



肺癌转移瘤动物模型的建立

陈渝生,林小芬,李鸿茹,林献,林明,许能銮

(福建医科大学省立临床医学院,福州 350001)

【摘要】目的 通过尾静脉注射,建立一种符合临床特征的肺腺癌转移瘤动物模型,为下一步的肺腺癌转移机制的研究提供可靠的实验造模方法。**方法** 取对数生长期的A549细胞,11只SPF级、4~6周龄BALB/c裸鼠,分别以 1×10^6 个细胞/只注射入裸鼠尾静脉。接种后每天观察小鼠状态。分别于接种肿瘤细胞后第4、5、6、7周随机处死2只,余3只小鼠处于濒死状态时处死。解剖小鼠,观察肺部有无转移、转移结节的数目及全身其他器官的转移情况,并做病理取材,HE染色观察。**结果** 注射过程中小鼠均存活。未处死的3只分别于第11、13、14周出现恶液质。第4周肺部未见转移结节;第5周出现镜下肺部转移结节;第6周肉眼可见肺部转移结节;第7周转移结节数增多;第11周出现纵隔淋巴结转移。第11、13、14周出现肺部结构大量破坏,弥漫性的肿瘤细胞浸润,出现淋巴结浸润,病理证实为腺癌。**结论** 通过尾静脉注射A549细胞可以成功建立人肺腺癌转移瘤模型。

【关键词】 肺腺癌;肿瘤转移;动物模型;裸鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014)05-0032-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.007

Establishment of a nude mouse model of pulmonary adenocarcinoma metastasis

CHEN Yu-sheng, LIN Xiao-fen, LI Hong-ru, LIN Xian, LIN Ming, XU Neng-luan

(Fujian Provincial Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To establish an optimal animal model of pulmonary metastasis of human lung adenocarcinoma, to serve further investigation of mechanism of lung adenocarcinoma metastasis. **Methods** Eleven nude mice aged 4-6 weeks were used in this study. Suspension of human lung adenocarcinoma A549 cells (0.1 mL, 10^7 cells/mL) was injected into the tail vein in nude mice. From four weeks after inoculation, two nude mice were killed each time at 4, 5, 6 weeks after the tumor cell injection at random for examination. The remaining 3 mice were killed at the end of the experiment. At autopsy, the lung, brain, liver, kidney and other organs were removed, fixed in neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were cut and stained with hematoxylin-eosin, and examined by histopathology. The number of metastatic foci was counted. **Results** No mouse died after tumor cell inoculation. Serially euthanized mice revealed evidence of gradually increasing pulmonary metastases in the mice: No metastasis was found before 4 weeks after tumor cell inoculation, the first histological metastases appeared at 5 weeks, gross metastatic foci were observed at 6 weeks, widely spread metastatic foci were observed at 7 weeks, and the remain 3 mice developed cachexia at 11, 13, and 14 weeks after tumor cell inoculation. Mediastinal lymph node metastases were found in the nude mice by 11 weeks after tumor cell inoculation. **Conclusions** We have successfully established a nude mouse model of pulmonary metastasis by injecting human lung adenocarcinoma A549 cells into the tail vein.

【Key words】 Lung adenocarcinoma; Neoplasm metastasis; Animal model; Nude mice.

肺癌是世界上发生率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,转移是肺癌死亡的主要原因,所以肺癌转移的

研究意义重大。利用免疫缺陷动物建立肿瘤动物模型,是研究肿瘤转移机制的重要工具,国内外学者已

[基金项目] 福建省科学自然资金,livin基因致肺癌侵袭及作用机制研究(2011J01130)。

[作者简介] 陈渝生(1957年-),女,教授,博士生导师,本文通讯作者。Email: slyywb@126.com.cn。

经在这方面做了大量的探索^[1,2],理想的转移模型却并不多。本研究以人肺腺癌细胞 A549 为研究细胞,以 BALB/c 裸鼠为宿主动物,经尾静脉注入人肺腺癌细胞,建立人肺腺癌实验性转移动物模型,为下一步的肺腺癌转移机制的研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及实验动物

人肺腺癌 A549 细胞株来源于中科院上海细胞研究所。SPF 级 BALB/c 裸鼠 11 只,4~6 周龄,体重(16 ± 2)g,雌雄各半,购于中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2012-002】;饲养于福建医科大学动物实验中心 SPF 级动物室【SYXK(闽)2012-0001】;所用的饲料、水、垫料都经过严格灭菌处理,并按动物实验的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要试剂与设备

RPMI 1640 培养基、0.25% 胰酶 2-EDTA (Hyclone 公司,美国)、胎牛血清(杭州四季青公司,中国)、生物安全柜和 CO₂ 培养箱(日本三洋公司,日本)、倒置显微镜(奥林巴斯公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,将 A549 细胞培养于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中。取对数生长期细胞,经胰酶消化制备细胞悬液,以 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入无血清的 1640 培养基,再经吹打、离心。以无血清培养基重悬制备单细胞悬液。

1.2.2 细胞计数

吹打混匀细胞,取 4 滴细胞悬液、4 滴台盼蓝染液混于离心管中,活细胞不被染。将混匀的细胞悬液滴入细胞计数板中,统计四大格的活细胞及死细胞数,细胞量/mL = (四大方格细胞总数 / 4) × 10⁴ × 2/mL。台盼蓝染色示细胞存活率 > 90% (细胞存活率 = 活细胞数 / 细胞总数 × 100%)。离心并重悬细胞至密度为 1×10^7 个 / mL。

1.2.3 细胞接种

通过剪裸鼠耳朵标记裸鼠的左耳上下、右耳上下部位。在 SPF 级动物房,将裸鼠固定在固鼠器内,压住鼠尾巴根部,用酒精棉球擦拭尾巴消毒并扩张血管,用 1 mL 注射器吸取单细胞悬液,于尾部中外三分之一处进针,注意控制速度防止小鼠发生栓塞。每只 0.1 mL,即 1×10^6 个。

1.2.4 肺部及全身其他脏器的转移情况

分别于接种肿瘤细胞后第 4、5、6、7 周,用颈椎

脱臼法随机处死 2 只,余 3 只出现恶液质时处死。解剖小鼠,观察肺、淋巴结、脑、肝、肾等脏器有无转移灶,计算肺部转移的结节数。

1.2.5 肺部转移病灶的病理检查

对肺部转移灶行病理取材,置于 4% 甲醛固定,固定 24 h 后,制成石蜡切片,HE 染色,镜下观察。

2 结果

2.1 接种后裸鼠的一般情况

尾静脉注射过程中,11 只裸鼠均未见死亡,精神状态好,反应灵敏。未处死的 3 只,分别于接种后第 11、13、14 周出现恶液质。

2.2 小鼠解剖后肺部及其他脏器转移情况

第 4 周未出现转移结节;第 5 周出现镜下转移结节;第 6 周出现肉眼转移结节,平均 15 个;第 7 周转移结节数目明显增多,平均 30 个;第 11、13、14 周的肺部呈弥漫性病变,肺质地坚韧。肺部的转移结节呈半透明样,切开呈实性(彩图 1,见彩插 6,图 2 见彩插 7)。其他脏器在第 11 周纵隔淋巴结有转移灶(见彩图 3A,彩插 7),其余小鼠均未见其他脏器的转移灶,亦未见胸水。

2.3 肺转移灶的病理检查结果

转移灶细胞呈腺样排列。细胞呈圆形、椭圆形或不规则形,分化差,核大,深染,核质比大,核分裂相多见,符合腺癌病理特点(见彩图 3B,彩插 7)。

3 讨论

建立一种比较理想的肺癌转移模型,对于进一步研究肺癌转移分子机制、研究肺癌转移细胞的生物学特性、肺癌远处转移的基因治疗等方面意义重大。

实验动物模型建立成功与否主要取决于以下几个方面:①肿瘤细胞接种部位。②接种细胞的数量及状态。③实验动物的选择。

目前存在的肿瘤转移模型形式多样,主要分为自发性转移模型和实验性转移模型,前者包括皮下接种、原位接种,后者为循环系统接种。

皮下接种转移模型国内外学者^[3,4]均有报道,该模型建立周期长,且不易出现转移。肿瘤在小鼠体内出现转移需要的周期长,常于未出现转移时,负荷的肿瘤出现破溃,或肿瘤负荷过重,小鼠出现恶液质,难以达到实验要求^[5]。

原位移植建立肺癌转移模型渐渐成为热点,学者们认为原位移植转移模型能比较确切的模拟临床转移的过程。该模型成瘤率高,表现出较强的侵袭及转移性^[6],但是原位移植存在一些不易实行的地方。小鼠的个体较小,4~6 周龄,操作难度大;操作

时必须严格遵守无菌原则,裸鼠为免疫缺陷动物,易发生术后感染甚至是死亡。此种模型安全性偏低,动物死亡率偏高。

本研究采用经尾静脉注入肺腺癌细胞 A549,建立肺癌实验性转移模型。实验性转移模型是指将瘤细胞悬液直接接种于血管腔内或淋巴管腔内建立的模型,这种方法的优点是缩短了靶器官内形成瘤灶的时间,转移率高;缺点是该模型模拟了肿瘤复杂转移过程的一个阶段,并不能模拟转移的全过程。本研究中注入肿瘤细胞后第 5 周开始出现肺部转移,肺部转移率达 11/11,与皮下注射肿瘤细胞相比,转移率高且出现转移的时间明显缩短;本研究过程中未出现裸鼠死亡,未处死的 3 只裸鼠最早于注射肿瘤细胞后第 11 周出现恶液质,与原位移植相比,裸鼠不易出现感染,且存活时间长,有利于后续的研究。该模型特点是操作简单、出现远处转移的时间短、转移率高、动物存活率高及存活时间长。

种植的细胞数量及状态会影响建模的成功与否。细胞接种过少,接种的成功率和自发转移率都会减少;接种过多,又会引起肿瘤的失控生长,不利于后续的实验。郑井红等^[7]研究表明,接种细胞数过少未能形成肺转移灶;接种细胞数量过大小鼠全部死亡。另外,接种的细胞一般取对数生长期的细胞,该期细胞生长活力高。参考有关文献,本研究采用 1×10^6 个/只接种裸鼠尾静脉,经台盼蓝染色,细胞活力达 90%。通过分批处死裸鼠,动态观察,肺部转移率达 100%,第 7 周转移达到最高,符合既往文献的报道^[8]。

本研究选择 BALB/c 裸鼠,因为它是无胸腺鼠,T 细胞不能正常分化,所以对于异体物质没有明显的排斥反应,移植后肿瘤生长良好,也能保持肿瘤细胞原有形态及生物学特性,是肿瘤研究中较为常用的实验动物^[9]。BALB/c 裸鼠为单一 T 细胞缺陷,NK 细胞活性较高,B 细胞仍参与免疫应答。而 SCID 小鼠为联合免疫缺陷小鼠,T、B 细胞联合免疫缺陷,是人体异种移植较好的实验动物。Bosma 等^[10]研究表明,SCID 鼠在对人体肿瘤细胞系敏感性、成瘤率和转移率方面都高于 BALB/c 裸鼠。但是由于 SCID 裸鼠为联合免疫缺陷裸鼠,价格昂贵,对于环境要求极高且不易饲养,死亡率较高。本研究持续时间长,为使结果具有统计学意义,尽量减少动物死亡数目,故本研究选择 BALB/c 裸鼠。此外,裸鼠成瘤也受年龄影响。选取 4~6 周龄的裸鼠最佳。裸鼠体内 T 细胞会随着年龄的增加而增加,相应的裸鼠的免疫功能增强,移植成功率会受影响。综合这几方面的因素,本研究选择了 4~6 周

BALB/c 裸鼠。

本研究中,接种 1×10^6 个/只到 11 只裸鼠尾静脉。分别于接种后第 4、5、6、7 随机处死 2 只,取肺部做 HE 染色观察,第 5 周开始出现镜下肺部转移结节,第 6 周出现肉眼转移结节,第 7 周转移结节数增多。随着接种周数的延长,肺部转移结节的数目相应增多,符合肿瘤的生长规律。第 11、13、14 周肺部呈弥漫性病变,肺泡结构大量破坏,第 11 周出现淋巴结浸润。生存时间较长,有利于肿瘤机制研究。本研究动态观察肿瘤细胞的生长情况,更好反映肺腺癌在体内的转移规律。但是,既往的文献分批处死的动物数量一般较多^[11],本研究每批处死的 2 只,数量偏小,易引起假阴性。相关文献报道,经尾静脉注射其他肿瘤细胞建立肺部转移模型,在肺部形成转移结节的同时,其尾部注射部位也会形成肿瘤,但是本研究未出现尾部成瘤。

(本文图 1 见彩插 6, 图 2,3 见彩插 7。)

参 考 文 献

- [1] 徐冰,姚明,闫明霞,等.人肝癌 NOD-SCID 小鼠原位移植模型的建立及其生物学特性的研究[J].肿瘤,2006,26(11):975~978.
- [2] 魏泓,牛荣,黄中波,等.人肺癌不同程度免疫缺陷小鼠的移植及其高转移模型的建立[J].中国实验动物学杂志,1997,7(2):107~111.
- [3] Tanaka, Eiji MD, Yamashita, et al. A Pulmonary metastatic model of human non-small cell lung carcinoma cells that produce a neutrophil elastase-like molecule in severe combined immunodeficiency mice [J]. Chest, 2003, 123:1248~125.
- [4] 朱惠芳,兰岚,赵轼轩,等. A549 人肺癌细胞系/615-SCID 小鼠转移瘤的生物学特征 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4):199~202.
- [5] 刘蕾,姚明,闫明霞,等.裸小鼠人肺癌术后转移模型的建立及动态观察 [J].肿瘤, 2007, 27(4):265~268.
- [6] Miyoshi, Kondo K, Ishikura H, et al. SCID mouse lymphogenous metastatic model of human lung cancer constructed using orthotopic inoculation of cancer cells [J]. Anticancer Res. 2000, 20(1A):161~163.
- [7] 郑井红,陆佳琦,程明军,等.人绒毛膜癌鼠肺转移模型的建立及其生物学特性的初步观察 [J].中华妇产科杂志, 2010, 45(7):519~524.
- [8] Harris, Shin J, Lee B, et al. A murine xenograft model of spontaneous metastases of human lung adenocarcinoma [J]. J Surg Res, 2011, 171(1):e75~e79.
- [9] 伍细丕,钱林法.实验动物与肿瘤研究 [M].北京:中国医药科技出版社, 2000:78~83.
- [10] Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ, et al. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. Nature, 1983, 301:527~530.
- [11] 陈苏峰等.肺癌转移模型建立及 LacZ 基因转染 EPCs 检测 [D]. 上海交通大学. 2007

[收稿日期] 2014-05-03