

急性B淋巴细胞白血病动物模型的建立

李丽霞, 汤永民, 顾伟忠, 汤宏峰, 钱柏芹, 沈红强, 罗春芳
(浙江大学医学院 附属儿童医院血液肿瘤科, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的:**建立急性B淋巴细胞系白血病动物模型,为药物进行体内靶向杀伤研究奠定基础。**方法:**裸鼠用环磷酰胺预处理后,尾静脉注射 5×10^6 个Nalm-6细胞,观察小鼠症状,记录发病时间,取其各个组织做病理检查,了解肿瘤细胞浸润情况。**结果:**小鼠注射肿瘤细胞(19.4±0.55)d后出现严重消瘦、脊柱侧弯和弓背症状,平均死亡时间(24.75±0.87)d;病理切片观察到小鼠骨髓、肝、脾、肾、脑膜、脑实质、卵巢、肺都有肿瘤细胞浸润,部分肝脾组织出现坏死。**结论:**采用裸鼠成功建立了急性B淋巴细胞系白血病的动物模型,为靶向治疗白血病研究奠定了基础。

[关键词] 白血病, B细胞, 急性; 疾病模型, 动物; 白血病; 环磷酰胺/药理学

[中图分类号] R 733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)05-0511-04

Establishment of animal model with B lineage acute leukemia in nude mice for evaluation of new therapeutic agents

LI Li-xia, TANG Yong-min, GU Wei-zhong, TANG Hong-feng, QIAN Bai-qin, SHEN Hong-qiang, LUO Chun-fang (Department of Hematology-Oncology, The Affiliated Children's Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an acute leukemia animal model for testing new therapeutic agents *in vivo*. **Methods:** Nude mice were intraperitoneally injected with 2 mg cyclophosphamide, 24 h later 5×10^6 acute B-cell leukemia Nalm-6 cells was inoculated via the tail vein, then monitored daily. When animals were paralyzed or dying, the organs including the liver, spleen, lung, heart, kidney, brain, bone marrow, pancreas, testes were removed and fixed with formalin, examined by routine histopathology. **Results:** After Nalm-6 cells were inoculated the mean survival of mice were (19.4±0.55)d ($n=6$). The paralysis of mice was followed by weight loss, bent spines, hogback, cachexia and death. Histopathological examination showed that the tumor cells infiltrated liver, spleen, kidney, lung, meninges, interior cerebrum, the liver and kidney were the most affected organs. **Conclusion:** B lineage acute leukemia animal model has been successfully established in the nude mice, which is suitable for testing new therapeutic agents.

收稿日期: 2007-07-18 修回日期: 2008-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30170391); 浙江省自然科学基金重点项目(编号: Z205166), 面上项目(编号: 301570)。

作者简介: 李丽霞(1982—), 女, 硕士研究生, 主要从事小儿血液肿瘤的研究, 现在绍兴妇幼保健院工作。

通讯作者: 汤永民(1957—), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: Y_M_TANG@zju.edu.cn.

[Key words] Leukemia, B-cell, acute; Disease models, animal; Leukemia; Cyclophosphamide /pharmacol

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(5): 511-514.]

急性白血病是儿童常见的血液系统肿瘤,急性淋巴细胞白血病(ALL)约占 70%,其中 80%来自 B 细胞系,联合化疗是当前主要的治疗方法。但化疗因具有选择性差、全身毒副作用大、易诱导药物耐药等缺点。为此,研究者正在寻找新的治疗方法。其中,靶向治疗具有选择性杀伤作用强、用量少、全身毒副作用小等优点而备受关注。然而,抗体治疗、分子靶向治疗及其作用机制的前期实验研究均需在动物体内进行。因此,动物模型的成功建立是药物进行体内研究的重要环节。裸鼠和 SCID 小鼠常用于建立血液系统肿瘤动物模型,裸鼠 T 淋巴细胞缺陷,而 SCID 小鼠 T、B 淋巴细胞联合缺陷,更容易移植成功,但是价格昂贵。为此,本研究采用裸鼠建立白血病动物模型。

1 材料方法

1.1 细胞株 Nalm-6 是急性 B 淋巴细胞系白血病细胞株,用含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml、15% 灭活新生牛血清的 RPMI-1640 完全培养液,在 37℃ 含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 裸鼠(BALB/C-nu/nu) 购于中国科学院上海试验动物中心,5~6 周龄,雌性,体重 16 g 左右,饲养于浙江大学医学院附属第一医院 SPF 实验室。所用的水、饲料及垫料均经高压消毒处理,每隔 2~3 d 换一次垫料。

1.3 药物 环磷酰胺(200 mg/支)为江苏恒瑞医药股份有限公司产品。

1.4 急性白血病动物模型的建立 ①用无菌 PBS 液将环磷酰胺浓度调整到 10 mg/ml,腹腔注射环磷酰胺 2 mg/只,连续注射 2 d;24 h 后,收集处于对数生长期的 Nalm-6 细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后,悬浮于无菌 PBS 中,调整细胞密度至 2.5×10^7 个/ml,尾静脉注射 5×10^6 个/只(200 μ l)。②每隔 1~2 d 观察小鼠症状,以后肢出现瘫痪为发病标准,记录小鼠发病和死

亡日期。③待小鼠濒死时,颈椎脱臼法将其处死,立即取小鼠的肝、脾、肺、心脏、肾、肠、脑组织、骨髓、胰腺、睾丸、卵巢等,经 10% 中性福尔马林固定脱水、透明、浸蜡、包埋,制成石蜡切片, H-E 染色后在光镜下观察各个组织肿瘤细胞浸润情况。

1.5 骨髓片的光镜观察 具体骨髓片的制作如下:剪掉小鼠大腿上的皮肤和肌肉,暴露股骨及两端相连的关节,然后从股骨两端关节头处取下股骨,剪断股骨一端,用抽有生理盐水的 1 ml 注射器插入骨髓腔深处,注入 0.5 ml,将冲出的骨髓液滴于洁净的玻片中间,轻轻晃动使其均匀铺开,晾干固定。将制得的骨髓片用瑞氏染色,光镜下观察。

2 结果

2.1 裸鼠 B 系 ALL 白血病动物模型 小鼠尾静脉注射 5×10^6 个肿瘤细胞后 (19.4 ± 0.55) d 后肢行动迟缓,而且迅速发展为双后肢瘫痪,随着病情进展,小鼠严重消瘦,体重从发病前的 19.8 g 下降到 12.7 g,并伴有脊柱侧弯、弓背,呈恶病质,直至死亡(图 1),平均死亡时间 (24.75 ± 0.87) d。

2.2 Nalm-6 细胞光镜观察 骨髓中可观察到肿瘤细胞,同时与体外培养的 Nalm-6 细胞相比,有相似的形态学特征,细胞大,核大深染,染色质疏松,有分裂象(图 2)。

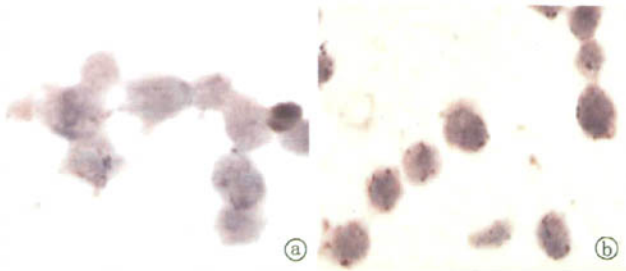
2.3 组织病理结果 与正常小鼠组织切片相比,白血病小鼠的肝、脾、肾、脑膜、脑实质、卵巢、肺都有肿瘤细胞浸润,细胞呈团块状生长,形成结节,有的呈弥漫性生长,其中以肝、脾、脑膜、脑实质浸润最明显,小鼠部分肝脾组织出现坏死,而心肌、胃、小肠、结肠黏膜下层未发现肿瘤细胞(图 3)。

3 讨论

急性白血病动物模型的建立有静脉注射、

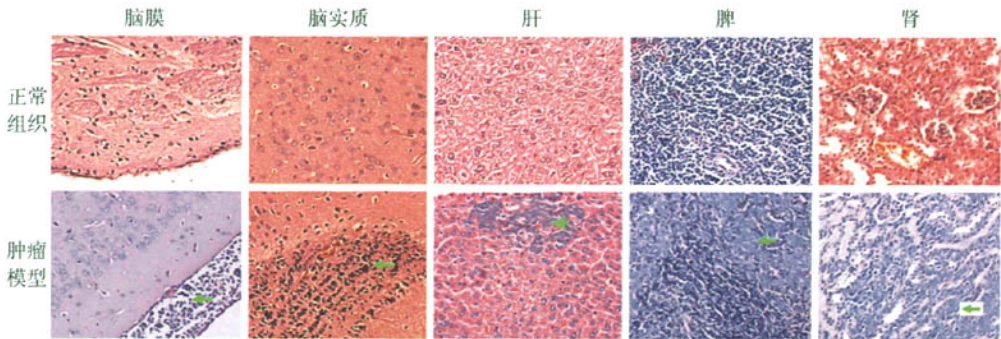


图 1 裸鼠B系ALL 白血病动物模型
Fig. 1 The nude mice model of B-ALL



a:骨髓中Nalm-6 细胞; b:体外培养后的Nalm-6 细胞

图 2 Nalm-6 细胞
Fig. 2 Nalm-6 cell



肿瘤模型小鼠组织内有大量肿瘤细胞浸润(见箭头所示)

图 3 小鼠组织病理检查结果(×100 倍)
Fig. 3 The histopathological examination of each organ (×100)

皮下注射和腹腔注射等途径^[1-2]。小鼠静脉注射时常采用尾静脉,鼠尾静脉共有 3 根,左右两侧和背部各 1 根,两侧尾静脉比较容易固定,故此法常被采用。本研究也选择通过尾静脉注射肿瘤细胞来建立全身白血病动物模型。

Nalm-6 是急性人 B 淋巴细胞系白血病细胞株,在普通的 RPMI-1640 培养基中容易生长,繁殖快,恶性度高,能引起弥散性疾病,可移植入裸鼠或 SCID 小鼠,被研究者广泛应用。本

研究中,小鼠注射 5×10^6 个肿瘤细胞后,先观察到小鼠行动迟缓,后肢瘫痪,然后呈全身性表现,如消瘦,脊柱侧弯等,这与 Gunther 制备的模型有相似之处,同时 Gunther 在小鼠的颅骨、脊柱骨髓和脑膜检测到白血病细胞^[3]。本实验病理切片发现,各个小鼠的脑膜、脑实质内均有大量白血病细胞浸润,可见小鼠极易发生中枢神经系统白血病,这也可能是导致瘫痪的主要原因。

动物模型是否建立成功的影响因素有许多,如注射途径、小鼠周龄、注射的肿瘤细胞数目等。随着小鼠周龄的增长,体内残存的免疫功能逐渐增强,模型建立成功率会有所下降。Ohsugi 等^[4]用 5、7、9、11 周的 B-17 scid/scid (SCID)小鼠建立模型,结果 5 周龄的小鼠 100% 有肿瘤形成,7 周龄小鼠肿瘤形成率为 50%,9 周龄小鼠为 20%,11 周龄的小鼠没有大体肿瘤形成,所以随着小鼠周龄的增加,肿瘤形成率明显下降,而且器官浸润阳性率也明显下降,因此小鼠周龄对模型是否建立成功有重要影响。

白血鼠小鼠的发病时间不仅与小鼠周龄有关,也与注射的肿瘤细胞数目有密切关系,但与雌雄关系不大。Gunther 用 6 周龄的 SCID 小鼠,每只注射 1×10^6 个 Nalm-6 细胞,平均 32 d 后肢行动迟缓,39 d 瘫痪;Uckun 用 6~7 周龄的雌性 SCID 小鼠^[5],每只注射 1×10^6 个 Nalm-6 细胞,有 56% 的小鼠平均 33 d 发生瘫痪,39 d 全部死亡,两研究小鼠发病时间相似;Herrera 用 10~13 周龄的 SCID 小鼠^[6],注射 5×10^6 个 Nalm-6 细胞后平均 36 d 发病。本研究采用 5~6 周的裸鼠,每只注射 5×10^6 个 Nalm-6 细胞,平均 20 d 发病,模型建立成功率 100%,但是发病时间比上述报道早,可能是由于使用的小鼠周龄小,注射肿瘤细胞数目多,进入小鼠体内后生长繁殖较快,导致小鼠发病较早。

本研究通过制备小鼠组织病理切片, H-E 染色后观察小鼠各个组织脏器中肿瘤细胞的浸润情况,为模型是否建立成功提供依据。Uckun 建立的 Pre-B 急淋动物模型病理结果显示^[5]:小鼠髓腔里正常的造血细胞已由 CD45+HLA-DR+ 的人白血病细胞所代替,脾红髓和血窦中充满白血病细胞,肝脏白血病细胞弥散性浸润,有实质性白血病结节,卵巢、膀胱壁、胃黏膜下层、结肠黏膜下层都可发现白血病细胞;白血病细胞广泛浸润蛛网膜下腔、脑血管周 V-R 间隙、脊髓、脑膜。Herrera 等^[6]用 PCR 法检测小鼠的脑、骨髓、肝、脾、心、肺、睾丸、肾均有肿瘤细胞浸润。本研究动物模型病理结果显示:白血

病细胞广泛浸润脑膜、脑实质、肝、脾、肾组织,卵巢、肺也有浸润,部分小鼠的肝脾坏死,但心肌、胃黏膜,小肠、结肠黏膜、肾上腺中均未发现白血病细胞,这与 Uckun 报道的浸润范围有相似之处^[5],但是本研究中,小鼠的胃、小肠、结肠黏膜下层均未发现肿瘤细胞,原因不明,有待于进一步研究。

References:

- [1] VALLERA DA, TODHUNTER DA, KUROKI DW, et al. A bispecific recombinant immunotoxin, DT2219, targeting human CD19 and CD22 receptors in mouse xenograft model of B-cell leukemia/lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10):3879-3888.
- [2] DEMEHRI S, CORBIN A, LORIAUX M, et al. Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(3):284-288.
- [3] GUNTHER R, CHELSTROM LM, TUEL-AHLGREN L, et al. Biotherapy for xenografted human central nervous system leukemia in mice with severe combined immunodeficiency using B 43 (anti-CD19)-pokeweed antiviral protein immunotoxin [J]. *Blood*, 1995, 85(9):2537-2545.
- [4] OHSUGI T, YAMAGUCHI K, KUMASAKA T, et al. Rapid tumor death model for evaluation of new therapeutic agents for adult T-cell leukemia [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(2):263-266.
- [5] UCKUN F M, MANIVEL C, ARTHUR D, et al. *In vivo* efficacy of B 43 (anti-CD19)-pokeweed antiviral protein immunotoxin against human Pre-B cell acute lymphoblastic leukemia in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *Blood*, 1992, 79(9):2201-2214.
- [6] HERRERA L, YARBROUGH S, GHETIE V, et al. Treatment of SCID/human B cell precursor ALL with anti-CD19 and anti-CD22 immunotoxins [J]. *Leukemia*, 2003, 17(2):334-338.

[责任编辑 黄晓花]