维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)12-1337-03

建立移植型肺癌动物模型的最新方法和进展

田雪莲 综 述,王莎莉 审 校

(重庆医科大学生理学教研室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R-332 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-14

在众多的肺癌模型研究中，尤其是移植型肺癌模型,是将人肺癌细胞移植到动物体内传代生长,其移植的肿瘤细胞形态学特征,染色体数量,同工酶水平等仍保持不变,对临床常用抗癌药物敏感性也大致相同,所以常用来做疾病定向性筛选,抗癌药物的筛选。同时还具有移植肿瘤细胞生长迅速,倍增时间短,耗费低等优点。

1 提高移植成功率的改进方法

1.1 动物的选择

1.1.1 小鼠 各种小鼠,特别是免疫缺陷小鼠,如裸鼠、SCID小鼠在建模中广泛应用。运用这类小鼠建立的异种移植模型有移植成功率高,移植瘤的生物学行为和药物动力学更接近人体的原发瘤等特点。虽然 SCID 小鼠 T、B 淋巴细胞联合免疫缺陷,但它仍有 NK 细胞等其他免疫功能,需要运用免疫抑制剂或者放射线照射以提高移植成功率;同时还具有饲养条件高,耗费高,易感染各种疾病等特点。

1.1.2 大鼠 人类肺泡和下呼吸道的上皮组织是支气管肺癌的好发部位,也是诱发肺肿瘤的主要靶位。而大鼠的气管和支气管腺不发达，支气管上皮的厚度与人类也有明显差异,因此两者肺癌的诱发机制可能有差异,故大鼠不是理想的原发性支气管肺癌模型的选择动物。

1.1.3 家兔 家兔呼吸系统的解剖特点与人类接近,是建立肺癌模型,特别是研究肿瘤供血和介入治疗的良好对象。

1.1.4 犬 犬的生活方式和环境更接近于人类,犬的支气管动脉与人类相似,常用犬作为血管造影和介入治疗的研究对象。

1.2 动物年龄的选择

NK 细胞最能反映年龄相关性的变化，研究表明无胸腺小鼠的 NK 细胞水平越高,人类肿瘤细胞的转移率越低。例如 3 周龄的小鼠的 NK 细胞活性就比 6~8 周的低,此外给予环磷酰胺、β 雌二醇或抗 NK 抗体抗小鼠 IL-2 受体 β-链特异性单克隆抗体(TM-β1)和 anti-asialo GM1 抗体等治疗后,建立鼠类肿瘤的转移模型容易成功,并且选择接种的年龄应该尽可能的年轻。

1.3 接种物的量和粘稠度

鼠类模型注射细胞悬液的量一般在 0.1~0.2ml，浓度在 1×10^8cells/ml 以下最理想。小鼠的静脉注射量不要超过 0.2ml，肿瘤块移植时常位移植量 0.5~1.0g。麻醉给药量在 0.1ml/10g 最理想,但是裸鼠药量需要高,在 0.15ml/10g。

1.4 做 X 射线照射可以提高移植成功率

胸腺切除后,经放射线照射的小鼠来建模或者给裸鼠辅以 X 射线照射处理,能够使移植肿瘤的成功率大大增加。夏曙等的实验发现,6Gy 全身照射昆明小鼠后再接种人肺癌 A549 细胞,移植瘤的成瘤率可达 80%,移植瘤可以持续存在 2~3 周,且移植瘤病理阳性率为 100%。该方法的技术关键是小鼠照射剂量的选择和照射中确保小鼠处于 90%的剂量曲线范围中。但是 2 周后小鼠免疫功能逐渐恢复,故此模型只适用于实验周期短的实验。

1.5 加 EDTA 或胰弹性蛋白酶可提高移植成功率

March TH 等用全身放射线照射使裸鼠的免疫抑制,轻微破坏肺上皮或肺表面活性物质层,经气管插管,灌注人人肺癌细胞 ---Calu-6 细胞系与胰弹性蛋白酶或者加乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA),可使移入成功率分别达到 80%~100%，并且复合给药 EDTA 比单给予弹性蛋白酶(elastase)的动物肿瘤块生长的更大,数量更多。

2 移植型肺癌模型建立的常用方法

2.1 皮下接种瘤细胞悬液或瘤组织

是将肺癌细胞或组织块接种于裸鼠或其他免疫缺陷小鼠的皮下(腋部、背部、后肢等)建立肺癌模型。腋部皮下移植因不影响动物活动是常采用的部位。此建模简单易行,成瘤率高,易监视肿瘤生长情况,多用于研究肺癌的生物学特征以及制作转移模型等。Eiji Tanaka 等将 6 周龄 SCID 小鼠腋下注射入 1×10^6/0.1ml 个 EBC-1 细胞,接种第 7 周后检测到原位癌,第 10~12 周发现各个器官的转移。Douglas A.Arenberg 等用 6 周龄 CB17-SCID 雌性小鼠,注射 1×10^6(100μl) A549 细胞于小鼠腋部皮下，成瘤率 100%。Kitamura H 等从病人肺切除的癌组织移植到裸鼠皮下,2 周后，移植物的

作者介绍：田雪莲(1978-),女,硕士,
主要研究方向:干细胞生物学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

血运重建，有未成熟细胞的复制；4 周以后，移植物的上皮细胞发育成熟，含有纤毛，粘液，大范围的基底细胞系组成的假复层柱状上皮，然而小的空间包含的肺泡结构通常由排列着Ⅱ型肺泡细胞组成，偶而排列 Clara 细胞，移植物在裸鼠体内保持了 26 周。虽然皮下移植建模方法已广泛采用，但皮下生长的肺癌与临床上在肺部生长的肺癌的生物学特性有很大的不同，所以，应用此模型得到的实验结果与临床应用的实际效果之间常有比较大的距离。

2.2 肺内接种癌细胞悬液或者癌组织块

肺内移植的方法因其肿瘤生物学行为与人类肺癌比较接近，移植成功率高而成为近年来研究的热点，但此方法对技术要求更高。Ahrar K 等建立一种与人肺癌相似的犬肺癌模型，他们将新鲜的犬传播性肿瘤（Canine transmissible venereal tumor，cTVT）瘤块制成悬液，60~120min 内接种。2 只狗的接种经右股静脉插管插入右肺尖动脉，分别注入 0.5ml 悬液。另外 8 只狗在 CT 监控下接种到肺上叶实质内。其中九只狗均口服环孢菌素，结果显示两种接种方法都可见到肺内肿瘤结节，而未服用环孢菌素的狗则无肿瘤生长。可见这种方法制作的动物模型和人单发瘤结节以及转移类似，而且服用环孢菌素是促进肿瘤生长活性所必须的。

用家兔建立肺癌模型的研究表明，肺内移植肿瘤组织块的方法成功率更高。薛强等采用肿瘤埋植法将肺鳞癌肿瘤组织制成 1 大小，经兔右胸 4、5 肋间隙，在肺下叶尖部剪 0.3~0.5cm 切口，将肿瘤组织块缝合入切口中，闭合胸腔，抽出胸腔气体，恢复动物的自主呼吸。此方法成癌率高（100%），动物平均生存时间较长。特别是癌细胞仅局限于肺部生长，转移模式类似于人肺癌转移方式，且稳定性强，是较理想的建立肺癌模型的方法。

2.3 气管内移植的方法

该方法最初用于建立诱发型肺癌模型，但是通过气管内移植肿瘤细胞或组织块建立模型也是常位移植模型之一。Howard RB 等选择 500radsX 射线照射后的 5 周龄裸鼠，经气管插管到达右肺下叶时注射入左右的瘤块。21 天后大部分鼠出现右侧纵隔淋巴结转移，28 天所有鼠均可见右侧纵隔淋巴结转移，而且有 45%~71%的动物还出现肾、骨、脑、左肺等部位转移，32~35 天后进一步增加到 63%~91%。

2.4 静脉内注射癌细胞悬液

Vertrees RA 等为了研究肿瘤细胞的入侵及转移情况，采用两种移植方法：①将裸鼠尾静脉注射 $1\times$ 个 BZR-T33（转染了 H-ras 的 BEAS2-B）细胞，接种后的小鼠体重减轻，67%的可触及肺部包块，44%的可触及尾部包块，组织学检查显示肺组织入侵和间质出血。②通过气管切开术将 1×10^6 个 BZR-T33 细胞移植入肺，移植了 BZR-T33 的小鼠最多存活 59 天，100%的出现肺部包块，有 30%的转移。结果显示移植 BZR-T33 通过尾静脉注射和气管内接种都可以使肺部出现包块。

3 移植型肺癌转移模型与细胞株

3.1 肺癌淋巴道转移模型与细胞株

淋巴道转移肺癌模型细胞株的选择广泛，建模方法也较多。常用的细胞株有：Ma-44 细胞、EBC-1、Ma44-3、H69/VP、LCC 等。建立淋巴道转移的模型时选择的细胞株不同，其淋巴道转移潜力也不相同。Yano S 等的研究发现 H69/VP 有高的全身淋巴结转移潜力，而 RERF-LC-AI 主要发生肝、肾部位的转移，很少有淋巴结的转移。Fujino H 等取不同非小细胞性肺癌病人的肺组织常规培养，制成癌细胞悬液，取 2×10^4 注入 SCID 小鼠左肺，植入 FM205 细胞的小鼠 4 周后可见镜下的纵隔转移，16 周后肉眼可见转移。植入 FT821 细胞的小鼠 4 周后可见镜下的纵隔转移，6 周后肉眼可见转移。这些培养细胞的淋巴道转移潜力与临床肿瘤的类似。

Miyoshi T 等通过三种方法接种来源于人肺鳞癌的 Ma-44 细胞系 $(2\sim3)\times10^4$ 来观察并比较淋巴道转移情况①经皮注射 Ma-44 细胞入 SCID 小鼠左肺，接种成功率达 68%（17/25），接种第 14 天观察到 76%（13/17）的纵隔淋巴结转移，无其他器官的转移。②Ma-44 细胞系植入皮下，所有的小鼠到第 28 天都没有任何器官的转移。③静脉内接种 Ma-44 细胞系后，成功率达 74%（37/50），在第 14 天这些转移灶转移到纵隔淋巴结的转移率低 8%（3/37）。结果提示肺内接种的方法更适用。

3.2 肺癌恶性胸腔积液模型与 PC-14-PM4 细胞

Yano S 等通过静脉接种肺癌 PC-14-PM4 细胞建立了人肺腺癌恶性胸腔积液（pleural effusion，PE）的 SCID 小鼠模型。先尾静脉内注入肺腺癌 PC-14 细胞，8 周以后在所有 SCID 小鼠肺内形成血性的胸腔积液。同时给予小鼠抗鼠 IL-2 受体 β 链抗体（TM-β）耗竭自然杀伤细胞（NK 细胞），促进血性胸腔积液的生成和广泛转移。收集胸腔积液，将肿瘤细胞在体外培养后再次静脉注射入 SCID 小鼠体内。通过这样的方式体内选择性循环四次，获得 PC-14-PM4 细胞。这种细胞可造成肺转移，胸腔积液也比 PC-14 细胞更早。接种过 PC-14-PM4 细胞的 SCID 小鼠比接种 PC-14 细胞的小鼠存活时间短，在 PC-14-PM4 细胞的 CD44，CD49d，I-CAM-1，MHC-1 等粘附分子的表达比 PC-14 细胞增加，这些黏附分子的改变是 PC-14-PM4 细胞的高转移力的可能性机制之一。

3.3 肺癌骨转移模型与 SBC-5 细胞

Miki T 等的研究，将 8 个人肺癌细胞系通过尾静脉注射入已有 NK 细胞耗竭的 SCID 小鼠，在骨和多个器官产生转移性瘤结节，探测骨转移与甲状旁腺激素关联蛋白（parathyroid hormone-related protein，PTHrP）的相互关系。结果尽管所有的小细胞性癌细胞系：SBC-5、SBC-3、SBC-3/ADM、H69、H69/VP、RERF-LC-AI、PC-14、A549 都可以在多个器官（肝，肾，淋巴结）发生转移性瘤结节，但是只有 SBC-5 细胞复制出完全的骨转移。并且溶骨性骨转移发生最早（发生在注射 28 天后，其它小鼠发生在注射后 35 天）。八个细胞系的 PTHrP 表达与骨转移的形成有直接联系。SBC-5 细胞与骨转移形成一致，小鼠血浆 PTHrP 和钙离子水平呈时间依赖性方

维普资讯 http://www.cqvip.com

式增高,提示人肺癌所产生的 PTHrP 在骨转移和高钙血症形成中起一个至关重要的作用。研究显示建立肺癌骨转移模型的最佳细胞株是 SBC-5 细胞,此模型还可以用于证实不同器官的微环境中转移过程的分子机制。

3.4 肺癌脑转移模型与 EBC-1 细胞

Yoshimasu T 等应用七个人的 NSCLC 细胞系:EBC-1、LK-2、PC-3、VMRC-LCD、LC-2/sq、PC-14、IA-5,培养制成每 100μl 含 1×10^5 个用表面整联蛋白标记的单细胞悬液,通过尾静脉内注射接种和左心室内接种(癌细胞很容易从肺静脉到达左脑室)。当小鼠出现严重恶病质或者死去后,将它们的整个脑组织取出并切碎,脑组织加入培养基在培养瓶中培育,3 天后弃去瓶内脑组织,收集附于瓶底的细胞。细胞通过几次传代培养后,通过流式血细胞计数法观察到细胞有规则的复染上人特有的单克隆抗体(抗整联蛋白 β1 亚基),观察到所有的 NSCLC 细胞系都含有整联蛋白 β1 亚基,证实 EBC-1 是具有高度脑转移能力的细胞系,也可以通过检测人整联蛋白 β1 亚基的表达来确定脑转移情况。

4 结 语

总之,建立一个理想的肺癌动物模型,应具备以下几个原则:① 动物来源容易;②操作简单,定位准确,重复性好,并且剂量相关;③肿瘤组织学类型、生物学特征与人类相似;④诱发机制与人类致癌因子的作用机制相同;⑤所需时间周期短,移植成功率高;⑥有利于临床研究。随着科学技术的进步,相信将会有更优的肺癌模型的研究问世,并由此加深人类对肺癌的认知。

参 考 文 献

[1] Kelland LR. Of mice and men:values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development [J]. European Journal Of Cancer,2004;40(6):827-836.

[2] 彭 鹏.肺癌动物模型的制作概况[J]. 徐州医学院学报,2005;25(3):263-267.

[3] Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo[J]. Clinical and Experimental Metastasis,1997;15(3):272-306.

[4] 夏 曙,于世英,袁响林,等. 高能电子线照射建立人肺癌动物模型[J]. 中华实用医学,2004;6(13):7-9.

[5] March TH,Marron-Terada PG,Belinsky SA. Refinement of an orthotopic lung cancer model in the nude rat[J]. Veterinary Pathology,2001;38 (5):483-490.

[6] Tanaka E,Yamashita J,Hayashi N,et al. A Pulmonary Metastatic Model of Human Non-small Cell Lung Carcinoma Cells That Produce a Neutrophil Elastase-Like Molecule in Severe Combined Immunodeficiency Mice[J]. Laboratory and Animal Investigations,2003;123(4):1248-1253.

[7] Arenberg DA,Zlotnick A,Strom SR,et al. The murine CC chemokine,6C-kine,inhibits tumor growth and angiogenesis in a human lung cancer SCID mouse model[J]. Cancer Immunol Immunother,2001;49(11):587-592.

[8] Kitamura H,Tsubakihara M,Inayama Y,et al. Long-term maintenance of human distal airway epithelial cells in nude mice: a potentially useful model for the study of pulmonary carcinogenesis and lung cell biology[J]. Laboratory Investigation;A Journal Of Technical Methods And Pathology,1990;62 (3):383-389.

[9] Ahrar K,Madoff DC,Gupta S,et al. Development of a large animal model for lung tumors[J]. Journal Of Vascular And Interventional Radiology:JVIR,2002;13(1):923-928.

[10] 薛 强,屈 谦,杜永洪,等. 兔肺癌模型的建立及生物学特征观察[J]. 中华实验外科杂志,2001;18(5):478.

[11] Howard RB,Mullen JB,Pagura ME,et al. Characterization of a highly metastatic,orthotopic lung cancer model in the nude rat[J]. Clinical and Experimental Metastasis,1999;17(2):157-162.

[12] Vertrees RA,Deyo DJ,Quast M,et al. Development of a human to murine orthotopic xenotransplanted lung cancer model [J]. Journal of Investigative Surgery,2000;13(6):349-358.

[13] Miyoshi T,Kondo K,Ishikura H,et al. SCID mouse lymphogenous metastatic model of human lung cancer constructed using orthotopic inoculation of cancer cells[J]. Anticancer Research, 2000;20(1):161-163.

[14] Tanaka E,Yamashita J,Hayashi N,et al. A pulmonary metastatic model of human non-small cell lung carcinoma cells that produce a neutrophil elastase-like molecule in severe combined immunodeficiency mice[J]. Chest,2003;123(4):1248-1253.

[15] Ishikura H,Kondo K,Miyoshi T,et al. Artificial lymphogenous metastatic model using orthotopic implantation of human lung cancer [J]. The Annals Of Thoracic Surgery,2000;69(6):1691-1695.

[16] Yano S,Nishioka Y,Izumi K,et al. Novel metastasis model of human lung cancer in SCID mice depleted of NK cells[J]. Cancer,1996;67(2):211-217.

[17] Yamaura T,Doki Y,Murakami K,et al. Model for mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic intrapulmonary implantation of lung cancer cells in mice[J]. Human Cell,1999;12 (4):197-204.

[18] Fujino H,Kondo K,Miyoshi T,et al. Establishment of patient-like SCID mouse model by orthotopically implanting primary cultured cells from surgically-resected lung cancer tissues [J]. Oncology Reports,2003;10 (6):1709-1715.

[19] Yano S,Nokihara H,Hanibuchi M,et al. Model of malignant pleural effusion of human lung adenocarcinoma in SCID mice[J]. Oncology Research,1997;9(11-12):573-579.

[20] Miki T,Yano S,Hanibuchi M,et al. Bone metastasis model with multiorgan dissemination of human small-cell lung cancer (SBC-5) cells in natural killer cell-depleted SCID mice [J]. Oncology Research,2000;12 (5):209-217.

[21] Yoshimasu T,Sakurai T,Oura S,et al. Increased expression of integrin a3β1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line[J]. Cancer Science,2004;95(2):142-148.