

大鼠胃炎癌转化模型建立与早期诊断方法探索

纪润璧, 马吉春, 闻向梅, 林江*

(江苏大学附属人民医院, 江苏 镇江 212002)

【摘要】 目的 构建大鼠胃炎癌转化模型, 探索新的胃癌早期血清学诊断指标。**方法** 采用 N-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍饮水 (MNNG) 协同高盐饲料喂养的方法诱导大鼠胃炎癌转化模型。核磁共振成像及组织病理学观察大鼠胃部恶化过程。qRT-PCR 检测不同时间点 (造模第 0, 12, 24, 36, 48 周) 大鼠血清 miR-17-5p 和 miR-374-5p 表达水平。**结果** MNNG 饮水协同高盐饲料喂养成功诱导大鼠胃炎癌转化, 经历萎缩性胃炎 (造模第 24 周) 和不典型增生 (造模第 48 周) 的过程。血清中 miR-17-5p 和 miR-374-5p 的表达水平与大鼠胃部恶化程度正相关。与正常对照组相比, 第 36、48 周时, miR-17-5p 表达水平分别增加约 8 倍 ($t=4.12, P<0.001$) 和 10 倍 ($t=5.33, P<0.001$); 第 48 周时, miR-374-5p 表达水平增加约 6 倍 ($t=3.62, 0.001<P<0.002$)。**结论** MNNG 饮水协同高盐饲料喂养构建的大鼠胃炎癌转化模型为研究胃癌发病机理提供了良好的动物模型, 血清 miR-17-5p 和 miR-374-5p 是潜在的胃癌早期无创诊断指标。

【关键词】 动物模型; 胃癌; 炎症转化; 早期诊断

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 04-0444-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.006

Construction of gastritis transformation into cancer model of rat and preliminary exploration of early diagnosis of gastric cancer

Ji Runbi, Ma Jichun, Wen Xiangmei, Lin Jiang*

(The Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China)

Corresponding author: LIN Jiang. E-mail: 2651329493@qq.com

【Abstract】 Objective To construct a rat model of transformation from gastritis to cancer and to explore possible serological index for early diagnosis of gastric cancer. **Methods** N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine (MNNG) in drinking water combined with high salt feed were used to induce gastric carcinogenesis in rats. Dynamic observation of gastric changes in the rats was carried out by nuclear magnetic resonance imaging and histopathology. The expression of serum miR-17-5p and miR-374-5p of rats were detected by qRT-PCR at different time points (0th, 12th, 24th, 36th, 48th weeks). **Results** MNNG combined with high salt diet induced gastric alterations, through the atrophic gastritis (the 24th week) and atypical hyperplasia (the 48th week) process. The expressions of serum miR-17-5p and miR-374-5p were positively correlated with the degree of gastric changes in the rats. Compared with the normal control group, the expression of miR-17-5p was increased about 8 times ($t=4.12, P<0.001$) and 10 times ($t=5.33, P<0.001$) at the 36th and 48th week, respectively, and the expression of miR-374-5p increased by about 6 times ($t=3.62, 0.001<P<0.002$) at the 48th week. **Conclusions** The rat model of transformation from gastritis into cancer is constructed by MNNG drinking water combined with high salt feed. It provides a good animal model for studying the pathogenesis of gastric cancer. Our findings preliminarily indicate that serum MiR-17-5p and miR-374-5p may be potential markers for non-

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (No. 81702429); 江苏省自然科学基金青年项目 (No. BK20170561); 镇江市社会发展项目 (No. SH2016047)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81702429), Natural Science Foundation of the Jiangsu Province (No. BK20170561), Zhenjiang Science & Technology Program (No. SH2016047).

【作者简介】 纪润璧 (1986 年—), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤的基础与临床。E-mail: runbiji@163.com

【通信作者】 林江 (1967 年—), 女, 研究员, 硕士生导师。Email: 2651329493@qq.com

invasive diagnosis of gastric cancer at the early stage.

【Key words】 animal model; gastric cancer; transformation from gastritis to cancer; early diagnosis

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

我国恶性肿瘤中,胃癌的发病率和死亡率分别高居第 2 位和第 3 位,严重威胁人类生命健康^[1]。胃癌是一个多因素作用、多步骤发展的过程,其发生的确切机制仍不清楚。研究胃癌发生过程有利于胃癌的早期诊断和防治。研究胃癌发生需要良好的原发性动物胃癌模型。目前已报道多种胃癌动物模型^[2-4]。其中,N-甲基-N'-硝基-N'-亚硝基胍(简称为 MNNG)可特异性诱导胃部 DNA 突变与过氧化损伤,是有效的胃癌诱导剂^[5-6]。Wistar 大鼠因其成本较低,易于饲养,自然癌发率低,诱癌率高,诱发胃癌前的各期胃组织形态与人类相似,成为诱导胃癌的首选动物^[7]。然而,有关胃癌发生的动态变化过程研究尚少。本研究在建立大鼠原发性胃炎癌转化模型的基础上,采用影像学和组织学技术观察大鼠胃部异常变化过程,检测血清中 miR-17-5p、miR-374-5p 的表达水平,为研究胃癌发病机理,寻找有效的早期诊断手段提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 80 ~ 100 g,购于国家实验动物种子中心上海分中心暨上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】,饲养于江苏大学实验动物中心屏障环境内【SYXK(苏)2013-0036】。Wistar 大鼠分为两组,对照组饲养期间给予标准饲料及洁净饮用水(由江苏大学实验动物中心提供)。实验组每日自由饮用 MNNG 溶液(100 mg/L)40 周,自饲养第 5 周起每日喂养含 8% NaCl 的高盐饲料至第 20 周,第 21 周起正常饮食。第 40 周后实验组停止任何干预。饲养环境:昼夜各半交替,湿度恒定,温度 20 ~ 25℃。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:K-20160070-Y)。

1.1.2 试剂与仪器

MNNG(日本 TCI 公司);高盐饲料(苏州双狮实验动物饲料公司);miRNA 引物、血清 miRNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)。

核磁共振仪(德国 Siemens 3.0T);倒置生物显微镜(TE300,日本 Nikon 公司);超低温冰箱(美国 Forma 公司);电热恒温水浴箱 DK-8D(上海一恒公司);PCR

仪(2720 Thermal Cycler,美国 Applied Biosystems 公司);荧光定量 PCR 分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 核磁共振成像

大鼠受检前饥饿 24 h,腹腔给予 1% 戊巴比妥钠(20 mg/kg)麻醉,取俯卧位标准轴配以小动物专用线圈固定。快速自旋回波(TSE)T2WI 序列扫描,包括冠状位、矢状位、轴位。具体扫描参数为:TR = 3200 ms,TE = 110 ms,层厚 1.0 mm,无间隔扫描,层数 36,Nex(激励次数) = 4,FOV = 100 mm × 100 mm,矩阵 = 384 × 384,带宽 260 HZ。采用西门子 3.0 T 磁共振仪扫描完成后图像传至西门子 syngo 工作站,手动选择病变区域。

1.2.2 胃组织取材与切片染色

对照组和实验组大鼠自造模后第 0、24、48 周定时处死,每个时间点至少达到 6 只。取大鼠胃生理盐水洗净,肉眼观察胃内壁黏膜色泽及损伤情况。选取病变部位常规多聚甲醛固定后,石蜡包埋,行连续切片(4 μm 厚)和苏木素-伊红(HE)染色。镜下观察胃黏膜形态学改变。

1.2.3 血标本采集

对照组和实验组大鼠自造模后第 0、12、24、36、48 周定时采用右眼内眦静脉采血法收集血标本。37℃ 水浴 30 min 后,3000 r/min 离心并吸取血清分装,-80℃ 保存。

1.2.4 RNA 提取与 qRT-PCR

根据血清 miRNA 提取试剂盒说明书提取 miRNAs。根据 qRT-PCR 试剂盒说明书推荐体系进行逆转录反应和 qPCR 反应。以 U6 为内参分析不同时间点大鼠血清中 miRNA 表达水平。qPCR 总反应体系为 25 μL,包括上、下游引物各 2.5 μL,2 × SYBR Green Mix 12.5 μL,cDNA 模板 2.5 μL,RNase-free 水 5 μL。循环参数:95℃ 预变性 15 min,94℃ 15 s,55℃ 30 s,70℃ 30 s,共 40 个循环。miRNA 相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计: $\Delta\Delta Ct = [(样本 Ct_{目的基因} - 样本 Ct_{管家基因}) - (对照组 Ct_{目的基因} - 对照组 Ct_{管家基因})]$ 。

1.3 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行。数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,多样本均数的两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组大鼠历经胃炎和不典型增生阶段

正常大鼠胃壁肥厚有弹性,胃黏膜光滑呈浅红色,皱襞完整且排列整齐,未见异常增生或结节。实验组大鼠胃壁普遍缺乏弹性,胃黏膜呈灰黄或灰白色,黏膜层变薄,皱襞变浅甚至消失。第 24 周时(MNNG-24),胃内壁可见散在出血点或糜烂,表面可有粘液性渗出物覆盖,可出现增生结节或溃疡样改变。第 48 周时(MNNG-48),贲门部见菜花样肿块,胃体部或近幽门部有结节样肿块形成,肿块组织颜色发白,质地较硬,活动性差(图 1)。

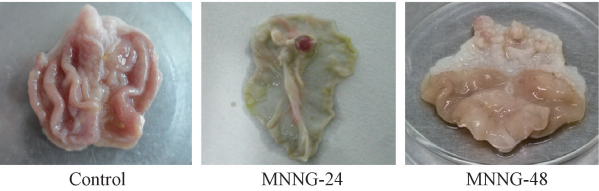


图 1 大鼠胃内壁大体观

Figure 1 Macroscopic observation of the stomach inner wall

如图 2 所示,正常大鼠胃 HE 染色可见胃黏膜结构完整;腺体密集分布,大小均一;腺体管腔形状规则;细胞形态一致,排列整齐。第 24 周大鼠胃黏膜镜下发现腺体变小,数目减少,胃黏膜变薄,胃小凹变浅,可见炎性细胞浸润,诊断为萎缩性胃炎。第 48 周时,黏膜层局部腺体结构消失或腺体排列紊乱,形状不规则,大量炎细胞浸润,有的甚至可以突破基底膜,细胞大小不一,杂乱无章,但细胞核未见增大深染,也未见核异形,判断为不典型增生。

2.2 MRI 可检测大鼠胃部早期恶化情况

大鼠麻醉后行冠状位、矢状位及轴位三轴扫描显示胃部结构。正常大鼠的食管和胃的交界处在轴位上易于呈现;冠状位上显示胃壁整体情况较好。在 T2WI/TSE 上呈等稍高信号,胃外壁与周围组织因外周高信号的脂肪组织衬托而易于区分,胃腔内为明显低信号的气体影,气体充盈胃部扩张状态下的内壁显示清晰。胃内壁光滑平整,无异常增厚或突起。实验组大鼠第 24 周行 MRI 检测发现其可出现局限性胃壁增厚,增厚部位多位于贲门部,内外边界光整,病灶周围脂肪层清晰。当胃内有软组织肿块形成时,MRI 可显示 T2WI 上稍高信号特征,肿块邻近胃壁不规则增厚。实验组第 48 周大鼠 MRI 检测发现胃内有软组织肿块形成,边缘光滑,位于胃腔轮廓之外(图 3)。

2.3 miR-17-5p、miR-374-5p 可作为潜在的胃癌早期诊断指标

与对照组相比,实验组大鼠血清中 miR-17-

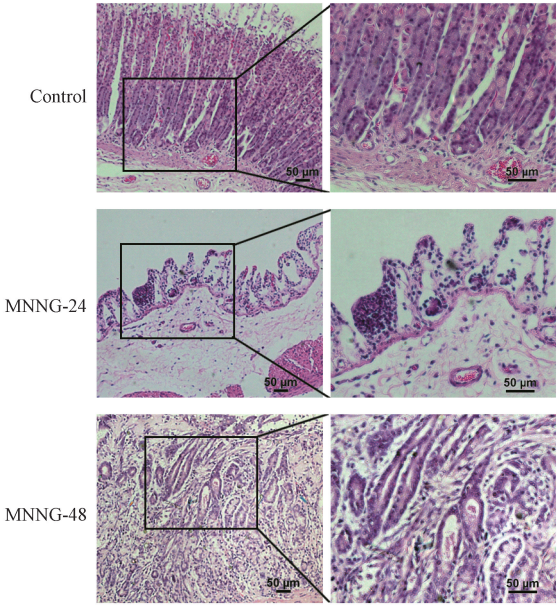
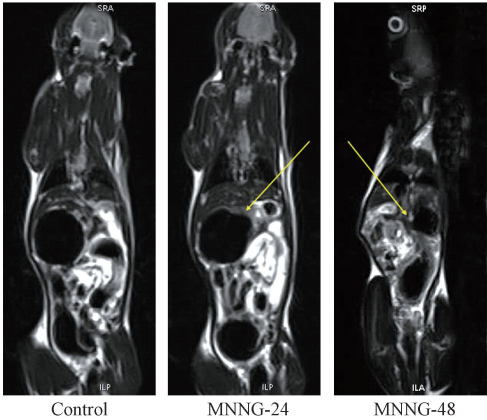


图 2 胃黏膜 HE 染色病理学诊断(bar=50 μm)

Figure 2 Histological changes of the gastric mucosa at different time points (HE staining, Scale bar=50 μm)



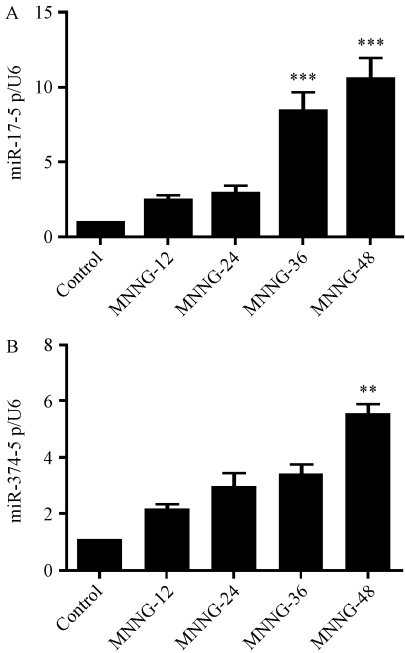
注:图 MNNG-24 箭头所指处胃内壁出现增厚,图 MNNG-48 箭头所指处胃内有肿块形成。

图 3 核磁共振成像观察大鼠胃部恶化

Note. MNNG-24 shows a thickening in inner wall of the stomach by the arrow, MNNG-48 shows a lump forming in the stomach by the arrow.

Figure 3 Observation of the deterioration of stomach by using magnetic resonance imaging

5p 和 miR-374-5p 表达水平随处理时间延长而增加。组间两两比较后发现,与正常对照组相比,第 36、48 周时,miR-17-5p 表达水平分别增加约 8 倍($t=4.12, P<0.001$)和 10 倍($t=5.33, P<0.001$)(图 4 A);第 48 周时,miR-374-5p 表达水平增加约 6 倍($t=3.62, 0.001<P<0.002$),差异有显著性(图 4B)。提示,miR-17-5p 和 miR-374-5p 可作为潜在的胃癌早期诊断指标。



注：*** 代表 $P < 0.001$ ，** 代表 $P < 0.01$ 。
图 4 qRT-PCR 检测不同时间点大鼠血清 miR-17-5p 和 miR-374-5p 的表达水平
Note. *** means $P < 0.001$, ** means $P < 0.01$.
Figure 4 Levels of serum miR-17-5p and miR-374-5p of rats at different time points detected by qRT-PCR

3 讨论

近年来,除了基于临床的对胃癌相关病因、诊断标准和预后的回顾性研究,研究人员越来越注重胃癌动物模型的建立,旨在进行胃癌发病机制与抗癌药物药理学的前瞻性研究^[2]。许多动物模型,如化学致癌物诱导模型,幽门螺杆菌感染和转基因小鼠模型可用于胃癌发生的研究。每种方法有各自的特点,运用 MNNG 等化学致癌物诱导的大鼠模型因其操作简单,成本低廉,且 Wistar 大鼠胃癌形成的各个阶段与人类的组织形态相似而被广泛应用^[8-11]。在本研究中,高盐饮食促进大鼠饮水,饮水水中加特异性胃癌诱导化学制剂 MNNG,可提高大鼠每日 MNNG 的摄入量,进一步加速胃癌发生。胃癌发生前各个阶段可分为癌前疾病和癌前病变,统称为癌前状态。前者指有发生胃癌危险性的胃良性疾病,如萎缩性胃炎、胃溃疡等。后者指易癌变的组织病理学改变,如肠型化生和不典型增生。我们运用核磁共振成像动态观察了大鼠胃部的恶化过程,采集不同时间点的大鼠胃组织标本进行病理学诊断,发现大鼠经历了萎缩性胃炎和不典型增生的演变。在本研究中,未有大鼠发生胃腺癌。但本模型中大鼠正常胃黏膜逐步恶性转化,对研究胃癌发生过程仍有良好的帮助,为今后研究胃癌发生的机制提供了有效的动物模型数据。

目前广泛应用于胃癌检测的血液肿瘤标志物如 CEA、CA 系列等,其诊断的灵敏度和特异性相对较低。我们的研究结果显示,血清中 miR-17-5p、miR-374-5p 的表达水平与大鼠胃部恶化程度呈正相关,且在癌前状态阶段即发生显著性升高。因此,血清 miR-17-5p 和 miR-374-5p 检测有望成为胃癌早期无创诊断的方法。然而,miR-17-5p、miR-374-5p 与胃癌发生的确切联系,有待我们的深入研究。同时,miR-17-5p 和 miR-374-5p 是否能够成为新的胃癌早期诊断指标还需在临床标本中进一步进行验证。

综上所述,MNNG 饮水协同高盐饲料喂养构建的大鼠胃炎癌转化模型为研究胃癌发病机理提供了良好的动物模型,血清 miR-17-5p 和 miR-374-5p 是潜在的胃癌早期无创诊断的指标。

参 考 文 献 (References)

[1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. The incidence and mortality of major cancers in China, 2012 [J]. Chin J Cancer, 2016, 35 (1): 73.

[2] Yu S, Yang M, Nam KT. Mouse models of gastric carcinogenesis [J]. J Gastric Cancer, 2014, 14(2): 67-86.

[3] Hayakawa Y, Fox JG, Gonda T, et al. Mouse models of gastric cancer [J]. Cancers (Basel), 2013, 5(1): 92-130.

[4] Zheng MJ, Wang J, Chen YW, et al. A novel mouse model of gastric cancer with human gastric microenvironment [J]. Cancer Lett, 2012, 325(1): 108-115.

[5] Arivazhagan S, Nagini S, Santhiya ST, et al. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced in vivo clastogenicity: protective effects of aqueous neem leaf extract [J]. Pharmazie, 2003, 58(10): 750-752.

[6] Bai H, Gu L, Zhou J, et al. p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of Wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. Mutat Res, 2003, 535(1): 73-78.

[7] Miti H, Bathaie SZ, Mohagheghi MA, et al. A noninvasive method for early detection of MNNG-induced gastric cancer of male Wistar rat: ultrasonic study [J]. Ultrasound Med Biol, 2011, 37(5): 780-787.

[8] Tsukamoto H, Mizoshita T, Katano T, et al. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats [J]. Exp Toxicol Pathol, 2015, 67 (3): 271-277.

[9] Alizadeh AM, Afrouzan H, Dinparast-Djadid N, et al. Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis [J]. Arch Iran Med, 2015, 18(1): 18-23.

[10] Wang X, Liu H, Wang X, et al. Preventive effect of Actinidia valvata Dunn extract on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastrointestinal cancer in rats [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 6363-6367.

[11] Gunasekaran GR, Priya DK, Gayathri R, et al. In vitro and in vivo studies on antitumor effects of gossypol on human stomach adenocarcinoma (AGS) cell line and MNNG induced experimental gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(4): 661-666.

[收稿日期] 2018-04-23