·实验研究·

基于荧光成像技术验证视网膜母细胞瘤小鼠模型

代彩玲[1],杨 威[1,2],王俐梅[1],戴锦龙[1],温玉莹[1],郭健敏[1,2]

引用:代彩玲,杨威,王俐梅,等. 基于荧光成像技术验证视网膜母细胞瘤小鼠模型. 国际眼科杂志, 2025,25(5):706-713.

基金项目:广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目{No.GDNRC[2024]25}

作者单位:[1](510990)中国广东省广州市,广州湾区生物医药研究院 广东莱恩医药研究院有限公司 广东省药物非临床评价与研究重点实验室 国家中药现代化工程技术研究中心中药非临床评价分中心 广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心;[2](999077)中国香港特别行政区,香港科技大学生命科学部
作者简介:代彩玲,女,硕士,主管药师,研究方向:临床前药效学和安全性评价。
通讯作者:郭健敏,女,博士,硕士研究生导师,正高级工程师,研究方向:药物药理毒理研究. guojianmin@lewwin.com.cn
收稿日期: 2024-10-12 修回日期: 2025-04-01

摘要

目的:通过玻璃体注射经荧光标记的 Y79 细胞建立视网膜母细胞瘤 BALB/c-nu 小鼠模型,并以视网膜母细胞瘤常用化疗药物 Melphalan 治疗组作为阳性对照,通过荧光成像技术验证,以期为视网膜母细胞瘤治疗靶点或药物的非临床药效评价提供参考。

方法:BALB/c-nu 小鼠玻璃体内注射 GFP 转染 Y79 细胞(1.0×10^7 cell/mL,3 μL)造模,造模 27 d 根据活体成像荧光值随机分为模型对照组和不同剂量 Melphalan 组(1、3、10 μg/eye 组),玻璃体单次给药,每天观察眼部症状;于造模后 12、20、29、35、42、48、55、76、83 d 对造模眼/给药眼进行裂隙灯检查,造模 12、20、27、41、48、55、62、69、76、83 d 行活体成像检查;末次处理摘取眼球、大脑和小脑组织进行组织病理学检查。

结果:造模 6 d 开始,动物眼内可见云状物质,模型对照组小鼠眼云状物后期占据整个眼球,并伴有血管不规则生长;造模 27 d 后动物眼均检测到荧光值,随造模时间延长,荧光值持续增加,造模 69-83 d,肿瘤荧光值达峰值。组织学检查见模型对照组眼内瘤细胞重度增殖,1 例模型动物大脑可见肿瘤细胞。Melphalan 10 μg/eye 组在给药后17 d荧光值显著降低;Melphalan 3 μg/eye 组给药后 59 d 荧光值显著抑制,Melphalan 组动物脑组织均未见肿瘤细胞。

结论:BALB/c-nu 小鼠玻璃体注射 Y79/pCDH-LUC-copGFP 细胞后,可观测到明显眼部病变及肿瘤细胞在眼部的增殖。同时,Melphalan 干预后肿瘤细胞显著抑制,且呈剂量依赖性,表明视网膜母细胞瘤小鼠模型构建成功。

关键词:BALB/c-nu 小鼠;视网膜母细胞瘤;Y79 细胞;活体成像;荧光成像技术
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.5.03

Validation of retinoblastoma mouse model based on fluorescence imaging technology

Dai Cailing[1], Yang Wei[1,2], Wang Limei[1], Dai Jinlong[1], Wen Yuying[1], Guo Jianmin[1,2]

Foundation item: Guangdong Province Marine Economy Development (Six Major Marine Industries) Special Funds Project {No.GDNRC[2024]25}
[1]Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine; Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd.; Guangdong Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research; TCM Non-clinic Evaluation Branch of National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine; Guangdong Engineering Research Center for Innovative Drug Evaluation and Research, Guangzhou 510990, Guangdong Province, China; [2]Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong SAR 999077, China
Correspondence to: Guo Jianmin. Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine; Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd.; Guangdong Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research; TCM Non-clinic Evaluation Branch of National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine; Guangdong Engineering Research Center for Innovative Drug Evaluation and Research, Guangzhou 510990, Guangdong Province, China; Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong SAR 999077, China. guojianmin@lewwin.com.cn
Received: 2024-10-12 Accepted: 2025-04-01

Abstract

• AIM: To provide references for the non-clinical evaluation of therapeutic targets or drugs for retinoblastoma, fluorescently labeled Y79 cells are injected into the vitreous body of BALB/c-nu mice to establish a retinoblastoma model, and the Melphalan treatment group is used as a positive control, which is verified by fluorescence imaging technology.

• METHODS: BALB/c-nu mice were intravitreous injected with GFP transfected Y79 cells (1.0×10^7 cell/mL, 3 μL) to establish the model. On the 27th day, the mice were randomly divided into model control group and different doses of Melphalan groups (1, 3, 10 μg/eye groups) according to the fluorescence value of *in vivo* imaging, with vitreous body single administrated and ocular symptoms observed daily. Slit-lamp examination was performed at 12, 20, 29, 35, 42, 48, 55, 76, and 83 d after modeling. *In vivo* imaging was performed on 12, 20, 27, 41, 48, 55, 62, 69, 76, and 83 d. At the last treatment, the eyeball, brain and cerebellum tissues were removed for

histopathological examination.

• RESULTS: From the sixth day of modeling, cloud-like substances could be seen in the eyes of the animals, and the cloud-like substances occupied the whole eyeball of the mice in the model control group at the later stage, accompanied by irregular growth of blood vessels. After 27 days of modeling, the fluorescence value was detected in all the animals, and the fluorescence value continued to increase with the extension of modeling time. The fluorescence value of the tumor reached the peak after 69-83 days of modeling. Histological examination showed severe proliferation of intraocular tumor cells in the model control group, and tumor cells were observed in the brain of 1 model animal. In the 10 μg/eye Melphalan group, the fluorescence value was significantly decreased at 17 d after administration. The fluorescence value of the 3 μg/eye Melphalan group was significantly inhibited at 59 d after administration. No tumor cells were found in the brain tissue of animals in all Melphalan groups.

• CONCLUSION: After vitreous injection of Y79/pCDH-LUC-copGFP cells in BALB/c-nu mice, significant ocular lesions and proliferation of tumor cells were observed in the eyes. Meanwhile, Melphalan intervention significantly inhibited tumor cells in a dose-dependent manner, indicating that the mouse model of retinoblastoma was successfully constructed.

• KEYWORDS: BALB/c-nu mice; retinoblastoma; Y79 cells; *in vivo* imaging; fluorescence imaging technology

Citation: Dai CL, Yang W, Wang LM, et al. Validation of retinoblastoma mouse model based on fluorescence imaging technology. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025, 25(5): 706-713.

0 引言

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma,RB)是婴幼儿时期最常见的眼内恶性肿瘤类型之一,由 RB1 基因突变引起,在世界范围内平均每 15 000-20 000 婴幼儿中有 1 例会发生 RB,大多数患者在 2 a 内死于颅内扩展和转移,死亡率接近 100%[1-2]。RB 临床分期一般为眼内期、青光眼期、眼外期、全身转移期,常表现为斜视、眼痛、红眼、角膜混浊、前房出血和青光眼,最终丧失眼球结构。临床前眼科药理学转化模型的建立,有助于了解眼病的病因、病理和进化,并应用于评价新的眼科药物。目前用于构建 RB 模型的动物种属包含小鼠、大鼠、兔、非洲爪蟾、斑马鱼等,其中小鼠模型应用最多[3-5]。小鼠 RB 模型有转基因动物模型、基因敲除动物模型、新生小鼠异种移植模型及裸鼠异种移植模型等。已有报道的转基因模型如 T 抗原 RB 模型[6]、LHBETATAG RB 小鼠模型[7]操作复杂,成本较高且无法表现出人类 RB 的局灶性和克隆性。基因敲除模型则存在调控机制复杂且肿瘤特异性较低的缺点。目前大多数研究采用将人类 RB 细胞植入免疫缺陷动物眼睛构建异种移植模型,Y79 细胞株来源于 1 例 2.5 岁且伴有 RB 家族史的女性患儿,在免疫缺陷小鼠玻璃体内注射 Y79 细胞后,形成的 RB 具有侵袭性和转移潜力,与人类肿瘤非常相似,广泛用于临床前的药效研究。

2016 年 Tschulakow 等[8]在前人的研究基础上建立了 Y79 细胞诱导的 BALB/c-nu 小鼠 RB 模型,通过扫描激光眼科检查(SLO)、光学相干断层扫描(OCT)和组织学分析了肿瘤的发病率、生长速度及超微结构水平。研究根据肿瘤进展情况将 RB 分为 0 期、Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期。SLO/OCT 可分析在早期肿瘤或无肿瘤的 0 期眼睛,而对于处在肿瘤生长Ⅰ-Ⅲ期的眼睛,由于肿瘤覆盖眼底,SLO/OCT 难以进行扫描分析。Jiang 等[9]采用 Fluc 和 GFP 同时标记的 WERI-Rb-1 细胞制备 RB 模型,使用荧光活体成像技术评价药物处理 30 d 的有效性,其观测的周期较短,未充分体现模型的整个发展周期,且其使用的造模细胞不具有侵入性和转移性,与人类疾病特征存在差异。因此,迫切需要为 RB 治疗药物的开发提供一种合适的模型工具。

随着成像技术的发展,非侵入性成像技术因其易操作、低成本等特性已成为眼科临床诊断的关键技术工具,包括光学相干断层成像技术、生物标记的活体成像技术等[10-11]。在这些技术中,基于体内生物发光成像已成为研究小型动物实验广泛使用的工具[12-13],具有简单和实时监测等明显优势,尤其适用于肿瘤组织动态观测,且不会对动物造成明显伤害,减少评价所需的动物数量。本研究以 BALB/c-nu 小鼠为研究对象,采用 Luciferase 和 CopGFP 同标记的 Y79 建立 RB 小鼠模型,活体荧光成像技术实时定量监测模型进展,同时,应用不同剂量的 Melphalan 考察荧光成像技术用于药效评价的可行性。临床前眼科药理学转化模型的建立,有助于了解眼病的病因、病理和进展,用于新的眼科药物的研发,从而促进研究成果转化为临床实践,推进 RB 疾病的科学发展。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c-nu 小鼠 12 只,雌性,4-5周龄,体质量 14-16 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验环境:广东莱恩医药研究院有限公司屏障环境动物房[SYXK(粤)2022-0146]。动物自由摄食、饮水,动物房环境温度控制在 20-26 ℃,相对湿度 40%-70%,最小换气次数 15 次/时,12 h/12 h 光照/黑暗交替。本研究符合伦理学标准,经广东莱恩医药研究院有限公司实验动物伦理研究委员会审核通过(审批号:IA-CS2023023-01)。按照 3Rs 原则给予实验动物人道关怀。实验动物生产许可证:SCXK(湘)2021-0002。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(Excell Bio);RPMI 1640 培养基(Gibco);Y79 细胞系起源于 1 例 2.5 岁的白人女性的原发肿瘤,该女性于 1971 年有 RB 病史,购自 ATCC,该细胞株委托广州艾基生物技术有限公司进行 Y79/luciferase+CopGFP 基因过表达单克隆稳转细胞株的构建。戊巴比妥钠(Alfasan Intenational B.V);左氧氟沙星滴眼液(参天制药中国有限公司);氧氟沙星滴眼液(湖北远大天天明制药有限公司);盐酸丙美卡因滴眼液(s.a. ALCON-COUVREUR n.v);复方托吡卡胺滴眼液(沈阳兴齐眼药股份有限公司);异氟烷(河北金达福药业有限公司); Melphalan Hydrochloride for Injection (Cenexi-Laboratories Thissen SA)。电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司,型号 BCE2201-1CCN];VMR 型麻醉机

(Midmark Corporation,型号 VMR);小动物活体成像系统(PerkinElmer,型号 IVIS Lumina LT);裂隙灯显微镜[万灵帮桥医疗器械(苏州)有限责任公司,型号 OVS-Ⅲ]。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药　造模:(1)对小鼠腹腔注射 0.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg,10 mL/kg)麻醉,滴眼给予托吡卡胺进行散瞳,滴眼给予盐酸丙美卡因进行眼表局部麻醉,对眼组织及眼周进行清洁消毒;(2)在手术显微镜下采用 33G 微量注射器对小鼠进行玻璃体注射 GFP 稳转 Y79 细胞(1.0×10^7 cell/mL),注射容积为 3 μL(图 1);(3)注射后,滴眼给予左氧氟沙星滴眼液抗菌。造模期间动物置于保温垫上进行保温。考虑到实验动物 3Rs 原则中的"减少"要求,本研究使用荧光活体成像技术检测多个时间点荧光值,并根据统计学方法中对动物数量的最低要求,选用动物数量。分组:接种后第 27 d 根据肿瘤荧光成像均衡随机分为模型对照组、Melphalan 1 μg/eye 组、Melphalan 3 μg/eye组、Melphalan 10 μg/eye 组,3 只/组。给药:根据 Jiang 等[9]的研究结果设计 Melphalan 给药剂量,注射用盐酸 Melphalan(1、3、10 μg)治疗组小鼠玻璃体内注射浓度分别为 0.5、1.5、5 mg/mL,玻璃体注射体积均为每眼 2 μL;模型组小鼠玻璃体注射等体积 0.9%氯化钠注射液。

1.2.2 眼部观察和裂隙灯检查　每天对眼部进行观察。于造模后第 12、20、29、35、42、48、55、76、83 d 行裂隙灯检查。

1.2.3 动物活体成像　小鼠腹腔注射 150 mg/kg D-荧光素钾盐,注射容积为 10 mL/kg,异氟烷(麻醉浓度为 2%-3%)吸入麻醉成功后,15 min 内通过 IVIS Lumina LT 型小动物活体成像系统(PerkinElmer,USA)检测发光信号。于造模后第 12、20、27、41、48、55、62、69、76、83 d 行小鼠体内活体成像。

1.2.4 组织病理学检查　摘取小鼠眼、大脑和小脑进行固定,苏木素-伊红染色,进行组织病理学检查。病理改变程度标准:正常:未观察到肿瘤细胞浸润情况;轻微:肿瘤细胞浸润面积占据视野范围面积的 10%以下,视野范围内观察到数量极少的肿瘤细胞,小灶性或散在个别细胞分布;轻度:肿瘤细胞浸润面积占据视野范围面积≥10%,且<40%,可看到肿瘤组织,灶性/多灶性或散在分布。100 倍镜下可见 1 个视野;中度:肿瘤细胞浸润面积占据视野面积≥40%,且<70%,视野范围内大部分为肿瘤细胞。100 倍镜下可见 1-3 个视野;重度:肿瘤细胞浸润面积占据视野面积 70%-100%,视野内几乎被肿瘤细胞占据,未见正常组织结构。可见 3 个视野以上。

统计学分析:采用 SPSS 21.0 统计软件处理。计量资料以均数±标准差表示,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床症状观察和裂隙灯检查　造模前,小鼠眼球清澈透明,血管均匀清晰,瞳孔圆形界限清晰可辨(图 2)。造模后第 6 d,部分小鼠造模眼内开始出现云样模糊物质,至第 10 d,90%以上造模小鼠眼内出现云样物质,模型对照组肿块面积在试验期间不断增大、变白,云样物质最终占据整个眼球,并伴有血管增生不规则生长;晚期出现眼球突出,肿瘤物凸出眼外,血管破裂血液大量渗出,血管加粗,无正常血管,眼球混浊,瞳孔消失,严重时会出现眼球破溃、眼球萎缩等现象。Melphalan 1、3、10 μg/eye 组小鼠给药后云吞样症状减弱,且呈现剂量依赖性, Melphalan 3、10 μg/eye 组小鼠增生速度和程度明显低于模型对照组(图 3)。

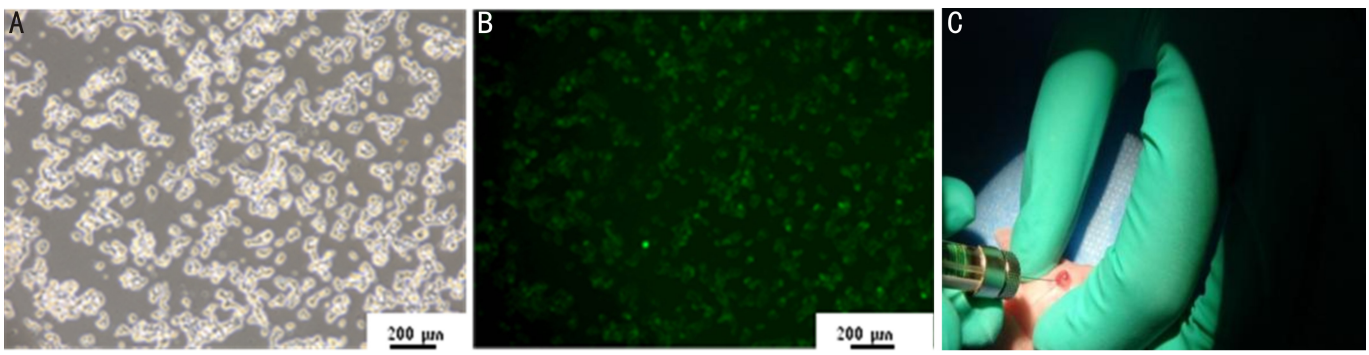


图 1　Y-79/pCDH-luciferase+CopGFP-puro-Clone 细胞图片和玻璃体注射过程　A:Y79-pCDH-LUC-copGFP-MOI=5-感染 72 h(白光);B:Y79-pCDH-LUC-copGFP-MOI=5-感染 72 h(荧光);C:玻璃体注射操作。

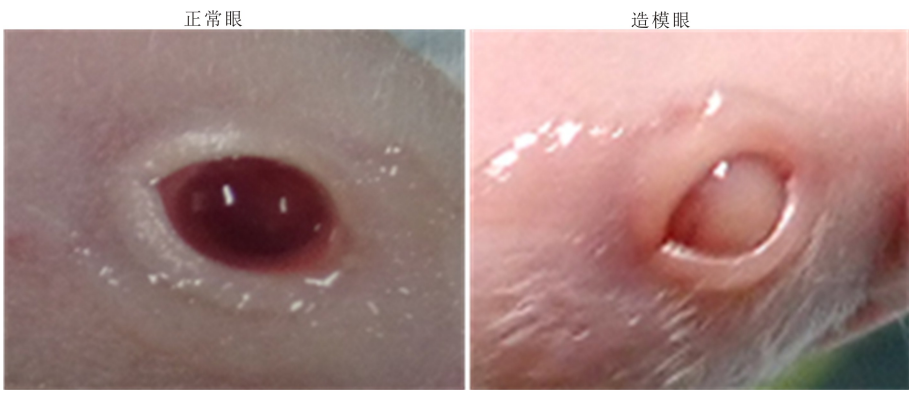


图 2　正常眼和造模眼。

2.2 活体成像检测 造模后第 20 d,小鼠造模眼活体成像开始检测到较弱散在荧光;第 27 d,所有小鼠造模眼均开始检测到荧光信号;第 69 d,模型对照组小鼠荧光值达到峰值,至第 83 d 时维持在峰值,见图 4、5。给药后不同时间四组小鼠荧光值比较,差异有统计学意义($F_{时间}=7.321$, $P_{时间}<0.01$; $F_{组间}=5.361$, $P_{组间}=0.031$; $F_{组间\times时间}=3.574$, $P_{组间\times时间}<0.01$)。给药 59 d(造模后第 83 d),Melphalan 3 μg/eye组小鼠荧光值明显低于模型对照组($P<0.05$);给药17-59 d(造模后第 48-83 d),Melphalan 10 μg/eye 组小鼠荧光值明显低于模型对照组(均 $P<0.05$),呈剂量依赖性,见图 6,表 1。综上, Melphalan 1、3、10 μg/eye 组小鼠荧光值与模型对照组相比均有下降,且随剂量升高,荧光值降低越明显。

2.3 肿瘤组织观察 根据本院前期研究结果[13],正常小鼠眼 HE 染色结果:眼结构完整,上皮细胞排列整齐,杯状细胞丰富,黏膜层及黏膜下层未见坏死和炎细胞浸润。模型对照组 3 例动物可见眼内瘤细胞重度增殖,肿瘤细胞异型性明显,细胞大小不均,呈圆形、椭圆形或不规则形,有呈泡状的大细胞核或深染的小细胞核,并可见丰富的核分裂像。Melphalan 1 μg/eye 组:2 例动物眼内瘤细胞重度增殖,1 例动物眼内未见瘤细胞增殖。Melphalan 3 μg/eye 组:1 例动物眼内瘤细胞轻度增殖;1 例动物眼内瘤细胞重

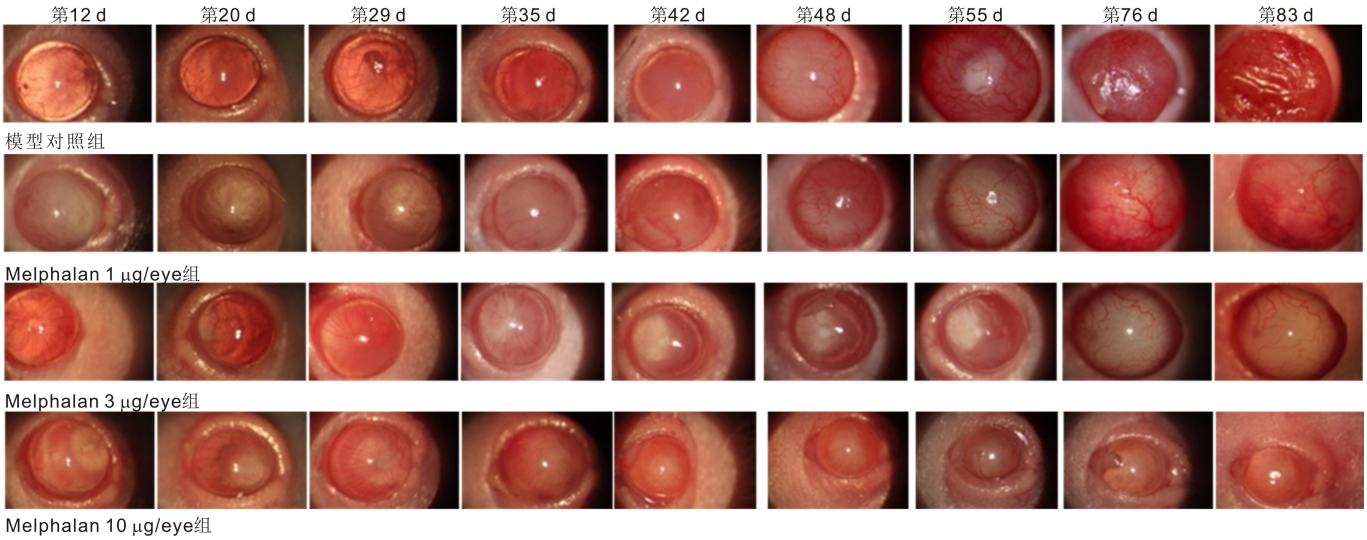


图 3 各组裂隙灯检查变化图(40×)。

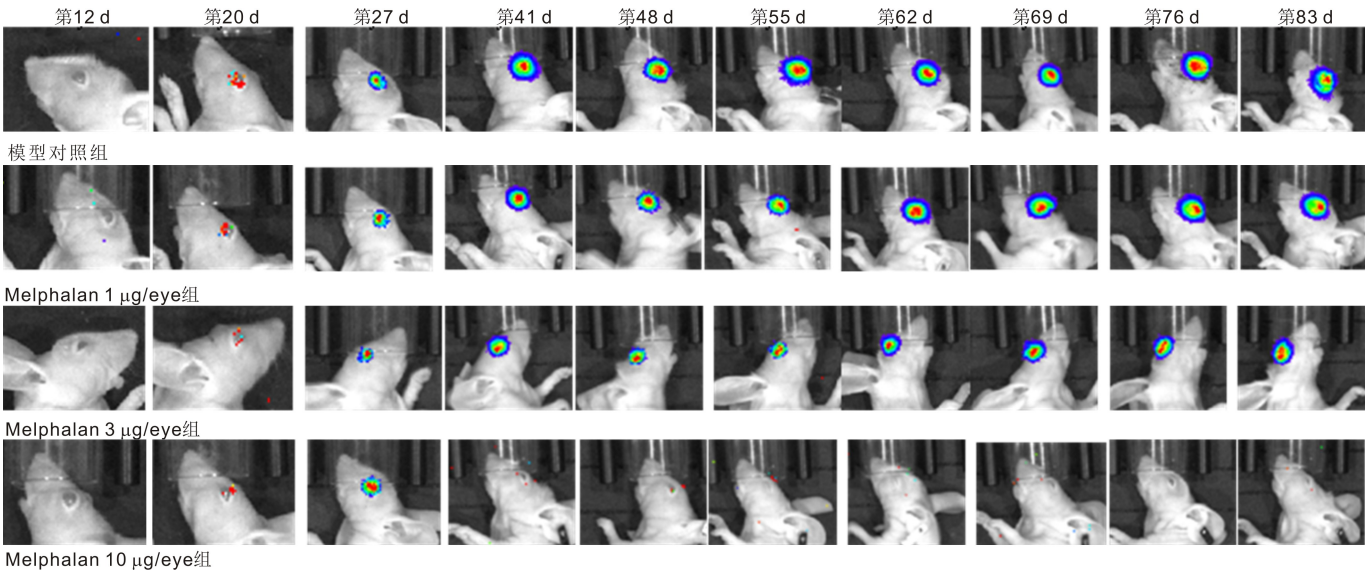


图 4 造模后 12-83 d 眼内肿瘤的活体成像结果。

表 1 治疗期间各组眼内肿瘤增殖荧光值 ($\bar{x}\pm s$, $\times10^5$)

组别	造模后 27 d	造模后 41 d	造模后 48 d	造模后 55 d	造模后 62 d	造模后 69 d	造模后 76 d	造模后 83 d
模型对照组	6.69±1.71	32.1±7.35	22.9±1.21	42.2±6.18	103±81.3	324±108	241±103	322±233
Melphalan 1 μg/eye 组	6.90±4.16	41±23.3	16.1±14.1	30±36.7	43.3±45.5	56.7±60.1	40.6±39.4	113±89
Melphalan 3 μg/eye 组	7.42±3.81	21.6±12.9	14.5±16.6	17.4±21.8	80.9±105	71.9±103	38.1±47.5	69.1±91.2[a]
Melphalan 10 μg/eye 组	6.91±3.16	13.2±10.5	2.06±1.96[a]	1.12±0.40[a]	2.33±0.90[a]	1.38±0.97[a]	1.52±0.75[a]	3.70±3.19[a]

注:[a]$P<0.05$ *vs* 模型对照组。

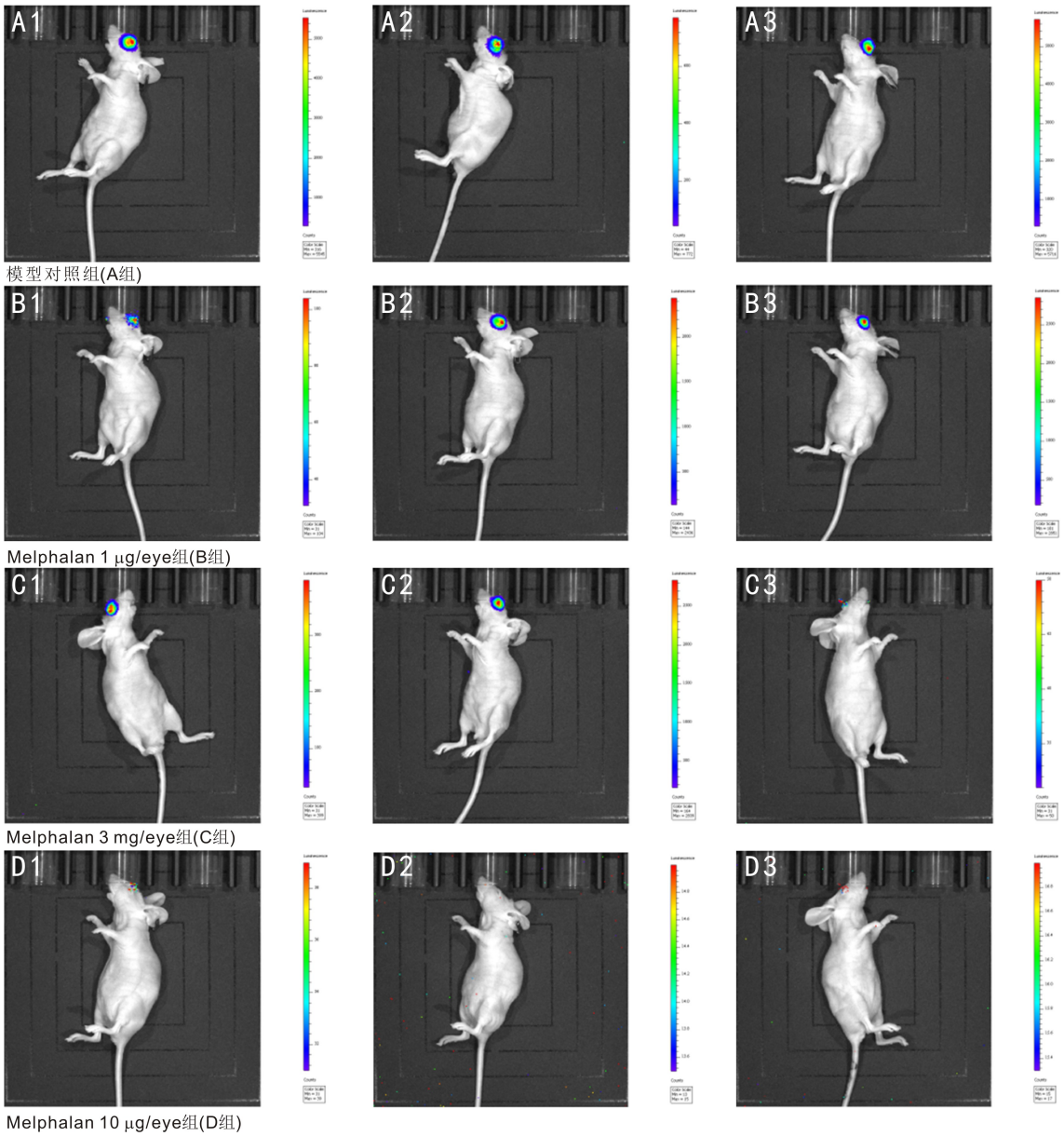


图 5　造模后 83 d 小鼠活体动物成像结果。

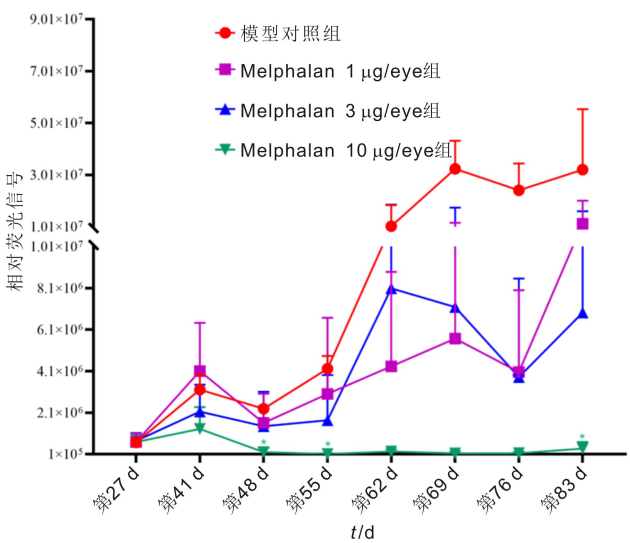


图 6　治疗期间(造模后 27 d 开始)各组眼内肿瘤增殖程度的比较。

度增殖,1 例动物眼内未见瘤细胞增殖。Melphalan 10 μg/eye 组:1 例动物眼内瘤细胞轻微增殖;1 例动物眼内瘤细胞轻度增殖;1 例动物眼内瘤细胞中度增殖,见图 7。Melphalan 1、3、10 μg/eye 组均对眼内 RB 增殖具有明显抑制作用,且随着剂量的递增,抑制效果越明显。

脑:模型对照组 1 只小鼠大脑可见少量肿瘤细胞,其余动物脑膜结构正常,脑膜下血管无扩张,灰质及白质神经细胞正常,无噬神经元现象、卫星现象、神经细胞坏死,神经纤维完整,胶质细胞无聚集,脑血管扩张或血管袖套现象。小脑分子层、浦肯野细胞层及颗粒层神经细胞正常,血管无扩张或炎细胞浸润;第三脑室和第四脑室脉络丛结构正常,无上皮细胞坏死、毛细血扩张等变化。Melphalan 1、3、10 μg/eye 组小鼠脑组织均未见异常肿瘤细胞,表明肿瘤未发生脑转移,见图 8、9。

3 讨论

RB 是最常见的原发性儿科恶性肿瘤之一,通常由视网膜的未成熟细胞发展而来。近年来,由于早期准确的诊断和预后,RB 的发病率和死亡率大大降低[14]。目前大多

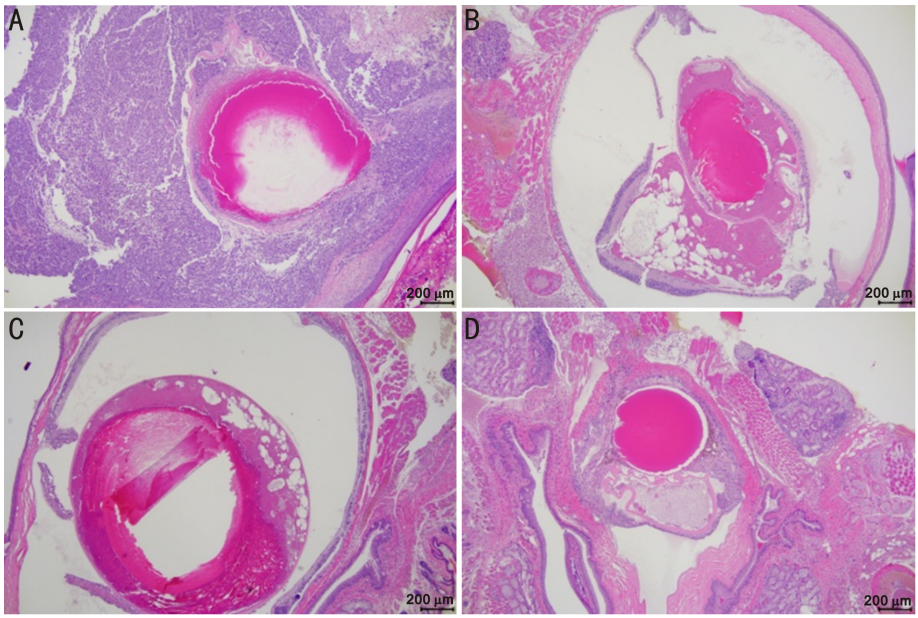


图 7 眼部组织病理学改变(苏木精-伊红染色) A:模型对照组;B:Melphalan 1 μg/eye 组;C:Melphalan 3 μg/eye 组;D:Melphalan 10 μg/eye组。

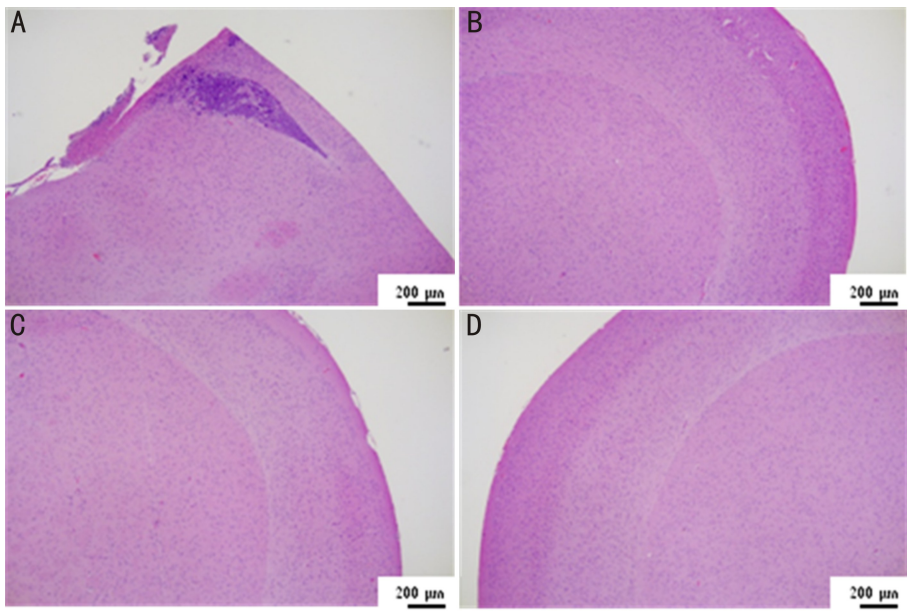


图 8 大脑组织病理学改变(苏木精-伊红染色) A:模型对照组;B:Melphalan 1 μg/eye 组;C:Melphalan 3 μg/eye 组;D:Melphalan 10 μg/eye组。

数 RB 动物模型是将人类 RB 细胞植入免疫缺陷动物眼睛构建异种移植模型,其中 Y79 和 WERI-Rb 细胞是全球公认的主要用于 RB 异种移植细胞。WERI-Rb 细胞来源于 1 岁无 RB 家族史的白种女性患儿,构建的 RB 模型接近于非转移性疾病,仅在晚期阶段入侵脉络膜[15],不具有 RB 模型的临床典型症状。Y79 细胞构建的 RB 模型则具备侵入性和转移性,与人类常见 RB 类似。近年来,随着基于生物发光的活体成像技术的发展,越来越多的荷瘤模型通过使用带有生物标志物的细胞进行荷瘤,实时动态监测肿瘤的发展过程,用于诊断和预后指标,有助于了解 RB 的发病机制。

治疗 RB 首选的方法是玻璃体内化疗[16-18],将更高水平的药物暴露在视网膜和玻璃体中,明显改善了晚期眼内 RB 的预后。临床上治疗 RB 主要化疗药物主要包含:Melphalan、卡铂、拓扑替康等[19-22]。对于化疗药物,局部浓度对正常细胞和肿瘤细胞的杀伤力影响明显,研究中需重点考虑平衡疗效、毒性及持续时间,以期实现更优的治疗方案[23-24]。多项临床人体安全性试验结果显示:20-30 μg Melphalan 是眼内注射安全、有效的剂量[25-27]。在 Fluc/GFP-Rb-1 RB 小鼠模型中,玻璃体内注射 16 μg Melphalan;随后每 2 wk 注射 1 μg Melphalan,显著抑制肿瘤的生长[9]。

本研究通过玻璃体注射 Y79/pCDH-LUC-copGFP 细胞构建 RB 小鼠模型,裂隙灯检查和荧光成像动态监测 RB 模型的发展过程,组织病理学检查评估模型的病变程度,荧光强度定量和组织学评估 Melphalan 治疗药效。造模小鼠在造模 6-10 d 出现云状物质,至 27 d 检测到荧光信号,根据荧光值均衡分组,单次给药。模型对照组小鼠眼部荧光值持续增加,至造模后 69 d,荧光值达到峰值,眼内病理学可见瘤细胞重度增殖,肿瘤完全取代玻璃体,一

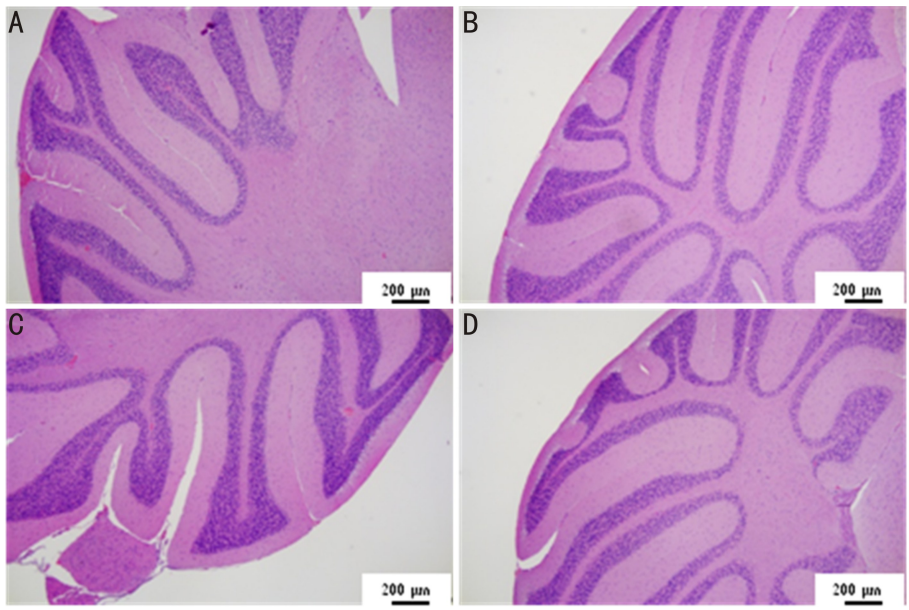


图 9　小脑组织病理学改变(苏木精和伊红染色)　A:模型对照组;B:Melphalan 1 μg/eye 组;C:Melphalan 3 μg/eye 组;D:Melphalan 10 μg/eye 组。

只小鼠大脑发现了转移灶,眼睛肿瘤突破了巩膜,并生长到大脑。Chevez-Barrios 等在 Rag2 KO 小鼠玻璃体内植入 Y79 细胞后,肿瘤形成并逐渐扩散到眼部,在注射后 4 wk 同样发生脑转移,研究表明,Rag2 KO 小鼠模型的转移性比在裸鼠中更强,在选择模型时应该考虑到这一点[12]。本研究使用 Melphalan 干预后,小鼠的体质量、保眼率、荧光值、病理改变均得到明显改善;Melphalan 10 μg/eye 组在给药后 15 d 可显著抑制眼肿瘤生长,直至试验末期,抑制率维持在 98%以上; Melphalan 1、3 μg/eye 组在给药后 30 d 开始抑制眼肿瘤生长,直至试验末期,抑制率分别为 64.9%、78.5%。病理组织学结果显示: Melphalan 3、10 μg/eye组均对眼内视网膜母细胞瘤增殖具有明显抑制作用,且随着剂量的递增,抑制效果越明显,且均未发生脑转移。在本研究中,由于模型对照组动物模型眼荧光强度达到峰值,且部分眼球破裂,出于动物福利的考虑,须在肿瘤细胞注射后 83 d 杀死动物,该模型很可能在稍后的时间点发生更多的转移。本研究构建的 RB 小鼠模型与人类疾病非常相似,荧光活体成像技术可用于监测 RB 早期、中期、晚期发展全过程,实现定量定性评估肿瘤的生长,裂隙灯表征小鼠眼睛中的肿瘤,上述结果与相应的组织学病理结果进行比较后,结果显示出良好的相关性,未来可用于监测化疗药物的治疗效果。

转基因或基因敲除模型基因调控机制复杂仍需突破大量难点[27],异种移植模型周期短,成本低,眼内直接注射,大部分已报道研究通过眼底和光谱域光学相干断层扫描成像等技术监测眼内肿瘤生长,但此监测方法无法定量,且对肿瘤晚期阶段的监测受限[28-29]。本研究对 BALB/c-nu 小鼠玻璃体注射 Y79/pCDH-LUC-copGFP 细胞建立 RB 模型,模型小鼠体质量下降,眼部观察到云团状物质,占据面积持续增加,荧光值持续增加,病理可见眼内瘤细胞重度增殖,Melphalan 干预后,体内成像实时连续监测其治疗效果明显。本造模方法在控制好麻醉程度的情况下不会对动物造成明显伤害,减少评价所需的动物数量,满足 3Rs 原则中的"减少""优化"原则;使用荧光活体成像在特定时间点对单个动物的肿瘤发生、肿瘤生长和血管生成等动态生物学过程进行分析,可连续动态评价药物对异种移植肿瘤的药效作用。前期研究发现,动物模型个体成瘤时间差异较大,潜伏期 3-14 d,或是肿瘤个体差异较大,上述情况通常与 RB 细胞的注射方法、部位及注射技术的要求程度有关。本研究通过玻璃体注射,注射部位体积大,操作简单,较好模拟了肿瘤的生长环境,同时对构建了荧光蛋白的 RB 细胞进行示踪,实现直接观察肿瘤的目的。值得注意的是,为了保证模型的可重复性,本研究需特别关注造模细胞数量的选择,细胞数量过高,则模型易过早达到破溃终点,评价周期不足;若细胞数量过低则模型成模时间过长,实验周期过长。

综上所述,BALB/c-nu 小鼠玻璃体注射 Y79/pCDH-LUC-copGFP 细胞的建立持续发展 RB 模型,最终可发展进入晚期脑转移阶段,通过荧光活体成像检测实现了量化肿瘤大小且动态监测肿瘤发展过程的目的,对于研究肿瘤的发展和扩散具有广阔的应用前景,适用于 RB 治疗药物药效作用评价。在本研究中,玻璃体腔注射法操作相对简单,肿瘤模拟了人眼内生长和侵袭的状态,与临床肿瘤生长环境相似,通过示踪可直接观察肿瘤的生长,在药物的临床前研发阶段应被广泛应用。然而研究的不足之处在于每组使用的统计学动物数较少,可在后期对更大范围的动物进行相关研究。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。
作者贡献声明:代彩玲论文选题与修改,初稿撰写;王俐梅数据分析,对重要内容进行关键性修改;戴锦龙承担研究活动,文献检索,数据分析;温玉莹承担研究活动执行方面协调责任,文献检索,数据分析;杨威、郭健敏选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Zhang Q, Cheng Y, Huang LZ, et al. Inhibitory effect of carboplatin

in combination with bevacizumab on human retinoblastoma in an *in vitro* and *in vivo* model. Oncol Lett, 2017,14(5):5326-5332.
[2] Cruz-Gálvez CC, Ordaz-Favila JC, Villar-Calvo VM, et al. Retinoblastoma: review and new insights. Front Oncol, 2022,12:963780.
[3] Nassr M, Wang XD, Mitra S, et al. Treating retinoblastoma in tissue culture and in a rat model with a novel isoquinoline derivative. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010,51(7):3813-3819.
[4] Naert T, Colpaert R, van Nieuwenhuysen T, et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of Rb1 and rbl1 leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in Xenopus tropicalis. Sci Rep, 2016,6:35264.
[5] Gyda M, Wolman M, Lorent K, et al. The tumor suppressor gene retinoblastoma-1 is required for retinotectal development and visual function in zebrafish. PLoS Genet, 2012,8(11):e1003106.
[6] Wenzel AA, O'Hare MN, Shadmand M, et al. Optical coherence tomography enables imaging of tumor initiation in the TAg-RB mouse model of retinoblastoma. Mol Vis, 2015,21:515-522.
[7] Shah NV, Pham DG, Murray TG, et al. Intravitreal and subconjunctival melphalan for retinoblastoma in transgenic mice. J Ophthalmol, 2014,2014:829879.
[8] Tschulakow AV, Schraermeyer U, Rodemann HP, et al. Establishment of a novel retinoblastoma (Rb) nude mouse model by intravitreal injection of human Rb Y79 cells - comparison of *in vivo* analysis versus histological follow up. Biol Open, 2016, 5(11):1625-1630.
[9] Jiang K, Fan XY, Hu Y, et al. Topical instillation of cell-penetrating peptide - conjugated melphalan blocks metastases of retinoblastoma. Biomaterials, 2022,284:121493.
[10] Tang ZY, Zhao TZ, Ren J, et al. An innovative multi-modal retinal imaging system for *in vivo* retinal detection in small animals. Front Ophthalmol (Lausanne), 2023,3:1251328.
[11] Gukasyan HJ, Hailu S, Karami TK. Ophthalmic drug discovery and development. Pharm Res, 2019,36(5):69.
[12] Gutowski MB, Wilson L, van Gelder RN, et al. *In vivo* bioluminescence imaging for longitudinal monitoring of inflammation in animal models of uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(3):1521-1528.
[13] 王俐梅, 张建, 杨威. 视网膜母细胞瘤小鼠模型的建立与评价. 第十五届中国实验动物科学年会论文集, 2019.
[14] Sun J. Biomarkers in retinoblastoma. Int J Ophthalmol, 2020,13(2):325-341.
[15] Ravishankar H, Mangani AS, Shankar MB, et al. Characterization of NCC-RbC-51, an RB cell line isolated from a metastatic site. Histochem Cell Biol, 2020,153(2):101-109.
[16] Ancona-Lezama D, Dalvin LA, Shields CL. Modern treatment of retinoblastoma: a 2020 review. Indian J Ophthalmol, 2020,68(11):2356-2365.
[17] Yamık Ö, Gündüz K, Yavuz K, et al. Chemotherapy in retinoblastoma: current approaches. Turk J Ophthalmol, 2015,45(6):259-267.
[18] Koç i, Taylan Şekeroğlu H, Kıratlı H, et al. Management of cataracts secondary to intravitreal chemotherapy injections for retinoblastoma seeding. Eur J Ophthalmol, 2022,32(3):1766-1771.
[19] Cho CS, Jo DH, Kim JH, et al. Establishment and characterization of carboplatin-resistant retinoblastoma cell lines. Mol Cells, 2022,45(10):729-737.
[20] Francis JH, Brodie SE, Marr B, et al. Efficacy and toxicity of intravitreous chemotherapy for retinoblastoma: four-year experience. Ophthalmology, 2017,124(4):488-495.
[21] Manjandavida FP, Stathopoulos C, Zhang J, et al. Intra-arterial chemotherapy in retinoblastoma - A paradigm change. Indian J Ophthalmol, 2019,67(6):740-754.
[22] 俞依琳, 葛盛芳, 范佳燕. 视网膜母细胞瘤化疗耐药的研究进展. 国际眼科杂志, 2023,23(10):1653-1657.
[23] Bogan CM, Pierce JM, Doss SD, et al. Intravitreal melphalan hydrochloride vs propylene glycol-free melphalan for retinoblastoma vitreous seeds: Efficacy, toxicity and stability in rabbits models and patients. Exp Eye Res, 2021,204:108439.
[24] Hsieh T, Liao A, Francis JH, et al. Comparison of efficacy and toxicity of intravitreal melphalan formulations for retinoblastoma. PLoS One, 2020,15(7):e0235016.
[25] Liang TY, Zhu XY, Hua XM, et al. Combined intra-arterial chemotherapy and intravitreal melphalan for the treatment of advanced unilateral retinoblastoma. Int J Ophthalmol, 2020,13(2):257-262.
[26] Yousef YA, Al Jboor M, Mohammad M, et al. Safety and efficacy of intravitreal chemotherapy (melphalan) to treat vitreous seeds in retinoblastoma. Front Pharmacol, 2021,12:696787.
[27] Lemaître S, Poyer F, Fréneaux P, et al. Low retinal toxicity of intravitreal carboplatin associated with good retinal tumour control in transgenic murine retinoblastoma. Clin Exp Ophthalmol, 2020,48(4):500-511.
[28] 李洋, 解颖, 董志军. 视网膜静脉阻塞继发黄斑水肿中 OCT 生物标志物的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(6):912-916.
[29] 李娜, 廖洪霞, 秦波. OCT 和 OCTA 在特发性黄斑前膜术后视力预测中的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(5):737-742.