论著

T和NK细胞联合免疫功能缺陷型——PBI/2 beige裸鼠的培育及其在癌生物学研究中的初步应用*

孙 靖 汪宝平 吴秉铨[1] 褚建新[2] 钱振超[3] 陆应麟[4]

（中国药品生物制品检定所，北京）

摘 要 将PBI/1裸鼠（即615/PBI裸鼠）的裸基因(nu)导入NK细胞缺陷的615/PBI beige鼠，育成二联合缺陷型PBI/2 beige裸鼠（即615.B_6/PBI beige裸鼠）。经遗传和表型特征以及免疫特性等方面检查，证实该PBI/2 beige裸鼠具有T和NK细胞联合免疫功能缺陷特性，并已初步应用于肿瘤异质性，肿瘤转移因素，肿瘤转移遗传机理，肿瘤免疫研究以及难移植成功的人类肿瘤异种移植模型的建立。

关键词 T和NK细胞联合免疫功能缺陷 beige裸鼠 癌生物学

作者为了满足国内实验肿瘤研究的需要，在完成同源系PBI/1裸鼠和非同源系615·B_6/PBI-beige鼠的基础上，在国内又首次成功地培育出二联免疫缺陷的同源系 C_{57}BL/6PBI beige裸鼠[1]和非同源系PBI/2beige鼠裸[2]。本文主要报导 PBI/2beige裸鼠的培育、特性以及在癌生物学研究中的初步应用。

材料与方法

一、亲代动物

1.受体动物：615/PBI beige鼠．NK活性低，与人类Chediak-Higashi综合症相似。作者以615/PBI近交系小鼠与C_{57}BL/6 beige小鼠经M_3育成，基因符号以‘bg’表示。

2.供体动物：PBI/1裸鼠，T 细胞功能缺陷，作者以昆明远交群中突变的无毛鼠与615/PBI小鼠经M_6+N_3而育成[3]，基因符号以‘nu’表示。

以上两系小鼠核心群，临产前经剖腹净化手术饲养于无菌隔离器内，按无菌动物控制标准进行饲养，导入群饲养于屏障系统内，按SPF动物标准进行饲养管理。

二、培育方法 根据位于非同源染色体上的两对非等位基因（nonallelic gene）减数分裂时可以自由组合而不融合，各自保持其原有特性的细胞遗传学原理，采用杂交-互交（cross-intercross）和杂交-回交（intercoss-backcross）方法[4]进行培育。

三、基本特性检查 参考田嶋嘉雄[5]、Slivers[6]、京极方久[7]等有关资料，对PBI/2 beige裸鼠的基因分离率、表型特征、凝血时间、嗜中性白血球和虹膜、脉络膜色素细胞等

1.北京医科大学 2.中国医学科学院血液学研究所 3.大连医学院 4.中国人民解放军总医院·

* 本文为国家七五攻关项目

特征进行检测，并采用^{51}Cr标记的体外细胞毒试验[8]和^{3}H-TdR掺入法测定NK细胞活性及脾细胞对ConA诱导的增殖反应。

四、实验肿瘤学应用研究的材料和方法 见文献[9~13]。

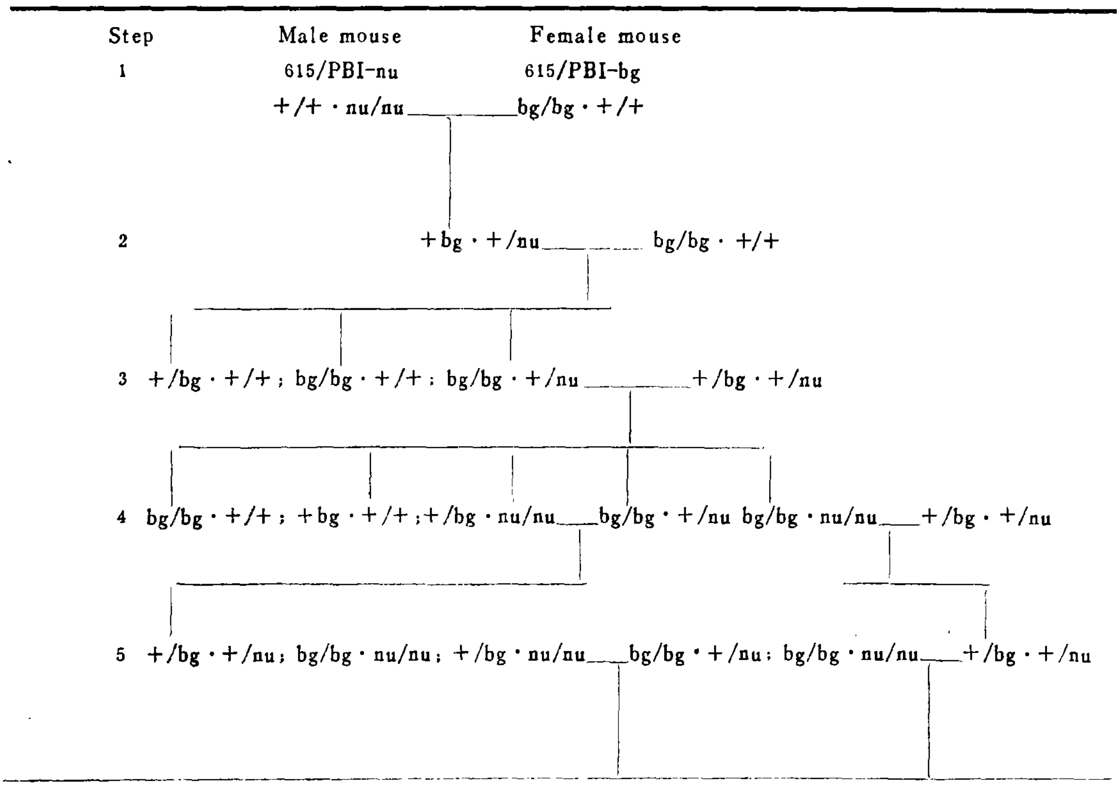
结 果

一、PBI/2beige裸鼠的主要生物学特性

该PBI/2 beige裸鼠，通过五个交配步骤（图1）育成。经五组不同基因组合（bg/bg·+/nu×+/+·nu/nu；+/bg·+/nu×+/bg·+/nu；bg/bg·+/nu×bg/bg·nu/un；+/bg·+/nu×bg/bg·nu/nu；bg/bg·+/nu×/bg/bg·nu/nu）交配所生九种基因型（+/?·+/?；bg/bg·+/?；+/bg·+/nu；bg/bg·+/nu；+/+·nu/nu；+/bg·nu/nu；bg/bg·nu/nu；+/?·+/nu；+/bg·+/?）小鼠比例证明，其遗传特性是受两对非等位基因控制，属于常染色体隐性遗传，符合孟德尔的两对非等位基因分离重组规律[5, 6]。

图1 PBI/2 beige裸鼠杂交-回交-互交培育图

Fig1 Production of PBI/2 beige Nude Mouse by the Cross-Backcross-Intercross Breeding System



该PBI/2 beige裸鼠具有裸鼠和beige鼠的主要生物学特性，其表型为裸体，毛干萎缩，毛囊角化，无肉眼可见胸腺，胸腺残迹是由一组扩张的腺管、腺泡、脂肪及少数淋巴细胞组成。该小鼠耳廓及尾巴皮肤苍白，虹膜和脉络膜色素变浅，并形成一个深色颗粒的色素环。

末梢血液检查结果表明：出血时间延长，嗜中性白细胞内含有巨大异常颗粒。

^{51}Cr体外细胞毒试验表明，PBI/2beige裸鼠NK细胞活性为9.2±2.4，明显低于PBI/1裸鼠（39.2±3.6）和BALB/c裸鼠（31.7±4.6）（$P<0.01$），介于beige鼠（3.8±1.0）与免疫功能正常的615/PBI小鼠（17.2±3.6）之间。对ConA诱导的增殖反应结果，在PBI/2 beige 裸鼠为1600±400，与PBI/1裸鼠（1700±500）和BALB/c裸鼠（1400±500）相当（$P<0.05$）[2, 6, 8]。

二、PBI/2 beige裸鼠在癌生物学研究中的应用

1.肿瘤转移因素和肿瘤异质性研究：人类肺腺癌（PAa）移植瘤在BALB/c裸鼠体内属于低转移和不转移癌系。作者取第35、38代PAa移植瘤分别移植于BALB/c裸鼠（对照组）和PBI/2beige裸鼠（实验组），带瘤观察70～110d结果表明，对照组仍未发现转移（0/7），而实验组出现转移，淋巴结转移率为36.3%（4/11），值得一提的是首次出现肺转移。其转移率为9%（1/11）[9]。

克隆化的人肺巨细胞癌细胞系（PLA-801）C株，在 BALB 裸鼠表现低成瘤性，而在PBI/2 beige裸鼠则不仅表现很高的成瘤性，而且可产生自发性远隔器官的肿瘤性转移[10]。

以上结果证明，肿瘤细胞确实存在异质性，肿瘤群体细胞中不同亚系瘤细胞对 NK 细胞杀伤具有不同的敏感性，这为探讨NK细胞数量和活性与机体抗肿瘤的生长及转移关系提供了新的探索途径和有意义的实验依据。

2.肿瘤免疫保护效应的实验研究：作者用丝裂霉素C处理的L615白血病瘤苗进行主动免疫或转输正常615供鼠脾细胞，能在免疫功能正常615小鼠、NK细胞低活性的beige鼠体内诱致免疫保护效应，而对T细胞缺陷的PBI/1裸鼠和T、NK细胞缺陷的PBI/2 beige裸鼠则无效。若将beige鼠或裸鼠脾细胞转输给正常小鼠，同样可产生保护效应，而转输beige裸鼠脾细胞则不然。这些结果表明，诱导受鼠产生免疫预防效应的脾细胞成分是T和（或）NK 细胞，它们只有在受鼠体内有T细胞的条件下才可能使其产生免疫预防效应；同样，MMC-L615瘤苗诱导的主动免疫保护效应也是通过体内T细胞中介实现的[11]。

3.肿瘤转移遗传机制的实验研究：作者将在不同遗传背景（BALB/c，NIH，615，C_{57}BL/6）裸鼠已移植100代以上，淋巴结转移率为94%（110/117），肺转移率为83%（97/117）的高转移人肺巨细胞移植瘤PG瘤细胞中提取的高分子量DNA片段，转染 NIH/3T3小鼠纤维母细胞获得的一个转化克隆TF87-2-10，皮下接种于NK细胞活性不同的NIH 裸鼠，BALB/c裸鼠和beige裸鼠体内，发现该转化细胞的转移率与宿主NK细胞活性呈负相关。转移率为NIH裸鼠0%（0/10），BALB/c裸鼠20%（5/25），beige裸鼠46%（6/13）。DNA分子杂交显示该细胞基因组中整合有人DNA序列，说明该转化细胞转移表型的获得与 DNA转染有关[12]。

4.非beige裸鼠体内难移植成功的人类T淋巴细胞白血病细胞beige裸鼠异种移植模型的建立：作者成功地在PBI/2 beige裸鼠建立了人T淋巴细胞系（CEM）瘤株（CEM/HI瘤），在beige裸鼠传至三代后转入BALB/c裸鼠，移植成功率达90～100%。其淋巴结转移率为59.1%（13/22），肝、脾转移率为31.8%（7/22）[13]。这是造血系统恶性细胞的裸鼠移植瘤中极少见的现象。

讨　论

当bg基因隐性纯合时，可影响颗粒细胞（NK细胞、色素细胞等）的趋化性，影响色素生成，使前黑色体（premelanosome）和黑色体（melanosome）聚集融合而形成巨大异常色素颗粒，此特征在研究人和小鼠NK细胞活性低下的 chediak-Higashi 综合征时得到证实[5, 14]，这些细胞的形态学变化是检测NK细胞活性正常与否的主要特征。可通过细胞染色在显微镜下进行观察，其肉眼可见的表型可用于鉴别beige裸鼠和非beige裸鼠，从而代替文献报导的末梢血液嗜中性白血球检查鉴别法[15]。

与T和 NK 细胞免疫功能缺陷有关的基因，目前已报导的有八对，其中bg（beige）；hr（hairless）；me（metheaton）；ob(obese)；se（steel）和w（dominant sporting）等六对基因可引起NK细胞活性下降；而nu（nude）和Lyr（Lymphoperoliferation）基因可使NK 细胞活性增高[16]。本文报导的PBI/2 beige裸鼠是由bg和nu两个不同的非等位基因复合而成，但仍保持两个非等位基因独立特性，在免疫功能缺陷动物模型的培育中，占有重要地位[17]。它是研究人体免疫机理和免疫监控[18]。人类肿瘤异质性，肿瘤转移因素，肿瘤转移遗传机理，药物敏感性以及造血系统调控因素的极有价值的动物模型。可以预见，这一新型的T和NK细胞联合缺陷的beig裸鼠，必将为医学科学研究作出新的更大的贡献。

（本文获中国实验动物学会第一届论文评比一等奖）

参 考 文 献

1.孙靖，等.畜牧兽医学报 1989；增刊2期：100

2.Sun Jing, et al.Immuno-Deficient Animals in Experimental Medicine, 1st, Switzerland, Bing-quan Wu et al., 1989; 50～53

3.孙靖,等.上海实验动物科学 1985; 5（1）：65

4.Green EL. The Mouse in Biomedical Research, Vol 1, 2ed, Academic Press, Foster et al., 1981：180～229

5.田嶋嘉雄，等.实验动物概论.朝仓书店.第一版，1979

6.Silvers WK. The Coat Color Of Mice, Springer-Verlag, 1979：125

7.京极方久.难治疾患のモデルと动物実験ーヒト疾患との共通理解のために,Tokyo: Soft Science Inc., 1984：264

8.Haree K, et al.Int J Concer 1980; 26：789

9.吴秉铨，等.中华肿瘤学杂志 1988; 10（1）：1

10.Lu Yinglin, et al.Abstract of 6th International Workshop on Immune-Deficient Animals in Biomedical Resrarch, Beijing, Bing-quan Wu, 1988：22

11.Qian ZC, et al. Immune-Deficient Animals in Experimental Medicine, 1st, Switzerland, Bing-quan Wu et al., 1989：95～96

12.Fang WG, et al.Immune-Deficient Animals in Experimental Medicine, 1st, Switzerland Bing-quan Wu et al., 1989：112～117

13.Jianxin Chu, et al.Abstract of 6th International Workshop on Immune-Deficient Animals In Biomedical Research, Bijing, Bing-quan Wu et al., 1988：22

14.Haliotis T, et al.J Exp Med 1984; 151：1039

15.口置恭司，等.第18回日本实验动物学会讲演要旨.A60，1983

16.Clark EA, et al.Immunogenetics 1981; 12: 601
17.Rygarrd J.et al.Abstract of 5th Int. Workshop On Immune-Deficient Animals, Copenhagen, 1985
18.Fodstad O, et al. Scand J Immunol 1984; 20: 267

A Breeding of T and NK Cell Combined Immunodeficient PBI/2 Beige Nude Mouse and Its Primary Application in the Biological Research on Cancer

Sun Jing, et al

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

We introduced nu gene, from PBI/1 nude mouse, to 615/PBI beige mouse with NK cell deficient, and bred T and NK cell combined immunodeficient PBI/2 beige nude mouse. It is proved that this mouse is of T and NK cell combined immunodeficiency. It has been successfully used in the experimental researches on tumor heterogenity, metastatic factors, genetic mechanism of tumor metastasis and immunoprotective effects, establishment of human tumor xenograft model which is difficult to establish in a single T cell deficient nude mouse and so on.

Key words T and NK cell combined immunodeficiency Beige nude mouse Biological research on cancer