【基础研究】

巨型先天性黑色素细胞痣人源性异种移植模型的建立方法探究

解永怡[1#]，马　欣[1,2#]，曾俊文[3,4]，许小向[1]，邓　丹[4*]，刘业强[1*]
（1. 同济大学附属皮肤病医院，上海 200443；2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海 200437；
3. 南昌大学公共卫生学院，南昌 330031；4. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心皮肤科，上海 200127）

摘要：目的 探究巨型先天性黑色素细胞痣（giant congenital melanocytic nevus，GCMN）人源性异种移植模型的建立方法。**方法** 将 GCMN 患者的皮肤标本移植到 2 只重度联合免疫缺陷小鼠的背部，加压包扎 4 周后拆开，观察移植 GCMN 皮肤的存活情况及组织病理学特征。**结果** 1 号小鼠术后 1 周时死亡，可能与移植面积过大有关。2 号小鼠长期存活且移植部位皮肤稳定存活至少 28 周，移植皮肤与小鼠正常皮肤交界处无瘢痕形成。移植 GCMN 部位苏木精 - 伊红染色可见真皮内有上皮样痣细胞及黑素颗粒；免疫组化示黑色素抗原、小眼畸形相关转录因子、S-100 蛋白及性别决定区盒基因 10 均为阳性。**结论** 采用该方法构建的 GCMN 人源性异种移植动物模型可维持 GCMN 组织学特征及重要分子表型，移植皮肤长期存活，可用于后续基础实验的开展，有利于对 GCMN 发病机制及潜在药物研发的进一步探究。

关键词：巨型先天性黑色素细胞痣；动物模型；皮肤移植
中图分类号：R758.5 ＋ 1；R-33　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2024）02-0133-06
DOI：10.13683/j.wph.2024.02.005

An investigation of the methodology for establishing a human-derived xenograft model of giant congenital melanocytic nevus

XIE Yongyi[1#], MA Xin[1,2#], ZENG Junwen[3,4], XU Xiaoxiang[1], DENG Dan[4*], LIU Yeqiang[1*]
（*1. Shanghai Skin Disease Hospital of Tongji University, Shanghai 200443, China; 2. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 3. School of Public Health, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi Province, China; 4. Department of Dermatology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China*）

Abstract: ***Objective*** To explore the establishment of a human-derived xenograft mouse model for giant congenital melanocytic nevus（GCMN）. ***Methods*** Skin from GCMN patients was transplanted onto the backs of two mice with severe combined immunodeficiency, which were then removed after 4 weeks of pressure bandaging. The survival and histopathological characteristics of the transplanted GCMN skin were observed. ***Results*** Mouse No.1 died at 1 week after operation, which may be related to overlarge graft area. Mouse No.2 survived for a long time. The skin xenograft was stable for at least 28 weeks. There was no scar formation at the junction of grafted skin and normal mouse skin. HE staining at GCMN site showed that there were epithelioid nevus cells and melanin granules in the dermis, and immunohistochemistry showed that melanin antigen, microphthalmia transcription factor, S-100 protein, Sry-related HMG-BOX gene 10 were all positive. ***Conclusion*** The human-derived xenograft mouse model of GCMN constructed by this method can maintain the histological features and important molecular phenotypes of GCMN. Meanwhile, the transplanted skin can survive for a long time, which can be used for subsequent basic experiments, and is conducive to the further investigation of the pathogenesis of GCMN and its potential drug development.

Key words: giant congenital melanocytic nevus; animals model; skin xenograft

收稿日期：2023-11-23
作者简介：解永怡，硕士研究生，研究方向：黑素瘤、巨型先天性黑色素细胞痣等。
马欣，主治医师，研究方向：中西医结合防治皮肤病。
通讯作者：邓丹，副主任医师，硕士生导师，研究方向：儿童巨大胎记诊治与管理、皮肤创面修复与干细胞治疗等方向。
刘业强，主任医师，博士生导师，研究方向：皮肤病理，黑素瘤等。
基金项目：国家自然科学基金（82173396）；上海市“科技创新行动计划”自然科学基金项目（23ZR1456100）

巨型先天性黑色素细胞痣（giant congenital melanocytic nevus，GCMN）是一种罕见的先天畸形，与神经嵴黑色素细胞异常迁移、聚集于体表有关[1—2]。新生儿该病发病率约为1/20 000，表现为出生时存在粗糙、肥厚及广泛的黑褐色皮损，直径常＞20 cm。除影响美观、对患儿造成严重心理负担外，该病还有恶变风险，约2%～12%的GCMN可能恶变为黑色素瘤[3—4]。有研究表明，GCMN中最常见的基因突变位点为神经母细胞瘤RAS（neuroblastoma RAS，NRAS）基因的Q61K及Q61R[5—6]。然而GCMN的发生、发展及其恶变机制仍未完全明确。目前，GCMN的治疗以手术切除为主，但很难完全切除病变，并且存在广泛留疤的风险[7]。因此，探究GCMN的替代疗法十分必要，例如开发针对GCMN的药物，以期在消除痣细胞的同时最大程度地降低黑色素瘤的发生风险，使患者受益。目前GCMN的研究模型有限，不仅基础研究开展困难，且限制针对GCMN的药物研发。现有GCMN动物模型主要是转基因小鼠。Choi等[7]构建GCMN小鼠模型（Dct-Cre *NRAS*Q61R和Tyr-CreERT2 *NRAS*Q61R小鼠）。国内李青峰教授团队也针对中国GCMN患者构建色素细胞选择性表达*NRAS*Q61K突变基因的GCMN小鼠模型[8]。以上模型均与人类GCMN具有相似特征。考虑到转基因小鼠技术操作难度大、价格昂贵，探究其他简便易操作且能保持GCMN特征的动物模型十分必要，将有利于药物研发，但目前尚未见该类型的探究。

人源性异种移植模型是患者起源的异种移植，因其生物学特性保持完整而被认为是最接近患者临床特征的模型[9—10]。其一般为肿瘤组织移植，多次传代仍可保留肿瘤组织的特性，故常被用于肿瘤相关研究[11]。笔者在参考相关文献基础上，首次尝试建立GCMN人源性异种皮肤移植动物模型。本文现总结实验方法、小鼠一般情况、GCMN组织学及关键分子学表达特征，报告如下。

1 资料与方法

1.1 GCMN组织来源及实验动物

GCMN组织来源于2023年于上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心皮肤科门诊就诊、诊断为GCMN且需要手术的1例男性患者。选取手术标本中符合要求的组织作为人源GCMN样本，其获取及使用已获患者知情同意。6周龄重度联合免疫缺陷（severe combined-immuno-deficient，SCID）小鼠2只，体质量分别为24及24.1 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验动物生产许可证号：SCXK（沪）2022-0009；实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2019-0025。所有实验动物饲养于SPF级动物房，实验室保持恒温恒湿，12 h交替照明，予普通饲料饲养、自由饮水。

1.2 主要试剂及仪器

2%青霉素-链霉素-两性霉素B溶液（B1216-081）、Dulbecco改良Eagle培养基（Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM，SH30022.01B）均购自上海圆创生物科技有限公司，磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS，C0221A）、苏木精-伊红（hematoxylin eosin，HE）染色试剂盒（C0105S）均购自上海碧云天公司。抗体黑色素抗原（melan antigen，Melan A，MAB-1033）、小眼畸形相关转录因子（microphthalmia transcription factor，MITF，MM-0321）、S-100蛋白（RAB-0150）及性别决定区盒基因（sry-related HMG-BOX gene，SOX）10（RMA-0726）即用型快捷免疫组化HRP试剂盒（KIT-5020）购自福州迈新生物技术开发公司。电子天平购自上海玉研科学仪器有限公司，DermLite手持式皮肤镜购自贝登医疗。

1.3 GCMN人源性异种移植模型构建过程

GCMN组织取自1例诊断明确的男性患者，从手术标本中选择符合要求的部分，及时保存于冰生理盐水中并于1 h内完成小鼠皮肤移植。具体步骤：在冰浴情况下将所取组织从真皮侧去除真皮脂肪以

增强血管形成，继而裁剪成合适的长方体形状，大小约 4 cm×2 cm，用含抗生素（青霉素、链霉素及两性霉 B）的 PBS 清洗 3 次后浸入 DMEM 中。将 SCID 小鼠麻醉，背部去毛并用 75% 乙醇消毒，随后剥离小鼠背部皮肤；将 GCMN 皮肤组织覆盖于小鼠后背，采用外科缝线间断缝合，将 GCMN 皮肤与小鼠皮肤沿周边缝合；移植皮肤上方用凡士林纱布和绷带加压包扎。纱布及绷带 4 周后取下。

1.4 观察指标

观察指标包括小鼠术后一般情况、移植部位皮肤情况、体质量变化、组织病理学表现及组织免疫组化表达等 5 个方面。其中小鼠术后一般情况包括小鼠毛发状况、精神状态，于术后 4 周内每日观察记录。术后 28 周内，每周观察并记录小鼠体质量。

术后第 4 周拆除纱布，并于术后第 4 ～ 28 周每周观察移植部位皮肤情况，记录移植部位皮肤柔软度变化，测定移植 GCMN 皮肤面积变化。

术后第 28 周处死小鼠并取材，取材组织用 10% 福尔马林固定后进行脱水、石蜡包埋及切片，进行 HE 染色，光学显微镜下观察组织病理学形态。组织免疫组化表达则对组织进行免疫组化染色，观察 Melan A、MITF、S-100 蛋白及 SOX10 等关键蛋白的表达情况。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

术后 1 周，1 号小鼠毛发粗糙、失去光泽，随后死亡；2 号小鼠毛发有光泽，精神状态佳。术后 4 周时，2 号小鼠毛发光泽好、精神状态好。

2.2 移植部位皮肤情况

4 周时，2 号小鼠拆包可见移植皮肤成功存活，表面柔软，面积较前缩小，约 2.5 cm×2 cm；术后 15 周时，移植皮肤表面略硬，面积进一步缩小，后续面积趋于稳定，详见图 1。

此外，皮肤镜观察示，28 周时，2 号小鼠移植 GCMN 部分与皮肤融合，表面可见角化（图 2）。

2.3 体质量变化

在体质量变化方面，术后 28 周内 2 号小鼠体质量稳定上升，详见图 3。

2.4 组织学观察

小鼠背部正常自身皮肤表皮较薄，真皮内可见皮脂腺及疏松结缔组织（图 4a）。在 GCMN 人源性异种移植部位，可见表皮角化过度，棘层增厚，真



图 1 实验流程及小鼠术后情况

Figure 1 Experimental procedure and postoperative conditions of mice

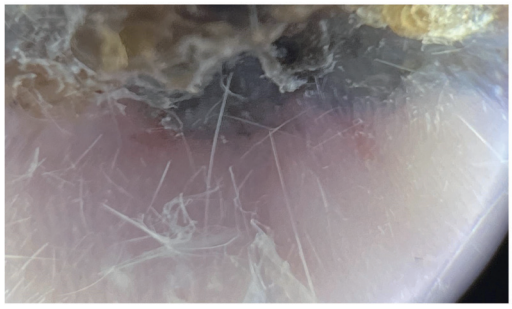


图 2 小鼠 28 周时 GCMN 移植部位与正常皮肤交界处的皮肤镜表现

Figure 2 Dermoscopic manifestations of the junction between the transplantation site of GCMN and normal skin in mouse at 28 weeks

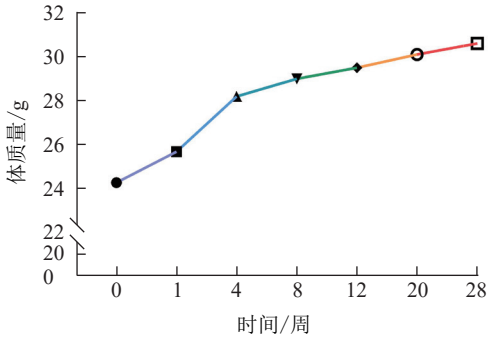


图 3 小鼠体质量变化

Figure 3 The record of weight change of mouse

皮部分可见痣细胞及黑色素。移植部分与小鼠皮肤交界部位融合较好，无纤维机化包裹（图 4b、c）。GCMN 真皮区域可见痣细胞散在分布，部分区域呈巢状，可见黑色素沉积（图 4d），痣细胞存活良好。

2.5 免疫组化

免疫组化显示，GCMN 人源性异种移植部位黑色素标记 Melan A（图 5a）、MITF（图 5b）、S-100 蛋白（图 5c）及 SOX10（图 5d）均为阳性。综上，结果显示，移植后 GCMN 部分皮肤存活，不影响小鼠生存，移植部位黑色素关键蛋白表达，GCMN 的分子特征得以保留。

3 讨论

GCMN 是一种皮肤黑色素细胞良性增生，该病最大可累及患儿 80% 的体表面积，严重影响患儿身心健康。GCMN 有一定的恶变风险，但目前 GCMN 发生、发展及恶变机制尚未完全明确[12—15]。有限的动物模型也是限制 GCMN 研究的一大原因，因此有必要进一步开发其他类型 GCMN 动物模型。作为国内首次探究，笔者尝试将 GCMN 患者的皮肤移植至 SCID 小鼠背部，从而构建一种人源性异种移植的 GCMN 动物模型。结果表明，移植皮肤及小鼠均成功存活，可尝试用于发病机制的研究及药物研发。

目前，GCMN 动物研究模型主要为转基因小鼠，包括 Dct-Cre*NRAS*Q61R 和 Tyr-CreERT2*NRAS*Q61R 小鼠[7]。但转基因小鼠价格昂贵，获取难度大。本

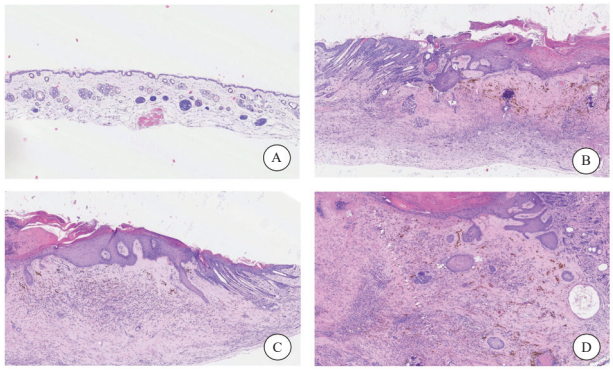


图 4 小鼠不同部位皮肤组织病理学表现（HE，×40）

Figure 4 Histopathology of different parts of skin tissue in mouse（HE，×40）

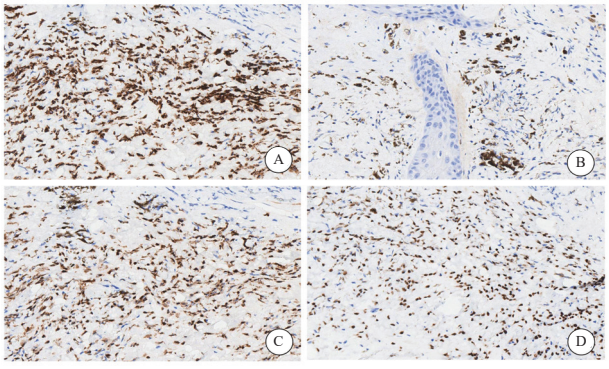


图 5 小鼠 GCMN 人源性异种移植部位免疫组化表达（×200）

Figure 5 The immunohistochemical expression of mouse GCMN human-derived xenograft site（×200）

研究探索的人源性异种移植 GCMN 动物模型具有操作简便、移植皮肤存活时间长且保留 GCMN 组织学特征等优势。王嘉厅等[16]也认为 GCMN 患者来源的异种移植模型因与疾病具有较高的相似性，是一种较优选择。本研究中，1 号小鼠术后 1 周死亡，伴有毛发粗糙、失去光泽，移植 GCMN 皮肤干燥变硬，肝脾病理学未见明显异常。推测原因可能为移植面积过大，超过小鼠 30% 体表面积，小鼠脱水死亡。根据既往文献[17—18]，在小鼠同种皮肤移植实验中，移植皮肤大小常为 1 cm^2，此时皮片存活较好，组织结构与正常组织相似。考虑到同种与异种移植间可能存在差异，有必要进一步探究小鼠异种移植的适宜皮肤面积。此外，研究中采用移植后加压包扎，结合文献[19]，该方法有利于移植皮肤的存活、血运构建。存活的 2 号小鼠移植 GCMN 皮肤面积有缩小趋势，15 周面积逐渐稳定，28 周时移植皮肤仍然存活。国外研究团队也报道异种皮肤移植小鼠模型可稳定至少 8 个月[7]，因此说明 GCMN 异种移植模型具有存活时间长且稳定的优势。在形态学方面，皮肤镜下小鼠 GCMN 移植部分与自身皮肤互相融合，未见瘢痕形成；HE 染色显示，GCMN 部分与小鼠皮肤交界处无结缔组织包绕，再次说明模型性质良好。Melan A、MITF、S-100 蛋白及 SOX10 是黑色素细胞标记物[20—21]。免疫组化结果显示，移植 GCMN 组织以上指标均为阳性，表明 GCMN 组织并未因异种移植而丧失原本的分子学特征。因此，该方法构建的小鼠模型移植皮肤不仅存活时间长，且能保持 GCMN 的病理形态学特点以及重要分子标志物表达。但不可否认的是，由于 GCMN 病例罕见且动物试验所需 GCMN 样本较多，因此本研究纳入的实验动物数量少。后续拟继续收集样本，扩大实验动物数量，进一步验证模型的可靠性及稳定性。

GCMN 目前治疗主要依赖手术，尚无满意的治疗方法，开发新的药物是 GCMN 研究中的一大热点。Choi 等[7]通过动物模型发现局部使用方酸二丁酯治疗后，GCMN 病变得到深度清除，同时还可预防小鼠黑色素瘤形成，提示方酸二丁酯可能是 GCMN 的潜在治疗药物。结合本研究，该 GCMN 异种移植动物模型在未来可能被用于深入研究发病机制，增加对 GCMN 病因和病理过程的理解，从而为预防及治疗策略提供关键见解。此外，该模型也可通过更好地呈现 GCMN 疾病状态，从而辅助研发新药、评估新药疗效。

4 结论

本实验探究小鼠 GCMN 异种皮肤移植的具体方法及可行性，并证明该方法构建的模型在病理形态、分子表型方面可长时间保持 GCMN 特征，有利于基础研究的开展，增加对疾病机制的了解。同时，对于临床药物靶点的筛选、GCMN 的药物研发也具有重要意义，有望在未来帮助患者进行个体化精准治疗。

参考文献：

[1] Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, *et al*. Congenital melanocytic nevi frequently harbor *NRAS* mutations but no *BRAF* mutations[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(1): 179-182.

[2] Kinsler VA, Birley J, Atherton DJ. Great Ormond Street Hospital for Children Registry for congenital melanocytic naevi: prospective study 1988—2007. Part 1-epidemiology, phenotype and outcomes[J]. Br J Dermatol, 2009, 160(1): 143-150.

[3] De Sousa Fernandes EN, Happle R, Gontijo B, *et al.* The Bork-Baykal phenomenon and umbilical sparing in large and giant congenital melanocytic nevus: a 21-case series[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2023, 37(1): e77-e79.

[4] Stark MS, Tell-Martí G, da Silva VM, *et al*. The distinctive genomic landscape of giant congenital melanocytic nevi[J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(3): 692-695.

[5] Charbel C, Fontaine RH, Malouf GG, *et al*. *NRAS* mutation is the sole recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(4): 1067-1074.

[6] 崔璐, 杨庆华. 巨型先天性黑色素细胞痣发病机制的遗传学研究进展[J]. 中华整形外科杂志, 2022, 38(4): 463-468.

[7] Choi YS, Erlich TH, von Franque M, *et al*. Topical therapy for regression and melanoma prevention of congenital giant

nevi[J]. Cell, 2022, 185(12): 2071-2085.
[8] Yu Q, Aimaier R, Chung MH, *et al*. Establishment and characterization of an immortalized human giant congenital melanocytic nevi cell line[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2022, 35(3): 356-368.
[9] Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, *et al*. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power[J]. Breast Cancer Res, 2015, 17(1): 17.
[10] 韩品盛, 苗宇, 徐策, 等. 胰腺癌人源性肿瘤异种移植模型的建立及初步应用[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(9): 1799-1802.
[11] 杨永明, 杨喜花, 阎磊, 等. 胃癌人源异种移植模型的建立及其在药效学研究中的应用[J]. 肿瘤研究与临床, 2021, 33(4): 249-253.
[12] 杨文, 周启星, 成琦, 等. 儿童先天性巨痣的病理特征及手术疗效探讨[J]. 临床小儿外科杂志, 2018, 17(2): 131-135.
[13] 陈露露, 祁佐良. 巨型先天性黑色素细胞痣的研究进展[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017, 28(8): 505-507.
[14] 汪雨, 李养群. 巨型先天性黑色素细胞痣的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(8): 1515-1519.
[15] 吴敏, 谢峰, 余庆雄, 等. 巨型先天性黑色素细胞痣的临床病理表现[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11(5): 305-309.
[16] 王嘉厅, 吴信峰. 先天性巨大黑素痣的发病机制及其靶向治疗的研究进展[J]. 中国美容医学, 2022, 31(11): 189-193.
[17] 蔡洁茹, 周芹, 王敏敏, 等. 小鼠耳-背皮肤移植模型的建立[J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31(7): 438-439.
[18] 郑配国, 薛海阔, 孙晓旭, 等. 移植器官体积对小鼠皮肤移植物生存时间影响的实验研究[J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(5): 430-433.
[19] 许一迪, 蒋邦红, 陈宇, 等. 强脉冲光照射与弹力绷带压力治疗防治增生性瘢痕的疗效观察[J]. 中国美容整形外科杂志, 2021, 32(10): 584-585.
[20] Mu EW, Quatrano NA, Yagerman SK, *et al*. Evaluation of MITF, SOX 10, MART-1, and R21 immunostaining for the diagnosis of residual melanoma in situ on ichronically sun-damaged skin[J]. Dermatol Surg, 2018, 44(7): 933-938.
[21] 刘小青, 万学峰. 黑素瘤诊断中常用的免疫组化标志物的意义[J]. 临床皮肤科杂志, 2021, 50(12): 756-759.

(编辑：王 佳)

