

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.001

· 基础研究 ·

EGFP 标记的 A20 细胞构建小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤模型 *

王 娜 王 迪 唐玉婷 黄 亮[△] 周剑峰

(华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的: A20 细胞是来源于同系 Balb/c 小鼠大 B 细胞淋巴瘤的细胞系,能通过尾静脉接种建立小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤的模型,但由于该细胞系缺乏细胞表面特异性标志而难于监测。本研究使用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记 A20 细胞,试图建立易于监测的小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤模型。**方法:** 用含增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的慢病毒载体将标记基因 EGFP 转入 A20 细胞,通过流式分选出 EGFP⁺ 的 A20 细胞,体外培养后通过尾静脉注射接种于同系 Balb/c 小鼠体内,用流式细胞仪监测其外周血 EGFP⁺ 细胞的百分率。当小鼠出现消瘦、毛发竖立、嗜睡等体征时,将小鼠处以安乐死;取动物脏器行石蜡包埋、病理切片、HE 染色。**结果:** 尾静脉注射 1×10^6 细胞于 6 只 Balb/c 小鼠体内,接种后 15 天可在外周血中检测到 EGFP⁺ 细胞,平均生存时间为 29.6 ± 0.8 天;在肝脏、脾脏、脊椎和淋巴结等多脏器成瘤,流式检测瘤细胞 EGFP 表达阳性。**结论:** 经尾静脉注射接种 A20 细胞可建立小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤模型,A20 细胞经含 EGFP 的慢病毒标记后易于通过流式进行监测,为通过动物体内试验评价靶向治疗的疗效提供了保证。

关键词: 淋巴瘤;模型;A20;流式细胞术;增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: Q95-3;R733 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)25-4801-05

Establishment of a Disseminated Model of Mouse B-Cell Lymphoma with A20 Cell Lines Expression Enhanced Green Fluorescent Protein*

WANG Na, WANG Di, TANG Yu-ting, HUANG Liang[△], ZHOU Jian-feng

(Department of Hematology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: The A20 cells are B lymphocytes from a syngeneic Balb/c mouse with a large B-cell lymphoma, and a disseminated model of mouse B-cell lymphoma can be established by using A20 cell line via tail vein injection. The model was hard to monitor because of no specific cell surface markers. Our study is to present a disseminated model of mouse B-cell lymphoma easy to be monitored by using A20 cells labeled with EGFP. **Methods:** A20 cells were transfected with a lentivirus vector containing a gene encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP), EGFP⁺A20 cells were sorted by FACS and intravenously injected into syngeneic Balb/c mouse, and the percentage of EGFP⁺ cells were evaluated by flow cytometry. The mice were euthanized at the first indication of morbidity (weight loss, ruffled fur, lethargy). Organs were paragon-imbedded, sectioned and analyzed by microscopy. **Results:** 1×10^6 cells were inoculated into 6 Balb/c mouse via tail vein injection, EGFP⁺ cells in peripheral blood were detected 15 days post inoculation. The average time of survival was 29.6 ± 0.8 days. Organs such as liver, spleen, spine and lymph nodes were involved, while flow cytometry showed the tumor cells were positive for EGFP. **Conclusion:** A disseminated model of mouse B-cell lymphoma can be established by using A20 cell line via tail vein injection, which was easy to be traced after transfection of A20 cells with a lentivirus vector containing a gene encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP), providing a useful experimental platform for further in vivo target therapy researches.

Key words: Lymphoma; Model; A20; Flow cytometry; Enhanced green fluorescent protein

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R733 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)25-4801-05

前言

淋巴瘤是发生于淋巴造血系统的恶性肿瘤,近年来,淋巴

瘤的发病呈上升及年轻化趋势,据统计,淋巴瘤发病率的年增长率为 3-4%^[1,2]。我国淋巴瘤的发病率为 0.02‰,每年新发病例 2.5 万人,死亡 2 万人^[3]。因此,建立成熟稳定的能够模拟人淋巴

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81200380)

作者简介:王娜(1983-),女,博士研究生,研究方向:恶性血液病的分子诊断和治疗

△ 通讯作者:黄亮,电话:83663609, E-mail: huangliang@medmail.com.cn

(收稿日期:2014-01-23 接受日期:2014-02-18)

瘤发病的动物模型在淋巴瘤病变机理的研究及进行有效的临床治疗药理研究中十分重要。目前常用的淋巴瘤模型多为裸鼠动物模型,由于缺乏免疫力,因而无法完全模拟淋巴瘤发病时的体内环境^[4]。本研究采用有免疫功能的 Balb/c 小鼠,使用含增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的慢病毒载体标记 Balb/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞株,通过尾静脉注射方式构建小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤动物模型,该模型可模拟淋巴瘤起病的自然方式,且使用 EGFP 可作为监测标记,为通过动物体内试验评价靶向治疗提供了保证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞系 A20 细胞株购自 ATCC(American Typical Culture Center)。

1.1.2 实验动物 6-8 周龄 Balb/c 雌鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:0178963。严格饲养于恒温(20~26℃)、恒湿(50%~56%)、无特定病原体(specific pathogen free, SPF)、空气洁净的动物房内。

1.1.3 主要试剂及仪器 RPMI 1640 培养基、胎牛血清及 2-巯基乙醇为 Gibco BRL 公司产品;含 EGFP 的慢病毒载体试剂盒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。1 mL 注射器,乙醇,动物手术器械,包埋盒,10%中性福尔马林,HE 制片所需试剂等。流式细胞仪为美国 BD 公司产品,型号为 FACS caliber™ 及 FACS Aria™。荧光显微镜为奥林帕斯产品,型号为 BX51。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A20 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,常规加入 0.05 mM 的 2-巯基乙醇。细胞置于 37℃,5% CO₂,相对湿度 90% 的培养箱中培养,A20 细胞呈悬浮生长。

1.2.2 绿色荧光标记的 A20 细胞株的构建 将生长良好的 2 mL A20 细胞以 1×10^5 /ml 接种至 6 孔板中,转染方法参照吉凯慢病毒转染操作手册,所用慢病毒量为 MOI=100,polybrene 为 5 μg/ml,孵育 8 h 后终止转染。

1.2.3 流式分选 按流式分选仪分选要求,将转染后的 A20

细胞制备成 1×10^7 /ml 的细胞悬液,在 FACS Aria™ 上进行分选,获取 EGFP⁺A20 细胞,培养方法同上。

1.2.4 尾静脉注射 收集生长状态良好的 A20 及 EGFP⁺A20 细胞悬液,PBS 液清洗 3 次,显微镜下计数,制备好的细胞悬液放置在冰盒内,30 min 内完成尾静脉注射。使用酒精棉球擦拭小鼠尾巴以扩张血管并消毒,1 mL 注射器吸取细胞悬液,距尾尖 1/3-1/2 处进针,以 1×10^6 个细胞/0.2 ml/只经尾静脉注入 Balb/c 小鼠体内。

1.2.5 实验动物的监测与处理 日观察 Balb/c 小鼠,见有消瘦、毛发竖立、嗜睡等体征时施行安乐死。取该动物进行解剖,仔细观察各部位成瘤情况。

1.2.6 流式细胞仪检测 肿瘤接种后每 5 天经 Balb/c 小鼠眼内眦采血,按 100 μL 加入流式细胞仪专用管,加入红细胞裂解液 0.5 mL,4℃ 裂解 10 min,充分洗涤后加入 200 μL PBS 重悬待上机检测。结束实验时,取小鼠股骨骨髓,使用预冷的 PBS 反复冲洗骨髓腔,制备成单细胞悬液,瘤结节则使用 200 目筛网进行研磨制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,待上机检测。以 A20 组小鼠相应组织作为空白对照,使用 FACS caliber™ 式细胞仪和 CellQuest 软件获取结果并分析 10000 个细胞,记录 EGFP⁺ 细胞百分率。

1.2.7 病理学检查 各脏器按常规病理取材,10%中性福尔马林固定后制作石蜡切片,HE 染色观察。逐级乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。

1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 13.0 对实验结果进行统计学处理和分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 构建绿色荧光标记的 A20 细胞

含 EGFP 编码基因的慢病毒载体以 MOI=100 转染 A20 细胞,5 天后使用流式检测慢病毒转染效率为 5%(见图 1A),使用 FACS Aria™ 分选 EGFP⁺ 的细胞于体外培养,2 月后使用荧光显微镜检测该细胞 EGFP 仍稳定表达(见图 1B)。

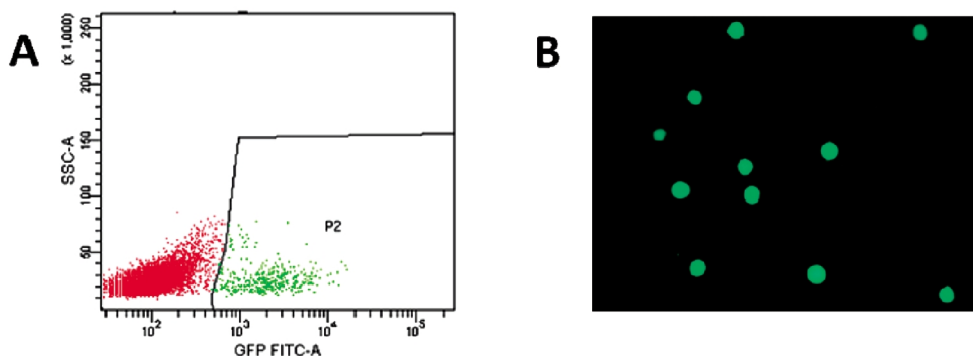


图 1 构建绿色荧光标记的 A20 细胞

A. 以含 EGFP 编码基因的慢病毒载体转染 A20 细胞,5 天后使用流式检测慢病毒转染效率为 5%(P2 代表 EGFP⁺ 的 A20 细胞),使用 FACS Aria™ 分选该群细胞并于体外培养;B. EGFP⁺A20 细胞在体外培养 2 月后,使用荧光显微镜检测该细胞 EGFP 仍稳定表达。

Fig.1 Establishment of EGFP⁺ A20 Cells

A. A20 cells were transfected with a lentivirus vector containing a gene encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP), 5% cells were EGFP⁺ when evaluated by flow cytometry 5 days later (P2 presented EGFP⁺ A20 Cells). EGFP⁺A20 cells were sorted by FACS and cultured in vitro. B. When EGFP⁺ A20 cells were cultured 2 months in vitro, the expression of EGFP was still stable.

2.2 成瘤情况

2.2.1 成瘤率 分别按 1×10^6 只尾静脉接种 EGFP⁺A20 细胞及 A20 细胞于两组 Balb/c 小鼠体内,两组均全部成瘤,成瘤率为 100%,肉眼均可见瘤组织。

2.2.2 生存时间 EGFP⁺A20 组小鼠平均生存时间为 29.6 ± 0.8 天($n=6$);EGFP⁺A20 接种后 2 周小鼠开始出现自梳理减少;3 周时出现腹胀、乏力,有 4 只老鼠同时伴随出现肢体瘫痪,瘫痪通常由一侧下肢开始,随即双侧下肢瘫痪,其中 1 只小鼠至疾病终末期时出现上肢瘫痪;1 只老鼠在肿瘤接种后 28 天自发性死亡,另外 5 只老鼠在第 30 天时施行安乐死。A20 组小鼠的平

均生存时间为 28.3 ± 2.9 天($n=6$),与 EGFP⁺A20 组小鼠相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.3 成瘤部位 大体观察时可见在动物腹部成瘤肿块;解剖后可见所有的小鼠肝脏、脾脏存在瘤结节,瘤块成圆形或椭圆形,从直径 1 mm 到 1 cm 大小不等,呈灰白色,边界清楚,部分结节可融合成团(图 2),质地柔韧;部分小鼠脊柱旁可见瘤块形成,呈分叶状,与周围软组织严重粘连,分界不清;另外还有小鼠在胃、肠、大网膜、子宫等多处存在瘤结节;12 只小鼠在肺部、脑均未见明显肿瘤结节形成。两组之间成瘤部位未见明显差异。

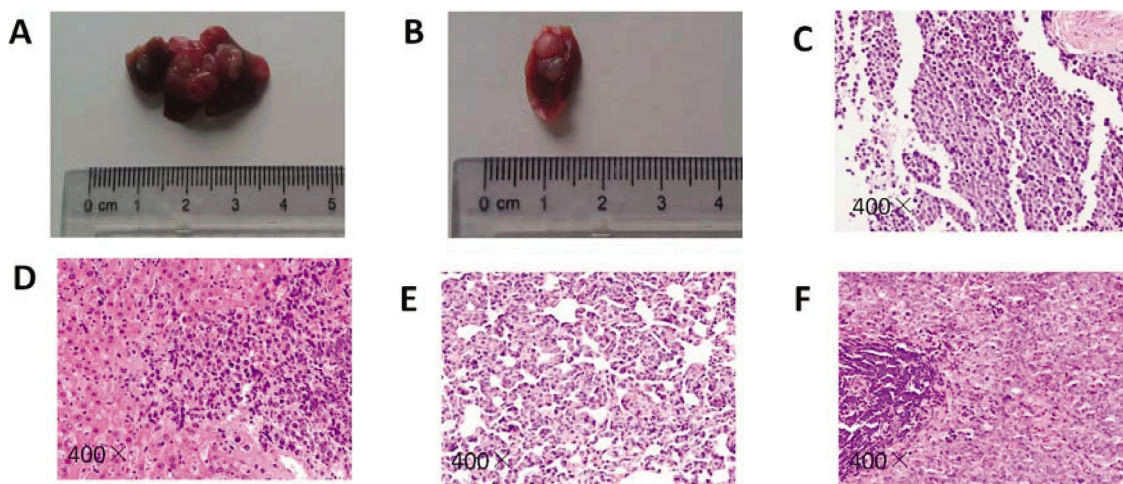


图 2 各脏器成瘤情况

A20 细胞尾静脉接种至 Balb/c 小鼠体内,当小鼠出现消瘦、毛发竖立、嗜睡等体征时,将小鼠安乐死处死。肉眼可见肝脏(A)、脾脏(B)有瘤块形成,瘤块呈圆形或椭圆形,直径 1 mm 到 1 cm 大小不等;HE 染色镜检($400\times$)见肾(C)、肝(D)、肺(E)、脾(F)有瘤细胞浸润。

Fig.2 Tumor formation in various organs

A20 cells were intravenously injected into syngeneic Balb/c mouse. The mice were euthanized at the first indication of morbidity (weight loss, ruffled fur, lethargy). At necropsy, tumor mass were formed in liver (A) and spleen (B), round or oval, ranging in size from 1 mm to 1 cm in diameter; HE staining ($400\times$) the kidney (C), liver (D), lung (E) and spleen (F) were involved by tumor infiltration.

2.3 流式检测

接种后 15 天在 EGFP⁺A20 组小鼠外周血中即可检测到 EGFP 标记的 A20 细胞,阳性百分率为 $0.77 \pm 0.06\%$,随疾病进展外周血 GPF⁺ 百分率最高可达 20.76%。将小鼠处以安乐死后,可在小鼠骨髓中检测到 EGFP 标记的 A20 细胞,其 EGFP⁺ 百分率为 $10.91 \pm 4.08\%$ (图 3),骨髓及外周血中肿瘤负荷具有一致性。瘤结节的 EGFP 表达率高达 90%以上(结果未显示)。

2.4 镜检切片

切片 HE 染色后镜检见瘤细胞浸润涉及心脏、肝脏、脾脏、肺、胃、肠、肾脏和子宫的淋巴结。镜下可见瘤细胞大小比较一致,核大深染,呈圆形或泡状核;核染色质不均匀,嗜碱性,胞质少,偶见核仁,可见病理核分裂像(图 2)。

3 讨论

淋巴瘤是一组异质性很强的疾病,发病率及病死率高,是危害人类健康的重要疾病^[5]。传统上淋巴瘤分为霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤两大类,WHO 于 2000 年提出了淋巴造血系统肿瘤的新的病理分类方法,同时也将淋巴瘤国际预后指数(international prognostic index. IPI)作为公认的淋巴瘤分层指标^[6,7]。

根据淋巴瘤的分类及分期,目前临床上面给予不同强度的化疗及适时选择自体移植,明显提高了淋巴瘤患者的治疗效果^[8-11]。近年来,随着利妥昔单抗(rituximab R)-抗 CD20 单克隆性抗体的应用,弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效取得了里程碑式的进步,患者整体长期缓解率提高 30% 以上^[12],因而个体化治疗的研究以及新的靶向药物的研发也成为目前淋巴瘤治疗的热点。

肿瘤动物模型是探索肿瘤发病、侵袭转移机理及抗肿瘤药物评价的重要工具^[13-15]。皮下及原位移植是目前建立淋巴瘤动物模型的常用方式,Raji 及 Jurkat 等常见细胞株均通过皮下接种建立了淋巴瘤模型;杨波等则采用人恶性淋巴瘤新鲜标本,通过原位移植法建立了人胃恶性淋巴瘤裸小鼠高转移模型^[4]。由于淋巴瘤为造血系统恶性肿瘤,皮下或原位接种方式难以再现人淋巴瘤自然发生的历程及反映淋巴瘤的播散特点;且淋巴瘤是淋巴结或结外部位淋巴组织的免疫细胞肿瘤,其发生与机体免疫状况有着密切的关系,此类动物模型多使用免疫缺陷鼠,难以用于揭示肿瘤发生及与机体免疫之间的相互作用。本实验采用的 A20 细胞株来源于老年 Balb/cAnN 小鼠淋巴瘤^[16],我们通过尾静脉注射接种的方式将 A20 细胞接种于具有免疫功能的小鼠 Balb/c 小鼠体内,构建了小鼠播散型淋巴瘤模型,

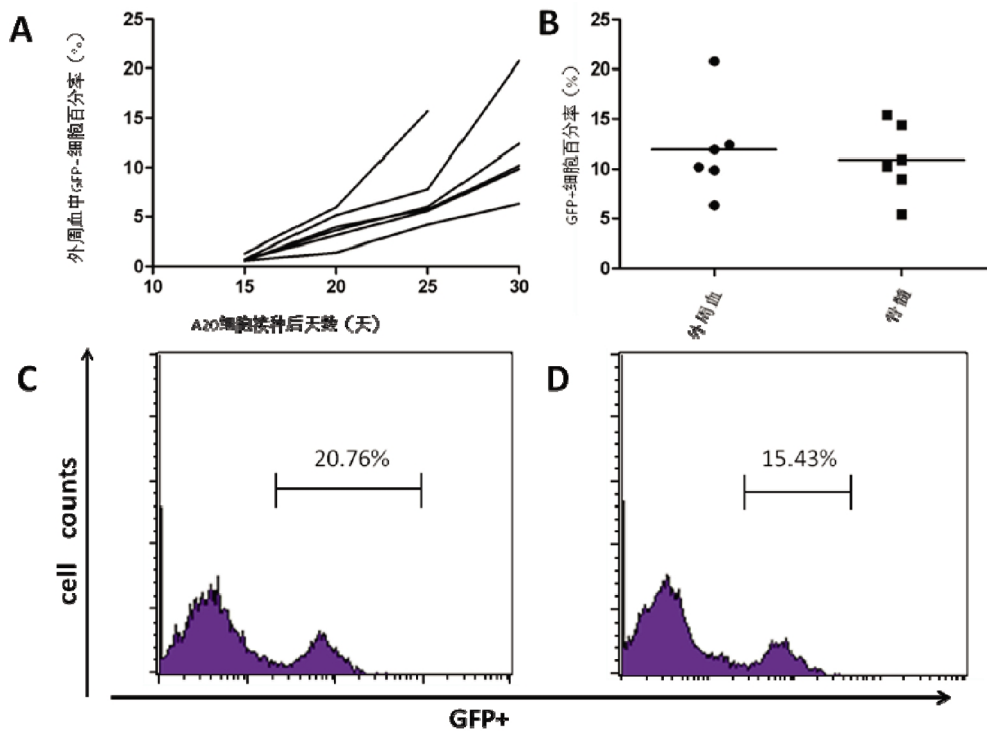


图3 流式细胞学检测 A. EGFP⁺A20 细胞经尾静脉接种至 Balb/c 小鼠, 15 天时可在外周血中检测到 EGFP⁺ 细胞, 随病情发展 EGFP⁺ 细胞比率增高; B. 处死老鼠后, 外周血中 A20 细胞的浸润程度为 $11.91 \pm 5.40\%$, 骨髓中 A20 细胞的浸润程度为 $10.91 \pm 4.08\%$ ($n=6$, 1 只老鼠在 28 天时死亡); C. A20 在外周血中浸润程度最高可达 20.76%; D. 骨髓中 A20 浸润程度最高可达 15.43%。

Fig.3 Flow Cytometry detection A. EGFP⁺A20 cells were inoculated into Balb/c mouse via tail vein injection. EGFP⁺ cells in peripheral blood were detected 15 days post inoculation, and the percentage of EGFP⁺ cells increased with the progression of the disease. B. The percentage of EGFP⁺ A20 was $11.91 \pm 5.40\%$ in peripheral blood, $10.91 \pm 4.08\%$ in bone marrow after the mice were euthanized ($n=6$, one mouse died at day 28). C. The infiltration of A20 cells in peripheral blood was up to 20.76%. D. The infiltration of A20 cells in bone marrow was up to 15.43%.

与使用传统的接种方式及免疫缺陷小鼠所构建的模型相比, 该模型更能够模拟人淋巴瘤发病时体内免疫微环境及发病方式。临床上所见的弥漫大 B 细胞淋巴瘤的肿瘤细胞形态上为大的泡状核, 嗜碱性胞质, 肿瘤呈高侵袭性, 容易压迫临近组织, 易侵犯肝、脾、骨等组织, 这些特点在我们所构建的模型中均可见到, 这证实了该模型在组织病理学及细胞形态学上和人类弥漫大 B 细胞淋巴瘤相似^[17]。

既往已有报道使用 A20 细胞株通过皮下接种的方式构建动物模型^[18], Micheal^[19]及刘芳^[20]等人也采用尾静脉接种的方式构建了播散型淋巴瘤模型, 但由于 A20 细胞来源于 Balb/c 小鼠, 接种至同系小鼠体内时无特异性标志以供监测, 仅能够通过生存状态及生存期了解疾病的进展, 并通过解剖学及病理学等检查了解肿瘤浸润情况, 无法在生存期内实时定量地监测疾病进展情况, 为靶向治疗的评估带来了一定的局限性。慢病毒载体介导的转基因技术具有较高效率, 可使目的基因整合到真核细胞基因组中, 转入的基因不随细胞分裂而丢失。正是由于这一特点, 慢病毒载体广泛用于血液系统的细胞示踪、基因功能研究和纠正异常基因等研究领域。EGFP 作为一种生物源性的荧光标记, 具有高效、稳定、无毒、易于检测等特性, 已广泛应用于各种细胞、蛋白质、细胞器的标记和特定基因表达的研究, 尤其是 EGFP 也不影响活细胞正常功能^[21]。鉴于此, 本研究用含 EGFP 的慢病毒载体将标记基因 EGFP 转入 A20 细胞, 通过流式细胞术可进行实时定量监测, 且 EGFP⁺A20 及 A20 两组小

鼠的成瘤情况和生存时间无统计学差异。从我们的实验可以看到外周血中肿瘤细胞百分率与动物生存状态相关, 在检测到外周血中有少量的 EGFP⁺ 细胞时小鼠出现自梳理减少; 第三周小鼠出现腹胀、乏力、下肢瘫痪时, 外周血 EGFP⁺ 百分率为 $7.51 \pm 1.29\%$; 至实验结束时外周血 EGFP⁺ 百分率为 $11.91 \pm 5.40\%$, 且均发现骨髓有肿瘤细胞浸润, 说明采用流式检测可以反映疾病的进展。EGFP 能够稳定表达, 通过我们的研究也表明 A20 细胞经过转染后 2 个月仍可见绿色荧光, 表明 EGFP 能够作为稳定的监测标记。当 A20 细胞直接通过尾静脉注入小鼠体内时, 因为无特异性的免疫表型较难通过流式细胞术实时检测其浸润程度, 使用 EGFP 标记后的 A20 细胞则解决了这个难题。综合外周血中肿瘤细胞的浸润程度和疾病进展有一致性, 及 EGFP 标记的稳定性和易于检测性, 我们的模型突破了原有模型的局限所在。

我们经尾静脉注射接种 A20 细胞可建立小鼠 B 细胞播散型淋巴瘤的模型, 且 A20 细胞经 EGFP 标记后易于通过流式进行检测, 为淋巴瘤机理的研究及通过动物体内试验评价靶向治疗的疗效提供了良好的实验平台。荧光成像技术发展极为迅速, 活体荧光成像系统采用数字化超高灵敏度的 CCD 与软件进行定量分析, 为今后在动物活体上实行实时性监测也提供了可能, 期望利用该模型及新的荧光成像技术为淋巴瘤的研究提供一个更为方便的实验手段。

参考文献(References)

- [1] Müller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology[J]. *Ann Hematol*, 2005, 84(1): 1-12
- [2] Ekström-Smedby K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma-a review[J]. *Acta Oncol*, 2006, 45(3): 258-271
- [3] 王黎, 沈志祥. 自体造血干细胞移植能否作为非霍奇金淋巴瘤的一线治疗方案[J]. *循证医学*, 2008, 8(5):2
Wang Li, Shen Zhi-xiang. If Autologous Stem-Cell Transplantation Can Be Front-Line Therapy of the Non-Hodgkin'S Lymphoma[J]. *The Journal of Evidence-Based Medicine*, 2008, 8(5):2
- [4] 杨波, 脱帅, 脱朝伟, 等. 原位移植体内连续筛选法建立人胃恶性肿瘤裸小鼠高转移模型系统 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(6): 413-417
Yang Bo, Tuo Shuai, Tuo Chao-wei, et al. Highly metastatic nude mouse model of human primary gastric lymphoma constructed by surgical orthotopic transplantation and in viVO continuous screening method[J]. *National Medical Journal of China*, 2010, 90(6): 413-417
- [5] 岑溪南. 淋巴瘤的治疗进展[J]. *中国全科医学*, 2004, 7(8): 583-585
Chen Xi-nan. Progress of lymphoma treatment [J]. *Chinese General Practice*, 2004, 7(8): 583-585
- [6] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group[J]. *Blood*, 1994,84(5):1361-1392
- [7] Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17: 3835-3849
- [8] Diehl V, Stein H, Hummel M, et al. Hodgkin's lymphoma:biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: 225-247
- [9] Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial [J]. *Lancet*, 2002, 359(9323): 2065-2071
- [10] Gianni AM, Magni M, Martelli M, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen) [J]. *Blood*, 2003,102(2): 749-755
- [11] Martelli M, Gherlinzoni F, De Renzo A, et al. Early autologous stem-cell transplantation versus conventional chemotherapy as front-line therapy in high-risk, aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an Italian multicenter randomized trial [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(7): 1255-1262
- [12] 易树华, 邱录贵. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗现状及展望[J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(10): 718-720
Yi Shu-hua, Qiu Lu-gui. Treatment actuality and expectation of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2010, 31(10): 718-720
- [13] Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation:advantages and disadvantages [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40 (6): 852-857
- [14] McCormack E, Bruserud O, Gjertsen BT. Animal models of acute myelogenous leukaemia-development, application and future perspectives[J]. *Leukemia*, 2005,19(5): 687-706
- [15] Wang N, Xiao F, Liu JP, et al. SLAM family predicting the initiation potential of human acute lymphoblastic leukemia in NOD/SCID mice [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011,124(19): 3074-3079
- [16] Kim KJ, Kanellopoulos-Langevin C, Merwin RM, et al. Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties[J]. *J Immunol*, 1979, 122(2): 549-554
- [17] Liu JK, Kan P, Schmidt MH. Diffuse large B-cell lymphoma presenting as a sacral tumor. Report of two cases[J]. *Neurosurg Focus*, 2003, 15(2): E10
- [18] Song W, Levy R. Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of naive dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5958-5964
- [19] Passineau MJ, Siegal GP, Everts M, et al. The natural history of a novel, systemic, disseminated model of syngeneic mouse B-cell lymphoma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2005, 46(11): 1627-1638
- [20] 刘芳, 张弓, 陈小艳, 等. 播散性鼠 B 细胞淋巴瘤动物模型的建立 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2008, 24(3): 353-357
Liu Fang, Zhang Gong, Chen Xiao-yan, et al. Establishment of a disseminated model of mouse B lymphoma [J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2008, 24(3): 353-357
- [21] Nguyen HS, Khosrotehrani K, Oster M, et al. Early phase of maternal skin carcinogenesis recruits long-term engrafted fetal cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(11): 2512-2517