

小剂量 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠动物模型的建立

黎 阳¹, 张绪超², 黄绍良¹, 魏 菁³, 黄文革⁴, 周敦华¹, 吴燕峰²(中山大学 1.附属第二医院儿科, 2.干细胞研究中心, 3.医学研究中心, 广东 广州 510120;
4. 中山医学院实验动物中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探索建立小剂量(1×10^6)人急性红白血病 K562 细胞株的 NOD/SCID 小鼠动物模型及通过流式细胞仪对 NOD/SCID 小鼠的肿瘤负荷情况进行评价的可行性。【方法】实验组 NOD/SCID 小鼠分别经尾静脉接种 K562 细胞 1×10^6 、 5×10^6 , 比较不同剂量接种实验组小鼠的生存时间、组织病理改变及通过流式细胞术对 NOD/SCID 小鼠体内的肿瘤标记进行检测。【结果】 1×10^6 及 5×10^6 K562 细胞接种的 NOD/SCID 小鼠的生存时间分别为 (30.3 ± 4.3) d 和 (22.2 ± 3.7) d; 其外周血、骨髓及肝、肺组织匀浆中均可发现不同比例的肿瘤细胞; 通过流式细胞术检测 5×10^6 K562 细胞接种组 NOD/SCID 小鼠外周血、肝匀浆中人 CD13 表达水平显著高于 1×10^6 接种组, 而肺匀浆的 CD13 表达水平两组无显著性差异。【结论】小剂量(1×10^6) K562 细胞 NOD/SCID 小鼠动物模型的建立是完全可行的, 这有助于降低实验成本。

关键词: 肿瘤; K562 细胞; NOD/SCID 小鼠; 动物模型

中图分类号: R332

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0523-05

Establishment of an Animal Model of Human Erythroleukemia in NOD/SCID Mice Using Microdose K562 Cells

LI Yang¹, ZHANG Xu-chao², HUANG Shao-liang¹, WEI Jing³, HUANG Wen-ge⁴,
ZHOU Dun-hua¹, WU Yan-feng²(1.Pediatric Department, 2.Stem Cells Research Center, 3.Medical Research Center, The Second Affiliated Hospital,
4.Experimental Animal Center, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University,
Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore the feasibility of establishment of NOD/SCID mice model using microdose (1×10^6) erythroleukemia K562 cells and to evaluate tumor load by flow cytometry. 【Methods】NOD/SCID mice divided into two groups, inoculated with 1×10^6 and 5×10^6 K562 cells by tail vein, compare the survival rate, histopathology changes in different groups. The tumor marker in the body of NOD/SCID mice was monitored by flow cytometry.【Results】The survival time of NOD/SCID mice that inoculated with 1×10^6 and 5×10^6 K562 cells were (30.3 ± 4.3) days and (22.2 ± 3.7) days, respectively. There were various proportion of tumor cells in the peripheral blood, bone marrow, and the liver or lung homogenate of the experimental groups. The tumor marker CD13 in the peripheral blood and liver homogenate of 5×10^6 K562 cells inoculated NOD/SCID mice group significantly higher than that in 1×10^6 group, but there was no significant difference of CD13 in the lung homogenate between the two groups.【Conclusion】Microdose tumor cells inoculation (1×10^6 tumor cells/per mice) can be used to establish an animal model of human leukemia in NOD/SCID mice successfully, this may contribute to minimize the experimental cost.

Key words: tumor; k562 cells line; NOD/SCID mice; animal model

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(5):523- 527]

在细胞过继免疫治疗抗肿瘤的实验研究中要了解免疫效应细胞体内的杀瘤作用, 须建立相应靶细胞的活体载体, 而这种活体载体体内必须缺

乏主要的免疫活性细胞, 这样才能减少其它因素对评价效应细胞体内抗瘤效果的干扰; 而 T、B 及 NK 细胞联合免疫缺陷的 NOD/SCID 小鼠可作为

收稿日期: 2005-04-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(031707); 中山大学附属第二医院医学科研青年启动基金(200240489)

作者简介: 黎 阳(1971-), 男, 广东东莞人, 医学博士, 硕士生导师, 副主任医师, 课题主持人. E-mail: doctorliyang@126.com

免疫效应细胞杀伤实验良好的模型。目前 NOD/SCID 小鼠人肿瘤动物模型的建立多采用较大数量的肿瘤细胞接种,尤其是经过尾静脉接种的肿瘤细胞,每鼠通常为 1×10^7 以上甚至 1×10^8 ^[1],虽然可以保证成功植入,但对研究一定效靶比的免疫效应细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的杀伤实验十分不利,主要原因在于即使植入的肿瘤细胞不再分裂繁殖(这种机会非常小),要保证 10:1 的效靶比,则每只小鼠需要输注高达 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 的免疫效应细胞,极大增加了实验所需的成本和时间;因此尝试小剂量肿瘤细胞接种对降低实验成本是十分必要的。在本研究中将尝试建立小剂量(1×10^6)人急性红白血病 K562 细胞株的 NOD/SCID 小鼠动物模型,并通过流式细胞仪对 NOD/SCID 小鼠的肿瘤负荷情况进行评价。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂和仪器

IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium), DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline),胎牛血清(FCS),CD13、CD33-FITC 流式细胞荧光标记抗体、抗体对照为小鼠抗人 IgG1-FITC(购自 Peprtech EC 公司,美国)。Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪及组织匀浆制备附件 Medimachine, Sysmex F-820 血细胞计数仪等。

1.2 实验动物 NOD/SCID 小鼠

选择 6 周龄,体质量 25~30 g 的雄性 NOD/SCID 小鼠,由中山大学中山医学院动物实验中心提供,在层流室中饲养(符合 SPF 标准)。

1.3 K562 肿瘤细胞的制备及表面标记的流式细胞术检测

人红白血病 K562 细胞株为中山大学附属肿瘤医院肿瘤研究所提供,以 5×10^5 的密度接种于含 IMDM(含 150 mL/L FCS、青、链霉素各 100 U/mL) 4 mL 的 25 cm² 培养瓶,每隔 2 d 半量换液,细胞接近铺满瓶底时传代;取传代后 24 h 内的 K562 细胞通过流式细胞术行相关表面标记 CD13、CD33 的检测,以选择合适的流式标记作为 K562 肿瘤细胞在 NOD/SCID 小鼠体内肿瘤负荷的指标。

取培养传代后 12~24 h 内的 K562 细胞(经台盼蓝染色,活性大于 95%)进行接种,用 DPBS 洗涤、离心 2 次(1 000 r/min, $r=15$ cm, 5 min) 后以 NS 重悬细胞,分别调节细胞浓度为 5×10^6 /mL, 25×10^6 /mL。

1.4 NOD/SCID 小鼠动物实验分组

27 只 NOD/SCID 小鼠,分为 A、B、C 3 组(以下细胞数均为每只鼠注射的数量),每组 9 只;A、B 组为荷瘤 NOD/SCID 小鼠,A 组每只鼠经尾静脉接种 K562 细胞 1×10^6 ,总体积共 0.2 mL;B 组每只鼠经尾静脉接种 K562 细胞 5×10^6 ,总体积共 0.2 mL;C 组为正常空白对照组,不接种 K562 肿瘤细胞的 NOD/SCID 小鼠。

1.5 检测指标

1.5.1 一般情况及生存时间 记录各组 NOD/SCID 小鼠的毛色、体重变化,肿瘤生长情况及生存时间。比较不同剂量 K562 细胞接种小鼠的成瘤率及生存率。

1.5.2 小鼠的外周血细胞、骨髓细胞形态改变 通过瑞氏-姬姆萨染色镜下观察各组发病濒死小鼠的外周血(peripheral blood, PB)细胞、骨髓(bone marrow, BM)细胞形态,在高倍油浸镜下连续分类计数 200 个有核细胞,计算出其中异常肿瘤细胞的百分比。采取颈椎脱臼法处死小鼠后取双侧股骨,用 5 mL 医用注射器吸取 DPBS 反复将 BM 冲洗入 15 mL 离心管,直至股骨外观呈白色。将 BM 沉渣离心后涂片、瑞氏-姬姆萨染色后镜检。

1.5.3 小鼠的 PB、肝、肺组织中 CD13 或 CD33 阳性细胞表达率 采取颈椎脱臼法处死小鼠后取出相应脏器(10~20 mm)切成 1~2 mm 的碎片,用 DPBS 浸湿后放入 BD 流式细胞仪附件 Medimachine 中制成组织匀浆,用注射器将上清吸去,用 1 mL DPBS 冲洗盛相应组织匀浆的器皿三遍,用 50 mm Filcon 滤膜过滤细胞悬液,并用 DPBS 反复冲洗器皿尽量将组织匀浆内容过滤冲洗入 15 mL 离心管中离心(2 500 r/min, $r=15$ cm, 5 min),用 DPBS 重悬细胞,调节细胞浓度至 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$ /mL,分别加入 K562 细胞株高表达的抗人 CD13 或 CD33 流式细胞检测抗体(FITC 标记, Pharmingen),4 避光染色 30 min,再加 2 mL 冷的 DPBS 后离心(2 500 r/min, $r=15$ cm, 5 min),用 DPBS 重悬细胞沉淀,上机检测。

1.5.4 肝、肺组织细胞形态学观察 将制成的 NOD/SCID 小鼠肝、肺组织匀浆过滤、洗涤、离心后取悬液涂片,瑞氏-姬姆萨染色后镜检。

1.5.5 病理学检查 濒死动物进行病理检查,杀死小鼠后取肝、脾、肺,以 100 mL/L 甲醛固定 48 h 以上,石蜡切片,HE 染色后镜检。

1.6 统计方法

采用 SPSS 10.0 软件包处理,多组间行 One-Way ANOVA Test;两组间行独立 t 检验。

2 结 果

2.1 K562 细胞肿瘤负荷标记的流式细胞术检测

流式细胞术检测结果见图 1。对 8 份 K562 细胞株标本的 CD13、CD33 检测结果：显示其抗人 CD13 阳性率达 (88.6 ± 4.6) %，显著高于 CD33 的 (20.0 ± 2.2) % (t=53.59, P < 0.01)，故我们选择 CD13 作为 K562 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内肿瘤负荷的标记。

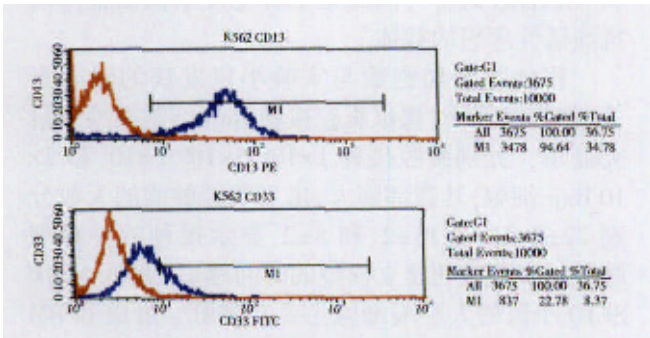


图 1 K562 细胞株 CD13、CD33 表达的情况

Fig.1 The positive expression of CD13 and CD33 in K562 tumor line

2.2 各组 NOD/SCID 小鼠一般情况及生存时间

接种 1 × 10⁶ K562 瘤细胞的 A 组于 39 h 内全部死亡，其死亡天数分别为：23、28 (2 只)、29、30 (2 只)、33、34 及 38；接种 5 × 10⁶ K562 瘤细胞的 B 组于 27 天内全部死亡，其死亡天数分别为：15、18、21、22、24 (2 只)、25 (2 只) 及 26；两组小鼠生存天数有显著性差异，均显著短于正常对照 C 组 (P < 0.01)；濒死小鼠出现纳差、少动、消瘦、毛色晦暗、松散等，体重均较 C 组显著下降。A、B 两组肉眼可见瘤块的小鼠分别为 5 和 6 只，成瘤率分别

为 55.56%和 66.67%；瘤块位于肝脏的 A 组 4 只、B 组 5 只 (图 2)，瘤块位于脾脏的 A、B 两组各 1 只 (图 3)，表明成功建立荷瘤的 NOD/SCID 小鼠模型。各组小鼠的生存时间与体重变化详见表 1。

表 1 各组 NOD/SCID 小鼠生存时间和体重变化

Table 1 The survival time and weight change of the experimental NOD/SCID mice ($\bar{x} \pm s$, n=9)

Group	Weight before inoculation (g)	Weight before 70 days or on the brink of death (g)	Survival time (days)
A	28.0 ± 1.6	26.5 ± 1.4 ²⁾	30.3 ± 4.3 ¹⁾
B	28.5 ± 1.4	26.0 ± 1.0 ²⁾	22.2 ± 3.7
C	27.7 ± 1.7	28.6 ± 1.7	>70

1) Compared with group B, t=8.11, P=0.000; 2) Compared with group C, t=-2.17(A), -2.58(B), P=0.000

2.3 各组 NOD/SCID 小鼠 PB 细胞、BM 细胞形态改变

A、B 两组发病濒死 NOD/SCID 小鼠 PB WBC、血小板分布与 C 组正常对照小鼠相比明显稀疏；A、B 两组 PB 片均可发现幼稚肿瘤细胞，比例分别为 1% ~ 3% 和 3% ~ 5%；A、B 组 BM 增生亦重度抑制，有核细胞增生明显低下，可见幼稚肿瘤细胞，比例分别为 3% ~ 6%；上述细胞胞浆深蓝，染色质疏松。

2.4 A、B 两组 NOD/SCID 小鼠肝、肺组织匀浆细胞形态改变

A、B 组小鼠肝、肺匀浆涂片均可发现数量不等的肿瘤细胞，部分肿瘤细胞成堆积样，以肝脏为多，发病小鼠镜检约占 15% ~ 20% (见图 4)，而肺部比例约 5% ~ 8% (见图 5)，这些肿瘤细胞胞浆深蓝色，部分细胞胞浆丰富，核大，呈深紫色，染色质疏松，有多个核仁。

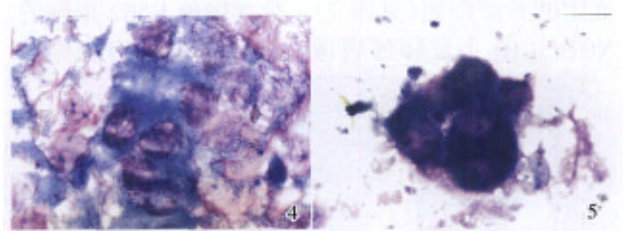


图 4 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠肝组织肿瘤细胞

图 5 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠肺组织肿瘤细胞

Fig.4 Tumour cell piled up in liver homogenate of K562 cells inoculated NOD/SCID mice.

(Wright s-Giemsa s Compound Staining, 1000 ×)

Fig.5 Tumour cell piled up in lung homogenate of K562 cells inoculated NOD/SCID mice Cytoplasm is deep blue stained.

(Wright s-Giemsa s Compound Staining, 1000 ×)

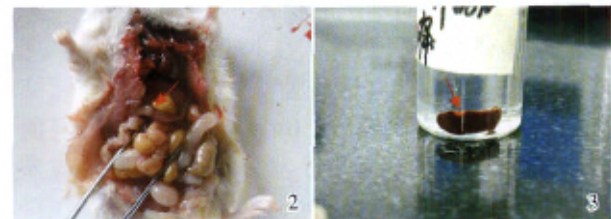


图 2 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠肝脏部位的瘤块

图 3 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠脾脏部位的瘤块

Fig.2 Tumor in liver of NOD/SCID mice that inoculated with K562 cells (arrow pointed).

Fig.3 Tumor in spleen of NOD/SCID mice that inoculated with K562 cells

(arrow pointed, pathologic specimen)

2.5 A、B 两组 NOD/SCID 小鼠 PB、肝、肺匀浆中人 CD13 表达水平

通过流式细胞术检测 A、B 两组各 5 例 NOD/SCID 小鼠 PB、肝、肺匀浆中人 CD13 表达水平,结果显示 B 组 PB、肝匀浆中人 CD13 表达水平显著高于 A 组,而肺匀浆的 CD13 表达水平两组无显著性差异,详见表 2。

表 2 A、B 两组 NOD/SCID 小鼠不同部位人 CD13+细胞水平

Table 2 The positive expression levels of CD13 in different preparation between group A and B NOD/SCID mice ($\bar{x} \pm s$, n=5) (%)

Group	Peripheral blood	Liver homogenate	Lung homogenate
A	1.26 \pm 0.20 ¹⁾	5.36 \pm 2.00 ²⁾	2.65 \pm 0.57
B	1.84 \pm 0.17	8.41 \pm 1.62	3.61 \pm 0.99

1) Compared with group B, t=-4.84, P=0.000; 2) Compared with group B, t=-2.65, P=0.030

2.6 病理学检查

肝、脾肉眼可见瘤块的发病小鼠的肿瘤病理检查可见肿瘤细胞在肝、脾组织中的浸润,形成的瘤块边界清晰,边缘不规则,肿瘤细胞排列成片状或聚集成团,瘤块间质血窦丰富,纤维组织较少,同正常肝组织间有部分区域可见出血灶。在脏器中形成实体瘤的 K562 细胞的形态较体外培养已经发生了较大的改变,胞体偏小,细胞大小不等,异型性明显,胞浆中等,HE 红染或嗜双色,胞核染色质呈片块状聚集,核膜增厚,可见一个或数个核仁;肿瘤细胞间大部分界限不清,细胞巢索间可见血窦形成丰富(见图 6)。A、B 两组肉眼未见瘤块的 NOD/SCID 小鼠,肝脏边缘还是可见少量聚集成团的肿瘤细胞(见图 7)。所有接种 K562 细胞的 NOD/SCID 小鼠肺部病理切片均未发现有肿瘤细

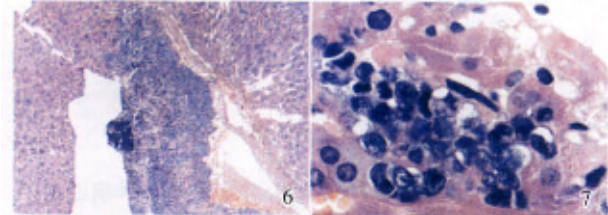


图 6 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠肝脏瘤块病理切片

图 7 接种 K562 细胞 NOD/SCID 小鼠肝脏肿瘤细胞浸润

Fig.6 Tumour in liver of NOD/SCID mice that inoculated with K562 cells

(Pathologic specimen, HE Staining, 100 \times)

Fig.7 Infiltration of aggregated tumour cells in liver of NOD/SCID mice that inoculated with K562 cells

(HE Staining, 1000 \times)

胞,但其肺间隔组织较正常 C 组小鼠明显增厚,肺泡大小不等,部分有代偿性扩张。

3 讨论

近年来已陆续有关于人类白血病细胞株在 NOD/SCID 小鼠体内移植成功,建立荷瘤小鼠模型的报道^[1,2],部分在 SCID 小鼠中植入失败的人 T 细胞白血病细胞株在 NOD/SCID 小鼠中可以成功植入。由于 NOD/SCID 小鼠体内缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞免疫^[3],因此是了解免疫杀伤细胞体内抗瘤活性理想的载体。

移植肿瘤细胞数与实验小鼠发病的时间有关。邵晓枫等^[4]对裸鼠腹腔接种 Raji 细胞模型的研究显示,分别腹腔接种 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 和 2×10^7 Raji 细胞,其腹部膨大,出现腹腔肿瘤的天数分别 22 ± 2 、 18 ± 2 、 15 ± 2 、和 8 ± 2 ,显示接种的肿瘤细胞数越多则成功建立模型的时间越短。植入 NOD/SCID 小鼠的人肿瘤细胞主要在脾脏、肝脏和 BM 出现浸润,死于白血病的小鼠均有体重减轻,部分发病小鼠 PB 未见肿瘤细胞浸润,需通过活检病理检查证实肿瘤细胞的浸润^[2]。Wang 等^[1]在接受 $4\text{Gy } ^{137}\text{Cs}$ 射线照射的每只 NOD/SCID 小鼠尾静脉接种高达 $(7-10) \times 10^7$ 的人慢性髓系白血病细胞,结果显示大部份(86%)荷瘤小鼠 BM 中肿瘤细胞超过 1%,只有近一半(48%)荷瘤小鼠 BM 中肿瘤细胞超过 10%,仅有数只荷瘤小鼠 BM 中人肿瘤细胞超过 50%。上述各种人肿瘤细胞 NOD/SCID 小鼠移植模型的结果说明不同肿瘤细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的生长,分布特性存在很大差异,但一般仍以在荷瘤小鼠体内人肿瘤细胞超过 1% 作为植入的标准^[1];由于 NOD/SCID 小鼠本身缺乏 NK 细胞免疫的特点使其相对 SCID 小鼠来说的更加适合人血液肿瘤细胞的植入^[5,6]。

在本研究中我们尝试在 NOD/SCID 小鼠以每只 1×10^6 和 5×10^6 的剂量接种人红白血病肿瘤细胞 K562,均获得成功,A、B 组发病小鼠均出现消瘦、食欲不振、毛色晦暗等发病体征;其肉眼成瘤率分别为 55.56%和 66.67%,两组小鼠均分别在接种 K562 细胞后 39 d 和 27 d 内死亡。对发病小鼠 BM 的 K562 细胞的计数显示,在发病晚期死亡前肿瘤细胞的比例分别为 3%~6%,与国内周剑芳等^[7]在 SCID 小鼠体内通过尾静脉接种 5×10^6 的 HL-60 细胞株的结果有相似之处,其荷瘤小鼠 BM 中人 CD33+ 的比例为 2.97%~3.79%。我们实验中两组发病小鼠 PB 肿瘤细胞比例低于文献^[7]报道的

11%的水平,可能与不同肿瘤细胞的体内生长特性或分布差异有关。A、B两组濒死小鼠的肝脏和肺部组织匀浆细胞涂片、病理及相关部位的肿瘤标记物流式细胞术检测均显示 K562 肿瘤细胞的广泛浸润(>1%),提示 K562 细胞的植入成功,而提示 K562 细胞浸润的 CD13+细胞数量为肝>肺>PB,其植入肿瘤的好发部位与文献报道一致^[2,7]。A、B两组 NOD/SCID 小鼠的 PB、肝组织匀浆抗人 CD13+细胞阳性比例与其生存时间呈反比改变,显示体内的肿瘤负荷的多少与其生存时间相关,即植入的 K562 细胞是影响小鼠生存的决定因素,说明接种低至 1×10^6 肿瘤细胞建立的白血病 NOD/SCID 小鼠模型也是完全可行的。由于 K562 细胞株是肿瘤免疫治疗研究中常用的靶细胞株,在本研究中不论 A 或 B 组的荷瘤 NOD/SCID 小鼠体内均可通过形态学、病理组织检查和流式细胞术监测到相当比例的 K562 细胞株的植入,为以后相应的免疫治疗实验疗效提供了有效的监测、评价指标,具有一定的实验应用价值。

值得注意的是在本研究中 A 组每鼠接种的肿瘤细胞数量(1×10^6)虽然远少于 Steele 与 Wang 等实验接种的数量[(1~10) $\times 10^7$],但本实验发病小鼠的平均生存时间却明显短于后者^[1,2],推测是由于我们实验中植入的是建系传代的 K562 肿瘤细胞株,其在 NOD/SCID 小鼠体内的增殖速度远远高于直接来自临床病人的白血病细胞,这有利于缩短成功建立此白血病 NOD/SCID 小鼠的实验周期,更好地满足血液肿瘤过继免疫实验的需要。由于本实验濒临死亡小鼠均出现消瘦、PB WBC 减少、BM 抑制, PB、BM 中出现肿瘤细胞,大部分

小鼠还出现肝、脾部位的瘤块,考虑其死亡原因为 K562 细胞浸润引起的 BM 衰竭和脏器功能损害。

参考文献:

- [1] Wang JC, Lapidot T, Cashman JD, et al. High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase[J]. *Blood*, 1998, 91(7): 2406-14.
- [2] Steele JP, Clutterbuck RD, Powles RL, et al. Growth of human T-cell lineage acute leukemia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice and non-obese diabetic SCID mice[J]. *Blood*, 1997, 90(5):2015-9.
- [3] 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):180-91.
- [4] 邵晓枫,杨纯正、熊冬生,等.人 B 淋巴瘤裸鼠腹腔内移植模型[J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(3):217-9.
- [5] Hauch M, Gazzola MV, Small T, et al. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia[J]. *Blood*, 1990, 75(11):2250-62.
- [6] Meseri A, Delwail V, Brizard A, et al. Endogenous lymphokine activated killer cell activity and cytogenetic response in chronic myelogenous leukemia treated with α -interferon[J]. *Br J Haematol*, 1993, 83(2):218-22.
- [7] 周剑芳,杨锡强,王宇泓,等. SCID 小鼠接种人白血病细胞 HL-60 的流式细胞术分析[J]. *上海免疫学杂志*, 2001, 21(2): 104-7.

(编辑 张恩健)