

人食管癌裸鼠皮下移植及原位移植模型的建立*

姚文健¹, 白玉², 赵宝生^{1△}

(1. 新乡医学院第一附属医院胸外科, 河南新乡 453100; 2. 新乡医学院病理学教研室, 河南新乡 453003)

摘要:目的 研究建立人食管癌裸鼠皮下移植及原位移植模型的方法。方法 从新鲜的人食管癌标本上切除肿瘤组织, 移植于裸鼠皮下, 建立原位移植瘤并连续传代 3 次后, 取肿瘤组织分别移植于裸鼠皮下及食管黏膜下, 分别观察移植瘤成瘤率、大体及组织形态、肿瘤的侵袭和转移情况。结果 皮下移植模型成瘤率 60%, 为低分化鳞癌, 未见淋巴结及远处器官转移; 原位移植模型成瘤率 80%, 与患者原发肿瘤组织形态一致, 可见广泛的淋巴结转移及肝肺转移。结论 初步建立了有效的人食管癌裸鼠皮下移植及原位移植模型, 为食管癌的研究提供了重要工具。

关键词:食管肿瘤; 肿瘤移植; 裸鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.07.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)07-0828-02

Establishment of subcutaneous and orthotopic transplatation tumor model of human esophageal cancer in nude mice*

Yao Wenjian¹, Bai Yu², Zhao Baosheng^{1△}

(1. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China;

2. Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To establish a subcutaneous and orthotopic transplatation tumor model of human esophageal cancer in nude mice. Methods Fresh tissues of human esophageal cancer were collected and transplanted into subcutaneous places of nude mice. The successfully transplanted primary generation tumor was passed down three times. Then tumor were implanted into the subcutaneous and esophageal submucous tissues of nude mice. The formation rate, morphology, invasion and metastasis of tumor were observed. Results The tumor formation rate of subcutaneous transplatation model was 60%, it was low grade squamous cell carcinoma without lymph node and distant organ metastasis. The tumor formation rate of orthotopic transplatation model was 80%, the morphological characteristics were consistent with human original tumor. Lymph node and organ metastasis could be found extensive. Conclusion We preliminary established effective subcutaneous and orthotopic transplatation tumor model of human esophageal cancer in nude mice. It might be an available model for further research of esophageal cancer.

Key words: esophageal; neoplasms transplatation; nude mice

肿瘤是当前威胁人类生命最严重的疾病之一, 每年死于肿瘤的人数以百万计, 肿瘤的防治研究, 已成为医学研究中的重要课题。在动物体内建立人类疾病模型可以更好地模拟活体状态下疾病的特征, 为疾病病因研究及治疗提供实验材料。1969 年 Ryaaid 首次成功地将人类肿瘤移植于无胸腺裸小鼠, 这为异种动物肿瘤移植开辟了新局面。由于裸鼠缺乏 T 淋巴细胞功能, 所以是极为理想的肿瘤移植模型材料^[1]。我国在这方面已经做了不少探索, 成功地将大肠癌^[2]、乳腺癌^[3]、肺癌^[4]等移植于裸鼠。但关于食管癌裸鼠皮下移植尤其是原位移植模型的报道较少, 本实验采用将人食管癌组织块接种于裸鼠体内的方法, 观察其生长特征, 初步建立了人食管癌裸鼠皮下移植及原位移植模型, 为食管癌的研究提供了重要的实验工具。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 食管癌组织来源 食管癌组织来源于新乡医学院第一附属医院胸外科的 1 例食管癌患者手术切除标本, 病理诊断为低分化、淋巴结转移阳性食管鳞癌组织, 且术前未进行放疗。

1.1.2 实验动物 实验所用的 BALB/C 裸鼠由新乡医学院

动物实验中心提供, 3~4 周龄, 体质量 16~22 g, 雌雄均可, 随机取用。裸鼠在恒温(25~27℃)、恒湿(40%~50%)、无特殊病原菌级饲养室条件下饲养。动物先放于有机玻璃盒内, 再置于超净生物层流架内, 每个饲养盒内饲养 5~6 只裸鼠。笼具、垫料、饲料、饮水均经高压蒸汽灭菌。所有实验程序均严格按无菌操作规程进行。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤手术标本的移植 手术切除标本离体后在无菌条件下去除包膜, 清除标本周围的纤维组织及坏死部分, 用含有青霉素/链霉素双抗(终浓度为 100 IU/mL)及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液反复冲洗后, 取新鲜的癌组织用弯剪剪成约 1 mm³ 组织碎块。裸鼠经 0.5% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射全身麻醉。取 2 粒组织碎块包埋于裸鼠右腹部皮下, 共 10 例, 5/0 丝线缝皮, 继续饲养观察, 取原位移植成功且肿瘤生长良好的裸鼠 1 只, 处死后进行鼠间传代, 连续传代 3 次, 每代 10 只, 观察成瘤率。

1.2.2 裸鼠皮下移植 取 10 例裸鼠, 全身麻醉后取传 3 代后移植瘤移植于裸鼠皮下, 移植方法同上。术后继续饲养, 每周

观察 2 次。裸鼠饲养至自然死亡或濒临死亡状态下处死。观察移植瘤成瘤率、大体及组织形态、肿瘤的侵袭和转移情况。

1.2.3 裸鼠食管黏膜下移植 取 10 例裸鼠,全身麻醉后取腹正中中线切口开腹,在手术显微镜下游离食管下段。做 3 mm 切口深达黏膜下层,经切口将 2 粒 1 mm^3 传代后瘤块以 10/0 无损伤缝合线固定于食管壁黏膜下层。以 7/0 丝线缝合腹膜,5/0 丝线缝皮。荷瘤裸鼠饲养至自然死亡或濒死状态下处死,观察移植瘤成瘤率、大体及组织形态、肿瘤的侵袭和转移情况。

1.2.4 病理学检测 上述移植瘤标本常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察。

2 结 果

2.1 裸鼠移植瘤成瘤率 人食管癌组织移植于 10 只裸鼠皮下,原代成瘤 1 只,成瘤率 10%(1/10),传代 3 次后,成瘤 5 只,成瘤率 50%(5/10)。

2.2 裸鼠皮下移植模型的观察 皮下移植的 10 例裸鼠共有 6 只形成肉眼可见肿瘤,成瘤率 60%,移植瘤呈膨胀性生长,圆形或椭圆形,灰白色,边界清楚,有纤维包膜包裹。光镜下观察移植瘤与人原发食管癌组织形态特点基本相同,为低分化鳞状细胞癌。细胞呈片状或条索状排列,细胞大小不同、形态各异,核浆比增加,核分裂像多见,见图 1A。肿瘤周围淋巴结、肝、肺未见癌转移。

2.3 裸鼠原位移植模型的观察 食管黏膜下移植的 10 例裸鼠尸检可见 8 例成瘤,成瘤率 80%。原位肿瘤肉眼观见图 1B。光镜下观察移植瘤与人原发食管癌组织形态特点基本相同,镜下观见图 1C。8 例均发生食管周围淋巴结癌转移,转移率 100.0%(8/8),见图 1D;有 3 例发生肝转移,转移率 37.5%(3/8)见图 1E;有 2 例发生肺转移,转移率 25.0%(2/8),见图 1F。

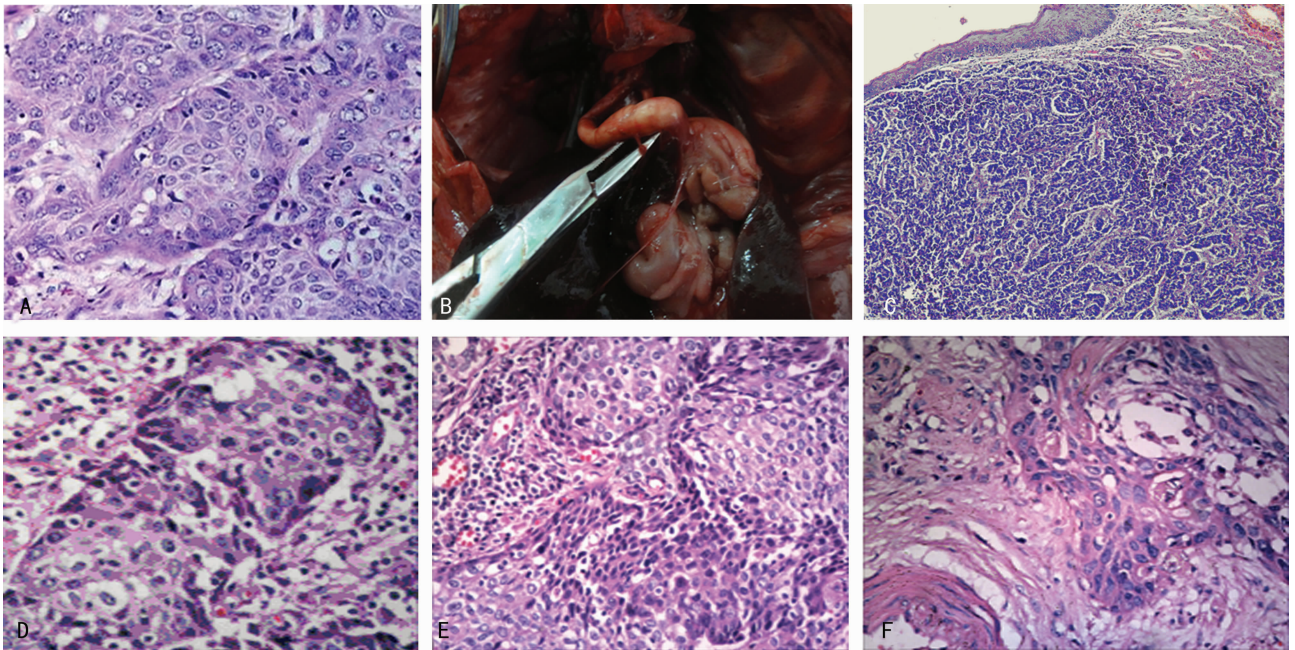


图 1 病理学检测结果
A:皮下移植模型肿瘤;B:原位肿瘤肉眼观;C:原位肿瘤镜下观;D:原位移植模型淋巴结转移瘤;E:原位移植模型肝转移瘤;F:原位移植模型肺转移瘤。

图 1 病理学检测结果

3 讨 论

肿瘤动物模型是研究肿瘤生物学行为及肿瘤治疗的主要工具之一,广泛应用于肿瘤生长、肿瘤免疫、抗肿瘤药物筛选等方面的研究^[5]。应用裸鼠建立的移植性肿瘤模型是目前应用最多的动物模型,他是将外源性肿瘤细胞或组织移植到裸鼠内生长并形成肿瘤,其中以皮下移植模型和原位移植模型最为常见。

本研究采用瘤组织块接种法,这种方法能较好地保持肿瘤细胞形态,接种后成瘤率高。在裸鼠皮下传代 3 次的目的是通过反复传代可以对肿瘤细胞起到筛选作用,提高成瘤率。与直接移植患者肿瘤标本相比,经过传代后,移植瘤处于无菌状态,用传代后的移植瘤建模,瘤体更易存活,也有较高的成瘤率^[6]。本次研究也证实了这一点。

传统的移植途径是将肿瘤细胞或组织进行皮下移植。皮下移植模型具有操作简单、便于观察的优点,可以部分模拟人

恶性肿瘤的生物学特征,但皮下移植属于异位移植,脱离了起源组织器官的微环境,在实验中移植瘤的一些行为常不同于原先患者身上恶性肿瘤的生物学行为^[7]。本次研究发现,皮下移植瘤虽与人原发食管癌组织相同,都是低分化鳞状细胞癌,但移植瘤被纤维结缔组织囊包裹,呈局限性生长,未见局部扩散和远处器官转移,原因考虑是结缔组织包裹干扰了新生血管的生长和长入^[8]。故皮下移植模型难以用于肿瘤转移相关的研究。

原位移植,是将人类肿瘤细胞或组织移植到免疫缺陷动物相当于人类肿瘤原发部位组织器官内。与皮下移植相比,原位移植具有丰富的自然血管,可保证瘤体获得充分的营养,且肿瘤细胞具有亲器官性,容易在与母体肿瘤相同的器官上滞留、浸润或扩散,更能模拟食管癌侵袭、转移的特征^[9]。本次研究发现,食管黏膜下移植瘤的成瘤率要高于皮下移植,为低分化鳞状细胞癌,没有包膜,呈浸润性生长,可见广(下转第 833 页)

II 诱导 VSMCs 的增殖与迁移的影响。实验结果显示, PD98059 能显著抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 的增殖与迁移, 而 SB23015 能显著促进 Ang II 诱导的 VSMCs 的增殖与迁移, 提示 Ang II 诱导的细胞增殖、迁移与磷酸化 ERK1/2 MAPK 表达上调有关, 且磷酸化 P38 在此过程中起负性调节作用。实验还应用蛋白质印迹法评估了 Val、PD98059 及 SB23015 对 Ang II 诱导的 VSMCs 内磷酸化 ERK1/2、P38 MAPK 表达上调的影响。作者选择 30 min 作为观察时间, Val($10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L) 和 SB23015(10^{-5} mol/L) 明显抑制了 Ang II 诱导的磷酸化 P38 MAPK 的表达, PD98059(10^{-5} mol/L) 则对此过程无明显影响, 说明磷酸化 ERK1/2 MAPK 则对 Ang II 诱导的磷酸化 P38 MAPK 的表达无调节作用。这与 Kintscher 等^[9] 研究结果相一致。

综上所述, Val 预防支架术后再狭窄的机制可能与其抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 的增殖与迁移及 ERK1/2 MAPK 表达有关, 而磷酸化 P38 MAPK 则对 Ang II 诱导的磷酸化 ERK1/2 MAPK 的表达起负性调节作用。这为今后临床应用 Val 预防支架植入术后再狭窄提供了依据。

参考文献:

- [1] 李拥军, 常亮. 2012 年中国经皮冠状动脉介入治疗指南解读[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(4): 294-296.
- [2] Segev A, Nili N, Qiang B, et al. Inhibition of intimal hyperplasia after stenting by over-expression of p15; a member of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(3): 417-425.
- [3] Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(12): 1706-1713.
- [4] 首云锋, 陈明. 血管紧张素受体 AT2 及 AT4 研究进展[J]. 心血管病学进展, 2010, 1(1): 58-61.
- [5] Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis; bane of the stent era[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(3): 232-239.

(上接第 829 页)

泛淋巴结转移及肝肺转移。可见, 原位移植为人类恶性肿瘤的研究, 尤其是与侵袭、转移相关的研究提供了更为适宜的动物模型。

参考文献:

- [1] Povlsen CO, Rygaard J. Heterotransplantation of human epidermoid carcinomas to the mouse mutant nude[J]. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1972, 8(6): 713-717.
- [2] 张东兴, 颜登国, 赵丙波. 人大肠癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(3): 247-250, 254.
- [3] 饶子亮, 黄威, 郑佳琳, 等. 两种人乳腺癌裸鼠移植瘤模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(5): 5-8.
- [4] 王晓东, 孙大强, 李志, 等. 个体化裸鼠荷人肺癌肿瘤模型的建立[J]. 天津医药, 2012, 40(5): 499-501.
- [5] 周杰, 漆松涛, 潘军, 等. 人颅咽管瘤裸鼠皮下移植瘤模型

- [6] Iwata A, Miura S, Imaizumi S, et al. Do valsartan and losartan have the same effects in the treatment of coronary artery disease? [J]. Circ J, 2007, 71(1): 32-38.
- [7] Peters S, Trümmel M, Meyners W, et al. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation—results of the VALVACE trial[J]. Int J Cardiol, 2005, 98(2): 331-335.
- [8] Sharma V, Sharma A, Kansal L, et al. The effect of oral administration of Allium sativum extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(3): 928-936.
- [9] Kintscher U, Bruemmer D, Blaschke F, et al. p38 MAP kinase negatively regulates angiotensin II-mediated effects on cell cycle molecules in human coronary smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(3): 552-556.
- [10] AbdAlla S, Lothar H, el Missiry A. Angiotensin II AT2 receptor oligomers mediate G-protein dysfunction in an animal model of Alzheimer disease [J]. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6554-6565.
- [11] Lee JC, Kumar S, Griswold DE. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy[J]. Immunopharmacology, 2000, 47(2/3): 185-201.
- [12] Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(9): 717-726.
- [13] Blaschke F, Leppanen O, Takata Y. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries[J]. Circ Res, 2004, 95(12): e110-123.

(收稿日期: 2013-10-18 修回日期: 2013-12-20)

的初步建立[J]. 重庆医学, 2012, 41(5): 455-457.

- [6] Furukawa T, Fu X, Kubota T, et al. Nude mouse metastatic models of human stomach Cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue[J]. Cancer Res, 1993, 53(5): 1204-1208.
- [7] 杨宏宇, 李金荣, 胡传真. 人舌鳞癌裸鼠原位移植模型及其主要生物学特性的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1998, 33(2): 73.
- [8] 王辉, 吴洁, 花宝金, 等. 人胃癌免疫缺陷小鼠移植瘤转移模型研究进展[J]. 北京中医药, 2012, 31(3): 237-240.
- [9] 高进, 李敏民. 中国人类恶性肿瘤在免疫缺陷动物体内的模型建立及现存问题[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(1): 69-72.

(收稿日期: 2013-10-22 修回日期: 2013-11-27)