

# 人眼眶横纹肌肉瘤动物模型的建立

梁莉<sup>1,2</sup>, 魏锐利<sup>1\*</sup>, 马晓晔<sup>1</sup>, 蔡季平<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003; 2. 武警安徽总队医院眼科, 合肥 230041)

**[摘要]** **目的:**探讨建立人眼眶横纹肌肉瘤动物模型的方法。**方法:**培养人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 细胞, 取对数生长期细胞分别接种于 4 周龄 SCID 鼠和<sup>60</sup>Co 照射 (1 Gy) 后 1 d 的 BALB/c 裸小鼠; 选用成瘤 BALB/c 裸小鼠的瘤块移植入另一批 4 周龄 BALB/c 裸小鼠腋下(组织块接种法)。观察各组动物肿瘤生长情况, 绘制肿瘤生长曲线; 肿瘤组织行常规病理 H-E 染色并镜检。**结果:**<sup>60</sup>Co 照射后 1 d 裸小鼠成瘤时间约 6~8 周, SCID 鼠组约 3~4 周, 组织块接种法移植 2 周后裸小鼠瘤体较明显, 3 组动物的成瘤率均为 100%; 成功绘制出肿瘤生长曲线, 肿瘤均呈进行性生长; 病理检查示各组移植性横纹肌肉瘤与人体肿瘤标本所见类似。**结论:**成功建立了裸小鼠和 SCID 鼠眼眶横纹肌肉瘤模型, 组织块接种法可以缩短 BALB/c 裸小鼠成瘤时间, 为进一步研究人眼眶横纹肌肉瘤奠定了基础。

**[关键词]** 模型, 动物; 眼眶; 横纹肌肉瘤

**[中图分类号]** R 739.72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0902-03

## Establishment of human orbital rhabdomyosarcoma model in mice

LIANG Li<sup>1, 2</sup>, WEI Rui-li<sup>1\*</sup>, MA Xiao-ye<sup>1</sup>, CAI Ji-ping<sup>1</sup> (1. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Ophthalmology, Anhui General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Hefei 230041)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To establish a mouse model of human orbital rhabdomyosarcoma(RD). **Methods:** RD cells were cultured and implanted subcutaneously into the costal regions of nude mice and severe combined immunodeficiency (SCID) mice (4 weeks old). The nude mice were radiated by <sup>60</sup>Co 1 day before the injection. The rhabdomyosarcoma tissue masses were harvested from nude mice and were subcutaneously implanted into the costal regions of another group of BALB/c mice (tumor tissue mass implantation). The tumor growth was observed in all groups and the growth curves were plotted. H-E staining was used to examine pathology of the tumor tissues. **Results:** Solid tumors were palpable 6-8 weeks after implantation in <sup>60</sup>Co radiated nude mice and about 3-4 weeks after implantation in SCID mice. The solid tumors were obviously seen in the nude mice 2 weeks after tumor tissue mass transplantation. The tumor forming rates were 100% in all groups. The tumor growing curves were successfully plotted and the tumors had a progressive growth. Pathological findings of the tumor tissue were similar to those of human orbital rhabdomyosarcoma. **Conclusion:** The human orbital rhabdomyosarcoma models have been successfully established in nude mice and SCID mice. Tumor tissue mass implantation can shorten the tumor forming time in BALB/c nude mice. This research lays a foundation for further study of human orbital rhabdomyosarcoma.

**[KEY WORDS]** models, animal; orbital; rhabdomyosarcoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8):902-904]

眼眶横纹肌肉瘤 (orbital rhabdomyosarcoma, ORMS) 是一种儿童时期常见的眶内恶性肿瘤, 恶性程度高, 发展快, 如得不到及时治疗, 多于一年内死亡<sup>[1]</sup>。建立人眼眶横纹肌肉瘤动物模型为该病的防治研究提供了体内研究的实验系统。本实验预试验中应用人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 细胞接种 BALB/c 裸小鼠后成瘤率较低 (约 60%), 现采用 SCID 鼠以及术前 1 d <sup>60</sup>Co 照射过的 BALB/c 裸小鼠进行细胞接种, 之后选用已成瘤的裸小鼠的瘤块移植入另外一批 4 周龄 BALB/c 裸小鼠皮下, 观察各组成瘤情况, 探讨建立人眼眶横纹肌肉瘤动物模型的方法。

### 1 材料和方法

1.1 细胞株 人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 细胞, 由中

科院细胞研究所提供。

1.2 动物及分组 4 周龄 BALB/c 裸小鼠及 SCID 小鼠, 雌雄各半, 体质量 15~20 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [许可证号: FCXK (沪) 2003-0003], 在第二军医大学实验动物中心清洁级 (SPF) 动物实验室饲养及实验。分组: BALB/c 裸小鼠共 24 只, 先后分为 2 批, 前 1 批 14 只, 后 1 批 10 只, 雌雄各半; SCID 鼠 10 只, 雌雄各半。

**[基金项目]** 上海市科委专项基金 (0352nm114)。Supported by Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (0352nm114)。

**[作者简介]** 梁莉, 硕士生, E-mail: lily-foxting@126.com

\* Corresponding author. E-mail: ruiwei@gmail.com

1.3 RD细胞培养 人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清、青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml) 的 DMEM-1640 培养基,置于含 8% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 孵育箱中,用胰蛋白酶消化,以 1:3 传代。

#### 1.4 人眼眶横纹肌肉瘤动物模型的制备

1.4.1 细胞接种 消化对数生长期细胞,离心 5 min (200 × g),计数,用 PBS 液制备 RD 单细胞悬液(含细胞数为  $1 \times 10^8$  /ml),对第 1 批裸小鼠和 SCID 鼠肺部皮肤进行局部消毒后,取 0.1 ml 上述悬液注射于肺部皮下。第 1 批裸小鼠于注射前 1 d 进行了 <sup>60</sup>Co 照射,剂量为 1 Gy/只。

1.4.2 组织接种 待上述第 1 批裸小鼠肺部皮下长出花生米大小的瘤块后,处死其中 4 只裸小鼠,剥离瘤块将瘤块切边长约为 2 mm 的正方形块若干,置于细胞培养液中。于第 2 批裸小鼠背部局部消毒后,用眼科剪剪开长约 0.5 cm 皮肤切口,用镊子将上步制得的瘤块沿皮下塞至肺部皮下,缝合皮肤。

1.5 肿瘤生长曲线的绘制 接种后每日观察各组动物 (SCID 鼠,第 1、2 批 BALB/c 裸小鼠)接种部位有无感染及肿瘤生长情况。使用游标卡尺于肿瘤长出后大小为 28 mm<sup>3</sup> 左右为记录起始,第 0、3、7、11、14、17、21、24 天测量肿瘤的长径(A)和短径(B),并按下述公式计算肿瘤体积:肿瘤体积  $V(\text{mm}^3) = A \times B^2 / 2$ ,共测量 7 次,绘制肿瘤生长曲线。

1.6 常规病理检查 每组测量至 24 d 后处死,完整取出肿瘤,10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,H-E 染色后镜检。

1.7 统计学处理 各组数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS ver. 10.0 统计软件处理,进行 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 细胞生长情况 人胚胎型横纹肌肉瘤细胞系 RD 在 DMEM 1640 培养基中呈贴壁生长,每 3 d 传代 1 次,体外培养的细胞生长状态良好,大部分呈多边形、梭形,核仁较多(图 1)。

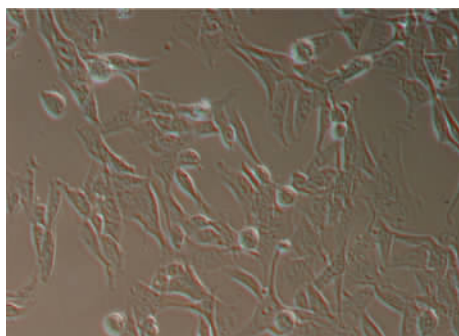


图 1 体外培养的 RD 细胞

Fig 1 RD cells cultured *in vitro*

2.2 动物模型肿瘤生长情况 接种当天各组皮下接种部位均见细胞悬液形成的囊泡,次日观察囊泡消失,均未出现明

显红肿的炎性反应。第 1 批裸小鼠、SCID 鼠分别于接种后第 6~8 周、3~4 周出现可触及米粒大小的瘤块,第 2 批裸小鼠瘤块接种后,瘤块未见消失,逐渐增大。各组成瘤率均为 100%,动物状态良好,实验期间无死亡。

2.3 肿瘤生长曲线 成功绘制肿瘤生长曲线,各组肿瘤生长趋势相近,均呈进行性生长,生长速度快(图 2),三组体积间无明显差异。

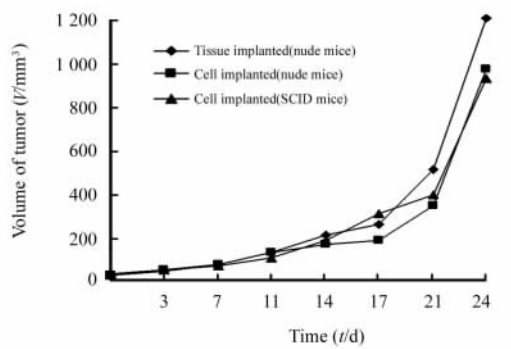


图 2 肿瘤生长曲线

Fig 2 Growth curves of tumors

2.4 常规病理检查 3 组皮下剥出的肿瘤近球状,表面光滑可见丰富的血管及少量纤维组织增生,表面及切面色白,质较硬。镜检可见毛细血管以及肿瘤细胞分布密集,呈腺样生长,细胞核大、深染,有异型,核仁 1~6 个,核分裂象多见(图 3)。

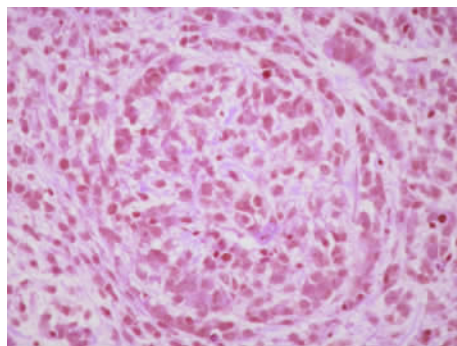


图 3 肿瘤组织标本 H-E 染色

Fig 3 H-E staining of tumor tissues (×100)

## 3 讨论

横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma, RMS) 是儿童时期最常见的一种软组织肉瘤,占有儿童期软组织肉瘤的 50%<sup>[2]</sup>。在人体很多部位发生,45% 发生于头颈部,在头颈部的 RMS 中原发于眼眶的占 25%~35%<sup>[3]</sup>。横纹肌肉瘤来源于横纹肌细胞及向横纹肌分化的间叶细胞,按其形态学特点可分为 4 型:胚胎型、葡萄状型、腺泡型和多形型。不同的组织类型与发病部位有密切关系,最常见的组织类型为胚胎型,占

RMS的50%~60%<sup>[4]</sup>,其中眼眶横纹肌肉瘤的四分之三也是属于胚胎型<sup>[5,6]</sup>,恶性程度高,发展快,如得不到及时治疗,多于1年内死亡<sup>[1]</sup>。根据实验的需要我们建立了人眼眶横纹肌肉瘤动物模型,以供研究此肿瘤的发生、发展以及治疗等。

通常,肿瘤动物模型可由以下几种途径产生:动物的自发肿瘤、诱发肿瘤和移植性肿瘤<sup>[7]</sup>。前两者较少应用,移植性肿瘤动物模型具有特性明确、生长一致性好、瘤株分布广泛、可反复复制等优点,在肿瘤研究中占有重要地位。因此实验前期我们选用了人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株RD的细胞悬液对BALB/c裸小鼠进行接种形成移植性肿瘤。裸鼠因缺乏胸腺或仅有残遗的胸腺器官存在,缺乏成熟T细胞的辅助抑制及杀伤功能,细胞免疫力低下<sup>[8]</sup>,因此通常作为肿瘤动物模型的理想选择,但在我们的预实验中成瘤率较低、肿瘤发生潜伏期长,考虑裸小鼠存在体液免疫,因此本研究采用<sup>60</sup>Co对裸小鼠进行照射,人为地进一步抑制裸小鼠免疫功能,同时我们考虑选用细胞和体液严重联合免疫缺陷的近交系小鼠——SCID小鼠,它同时缺乏T细胞和B细胞,免疫力更加低下<sup>[9]</sup>。本研究结果显示经过<sup>60</sup>Co照射后的裸小鼠和SCID鼠进行细胞接种后的确缩短了肿瘤发生的潜伏期。

经过<sup>60</sup>Co照射后的裸小鼠进行细胞接种虽然缩短了肿瘤发生的潜伏期,但成瘤时裸小鼠已为10周龄以上成年裸小鼠,研究表明成年裸小鼠体内有较高的NK细胞活力和不依赖T细胞的效应机制<sup>[8]</sup>,可能影响实验的结果。因此,本研究继续取出已成瘤的瘤块采用组织块接种法,接种于另外一批4周龄的BALB/c裸小鼠的肺部皮下,也获得100%成瘤率,同时缩短了成瘤时间。新的一批裸小鼠没有预先进行<sup>60</sup>Co照射,成瘤效果良好,考虑为经过体内培养后,提高了肿瘤细胞的适应体内环境的能力以及增加有活力的肿瘤细胞数量的结果。

在移植部位的选择上目前除了通常的皮下、肌肉内、腹腔内、脑内、肾囊膜下之外,还有常位异种移植(orthotopic hetero-transplantation)<sup>[8]</sup>,即将人肿瘤细胞移植至与肿瘤原

发部位相对应的动物脏器内,其移植瘤的生物学行为和药物动力学特点更接近人类的原发瘤,但操作相对复杂,同时不利于观察肿瘤。本研究中移植部位选用动物的肺部皮下,肺部皮下生长空间大,利于肿瘤生长,便于药物应用后的疗效观察,适应下一步研究的要求。

本研究表明应用细胞接种<sup>60</sup>Co照射后的裸小鼠、SCID小鼠以及结合组织块接种法接种裸小鼠形成人眼眶横纹肌肉瘤的动物模型成瘤率高,移植瘤生长良好,适于观察和研究,为下一步对人眼眶横纹肌肉瘤的研究奠定了基础。SCID鼠制模成本相对较高,但由于裸小鼠仍具有体液免疫功能,因此当研究免疫治疗方法时宜选择SCID鼠制模。

[参考文献]

- [1] Shields JA, Shields CL. Rhabdomyosarcoma: review for the ophthalmologist[J]. Surv Ophthalmol, 2003, 48:39-57.
- [2] Andrea S, Jayant R. Rhabdomyosarcoma [J]. India J Pediatr, 2004, 71: 331-337.
- [3] Nishi M, Hatae Y. Epidemiology of malignant neoplasms in soft tissue during childhood[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2004, 23: 437-440.
- [4] 赖日权 主编. 软组织肿瘤病理学[M]. 北京:人民军医出版社, 1998:101-109.
- [5] 倪 逵, 马小葵, 郭秉宽. 1422例眼眶肿瘤的病理分类[J]. 中华眼科杂志, 1991, 27:71-73.
- [6] SongGX. Orbital lesions: enlightenment from 1012 operations [J]. Asian Hospital, 1989, 8:23.
- [7] 王蘅文 主编. 实验肿瘤学基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992:18-19.
- [8] 朱清华, 祝庆蕃 主编. 实验动物学[M]. 广州:高等教育出版社, 1991:141-142, 146-154.
- [9] Tary-Lehmann M, Saxon A, Lehmann PV. The human immune system in hu-PBL-SCID mice[J]. Immunol Today, 1995, 16:529-533.

[收稿日期] 2006-04-17

[修回日期] 2006-06-16

[本文编辑] 贾泽军

## 全国博士学位论文评选二军大荣膺“双冠王”

2006年“全国优秀博士学位论文”日前揭晓,第二军医大学免疫学博士生陈涛涌(导师:曹雪涛院士)、普通外科学博士生张琪(导师:吴孟超院士)的两篇博士学位论文入选。至此,论文评选活动开展8年来,第二军医大学共入选论文9篇、获提名奖5篇,入选的论文总数列全军院校第1名、全国医科院校第1名。