建立小鼠淋巴瘤模型所需环磷酰胺最佳预处理剂量探索

徐岳一 陈敏敏 李 娟 欧阳建△

(南京大学医学院附属鼓楼医院血液科 江苏 南京 210008)

摘要 目的 探讨不同剂量环磷酰胺对小鼠肿瘤成模情况的影响 ,寻找一种简单、有效的建立肿瘤模型的预处理方法。方法:给予BALB/c 裸鼠腹腔注射不同剂量环磷酰胺 ,72 小时后再给予小鼠皮下接种淋巴瘤细胞 ,观察预处理前后小鼠外周血白细胞数量及体重变化情况 ,以及肿瘤成模率、急性死亡率等。结果:①组1(NS 对照组)、组2(100mg/kg×1d)、组3(125mg/kg×1d)、组4(75mg/kg×2d)预处理后体重较处理前无显著性变化 ,亦无急性死亡情况发生 ;而组5(125mg/kg×2d)、组6(200mg/kg×2d)、组7(125mg/kg×3d)、组8(250mg/kg×3d)小鼠体重较预处理前明显减轻 ,且急性死亡率依次为30%、58.3%、50%、75% ,②组1和组2小鼠预处理后72小时外周血白细胞数较处理前无明显差异 ,同时均未成模 ,而组3、组4、组5、组6、组7、组8小鼠白细胞较预处理前均显著下降 ,成模率依次为20%、83.3%、60%、33.3%、50%、25%。结论:使用环磷酰胺75mg/kg连续2天腹腔注射的预处理方案 ,操作简单 ,成本低廉 ,通过观察外周血白细胞数和小鼠体重水平等指标即可初步判断建模情况 ,同时肿瘤成模率高 ,毒副作用小 是理想的预处理方案。

关键词 环磷酰胺 免疫抑制 裸鼠 肿瘤模型

中图分类号:Q95-33 R730.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)14-2626-06

Dosage of Cyclophosamide Pretreatment in Lymphoma Animal Models Establishment

XU Yue-vi, CHEN Min-min, LI Juan, OUYANG Jian

(Department of Hematology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different doses of cyclophosphamide on the tumor implantation and growth rate in immunodeficient mice models. Methods: Different doses of cyclophosphamide were given to BALB/c nude mice, and then human lymphoma cells were inoculated for 72 hours. The effect of pretreating mice with cyclophosphamide was compared, as well as the tumor implantation and growth rate. Results: ①The mice in group 1, group 2, group 3 and group 4 had no changes in body weight and the acute death rate after treated with cyclophosphamide. Mice in group 5, group 6, group 7 and group 8 lost their weight significantly after treated with cyclophosphamide. The acute death rate of each group was 30%, 58.3%, 50%, 75%. ②The mice in group 1 and group 2 had no changes in WBC count, and no lymphoma model developed either. The WBC count was significantly decreased in mice of group 3, group 4, group 5, group 6, group 7 and group 8, and the tumor implantation rate of each group was 20%, 83.3%, 60%, 33.3%, 50%, 25%. Conclusion: The mouse cancer models can be established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and the dose of 75mg/kg for 2 days was the best dose for establishing the model.

Key words: Cyclophosphamide; Immunosuppression; Nude mice; Models of human malignancies

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R730.5 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)14-2626-06

前言

在肿瘤研究领域,科学家们为了明确肿瘤的致病机制、及其在体内的生长、侵袭特性,同时验证各种治疗手段的有效性,常需要建立合适的肿瘤动物模型。其中,具有免疫缺陷的小鼠具有较高的肿瘤移植成功率,从而成为肿瘤研究的理想模型。早在1960年,存在免疫缺陷的裸鼠就已被应用于人类白血病及淋巴瘤的研究^[12]。目前建立免疫缺陷小鼠模型的方法主要有以下几种:1)基因突变诱导的免疫缺陷小鼠,如严重联合免疫缺陷小鼠(severe combined immuno de?ciency ,SCID)、BALB/c

作者简介 徐岳一(1985-),女 硕士研究生 主要研究方向 恶性血液病分子机制及靶向治疗 F-mail:may6204@163.com

△通讯作者 欧阳建 电话 0.25-83105211 E-mail: oy626@sina.com (收稿日期 2012-02-16 接受日期 2012-03-12)

裸鼠等 2)放射线诱导的免疫缺陷小鼠 如使用 X 线照射小鼠 诱导其免疫抑制 3)化学药物诱导的免疫缺陷小鼠 如使用环磷酰胺抑制小鼠免疫等。本研究将环磷酰胺作为免疫抑制剂 ,诱导小鼠产生免疫抑制后进行移植肿瘤模型的建立 ,并探讨不同剂量环磷酰胺对小鼠免疫功能及成模情况的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 BALB/c 裸鼠 5周龄,体重 15-20g,购自南京医科大学实验动物中心(许可证号 SCXK 芬 2008-0004)。在层流架带盖鼠盒中饲养(符合 SPF, Specific Pathogen free Condition标准)标准颗粒饲料、饮水、垫料,一切与鼠接触物品均经灭菌处理。

1.2 主要试剂

注射用环磷酰胺(CTX),中国恒瑞医药。

1.3 细胞株

人 Burkitt's 淋巴瘤细胞株 Raji 为本实验室保存细胞系。在 含 10%胎牛血清(GIBCO)的 RPMI-1640 培养基(GIBCO)中, 于 37°C、5% CO₂条件下常规培养,每 2-3 天换液传代。

1.4 动物模型建立

1.4.1 动物分组 BALB/c 裸鼠共 86 只,按不同 CTX 预处理剂 量分为八组,分别为:1)生理盐水(NS)对照组 2)100 mg/kg CTX 处理 1 天 ;3)125 mg/kg CTX 处理 1 天 ;4)75 mg/kg CTX 处理 2 天 5)125 mg/kg CTX 处理 2 天 6)200 mg/kg CTX 处理 2 天 ;7)125 mg/kg CTX 处理 3 天 ;8)250 mg/kg CTX 处理 3 天。CTX 均为连续腹腔注射给药 给药体积为每次 0.2 ml。

1.4.2 接种细胞 预处理结束 72 小时后, 于裸鼠右侧腋下皮下 注射对数生长期 Raji 细胞,每只接种细胞 2× 10⁷个(体积约 0.1ml)

1.5 观测指标

1.5.1 一般情况 观察小鼠有无萎靡少动、体重减轻等;有无急 性死亡(开始预处理1周内死亡)。

1.5.2 外周血白细胞计数 预处理前及预处理后,隔天对小鼠

行眼眶静脉采血 50 µL ,1:50 稀释于 1%醋酸溶液中 ,于镜下计

1.5.3 肿瘤体积测量 接种细胞后 隔天用游标卡尺测量皮下瘤 体长(d1)、宽(d2)、高(d3),瘤体体积计算公式为[3]:

Volume=
$$\frac{d1}{2} \times \frac{d2}{2} \times \frac{d3}{2} \times \frac{4}{3} \pi$$

待瘤体体积达 100mm3 时 视为成模[46]。

1.6 统计学分析

用 SPSS v17.0 软件对结果进行单因素方差分析。数据均用 x± s表示。P< 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量 CTX 对小鼠一般情况的影响

2.1.1 体重变化情况 前四组小鼠预处理后 1 周体重较处理前 无显著性变化 (P> 0.05), 即组 1 (NS 对照组)、组 2(100 mg/kg× 1d)、组 3(125 mg/kg× 1d)、组 4(75 mg/kg× 2d)。而后 四个剂量组小鼠体重则较预处理前明显减轻(P< 0.05),即组 5 (125 mg/kg× 2d)、组 6(200 mg/kg× 2d)、组 7(125 mg/kg× 3d)、组8(250 mg/kg× 3d)(见表1 图 1)。

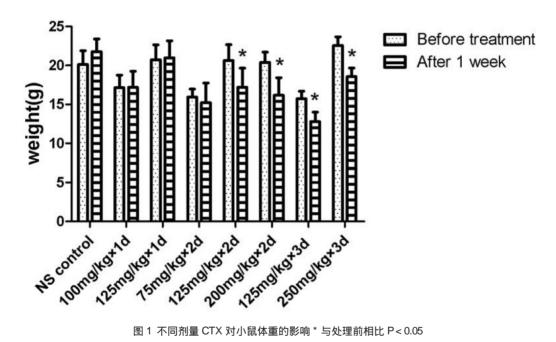


图 1 不同剂量 CTX 对小鼠体重的影响 * 与处理前相比 P < 0.05 Fig.1 The effect of different doses of CTX on body weight* compared with before treatment P < 0.05

2.1.2 急性死亡率 与体重变化情况相类似,前四组小鼠预处 理开始后1周内无死亡情况发生,即组1(NS对照组)、组2 (100mg/kg× 1d)、组 3(125mg/kg× 1d)、组 4(75mg/kg× 2d)。 而后四个剂量组小鼠均出现了急性死亡情况,即组5 (125mg/kg× 2d)、组 6(200mg/kg× 2d)、组 7(125mg/kg× 3d)、 组 8(250mg/kg× 3d) 其急性死亡率依次为 30%、58.3%、50%、 75%(见表 2 ,图 2)。

2.2 不同剂量 CTX 对小鼠外周血白细胞数的影响

组 1(NS对照组)和组 2(100 mg/kg× 1d)小鼠预处理后 72 小时外周血白细胞数较处理前无明显差异(P>0.05)。而后六 个剂量组小鼠白细胞较预处理前均显著下降(P<0.05),即组3 (125 mg/kg× 1d)、组 4(75 mg/kg× 2d)、组 5(125 mg/kg× 2d)、 组 6(200 mg/kg× 2d)、组 7(125 mg/kg× 3d)、组 8(250 mg/kg× 3d)(见表 1 图 3)。

2.3 不同剂量 CTX 对小鼠成模情况的影响

在八个预处理剂量组中,组1(NS对照组)和组2 (100mg/kg×1d) 中小鼠均未成模。在其余六组中,组4 (75mg/kg× 2d) 成模率最高,为83.3%,平均成模天数为 17.50± 4.03 天 组 3(125mg/kg× 1d)成模率最低 ,仅为 20% ,平 均成模天数最长 ,为 20.0± 2.83 天 ,组 7(125mg/kg× 3d)和组 8 (250mg/kg× 3d)小鼠平均成模天数较短 分别为 3.80± 1.10 天 和 3.67± 1.15 天(见表 2 图 4 图 5)。

表 1 不同剂量 CTX 对小鼠外周血 WBC 及体重情况的影响 Table 1 The effect of different doses of CTX on WBC count and body weight

	,			
Group	WBC count (× 10%L)		Weight (g)	
	Before	After 72	Before	After 1 week
	treatment	hours	treatment	
NS control	5.50± 1.83	6.05± 2.07	20.14± 1.77	21.79± 1.61
100mg/kg× 1d	3.74± 0.72	3.42± 0.26	17.16± 1.60	17.20± 2.06
125mg/kg× 1d	5.26± 1.84	1.10± 1.10*	20.73± 1.92	20.98± 2.20
75mg/kg× 2d	3.10± 0.87	0.44± 0.34*	15.94± 1.03	15.22± 2.54
125mg/kg× 2d	6.21± 2.08	0.97± 0.35*	20.63± 2.04	17.21± 2.45*
200mg/kg× 2d	2.33± 0.40	0.33± 0.22*	20.40± 1.32	16.18± 2.25*
125mg/kg× 3d	5.81± 1.31	0.4± 0.21*	15.74± 0.96	12.80± 1.21*
250mg/kg× 3d	5.68± 0.83	0.26± 0.15*	22.58± 1.10	18.58± 1.10*

注:* 与处理前相比 P < 0.05;

Note: *Compared with before treatment P< 0.05.

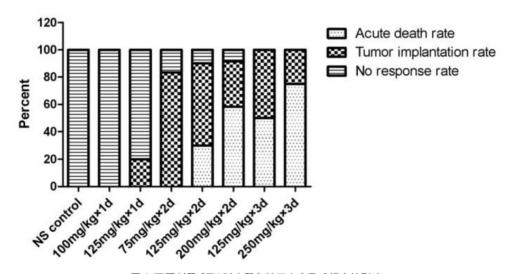


图 2 不同剂量 CTX 对小鼠急性死亡率及成模率的影响 Fig.2 The effect of different doses of CTX on acute death rate and tumor implantation rate

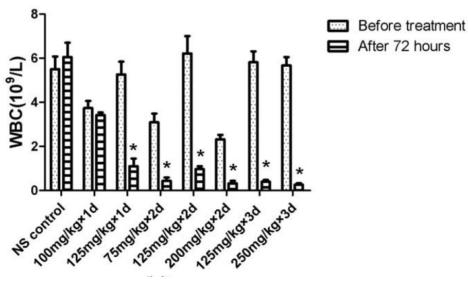


图 3 不同剂量 CTX 对小鼠外周血白细胞数的影响 :* 与处理前相比 P < 0.05 Fig.3 The effect of different doses of CTX on WBC count :*compared with before treatment P < 0.05

表 2 不同剂量 CTX 对小鼠急性死亡率及成模情况的影响 Table 2 The effect of different doses of CTX on acute death rate and tumor implantation rate

		<u> </u>		
Group	Animal number (n)	Acute death rate (%)	Tumor implantation rate (%)	Time of model induced (day)
NS control	10	0 (0%)	0 (0%)	
100mg/kg× 1d	10	0 (0%)	0 (0%)	
125mg/kg× 1d	10	0 (0%)	2/10 (20%)	20.0± 2.83
75mg/kg× 2d	12	0 (0%)	10/12 (83.3%)	17.50± 4.03
125mg/kg× 2d	10	3/10 (30%)	6/10 (60%)	7.83± 2.23
200mg/kg× 2d	12	7/12 (58.3%)	4/12 (33.3%)	8.50± 7.77
125mg/kg× 3d	10	5/10 (50%)	5/10 (50%)	3.80± 1.10
250mg/kg× 3d	12	9/12 (75%)	3/12 (25%)	3.67± 1.15

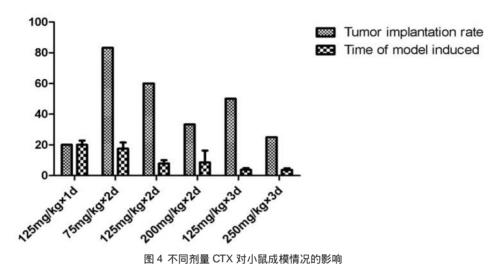


Fig.4 The effect of different doses of CTX on tumor implantation

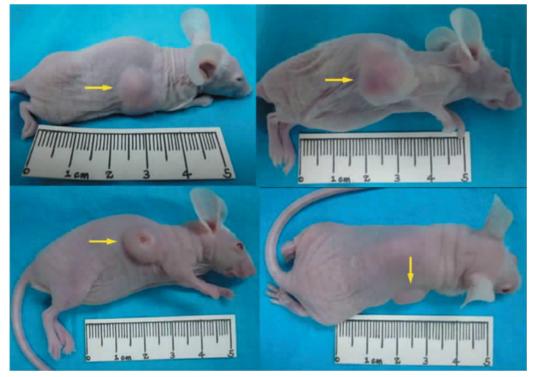


图 5 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤成模情况 Fig.5 The tumor xenografts in BALB/c nude mice

3 讨论

恶性肿瘤是当今人类最大的健康杀手之一,因此抗肿瘤新药物和手段的开发成为了目前医学研究的热点,而大量的基础实验和临床前期研究都以动物模型作为研究对象。目前国内外多采用免疫缺陷小鼠作为建立肿瘤模型的对象。本研究的目的在于寻找一种操作简单、建模成功率高、适于在大多数科研院校中推广的造模方法。

目前动物移植瘤模型的建立多以免疫缺陷小鼠为基础 如 SCID 小鼠、BALB/c 裸鼠等。WA Hudson 等人认为,即使同样 是先天免疫缺陷小鼠 不同品系的小鼠对不同肿瘤的敏感性也 不完全相同 故其肿瘤建模成功率也有差异[7]。有研究证明 Rag-1 缺陷小鼠和 BALB/c 裸鼠的淋巴瘤建模成功率要明显低 于 SCID 小鼠 这是由不同品系小鼠之间的免疫功能差异所造 成的[89]。例如 BALB/c 裸鼠为先天胸腺缺如 即缺乏 T 细胞免 究中[10]。但其 B 细胞免疫仍存在 .且 NK 细胞免疫在三周龄左 右亦开始发挥作用,与 T、B 细胞免疫联合缺乏的 SCID 小鼠相 比 其肿瘤成模率亦偏低[11-12]。但有文献认为 在给小鼠接种肿瘤 细胞前,进一步抑制其免疫功能,可提高肿瘤建模的成功率[6], 如全身 X 线照射 使用抗 NK 细胞抗体 anti-asialo-GM1 或注 射环磷酰胺(CTX)等[213-15]。CTX 作为一类烷化剂用于抗肿瘤治 疗已有 50 多年历史 同时 CTX 还是有效的免疫抑制剂 常在 自身免疫疾病和器官移植的过程中使用[16]。有研究认为 环磷 酰胺(CTX)可抑制裸鼠残存的免疫功能 从而提高裸鼠肿瘤建 模成功率[11-12]。

本实验结果显示,生理盐水及低剂量 CTX (100mg/kg×1d)预处理小鼠后,对小鼠免疫功能无明显影响,其外周血白细胞数较处理前并无降低,且成模率为 0%。逐渐加大 CTX 预处理剂量后,从各组小鼠白细胞数均出现明显下降,从(125mg/kg×1d)组开始有成模小鼠出现,其成模率为 20%。其中(75mg/kg×2d)组成模率最高,达 83.3%;而该浓度对小鼠体重无明显影响。急性死亡率为 0%。这提示较低剂量 CTX 连续使用 2 天,可使血药浓度保持在相对稳定的水平,且无明显毒副作用,故使用 CTX 75mg/kg×2d 预处理小鼠,其免疫抑制效果要优于 CTX 125mg/kg×2d 预处理小鼠,其免疫抑制效果要优于 CTX 125mg/kg 单次使用。而随着预处理剂量的不断增加,小鼠成模率并未继续上升,这是由于此时 CTX 的毒副反应开始出现,表现为小鼠萎靡不振、体重下降,急性死亡率升高,而成模率因此反而降低。从(125mg/kg×2d)组开始,小鼠体重较预处理前均有显著下降,同时急性死亡率不断上升,最高达 75%。

表 1、表 2 显示 出现外周血白细胞数量降低的小鼠 其肿瘤成模率高于白细胞未降低的组别 这提示外周血白细胞水平可初步反映小鼠的免疫功能情况。目前 常用的免疫功能检测指标有 NK 细胞活性、淋巴细胞转化率、T 淋巴细胞亚群变化等[17,18]。而在实际建造动物肿瘤模型的过程中 若对所有实验对象常规检测以上指标则工作量较大。而本实验中发现外周血白细胞数与小鼠成模率之间存在相关性 提示可将外周血白细胞数作为反映小鼠免疫功能的简单指标 在预处理后短时间内即可初步判断免疫缺陷模型是否建造成功 并预测肿瘤建模的成

功率。同时表 1、表 2 还显示,体重明显下降的小鼠急性死亡率亦较高。这提示体重是反应小鼠活力及一般情况的重要指标,通过对预处理前后体重的监测,可及时发现小鼠是否出现 CTX 毒副反应,并调整预处理。

综上所述,使用环磷酰胺 75mg/kg 连续 2 天腹腔注射的预处理方案,在接种肿瘤细胞前进一步抑制 BALB/c 裸鼠的免疫功能,可获得较高的肿瘤成模率(83.3%),同时毒副作用微小(急性死亡率为 0%),是理想的预处理方案,且该方案平均成模天数为 17.50± 4.03 天,与国外报道的 2-3 周符合[11.18]。因此认为,使用环磷酰胺诱导免疫缺陷小鼠模型,操作简单,成本低廉,通过观察外周血白细胞数和小鼠体重水平等指标即可初步判断建模情况,适合于在大多数科研院校中使用,其中以连续2 天腹腔注射 75mg/kg 环磷酰胺效果较为理想。

参考文献(References)

- [1] Faguet GB, Agee JF. Transplantation of human hairy cell leukemia in radiation-preconditioned nude mice: characterization of the model by histological, histochemical, phenotypic and tumor kinetic studies[J]. Blood, 1988, 71: 1511-1517
- [2] McManaway ME, Marti GE, Tosato G, et al. Hetero-transplantation of human Burkitt's lymphoma cell lines in athymic nude mice: tumor-host relationships[J]. Pathobiology, 1993, 61: 164-172
- [3] Laird M, Sally J, De Nardo, et al. Implantation of Different Malignant Human Cell Lines in an Athymic Mouse Does Not Alter Success and Growth Rates of Either Xenograft[J]. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2005, 20(6): 614-619
- [4] Zhang HF, David ZQ, Yee ST, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth[J]. PNAS, 2008, 105(50): 19579-19586
- [5] Jeroen M, Ernst J, Frans H, et al. Enhancing Tumor Implantation and Growth Rate of Ramos B-Cell Lymphoma in Nude Mice[J]. Comparative Medicine, 2002, 52(1): 36-38
- [6] Chen J, Su CQ, Lu QJ, et al. Generation of adenovirus-mediated anti-CD20 antibody and its effect on B-cell deletion in mice and nonhuman primate cynomolgus monkey [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1562-1568
- [7] Hudson W,Li Q, Le C, et al. Xeno-transplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects [J]. Leukemia, 1998, 12: 2029-2033
- [8] Kawata A, Yoshida M, Okazaki M, et al. Establishment of new SCID and nude mouse models of human B leukemia/lymphoma and effective therapy of the tumors with immuno-toxin and monoclonal antibody: marked difference between the SCID and nude mouse models in the antitumor efficacy of monoclonal antibody [J]. Cancer Res, 1994, 54: 2688-2694
- [9] Kamel-Reid S, Letarte M, Sirard C, et al. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice [J]. Science, 1989, 246: 1597-1600
- [10] Liu C, Lambert JM, Teicher BA, et al. Cure of multi-drug-resistant human B-cell lymphoma xenografts by combinations of anti-B4-blocked ricin and chemotherapeutic drugs[J]. Blood, 1996, 87: 3892-3898
- [11] Gene K, Rong NS, Jen WC. Nude Mice as Models for Human Leukemia Studies[J]. Am J Pathol, 1984, 114: 360-366

- [12] Jin K, Teng L, Shen Y, et al. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immuno-deficient mice: a systematic review [J]. Clin Transl Oncol, 2010, 12(7): 473-480
- [13] Taghian A, Budach W, Zietman A, et al. Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the subcutaneous tissue of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunode?cient mice[J]. Cancer Res, 1993, 53: 5012-5017
- [14] Zubair AC, Ali SA, Rees RC, et al. Analysis of the colonization of unirradiated and irradiated SCID mice by human lymphoma and nonmalignant lymphoid cells[J]. Leuk Lymphoma, 1996, 22: 463-471
- [15] Huang P, Taghian A, Allam A, et al. The effect of whole-body irradiation of nude mice on the tumor transplant ability and control probability of a human soft tissue sarcoma xenograft [J]. Radiat Res, 1996, 145: 337-342

- [16] Sistigu A, Viaud S, Chaput N, et al. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design Semin[J]. Immunopathol, 2011, 33(4):369-383
- [17] Cao LZ, Lin ZB. Regulatory effect of ganodermalucidum polysaccharides on cytotoxic T lymphocytes induced by dendritic cells in vitro [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(4): 321-326
- [18] Sheng XL, Zhang H. In-vitro activation of cytotoxic T lymphocytes by fusion of mouse hepatocellular carcinoma cells and lymphotactin gene-modified dendritic cells [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (44): 5944-5950
- [19] Postema EJ, Frielink C, Oyen WJ, et al. Biodistribution of 131I-, 186Re-, 177Lu-, and 88Y-Labeled hLL2 (Epratuzumab) in Nude Mice with CD22-Positive Lymphoma[J]. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2003, 18(4): 525-533

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

ト丽红¹ 戴薇薇²

(1哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gamhbir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委 国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委 还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字 , 收录图片 378 幅 , 共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章 主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章 着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元, 全国各大书店有售。