

建立裸小鼠人胃癌原位移植模型的一种新方法

汪芳裕 朱人敏 王 琳 孙敬方 恽时锋

摘要 建立人胃癌裸小鼠原位移植模型,并对不同方法进行比较。方法: BALB/Cnu/nu 裸小鼠 18 只,随机分为三组,胃囊法组通过手术将 SGC-7901 人胃癌组织块移植到裸小鼠胃壁缝制的粘膜小囊内;缝挂法组以缝挂方法作对比;第三组为对照组。待荷瘤鼠濒临死亡时处死进行解剖检查。结果:胃囊法组及缝挂法组原位成瘤率及局部浸润发生率均为 100%,胃囊法组肝脏转移率为 66.7% (4/6),显著 $P < 0.01$ 高于挂法组 (33.3%),且幽门梗阻及癌性腹水发生率亦明显提高 (分别为 83.33% vs 16.6% $P < 0.001$; 66.7% vs 16.6%, $P < 0.001$)。结论:胃囊法建立的模型能更好地再现人胃癌的生长特性。

关键词 胃癌; 疾病模型; 裸小鼠; 原位移植

浸润和转移是恶性肿瘤致死的主要原因,人癌转移模型是研究肿瘤转移的重要手段,裸鼠体内原位移植建立的转移模型是目前国际上普遍接受的技术理论模式^[1]。原位移植模型的研究始于 80 年代末,进入 90 年代后已逐步完善, Furukawa 等^[2]于 1993 年首次报道将组织学完整的瘤组织块缝挂于裸鼠胃壁,建立人胃癌原位移植模型与以前采用浆膜下注射瘤细胞悬液的方法相比,这种模型原位成瘤率达 100%,且肝脏转移的发生率较高。本实验对上述方法进一步改进,在裸鼠胃壁缝制粘膜小囊,将瘤组织块包埋,成功地建立了较为理想的胃癌原位移植模型。

1 材料与方法

1.1 动物 BALB/C-nu/nu 裸小鼠购自上海市肿瘤研究所(实验动物合格证号为 0001261),在 SPF 条件下饲养。

1.2 细胞株 SGC-7901 人胃癌细胞株引自上海市第六人民医院,有含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养于 CO₂ 恒孵箱中,温度为 37℃,CO₂ 浓度为 5% 隔日换培养液一次,以 0.02% EDTA 消化传代。

1.3 皮下移植模型的建立和传代 方法详见文献^[3],本实验以第八代皮下移植瘤为原位移植的材料。

1.4 原位模型的建立 取 6~8 周龄健康裸小鼠 18 只,随机分为三组。胃囊法组 6 只,所有动物术前禁食 12 小时,以 0.5% 的戊巴比妥钠腹腔麻醉 (50mg/Kg),常规消毒皮肤,选择左侧正中旁切口,打开腹腔后将胃拉出,先用 5-0 丝线对腺胃胃壁浆膜层作荷包缝合(直径约 0.5cm),再用眼科剪细心剪切荷包中心胃壁浆肌层,如此制备腺胃粘膜小囊,然后将 3~4 块瘤组织块(直径为 0.1cm)包埋至小囊内,扎紧荷包缝线,最后以 4-0 丝线分别缝合腹膜(含肌层)及皮肤。精心饲养观察,待动物濒临死亡时处死解剖,取原位瘤体、肝脏、网膜、肺等处标本,收取腹水。缝挂法组 6 只,用同样大小的自网膜组织块包埋至粘膜小囊中,其余处理程序同模型组。

1.5 病理组织学观察 所取标本常规固定、切片、染色后行光镜及电镜检查。

2 结果

2.1 胃囊法原位移植模型的生长特点 所有正式实验动物均无意外死亡。模型组裸鼠移植手术后 1 周左右动物伤口愈合,皮肤缝线脱落。术后第 3~4 周原位肿瘤突破潜伏期,左上腹可触及 0.2~0.3cm 的小结节,6~8 周左上腹结节逐渐增大且质地变硬,8~10 周左右可触及 1.0~1.5cm 的包块,以后肿瘤迅速长大,左上腹包块透壁可见,表面呈结节状,动物逐渐消瘦。12 周以后动物极度消瘦,活动

受限,部分动物瘤体突出至皮下。16 周以后动物进食减少,逐渐衰竭而死亡。

2.2 病理学检查 肉眼检查可见胃壁上有灰白色鱼肉状包块,与网膜粘连,胃腔受压,胃底扩张,有大量食物残留,部分动物可见少量腹水,肝脏表面可见数个至十余个灰白色小结节,直径约 2~5mm 大小。

原位病灶为腺癌组织。癌细胞排列呈巢状,在

胃壁呈浸润性生长,中央有片状坏死。癌细胞核大,畸形,核仁明显,病理性核分裂相多见。电镜下更清楚的观察到巨核及怪核、核仁明显且数目增多,染色质浓集,细胞间隙增宽及线粒体空泡变等。此外,肝转移灶及腹水涂片均为与原位癌灶一致的癌组织。

2.3 胃囊法与缝挂法的比较(见附表)。

附表

胃囊法与缝挂法建立的原位模型比较

方法	原位成瘤率	局部浸润	肝脏转移	幽门梗阻	腹水	中位生存期(周)
胃囊法组	6/6	6/6	4/6 *	5/6 * *	4/6 * *	18
缝挂法组	6/6	6/6	2/6	1/6	1/6	16
对照组	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	35

注:与缝挂法组比较 * $P < 0.01$ * * $P < 0.001$

3 讨论

人类肿瘤裸鼠移植模型的研究已有近 30 年的历史,自 1969 年首例人类结肠癌移植到裸鼠皮下获得成功以来,人们相继建立了黑色素瘤、肾癌、乳腺癌及前列腺癌等皮下移植模型^[4,5],移植肿瘤基本保持了来源肿瘤的组织结构和生化特性,因而人癌裸鼠移植模型已越来越广泛地用于肿瘤学研究。然而,移植肿瘤缺乏人癌最典型的特性—转移。其原因可能是皮下肿瘤一般有包膜包绕,故难以表达其转移潜能^[6]。Morikawa 等^[7]将人结肠癌细胞移植到裸鼠体内的不同部位,发现其生长特点和转移能力明显不同,结肠癌细胞移植到裸鼠盲肠浆膜下最易发生肠系膜浸润和肝脏转移,因而认为肿瘤生长的器官环境(organ environment)对其转移潜能的表达有着直接的影响。80 年代后期人们开始研究原位移植模型(orthotopic transplantation),即将肿瘤种植到相应的器官部位,成功地再现人类恶性肿瘤远处转移等特点^[8]。

Furukawa 等^[2]将瘤组织块缝挂于浆膜损伤的胃壁(即缝挂法),使肿瘤在胃壁呈浸润性生长,成功地建立人胃癌原位移植模型,与以前采用的浆膜下注射瘤细胞悬液的方法相比,这种模型成瘤率及肝脏转移的发生率均明显提高,因而认为,组织学完整的瘤组织块是较之瘤细胞悬液更为理想的移植材料。

然而,组织块缝挂法的瘤组织早期并未与胃壁粘膜层接触,成瘤以后也主要向胃腔外生长,且易与腹壁粘连,直至晚期一般不发生幽门梗阻^[2],这些都与人体胃癌有所不同,为了克服这些不足,我们首次采用荷包缝合的方法先制备粘膜小胃囊,再将瘤组织块包埋其中(即胃囊法),使其早期直接与粘膜接触,如此建立的模型肿瘤主要向粘膜面生长,以后

随着肿瘤的生长,必须从胃壁血管中获得血液供应方能继续长大,晚期可发生幽门梗阻、癌性腹水、局部浸润及肝脏转移等,因而更加符合临床胃癌的特点。

参 考 文 献

- 1 Liotta, LA, Steeg PS, Stetler - Steveson WG, Cancer metastasis and angiogenesis; an imbalance of positive and negative regulation. Cell, 1991,64:327
- 2 Furukawa T, Fu, X, Kubota T, et al. Nude mouse metastatic model of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologic intact tissue. Cancer Res, 1993,53:1204
- 3 汪芳裕,李绍白,林菊生,等. NK 活性与裸鼠体内移植肿瘤生长的关系. 中国免疫学杂志, 1995, 11(增刊): 492
- 4 Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, et al. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinoma implanted into different sites in nude mice. Cancer Res, 1986,46:1928
- 5 Stephenson RA, Dirney CPN, Gohji NG, et al. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. J natl Cancer Inst, 1992,84:951
- 6 Fidler IJ. Critical factors in biology of human cancer metastasis; twenty - eighth G, H, A, Clowes memorial award lecture. Cancer Res, 1990,50:6130
- 7 Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, et al. Influence of organ environment on the growth selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice, Cancer Res, 1988,48:6863
- 8 孙昉亮,汤钊猷,刘康达,等. 裸鼠人肝癌原位移植模型的生长特性及转移潜能. 中华医学杂志, 1995, 75:673

(下转 19 页)

- dimethyl sulfoxide and retindic acid in the cell growth and the pheuotype of ovarian cancer cells. J Cell Science, 1991,100:657
- 3 艾兆伟,查锡良,汤华,等. 甲酸对人肝癌细胞一些表型的逆转作用. 中华肿瘤杂志,1991,13:9
- 4 Feroze NC. Ultrastructural pathology of the cell and mareix. Third Edition, Butterworths, 1989, 1:192~550
- 5 谭鲁鲁,周柔丽主编. 医学细胞生物学. 第一版. 北京中国协和医科大学和北京医科大学联合出版社, 1992

The Growth Inhibition and the effects of ultrastructure of DMSO and RA on Human Ovarian Cancer Cell COC1

Li Congrong, et al

The first affiliated hospital of Hubei Medical

The effects of DMSO and RA on cell growth and ultrastructure in the cell were studied by using ovarian cancer cell COC1 as a model. The results showed that the proliferation of COC1 cells was significantly inhibited by DMSO or RA, DMSO or RA can change the structural characteristic of COC1 cell from malignant state to differentiated one. It suggest that DMSO and RA have the ability to induce differentiation of human ovarian cancer cell.

Key words: DMSO; RA; Ultrastructure

(上接 16 页)

Establishment of an model of human gastic cancer in nude mice via orthotopic transplantation

Wang Fangyu, et al

Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002

Objective: to establish an orthotopic transplant model of human stomach cancer and compare two different approaches. Methods: Eighteen BALB/C - nu/nu nude mice were randomly divided into three groups: for the first group, SGC - 7901 human gastric tumor tissue pieces were transpianted into a small "pouch" in stomach wall; for the second group, tumor tissue pieces were fixed in the stomach wall directly; and the third group was the control. All the tumor - bearing mice underwent autopsy, Results: Both approaches yielded 100% tumor take rate, 100% local invasiveness however, liver metastasis were higher in the first group than the second one (66.7% vs 33.3%, $P < 0.001$) and so were pylorochesis and ascites (83.33% vs 16.6%, $P < 0.001$; 66.7% vs 16.6%, $P < 0.001$, respectively). Conclusion: the model grew more "patient - like" when tunor tissue pieces were implanted into the small artificial pouch.

Key words: Gastric cancer; Nude mice; Disease model; Orthotopic implantation