基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1627-03

人神经母细胞瘤免疫活性小鼠移植瘤模型的建立

何文飞,何大维,马 超,赵 丹,张永波,卞则栋,易钦君,吴 鑫
(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨建立 C57BL/6j 小鼠人神经母细胞瘤移植瘤模型可行性。方法:取含 1×10^7 个对数生长期 SK-N-SH 人神经母细胞瘤细胞悬液 0.2 ml,接种于 C57BL/6j 系小鼠右前肢腋窝皮下,观察小鼠成瘤率、相对肿瘤体积(Relative tumor volume,RTV)、相对肿瘤增长速率(K)、相对肿瘤倍增时间(Td)、存活时间及移植瘤病理学情况。结果:C57BL/6j 小鼠在 3、7 d、3 周、4、5、6、7 周各年龄段持续成瘤率分别为:100%、100%、90%、70%、60%、0%、0%。成瘤后 3~5 周内,3 周与 4 周及 5 周龄接种的肿瘤 RTV、K、Td 及 C57BL/6j 存活时间均有差异($P<0.05$)。结论:在 C57BL/6j 小鼠体内成功建立人类异种移植瘤模型。不同年龄段接种的成瘤率有差异,可以根据后期研究目的选择接种建模时间。

【关键词】C57BL/6j 小鼠;移植瘤;动物模型;神经母细胞瘤
【中国图书分类法分类号】R730.264 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-20

Establishment of xenograft tumor model of human neuroblastoma in immunocompetent mice

HE Wen-fei, et al
(*Department of Urology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feasibility of human neuroblastoma xenograft model in C57BL/6j mice. *Methods*: SK-N-SH cells were collected and condensed as 1×10^7/ml during the logarithmic growth phase, 0.2 ml injected subcutaneously into C57BL/6j mice. The tumor generation rate, relative tumor volume (RTV), relative growth rate (K), relative doubling time (Td), survival time and pathology were tested. *Results*: The continuing tumor generation rate of C57BL/6j mice was 100% (10/10) in 3 day, 100% (10/10) in 7 day, 90% (9/10) in 3 week and 70% (7/10) in 4 week, 60% (6/10) in 5 week, 0% (0/10) in 6 week and 0% (0/10) in 7 week respectively. There were differences in RTV, K, Td, and survival time ($P<0.05$) when comparing 3 week C57BL/6j mice with 4 week and 5 week ones. *Conclusion*: Human neuroblastoma xenograft model is successfully established in the immunocompetent C57BL/6j mice. There is significant difference between the inoculated ages in the tumor generation rate, and time-points of model inoculation can be selected according to later research purposes.

【Key words】C57BL/6j mice; Xenograft; Animal model; Neuroblastoma

人类肿瘤动物模型的构建是肿瘤病因认识及治疗策略研究的重要方式[1-3]。成功的模型是要近似临床肿瘤复杂的生物学行为。目前人类移植瘤模型主要是裸鼠动物模型,但是,该模型是建立在免疫缺陷机体基础上,与人类肿瘤有着正常免疫系统中的生物学行为有着本质差别[4-5]。为此,我们针对该缺点,应用人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株接种有正常免疫系统 C57BL/6j 小鼠皮下,通过肿瘤发生率、形态学及生长速率等生物学行为观察,评估建立该模型的可行性及应用价值。

作者介绍:何文飞(1982-),男,硕士,
研究方向:小儿肿瘤、泌尿生殖器畸形。
通讯作者:何大维,男,副教授,E-mail:dw.he@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30772274);重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2010BB5112);重庆市卫生局医学科研基金资助(编号:2008-1-35)。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株

SPF 级正常 C57BL/6j 系小鼠,雌雄性随机,动物及饲料购自重庆医科大学动物实验中心。人神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 由重庆医科大学金先庆教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞接种液制备 细胞株生长于 DMEM 培养基补充 5%FBS(Hyclone 公司,美国)、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 U/ml)及 2 ml 谷氨酰胺(Sigma 公司,美国),在 37℃及 5%CO_2 孵育。取对数生长期 SK-N-SH 细胞,0.25%胰酶(Invitrogen 公司,美国)消化形成细胞悬液,计数调整细胞浓度 1×10^7 个/ml。

1.2.2 实验随机分组及动物接种 C57BL/6j 小鼠组，分别取 3、7 d、3 周、4、5、6 周及 7 周龄，每年龄段各 10 只。用 1 ml 注射针抽取单细胞悬液 0.2 ml 接种于 C57BL/6j 小鼠右前肢腋下。肉眼可见瘤块，肿瘤体积达到或超过 100 mm^3，默认建模成功。

1.2.3 测量指标及标本收集 记录肿瘤生长潜伏期、荷瘤鼠自然存活时间。定人每周游标卡尺测量肿瘤的长(L)、宽(W)及高(H)，按公式 $V=L\times W\times H\times \pi/6$[6]计算肿瘤生长体积。根据测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)，计算公式为：$RTV = V_t/V_0$。其中 V_0 为第 1 次测量所得肿瘤体积，V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。用指数函数先计算其生长速率 $K=(LnV_t-LnV_0)/t$，再绘制生长曲线及计算倍增时间 $Td=Ln(2)/K$[7]。肿瘤组织病理学观察 肿瘤标本 4%中性甲醛固定，石蜡包埋切片厚 5 μm，苏木精－伊红染色(HE)染色，观察肿瘤镜下组织结构及浸润。

1.3 统计学分析

实验数据以 ± s 表示，应用 SPSS16.0 软件处理，相对肿瘤增长速率、相对肿瘤倍增时间值进行单因素 ANOVA 分析；相对肿瘤体积值进行重复测量方差分析；存活时间值采用 logrank 检验，$P<0.05$ 为有差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同鼠龄 C57BL/6j 移植瘤成瘤率及存活时间

各组肿瘤细胞悬液接种 4~6 h 后，注射部位皮丘全部消失。3~6 d 后，接种部位出现新的结节状物，初时触感细碎，在皮下有游移滑动感。接种后第 1 周，3 d、7 d 龄成瘤率均为 100%，随着肿瘤增大，小鼠发育严重不良，体重减轻；3、4、5 周龄成瘤率分别为 90%(9/10)、80%(8/10)、70%(7/10)。但是，部分瘤块逐渐缩小。接种后第 3 周，3、4、5 周龄成瘤率分别为 90%(9/10)、70%(7/10)、60%(6/10)。未缩小或消失瘤块继续增大，成瘤小鼠出现活动减少、呆滞。接种后 30 d，3 d 龄鼠全部死亡，7 d 龄至 5 周龄 30 d 存活率及存活时间见表 1。接种后 60 d，受肿瘤生长影响，7 d 龄组全部死亡，3 周至 5 周龄小鼠存活率及存活时间见表 1。3 d 龄鼠存活时间短，与 7 d龄鼠比较有显著性差异($P<0.05$)。3 周及 4 周龄小鼠存活时间无显著性差异($P>0.05$)，其中与 5 周龄存活时间比较有显著性差异($P<0.05$)(表 1)。6 周及 7 周龄 C57BL/6j 小鼠在接种后 100 d 内成瘤率均为 0。

2.2 移植瘤生长相关指数

根据默认荷瘤成功及成瘤时间和每周测量结果，连续观察各组荷瘤鼠移植瘤生长，绘制相对肿瘤生长曲线(图 1)；肿瘤生长速率(表 2)；肿瘤倍增时间趋势(表 2)。研究发现：3 周龄与 4 周和 5 周 C57BL/6j 小鼠比较移植瘤生长趋势有明显差异，且 4 周与 5 周龄段移植瘤生长趋势无差异。

2.3 移植瘤组织病理学

皮下移植瘤呈类似球形，形成完整假包膜，发现中央组织充血及坏死。肿瘤细胞接种部位肌肉有浸润及肿胀，腹腔脏器未见转移。HE 染色观察细胞染色较深，形态不规则，大小不一，菊花状生长，分化低，细胞核大、深染，多见病理性核分裂(图 2)，肿瘤内微血管丰富，其间有少量淋巴细胞浸润。

3 讨 论

人类肿瘤移植瘤模型是研究人类肿瘤生物学行为及肿瘤治疗的主要工具之一，广泛应用于肿瘤生长、肿瘤疫苗、肿瘤干细胞筛选、化疗药物筛选等方面研究[3,5,8,9]。1969 年 Raygard J 首次成功建立了人结肠癌移植瘤裸鼠(Nude mice)模型。但是，裸鼠异种移植瘤模型普遍存在非免疫活性缺陷，其瘤细胞生物学行为与临床不一致[10,11]。

神经母细胞瘤是儿童常见恶性实体瘤，其裸鼠移植瘤模型技术成熟，移植后生长稳定，故本实验采用该细胞株建立

表 1 C57BL/6j 小鼠及 BALB/C 裸鼠皮下接种成瘤情况比较

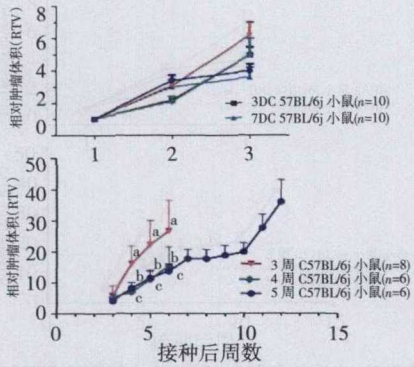
	接种时期	总例数(只)	1 周成瘤例数(%)	3 周成瘤例数(%)	持续荷瘤例数(%)	荷瘤 30 d 存活率(%)	荷瘤 60 d 存活率(%)	存活时间(d, $\bar{x}\pm s$)
C57BL/6j	3 d	10	10(100)	10(100)	10(100)	0(0/10)	-	28.20 ± 1.75*
	7 d	10	10(100)	10(100)	10(100)	40(4/10)	0(0/10)	31.70 ± 7.06*
	3 周	10	9(90)	9(90)	9(90)	100(9/9)	22(2/9)	50.7 ± 10.08◆
	4 周	10	8(80)	7(70)	7(70)	100(7/7)	43(3/7)	53.71 ± 9.91●
	5 周	10	7(70)	6(60)	6(60)	100(6/6)	100(6/6)	87.67 ± 2.73■
	6 周	10	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	-
	7 周	10	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	-

注：统计采用 logrank 检验；*，$P<0.05$；◆与●，$P>0.05$；●与■，◆与■，$P<0.05$；d，日龄

表 2 接种后第 6 周移植瘤增长速率与倍增时间

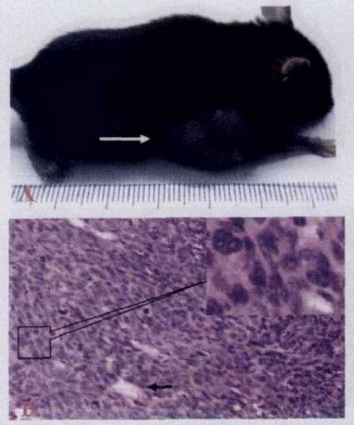
	3 周 C57BL/6j 小鼠(n=8)	4 周 C57BL/6j 小鼠(n=6)	5 周 C57BL/6j 小鼠(n=6)
K	0.096 ± 0.015*	0.075 ± 0.014	0.073 ± 0.012
Td	7.296 ± 0.832*	9.430 ± 1.519	9.797 ± 1.743

注：统计采用单因素 ANOVA 分析，*$P<0.05$，K：相对肿瘤增长速率，Td：相对肿瘤倍增时间



注：统计采用重复测量方差分析，接种后 3 周内，各组 RTV 无显著性差异（$P>0.05$）；3~5 周，a 与 b，a 与 c，$P<0.05$，小鼠 RTV 差异有显著性；b 与 c，$P>0.05$，RTV 无差异

图 1　移植瘤 RTV 生长曲线图



A. 移植瘤实体；B. 移植瘤组织学，箭头所指为微血管；×200；插入图，×1 000

图 2　C57BL/6j 小鼠移植瘤实体及组织学

移植瘤模型。结果显示：6 周龄后 C57BL/6j 小鼠不能建立移植瘤模型，而 5 周龄以内小鼠能够成功建立稳定的移植瘤模型，提示免疫活性起关键作用，而且，我们推测，5 周龄为 C57BL/6j 小鼠免疫系统成熟的分界，6 周龄及以后，小鼠已经拥有健全的免疫系统，能够对异质细胞进行免疫监控和灭杀；5 周龄及以内免疫系统尚不健全，且周龄越小免疫系统发育越不完善，肿瘤细胞逃逸监控和杀灭的机率越大，移植瘤模型适宜于在此期内建立。接种后 3 周内，各组 RTV 无显著性差异（$P>0.05$），我们推测是移植瘤与宿主免疫系统一个平台期。经过 3 周后，小鼠已经建立成熟的免疫系统，肿瘤只能在部分小鼠中持续生长，正类似人类肿瘤仅在部分非免疫缺陷人群中发生。

本研究发现：3、7 d 龄小鼠成瘤率 100%，相对肿瘤增长迅速、倍增时间短、宿主寿命短（表 1），宿主快速出现死亡，推测 3、7 d 龄小鼠免疫系统发育不完善，肿瘤被宿主免疫系统接受并逃逸监控，并呈现出非受控性增殖，最终致使小鼠死亡。这一现象较临床肿瘤患者死亡时间不吻合。60%~70% 的 4、5 周龄 C57BL/6j 小鼠持续成瘤，但是，相对肿瘤增长速率缓慢、倍增时间长、宿主寿命较长（图 1）。3 周龄与 4、5 周龄 C57BL/6j 小鼠移植瘤增长趋势差异具有显著性（图 1），我们推测 3 周龄 C57BL/6j 小鼠移植瘤可能形成肿瘤免疫耐受，移植瘤稳定而快速增长。病理检查显示 C57BL/ 6j 小鼠移植瘤镜下结构与临床相近。从以上移植瘤相关系数比较及病理组织学检测结果提示，正常 C57BL/6j 小鼠可以用以建立人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株异种移植瘤模型；尤其是 3 周龄 C57BL/6j 小鼠，移植瘤经历了免疫耐受至免疫监视全过程，模拟了临床肿瘤发生微环境。另外，3 周龄 C57BL/6j 小鼠移植瘤成瘤率高、生长速度快、移植瘤倍增时间较短、RTV 较突出、宿主寿命较长等优点，因此，3 周龄 C57BL/6j 小鼠可能作为肿瘤学研究移植瘤模型选择。

本实验构建人神经母细胞瘤免疫活性 C57BL/6j 小鼠移植瘤模型，增加了宿主免疫系统监控人类肿瘤移植瘤模型的建立，具有成瘤率高、重复性好、稳定等优点，模拟临床恶性实体肿瘤生长的特点。且不同年龄段接种的成瘤率有差异，可以根据后期研究目的选择接种建模时间。我们认为，人神经母细胞瘤免疫活性 C57BL/6j 小鼠移植瘤模型是一种比较理想的人神经母细胞瘤移植瘤模型。

参 考 文 献

[1] Frese K K, Tuveson D A. Maximizing mouse cancer models[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(9): 645-658.

[2] Ostrand-Rosenberg S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(2): 143-150.

[3] Marx J. Building better mouse models for studying cancer[J]. Science, 2003, 299(5615): 1972-1975.

[4] Sikder H, Huso D L, Zhang H, et al. Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors[J]. Cancer Cell, 2003, 4(4): 291-299.

[5] Becher O J, Holland E C. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies[J]. Cancer Res, 2006, 66(7): 3358-3359.

[6] Tomayko M M, Reynolds C P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1989, 24(3): 148-154.

[7] 毕允力，高解春. 肾母细胞瘤裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性[J]. 中华小儿外科杂志，2000，21(2)：115-118.

[8] Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, et al. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye[J]. Trends Immunol, 2002, 23(7): 364-371.

[9] Rangarajan A, Weinberg R A. Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(12): 952-959.

[10] Leaf C. Why we're losing the war on cancer (and how to win it)[J]. Fortune, 2004, 149(6): 76-82, 84-6, 88 passim.

[11] Anisimov V N, Ukraintseva S V, Yashin A I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(10): 807-819.

（责任编辑：冉明会）