



裸鼠荷瘤实验中常见问题的解析和总结

赵 勇, 伍 静, 毛峰峰, 赵善明, 张彩琴, 白 冰, 师长宏

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 探讨裸鼠荷瘤过程中的出现的常见问题,提高裸鼠荷瘤的成功率。方法 通过分析实验过程中影响裸鼠荷瘤的各种因素,寻求裸鼠荷瘤常见问题的解决方案。结果 总结了在裸鼠荷瘤实验中的各种影响因素,并提出了合理的建议。结论 裸鼠肿瘤模型的制备是研究肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价以及有效性筛选等研究课题的基础,本文为制备良好的裸小鼠肿瘤模型提供合理的建议。

【关键词】 裸鼠; 肿瘤; 模型, 动物

【中图分类号】 Q95-331; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0017-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.005

Summarize of the Common Problem and the Experience of Tumor-burdened in Nude-mice

ZHAO Yong, WU Jing, MAO Feng-feng, ZHAO Shan-min, ZHANG Cai-qin, BAI Bing, SHI Chang-hong
(Laboratory Animal Center of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective Discussion the common problem of tumor-burdened in nude-mice, In order to improve the success rate of tumor burden. **Method** Through analysis the influence of various factors of tumor-burden in nude-mice, seek the solution of problem in tumor burdened. **Result** Summarized the various factors in the tumor burden, and put forward reasonable suggestions. **Conclusion** Nude-mice tumor burden is the base of the oncology, drug and biological products of safety evaluation and effectiveness screening. This paper is to provide reasonable suggestions for the preparation of good nude mice tumor model.

【Key words】 Nude mice; Tumor; Model, animal

无胸腺裸鼠(outbred nude mice)是当今医学生物学研究领域中不可缺少的实验动物模型。特别是在肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等实验方面,有着特殊的价值。随着现代免疫学的发展,明确指示了胸腺为中枢性免疫器官,并进一步揭示了胸腺和胸腺依赖淋巴细胞(T细胞)的功能,开创了细胞免疫的新途径。而无胸腺裸鼠无疑成为了研究者最受欢迎的

实验材料。

由于裸鼠的免疫缺陷,在一定情况下,不排斥来自异种动物的组织移植。因此成为移植人类肿瘤在接受体。根据 T. Fogh 等的报导,已有 150 株人瘤细胞和人体原发癌移植于裸鼠获得成功,目前已成功将结肠癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、肾癌、宫颈癌、软组织肉瘤和骨肉瘤等移植于裸鼠、获得了良好生长,并可传代。若用

[作者简介] 赵勇, (1982 -) 男, 主要从事实验动物疾病模型制备; E-mail: zhaoy_mail@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 师长宏, 博士, 副教授, 主要研究方向: 动物疾病模型; E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。

已建株的人体肿瘤组织培养细胞作移植材料,接种后的成活率更高。利用裸鼠进行肿瘤造模实验研究是一个相对成熟的技术,但由于诸多的影响因素不被我们所重视,在实验过程中造成不必要的时间和材料的浪费。所以我们通过分析和总结裸鼠成瘤实验中的常见问题,提供一些建议,供大家参考和讨论。

1 制备肿瘤模型的意义

肿瘤已成为当前威胁人类最严重的常见病之一,每年死于肿瘤的人数以百万计,因此,利用裸鼠建立肿瘤模型,进行防治研究,是基础医学研究中重要课题。一般来说,裸鼠人类恶性肿瘤抑制具有几个典型的特点,首先,被移植肿瘤仍保持原有组织学构成或各种机能。再则,人癌组织的组织培养物移种于裸鼠时,能重现已在组织培养中消失的原有的癌结构。同时,几乎很少发现被移植肿瘤的转移。这些特征有利于分析肿瘤的性质,例如:裸鼠体内免疫缺陷机制恒定,决定其不需通过去免疫方法处理动物;可以控制肿瘤的致癌性,使人体肿瘤移植后良好生长;裸鼠接种成功的肿瘤具有原肿瘤的结构特点,有利于体外培养的瘤细胞株的鉴定;研究肿瘤在体内的生长行为与过程,探讨肿瘤与宿主免疫间的相互关系;体内和体外研究互补配合进行观察。利用建立的裸鼠肿瘤模型,进行药物筛选;在动物体内进行连续接种传代后的肿瘤细胞,在体外培养中也易于获得长期生存,可提高培养的成功率等。因此,裸鼠在肿瘤研究中的应用,将对肿瘤基础研究做出新的贡献。而利用裸鼠制备肿瘤模型是最基础的环节,也直接关系到后期实验研究的成败和进度。

2 影响裸鼠荷瘤的因素

2.1 细胞株的选择

肿瘤细胞株的选择对裸鼠成瘤具有直接关系,各类文献中提到的细胞株相对较多,但是一般情况下,并非所有的细胞株都具有较好的成瘤性^[1]。我们认为,细胞株的选择应充分考虑几个方面;首先该细胞株的国际公认度,虽然国家食品药品监督管理局(SFDA)的指导原则上表示只要是建株的细胞株均可以成瘤^[2],但一般情况下,我们尽可能的选用国际上比较公认的细胞株建模。其次,很多细胞株在文献中有较多的报道,但在实际应用中,有许

多细胞株基本都是从体外开始进行研究,所以我们需充分考虑细胞株在动物体内的生长情况,例如我们常见的 A549 和 MCF-7,其在体内并不是一个好的研究对象,其成瘤率低^[3],生长缓慢,且均一性较差,并不适合用于动物实验。如果我们缺乏这方面相关的认识,不仅会造成实验材料的浪费,还会耽误宝贵的时间。再则,有许多的裸鼠肿瘤模型是用于抗肿瘤药物的筛选以及相关研究的,我们通常情况下会选择成瘤效果好的细胞株进行造模,但常常忽略了该肿瘤细胞株本身对药物的敏感性,例如常见的 Lovo 细胞,国际公认度相对较高,体内生长情况也比较理想,但是该细胞株对于药物的敏感性比较差^[4],大部分的常规化疗药对其的抑瘤率都会下降,如果做肿瘤药物筛选来说,我们需要避免这样的细胞株进行裸鼠肿瘤模型的制备。

因此,我们建议在利用裸鼠开展肿瘤造模的实验中,要充分的考虑该细胞株的体内和体外实验特性,进而选择理想的细胞株开展实验研究。一般来说,体外实验可供选择的细胞株相对较多,如果不能充分考虑后期的体内实验,其后期的研究相对会很被动。所以在选择细胞株造模时,充分考虑研究的方向以及我们需要的靶点就显得尤为必要。

2.2 裸鼠的状态

裸鼠的状态和荷瘤有着较为紧密的关系。首先是裸鼠的年龄,比如 4~6 周比 8 周以上容易成瘤,这时免疫系统不够强,所以成瘤率相对较高;此外,如果裸鼠由于试验系统染菌而长毛或感染,成瘤率也会受到影响。这种表现有较多的因素构成,最典型的如牛棒状杆菌感染裸鼠,该细菌是一种常见的大棒状杆菌,免疫功能正常的大小鼠一般不会长期携带,但对免疫缺陷鼠致病,一旦感染,几乎是终身性的^[5]。主要表现为身体长“白色鳞屑”,该症状会在 14~20 d 后消失,但是病毒的感染和排毒至少要持续 30 d 以上,此时动物表现为体重减轻、摄水量增加、异种植物生长缓慢、对化疗的敏感性增加等。

此外,鼠肝炎病毒,是裸鼠的致命性传染病,一旦感染,将会造成大面积的死亡^[6],只能处死该动物房所有的动物并用甲醛熏蒸消毒才能有效的控制病毒的蔓延。正常的大小鼠对鼠肝炎病毒不敏感,经常带毒正常生长,但是裸鼠对其反应及其敏感,一般最基本的传染源就是来自于普通大小鼠的直接或者间接接触。因此,裸鼠的饲养必须是独立

的饲养单元,避免和大小鼠直接或间接接触。人员的混乱,房间内物品、笼具、垃圾等的交叉污染都可能是传染源,一般感染后 3~4 周发病死亡,在此之前,得病动物会出现突然消瘦,弓背等症状,然后由少到多出现大批死亡,尸检会发现肝脏明显病变,布满白色或黄色的节结,而且到后期整个肝脏都几乎纤维化,非常典型的症状。如果处死已染病但还没有明显症状的动物并尸检发现肝脏有明显病变,且症状很像肝转移的肿瘤。

裸鼠的饲养要求必须是在 SPF 环境条件下,但如果环境设施的无菌等项目不达标,裸鼠长期暴露在弱抗原的刺激中,NK 细胞等免疫细胞的活性逐步增强,会导致裸鼠对肿瘤的非特异性免疫力增强,进而影响肿瘤模型的制备。所以,对裸鼠饲养单位的环境指标控制是保证裸鼠健康状态的最基本也是最直接的控制方式。我们建议在 SPF 条件下配合 IVC 独立通风笼具饲养裸鼠,且相关实验也在超净工作台开展,不仅对裸鼠进行双重保障,而且避免裸鼠之间的交叉感染,这种方式将是排除外来生物因素干扰的最直接的方式。

此外,也有人预先用放射线照射进而进一步抑制裸鼠的免疫功能再接种的方法,对此我们不推荐,但在必需时也是可以尝试的。

2.3 细胞状态

肿瘤细胞的接种,要充分考虑到肿瘤细胞的来源、分化程度、以及活力,生长状态,是否在对数生长期,有无污染等相关的因素。一般来说,肿瘤细胞可以悬浮在相应的无血清培养基、PBS、saline 中,接种效果依次降低。也有人用 matrigel 和肿瘤细胞混匀进而造模^[7],我们认为并无必要,matrigel 是一种促进肿瘤形成生长的手段,如果肿瘤生长不是特别困难不建议用它,但是一些比如 A549 之类的细胞株,接种后两个月还只有 600~700 mm³ 的肿瘤,就可以考虑使用 matrigel。使用 matrigel 的时候要注意低温操作,因为室温下 matrigel 就有可能固化。一般是在冰浴中操作比较合适。

2.4 细胞接种量

细胞的接种量直接关系的肿瘤的成瘤效果,一般动物源性肿瘤接种 2~6 × 10⁶/site 即可成瘤,而人源性肿瘤细胞则需要 10⁷ 级细胞才能形成相对理想的肿瘤^[8]。但最好通过查阅文献来确定接种量。在找不到任何相关资料的情况下,最高可用到 1 × 10⁷/0.2 mL/site,再加大细胞量就没有太多的意义。

如果细胞很小,也可以采用 1 × 10⁷/0.1 mL/site 操作,不至于很粘稠。除此之外,我们在接种之前需查阅文献,看他们的构建条件是什么样的,比如培养条件,接种量,接种位置以及裸鼠的性别等。

在我们的实验中,也经常会发现有的肿瘤细胞株接种裸鼠后,其生长速度很快。这种情况下,我们就需要根据情况调整一个合适的浓度,一个理想的裸鼠肿瘤模型我们认为有应该具备几个特征:其一,接种后 10~15 d 左右即可开始进行实验研究,如果造模周期太短,生长速度也会被加快,肿瘤可能很快就溃烂了,这样就不不得被迫中止实验,而用药却没有用到足够的时间,药效还没有发挥出来就结束了,这样是很不利的。所以一般情况下,应该尽量的复合这个瘤株本身的生长特性,不应该过多地去加以人为的干扰;其二,开始试验时可以用于试验的动物数不少于 60%~70%,而且 SD 不大于平均值的 1/3 左右;第三,开始试验 3~4 周后肿瘤重量大于 1 g,并且没有溃烂。但如果在高数量级的肿瘤细胞都未能成功造模的情况下,就没有必要坚守这种的观点。

2.5 接种部位

一般情况下,裸鼠肿瘤细胞株接种首选腋窝中部外侧皮下。接种时由裸鼠体侧腰部稍靠上的部位进针,要保证与接种点的距离小于针头的长度,向头部穿行,避免刺破皮肤或者刺破肌肉层,当针头到达接种位点时注射,退出针头,这样操作的目的是并不完全是避免漏液,主要是避免污染,进针点还有少量污染的可能性的,针头在皮下穿行一段后,接种点离进针点较远,可最大限度减少污染的可能。

在正式实验研究中,我们建议一只老鼠只能接种一个位点,因为一个裸鼠身上如有多于一个肿瘤,可能会相互影响。接种肿瘤细胞时,皮肤不用绷得太紧,平展即可,接种的进针点尽可能的靠下,针头在皮下走一段后再注射,速度不易太快。注射前针头稍微动一动,明确针头在皮下,否则可能在皮内或者肌肉内。

2.6 手术标本的荷瘤

SFDA 的临床前指导原则明确指出要用建株的肿瘤株进行试验^[2],所以,如果是药效学方面的实验研究,一般不宜使用手术标本进行肿瘤模型的制备。因为用手术标本的试验可重复性太差,其保存条件受到限制,一旦保存的肿瘤组织死亡,就很难

重复出以前的试验结果。国外的文献上基本没有用手术标本进行建模开展实验研究的。对手术肿瘤标本的取材,我们一般选择肿瘤生长活跃,状态良好,结缔组织比较少的地方。对肿瘤组织的运输主要是保证无菌,其次是冰浴保温,无菌培养液浸泡,时间不宜超过 1 h。最好在一个小时内完成动物的接种。接种部位一般选择腹外侧皮下。此外,对手术标本荷瘤的方法,我们也不能保证取得的标本一定能够顺利地成瘤并且用于实验研究。

2.7 肿瘤的倍增时间

William 等^[9]认为结节的体积变化百分数 $PVC = 100 * (V_2 - V_1) / V_1$, PVC 代表前后两次体积 V_1 、 V_2 的差值百分比,包括部分容积效应、分割指数、伪影以及结节很轻微但是确实存在的体积变化所造成的影响,对于首次普查检测到或偶然查出的结节,DTt 等于 400 d,因为它接近生长最慢的结节的倍增时间;动物肿瘤实验模型的倍增时间,应该是在瘤体积 100 ~ 800 之间计算,Aoki 等^[10]将结节倍增时间的计算公式表示为: $DTt = (\ln 2 \Delta t) / \ln(V_2 / V_1)$, V_1 、 V_2 分别是前后两次测量的体积, Δt 是两次测量的时间间隔。通过该公式,可以实现对肿瘤倍增时间的计算,进而设计和优化实验方案。

3 讨论

人体肿瘤移植于免疫缺陷动物,能保持其生物学特性,用于研究人体肿瘤对药物的敏感性有很大帮助。早期的研究工作是将人体肿瘤移植到动物缺乏免疫机能的特殊部位,如鸡胚、动物的眼前房,仓鼠颊囊内等,虽有一定比例的成活率,但因肿瘤生长缓慢又受移入部位包膜的限制,肿块往往较小,难于传代,更不能适应需要较多瘤源的实验治疗工作。随着免疫缺陷裸鼠的发现,为肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等实验方面的研究提供了难得的工具。虽然裸鼠肿瘤模型的制备是一个相对简单的过程,但其中的一些因素会直接影响到我们实验的进展,我们通过实践总结了影响裸鼠荷瘤效果的诸多因素,重点分析了接种裸鼠肿瘤细胞系的选择;裸鼠的状态;细胞的状态,接种裸鼠的细胞量和接种部位等方面对裸鼠荷瘤的影响。

参考文献:

- [1] Kinsella TJ, Mitchell JB, McPherson S, et al. , In vitro radiation studies on Ewing's sarcoma cell lines and human bone marrow: application to the clinical use of total body irradiation (TBI) [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1984. 10 (7): p. 1005 - 11.
- [2] Teicher, B. A. and P. A. Andrews, *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2nd ed. ed. *Cancer drug discovery and development* [M]. 2004, Totowa, N. J. : Humana Press. 450.
- [3] Li W Y, Chan S W, Guo D J, et al. Water extract of *Rheum officinale* Baill. induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 and human breast cancer MCF-7 cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(2): 251 - 256.
- [4] Kulbacka J, Chwilkowska A, Bar J, et al. Oxidative alterations induced in vitro by the photodynamic reaction in doxorubicin-sensitive (LoVo) and -resistant (LoVoDX) colon adenocarcinoma cells [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235 (1): 98 - 110.
- [5] Gobbi A, Crippa L, Scanziani E. *Corynebacterium bovis* infection in immunocompetent hirsute mice [J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49(2): 209 - 211.
- [6] Choo K B, Liew L N, Wang H C. Production of transgenic mice carrying the human hepatitis B virus or the human papillomavirus DNA sequences in Taiwan: analysis of physical structure and hereditary mode [J]. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 1989, 13(4): 314 - 318.
- [7] Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, et al. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(17): 6698 - 6702.
- [8] Weber C, Freimark D, Portner R, et al. Expansion of human mesenchymal stem cells in a fixed-bed bioreactor system based on non-porous glass carrier—part A: inoculation, cultivation, and cell harvest procedures [J]. *Int J Artif Organs*, 2010, 33 (8): 512 - 525.
- [9] Kostis W J, Yankelevitz D F, Reeves A P, et al. Small pulmonary nodules: reproducibility of three-dimensional volumetric measurement and estimation of time to follow-up CT [J]. *Radiology*, 2004, 231(2): 446 - 452.
- [10] Aoki T, Nakata H, Watanabe H, et al. Evolution of peripheral lung adenocarcinomas: CT findings correlated with histology and tumor doubling time [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2000, 174(3): 763 - 768.