

· 基础研究 ·

# 金黄地鼠颊黏膜鳞癌动物模型的建立及其生物学特性的研究\*

吕长坤<sup>1#</sup>, 万澎波<sup>2</sup>, 马菲菲<sup>2</sup>, 罗春丽<sup>1△</sup>, 万雪莲<sup>2</sup>, 王长海<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学检验医学院 400016; 2. 商丘医学高等专科学校教务处, 河南商丘 476100)

**摘要:**目的 建立金黄地鼠颊黏膜鳞癌动物模型, 观察其生物学特性。方法 40 只采用 0.05% 4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)涂抹颊黏膜, 10 只采用自来水涂抹颊黏膜。苏木精-伊红(HE)、转录因子蛋白(Foxm1)免疫组织化学观察第 8、12 周组织标本。有限稀释法体外传代培养颊黏膜组织标本, 观察平板克隆形成率, 检测单克隆细胞内细胞角蛋白(CK)和波形蛋白(Vim)表达, 染色体分析确定细胞核型。**结果** 第 12 周时 26(84.6%)只颊黏膜病理为原位癌, HE 染色、Foxm1 免疫组织化学结果表明, 符合鳞癌细胞基本特征, CK 和 Vim 免疫组织化学阳性率约为 96.0%, 染色体为四倍体核型。**结论** 4NQO 涂抹诱发金黄地鼠颊黏膜癌变, 建立金黄地鼠颊黏膜鳞癌动物模型。

**关键词:** 癌, 鳞状细胞; 模型, 动物; 金黄地鼠; 颊黏膜

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)21-2493-03

## Study on establishment of golden hamster buccal squamous carcinoma model for and its biological characteristics

Lv Changkun<sup>1#</sup>, Wang Pengbo<sup>2</sup>, Ma Feifei<sup>2</sup>, Luo Chunli<sup>1△</sup>, Wan Xuelian<sup>2</sup>, Wang Changhai<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Diagnosis, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Office of Educational Administration, Shangqiu Medical College, Shangqiu, Henan 4761000, China)

**Abstract: Objective** To establish the golden hamster model of buccal squamous carcinoma and observe its biological characteristics. **Methods** 50 golden hamster were randomly divided into two group: experiment group ( $n=40$ ) and control group ( $n=10$ ). Buccal mucosa of golden hamster were daubed by exposure 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in experiment group and tap water in control group. HE staining and immunohistochemistry were used to observe the tissue sample on the 8th and 12th week. The tissue samples of golden hamster buccal-mucosa cancer were used for the in-vitro subculture. Then flat cloning formation rate, expression of CK and Vim, and cell karyotype were detected. **Results** The observations of cell morphology and biology showed that the tissue of buccal squamous carcinoma were conformed to the basic characteristics of squamous carcinoma cell in 26 golden hamster (84.6%) after 12 weeks. The positive rate of CK and Vim were 96.0% by immunohistochemical staining. The Chromosomes were tetraploid karyotype. **Conclusion** We successfully established the golden hamster model of buccal squamous carcinoma by the daub method of 4NQO.

**Key words:** carcinoma, squamous cell; animal models; golden hamster; buccal mucosa

口腔鳞癌是口腔颌面部恶性肿瘤最多见的一类, 本课题组采用水溶性致癌剂, 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO)涂擦诱发金黄地鼠颊黏膜鳞癌, 通过检测细胞角蛋白、波形蛋白等与肿瘤密切相关的蛋白表达, 研究金黄地鼠颊癌的诱发情况。角蛋白的是一种常用的肿瘤免疫组织化学标记物, 阳性表达见于癌, 间皮瘤等<sup>[1]</sup>, 多种上皮源性肿瘤均可表达波形蛋白, 且与肿瘤细胞的分化、侵袭和转移密切相关<sup>[2]</sup>。本文通过诱发金黄地鼠颊黏膜鳞癌旨在寻找更简便、更接近人类自然生癌过程的建模方法, 为基础和临床研究提供较理想的口腔鳞癌动物模型。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物与主要试剂** 金黄地鼠 50 只(南京医科大学提供); 细胞角蛋白(cytokeratin, CK)单克隆抗体(克隆 AE1/AE3)和波形蛋白(vimentin, Vim)单克隆抗体, 购自 DAKO 公司; 4NQO 购自 Sigma 公司; Cycle Testtmplus DNA 试剂盒购自美国 BD 公司, 转录因子蛋白质(forkhead box protein M1, Foxm1)抗体购自 Santa Cruz 公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 造模及标本采集** 50 只金黄地鼠, 40 只采用 0.05% 化学致癌剂 4NQO 涂抹金黄地鼠颊黏膜为实验组, 10 只采用自来水涂抹颊黏膜为对照组。分别于第 8 周处死实验组 10 只、对照组 5 只。第 12 周处死实验组 30 只、对照组 5 只, 无菌条件下切取涂抹处颊黏膜组织块, 10% 中性甲醛固定, 苏木精-伊红(HE)染色、Foxm1 免疫组织化学观察第 8、12 周组织标本肿瘤诱发情况。

**1.2.2 有限稀释法筛选单克隆肿瘤细胞<sup>[3]</sup>** 将第 12 周组织标本用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗数次, 去除成纤维细胞, 制备成单细胞悬液。将上述细胞悬液移入 24 孔板内, 1 毫升/孔, 连续传代培养。培养细胞 80% 汇合后, 收集细胞, 用培养液稀释细胞密度至 5~10 个/毫升, 以每孔 200  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 24 h 后标记含有单个细胞的孔。第 4 天开始对单克隆细胞形成的细胞集落继续培养; 培养条件为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  培养箱。

**1.2.3 免疫组织化学法** 将细胞悬浮液置于培养板中, 使盖玻

\* 基金项目: 商丘市 2011 年科技发展计划项目(20115005)。 作者简介: 吕长坤(1979~), 讲师, 在读硕士, 主要从事泌尿系统肿瘤发生、发展的分子机制研究。 # 现工作于商丘医学高等专科学校。  $\Delta$  通讯作者, Tel: (023)68485223; E-mail: luochunli79@126.com。

片完全浸在培养液中,当细胞生长至覆盖培养板底部 2/3 面积时,用盖片镊轻轻取出盖玻片,PBS 轻轻漂洗,4 ℃ 预冷 10% 中性甲醛固定 45 min,PBS 洗涤 3 次。0.2% Triton X-100 破膜 10 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 30 min。室温下 PBS 洗涤后,吸净水分,加一抗,孵育 2 h。PBS 洗涤后,吸净水分,滴加 EnvisionTM 二抗,孵育 30 min,PBS 洗涤后,加 DAB 于盖玻片细胞上,显色室温静置 5~10 min,自来水洗涤,HE 淡染,梯度酒精脱水,树脂封片,镜下观察,照相。

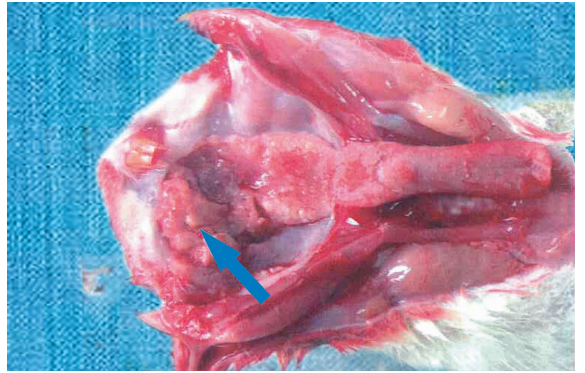
**1.2.4 46 代细胞分裂中期的染色体核型分析** 取指数分裂期细胞加入秋水仙素,终浓度为 0.03 μg/mL,温箱培养过夜,轻轻吹打分裂象细胞,移入 10 mL 离心管,经 0.08 mol/L KCl 低渗 2 次,每次 30 min;用固定液(醋酸:甲醇=1:3)预固定 3 次后,加入 1 mL 固定液轻吹打均匀,将细胞悬液滴于预冷载玻片,室温干燥,新 Giemsa 液染色 20 min,冲洗,干燥,封片。油镜下观察分散良好的染色体,并拍照<sup>[4]</sup>。

**2 结 果**

**2.1 模型外观观察** 对照组金黄色地鼠颊黏膜呈粉红色富有弹性,无白斑样改变,黏膜下可见清晰血管,为正常金黄色地鼠颊黏膜外观。实验组金黄色地鼠第 8 周 9(90.0%) 只金黄色地鼠颊黏膜呈大小不等的片状、均匀浅白色样改变,略高出黏膜表面;表面粗糙,第 12 周 26(84.6%) 只金黄色地鼠颊黏膜白色斑块中间夹杂数个 2~4 mm 大小不等红色斑块区,表面较粗糙,高出正

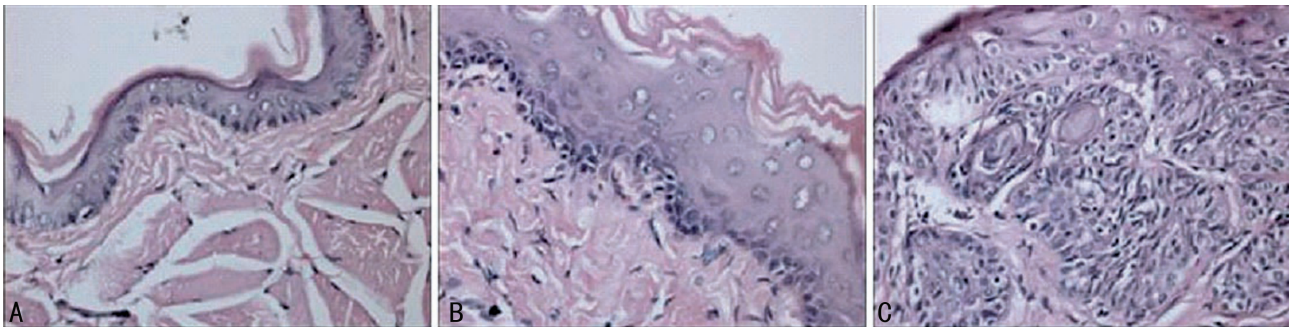
常黏膜表面,见图 1。

**2.2 组织切片的细胞形态学观察** 药物涂抹 8 周后,细胞细胞核质比例增加,上皮钉突伸长呈点滴状,颊黏膜不典型增生;药物涂抹 12 周颊鳞癌形成,可见细胞有核分裂象和异常核分裂(图 2)。Foxm1 免疫组织化学结果显示,正常黏膜(图 3A);第 8 周颊黏膜标本,细胞异型性和细胞间黏聚力显著降低,基底细胞极性消失,细胞核仁增大、浓染(图 3B);第 12 周颊黏膜标本,Foxm1 表达明显增强,核浆比例增大,有丝分裂象增加,上皮层次紊乱,细胞异型性明显,为原位癌(图 3C)。



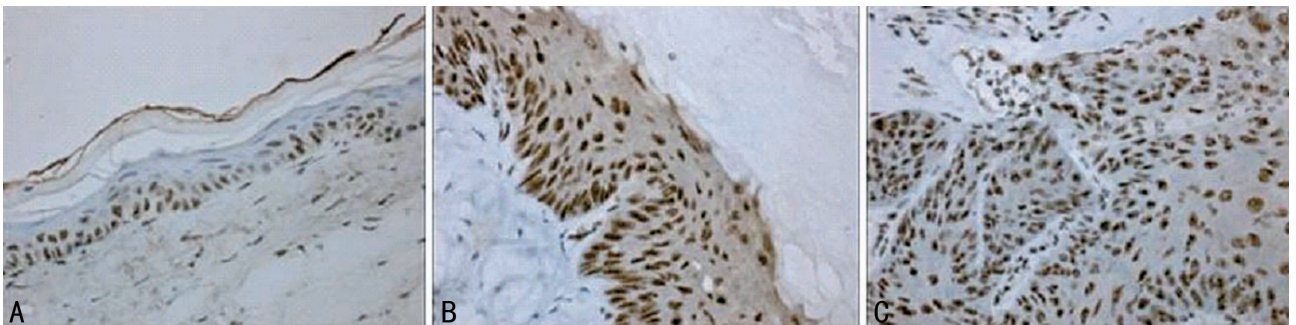
箭头:颊癌。

图 1 4NQO 诱发 12 周的金黄色地鼠颊黏膜鳞癌动物模型



A:正常金黄色地鼠颊黏膜组织;B:涂药 8 周后金黄色地鼠颊黏膜组织;C:涂药 12 周后金黄色地鼠颊黏膜组织。

图 2 4NQO 诱到金黄色地鼠颊黏膜组织(HE, ×100)



A:正常金黄色地鼠颊黏膜组织;B:涂药 8 周后金黄色地鼠颊黏膜组织;C:涂药 12 周后金黄色地鼠颊黏膜组织。

图 3 4NQO 诱到金黄色地鼠颊黏膜组织(Foxm1 免疫组织化学染色, ×100)

**2.3 平板单克隆鳞癌肿瘤细胞的形成** 经体外纯化和有限稀释培养,含有单细胞的 96 孔培养板中,5 d 后可见含 4~10 个细胞不等的细胞团,大部分细胞团在生长至 10 d 后,开始老化死亡;至 18 d 时,3 块 96 孔板共有 4 个孔有细胞集落形成;将此 4 孔中的细胞分别转移至 12 孔板中培养;26 d 时再将细

胞分别转移至 6 孔板中培养。其中一孔形态为多角形的细胞,经连续传代培养,最后得到单克隆来源的鳞癌细胞<sup>[5]</sup>,见图 4。

**2.4 单克隆鳞癌细胞中 CK、Vim 的表达** CK、Vim 阳性染色为胞浆棕褐色颗粒,Vim 阳性反应物主要分布于细胞核膜、核仁和突起的末梢;CK 阳性反应物质定位于胞质,但以细胞周



边部明显,均呈现棕黄色。结果显示细胞 CK、Vim 阳性率为 96.0%以上,见图 5。

**2.5 单克隆鳞癌细胞染色体核型分析** 第 46 代细胞染色体计数结果都为四倍体核型,染色体众数为 84 条,见图 6。

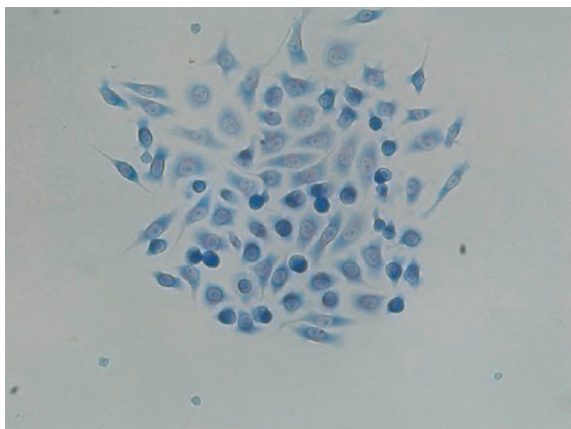
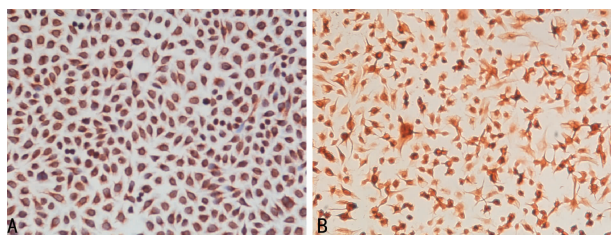


图 4 平板细胞单克隆形成图( $\times 200$ )



A:CK;B:Vim。

图 5 单克隆鳞癌细胞中 CK、Vim 蛋白表达 (免疫组织化学染色 $\times 100$ )

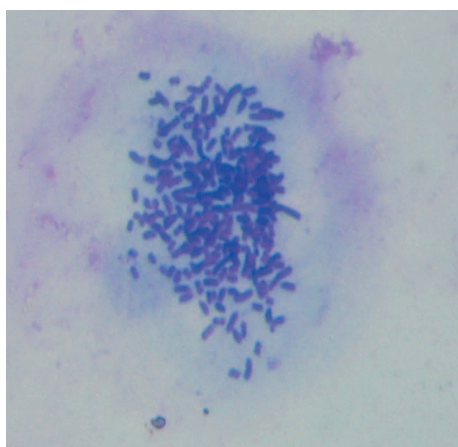


图 6 第 46 代单克隆鳞癌细胞染色体核型( $\times 500$ )

### 3 讨论

颊黏膜鳞癌的产生多要经历由正常上皮 $\rightarrow$ 异常增生 $\rightarrow$ 癌变的变化过程<sup>[6]</sup>。4NQO 是水溶性喹啉衍生物,是一种很强的水溶性前体致癌剂,属芳香胺杂环化合物,以其价键的方式与靶器官细胞 DNA 结合,并破坏染色体的结构,最终导致癌发生<sup>[7]</sup>。口腔鳞状细胞癌占头颈部恶性肿瘤的 80%以上,由于地域、生活习惯等不同,不同地区的发病率有一定的差异<sup>[8]</sup>。本研究目的是水溶性诱癌剂 4NQO 对金黄地鼠颊黏膜复层鳞状上皮的诱变作用,确定其致癌的情况,以获得易建立、重复性好、稳定且与人类鳞癌发生相似的动物模型。动物肿瘤模型,密切模仿人类口腔癌是最重要的除了有效的化学预防提供线索,

在阐明肿瘤转化的机制<sup>[9]</sup>。本研究并对肿瘤组织的生物学特性进行研究,该鳞癌模型生长缓慢、潜伏期较长,致癌过程和组织病理学特征与人口腔癌相似,方法简便,靶器官代表性强,为口腔鳞癌的发生机制研究和防治药物筛选提供了较理想的动物模型。为下一步地研究提供条件支持。

用 4NQO 涂擦 8 周时,金黄地鼠颊黏膜病变以中度至重度异常增生为主,黏膜上皮异常增生的比例高,HE 染色、Foxm1 免疫组织化学显示上皮由数层不规则细胞组成,表现为增生的细胞,大小不一,形态多样,细胞核大而浓染,核质比例增大。用 4NQO 涂擦 12 周时,呈条索状和小团状,多为高分化,上皮层次紊乱,细胞异型性明显,细胞核浓染,核浆比例增大,有丝分裂象增加,为原位癌<sup>[10]</sup>。与人类口腔黏膜上皮癌变病理变化过程极其相似,而且具有相似的生长特性和生物学行为<sup>[11]</sup>。

细胞置于体外培养时,因环境的改变细胞分化的表达形式也发生了与体内时不同的变化,如在体内胶原蛋白只是成纤维细胞和骨细胞的主要产物,体外培养的细胞,不仅成纤维细胞能产生胶原,在一定条件下,上皮细胞、神经细胞、甚至一些肿瘤细胞也能产生胶原。这可能部分解释单一纯化的金黄地鼠颊癌细胞 Vim 染色为阳性的原因。CK 和 Vim 的表达升高与肿瘤的分化和转移有关,在评估高危人群中角蛋白在口腔黏膜表达的监测有实用性<sup>[12]</sup>。本颊癌细胞免疫组织化学结果显示 CK 和 Vim 阳性率为 96.0%以上,提示细胞存在着“上皮间叶变”。

肿瘤细胞大多失去正常的二倍体核型,成为多倍体、异倍体或其他形式的变化,健康金黄地鼠细胞的二倍体核型染色体数为 42 条。Keuchi 等<sup>[13]</sup>建立的金黄地鼠舌癌细胞系染色体数 RSC3-P 为 83、78。本颊癌细胞来源于同一个肿瘤细胞,第 21、65 代各分析 200 个细胞,染色体均为 84 条,遗传性状稳定。本研究中第 46 代细胞染色体计数结果都为四倍体核型,染色体众数为 84 条。

动物模型对于研究人类各种疾病的发生、发展规律和防治疾病的机制等是极为重要的手段和工具。目前颊黏膜的发病机制不明,因此临床诊断治疗效果差。金黄地鼠颊囊处无腺体,无淋巴引流通道,异种组织植入不发生排斥,是一种免疫豁免区,为较理想的诱癌部位<sup>[14]</sup>。利用金黄地鼠颊鳞癌动物模型对颊鳞癌进行各种基础和临床研究,探索其发生、发展规律,开发新的治疗方法和药物,将对颊鳞癌防治水平的提高起到重要的推动作用。该模型会随着颊鳞癌的实验性治疗和基础研究的日益深入而不断改进并完善。

### 参考文献:

- [1] Li SJ, Ren GX, Jin WL, et al. Establishment and characterization of a rabbit oral squamous cell carcinoma cell line as a model for in vivo studies[J]. Oral Oncology Volume, 2011, 47(1):39-44.
- [2] Coburn MA, Brueggemann S, Bhatia S, et al. Establishment of a mammary carcinoma cell line from Syrian hamsters treated with N-methyl-N-nitrosourea [J]. Cancer Lett, 2011, 312(1):82-90.
- [3] 田波. 人肝癌淋巴道转移模型体系的建(下转第 2499 页)

本实验结果显示,EsA 可抑制了 IL-1 $\beta$  诱导的 rGMC 增殖,可能机制是 EsA 激活并促进了 rGMC 的 P27 表达,使其抑制了 CDK 磷酸激酶活性,从而降低了 Cyclin-CDK 复合物活性,同时也下调了 CDK2 的表达,减少了 Cyclin-CDK2 复合物的生成,进而延缓了细胞周期的进程及抑制了细胞的生长,抑制了 GMC 的炎症,减缓了其硬化,改善了肾脏的病理表现,改善了系膜细胞增殖性肾小球疾病的病情,说明了 EsA 在系膜增殖性肾脏病中具有一定的应用前景,为临床运用 EsA 提供了一定的实验基础和理论依据。EsA 在体外作用和经体内生物转化对细胞的作用是否同等,有待于今后进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Zhen XY, Su Y, Yang SM, et al. Protective effect of esculentoside A on radiation-induced dermatitis and fibrosis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65(3): 882-889.

[2] 邓俐, 张德堂, 杜江. 商陆皂苷甲对体外培养的人角质形成细胞增殖的影响[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2006, 20(11): 655-657.

[3] 张亮, 张克非, 吴雄飞. 商陆皂苷甲对大鼠抗 Thy1 系膜增殖性肾炎的治疗作用[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(6): 506-508.

[4] Hu ZL, Qiu L, Xiao ZY, et al. Effects of esculentoside A on autoimmune syndrome induced by campylobacter jejuni in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(1): 65-71.

[5] 马华林, 张欣洲, 张祥贵. 商陆皂苷甲治疗 BXS 狼疮性

肾炎小鼠的实验研究[J]. *广东医学*, 2011, 32(12): 1540-1542.

[6] 杨丹. 商陆皂苷甲对 BXS 小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[D]. 遵义: 遵义医学院, 2010.

[7] 孟令国. 商陆皂苷甲对 BXS 小鼠肾组织 PCNA, Caspase-3, Fas 和 FasL 表达的影响[D]. 遵义, 遵义医学院, 2011.

[8] Ma HL, Zhang XG, Zhang XZ, et al. The effect of esculentoside A on lupus nephritis-prone BXS mice [J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(2): 354-360.

[9] 祝正明, 孙建实, 赵湘. 三七总皂苷对大鼠肾小球系膜细胞增殖及细胞凋亡的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2007, 8(8): 471-472.

[10] 刘书馨, 陈香美. 系膜细胞增殖与细胞周期调节蛋白[J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(4): 247-249.

[11] 余荣杰, 杨慧标, 赵景宏, 等. 缬沙坦对 Thy1 肾炎大鼠肾小球系膜细胞 CDK2 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2007, 8(2): 81-83.

[12] 傅博, 张四方, 卓莉, 等. 雷帕霉素对肾小球系膜细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中华肾病杂志*, 2009, 25(11): 849-852.

[13] Kim SM, Kim N, Lee S, et al. TGF-beta1-induced PINCH-1-ILK-alpha-parvin complex formation regulates mesangial cell proliferation and hypertrophy[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 514-523.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-03-15)

(上接第 2495 页)

立及转移机制的探讨[D]. 上海: 上海复旦大学肝癌研究所, 2004.

[4] 李侃. 应用细胞遗传学方法检测口腔鳞状细胞癌染色体畸变[J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(2): 83-84.

[5] 陈万涛, 冯元勇, 蒋灿华, 等. 大鼠颊黏膜鳞状细胞癌单克隆细胞系 Rca-B 的建立及其生物学特性研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2007, 42(8): 477-482.

[6] Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(4): 365-374.

[7] 陈万涛. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱发大鼠舌黏膜鳞癌模型和分子发病机制研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2010, 3(7): 10-13.

[8] Kademani D, Bell RB, Schmidt BL, et al. Oral and maxillofacial surgeons treating oral cancer: A preliminary report from the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Task Force on Oral Cancer[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 66(10): 2151-2157.

[9] Nagini S, Letchoumy PV, A T, et al. Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation,

DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas[J]. *Oral Oncology*, 2009, 5(6): e31-37.

[10] 邱存平, 温玉明, 王昌美. 金黄地鼠舌癌模型的建立及其颈淋巴结转移[J]. *口腔医学纵横杂志*, 2000, 16(1): 10-12.

[11] Feng L, Wang Z. Chemopreventive effect of celecoxib in oral precancers and cancers[J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(10): 1842-1845.

[12] 聂敏海, 钟利, 曾光明. 细胞角蛋白 CK19 在口腔黏膜癌变过程中的变化[J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(3): 187-191.

[13] Takeuchi S, Nakanishi H, Yoshida K, et al. Isolation of differentiated squamous and undifferentiated spindle carcinoma cell lines with differing metastatic potential from a 4-nitroquinoline N-Oxide-induced tongue carcinoma in a F344 rat[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(12): 1211-1221.

[14] 李金荣, 何荣根. 口腔颌面部肿瘤基础研究新进展[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 98.

(收稿日期: 2013-01-21 修回日期: 2013-04-12)