

徐昊森,李雅竹,程涓,等. 尾静脉注射 M1 细胞构建 BALB/c 裸鼠髓系白血病模型[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 45 - 50.

Xu HM, Li YZ, Cheng J, et al. Establishment of a nude mouse model of granulocytic leukemia by injection of M1 cells into the tail vein [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 45 - 50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.008

尾静脉注射 M1 细胞构建 BALB/c 裸鼠髓系白血病模型

徐昊森¹, 李雅竹¹, 程涓¹, 赵勇², 许亚梅^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国科学院动物所, 北京 100101)

【摘要】目的 应用 BALB/c 裸小鼠构建 M1 白血病模型。**方法** 将 12 只 5~6 周龄的雌性 BALB/c Nude 小鼠随机分为低、中、高剂量组及空白组, 每组 3 只, 进行尾静脉注射。低、中、高三组分别接种对数生长期 M1 细胞悬液每只 1×10^6 个、每只 5×10^6 个及每只 8×10^6 个。观察小鼠的一般状况, 于造模后第 0、10、20、30 天采集外周血, 检测血常规、进行白细胞分类, 第 30 天或濒死时处死取材, 流式检测外周血及骨髓 CD33CD117 阳性细胞比例, 制备组织病理切片。**结果** 模型组小鼠在接种后第 10~15 天出现萎靡少动、脊背弓起等状况。实验第 30 天时, 与空白组相比, 高剂量组小鼠外周血白细胞数显著升高 ($P<0.05$); 各组小鼠外周血白血病细胞比例较空白组显著增高 ($P<0.05$); 各组小鼠骨髓中 CD33+CD117+ 比例增高, 高剂量组最为显著 ($P<0.05$); 高剂量组脾脏中可见少量白血病细胞浸润。**结论** BALB/c Nude 小鼠经尾静脉注射 8×10^6 个小鼠白血病细胞 M1 后可构建急性髓系白血病模型, 符合急性髓系白血病的生物学特点。

【关键词】 髓系白血病; M1 细胞; 动物模型; 裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0045-06

Establishment of a nude mouse model of granulocytic leukemia by injection of M1 cells into the tail vein

XU Haomiao¹, LI Yazhu¹, CHENG Juan¹, ZHAO Yong², XU Yamei^{1*}

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China.
2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

【Abstract】Objective To construct a nude mouse model of granulocytic leukemia with M1 cells. **Methods** Nine female BALB/c nude mice, 5-6 weeks old, were randomly divided into three groups (n=3 per group): group A mice were the blank control group, and groups B and C were inoculated via the tail vein with a logarithmic growth phase M1 cell suspension (1×10^6 and 5×10^6 , respectively). The general condition of the mice was observed. Blood samples, peripheral blood leukocyte differential count, and peripheral blood CD33CD117 positive cells were detected on days 0, 10, 20 and 30 after modeling. On the day 30 or at the time of death, tissue sections were taken for pathological examination. **Results** The mice in the model group developed symptoms such as wilting and dorsiflexion on days 10-15 after inoculation. Compared with the blank group, the number of peripheral blood leukocytes in each mouse injected with 8×10^6 M1 cells was

[基金项目] 北京市自然科学基金(7152092)。

[作者简介] 徐昊森(1993—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 中西医结合防治恶性血液病。E-mail: 457514117@qq.com

[通信作者] 许亚梅(1975—), 女, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治恶性血液病。E-mail: xuyamei@sina.com

significantly increased on the 30th day ($P<0.05$). On the 30th day, the proportion of peripheral blood leukemia cells in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the proportion of CD33⁺CD117⁺ cells in the bone marrow of the other groups increased, and the high dose group was the most significant. ($P<0.05$), and that on day 30, leukemia cells infiltrated into the spleen of model mice. **Conclusions** The injection of 8×10^6 mouse leukemia M1 cells into the tail vein of BALB/c nude mice can induce an acute myeloid leukemia model consistent with the biological characteristics of acute myeloid leukemia.

【Keywords】 myeloid leukemia; M1 cells; animal model; nude mouse

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是髓系造血干/祖细胞恶性疾病,可造成骨髓与外周血中原始和幼稚髓性细胞恶性克隆增殖,临床表现为贫血、出血、感染和发热、脏器浸润等症状,如不及时治疗常可危及生命^[1],因此探索白血病的发病机制、寻求有效的治疗手段成为我们研究的重点^[2-3]。M1 细胞来源于自发性髓系白血病小鼠的骨髓,本研究应用 M1 细胞构建小鼠白血病模型,通过尾静脉注射的方式,模拟临床白血病累及骨髓和全身播散特点,为探索药物作用机制、筛选评价奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SPF 级 BALB/c 裸小鼠 12 只,雌性,5~6 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],体重 15~18 g。小鼠于中国科学院动物研究所 SPF 层流柜中饲养[SYXK(京)-2013-0015],含复合维生素 B 的标准颗粒饲料,饮水,垫料及一切与鼠接触的物品均经灭菌处理。实验室内温度约为 25℃,相对湿度为 40%~70%,每日光照时间为 12 h,实验前适应性饲养 1 周。实验方案符合 3R 原则并通过了北京中医药大学东直门医院实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批(2017-39)。

小鼠白血病细胞 M1 购于上海素尔生物科技有限公司,接种于含有 20%胎牛血清的 1640 培养基的 10 cm 细胞培养皿中,37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下的培养箱中培养并传代。

1.2 主要试剂与仪器

台式冷冻离心机(美国 Thermo Scientific,型号 Sorvall Legend RT),CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司),RPMI-1640 培养基(北京利维宁生物科技有限公司),胎牛血清(天津康源生物技术有限公司),青霉素和链霉素各 100 U/ml(Sigma),流式细

胞仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号 EpicsXL),Anti-Mouse CD117-APC、Anti-Mouse CD33-PE-Cyanine7(ThermoFisher)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模

将 BALB/c 裸小鼠分为低、中、高剂量组及空白对照组,每组 3 只。取对数生长期的 M1 细胞,将细胞悬液浓度分别调至每只 1×10^6 个、每只 5×10^6 个、每只 8×10^6 个,在无菌条件下经尾静脉分别注射入低、中、高剂量组小鼠体内,空白组小鼠经尾静脉注射等剂量的生理盐水。观察各组小鼠在接种 M1 细胞后的发病情况、体重变化及生存时间。

1.3.2 外周血常规及血涂片的检查

分别于接种前及接种后第 10 天、第 20 天、第 30 天经尾静脉取外周血约 0.1~0.2 mL 的加入抗凝管中,送至北京中医药大学东直门医院检验科进行血常规检查,并制备血涂片,经吉姆萨-瑞氏染色后,观察细胞形态,计算白血病细胞的比例。

1.3.3 流式细胞技术检测

CD33 是髓系细胞分化抗原,临床中 CD33 在 90%以上的急性髓系白血病中都有表达,是急性髓性白血病的治疗靶标^[4],而对应的鼠源 CD33 分布在分化早期阶段的髓系血细胞中,主要在于小鼠骨髓中的粒细胞和巨噬细胞前体中,此外,CD33 也在外周血单核细胞上有少量表达,可作为小鼠白血病细胞的标记进行检测^[5]。CD117 也称为 c-Kit,是由 c-Kit 原癌基因编码的 145×10^3 跨膜酪氨酸激酶,能够调节多种生物反应,包括细胞增殖,凋亡,趋化性和粘附^[6-7]。c-Kit 突变与多种癌症中的肿瘤生长和进展相关,在急性髓系白血病中可见到 c-Kit 突变^[8-9]。经前期实验检测小鼠白血病细胞 M1 表面抗原 CD33⁺CD117⁺所占比例在 90%以上,故采用 CD33⁺CD117⁺对模型鼠进行鉴定。

尾静脉外周血。取 50 μ L 外周血加入 2 μ L 肝素抗凝,加入二蒸水 9 mL 低渗裂解红细胞及血小板 20 s,加入 1 mL MPBS 终止反应,离心后弃上清并加

入 1 μL CD117-APC、Anti-Mouse CD33-PE-Cyanine7 摇晃混匀,避光 37℃ 孵育 30 min 后上机检测。

1.3.4 组织病理切片

处死后取小鼠肝、脾、肾固定于 4% 甲醛中,修整形状后通过梯度酒精法脱去组织中的水分,加入二甲苯使组织透明后进行包埋并切片,切片厚度为 2 μm,经 HE 染色后,观察白血病细胞的浸润程度。

1.4 统计学分析

所有数据通过 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,所得结果均以平均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$),各组比较时,符合正态分布方差齐的用单因素方差检验,组间比较采用 LSD 法进行分析;方差不齐时采用非参数检验,组间比较采用 Tamhane's (M) 法进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生存状况

接种细胞后 7~15 d 后,模型组小鼠出现皮肤粗糙、暗淡无华、脊背弓起、萎靡少动等表现,到实验后期小鼠逐渐枯瘦、步态不稳,实验进行过程中小鼠均未出现死亡。(图 1)

与空白组相比,高剂量组小鼠体重显著下降,低、中剂量组小鼠体重未见明显变化。(表 1)

2.2 血涂片及血常规检查

与空白组相比,第 30 天时,中、高剂量组小鼠外周血白细胞数明显升高,高剂量组最为显著($P<0.05$);第 30 天时,高剂量组小鼠血红蛋白量较空白组明显降低($P<0.05$),且低于其他各组,低剂量组、中剂量组小鼠血红蛋白含量与空白组比较未见明显变化;各组小鼠血小板的比较差异无统计学意义。(表 2-4)

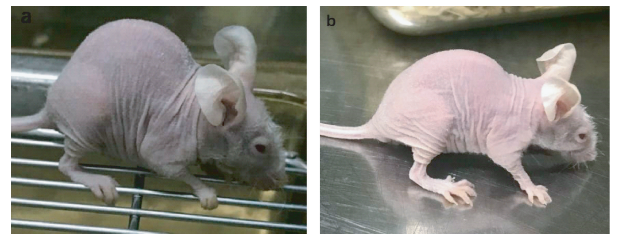


图 1 小鼠经尾静脉接种 M1 细胞后生存状态
Figure 1 Living state of the mice after inoculation of M1 cells

表 1 BALB/c Nude 小鼠各组体重变化($n=3$)
Table 1 Changes in body weight of the mice in four groups

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day
空白组 Blank group	16.30±0.30	17.77±0.11	18.86±0.17	19.42±0.72
低剂量组 Low dose group	16.33±0.44	17.10±0.10	18.79±0.03	19.48±0.163
中剂量组 Medium dose group	17.26±1.09	17.19±0.25	18.14±0.24	16.93±0.94
高剂量组 High dose group	16.84±1.54	17.27±1.40	18.10±0.77	14.56±1.43**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 2 BALB/c Nude 小鼠外周血白细胞计数变化($n=3$)
Table 2 Changes in the peripheral blood WBC counts in mice of the four groups

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day
空白组 Blank group	2.89±0.90	3.22±0.63	2.84±0.83	3.22±0.49
低剂量组 Low dose group	4.15±0.90	4.52±0.91*	4.48±1.26	4.9±0.56
中剂量组 Medium dose group	2.54±0.46	6.93±0.46**	7.72±1.01**	9.34±1.25
高剂量组 High dose group	2.43±0.65	4.9±0.569*	8.44±1.88**	14.23±6.38**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 3 BALB/c Nude 小鼠外周血血红蛋白含量变化

Table 3 Changes in HGB of BALB/c Nude mice peripheral blood among five groups

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day
空白组 Blank group	137.00±8.19	175.67±3.51	175.33±19.50	180.00±2.00
低剂量组 Low dose group	134.00±1.00	190.33±9.50 *	183.33±8.08	184.00±7.00
中剂量组 Medium dose group	144.00±1.00	183.67±4.04	169.21±3.00	171.00±8.89
高剂量组 High dose group	146.00±13.00	146.66±4.73 **	152.67±3.05 *	133.33±5.03 *

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 4 BALB/c Nude 小鼠外周血外周血小板计数变化

Table 4 Changes in the peripheral blood platelets counts in mice of the four groups

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day
空白组 Blank group	577.67±17.16	360.00±93.79	303.67±23.63	582.67±20.60
低剂量组 Low dose group	404.33±126.82	743.33±99.35 *	535.00±19.97 *	499.00±77.50
中剂量组 Medium dose group	507.33±78.85	416.67±51.87	560.33±44.79 **	644.67±22.50
高剂量组 High dose group	610.67±92.09	836.00±38 *	609.67±96.69 **	662.67±210.53

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

镜下 M1 细胞多为圆形或卵圆形,细胞核较大约占面积 3/4 左右,有多个核仁,细胞质为深蓝色,见图 2。造模第 20 天时,每片计数 100 个细胞,低、中、高剂量组小鼠外周血均可见到白血病细胞,至第 30 天时白血病小鼠外周血白血病细胞比例明显增多,高剂量组最为显著。空白组外周血涂片始终未见白血病细胞。(图 2-3,表 5)

表 5 BALB/c Nude 小鼠各模型组外周血涂片白血病细胞比例

分组 Groups	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day
低剂量组 Low dose group	6.00±1.73	7.33±2.08
中剂量组 Medium dose group	12.33±3.21	19.00±4.36
高剂量组 High dose group	15.33±4.16	23.33±2.08

2.3 流式表达变化

与空白组比较,造模第 30 天时,低、中、高三组

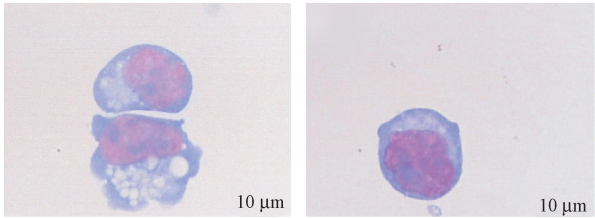


图 2 M1 细胞形态(吉姆萨-瑞氏染色,×1000)

Figure 2 Cell morphology(Wright-Giemsa staining)

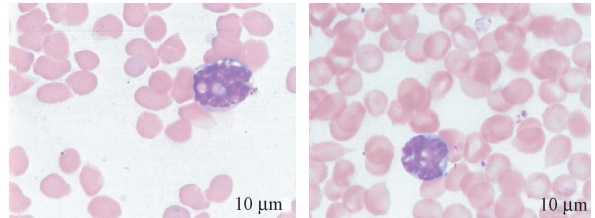


图 3 接种 M1 后小鼠外周血涂片(吉姆萨-瑞氏,×1000)

Figure 3 Morphology of leukemia cells in the peripheral blood of mice after MI cell inoculation(Wright Giemsa staining)

小鼠外周血及骨髓中 CD33⁺CD117⁺细胞比例增高,与注射剂量呈正相关。(表 6)

表 6 BALB/c Nude 小鼠各模型组外周血及骨髓中 CD33⁺CD117⁺ 比例变化

Table 6 Changes of CD33⁺CD117⁺ positive proportion of BALB/c Nude mice

组别 Groups	外周血 Peripheral blood	骨髓 Marrow
空白组 Blank group	0.21±0.13	2.61±2.38
低浓度组 Low dose group	0.61±0.39	13.69±5.10
中浓度组 Medium dose group	2.35±0.67 *	21.02±6.22 *
高浓度组 High dose group	4.20±1.38 **	34.42±10.19 **

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.4 小鼠脏器组织病理学观察

高剂量组小鼠肝脾脏中可见多核肿瘤细胞聚集,核仁清、体积大,为白血病细胞浸润灶;空白组、低剂量组、中剂量组小鼠肝脾中未见明显白血病细胞浸润。

各组小鼠肝脏结构完整,未见白血病细胞浸润。(图 5)

2.5 结论

BALB/c Nude 小鼠经尾静脉注射 8×10^6 个小鼠白血病细胞 M1 后可构建急性粒细胞性白血病模型,符合急性髓系白血病的生物学特点,高浓度成瘤更快。

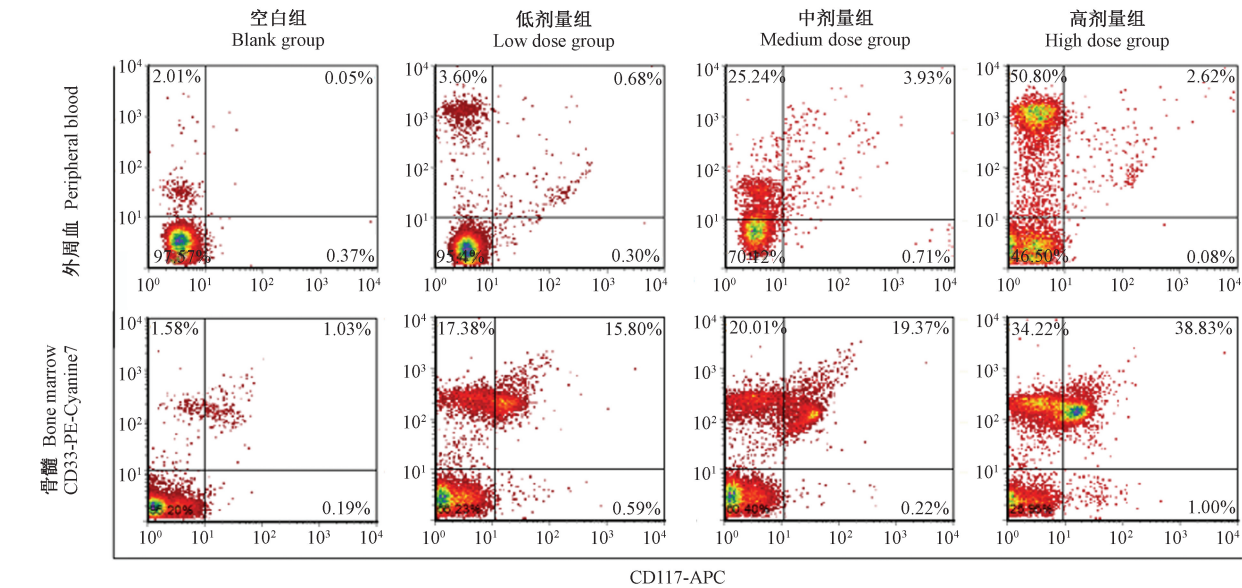


图 4 小鼠外周血及骨髓流式图

Figure 4 Flow cytometric analysis of the mouse peripheral blood and bone marrow cells

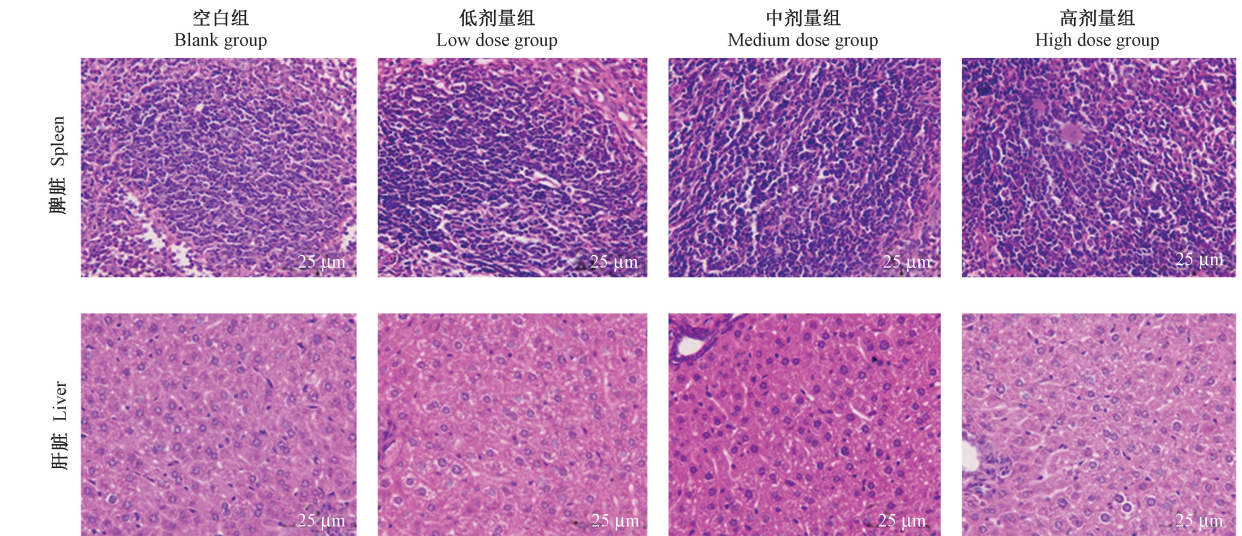


图 5 小鼠肝脾组织病理形态 (HE 染色, ×400)

Figure 5 Histo pathological changes of the mouse liver and spleen (HE Staining)

3 讨论

前期实验研究中,通过对 SCID beige 小鼠照射 2GyX 线预处理,经尾静脉分别接种了 1×10^7 个/只、 5×10^6 个/只两种不同浓度的 HL60、HL60/ADR 细胞株,建立了发病时间长,生存期稳定人源性白血病模型^[10],本次研究中研究人员采用了鼠源急性髓系白血病 M1 构建小鼠急性髓系白血病模型,因物种差异小,鼠源细胞相对于人源细胞更容易在小鼠体内生长^[11-12]。研究选用 BALB/c 裸小鼠作为模型鼠,BALB/c 裸小鼠由于无胸腺,不能正常分化 T 细胞,导致 T 细胞免疫缺陷,B 淋巴细胞正常但功能缺陷,因而为本实验尾静脉造模提供了良好的条件^[13-14]。目前建立白血病动物模型的方法有多种,包括尾静脉注射、腹腔注射和皮下注射三种方法^[15-17],其中,尾静脉造模白血病细胞可随血液流动全身播散,能更好的模拟临床白血病累及骨髓和弥漫生长特点,贴近临床白血病患者的疾病特点^[18-19]。

本次研究采用了每只 1×10^6 个、 5×10^6 个及 8×10^6 个三种浓度,通过接种前及接种后第 10 天、第 20 天、第 30 天后对动物模型的形态学、分子免疫学和组织病理学检测对比发现,高浓度组发病更快,外周白血血病细胞比例均升高明显,更有利于小鼠成模,这与课题既往造模结果相一致^[20],为后期药物干预实验提供了良好的模型基础。

参考文献:

- [1] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 复发难治性急性髓系白血病中国诊疗指南(2017 年版) [J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3):183-184.
- [2] 吕俊廷, 杨志刚, 管有洪, 等. 急性髓系白血病治疗前后白血病干细胞的变化 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018(3):658-664.
- [3] 杜云云. 老年急性髓系白血病治疗效果及预后因素分析 [J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(12):21-22.
- [4] 杨柳, 丁小凤, 胡翔, 等. Hoxa 家族基因在白血病中的表达及意义 [J]. 湖南理工学院学报(自然科学版), 2018, 31(1):47-51.
- [5] 杨红, 刘建兴, 周泽平, 等. 应用 SCID 和 NOD/SCID 小鼠构建急性髓系白血病模型成瘤率的比较 [J]. 中国实验血液学

- 杂志, 2015, 23(2):328-334.
- [6] 周小东, 雷行华. 原癌基因与造血系统恶性肿瘤的研究 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(14):2407-2411.
- [7] Agarwal S, Kazi JU, Rönstrand L. Phosphorylation of the activation loop tyrosine 823 in c-Kit is crucial for cell survival and proliferation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(31):22460-22468.
- [8] 陆伟, 丁润生, 姜胜华. CD117 在白血病细胞中的表达及意义 [J]. 交通医学, 2004, 18(3):243-244.
- [9] 郑文娟, 李建勇, 吴雨洁, 等. CD117 在急性髓细胞白血病中的表达特异度 [J]. 临床血液学杂志, 2007, 20(1):5-7.
- [10] 张坤, 徐昊森, 程涓, 等. 尾静脉注射 HL60、HL60/ADR 细胞建立 SCID beige 小鼠白血病动物模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7):43-51.
- [11] 徐玉洁, 贾文华, 刘苍春, 等. 人源化慢性髓系白血病小鼠模型的建立 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(5):1329-1333.
- [12] 付春玲, 龚艳青, 万艳, 等. 应用 MEC-1 与 HG3 细胞株建立慢性淋巴细胞白血病 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤的模型 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(6):1644-1648.
- [13] 王礼学. K562/BALB/c 裸鼠白血病模型的建立及 LDR、IM7 对 CML 患者骨髓干/祖细胞集落形成能力影响的研究 [D]. 徐州:徐州医学院, 2008.
- [14] 时彦胜, 耿志贤, 战大伟, 等. SCID 小鼠和 BALB/c 裸鼠对两株人体肿瘤细胞系移植敏感性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2000, 10(1):5-10.
- [15] Zunino SJ, Storms DH, Newman JW, et al. Resveratrol given intraperitoneally does not inhibit the growth of high-risk t(4;11) acute lymphoblastic leukemia cells in a NOD/SCID mouse model [J]. Int J Oncol, 2012, 40(4):1277-1284.
- [16] Greenblatt S, Li L, Slape C, et al. Knock-in of a FLT3/ITD mutation cooperates with a NUP98-HOXD13 fusion to generate acute myeloid leukemia in a mouse model [J]. Blood, 2012, 119(12):2883-2894.
- [17] 单武林, 章成芳, 马筱玲, 等. 不同方法接种构建的 SCID 小鼠 HL-60 白血病模型生物学特性分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2014(6):837-841.
- [18] 温顺祝, 傅红春, 李晓明, 等. 290 例成人急性髓系白血病临床特点及治疗效果 [J]. 西南国防医药, 2018(1):47-50.
- [19] 范金清. 急性白血病患者凝血与纤溶指标的特点分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2018(4):125-126.
- [20] 田晓琳, 许亚梅, 王珍珍, 等. 尾静脉注射及皮下接种方法建立小鼠高表达 miR-17-92 的 L1210 白血病模型的比较研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(8):3449-3453.

[收稿日期]2019-01-23