研究报告

二甲基苯蒽/佛波酯两步化学法诱导小鼠皮肤癌的模型优化

孙佳惠[1],单慧[1],潘萧羽[2],顾玉超[1]*

(1. 中国海洋大学医药学院,教育部海洋药物重点实验室,山东 青岛 266003;
2. 青岛黄海学院基础教学部,山东 青岛 266427)

【摘要】 目的 对两步化学诱导法建立 BALB/c 小鼠皮肤癌模型进行方法优化。**方法** 将 BALB/c 小鼠背部剃毛暴露出约 2 cm×2 cm 的皮肤,小鼠随机分为空白对照组和 4 个模型组,4 个模型组第 1 周分别涂 1、2、4、7 次 100 μg/100 μL DMBA/丙酮液,后续均 1 周涂两次 4 μg/100 μL TPA/丙酮液,记录小鼠体重、成瘤时间、成瘤数量,并在 12 周后处死小鼠取肿瘤组织及瘤旁组织做 HE 染色分析。**结果** 1 周涂 1 次 DMBA 成瘤周期长;1 周两次成瘤周期短,质量高;1 周 4 次会损伤皮肤但不影响肿瘤的形成;1 周 7 次对皮肤伤害较大并导致小鼠死亡。**结论** 采用第 1 周涂两次 DMBA 启动,后续用 TPA 连续诱导建立 BALB/c 小鼠皮肤癌模型操作简便,成瘤期短,癌变率高,与人类皮肤癌发生发展相似,可用于建立研究皮肤癌较为理想的实验动物模型。

【关键词】 皮肤癌;两步化学法;小鼠;二甲基苯蒽;佛波酯
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 01-0031-05
Doi:10. 3969/j. issn. 1005 – 4847. 2017. 01. 006

Optimization of the establishment protocol of a mouse model of MBA/TPA-induced skin cancer

SUN Jia-hui[1], SHAN Hui[1], PAN Xiao-yu[2], GU Yu-chao[1]*

(1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China; Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education; Qingdao 266003, China; 2. Basic Teaching Department of Qingdao Huanghai University, Qingdao 266427)

【Abstract】 Objective To induce skin cancer in BALB/c mice using DMBA as initiator and TPA as tumor promoter. Through optimizing the doses and frequencies of DMBA administration to establish a stable skin cancer model with less time and causing less skin damage. **Methods** Shaving the back of mice to expose a piece of skin around 2 cm × 2 cm. The mice were divided into a blank control group and four treatment groups randomly. These four groups were given 1, 2, 4, 7 times 100 μg/100 μL DMBA/acetone, respectively, in the first week, and twice 4 μg/100 μL TPA/acetone per week in the next 11 weeks. The body weight changes, time of tumor formation and number of tumors formed were recorded during the experiment. The mice were sacrificed at 12th week and samples of tumor tissue and adjacent normal skin tissue were taken for pathological examination using HE staining. **Results** Tumors were observed at the 7th week in the group with once DMBA administration in the first week and at the 4th week in the group with twice DMBA administration in the first week. Skin cancers were formed also in the group with 4-time DMBA administration in the first week, however, with significantly more severe skin damages. The mice receiving DMBA everyday in the first week died at the 3th week. **Conclusions** The best induction protocol for skin cancer in BALB/c mice should be twice DMBA in the first week followed by twice TPA

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(项目编号 81272264);中央高校基本科研业务费(201562028)。
[**作者简介**]孙佳惠(1993 –)女,硕士研究生,研究方向:药理学。Email: pharmacy_sjh@ 163. com
[**通讯作者**]顾玉超(1981 –)男,副教授,Email: guych@ 126. com

in the next few weeks. This protocol has the advantages of easy operation, short modeling time, high cancer formation rate, and presents a similar process of human skin carcinogenesis, thus, it can be used as a useful animal model for skin cancer research.

【Key words】 Skin cancer; Multi-step tumorigenesis; Mice; DMBA; TPA

Corresponding author: GU Yu-chao, E-mail: guych@126.com

皮肤癌系表皮角质形成细胞恶性增生的结果，是人类最常见的恶性肿瘤。动物模型已成为肿瘤相关研究的重要工具[1]。目前皮肤癌造模方法主要有化学诱发、光诱发[2]两种方法，最常用的是 DMBA/TPA 两步化学诱导法[3]。

本实验主要针对 BALB/c 小鼠的两步化学诱导皮肤癌造模方法进行了优化。虽然 KM 小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠，且经常被用在皮肤癌造模中，但在前期使用 KM 小鼠的实验中我们发现，在诱导成瘤的过程中，其个体间差异较大，无法获得均一性很好的实验结果。因此，我们选择了近交系小鼠 BALB/c 进行了此次皮肤癌诱导条件的优化实验，鉴于 BALB/c 小鼠的基因纯合性和遗传稳定性，其有较为均一的表现型，且在肿瘤发病率、形态学特点、对药物的反应等方面的均衡一致要强于远交系小鼠。

另外，在前期使用 BALB/c 小鼠进行皮肤癌造模的实验中，我们发现采用经典的两步化学诱导法可以有效地诱导皮肤癌的发生。而且 DMBA 作为启动剂，在诱导皮肤癌发生的过程中发挥着至关重要的作用。但 DMBA 剂量过低，即使后续加大 TPA 剂量也很难诱导皮肤癌的发生，而过高的 DMBA 剂量又会对小鼠皮肤产生刺激，甚至伤害皮肤表层，使皮肤出现破损、结痂、发炎流脓的现象。因此，DMBA 的涂药剂量对成瘤质量、成瘤时间、小鼠荷瘤数等有重要影响。由于 BALB/c 小鼠体型小、免疫力弱，更需要对 BALB/c 小鼠皮肤癌造模的最适 DMBA 给药量进行探究，以期用最合适的 DMBA 给药量，快速诱导出皮肤癌又尽量避免对小鼠皮肤的伤害，建立与肿瘤自发形成规律最贴合的皮肤癌模型以用于后续针对皮肤癌的科学研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养条件

4～5 周龄雌性 SPF 级近交系 BALB/c 小鼠 50 只，体重 12～16 g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012－0001]。整个过程按照 SPF 级动物饲养标准在青岛海洋生物医药研究院动物实验室进行饲养，[SYXK(鲁)2015－0011]。饲养条件：每笼 5 只。饲料：普通繁殖鼠料。温度：25～30 ℃。湿度：50%～70%。

适应性饲养 1 周后，全部小鼠背部备皮，暴露约 2 cm × 2 cm 皮肤，24 h 后随机分组备用。

1.2 主要试剂

7,12 一二甲基苯蒽(DMBA)分子式：$C_{20}H_{16}$，相对分子量：256.34，含量≥95%，产品编号 D3254。购自美国 Sigma 公司。佛波酯(TPA)分子式：C36H56O8，分子量：616.83，含量≥99%，产品编号 P1585。购自美国 Sigma 公司。丙酮分子式：C3H6O，分子量：58.08，含量：≥99.0%，购自国药集团化学试剂有限公司。苏木素伊红(HE)染色试剂盒：产品编号：C0105，购自碧云天生物技术有限公司。其余试剂为市售分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及处理

50 只 BALB/c 雌性小鼠，每组 10 只，计算机随机分为 5 组。正常对照组：背部皮肤用 1 mL 注射器每周 2 次涂抹丙酮溶液，每次 100 μL；1 号模型组：背部脱毛处理后，第 1 周涂 1 次(星期一)DMBA/丙酮液 100 μg/100 μL，从第 2 周开始每周涂两次 TPA/丙酮液，每次 4 μg/100 μL。2 号模型组：背部脱毛处理后，第 1 周涂两次(星期一、四，即隔 3 d 涂 1 次)DMBA/丙酮液 100 μg/100 μL，从第 2 周开始每周涂两次 TPA/丙酮液 4 μg/100 μL。3 号模型组：背部脱毛处理后，第 1 周涂 4 次(星期一、三、五、七，即隔 2 d 涂 1 次)DMBA/丙酮液 100 μg/100 μL，从第 2 周开始每周涂两次 TPA/丙酮液 4 μg/100 μL。4 号模型组：背部脱毛处理后，第 1 周每天涂 1 次 DMBA/丙酮液 100 μg/100 μL，从第 2 周开始每周涂两次 TPA/丙酮液 4 μg/100 μL。

所有小鼠每周背部脱毛 1 次。各组小鼠经上述处理后均继续观察至 12 周实验结束。所有小鼠异戊巴比妥钠麻醉后使用颈椎脱臼法处死。

1.3.2 一般观察

每天观察小鼠皮肤的改变及肿瘤生长情况；每周测量并记录小鼠体重及背部肿瘤的数量和瘤体直

径,在鼠体平面示意图上标明部位,并拍照记录。肿瘤直径大于 1 mm 视为阳性。按体积计算方式(1)进行:

$$V = \frac{1}{2}AB^2 \quad (1)$$

其中:A 为肿瘤最大直径,B 为垂直于 A 的直径。

描绘时间—平均荷瘤数动态变化曲线。肿瘤发生率 = 各组荷瘤动物数/该组存活动物数 × 100%;每鼠平均荷瘤数 = 各组小鼠乳头状瘤发生总数/该组存活小鼠数。

死亡小鼠为处理诱癌实验开始后非处死计划内死亡的小鼠,注意记录其死亡时间及数量,实验结束后计算小鼠死亡率。死亡小鼠经解剖观察其肝、肺及肠道等器官,了解其死亡原因,必要时行病理检查,明确死因。

1.3.3　肿瘤组织病理学染色

取背部荷瘤组织和非荷瘤组织各 1 cm × 1 cm 大小,迅速放入 4% 多聚甲醛中固定后常规石蜡包埋,进行连续石蜡切片,厚度 3 μm。肿瘤组织染色采用 HE 染色法。

1.3.4 统计学处理

所有数据均运用 SPSS 17.0 统计软件分析。采用两因素析因设计定量资料的方差分析,组间分析采用两两比较的方法进行。数据表示为平均值 ± 标准差(SD),$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　一般观察

第 1 周对小鼠进行不同频率的皮肤癌诱发剂 DMBA 的涂抹后,第 2 周继续进行 TPA 涂抹时,3 号、4 号模型组涂药处出现了明显的毛发脱落,皮肤表层溃烂,皮下组织暴露、皱褶,继而流脓结痂(图 1B),3 号模型组在第 5 周时涂药处结痂并逐渐脱落,但皮肤仍触摸略硬,第 6 周时基本恢复,与空白对照组小鼠背部皮肤无明显差异(图 1A)。4 号模型组在第 3 周时全部死亡,涂药处皮肤发黑,经鉴定应为皮肤遭到过度损伤后感染引发炎症,最终死亡。1 号、2 号模型组小鼠皮肤始终正常,无明显皮肤损伤现象。2、3 号模型组在第 4 周开始出现肉眼可见肿瘤,而 1 号模型组于第 7 周开始成瘤(图 1C)。

2.2　体重、肿瘤指标

经 12 周实验,模型组小鼠的体重变化率均低于空白对照组,3 号模型组与空白对照组差异有显著性,而 4 号模型组由于 DMBA 剂量过大导致小鼠在实验周期内全部死亡(表 1)。

本方法成瘤结果见表 2,1 个月后 1 号模型组肿瘤发生率为零,而 2 号模型组的肿瘤发生率略高于 3 号模型组,3 个月后,2 号模型组的肿瘤发生率最高,其次是 3 号模型组、1 号模型组。这说明两步化学诱导法可成功诱导肿瘤的发生,但 1 周涂 1 次 DMBA 的 1 号模型组肿瘤发生比较晚,且部分小鼠直至实验结束也未能成瘤。1 周涂 4 次 DMBA 的 3 号模型组虽然皮肤受到损伤,但仍有肿瘤的发生,但肿瘤发生率低于 1 周涂两次 DMBA 的 2 号模型组。

由时间—平均荷瘤数动态变化曲线(图 2)也可直观地看出,1 号模型组成瘤时间明显晚于 2 号、3 号模型组,2 号、3 号模型组成瘤时间相似,但 3 号模型组的成瘤率又明显低于 2 号模型组,这证明 2 号模型组无论是在成瘤时间还是成瘤数量上都明显优于其他,这与之前的结论是相一致的。

表 1　小鼠体重变化($\bar{x} \pm s, n = 10$, g)

Tab. 1　Changes of body weight in the mice

组别 Groups	实验开始 Start	实验结束 End	体重变化 Weight changes
空白对照组 Control	14.94 ± 0.45	22.12 ± 0.75	7.20 ± 0.70
1 号模型组 Group 1	15.05 ± 0.50	21.90 ± 0.50	6.85 ± 0.75
2 号模型组 Group 2	15.22 ± 0.75	21.99 ± 0.50	6.75 ± 0.95
3 号模型组 Group 3	15.37 ± 0.50	19.56 ± 0.80	4.00 ± 1.00 **
4 号模型组 Group 4	15.12 ± 0.50	死亡 Dead	死亡 Dead

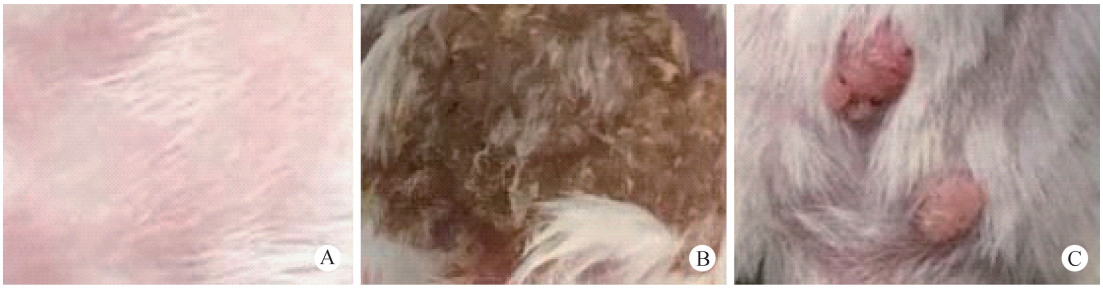
注:与空白对照组比较,** 为 $P < 0.01$

Note. Compared with the control group: ** $P < 0.01$.

表 2 小鼠背部肿瘤组织生长情况

Tab. 2 Tumor formation and growth in the mouse skin

组别 Groups	1 个月 One month		3 个月 3 months	
	肿瘤发生率/% Tumor incidence/%	平均荷瘤数(个/只) Average number of tumors per mouse	肿瘤发生率/% Tumor incidence/%	平均荷瘤数(个/只) Average number of tumors per mouse
空白对照组 Control	0	0	0	0
1 号模型组 Group 1	0	0	70	1.1
2 号模型组 Group 2	70	0.8	90	2.2
3 号模型组 Group 3	60	0.7	80	1.7



注:A. 正常皮肤;B. 皮肤流脓结痂;C. 皮肤成瘤。

图 1 小鼠皮肤一般观察

Note. (A) Healthy skin. (B) Suppuration and eschar in the skin. (C) Skin tumors.

Fig. 1 Gross appearance of the mouse skin

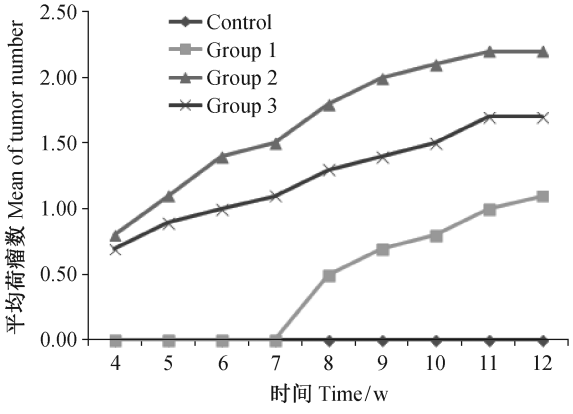


图 2 对照组和模型组小鼠时间 – 平均荷瘤数动态变化曲线

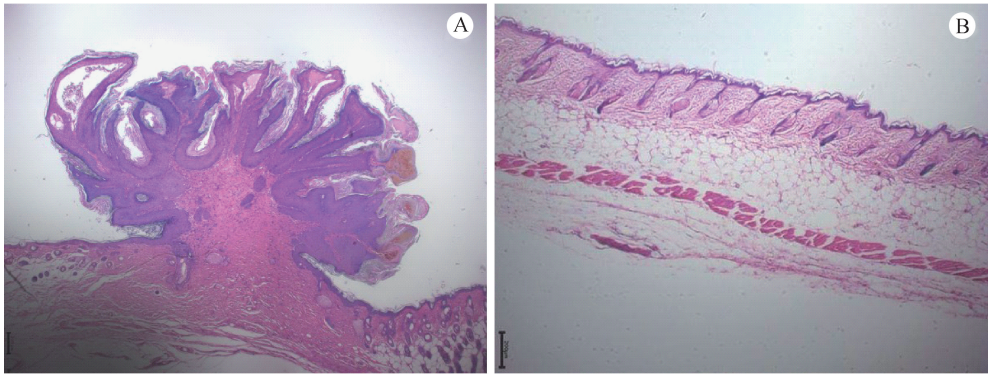
Fig. 2 The dynamic growth curve of time-tumor number in the control and model groups

2.3 病理学检测

诱导性肿瘤的发展过程主要分为乳头状瘤 1, 2, 3 期,微浸润性鳞状细胞癌 1, 2, 3 期及完全浸润鳞状细胞癌。经 12 周诱导后处死小鼠,取背部荷瘤组织及瘤旁组织进行 HE 染色发现,所诱导肿瘤基本都处于乳头状瘤 3 期(图 3)。

3 讨论

皮肤癌是皮肤恶性肿瘤的统称,各国皮肤癌发病率差异较大,其中白色人种发病率较高,如新西兰就是其中之一。在我国以沿海地区及高山地区较多见。近年来,因臭氧层破坏加重,造成全球范围内皮肤癌发病率逐年上升,并呈年轻化趋势。因此,皮肤癌防治已成为皮肤病研究领域的热点[4]。



注:A. 皮肤肿瘤;B. 正常皮肤。

图 3 小鼠皮肤组织镜下观察 (HE 染色, ×4)

Fig. 3 Histology of the mouse skin. (A) Skin tumor. (B) Heathy skin. HE staining, ×4

小鼠皮肤癌模型是最为简便的小鼠肿瘤模型,而化学诱导法也最为接近日常致癌剂的接触而导致癌症发生的过程,因此小鼠化学诱导法皮肤癌肿瘤模型是研究一些抗肿瘤药物药效的最为常用的一种肿瘤模型[5]。DMBA/TPA 模型模拟的是鳞状细胞癌的发生,该模型用 DMBA 作为启动剂,在致癌基因 Ha-ras 的第 61 个密码子上使 A 突变成 T,造成不可逆转的特异性突变,用于皮肤癌的初始化。TPA 作为促癌剂,促进肿瘤的生长[6,7]。两步法诱导产生的大多是乳头状瘤,本次实验的病理检测结果也表明所诱导肿瘤基本都处于诱导性肿瘤分期中的乳头状瘤 3 期。

本实验针对两步化学诱导皮肤癌造模方法进行了优化,采用遗传背景单一的 BALB/c 小鼠作为实验鼠。实验结果表明,DMBA 对 BALB/c 小鼠的皮肤有显著地刺激作用,并且 DMBA 的涂药剂量对成瘤质量、成瘤时间、小鼠荷瘤数等有重要影响。第 1 周涂 DMBA 1 次,2 次,4 次均可以诱导成瘤,但涂 7 次可以使 BALB/c 小鼠皮肤溃烂致死。其中第 1 周涂 DMBA 两次对小鼠皮肤影响不大,且 1 个月即可成瘤,成瘤时间短,肿瘤发生率高。该皮肤癌优化模型造模时间短,成瘤率高,个体间差异小,实用性强,对需要皮肤癌小鼠模型的实验有重要的参考价值,对临床防治皮肤癌的研究也具有重要应用意义。

参　考　文　献

[1] 饶子亮,黄威,郑佳琳,等. 两种人乳腺癌裸鼠移植模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(5):5-8.

[2] 王红丽,陈苑,胡银霞,等. 皮肤光损伤肿瘤模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(9):49-51.

[3] Aldaz CM, Conti CJ, Chen A, et al. Promoter independence as a feature of most skin papillomas in SENCAR mice [J]. Cancer Res. 51(3): 1045-1050.

[4] Abel EL, Angel JS, Kiguehi K, et al. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications [J]. Nat Protoc, 2009, 4(9): 1350-1362.

[5] Ishikawai T, Kumar IP, Machado HB, et al. Positron emission tomography imaging of DMBA/TPA mouse skin multi-step tumorigenesis [J]. Mol Oncol, 2010, 4(2): 119-125.

[6] Carver BS, Pandolfi PP. Mouse modeling in oncologic preetinical and translational research [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18): 5305-5311.

[7] Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells [J]. Semin Cancer Biol, 2005, 15: 460-473.

[收稿日期] 2016-06-07

会议 征文

第十三届中国实验动物科学年会预通知

“第十三届中国实验动物科学年会”拟定于 2017 年 9-10 月在四川省成都市召开。大会由中国实验动物学会主办,四川省实验动物学会、四川省医学科学院·四川省人民医院承办。

会议将邀请国内外优秀的专家学者聚焦实验动物学及相关生命科学领域的基础研究、科技进展、政策法规、科学普及、福利伦理等方面,以主题报告、专题研讨、学术沙龙、技术培训、科普讲堂、墙报交流等多种会议形式为广大实验动物学及生命科学领域科技工作者奉献一场异彩纷呈的学术盛宴。会议内容涉及实验动物学与交叉学科新研究、新理论,比较医学,实验动物福利伦理及替代技术,实验动物管理及标准化以及学会各专业委员会工作相关的研究等。

1　会议征文

两年内公开发表或未公开发表过的研究论文(已公开发表过的请注明发表期刊信息),研究进展综述均可投稿。征文形式为全文或摘要(目的,方法,结果,结论)。年会学术工作委员会将对以全文形式提交的论文,进行评选,授予“优秀论文奖”,并择优选择一些论文做墙报交流和会场交流。

征文请发送至邮箱:calas2017@126.com

2　会议招商

会议同期将举办实验动物学及相关产品展示会。欢迎与实验动物饲养、生产、生命科学研究相关的仪器设备,实验动物笼器具,实验动物设施设计,生物技术产品与常规试剂,畜牧兽医产品,动物综合开发产品相关的公司、企业参加展览,或冠名赞助会议。具体赞助及展示细节请见后续的招商方案。

学会网站:http://www.calas.org.cn;Email: calas@cast.org.cn

咨询电话:010-67781534