

赵子璇,南苗苗,贺喜白乙,等. MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 75-81.

Zhao ZX, Nan MM, Hexig BY, et al. Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 75-81.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.009

# MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型

赵子璇<sup>#</sup>, 南苗苗<sup>#</sup>, 贺喜白乙<sup>\*</sup>, 梁浩<sup>\*</sup>, 郭旭东<sup>\*</sup>, 刘东军

(内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010020)

**【摘要】 目的** 制备并评估慢性淋巴细胞白血病小鼠模型, 以为慢性淋巴细胞白血病的治疗提供临床前模型。**方法** 通过文献查阅及实验确定环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 注射剂量以制备免疫抑制小鼠模型; 通过腹腔注射、尾静脉注射将  $1 \times 10^7$  个 MEC-1 细胞连续 3 d 移植到小鼠体内, 以制备慢性淋巴细胞白血病小鼠; 应用流式细胞术、免疫组化等方法, 检测慢性淋巴细胞白血病小鼠外周血白细胞、CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞变化情况, 并分析肝、脾、胸腺、肺、淋巴及骨髓中 MEC-1 细胞浸润情况。**结果** 确定 CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 能够显著降低小鼠免疫系统功能; 移植 MEC-1 细胞后小鼠表现慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 特征, 其白细胞及 B 淋巴细胞数量增多、骨髓细胞发生增殖。**结论** CTX 注射剂量为 150 mg/kg 连续注射 4 d, 可以使小鼠免疫功能显著下降; 成功制备 CLL 小鼠模型。

**【关键词】** 慢性淋巴细胞白血病; 小鼠模型; MEC-1; 环磷酰胺

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0075-07

## Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation

ZHAO Zixuan<sup>#</sup>, NAN Miaomiao<sup>#</sup>, HEXIG Bayar<sup>\*</sup>, LIANG Hao<sup>\*</sup>, GUO Xudong<sup>\*</sup>, LIU Dongjun

(State Key Laboratory of Reproductive Regulation and Breeding of Grassland Livestock, Inner Mongolia University, Hohhot 010020, China)

Corresponding author: GUO Xudong. E-mail: xudguo@163.com; HEXIG Bayar. E-mail: bhexig@imu.edu.cn; LIANG Hao. E-mail: liangkaihao@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To prepare and evaluate a mouse model of chronic lymphocytic leukemia in order to provide a preclinical model for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Methods** The cyclophosphamide (CTX) injection dose was determined after a literature review and experiments to prepare an immunosuppressed mouse model;  $1 \times 10^7$  MEC-1 cells were transplanted into mice for three consecutive days by intraperitoneal injection and tail vein injection to prepare mice with chronic lymphocytic leukemia. Flow cytometry, immunohistochemistry, and other method were used to detect changes in peripheral blood leukocytes and CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B lymphocytes in mice with chronic lymphocytic leukemia and to

[基金项目] 内蒙古自治区科技重大专项 (zdx2018044, 2020ZD0008)。  
Funded by the Science and Technology Major Project of Inner Mongolia Autonomous Region (zdx2018044, 2020ZD0008)。  
[作者简介] 赵子璇 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: 1105186391@qq.com;  
南苗苗 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: 1406757891@qq.com。  
<sup>#</sup>共同第一作者  
[通信作者] 郭旭东, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: xudguo@163.com;  
贺喜白乙, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。bhexig@imu.edu.cn;  
梁浩, 副研究员, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: liangkaihao@aliyun.com。  
<sup>\*</sup> 共同通信作者

analyze the infiltration of MEC-1 cells into the liver, spleen, thymus, lungs, lymph, and bone marrow. **Results** It was determined that a CTX dose of 150 mg/kg injected for four days could significantly reduce the immune system function of mice. After transplantation with MEC-1 cells, mice exhibited chronic lymphocytic leukemia (CLL) characteristics. The number of white blood cells and B lymphocytes increased, and bone marrow cells multiplied. **Conclusions** A CTX dose of 150 mg/kg injected for four consecutive days significantly reduced the immune function of mice and led to the successful preparation of a mouse model of CLL.

【**Keywords**】 chronic lymphocytic leukemia; mouse model; MEC-1; CTX

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

白血病 (Leukemia) 是一种由于骨髓中的血细胞不断增殖, 导致骨髓细胞癌变的血液恶性肿瘤疾病<sup>[1]</sup>。慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 是一种以 CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞在各免疫器官中进行恶性克隆增殖的血液系统疾病<sup>[2]</sup>。多数患者完全没有症状, 出现不适症状的患者通常表现为体重减轻、疲劳、盗汗、频繁感染、发烧、出血及淋巴结、肝和脾肿大, 少数患者还可能会有血小板减少、出血等症状<sup>[3]</sup>。虽然目前治疗 CLL 的药物非常丰富, 但仍无法根治 CLL, 因此还需探索新的治疗方法。

目前针对慢性淋巴细胞白血病的致病机制, 大部分采用临床研究, 周期较长。CLL 的动物模型非常难建立。目前, 最流行的 CLL 模型是将人 Tc1-1 基因插入免疫球蛋白重链可变区启动子和免疫球蛋白重链增强子控制下获得的转基因小鼠, 在较长时间 (13 ~ 18 个月) 后造模成功<sup>[4]</sup>。文献报道, MEC-1 细胞和 MEC-2 细胞是处于两个不同阶段的 CLL 细胞系<sup>[5]</sup>, 是进行细胞移植的常用细胞系。有研究表明, 给裸鼠移植 MEC-2 细胞能使小鼠患慢性 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL)<sup>[6]</sup>, 但目前尚未有文献提及给小鼠移植 MEC-1 是否也能使小鼠患 CLL。

本研究通过对免疫抑制小鼠模型腹腔注射和尾静脉注射 MEC-1 细胞以构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型, 并对模型进行效果评价, 以期后续研究提供简便、生产周期短的动物模型, 对临床实践及转化具有重大意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只清洁级 ICR 小鼠 (雌雄各半), 6 ~ 8 周龄, 体重约为 230 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】, 饲养于内蒙古大学省部共建国家重点实验室清洁级实验动物房

【SYXK(蒙)2020-0006】。昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合内蒙古大学实验伦理学要求 (伦审 2021 年第 039 号)。

#### 1.1.2 细胞

本实验移植所使用的细胞 MEC-1 购自南京科柏生物技术有限公司。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

环磷酰胺 (SIGMA, 德国)、EDTA-K2 (麦克林, 加拿大)、IMDM 培养液 (GIBCO, 美国)、红细胞裂解液、白细胞稀释液、HE 染色试剂盒、吉姆萨染色液 (均来自 SOLARBIO, 中国)、Caspase3 mouse monoclonal antibody (PROTEINTECH, 美国); 流式细胞仪 (BECKMAN COULTER, 美国)、石蜡切片机 (LEICA, 德国)、酶标仪 (THERMO, 美国)、化学发光成像分析系统 (TANON, 中国)。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

本实验采用 6 ~ 8 周龄 ICR 小鼠共 30 只, 实验前分别将小鼠分为两大组, 即实验组和对照组, 每组各 15 只。再将两大组小鼠分别在组内随机分为 5 个小组, 每组 3 只。

#### 1.2.2 免疫抑制小鼠模型的制备

用 ddH<sub>2</sub>O 配制 5 种不同浓度的 CTX, 然后通过腹腔注射将 CTX 分别以 40 mg/kg 注射 10 d, 100 mg/kg 注射 3 d 及 5 d, 150 mg/kg 注射 4 d, 及 200 mg/kg 注射 24 h 的方式应用于实验组小鼠, 对照组注射相应剂量及天数的 PBS。

#### 1.2.3 CLL 小鼠模型的制备

利用免疫抑制效果最好的 CTX 注射剂量来制备免疫抑制小鼠共 24 只, 其中 6 只作为 WT 对照, 6 只作为 PBS 对照, 其余 6 只进行腹腔细胞移植, 6 只进行尾静脉细胞移植。在小鼠免疫功能低下的时间内, 通过前期条件摸索和优化, 将  $1 \times 10^7$  个 MEC-1 细胞分别通过腹腔及尾静脉连续 3 d 移植到

小鼠体内,对照组同时注射相应剂量的 PBS。

1.2.4 小鼠血液中白细胞数量检测

小鼠尾静脉取外周血 20 μL 镜检计数,每毫升细胞数=(X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>+X<sub>4</sub>+X<sub>5</sub>)×5×10<sup>4</sup>;采用吉姆萨染色法制作血涂片;小鼠取血检测外周血中 CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞数量。

1.2.5 小鼠各组织病变检测

取小鼠各器官制备组织石蜡切片,股骨制备骨髓石蜡切片,HE 染色后观察骨髓细胞数量变化。

1.2.6 小鼠骨髓细胞相关凋亡因子的鉴定

收集骨髓细胞,利用 qRT-PCR 及 Western Blot 检测 Bcl-2、Caspase3、Bax 的表达。

1.3 统计学分析

所有数据均至少进行 3 个生物学重复,实验数据通过 SPSS 22.0 整理分析,计量数据用平均值 ±

标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。统计数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行绘图。

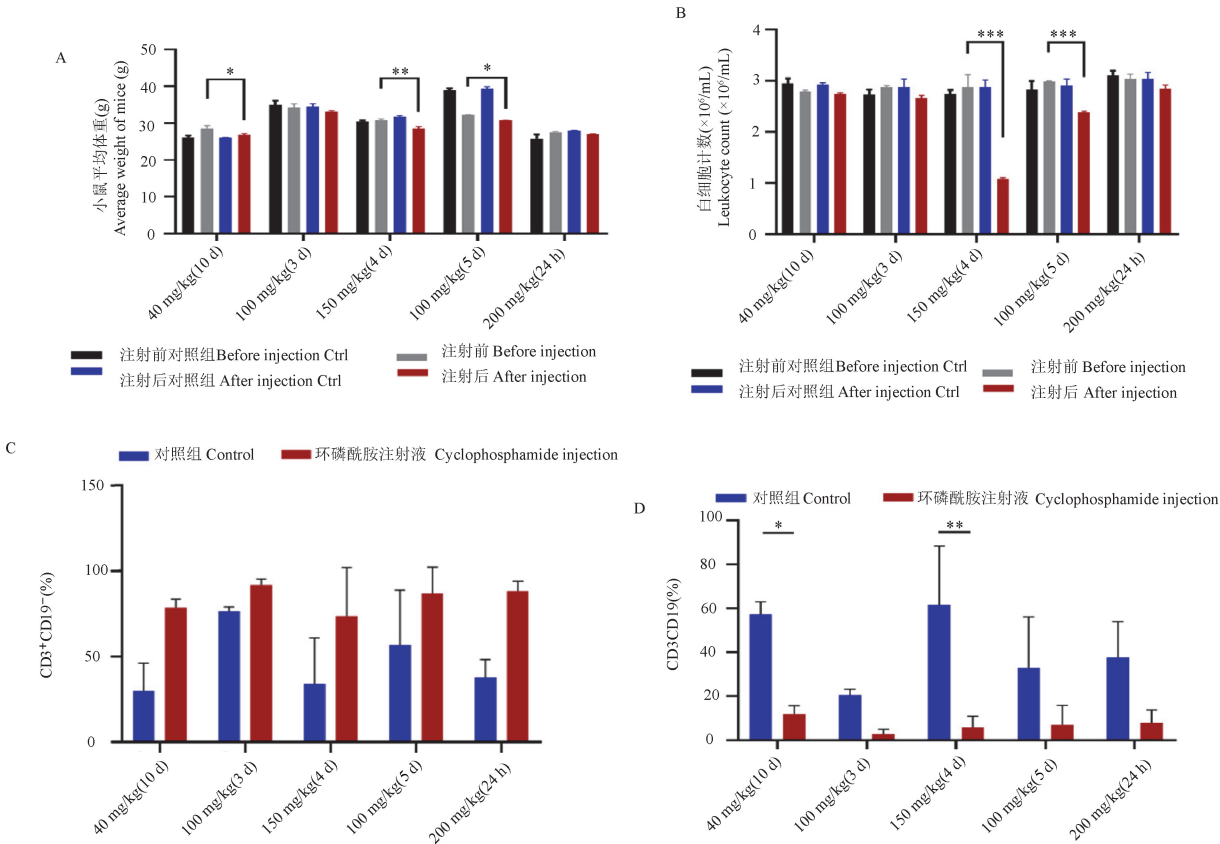
2 结果

2.1 成功制备免疫抑制小鼠模型

从细胞计数、血涂片、淋巴细胞分群分析,免疫器官 HE 染色等,如图 1 所示,得到 CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 的注射方式对小鼠免疫系统的影响最显著,因此以 150 mg/kg 注射 4 d 的注射方式来制备免疫抑制小鼠模型,为后续 CLL 小鼠模型的制备提供了条件。

2.2 MEC-1 细胞移植影响小鼠生长

WT 小鼠与 PBS 注射组小鼠的体重变化不明显,保持相对稳定,经腹腔及尾静脉移植 MEC-1 细



注:A:小鼠平均体重;B:细胞计数统计小鼠外周血白细胞数量;C:T淋巴细胞百分比;D:B淋巴细胞百分比;与对照组、CTX注射前实验组相比,\**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01,\*\*\**P* < 0.001。(下图同)

图1 免疫抑制小鼠基础检测

Note. A. Average mouse weight. B. Peripheral blood white blood cell counting in mice. C. Percentage of T lymphocytes. D. Percentage of B lymphocytes. Compared with the control group, the experimental group before CTX injection, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. (The same in the following figures)

Figure 1 Basic testing in immunosuppressed mice

胞的小鼠,随着实验时间增加,小鼠体重总体呈下降趋势,并且经腹腔注射进行细胞移植的方法小鼠体重下降更明显(图 2,  $P < 0.001$ )。实验结果说明,给小鼠移植 MEC-1 细胞,能够影响小鼠的生长。

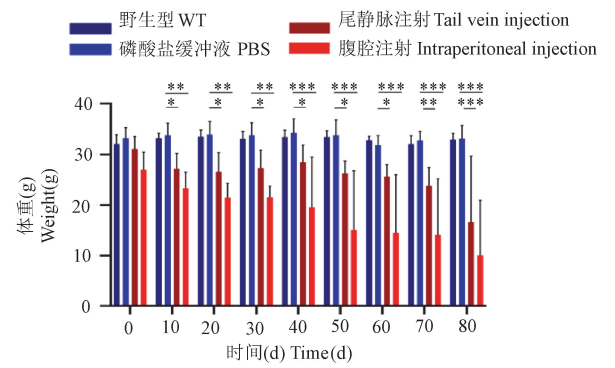


图 2 MEC-1 细胞移植对小鼠体重的影响  
Figure 2 Effect of MEC-1 cell transplantation on body weight of mice

2.3 小鼠外周血白细胞数量检测

取小鼠外周血对其白细胞及 B 淋巴细胞数量进行监测,图 3 结果表明,移植 MEC-1 细胞,可以使小鼠白细胞及 B 淋巴细胞数量增多,并且尾静脉注射法进行细胞移植得到的效果更好。经流式细胞

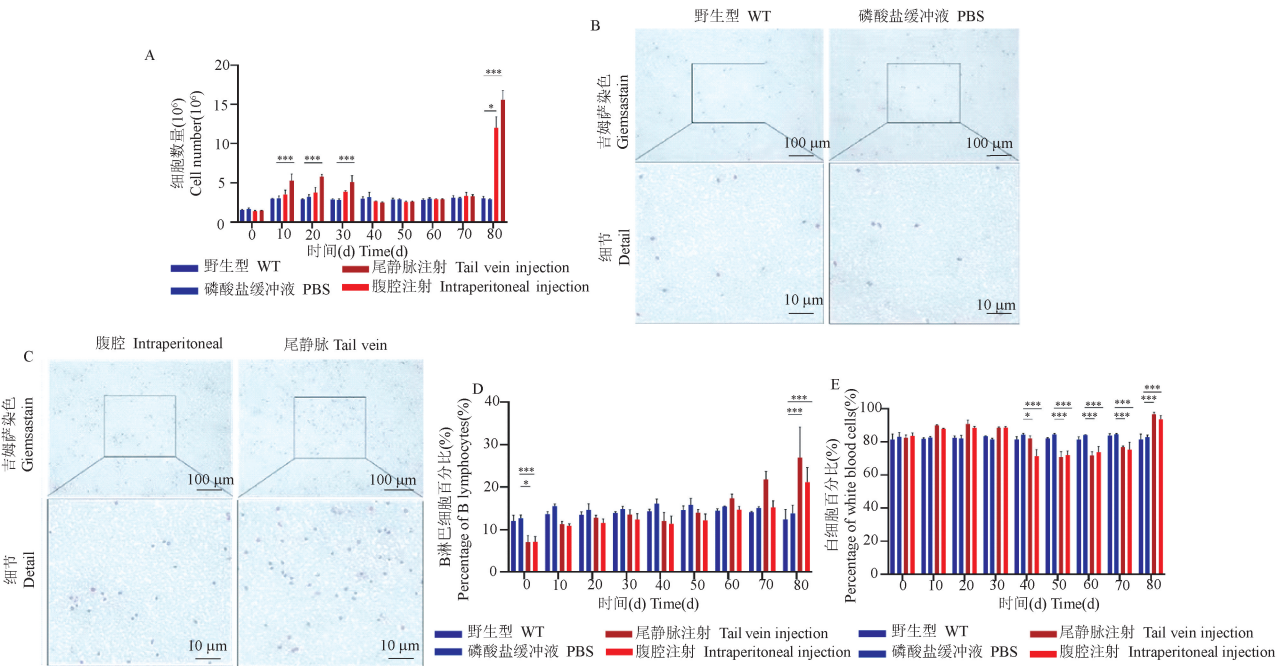
术分析,检测到实验组小鼠外周血中存在  $CD19^+CD5^+$  的 B 淋巴细胞(图 4),结果说明,实验组小鼠外周血白细胞数量增多可能是外周血中出现了  $CD19^+CD5^+$  的 B 淋巴细胞所致。

2.4 小鼠各组织 MEC-1 细胞浸润情况鉴定

以 CD19 为标记蛋白对 MEC-1 细胞进行追踪,实验发现,腹腔注射法进行细胞移植的小鼠中,在 3 只小鼠的外周血中检测到  $CD19^+$  的 MEC-1 细胞;尾静脉注射法进行细胞移植的小鼠中,在 4 只小鼠的外周血中检测到  $CD19^+$  的 MEC-1 细胞,同时发现,两种移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠的肝、脾、肺、胸腺、淋巴和骨髓(图 5)。

2.5 小鼠骨髓细胞相关凋亡因子的鉴定

如图 6A 所示,实验组小鼠的肝和脾均大于对照组小鼠;两个实验组小鼠的骨髓细胞多于对照组小鼠(图 6B, 6C)。Real-time PCR 结果表明,实验组小鼠骨髓细胞 Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著升高(图 6D),尾静脉注射法实验组小鼠骨髓细胞 Caspase3、Bax 的 mRNA 表达水平显著下降(图 6E);Western Blot 所显示的各基因表达趋势与 qRT-PCR 结果显示的表达趋势一致。



注: A、B: 外周血涂片; C: 外周血白细胞计数; D: 外周血 B 淋巴细胞百分比; E: 外周血白细胞百分比。  
Figure 3 Effect of MEC-1 cell transplantation on leukocyte count

Note. A, B. Peripheral blood smears. C. Peripheral blood leucocyte count. D. Percentage of B lymphocytes in peripheral blood. E. Percentage of leukocytes in peripheral blood.



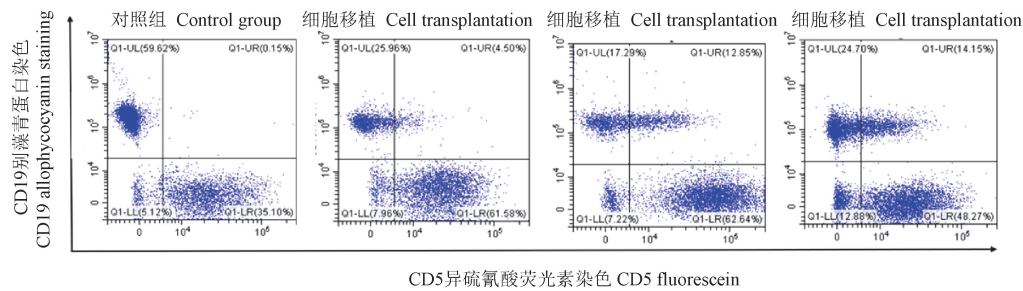
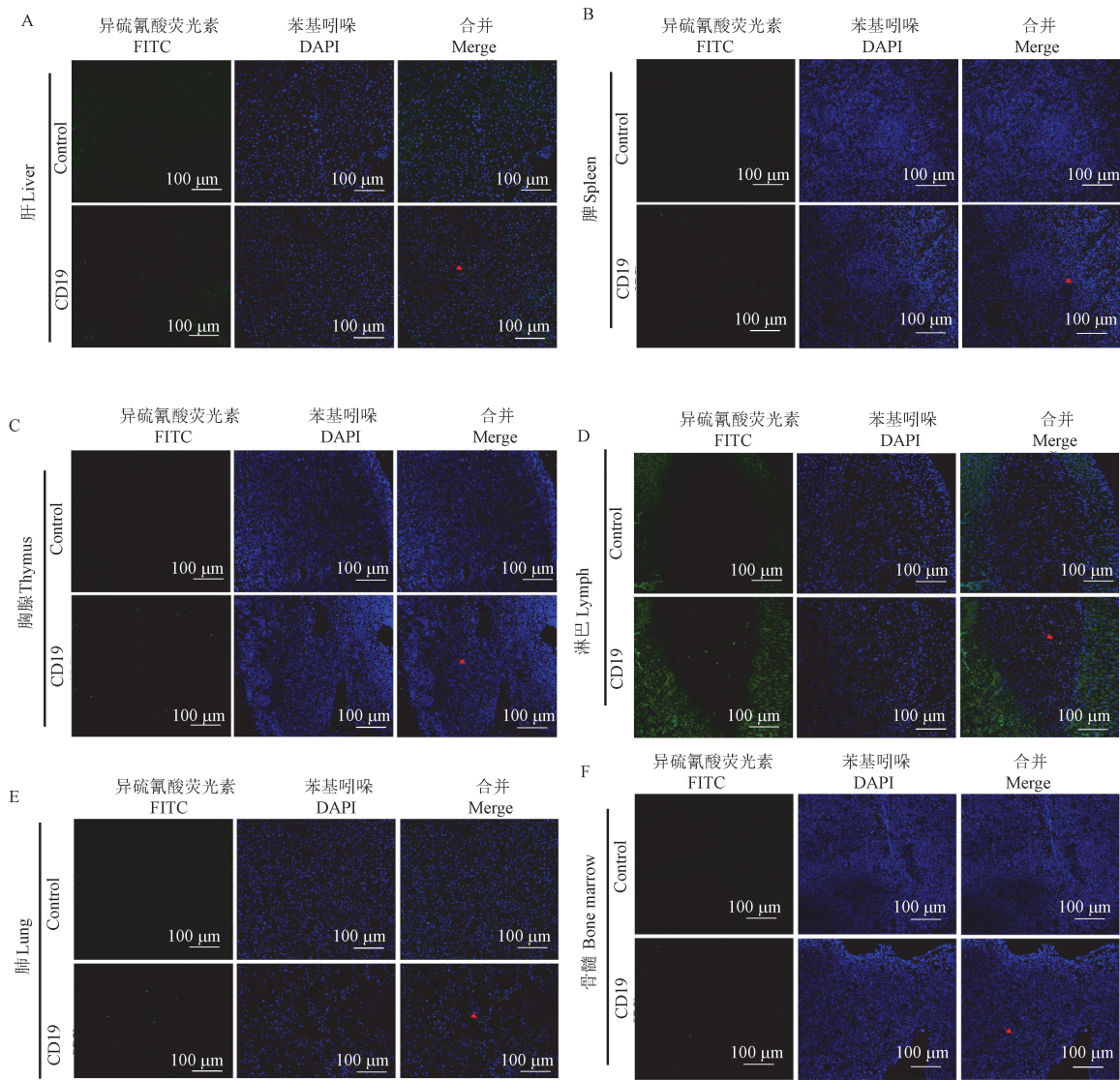


图 4 外周血 CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞百分比

Figure 4 Percentage of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B lymphocytes in peripheral blood

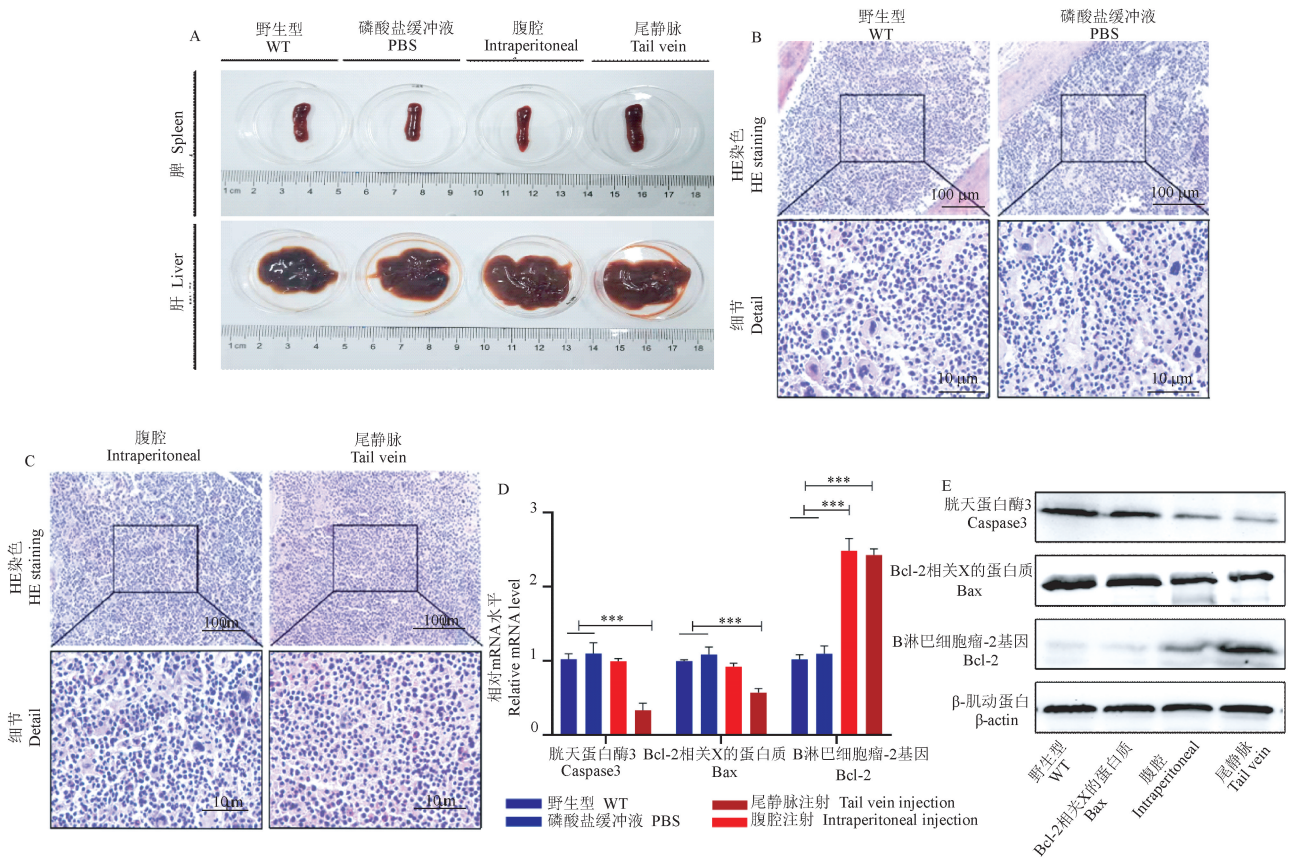


注:A:小鼠肝中 MEC-1 细胞鉴定;B:小鼠脾中 MEC-1 细胞鉴定;C:小鼠胸腺中 MEC-1 细胞鉴定;D:小鼠淋巴中 MEC-1 细胞鉴定;E:小鼠肺中 MEC-1 细胞鉴定;F:小鼠骨髓中 MEC-1 细胞鉴定。

图 5 MEC-1 细胞浸润小鼠各组织情况

Note. A. Identification of MEC-1 cells in mouse liver. B. Identification of MEC-1 cells in mouse spleen. C. Identification of MEC-1 cells in mouse thymus. D. Identification of MEC-1 cells in mouse lymph. E. Identification of MEC-1 cells in mouse lung. F. Identification of MEC-1 cells in mouse bone marrow.

Figure 5 Infiltration of MEC-1 cells in various tissues of mice



注:A:小鼠肝、脾形态;B、C:骨髓 HE 染色;D:骨髓细胞增殖相关基因表达情况;E:骨髓细胞增殖相关基因蛋白表达量。

图 6 MEC-1 细胞移植到小鼠体内对小鼠肝、脾及骨髓细胞的影响

Note. A. Liver and spleen morphology in mice. B,C. Bone marrow HE staining. D. Expression of bone marrow cell proliferation related genes. E. Expression of bone marrow cell proliferation related gene protein.

Figure 6 Effects of MEC-1 cell transplantation on liver, spleen and bone marrow cells in mice

3 讨论

CLL 小鼠模型的制备,为进一步探究 CLL 的发病机制及治疗方法提供实验材料。研究表明,CLL 的一个主要特征为,CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞在外周血、骨髓,及各免疫器官中进行恶性克隆增殖<sup>[2]</sup>,因此 CLL 细胞表达成熟 B 细胞标志抗原 CD19 及高水平的 CD5<sup>[7-8]</sup>。CLL 患者通常有体重减轻,肝、脾肿大等特点<sup>[3]</sup>。利用细胞移植法制备小鼠模型,免疫排斥是需要解决的首要问题。免疫抑制剂能够降低免疫排斥反应。在制备疾病模型之前,先经小鼠腹腔,通过注射免疫抑制剂来降低其免疫功能,再以此为基础来制备预期疾病模型。用此方法得到的动物模型,其生存期能够明显延长,有利于慢性疾病研究。

本研究发现,随着实验进行,实验组小鼠体重逐渐减轻。当小鼠死亡后取其主要免疫器官,能够看到小鼠胸腺和脾的体积减小。经 HE 染色后,能

够观察到各免疫器官中免疫细胞数量均减少。胸腺和脾体积减小及其中免疫细胞减少的原因可能是因为二者都属于淋巴器官,CTX 能够在抑制二者发育的同时溶解其中的淋巴细胞。以上实验结果与以往文献报道的内容均一致<sup>[9-10]</sup>。白细胞计数和流式细胞术结果显示,实验组小鼠外周血白细胞数量及淋巴细胞数量均多于对照组,并且实验组小鼠外周血中存在 CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B 淋巴细胞;对照组小鼠的肝和脾均小于实验组小鼠。实验结果说明,本研究制备的模型小鼠均能够表现出 CLL 基本特征。

为确定移植的 MEC-1 细胞能否浸润到小鼠的各组织中,通过免疫荧光染色及流式细胞术以 CD19 为标记蛋白对 MEC-1 细胞进行追踪。实验发现,腹腔注射法进行细胞移植的小鼠中,在 3 只小鼠的外周血中检测到 CD19<sup>+</sup>的 MEC-1 细胞;尾静脉注射法进行细胞移植的小鼠中,在 4 只小鼠的外周血中检测到 CD19<sup>+</sup>的 MEC-1 细胞,同时发现,两种移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠的肝、脾、肺、胸腺、



淋巴和骨髓。对照组小鼠的外周血及各器官均没有发现 CD19<sup>+</sup>MEC-1 细胞。实验结果说明,两种细胞移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠各组织。

研究表明,Bax 与 Bcl-2 是一对拮抗基因,Bcl-2 表达量增加,相应的 Bax 表达量则减少,因此细胞色素 C 释放受阻,Caspase9 无法被完全激活,Caspase3 表达量也会相应减少<sup>[9]</sup>,进而影响细胞凋亡途径。本研究分别检测了 Bax 和 Caspase3 在 mRNA 及蛋白水平上的表达,结果显示,移植 MEC-1 细胞的小鼠其骨髓细胞 Bax 和 Caspase3 在 mRNA 及蛋白水平上的表达量均低于对照组;通过腹腔进行细胞移植的小鼠,其骨髓细胞 Caspase3、Bax 的 mRNA 表达水平与对照组相比差异性并不显著。本研究验证了实验组小鼠骨髓细胞 Bcl-2 表达较高,而 Bax 及 Caspase3 表达相对较低,此结果与 Packham 等<sup>[11]</sup>在 2005 年的研究结果一致。

综上所述,CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 是制备免疫抑制小鼠模型的最佳剂量。给小鼠移植外源 MEC-1 细胞,能够影响小鼠生长,使小鼠外周血白细胞、B 淋巴细胞数量增多,并且外周血中出现 CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>的 B 淋巴细胞,引起小鼠骨髓细胞增殖。我们认为,通过 MEC-1 细胞移植能够成功制备慢性淋巴细胞白血病小鼠,可以为慢性淋巴细胞白血病治疗提供临床前模型。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Wan Z, Sun R, Moharil P, et al. Research advances in nanomedicine, immunotherapy, and combination therapy for leukemia [J]. J Leukoc Biol, 2021, 109(2): 425–436.
- [ 2 ] Scarfo L, Ferreri AJ, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 104: 169–182.
- [ 3 ] Munir T. Chronic lymphocytic leukemia [J]. Hematology,

2015, 20(4): 245–246.

- [ 4 ] Bichi R, Shinton SA, Martin ES, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(10): 6955–6960.
- [ 5 ] Eahsan R, Daniel S, Noemi N, et al. The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards polymphocytic leukemia [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e106008.
- [ 6 ] Loisel S, Ster KL, Quintin-Roue I, et al. Establishment of a novel human B-CLL-like xenograft model in nude mouse [J]. Leukemia Res, 2005, 29(11): 1347–1352.
- [ 7 ] Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia [J]. Lancet, 2018, 391(10129): 1524–1537.
- [ 8 ] Ghia P, Pluta A, Wach M, et al. ASCEND: Phase III, randomized trial of acalabrutinib versus idelalisib plus rituximab or bendamustine plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(25): 2849–2861.
- [ 9 ] Huyan XH, Lin YP, Gao T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(9): 1293–1297.
- [ 10 ] 宋雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 218–225.  
Song Y, Jia XD, Cui W, et al. Comparison research of immunosuppression models induced by different ways and doses of cyclophosphamide in mice [J]. Chin Food Hyg, 2013, 25(3): 218–225.
- [ 11 ] Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia [J]. Immunology, 2005, 114(4): 441–449.

[ 收稿日期 ] 2022-08-04