基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000873

神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株接种 SD 幼鼠成瘤规律及其原因分析

张　旺，吕麟亚，王　珊，孔祥如，章　均，杨　娇
（重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨神经母细胞瘤荷瘤 SD 幼鼠成瘤规律及其原因分析。**方法**：以 3~4 周龄 SD 幼鼠为研究对象，随机分组为对照组（10 只）和实验组（45 只根据肿瘤生长情况，又再分成瘤组和非成瘤组）。每 2 d 观察并且测量各组生长指标，第 20 天处死动物后，计算各组胸腺、脾脏脏器指数；计算外周血淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$细胞数量变化；检测各组胸腺、脾脏组织中增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）、Caspase-3 蛋白的表达。**结果**：①45 只实验组 SD 幼鼠有 13 只成瘤，成瘤率为 31.1%。②胸腺脏器指数：成瘤组>对照组（$P<0.01$），非成瘤组>对照组（$P<0.01$），成瘤组与非成瘤组无统计学差异（$P>0.05$）；脾脏脏器指数在各组间无统计学差异（$P>0.05$）。③非成瘤组中 $CD3^+$、$CD8^+$细胞数量明显高于成瘤组（$P<0.01$），非成瘤组与对照组、成瘤组与对照组中 $CD3^+$、$CD8^+$细胞数量无统计学差异（$P>0.05$）；$CD4^+$在 3 组中无统计学差异（$P>0.05$）。④胸腺组织中 PCNA、Caspase-3 蛋白表达：成瘤组及非成瘤组胸腺 PCNA 表达较对照组增加（$P<0.05$），Caspase-3 表达较对照组降低（$P<0.05$），其中非成瘤组中 PCNA 较成瘤组明显增加（$P<0.05$），Caspase-3 表达明显降低（$P<0.05$）；在脾脏内 PCNA、Caspase-3 蛋白在各组中表达无统计学差异（$P>0.05$）。**结论**：①SD 幼鼠接种人神经母细胞瘤细胞后，其生长规律出现潜伏期、快速生长期、平台期、消退期的变化；②成瘤率及成瘤规律与幼鼠免疫器官反应有关系。

【关键词】SD 幼鼠；神经母细胞瘤；生长规律
【中图分类号】R726.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-22

Tumorigenic regularity of neuroblastoma SK-N-SH cells in SD immature rats and potential mechanism

Zhang Wang, Lü Linya, Wang Shan, Kong Xiangru, Zhang Jun, Yang Jiao
(Department of Surgical Oncology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing)

【Abstract】***Objective***: To explore tumorigenicity rules and cause of neuroblastoma in SD immature rats. ***Methods***: Immature SD rats of 3-4 weeks were taken as object of study and were randomly allocated into contrast group (n=10) and experimental group (n=45). After inoculating SK-N-SH cell suspension, rats were divided it into tumor group and non-tumor group. Growth indexes of all groups were observed and measured every 2 days until the animals being killed. Then viscera indexes of thymus and spleen in each group were calculated. Flow cytometry was used to calculate the number of positive cells of the peripheral blood lymphocyte subsets CD3, CD4 and CD8. Western blot was used to detect the expression of PCNA and Caspase-3 protein of thymus and spleen tissues in all groups. ***Results***: Among 45 SD immature rats of experimental group, 13 (31.1%) suffered from tumor. The weight of thymus in experimental group increased ($P<0.05$) and there was no statistical significance between tumor group and non-tumor group ($P>0.05$). The weight of spleen in experimental group was the same as that in control group ($P>0.05$). Flow cytometry was used to examine value of peripheral blood lymphocyte subsets CD3, CD4 and CD8. $CD3^+$ and $CD8^+$ content of non-tumor group was higher than that of tumor group ($P<0.05$). There was no difference between non-tumor group and contrast group and no difference between tumor group and contrast group ($P>0.05$). However, $CD4^+$ was different in the three groups ($P>0.05$). In thymus, expression of PCNA increased and expression of Caspase-3 decreased in experimental group ($P<0.05$). And both the PCNA and Caspase-3 were significantly different in non-tumor group from that in tumor group ($P<0.05$). In spleen the expression of Caspase-3 and PCNA in experi-

作者介绍：张　旺，Email：632212737@qq.com，研究方向：儿童肿瘤。
通信作者：吕麟亚，Email：1905469939@qq.com。
基金项目：国家临床重点专科建设项目资助（国卫办医函[2013]544）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160224.1440.004.html（2016-02-24）

mental group and control group were the same(P>0.05). ***Conclusion***: After being inoculated with human neuroblastoma cell lines, SD immature rats experiences incubation, rapid growth stage, platform stage and paracmasis. The tumor rate amd the tumorigenic regularity is in correlation with rats' immune organ reaction.

【Key words】SD immature rat; neuroblastoma; tumorigenic regularity

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是婴儿和儿童最常见颅外实体肿瘤，占儿童肿瘤 8%~10%，占肿瘤死亡人数 15%，严重影响着儿童健康[1-3]。神经母细胞瘤是复杂多样恶性肿瘤，一部分类型表现为高度恶性，但另一部分类型却具有自愈性，生物学行为非常特殊，其中免疫状态对肿瘤自限性有着重要作用。故利用荷瘤动物模型探讨肿瘤生物学行为以及为后期摸索治疗方法，一直是目前国内外研究热点。然而，目前国内外文献报道建模多采用免疫缺陷的裸鼠[4-8]，而对于具有正常免疫功能的 SD 幼鼠，虽有文献报道成功建立动物模型，但其成瘤后生长规律及其相关免疫应答情况报道较少。故本研究采用 SD 幼鼠建立神经母细胞瘤荷瘤动物模型，探讨其成瘤规律并分析相关原因，为本研究小组后期探讨治疗方法进行预实验，同时也为相似实验提供数据和参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 无特定病原体(SPF)级 SD 幼鼠 55 只，由重庆医科大学实验动物中心提供，体质量 50~70 g，年龄 3~4 周，雌雄不限。

1.1.2 细胞 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。

1.1.3 主要试剂 抗大鼠 CD3-TITC(货号：11-0030-81，产地：美国)、CD4-PE(货号：12-0040-80，产地：美国)、CD8-APC(货号：17-0084-82，产地：美国)荧光单抗购自美国 BD Biosciences 公司；Caspase-3 (货号：GTX100543-S, 产地：美国)、PCNA(货号：GTX100543-S，产地：美国)抗体购自美国 Genetex 公司。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞悬液制备 细胞株生长于 DMEM 培养基补充 10%胎牛血清(Hyclone 公司，美国)、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 U/ml)以及 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 SH-N-SH 细胞，用 0.25%胰酶(Hyclone 公司，美国)消化形成细胞悬液，计数并且调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

1.2.2 动物接种及分组 55 只 SD 幼鼠，随机编号为 1~55，每间隔 5 只选出 1 只，分为对照组(10 只)、实验组(45 只)。按照 0.3 ml/100 g 腹腔注射水合氯醛；麻醉满意后，抽取单细胞悬液 0.2 ml 接种于实验组右前肢腋下，对照组接种 0.2 ml 生理盐水。每 2 d 观察肿瘤生长情况，第 6 天发现肿瘤生长，再将实验组分为：成瘤组 13 只、非成瘤组 32 只。

1.2.3 测量瘤体生长指标及标本收集 每 2 d 测量肿瘤长径 a、短径 b，根据公式 $V=ab^2\times0.523\ 6$ 计算肿瘤体积；在第 20 天时处理各组动物如下：分别称取脾脏、胸腺质量，计算各个脏器指数(脏器质量/体质量 × 100%)；用 EDTA 抗凝管收集300 μl 血液，流式细胞仪计算外周血淋巴细胞亚群CD3、CD4、CD8 的变化情况；用预冷的冻存管收集胸腺、脾脏组织用于 Western blot 检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Caspase-3 蛋白表达情况。

1.2.4 Western blot 检测PCNA 及 Capsase-3 蛋白质表达 提取各组胸腺、脾脏总蛋白，用凯基 BCA 蛋白含量检测试剂盒(货号：KGPBCA，产地：中国)测定蛋白浓度，取 10 μg 经 10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离后，以 250 mA 恒电流转至 PVDF 膜上，室温下 5%脱脂牛奶封闭 1~2 h、TBS 洗膜 3次、加入大鼠抗β-actin(1:1 000 稀释，货号：CW0097A，产地：中国)、大鼠抗 PCNA(1:1 000 稀释)、大鼠抗 Caspase-3(1:1 000 稀释)，4 ℃过夜；洗膜后分别加入二抗山羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释，货号：ZF-2301，产地：中国)，室温孵育 1 h，ECL 发光。应用 Image J 软件分析条带的灰度值。

1.2.5 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$以及 $CD8^+$变化情况 收集 100 μl SD 幼鼠全血，加入 2 μl FITC anti-rat CD3，混匀后均分成 2 管，一只加入 2.5 μl IgG1 Control APC(货号：17-4714-41，产地：美国)和 2.5 μl IgG2 Control PE 货号：12-4724-41，产地：美国)，另一支加入 2.5ul PE anti-rat CD4 和 2.5ul APC anti-rat CD8，混匀后室温避光反应 30 min，加入红细胞裂解液(货号：C3702，产地，中国) 2 ml 反应 10~15 min 后离心(3 000 rpm，5 min)，弃上清，PBS 洗涤 1 次，加入 200 μl PBS 混匀后在流式细胞仪上检测。

1.3 统计分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析，计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两均数比较采用独立样本 t 检验，多组间分析采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 一般情况

接种 SK-N-SH 细胞株后第 6 天，在 SD 幼鼠接种部位触及结节为成瘤组，未触及结节为非成瘤组。45 只实验组中有 13 只成瘤，其成瘤率为 31.1%。

第 20 天时，解剖后，肿瘤呈粉色（图 1B），HE 染色切片光镜下可见细胞染色较深，形态不规则，排列紊乱，核染色质不均匀。病理切片证实为神经母细胞瘤。



A. 动物模型　　B. 肿瘤标本

图 1 成瘤组中肿瘤图

Fig.1 Tumor in tumor group

2.2 肿瘤生长曲线

每 2 天用游标卡尺（0.02 mm）测量肿瘤的长径 a（mm）、短径 b（mm），计算肿瘤体积，描绘成图 2。参考其它文献，我们将肿瘤生长曲线定义为：第 0~6 天为潜伏期，第 6~12 天为快速生长期，第 12~16 天为平台期，16 d 后为消退期。

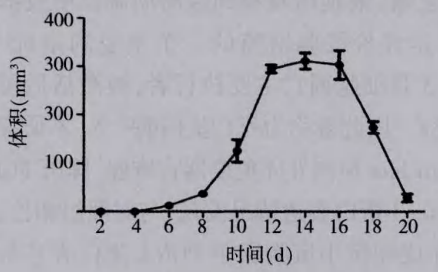
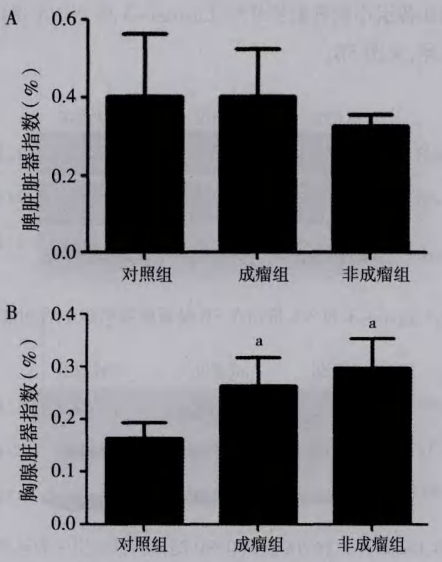


图 2 荷瘤 SD 幼鼠肿瘤生长曲线

Fig.2 Tumor growth curve in SD immature rats

2.3 脏器指数

在 20 d 时处死各组 SD 鼠，称取体质量（g），解剖外周免疫器官胸腺和脾脏，称取质量，计算脏器指数。如图 3A 所示：脾脏脏器指数在对照组（0.403 ± 0.160）%、成瘤组（0.403 ± 0.122）%和非成瘤组（0.327 ± 0.030）%中无统计学差异（F=1.883，P=0.168）。胸腺脏器指数中（图 3B）3 组间有统计学差异（F=22.457，P=0.000），成瘤组（0.265 ± 0.053）%和非成瘤组（0.299 ± 0.055）%明显高于对照组（0.165 ± 0.029）%（P<0.01）；而成瘤组与非成瘤组无差异（P>0.05）。



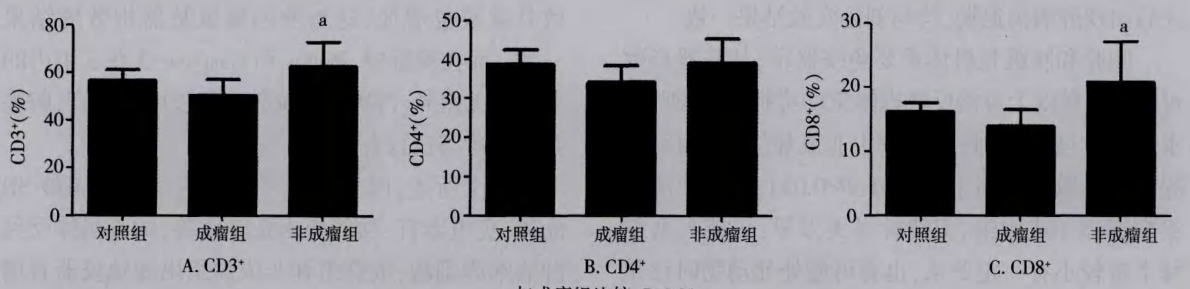
a，P<0.01，表示与对照组相比

图 3 SD 幼鼠胸腺、脾脏脏器指数

Fig.3 Viscera index of thymus and spleen

2.4 外周血淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$细胞数量变化

$CD3^+$（图 4A）在对照组、成瘤组和非成瘤组中分别为：（55.907 ± 4.720）%、（51.243 ± 5.140）%、（61.124 ± 7.661）%3 组间有统计学差异（F=8.576，P=0.001）。$CD8^+$（图 4C）在对照组、成瘤组和非成瘤组中分别为：（16.618 ± 2.459）%、（14.579 ± 2.183）%、（18.591 ± 2.924）%，3 组间有统计学差异（F=8.815，P=0.000）。非成瘤组中 $CD3^+$、$CD8^+$细胞数量明显高于成瘤组（P<0.01）；非成瘤组与对照组、成瘤组与对照组中 $CD3^+$、$CD8^+$细胞数量无差异（P>0.05）。$CD4^+$（图 4B）在对照组（39.235 ± 2.629）%、成瘤组（36.976 ± 3.627）%和非成瘤组（37.642 ± 5.978）%中无统计学差异（F=0.789，P=0.459）。



a：与成瘤组比较，P<0.01

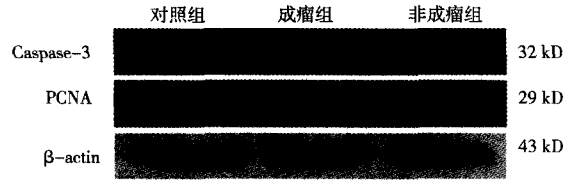
图 4 各组 SD 幼鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ 变化情况

Fig.4 Change of peripheral blood T lymphocyte subsets $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$

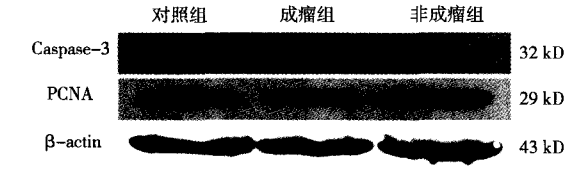
2.5 PCNA 及 Caspase-3 蛋白表达差异

通过 Western blot 实验检测各组小鼠中 PCNA 和 Caspase-3 蛋白表达量差异。结果显示，与对照组相比，成瘤组及非成瘤组小鼠胸腺中 PCNA 蛋白表达量增加，而 Caspase-3 蛋白表达量降低（图 5A），其中 PCNA 及 Caspase-3 蛋白表达量在非成瘤组中变化最为显著。

而在各组小鼠脾脏组织中 Caspase-3 和 PCNA 蛋白表达量无差异，见图 5B。



A. Caspase-3、PCNA 蛋白在 SD 幼鼠胸腺组织中表达情况



B. Caspase-3、PCNA 蛋白在 SD 幼鼠胸腺组织中表达情况

图 5 Caspase-3、PCNA 蛋白在 SD 幼鼠脾脏组织中表达

Fig.5 Caspase-3 and PCNA protein expression detected by Western blot

3 讨 论

本实验采用皮下注射方式建立 SD 幼鼠神经母细胞瘤荷瘤动物模型，接种肿瘤细胞株后第 6 天后，45 只实验组中有 13 只成瘤，其成瘤率为 31.1%，将瘤体体积绘制成生长曲线图，参考刘沁等[9]研究命名方法，本课题组也将肿瘤生长各个阶段命名为潜伏期、快速生长期、平台期、消退期。潜伏期为 0~6 d，快速生长期为第 6~12 天，平台期为第 12~16 天，16 天后出现肿瘤消退期，均与刘沁实验结果一致。

胸腺和脾脏是机体重要免疫器官，其脏器指数可在一定程度上直接反映机体免疫功能的强弱[10-12]。本研究发现，胸腺脏器指数中非成瘤组、成瘤组胸腺脏器指数明显高于对照组（$P<0.01$），虽然非成瘤组数据高于成瘤组，但统计学无差异，可能与两组样本量较小有一定关系，也有可能处死动物时已是成瘤 20 d，处于肿瘤消退期而不是快速生长期，此时免疫脏器的脏器指数变化已不是突出特征；至于脾脏脏器指数无差异，可能与参与抗肿瘤的免疫应答为 T 细胞，其主要场所是胸腺，故脾脏脏器指数变化不明显。

$CD3^+$分子表达于全部 T 细胞上，是 T 细胞共同表面标志[13]。检测 $CD3^+$淋巴细胞可反映 T 淋巴细胞的总数。$CD4^+$亚群属辅助性 T 细胞（Th），可产生多种细胞因子，能辅助 B 细胞产生抗体，也能辅助 $CD8^+$T 细胞产生细胞毒作用。$CD8^+$细胞可产生穿孔素等细胞毒物质，参与抗肿瘤免疫、抗病毒和移植排斥反应，归属于抑制性 T 细胞（Ts）[14-16]，$CD4^+$和 $CD8^+$T 细胞亚群在机体特异性免疫应答中起核心作用。本实验通过测量 SD 幼鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$因子发现，与成瘤组相比，非成瘤组中 $CD3^+$、$CD8^+$数量较多（$P<0.01$），表明非成瘤组自身 T 淋巴细胞及其亚群细胞数量较高，其接种肿瘤细胞后免疫应答明显，免疫能力相对较强，致肿瘤不能生长；而 T 淋巴细胞及其亚群含量较低的成瘤组幼鼠，因自身机体免疫能力较弱，应答弱，则肿瘤细胞生长。

增殖细胞核抗原（PCNA）主要在细胞核表达，在 DNA 复制、细胞增殖和细胞周期调控中发挥重要作用，是评价细胞增殖的一个重要的指标[17]。Caspase-3 是细胞凋亡主要执行者，被激活后可导致细胞死亡，因此被称为死亡蛋白酶[18-19]。本研究通过 Western blot 检测外周免疫器官胸腺、脾脏 PCNA 和 Caspase-3 蛋白表达情况发现，与对照组相比，成瘤组和非成瘤组小鼠胸腺中 PCNA 蛋白表达量增加，Caspase-3 蛋白表达量降低，而 PCNA 及 Caspase-3蛋白表达量在非成瘤组中变化更显著，表明在接受肿瘤细胞刺激后，成瘤组和非成瘤组的免疫器官均出现相应的免疫应答反应，而在非成瘤组中其免疫应答反应更积极。胸腺组织增殖增加，凋亡减少，致其重量也增加，这与前面胸腺脏器指数的结果一致。而在脾脏中，PCNA 和 Caspase-3 在 3 组内的表达均无差异，再次表明抗肿瘤免疫应答器官，胸腺是主要参与执行者。

综上所述，因为本研究选用的是 3~4 周龄 SD 幼鼠，免疫器官、功能尚未发育完善，随着机体受到肿瘤细胞刺激，成瘤组和非成瘤组出现免疫器官增殖增加、凋亡减少，从而增强机体免疫能力，但成瘤组中 SD 幼鼠胸腺产生 T 淋巴细胞能力较弱，外周

血 T 淋巴细胞数量较非成瘤组少，表现肿瘤生长，但是随着肿瘤细胞持续存在、生长，不停刺激机体免疫能力、使免疫器官增生、免疫功能逐渐完善，最后肿瘤出现缓慢生长、最后消退。

参 考 文 献

[1] Maris JM. Recent advances in neuroblastoma[J]. New England Journal of Medicine,2010,362(23):2202-2211.

[2] Pastorino F,Loi M,Sapra P,et al. Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38(EZN-2208), a novel topoisomerase I inhibitor[J]. Clinical Cancer Research,2010,16(19):4809-4821.

[3] Cheung NKV,Dyer MA. Neuroblastoma:developmental biology, cancer genomics and immunotherapy[J]. Nature Reviews Cancer,2013, 13(6):397-411.

[4] Di Paolo D,Yang D,Pastorino F,et al. New therapeutic strategies in neuroblastoma:combined targeting of a novel tyrosine kinase inhibitor and liposomal siRNAs against ALK[J]. Oncotarget,2015,6(30): 28774-28789.

[5] Cossu I,Bottoni G,Loi M,et al. Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration,delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion[J]. Biomaterials,2015,68:89-99.

[6] 冯瑞华，王 珊，白 洁，等. 高强度聚焦超声消融人神经母细胞瘤 SD 幼鼠模型后对肿瘤转移的影响[J]. 中华小儿外科杂志，2013, 34(005):381-386.

[7] Krieger-Hinck N,Schumacher U,Muller A,et al. The effect of the PPAR-grmma agonist rosiglitazone on neuroblastoma SK-N-SH cells in a metastatic xenograft mouse model[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics,2009,18(8):387-393.

[8] Kroesen M,Brok IC,Reijnen D,et al. Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents [J]. Cancer Immunology,Immunotherapy,2015,64(5):563-572.

[9] 刘 沁，王 莽，全学模，等. 高频超声监测 SD 大鼠肾上腺区人神经母细胞瘤移植瘤模型[J]. 重庆医科大学学报，2011,36(11): 1332-1335.

[10] Zhu BD,Yuan SJ,Zhao QC,et al. Antitumor effect of Gefitinib,an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor,combined with cytotoxic agent on murine hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2005,11(9):1382-1386.

[11] 韩群花，张美文，郭 聪，等. 种群密度效应对成年东方田鼠内脏器官的影响[J]. 生态学报，2015,35(3):865-872.

[12] 王 勇，司丽芳，李相能，等. 银杏叶提取物增强大鼠脾脏和胸腺的免疫功能[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2015 (6):792-795.

[13] Bashour KT,Gondarenko A,Chen H,et al. CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2014,111(6):2241-2246.

[14] Koebel CM,Vermi W,Swann JB,et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state[J]. Nature,2007,450(7171): 903-907.

[15] Haabeth OA,Tveita AA,Fauskanger M,et al. How do CD4(+) T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class Ⅱ molecules[J]. Front Immunol,2014,5:174.

[16] Quezada SA,Simpson TR,Peggs KS,et al. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts[J]. The Journal of experimental medicine,2010,207(3):637-650.

[17] Wildemann B,Schmidmaier G,Ordel S,et al. Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-β1:comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials,2003,65(1):150-156.

[18] Fiocchetti M,De Marinis E,Ascenzi P,et al. Neuroglobin and neuronal cell survival[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Proteins and Proteomics,2013,1834(9):1744-1749.

[19] Yu X,Pan Y,Ma H,et al. Simvastatin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung cancer cells[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics,2013,20(8): 351-357.

（责任编辑：张辉洁）