

脊柱转移瘤动物模型的比较及研究进展

代 国 郑 迪 余 铃 郭卫春

摘 要 脊柱是恶性肿瘤骨转移的常见部位,晚期乳腺癌、肺癌、前列腺癌等患者大多可出现脊柱转移。肿瘤脊柱转移造成椎体溶骨性破坏,病理性骨折,从而导致脊柱不稳,再则出现疼痛以及神经功能损害等一系列骨相关事件,使患者生活质量严重下降。目前,对于恶性肿瘤脊柱转移的过程,以及其随后在脊柱中继续生长,侵袭的机制尚缺深入了解。因此,建立一个能有效模拟肿瘤在人体内侵袭、转移过程的动物模型以便于深入研究显得至关重要。本文综述了近些年国内外研究者们常用的建立脊柱转移瘤的动物模型及其方法,比较其优缺点,为研究者们提供参考。

关键词 脊柱转移 动物模型 肿瘤 进展

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.041

肿瘤是严重威胁人类健康和生命的首要疾病,转移是恶性肿瘤的一个重要标签,超过 90% 的肿瘤患者死于转移灶,而脊柱是恶性肿瘤发生骨转移的常见部位之一^[1,2]。肿瘤脊柱转移造成椎体溶骨性破坏,病理性骨折,从而导致脊柱不稳,再则出现疼痛以及神经功能损害等一系列骨相关事件,使患者生活质量严重下降。所以加强对脊柱转移瘤发生机制的研究,为肿瘤的靶向治疗提供理论基础,已成为当务之急。而如何有效的模拟人体恶性肿瘤的脊柱的转移过程,以及其随后在脊柱中定植、生长、侵袭的机制,都需要建立一个有效的实验动物模型,并且该模型应具有良好的重复性,有效性和便捷性也是研究者们需要考虑的问题。在肿瘤脊柱转移模型的建立中:癌细胞系的选择,实验动物的筛选,脊柱转移瘤的建立方式,动物的行为评定,活体动物成像是其 5 个重要方面。目前,许多研究已经建立了多种脊柱转移瘤的动物模型,但各有优劣。本文就上述 5 个方面综述国内外研究者常用的建立脊柱转移瘤动物模型的方法,比较其优缺点,为研究者提供参考。

一、癌细胞系的选择

1. 动物癌细胞系:早些年用于脊柱转移瘤动物模型的癌细胞系来源与动物种系相同:Ushio 等^[3]将 Walker-256 大鼠乳腺癌细胞注射在大鼠胸 12 前建立脊柱转移瘤的模型,进而造成脊髓压迫从而研究地

塞米松的治疗效果。Ikeda 等^[4]将兔 VX2 病毒诱导的表皮癌细胞注射在兔胸 13 前建立脊柱转移瘤的模型,从而研究硬膜外肿瘤致脊髓受压导致的水肿与循环障碍。虽然动物癌细胞系可以成功的建立脊柱转移瘤的动物模型,但是毕竟与人类癌细胞系存在差异,为了更好的模拟人体内肿瘤的转移、侵袭过程,使用人类癌细胞系建立脊柱转移瘤的动物模型无疑是更好的选择。

2. 人类癌细胞系:MDA-MB-231、MT-1、CRL-166 乳腺癌细胞系,PC-3 前列腺癌细胞系和 PC-14 肺癌细胞系是目前常用的人类癌细胞系,组织学研究已经证实这些癌细胞系具有在椎体内成瘤的能力,并能侵入硬膜外间隙导致脊髓压迫^[5-8]。Liang 等^[6]将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系经腹腔注入雌性无胸腺大鼠 VB L5 中,成功的建立了单椎体转移瘤模型。Burch 等^[9]将 MT-1 乳腺癌细胞系心室内注射入无胸腺大鼠中,进而研究光动力疗法治疗脊柱转移瘤的效果。需要注意的是,无论是使用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系,还是 MT-1 乳腺癌细胞系或 PC-14 肺癌细胞系,所选的动物均是免疫缺陷的动物,这就意味着无法研究免疫反应在肿瘤进展中的作用,因而一定程度上限制了研究的范围。

二、实验动物的选择

鼠类和兔是最常用的实验动物。2004 年,Takahashi 等^[10]将 VX2 瘤株注入兔 L3 椎弓根中建立脊柱肿瘤模型以研究脊柱肿瘤导致的截瘫。2008 年,Wang 等^[11]将 VX2 瘤株注入兔乳腺中,用以评估 MRI、PET/CT 等影像学检测手段在肿瘤生长、转移中的作用,结果在第 51 天有 1 只(4%)兔出现腰椎转

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341078)

作者单位:430060 武汉大学人民医院

通讯作者:郭卫春,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:

2218331865@qq.com

移瘤。2012 年, Zibly 等^[8]将 CRL - 166 乳腺癌瘤体组织经后路植入脊髓后方, 造成脊髓压迫症状的模型, 很好地模拟了临床上肿瘤脊柱转移造成的脊髓压迫。近年来, 也有一些其他的研究者使用兔子作为实验动物以建立脊柱转移瘤模型。裸鼠和 SCID 小鼠则是最常用的鼠类。裸鼠是天生胸腺缺陷小鼠, 缺乏 T 淋巴细胞, 免疫力缺陷, 对于异体物质没有明显的排斥反应, 是肿瘤研究中较为常用的实验动物; SCID 小鼠则同时缺乏 T 和 B 淋巴细胞, 为联合免疫缺陷小鼠, 对异种移植的人类肿瘤细胞和组织不能产生免疫排斥反应, 较裸鼠在成瘤率和转移率方面更高, 但同时价格也更加昂贵^[12]。

选择何种动物建立模型更有利于研究, 目前尚无定论。与鼠类相比, 兔子的体型较大, 操作起来更为简单, 但同时兔子价格比较高, 饲养起来比较麻烦, 最为重要的是癌细胞系的选择比较有限, 而鼠类的价格相对来说较为便宜, 与人类的基因序列更为接近, 有着类似的器官系统, 因此, 近年来越来越多的学者使用裸鼠或 SCID 小鼠来建立脊柱转移瘤的动物模型。

三、脊柱转移瘤的建立

在人体, 恶性肿瘤转移是自发进行的, 晚期乳腺癌、肺癌、前列腺癌等患者大多会出现脊柱转移, 然而, 在实验动物中, 大部分原发性肿瘤不转移或者转移到骨骼十分罕见, 因此, 注射肿瘤细胞进入动物体内是最常见的建模的方法, 主要分为两种, 系统注射和局部接种。

在鼠类, 系统注射目前应用得最多的两种方法是经尾静脉注射和左心室内注射。经尾静脉注射需要将动物固定, 消毒后用注射器将癌细胞系注入尾静脉即可, 而左心室内注射则显得繁琐许多, 在动物全身麻醉后, 常规消毒铺巾, 切开胸前皮肤, 暴露肋骨, 将注射器插入左心室(鲜红色的动脉血回流提示位置正确), 再注入癌细胞系^[13-15]。系统注射模拟了肿瘤细胞血行转移途径, 同时也导致不同的器官位点出现转移瘤, 如肺脏、肝脏、骨骼等, 脊柱只是其中位点之一, 因而重复性较差^[16]。很多实验动物在还没有出现肿瘤脊柱转移之前就已经因为多发转移而死亡, 而剩下的动物往往有多部位转移, 此外, 从癌细胞系注射进动物体内到形成脊柱转移瘤所用时间较长, 这也进一步增加了研究的负担。

局部接种根据接种部位的不同可进一步分为椎旁接种、椎弓根接种、椎体接种等。Ushio 等^[3]将乳腺癌细胞经皮注入 Wistar 大鼠胸 12 或胸 13 椎体旁, 4

周后肿瘤生长并通过椎间孔压迫脊髓导致截瘫; Takahashi 等^[10]通过后路暴露腰 3 椎体, 并在左侧椎弓根钻出一个 2mm 左右的洞, 植入癌细胞后用骨蜡密封, 大部分动物在 5 周内出现截瘫, 剩下的在出现神经功能缺损之前死于肺转移。Liang 等^[5]通过前路暴露裸鼠 VB L5, 用针头穿过皮质骨, 将癌细胞悬液或者磷酸盐缓冲液注入椎体, 术后第 1 天就通过 micro - PET 在脊柱中检测到肿瘤信号, 并用 qCT 和 micro - CT 发现在出现骨质溶解之前骨密度出现了短暂的上升。与系统注射相比, 局部接种具有重复性好, 造模时间短等优点。但局部接种对手术操作要求较高, 可能会出现感染、出血、死亡等并发症^[17]。此外局部接种作为一个侵入性操作, 特别是椎弓根接种和椎体接种, 它本身就会引起椎体的骨质重建, 对研究肿瘤所致椎体骨质改变产生干扰。最为重要的是, 局部接种直接跳过了肿瘤血行转移的过程, 因此无法研究这其中的分子机制, 故而在一定程度上限制了研究的范围。

四、动物的行为学评定

晚期肿瘤脊柱转移造成椎体溶骨性破坏, 病理性骨折, 从而导致脊柱不稳, 再则出现疼痛以及神经功能损害等一系列骨相关事件, 使患者生活质量严重下降。在实验动物中, 当肿瘤压迫脊髓时, 实验动物会出现步态异常, 后肢肌力下降, 奔跑行走站立不能, 甚至截瘫等表现, 也有一些学者观察到实验动物出现大小便失禁等症状^[3]。总的来说, 在实验动物中, 最简单的评定方式是观察实验动物能否正常站立、行走或者奔跑^[18]。Ushio 等^[3]将大鼠后肢肌力分为 0 ~ 6 级: 0 级 正常; 1 级 轻度乏力伴奔跑时髌关节不稳; 2 级 中度乏力但仍然奔跑; 3 级 可以行走但不能奔跑; 4 级 可以站立但不能行走; 5 级 不能站立但肢体还有轻微活动; 6 级 截瘫。根据上述动物的行为学表现, 可以从大体上判断脊柱转移瘤对实验动物功能的损害, 进而进行一些相关的研究。

五、活体动物成像

目前, 临床上常用的影像学检查方式包括 X 线平片、CT、MRI 和 PET 等, 它们在脊柱转移瘤的诊断上发挥着重要作用。同样, 这些检查方式也可以用于实验动物, 以监测肿瘤的生长、侵袭、转移等。此外, 一些新的技术也常用于实验动物。生物发光成像是用转染荧光素酶基因的癌细胞系建模, 外源(腹腔或静脉注射)给予其底物荧光素, 即可在几分钟内产生发光现象, 它可以检测到骨髓中 0.5mm³ 以上癌灶,

具有敏感度高,特异性高的优点^[19]。但同时也有信号较弱,检测时间较长,仪器精密度要求高,需要注入荧光素,实验成本高等不足。荧光成像则是用转染绿色荧光蛋白基因的癌细胞系建模,利用绿色荧光蛋白发光的特性,通过高度灵敏的电荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)捕捉光信号,进而研究肿瘤在动物体内的生物学行为,与生物发光成像相比,具有信号强度大,成像速度快 实验成本低的优势,但在敏感度和特异性方面则略微不及。所以,选择何种成像系统,取决于具体的实验目的。

六、展 望

脊柱是恶性肿瘤骨转移的常见部位,晚期乳腺癌、肺癌、前列腺癌等患者大多会出现脊柱转移。肿瘤脊柱转移可导致脊柱不稳,病理性骨折,疼痛以及神经功能损害等一系列骨相关事件,使患者生活质量严重下降。近年来,在脊柱转移瘤的诊断和治疗方面已经取得了长足的进步,但是仍无法有效的延长患者的生存期。研究恶性肿瘤脊柱转移的过程,以及其随后在脊柱生长,侵袭的机制,可能为脊柱转移瘤的治疗提供一个思路。因此,建立一个模拟恶性肿瘤在人体内转移、侵蚀过程的动物模型的以便于研究至关重要,而现有的脊柱转移瘤模型均存在各自的不足,未来,一个更具有代表性、重复性、有效性和实用性的动物模型需要研究者们进一步探索。

参考文献

- 1 Sleeman J, Steeg PS. Cancer metastasis as a therapeutic target[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 1177-1180
- 2 Expert Panel on Radiation Oncology - Bone Metastases, Lo SS, Lutz ST, *et al*. ACR appropriateness criteria ® Spinal bone metastases[J]. *J Palliat Med*, 2013, 16(1): 9-19
- 3 Ushio Y, Posner R, Posner JB, *et al*. Experimental spinal cord compression by epidural neoplasms[J]. *Neurology*, 1977, 27(5): 422-422
- 4 Ikeda H, Ushio Y, Hayakawa T, *et al*. Edema and circulatory disturbance in the spinal cord compressed by epidural neoplasms in rabbits[J]. *J Neurosurg*, 1980, 52(2): 203-209
- 5 Liang H, Ma S Y, Mohammad K, *et al*. The reaction of bone to tumor growth from human breast cancer cells in a rat spine single metastasis model[J]. *Spine*, 2011, 36(7): 497
- 6 Schuster J, Zhang J, Longo M. A novel human osteoblast-derived severe combined immunodeficiency mouse model of bone metastasis

- [J]. *J Neurosurg: Spine*, 2006, 4(5): 388-391
- 7 Tatsui CE, Lang FF, Gumin J, *et al*. An orthotopic murine model of human spinal metastasis: histological and functional correlations: Laboratory investigation[J]. *J Neurosurg: Spine*, 2009, 10(6): 501-512
- 8 Zibly Z, Schlaff CD, Gordon I, *et al*. A novel rodent model of spinal metastasis and spinal cord compression[J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13:137
- 9 Burch S, Bisland S K, Bogaards A, *et al*. Photodynamic therapy for the treatment of vertebral metastases in a rat model of human breast carcinoma[J]. *J Orthopaedi R*, 2005, 23(5): 995-1003
- 10 Takahashi M, Ogawa J, Kinoshita Y, *et al*. Experimental study of paraplegia caused by spinal tumors: an animal model of spinal tumors created by transplantation of VX2 carcinoma[J]. *Spine J*, 2004, 4(6): 675-680
- 11 Wang L, Yao Q, Wang J, *et al*. MRI and hybrid PET/CT for monitoring tumour metastasis in a metastatic breast cancer model in rabbit[J]. *Nuclear Med Commun*, 2008, 29(2): 137-143
- 12 Jin K, Tenq L, Shen Y, *et al*. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review[J]. *Clin Transl Oncol*, 2010, 12(7): 473-480
- 13 Takahashi M, Miyazaki H, Furihata M, *et al*. Chemokine CCL2/MCP-1 negatively regulates metastasis in a highly bone marrowmetastatic mouse breast cancer model[J]. *Clin Exp Metastas*, 2009, 26(7), 817-828
- 14 Burch S, Bisland SK, Wilson BC, *et al*. Multimodality imaging for vertebral metastases in a rat osteolytic model[J]. *Clin Orthopaed Related Res*, 2007, 454: 230-236
- 15 Strube A, Stepina E, Mumberg D, *et al*. Characterization of a new renal cell carcinoma bone metastasis mouse model[J]. *Clin Exp Metastas*, 2010, 27(5): 319-330
- 16 Bäuerle T, Adwan H, Kiessling F, *et al*. Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein[J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(2): 177-186
- 17 Mantha A, Legnani FG, Bagley CA, *et al*. A novel rat model for the study of intraosseous metastatic spine cancer[J]. *J Neurosurg: Spine*, 2005, 2(3): 303-307
- 18 Amundson E, Pradilla G, Brastianos P, *et al*. A novel intravertebral tumor model in rabbits[J]. *Neurosurgery*, 2005, 57(2): 341-346
- 19 Tanaka K, Toiyama Y, Okugawa Y, *et al*. In vivo optical imaging of cancer metastasis using multiphoton microscopy: a short review[J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(3): 179-187

(收稿日期:2016-04-10)

(修回日期:2017-04-22)