

小鼠 Lewis 肺癌不同部位皮下移植瘤模型的比较

马雪曼^{1,2}, 于明薇², 张甘霖², 于洁², 曹可心², 孙旭², 杨国旺^{2*}, 王笑民^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

【摘要】 目的 探究不同部位肺癌皮下移植瘤存在的差异, 为肺癌研究者提供提供基础依据。**方法** 将稳定表达虫萤光素酶的小鼠 Lewis 肺腺癌细胞 (ll2-luc-m38) 分别注射于 C57 BL/6 小鼠的右腋皮下、右腹股沟皮下、脚垫皮下, 定期利用小动物活体成像系统观察小鼠皮下移植瘤成瘤情况及转移情况, 观察不同部位荷瘤小鼠的生存时间和死亡率, 肿瘤组织取材, 采用石蜡包埋、切片、HE 染色做出病理学诊断。并将小鼠处死后立即进行肺部组织固定、观察转移灶。对皮下移植瘤行切除术观察小鼠术后生存情况和转移情况。**结果** 腋下组和腹股沟组成瘤时间较早, 成瘤率为 100%, 脚垫组成瘤时间较晚, 成瘤率为 33%; 腹股沟组和腋下组瘤体体积增长迅速, 其中腹股沟组瘤体体积增长最快; 接种后第 21 天腋下组 70% 的小鼠出现了肺转移, 转移灶数目较多; 腹股沟组 50% 小鼠出现肺转移, 且转移灶数目较少; 脚垫组小鼠未观察到肺转移灶。脚垫组小鼠死亡率最高。腹股沟组和腋下组小鼠可行皮下移植瘤切除术, 术后存活率为 100%。**结论** 小鼠 lewis 肺癌皮下移植瘤模型中, 腹股沟组和腋下组成瘤率高, 可耐受移植瘤切除术, 手术死亡风险低, 便于监测, 操作简单且可重复性高, 其中腋下组转移性更好。

【关键词】 肺癌; 皮下移植瘤; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0386-05

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2017. 04. 008

Comparison of mouse models of Lewis lung carcinoma subcutaneously transplanted at different sites

MA Xue-man^{1,2}, YU Ming-wei², ZHANG Gan-lin², YU Jie², CAO Ke-xin², SUN Xu², YANG Guo-wang^{2*},
WANG Xiao-min^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Department of Oncology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010)

【Abstract】 Objective Subcutaneous transplantation Lewis lung carcinoma model is commonly used in experimental studies. Researchers often choose different transplantation sites to create the models while little attention was paid on the effect of different inoculation sites on the formation of transplanted tumors. The aim of this study was to compare the effect of tumor cell inoculation at different sites on tumor formation in mice. **Methods** Lewis lung adenocarcinoma (ll2-luc-m38) cells stably expressing luciferase protein were subcutaneously injected into C57 BL/6 mice at the right armpit, right groin, or footpad, respectively. An IVIS spectrum *in vivo* imaging system was used to observe the tumor and metastasis formation. The survival time and mortality were recorded. H-E stained pathology was performed to examine the histological changes of the lung tissues and tumor metastasis. **Results** The tumor formation time was earlier in the armpit and groin groups, both with a tumor formation rate of 100%, while the tumors occurred later, with a tumor formation rate of 33% in the footpad group. The pulmonary metastasis rate was 70% in the groin group, 50% in the armpit group, and 0% in the footpad group, at the 21st day after inoculation. The footpad group had a high mortality. The tumors in the groin group and

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号: 81473643); 首都医科大学基础-临床科研合作基金项目 (编号: 15JL79); 北京市医院管理局青苗计划项目 (编号: QML20150903)。

【作者简介】 马雪曼 (1988 -), 女, 博士研究生, 专业: 中西医结合临床。Email: mxmbucm@163.com

【通讯作者】 王笑民 (1965 -), 男, 教授, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤。Email: wangxiaomin_bhtcm@126.com;

杨国旺 (1969 -), 男, 主任医师, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤。E-mail: guowangyang@sina.com。* 共同通讯作者

armpit group can be surgically resected, with a postoperative survival rate of 100%. **Conclusions** In this mouse model of subcutaneously transplanted Lewis adenocarcinoma, the groin and armpit groups have advantages such as a high tumor formation rate, good tolerance of tumor resection, low surgical mortality rate, easy to monitor, simple operation and high reproducibility. The axillary group has an even higher metastasis rate.

【Key words】 Lung adenocarcinoma; Subcutaneous transplantation; tumor; Mouse model

Corresponding author: Wang Xiao-min. E-mail: wangxiaomin_bhtcm@126.com; YANG Guo-wang, Email: guowan-gyang@sina.com

肺癌作为最普遍的恶性肿瘤之一,其死亡率在世界范围内仍然居高不下。在目前的治疗方式下非小细胞肺癌的 5 年存活率仍不乐观,迫切需要更安全有效的治疗方式。在肺癌的新型治疗方法的研究中,肺癌皮下移植瘤模型是目前运用最为广泛的动物模型,其优点是简便易行、可重复性高。目前,已有很多种皮下移植瘤模型的建立方法,其主要的差异在于接种部位的不同,然而各部位移植瘤的成瘤性、转移率、手术创伤大小、荷瘤鼠生存时间等均存在差异,缺少对不同部位肺癌移植瘤模型小鼠的对比研究。因此,我们同时建立了三种不同部位的生物发光的异位皮下移植瘤模型,对模型小鼠进行观察,对比它们的一般情况、成瘤情况、转移情况、生存情况等,以期发现它们在整体和肿瘤局部的生物学差异。在非小细胞肺癌的实验研究中,为研究者选择合适的动物模型提供多角度的、更为可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 60 只,6~8 周龄,雄性,体重 19~21 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0024】,饲养在首都医科大学附属北京中医医院实验动物中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)的饲养间【SYXK(京)2013-0002】,并进行无菌接种,所有实验操作程序均经过首都医科大学附属北京中医医院实验动物中心批准,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 试剂与仪器

小鼠 Il2-luc-m38 肺癌细胞株(ATCC 细胞库,美国),10% 胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶(均为 Hyclone 公司产品,美国),异氟烷,河北一品制药有限公司。荧光素(D-Luciferin)购自美国 Gold Biotechnology 公司,用 PBS 溶解稀释为 15 mg/mL 的溶液,0.22 μm 滤器过滤后避光保存。电子游

标卡尺:上海申韩量具有限公司;小动物活体成像系统(In-vivo imaging system, IVIS):美国 Caliper 公司;CO₂ 培养箱:日本三洋公司;微量移液器:Eppendorff 公司;离心机:北京白洋医疗器械有限公司。细胞培养箱、超净台、电子称等均由首都医科大学附属北京中医医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

将小鼠 Lewis 肺癌细胞置于含 10% 胎牛血清及高糖 DMEM 的完全培养基中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,每 1 d 更换培养液 1 次,每 2 d 用 0.25% 胰酶消化传代一次,细胞汇合率达 90% 时,收集细胞,离心去上清,加入生理盐水吹打,使细胞悬浮于生理盐水中,台盼蓝染色细胞活力测定大于 95%,并进行细胞计数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液备用,每只小鼠接种 0.1 mL(细胞数 1×10^6 个)。

1.2.2 肺癌皮下移植瘤动物模型的建立

根据接种部位分组:右腋下组接种 20 只,右腹股沟下组接种 20 只,右脚垫组接种 20 只。接种方法:小鼠注射部位用 75% 乙醇消毒,无菌注射器吸取细胞悬液,腋后线下 2 cm 处斜行入针,刺入皮下,每只注射 0.1 mL 细胞悬液,形成圆形小皮丘,注射完按压入针点,出针。

1.2.3 小鼠体重及一般情况

每周两次使用电子天平称量小鼠体重,观察小鼠进食、饮水、皮毛光泽度和脱落等情况。每组随机抽取 10 只小鼠观察生存时间并记录。

1.2.4 肿瘤光子数检测

小动物活体成像仪每 4 d 检测 1 次荷瘤小鼠皮下移植瘤及肺转移灶肿瘤光子数。小鼠背部皮下注射 200 μL 底物荧光素 10 min 后应用小动物活体成像系统检测皮下移植瘤生物发光及转移情况。具体原理为:Il2-luc-m38 是能稳定表达荧光素酶(luciferase, luc)的细胞株,当外源性给予底物荧光素(luciferin)时,荧光素酶催化荧光素的氧化反应,即可在

体内产生发光现象,发光强度可以用小动物活体成像仪器(IVIS)进行检测^[1]。

1.2.5 解剖学和病理组织学观察肺转移灶

接种后第 21 天脱颈椎处死小鼠,或将已经死亡的小鼠,进行详细的解剖并取材,检查肺转移及其他器官转移情况。取出皮下移植瘤,用 4% 中性甲醛固定,经脱水透明石蜡包埋切片 HE 染色及封片,光镜下观察照像。肺脏拍照,固定,观察转移灶^[2]。

1.2.6 肿瘤体积

接种后每周 2 次应用游标卡尺测量肿瘤长径 (length) 和短径 (width), 计算肿瘤体积方法: Tumor volume (mm³) = Width (mm²) × Length (mm) × 0.5^[3]。

1.2.7 皮下移植瘤切除术

小鼠麻醉状态,75% 乙醇常规消毒手术区域,轻轻剥离肿瘤并切下,200 mg/L 庆大霉素 0.5 mL 冲洗手术创面,用 4-0 缝合线缝合手术切口,后将小鼠放置在温暖的环境中苏醒。配制 200 mg/L 的庆大霉素饮用水,防止术后感染死亡。术后观察小鼠生存时间及肺转移灶^[4]。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 软件进行统计,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较进行单因素方差分析,LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行绘图。

2 结果

2.1 小鼠体重及一般情况

每周 2 次用电子天平称量小鼠体重,绘制小鼠体重变化曲线(如图 1)。各组荷瘤小鼠体重逐渐上升,组间未见统计学差异。随着肿瘤的进一步增大,小鼠进食进水量减少,逐渐出现恶病质的现象,小鼠活动减少,皮毛失去光泽,有卷曲脱落的现象。

2.2 成瘤时间和成瘤率

成瘤时间:腹股沟组和腋下组接种部位第 7 天出现了生物发光,随时间延长生物发光强度逐渐增强。脚垫组小鼠接种部位第 14 天出现较弱的生物发光。腹股沟组和腋下组成瘤率均为 100%,脚垫组成瘤率为 33%,如图 2。

2.3 肿瘤体积

接种后每周 2 次应用游标卡尺测量肿瘤长径 (length) 和短径 (width), 计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线(如图 3)。连续观察 21 d,各组小鼠皮下移

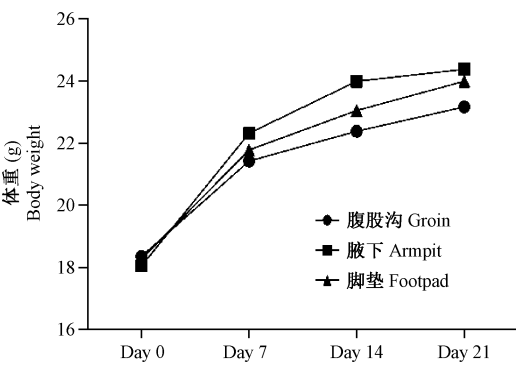


图 1 小鼠体重变化曲线

Fig.1 Curves of body weight in the mice

植瘤体积随时间逐渐增大,不同部位接种后小鼠皮下移植瘤平均体积如表 1 所示,腹股沟组和腋下组肿瘤体积从接种后第 14 天起迅速增大,其中腹股沟组肿瘤增长最快,其平均体积是腋下组肿瘤体积的 1.5~1.8 倍。脚垫组移植瘤出现时间最晚,在第 14 天出现了肉眼可见的瘤块,经测量其平均体积分别是腹股沟组的 1/7,腋下组的 1/5。随后两周,脚垫移植瘤增长缓慢,第 21 天小鼠下肢肿胀,行动不便,终止实验。第 21 天各组小鼠移植瘤体积差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠皮下移植瘤平均体积/mm³

Tab.1 The mean tumor volume in the mouse groups				
身体部位 Body parts	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21
腹股沟 Groin	0	19.24	281.40	1800.77
腋下 Armpit	0	20.74	189.72	1054.60
脚垫 Footpad	0	0.00	36.80	432.50

2.4 解剖学和病理组织学

各部位皮下移植瘤呈囊实性,随肿瘤体积增大瘤体中央可出现破溃出血,坏死,脱落。组织切片 HE 染色观察,无明显腺体结构存在,细胞形态不一,多呈椭圆性,胞质丰富,核大畸形深染,核分裂象多见,呈弥漫性浸润性生长,癌细胞间有结缔组织浸润(如图 4)。

2.5 肺转移灶

每组 10 只小鼠用于肺转移灶的观察,第 21 天肺转移发生情况如下:腹股沟组 10 只小鼠,其中 7 只出现肺转移;腋下组 5 只小鼠出现肺转移;脚垫组小鼠未观察到肺转移灶。肺转移灶 HE 染色,观察转移灶,病理学确诊为肺组织内肿瘤转移^[4](如图 5)。

2.6 小鼠死亡率

接种后持续观察 40 d,腹股沟组小鼠直至接种

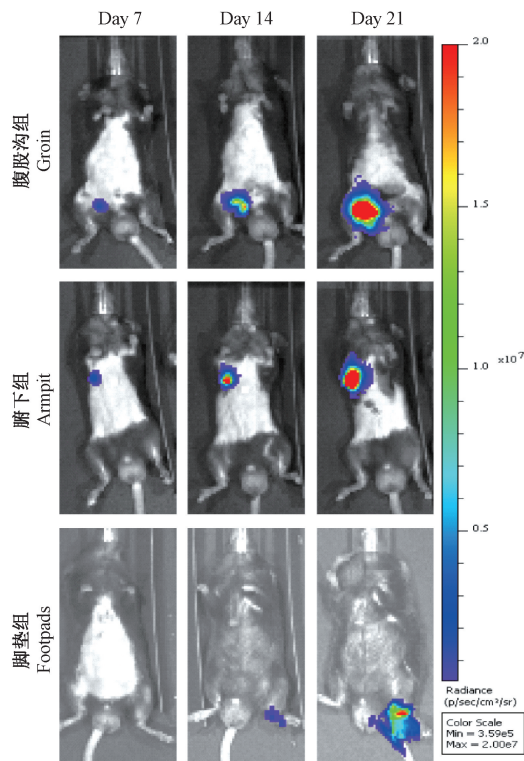


图 2 不同部位移植瘤生物发光情况

Fig. 2 Bioluminescence imaging of the transplanted tumors in the mouse groups

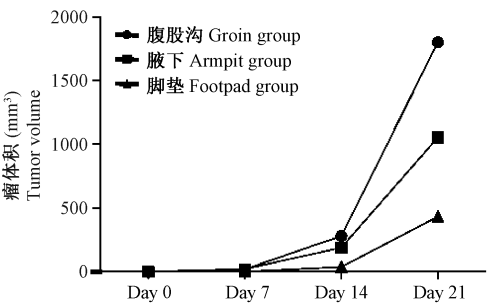


图 3 不同部位移植瘤生长曲线

Fig. 3 Curves of tumor volume in the mouse groups

后第 28 天死亡 3 只,第 35 天死亡 1 只,40 d 观察期结束时 6 只存活。腋下组小鼠接种后第 21 天死亡 1 只,第 28 天死亡 3 只,第 35 天死亡 2 只,40 d 观察结束时 4 只存活。脚垫组小鼠接种后第 7 天死亡 3 只,第 14 天死亡 3 只,第 21 天死亡 1 只,第 28 天死亡 1 只,第 35 天死亡 2 只,40 天观察结束时全部死亡(如图 6)。

2.7 移植瘤切除术后情况

脚垫组小鼠皮下瘤无法切除,只对腹股沟组和腋下组小鼠进行手术切除皮下移植瘤。小鼠皮下移植瘤切除后,腋下组和腹股沟组均有部分小

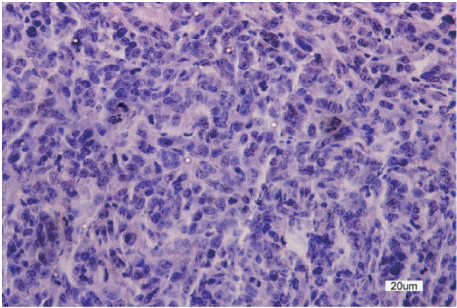
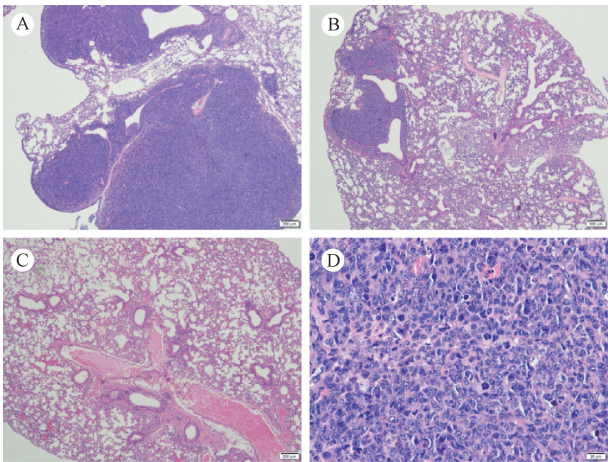


图 4 肿瘤组织 HE 染色

Fig. 4 Histological appearance of the tumor tissue (H-E staining)



注:A. 腋下组; B. 腹股沟组; C. 脚垫组 (A-C, ×4, bar = 200 μm); D. 肺转移灶病理诊断 (A-C, ×40, bar = 20 μm)。

图 5 肺转移灶 HE

Note. H-E staining. (A) Armpit group, ×4; (B) Groin group, ×4; (C) Footpad group, ×4; (D) Histological appearance of a metastatic tumor. ×40.

Fig. 5 Histology of the lung metastatic tumors in the mouse groups

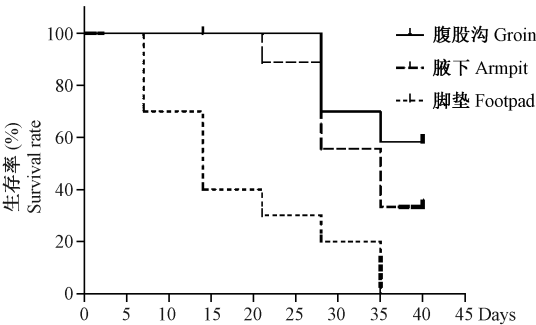


图 6 不同部位移植瘤小鼠生存情况

Fig. 6 Survival rates of the mouse groups

鼠出现了肺转移,但转移灶数目较少,可能与本实

验观察时间较短有关,若延长观察时间,肺转移发生率和转移灶数目可能增多。腹股沟组和腋下组小鼠术后均存活。

3 讨论

小鼠肺癌模型的建立方法多种多样,包括转基因动物模型、诱发性动物模型、移植性动物模型,其中移植性动物模型又分为原位移植模型及异位移植模型,在基础研究中最常用的是异位移植动物模型^[4]。异位移植动物模型的特点是皮下注射肿瘤细胞,操作简单,易于在动物体表观察成瘤情况、易于动态监测肿瘤大小、并易于取材等。

目前,有很多研究尝试建立肺癌原位移植瘤模型。其中包括,经胸壁、经气管注射、气管插管滴注等方法,虽然能模拟肺癌原位生长的特点,但是这些造模方法伴随着极高的风险,如气胸、血胸、经胸膜播散和多发病灶等。传统的皮下移植瘤模型在规避了造模风险的同时,具备操作简单、易于观察的优点,因此仍然是肺癌研究中最常用的动物模型。小鼠 lewis 肺癌皮下移植模型不仅能观察皮下瘤,还能在腹腔脏器形成转移瘤,观察肺、肝等转移灶。皮下移植瘤的接种部位多种多样,不同部位皮下移植瘤成瘤特点和转移性等都存在差异,但是鲜有这方面的相关研究,选择合适的接种部位是肺癌深入研究的基础,本研究选择了腋下、腹股沟、脚垫这 3 个最常用且具有代表性的不同部位进行接种,定期利用小动物活体成像系统观察小鼠皮下移植瘤成瘤情况及转移情况,小鼠的生存时间和死亡率等。小动物成像仪检测肿瘤生物发光灵敏度较高,能够发现早期较小肿瘤组织,因此可以根据小动物成像仪检测到的肿瘤生物发光来判断最早成瘤时间。小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤模型中,腹股沟组和腋下组出

瘤时间早、成瘤率高,可耐受移植瘤切除术,手术死亡风险底,便于监测,操作简单且可重复性高,其中腋下组转移性更高。值得注意的是,腹股沟组肿瘤增长最快、体积最大,随观察时间延长肿瘤出现破溃、坏死,因此腹股沟皮下移植瘤模型不适用于观测时间较长的研究。腋下组小鼠肺转移发生率最高,且出现的转移灶最多,与腹股沟组相比瘤体体积增长稳定,出现破溃坏死时间较晚,适用于观测时间较长、需要观测转移灶的研究。脚垫组成瘤率低,小鼠死亡率高,不推荐用于肺癌的研究。

本研究使用小动物活体成像系统检测小鼠移植瘤成瘤时间、肿瘤生长状况,并能在活体中连续观测到小鼠脏器转移情况。对荷瘤小鼠行移植瘤切除术,可模拟临床肿瘤术后转移模型,用小动物活体成像系统检测术后转移情况。

(致谢:本研究依托于首都医科大学附属北京中医医院中心实验室,感谢中心实验室所有工作人员和同学。)

参 考 文 献

- [1] 胥孜杭. 小鼠肺癌原位模型的建立 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(1): 15-18.
- [2] Jenkins DE. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7: R444-R454.
- [3] 于明薇. 化疗联合化疗对小鼠 Lewis 肺癌生长及血栓形成相关因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 12: 3179-3183.
- [4] Tao K. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer [J]. BMC Cancer, 2008, 8: 228.
- [5] 李宁. 小鼠 Lewis 肺癌原位模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 79-83.

[收稿日期] 2016-10-28