

妊娠小鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞 对胎鼠生长发育的影响

李姗姗,舒 昀,陈 来,李 俊,陈丽玲,曾文婷,袁可望,舒 坤,
徐 彭,罗小泉*

(江西中医药大学,南昌 330004)

【摘要】 目的 探讨妊娠小鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞对胎鼠生长发育的影响。**方法** 将孕鼠随机分为5组,细胞注射组在孕14 d胎鼠腹腔注射不同浓度的 HepG2 细胞悬液,并设假手术组及对照组,记录孕鼠生产情况、出生小鼠的体重,并对子代鼠的发育学指标进行评价,选取成年后小鼠解剖观察肝、肺、肾等主要脏器有无畸形、病变,并取材进行 HE 染色,显微观察各组小鼠主要脏器的病理改变情况。**结果** 与对照组相比,子宫内胎鼠腹腔各细胞注射组子代鼠的体重和生长发育指标差异无显著性,肉眼观察各主要脏器无病变,显微观察未见异常结构。**结论** 子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞不会对胎鼠发育产生影响。

【关键词】 子宫内胎鼠腹腔注射;获得性免疫耐受;肿瘤动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0033-10

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 07. 007

Effect of *in utero* intraperitoneal injection of human tumor HepG2 cells on the growth and development of fetal mice

LI Shanshan, SHU Yun, CHEN Lai, LI Jun, CHEN Liling, ZENG Wenting, YUAN Kewang, SHU Kun,
XU Peng, LUO Xiaoquan*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *in utero* intraperitoneal injection of human tumor HepG2 cells on the growth and development of fetal mice. **Methods** Pregnant mice were randomly divided into five groups and various densities of HepG2 cell suspensions were injected into the fetus by intrauterine injection at embryonic day 14. Sham operation and control groups were included. Pregnancies and the body weight of offspring were recorded, and developmental indicators were evaluated. Adult mice were selected and dissected to observe malformations and pathological changes in major organs including the liver, lungs, and kidneys. **Results** There was no significant difference in the growth or development of offspring in HepG2 cell injection and control groups. There were no lesions in major organs based on macroscopic and microstructural observations. **Conclusions** *In utero* intraperitoneal injection of human tumor HepG2 cells has no effect on the development of fetal mice.

【Key words】 *In utero* intraperitoneal injection of fetal mice; acquired immune tolerance; tumor animal model

【基金项目】 江西省青年科学基金(编号:20161BAB215214);江西省教育厅科学技术研究项目基金(编号:GJJ14623)。

【作者简介】 李姗姗(1982—),女,讲师,博士,研究方向:肿瘤药理及安全性药理。E-mail: shines_li@yahoo.com

【通信作者】 罗小泉(1966—),男,教授,硕士生导师,研究方向:实验动物模型研制及中药药效研究。E-mail: lxqdlj@126.com

肿瘤研究中,新疗法、新药物并未显著改善癌症患者的治疗和预后的一个重要原因是临床前肿瘤动物模型不能很好地预测临床试验效果。在现有肿瘤动物模型中,肿瘤瘤株与人肿瘤之间不可避免的种属差异,是导致动物试验结果与临床治疗人肿瘤的实际情况相差较远的根本原因,从这个角度出发,人肿瘤的异种移植模型无疑是最具有应用价值和前景的。而现有成熟的异种移植模型以先天免疫系统组成成分缺陷的动物作为载体的人源肿瘤模型存在一个重要的先天缺陷:即其搭载动物为免疫缺陷小鼠,在允许异种人肿瘤存活的同时,先天缺失抗肿瘤免疫反应,这意味着无法采用该模型研究移植肿瘤与特异性免疫系统的相互作用和评估免疫治疗方法及药物的作用效果^[1-2],限制了近年来活跃的肿瘤免疫治疗及其基础研究。因此,建立既能保留人体肿瘤生物学特性,又具有正常免疫功能的动物模型是肿瘤研究尤其是肿瘤免疫研究的迫切需要。本研究拟建立可适用于病人来源的,且免疫功能相对正常的人肿瘤异种移植动物模型,从而为肿瘤研究,尤其是肿瘤免疫研究提供新的临床前研究模型。KM 小鼠由于繁殖周期短、多胎妊娠和抵抗力强,是常用的宫内移植实验对象。本文在前期工作的基础上^[3]继续探讨了妊娠小鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞对胎鼠成活率和生长发育的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,8 周龄,体重 30 ~ 40 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2013-0004]。雌鼠经配种、生产后备用。饲养于江西中医药大学实验动物科技中心[SYXK(赣)2017-0004]。实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准(伦理审查证号:JZLLSC2017-0021),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞株

人肝癌 HepG2 细胞购自上海细胞研究所,由江西中医药大学中药资源与民族药研究中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(批号为 922L035),购自德国默克制药公司;盐酸布比卡因(批号为 D1102A),购自大连美仑生物技术有限公司;通用型中性组织固定液(4%多聚甲醛)(批号为 175030),购自武汉赛维尔

生物科技有限公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(批号为 20171108),购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;DMEM 高糖培养基(含双抗,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL)(批号为 20170812),购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;胎牛血清(批号为 RY3201),购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;胰蛋白酶(批号为 T1300),购自北京索莱宝科技有限公司;台盼蓝染液(批号为 20161122),购自北京索莱宝科技有限公司。拉制仪(型号为 PC-1),购自日本成茂公司;微量注射器(型号为 IM-9B),购自日本成茂公司;恒温台(型号为 TP-SMZSL),购自日本东海希多公司;CO₂ 培养箱(型号为 C150),购自德国宾德有限责任公司;全自动脱水机(型号为 HistoCore Pearl),购自德国徕卡仪器有限公司;包埋机(型号为 Arcadia),购自德国徕卡仪器有限公司;切片机(型号为 RM2235),购自德国徕卡仪器有限公司;染色封片工作站(型号为 AutostainerXL + TS5015 + CV5030),购自德国徕卡仪器有限公司;五人共览显微镜(型号为 DM2500B),购自德国徕卡仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,移入培养于 CO₂ 培养箱,于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。注射前于倒置显微镜下采用台盼蓝染色法计活细胞数,用 PBS 调整细胞悬液至不同浓度:2.5 × 10⁷/mL、5 × 10⁷/mL 和 7.5 × 10⁷/mL,即时备用。

1.3.2 实验动物分组、手术及术后观察

选取雄性种鼠和经产的雌性种鼠,在交配前分开隔离饲养。下午 1:1 合笼,第二天检查阴栓,发现阴栓当天定为 0 d。孕鼠随机分为 5 组,于孕 14 d 开腹腔行子宫内注射,即向每只胎鼠腹腔注射 10 μL 不同浓度的 HepG2 细胞悬液,对照组注射等量无菌 PBS 溶液,全部胎鼠注射完成后缝合,假手术组孕鼠只开腹腔不进行胎鼠腹腔注射,直接缝合。

手术具体方法如下:孕鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠溶液(70 mg/kg)麻醉,放置在恒温台上,仰卧,固定。75% 酒精消毒并剃光腹部毛发。下腹部做 1 cm 的纵向切口,用湿润棉签轻轻舒展筋膜,并将妊娠子宫从切口中牵出,确定左、右卵巢,记录胎

鼠数量后将子宫放回腹腔。其后逐只牵出进行注射,注射针头由外径 1 mm 的毛细玻璃管控制,术中不断用 37°C 预热生理盐水湿润子宫。记录胎鼠注射可能出现的出血、囊液渗出、囊膜外突、胎鼠损伤等手术并发症。注射完成后,小心抽离注射针,将胎鼠小心放回腹腔。用 5-0 编织可吸收缝线缝合筋膜,5-0 不可吸收缝线缝合皮肤。于切口处皮下注射 0.05% 盐酸布比卡因溶液(5 mg/kg)以减少孕鼠痛苦。将孕鼠放置在保温台上保持体温,直至其醒来。醒来后转移至铺有厚纱布的笼具里,并置于安静的区域直到生产。

第二天检查孕鼠有无阴道出血、腹部收缩或烦躁等流产征兆。其后每天观察,注意伤口红肿、发炎、伤口分离和感染等症状。记录每组孕鼠分娩及胎鼠成活情况。

1.3.3 经子宫内腹腔注射胎鼠的出生后生长发育指标测定

考察出生后存活的乳鼠发育状况,包括观察是否存在外观畸形,定期称重,并记录耳廓分离、牙萌出、出毛、睁眼时间、张耳、雄性睾丸下降、雌性阴道开口等一般生理发育和运动发育、神经肌肉发育、反射和感觉功能等特殊生理发育指标的达标时间^[4-6]。

选取成年后部分小鼠,摘眼球取血后,解剖观察肝、肺、肾等主要脏器有无畸形、病变,并取心、肝、肺、肾、胃、十二指肠、空肠、回肠和盲肠,用 4% 多聚甲醛组织固定液固定,梯度乙醇脱水,常规石

蜡包埋,5 μm 连续切片,HE 染色,显微观察各组小鼠主要脏器的病理改变情况。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,用 SPSS 17.0 软件包分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)评价整体性差异,并进行方差齐性检验。采用 χ^2 检验、*t* 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 手术并发症

孕鼠中除 1 只因术中麻醉过量死亡外,其余孕鼠均未发现感染迹象,每只孕鼠妊娠胎鼠个数为 2 ~ 18 只,孕鼠及胎鼠具体情况见表 1。

除假手术组外,各组均出现出血、囊液渗出、囊膜外突等手术并发症,各组总并发症较假手术组差异均有显著性($P < 0.01$), 2.5×10^5 细胞注射组囊液渗出、囊膜外突并发症与假手术组间比较差异有显著性($P < 0.01$),对照组囊液渗出并发症、 7.5×10^5 细胞注射组囊液渗出、囊膜外突并发症与假手术组相比差异有显著性($P < 0.05$)。与对照组相比, 2.5×10^5 细胞注射组和 7.5×10^5 细胞注射组总并发症有所增加,差异有显著性($P < 0.01$), 2.5×10^5 细胞注射组囊液渗出、囊膜外突并发症与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$), 7.5×10^5 细胞注射组囊膜外突并发症与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 手术孕鼠、胎鼠情况及各组手术并发症的比较

Table 1 Comparison of conditions and complications of pregnant and fetal mice during operation in each group

组别 Groups	假手术组 Sham operation group	对照组 Control group	细胞注射组(细胞数) HepG2 cell injection groups (number of cells)		
			2.5×10^5	5.0×10^5	7.5×10^5
手术孕鼠数 Number of pregnant mice during operation	8	30	17	10	14
妊娠胎鼠数 Number of fetal mice	88	426	240	122	175
出血数(百分比,%) Number of bleeding (Percentage,%)	0(0)	3(0.7)	1(0.4)	0(0)	3(1.7)
囊液渗出数(百分比,%) Number of cystic fluid exudation (Percentage,%)	0(0)	6(1.4) *	15(6.2) ** $\Delta\Delta$	2(1.6)	7(4.0) *
囊膜外突数(百分比,%) Number of capsule evagination (Percentage,%)	0(0)	0(0)	5(2.1) ** $\Delta\Delta$	0(0)	2(1.1) * Δ
胎鼠损伤数(百分比,%) Number of injured fetal mice (Percentage,%)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
并发症总数(百分比,%) Total number of complications (Percentage,%)	0(0)	9(2.1) **	21(8.8) ** $\Delta\Delta$	2(1.6) **	12(6.8) ** $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with the sham operation group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.2 妊娠结局

因正常 KM 小鼠生产在孕 18 ~ 20 d 之间,故将生产天数少于 18 d 孕鼠认定为早产孕鼠;术后观察有流产迹象且超出孕 26 d 仍未生产孕鼠认定为流产孕鼠。

各注射组的胚胎丢失率较假手术组高,差异均有显著性($P < 0.01$)。细胞注射组与对照组相比,

胚胎丢失率有所增加,其中 7.5×10^5 细胞注射组较对照组差异有显著性($P < 0.05$)(见表 2)。

2.3 经子宫内腹腔注射胎鼠的发育状况

结果表明,各细胞注射组顺利分娩的胎鼠与假手术组相比,差异无显著性。对照组与假手术组相比,虽差异无显著性,但体重有所增加(见图 1)。

表 2 各组孕鼠妊娠结局的比较

Table 2 Comparison of pregnancy outcomes of mice in each group

组别 Groups	假手术组 Sham operation group	对照组 Control group	细胞注射组(细胞数) HepG2 cell injection groups (number of cells)		
			2.5×10^5	5.0×10^5	7.5×10^5
手术孕鼠数 Number of pregnant mice during operation	8	30	17	10	14
正常生产孕鼠数 Number of normal parturition mice	6	13	4	2	2
早产孕鼠数 Number of premature labour mice	0	0	0	0	0
流产孕鼠数 Number of aborting mice	2	17	13	8	12
难产死亡孕鼠数 Number of pregnant mice died of dystocia	0	0	0	0	0
妊娠胎鼠数 Number of fetal mice	88	426	240	122	175
存活乳鼠数(百分比,%) Number of surviving neonatal mice (Percentage, %)	48(54.5)	44(10.3)**	16(6.7)**	10(8.2)**	7(4.0)** Δ
流/死产乳鼠数(百分比,%) Number of aborted or dead neonatal mice (Percentage, %)	40(45.5)	382(89.7)**	224(93.3)**	112(91.8)**	168(96.0)** Δ

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$. Compared with the control group, $\Delta P < 0.05$.

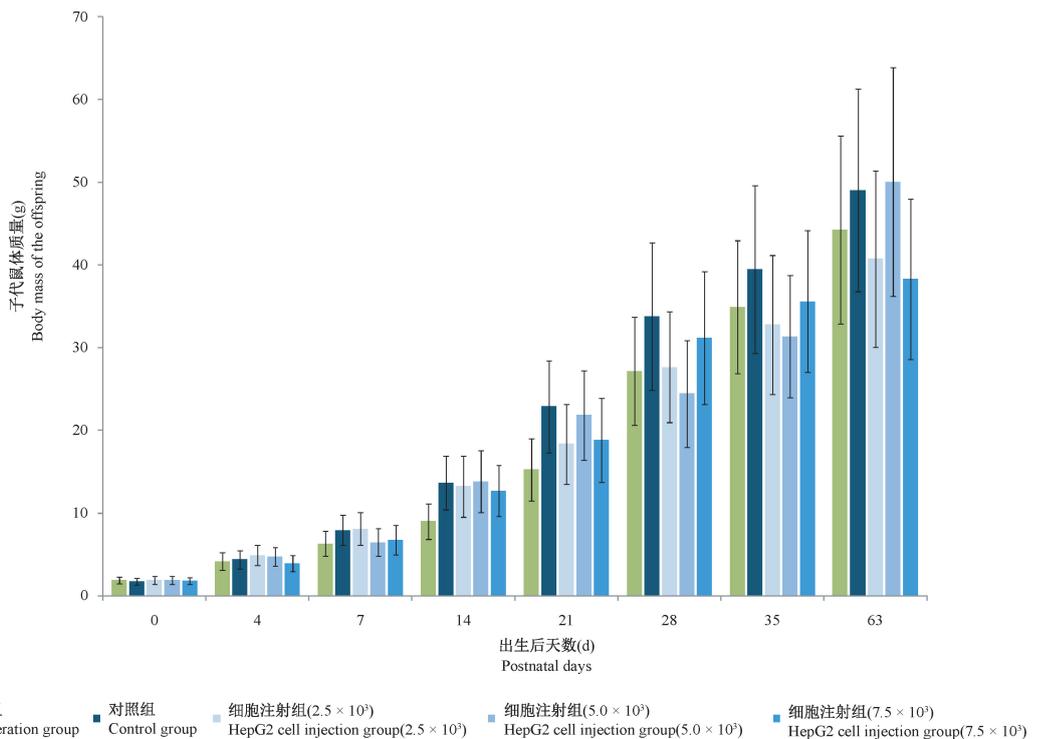


图 1 经子宫内腹腔注射胎鼠出生后体质量增长情况

Figure 1 Body mass of fetal mice with *in utero* intraperitoneal injection after birth

经子宫内腹腔注射并顺利分娩的胎鼠,出生时无形态缺陷,新生鼠继续发育至成年,其一般发育指标、特殊发育指标,与假手术组相比无明显变化, 7.5×10^5 细胞注射组胎鼠的耳廓分离、雄性睾丸下降、爬

行、听觉惊愕和空中翻正反射时间较假手术组有所延长,但差异均无显著性(见表 3、表 4)。肉眼和 HE 染色、镜下观察表明所有注射组各主要脏器的发育正常,未见异常结构及细胞(见图 2 ~ 10)。

表 3 经子宫内腹腔注射胎鼠出生后的一般生理发育指标(出生后天数)

Table 3 General physiological functions of fetal mice with *in utero* intraperitoneal injection after birth (postnatal days)

指标 Indices	假手术组 Sham operation group	对照组 Control group	细胞注射组(细胞数) HepG2 cell injection groups (number of cells)		
			2.5×10^5	5.0×10^5	7.5×10^5
			耳廓分离 Auricular separation	3.60 ± 0.55	3.49 ± 0.71
上牙萌出 Odontosis of upper teeth	6.41 ± 1.34	7.71 ± 1.45	7.52 ± 1.73	5.50 ± 2.12	7.05 ± 1.67
下牙萌出 Odontosis of lower teeth	4.20 ± 0.53	4.01 ± 0.38	4.12 ± 0.54	4.51 ± 0.71	4.55 ± 0.71
出毛 Growing hair	6.67 ± 0.89	6.26 ± 0.67	6.25 ± 0.51	6.06 ± 0.33	6.54 ± 0.71
睁眼 Opening eyes	15.89 ± 2.74	16.25 ± 2.62	16.33 ± 2.08	15.50 ± 2.12	15.96 ± 1.41
张耳 Opening ear	15.96 ± 2.74	15.38 ± 2.27	16.33 ± 2.08	16.11 ± 1.41	15.53 ± 2.12
雄性睾丸下降 Male testicular descent	21.23 ± 0.84	21.25 ± 1.28	20.12 ± 1.93	20.45 ± 2.32	22.81 ± 2.29
雌性阴道开口 Female vaginal opening	25.48 ± 0.94	25.83 ± 0.98	25.65 ± 1.87	25.18 ± 2.19	25.02 ± 2.38

表 4 经子宫内腹腔注射胎鼠出生后的特殊生理发育指标(出生后天数)

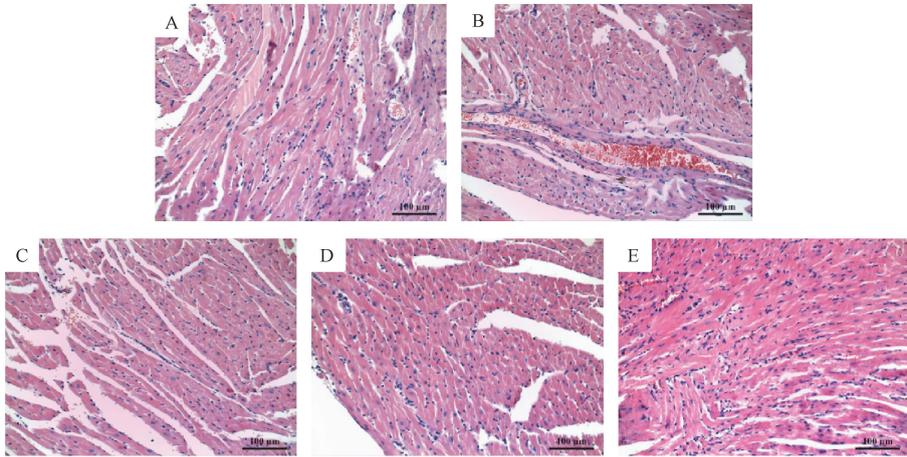
Table 4 Specialized physiological functions of fetal mice with *in utero* intraperitoneal injection after birth (postnatal days)

指标 Indices	假手术组 Sham operation group	对照组 Control group	细胞注射组(细胞数) HepG2 cell injection groups (number of cells)		
			2.5×10^5	5×10^5	7.5×10^5
			爬行 Crawling	9.09 ± 1.27	9.07 ± 1.36
前肢悬挂 Forelimb hanging	10.06 ± 1.22	9.64 ± 0.84	9.75 ± 0.96	9.59 ± 0.71	9.49 ± 0.71
断崖回避反射 Cliff avoidance reflex	2.05 ± 0.26	2.13 ± 0.26	2.75 ± 1.50	2.15 ± 0.63	2.04 ± 0.56
听觉惊愕 Auditory startle reflex	12.28 ± 1.10	11.94 ± 0.88	12.00 ± 1.00	12.94 ± 1.56	14.18 ± 2.83
平面翻正反射 Surface righting reflex	5.98 ± 1.27	6.23 ± 0.63	6.75 ± 0.96	6.5 ± 0.71	6.49 ± 0.71
空中翻正反射 Air righting reflex	7.29 ± 0.45	7.41 ± 0.52	7.25 ± 0.50	7.06 ± 0.64	10.17 ± 4.24

3 讨论

1948 年,Medawar 等^[7]通过向一种小鼠子宫内注射另一种小鼠的细胞,即在胚胎时期接触外来抗原,使前者出生后小鼠对后者的排斥反应消失,并首次提出“获得性免疫耐受”概念。这为器官移植领域的研究者打开了大门,让其看到了具有正常免

疫功能的机体接纳特定非己抗原特性活体细胞、器官的可能性。其后,对“获得性免疫耐受”的机制研究表明:在胚胎时期,体内已有针对多种抗原的具有免疫活性的淋巴细胞克隆,此时若与某种抗原(包括自身的或人工导入的)相遇,与其对应的淋巴细胞克隆即被破坏或抑制,出生后只对胚胎期曾接触过的抗原形成耐受,而对胚胎时期从未接触过的



注:A:假手术组;B:对照组;C:细胞注射组(2.5×10^5);D:细胞注射组(5.0×10^5);E:细胞注射组(7.5×10^5)。下图同。

图2 各组顺利分娩胎鼠成年后心脏病理学观察(HE染色, $\times 200$)

Note. A: Sham operation group; B: Control group; C: HepG2 cell injection group (2.5×10^5); D: HepG2 cell injection group (5.0×10^5); E: HepG2 cell injection group (7.5×10^5). The same in the following figures.

Figure 2 Histopathological observation of heart tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

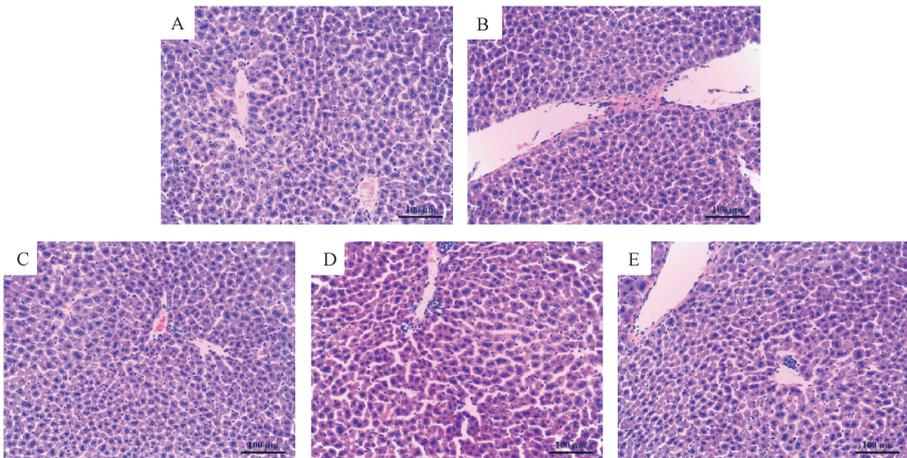


图3 各组顺利分娩胎鼠成年后肝脏病理学观察(HE染色, $\times 200$)

Figure 3 Histopathological observation of liver tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

抗原仍有免疫应答^[8]。研究表明,采用子宫内注射异体、甚至异种细胞的方法,可诱导免疫耐受^[9-10],并在移植排斥研究领域得到广泛应用^[11]。本研究基于此原理,拟通过向孕鼠子宫内的胎鼠注射人源细胞,建立免疫功能相对正常的人肿瘤异种移植动物模型,从而为肿瘤研究,尤其是肿瘤免疫研究提供新的临床前研究模型。

基于上述观点或假定,本研究需建立 KM 小鼠子宫内注射方法。在注射部位的选择上,刘英等^[12]采用胎鼠腹腔注射成功地建立了人脐血造血干细

胞宫内移植的小鼠模型,其推测宿主腹腔的间皮细胞可起到支架基质作用,并把造血干细胞不断地输送到血循环。据此,本研究采用了胎鼠腹腔注射,通过前期实验确定了注射时间为孕 14 d,并采用了生育耐受性、适应性和经验上都优于初产孕鼠的经产孕鼠。

因为恶性肿瘤细胞和胚胎组织一样,呈现旺盛的增殖能力,需先考察注射人肿瘤细胞是否会对胎鼠的发育产生影响,因此本研究拟先考察注射人肿瘤细胞对胎鼠的发育的影响。考虑到其后研究中

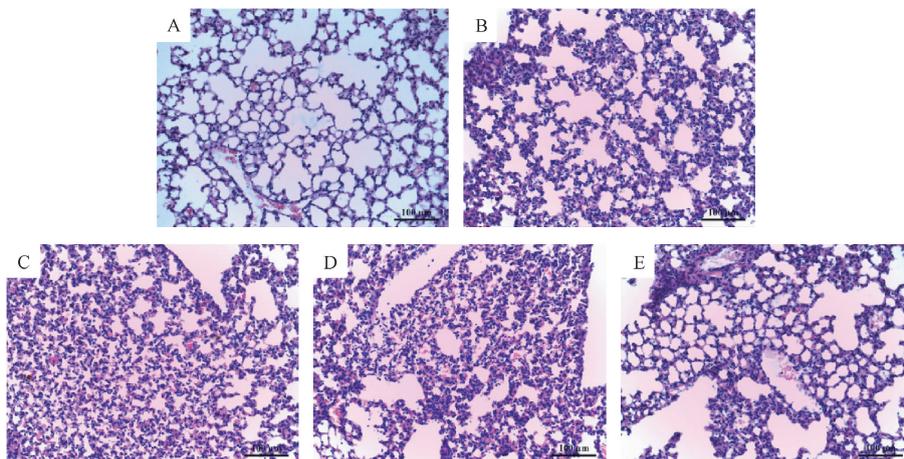


图 4 各组顺利分娩胎鼠成年后肺脏病理学观察(HE 染色, × 200)

Figure 4 Histopathological observation of lung tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

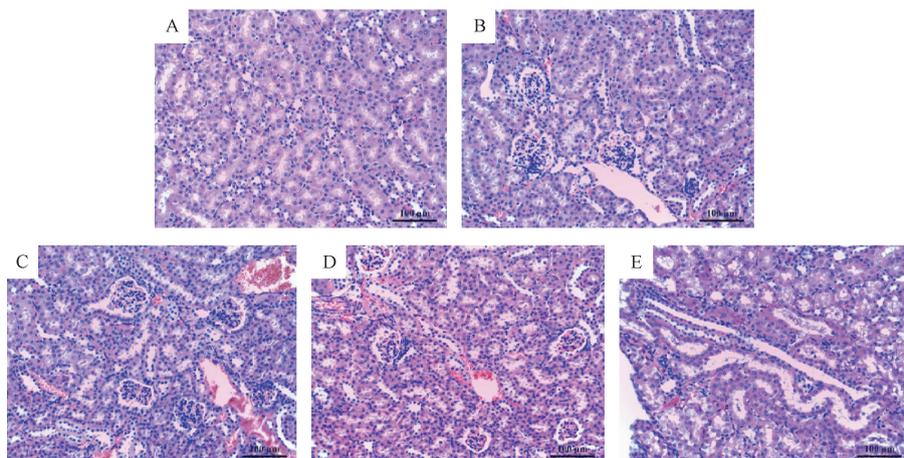


图 5 各组顺利分娩胎鼠成年后肾脏病理学观察(HE 染色, × 200)

Figure 5 Histopathological observation of kidney tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

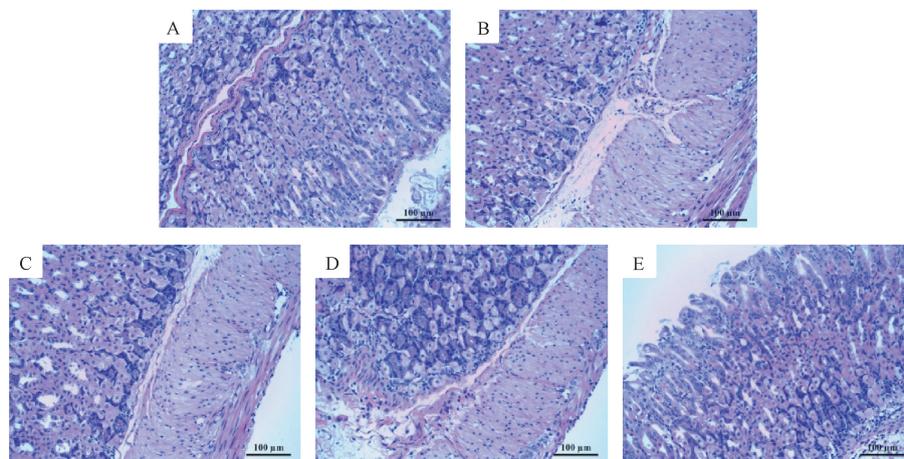


图 6 各组顺利分娩胎鼠成年后胃病理学观察(HE 染色, × 200)

Figure 6 Histopathological observation of stomach tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

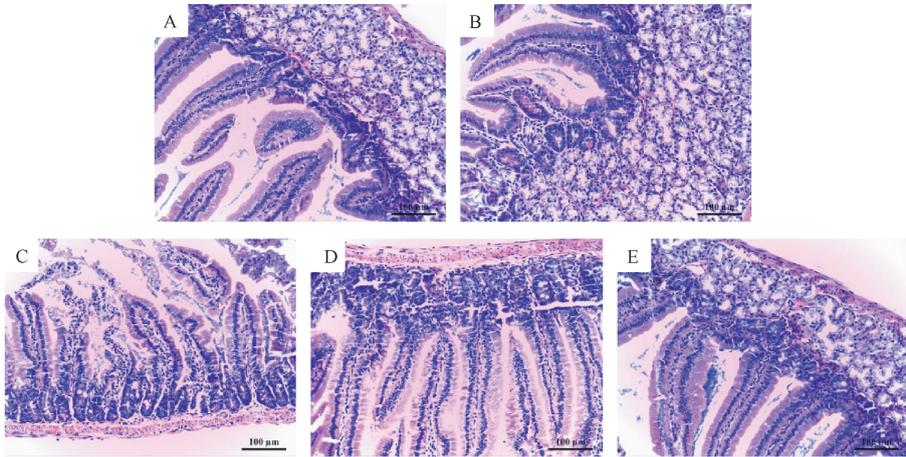


图 7 各组顺利分娩胎鼠成年后十二指肠病理学观察(HE 染色, $\times 200$)

Figure 7 Histopathological observation of duodenum tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

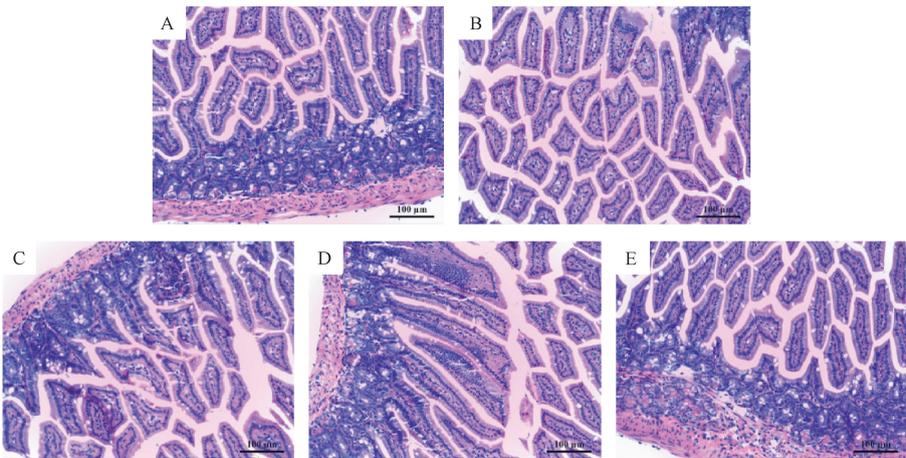


图 8 各组顺利分娩胎鼠成年后空指肠病理学观察(HE 染色, $\times 200$)

Figure 8 Histopathological observation of jejunum tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

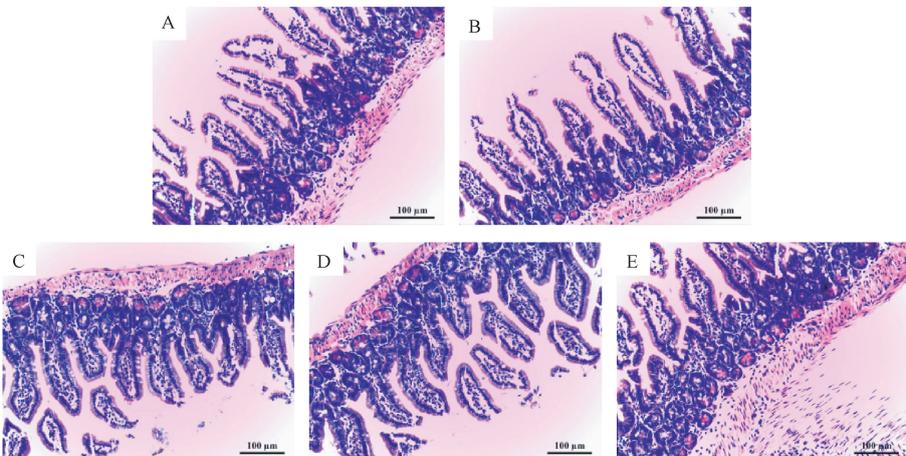


图 9 各组顺利分娩胎鼠成年后回指肠病理学观察(HE 染色, $\times 200$)

Figure 9 Histopathological observation of ileum tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

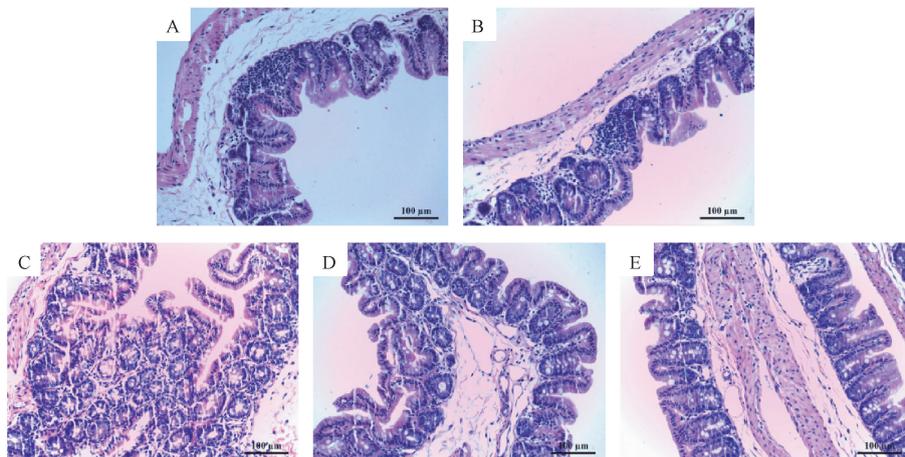


图 10 各组顺利分娩胎鼠成年后盲指肠病理学观察(HE 染色, $\times 200$)

Figure 10 Histopathological observation of cecum tissue from the grown-up fetal mice after successful delivery in each group. HE staining

胎鼠接触异种抗原细胞的数量是出生后胎鼠的免疫功能及耐受情况的重要影响因素,本研究设置了不同浓度的人肝癌 HepG2 细胞注射组^[13-14],并设假手术组及对照组,记录手术情况及孕鼠生产情况,以及出生小鼠的体重,并对子代鼠的耳廓分离、上下牙萌出、全身绒毛、睁眼时间、张耳、雄性睾丸下降、雌性阴道开口等一般生理发育学指标和爬行、前肢悬挂、断崖回避反射、听觉惊愕、平面翻正反射、空中翻正反射等特殊生理发育指标进行评价,选取成年小鼠解剖观察肝、肺、肾等主要脏器有无畸形、病变,并取材进行 HE 染色,显微观察各组小鼠主要脏器的病理改变情况。

实验结果表明,与假手术组相比,孕鼠子宫内胎鼠腹腔注射组的术中总并发症显著增加;与对照组相比,个别细胞注射组的囊液渗出、囊膜外突并发症显著增加,这可能是导致细胞注射组较对照组胚胎丢失率有所增加的原因之一。各浓度细胞注射组子代鼠的体重和生长发育指标差异无显著性,肉眼观察各主要脏器无病变,显微观察未见异常结构。其中对照组及部分细胞注射组与假手术组相比,虽差异无显著性,但体重有所增加的原因可能是对照组较假手术组胚胎丢失率高,存活的子代鼠少,哺乳期从母鼠获得的营养相对较多。

在本实验确定孕鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞对胎鼠发育影响的基础上,后续实验还将系统考察子宫注射人源细胞的数量及时间对顺利出生胎鼠的荷瘤能力和免疫系统功能的影响,以确定胚胎期经人源肿瘤细胞诱导特异性免疫耐受的小鼠,是否具备正常免疫力,且独能允许胚胎

时期接触过的肿瘤细胞生长。

在孕鼠子宫内胎鼠腹腔注射后出现的流产等非正常生产受操作技术影响较大,术中操作不当、过度压迫胚胎、子宫复位不好压迫供血血管、孕鼠术后疼痛不适和各种原因造成的手术时间过长均会导致手术成功率及胎鼠存活率的下降。为减少并发症的发生,提高手术成功率,本课题组总结经验,采取了以下措施:①相较于子宫内胎鼠注射现普遍采用的微量注射器,本研究用小直径(1 mm)玻璃毛细管控制极细的针头,使进针损伤降至最低。②手术中对胚胎进行操作时要格外注意,如固定胚胎时注意捉持力度,在保证准确进针的前提下尽可能轻柔;胚胎放回腹腔时用预热生理盐水湿润,减少对胚胎的挤压。③术后注射镇痛药,减少孕鼠的疼痛,缓解不适,保证术后的保暖和护理措施到位。整个手术过程严格无菌操作,以及不断练习提高和熟练实验操作技术也是降低流产、早产的发生,提高手术成功率的重要保证。

通过以上实验,本课题组确认了孕鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞不会对胎鼠发育产生影响,同时提高了子宫内注射操作的技术水平,为后续继续研究模型小鼠的荷瘤情况和免疫功能打下了基础。

参考文献:

- [1] Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(5): 311-316.
- [2] China plans large center for PDX models. *Cancer Discov*, 2014, 4(2): 136-137.

- [3] 陈来, 李俊, 殷玉婷, 等. 妊娠小鼠子宫内注射影响因素的研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3): 77 - 79, 86.
- [4] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术 [M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.
- [5] 姬艳丽, 余素贞, 豆正东. 昆明种小鼠正常行为发育指标探讨 [J]. 安徽医科大学学报, 2002, 37(6): 429 - 432.
- [6] 左谦益, 宁磊. 昆明小鼠生长发育指标及繁殖性能测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(4): 199 - 202.
- [7] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells [J]. Nature, 1953, 172(4379): 603 - 606.
- [8] Ada GL, Nossal G. The clonal-selection theory [J]. Sci Am, 1987, 257(2): 62 - 69.
- [9] Chen JC, Ou LS, Yu HY, et al. Allogeneic lymphocytes exerted graft-versus-host rather than tolerogenic effects on preimmune fetuses [J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 405 - 411.
- [10] MacArthur KL, Wu CH, Wu GY. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and replication [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(23): 2909 - 2913.
- [11] Chen JC, Kuo ML, Ou LS, et al. Characterization of tolerance induction through prenatal marrow transplantation: the requirement for a threshold level of chimerism to establish rather than maintain postnatal skin tolerance [J]. Cell Transplant, 2010, 19(12): 1609 - 1622.
- [12] 刘英, 庄广伦, 游泽山, 等. 经胎鼠腹腔途径进行人脐血造血干细胞宫内移植的实验 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(1): 22 - 24, 28.
- [13] Smolic M, Wu CH, Madadi S, et al. Pharmacogenetic selection of transplanted human hepatocytes in immunocompetent rats [J]. J Dig Dis, 2012, 13(11): 579 - 587.
- [14] Lin H, Mao Q, Wang YM, et al. Proliferation of L02 human hepatocytes in tolerized genetically immunocompetent rats [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(15): 2329 - 2337.

[收稿日期]2017 - 12 - 08

(上接第 27 页)

- [11] 马俊芳, 崔博, 沈东超, 等. CyclinD1 基因过表达慢病毒载体的构建和对神经干细胞增殖的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 10(2): 98 - 101.
- [12] Yao M, Wang Y, Zhang P, et al. BMP2-SMAD signaling represses the proliferation of embryonic neural stem cells through YAP [J]. J Neurosci, 2014, 34(36): 12039 - 12048.
- [13] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584.
- [14] Sangadala S, Metpally RP, Reddy BV. Molecular interaction between Smurf1 WW2 domain and PPXY motifs of Smad1, Smad5, and Smad6-modeling and analysis [J]. J Biomol Struct Dyn, 2007, 25(1): 11 - 23.
- [15] Bourgeois B, Gilquin B, Tellier-Lebègue C, et al. Inhibition of TGF- β signaling at the nuclear envelope: characterization of interactions between MAN1, Smad2 and Smad3, and PPM1A [J]. Sci Signal, 2013, 6(280): ra49.
- [16] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 1017 - 1030.

[收稿日期]2018 - 04 - 13