

人大肠癌HT-29原位移植瘤裸小鼠模型建立方法的比较^Δ

朱 琰^{1*}, 刘 静^{2#}, 史 勤², 吕 祥²(1.上海中医药大学附属曙光医院药剂科, 上海 200021; 2.上海市中医医院肿瘤科, 上海 200071)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3463-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.03

摘要 目的:比较组织块包埋法和组织块生物胶粘贴法建立人大肠癌HT-29原位移植瘤裸小鼠模型的特点和差异。方法:将24只BALB/c裸小鼠均分为两组,分别采用组织块包埋法(包埋法组)和组织块生物胶粘贴法(粘贴法组)建立人大肠癌HT-29原位移植瘤模型,于接种后8周处死,考察两组裸小鼠建模前后的体质量和成瘤率、瘤质量、瘤体积,以及发生肿瘤转移和产生腹水的情况。结果:与粘贴法组比较,包埋法组裸小鼠的瘤质量更大($P<0.05$),建模前后体质量和瘤体间差异无统计学意义($P>0.05$),两组裸小鼠的成瘤率均为100%。粘贴法组只有4只裸小鼠发生肿瘤转移,1只产生腹水;包埋法组所有裸小鼠均发生肿瘤转移,有6只产生腹水。结论:两种方法建模均表现出良好的成瘤率和肿瘤生长,但包埋法组能更好地表现肿瘤转移等生物学特征。
关键词 大肠癌;HT-29原位移植瘤;裸小鼠;组织块包埋法;组织块生物胶粘贴法;建模

Comparison of the Methods for the Establishment of Human Colorectal Cancer HT-29 In-situ Transplantable Tumor Model in Nude Mice

ZHU Yan¹, LIU Jing², SHI Qin², Lü Xiang²(1.Dept. of Pharmacy, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China; 2.Dept. of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of TCM, Shanghai 200071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the characteristics and difference of tissue mass investment method and tissue mass biogel glue method to establish human colorectal cancer HT-29 in-situ transplantable tumor model in nude mice. METHODS: 24 BALB/c nude mice were divided into 2 groups. The human colorectal cancer HT-29 in-situ transplantable tumor model was established by tissue mass investment method (investment group) and tissue mass biogel glue method (glue group) separately. All nude mice were sacrificed after 8 weeks. The changes of body weight, tumor developing rate, tumor weight, tumor volume, tumor metastasis and ascites were observed in 2 groups before and after modeling. RESULTS: Compared with glue group, tumor weight of nude mice in the investment group were greatly changed ($P<0.05$); there was no statistical significance in the difference of body weight and tumor weight before and after modeling ($P>0.05$). The tumor developing rates of both groups were 100%. 4 nude mice suffered from tumor metastasis and 1 suffered from ascites in glue group; all mice suffered from tumor metastasis and 6 suffered from ascites in investment group. CONCLUSIONS: Both methods can show sound tumor developing rate and tumor growth, but the investment group shows better tumor biocharacteristics such as metastasis.

KEY WORDS Colorectal cancer; HT-29 in-situ transplantable tumor; Nude mice; Tissue mass investment method; Tissue mass biogel glue method; Modeling

在笔者以往的研究中发现,使用人大肠癌组织块包埋法(下简称包埋法)能成功建立人大肠癌裸小鼠原位移植瘤模型,并能很好地反映肿瘤生长、转移等生物学特点^[1]。但包埋法的实际操作对手术要求较高,手术操作相对复杂,包埋缝合不好时容易造成瘤块掉落,从而引起建模失败,因此需要一种相对简单易行的建模方法。有研究^[2]报道,组织块生物胶粘贴法(下简称粘贴法)可成功在胃肠道肿瘤动物中建立肿瘤组织块原位移植瘤模型,且成功率高,操作简单方便,可避免包埋缝合引起的造模失败。为了解模型动物采用这两种方法建模后肿瘤生物学特征的异同,笔者比较了包埋法和粘贴法建立人大肠癌HT-29原位移植瘤裸小鼠模型的特点和差异。

Δ 基金项目:上海市自然科学基金项目(No.08ZR1419300);上海市教育委员会科研创新项目(No.08YZ59)

* 主任药师,硕士。研究方向:药理学及药事管理。E-mail: shuguangypjg@126.com

通信作者:主任医师,副教授。研究方向:中西医结合防治消化道恶性肿瘤的临床与实验研究。E-mail: wildroselj@gmail.com

1 材料

YD-1508B石蜡两用切片机(上海五相仪器仪表有限公司);XSZ-DZ显微镜(重庆光学仪器厂);JA-1003电子分析天平(上海天平仪器厂)。

医用生物胶(广州白云医用胶公司,批号:20080526,规格:每支1ml);盐酸氯胺酮注射液(上海中西药业股份有限公司产品,批号:000602,规格:每支100mg)。

大肠癌HT-29细胞由上海市肿瘤研究所提供。

BALB/c裸小鼠26只,SPF级,4~6周龄,体质量18~20g,由中国科学院上海实验动物中心提供,使用许可证号:SYXK(沪)2004-2005。按SPF级要求饲养,自由饮食。

2 方法

2.1 裸小鼠原位移植瘤块的制备

取BALB/c裸小鼠2只,取对数生长期HT-29细胞制备成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $8 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$,用无菌一次性注射器在裸小鼠右侧腋下皮下注射,每只裸小鼠剂量0.1ml。上述制备过程由上海市肿瘤研究所协助完成。连续观察4周,皮

下瘤直径达1 cm时处死裸小鼠,切下瘤块去除坏死部分,选用淡黄色或呈鱼肉状瘤组织置于0.9%氯化钠溶液(生理盐水)中,剪成直径2 mm的瘤块备用。

2.2 包埋法裸小鼠原位移植瘤模型的制作

取12只裸小鼠作为包埋法组。术前禁食12 h,腹腔内注射氯胺酮进行麻醉,仰卧固定,选择下腹正中切口,打开腹腔,找到盲肠,在距离盲肠末端1 cm处肠系膜侧的浆膜面,用手术刀轻轻刮伤浆膜层,然后用8-0无损伤尼龙线和圆针将已制备好的新鲜瘤块行“8”字全层透壁包埋缝合在损伤处,然后用无损伤缝线全层缝合,术毕观察无活动性出血后关腹。

2.3 粘贴法裸小鼠原位移植瘤模型的制作

取12只裸小鼠作为粘贴法组。术前准备、麻醉、手术等方法同“2.2”项下,用手术刀轻轻刮伤浆膜层后,在瘤块表面滴加0.05 ml医用生物胶,将瘤块粘贴在浆膜层上,等医用OB生物胶凝固后,将肠组织纳回腹腔,然后用无损伤缝线全层缝合,术毕观察无活动性出血后关腹。

术后两组裸小鼠均暂时分笼饲养至完全清醒。包埋法和粘贴法的整个手术过程均在“2.1”项切下皮下瘤后1 h内完成。

2.4 标本处理

所有裸小鼠均于接种后8周处死,处死后立即打开腹腔,切取肿瘤组织,测量瘤块的质量和长(a)、短(b)径后,经10%甲醛溶液固定,送病理检查。

2.5 观察指标

2.5.1 一般情况观察。术后每天观察并记录所有裸小鼠的活动和进食情况,以及腹部是否可以触及实质性瘤块。所有裸小鼠建模前和处死前称体质量。

2.5.2 肿瘤形态学观察。观察和测量瘤质量、瘤体积(V)、瘤块与周围肠壁关系及肿瘤转移情况。瘤块近似体积计算公式为 $V=a \times b^2/6$ 。

2.5.3 病理检查。瘤块用10%甲醛溶液固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,YD-1508B石蜡两用切片机切片(6 μm厚),苏木精染色,XSZ-DZ显微镜下进行病理观察。

2.6 统计学方法

采用SAS 8.0统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差表示。组间比较先进行方差齐性检验,方差齐采用t检验,方差不齐采用Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

包埋法组有1只裸小鼠于建模术后次日死亡,考虑可能因手术或灌胃不当引起;另有1只裸小鼠于建模术后第22天死亡,死因不明。粘贴法组有1只裸小鼠于建模术后第48天死亡,为恶病质和肠梗阻引起,病理证实肿瘤类型为腺癌。最终包埋法组和粘贴法组分别有10、11只裸小鼠纳入数据分析。

3.1 一般情况观察

两组裸小鼠建模术后第3周左右,腹部可触及结节性肿块,质地较硬,随后肿块增大较迅速,并在4周左右裸小鼠开始消瘦、反应迟缓、行动受限,逐渐呈现恶病质表现。建模前两组裸小鼠体质量相似,处死前两组裸小鼠体质量减轻程度差异无统计学意义($P=0.0519$),具体数据见表1。

3.2 肿瘤形态学结果

3.2.1 肿瘤大体形状。21只裸小鼠均在盲肠末端出现实质性肿瘤,表面结节状突起,切面呈鱼肉状,部分瘤块切开后中央有小片坏死区。由于瘤外形无明显差异,所以只选取了包埋法中的1个瘤块进行拍照,照片见图1。

3.2.2 瘤质量和瘤体积。包埋法组的瘤质量明显高于粘贴法

组的瘤质量($P=0.0047$),但两组的瘤体积差异无统计学意义($P=0.7913$),具体数据见表1。

表1 两组裸小鼠体质量、成瘤率、瘤质量、瘤体积比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of body weight, tumor developing rate, tumor weight and tumor volume between 2 groups($\bar{x} \pm s$)

项目	包埋法组(n=10)	粘贴法组(n=11)
建模前体质量,g	18.70 ± 0.68	18.69 ± 0.86
处死前体质量,g	14.71 ± 1.41	15.76 ± 1.28
体质量减轻,g	4.11 ± 1.52	2.57 ± 1.02
成瘤率,%	100	100
瘤质量,g	1.51 ± 0.77	0.49 ± 0.22*
瘤体积,cm ³	0.90 ± 0.43	0.84 ± 0.56

与包埋法组比较: * $P < 0.05$

vs. investment group: * $P < 0.05$

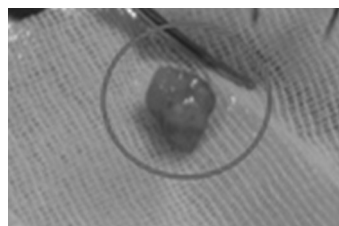


图1 人大肠癌原位移植瘤块照片

Fig 1 Photograph of human colorectal cancer in-situ transplantable tumor

3.2.3 肿瘤转移和腹水。包埋法组有6只裸小鼠产生腹水,所有裸小鼠均发生肿瘤转移(转移部位包括腹腔种植转移、肝转移、股沟转移等);其中1只裸小鼠有1个转移灶,5只裸小鼠有2个转移灶,1只裸小鼠有3个转移灶,3只裸小鼠有4个转移灶。粘贴法组有1只裸小鼠产生腹水,4只裸小鼠发生肿瘤转移(3只裸小鼠发生腹腔种植转移,1只裸小鼠发生肝转移,1只裸小鼠发生股沟转移);其中1只裸小鼠有2个转移灶,其余3只裸小鼠只有1个转移灶。

3.3 病理检查情况

所有裸小鼠取得的瘤块组织均为低至中度分化腺癌,癌细胞异型性明显,多呈实体状排列,部分呈腺样排列,肿瘤间质少,均有不同程度的肿瘤组织坏死和炎细胞浸润。两组裸小鼠结肠组织显微镜图见图2。

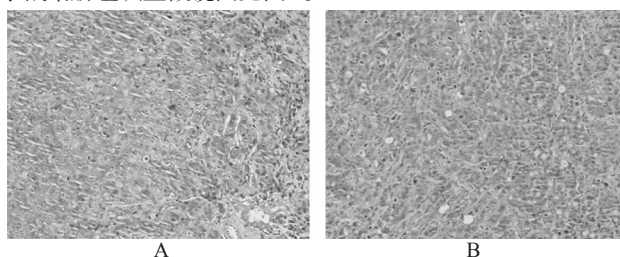


图2 两组裸小鼠结肠组织显微镜图(×200)

A.包埋法组;B.粘贴法组

Fig 2 Microscopic images of colonic tissue of nude mice in 2 groups(×200)

A. investment group; B. glue group

由图2可见,包埋法组和粘贴法组裸小鼠结肠壁有大量腺癌组织生长,组织结构遭到破坏。

4 讨论

建立一个理想的大肠癌裸小鼠原位移植瘤模型应从几个方面考虑,包括致癌方法简单易行、实验周期短、致癌率高、诱

蛋白酶激活受体1活化对小鼠内皮祖细胞增殖和迁移的影响

代静澜*,古平,潘波,牟海刚(解放军324医院心内科,重庆 400020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3465-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.04

摘要 目的:研究蛋白酶激活受体1(PAR-1)活化对小鼠内皮祖细胞(EPCs)增殖和迁移的影响,及CXC型趋化因子受体4(CXCR4)的作用。方法:取对数生长期的的小鼠EPCs,加入PAR-1激活剂SFLLRN(50 μmol/L)进行活化,再加入CXCR4拮抗药AMD3100使后者终浓度分别为0、50、100、200 nmol/L(即b、c、d、e组);另设不活化、不加AMD3100的为空白对照(即a组)进行比较。采用荧光定量实时聚合酶链式反应法检测各组细胞中CXCR4 mRNA表达水平,Transwell小室共培养分析EPCs的迁移能力,MTT法检测各组细胞作用24、48、72、96 h后的EPCs增殖情况。结果:与a组比较,b组EPCs中CXCR4 mRNA表达水平和细胞迁移能力均明显增加($P<0.05$),细胞增殖能力增强;与b组比较,d、e组EPCs中CXCR4 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),c、d、e组EPCs细胞迁移能力均明显减弱($P<0.05$),增殖能力明显减慢,且呈剂量依赖性。结论:PAR-1活化能促进小鼠EPCs的增殖和迁移,其作用可能与CXCR4表达的上调有关。

关键词 蛋白酶激活受体1;CXC型趋化因子受体4;小鼠;内皮祖细胞;增殖;迁移

Effects of PAR-1 Activation on the Proliferation and Migration of Endothelial Progenitor Cells in Mice

DAI Jing-lan, GU Ping, PAN Bo, MOU Hai-gang (Dept. of Cardiology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of PAR-1 activation on the proliferation and migration of endothelial progenitor cells (EPCs) in mice and the effects of CXC receptor 4 (CXCR4). **METHODS:** Mice EPCs at logarithmic growth phase were stimulated by 50 μmol/L SFLLRN (protease-activated receptor 1 activator), then added with 0, 50, 100, 200 nmol/L of AMD3100 (group b, c, d, e), which was an antagonist of CXCR4. Unactivated EPCs without AMD3100 were included in blank control (group a). The mRNA expression of CXCR4 was detected by fluorescent quantitative real-time PCR. The migration ability of EPCs was analyzed by Transwell chambers, and the proliferation of EPCs was detected by MTT after treated for 24, 48, 72 and 96 h. **RESULTS:** Compared with group a, the mRNA expression of CXCR4 and migration ability of EPCs were enhanced significantly in group b ($P<0.05$), and the proliferation ability of EPCs was also enhanced. Compared with group b, the mRNA expression of CXCR4 was decreased significantly in group d and e ($P<0.05$), and the migration ability of EPCs were decreased significantly in group c, d and e ($P<0.05$); and the proliferation ability of EPCs was obviously slow down in dose-dependant manner. **CONCLUSIONS:** Activation of PAR-1 induces the proliferation and migration of EPCs in mice, and its mechanism may be related to the up-regulation of CXCR4.

KEY WORDS Protease-activated receptor 1; CXC receptor 4; Mice; Endothelial progenitor cells; Proliferation; Migration

发的肿瘤病理类型、生物学特性、组织化学改变等应与人体大肠癌类似。包埋法建立人大肠癌原位移植瘤的成功率较高,笔者以往的经验显示成功率达90%~100%;肿瘤的生物学特性与人大肠癌自然生长和转移过程相似,可出现肠梗阻、肝转移、腹水、种植转移、恶病质等^[1-3]。但其缺点是对手术要求较高,需要操作人员有一定的手术经验和技能,而且手术耗时相对较长,动物死亡率较高。

粘帖法建立原位移植瘤,其操作相对包埋法简便易行,对操作人员而言难度较低,对实验动物创伤小。笔者在实验中采用了医用OB生物胶,该生物胶的主要成分是 α -氰基丙烯酸烷基酯,其生物相容性好,不会产生致癌、致畸和致突变作用,因而不会干扰本实验的结果。粘帖法在胃癌中应用较多,而在大肠癌中鲜见。

本文结果显示,两组裸小鼠成瘤率均达到100%,均得到了病理证实。实验周期较短,在3周左右就能在体外扪及瘤块

* 主治医师,硕士。研究方向:缺血性心脏病的研究。E-mail: guotaibi@163.com

生长。但包埋法组的瘤质量较粘帖法组更高,裸小鼠体质量减轻程度等恶病质表现更明显,且其肿瘤生物学特性尤其是肿瘤转移、腹水产生等较粘帖法组更明显。由此推测可能是粘帖组喷涂胶量过多,创面胶液过量会形成结晶,延缓其降解吸收,影响移植瘤的生长所致^[2],但这还需要进一步的研究证实。总之,两种方法建模均表现出良好的成瘤率和肿瘤生长,但包埋法组能更好地表现肿瘤转移等生物学特性。

参考文献

- [1] 刘静,史勤,吕祥.健脾复方对人大肠癌移植瘤裸小鼠肿瘤生长转移的影响[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(8):57.
- [2] 苏晓妹,魏品康,张涛,等.人胃癌完整组织块裸鼠原位种植转移模型的建立方法和技巧[J].西南国防医药,2009,19(12):1182.
- [3] 王磊,陈卫昌,谢学顺,等.塞来昔布对实验性结肠癌原位移植瘤生长及血管形成的影响[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(17):1295.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-06-17)