

裸小鼠胃癌原位移植模型的建立

田树红,王日超,肖 敏,符 健

(海南医学院海南省药物安全性评价研究中心,海南 海口 571199)

【摘要】 目的 建立一种新的裸小鼠胃癌原位移植模型。**方法** 采用 Matrx VIP 3000 型气体麻醉系统对实验动物进行麻醉。分别用“包埋法”、“挂线法”、和“胃囊法”建立 BALB/c 裸小鼠胃癌原位移植瘤模型。术后用 Caliper IVIS Kinetic 小动物活体成像系统对实体瘤的生长情况进行检测和分析。术后 28 d 对肿瘤组织进行组织病理学检查。**结果** 采用包埋法建立胃癌原位移植裸小鼠模型,除了与其它常用方法一样具有高移植成功率以外,还具有操作简便、时间短、难度低、肿瘤组织不易与其它组织直接接触等特点。**结论** 包埋法能快速制备大批量小鼠胃癌原位移植模型,为胃癌原位移植模型相关研究提供便利。

【关键词】 胃癌;原位移植;小动物活体成像;气体麻醉

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 02-0021-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 02. 004

Establishment of an orthotopic gastric cancer model in nude mice

TIAN Shu-hong, WANG Ri-chao, XIAO Min, FU Jian

(Hainan Research Center for Drug Safety Evaluation, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

【Abstract】 Objective To establish a new orthotopic gastric cancer model in nude mice. **Methods** The BALB/c nude mice were anesthetized by Matrx VIP 3000 type gas anesthesia systems. Orthotopic gastric cancer models were established by embedding method, thread-ligation method or gastric bursa method in the nude mice. The tumor growth after transplantation in living body was detected by a Caliper IVIS Kinetic small animal imaging system. Samples of the transplanted tumor tissues for histological examination were taken at 28 days after transplantation. **Results** The orthotopic gastric cancer model was successfully established by embedding method. Compared with the models prepared by other commonly used methods, it showed obvious advantages such as a high success rate of transplantation, simple operation, short time, less difficulty, and less direct contact of the implanted tumor tissue with other organs, etc. **Conclusions** Large amount of mouse models of orthotopic gastric cancer can be prepared rapidly by the embedding method, thus, provide a convenient tool for related research of gastric cancer in future.

【Key words】 Gastric Cancer; Orthotopic transplantation; Fluorescence imaging, in vivo; Model, nude mice

胃癌是常见的消化道癌症之一,在世界癌症致死病例中位列第 2,仅次于肺癌,抗胃癌药物的研发也越来越受到重视。荷瘤动物模型的建立是抗癌药物研发必不可少的条件。常见的胃癌移植模型

按接种部位可分为皮下移植和原位移植,按接种类型又可分为细胞混悬液法和肿瘤组织块法。常见的肿瘤组织块胃癌原位移植模型的建立方法有“挂线法”、“胃囊法”和“OB 法”^[1,2]。本研究建立了一

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(NO 81160408)。

【作者简介】 田树红(1980 -),男,助理研究员,硕士,研究方向:药理毒理学。E-mail: 18089862900@163.com。

【通讯作者】 符健,(1960 -),男,博士,教授,研究方向:药理毒理学,E-mail: Fujian.hnmc@163.com。

种新的 BALB/c 裸小鼠胃癌原位移植模型,即包埋法,可快速制备大批量小鼠胃癌原位移植模型,为胃癌原位移植模型相关研究提供便利。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、饲料与分组:SPF 级 BALB/c 裸小鼠,5~6 周龄,雄性,体重(18~22)g,购于广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002。实验地点为海南省药物安全性评价研究中心,实验动物使用许可证号:SYXK(琼)2012-0013。实验动物饲料购于广东省医学实验动物中心,合格证号 No.44200300005682。6 只裸小鼠用于皮下移植模型的建立,24 只裸小鼠用于胃癌原位移植模型的建立,分为挂线法、胃囊法和包埋法 3 个组,每组 8 只。

1.1.2 肿瘤细胞株:人胃癌细胞 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞库,并委托上海乐晨生物科技有限公司对细胞株进行生物发光标记。

1.1.3 实验试剂及主要仪器:试剂:异氟烷(瑞沃德),生物发光检测底物 D-荧光素钾盐(Synchem),PBS 缓冲液、RPMI 1640 培养液和胰酶消化液(Gibco),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);主要仪器:Kinetic 小动物活体成像系统(Caliper);VIP 3000 型气体麻醉系统(Matrux);BX41 显微镜系统(奥林巴斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 胃癌皮下移植瘤模型的建立:术前和手术过程中均使用 Matrux VIP 3000 型气体麻醉系统对动物进行麻醉,麻醉剂为异氟烷。将体外培养好的人胃癌细胞 SGC-7901 用无菌 PBS 缓冲液制备成浓度为 1×10^7 个细胞/mL 混悬液备用。取 0.2 mL 该细胞混悬液,接种于 6 只裸小鼠右侧腋窝皮下,待成瘤后备用。

1.2.2 胃癌原位移植瘤模型的建立:动物术前禁食 12 h,术前和手术过程中均使用 Matrux VIP 3000 型气体麻醉系统对动物进行麻醉,麻醉剂为异氟烷。取 30 只检疫合格的 SPF 级 BALB/c 裸小鼠,按体重顺序随机分为挂线法、胃囊法和包埋法 3 个组,每组 8 只。取生长良好的皮下移植瘤(色泽红润、皮肤无损伤、肿瘤无破损),制备成体积约为 2 mm^3 的肿瘤组织块备用。麻醉动物取仰卧位,安尔碘消毒手术部位及周边皮肤,剑突下方约 5 mm 处沿腹中线左

侧横向逐层剪开皮肤,开口长度约为 1 cm,用小弯捏轻轻将胃拉出准备接种肿瘤组织块。挂线法和胃囊法操作步骤参照相应参考文献。包埋法操作步骤如下:用 1 mL 一次性无菌注射器往动物胃浆膜层轻轻注入 0.1 mL 0.9% (g/mL) 氯化钠注射液,使浆膜层形成一个小皮丘,然后用小镊子轻轻捏住皮丘一侧边缘,用眼科剪剪一个约 3 mm 长的小口,再用小镊子将肿瘤块送入皮丘内即可。这样肿瘤组织不会与其它组织黏连,对胃的损伤也较小。最后逐层缝合好腹腔,安尔碘消毒创口,小心饲养。

1.2.3 荷瘤裸小鼠胃癌原位移植肿瘤生长情况的检测:采用美国 Caliper IVIV Kinetic 小动物活体成像系统检测荷瘤裸小鼠体内原位移植瘤的生长情况。小动物活体成像系统是目前原位癌检测最有效的技术,动物体内的肿瘤灶只要有数十个肿瘤细胞就能被检测到。检测前 5~10 min 按 0.1 mL/10 g 体重腹腔注射 30 mg/mL 的底物 D-荧光素钾盐。

1.2.4 荷瘤裸小鼠胃癌原位移植肿瘤组织病理检查:裸小鼠胃癌原位移植模型建立 4 周时,CO₂ 处死动物,剖检取出胃及肿瘤组织,4% (v/v) 甲醛溶液固定,修块、脱水、浸蜡、包埋、切片,HE 染色,镜下观察肿瘤细胞的生长情况。

1.2.5 统计学方法:采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行单因素方差分析,计算结果用平均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 裸小鼠胃癌原位移植模型的建立

分别采用挂线法、胃囊法和包埋法建立裸小鼠胃癌原位移植模型,成瘤率均为 100%,手术过程中动物死亡率均为 0。比较这 3 种方法,挂线法和包埋法手术时间最短,胃囊法用时最长,分别为(4.8 ± 0.41) min (与胃囊法比较, $P < 0.01$)、(4.7 ± 0.53) min (与胃囊法比较, $P < 0.01$) 和 (8.3 ± 0.66) min。

2.2 小动物活体成像系统检测荷瘤动物体内肿瘤的生长情况

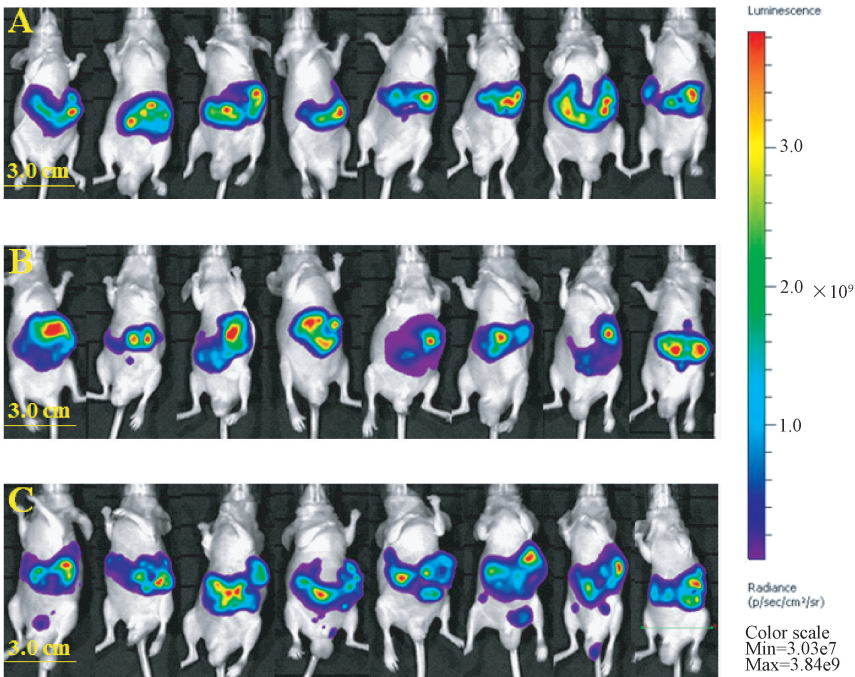
建立小鼠胃癌原位移植模型后,用小动物活体成像系统对动物体内肿瘤生长情况进行实时监控,检测结果见图 1。植入荷瘤动物体内的肿瘤细胞只有存活的才能被检测到。结果表明,用包埋法建立的 BALB/c 裸小鼠胃癌原位移植模型与常用的挂线

法和胃囊法比较,肿瘤生长良好,不易发生肿瘤广泛种植现象。图 1 中 A、B、C 分别为包埋法、胃囊法和挂线法建立的胃癌原位移植模型。其中,采用挂线法建立的胃癌原位移植模型中,有 50% (4/8 只) 的动物肿瘤已经发生肿瘤广泛种植现象。实验各组的实体瘤见图 2。

2.3 常用方法和新方法建立小鼠肝癌原位移植瘤

病理检查

BX41 显微镜系统 100 倍光镜下观察肿瘤组织标本,结果表明,挂线法、胃囊法和包埋法建立的裸小鼠胃癌原位移植瘤肿瘤细胞及组织生长良好,未出现坏死,细胞形态一致,癌细胞成癌巢状分布,癌巢周围为纤维结缔组织(图 3)。

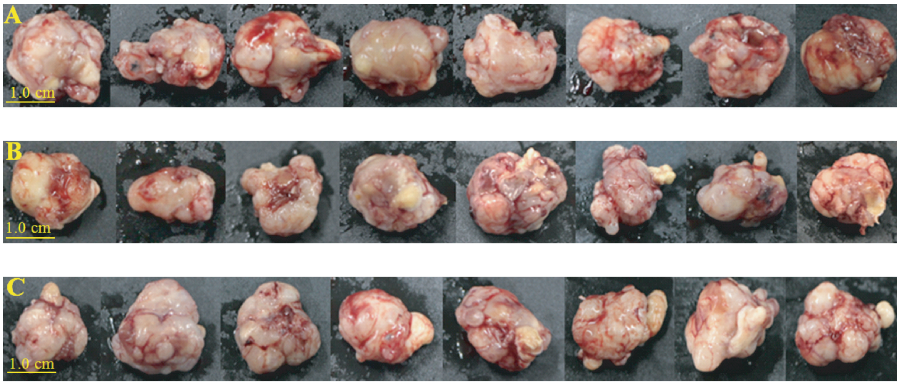


注:(A)包埋法;(B)胃囊法模型;(C)挂线法模型。

图 1 胃癌原位移植瘤生物发光检测结果

Note. (A) Embedding method; (B) Gastric bursa method. (C) Thread-ligation method.

Fig. 1 The images of orthotopic transplantation tumors tested by IVIS Imaging Systems

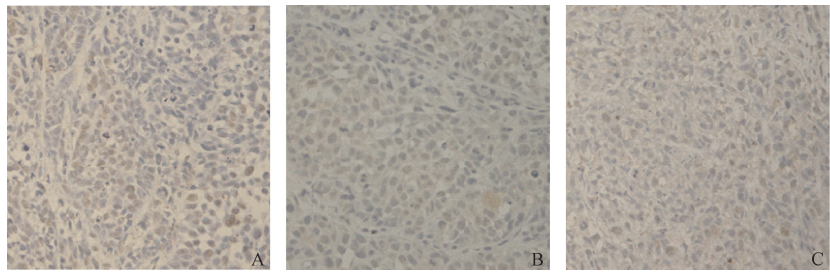


注:(A)包埋法;(B)胃囊法模型;(C)挂线法模型。

图 2 原位癌实体瘤

Note. (A) Embedding method; (B) Gastric bursa method. (C) Thread-ligation method.

Fig. 2 Gross appearance of the orthotopic gastric carcinomas



注: (A) 包埋法; (B) 胃囊法模型; (C) 挂线法模型。

图3 胃癌原位实体瘤病理检查照片(HE 染色, ×100)

Note. (A) Embedding method; (B) Gastric bursa method (C) Thread-ligation method.

Fig.3 Histological appearance of the solid tumors(HE staining, ×100)

3 讨论

在进行原位移植手术时,实验动物一般采用注射类麻醉剂进行麻醉,如戊巴比妥钠、氯胺酮和水合氯醛等。但这些麻醉剂的麻醉时间较长(1~3)h,在麻醉过程中易出现动物麻醉不深或麻醉死亡等现象。因此,在手术过程中,我们采用通过VIP3000型气体麻醉系统(Matrx)改造的新装置对动物进行持续气体麻醉。采用这种方法对动物进行麻醉时,动物不易发生麻醉死亡,而且动物在术后10min以内就能自主活动,避免由于麻醉时间较长引起动物体温过低而造成术后死亡。

在胃癌原位移植方法中,挂线法是用手术线将肿瘤组织块直接缝挂在浆膜损伤的胃壁上^[3];胃囊法是先采用荷包缝合法制备胃黏膜小胃囊,再将肿瘤组织块放入其中^[4-6];OB法是用医用生物胶将肿瘤组织粘贴于损伤的胃大弯浆肌层上^[6-8]。在挂线法和OB法中,肿瘤组织容易向腹腔生长且会与其它组织发生粘连;胃囊法操作难度大,由于小鼠胃壁较薄,容易刺穿胃壁造成胃穿孔并引起动物死亡。因此,本研究建立了一种新的BALB/c裸小鼠胃癌原位移植模型,即包埋法。该方法具有移植成功率高(100%),操作简便、时间短、难度低、肿瘤组织不易与其它组织直接接触等特点。

此外,无论是采用哪种胃癌原位移植方法,在制备肿瘤块时,要用氯化钠注射液或缓冲液将切好的肿瘤组织块多漂洗几次,以避免组织块表面易脱落的肿瘤细胞掉到腹腔内或手术切口处造成肿瘤

的广泛种植。在通常的胃癌原位移植模型方法中,OB胶法与挂线法较为类似,肿瘤块均直接暴露在腹腔内,溶液与其它组织发生黏连。胃囊法虽然能避免肿瘤组织块与其它组织发生黏连,但操作难度较大,且容易对胃黏膜造成较大损伤及胃穿孔。包埋法则有效避免了这些情况的发生,为实现快速制备大批量胃癌原位移植模型提供了有力保障。

参考文献:

[1] Zhou GX, Gao C, Xu P, *et al.* Replication Methodology of Animal Models for Human Disease [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2008.

[2] 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.

[3] 戴小军, 张晓春, 孙卫东, 等. VRIN 治疗后人胃癌裸鼠原位移植瘤活体成像观察 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版) 2014, 35(2): 11-14.

[4] 汪芳裕, 朱人敏, 王琳, 等. 建立裸小鼠人胃癌原位移植模型的一种新方法[J]. 肿瘤防治研究, 1998, 52(1): 15-16.

[5] 汪芳裕, 朱人敏, 王琳. 原位移植建立裸小鼠人胃癌转移模型 [J]. 南京部队医药, 1997, 5: 25-26.

[6] 陈亚琳, 魏品康, 许玲, 等. 采用OB胶粘贴法建立人胃癌裸鼠原位种植转移模型 [J]. 癌症, 2005, 24(2): 246-248.

[7] 范立侨, 李勇, 冯峰, 等. 抑制锌指蛋白139对胃癌原位移植裸鼠肿瘤细胞凋亡的影响 [J]. 广东医学, 2015, 36(3): 353-356.

[8] 叶敏, 孙大志, 修丽娟, 等. 痰散结方对MKN-45人胃癌裸鼠原位移植瘤细胞超微结构的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(9): 60-62.