维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0935-05

大鼠骨肉瘤肺转移模型的建立

王忠良[1],李旭良[2],张德文[1],李 明[1],刘传康[1],覃佳强[1]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院矫形外科,重庆 400014;2. 重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建大鼠骨肉瘤的肺转移模型,为骨肉瘤肺转移的机理及治疗研究奠定基础。方法:RPMI1640 培养基体外扩增 UMR106 细胞(大鼠骨肉瘤细胞株),分别用无血清培养基和鼠尾胶稀释成 1×10^7cells/ml 混悬液,原位注入 3 周龄 SD 大鼠胫骨近端骨髓腔内,每只 0.2ml。观察成瘤情况,死后尸检肺转灶数目,X 线检查骨质变化,组织学检查确定肿瘤性质。结果:两组大鼠原位成瘤率及肺转移率均达 100%。X 线检查示明显骨质破坏和瘤骨形成,组织学检查见肿瘤样骨基质形成,符合临床骨肉瘤各项特征。培养基组和鼠尾胶组肿瘤形成时间分别为(10.0±1.65)天和(17.8±0.87)天,差异有显著性($P<0.0001$);肺转移灶数目分别为(155.25±36.63)个和(91.5±29.56)个,差异有显著性($P<0.0001$);大鼠生存时间分别为(21.4±6.67)天和(40.6±9.52)天,差异也有显著性($P<0.0001$)。结论:UMR106 细胞原位移植 SD 大鼠建立骨肉瘤模型方法简单、重复性好、实验周期短、肺转移率 100%,是研究骨肉瘤肺转移的理想动物模型。无血清培养基稀释法肿瘤形成及肺转移出现时间早,实验周期快,可用于骨肉瘤肺转移机制的研究。鼠尾胶稀释法肿瘤形成时间相对较晚,生存时间长,肺转移数目稍少,适用于骨肉瘤治疗方法的研究。

【关键词】骨肉瘤;肺转移;原位移植;大鼠

【中国图书分类法分类号】R730.59 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-02

Establishment of osteosarcoma pulmonary metastasis in rat model

WANG Zhongliang, et al

(*Department of Orthopedic Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the pulmonary metastasis model of osteosarcoma in rats. *Methods*: UMR106 cells (rat osteosarcoma strain) were cultured in RPMI1640 media and collected before transplantation and resuspended in serum-free media or collagen gel to a final concentration of 1×10^7 cells/ml. About 200μl cell suspensions were injected into the right proximal tibia of 3-week-old Sprague-Dawley rats. Twelve rats were used in every group sorted by resuspension fluid. All rats were treated by cyclosporin A and SMZ-TMP after transplantation. The dates of tumor appearance and rat death were noted, the size of tumor was measured once a week, the metastasis foci on the lung surface was counted and the limbs afflicted by tumor were observed by X-ray after death. Both the tumors in limb and lung were stained with hematoxylin and eosin, and analyzed by microscopy. *Results*: All rats developed local intratibial bone tumors that were radiographically and histologically similar to primary human osteosarcoma. The pulmonary metastasis foci were found in all rats at autopsy. The tumor formation time of serum-free media group was (10.0±1.65) days, shorter than that of collagen gel group, which was (17.8±0.87) days ($P<0.0001$). The metastasis foci in lung of serum-free media group were more than that of collagen gel group(155.25±36.63vs 91.5±29.56, $P<0.0001$). The rats of serum-free media group died earlier than collagen gel group (21.4days±6.67days vs 40.6 days±9.52days, $P<0.0001$). *Conclusions*: The osteosarcoma model established by UMR106 cell strain orthotopic transplantation in SD rats, which is reliable, easily manipulated, tumor formation quickly and pulmonary metastasis in 100 percent, is a perfect model for study pulmonary metastasis of osteosarcoma. The model established by cells resuspened in serum-free media is better for the mechanism study, while the model established by collagen gel is better for pulmonary metastasis treatment study.

【Key words】 Osteosarcoma; Pulmonary metastasis; Orthotopic transplantation; Rat

骨肉瘤在青少年并不少见,20 世纪 70 年代前 5 年生存率仅为 15%,80%~90%以上的病人在确诊时已有微小肺转移灶[1]。虽然此后随着大剂量化疗的应用 5 年生存率有明显提高[2],但肺转移仍是目前最主要死亡原因,一旦发生其死亡率高达 50%以上[3]。因此,控制肺转移和提高肺转移治疗效果仍是骨肉瘤

作者介绍:王忠良(1973-),男,主治医师,博士研究生,主要研究方向:小儿骨肿瘤及 Perthes 病的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究的热点。具有较高肺转移率的骨肉瘤动物模型的制作是进行上述研究的基础，然而目前所建立的模型都存在一定的局限性，不能完全满足实验研究的需要。本实验应用 UMR106 细胞在 SD 大鼠建立骨肉瘤及肺转移模型，拟为骨肉瘤肺转移的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 周龄 SD 大鼠 24 只，50~70g，雌雄各半，购自重庆腾鑫生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

UMR106 细胞为大鼠骨肉瘤细胞株，购自第四军医大学实验动物中心，于含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养基、37℃、5% CO_2 恒温孵箱中培养。0.25%胰蛋白酶 -0.02%EDTA 消化传代，3~4 天传代 1 次。

1.3 鼠尾胶的制备

取 SD 成年大鼠尾巴两根，75%酒精浸泡 30min 消毒；剪开尾巴，去掉皮毛，剪成小段，抽出银色的尾键；剪碎后置于 250ml 0.1%(v/v)醋酸中，4℃放置，2~4h 振荡 1 次；48h 后低温离心机离心 30min，取上清，调节 pH 值至 6.8，分装，4 度保存备用。

1.4 大鼠原位移植模型的建立

对数生长期收集 UMR106 细胞，台盼兰染色计数，活细胞 90%以上者用于实验。细胞离心后 PBS 漂洗、重悬，再次离心，用无血清 RPMI1640 培养基或鼠尾胶稀释成 10^7 cells/ml 备用。腹腔注射麻醉大鼠后消毒双侧后肢，于右后肢胫骨结节处穿刺至骨髓腔，缓慢注入上述细胞混悬液 0.2ml。左后肢同法注入 0.2ml 细胞重悬稀释液（无血清 RPMI1640 培养基或鼠尾胶）。根据细胞重悬稀释液的不同，将大鼠随机分为两组，每组 12 只。术后每天经胃灌入环孢菌素 A 10mg/kg 抑制免疫反应，复方新诺明 170mg/kg 预防感染，直至肿瘤形成后 1 周。

1.5 大鼠骨肉瘤模型的观察与检测

(1)肿瘤生长曲线的测定：移植后每周测量一次包块长径(L)和短径(S)，按公式 V(体积)=0.5·LS^2 计算肿瘤体积，绘制生长曲线图。

(2)病理学及 X 线观察：移植后每日观察注射部位有无包块形成，有无感染，观察大鼠呼吸及全身情况。大鼠死亡后截取肢体标本行 X 线检查，观察肿瘤生长、骨质破坏及软组织受累情况；尸检取肺，按 Khanna 等[4]方法自气管内注入 15%墨汁，然后以 Fecet's 溶液灌洗，并于新鲜 Feket's 溶液浸泡过夜，两名研究者各自独立计数肺表面白色转移结节；并观察肝脏和肾脏有无肿瘤转移，计数转移灶数目；原位瘤及转移瘤标本均经 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋、切片，HE 染色，光学显微镜观察。

1.6 统计分析

实验数据用 SAS8.1 软件包进行分析处理。动物成瘤时间、生存时间及肺转移灶数目分析用 t 检验。

2 结 果

2.1 细胞培养

UMR106 细胞在含 10%胎牛血清的 1640 培养基中呈单层上皮样生长，细胞形态大部分呈多角形或梭形，3~4 天传代 1 次。培养 1 个月，细胞数达 10×10^7，台盼兰染色示活细胞数 90%以上。

2.2 大体观察

移植后第 1 天注射部位稍肿，但无明显发红，第 2 天即恢复正常，细胞注射侧与稀释液注射侧无差别。两种稀释液悬浮细胞均能在胫骨结节处形成原位肿瘤(图 1)，成瘤率 100%。但肿瘤形成时间不同，无血清培养基组成瘤时间短，最早移植后 6 天，最晚 12 天，平均(10.0±1.65)天；鼠尾胶组成瘤时间长，最早移植后 16 天，最晚 19 天，平均(17.8±0.87)天；两组间差异有显著性(t=14.4，P<0.0001)。所有实验大鼠均出现了肺转移，而肝脏和肾脏内未见转移灶，两组肺转移发生率均为 100%。但培养基组肺转移发生早，瘤灶多呈栗粒样遍布双肺，小而密集，数目多达(155.25±36.63)个；鼠尾胶组肺转移出现较晚，转移灶数目少，死亡时瘤灶较大，平均(91.5±29.56)个(图 2)，两组比较差异有显著性(t=4.69，P<0.0001)。两组生存时间差异亦有显著性，培养基组(21.4±6.67)天，鼠尾胶组明显延长，达(40.6±9.52)天(t=5.71，P<0.0001)。肿瘤出现后，大鼠有明显跛行，部分肿瘤发生破溃，死亡前大鼠出现消瘦、食欲减退、活动减少、呼吸急促、贫血等恶病质和肺转移表现。

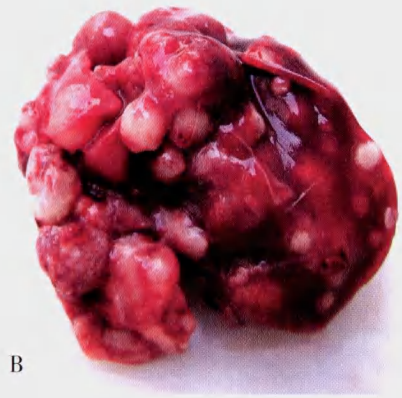


图 1 大鼠右后肢见明显肿瘤生长(箭头所示)，肿瘤表面凸凹不平。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A：早期转移灶多，小而密集，成粟粒样；



B：晚期转移灶少，大而散在。

图 2　大鼠肺转移情况

2.3　X 线检查

2 周时即见软组织内巨大肿瘤影，胫骨近端局部膨大，皮质变薄，骨质密度降低；3 周后可见明显胫骨骨质破坏，伴瘤骨形成，偶见 Codman 三角征象（图 3）。

2.4　镜下观察

肺转移灶肿瘤与原位肿瘤细胞形态结构一致，均呈弥漫性生长，细胞大小不一，深染，核圆形或卵圆形，核浆比例大，核仁清晰，病理性核分裂相多，细胞间质少，偶见瘤巨细胞（图 4）。2 周时可见肿瘤样类骨质，3~4 周时出现钙化的肿瘤样骨基质（图 5）。

2.5　肿瘤生长体积变化

原位肿瘤出现后，随时间增加而增大，直到死亡。两组比较，鼠尾胶组肿瘤生长相对较慢（图 6）。



A：软组织内肿瘤影，胫骨近端膨大，骨皮质变薄，骨密度降低；B：明显瘤骨形成，腓骨挤压变弯；C：Codman 三角征象（箭头所示）

图 3　X 线表现

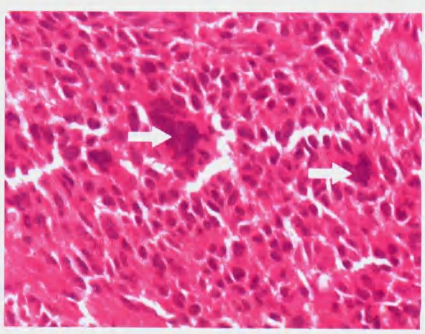


图 4　瘤巨细胞（箭头所示）

维普资讯 http://www.cqvip.com

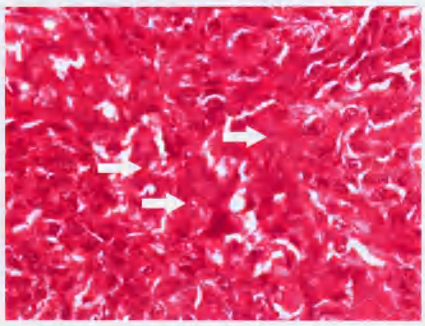


图 5 肿瘤样骨基质(箭头所示)

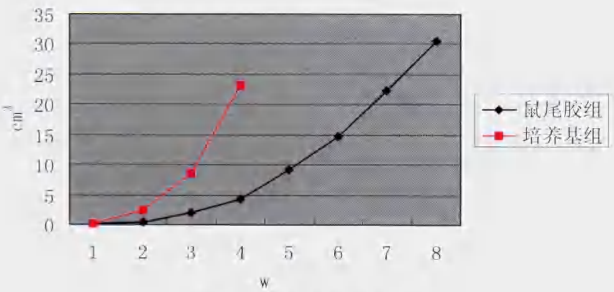


图 6 肿瘤生长曲线图

3 讨 论

骨肉瘤在青少年并不少见,恶性程度高,预后差。肺转移是骨肉瘤目前最主要的死亡原因,约30%以上的患者因此致死[5]。减少肺转移的发生和寻找治疗肺转移的有效方法是提高骨肉瘤治愈率的关键。建立一个稳定而可靠的骨肉瘤肺转移动物模型是进行上述研究的基础。

构建骨肉瘤动物模型的方法众多,目前以移植模型为主。移植物和移植方式的选择是成功构建骨肉瘤及肺转移动物模型的两个关键因素。已有研究发现肿瘤细胞与间质及起源器官微环境间复杂的相互作用对肿瘤形成非常重要,决定了肿瘤的许多生物学性质[6]。因此,移植于皮下或肌肉的异位移植模型(Heterotopic transplantation)很少发生肺转移。目前多采用将移植物直接移植到肿瘤正常发生的组织或脏器的原位移植(Orthotopic transplantation)方式。原位移植明显提高了骨肉瘤的肺转移率,现有的几个高肺转移率的骨肉瘤动物模型都是采用原位移植方式建立的。转移物的转移能力是成功构建骨肉瘤肺转移模型的另一个关键因素。为了提高移植物的转移能力,学者们采用了以下方法:(1)原癌基因转化:高肺转移细胞株 KRIB[7,8]和 143B[9]就是 TE85 经原癌基因 V-ki-ras 转化而获得的。(2)反复移植筛选:尾静脉注射低转移细胞株,收集肺部转移瘤细胞再次尾静脉注射,再收集肺部转移瘤细胞,如此反复以获得高转移细胞株。K7M2[4]、LM8[10]、SAOS-LM6[11]、HMPOS[12]、SOSP-9607[13]等都是通过这一方法筛选出来的。目前成功建立肺转移模型的细胞株中 SOSP-9607、SAOS-LM6、KRIB 和 143B 是人骨肉瘤细胞株,HMPOS 是狗自发骨肉瘤细胞株,这些细胞株只能异种移植到裸鼠,无法建立同基因移植动物模型。然而,裸鼠模型具有价格贵、喂养条件高、操作困难,不适合免疫治疗研究等缺欠,因此不是一个理想的骨肉瘤模型。K7M2、LM8 是小鼠自发骨肉瘤细胞株,除可异种移植裸鼠外,还可移植于同基因小鼠, 建立同基因移植骨肉瘤肺转移模型。Khanna 等[4]应用 K7M2 肿瘤块原位移植 balb/c 小鼠胫骨近端建立的同基因异体原位移植骨肉瘤模型,成瘤率 100%,肺转移达 90%,是目前较好的一个骨肉瘤肺转移模型。但该模型需行荷瘤肢体截肢,且平均存活时间 74 天,实验周期较长,仍然不够理想。

UMR106 细胞是 20 世纪 70 年代 SD 大鼠经放射性元素 ^{32}P 诱导获得的一种骨肉瘤细胞株[14]。2001 年,Fisher 等[15]首次应用 UMR106 细胞移植裸鼠胫骨近端成功构建骨肉瘤模型, 该模型自发肺转移。李艳等[16]也应用 UMR106 细胞株在裸鼠体内构建成类似的骨肉瘤原位移植模型。后来有人[17,18]应用此细胞株先后在 SD 大鼠成功建立异位骨肉瘤模型,肺转移率高达 70%,这么高的肺转移率在异位移植模型中是很少见,说明 UMR106 细胞具有极强的转移能力。最近,李艳等[19]进一步用这个细胞株采用组织块法在 SD 大鼠成功构建骨肉瘤原位移植模型,成瘤率 91.67%,晚期自发肺转移,是一个比较理想的骨肉瘤肺转移模型。

肿瘤原位移植模型根据移植物的不同可分为组织块移植和细胞混悬液移植两类,早期原位移植中大多采用组织块移植法。组织块移植法就是先用细胞混悬液构建异位肿瘤模型,再将所得肿瘤组织切成小块后移植到肿瘤的正常发生组织或器官。组织块移植法操作较复杂,需先构建异位移植荷瘤模型,瘤块移植时难度大,实验周期长,肺转移发生较晚。Cherrier 等[1]最先应用 OSR 细胞株藻酸盐混悬液原位移植 SD 大鼠股骨,成功构建大鼠骨肉瘤模型,成瘤率近 80%,肺转移率达 96%,说明细胞混悬液法进行原位肿瘤移植是可行的。后来 Luu 等[9]采用细胞 PBS 混悬液法也成功构建了裸鼠原位骨肉瘤模型。本实验采用 UMR106 细胞混悬液原位移植建立的 SD 大鼠骨肉瘤模型有明显骨质破坏和瘤骨形成,镜下可见肿瘤样骨基质,符合临床骨肉瘤的特

维普资讯 http://www.cqvip.com

征;而且细胞用量少(每只鼠仅 2×10^6 个细胞)、成瘤率和肺转移率均达 100%, 操作简单,实验周期短,SD 大鼠价格便宜且易于饲养,是一个理想的骨肉瘤肺转移模型。有研究认为,细胞悬液移植因为肿瘤细胞间缺乏相互联系,细胞易于直接进入血液循环和周围软组织。为此,本实验根据细胞重悬液不同分成两组,一组为无血清培养基组,一组为鼠尾胶组。鼠尾胶是鼠尾 I 型胶原经酸浸泡后制成的,低温下为粘稠液体,温度上升至 37℃附近时,胶原纤维进行组装而成为凝胶,可增加细胞间的粘附,减少细胞进入血液循环和周围软组织。结果证实,鼠尾胶组成瘤时间和大鼠存活时间均明显长于无血清培养基组,肺转移时间晚,转移灶数目少,达到了预期目的。这两组模型成瘤率和肺转移率均达 100%,实验周期短,都适合肺转移的研究。但由于无血清培养基组大鼠存活时间较短, 肺转移出现早且多,较适于肺转移机制方面的研究;而鼠尾胶组存活时间较长,肺转移出现相对较晚,更适合于肺转移治疗方面的研究。

由于 UMR106 细胞株取自 20 世纪 70 年代的 SD 大鼠,距今已三十余年,且国内的 SD 大鼠多以封闭群方式饲养, 细胞株与 SD 大鼠间可能存在一定的基因差异,不利于肿瘤的生长。故本实验在细胞接种后按 Cherrier[1]的方法给予环孢菌素 A 抑制免疫直至肿瘤形成后 1 周,为避免感染给予复方新诺明预防,结果无 1 只大鼠发生感染。

总之, 本实验应用 UMR106 细胞混悬液原位移植法成功构建了 SD 大鼠骨肉瘤及肺转移模型,成瘤率和肺转移率均达 100%,该模型操作简单,饲养容易,实验周期短,是一个理想的研究骨肉瘤肺转移的模型。采用无血清培养基重悬细胞成瘤早,肺转移灶多,大鼠存活时间短,适合肺转移机制方面的研究;鼠尾胶重悬细胞成瘤时间稍晚, 肺转移数目略少,大鼠存活时间长,可用于肺转移治疗方面的研究。

参 考 文 献

[1] Cherrier B,Gouin F,Heymann MF,et al. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation,useful for biology and therapy investigations[J]. Tumour Biol,2005;26(3):121-130.

[2] Fogioli F,Aglietta M,Tienghi A,et al. High-dose chemotherapy in the treatment of relapsed osteosarcoma:an Italian sarcoma group study[J]. J Clin Oncol,2002;20(8):2150-2056.

[3] Tsuchiya H,Tomita K,Mori Y,et al. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy[J]. Clin Orthop,1999;358(1):27-35.

[4] Khanna C,Prehn J,Yeung C,et al. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential[J]. Clin Exp. Metastasis,2000;18(26):261-271.

[5] Bruland OS.,Pihl A. On the current management of osteosarcoma. A critical evaluation and a proposal for a modified treatment strategy[J]. Eur. J. Cancer,1997;3(3):1725-1731.

[6] Hanahan D,Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell,2000;100(1):57-70.

[7] Samid D,Mandler R. Human osteosarcoma cells transformed by ras-oncogenes:a new model for in vivo studies of pulmonary metastasis[J]. Clin Biol,1989;1:21-26.

[8] Mandler R,Rimoldi D,Kariko K,et al. Urokinase-type plasminogen activator in experimental metastasis of human osteosarcoma cells[J]. Cancer J,1991;4(5):316-321.

[9] Luu HH,Kang Q,Park JK,et al. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis[J]. Clin Exp Metastasis,2005;22(4):319-329.

[10] Fukaya Y,Ishiguro N,Senga T,et al. A role for PI3K-Akt signaling in pulmonary metastatic nodule formation of the osteosarcoma cell line,LM8[J]. Oncol Rep,2005;14(4):847-852.

[11] Jia SF,Worth LL,Kleinerman ES. A nude mouse model of human osteosarcoma lung metastases for evaluating new therapeutic strategies[J]. Clin Exp Metastasis,1999;17(6):501-506.

[12] Barroga EF,Kadosawa T,Okumura M,et al. Establishment and characterization of the growth and pulmonary metastasis of a highly lung metastasizing cell line from canine osteosarcoma in nude mice [J]. J Vet Med Sci,1999;61(4):361-367.

[13] 杨 宁,范清宇,殷剑宁,等. 完整瘤组织块原位移植法建立人成骨肉瘤转移模型[J]. 癌症,2000;19(10):843-846.

[14] Martin TJ,Ingleton PM,Underwood JC,et al. Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma[J]. Nature,1976;260(5550):436-438.

[15] Fisher JL,Mackie PS,Howard ML,et al. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma:An in vivo mouse model[J]. Clin Cancer Res,2001;7(6):1654-1660.

[16] 李 艳,向理科,罗 娟,等.原位异种移植性骨肉瘤的动物模型及生物学特性的初步观察[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(2):137-140.

[17] 郝新保,范清宇. 大鼠移植骨肉瘤动物模型的建立及初步评价[J]. 中国比较医学杂志,2004;14(6):329-331.

[18] 于 哲,范清宇,郝新保. 骨肉瘤肺转移大鼠模型的建立[J]. 中国临床康复,2004;8(20):4048-4049.

[19] 李 艳,向理科,罗 娟,等. 大鼠原位移植性骨肉瘤模型的建立及生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志,2006;16(11):645-648.