

免疫缺陷动物筛选人转移癌中动物非期望死亡原因分析

谭晓洁^{1△}, 贺松琴^{1△}, 侯建国², Daniele Martarelli¹, 余永伟³, 曹广文^{1*}

(1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433; 3. 长海医院病理科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 阐明免疫缺陷动物筛选人转移癌组织过程中主要的非正常死亡原因, 为人类肿瘤动物模型建立和筛选提供借鉴。 **方法:** 采用皮下、原位、肾包膜下移植等多种方法对 267 只 BALB/c 裸小鼠接种 (或注射) 人肾细胞癌、前列腺癌临床标本、DU-145 细胞系, 分析成瘤率、肝脏病变情况 (临床表现、病理切片、死亡时间分布) 等。 **结果:** 移植肾细胞癌标本的总成瘤率为 21.7% (35/161), 转移率为 1.2% (2/161)。移植前列腺癌临床标本均未成瘤或发生转移; 移植 DU-145 细胞系成瘤率为 100% (20/20), 转移率为 25% (5/20)。肾细胞癌临床标本移植小鼠肝脏病变率为 58.4% (94/161), 前列腺癌临床标本移植小鼠肝脏病变率为 43.4% (46/106), DU-145 细胞系移植小鼠无 1 例肝脏病变发生。移植肾细胞癌、前列腺癌标本肝脏病变小鼠死亡高峰与小鼠总体死亡高峰趋势一致, 均发生在每年的冬春季。 **结论:** 肝脏病变是造成动物非正常死亡的主要原因, 严格控制 SPF 环境方可保证肿瘤动物模型的顺利建立。

[关键词] 肿瘤移植; 癌; 肾细胞; 前列腺肿瘤; 肝脏病变; 动物, 模型

[中图分类号] R-322 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0077-05

Unexpected death analysis of immune-deficient mice when they were used for establishing human metastatic cancer models

TAN Xiao-jie^{1△}, HE Song-qin^{1△}, HOU Jian-guo², Daniele Martarelli¹, YU Yong-wei³, CAO Guang-wen^{1*} (1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To elucidate the major reasons for unexpected death nude mice when they were used for establishing human metastatic cancer models. **Methods:** The fresh specimens of human renal cell carcinoma (RCC), prostate cancer (PC), and DU-145 cells were transplanted / injected into nude mice ecotopically and orthotopically. Tumorigenesis and pathological changes (including the symptoms, pathological sections, survival time, etc.) of mouse liver were investigated subsequently. **Results:** The tumorigenesis and metastasis rates were respectively 21.7% (35/161) and 1.2% (2/161) after implantation of RCC sample, and were respectively 100% (20/20) and 25% (5/20) after implantation of DU-145 cell line, while there was no tumorigenesis or metastasis after implantation of PC specimens. Liver pathological changes were found in 58.4% (94/161) of mice implanted with RCC samples and in 43.4% (46/106) of mice implanted with PC samples. No pathological lesion was found in mice implanted with DU-145 cells. The death peak of mice with pathological changes after implanting RCC and PC samples was consistent with that of the total mice used in this study, all occurring in the winter and spring of the year. **Conclusion:** The pathological changes of liver appear to be the major reason of unexpected death of the nude mice when they were used for establishing human metastatic cancer models. A specified pathogen-free environment is very important for establishment of the models.

[KEY WORDS] implantation; carcinoma, renal cell; prostatic neoplasms; pathological changes of liver; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 77-81]

我室于 2003 年 2 月至 2006 年 4 月间在某校两个 SPF 级实验动物中心采用肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 临床标本及其原代培养细胞悬液、前列腺癌 (prostate cancer, PC) 临床标本及其原代培养细胞悬液、DU-145 细胞系对免疫缺陷动物进行了移植, 以建立 RCC、PC 免疫缺陷动物转移模型。并通过低成瘤率、低转移率、高肝脏病变率的对比分析, 阐明免疫缺陷动物筛选人转移癌组织过程中主

要的非正常死亡原因, 提出改进措施。现报告如下。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30370788); 教育部回国人员启动基金 (教外留司 [2003] 406 号)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30370788) and Scientific Research Foundation for Returned Scholars from Abroad, Ministry of Education of China ([2003] 406)。

[作者简介] 谭晓洁, 硕士, 助教; 贺松琴, 硕士生。

△ Two authors contributed equally to the project.

* Corresponding author. E-mail: gcao@smmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c 裸小鼠,雌雄不拘,4 周龄,分别购自中国科学院上海分院动物中心和上海 BK 公司。在某校两个动物中心 SPF 条件下饲养。DU-145 细胞系,购自中国科学院上海细胞研究所。

汉族人新鲜 RCC 临床标本和 PC 标本,取自长海医院泌尿外科未经其他治疗的 RCC、PC 手术患者,手术切除后立即置于 4℃ 保存(保温瓶加冰块),手术切除到动物移植间隔一般不超过 30 min。

1.2 人肿瘤动物体内移植方法 采用 10 mg/ml 戊巴比妥钠(70 μl/10 g)腹腔注射麻醉动物。应用精密手术器具(Roberz,德国)进行精密动物手术。除移植过程中麻醉意外、未接种标本饲养意外,共成功移植了 267 只免疫缺陷动物。人新鲜 RCC 临床标本采用皮下、肾周筋膜内^[1]、肾包膜下原位^[2]、皮下+肾包膜下移植,RCC 原代培养细胞悬液采用肾包膜下原位注射法。汉族人新鲜 PC 标本采用皮下、前列腺原位、肾包膜下移植^[3],PC 原代培养细胞悬液采用前列腺原位注射法^[4]。DU-145 细胞系采用皮下注射、前列腺原位注射、肾包膜下注射法。

1.3 小鼠形成肿瘤的观察、细胞培养和再移植 移植 RCC 相关标本的小鼠:通常在小鼠瘦弱、精神萎靡濒死时,颈椎脱臼处死。移植 PC 相关标本的小鼠:由于致瘤后期瘤体增大易堵塞尿道引起尿潴留

而死亡,故一般当触摸到膀胱涨大、但尚未出现恶液质时即处死,以免影响肿瘤组织再移植的活性。凡发现可疑肿瘤灶或转移灶,常规进行体外培养包括相关脏器在内的病理检查,并冻存。肉眼可见的较为明显的肿瘤灶除进行上述两项操作外,进行裸小鼠体内肿瘤组织的再移植。

1.4 病理分析 Formalin 固定,取材包埋连续石蜡切片,H-E 染色,常规方法进行。

1.5 统计学处理 采用第二军医大学卫生勤务学系统统计学教研室 SAS 9.12 软件进行分析,检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 成瘤及转移情况 总成瘤率为 20.6% (55/267),转移率为 2.6% (7/267)。移植 RCC 标本的总成瘤率为 21.7% (35/161),转移率为 1.2% (2/161),其中皮下移植成瘤率最高,其次为肾包膜下、肾周筋膜内、皮下+肾包膜下,细胞悬液原位注射为 0。5 种不同的 RCC 标本移植法只有肾包膜下存在转移,均转移至肠系膜淋巴结,转移率为 4.1% (2/49)。移植 PC 标本的总成瘤率为 18.9% (20/106),转移率为 4.7% (5/106)。移植 PC 临床标本均未成瘤或发生转移,而采用同样的方法移植 DU-145 细胞系成瘤率为 100% (20/20),转移率为 25% (5/20),分别转移至肠系膜淋巴结、肝门淋巴结、腹股沟淋巴结、肝、肺。见表 1。

表 1 移植肿瘤标本成瘤及转移情况

Tab 1 Tumorigenesis and metastasis of human tumors implanted into nude mice

[% (n/N)]

Samples	Implantation location	Rate of tumorigenesis	Rate of metastasis
RCC(fresh surgical specimens)		21.7(35/161)	1.2(2/161)
	Subcutis	37.5(3/8)	0(0/8)
	COI	0(0/27)	0(0/27)
	Perinephrium	23.1(9/39)	0(0/39)
	SOI	36.7(18/49)	4.1(2/49)
PC	Subcutis and SOI	13.2(5/38)	0(0/38)
		18.9(20/106)	4.7(5/106)
	Fresh surgical specimens	0(0/86)	0(0/86)
	Subcutis	0(0/13)	0(0/13)
	COI	0(0/19)	0(0/19)
DU-145	SOI	0(0/16)	0(0/16)
	Under renal capsule	0(0/38)	0(0/38)
		100(20/20)	25(5/20)
	Subcutis	100(4/4)	25(1/4)
	COI	100(5/5)	80(4/5)
Total	Under renal capsule	100(11/11)	0(0/11)
		20.6(55/267)	2.6(7/267)

COI:Cellular orthotopic injection; SOI: Surgical orthotopic implantation

2.2 术后存活时间 依据相关文献^[5], 2 周存活率可反映小鼠术后感染或其他意外情况, RCC 细胞系成瘤鼠最快 5 周濒死, 最慢 8 周濒死。故分别选择 2 周、5 周、8 周为时间界值评价不同移植方法对动物健康状况造成的影响。各种方法 2 周存活率无统计学差别, 平均存活率为 92.5% (149/161)。各种方法 5 周存活率无统计学差别, 平均存活率为 83.2% (134/161)。8 周存活率平均值为 60.9% (98/161), 以皮下+肾包膜下法最高(84.2%), 其次分别为皮下移植法(62.5%)、肾包膜下法(61.2%)、细胞悬液原位注射法(48.1%)、肾周筋膜内法(46.2%), 各方法间的差别有统计学意义($P < 0.05$)。

进一步分析 RCC 临床标本移植术后存活时间。成瘤鼠术后平均存活时间小于未成瘤鼠, 但无统计学意义。除细胞悬液原位注射法无成瘤外, 皮下移植法和肾包膜下法成瘤鼠平均存活时间大于未成瘤鼠平均存活时间, 皮下+肾包膜下法和肾周筋膜内法成瘤鼠平均存活时间小于未成瘤鼠平均存活时间(图 1A)。

PC 临床标本及 DU-145 移植动物成瘤鼠原位注射法和肾包膜下注射法成瘤鼠存活时间均小于未成瘤鼠平均存活时间($P < 0.05$, 图 1B)。

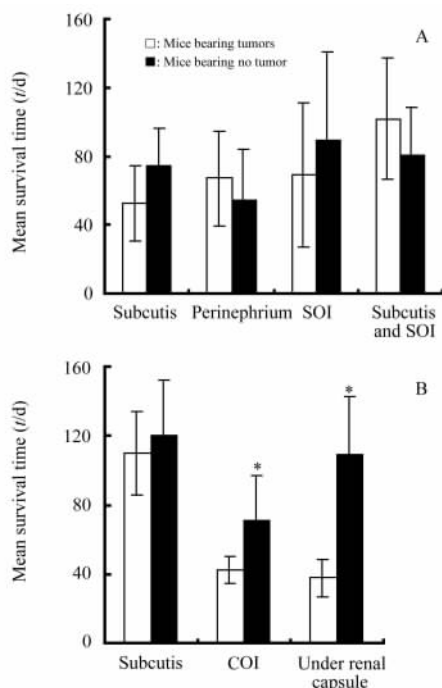


图 1 RCC 临床标本不同移植方法(A)及 PC 临床标本和 DU-145 细胞系移植小鼠(B)术后平均存活时间分析

Fig 1 Average survival time of mice transplanted with RCC by different methods (A), transplanted with PC and DU-145(B)

* $P < 0.05$ vs mice bearing tumors; $\bar{x} \pm s$

2.3 肝脏病变情况 在成功移植的 267 只小鼠中, 有 140 只发生不同程度肝脏病变致死。其中 RCC 临床标本移植小鼠肝脏病变率为 58.4% (94/161), PC 临床标本移植小鼠肝脏病变率为 43.4% (46/106), DU-145 细胞系移植小鼠无 1 例肝脏病变发生。解剖时见肝脏表面弥漫性出血或坏死性病灶、脾肿大, 并伴有不同程度的肾门淋巴结、髂动脉间淋巴结、前肢腋下淋巴结、腹股沟淋巴结肿大。镜下观察, 肝细胞弥漫性的大片坏死, 肝窦扩张充血, 小叶内有淋巴细胞和巨噬细胞为主的炎性细胞浸润。见图 2。2003 年 2 月至 2006 年 4 月出现 2 个死亡高峰, 分别为 2004 年 12 月至 2005 年 3 月、2005 年 11 月至 2006 年 3 月。移植 RCC 标本肝脏病变小鼠死亡高峰与小鼠总体死亡高峰趋势一致(图 3A), 移植 PC 标本也出现类似的情况(图 3B), 死亡高峰均发生在每年的冬春季。

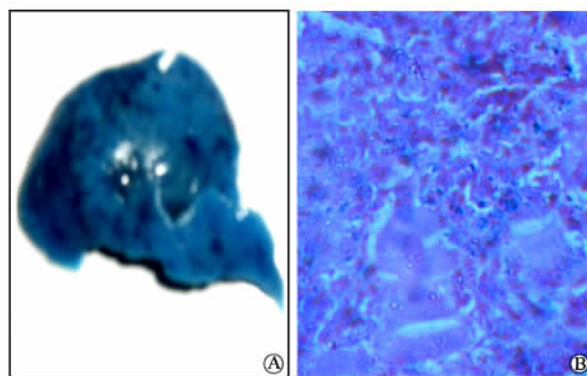


图 2 小鼠病变肝脏(A, 10%甲醛溶液固定)及其病理切片(B)

Fig 2 Pathological changes of mice liver(A, 10% formalin fixed) and pathological sections (B, H-E, X400)

3 讨论

小鼠的自身健康状况对移植瘤的生长至关重要^[6]。移植 RCC 临床标本, 皮下移植和肾包膜下移植成瘤率较高。皮下成瘤鼠瘤体生长局限, 肾包膜下移植成瘤鼠移植组织虽大都已侵入肾实质, 但只有个别小鼠瘤体较大。成瘤鼠、未成瘤鼠普遍存在肝脏的损害。移植 RCC 临床新鲜标本发生小鼠肝脏病变比例为 58.4%。其中肾周筋膜内法、皮下+肾包膜下移植未成瘤小鼠平均存活时间均小于成瘤小鼠平均存活时间, 提示小鼠健康状况较差, 小鼠尚未成瘤即因其他原因死亡。由此导致肾周筋膜内

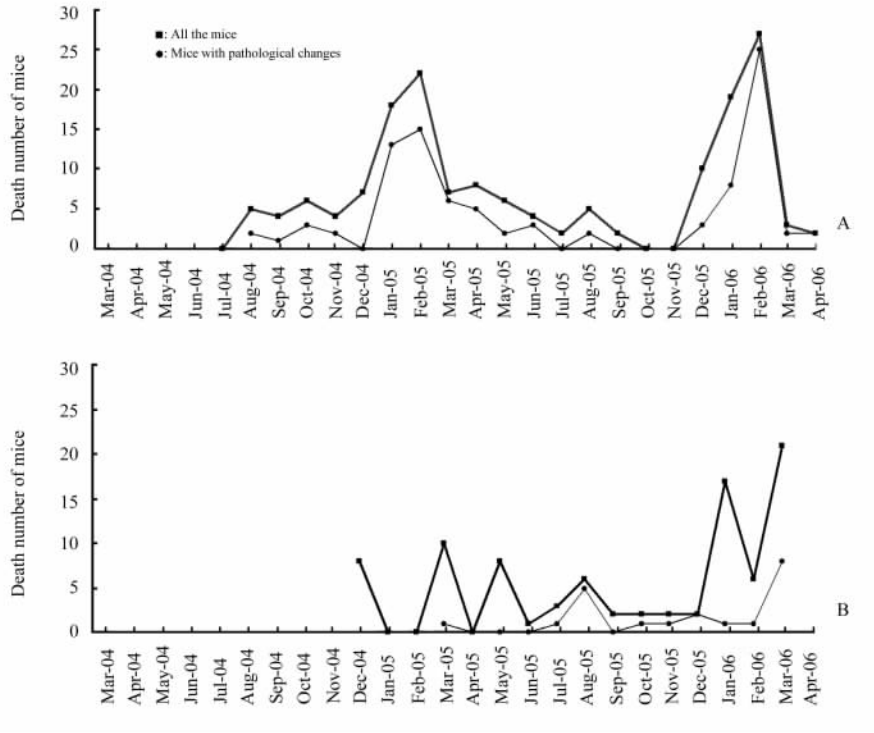


图 3 RCC(A)和 PC(B)全部小鼠、肝脏病变小鼠死亡时间分布

Fig 3 Distribution of death time of all mice and mice with pathological changes after transplanted RCC(A)and PC(B)

法、皮下+肾包膜下移植法成瘤率相对较低。皮下移植、肾包膜下移植未成瘤小鼠平均存活时间大于成瘤小鼠平均存活时间,其成瘤率也相对较高。又各种方法 2 周、5 周存活率均较高,即便是成瘤率较低的皮下+肾包膜下移植法的 8 周存活率也达到 84.2%(32/38),故可初步排除手术及术后感染、免疫排斥反应对小鼠健康造成的损害。小鼠总体死亡时间和肝脏病变小鼠死亡时间分布的升降趋势基本一致,均出现 2 个死亡高峰——2004 年 12 月至 2005 年 3 月、2005 年 11 月至 2006 年 3 月,说明小鼠肝脏病变情况是造成小鼠非预期死亡的主要原因。由于 2 个死亡高峰均在每年的冬春交替季节,此时正是冠状病毒活跃的季节,为小鼠提供了感染鼠肝炎病毒的机会。这两个时间段分别对应着该阶段所采取的移植方法:肾周筋膜内移植、皮下+肾包膜下移植,由于这两种方法成瘤率低,更加确证小鼠是由于肝脏病变而不是致瘤因素导致死亡。

移植 PC 临床标本,无 1 例成瘤或转移,肝脏病变率为 53.5%。采用不同方法注射 DU-145 细胞系,成瘤率为 100%,且广泛转移,转移率为 25%,但无 1 例肝脏病变。由于 PC 与某些前列腺良性病变

在组织学和细胞学上有一定程度相似,肉眼区分存在较大局限性和误差。临床上采用多点穿刺病理诊断确定 PC 患者。而用于移植小鼠的 PC 组织由于实验条件的限制无法作到多点穿刺病理确定,实际是否存在具有活性的肿瘤细胞及其含量都无法确定。这是采用 PC 临床标本建立动物模型的难点所在,也是本研究零致瘤率的主要原因之一。

另一个不可忽视的因素就是肝脏的损害使得小鼠在尚未致瘤即终止生命,严重影响了致瘤及转移^[7]。病鼠病程通常进展较快,表现为精神萎靡、呆滞、被毛粗乱、弓背、营养不良、进行性消瘦直至死亡。病理切片见肝细胞坏死,大量炎性细胞浸润。所有临床资料、病理资料及流行病学资料提示动物很可能因感染小鼠肝炎致死。但缺乏鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)的血清学资料,这是本研究的不足之处。

肿瘤组织的移植部位影响着肿瘤的生长方式及转移行为。早有文献报道,非特异性免疫炎性病变可改变肿瘤在动物体内的致瘤过程包括肿瘤细胞的生长方式,感染 MHV 的小鼠对动物体内致瘤有抑制作用。Kyriazis 等^[6]将同样数量的肿瘤细胞注射

MHV 阳性和 MHV 阴性的裸鼠,结果发现在裸鼠成瘤数量、瘤体大小、乳酸脱氢酶是否阳性存在显著差别,且 MHV 阳性裸鼠所形成的肿瘤无一例存在侵袭和转移。转移是包括一系列步骤的复杂过程,虽然制约影响转移的因素很多,但就本研究低成瘤率、低转移率、高肝脏病变率而言,MHV 感染是重要的影响因素,它直接或间接地影响了瘤体的生长行为及转移的发生。MHV 主要通过气溶胶、直接接触传播等造成自发感染,也可通过移植的肿瘤组织及胎盘等形成实验性感染^[8]。小鼠受 MHV 感染,血清中可产生抗体。抗体可保护小鼠免受同一品系^[9]病毒感染 1 个月至半年,但很难保证免受不同品系病毒感染^[10]。加之 MHV 病毒高频率的基因重组与变异特性,对免疫缺陷小鼠的影响将更加严重。不仅 MHV 感染造成的高死亡率影响了致瘤,而且 MHV 感染免疫与小鼠原位移植模型的低转移率密切相关。具有转移潜能的瘤细胞逃避宿主的免疫监督是转移的关键步骤。裸鼠体内有 T 细胞前体,可以诱导分化为胸腺细胞增强非特异性免疫。在感染 MHV 的宿主细胞的免疫调控下,不仅成瘤困难而且很难形成转移,即便成瘤也可能因为动物的健康状况受到影响而终止^[11]。重症联合免疫缺陷小鼠受 MHV 感染,病程进展迅速,通常表现为同一笼具内的小鼠在一夜间全部死亡,解剖见严重的肝脏病变。小鼠肝炎严重影响科学实验的顺利进行,同时造成科研经费的严重浪费,导致灾难性后果。

免疫缺陷动物的日常饲养及手术移植等工作对众多环节提出了严格的要求,相关专业人员必须接受专业培训。在严格控制手术过程无菌操作基础上,环境因素也要格外引起关注。只有严格的 SPF 环境,才能保证肿瘤动物模型的顺利建立,从而无偏倚地作出科学结论。

[参考文献]

- [1] 谭晓洁,侯建国,贺松琴,等. 人肾细胞瘤原位移植裸鼠模型的建立及转移相关基因表达分析[J]. 第二军医大学学报,2006,27:263-267.
- [2] An Z, Jiang P, Wang X, et al. Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection[J]. Clin Exp Metastasis,1999,17:265-270.
- [3] Wang Y, Revelo M P, Sudilovsky D, et al. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue[J]. Prostate,2005,64:149-159.
- [4] 王鹏飞,师长宏,邵晨,等. 利用裸鼠建立人前列腺肿瘤原位移植模型[J]. 中华实验外科杂志,2002,19:230-231.
- [5] Fidler I J. Experimental orthotopic models of organ-specific metastasis by human neoplasms[M]//Zetter BR ed. Advances in molecular and cell biology: homing mechanisms and cellular targeting, Vol. 9. Greenwich, CT: JAI Press Inc,1994:191-121.
- [6] Kyriazis A P, DiPersio L, Michael J G, et al. Influence of the mouse hepatitis virus (MHV) infection on the growth of human tumors in the athymic mouse[J]. In J Cancer, 1979,23:402-409.
- [7] 罗勇,张林琳,贺大林,等. 裸鼠前列腺原位肿瘤模型的建立[J]. 第四军医大学学报,2005,26:1797-1799.
- [8] Baker D G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11: 231-266.
- [9] Nakamura N, Yoshizumi S, Urano T, et al. Differentiation of mouse hepatitis virus genotypes by restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Lab Anim,2005,39:107-110.
- [10] Won Y S, Jeong E S, Yark H J, et al. Microbiological contamination of laboratory mice and rats in Korea from 1999 to 2003[J]. Exp Anim,2006,55:11-16.
- [11] Fuchizaki U, Kanako S, Nakamoto Y, et al. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus[J]. J Med Virol, 2003,69:188-194.

[收稿日期] 2006-06-30

[修回日期] 2006-11-03

[本文编辑] 尹茶