

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.001

· 基础研究 ·

人 T 细胞急性淋巴细胞白血病小鼠动物模型的建立*

朱光荣^{1,2} 王娜¹ 姜利军¹ 季建敏² 沈群² 孙汉英^{1△}

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科 湖北 武汉 430030;

2 南京中医药大学附属江苏省中医院血液科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:通过建立一理想的动物模型来模拟 T 细胞急性淋巴细胞白血病的发病状态,为探索急性淋巴细胞白血病全新的治疗方法提供平台。**方法:**采用抗鼠 CD122 抗体注射 NOD/SCID 小鼠进行预处理,通过尾静脉注射 9 例不同病例的白血病细胞,以及 1 株 T-ALL 细胞系。通过检测小鼠体内白血病细胞及脏器白血病细胞浸润情况,观察白血病细胞植入。将白血病细胞进行二次移植,观察移植稳定性。对白血病动物模型进行药物处理,观察小鼠生存期,模拟人体治疗反应。**结果:**有 4 例病例的细胞及 T-ALL 细胞株成功植入。流式细胞检测显示受体小鼠体内较多比例人 CD45⁺ 细胞表达,免疫组化显示 CD45⁺ 细胞浸润小鼠不同脏器,系列移植也获得成功。体内药物处理显示地塞米松能延长小鼠的生存期,与临床观察相一致。**结论:**成功建立经抗鼠 CD122 单抗预处理的人 T 细胞急性淋巴细胞白血病 NOD/SCID 小鼠模型,具有原发疾病的所有主要特征。

关键词:T 细胞急性淋巴细胞白血病;NOD/SCID 小鼠;异种移植模型;疾病特征

中图分类号:Q95-3;R733.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)09-1601-07

Establishment of Mice Animal Model of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*

ZHU Guang-rong^{1,2}, WANG Na¹, JIANG Li-jun¹, JI Jian-min², SHEN Qun², SUN Han-ying^{1△}

(1 Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China; 2 Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To develop the animal models for understanding the pathophysiology of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and identifying novel therapeutic approaches. **Methods:** we inoculated the anti-mouse CD122 monoclonal antibody conditioned NOD/SCID mice with the leukemia cells from 9 T-ALL patients and one cell line via the tail vein. Specimens obtained from these mice models were analyzed to confirm the engraftment of the leukemia cells. Serial transplanted leukemia cells from the secondary passage of model to NOD/SCID mice for in vivo drug treatment were to mimick human responses. **Results:** Four of the 9 patients and the cell line were successfully engrafted. The high percentage of human CD45⁺ cells was detected in recipient mice by flow cytometry. Immunohistochemistry showed infiltration of human CD45⁺ cells in different organs. Serial transplantation was also achieved. In vivo drug treatment showed that dexamethasone could extend survival of rats, which was consistent with clinical observation. **Conclusion:** These results demonstrated that we successfully established 5 xenotransplantation model of T-ALL in anti-mCD122 mAb conditioned NOD/SCID mice, which recapitulated the characteristics of original disease.

Key words: T-ALL; NOD/SCID mice; Xenotransplantation model; Disease characteristics

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1601-07

前言

急性淋巴细胞白血病的生物学特性表现为 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞分化异常、增殖失控以及凋亡失常^[1]。其中 T 细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)大约占有儿童急性淋巴细胞白血病 10%-15%,而占有成人急性淋巴细胞白血病 25%^[2]。然

而,T-ALL 仍然是急性淋巴细胞白血病最常见的死亡原因之一。有报道称成人 T-ALL5 年生存率不到一半^[3]。尽管有几种再现性遗传异常已被确认,但大多数基本原因仍尚未明了。另一方面,因为 T-ALL 发病率较低且预后差,临床上对 T-ALL 采用新药治疗进行评价有较多困难。由此,建立小鼠模型,模拟 T-ALL 临床发病表现是十分需要的。

* 基金项目:华中科技大学博士点基金(200804870008)

作者简介:朱光荣(1974-),男,博士研究生、副主任医师,主要研究方向:血液肿瘤与免疫,电话:18652043076,E-mail:zhugrzww@sina.com

△ 通讯作者:孙汉英(1957-),女,教授、主任医师、博士生导师,主要研究方向:血液肿瘤与免疫,

电话:13807165617,E-mail:sunhanying@hotmail.com

(收稿日期:2014-09-07 接受日期:2014-09-30)

异种移植模型通常采用目前最广泛应用的非肥胖 - 重症联合免疫缺陷小鼠(NOD/SCID 小鼠)作为移植模型。此小鼠系既可适合作正常的, 亦可作人恶性造血干细胞受者^[45]。NOD/SCID 小鼠缺乏功能性 B 细胞和 T 细胞, 而且 NK 细胞也是功能缺陷的^[6-8]。NK 细胞吞噬功能极差, 不能激活补体。固有免疫和过继免疫功能均缺乏增加了 NOD/SCID 小鼠接受移植物的能力^[9]。更为重要的是, 供者细胞的形态学特征、免疫表型、基因型和生物学特征 NOD/SCID 小鼠中能很好的保留。由此, 为人类移植提供了精确的保存场所^[10]。

为了评估 T-ALL 的病理生理特征以及开发新的治疗方案, 我们采用经小鼠尾静脉注射初发的人 T-ALL 细胞, 从而成功建立了数个异种移植 NOD/SCID 小鼠 T-ALL 模型。

1 材料和方法

1.1 主要药物及试剂

抗鼠 -CD122 单克隆抗体 (TM-β1, Rat IgG2b, Bio X cell, USA); 标准单克隆抗体(MoAb)包括抗人 CD45-FITC(购自美国 Becton-Dickinson 公司); 长春新碱购自浙江海正药业; 地塞米松购自湖北天药药业; RPMI 1640、IMDM 培养液采购自 Gibco 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒 Blood Mini Kit, 购自 QIAGEN 公司; 2× PCR mix 采购自东胜生物公司; 人 p17H8 探针采购自 Invitrogen 公司; 荧光显色剂 Gelred 购自 Biotium 公司。

1.2 细胞来源

9 例 T 急淋病例骨髓来自同济医院血液科, 诊断符合 MICM 诊断标准。T-ALL 细胞系 MOLT-4 购自美国 ATCC 公司(USA)。9 例 T 细胞急性淋巴细胞白血病病例, 其中 4 例未见异常基因, 2 例检测到 MLL/AF9 融合基因, 1 例检测到 MLL/AF10 融合基因, 1 例伴有 SIL/TAL1 融合基因。各病例特征如下表:

表 1 9 例初发急性 T 淋巴细胞白血病的临床特征
Table 1 Clinical features of 9 patients with de novo T-ALL

Patients	Age	Sample	WBC at diagnosis	Genetic	
	(years)	Gender	(× 10 ⁹ /L)	abnormalities	
ALL-1	20	Female	BM	156.0	Normal
ALL-2	28	Male	BM	191.4	MLL/AF10
ALL-3	16	Male	BM	7.0	MLL/AF10
ALL-4	44	Male	BM	28.9	Normal
ALL-5	15	Female	BM	178.0	Normal
ALL-6	35	Male	BM	7.4	Normal
ALL-7	7	Male	BM	308.0	SIL/TAL
ALL-8	29	Male	BM	134.0	Normal
ALL-9	35	Male	BM	536.6	MLL/AF9

1.3 实验动物

重症联合免疫缺陷小鼠(nonobese diabetic mice with severe combined immunodeficiency disease, NOD/SCID)75 只, 4-6 周龄 71 只, 8 周龄 4 只, 雌性 37 只, 体重 17-19 克; 雄性 38 只, 体重 18-25 克。动物均购自中国科学院上海实验动物中心, 符合

国家标准 GB9-9, 无特定病原动物 (Specific Pathogen free animals, SPF)级质量标准。用第二代荷瘤小鼠模型作为实验动物, 无特定病原体动物(Specific Pathogen free animals, SPF)级条件下分笼饲养。保持室温 18-25℃, 相对湿度 40%-60%。专用鼠笼、垫料, 饲料及饮水经 21℃, 30 min 高压灭菌。每周至少 2 次更换垫料。

1.4 原代 T-ALL 白血病细胞制备

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离骨髓细胞单个核细胞, 细胞采用 90%胎牛血清及 10%二甲基亚砜(DMSO)冻存液冻存, 液氮保存。无菌条件下将骨髓液轻轻混匀; 取等体积 Ficoll 淋巴细胞分离液, 缓慢加入等体积骨髓液; 将试管置入水平离心机, 1500 rpm, 离心 10-15 min; 轻轻吸取离心后白细胞层, 3000 rpm, 离心 10 min, 形成细胞团块; 将细胞团块用灭菌 PBS 液 3 反复冲洗 3 遍; 按 90:10 加入适量胎牛血清及 DMSO, 轻轻打匀; 将细胞悬液加入细胞冻存管, 液氮保存, 备用。

1.5 T-ALL 白血病细胞株细胞培养

1.5.1 T-ALL 白血病细胞株细胞培养 在 37℃ 孵育箱、5% CO₂, 饱和湿度培养箱条件下, 人 T-ALL 细胞株 MOLT-4 细胞, 以 2~5× 10⁶ mL 浓度接种于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。3-4 天换液一次。将骨髓单个核细胞和 MOLT-4 细胞涂片晾干, Wright-Giemsa 染色室温下染色 1 分钟, 加 20 滴蒸馏水, 继续染色 5 分钟用自来水冲洗, 晾干, 光学显微镜 (1000×) 下观察。

1.5.2 台盼兰拒染法活细胞计数 0.4%台盼兰溶液与细胞悬液以体积比 1:1 混合, 染色 3-10 分钟, 光学显微镜下观察 MOLT-4 细胞及复苏后骨髓单个核细胞。

1.6 T-ALL 白血病细胞动物接种

1.6.1 NOD/SCID 小鼠的预处理 取鼠龄 3-4 周 NOD/SCID 小鼠, 输注白血病细胞前一天, 经腹腔注射 200 μg 抗鼠 -CD122 单克隆抗体, 输注白血病细胞当天, 再次经腹腔注射 200 μg 抗体。

1.6.2 动物接种 取对数生长期 MOLT-4 细胞, PBS 调整细胞 1× 10⁸ mL, 无菌条件下, 每只注射约 0.3 mL MOLT-4 胞接种于第一代 NOD/SCID 小鼠尾静脉。

冻存的原代 T-ALL 白血病细胞快速溶解, 按每 1× 10⁷ 细胞加入 300 μL PBS 重新悬浮, 经鼠尾静脉注射接种。

1.7 荷瘤组织细胞来源及其生物学特性分析的方法

(1) 无菌手术切取部分瘤组织, 采用常规石蜡包埋切片, 用于组织病理学及免疫组织化学检测。(2) 将组织切块轻轻研磨, 80 目过滤网将荷瘤组织碎块过滤, 制成单细胞悬液。细胞悬液用于流式细胞术免疫学、常规染色体核型分析和相关基因检测等。(3) 将部分组织标本置于液氮冻存。

1.8 病理学和免疫组织化学分析(Immunohistochemistry, IHC)

(1) 无菌条件下取人 T-ALL 荷瘤小鼠的瘤组织及小鼠肝脏、脾脏、肺组织、肾脏、脑组织、骨髓、皮肤等。采用常规固定、石蜡包埋、切片。取正常 NOD/SCID 小鼠对应组织用于组织病理学等对照。

(2) 采用苏木素 - 伊红染色法对所取组织进行染色, 对荷瘤组织形态学观察。

(3) 采用免疫组织化学染色, 检测人 T-ALL-NOD/SCID 荷

瘤小鼠不同组织的人 CD45 抗原表达。

1.9 流式细胞仪(FCM)检测细胞表面免疫表型

(1)无菌条件下手术取荷瘤小鼠模型荷瘤淋巴组织,将组织块轻轻研磨,80目过滤网过滤,制成单细胞悬液(将部分细胞置于-80℃低温冰箱冻存备用)。外周血和骨髓液直接抽取,采用 EDTA 抗凝。

(2)采用多色直接免疫荧光标记法标记。①加入 AB 型血浆,在染色前按 100 μ L/10⁵ 细胞的比例加入,4℃ 条件下孵育 20 分钟,封闭 Fc 受体;②采用 FACS 流式细胞仪和 CellQuest 软件获取并分析 10000 个荷瘤组织单细胞,检测其细胞表面免疫标志的表达,对外周血、骨髓、脾脏、淋巴结 CD45⁺ 细胞定量。

1.10 荧光原位杂交及 RT-PCR 检测特异性融合基因

采用人类染色体特异性探针检测小鼠外周血标本,采用 RT-PCR 检测 SIL-TAL1 融合基因。PCR 引物序列:上游引物 5'-TCC CGC TCC TAC CCT GCA A-3' 下游引物 5'-CGT CGC GGC CCT TTA AGT C-3'。

1.11 T-ALL 白血病细胞动物连续接种

从原代植活的 NOD/SCID 小鼠抽取血液,采用 Ficoll 密度梯度离心法分离骨髓细胞单个核细胞,灭菌 PBS 冲洗 3 遍,层流室中无菌条件下,按每 1 \times 10⁷ 细胞加入 300 μ L PBS 重新悬浮,经鼠尾静脉注射接种。

1.12 体内药物处理 SIL-TAL1+ 小鼠模型

将 21 例小鼠随机分入治疗组和对照组。治疗组采用长春新碱或地塞米松,长春新碱按 0.5 mg/kg,每 4 周给药 7 天;地塞米松按 20 mg/kg,每 4 周给药 5 天;对照组给等剂量的 PBS。药物均经腹腔注射。每组 7 只小鼠。每周监测外周血人 CD45⁺ 细胞比例。观察终点为显示首次发病症状,体重减少大于 20%、精神萎靡、毛发蓬乱。生存期计算为自接种之日到观察终点。分别采用流式细胞术、免疫组化及 RT-PCR 检测免疫表型及遗传特征。

1.13 比较 SIL-TAL1+ 和 SIL-TAL1-T-ALL 小鼠模型

经成功接种 1 例 SIL-TAL1+T-ALL 细胞于 NOD/SCID 小鼠后,我们将其传至第 2 代。同时将 SIL-TAL1- T-ALL 细胞接种于 NOD/SCID 小鼠后,再传至第 2 代。比较两组荷瘤小鼠疾病表型、生存期之间的差别。以检测到外周血人 CD45⁺ 细胞作为起病之日。从起病之日到荷瘤小鼠死亡作为疾病总生存期。

1.14 统计方法

所有统计计算均使用 SPSS16.0 软件 (SPSS, Chicago, IL) 进行。比较连续性数据的差异使用 student-t 检验,分类资料的比较使用卡方检验,生存期采用 log-rank 检验方法比较,采用 Kaplan and Meier 法做图分析,P<0.05 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘤率

收集的 9 例患者标本中,有 4 例成功植入 NOD/SCID 小鼠。其中 1 例为 SIL-TAL1+T-ALL 细胞(病例 7),3 例正常核型 T-ALL 细胞(病例 1、4、6),T-ALL 细胞系 MOLT-4 细胞亦成功植入。

2.2 成瘤潜伏期

如图 1 所示,NOD/SCID 小鼠的成瘤在 4 例原代 T-ALL

白血病细胞以及 MOLT-4 细胞植入后潜伏期相差较大,潜伏期中位 5.3 wks (1.8~ 17.3 wks),SIL-TAL1+T-ALL 细胞潜伏期最短,2 周左右即可检测出人白血病细胞,MOLT-4 细胞与 1 例正常核型细胞相近,另 2 例白血病细胞成瘤潜伏期分别达 7.5 wks 和 17.3 wks。随着时间延长,外周血 hCD45⁺ 细胞比例增加,SIL-TAL1+T-ALL 细胞增加的速度最快,显示此白血病增殖能力较强。

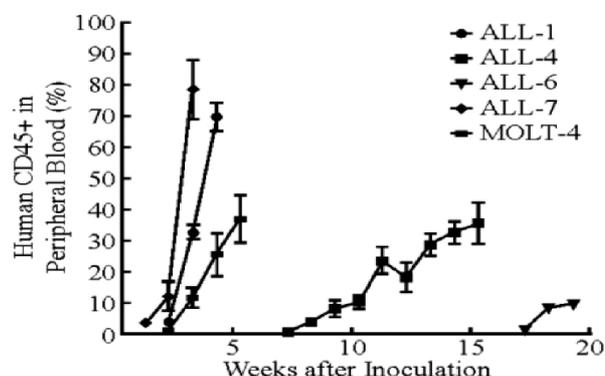


图 1 4 例初发 T-ALL 和 1 例 MOLT-4 细胞 NOD/SCID 异种移植后成瘤潜伏期的差别

Fig. 1 Incubation period of 4 cases primary T-ALL and MOLT-4 cell line after xenograft in NOD/SCID mice

2.3 NOD/SCID 小鼠植入白血病细胞的检测结果

采用流式细胞术检测白血病细胞在 NOD/SCID 小鼠体内植入。人 T-ALL 表达人白细胞共同抗原 LCA(CD45),是特异性人类抗原。采用 hCD45-FITC 抗体,流式细胞检测其数量及信号强度,反应白血病细胞在 NOD/SCID 小鼠体内植入情况。采用 SSC 和 FSC 设门后,选择低 SSC、低 FSC 信号区域(图 2,左图所示),CD45 高信号,低 SSC 信号即为人 CD45 表达区域(图 2,右图所示)。图 2 显示 T-ALL 细胞 CD45 强表达。

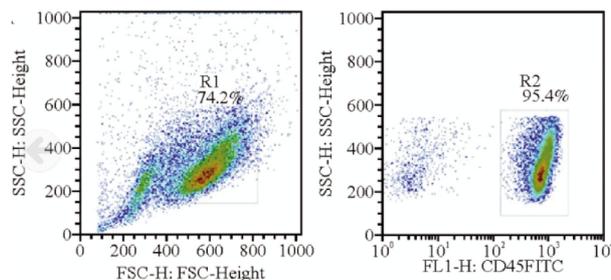


图 2 NOD/SCID 小鼠外周血人 CD45 的表达

Fig. 2 Expression of human CD45 on peripheral blood cells in NOD/SCID mice

2.4 白血病细胞对 NOD/SCID 小鼠各脏器的浸润

采用免疫组化法检测 NOD/SCID 小鼠的淋巴结、脾脏、肝脏、肺脏、肾脏和脑组织。免疫组化法检测到各脏器有 hCD45⁺ 细胞的出现。其中淋巴结浸润最为密集,脑组织浸润程度较轻,数据统计显示淋巴结浸润为 100%,脾脏超过 90%,肝脏、肺脏、肾脏、脑组织分别为 90%、80%、10%~20%、1%~5%。

2.5 荧光原位杂交(FISH)技术确定细胞来源

采用人类特异性探针 p17H8 检测 NOD/SCID 小鼠外周血的来源。p17H8 系针对位于 17 号染色体特异性中心粒重复序

列探针。采用 DAPI 作为对比染色。如图 4 显示,图 G 显示成功检测出 NOD/SCID 小鼠外周血人源细胞。

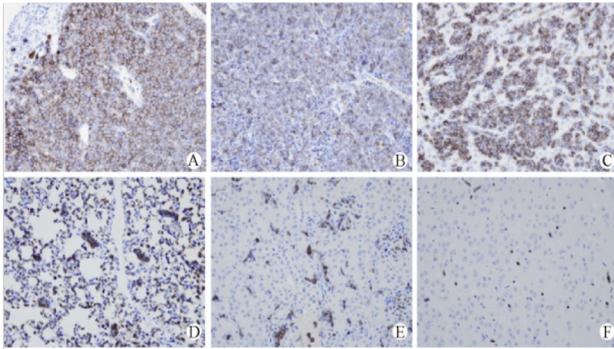


图 3 免疫组化显示 NOD/SCID 小鼠 T-ALL 细胞移植后白血病细胞对各脏器的浸润(× 400)

Fig. 3 Leukemic cells infiltrating organs of NOD/SCID mice after engrafted with T-ALL cells by IHC (× 400)

注: A: 淋巴结; B: 脾脏; C: 肝脏; D: 肺脏; E: 肾脏; F: 脑组织。

Note: A: lymph node; B: spleen; C: liver; D: lung; E: kidney; F: brain.

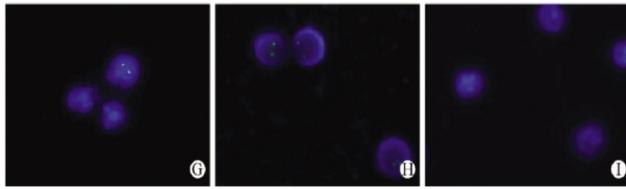


图 4 采用 FISH 检测人源 T-ALL 细胞

Fig. 4 Detection of human T-ALL cell by FISH

注: G: 人 T-ALL; H: 人源细胞(阳性对照); I: 鼠源细胞(阴性对照)。

Note: G: Detection of a human cell, a human T-ALL cell by FISH; H: human cells, as positive control; I: mouse cells, as negative control.

2.6 白血病连续性异种移植结果

从第一代小鼠模型收集白血病细胞,然后分别接种给 7 只小鼠传代。在起病时检测 hCD45⁺ 细胞比例。从图中可以看出第二代小鼠体内 hCD45⁺ 细胞比例较第一代小鼠体内 hCD45⁺ 细胞百分比高(P<0.05),病例 7(SIL-TAL1⁺)无变化,均超过 90%(P>0.05)。

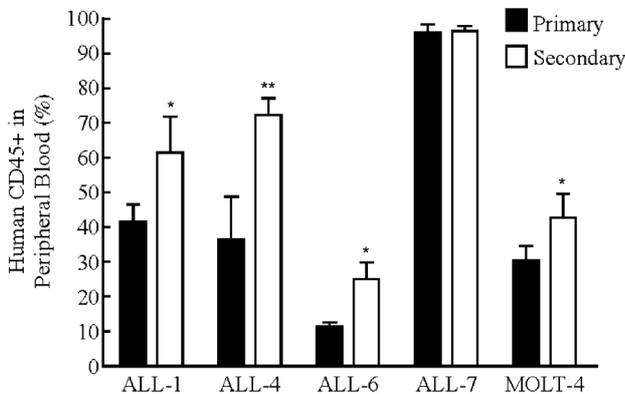


图 5 第二代小鼠与第一代小鼠体内 hCD45⁺ 细胞百分比的比较

Fig. 5 Comparison of percentage of hCD45⁺ cells in peripheral blood in NOD/SCID mice between primary and secondary passages

注:与第一代比较,*P<0.05,**P<0.01。

Note: *P<0.05,** P<0.01, compared with the primary passage.

2.7 第一、二代成瘤潜伏期比较

从接种到起病以及观察终点的时间,第一、二代之间有较大差别。第二代种植的白血病细胞后起病时间较第一代显著缩短,且结束终点时间也显著缩短。病例 1 的第一、二代异种移植后起病时间一致,然而,其结束终点时间缩短;病例 4 异种移植后起病时间缩短近一半,由 54 天缩短为 28 天,结束终点时间由 102.2 天缩短为 71 天;病例 6 异种移植后起病时间由 119 天缩短为 44.8 天,缩短幅度最大,结束终点时间由 126 天缩短为 65 天;病例 7(SIL/TAL1⁺)异种移植后起病时间缩短一周,由 21 天缩短为 14 天,结束终点时间由 27 天,缩短为 19.88 天。这反应了经持续异种移植后白血病细胞获得稳定的植入效应。

表 2 第一、二代小鼠成瘤起病时间的比较

Table 2 Comparison of disease progress in NOD/SCID mice between primary and secondary passages

Patients		Onset of disease (days)	End point (days)
ALL-1	Primary	14	31
	Secondary	14	28.5± 4.6
ALL-4	Primary	54.6± 3.1	102.2± 6.3
	Secondary	28	71
ALL-6	Primary	119	136.0± 9.9
	Secondary	44.8± 6.3	65
ALL-7	Primary	21	27
	Secondary	14	19.88± 2.30

2.8 细胞遗传稳定性的鉴定

为确定经连续异种移植后白血病细胞遗传稳定性,将白血病细胞连续异种移植 3 代,检测带有特征性细胞遗传学异常的 SIL/TAL1⁺⁺ T 细胞白血病细胞。RT-PCR 方法测出第 1、2、3 代异种移植后均带有 SIL/TAL1⁺ 融合基因,与原发患者白血病细胞一致。

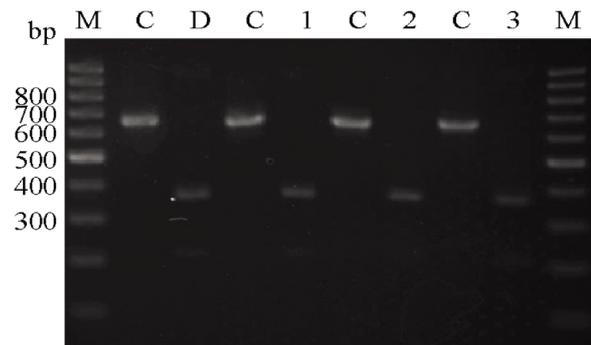


图 6 RT-PCR 方法测出第 1、2、3 代异种移植后 SIL/TAL1⁺ 融合基因产物

Fig. 6 Products of SIL/TAL1⁺ fusion gene of 1st, 2nd, 3rd generation leukemia cells after xenograft in NOD/SCID mice

注: M: marker; C: 内对照; D: 原代白血病细胞产物; lane 1: 第一代产物; lane 2: 第二代产物; lane 3: 第三代产物。

Note: M: marker; C: Internal control; D: Products of primary leukemia cells; Lane 1: Products of 1st generation leukemia cells; Lane 2: Products of 2nd generation leukemia cells; Lane 3: Products of 3rd generation leukemia cells.

2.9 SIL/TAL1+ 和 SIL/TAL1- 急性淋巴细胞白血病细胞异种移植潜伏期及外周血 hCD45+ 细胞百分比的比较

从图 7 可以看出 SIL/TAL1+ 白血病细胞较 SIL/TAL1- 白血病细胞异种移植植入时间显著缩短, NOD/SCID 小鼠起病在 SIL/TAL1+ 白血病细胞后为 15 天, 而植入 SIL/TAL1- 白血病细胞在 27-42 天起病两组之间有显著差异性 ($P < 0.001$)。显示 SIL/TAL1+ 白血病细胞具有更强的侵袭性及增殖活性。

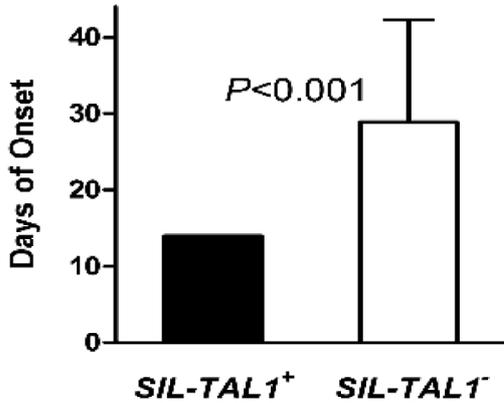


图 7 SIL/TAL1+ 和 SIL/TAL1- T-ALL 异种移植成瘤潜伏期比较
Fig. 7 Comparison of incubation period between SIL/TAL1+ and SIL/TAL1- T-ALL cells

2.10 不同药物对 SIL/TAL1+ NOD/SCID 小鼠外周血 hCD45+ 细胞比例的影响

从图 8 看出地塞米松组小鼠较长春新碱组小鼠外周血具有更多 hCD45+ 细胞, 而对照组最高。未经处理小鼠外周血 hCD45+ 细胞增殖最快, 地塞米松组上升与其类似, 显示地塞米松对 hCD45+ 细胞增殖影响较小。

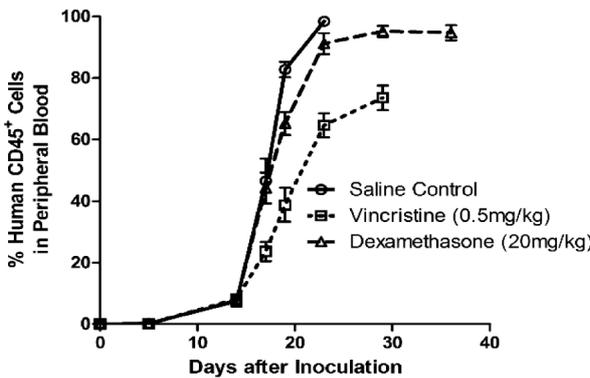


图 8 长春新碱、地塞米松处理后 NOD/SCID 小鼠外周血人 CD45+ 细胞比例的变化
Fig. 8 Percentage of human CD45+ cells in peripheral blood in NOD/SCID mice after treated with vincristin, dexamethasone

2.11 不同药物处理后对 SIL/TAL1+NOD/SCID 小鼠生存期的影响

采用长春新碱和地塞米松处理 SIL/TAL1+NOD/SCID 小鼠, 与对照组进行比较, 可以看出地塞米松组生存期最长, 长春新碱组次之, 对照组生存期最短。各组间生存曲线差异明显 ($P < 0.05$)。

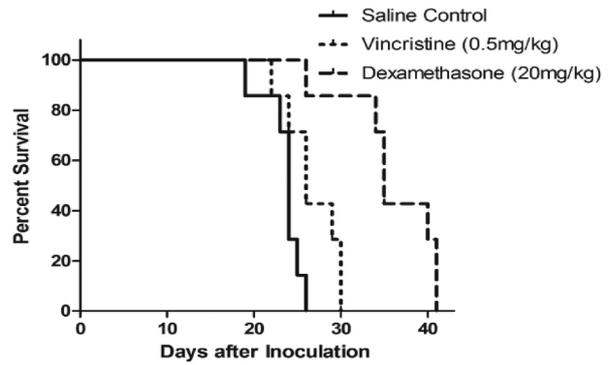


图 9 采用长春新碱、地塞米松和生理盐水(对照组)处理 SIL/TAL1+NOD/SCID 小鼠生存期的比较

Fig. 9 Comparison of survival duration of SIL/TAL1+ NOD/SCID mice between vincristin group, dexamethasone group and control group

2.12 地塞米松处理 SIL/TAL1+ 和 SIL/TAL1- 急性淋巴细胞白血病细胞异种移植后, NOD/SCID 小鼠外周血 hCD45+ 细胞比例的影响

采用地塞米松或长春新碱处理 SIL/TAL1+NOD/SCID 小鼠和 SIL/TAL1-NOD/SCID 小鼠后, 小鼠外周血 hCD45+ 细胞比例在 SIL/TAL1+ 组中比例较 SIL/TAL1- 组显著增高, 两者之间有显著差异性 ($P < 0.001$), 显示 SIL/TAL1+ 白血病细胞具有更强的增殖活性及对药物的抵抗作用。

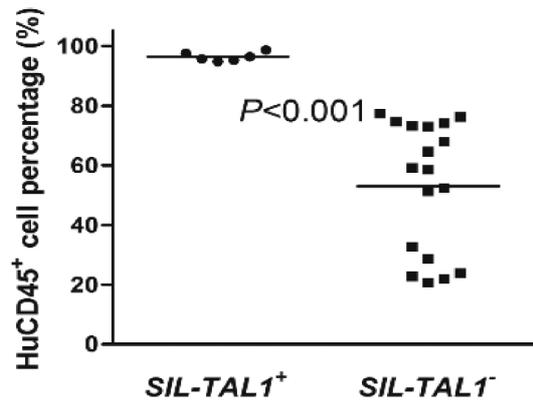


图 10 采用长春新碱、地塞米松处理后外周血人 CD45+ 细胞比例的比较

Fig. 10 Comparison of percentage of hCD45+ cells in peripheral blood in NOD/SCID mice treated with vincristin or dexamethasone

3 讨论

本研究中, 我们采用经尾静脉注射 T-ALL 细胞成功的在 NOD/SCID 小鼠身上建立 5 例异种 T-ALL 模型。其中 4 例白血病细胞取自 T-ALL 患者, 1 例为 T-ALL 细胞系 MOLT-4, 成功建立模型后给予药物来评价疗效。移植后 NOD/SCID 小鼠的反应与临床患者表现一致。我们的异种移植模型保留了供者白血病表型和植入能力, 为研究 T-ALL 提供了一极佳的平台。

到目前为止, 有三种不同的实验方法最常用于研究急性白血病。包括逆转录病毒、转基因以及异种移植模型。逆转录病毒转导和移植模型产生异位表达的目的基因, 通常为原癌融合基因, 在小鼠身上形成白血病^[11, 12]。通过简单逆转录病毒构建, 该

系统能同时测试不同的多个目的基因^[13]。然而,从逆转录病毒载体插入突变源和潜在促进子,引起白血病的发生机制有所不同。

转基因小鼠模型在胚胎干细胞中通过同源染色体重组采用突变的外源性 cDNA 直接靶向预先确定的位点^[14,15]。这样小鼠经过修饰的基因组具有遗传性,而且对研究白血病转化的最早期事件具有一定价值,以及通过杂交技术了解目的基因和其他基因之间相互作用。然而,小鼠基因组与人类基因组有较大差异,并非所有转基因小鼠最终表现原发疾病的模式,此实验繁杂且耗时较长^[16,17]。例如,TAL1 断裂的小鼠不能发展白血病,除非与 LMO1 小鼠杂交后产生共同突变后代,后代出现白血病发病^[18]。对于异种移植模型,一显著优势就是能直接从患者身上取出原发白血病细胞研究,供者的特征均被保留,从而有可能阐释原发疾病的病理生理特性^[19,20]。而且,当采用不同的治疗方案时,异种移植同一移植物能在最短时间内提供有价值的预后信息^[21]。考虑到这些优势,在目前实验中,我们采用 NOD/SCID 小鼠异种移植模型。

由于 NOD/SCID 小鼠仍保留一些残留固有免疫功能,包括减少的但仍可检测到一定水平的 NK 细胞的细胞毒活性。对此需进行预处理来清除针对异种移植物的免疫反应^[18,22]。抗鼠 CD-122 单克隆抗体(Anti-mCD122 mAb)是一针对 IL-2 受体 β 链的抗体,用于小鼠免疫抑制^[23]。此制剂清除 NK 细胞的细胞毒活性^[24]。宿主 CD122+ 细胞系介导 NOD/SCID 抵抗小鼠排斥移植物的主要成分^[25]。McKenzie 等证实采用抗鼠 CD-122 单克隆抗体处理 NOD/SCID 小鼠后,移植物植活水平高于未处理者^[26]。该结果显示针对性清除受者小鼠 CD122+ 细胞有利于植入。然而,9 例患者中仅有 4 例成功植入。有趣的是,无论是高细胞计数或特殊不良预后基因改变如 MLL 易位,尽管被认为高危及肿瘤侵袭性更高,均不能保证成功植入。这显示我们采用的 NOD/SCID 小鼠异种移植模型系统某种程度的局限性。

NOD/SCID 小鼠异种移植模型系统主要劣势在于对于供者的高度依赖。此模型仅能用于评估某一特殊疾病样本。从临床类似患者取得的细胞可能产生完全不同的移植模型^[27]。另一不足是并非所有白血病均能成功植活。Ailles 等报告仅有 70% AML 样本能在 NOD/SCID 小鼠植活^[19]。某些研究报告侵袭性较强的白血病具有更高的异种植活的潜能^[28,29]。但在我们的研究中,情况并非如此,至少在 T-ALL 患者中。免疫系统残留成分以及人鼠微环境的差异可能导致此种情况。最近提出了最新异种移植方案,增加异种移植潜能,包括接种路径的改变、人细胞因子应用以及对受者采用更强的免疫抑制剂^[29,31],这些方法应当在我们未来的研究中使用。

另外,从 T-ALL 患者中分离的单个核细胞包含有功能性正常 T 细胞,移植物抗宿主病(GVHD)应当被考虑。NOD/SCID 小鼠模型免疫缺陷使其极易遭受移植物抗宿主病影响。因此我们从两方面着手最大程度减少移植物抗宿主病起病的可能性。首先,我们使用骨髓而非外周血作为移植物来源,骨髓较外周血具有更多的瘤负荷及更低的淋巴细胞比例。第二,我们将接种的细胞数量限制在每只鼠 1.0×10^7 个细胞,由此减少功能性正常 T 细胞绝对数量。通过上述努力,我们没有观察到接种小鼠早期死亡,提示患者骨髓采集物没有足够数量正常 T 细胞而

产生移植物抗宿主病。

总之,通过异种移植,我们成功的在经抗抗鼠 CD-122 单克隆抗体预处理的 NOD/SCID 小鼠身上建立 5 例 T-ALL 模型。这些模型具有 T-ALL 的特征,在系列移植后保持稳定。对将来 T-ALL 疾病发生的研究和评估各种治疗方案提供了一个基础平台。

关于小鼠模型,我们从一例 7 岁男孩患者取得的标本,该患者表现为外周血原始细胞迅速增殖,明显的多器官浸润,以及较短的生存期,移植成功建立异种移植模型同样显示 SIL-TAL1+ T-ALL 高度增殖性及侵袭性。糖皮质激素长期用于治疗 ALL,而糖皮质激素抵抗是儿童 ALL 一预后不良指标^[29,30]。在我们的体内药物治疗中,地塞米松几乎不能延迟移植物的进展。从 ALL-BFM95 试验的资料的结论认为对强的松耐药的儿童 T-ALL 预后较差^[31],从这点可以看出此男孩预后不佳。通过此 T-ALL 异种移植小鼠模型另一发现是 T-ALL 白血病细胞小鼠不能通过长春新碱改善预后。尽管长春新碱抑制肿瘤生长,但使用长春新碱后小鼠很快死亡。与临床观察到的 TLS 和 DIC 表现类似。这表明 SIL-TAL1+ T-ALL 具有发生 TLS 和 DIC 的倾向。地塞米松组具有较长的生存期可能是地塞米松对内皮细胞具有拮抗白细胞瘀滞的保护作用。

基于我们对临床表现的观察和小鼠模型的建立,我们认为 SIL-TAL1+ ALL 系一独特的 ALL 亚型,表现为高白细胞计数、有皮质 T 免疫表型。而且,SIL-TAL1+ ALL 倾向并发 TLS 和 DIC,预后极差。这些发现有助于我们针对个体 T-ALL 患者采用基于危险分层的个体化治疗措施和更加注意并发症的积极处理。

参 考 文 献(References)

- [1] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control[J]. Nat Med, 2004, 10(8): 789-799
- [2] Tremblay CS, Curtis DJ. The clonal evolution of leukemic stem cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Curr Opin Hematol, 2014, 21(4): 320-325
- [3] Ribera JM, Ribera J, Genesca E. Treatment of adolescent and young adults with acute lymphoblastic leukemia [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2014, 6(1): e2014052
- [4] Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis [J]. J Mol Med (Berl), 1997, 75(9): 664-673
- [5] Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(2):118-130
- [6] Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, et al. Efficient engraftment of human iPSC cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene [J]. Cell Transplant, 2014. [Epub ahead of print]
- [7] Trivai I, Ziegler M, Bergholz U, et al. Endogenous retrovirus induces leukemia in a xenograft mouse model for primary myelofibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(23): 8595-8600
- [8] Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice[J].

- J Immunol, 1995, 154(1):180-191
- [9] Kong Y, Liu YR, Liu KY, et al. Establishment of human acute B-lymphoblastic leukemia NOD/SCID/IL2 receptor γ chain (null) neonatal mouse xenotransplant model [J]. Journal of Experimental Hematology, 2012, 20(3): 762-768
- [10] Cox CV, Evely RS, Oakhill A, et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells [J]. Blood, 2004, 104(9): 2919-2925
- [11] Xu SM, Yang Y, Zhou M, et al. Establishment of the retrovirus-mediated murine model with MLL-AF9 leukemia [J]. Journal of Experimental Hematology, 2013, 21(5): 1126-1132
- [12] de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, et al. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(15): 5506-5517
- [13] Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, et al. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity[J]. J Exp Med, 1999, 189(9):1399-1412
- [14] Kamezaki K, Luchsinger LL, Snoeck HW. Differential requirement for wild-type Flt3 in leukemia initiation among mouse models of human leukemia[J]. Exp Hematol, 2014, 42(3): 192-203
- [15] Yu Y, Bradley A. Engineering chromosomal rearrangements in mice [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 780-790
- [16] Onnebo SM, Rasighaemi P, Kumar J, et al. Alternative TEL-JAK2 fusions associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia and atypical chronic myelogenous leukemia dissected in zebrafish [J]. Haematologica, 2012, 97(12): 1895-1903
- [17] Sarsero JP, Holloway TP, Li L, et al. Rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice containing an FXN-EGFP genomic reporter[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e93307
- [18] Tremblay M, Tremblay CS, Herblot S, et al. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes[J]. Genes Dev, 2010, 24(11): 1093-1105
- [19] Ailles LE, Gerhard B, Kawagoe H, et al. Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice[J]. Blood, 1999, 94(5): 1761-1772
- [20] Lumkul R, Gorin NC, Malehorn MT, et al. Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression [J]. Leukemia, 2002, 16(9): 1818-1826
- [21] Plasivola M, Zivny J, Jelinek J, et al. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors [J]. Leukemia, 2002, 16(1): 67-73
- [22] Shultz LD, Lang PA, Christianson SW, et al. NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells [J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2496-2507
- [23] Tanaka T, Tsudo M, Karasuyama H, et al. A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells [J]. J Immunol, 1991, 147(7): 2222-2228
- [24] Scheuplein F, Thariath A, Macdonald S, et al. A humanized monoclonal antibody specific for invariant Natural Killer T (iNKT) cells for in vivo depletion[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e76692
- [25] Miller PH, Cheung AM, Beer PA, et al. Enhanced normal short-term human myelopoiesis in mice engineered to express human-specific myeloid growth factors[J]. Blood, 2013, 121(5): e1-4
- [26] McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, et al. Human short-term repopulating stem cells are efficiently detected following intrafemoral transplantation into NOD/SCID recipients depleted of CD122+ cells [J]. Blood, 2005, 106(4): 1259-1261
- [27] Qiu S, Jia Y, Xing H, et al. N-Cadherin and Tie2 positive CD34⁺CD38⁻CD123⁺ leukemic stem cell populations can develop acute myeloid leukemia more effectively in NOD/SCID mice[J]. Leuk Res, 2014, 38(5): 632-637
- [28] Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML [J]. Blood, 2006, 107(3): 1166-1173
- [29] Fan X, Gay FP, Lim FW, et al. Low dose insulin like growth factor binding proteins 1 and 2 and angiotensin like protein 3 coordinately stimulate ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells as assayed in NOD/SCID gamma null mice [J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(3): 71
- [30] Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE. Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model[J]. Leukemia, 2000, 14(5): 889-897
- [31] Nitsche A, Junghahn I, Thulke S, et al. Interleukin-3 Promotes Proliferation and Differentiation of Human Hematopoietic Stem Cells but Reduces Their Repopulation Potential in NOD/SCID Mice [J]. STEM CELLS, 2003, 2(21): 236-244