

胫骨内移植 UMR-106 成瘤组织块构建裸鼠骨肉瘤模型

福建省福州市第二医院骨肿瘤科（福州 350007） 陈冬冬 林佳生 严 伟 陈 嵘¹

【摘 要】 目的 获得 UMR-106 成瘤组织块，构建裸鼠骨肉瘤模型。**方法** 采用组织块移植的方法，在受体动物的胫骨髓腔内移植 UMR-106 骨肿瘤细胞株，观察裸鼠行为特征变化、体质量变化、肿瘤生长状况、成瘤率、肿瘤包块的病理学、血清指标，构建裸鼠骨肉瘤模型。**结果** 造模后，模型组裸鼠活动量明显减少，精神状态变差，觅食性变差；模型组裸鼠体质量随着天数的增加逐渐增大；肿瘤体积随着天数的增加逐渐增大，成瘤率 91.67%；模型组皮下肿瘤形体可见明显包膜，较大，瘤体质地较硬，表面呈结节状，表面大量血管分布，显微镜下可见丰富的毛细血管，细胞核有异型且大小不等，核仁约 1~4 个，核分裂相较多；模型组与对照组相比，碱性磷酸酶和磷酸差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。**结论** 采用组织块移植的方法，在受体动物的胫骨髓腔内移植 UMR-106 骨肿瘤细胞株，构建骨肉瘤动物模型，为骨肉瘤的进一步研究、治疗等奠定了实验基础。

【关键词】裸鼠；骨肉瘤模型；UMR-106；成瘤组织块

基金项目：2017 年福州市卫生计生科技计划中青年科研项目（2017-S-wq24）；2015 年福州市临床重点专科建设项目（骨科）

1 通信作者

【中图分类号】R738.1; R332 【文献标识码】B 【文章编号】1002-2600(2018)06-0134-04

骨肉瘤是常见的恶性肿瘤,多发于儿童和青少年,由于在术前患者已经有了微小肺转移灶,并且术后易局部复发,所以有很高的死亡率和致残率^[1]。因此,构建具有人类骨肉瘤生理和病理特性的动物模型,对研究骨肉瘤的治疗具有重要意义。但是骨肉瘤细胞起源于间叶组织这一特点导致骨肉瘤动物模型的构建存在较多困难,研究进展缓慢。本研究通过采用组织块移植的方法,在受体动物的胫骨髓腔内移植 UMR-106 骨肿瘤细胞株,通过观察裸鼠行为特征变化、体质量变化、肿瘤生长状况、成瘤率、肿瘤包块的病理学、血清指标,探讨构建的骨肉瘤动物模型是否成功,旨在为骨肉瘤的进一步研究、治疗等奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 动物: 4 周龄大小的 BALB/c 裸鼠 20 只(北京维通利华实验动物技术有限公司), SPF 级,雌雄各半,体质量(20±5) g,恒温(26~27℃)、恒湿(45%~50%)环境下饲养。2) 细胞: 裸鼠骨肉瘤细胞系 UMR-106,购自美国 ATCC (American Tissue Culture Collection),培养于 100 mL/L 的 FCS-1640 完全培养液中(含 HEPES 25 mol/L),隔日换液,及时传代; 3) 试剂: 美国 HyClone 公司产品提供 HEPES、FCS-1640 培养基、小牛血清; 本实验室病理室提供梯度乙醇溶液、二甲苯、石蜡、苏木精、中性树胶、伊红、0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)、40 g/L 多聚甲醛。

1.2 方法:

1.2.1 实验分组及成瘤组织块移植: 将 20 只实验裸鼠均分为模型组和对照组,两组在周龄、体质量等一般数据上差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组成瘤组织块的移植: 在裸鼠右前肢腋下部位注射制备好的骨肉瘤细胞悬液,0.2~0.25 mL/只。待瘤体长至 1 cm×1 cm×1.5 cm 时,将组织取出,剪成块状,体积大小约为 0.2 cm³,埋植于裸鼠臀部皮下。连续传 3 代、肿瘤生长稳定后取出,剪成约 0.1 cm³ 大小的块状备用。消毒后在裸鼠右后肢膝关节前内侧做一切口,露出膝关节,在钻孔、抽取少量的骨髓液后,将制备好的碎块置入胫骨髓腔内后缝合。手术后放入笼中饲养观察。对照组不做任何处理,按照常规饲养方式继续饲养观察。

1.2.2 动物行为特征变化: 造模后,每天早上 9:

30(喂食前)观察两组裸鼠的活动、精神状态、觅食等情况,5 d 记录 1 次。

1.2.3 动物体质量变化: 在造模后的第 1、2、3、4 周对动物各称量 1 次,连续对裸鼠的体质量进行观察和记录,每次称取时间均在上午 9:30(即喂食前)。

1.2.4 肿瘤的生长情况及成瘤率: 造模后,前期观察两组裸鼠瘤体生长情况,测量局部尺寸并记录。骨肉瘤成瘤率=(成瘤只数/本组动物总数)×100%。

1.2.5 肿瘤的病理学检测: 观察模型组和对照组接种部位瘤体生长情况,显微镜下观察肿瘤细胞形态。

1.2.6 血清检测: 待裸鼠成瘤明显后,在每组中随机选取 4 只裸鼠,采集裸鼠的股动脉血,进行碱性磷酸酶(ALP)、钙(Ca)、磷(P)检测。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析。裸鼠的体质量,肿瘤体积,ALP、Ca、P 的检测数据采用均数±标准差表示,两组间比较采用两样本 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠术后行为特征观察: 对照组裸鼠一直反应灵敏、喜动、动作灵活。模型组裸鼠造模后 1 周,活动量明显减少,精神状态以及觅食量较差;造模后 2 周,活动量有所增加,精神状态好转,觅食量较上周增加;造模后 3 周,活动量较上周较小,精神不振,觅食量与上周差异不大;造模后 4 周,下肢肿胀,活动量减弱,精神状态出现烦躁,觅食量与上周差异不大。随着时间推移,模型组裸鼠接种骨肉瘤组织块后,活动量明显减少,精神状态变差,觅食性变差。

2.2 裸鼠体质量变化: 造模后,模型组裸鼠体质量随着天数的增加逐渐增大。当造模第 3 周和第 4 周时,模型组与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

表 1 两组裸鼠各时间点的体质量($\bar{x}\pm s$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
对照组	24.6±4.8	33.4±5.5	38.77±4.7	45.0±4.8
模型组	23.2±5.1	31.5±6.3	48.46±5.3	52.0±6.4
<i>t</i> 值	2.352	2.412	6.244	7.641
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

2.3 肿瘤的生长情况及成瘤率：接种骨肉瘤组织块第 1、2、3、4 周时，模型组测定肿瘤的体积分别为 $(11.04 \pm 4.32) \text{ mm}^3$ 、 $(15.51 \pm 4.78) \text{ mm}^3$ 、 $(21.58 \pm 5.34) \text{ mm}^3$ 、 $(36.25 \pm 6.75) \text{ mm}^3$ ，肿瘤体积随天数的增加逐渐增大。用于造模的 12 只裸鼠全部存活，其中有 1 只未发现瘤体生长，其余均造模成功，成瘤率 91.67%。

2.4 肿瘤的病理学检测结果：对照组接种部位皮下均未见明显异物。模型组皮下肿瘤形体可见明显包膜，较大，瘤体质地较硬，表面呈结节状，表面大量血管分布，显微镜下可见丰富的毛细血管，细胞核有异型且大小不等，核仁约 1~4 个，核分裂相较多。

2.5 血清检测：模型组与对照组相比，ALP 和 P 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ ，表 2)。

表 2 两组裸鼠 ALP、Ca、P 结果比较

组别	ALP/ (U/L)	Ca/ (mmol/L)	P/ (mmol/L)
对照组	284.22 ± 45.11	2.24 ± 0.04	2.37 ± 0.14
模型组	624.17 ± 64.21	2.31 ± 0.07	1.28 ± 0.28
t 值	9.763	1.986	7.034
P 值	<0.05	>0.05	<0.05

3 讨论

目前骨肉瘤动物模型分为自发型、诱导型、肿瘤移植和基因工程。自发肿瘤模型，理论上是很理想的动物模型，在生理和病理状态下与人类骨肉瘤的性状相似，但是由于模型裸鼠存在成瘤时间长、发病率低、稳定性差、均一性差等缺点，因此实际应用极少。化学诱导是以一定浓度并持续往动物体内注射化学物质诱导出恶性骨肉瘤，但是因为存在化学物质对科研人员有害，且造模耗时在 40 周以上，诱导的肿瘤模型重复性低等特点，实验室目前已经很少使用此法。基因工程利用分子技术改造相关基因，构建可模拟部分癌前病变肿瘤模型，但是转基因动物模型依然也有不足之处，诱导的骨肉瘤模型仅有 16.3% 发生于四肢骨（后足和前足），不同于与人类骨肉瘤的好发部位，因此，转基因动物模型仍需进一步研究改良。肿瘤移植通过将肿瘤组织块或细胞株移植到动物模型体内，形成与原发肿瘤相同的肿瘤，再把肿瘤移植到下一代，从而构建动物模型^[2-4]。该方法具有操作容易、均一性好、成瘤率高且成瘤稳定等优点，现在多用于肿瘤成瘤、治疗、浸润、转移等方面的实验研究。本文采用的组织块移植方法是将 UMR-106 骨肿瘤细胞株

移植到受体动物的胫骨髓腔内，使其获得与人体肿瘤相似的微环境以及多种促进肿瘤生长的内源性生长因子，不仅可以改变骨肿瘤细胞株的生长和转移的一些特性，而且可以更好地模拟人原发骨肉瘤浸润的恶性行为和生长特点，获得的移植瘤的生物学特性更接近人体肿瘤的生物学行为。

本文通过采用组织块移植的方法，在受体动物的胫骨髓腔内移植 UMR-106 骨肿瘤细胞株，建立骨肉瘤动物模型，通过观察动物行为特征、动物体质量变化、骨肉瘤生长情况、成瘤率及两组裸鼠血清测定结果来判断骨肉瘤动物模型是否构建成功。结果表明，随着时间推移，模型组裸鼠接种骨肉瘤组织块后，活动量明显减少，精神状态变差，觅食性变差；模型组裸鼠体质量随着天数的增加逐渐增大；肿瘤体积随天数的增加逐渐增大，成瘤率 91.67%；病理学检测显示瘤体形成，且血清中 ALP 显著升高、P 显著降低，以上特征均说明模型动物肿瘤组织呈现典型的骨肉瘤病理表现，生化检测结果与病理所见相吻合。骨肉瘤作为起源于成骨组织的恶性肿瘤，其特征为高水平的成骨活性。在骨代谢过程中，ALP 常用来反映成骨作用，ALP 水平可因罹患骨肉瘤明显升高，并能准确地反映出成骨活动^[5]；Ca、P 常用来反映溶骨。骨肿瘤的发生导致骨吸收和骨生成之间的平衡受到了破坏。因此，可以通过动物模型的血液骨代谢生化及血常规检查可对骨肿瘤进行鉴别与预测^[6]。周斌^[7]也通过对造模后两组裸鼠进行动物行为和体征观察、检测成瘤率及血清 ALP、Ca、P 含量等来评价骨肉瘤裸鼠模型。

总之，本文采用肿瘤移植的方式建立骨肉瘤动物模型，通过观察裸鼠行为特征变化、体质量变化、肿瘤生长状况、成瘤率、肿瘤包块的病理学、血清指标，探讨构建的骨肉瘤动物模型是否成功，为骨肉瘤的进一步研究、治疗等奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Hillers K R, Dernell W S, Lafferty M H, et al. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003) [J]. J Am Vet Med Assoc, 2005, 226 (8): 1364-1367.
- [2] 潘海涛, 杨述华, 刘勇, 等. 可移植性鼠骨肉瘤肿瘤模型的建立 [J]. 华中医学杂志, 2005, 29 (6): 471-472.
- [3] 王忠良, 李旭良, 张德文, 等. 裸鼠骨肉瘤肺转移模型的建立 [J]. 重庆医科大学学报, 2017, 32 (9): 935-939.

(下转第 141 页)

(上接第 136 页)

- [4] 刘振峰, 任晓强, 艾力江·阿斯拉, 等. 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 [J]. 科技导报, 2013, 31 (16): 65-68.
- [5] Singh I, Tsang K Y, Ludwig G D. Alkaline phosphatase and ultrastructural alterations in human osteosarcoma cells in tissue

culture [J]. Eur Surg Res, 1974, 6 (4): 247-263.

- [6] 武湘云, 杨玲. 胫、股骨良恶性骨肿瘤骨代谢指标及血象分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (12): 1676-1678.
- [7] 周斌. 采用组织块移植法快速建立裸鼠原位骨肉瘤模型 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19 (49): 7890-7894.