

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.009

免疫重建荷人膀胱癌-SCID 鼠模型的建立*

吴建红 张 飞 赵 炜 张 琦 刘海涛[△] 夏术阶

(上海市第一人民医院泌尿外科 上海 200060)

摘要 目的: 探讨建立稳定的荷人膀胱癌 SCID 鼠人化复合模型的方法, 为在人免疫重建荷人膀胱肿瘤 SCID 鼠模型检测重组 BCG 的免疫刺激和免疫保护中打下基础。**方法:** 经 SCID 鼠腹腔内注射人 PBL、皮下接种 RT4 膀胱癌细胞, 于接种后 4 周检测 SCID 鼠体内人免疫细胞水平(IgG 和 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ T 细胞)及脾脏重量, 观察皮下成瘤潜伏期及成瘤率。**结果:** 模型组 100% 成瘤, 病理类型为移行细胞癌; 检测 SCID 鼠血中人 IgG 均一定水平存在, 与对照组间差异有统计学意义($P < 0.01$); 人 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ T 细胞在鼠血及脾中均有表达, 而对照组均未检出($P < 0.05$); 4 周鼠脾重平均(178.9 ± 45.2)mg。较对照组(40.6 ± 14.8)mg 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:** 采用腹腔注射人 PBL、皮下接种 RT4 膀胱癌细胞的方法可以有效地建立人化荷人膀胱癌 SCID 鼠模型, 较好地模拟人浸润性膀胱癌体内生物学特性, 是膀胱癌免疫基因治疗的较理想模型。

关键词: 膀胱癌; SCID 鼠; 动物模型; 免疫重建

中图分类号: Q95-3, Q737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)06-1033-03

Establishment and Identification of HU-PBL-SCID Mice Model of Human Bladder Cancer Model*

WU Jian-hong, ZHANG Fei, ZHAO Wei, ZHANG Qi, LIU Hai-tao[△], XIA Shu-jie

(Department Of Urology, Shanghai First Hospital, Shanghai, 200060, China)

ABSTRACT Objective: To establish a human bladder cancer model in Hu-PBL-SCID mice. **Methods:** The immunological features of mice were evaluated after intra-peritoneal injection of hu-PBL and subcutaneous implantation of human RT4 cells. **Results:** 16 mice had pathologically transitional cell carcinoma tumor in group one. The level of the human IN. Was gradually elevated in all the humanized mice following the time of PBL transplantation prolonging until 4th week on, and was significantly higher than that in control mice ($P < 0.01$). The different level of human CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺ T cells among two groups was statistically significant ($P < 0.05$). Furthermore, human CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺ T cells in mice blood and spleen cells could be still detected at 4th week. The weight of spleen was averagely (178.9 ± 45.2) mg in group one at 4th week, and had statistical significance compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Humanized SCID mice model can be successfully established via intraperitoneally human peripheral blood cells into SCID mice. The model simulated the real biological behavior of human bladder invasive carcinoma very well.

Key words: Bladder tumor; SCID mouse; Animal model; Immune reconstruction

Chinese Library Classification: Q95-3, Q737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1033-03

前言

膀胱肿瘤是我国泌尿男生殖系统最常见的肿瘤, 其中 80% 以上为浅表性肿瘤, 以多发和易复发为其主要特征, 且肿瘤在不断的复发中日趋进展, 目前应用于临床的综合治疗方法疗效不甚满意, 越来越多的学者寄希望于生物疗法等辅助治疗方法的应用以取得更好的疗效^[1-3]。BCG 膀胱灌注已被公认为是浅表性膀胱肿瘤最有效的辅助治疗之一, 但一直面临着患者对 BCG 免疫反应弱和 BCG 毒副作用大的难题, 这极大地限制了 BCG 在临床的广泛应用。因此, 改造 BCG 以提高其防治膀胱肿瘤的疗效, 同时减少其毒、副作用是目前膀胱肿瘤免疫治疗的热点问题。膀胱癌独特的病因为其生物治疗尤其是免疫治疗取得成功奠定了坚实的基础。建立能很好模拟人膀胱癌的动物

模型对于免疫治疗的实验研究具有重要意义。本研究利用严重联合免疫缺陷(SCID)鼠进行人免疫功能重建并进行人膀胱癌 RT4 细胞皮下移植, 建立人免疫重建荷人 RT4 膀胱癌 SCID 鼠模型并研究其免疫学特性, 为膀胱癌免疫基因治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** SPF 级 CB17SCID 纯系小鼠, 雌性, 8~10 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.2 **肿瘤细胞系** 人膀胱癌细胞系 RT4 为我医院实验室长期冻存; 人外周血淋巴细胞 (PBL): 来源于健康女性志愿者的外周静脉血, 由上海市第一人民医院血库提供。

* 基金项目: 上海市医学领先专业重点学科建设基金(061125)

作者简介: 吴建红(1986-), 男, 硕士, 医师, 主要研究方向: 膀胱疾病及男科学, 电话: 021-63240090/3161, E-mail: wujianhong86@gmail.com

[△] 通讯作者: 刘海涛, E-mail: doctorlht69@163.com

(收稿日期: 2013-06-28 接受日期: 2013-07-24)

1.1.3 试剂及仪器 RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,淋巴细胞分离液购自上海索莱宝生物有限公司,鼠抗人单克隆抗体 CD3-CY、CD4-FITC、CD8-PE 购自美国 BD 公司,流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RT4 细胞培养于 RPMI-1640 完全培养基(10% 胎牛血清),存放在 37℃、5% CO₂ 孵箱中,常规传代培养。

1.2.2 分离人外周血淋巴细胞(hu-PBL) 按常规方法利用淋巴细胞分离液分离 hu-PBL,PBS 液使细胞悬浮后计数,根据计数结果调整细胞浓度至 8×10^7 cells/mL。

1.2.3 动物分组、肿瘤移植及免疫重建 全部动物均于实验前 1 天进行 NK 细胞封闭,用 ELISA 方法测定鼠 IgG<5 ug/mL,排除免疫渗漏,合格 SCID 鼠共 24 只,将鼠用随机表法分为 2 组,每组 12 只。第 1 组,空白组:磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 mL;第 2 组,荷 RT4 人化组:PBL 细胞 4×10^7 个/只,24 h 后注射 RT4 细胞 1×10^7 个/只。所有的细胞均悬浮在 PBS 0.5 mL 中,于 SCID 鼠左侧腋下皮下注射 RT4 细胞,腹腔注射 PBL 细胞。

1.2.4 各组荷瘤 SCID 鼠的生物学、免疫学特性观察 (1)生物学特性:观察各组小鼠荷瘤后的活动力、反应、饮食、体重、毛色、毛顺滑度及背部和腹部瘤组织的生长情况。4W 后摘除眼球放血处死小鼠。大体检查:解剖处死后的 SCID 鼠,肉眼观察移植瘤生长情况:形态、大小、质地、活动度及是否有远处转移、腹水生成等。

组织学检查:制备移植瘤及各脏器切片行 HE 染色,在光镜下行组织学检查。

(2)免疫学特性:脾脏及外周血 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ 细胞比例及终末血人 IgG 测定:荷瘤 4 周后处死 SCID 鼠,摘眼球取血分装于 EDTA 抗凝管 0.2 mL 及非抗凝管 0.2 mL,脾脏及外周血 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ 细胞比例及终末血测量人 IgG 的含量。脾脏称重:处死后解剖各组小鼠并取脾称重。取肿瘤组织行 HE 染色,镜下观察淋巴细胞对肿瘤组织浸润情况。移植瘤抗宿主

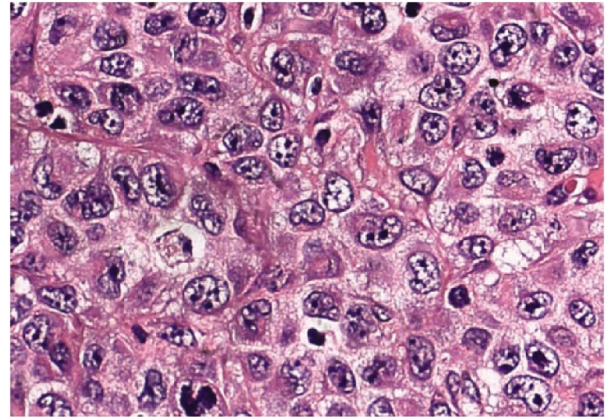


图 1 荷瘤 SCID 鼠移植瘤 HE 染色结果(× 400 倍)

Fig.1 The HE staining results of transplanted tumor in SCID mice(× 400)

疾病(GvHD)情况:对主要脏器如肝脏、结肠等行 HE 染色,依参照文献的相关标准诊断 GvHD^[4]。

1.3 统计学处理

实验数据由 $\bar{x} \pm s$ 表示,由 SPSS12.0 统计软件包,采用 t 检验,以 P<0.05 为有差异性。

2 结果

2.1 荷瘤 SCID 鼠成瘤情况及组织学特征

各组荷瘤鼠肿瘤 100%成瘤,于 3~5 d 内形成。移植瘤呈椭圆形,灰白色,质硬,有部分坏死,完整包膜大都完整,瘤体富含血管,长直径约 1~1.5 cm。腹腔及各脏器均未发现转移灶。镜下表现呈移行细胞癌征象,部分浸润程度及细胞异型性较高(图 1)。空白组小鼠都未见肿瘤征象。

2.2 荷瘤 SCID 鼠免疫学特征

2.2.1 小鼠血浆中人 IgG 水平测定(表 1) 实验中人化组小鼠均检测到人 IgG 的存在,最高可达 2603 μg/mL,与对照组比较 P<0.05。

表 1 SCID 鼠血浆中人 IgG 水平(μg/mL)与脾重(mg)

Table 1 The IgG level and spleen weight in SCID mice

Group	IgG level(μg/mL)	Spleen weight (mg)
Model	2603.16± 54.65*	178.9± 45.2*
Control	0.19± 0.15	40.6± 14.8

注:* 与对照组比,P<0.01。

Note: *with the control, P<0.01.

2.2.2 脾重 脾重随人化时间延长逐渐加重,4 周达 (178.9± 45.2) mg. 较对照组(40.6± 14.8) mg 增加显著(P<0.01)。

2.2.3 免疫重建后 SCID 鼠人源性细胞检测(表 2) 在模型组

鼠外周血和脾中人 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺T 细胞均有不同程度表达,而对照组未有表达,与对照组间,各表型 T 细胞水平差异均有统计学意义(P<0.05)。

表 2 SCID 鼠体内人 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺T 细胞的阳性表达率(%)

Table 2 The percent of CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺T positive cell in SCID mice

Group	CD ³⁺	CD ⁴⁺	CD ⁸⁺
Blood	4.23± 1.14	3.56± 1.29	2.14± 0.77
Spleen	4.67± 0.61	3.78± 1.58	2.67± 1.23

2.2.4 荷瘤小鼠移植瘤抗宿主病 (GVHD) 情况 所有移植组 SCID 小鼠, 未有皮毛干燥紊乱、腹泻及肛周污渍、弓背体位等表现; 无明显体重改变; 主要脏器, 包括肝脏、结肠、肾脏等均无明显 GVHD 表现。

3 讨论

膀胱肿瘤是我国泌尿男生殖系统最常见的肿瘤, 其中 80% 以上为浅表性肿瘤, 以多发和易复发为其主要特征, 且肿瘤在不断的复发中日趋进展。浅表性膀胱肿瘤的治疗手段包括以经尿道膀胱肿瘤切除 (transurethral resection of bladder tumor, TURBT) 为主的手术治疗和术后的膀胱灌注治疗等。尽管多种化学药物如丝裂霉素、表阿霉素、吡柔比星等和新型抗膀胱肿瘤疫苗相继应用于膀胱肿瘤的灌注治疗, 但国内外大量临床资料已经证明, 卡介苗 (bacillus calmette-tuerin, BCG) 是目前防治浅表性膀胱肿瘤最有效的免疫制剂, 其在减少肿瘤复发数目、降低复发频率以及预防低分化膀胱肿瘤进展三个方面, 均优于传统的化疗药物^[5,6]。

BCG 膀胱灌注已被公认为是浅表性膀胱肿瘤最有效的辅助治疗之一, 但一直面临着患者对 BCG 免疫反应弱^[7]和 BCG 毒副作用大^[8]的难题, 这极大地限制了 BCG 在临床的广泛应用。因此, 改造 BCG 以提高其防治膀胱肿瘤的疗效, 同时减少其毒、副作用是目前膀胱肿瘤免疫治疗的热点问题。

目前国内外在重组 BCG 的疫苗研究中, 大多利用小鼠肿瘤细胞接种于正常小鼠建立膀胱肿瘤模型, 尽管肿瘤细胞与小鼠具有同源性不用考虑免疫排斥反应, 然而这一模型模拟的仅是小鼠体内的免疫功能, 因而不能准确地表达人膀胱肿瘤的生物学特征。另外, 国内外也有应用人膀胱肿瘤异种移植裸鼠肿瘤模型的, 这类模型虽能使膀胱肿瘤获得较高的移植成功率, 但是与人类自发膀胱肿瘤的生物学特征尚有较大差距。尽管分泌人细胞因子的重组 BCG 在小鼠体内显示出强大的免疫原性及抗癌活性, 但这些实验模型不能完全模拟重组 BCG 对正常人和膀胱肿瘤患者免疫系统的影响, 因而临床指导价值受到限制。如何选择合理的临床前动物模型, 以评估重组 BCG 对正常人和膀胱肿瘤患者免疫功能的影响, 是重组 BCG 走向临床应用过程中亟待解决的问题。

膀胱肿瘤动物模型分为诱发模型、移植模型。而诱发模型的肿瘤与人类肿瘤存在一定差异, 故人裸鼠移植模型的应用更为常见。但裸鼠先天胸腺缺陷, 没有抗肿瘤免疫系统, 不具备模拟人类体内真实内环境的能力, 因而很少应用于免疫治疗研究。

由 Bosma 等首先报道的 SCID 鼠是一种严重联合免疫缺陷小鼠, 系 CB-17 纯系小鼠第 16 号常染色体上近着丝点端发生 SCID 隐性基因突变而来。这个突变引起免疫球蛋白基因、T 细胞受体基因的重组障碍, 导致了成熟的功能性 T、B 细胞的匮乏。SCID 鼠体内无 T 和 B 淋巴细胞, 细胞免疫和体液免疫均有严重缺陷^[9], 与单纯 T 淋巴细胞缺乏的裸小鼠相比, 构建人肿瘤模型的成功率更高, 在肿瘤转移方面也具有一定优势, 成为异种移植的良好活体承载系统。

T、B 淋巴细胞严重联合缺陷的 SCID 鼠同时存在细胞免疫和体液免疫的缺陷, 而且 SCID 鼠可用人类免疫细胞(如胎肝

细胞、人骨髓细胞、脾细胞、人外周血淋巴细胞) 移植重建人免疫功能, 再移植人肿瘤细胞, 从而可建立人免疫系统-人肿瘤的嵌合模型^[9]。因此 SCID 鼠被研究者^[10]作为肿瘤及免疫功能重建的理想动物模型, 并已成为研究肿瘤学、免疫学、病毒学及寄生虫学等方面的重要工具。国内外学者已将 SCID 鼠作为研究人宫颈癌、卵巢癌的动物模型并已做出一些有意义的成果。

目前免疫重建的方式很多, 主要包括取人类胎儿的胸腺、胎肝、胎骨甚至成人的外周血造血干细胞、外周血淋巴细胞 (PBL) 移植以重建免疫系统^[12-14], 静脉与腹腔注射为免疫重建的两种途径。近年来发展起来的在 SCID 鼠体内植入人淋巴细胞是一种能成功重建人体免疫系统的新型动物模型^[15]。结果显示, 人免疫细胞可在 SCID 小鼠体内生存 3 个月, 并维持其生物学特性, 发挥免疫功能^[16,17]。我们建立的 SCID 鼠模型与免疫重建荷人膀胱癌 RT4 SCID 鼠模型, 实验中所有的人化组小鼠血浆中均有人 IgG 存在, 且随着时间的推移有明显的上升趋势, 表明免疫系统已成功建立。本实验中所有荷瘤组中肿瘤移植成功率及 PBL 免疫重建率均较高。免疫重建后所有人化组小鼠血浆中人 IgG 水平升高, 而荷 RT4 人化组显著高于单纯人化组。

本实验结果提示经免疫重建后的荷人膀胱癌 SCID 鼠机体内的免疫系统对肿瘤组织的生长有一定的抑制作用, 其原理可能是多种调控途径诱导肿瘤细胞凋亡。这是单纯荷人膀胱癌 SCID 鼠模型不具有的生物学特性。此次成功构建的人免疫重建荷人膀胱癌 SCID 鼠模型检测重组 BCG 的免疫刺激和免疫保护中奠定了基础, 为重组 BCG 疫苗应用于人膀胱肿瘤防治提供临床实验依据。

参考文献 (References)

- [1] Racioppi M, Cappa E, D'Agostino D, et al. Size of Bladder Cancers: Correlation among Different Types of Measurement [J]. Urol Int, 2012, 90: 191-194
- [2] Cosentino M, Palou J, Gaya JM, et al. Upper urinary tract urothelial cell carcinoma: location as a predictive factor for concomitant bladder carcinoma[J]. World J Urol, 2012, 31: 141-14
- [3] Cordier J, Sonpavde G, Stief CG, et al. Oncologic outcomes obtained after neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for the treatment of urothelial carcinomas of the upper urinary tract: a review [J]. World J Urol, 2012, 31: 77-82
- [4] Williamson LM, Warwick RM. Transfusion-associated graft-versus-host disease and its prevention[J]. Blood Rev, 1995, 9: 251-261
- [5] Catto JW. Thirty-five years of intravesical bacillus Calmette-Guerin for bladder cancer: where now[J]. Eur Urol, 2011, 60: 37-38
- [6] Cai T, Malossini G. Bladder cancer and BCG response prediction: what we must know[J]. Cancer, 2011, 117: 872
- [7] Xiao Z, Hanel E, Mak A, et al. Antitumor Efficacy of Intravesical BCG, Gemcitabine, Interferon-alpha and Interleukin-2 as Mono- or Combination-Therapy for Bladder Cancer in an Orthotopic Tumor Model[J]. Clin Med Insights Oncol, 2011, 5: 315-323
- [8] Kanamori H, Isogami K, Hatakeyama T, et al. Chest wall abscess due to Mycobacterium bovis BCG after intravesical BCG therapy [J]. J Clin Microbiol, 2011, 50: 533-535

- Cells Tissues Organs, 2003, 174(3): 101-109
- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228
- [7] Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26(6): 664-675
- [8] Liang L, Ma T, Chen W, et al. Therapeutic potential and related signal pathway of adipose-derived stem cell transplantation for rat liver injury[J]. Hepatol Res, 2009, 39(8): 822-832
- [9] Wang Y, Lian F, Li J, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats [J]. J Transl Med, 2012, 10: 133
- [10] Guiting Lin, Maurice Garcia, Hongxiu Ning, et al. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(6): 1053-1063
- [11] Kärber G. Contribution to collective treatment of pharmacological serial tests[J]. Arch Exp Pathol Pharmacol, 1931, 162: 480-483
- [12] 陈小伍, 李利红, 朱达坚, 等. 大鼠肝损伤动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(12): 1723-1725
Chen Xiaowu, Li Lihong, Zhu Dajian, et al. Establishment of the surgical hepatic lesions model in rats [J]. Chin J Exp Surg, 2009, 26(12): 1723-1725
- [13] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(12): 2542-2547
- [14] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy [J]. J Atheroscler Thromb, 2006, 13(2): 77-81
- [15] Seo MJ, Suh SY, Bae YC, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(1): 258-264
- [16] Kim SJ, Park KC, Lee JU, et al. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes[J]. J Korean Surg Soc, 2011, 81(3): 176-186
- [17] Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(3): 230-236
- [18] Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Differentiation Potential [J]. Cell Transplant, 2013, 22(4): 701-709
- [19] Shi Z, Neoh KG, Kang ET, et al. Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/term.1496
- [20] Seki T, Yokoyama Y, Nagasaki H, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats [J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 63-70

(上接第 1035 页)

- [9] Chung MA, Luo Y, O'Donnell M, et al. Development and preclinical evaluation of a Bacillus Calmette-Guerin-MUC1-based novel breast cancer vaccine[J]. Cancer Res, 2003, 63: 1280-1287
- [10] Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies [J]. Trends Immunol, 2001, 22: 386-393
- [11] Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. Nature, 1983, 301: 527-530
- [12] Jackson DJ, Elson CJ, Kumpel BM. Reduction of human anti-tetanus toxoid antibody in hu-PBL-SCID mice by immunodominant peptides of tetanus toxoid[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137: 245-252
- [13] Feuerer M, Beckhove P, Bai L, et al. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow[J]. Nat Med, 2001, 7: 452-458
- [14] Hill LL, Perussia B, McCue PA, et al. Effect of human natural killer cells on the metastatic growth of human melanoma xenografts in mice with severe combined immunodeficiency [J]. Cancer Res, 1994, 54: 763-770
- [15] Gao H, Bian A, Zheng Y, et al. sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against BAFF[J]. FEBS Lett, 2007, 581: 581-586
- [16] Waldron-Lynch F, Deng S, Preston-Hurlburt P, et al. Analysis of human biologics with a mouse skin transplant model in humanized mice[J]. Am J Transplant, 2012, 12: 2652-2662
- [17] Mas A, Cervello I, Gil-Sanchis C, et al. Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells[J]. Fertil Steril, 2012, 98: 741-751