DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.016
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)10-0877-03

论著

自制扩散匣的免疫隔离作用及匣内异基因瘤细胞的在体生长观察

李占京[1],韩本立[1],吴 军[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院;[2]全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察自制细胞扩散匣的免疫隔离作用及匣内异基因瘤细胞的在体生长情况。方法 通过PEG介导制备SP2/0-BALB/c小鼠脾细胞杂交细胞。注入BALB/c小鼠和C57 BL/6(B6)小鼠腹腔,观察腹水产生和瘤体形成,了解杂交细胞MHC抗原携带情况。再将含杂交细胞的微孔膜扩散匣分别植入BALB/c和B6小鼠腹腔,观察匣内细胞生存情况。结果 腹腔注射杂交细胞后2个月内,BALB/c小鼠产生血性腹水,或形成瘤体,B6小鼠未见腹水产生和瘤体形成。腹腔植入杂交瘤细胞扩散匣后30 d和101 d,两组动物体内扩散匣均被大网膜或肠系膜包裹,外壁可见新生血管,匣内形成瘤体,但不能充满整个匣腔。结论 SP2/0细胞与BALB/c小鼠脾细胞融合后可转变为携带BALB/c品系MHC抗原的永生细胞,在异基因宿主(B6小鼠)体内不能存活。自制微孔膜扩散匣能有效起到免疫隔离作用。微孔膜外表面能够形成新的营养血管,支持匣内细胞长期生存与增殖。

关键词:小鼠;肿瘤;扩散匣;免疫隔离
中图法分类号:R392.4;R73-35 文献标识码:A

Immune isolation of diffusion chamber for hybridoma

LI Zhan-jing, HAN Ben-li, WU Jun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To determine the effect of diffusion chamber for immune isolation and the proliferation of allogenic hybridoma within diffusion chamber in mice. **Methods** The hybridoma cell strain was established from SP2/0 cells and the splenocytes of BALB/c mouse by PEG-mediate technique. The cells were injected peritoneally into BALB/c ($n=5$) and C57 BL/6 (B6, $n=5$) mice. Diffusion chambers with microporous membrane containing hybridoma cells were implanted peritoneally into 5 BALB/c and 5 B6 mice. **Results** Within two months after peritoneal injection of the cell strain, four BALB/c mice developed bloody ascites and one developed abdominal tumor, but the B6 mice developed neither ascites nor tumor. After 30 and 101 days of the chamber implantation, the chambers were coated by omentum or mesenterium in all the animals of both strain groups and freshly formed blood vessels to the chamber membrane could be observed. Within the chambers, tumor developed, but the tumor could not fully fill the inner space of the chamber during the whole observation period. **Conclusion** The hybridoma cells established from SP2/0 cells and the splenocytes of BALB/c mouse may carry BALB/c MHC antigen. The diffusion chambers can effectively isolate immune rejection. Freshly formed blood vessels to the chamber membrane can support the cells within the chambers.

Key words: mouse; tumor; diffusion chamber; immune isolation

肿瘤是医学研究的难题。由于临床的局限性,为研究肿瘤,常需建立各种动物肿瘤模型,小动物肿瘤模型具有实验方便的突出优点[1],但由于免疫排斥,建立小动物异基因肿瘤模型较为困难,若能采用免疫隔离技术将异基因肿瘤细胞植入小动物体内,排除免疫排斥因素的干扰,将能为肿瘤的治疗等研究提供良好实验模型。我们将携带MHC抗原的杂交瘤细胞注入自制微孔膜扩散匣内,植入异品系小鼠腹腔,匣内瘤细胞能够长期生存和增殖,模型稳定,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c小鼠(H-2^d),由第三军医大学实验动物中心提供,8~10周龄,雌雄不限,体质量18~24 g。C57 BL/6(B6)小鼠

作者简介:李占京(1957-),男,河南省洛阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事器官移植方面的研究,发表论文9篇。现在附属大坪医院肝胆外科工作。电话:(023)68757247

收稿日期:2002-06-30;修回日期:2002-12-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(H－2^b)，由四川省中药研究所提供，8～10周龄，雌雄不限，体质量16～22 g。饲养在18～25 ℃环境中。纯系动物颗粒饲料由第三军医大学实验动物中心提供，B6小鼠辅加麦芽喂养。实验前经历至少1周的环境适应。

1.2 主要试剂

RPMI1640培养基，GIBCO产品。HAT，PEG(分子量1450)，Sigma公司产品。Ficoll淋巴细胞分离液，华美公司产品。SP2/0细胞系，由第三军医大学全军免疫学研究所提供。

1.3 微孔膜扩散匣的制作

取直径为1 cm，厚约0.5 mm的有机玻璃环，在环的两端面用LD－5型粘合剂粘上孔径为0.8 μm的醋酸纤维素微孔薄膜，在有机玻璃环上开一小孔，拟作细胞悬液加样用。使用前经^{60}Co照射2.5×10^6 Gy/s灭菌。

1.4 脾淋巴细胞分离

断颈处死动物，消毒胸腹部皮肤，剪开腹腔，取出脾脏，经D-Hanks液漂洗后，将脾脏剪成碎块，置于150目钢丝网筛中，用5 ml注射器芯缓缓磨压至组织完全磨碎，用冷D-Hanks液冲洗，将细胞收集于玻璃平皿中。将此细胞悬液小心吸加在含有约3 ml淋巴细胞分离液的离心管内，使细胞悬液处于上层。600× g离心10 min，吸取中间界面上的淋巴细胞至另一管中，加入适量(约3 ml)D-Hanks液，离心漂洗2次。用RPMI1640培养液重悬细胞，计数，2%台盼蓝检查细胞活力(＞90%)，调整细胞至所需浓度。

1.5 细胞杂交及筛选

1.5.1 饲养细胞的制备　将BALB/c小鼠断颈处死，无菌条件下，用5 ml注射器抽吸预温(37 ℃)的RPMI1640培养液5 ml，斜穿腹肌注入腹腔，按摩小鼠腹部1～2 min，抽吸腹腔液，注入25 ml培养瓶内，37 ℃，5%CO_2培养，次日使用。

1.5.2 细胞杂交及筛选　取BALB/c小鼠脾细胞悬液与SP2/0细胞以5∶1(细胞数之比)混合于锥形离心管中，离心，弃上清。轻弹离心管使细胞分散，37 ℃水浴，边摇边滴加50% PEG预温液(37 ℃)0.5～0.7 ml，1min内滴完。继续置37 ℃水浴90 min并间断摇动。滴加无血清RPMI1640培养液，离心，弃上清。加25 ml HAT完全培养基浮起细胞，分装于备有饲养细胞的培养瓶内，37 ℃，5%CO_2培养，每3天换HAT培养液1次，两周后改换HT培养液培养1～2周。使用前改换RPMI1640完全培养液扩增。

1.6 杂交细胞扩散匣腹腔内植入

将上述杂交细胞用不含血清的RPMI1640培养液混匀，制成1×10^7/ml细胞悬液，向每个扩散匣内注入0.1 ml，石蜡封口。在无菌条件下将扩散匣植入BALB/c或B6小鼠腹腔内，腹壁切口分两层用细丝线连续缝合关闭。

1.7 分组设计

1.7.1 杂交细胞携带BALB/c品系MHC抗原鉴定试验　取BALB/c和B6小鼠各5只，每只小鼠一次性腹腔注射1×10^6个杂交细胞，观察2个月内的腹水产生或瘤体形成情况。

1.7.2 扩散匣的免疫隔离作用　取BALB/c和B6小鼠各5只，于每只小鼠腹腔内植入1个含有杂交细胞的扩散匣，分别在植入后30 d和101 d剖腹观察匣内细胞生存情况。

2 结果

2.1 杂交细胞携带BALB/c品系MHC抗原情况

腹腔注射杂交细胞后2个月内，4只BALB/c小鼠出现血性腹水，1只在腹部形成巨大瘤体。B6小鼠则未见腹水产生和瘤体形成，精神状态良好，毛色光泽，无营养不良等恶病质征象。

2.2 扩散匣的免疫隔离作用

于扩散匣植入后30 d和101 d剖腹观察，见两组动物中，扩散匣均已被大网膜或肠系膜包裹，匣外壁微孔半透膜上已形成明显可见的营养支持血管，见图1。匣内细胞形成鱼肉样瘤体，仅占居匣内约1/2空间，半透膜与瘤体之间存在液体成分间隙，见图2。冲洗匣内容物再行体外培养，可见瘤细胞仍显示增殖活跃，永生性未变，但见同时存在许多不增殖的贴壁细胞，部分呈成纤维细胞样改变。



图1 小鼠腹腔内植入扩散匣后101 d，微孔半透膜外表形成新的营养支持血管

Fig 1 Freshly formed blood vessels to the chamber membrane could be observed after 101 days of chamber implantation



图2 瘤体约占居扩散匣内容积的1/2(植入后101 d)，半透膜与瘤体之间存在液体成分间隙

Fig 2 The tumor could not fully fill the inner space of the chamber after 101 days of chamber implantation. Liquid space exists between the tumor and the chamber membrane

3 讨论

SP2/0细胞是来源于BALB/c小鼠浆母细胞的一种

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不表达 MHC 抗原的永生细胞系, 为了使该细胞系携带 BALB/c 小鼠 MHC 抗原, 本组通过 PEG 介导制备出 SP2/0-BALB/c 小鼠脾细胞杂交细胞, 具有与 SP2/0 细胞相似的生长特性, 表现为增殖活跃, 传代周期短, 单层贴壁生长。为确定杂交后的细胞 MHC 抗原携带情况, 本组通过腹腔注射分别观察杂交细胞在 BALB/c 小鼠和 B6小鼠体内的生存情况, 结果发现, 被注射的 5 只 BALB/c 小鼠 2 个月后均产生腹水或形成肿瘤, 而 B6 小鼠未见腹水产生或肿瘤形成, 表明这种杂交瘤细胞携带有 BALB/c 品系 MHC 抗原, 在 B6 小鼠体内不能存活。

微孔膜扩散匣作为一种免疫隔离装置在人工胰[2,3]、成骨细胞移植[4]、肿瘤治疗等[5]研究方面已有报道, 为进一步观察扩散匣的免疫隔离作用以及瘤细胞在异基因宿主体内扩散匣中的生长状况, 本组将杂交瘤细胞注入微孔径为 0.8 μm 的扩散匣内, 分别植入同品系宿主(BALB/c 小鼠)和异品系宿主(B6 小鼠)腹腔, 于植入后 30 d 和 101 d 剖腹观察, 发现在两组动物体内, 扩散匣均已被大网膜或肠系膜包裹, 在微孔膜表面可见新形成的营养血管, 匣内细胞增殖已形成瘤体, 冲洗匣内细胞作体外培养, 见瘤细胞生长良好, 永生性不变。根据本组观察, 我们认为, 这种自制扩散匣能够有效起到免疫隔离作用, 保护匣内细胞不受宿主免疫系统的排斥; 杂交瘤细胞在体外培养时, 增殖速度极快, 传代时间为 2~3 d, 营养消耗很大, 在体内扩散匣中 101 d 仍存活良好并形成瘤体, 加之微孔半透膜外新形成的明显可见的营养支持血管, 表明扩散匣内细胞的营养状态良好, 能够长期生存和增殖。

根据本组观察, 匣内瘤体在两组动物中均始终不能长满整个匣腔, 仅占居匣内容积的 1/2 左右, 在瘤体两侧贴近半透膜内表面处存在着液体间隙, 这一现象未见报道, 原因尚不清楚, 但表明匣内细胞可能处于增殖与死亡消失并存的动态平衡, 受扩散匣内容积的直接影响。

综上所述, SP2/0 细胞与 BALB/c 小鼠脾细胞杂交后可转变为携带 BALB/c 品系 MHC 抗原的永生细胞, 在异品系动物体内不能存活。自制微孔膜扩散匣能有效起到免疫隔离作用, 保护匣内异基因细胞不受排斥。微孔膜扩散匣腹腔内植入后在半透膜外表面能够形成新的营养血管, 支持匣内细胞长期生存与增殖。异基因瘤细胞扩散匣腹腔内植入可作为研究肿瘤的稳定模型之一。

参考文献:

[1] Mirzaie M, Herse B, Oster O, *et al*. The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits the lung colonisation of orthotopically implanted malignant pancreatic tumor cells in SCID mice[J]. Swiss Surg, 2002, 8(4): 165—170.

[2] Sasaki S, Nio Y, Hirahara N, *et al*. Intraperitoneally implanted artificial pancrease with transkaryotic beta-cells on microcarrier beads in a diffusion chamber improves hyperglycemia after 90% pancreatectomy in rats[J]. *In Vivo*, 2000, 14(4): 535—541.

[3] Ohgawara H. Strategies for immunoisolation in islet transplantation: challenges for the twenty-first century[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2000, 7(4): 374—379.

[4] Gotoh Y, Fujisawa K, Satomura K, *et al*. Osteogenesis by human osteoblastic cells in diffusion chamber *in vivo*[J]. Calcif Tissue Int, 1995, 56(3): 246—251.

[5] Ogura H, Tani K, Ozawa K, *et al*. Implantation of genetically manipulated fibroblasts into mice as antitumor alpha-interferon therapy[J]. Cancer Res, 1990, 50(16): 5102—5106.

(编辑　刘洪娥)

(上接 876 页)

CT 腹主动脉及左侧髂血管周围淋巴结增多, 增大、融合, 考虑淋巴瘤或淋巴转移癌。行颈部淋巴结病理检查, NSE(+), LCA(−), B(−), T(−), NF(+), 考虑为神经母细胞瘤。由于病人经费困难, 自动出院。

讨论

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)来源于未分化的交感神经节细胞, 多见于小儿, 多以贫血、发热、上肢疼痛就诊。早期易发生骨髓、肝、皮肤、眼眶等多部位转移, 以各系统转移症状就诊是本病的特点之一[1,2]。本例患者以膝、肩关节疼痛和贫血为主诉, 伴全身骨骼的广泛转移, 符合该病特点。经过颈部淋巴结活检和其他辅助检查诊断为 NB, 但原发灶尚不明确。CT 和 B 超提示腹腔内多发实性占位, 推测可能系原发灶部位, 但患者由于经费困难未作进一步检查以证实原发灶。对怀疑 NB 的患儿应尽早做以下检查: ①儿茶酚胺及其代谢物: 血中儿茶酚胺及尿代谢产物 VMA 和高香草酸(HVA)水平对 NB 诊断率达 95%[1,3]; ②骨髓、淋巴结及原发灶病理检查: 瘤细胞似原、幼淋巴细胞, 大小相差悬殊, 胞浆少, 染色质稍粗糙, 核膜不清楚, 部分呈菊花样排列。而 NSE、S-100、神经丝蛋白、角蛋白阳性可为 NB 的诊断提供依据。X 线可见广泛溶骨性破坏, 有一定辅助诊断价值。

关键词: 关节疼痛; 骨质破坏; 神经母细胞瘤
中图法分类号: R739.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 梁贵友, 刘唐彬. 小儿神经母细胞瘤 33 例治疗及预后[J]. 遵义医学院学报, 1998; 21(3): 27—28.

[2] 葛运芬, 孔庆武. 小儿神经母细胞瘤 22 例误诊分析[J]. 山东医药, 1999, 39(24): 24—24.

[3] 神经母细胞瘤 86 例诊断与治疗[J]. 浙江肿瘤, 1998, 4(2): 85—86.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net