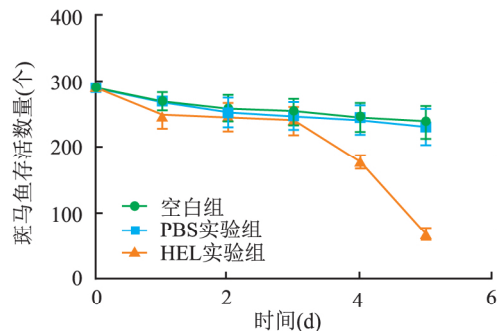


图4 HEL 细胞注射后斑马鱼生存情况

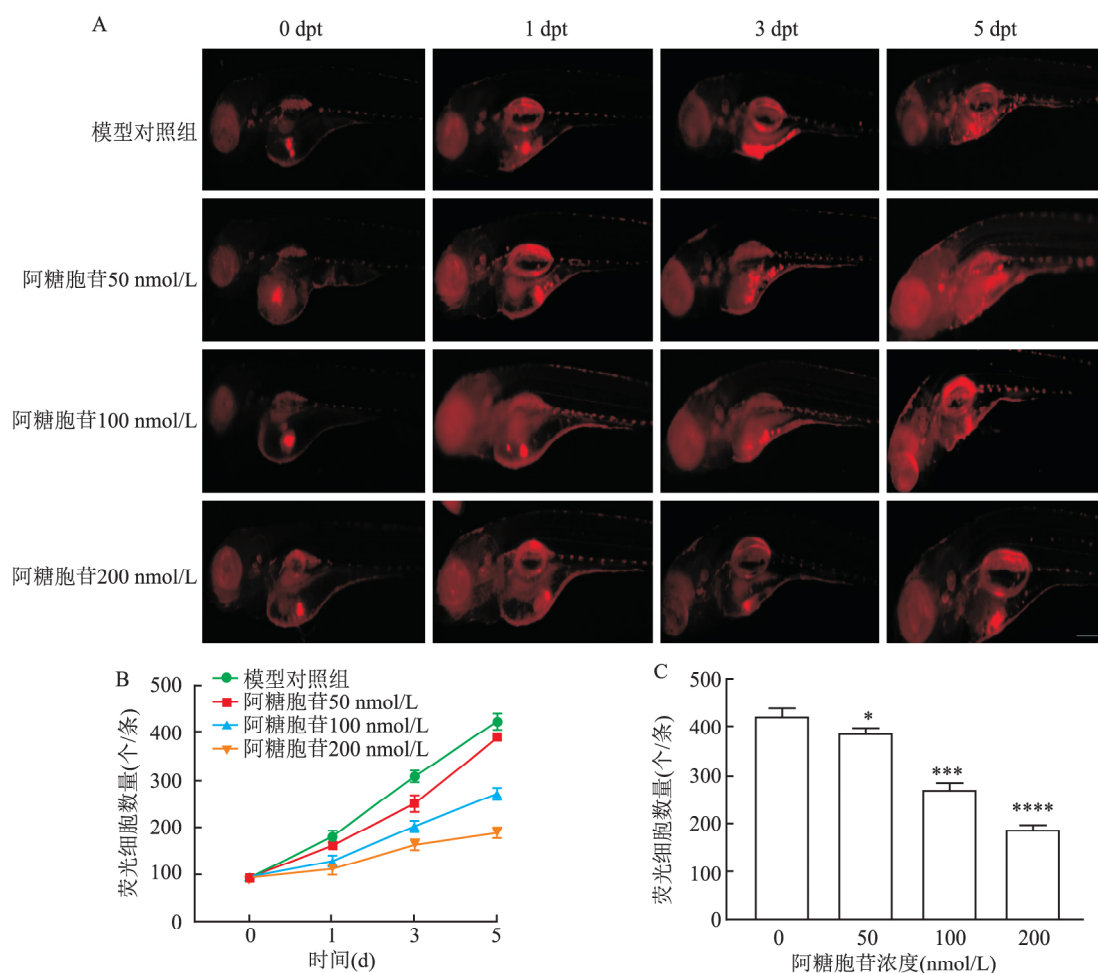


图5 阿糖胞苷药物暴露后斑马鱼体内 HEL 细胞增殖及迁移情况

A: 阿糖胞苷药物暴露后 HEL 细胞在斑马鱼体内荧光分布图; B: 不同浓度阿糖胞苷药物干预下的斑马鱼体内 HEL 细胞增殖曲线图; C: 不同浓度阿糖胞苷干预后第 5 天斑马鱼体内 HEL 细胞增殖柱状图; 与模型对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.5 人红白血病异种移植模型阿糖胞苷药物暴露

使用荧光显微镜观察时,药物干预后第 1 天(1 days post-treatment, 1 dpt),模型对照组斑马鱼卵黄囊内的红色荧光细胞簇与药物暴露斑马鱼(50 nmol/L)相比,差异无统计学意义($t = 3.159$, $P > 0.05$),与药物暴露斑马鱼(100、200 nmol/L)相比,差异有统计学意义($t = 8.533$, $t = 7.233$, $P < 0.05$);药物干预后第 5 天发现药物暴露的斑马鱼(50、100、200 nmol/L)体内的红色荧光细胞簇荧光强度相对于模型对照组减弱,差异有统计学意义($t = 6.635$, $t = 24.111$, $t = 34.671$, $P < 0.05$),这表明 HEL 细胞增殖被抑制(图 5A)。单细胞悬液计数显示随着阿糖胞苷浓度增加,荧光细胞数量降低(图 5B、5C)。

3 讨论

AEL 又称 AML-M6 变异型。临床上, AEL 患者通常与其他类型的 AML 患者接受相似的治疗,其中

阿糖胞苷是最有效的药物^[7],阿糖胞苷作为一种重要的抗白血病药物,在体内能干扰 DNA 的合成,从而抑制白血病细胞的增殖,实现抗肿瘤的药理作用^[8]。但目前仍无针对这种疾病的特定靶向治疗药物。寻找合适且有效的 AEL 治疗药物成为当务之急。然而,如何在模式生物体内进行新型药物的快速安全且有效的验证成为需要解决的问题,美国科研团队曾将人类肿瘤细胞移植到斑马鱼和小鼠中,使它们成为癌症患者的替身,并借助其研究癌症治疗的用药和术后反弹等问题,实验结果表明使用小鼠作为模型自实验开始到分析结果需要 2~6 个月,相比于用斑马鱼耗时更久,花费更高。

斑马鱼作为新兴的异种移植模型,确定具有人类癌症主要参与者的许多癌基因和肿瘤抑制基因的同源物^[9-10],并且斑马鱼造血系统相关转录因子与人类高度保守^[11]。2017 年,研究者通过将 KG-1 细胞植入斑马鱼体内构建髓系白血病模型,并通过体

内外检测得出植入的白血病细胞可在斑马鱼体内存活、增殖及扩散^[12]。参照此研究,本实验将经活细胞示踪剂 CM-DiI 标记的人急性红白血病 HEL 细胞通过显微注射技术植入斑马鱼体内,从而构建斑马鱼白血病模型,其中涉及的各个参数,包括注射时期、注射部位、注射细胞数量及注射完毕后放置温度等均通过参与文献及实际操作得到了最优化^[13]。结果得出移植入斑马鱼体内的 HEL 细胞可发生增殖及迁移,但是随着细胞增殖越多,斑马鱼的死亡、畸形增多,而对照组斑马鱼并未致死。进一步使用阿糖胞苷对 HEL 移植组斑马鱼进行了药物暴露,证实阿糖胞苷对 HEL 细胞增殖出现抑制作用。这说明该实验成功建立了斑马鱼白血病模型,亦为以后使用此模型进行新型药物的高通量筛选提供了实验依据。同时该模型也可用于临床个体化治疗方案比选^[14]。将患者来源白血病细胞移植到斑马鱼体胚胎内建立人源肿瘤异种移植模型,能更好地保持患者临床肿瘤的异质性^[15],进行多个化疗方案疗效评价,进而选取抑制肿瘤细胞最好的化疗方案。因此,该模型具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, et al. Genomic subtyping and therapeutic targeting of acute erythroleukemia[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(4): 694–704.
- [2] Klein K, de Haas V, Kaspers G J L. Clinical challenges in de novo pediatric acute myeloid leukemia[J]. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018, 18(3): 277–93.
- [3] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med* 2016, 374(23): 2209–21.
- [4] Brown H K, Schiavone K, Tazzyman S, et al. Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov* 2017, 12(4): 379–89.
- [5] Pruvot B, Jacquelin A, Droin N, et al. Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy[J]. *Haematologica* 2011, 96(4): 612–6.
- [6] Chen L, Groenewoud A, Tulotta C, et al. A zebrafish xenograft model for studying human cancer stem cells in distant metastasis and therapy response[J]. *Methods Cell Biol* 2017, 138: 471–96.
- [7] Zuo Z, Polski J M, Kasyan A, et al. Acute erythroid leukemia[J]. *Arch Pathol Lab Med* 2010, 134(9): 1261–70.
- [8] Pereira R B, Evdokimov N M, Lefranc F, et al. Marine-derived anticancer agents: clinical benefits, innovative mechanisms, and new targets[J]. *Mar Drugs* 2019, 17(6): 329.
- [9] Bianchi E, Bulgarelli J, Ruberti S, et al. MYB controls erythroid versus megakaryocyte lineage fate decision through the miR-486–3p-mediated downregulation of MAF[J]. *Cell Death Differ* 2015, 22(12): 1906–21.
- [10] Zheng C, Shan L, Tong P, et al. Cardiotoxicity and cardioprotection by artesunate in larval zebrafish[J]. *Dose Response* 2020, 18(1): 1559325819897180.
- [11] Shu L P, Zhou Z W, Zhou T, et al. Ectopic expression of Hoxb4a in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015, 42(12): 1275–86.
- [12] 叶永斌, 张明宛, 邱大发, 等. 斑马鱼异种异体急性髓系白血病模型的建立[J]. *中国实验血液学杂志* 2017, 25(1): 35–41.
- [13] Vittori M, Motaln H, Turnsek T L. The study of glioma by xenotransplantation in zebrafish early life stages[J]. *J Histochem Cytochem* 2015, 63(10): 749–61.
- [14] Raby L, Volkel P, Le Bourhis X, et al. Cancer cell transplantation in zebrafish: From translational research to personalized medicine[J]. *Bull Cancer* 2019, 107(1): 30–40.
- [15] 博庆丽, 阮亮, 胡安拉, 等. 人源性肝癌异种移植动物模型的建立及 CD90、ALDH1 表达鉴定[J]. *安徽医科大学学报*, 2015(11): 1698–701.

Establishment of a zebrafish xenogeneic model of human erythroleukemia

Wang Yihui^{1,2}, Liu Qing³, Yang Xiaoyan^{1,2}, et al

(¹Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Key Laboratory of Adult Stem Cell Transformation Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004;

²Dept of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ³Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective A human erythroleukemia(HEL) cell xenograft model was established using zebrafish embryos to provide a model for studying *in vivo* behavior and practical drug testing of hematological tumors. **Methods** Divide the HEL cells into a blank group and a CM-DiI group. The CM-DiI group was labeled with a live cell tracer. Wild-type zebrafish were cultivated and reproduced. After embryogenesis, the embryos were incubated at 28 °C for 48 h until the membrane was broken. The zebrafish were divided into blank control group, PBS experimental

网络出版时间: 2020-12-9 14:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201208.0843.016.html>

幼羊颅骨缺损修复中 LncRNA 的差异性表达及作用

刘 岩^{1,2,3} 邵 国^{1,2,3*} 张春阳^{1,2,3}

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) 基因在幼羊颅骨缺损修复的差异性表达及改善颅骨缺损的作用。方法 将 12 只 1 月龄的小尾寒羊分成 2 组: 原生骨组织组、新生骨组织组, 每组 6 只。通过高通量测序检测两组骨组织内 LncRNA 的表达变化, 通过 Real-time PCR 验证测序 LncRNA 表达量的变化。ELISA 法检测血清中碱性磷酸酶 (ALP) 和钙调蛋白 (OCN); Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 的蛋白表达水平。结果 与原生骨组织组相比, 新生骨组织中 LncRNA ODSM、LncRNA UCA1 表达上调, LncRNA H19、LncRNA MEG3 的表达下调; 新生骨组织组幼羊血清中 ALP、OCN 的含量升高; 新生骨内的 Wnt/ β 蛋白的表达升高。结论 LncRNA ODSM、UCA1 可能调控 Wnt/ β 信号通路参与缺损部位颅骨组织的修复。

关键词 长链非编码 RNA; 颅骨缺损; Wnt/ β -catenin; 碱性磷酸酶

中图分类号 R 651

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0082-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.016

颅骨缺损修补是神经外科的一个难题, 多种因素可以影响缺损区颅骨的生长。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 能与 DNA、RNA、蛋白质结合形成由 LncRNA 参与的复杂的基因表达调控网, 进而参与骨损伤后的修复^[1]。Bu et al^[2]发现 LncRNA t6 通过下调 miR-30a-5p, 促进颗粒诱导的成骨细胞凋亡。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 是一种由骨细胞分泌的磷酸酯酶, 在骨组织广泛存在。骨钙素 (osteocalcin, OCN) 可间接反映成骨细胞的活跃水平。ALP、OCN 的含量反应机体骨组织的代谢情况。在颅骨组织损伤时, 骨的吸收和代谢因子发生变化, 如血清 ALP、OCN 等^[3-4]。然而在幼羊颅骨缺损再生中 ALP、OCN 的表达情况还没有被明确。

该研究通过测序探究在原生、新生骨组织中 LncRNA 的差异性表达与其联系的 MicroRNA、Wnt/ β 调控骨生长的关系, 确定差异性表达的 LncRNA 在幼羊颅骨缺损修复表达调控的意义, 为临床上颅骨缺损的治疗提供新的理论基础。

2020-09-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81660214、81960238)

作者单位: 内蒙古科技大学包头医学院¹ 第一附属医院神经外科、
² 神经外科疾病研究所 (转化医学), 包头 014040

³ 内蒙古自治区骨组织再生与损伤修复工程技术中心, 包头 014040

作者简介: 刘 岩 男 硕士研究生;

张春阳 男 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangchunyang_1964@aliyun.com

* 对本文具有同等贡献

group, and HEL experimental group. Cells of CM-Dil group were transplanted into zebrafish yolk sac of HEL experimental group by microinjection, and PBS experimental group was injected with PBS. The three groups of zebrafish were cultured in an incubator at 34 °C, and whether the model was established successfully was identified through *in vivo* and *in vitro* proliferation experiments and *in vivo* fluorescence observation, the successfully identified zebrafish were exposed to cytarabine drug, divided into 50, 100, 200 nmol/L group and model control group, the proliferation and migration of leukemia cells in xenograft tumor models after drug exposure in each group were observed. **Results** The proliferation status of HEL cells in the CM-Dil group and the blank group was similar, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The proliferation of HEL cells in zebrafish was confirmed by *in vitro* and *in vivo* proliferation experiments; The number of zebrafish in the HEL experimental group was lower than that in the blank control group and PBS injection group ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the proliferation of the three concentrations of cytarabine drug exposure group was lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Human acute erythroleukemia HEL cells can be proliferated after transplantation into zebrafish embryos, and the proliferative activity can be interfered by cytarabine, confirming the successful establishment of the xenograft model. **Key words** zebrafish; acute erythroleukemia; xenograft; human erythroleukemia cell; cytarabine