维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0137-04

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

李 艳[1],向理科[2],罗 娟[3],王智彪[4]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院病理科,重庆 400014;2. 重庆医科大学病理学教研室,重庆 400016;
3. 浙江省肿瘤医院病理科,杭州 310022;4. 重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立大鼠 UMR106 骨肉瘤细胞株的裸鼠原位移植模型。方法:采用完整瘤组织块原位移植到裸鼠右胫骨骺端,分不同时期处死,观察其生长及转移特性。结果:肿瘤原位移植成功率为 100%,移植后 1~2w 从髓内向髓外生长,3w 已侵犯髓外软组织并有明显骨皮质破坏,4~5w 有肺转移,6w 左右裸鼠出现恶病质,且双肺广泛转移,最终全身衰竭死亡。结论:该模型成功率高,模拟了人类骨肉瘤临床发病和发展过程,可作为研究骨肉瘤较理想的模型。

【关键词】骨肉瘤;裸鼠;原位移植
【中国图书分类法分类号】R730.59 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-05

A model of rat osteosarcoma in nude mice using orthotopic implantation and studies on its biological characteristics

LI Yan, et al

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

【Abstract】***Objective:*** To establish a model of rat osteosarcoma in nude mice and to study its biological characteristics. ***Methods:*** Intact tumor pieces were inoculated into the right tibia of nude mice. The nude mice were killed at different time and the growth of tumor and metastasis were observed. ***Result:*** The tumor growth rate was 100%. From the first week to the second week after implantation it grew into outer tissue from tibia, and widely invaded Soft tissue on the third week. Pulmonary metastasis took place from the fourth week to the fifth week, and the nude mice died of cachexia and respiratory failure resulting from the widely whole pulmonary metastasis on the sixth week or so. ***Conclusion:*** The tumor growth rate is high. The model simulates the clinical process of human osteosarcoma, and could be a satisfactory model for studying osteosarcoma.

【Key words】Osteosarcoma; Nude mice; Orthotopic implantation

骨肉瘤是危害青少年的恶性肿瘤之一,多数需要截肢治疗,给患者身心带来很大痛苦。近年,随着人们对生活质量要求的提高,保肢治疗成为研究热点。骨肉瘤模型的建立是进行临床治疗研究的基础,我们模拟骨肉瘤的好发年龄、生长部位,用 SD 大鼠的 UMR106 骨肉瘤细胞株成瘤后,原位植入裸鼠骨髓腔中建立 UMR106 原位异种移植骨肉瘤模型,观察其浸润和转移规律。

1 材料与方法

作者介绍:李 艳(1976-),女,医师,硕士,
主要研究方向:骨肿瘤的病理学研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171060),本研究实验条件和经费由重庆医科大学生物医学工程系提供。

1.1 实验动物及细胞株

BALB/cA Nu/Nu 裸鼠 12 只(购自中科院上海实验动物中心),在恒温(25~27℃)、恒湿(45%~50%)半屏障系统环境下饲养。鼠龄 3w,体重 15g~18g,雌性。每次实验前以速眠新Ⅱ 0.02ml/只麻醉动物。SD 大鼠 UMR106 骨肉瘤细胞株(购自北京医科大学),培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.2 瘤鼠制备和原位移植

取对数生长期 UMR106 细胞以 10^6/0.2ml 细胞数接种于裸鼠右臀皮下,2w 后形成约 1.8cm × 2.0cm × 1.0cm 的肿瘤。常规无菌操作剥离肿瘤,将其剪成 0.5mm³ 大小的瘤块,置于无血清 1640 中备用,用前在生理盐水中漂洗。

原位移植在超净台上进行。裸鼠麻醉后固定于已高温消毒的手术板上,常规消毒右下肢,在右胫骨骺端作内侧切口,分离皮下组织暴露好骨面后,用直径 1mm 克氏针在骺端下方 5mm 处轻轻钻入骨髓腔(有明显落空感),然后用 12 号

维普资讯 http://www.cqvip.com

输血针头沿此孔斜钻入髓腔，挖取其中骨髓，形成一倾斜通道，取 2~3 个瘤块，在放大镜直视下植入骨髓腔，骨蜡封口，依次缝合肌膜、皮肤，常规消毒切口，送回饲养笼中观察。

1.3 病理学检查

将模型鼠分 1~6w 处死，每周处死 2 只，详细解剖检查原位移植后肿瘤的生长侵袭和转移情况。原位骨肉瘤、肺及其它可疑脏器均经 10%中性福尔马林固定，石蜡切片，HE 染色检查。

1.4 肿瘤生长体积变化

移植后每隔 1w 测量肿瘤相互垂直的两直径 D_1 和 D_2，按公式 $V = 4/3\pi[1/4(D_1+D_2)]^3$ 计算体积后绘制生长曲线图。

2 结 果

2.1 裸鼠移植成功率及大体观察

肿瘤移植成功率为 100%，荷瘤裸鼠的自然生存期为 6w 左右。原位肿瘤、肺转移、体格状况等大体观察详见表 1。原位肿瘤（移植后 5w）、肺转移瘤（移植后 6w）分别见图 1、图 2。

2.2 光镜

接种前倒置显微镜下观察，细胞形态呈多边形、梭形，细胞分裂相较多。移植后 1w 肿瘤在髓内生长，并开始穿破骨皮质。光镜下：瘤细胞弥漫性生长，细胞体积大，大小不一、深染，核圆形或卵圆形，核浆比例大，核膜清楚，核仁清晰可见，病理性核分裂相多，细胞间质少，呈肉瘤特性（图 3）。2w 肿瘤细胞破坏骨皮质向髓外生长，无骨样基质产生。3w 肿瘤细胞破坏骨皮质明显，并侵犯软组织（图 4），



图 1 原位移植后 5w 裸鼠右胫呈球形肿大，肿瘤有分叶，瘤区皮下血管明显扩张，皮肤变红。

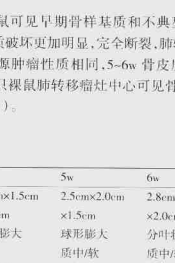


图 2 原位移植后 6w 裸鼠双肺广泛瘤转移

其中 4 只裸鼠可见早期骨样基质和不典型骨样基质。4w 骨皮质破坏更加明显，完全断裂，肺转移瘤细胞与髓腔来源肿瘤性质相同，5~6w 骨皮质严重破坏、其中 2 只裸鼠肺转移瘤灶中心可见骨基质，呈鹿角状（图 5）。

表 1 裸鼠骨肉瘤的大体观察

		1w	2w	3w	4w	5w	6w
原位肿瘤	大小	0.1cm×0.1cm×0.1cm	0.3cm×0.3cm×0.3cm	0.8cm×0.5cm×0.2cm	2.0cm×1.5cm×1.3cm	2.5cm×2.0cm×1.5cm	2.8cm×2.5cm×2.0cm
	形状	小米粒状	降起物	降起物	梭形膨大	球形膨大	分叶状球形
	质地	质中	质中	质硝硬	质中	质中/软	质中/软
	颜色	鱼肉状	鱼肉状	鱼肉状	鱼肉状	鱼肉状	鱼肉状
	瘤区毛细血管或小血管	放射状排列，扩张	迂曲扩张	扩张明显	迂曲扩张更明显	血管丰富	血管丰富
切面情况	骨皮质	无破坏	无破坏	似见破坏断裂	严重破坏髓腔变小	胫骨变形髓腔消失	完全破坏
	出血坏死			有	明显	更加明显	更加明显
肺	有无转移瘤结节直径	无	无	无	肺边缘有转移瘤 0.5mm	多个转移灶 0.1cm 左右	广泛转移 0.1~0.3 cm
体格状况		精神好	无消瘦	无消瘦	有消瘦	明显消瘦精神萎靡	死亡

维普资讯 http://www.cqvip.com

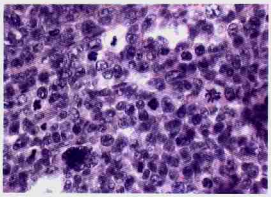


图 3 裸鼠原位移植后骨肉瘤细胞，瘤细胞弥漫性生长，异型性明显，出现瘤巨细胞，病理核裂像多，HE×400

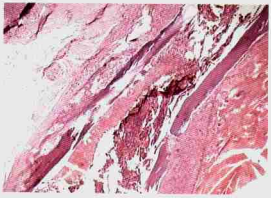


图 4 肿瘤组织破坏骨皮质，侵犯周围软组织，HE×40

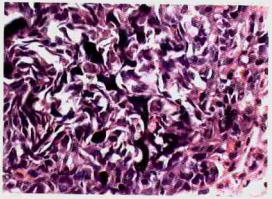


图 5 裸鼠肺内转移的骨肉瘤细胞，可见鹿角状骨基质形成，HE×200

2.3 肿瘤生长曲线

肿瘤生长呈逐渐增大趋势，尤其是第 3w 开始肿瘤生长明显加快，第 4w 开始肿瘤膨大异常明显，说明瘤细胞的生成远大于丢失。随着肿瘤体积的增大，裸鼠渐发生恶病质并日益加重，最终全身衰竭死亡（图 6）。

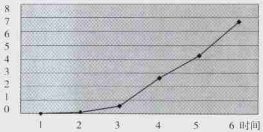


图 6 原位肿瘤体积大小与时间的关系

3 讨 论

骨肉瘤是一种好发于青少年的原发性恶性肿瘤，尽管现在保肢治疗已经大大提高了患者的生存质量，但仍有很多患者死于肺转移。为了找到更好的治疗方法，动物模型的建立就变得至关重要，骨肿瘤的动物模型的制作可通过化学诱导、放射性核素诱导、病毒诱导、移植法等。

近年来引人注目的是原位移植法，即将肿瘤细胞移植到与肿瘤原发部位相似的组织或脏器中[1]。目前国内外已有少数报道，陈永裕等[2]用人成骨肉瘤细胞 HOS-8603 悬液注射到裸鼠股骨髓腔内建立了骨肉瘤动物模型。另有研究者[3]也采用常位移植法将人骨肉瘤植入到裸鼠股骨下段，结果虽不及上述研究理想（成瘤率仅为 6%），但也在探索骨肿瘤的生物学特性和实验性治疗方面提供了宝贵经验。近年，潘朔晖等[4]借助显微外科手术将瘤组织块原位植入裸鼠胫骨髓腔内，建立了人骨肉瘤自发性高肺转移性模型，成瘤率为 100%，肺转移率高达 80%。另外，杨宁等[5]采用人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 瘤组织块原位植入裸鼠胫骨，结果显示成瘤率 100%，自发性肺转移率也高达 100%，肝转移率为 30%，影像学与组织学检查均与人成骨肉瘤临床情况相似，是一个较为理想的骨肉瘤动物模型。司海鹏等[6]采用原位移植法成功建立了兔 VX2 骨肿瘤模型，成瘤率 100%，3~4w 时出现肺转移，不失为理想的模型之一。在国外，1997 年 Crmalic 等[7]将人胫骨骨肉瘤培养至第 32 代后取组织学上完整的瘤块植入 31 只裸鼠胫骨近端，结果 2w 内全部致瘤，肿瘤影像学、组织学及生物学特性与原供瘤者相似，肺转移率 100%，淋巴结转移率 48%，肝转移率 19%，是研究骨肿瘤的较好模型。同时上述研究也表明不同的肿瘤细胞系建立的动物模型的生物学特性是不完全相同的。UMR106 骨肉瘤细胞株在以往的研究中

维普资讯 http://www.cqvip.com

多采用皮下或肌肉移植[8,9]，国外有学者将此肿瘤细胞悬液注入裸鼠髓腔中成功形成骨肉瘤模型[10]，国内少见有正位移植的报道。本实验采用 UMR106 骨肉瘤细胞株培养后在裸鼠形成的皮下瘤块，移植在裸鼠的胫骨骺端髓腔中，形成原发移植性骨肉瘤模型，并观察其不同于其它肿瘤的生物学特性。

UMR106 是一个从 SD 大鼠体内分离而来的骨肉瘤细胞株，具有成骨性肿瘤细胞的特点，该细胞株的原单位一直用于细胞培养从未进行过动物实验的研究。在本实验中显示该细胞株易于传代，在裸鼠体内生长具有恶性肿瘤侵袭、转移等生物学特性。本实验建立的骨肉瘤模型，在移植后 1w 即在髓腔中生长并向腔外侵袭；2w 可在胫骨骺端见一明显包块，骨皮质有破坏；3w 骺端明显膨大，骨皮质破坏更明显；4w 裸鼠有肺转移和跛行；5w 整个下肢球形膨大，行走不便，下肢受肿瘤压迫可发生坏疽；6w 裸鼠有明显的恶病质，双肺有广泛的瘤转移，呼吸急促，最终全身衰竭死亡；这与人类骨肉瘤的临床发生发展过程非常相似。另外，本实验中对 4~6w 的 6 只裸鼠进行了 X 片检测，发现骨皮质均有不同程度的破坏。

肿瘤在形成过程中有明显的分叶现象，肿瘤呈鱼肉状，质软，镜下肿瘤细胞浸润性生长，瘤细胞有明显异型性，形态多样，可呈多角形、梭形等，并可见丰富的毛细血管及小血管。肿瘤组织周围有大量淋巴细胞浸润，少量纤维组织增生，至于何种淋巴细胞类型尚需进一步确认。

肿瘤样骨基质是确诊骨肉瘤的关键，找不到也不能完全否定该瘤的诊断[11]。本模型中部分动物原位发现早期幼稚的骨样基质和不典型的骨基质，2 只裸鼠在移植后 6w 的肺转移灶中找到了典型的肿瘤样骨基质，其它动物原发部位未形成骨基质尚需进一步探讨，推测可能与动物的个体差异、肿瘤细胞的异质性和生长时间有关。

总之，该模型具有 100%成瘤率和首发肺转移特性，实验周期短，并与人类骨肉瘤演变发展过程相似，肿瘤增殖能力稳定，是进行骨肉瘤相关研究的良好模型。

参 考 文 献

[1] 杨彩虹，曾 恒，陈安民.骨肉瘤动物模型研究的进展[J]. 中华实验外科杂志，2000;17(2):108~181.

[2] 陈永裕，刘振华，徐登仁，等.裸鼠人成骨肉瘤骨模型的建立[J]. 第二军医大学学报，1990;11(6):495~497.

[3] 沈靖南，王连唐，魏献忠，等.人骨肉瘤在裸鼠常位移植的研究[J]. 中华实验外科杂志，1994;11(5):291~292.

[4] 潘朝晖，范清宇，殷剑宁，等.人骨肉瘤自发性高肺转移模型的建立及其它生物学特性初探 [J]. 第四军医大学学报，2000;21(1):509~511.

[5] 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.

[6] 司海鹏，向理科，孙保勇，等.移植性骨肿瘤模型的生物学特性[J]. 实用医学杂志，2003;19(2):122~123.

[7] Crnalic S, Hakasson I, Boqnist L, et al. A novel spontaneous metastasis model human ostosarcoma developed using orthotopic transplantation of intact tumor tissue into tibia of nude mice [J]. Clin Exp Metastasis, 1997;15:164~172.

[8] 卢 平，冯传汉，郭钤新.人成骨肉瘤的裸鼠移植瘤[J]. 科学通报，1986;8:627~629.

[9] 郝新保，范清宇，张殿忠，等.巨噬细胞融合疫苗对大鼠骨肉瘤的主动性免疫治疗[J].第四军医大学学报，1999;20(12):1042~1044.

[10] Jane Lisette Fisher, Peter Scott Mackie, Monique Louise Howard. The Expression of the Urokinase Plasminogen Activator System in Metastatic Murine Osteosarcoma: An in Vivo Mouse Model [J]. Clinical Cancer Research, 2001;7:1654~1660.

[11].高奉渌，李增鹏，苏 红.骨肉瘤病理组织学特点和免疫组织化学的研究[J].第三军医大学学报，1993;15:223~227.