

陈红霞, 谭志刚, 林惠然, 等. 神经母细胞瘤肝及肾上腺移植模型比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 100-108.  
Chen HX, Tan ZG, Lin HR, et al. Comparison of liver and adrenal transplantation models of neuroblastoma [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 100-108.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.012

# 神经母细胞瘤肝及肾上腺移植模型比较

陈红霞<sup>1,2</sup>, 谭志刚<sup>1,2</sup>, 林惠然<sup>3</sup>, 冯露平<sup>1,2</sup>, 郑楚雅<sup>1,2</sup>, 廖文峰<sup>1,2</sup>,  
曾如凤<sup>1,2</sup>, 刘锦信<sup>1,2</sup>, 卓振建<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京大学深圳研究生院实验动物中心, 广东 深圳 518055; 2. 省部共建肿瘤化学基因组学国家重点实验室, 广东 深圳 518055; 3. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055)

**【摘要】 目的** 建立神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 肝移植模型, 并与肾上腺原位移植模型进行比较, 探索模型的特征。**方法** 采用微量注射针将含有  $5 \times 10^5$  (SK-N-SH) 细胞溶液沿肝叶长轴种植于小鼠肝左叶, 造模结束后检测肿瘤的生长、转移情况、相关基因表达及肿瘤组织病理学变化。**结果** 小鼠接种肿瘤细胞 21 d 后成瘤率达 100%, 肿瘤的生长、转移、相关基因表达及病理特征明显。**结论** 本文通过更为简单的手术造模方法, 成功构建了一种神经母细胞瘤肝移植模型, 为 NB 研究者今后科学实验提供了更多理想的模型选择。

**【关键词】** 神经母细胞瘤; 肾上腺原位移植; 肝移植; 疾病模型; 成瘤率

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0100-09

## Comparison of liver and adrenal transplantation models of neuroblastoma

CHEN Hongxia<sup>1,2</sup>, TAN Zhigang<sup>1,2</sup>, LIN Huiran<sup>3</sup>, FENG Luping<sup>1,2</sup>, ZHENG Chuya<sup>1,2</sup>, LIAO Wenfeng<sup>1,2</sup>,  
ZENG Rufeng<sup>1,2</sup>, LIU Jinxin<sup>1,2</sup>, ZHUO Zhenjian<sup>1,2\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China.  
2. State Key Laboratory of Chemical Oncogenomics, Shenzhen 518055.  
3. Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055)

**【Abstract】 Objective** A neuroblastoma (NB) liver transplantation model was established and compared with the adrenal orthotopic transplantation model to explore its characteristics. **Methods**  $5 \times 10^5$  SK-N-SH cells were implanted along the long axis of the left lobe of mouse livers with a micro-injection needle. The growth, metastasis, expression of related genes, and histopathological changes of tumors were detected after the modeling. **Results** The tumor formation rate in mice inoculated with tumor cells reached 100% after 21 days, and tumor growth, metastasis, related gene expression changes, and pathological characteristics were apparent. **Conclusions** In this study, a neuroblastoma liver transplantation model was successfully constructed via a relatively simple surgical method to provide a more suitable choice for future scientific NB experiments.

**【Keywords】** neuroblastoma; orthotopic adrenal transplantation; liver transplantation; disease model; rate of tumor formation

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (82002636); 深圳市自然科学基金 (JCYJ20220531093213030)。

**【作者简介】** 陈红霞 (1994—), 女, 硕士, 研究方向: 神经母细胞瘤。E-mail: chx677868@163.com

**【通信作者】** 卓振建 (1990—), 男, 副研究员, 研究方向: 儿童实体瘤 (神经母细胞瘤、肾母细胞瘤、肝母细胞瘤、胶质瘤等) 的分子机制。

E-mail: zhenjianzhuo@163.com

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是起源于神经外胚层原始神经嵴细胞的颅外恶性实体肿瘤<sup>[1]</sup>,该肿瘤发病率在儿童肿瘤疾病中占8%~10%,死亡率约为15%,已成为儿童主要死亡病因之一。NB发病机制和治疗方法仍然是当前研究的热点,而动物模型的使用对于NB的研究至关重要,是深入了解NB发病机制和寻找新治疗策略的重要手段。当前,小鼠异位、原位移植瘤模型已被广泛应用于NB的发病机制与新药开发研究,但在不同研究中,选用不同的实验动物、移植物和移植方式均存在较大差异<sup>[2]</sup>。神经母细胞瘤国际分期系统(International Neuroblastoma Staging System, INSS)将NB分5期,即I~IV期和IVs期,其中IVs(4S)期较特殊,占NB总数的7%~10%<sup>[3]</sup>。临床上4S期NB患者总体预后较好,原发灶多较小不易发现,肿瘤转移的部位较固定,多局限于肝、皮肤和骨髓,严重的肝转移也是4S期NB预后不良的因素<sup>[4]</sup>。当4S期神经母细胞瘤出现肝弥漫增大时,肝与腹腔容积比例增大,出现多种器官功能障碍、腹腔间隔室综合征而危及生命。由于肾上腺是神经母细胞瘤最好发部位,肾上腺移植模型被看作是神经母细胞瘤最佳的动物模型,能够模拟NB相关临床特征,但对于神经母细胞瘤4S期患者,肾上腺显然不是最佳移植方式。转移特性是恶性肿瘤细胞特有的生物学行为<sup>[5]</sup>,临床诊断约有一半的NB患者可发生骨、肝等器官转移<sup>[6-7]</sup>。NB最显著的特点是多部位发生,大部分NB患者发病无明显症状,大多是在扩散到身体其他部位后才发现,常伴随其他疾病诊断出肿瘤病灶,反映出原发肿瘤的部位。临床上最典型的发生部位是肾上腺<sup>[8-9]</sup>,也有发现肝出现弥漫性肿物<sup>[10-11]</sup>,有报道,4S期肝弥漫转移NB患者,超声和磁共振(MR)均显示肝异常,而影像学未见肾上腺相关肿瘤,其原发部位不明<sup>[12]</sup>。迄今为止,有关神经母细胞瘤模型的构建大都在肾上腺,极少研究在NB的其他多发部位构建出能模拟人临床肿瘤生长过程动物模型,迫切需要研究者构建出更多理想的、可高度复制的模型用来支持NB的科学研究。由于传统肾上腺原位移植瘤模型构建上还存在一些技术问题,如小鼠肾上腺体积小,不仅限制了注射量,而且肾上腺易被脾等其他脏器遮挡,也不易于手术操作。本文创新性的选择肝为移植部位,成功构建出肝移植瘤动物模型。因肝是人体最大的腺体,能为肿瘤细胞的生长与形成病灶提供良好的

条件,同时接受肝动脉和门静脉的供血,血流丰富,也正因肝的血流量大,所以癌症转移最容易出现在肝。本文旨在建立一种新型神经母细胞瘤肝移植动物模型,为更好地研究NB发生、发展及治疗提供了技术支持,同时,也为NB研究者提供更多的模型选择。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

雌性SPF级NCG免疫缺陷小鼠10只,4~5周龄,体重19~20 g,购自广东药康生物科技有限公司[SCXK(粤)2020-0054],小鼠使用前在屏障环境中饲养1周。所有实验动物的饲养及观察在北京大学深圳研究生院实验动物中心设施内进行[SYXK(粤)2022-0172],相关操作均符合北京大学深圳研究生院伦理审查委员会的相关审批(AP0044001),动物实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例。实验动物饲养和实验过程均做到了3R原则。

#### 1.1.2 细胞

采用具有萤火虫荧光素酶(Luciferase)的神经母细胞瘤细胞(SK-N-SH),由广东省广州市妇女儿童医疗中心贺静课题组惠赠。神经母细胞瘤细胞株(SH-N-SH),采用含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的1640培养基于37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>条件下培养,2~3 d传代1次。取对数生长期的人神经母细胞瘤细胞株(SH-N-SH),用胰蛋白酶消化离心后细胞计数。按每只鼠接种细胞量 $5.0 \times 10^5$ 、接种体积每只5 μL(采用10 μL微量注射器,直径0.35 mm,最小刻度0.2 μL),取所需细胞量按PBS:Matrigel=1:1重悬后接种到动物肝特定位置(图1)。

### 1.2 主要试剂与仪器

1640(Gibco,批号:8123339);胎牛血清(普诺赛,批号:SA210518);Matrigel(Corning,批号:2348004);青霉素和100 μg/mL链霉素(赛默飞ThermoFisher批号:2289325);胰蛋白酶(美仑Meilunbio,批号:MA0233-1-Nov-03)。小动物呼吸麻醉机(RWD,型号:MODLE 3000);小动物活体成像仪(美国PerkinElmer,型号:IVIS Spectrum);ABI Q5荧光定量PCR仪(ABI,型号:Q5);徕卡石蜡切片机(Leica,型号:RM 2235)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

动物适应性喂养 1 周后,标记编号并称重,采用随机数字表将 10 只小鼠随机分为两组,A 组为肝移植组,B 组为肾上腺原位移植组。

1.3.2 人 NB 肝移植模型建立

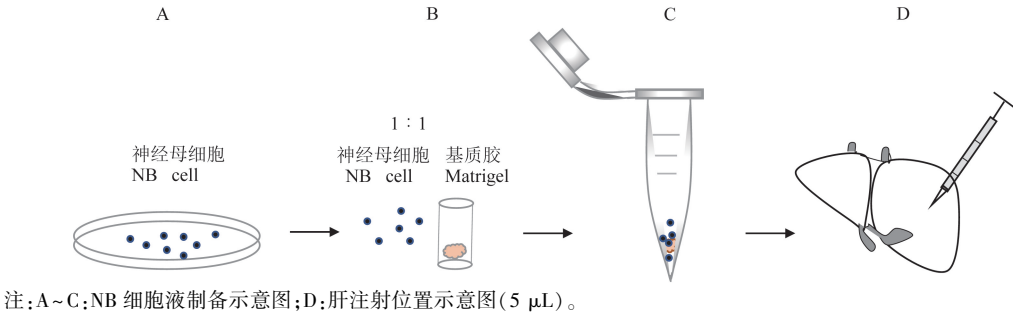
小鼠腹腔注射 0.1 mL/10 g 三溴乙醇(2.5%工作液)麻醉后,使其仰卧位固定在手术台上,腹腔表皮进行消毒后,沿剑突下方做一 2 cm 纵切口,用无菌棉签翻出肝左叶,暴露手术所需的视野,左手用消毒棉签固定手术位置,右手持注射器,将准备好的细胞悬液用微量注射器抽取 5  $\mu$ L 注射到肝左叶中间的位置,针尖朝下小角度刺入 1~2 mm,注射时尽量平行进针,注意针尖未穿透肝实质层,确定针尖斜面全部进入肝小叶后缓慢注射细胞液,注射后可见肝表层快速形成丘状隆起,确认细胞悬液全部注射后,缓慢拔出注射器的同时,左手棉签抵住入针位置 1~2 min,避免漏液。而后恢复脏器位置,逐层缝合动物肌肉层及皮层,注射完毕后医用缝合线(针弧 1/2,线 0.35 m)缝合并消毒创口,放回饲养笼内正常饲养(图 2)。

1.3.3 人 NB 肾上腺原位移植模型建立

小鼠腹腔注射 0.1 mL/10 g 三溴乙醇(2.5%工作液)麻醉后,左侧卧位固定,在左侧背部肋缘下开 2 cm 左右切口,用无菌棉签暴露手术所需视野,用消毒棉签将肾轻柔向小鼠尾侧拨动,此时将暴露肾上腺及周围脂肪层,将准备好的神经母细胞瘤细胞悬液 25  $\mu$ L 抽入微型注射器内,左手用棉签固定肾上腺三角区域,右手持注射器,应尽量平行进针,针头小角度刺入 1~2 mm,注意针尖不触碰到肾上腺实质层,确定针尖斜面全部进入注射部位后缓慢注射,注射后可见肾上腺周围脂肪层快速形成丘状隆起,确认细胞悬液全部注射入后缓慢拔出注射针的同时左手棉签抵住入针位置 1~2 min 避免漏液。而后恢复脏器位置,医用缝合线(针弧 1/2,线 0.35 m)逐层缝合肌肉层及皮层,缝合处消毒,待小鼠苏醒后放回饲养笼内正常饲养(图 3)。

1.3.4 测量小鼠体重、肿瘤生长及小鼠生长情况

模型建立后,利用小动物活体成像系统在指定时间观察并记录肿瘤生长情况。成像前小鼠腹腔注射 d-荧光素钾盐(15 mg/kg)进行体内成像。10 min 后,将麻醉后的小鼠腹部朝上放入成像仪摄像

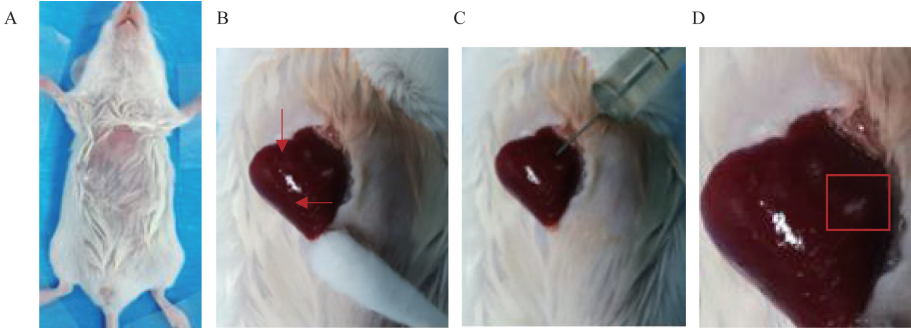


注:A~C:NB 细胞液制备示意图;D:肝注射位置示意图(5  $\mu$ L)。

图 1 NB 细胞液制备流程图

Note. A~C, Illustration of NB cell fluid preparation. D, Diagram of liver injection location (5  $\mu$ L).

Figure 1 Diagram of orthotopic liver implantation



注:A:小鼠麻醉后固定;B:暴露肝;C:注射位置;D:接种肿瘤细胞后肝扩张形成凸起小点(5  $\mu$ L)。

图 2 肝移植位置示意图

Note. A, Immobilize mice. B, Exposure of liver. C, Injection location. D, Small raised spot formed which is filled with tumor cells (5  $\mu$ L).

Figure 2 Diagram of liver implantation

机暗箱升降台采集荧光信号。

1.3.5 RT-qPCR

RT-qPCR 检测基因的表达。按照 TaKaRa 公司提供的方法,使用 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) 进行逆转录。所用引物序列由上海生工合成,序列见表 1。RT-PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量 PCR 试剂盒进行。RT-PCR 反应采用 ABI Prism 序列检测系统进行 3 个重复。

1.4 统计学方法

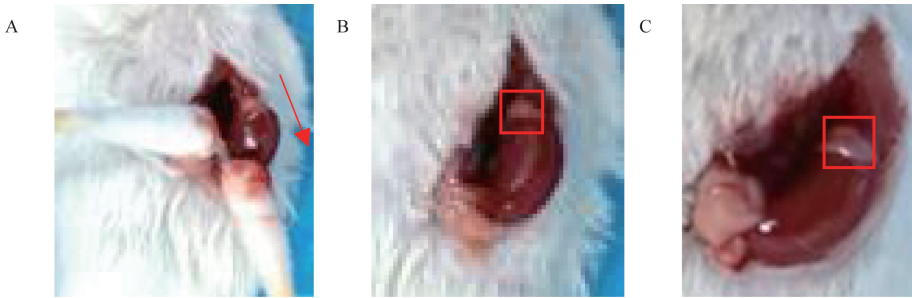
应用软件 GraphPad Prism 8 进行统计分析。定量数据以平均数±标准误差 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) 表示,组间

比较使用配对双尾  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

2 结果

2.1 肝移植瘤与肾上腺原位移植瘤成瘤情况比较

采用细胞植入法,建立肝移植模型和肾上腺原位移植模型,将人 NB 肿瘤细胞  $5 \times 10^5$  分别移植到 NCG 小鼠肝左叶和肾上腺。在接种相同数量肿瘤细胞的情况下,分别在 14 d、21 d、28 d 动态观察,比较两组小鼠的成瘤率(表 2)、肿瘤生长情况(图 4)。结果表明在肿瘤移植早期,肾上腺原位移植模型成瘤率较高于肝移植模型,但接种 21 d 后两种模型成



注:A:肾上腺暴露;B:A 的局部放大图;C:接种肿瘤细胞后肾上腺扩张充盈(25 μL)。

图 3 肾上腺原位移植位置示意图

Note. A, Exposure of adrenal gland. B, Local magnification of A. C, Expanded adrenal gland which is filled with tumor cells (25 μL).

Figure 3 Diagram of adrenal orthotopic implantation

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

| 序号<br>Number | 基因<br>Genes | 引物序列(5'-3')<br>Primers(5'-3') |
|--------------|-------------|-------------------------------|
| 1            | TP53-F      | CAGCACATGACGGAGGTTGT          |
|              | TP53-R      | TCATCCAAATACTCCACACGC         |
| 2            | PHOX2B-F    | AACCCGATAAGGACCACTTTTG        |
|              | PHOX2B-R    | AGAGTTTGTAAGGAAGTGC           |
| 3            | GAB2-F      | GTTCTATGTCCCGCAGGAATATC       |
|              | GAB2-R      | CCCTGTGTCAAACCACATGC          |
| 4            | GRB2-F      | CTGGGTGGTGAAGTTCAATTCT        |
|              | GRB2-R      | GTTCTATGTCCCGCAGGAATATC       |
| 5            | PTPN11-F    | GAAGTGTGCAGATCCTACCTCT        |
|              | PTPN11-R    | TCTGGCTCTCTCGTACAAGAAA        |

表 2 两种移植瘤成瘤率比较( $n = 5, \%$ )  
Table 2 Liver and adrenal glands orthotopic tumor formation rate comparison

| 组别<br>Groups                                  | 接种肿瘤细胞后各时间点成瘤率<br>Tumor formation rate at each time point after inoculation of tumor cells |      |      |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
|                                               | 14 d                                                                                       | 21 d | 28 d |
|                                               |                                                                                            |      |      |
| 肝移植瘤<br>Liver xenograft                       | 60%                                                                                        | 100% | 100% |
| 肾原位移植瘤<br>Adrenal glands orthotopic xenograft | 80%                                                                                        | 100% | 100% |

注:移植肿瘤细胞 28 d 后两组成瘤率比较。  
Note. Comparison of tumor formation rate at 28 days after inoculation of tumor cells.



瘤率均达 100%(表 2)。如图 4 所示,肾上腺移植瘤肿瘤的生长转移的速度相较肝更快。与肾上腺移植瘤相比,肝移植瘤肿瘤生长会局限于特定位置生长而且在短期内未发现转移形成。

2.2 两种不同成瘤方式肿瘤转移模式及生存期特点

利用小动物活体成像系统,通过生物发光信号监测小鼠肿瘤转移情况。结果发现两种移植瘤小鼠死亡前均出现腹部肿胀积水症状,且肝移植症状要更为严重,肝移植小鼠在 35 d 后,显示肿瘤大范围器官转移,而肾上腺原位移植小鼠 28 d 后即出现肿瘤大范围器官转移。我们发现两种不同移植小鼠在移植后期均出现了肝、脾和肠等多个器官的明显转移,同时,肝移植小鼠肿瘤也转移到肾(图 5A、5C)。此外,我们发现,肝移植小鼠的平均生存时间要相对较长约 45 d(图 5B),相比之下,肾上腺原位

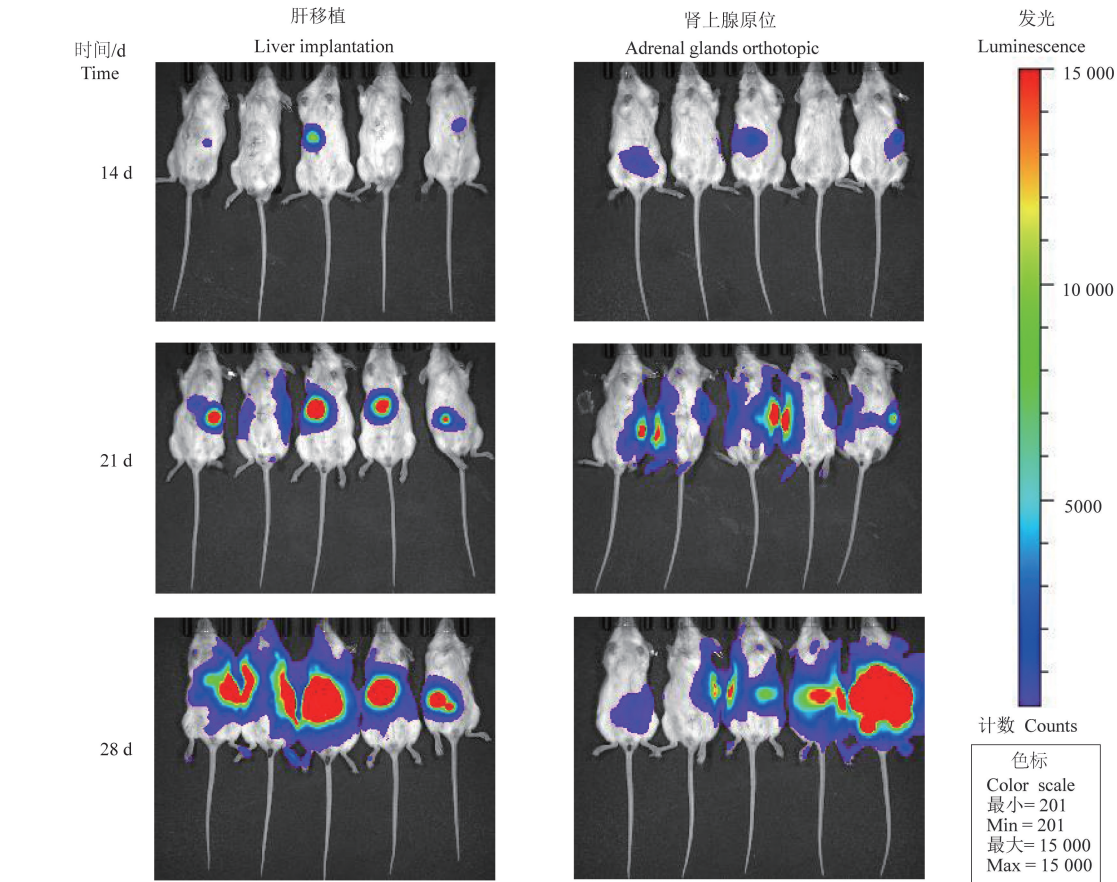
移植小鼠生存时间较短,约为 40 d(图 5D)。

2.3 两种不同成瘤方式肿瘤组织病理特点

如图 6 HE 染色结果显示,肾上腺原位移植瘤的肿瘤细胞相比肝移植瘤肿瘤细胞略显致密,细胞分布更均匀(图 6A、6C)。图 6B、6D 显示,两种不同移植模型肿瘤细胞的形态相同,肿瘤细胞分布均匀,呈蓝色,细胞形态小、核大、胞浆含量少。此外,两种移植模型在接种相同肿瘤细胞后,两者肿瘤组织形态具有各自特点,肾上腺原位移植瘤的肿瘤组织更集中在肾上腺上端,肝移植瘤则集中在整个肝叶弥漫生长(图 6E、6F)。

2.4 两种不同成瘤方式基因表达特点

RT-qPCR 检测肿瘤组织中 *TP53*、*PTPN11*、*GAB2*、*PHOX2B* 和 *GRB2* 的表达,结果表明肝移植瘤中 *TP53* 和 *GRB2* 的 mRNA 水平显著高于肾上腺原位移植瘤(图 7A、7B,  $P < 0.05$ )。肝移植瘤中



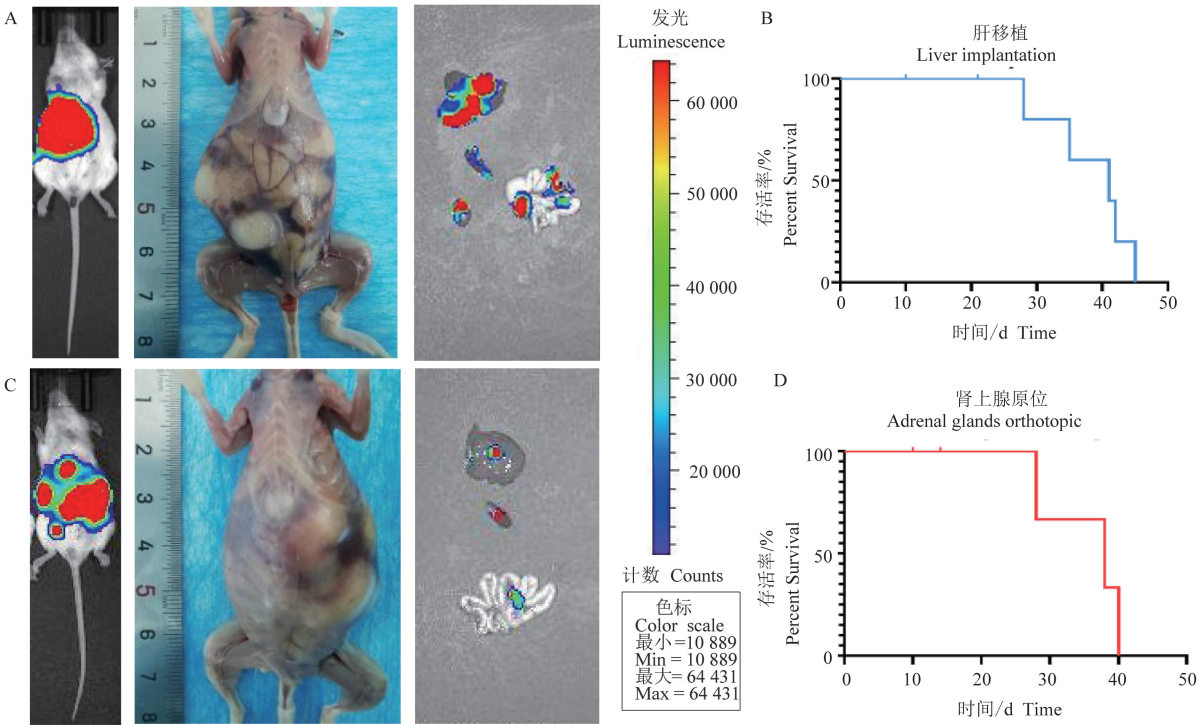
注:肝(左)及肾上腺原位(右)移植小鼠肿瘤生长生物发光信号。

图 4 两种不同成瘤方式肿瘤生长情况

Note. Bioluminescence signal of tumor growth in liver transplantation (left) and adrenal orthotopic transplantation (right) mice.

Figure 4 Tumor growth in the liver and adrenal glands orthotopic implantation

*PXOX2B* 的 mRNA 水平低于肾上腺原位移植瘤(图 7C),而 *GAB2* 的 mRNA 水平显著低于肾上腺原位移植瘤(图 7D, $P<0.05$ ),两者肿瘤组织中 *PTPN11* 的 mRNA 水平没有显著差异(图 7C、7E, $P<0.05$ )。

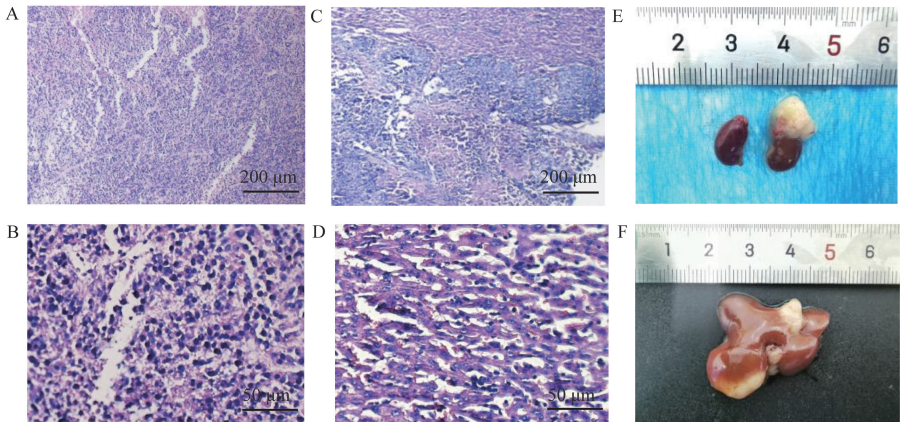


注:A:肝移植瘤小鼠 35 d 后肿瘤生长及在肝、脾、肾及肠等脏器转移情况;B:肝移植小鼠达到伦理终点前生存曲线( $n=5$ );C:肾上腺原位移植瘤 28 d 后肿瘤生长及在肝、脾、肾及肠等脏器转移情况;D:肾上腺原位移植小鼠达到伦理终点前生存曲线( $n=5$ )。

图 5 两种不同成瘤方式肿瘤转移及生存时间

Note. A, Tumor growth and metastasis and spleen, kidney, intestine and other organs after 35 days of liver transplantation models. B, Survival curve of liver transplantation models ( $n=5$ ). C, Tumor growth and metastasis and spleen, kidney, intestine and other organs 28 days after adrenal orthotopic transplantation. D, Survival curve of adrenal orthotopic transplantation models ( $n=5$ ).

Figure 5 Tumor metastasis and survival time in the liver and adrenal glands orthotopic implantation

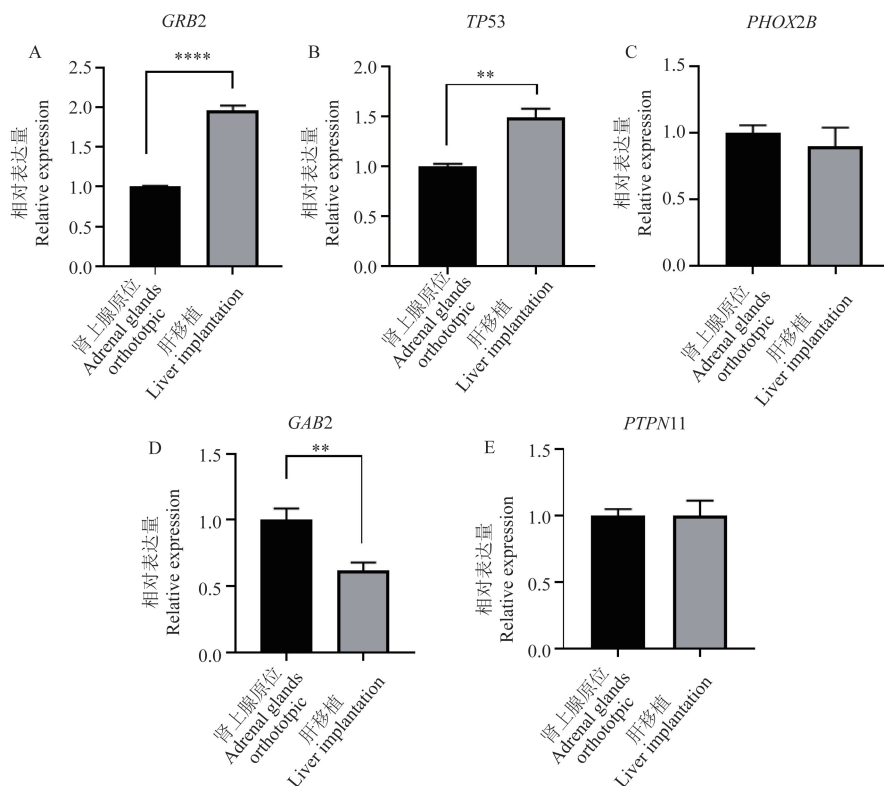


注:A、B:肾上腺原位移植小鼠肿瘤组织 HE 染色;C、D:肝移植小鼠肿瘤组织 HE 染色;E、F:肾上腺及肝移植小鼠肿瘤组织形态。

图 6 两种不同成瘤方式肿瘤组织形态及组织学病理图

Note. A/B, HE staining of the tumors formed by the adrenal glands orthotopic. C/D, HE staining of the tumors formed by the liver. E/F, Gross appearance of the tumors formed by the adrenal glands orthotopic and liver.

Figure 6 Histological and pathological images of two different tumor formation methods



注:与肾上腺原位移植组相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 7 两种不同成瘤方式肿瘤组织基因表达情况 ( $n = 3$ )

Note. Compared with adrenal orthotopic transplantation group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 7 Gene relative expression in orthotopic liver and adrenal glands orthotopic

### 3 讨论

原位移植小鼠模型更贴近临床实际,是被广泛用于肿瘤生物学研究和药物评价的临床前模型。临床上 4 S 期 NB 肝转移十分常见,4 S 期 NB 通常预后较好,患儿 5 年总体生存率为 84%~92%<sup>[13]</sup>,但仍有少部分 4 S 期 NB 患者预后不理想,4 S 期 NB 不同预后相关因素,会是今后进一步研究的方向,需要相关动物模型介入探索分析,对临床诊断和治疗有指导意义。本研究发现,肝和肾上腺原位移植模型有着各自特点,同时两种模型的成瘤率均较高,接种 21 d 后两者成瘤率均达 100%,两者都是 NB 研究的理想模型。研究发现,NB 原位移植小鼠模型神经母细胞瘤的生长、扩散与高风险 NB 患者类似,可以自发转移到临床相关位置<sup>[14]</sup>,NB 动物模型早期发生肝转移<sup>[15]</sup>,在一些 NB 原位小鼠肿瘤模型中也证实后期可转移至肝、脾和肠<sup>[16]</sup>。本结果发现两种原位移植小鼠死亡前均出现腹部肿胀积水症状,而且肝腹水症状较为严重,这可能是肝血流旺盛,肿瘤在肝组织中弥漫生长所致,而持续性肝

肿大容易引发呼吸和循环衰竭严重致死。两者在肿瘤移植早期肾上腺移植瘤肿瘤的生长、转移的速度相对较快,小鼠平均生存时间也较肝移植短,而肝移植肿瘤局限于特定位置生长而且在短期内未发现转移形成,符合临床某些 4 S 期患儿体内 NB 生长的特点。本文两者在移植后期均出现了肝、脾和肠等多个器官的明显转移,这与上述研究结果相一致。同时,肾上腺原位移植小鼠 28 d 后出现大范围器官转移,肝原位移植小鼠在 35 d 后显示大范围转移,且肝移植小鼠的肿瘤生长也转移到肾。病理显示两种移植模型肿瘤细胞的形态相同,肿瘤细胞分布均匀,呈蓝色,细胞形态小、核大、胞浆含量少,这与刘波等<sup>[17]</sup>研究结果一致。总之,通过上述比较可以得出,肝移植模型在肿瘤移植早期出现的症状如肿瘤在肝局部弥漫生长肿瘤负荷较大、腹部容积膨胀等特点更为突出,相比肾上腺移植更符合 4 S 期患者的临床特征。

研究发现,转录因子 *PHOX2B* 是 NB 免疫组化标记物<sup>[18]</sup>,*PTPN11* 在 NB 中的突变率为 3.4%<sup>[19]</sup>,是 NB 中第 3 个最常突变的基因,可增加患 NB 的风



险。*TP53* 及其相关基因与神经母细胞瘤的预后相关<sup>[20]</sup>。除此之外,*GAB2* 在神经母细胞瘤发病机制中起重要作用<sup>[21]</sup>。因此我们根据以上基因的功能,选择 *PTPN11*、*PHOX2B*、*TP53* 和 *GAB2* 基因,测量他们的表达情况,探讨两种不同移植模型各自肿瘤生长、转移的特点,这可能是研究两种模型肿瘤生长及转移的潜在分子机制。肿瘤细胞能与宿主器官周围微环境相互作用而影响肿瘤的生长或转移,原位异种移植模型为肿瘤细胞提供类似人类器官的原发移植部位和微环境<sup>[22]</sup>,本研究发现,肝移植瘤中 *PXOX2B* 的 mRNA 水平低于肾上腺原位移植瘤,而 *GAB2* 的 mRNA 水平显著低于肾上腺原位移植瘤,这可能是肾上腺相比肝能更好地模拟肿瘤细胞生长的微环境,更有利于肿瘤生长及器官的转移。同时,肿瘤血管生成是肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的必要条件。肾上腺可能提供肿瘤生长适宜的环境,利于肿瘤新血管生成<sup>[23]</sup>。已有报道称,微环境促进了肿瘤的侵袭或转移,这些结果也说明移植部位对肿瘤生长中的重要性<sup>[24]</sup>。肿瘤的侵袭和转移行为常常是导致病人死亡的原因,肾上腺移植的肿瘤相比肝肿瘤生长、转移更快,加速动物死亡,这可能是肝移植模型生存时间相对较长的原因。我们的结果 *TP53* 的 mRNA 水平显著高于肾上腺移植瘤,也说明了 *TP53* 及其相关基因与神经母细胞瘤进展相关。

本研究肝移植模型成模率高,手术操作可行性强,相比肾上腺操作更为简单,但也有其局限性。在模型建立过程中需注意:(1)移植位置的选择,本研究创新性选择肝左叶中间为移植位置,因肝左叶面积最大,大部分不被肋骨、脾所覆盖,便于观察注射细胞,只需针头小角度刺入 1~2 mm 即可,且肝血流丰富,为肿瘤的生长提供良好的生长环境。(2)对肝的保护,注射细胞时针尖水平进针,注意针尖未穿透肝实质层,确定针尖斜面全部进入肝小叶后缓慢注射细胞悬液,移植时注意对肝的保护以免造成小鼠出血过多术中死亡,尽量使用棉签一类的柔性器具来触碰,不当的操作会影响小鼠术后状态甚至成活率。(3)防止肿瘤细胞漏液,注射细胞时要做到进针要稳又准,注射器针尖不能刺穿肝小叶,注射位置要能看到皮丘状隆起,拔针的同时迅速用棉签抵住针眼 1~2 min 防止漏液。(4)术后要勤观察小鼠状态,原位移植后肿瘤发展迅速,对小鼠生理状态影响极大,每天观察小鼠,观察毛色及外观

等变化。

综上所述,本研究聚焦 NB 移植模型造模方法,利用免疫缺陷小鼠(NCG)成功构建出肝移植模型,具有成瘤率高、接种体积小、易于手术操作等优点,是研究神经母细胞瘤尤其是 4 S 期 NB 发生和转移的理想模型。因此,本研究为 NB 研究者提供了更多模型选择。

# 参考文献:

- [ 1 ] JANSKY S, SHARMA A K, KÖRBER V, et al. Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma [J]. Nat Genet, 2021, 53(5): 683–693.
- [ 2 ] 谭志刚,刘锦信,郑楚雅,等.神经母细胞瘤动物模型研究进展与应用[J].实验动物与比较医学,2023,43(3):288–296.  
TAN Z G, LIU J X, ZHENG C Y, et al. Advances and applications in animal models of neuroblastoma [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 288–296.
- [ 3 ] 陈欣,王浩入,李青.婴儿 4S 期神经母细胞瘤伴肝或皮肤转移的临床及 CT 影像分析[J].中国临床医学影像杂志,2022,33(9):647–651.  
CHEN X, WANG H R, LI Q. Clinical and CT imaging analysis of stage 4S neuroblastoma with liver or skin metastases in infants [J]. J China Clin Med Imag, 2022, 33(9): 647–651.
- [ 4 ] TAS M L, NAGTEGAAL M, KRAAL K C J M, et al. Neuroblastoma stage 4S: Tumor regression rate and risk factors of progressive disease [J]. Pediatr Blood Cancer, 2020, 67(4): e28061.
- [ 5 ] YAN J, YANG Q, HUANG Q. Metastasis suppressor genes [J]. Histol Histopathol, 2013, 28(3): 285–292.
- [ 6 ] BRAEKEVELDT N, WIGERUP C, GISSELSOON D, et al. Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts retain metastatic patterns and geno- and phenotypes of patient tumours [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E252–E261.
- [ 7 ] SARTELET H, DURRIEU L, FONTAINE F, et al. Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/IL2rg null (NSG) mice [J]. In Vivo, 2012, 26(1): 19–29.
- [ 8 ] LOUIS C U, SHOHET J M. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy [J]. Annu Rev Med, 2015, 66: 49–63.
- [ 9 ] VO K T, MATTHAY K K, NEUHAUS J, et al. Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project [J]. J Clin Oncol, 2014, 32(28): 3169–3176.
- [ 10 ] GUPTA K, BANSAL A. Congenital neuroblastoma: an autopsy report [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2012, 31(5): 331–335.
- [ 11 ] KHERA S, SARAVAGI G, YADAV S, et al. Neuroblastoma



with diffuse liver metastasis with unknown primary site [J]. Indian J Pediatr, 2022, 89(8): 819.

[12] CHATURVEDI A, KATZMAN P J, FRANCO A. Neonatal neuroblastoma 4s with diffuse liver metastases ( Pepper syndrome) without an adrenal/extraadrenal primary identified on imaging [J]. J Radiol Case Rep, 2018, 12(3): 18-27.

[13] 王鹏程, 董瑞. 神经母细胞瘤 4S 期预后不良相关因素的研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2022, 21(4): 394-398.

WANG P C, DONG R. Research advances on poor prognostic factors of children with stage 4S neuroblastoma [J]. J Clin Pediatr Surg, 2022, 21(4): 394-398.

[14] STEWART E, SHELAT A, BRADLEY C, et al. Development and characterization of a human orthotopic neuroblastoma xenograft [J]. Dev Biol, 2015, 407(2): 344-355.

[15] 郝希伟, 董蓓, 陈鑫, 等. 神经母细胞瘤原位荷瘤与转移瘤裸鼠模型建立的实验研究 [J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(4): 23-25.

HAO X W, DONG Q, CHEN X, et al. The experimental study for the establishment of the nude mice *in situ* and metastatic tumor-bearing model [J]. Pract J Clin Med, 2012, 9(4): 23-25.

[16] HAN R, ZHAO W, GU X, et al. Different tumorigenicity and distinct metastasis and gene signature between orthotopic and subcutaneous neuroblastoma xenografted mice [J]. Aging, 2022, 14(4): 1932-1940.

[17] 刘波, 苗佳宁, 张斯萌, 等. 神经母细胞瘤肾上腺原位移植瘤动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 1-6.

LIU B, MIAO J N, ZHANG S M, et al. Establishment of an orthotopic xenografted animal model of neuroblastoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 1-6.

[18] MANETHOVA M, GERYKOVA L, FAISTOVA H, et al. Phox2B is a sensitive and reliable marker of paraganglioma-Phox2B immunohistochemistry in diagnosis of neuroendocrine neoplasms [J]. Virchows Arch, 2023, 482(4): 679-686.

[19] BENTIRET-SALJ M, PAEZ J G, DAVID F S, et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8816-8820.

[20] WANG H, WANG X, XU L, et al. TP53 and TP53-associated genes are correlated with the prognosis of paediatric neuroblastoma [J]. BMC Genom Data, 2022, 23(1): 41.

[21] ZHANG X, DONG Z, ZHANG C, et al. Critical role for GAB2 in neuroblastoma pathogenesis through the promotion of SHP2/MYCN cooperation [J]. Cell Rep, 2017, 18(12): 2932-2942.

[22] DU Q, JIANG L, WANG X Q, et al. Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(8): 3747-3752.

[23] TAKASE Y, KAI K, MASUDA M, et al. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer [J]. Pathol Res Pract, 2010, 206(11): 725-730.

[24] 梁龙, 焦阳. 微环境促进的侵袭性肿瘤生长的元胞自动机模拟 [J]. 物理学报, 2015, 64(5): 29-45.

LIANG L, JIAO Y. Microenvironment-enhanced invasive tumor growth via cellular automaton simulations [J]. Acta Phys Sin, 2015, 64(5): 29-45.

[ 收稿日期 ] 2023-09-14