维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0204-04

移植性人白血病小鼠模型的建立

陈地龙,李 静,刘永刚,王亚平,王建伟,郑 敏,姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立移植性人白血病重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠模型,探讨人白血病细胞在 SCID 小鼠体内的生物学行为,为研究药物等因素治疗白血病的体内方法奠定基础。方法:在 SCID 小鼠腹腔或静脉分别接种 $5\times10^6\sim1\times10^7$ 个 K562 细胞,应用组织细胞化学、RT-PCR、流式细胞术、组织病理监测 SCID 小鼠的外周血、骨髓、肝脏、脾脏的白血病细胞。结果:K562 细胞经静脉或腹腔途径均可植入 SCID 小鼠体内,形成白血病模型;3w 时外周血即可见白血病细胞,肝、脾脏增生期细胞达 40.11%、41.66%;发病晚期,模型动物骨髓细胞中 CD_{13}^+ 细胞占 10.15%;接种 K562 细胞后能检测到人 DQα,ABL-BCR 基因,接种 K562 细胞后 3~4w 即可见白血病细胞累及肝、脾、肾、骨髓等主要脏器。结论:SCID 小鼠接种 K562 白血病细胞能成功建立白血病动物模型,CD13 阳性率能快速、客观地判断模型中肿瘤细胞浸润程度。

【关键词】K562 细胞;SCID 小鼠;动物模型

【中国图书分类法分类号】R733 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-15

Establishment of human leukemia model by transplanting K562 cells into SCID mice

CHEN Dilong, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the transplanted leukemia severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model and to explore the biological action of human leukemic cells in SCID mice. *Methods*: $5\times10^6\sim1\times10^7$ K562 cells were inoculated into the abdominal cavity or vein of SCID mice. Immunocytochemistry, RT-PCR, flow cytometry and histopathology were used to detect the leukemic cells in the peripheral blood, bone marrow, liver and spleen of SCID mice. *Results*: K562 cells could be transplanted into SCID mice through abdominal cavity or vein, and leukemia animal model was successfully established. 3 weeks after transplantation, the leukemia cells could be found in the peripheral blood, The proliferation phase cells in the liver and spleen reached 40.11% and 41.66% respectively. In the terminal stage, the CD_{13}^+ cells accounted for 10.15% of bone marrow cells in model animal. The DQα and ABL-BCR genes could be detected after injection of K562 cells, and 3 to 4 weeks after injection, the leukemic cells spread to the liver, spleen, kidney, bone marrow, and so on. *Conclusion*: The leukemia animal model could be successfully established by transplanting K562 cells into SCID mice. Positive rate of CD_{13} might be used as the index of tumor cells infiltration.

【Key words】K562 cells; Severe combined immunodeficiency mice; Animal model

白血病是严重危害人类生命健康的造血系统恶性肿瘤,白血病的生物学特征是造血干细胞分化成熟受阻,异常分化的细胞大量增殖及正常凋亡机制的受抑。白血病细胞系的生物学特征与体内白血病细胞存在差异,有关研究大多是在体外培养细胞系上进行的,但后者难以反映体内白血病细胞生物学行为的真正面目[1,2]。因此利用白血病动物模型进行实验能对研究白血病细胞的体内诱导分化提供更确切的帮助。本研究采用重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠建立白血病动物模型。

作者介绍:陈地龙(1971-),男,博士,讲师,
主要研究方向:造血调控机理。

实 验 室:重庆市生物化学与分子药理学重点实验室。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 SCID 小鼠 雌性和雄性兼有,8~10 周龄,体重 18~22g,北京联合维通利华公司提供。SCID 小鼠在层流架内带盖鼠盒中饲养(符合 SPF 标准)。饮用水经酸化处理 pH4~5,标准颗粒饲料加复合维生素 B、瓜子、鸡蛋、垫料,室

维普资讯 http://www.cqvip.com

内空气经中效过滤，一切与鼠接触物品均灭菌处理。

1.1.2 人白血病细胞株(K562) 本室常规传代培养，采用对数生长期的细胞做动物体内移植。

1.1.3 主要药品及试剂 RPMI-1640 培养基，IMDM 培养基：美国 GIBCO 公司产品；小牛血清(BS)：杭州四季清公司；小鼠抗人 CD13 单克隆抗体、DAB 试剂盒：北京中山生物技术有限公司产品；DEPC、Trizol：Sigma 公司；AMV 逆转录酶，Ex taq 酶：Takara 公司；DQa、BCR－ABL 引物合成：华美生物公司。

1.2 方法

1.2.1 移植 SCID 小鼠腹腔连续两天注射环磷酰胺(CTX) 2mg/只，每天注射 1 次，第 3 天取对数生长期 K562 细胞用于移植，以尾静脉一次性注射 5×10^6 个/只。

1.2.2 外周血白细胞计数及分类 接种前和接种后 1w、2w、3w、4w 或病程后期，分别取尾静脉血计数白细胞总数，并制备血涂片，经瑞氏染色，油镜下分类、计数。

1.2.3 RT－PCR 检测白血病细胞

1.2.3.1 总 RNA 提取 所有器具均经 DEPC 浸泡处理，并灭菌。

外周血细胞：取 SCID 小鼠眼眶(内眦)静脉血 1ml，用 DEPC 处理过的冰冷 PBS 洗涤 2 次；每 1×10^6 细胞加入 1ml Trizol，提取 RNA，28S、18S 两条带清晰，OD260/OD280 = 1.840；RNA 置于 −70℃待用。

组织：每只 SCID 小鼠取肝、脾、肾等组织各 100mg，迅速置入液氮中；从液氮中取出组织块，置于匀浆器中，每 100mg 组织加入 1ml Trizol，快速匀浆；Trizol 法提取组织 RNA28S、18S 两条带清晰，OD260/OD280=1.840；RNA 置于 −70℃待用。

1.2.3.2 逆转录反应(RT) 从 −70℃取出 RNA 进行反应。

参数：30℃ 10min，42℃ 30min，99℃ 5min，5℃ 5min

1.2.3.3 PCR 引物序列

ABL：上游：5′ GGT CCT gga cag cac cga 3′

下游：5′ TCA TTT CGT TCA CCG AAC TGA 3′

BCR 上游：5′ GGT GTC GGA CCG CAT CAG 3′

下游：5′ TGG CGT CGA TCA CGT TCT C 3′

DQa 上游：5′ GCA TCT TTG GTT TGG GTT ATG 3′

下游：5′ ACG CAG ATC ATC GAA ACG TC 3′

参数：94℃ 5min，预变性，94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 1min，30 次循环，72℃延伸 10min。

1.2.3.4 凝胶成像分析系统进行成像分析。

1.2.4 流式细胞术(FCM)检测 CD_{13} 阳性率 取外周血、骨髓、肝、脾、肾的细胞 PBS 洗涤 2 次(骨髓、肝、脾、肾的组织块采取研磨离心分离纯化细胞)，加入抗人 CD_{13} 第一抗体，4℃孵育 40 min，PBS 洗涤 2 次，沉淀加 FITC 标记二抗 20μl 混匀，4℃暗盒孵育 60 min，PBS 洗涤 1 次，沉淀加 PBS 200 ml 混匀后上样。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 取正常 SCID 小鼠、白血病模型小鼠肝、脾细胞、骨髓，制成单细胞悬液，经 PBS 洗 2 次，加碘化丙啶(PAPI)和 SRI01 工作液，40℃避光染色 30min，流式细胞仪检测，Midfilt 软件分析细胞周期分布。

1.2.6 病理学检查 取肝、脾、肾、肺、脑及肿瘤实体，以 10%甲醛固定 48h 以上，石蜡包埋切片，H.E 染色后进行光镜观察。

1.2.7 免疫组织化学检查 取肝、脾、肺、肿瘤块、肾脏、睾丸(卵巢)，以 10%中性福尔马林固定 24h 以上，石蜡切片，或者新鲜组织冰冻切片。骨髓可直接涂片。分别作直接病理读片和采用 CD_{13} 抗体免疫组织化学反应，观察白血病细胞浸润分布情况。

2 结 果

2.1 发病情况

SCID 小鼠在接种 K562 细胞 30 天后均发生白血病(图 1、表 1)，表现为动物皮毛起皱、萎靡少动、步态不稳，侧偏或转圈。经腹腔接种者可见腹部降起明显，并有肿块形成，随肿块增大体重减轻，脾脏肿大，雄性小鼠受累睾丸红、肿。经静脉注射者可出现偏瘫现象。白血病 SCID 小鼠存活时间为 32～45 天。



图 1 移植性人白血病重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠模型

表 1 K562 细胞移植 SCID 小鼠发病情况($x\pm s$，$n=5$)

接种 SCID 小鼠数	接种 K562 细胞数	接种途径	发病 SCID 小鼠数 *
2	1×10^7	iv	2
2	5×10^6	ip	2
2	1×10^7	ip	2
2	5×10^6	iv	2
4	1×10^7	iv	4

* 以出现临床症状，RT－PCR 在外周血检测到 DQa、BCR－ABL 基因为发病

2.2 外周血象

接种 K562 细胞的 SCID 小鼠外周血象在疾病早期无明显变化，第 18 天白细胞数略有升高，且可

维普资讯 http://www.cqvip.com

检测到 1% ~ 4% 人早幼粒白血病细胞，病程后期，白细胞明显增高，血涂片检查人早幼粒白血病细胞占 3% ~ 13%（表 2，图 2 和 3）。

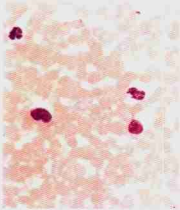


图 2 SCID 小鼠外周血象（瑞氏染色×200）

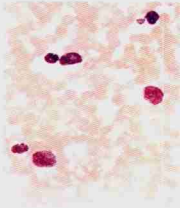


图 3 白血病模型 SCID 小鼠外周血象（瑞氏染色×200）

2.3 细胞周期分布

对照组 SCID 小鼠肝、脾组织处于增生期（G_2+M+S）的细胞占 28.61%、22.44%，实验组肝、脾组织增生期细胞达 40.11%、41.66%（表 3）。

2.4 SCID 小鼠骨髓细胞 CD_{13} 表达情况

对照组 SCID 小鼠骨髓 CD_{13} 细胞所占比例为 1.44%，实验组骨髓 CD_{13} 细胞所占比例为 10.15%，两者相比有统计学意义，$P<0.01$（图 4）。

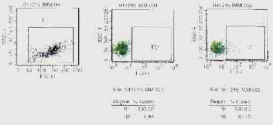


图 4 白血病 SCID 小鼠骨髓细胞 CD_{13} 表达情况

1. 对照组 SCID 小鼠骨髓细胞 CD_{13} 表达情况
2. 模型组 SCID 小鼠骨髓细胞 CD_{13} 表达情况

2.5 K562 细胞在 SCID 小鼠致白血病累及脏器情况

对照组 SCID 小鼠肝、脾、肾、骨髓、外周血未发现有 K562 细胞特有癌基因 DQα，ABL-BCR。实验组接种 K562 细胞 3~4w 后，在肝、脾、骨髓及外周血即可见 DQα，ABL-BCR 的表达（图 5~7）。

表 2 K562 细胞移植 SCID 小鼠外周血白细胞（$\bar{x}\pm s$，n=5）

	接种 K562 细胞时间（w）				
	0	1	2	3	4
白细胞总数（10^9/L）	4.15±0.77	4.33±0.91	4.75±0.65	7.65±1.24*	9.86±1.32**
中性粒细胞（%）	70±9	67±7	71±8	80±8*	82±9**
淋巴细胞（%）	30±10	33±8	29±6	16±5*	8±2**
K562 细胞（%）	0	0	0	3.9±1*	

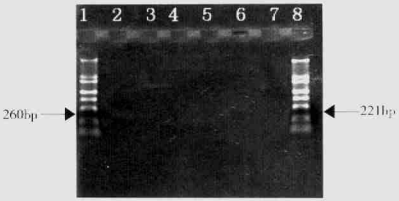
与接种 K562 细胞 0w 比较：* P<0.05 ** P<0.01

表 3 K562 细胞移植 SCID 小鼠肝、脾细胞周期分布（$\bar{x}\pm s$，n=3）

	细胞周期分布（%）			
	对照组		实验组	
	肝	脾	肝	脾
G_0/G_1	71.33±0.8	77.6±1.3	61.43±3.2*	58.34±2.8*
S	25.53±6.43	5.38±1.23	36.97±3.87*	8.96±1.6*
G_2 +M	3.09±0.86	17.06±3.25	1.99±0.32*	32.70±11.3*
G_2 +M+ S	28.61±1.57	22.44±2.43	40.11±0.86*	41.66±4.7*

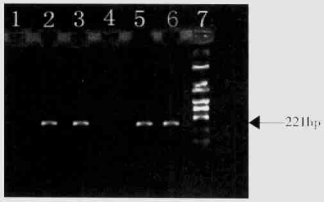
与对照组比较 * P<0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com



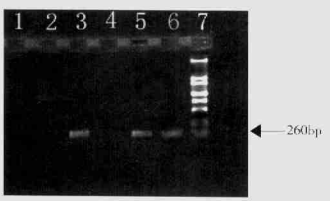
1.DNA marker 2.空白对照 3.骨髓 4.肝
5.肾 6.脾 7.外周血 8.DNA marker

图 5 对照组 SCID 小鼠 DQα、ABL-BCR 的表达



1.空白对照 2.骨髓 3.肝 4.肾
5.脾 6.外周血 7.DNA marker

图 6 接种 K562 细胞后 SCID 小鼠 DQα 的表达



1.空白对照 2.骨髓 3.肝 4.肾
5.脾 6.外周血 7.DNA marker

图 7 接种 K562 细胞后 SCID 小鼠 ABL-BCR 的表达

2.6 病理学检查

接种 K562 细胞的 SCID 小鼠，在肺、腹腔内形成实体肿瘤块，可见腹水、主要累及肝、肺、脾、肾、睾丸等。组织切片、免疫组织化学染色发现瘤块组织显示 CD_{13} 表达升高，胞膜及胞浆中见棕褐色颗粒，在肝、脾、肺、肾等器官内有瘤细胞浸润，以脾脏更明显。在发病晚期，接种 5×10^6 K562 细胞的 SCID 小鼠，肺细胞中 CD_{13}^+ 细胞占 38%，肝脏细胞中 CD_{13}^+ 细胞占 29%；其脾脏细胞中 CD_{13}^+ 细胞占 41%（表 4）。

表 4 白血病模型 SCID 小鼠肝、脾、肺中 CD_{13} 细胞表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=5）

CD_{13} 细胞（%）	接种 K562 细胞时间（w）		
	0	3	4
脾	10±2	25±4*	41±7**
肝	9±1	16±4*	29±4*
肺	14±4	31±6*	38±8*

与对照组相比 * P<0.05 ** P<0.01

3 讨 论

SCID 小鼠首先是在 CB-17 近交系小鼠中发现，因具有与人类重症联合免疫缺陷相似的生物学特征而得名，系 16 号染色体隐性突变所致，这种突变严重损害 T、B 细胞共用的重组酶系统，表现为严重缺乏功能成熟的 T、B 淋巴细胞，可作为异种细胞移植良好的研究工具。由于 SCID 小鼠的 NK 细胞、K 细胞活性和非特异性免疫活性仍然很高，为减轻非特异性免疫排斥反应，通常在接种细胞前给予小鼠腹腔连续两天注射环磷酰胺（CTX）2mg 或整体放射线处理[1-3]。本实验在接种 K562 细胞前给予小鼠腹腔连续两天注射环磷酰胺（CTX）2mg，移植 K562 细胞，3w 左右出现白血病症状，外周血光镜下即可见白血病细胞浸润、腹腔接种可在腹腔内形成实体瘤且向周围组织播散；静脉接种表现为全身白血病，可如实反映临床急性髓性白血病发病快、全身弥漫性扩散的特点。

在人髓性白血病细胞系 K562，CD_{13} 表达阳性率极高，因而本实验选用人 CD_{13} 阳性率作为判断肿瘤细胞浸润指标。本实验发现，接种人白血病细胞 K562 的 SCID 小鼠模型中，脾脏增生期细胞达 40.66%，肝脏的增生期细胞达 38.96%。流式细胞术检测 SCID 小鼠骨髓细胞中 CD_{13} 的阳性表达明显增加。

慢性髓性白血病(chronic myeloid leukemia,CML)是骨髓造血干细胞恶性克隆增生性疾病，约 95% CML 可出现费城染色体(Ph')，它是由位于人类正常 9 号染色体的原癌基因 c-abl 置换到 22 号染色体的 bcr 基因上所形成新的基因嵌合体。bcr-abl 融合基因编码的蛋白具有增强的酪氨酸激酶活性，后者通过激活信号传导途径，导致细胞生长和分化失控，在 CML 的病理过程中起重要作用。Ph 染色体及其融合基因 bcr-abl 作为 CML 特征性的细胞遗传学和基因标志物，在 CML 的诊断、 （下转第 230 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

前的研究认为羊膜 FasL 表达增加，诱导羊膜上皮细胞的凋亡，导致胎膜早破[3,4]。

细胞的凋亡与细胞生长因子有密切关系。羊膜上皮细胞为不稳定细胞，总在不断地增殖，以代替衰亡或破坏的细胞，这些细胞的更新过程中，有重要细胞生长因子如 EGF、bFGF、TGF-β 等的参与。

EGF 的体外作用是促细胞生长，作用于创伤修复的细胞有角化细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞。尚未有研究 EGF 对 HAEC 的影响。该实验加入 EGF 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数较对照组明显减少（$P<0.05$）。

bFGF 广泛存在于脑、肾、肾上腺、黄体等许多组织，几乎可刺激所有间叶细胞，但主要作用于内皮细胞，尤其在毛细血管的新生过程中，能使内皮细胞分裂并诱导其产生蛋白溶解酶，溶解基膜，便于内皮细胞穿越生芽。该实验加入 bFGF 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数也较对照组明显减少（$P<0.05$）。

TGF-β 对于不同的组织及细胞呈现不同的作用，即增殖或凋亡，该实验加入 TGF-β_1 后，纤维蛋白支架上培养的羊膜上皮细胞凋亡指数较对照组明显增加（$P<0.05$）。

本实验提示：HAEC 能够在体外构建的纤维蛋白支架上良好生长，而添加 EGF 和 bFGF 可减少 HAEC 的凋亡，从而为临床上纤维蛋白支架联合细胞生长因子修复 PPROM 破口提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] 漆洪波，李 玮，孙江川，等.体外构建纤维蛋白支架封闭胎膜破口的研究 [J]. 中国实用妇科与产科杂志，2005；21(6)：377-378.

[2] 王一飞，戴 云，刘杰生，等.含重组碱性成纤维细胞生长因子培养基中 3T3 成纤维细胞在血纤维蛋白凝块上生长的可能性 [J]. 中国病理生理杂志，2000；16(2)：97-101.

[3] Polzin WJ,Brady K.The etiology of premature rupture of the membranes[J]. Clinical obstetrics and Gynecology，1998；4(41)：810-816.

[4] Lockwood CJ,Kuczynski E.Markers of risk for preterm delivery [J]. Perinat Med,1999；27(1)：5-20.

（上接第 207 页） 疗效观察、预后判断中起重要作用[3~5]。DQα 基因系人特有的基因，本研究植入 SCID 小鼠系人白血病细胞，因此我们选择人 DQα 基因、白血病细胞 ABL-BCR 基因检测指标作为判断白血病模型成功与否。我们采用 RT-PCR 检测人 DQα 基因、白血病细胞 ABL-BCR 基因，发现 K562 细胞 3～4w 即可浸润肝、脾、肾、骨髓等主要脏器。接种 K562 细胞的 SCID 小鼠，病理学检查发现在腹腔内形成实体肿瘤块，可见腹水，主要累及肾、结肠、睾丸、背部肌肉及脊柱，组织切片发现瘤块组织的免疫组织化学显示 CD_{13} 强表达，胞膜及胞浆中见棕褐色颗粒，在肝、脾、肺内有瘤细胞浸润，以脾脏更明显（CD_{13} 强表达）。以静脉或腹腔接种建立人白血病细胞（K562）SCID 小鼠模型，骨髓检查发现小鼠接种 K562 细胞后，骨髓中大量肿瘤细胞增生，CD_{13} 阳性率达 41%；脾脏 CD_{13} 阳性率达 38%。因而以 CD_{13} 阳性率判断肿瘤细胞浸润指标能快速、客观地判断病情，且进一步可将此指标作为评价化疗药、生物抗瘤剂的体内疗效参数。以上结果表明，我们建立的 SCID 小鼠白血病（K562）模型是成功的，可以进行下一步的药理学研究。

参 考 文 献

[1] 聂小蒙，楼敬伟，王建民. SCID 小鼠 - 人白血病模型在白血病研究中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志，2003；11(1)：99-104.

[2] 林祥华，陈志哲，林景娟，等. 人白血病细胞重度联合免疫缺陷小鼠模型的建立和监测[J]. 福建医科大学学报，2002；36(4)：352-355.

[3] Ohsugi T, Horie R, Kumasaka T, et al. In vivo antitumor activity of the NF- {kappa} B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell [J]. leukemia Carcinogenesis，2005;29(4):14-18.

[4] Ninomiya M, Kiyoi H, Ito M, et al. Retinoic acid syndrome in NOD/scid mice induced by injecting an acute promyelocytic leukemia cell line [J]. Leukemia, 2004;18(3):442-448.

[5] Tomkinson B, Bendele R, Giles FJ, et al. OSI-211, a novel liposomal topoisomerase I inhibitor, is active in SCID mouse models of human AML and ALL [J]. Leuk Res, 2003;27(11):1039-1050.