

## B细胞非霍奇金淋巴瘤小鼠模型的建立

闫金松, 陈雪瑜, 李伟平, 杨岩, 宋振兰

Establishing SCID mouse models of B-cell non-Hodgkin's lymphoma

Jin-Song Yan, Xue-Yu Chen, Wei-Ping Li, Yan Yang and Zhen-Lan Song

**[Abstract]** **Background and Objective:** Recently, the incidence of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is increasing, in which most are aggressive. It is limited for promoting the efficacy of conventional chemotherapy on NHL. In this study, mouse models of B-cell NHL were established for determining the efficacy and mechanisms of novel therapies. **Methods:** Diffuse large B-cell lymphoma SU-DHL-4 cells and Burkitt's lymphoma Daudi cells were injected into SCID (severe combined immunodeficiency) mice through the tail veins to observe the presentations and requirements for establishing mouse models. The Daudi-cell lymphoma mice were divided into control group and rituximab group, and the latter received treatment of rituximab. The tumor onset and survival time of mice were investigated. **Results:** The median onset time of SU-DHL-4-cell NHL in SCID mice was 39.5 days, which presented cachexia, weight loss, erect hair, tardiness, and enlarged tumors in the abdomen, rump or pelvic limb, but without tumor cell infiltration in the liver, spleen or bone marrow. The median onset time of Daudi-cell NHL in SCID mice was 30.5 days, which were characterized by paralyzed lower limbs and died about 9.5 days after paralysation. Most organs such as the liver, kidney, spleen and bone marrow were infiltrated by a number of Daudi cells. After treatment of rituximab, Daudi cells presented typical characters of apoptosis. The median paralysation time and survival time of mice with Daudi-cell NHL were significantly longer in rituximab group than in control group (52.5 days vs. 30.5 days, 76.5 days vs. 40 days,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** SCID mouse models of B-cell NHL can be successfully established with either SU-DHL-4 cells or Daudi cells.

**Key words:** lymphoma, mouse model, Daudi cell, SU-DHL-4 cell, rituximab

**【摘要】** 背景与目的:近年来非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)发病率呈上升趋势,其中侵袭性NHL占了很大的比例,然而传统化疗方案提高NHL疗效的空间有限。本研究旨在建立淋巴瘤小鼠模型,为探讨治疗NHL新方案并研究其药物作用机制提供动物模型。方法:应用人弥漫大B细胞NHL细胞株SU-DHL-4及人Burkitt淋巴瘤细胞株Daudi,经尾静脉注射入SCID小鼠体内,探索建立淋巴瘤小鼠模型的条件及特点。Daudi淋巴瘤小鼠分为对照组及美罗华治疗组,观察小鼠的发病情况及生存时间。结果:SU-DHL-4淋巴瘤小鼠在中位时间39.5 d后开始发病,主要表现为精神萎靡、消瘦、竖毛、活动迟缓,于小鼠腹腔、尾部或后肢部位出现肿块,未发现肝脏、脾脏、骨髓等脏器出现淋巴瘤细胞浸润。Daudi淋巴瘤小鼠于中位时间30.5 d发病,出现双后肢瘫痪,于瘫痪后9.5 d左右死亡。Daudi淋巴瘤小鼠的脏器大多受淋巴瘤细胞的累及,骨髓中出现大量Daudi细胞浸润。美罗华治疗使小鼠骨髓中的Daudi细胞呈现明显的凋亡形态。对照组Daudi淋巴瘤小鼠的中位瘫痪时间及生存时间分别为30.5 d及40 d,美罗华治疗组的小鼠分别为52.5 d及76.5 d,美罗华治疗组小鼠的中位瘫痪时间及生存时间显著延长( $P<0.05$ )。结论:应用SU-DHL-4细胞及Daudi细胞均可以成功建立B细胞NHL小鼠模型。

大连医科大学附属第二医院  
血液科,  
辽宁 大连 116027

Department of Hematology,  
The Second Affiliated Hospital,  
Dalian Medical University,  
Dalian, Liaoning, 116027,  
P. R. China

通讯作者:闫金松  
Correspondence to: Jin-Song Yan  
Tel.: 86.411.84671291.3133  
Email: yanjs\_sh@yahoo.com

收稿日期:2008-01-21  
修回日期:2008-09-03

关键词: 淋巴瘤; 小鼠模型; Daudi 细胞; SU-DHL-4 细胞; 美罗华

中图分类号: R73-3 文献标识码: B

文章编号: 1000-467X(2009)02-0217-04

近年来非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)发病率逐年增加,其中侵袭性及高度侵袭性 NHL 的比例很大<sup>[1]</sup>。按照 REAL 和 WHO 分类,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤占成人 NHL 病例总数的 30%~40% 左右,伯基特淋巴瘤多累及儿童及青少年。上述两种 NHL 的 B 淋巴细胞均表达 CD20<sup>+</sup> 表面标志<sup>[2]</sup>。有关侵袭性 NHL 的大型前瞻性随机研究提示,第二、三代化疗方案与传统的 CHOP 方案相比较,毒性作用明显增加却不延长生存期,通过化疗提高 NHL 疗效的空间有限<sup>[3,4]</sup>,因此改进原有的或探索新的治疗方案十分必要。本研究应用人弥漫大 B 淋巴瘤细胞株(SU-DHL-4 细胞)及 Burkitt 淋巴瘤细胞株(Daudi 细胞)注入重症联合免疫缺陷小鼠(SCID)体内,探索建立 CD20<sup>+</sup> 的 B 细胞 NHL 小鼠模型的条件及其特点,并应用美罗华(抗 CD20<sup>+</sup> 单克隆抗体)处理淋巴瘤小鼠<sup>[5]</sup>,观察并验证对该模型的有效性及反应性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及其培养

细胞株: SU-DHL-4 及 Daudi 细胞来自上海血液体学研究所。细胞培养: 应用添加 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养细胞, 在含 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃ 培养箱中传代培养。

### 1.2 小鼠及饲养条件

6~8 周龄体重均一的雌性 SCID 小鼠购自中国科学院上海斯莱克实验动物有限责任公司(动物合格证号: SCXK(沪)2003-0003)。饲养于屏障设施动物层流室, 饲养温度 24~26℃, 日温差 2℃, 相对湿度 40%~60%, 室内采用人工照明, 饲料经消毒处理, 自由采食。

### 1.3 小鼠模型的建立

先将 12 只小鼠分为 2 组(每组 6 只), 一组经尾静脉注射 Daudi 细胞, 另一组经尾静脉注射 SU-DHL-4 细胞, 各组其中 4 只注射 5×10<sup>6</sup> 细胞, 2 只注射 10×10<sup>6</sup> 细胞, 研究建立小鼠模型的合适细胞数。将 SU-DHL-4 细胞及 Daudi 细胞培养至对数生长期, 离心收集细胞并应用无血清 RPMI 1640 培养液重悬, 每只小鼠经尾静脉注入 5×10<sup>6</sup> 或 10×10<sup>6</sup> 细胞。另将 16 只 SCID 小鼠随机分为对照组(8 只)及

美罗华治疗组(8 只), 给予 Daudi 细胞注射建立淋巴瘤模型。

### 1.4 观察小鼠淋巴瘤模型的发病情况、脏器累及与其病理检查情况

记录 SU-DHL-4 细胞淋巴瘤小鼠的体重、毛发、活动状态、肿瘤生长及脏器浸润情况。在 Daudi 淋巴瘤小鼠中, 以后肢瘫痪作为 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠的发病指标及开始发病日期。记录小鼠的瘫痪时间、发病征象及生存期。观察小鼠脏器病理及骨髓涂片的情况。

### 1.5 药物及应用方法

实验所用的美罗华(10 mg/mL)为商品化药物。美罗华治疗组治疗方法: 于 Daudi 细胞注射后 1 周, 经小鼠尾静脉注射美罗华(25 μg/g), 隔天 1 次, 共 3 次; 对照组小鼠经尾静脉注射等体积生理盐水。(观察项目同 1.4 段)。

### 1.6 统计学检验

采用 SPSS11.5 软件包进行统计处理。应用秩和检验对比对照组及治疗组 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠的发病时间及生存时间。

## 2 结 果

### 2.1 SU-DHL-4 细胞淋巴瘤小鼠模型的观察结果

6 只经尾静脉注射 SU-DHL-4 细胞的 SCID 小鼠, 初步观察注射不同数量细胞后的结果, 其淋巴瘤发生时间及发病情况无明显区别。小鼠于注射细胞中位时间 39.5(37~42) d 开始发病, 主要表现为精神萎靡、消瘦、竖毛、活动迟缓、于小鼠腹腔、尾部或后肢部位出现肿块, 肿块大小约为 2.0 cm×1.5 cm(见图 1A、B)。于注射 SU-DHL-4 细胞第 49 d(约发病 10 d 后) 处死并解剖小鼠, 将肝脏、脾脏、肾脏和骨髓等器官行病理切片检查, 结果未发现 SU-DHL-4 细胞浸润上述器官及组织。

### 2.2 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠模型的观察及药物治疗结果

2.2.1 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠模型的发病情况及发病指标 6 只 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠模型的 SCID 小鼠, 结果发现注射不同数量细胞的小鼠其淋巴瘤发病时间及发病情况无明显区别。在注射细胞后 2 周内, 小鼠活泼, 活动能力及生长状态良好, 体重呈逐渐增加趋势。注射细胞时小鼠平均体重 16.9±0.7 g, 注射后 2 周增加至 22.0±0.9 g。注射 Daudi 细胞 2 周后, 小鼠逐渐出现体重增长停滞并出现消瘦状态、精神萎靡、竖毛、活动迟缓。于注射

Daudi 细胞中位时间 30.5(29~32) d 时, 小鼠出现双后肢瘫痪, 依靠双前肢爬行, 消瘦明显, 平均体重下降至  $14.1\pm0.8$  g, 并于瘫痪后 9.5 d 左右死亡(图 1A、C)。

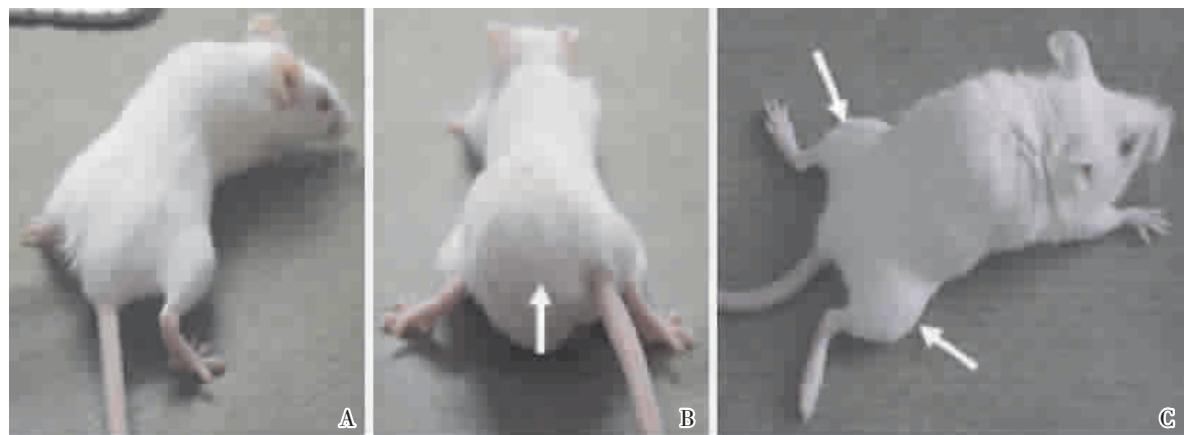


图 1 应用 CD20<sup>+</sup> B 淋巴瘤细胞株建立 NHL 小鼠(SCID)模型

Figure 1 SCID mouse models of non-Hodgkin's lymphoma established with CD20-positive B-cell lymphoma cells

A: A SCID mouse in control group. B: A SCID mouse with SU-DHL-4-cell lymphoma has enlarged tumor in the rump. C: A SCID mouse with Daudi-cell lymphoma has paralyzed limbs.

2.2.2 接受美罗华治疗的 Daudi 细胞淋巴瘤模型小鼠的发病时间及生存时间 实验发现对照组小鼠在注入细胞后中位时间 30.5 d 发病, 表现为后肢瘫痪(图 1A、C), 其中位生存时间为 40(39~42) d; 美罗华治疗组经美罗华治疗后, 中位瘫痪时间为 52.5(47~67) d, 生存时间 76.5(74~78) d, 较对照组小鼠的生存时间明显延长, 差异具有显著性( $P<0.05$ )。

2.2.3 接受美罗华治疗的 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠的组织与脏器中 Daudi 细胞浸润情况 将发病后

的 Daudi 淋巴瘤小鼠处死并解剖, 发现对照组小鼠的脏器大多受 Daudi 细胞累及, 例如存在腹腔肿块、肾脏周边肿瘤包裹、脾脏明显肿大; 病理切片证实有些小鼠肝脏存在 Daudi 细胞浸润; 所有发病小鼠的骨髓中存在大量浸润的 Daudi 细胞, 该细胞大量成堆生长, 具有典型 Daudi 细胞的形态学特点。而接受美罗华治疗的小鼠, 其脏器累及情况轻, 未见明显腹腔肿物, 脾脏多无肿大, 其骨髓涂片发现形态学上 Daudi 细胞明显的凋亡现象(图 2)。

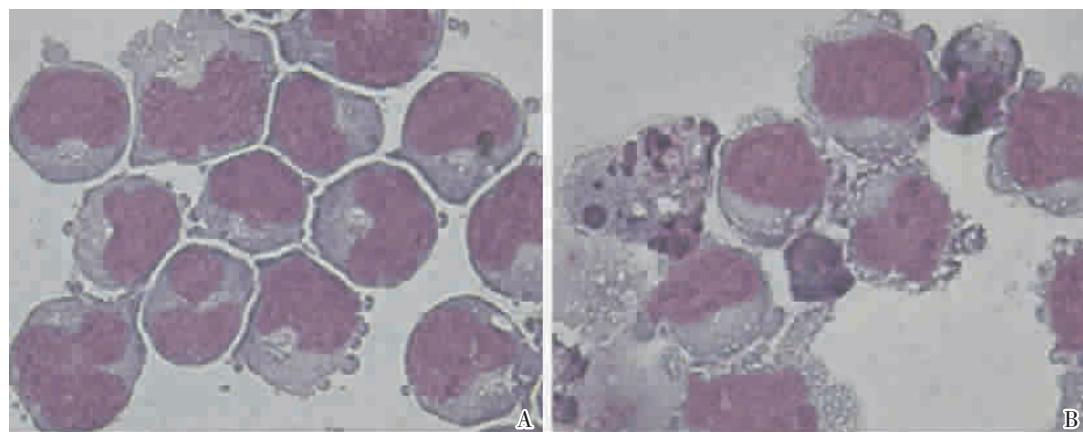


图 2 美罗华治疗前后 Daudi 淋巴瘤小鼠骨髓中 Daudi 细胞浸润情况 (Wright-Giemsa  $\times 100$ )

Figure 2 Daudi cell infiltration in the bone marrow of SCID mouse with Daudi-cell lymphoma (Wright-Giemsa  $\times 100$ )

A: Daudi cells infiltrated in the bone marrow of a SCID mouse without treatment of rituximab.

B: After treatment of rituximab, Daudi cells infiltrate in the bone marrow of a SCID mouse, and present typical characters of apoptosis.

### 3 讨 论

应用 SU-DHL-4 细胞及 Daudi 细胞均可以成功建立 CD20<sup>+</sup> B 细胞 NHL 小鼠模型。实验结果发现应用 SU-DHL-4 细胞建立的淋巴瘤小鼠模型,发病时间较晚,病程进展较缓慢,生存时间较长,发病部位较局限,其淋巴瘤肿物大多位于尾部及腹部,未发现肝脏、脾脏、骨髓等脏器或组织的淋巴瘤细胞浸润。Daudi 细胞株来源于 Burkitt 淋巴瘤患者,其致病性及侵袭性强,易体内播散。本研究所建立的 Daudi 细胞淋巴瘤小鼠模型发现,Daudi 细胞累及小鼠多个脏器及组织,在脾脏、肝脏、外周血、骨髓等均可以发现大量的 Daudi 细胞浸润,小鼠发病时间较早,病程进展快,发病后 9.5 d 左右死亡。用于判断小鼠发病的后肢瘫痪体征则是由于 Daudi 细胞累及中枢神经系统所致<sup>[6,7]</sup>。本研究中应用 Daudi 细胞建立的 NHL 模型,其发病表现、发病时间及生存时间等与相关文献报道的<sup>[8]</sup>相一致。

上述两细胞均表达 CD20<sup>+</sup>, 对 CD20<sup>+</sup> 的 NHL 细胞,美罗华可以通过依赖补体(CDC)和依赖抗体的细胞介导(ADCC)细胞毒性机制来消除肿瘤细胞,并通过多条细胞信号通路,影响细胞的增殖、分化、活化及凋亡等生理过程<sup>[9]</sup>。因此本研究中接受美罗华治疗的小鼠,骨髓中浸润的 Daudi 细胞明显凋亡,其生存时间明显延长,提示应用美罗华的靶向治疗具有显著的疗效。

淋巴瘤细胞耐药是传统化疗效果欠佳并导致淋巴瘤复发的原因之一。近年来随着淋巴瘤发病机制的深入研究,根据淋巴瘤发生机制中不同治疗靶点所设计的治疗手段,可以获得更好的疗效。如组蛋白去乙酰化酶抑制剂或蛋白酶体抑制剂可通过不同的机制,抑制肿瘤细胞的增殖和生长,促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[10,11]</sup>,而以上述药物为代表的新药应用于 NHL 的治疗尚处于研究中。选择淋巴瘤的不同治疗靶点并将上述药物应用于 NHL 的治疗,改进治疗方案或者探索新的治疗药物的组合并阐明其治疗机制,将是下一步研究的重点。

本研究成功建立了 CD20<sup>+</sup> B 细胞的 NHL 小鼠模型,根据建立该模型的条件可以建立所需的其他细胞类型淋巴瘤模型。这为研究新药物及其疗效

提供动物模型,并为阐明淋巴瘤的治疗机制奠定基础。

### [参 考 文 献]

- [1] Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(1):68-276.
- [2] Stein R, Qu Z, Chen S, et al. Characterization of a humanized IgG4 anti-HLA-DR monoclonal antibody that lacks effector cell functions but retains direct antilymphoma activity and increases the potency of rituximab [J]. Blood, 2006, 108(8):2736-2744.
- [3] Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma [J]. N Engl J Med, 1993, 328(14):1002-1006.
- [4] Montserrat E, Garcia-Conde J, Vinolas N, et al. CHOP vs. ProMACE-CytaBOM in the treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphomas: long-term results of a multicenter randomized trial. (PETHEMA: Spanish Cooperative Group for the Study of Hematological Malignancies Treatment, Spanish Society of Hematology) [J]. Eur J Haematol, 1996, 57(5):377-383.
- [5] Smith MR, Jin F, Joshi I. Enhanced efficacy of therapy with antisense BCL-2 oligonucleotides plus anti-CD20 monoclonal antibody in scid mouse/human lymphoma xenografts [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(12):1693-1699.
- [6] Ghetie MA, Tucker K, Richardson J, et al. The antitumor activity of an anti-CD22 immunotoxin in SCID mice with disseminated Daudi lymphoma is enhanced by either an anti-CD19 antibody or an anti-CD19 immunotoxin [J]. Blood, 1992, 80(9):2315-2320.
- [7] Gillies SD, Lan Y, Williams S, et al. An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma [J]. Blood, 2005, 105(10):3972-3978.
- [8] Ghetie MA, Richardson J, Tucker T, et al. Disseminated or localized growth of a human B-cell tumor (Daudi) in SCID mice [J]. Int J Cancer, 1990, 45(3):481-485.
- [9] Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia [J]. Drugs, 2003, 63(8):803-843.
- [10] Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent [J]. Oncogene, 2007, 26(9):1351-1356.
- [11] Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, et al. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies [J]. Cancer, 2005, 104(9):1794-1807.

[编辑:杨允贵;校对:夏宁静]