

组织块移植法建立人肺癌裸鼠移植瘤模型

唐诗聪, 潘泓

(广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021)

[摘要] 肺癌对人类的健康构成了严重的威胁,人肺癌裸鼠移植瘤模型的建立对于肺癌的研究是一项重要的工具. 建立肺癌移植瘤模型的方法主要有细胞培养移植法、组织块移植法和匀浆液移植法. 组织块移植法建立的模型能最大限度地模拟人体内环境,是一种理想的模型.就组织块移植法建模的操作方法及当前研究进展作一综述.

[关键词] 人肺癌裸鼠移植瘤模型; 组织块移植法; IHC; 基因芯片

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2014) 11-0169-03

The Establishment of Patient-derived Lung Cancer Xenograft Models by Cancer Tissue Transplant Directly

TANG Shi-cong, PAN Hong

(The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi 530021, China)

[Abstract] Lung cancer is a threat to human health. It will be a significant tool for studying on lung cancer to establish a patient-derived lung cancer xenograft model. There are three approaches to establishing a lung cancer xenograft model, lung cancer cell culturing, lung cancer tissues transplant and cancer tissue plasma transplant. Xenograft model has been considered an idea research model for human lung cancer because it reflects human internal environment of lung cancer itself. In this paper, we focus on recent advances in establishing xenograft model for human lung cancer studies.

[Key words] Patient-derived lung cancer; Xenograft model; IHC; Gene microarray

肺癌是一种严重威胁人类生命与健康的恶性肿瘤. 在全世界范围内, 每年有超过 100 万的人患肺癌, 其死亡率占所有肿瘤之首. 建立合适的动物模型是研究肿瘤体内生长、转移机制的重要工具^[1], 对深入了解肺癌的生物学特点及对各种治疗的应答有深远意义. 动物肿瘤模型的建立应注意: 选择动物的种系、操作方法等事项, 目前用新鲜获得的肿瘤组织块作为瘤源建立肺癌移植瘤模型研究为数不多, 综述如下.

1 建模动物的选择

动物肿瘤模型分为动物自发瘤模型, 诱发瘤模型和移植瘤模型, 而移植瘤模型为本文讨论的重点. 建立移植瘤的基本条件是: 肿瘤标本的取材, 应在无菌条件下取新鲜、无坏死、无包膜的瘤组织, 手术标本的取材应在 1~2 个小时内完成. 移植瘤受体动物常用的是免疫缺陷小鼠, 要求在 4

周龄左右, 移植的最常用部位是背侧皮下. 移植瘤建成的标准是: 传代数应在 15~20 代 (每代传 3~4 只动物); 最终移植成瘤率为 100%; 自发消退率减少到最低限度 (不一定完全达到零); 生长速度要稳定; 宿主寿命相似 (重复性强); 宿主反应性低 (已适应受体动物体内生长); 瘤组织的组织学结构仍保持与原发瘤相似. 符合以上标准即可称为移植性肿瘤模型^[2].

裸鼠 (nude mice, NM): 是指 nu 基因纯合突变引起的先天性胸腺发育不良和 T 淋巴细胞缺陷的免疫缺陷小鼠, 因其体表无毛而得名. 是历史悠久、应用广泛的宿主动物. 严重联合免疫缺陷小鼠 (severe combined immuno-deficient mice, SCID): 由于隐性突变基因 scid 的纯合突变导致 T、B 淋巴细胞不能分化为特异性功能淋巴细胞, 该品系小鼠 T、B 淋巴细胞功能缺陷, 而 NK 细胞及巨噬细胞功能存在. 非肥胖糖尿病 / 严重联合免疫缺

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81361236)

[作者简介] 唐诗聪 (1989~), 男, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤外科肺癌研究工作.

[通讯作者] 潘泓. E-mail: pan_hong1999@yahoo.com.cn

陷小鼠 (non-obese diabetes severe combined immuno-deficient mice, NOD/SCID): 由于部分 SCID 小鼠可出现淋巴细胞免疫功能恢复 (渗漏现象), 影响了 SCID 小鼠的更广泛应用. 通过将 SCID 小鼠与 NOD/Lt 品系回交, 既保留了 SCID 鼠 T、B 淋巴细胞缺陷的特点, 同时还具有 NK 细胞活性很低、无循环补体、无巨噬细胞和 APC 细胞功能损害等特点^[3].

胡野荣等^[4]接种 16 例肿瘤组织标本中有 12 例形成移植瘤. 其中 4 例病例只有 SCID 小鼠成瘤, 2 例病例只有 BALB/c 裸小鼠成瘤, NOD/SCID 小鼠没有一例病例单独成瘤, 总成瘤率为 75%. 王晓东^[5]等将 58 例术中切除肿块移植于 BALB/c 小鼠, 成功 24 例, 成瘤率为 24.1%. 卓莹^[6]等在 NOD/SCID 小鼠皮下接种 11 例术中切下肿瘤, 成功 3 例, 成瘤率 27%.

综上, 不同学者尝试使用不同的小鼠建模, 都能够取得一定的成功, 因此在建模小鼠的选择上, 并无特殊要求. 研究者可以根据自己的实验条件选择实验动物.

2 建模方法的选择

动物肿瘤模型建立主要有原位移植以及异位移植 2 种. 原位裸鼠移植瘤动物模型是将体外培养的肿瘤细胞或外科手术中采集的肿瘤组织移植到裸鼠的相同原发部位或相关的转移部位, 即应用肿瘤细胞悬浮液行气管内、胸内、静脉注射, 将肿瘤种植至免疫缺陷动物的相关组织内, 荷瘤表现出较强的侵袭及转移特性. 该模型与原肿瘤有最大的相似性, 但成瘤率低, 建模型困难, 目前尚未有报道用于建肺癌移植瘤模型.

异位移植建立移植瘤模型的建立可分为: 皮下移植建模及肾被膜下移植建模. 皮下移植建模是将体外培养的肿瘤细胞或外科手术中采集的肿瘤组织移植到裸鼠身体上同肿瘤原发部位不相关的部位. 应用较多的是将瘤细胞接种于裸鼠皮下 (腋部、背部、后肢等). 腋部皮下移植, 因不影响动物活动是较常采用的移植部位. 该方法操作简便, 是大多数建立移植瘤方法.

肾被膜下移植建模是将肿瘤穿刺标本剪成约 1 mm × 2 mm × 2 mm 的组织; 裸鼠予 250 mg/kg Avertin 腹腔注射麻醉; 摆左侧卧位, 固定, 消毒; 取右侧腹纵切口入腹; 托出右侧肾脏于切口外暴露; 显微操作打开肾盂处相应的肾包膜; 将组织送入肾包膜内; 将右肾放回腹腔恢复原位; 缝合腹壁, 结束手术. 每例接种 1 只小鼠, 须在肿瘤标

本离开人体后 3 h 内完成接种. 术后继续饲养, 自由进食. 肾被膜下接种需要组织少, 成瘤率稍高, 但操作复杂. 一般学者用于难以成瘤的特殊肿瘤.

影响建模成功率主要有以下因素: (1) 正确的实验操作: 准确的取材和精细的种植操作是影响模型成功建立的最关键的因素, 欲接种的新鲜肿瘤组织, 应在手术显微镜下精确取材, 制备成适宜大小的瘤组织块, 瘤块太大早期血管生成的数量少, 瘤组织易因供血不足而缺血坏死, 瘤块太小不易成瘤, 从而降低成瘤率, 因为不论细胞恶变来自单细胞还是多细胞, 恶变后的细胞在数量上必需达到一定数值后, 才有增殖形成肿瘤的可能. (2) 接种部位: 不同移植部位成瘤率不同, 利用裸鼠构建动物模型时, 最常用的接种部位是皮下接种. 据文献报道, 皮下接种时, 近头侧成功率较高, 这可能和近头侧血管多, 能为肿瘤生长提供丰富营养有关; (3) 动物年龄: 裸鼠尽管无 T 淋巴细胞, 缺乏 T 细胞免疫, 但随着动物年龄增长其免疫反应亦逐渐增强, 严重影响移植瘤的生长. 实验表明, 选择 5 周龄以下裸鼠进行肿瘤移植成功率较高; (4) 实验环境的要求: 裸鼠存在免疫缺陷, 在裸鼠饲养和实验操作时要严格遵循无菌原则; (5) 移植瘤血管生成: 血管作为肿瘤间质的重要组成部分, 与肿瘤细胞相互作用, 构成完整的微生态系统. 当肿瘤细胞丧失与增殖相等, 或者死亡细胞多于增殖细胞时, 肿瘤血管生成相对不足, 肿瘤往往生长较慢或者不生长.

3 人肺癌裸鼠移植瘤模型的研究

胡野荣等^[4]接种 16 例肿瘤组织标本中有 12 个形成移植瘤. 其中 4 例病例只有 SCID 小鼠成瘤. 2 例病例只有 BALB/c 裸小鼠成瘤. NOD/SCID 小鼠没有 1 例病例单独成瘤. 总成瘤率为 75%, SCID 小鼠成瘤率最高, 为 56.25%; 处死时头部成瘤点大于 1 cm 的比率 (56.52%) 与尾部成瘤点大于 1 cm 的比率 (25%) 相比差异有统计学意义 ($P=0.037$). 在该实验中, 裸鼠头部移植瘤的生长速度明显快于尾部. 王晓东^[5]等用 58 例术中切除肿块移植于 BALB/c 小鼠, 成功 24 例, 成瘤率为 24.1%. 重复操作此方法得到 3 代移植瘤. 实验证实组织块移植法建立的移植瘤细胞在保持肿瘤细胞原有排列结构的同时还保留了人肺癌细胞的异型性; 而对照组 (细胞培养法建模) 中的细胞系移植瘤细胞仅保留了癌细胞的异型性, 失去了原有的排列结构. 卓莹^[6]等在 NOD/SCID 小鼠皮下接种 11 例术中切下肿瘤, 建成 3 例可多次成功传代的移植

瘤模型, 成瘤率 27%. 各代移植瘤模型的组织病理学及免疫组化表型、K-Ras 和 EGFR 基因检测均与手术切除的人肺癌组织相一致. 在移植瘤细胞周期中 S 期延长, 提示瘤细胞有增殖活性. 美国的 Roman Perez-Soler 等^[7]用 100 例非小细胞肺癌移植裸鼠皮下, 成瘤率为 34%. 英国的 Jean-Claude Cutz 等^[8]将 14 例非小细胞肺癌组织移植至 BALB/c

小鼠皮下, 成瘤率为 95%. 德国的 Iduna Fichtner^[9]等选择了 102 例手术中切除的肺癌组织标本, 移植于 NOD/SCID 裸鼠背部皮下. 在所有移植瘤中, 有 25 例成瘤并进行了传代移植, 其中, 腺癌成功 6 例, 鳞癌成功 12 例, 成瘤率 25%. 在对经过 2~4 代传代的移植瘤的组织学分析及基因检测后可确认移植瘤与原肿瘤有同源性, 证明建模成功, 见表 1.

表 1 不同学者建模结果

Tab. 1 Several models for lung cancer studies established by different scholars

| 作者 | 研究单位 | 建模动物 | 接种部位 | 接种例数 | 成功例数 | 成瘤率 (%) |
|-------------------|----------------|----------------------|------|------|------|---------|
| Roman Perez-Soler | NCI | SCID、 | 皮下 | 100 | 34 | 34.0 |
| Iduna Fichtner | Germany | NOD/SCID | 皮下 | 102 | 25 | 25.0 |
| Jean-Claude Cutz | United kingdom | BALB/c | 皮下 | 14 | 13 | 95.0 |
| 王晓东 | 天津市胸科医院胸外科 | BALB/c | 皮下 | 58 | 14 | 24.1 |
| 卓莹 | 广东省人民医院 | NOD/SCID | 皮下 | 11 | 3 | 27.0 |
| 胡野荣 | 湘雅二医院 | SCID、BALB/c、NOD/scid | 皮下 | 16 | 12 | 75.0 |
| 高亦博 | 协和肿瘤医院 | NOD/SCID | 皮下 | 101 | 27 | 29.0 |

4 存在的问题

目前对于移植瘤的研究较多集中在探讨移植瘤成瘤率及移植瘤与原肿瘤一致性的方面. 关于移植瘤与原肿瘤一致性的研究目前主要通过 HE 染色组织学观察以及免疫组化检测基因及蛋白的一致性. 但是该方法亦有有待于提高的部分: 无法判断移植瘤为鼠源性自身肿瘤或是人源性肿瘤. 故笔者认为接下来的研究可在免疫组化时制作抗人抗体及抗鼠抗体, 及在行 Q-PCR 时设计针对人源及鼠源的引物检测微环境基因的来源, 做双向检测以最终确定肿瘤的来源为人源性还是鼠源性, 可以完善移植瘤模型的特性分析.

移植瘤在第 1 代的成瘤率较低, 第 2 代较第 1 代有所升高, 从第 3 代起基本可以稳定传代. 该现象可能是由于移植瘤在动物体内逐渐适应新的生长微环境, 而能够稳定传代. 但是每一代移植瘤较之前一代荷瘤的生物学特性是否有改变还有待于探讨, 无法确定在荷瘤适应动物体内的生长微环境之后其侵袭性是否会增强; 每一代移植瘤较之前一代移植瘤相比, 其原肿瘤特性是否会丢失等等, 这些都有待于接下来的研究.

5 展望

当前通过细胞块皮下移植法已经能够取得一定的成瘤率, 但是成瘤率并不高; 移植瘤的生物学特性以及传代后的变化依然有待于探讨. 以上所提问题以及其余有待发现的新问题让我们在接下来的研究中注定不能只单纯探讨一代移植瘤的个体生物学特性, 需要连续动态观察移植瘤与原

肿瘤之间的变化以及移植瘤与移植瘤之间的变化, 从而获得更佳的移植瘤模型以及更高的成瘤率.

[参考文献]

- [1] 张海燕, 李艳, 王喆. 用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型的建立[J]. 生物工程学报, 2009, 25(8):1 204 - 1 210
- [2] 高进. 动物肿瘤模型的建立及其标准研讨[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(1):76 - 78.
- [3] 高亦博. 肺部恶性肿瘤原代裸鼠移植瘤模型的建立[D]. 北京:北京协和医学院, 2011.
- [4] 胡野荣, 任泓, 刘哲亮. 人肺癌组织免疫缺陷鼠移植瘤模型的建立[J]. 癌症, 2009, 28(8):890 - 893.
- [5] 王晓东, 孙大强, 李志. 个体化裸鼠荷人肺癌肿瘤模型的建立[J]. 天津医药, 2012, 40(5):499 - 501.
- [6] 卓莹, 吴一龙, 郭爱林. 荷人肺癌小鼠皮下移植瘤模型的建立及其生物学特性初探 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(6):568 - 574.
- [7] JEAN-CLAUDE CUTZ, JUN GUAN, JANE BAYANI, et al. Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression related changes [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (9):4 043 - 4 054.
- [8] ROMAN PEREZ-SOLER, BONNIE KEMP, QING PING WU. Response and determinants of sensitivity to paclitaxel in human non-small cell lung cancer tumors heterotransplanted in nude mice[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(5): 4 932 - 4 938.
- [9] IDUNA F, JANA R, RICHIE S. Establishment of patient-derived non small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6):6 456 - 6 468.

(2014-08-03 收稿)