

细胞悬液注射法与组织块移植法建立骨肉瘤动物模型比较

刘振峰,任晓强,艾力江·阿斯拉,方锐,高振,孟庆才

新疆医科大学附属中医医院,乌鲁木齐 830000

摘要 为建立裸鼠胫骨原位骨肉瘤模型,并比较分析 MG-63 细胞悬液局部注射以及肿瘤组织块移植两种方法的成瘤特性,在注射组体内连续传代筛选 MG-63 细胞系获得高成瘤率的细胞,将 MG-63 细胞悬液(25 μ L,约 1×10^5 个)注射于裸鼠胫骨上段髓腔内;组织块移植组将 MG-63 细胞皮下成瘤组织块接种于裸鼠胫骨上段髓腔内。随后观察两种方法建立的胫骨骨肉瘤原位模型不同的成瘤特性,并采用影像学等手段比较两种方法的成瘤率和成瘤特点。结果表明,术后 3 周左右可见局部肿瘤形成,4 周后通过小动物 X 线技术可见胫骨中上段溶骨与肿瘤样骨形成,同时在光学显微镜下可见典型的骨肉瘤病理特征。细胞悬液法成瘤率 85%,组织块法成瘤率 95%,两种方法成瘤率的差异有统计学意义($P<0.05$),模型组血清碱性磷酸酶(ALP)明显高于对照组($P<0.01$)。两种方法均可形成裸鼠胫骨原位骨肉瘤模型,采用组织块移植法成瘤率较高,瘤体生长速度较快,而且对骨皮质及周围软组织的破坏力较强,转移率高。

关键词 骨肉瘤;原位模型;裸鼠

中图分类号 R684

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.16.014

Comparison Between Cell Suspension Shots and Tissue Mass Transfer in Osteosarcoma Animal Model Establishment

LIU Zhenfeng, REN Xiaoqiang, ASILA Ailijiang, FANG Rui, GAO Zhen, MENG Qingcai

Traditional Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract To establish an osteosarcoma model of the nude mouse osteosarcoma, and to compare the cell suspension shots and the tissue mass transfer of the two methods with respect to the tumor characteristics, the culture is continuously transferred into an injection group body and the MG-63 is screened to obtain the Du145 cell line with a top rate of tumor cells. The MG-63 cell suspension (25 μ L, about 1×10^5) is injected into the nude mouse tibial cavity; The organization block transplantation group will transplant the MG-63 cells into the subcutaneous tumor with the tumor tissue mass vaccination in the nude mouse tibial top. Then the two methods will be compared in the tibia bone sarcoma in the situ model with respect to the tumor characteristics, and the imaging methods are used to compare the tumor rate and the tumor characteristics. Postoperative has revealed after 2—3 weeks the visible local tumor formation, after 4 weeks in the X-ray film the visible tibia of soluble tumor samples of bone formation above the average period, and at the same time in the lens the typical osteosarcoma pathological features. With the cell suspension method, the tumor rate is 85%, with the organization block method, the tumor rate is 95%, and their difference is significant($P<0.05$). The serum alkaline phosphatase of the model group is obviously higher than that of the blank control group($P<0.01$). With both methods, the nude mouse tibia can be formed in the in-situ osteosarcoma model, but with the method of organization block transplant, the tumor rate is higher, the tumor growth is faster, and the surrounding soft tissue damage is stronger, closer to human tumors with respect to the transfer characteristics as well.

Keywords osteosarcoma; in situ model; nude mouse

收稿日期:2013-01-09;修回日期:2013-03-13

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211A101)

作者简介:刘振峰,主治医师,研究方向为骨与关节损伤,电子信箱:LLZF8689@163.com;任晓强(通信作者),副主任医师,研究方向为骨与关节损伤以及骨代谢性疾病,电子信箱:liuzhenfengat@163.com

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是一种起源于间叶组织的骨原发性恶性肿瘤,其特征是能产生骨样组织的梭形基质细胞,占原发性恶性肿瘤的 20%,多见于青少年,年发病率约为 (1~3)/100 万人^[1]。该病好发于血运丰富的干骺端,其血行转移发生率高且早、恶性程度大、病情进展迅速。虽然近年来针对骨肉瘤的基础研究与临床治疗取得了较大的成绩,但仍然存在诸多亟待解决的问题。骨肉瘤动物模型的不断完善对进一步研究骨肉瘤的病因、发病机制与治疗手段起着关键的作用。骨肉瘤不同于上皮细胞来源,其细胞起源于间叶组织,从而使骨肉瘤动物模型的构建存在一定困难。本文通过建立裸鼠胫骨原位骨肉瘤模型,比较分析 MG-63 细胞悬液局部注射以及肿瘤组织块移植两种方法的成瘤特性,以期为骨肉瘤相关的基础实验研究以及新的临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞系

采用新疆医科大学实验动物中心提供的 SPF 级 6 周龄裸鼠,体质量 (20±5)g,雌雄各半,随机分为对照组、细胞悬液注射组、组织块移植组,每组 20 只,共 60 只。人成骨肉瘤细胞株 MG-63 由新疆大学移植免疫实验室提供。

1.2 造模方法

MG-63 细胞悬液注射:造模前收集对数生长期 MG-63 细胞,采用台盼兰染色进行细胞计数,活细胞达到 90% 以上

者用于试验。用 PBS 液将准备好的肿瘤细胞洗一遍后,采用细胞计数法制备成浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液备用。碘伏对裸鼠腹部与膝关节局部消毒,盐酸氯胺酮注射液腹腔注射麻醉,每只裸鼠麻醉剂量为 0.02~0.04mL。麻醉成功后将裸鼠膝关节内侧皮肤剪开一长约 0.3~0.5cm 的切口,用 1mL 注射器针头与膝关节面成约 90°角缓慢插入裸鼠胫骨腔内,并吸出少量骨髓液进行减压处理,随后用微量注射器 (50 μL) 将 25 μL MG-63 肿瘤细胞悬液缓慢注入裸鼠胫骨腔内,骨蜡密封针眼防止悬液溢出,皮肤缝合后涂抹金霉素眼膏,放入饲养笼中观察(图 1)。

组织块移植:按照前述方法制备 MG-63 骨肉瘤细胞悬液,每只裸鼠注射量为 0.2mL,注射部位为裸鼠右前肢腋下,2~4 周后待移植瘤增大至 1cm×1cm×1.5cm 时,无菌条件下取无坏死的骨肉瘤组织,剪成大小约 0.2cm×0.2cm×0.2cm 的块体接种于裸鼠右臀部皮下。连续传 3 代,待肿瘤生长稳定后将瘤组织块剪成约 0.1cm×0.1cm×0.1cm 大小的块状备用。将裸鼠常规消毒,在其右侧后肢膝关节前内侧做一切口(长约 0.5cm),充分暴露膝关节,用无菌注射器针头在胫骨平台处向胫骨髓腔方向钻孔,进入髓腔后,选用 1mL 注射器针头扩髓,并抽吸少量的骨髓液以减轻髓腔压力,在局部造成直径约 2.0~2.5mm 的骨缺损,将上述剪碎骨肉瘤组织块(2~3 块/只)植入胫骨髓腔内,骨蜡封闭缺损处,皮肤缝合并用红霉素眼膏涂抹切口预防感染,放入笼中饲养观察。

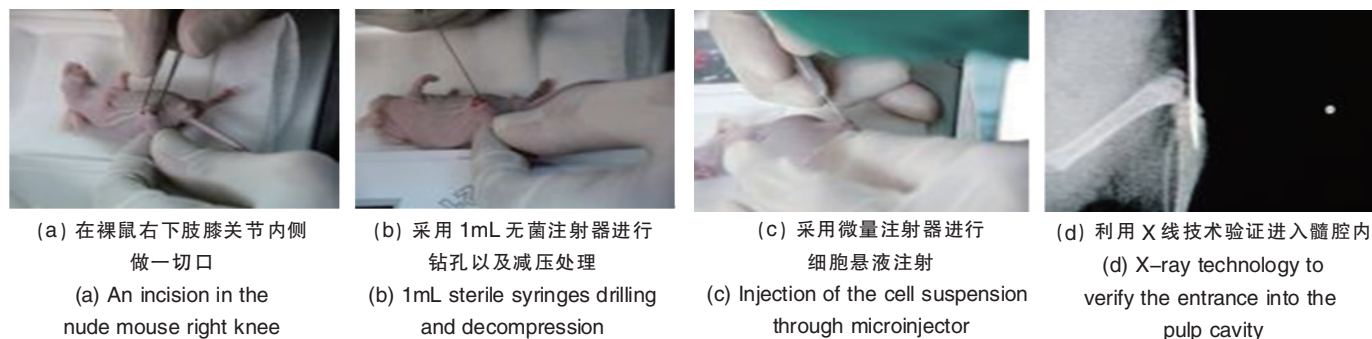


图 1 裸鼠原位骨肉瘤造模过程

Fig. 1 Process of nude mouse in *in-situ* osteosarcoma mode

1.3 观察与检测项目

瘤体生长观察与成瘤率计算:通过肉眼查看、游标卡尺测量,对 2 组裸鼠骨肉瘤模型肿瘤的生长状况进行观察,并计算 2 组的成瘤率:成瘤率=(成瘤只数/本组动物总数)×100%。

X 线观察:每周取裸鼠行 X 线检查,观察瘤体形态的变化、骨皮质的破坏和周围软组织的受累情况。

血清测定:成瘤明显后在 3 组裸鼠中随机处死裸鼠 5 只,并采集裸鼠的股动脉血进行碱性磷酸酶(ALP)、钙(Ca)、磷(P)检测。

1.4 统计方法

试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS 16.0 统计软

件,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,所有检验以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤生长情况以及成瘤率

造模完成后,每日对裸鼠右下肢造模部位进行观察,可见裸鼠生长情况及切口长合良好,局部均无感染现象。术后 3 周左右大部分裸鼠可见局部肿瘤逐渐形成,所有肿瘤生长后未发现自然消退现象。MG-63 细胞悬液注射组共有 3 只未见成瘤,其成瘤率为 85%,组织块移植组有 1 例未成瘤,其成瘤率为 95%,两组间成瘤率差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 影像学观察

在术后 1 周 X 线检查未发现 2 组裸鼠胫骨上段有变化, 周围软组织未见肿胀。术后 2 周时可见胫骨上端的骨密度有一定减低, 局部出现膨大, 同时周围软组织开始出现肿胀。术后 4 周时 2 组裸鼠均出现胫骨上段边界不清的骨质破坏区。其中组织块移植组部分可见边缘清晰的溶骨性破坏, 同时肿瘤样骨形成, 软组织肿胀较前明显(图 2(e))。术后 6 周时注

射组胫骨上段膨大较前增加,软组织肿胀明显(图2(b));而移植组胫骨与腓骨均已出现骨质破坏,软组织肿胀涉及整个右下肢(图2(f))。术后8~9周时MG-63细胞悬液注射组胫骨上段继续膨大并开始出现明显的骨质破坏,周围软组织肿胀较前明显(图2(c)、(d));组织块移植组胫骨上段骨质破坏严重,骨皮质出现缺损断裂(图2(g)、(h))。

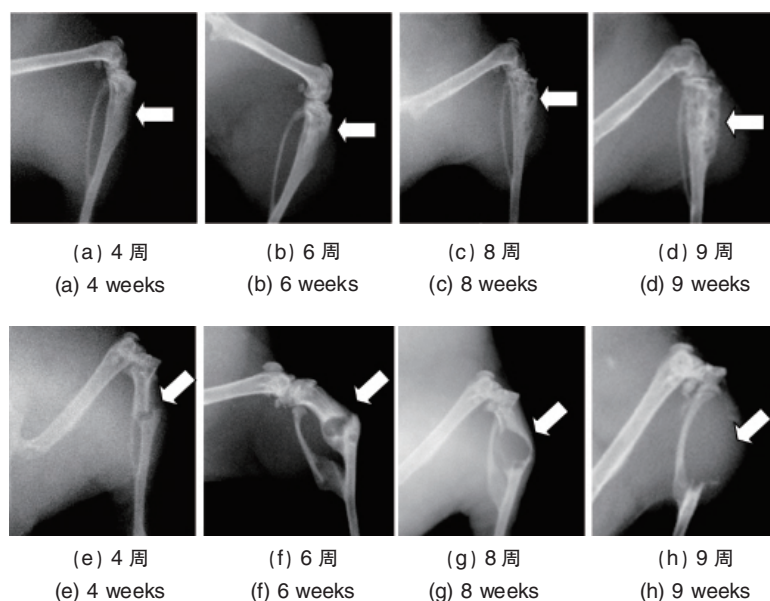


图2 注射法(a~d)和移植法(e~h)进行原位骨肉瘤造模术后不同时期成瘤的X线观察
Fig. 2 X-ray observation of injection method (a~d) and transfer method (e~h) in *in-situ* osteosarcoma tumors of different periods after modeling

2.3 3组裸鼠血清测定结果的比较

术后 4 周成瘤明显时随机在每组裸鼠中抽取 5 只进行血清测定。结果显示模型组 ALP 的水平明显高于对照组 ($P<0.01$), Ca 含量 3 组间没有统计学差异, 模型组 P 的水平高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 3 组裸鼠血清测定结果的比较 ($\bar{x} \pm S$)

Table 1 Comparison of nude mice serum determination results between three groups ($\bar{x} \pm S$)

组别	小鼠 数量	ALP/ (U·L ⁻¹)	Ca/ (mmol·L ⁻¹)	P/ (mmol·L ⁻¹)
细胞悬液注射组	5	598±75.8	2.38±0.07	1.36±0.30
组织块移植组	5	610±66.5	2.41±0.09	1.32±0.34
对照组	5	316±49.7	2.42±0.14	2.11±0.17
<i>t</i> 检验		5.96**	0.12	2.39*

注: * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著。

Notes: *and ** mean significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

3 讨论

骨肉瘤在骨源性肿瘤中较为常见,且恶性程度较高,好发于青少年^[2]。患者一旦患病出现肺转移的速度较快,术后复发的几率很高,预后较差。目前,在研究骨肉瘤的过程中,通过建立骨肉瘤动物模型,探索不同时期肿瘤在动物体内发生发展的规律,以及研究与开发临床较为有效的防治措施是骨肉瘤研究领域的重要途径。迄今为止,利用裸鼠、大鼠等动物进行骨肉瘤动物模型制作的方法愈来愈多,应用最为广泛的为诱发肿瘤模型和移植肿瘤模型。研究表明,各种方法制成的模型之间也存在一定的差异性,其中骨肿瘤原位模型的生物学行为更接近人骨肿瘤表现^[3,4]。

本试验对常用的细胞悬液注射法与组织块移植法进行比较,以此发现两种方法成瘤的不同特点。结果显示,术后 2~3 周时大部分裸鼠可见局部肿瘤逐渐形成,所有肿瘤生长后未发现自然消退现象。MG-63 细胞悬液注射组共有 3 只未见成瘤,其成瘤率为 85%,组织块移植组有 1 例未见成瘤,其成瘤率为 95%,两组间成瘤率差异有统计学意义。从影像学上观察发现,术后初期(1~3 周)两种方法成瘤无明显差异,从第 4 周开始组织块移植组裸鼠无论是瘤体增长速度还是骨质破

坏速度与程度,以及周围软组织肿胀的程度都较 MG-63 细胞悬液注射组明显。此外,术后 4 周时通过测定 3 组裸鼠的血清发现,模型组的 ALP 水平明显高于对照组。以上结果均说明两种造模方法在放射学和生物学特性上都接近人骨肉瘤表现,但相比之下,采用组织块移植法可提高成瘤率,并且此方法建立的模型更接近人骨肉瘤的表现。

近年来骨肉瘤动物模型的研究已取得很大成就,较为成熟的造模方法主要有自发肿瘤模型^[5],诱发肿瘤模型^[6],移植型肿瘤模型^[7],转基因小鼠模型^[8]等。在动物模型基础上开展的一系列基础与临床研究也获得了诸多成果^[9-11]。可以说,动物模型的成功建立为人类在骨肉瘤方面的研究提供了理想的替代,并降低了通过人进行各种实验的风险。但目前大多数的造模方式尚存在如成瘤率低、费用较高、操作过于复杂、稳定性差等缺点,而且骨肉瘤模型与人类肿瘤在发病机制、生物学特性、组织形态学等方面仍存在一定差别。因此,如何模拟并建立成瘤快、稳定性好、相似度高、费用合理,并且能够展现人类骨肉瘤的全部特性,特别是骨肉瘤的生物学、基因学以及治疗学等方面的特性的理想的骨肉瘤动物模型,一直是学界关注与研究的焦点。本试验研究结果发现采用组织块移植的方法成瘤率较高,瘤体生长速度快,而且对骨皮质及周围软组织的破坏力较强,同时还具有转移率高的特点。因此,组织块移植法可作为建立原位骨肉瘤动物模型的主要和可靠的方法之一。

4 结论

与细胞悬液注射法相比,采用组织块移植的方法成瘤率较高,瘤体生长速度快,而且对骨皮质及周围软组织的破坏力较强,同时还具有转移率高的特点。因此,组织块移植法可作为建立原位骨肉瘤动物模型的主要和可靠方法之一。

参考文献 (References)

[1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma[J]. Cancer Treat-

ment and Research, 2009, 152: 3-13.

[2] 燕太强, 梁伟民, 郭卫. 骨肉瘤的诊断和研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(17): 4988-4990.

Yan Taiqiang, Liang Weimin, Guo Wei. Chinese Journal of Clinicians, 2012, 6(17): 4988-4990.

[3] 于哲, 范清宇. 骨肉瘤动物模型的应用现状 [J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(1): 106-108.

Yu Zhe, Fan Qingyu. Journal of Modern Oncology, 2006, 14 (1): 106-108.

[4] 周光新, 赵建宁. 骨肉瘤动物模型构建的实验学特点 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(37): 7374-7377.

Zhou Guangxin, Zhao Jianing. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(37): 7374-7377.

[5] Pirie-Shepherd S R, Conffman K T, Resnick D, et al. The role of angio-statin in the spontaneous bone and prostate cancers of pet dogs [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 292(4): 886-891.

[6] 王玉民, 尤占云, 韦志康, 等. 物理、化学因子诱癌模型及其剂量-效应相关模式[J]. 职业卫生与应急救援, 2000, 18(1): 1-3.

Wang Yumin, You Zhanyun, Wei Zhikang, et al. Occupational Health and Emergency Rescue, 2000, 18(1): 1-3.

[7] Luu H H, Kang Q, Park J K, et al. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis [J]. Clinical Experimental Metastasis, 2005, 22(4): 319-329.

[8] Wang Y, Wang H. Functional genomics in drug target research [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2005, 21(3): 266-268.

[9] Tinkey P T, Lembo T M, Evans G R, et al. Postirradiation sarcomas in Sprague-Dawley rats[J]. Radiat Research, 1998, 149(4): 401-404.

[10] Dyer N W, Haynes J S, Ackermann M R, et al. Morphologicaleffects of *Pasteurella multocida* type—Ddermonecrotxin on ratosteosarcoma cells in a nude mouse model[J]. Journal of Comparative Pathology, 1998, 119 (2): 149-158.

[11] Nieves M A, Vahle J, Ackermann M, et al. Production and characterization of canine osteosarcoma cell lines that induce transplantable tumors in nude mice [J]. American Journal of Veterinary Research, 1998, 59(3): 359-362.

(责任编辑 王媛媛)

· 学术动态 ·



中国科学技术协会

冯守华当选国际溶剂热与水热协会主席

在 2013 年国际溶剂热与水热协会理事会上,中国科学院院士、吉林省科协主席、吉林大学教授冯守华当选第三届国际溶剂热与水热协会主席。

国际溶剂热与水热协会创建于 2006 年,是由国际水热协会(1982)、国际溶剂热协会(1994)合并而成,前 2 届主席分别由法国学者、美国学者担任。

冯守华是国际溶剂热与水热协会的创建人之一。他长期从事无机功能材料的水热合成化学研究,率先将水热化学应用于无机固体功能材料的合成,并在具有代表性的功能复合氧化物与复合氟化物体系获得突破。他在水热条件控制缺陷与混合价态,水热生物化学等方面取得了突出成就,特别是他的新概念原子分子尺度 p-n 结过渡金属氧化物晶体的水热合成研究工作,在国际上产生了重要影响。

详见中国科协网 <http://www.cast.org.cn/n35081/n35473/n35518/14574413.html>。