



小鼠骨肉瘤模型构建的关键

符策岗¹, 曾 艳², 赵红卫¹, 刘 扬¹, 肖运祥¹, 陈海丹¹

(1. 三峡大学第一临床医学院, 宜昌市中心人民医院脊柱外科/脊柱微创中心, 脊柱医学与创伤研究所, 宜昌 443000;
2. 三峡大学医学院, 宜昌 443000)

【摘要】 目的 探讨骨肉瘤动物模型荷瘤成功率的关键因素。**方法** 24 只 4~8 周龄 C3h 小鼠, 其中 C3h/HeJ 型 6 只、C3h/HeN 型 18 只, 随机分为 2 组。A 组采用一般脱毛膏脱毛后外侧腋下注射浓度为 5×10^7 个数量级/mL 的 LM8 细胞悬液 0.2 mL; B 组采用动物剃毛器剃毛后外侧腋下皮下注射浓度为 5×10^7 个数量级/mL 的 LM8 细胞悬液 0.2 mL 后每日给予注射处局部按摩, 并分别记录肿瘤生长情况。**结果** A 组成瘤率 33% (4/12); B 组成瘤率 100%。**结论** 不同的注射技巧对 LM8 的荷瘤过程及后期护理对成瘤率具有重要的意义。

【关键词】 C3h; 骨肉瘤; 模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0073-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.014

Keys in constructing osteosarcoma model of mouse

FU Ce-gang¹, ZEN Yan², ZHAO Hong-wei¹, LIU Yang¹, XIAO Yun-xiang¹, CHEN Hai-dan¹

(1. Institute of Spinal Medicine and Trauma, Department of Spinal surgery Ward/Center for Minimally Invasive Spine Surgery, The First College of Clinical Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443000, China.
2. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

【Abstract】 Objective Investigating the key factors in constructing animal model of osteosarcoma. **Methods** 24 C3h mice (C3h/HeJ type 6, C3h/HeN type 18 at 4–8 weeks old) were randomly divided into 2 groups: A group: Subcutaneous inject 0.2 mL of 5×10^7 cells/mL LM8 suspension in lateral armpit before treated with depilatory creams; B group: subcutaneous inject 0.2 mL of 5×10^7 cells/mL LM8 suspension in lateral armpit before treated with shaver, and the tumor growth was recorded. **Results** The rate of A was 30% (4/12), and the rate of B was 100%. **Conclusions** Injected techniques and the way of post handle play important role in constructing osteosarcoma model.

【Key words】 C3h; Osteosarcoma; Models

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 好发于儿童和青少年, 而在 25~59 岁之间发病率相对较低, 这可能说明骨肉瘤发病与骨的生长活动有关^[1]。骨肉瘤的好发部位是肱骨远端、股骨远端和胫骨近端, 临床治疗主要以手术联合化疗为主, 虽然在很大程度上提高了患者的生存率, 但由于化疗耐药性和肿瘤转

移使得部分患者的死亡率居高不下。因此, 借助各种肿瘤动物模型研究骨肉瘤的发生和发展、开发新型药物和治疗方式对提高 OS 患者的生存率具有重要意义。肿瘤细胞移植是常用的建模方法之一, 但在实际工作中发现, 不同的前/后期处理对荷瘤的成功率及肿瘤的生长具有很大影响, 尤其是在非裸

【基金项目】 国家自然科学基金 (81302346); 宜昌市科技研究基金 (A12301-06); 宜昌市中心人民医院基金 (KFJ2011009)。

【作者简介】 符策岗 (1991-), 男, 硕士生, 专业: 骨外科。Email: fucegang005@sina.com。

【通讯作者】 陈海丹 (1982-), 男, 博士, 研究方向: 免疫学。Email: wenquanchd@sina.com。

鼠荷瘤的过程中。近几年,肿瘤免疫逃逸及肿瘤免疫有关的研究广受人们关注,且探讨肿瘤免疫相关基因、蛋白及蛋白糖基化修饰对肿瘤的影响已经成为研究热点之一^[2]。因此,一个稳定的、成瘤率高且免疫力健全的动物模型成为了免疫机制相关体内试验的关键。在此,我们将对比 C3h 小鼠荷瘤过程中的细节问题并进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C3h 小鼠,周龄在 4~8 周,体重在 20~30g,由武汉大学动物实验中心提供【SCXK(鄂)2014-0004】【SYXK(鄂)2011-0061】,C3h/HeJ 型 6 只和 C3h/HeN 型 18 只,雌雄兼备。其实验操作和饲养均在 SPF 条件下的超净层流架中进行,灭菌处理的水和饲料供动物自由摄入。实验分为 A、B 两组,A 组采用脱毛膏备皮后右外侧腋下注射浓度 5×10^7 个数量级/mL 的 LM8 细胞悬液 0.2 mL;B 组采用动物剃毛器备皮后右外侧腋下皮下注射浓度 5×10^7 个数量级/mL 的 LM8 细胞悬液 0.2 mL 后每日给予注射处局部按摩,每组各 12 只。

1.2 主要试剂

α MEM 培养基:由 Thermo 公司提供;胎牛血清(FBS):由四季青公司提供(使用前 56℃ 水浴 30 min 灭活);胰酶及其他实验试剂:由宜昌市中心人民医院中心实验室提供;芊茗草脱毛膏和电动剃毛器由网上购买。

1.3 细胞

C3h 小鼠源性 LM8 骨肉瘤细胞购自第四军医大学西京骨科医院实验室,用含 10% 胎牛血清 α MEM 培养液培养,用 0.25% 胰酶消化传代,每 2~3 d 传代 1 次。

1.4 C3h 小鼠骨肉瘤模型的建立

1.4.1 小鼠前期处理

A 组:荷瘤前两小时将脱毛膏抹于小鼠右外侧腋下,范围为已拟定荷瘤部位为圆心半径为 2 cm 区域,待局部鼠毛脱落后无菌生理盐水洗净,可清晰观察到皮肤组织和皮下血管。B 组:荷瘤前两小时使用电子剃毛器剔除小鼠右外侧腋下局部鼠毛,范围同上。

1.4.2 细胞前期处理

荷瘤前 24 h,需给细胞常规更换培养基,保持细胞密度占培养瓶的 50% 左右。荷瘤前观察细胞密

度,挑取细胞密度在 80%~90% 活力较好的细胞用于荷瘤。

1.4.3 小鼠荷瘤

0.25% 胰酶消化细胞后,收集于无血清 α MEM 培养基中,定容至 5×10^7 个数量级/mL 后取 0.2 mL 皮下注射于小鼠右腋中线 1 cm 处。

1.5 荷瘤后期处理与观察肿瘤

移植完成后,A 组:逐日观察移植部有无感染,肿瘤生长后有无自然消退,有无破溃出皮肤。B 组:在 A 组观察项目的基础上给予荷瘤处局部按摩(以荷瘤部位为按摩点做按压滑动按摩)10 s。

2 结果

A 组:荷瘤时可观察到明显局部皮丘,荷瘤后 1 d 可见皮丘明显缩小;荷瘤后 5 d 66% (8/12) 小鼠荷瘤部位皮肤平坦,33% (4/12) 局部凸起;荷瘤后 10 d,66% (8/12) 仍保持局部平坦,33% (4/12) 凸起持续增大,但未见破溃出皮肤;荷瘤后 20 d,66% (8/12) 小鼠荷瘤部位皮肤平坦,未见其他不适症状,33% (4/12) 可见肿瘤生长处局部皮肤出现破溃。B 组:荷瘤时可观察到明显局部皮丘,荷瘤后 1 d 可见皮丘明显缩小;荷瘤后 5 d 100% (12/12) 小鼠荷瘤部位凸起明显,按压刺激肿瘤时有可能加速皮肤破溃;荷瘤后 10 d,凸起持续增大并出现破溃;荷瘤后 20 d,可见肿瘤生长处局部皮肤出现破溃。

3 讨论

骨肉瘤动物模型的建立包括自发、诱导、肿瘤移植和基因工程等方式,常用的实验动物有犬、鼠和斑马鱼等^[3-4]。理想的动物模型对研究肿瘤的发生和发展,以及新型药物和治疗方式的研发具有重要的指导作用。虽然自发型 OS 模型未加入其他人为因素的影响是最理想的模型,但多数自发肿瘤模型多见于成年犬类,且发病迅速不利集体实验。诱发型 OS 模型相对容易获取并稳定,目前也作为主要的 OS 模型获取方式之一,并适用于多种实验研究。但由于人为诱导方式一定程度的也影响了对 OS 发病机制和病理特点的研究。转基因模型建立技术虽然能更好地模拟人体内生理、病理环境,与所研究肿瘤的发生过程具有较好的一致性,但是诱导出来的骨肉瘤仅有 16.3% 发生于四肢骨,并不能很好的用于实验^[5]。

肿瘤移植是近年常用的肿瘤模型构建方式之

一, 由于其的操作简单、动物成瘤稳定且均一性好而广受科研工作者的青睐^[6]。根据肿瘤的来源不同可将肿瘤移植分为异种移植和同种移植。异种移植是指肿瘤来源和动物模型并不是同一个物种, 因此存在免疫排斥, 所以常用裸鼠作为实验模型, 常用于与免疫系统无关的实验。相对于异种移植, 同种移植常被用于免疫相关的实验研究中。常用的模型有 UMR-106 荷瘤的 Sprague-Dawley^[7] 和 LM8 荷瘤的 C3h 小鼠^[8]。两篇报道均称局部注射 UMR-106 或 LM8 均可 100% 的建立肿瘤模型, 但我们在日常操作时由于细节的忽视可能达不到这样的成瘤率。因此, 我们尝试对比不同的荷瘤操作及后期护理对荷瘤率的影响, 已确保荷瘤的成功率, 为后期实验提供有价值的指导。

本实验以 C3h 鼠源性 LM8 细胞以 5×10^7 个数量级/mL 的细胞悬液 0.2 mL 皮下注射于小鼠右腋中线下 1 cm 处, 并观察不同前/后期小鼠处理对小鼠荷瘤率及肿瘤生长的影响。结果发现使用剃毛器备皮, 并在荷瘤后每日给予相应按摩刺激, 能显著提高成瘤率且肿瘤生长迅速。备皮方式和局部按摩能帮助刺激肿瘤生长提高荷瘤率。

本实验同时发现许多有价值的操作方式方法。

1) 保证细胞活力: 荷瘤前一天常规给细胞更换培养基, 并保持细胞密度在 50% 左右, 待次日荷瘤时密度在 80% ~ 90%, 细胞活力较强, 荷瘤成功率较高。2) C3h/HeN 型小鼠肿瘤模型稳定性高: C3h 小鼠 HeJ 型 (C3H/HeJ-Pde6brd, 在脂多糖反应位点的突变 (*Tlr4*^{Lps-d}) 使得它对内毒素耐受, 对革兰氏阴性菌高度易感。携带 rd (视网膜退化) 基因, 在离乳周龄时便会产生失明。) 与 HeN 型 (除没有 *Tlr4* 位点突变外其余特征和 C3h/HeJ 基本类似, 对内毒素敏感。) 对比发现, HeN 型整个实验过程中并不存在自然死亡, 而 HeJ 型在未形成皮下肿瘤的小鼠, 在第 30 天发现存在自然死亡 1 例, 34 d 发现 2 例 (解剖后均未发现体内肿瘤)。3) 皮下注射: 肿瘤细胞皮下注射深度及进针长度对肿瘤的成长具有重要影响。本实验发现, 皮下注射较浅会引起注射后局部皮肤隆起明显并透亮的实验鼠常在第 5 天即可发现肿瘤破溃皮肤而流出, 以及入针部位距离注射部位较近会引起退针时细胞液流出较多并影响后期肿瘤大小的测量。通过改良注射的方式后发现, 将注

射器针头深入皮下, 并沿着皮下皮肤游行 10 ~ 15 mm 后针尖抵住肋骨注射肿瘤细胞, 能有效保证足够的皮下空间给予肿瘤生长, 并退减少时肿瘤细胞流出皮肤。4) 小鼠抓持手法: 注射肿瘤细胞时, 抓住小鼠颈背部并轻压于笼子上方注射肿瘤细胞相对于抓起小鼠颈背部、右后肢及尾巴并翻转注射要易于操作, 且小鼠更容易配合。5) 荷瘤速度及重悬: 当细胞从重悬计数到注射时间不宜超过 30 min, 且使用无血清的 α MEM 作为重悬液相对 PBS 更为稳定。

致谢: 感谢湖北宜昌中心人民医院中心实验室对本课题的大力支持。

参考文献:

- [1] Mirabello Lisa, Troisi Rebecca J, Savage Sharon A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. [J]. International Journal of Cancer Journal International Du Cancer, 2009, 125 (1): 229 - 234.
- [2] Chen H D, Zhou X, Yu G, et al. Knockdown of core 1 beta 1, 3-galactosyltransferase prolongs skin allograft survival with induction of galectin-1 secretion and suppression of CD8 + T cells; T synthase knockdown effects on galectin-1 and CD8 + T cells. [J]. Journal of Clinical Immunology, 2012, 32 (4): 820 - 836.
- [3] 符策岗, 赵红卫, 刘扬, 等. 骨肉瘤动物模型新进展[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23 (02): 210 - 220.
- [4] Leacock S W, Basse A N, Chandler G L, et al. A zebrafish transgenic model of Ewing's sarcoma reveals conserved mediators of EWS-FLI1 tumorigenesis [J]. Disease Models & Mechanisms, 2012, 5 (1): 95 - 106.
- [5] Walkley C R, Rameez Q, Sankaran V G, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease [J]. Genes & Development, 2008, 22 (3): 1662 - 1676.
- [6] Li W, Xu Q, He Y F, et al. Anti-Tumor Effect of Steamed Codonopsis lanceolata in H22 Tumor-Bearing Mice and Its Possible Mechanism [J]. Nutrients, 2015, 7 (10): 8294 - 8307.
- [7] 王忠良, 李旭良, 张德文, 等. 大鼠骨肉瘤肺转移模型的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32 (9): 935 - 939.
- [8] 潘海涛, 杨述华, 刘勇, 等. 可移植性鼠骨肉瘤肿瘤模型的建立[J]. 华中医学杂志, 2005, 29 (6): 471 - 472.

[修回日期] 2015-11-23