



大鼠 Walker-256 移植性肺癌模型的建立

黄文革, 李 婕, 陈凤英, 黄河清

(中山大学实验动物中心, 广州 510080)

【摘要】 目的 建立大鼠 Walker-256 移植性肺癌模型, 探讨应用 Walker-256 癌细胞建立大鼠移植性肺癌模型的可行性。**方法** SD 大鼠经尾静脉注射高、中、低三种不同细胞浓度的大鼠 Walker-256 细胞悬液, 观察大鼠的生存时间、体重变化、移植性肺癌模型的成模率, 其他脏器转移情况及病理形态学变化情况。**结果** 注射癌细胞后 14 d, 模型组大鼠均出现体重下降、摄食减少等体征, 与正常对照组比较体重明显降低 ($P < 0.05$); 注射癌细胞后 21 d, 高浓度组大鼠开始出现死亡; 高、中、低三组不同细胞浓度的移植性肺癌成模率分别为 100%、80%、30%, 模型组大鼠肝脏系数和肺脏系数均高于正常对照组。病理结果显示, 模型组大鼠肺部可见明显的癌灶病灶, 而其他脏器未发现明显异常。**结论** 注射高浓度 Walker-256 癌细胞 (3×10^5 个细胞/只) 能成功复制移植性肺癌模型, 为移植性肺癌模型的建立和应用提供实验依据。

【关键词】 大鼠; 移植性肺癌; 模型; walker-256

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0064-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.015

Establishment of a Rat Model of Walker-256 Transplanted Lung Cancer

HUANG Wen-ge, LI Jie, CHEN Feng-ying, HUANG He-qing

(Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of transplanted lung cancer by intravenous injection of tumor cells and evaluate the feasibility of this method. **Methods** Three doses of Walker-256 tumor cells were intravenously injected into the tail vein in rats; the high dose group (1.5×10^6 cells/mL), mid-dose group (0.5×10^5 cells/mL), and low dose group (2.5×10^4 cells/mL), 10 rats in each group. The survival time, body weight, tumor formation rate in the lung and metastasis to other organs in the rats of different groups were observed. The lung and several other organ tissues were examined by histopathology. **Results** Compared with the normal group, the body weight and daily food intake of the rats in model groups were markedly decreased 14 days after the injection of tumor cells. Some rats of the high-dose group began to die at 21 days after the injection of tumor cells. Therefore, at the 21 days after the injection of Walker tumor cells, all rats were sacrificed and organ samples were taken for pathological examination. The tumor formation rate in the rat lungs of the high-dose, mid-dose and low-dose groups were 100%, 80% and 30%, respectively. The liver coefficient and lung coefficient of model groups were much higher than that of the normal group. Pathological examination revealed that tumor nodules occurred in the rat lung tissues of model groups, but no was found in the liver, spleen and other organs. **Conclusions** Intravenous injection of high-dose of Walker-256 cells can be used to establish successfully transplanted lung cancer model in rats, therefore, to provide a useful method for establishment of rat models of lung cancer and serve further

【作者简介】 黄文革 (1966 -), 女, 主管技师; 研究方向: 动物实验与管理; E-mail: huangwg@mail.sysu.edu.cn; 李婕 (1987 -) 女, 实验员; 研究方向: 动物实验与管理; E-mail: celiagz@163.com。

【通讯作者】 黄河清 (1965 -), 男, 博士, 教授, 博士生导师; 研究方向: 中药心血管及糖尿病药理学, 实验动物模型。E-mail: huangheq@mail.sysu.edu.cn。

experimental studies of lung cancer.

【Key words】 Rats; Transplanted lung cancer; model; Walker-256 tumor

肺癌是目前死亡率最高的癌症之一。建立理想的动物肿瘤模型是研究恶性肿瘤发生、发展、转移及疗效评价的重要手段。其中,可移植肿瘤模型因操作简便、易于观察,得到了学者们的广泛认可。Walker-256 是目前广泛认可的大鼠可移植性肿瘤细胞株,植入体内能较好地模拟人类恶性肿瘤的膨胀性和浸润生长方式^[1]。目前,学者们主要应用 Walker-256 细胞植入大鼠支气管^[2],构建原位性肺癌模型。但此造模方法对实验技术要求较高,术后动物死亡率高,在实际应用中成模率低;而采用尾静脉注射建立肺癌移植性模型鲜见报道。本研究采用静脉注射方法建立大鼠 Walker-256 移植性肺癌模型,观察大鼠的成瘤及生存情况,为进一步的肿瘤实验研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠 Walker-256 瘤株,由中山大学实验动物中心细胞库提供;KM 小鼠,4 只,体重 18~22 g,雄性,SPF 级,实验动物质量合格证明号:No. 0084621。SD 大鼠 40 只,体重 60~70 g,雄性,SPF 级,实验动物质量合格证明号:No. 0084696,均购于中山大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2009—0011。动物饲养于标准的屏障环境动物实验室。实验动物设施许可证号:SYXK(粤)2007—0081。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的复苏和腹水的制备:Walker-256 癌细胞常规复苏,置于新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,低速离心,弃上清液,再用培养液配成细胞悬液($1 \times 10^7/\text{mL}$),将细胞悬液接种到 KM 小鼠腹腔中,0.2 mL/只,5~7 d 后出现腹水。

1.2.2 移植性肺癌模型的建立:将 KM 小鼠的 Walker-256 细胞腹水,无菌操作,用 5 mL 一次性注射器(6 号针头)抽出腹水,用生理盐水稀释,用细胞计数器进行计数,再用生理盐水稀释成高、中、低三个浓度(分别为 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$, $0.5 \times 10^5/\text{mL}$, $2.5 \times 10^4/\text{mL}$)备用。取 40 只 SD 大鼠随机分为高、中、低三个模型组和正常对照组,共 4 组,每组 10 只,采用尾静脉注射接种法,模型组大鼠尾静脉注射不同浓度的腹水细胞悬液,0.2 mL/只,正常对照组大鼠尾静脉注射等量的生理盐水,所有动物饲养在屏障环

境动物实验室中。实验期间,动物自由饮食;连续观察 21 d。

1.3 观察指标

1.3.1 大体观察:观察注射腹水细胞悬液后大鼠的毛色、体重、饮食、活动情况;当模型组有动物出现死亡时结束实验观察,采用颈椎脱臼法处死全部大鼠,对大鼠进行常规解剖,肉眼观察肺脏及其他器官的大小、色泽、质地及有无肿瘤结节形成。

1.3.2 取材:称取各组大鼠的肺部、肝脏、脾脏的重量,计算脏器系数(脏器系数 = 器官重量/体重 $\times 100\%$)。

1.4 组织病理学分析

所取的大鼠的肺和可疑脏器,用 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 4~5 μm ,HE 染色,观察病理形态学变化。

1.5 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件包处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的一般情况及体重变化

模型组大鼠注射肿瘤腹水细胞悬液后 7 d 动物饮食、体征正常,14 d 后大鼠出现食量明显减少,活动少,倦怠状,对外界刺激反应迟钝,皮毛松、无光泽,体质消瘦等癌症恶病质体征。注射后 7、12、14 和 21 d,高、中、低三个模型组体重均明显低于正常对照组($P < 0.05$)。注射后 21 d 高浓度模型组大鼠开始出现死亡。各组大鼠不同时间点的体重情况见表 1。

2.2 移植性肺癌模型的成瘤率

注射肿瘤腹水细胞悬液后 21 d,高浓度组动物出现死亡,处死所有实验组大鼠,解剖后肉眼观察发现高浓度模型组全部动物肺部均出现多个肉眼可见的癌结节(10/10),中浓度组则有 8 只(8/10),低浓度组中有 3 只(3/10)出现上述表现,各组移植性肺癌成瘤率见表 2。

2.3 各组大鼠脏器系数

高、中、低浓度组大鼠肺脏系数、肝脏系数高于正常对照组,其中高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$);各浓度组大鼠脾脏系数与正常对照组相比无显著性差异,见表 3。

表 1 各组动物不同时间点的体重情况($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 The body weight of the rats at different time

组别 Groups	不同时间点体重/克 The body weight of the rats at different time/g				
	实验前 Before experiment	7 d	12 d	14 d	21 d
正常组 Normal group	67.9 ± 5.3	111.4 ± 11.8	150.4 ± 9.9	159.7 ± 11.2	182.0 ± 27.6
高浓度 High dosage(3×10^5)	67.3 ± 6.0	87.0 ± 8.5 **	101.5 ± 12.8 **	105.3 ± 14.4 **	122 ± 23.5 **
中浓度 Mid dosage(1×10^5)	65.6 ± 6.5	88.2 ± 9.4 **	105.9 ± 10.9 **	112.0 ± 13.3 **	137.8 ± 15.4 **
低浓度 Low dosage(0.5×10^5)	68.2 ± 4.7	84.6 ± 7.5 **	100.5 ± 11.2 **	101 ± 12.1 **	126 ± 27.2 **

注:与正常对照组相比, ** $P < 0.01$.

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$

表 2 各组动物肺癌成模情况
Tab. 2 The establishment status of lung cancer models in the rats

组别 Groups	动物数	肺癌成模率(%)
	Rat number	Cancer formation rate
正常组 Normal group	10	0
高浓度组 High dosage	10	100
中浓度组 Mid dosage	10	80
低浓度组 Low dosage	10	30

2.4 肺部大体解剖情况

正常组大鼠,常规解剖后肉眼观察,各器官未见异常变化,肺部表面光滑;10只高浓度模型组大鼠,肺部均见有中央型、弥漫性病灶,呈结节状,不规则,结节表面光滑,与周围正常组织边界清楚,质硬,灰白。中、低浓度模型组部分大鼠肺部也可见少数肿块结节。各模型组大鼠肝脏、脾脏等器官均未发现异常(图1)。

表 3 各主要器官脏器系数
Tab. 3 The organ coefficient of the major organs

组别 Groups	各器官的脏器系数(%)		
	肺脏 Lung	肝脏 Liver	脾脏 Spleen
正常组 Normal group	1.03 ± 0.22	4.79 ± 0.68	0.49 ± 0.12
高浓度 High dosage	1.54 ± 0.33 *	6.02 ± 1.72 *	0.55 ± 0.19
中浓度 Mid dosage	1.18 ± 0.59	5.63 ± 0.98	0.51 ± 0.07
低浓度 Low dosage	1.17 ± 0.44	4.84 ± 0.96	0.46 ± 0.17

注:与正常对照组相比, * $P < 0.05$

Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$

2.5 肺部病理学检查

经过 HE 染色,镜下可见高浓度模型组 10 只大鼠(10/10)、中浓度模型组有 8 只大鼠(8/10)、低浓度模型组有 3 只大鼠(3/10)的肺部组织可见不规则的癌巢,肿瘤细胞排列紧密,癌细胞核大,浆少、核分裂相多见、核内染色质粗糙,部分呈空泡状,周围炎症细胞浸润,癌巢形态大小不一(图 2,图 1、2 见彩插 7)。所有模型组大鼠的肝脏和脾脏未见癌细胞转移(图 3、图 4,见彩插 8)。

3 讨论

肺癌疗效得不到提高的主要障碍在于肺癌临床表现复杂,难以早期发现,复制出与人类肺癌发病机制、发展过程相似的动物模型是肿瘤学研究必不可少的手段之一。目前肺癌动物模型的制备方法多采用诱发性、移植性或转基因动物模型。移植性动物模型又可分为原位移植和异位移植,其中异位移植因其方法简便、成模率高而被广泛应用,但该类模型适用于抗癌药物疗效检测,不适合用于肿瘤发生和形成机制的研究。原位移植动物模型被认为是目前比较理想的模型,主要通过将癌细胞直接注射到肺部支气管复制肺癌原位模型^[3,4],该模型能较真实地模拟肺癌患者的临床特征,但手术操作难度较大,动物死亡率高,成瘤率低。

Walker256 肿瘤是大鼠自发性乳腺癌,多移植于 SD 大鼠或 Wistar 大鼠这两种远交系动物中,用于肿瘤学基础研究或细胞传代^[5]。Walker256 也被用于移植性肺癌模型的制作^[6]。

本研究选取 KM 小鼠腹腔注射 Walker256 癌细胞,成功制备了腹水瘤细胞悬液,采用尾静脉注射 Walker256 癌细胞悬液的方法建立大鼠移植性肺癌模型,比较三个不同细胞浓度的肺癌成瘤情况。结果显示,造模 14 d 后,模型组动物出现摄食减少,活动减少,皮毛欠光泽等恶病质体征;造模 21 d 时,注射高浓度 Walker256 癌细胞(3×10^5 个细胞/只)的动物肺部均出现肉眼可见癌结节,成瘤率为 100%,肺脏系数和肝脏系数远远高于正常对照组。HE 结果显示,不同浓度组动物肺部均发现多发性癌灶,但并未出现其他脏器转移,与肺原位接种方法建立的肺癌模型病理结果类似^[7]。在生存状态上,此模型大鼠的症状与临床上癌症病人消瘦、乏力、食欲不振等临床病症类似,为药物的初步筛选提供依据。相比于传统的移植性肺癌造模方法,此造模方法简单可行,成模时间短,成模率高,与肺癌的发

展进程较一致,但肿瘤转移率不高,不能反映晚期癌症病人的临床生物学体征,仍有待进一步的研究。

本研究采用尾静脉注射 Walker-256 细胞成功建立大鼠移植性肺癌模型,可作为肿瘤学可靠的研究手段之一,为肿瘤发病机制及治疗研究奠定实验基础。

参考文献:

- [1] 王红卫,卓忠雄,赵树文. 大鼠 Walker-256 皮下移植瘤模型的建立及其超声评价 [J]. 临床超声医学杂志, 2007, 9 (2):68 - 71.
- [2] Gomes Neto A, Simao AF, Miranda Sde, P, et al. Experimental rat lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation [J]. Acta Cir Bras, 2008, 23(1):84 - 92.
- [3] Kondo K, Fujino H, Miyoshi T, et al. Orthotopically implanted

SCID mouse model of human lung cancer suitable for investigating metastatic potential and anticancer drug effects [J]. Oncol Rep, 2004, 12(5):991 - 999.

- [4] Wang HY, Ross HM, Ng B, et al. Establishment of an experimental intrapulmonary tumor nodule model [J]. Ann Thorac Surg, 1997, 64(1):216 - 219.
- [5] 姚明,杨建平,王丽娜,等. 腹水传代和体外培养 Walker256 癌细胞系建立大鼠骨癌模型可行性 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(13):880 - 889.
- [6] 彭永海,李琦,刘庆,等. 大鼠肝包膜下接种 Walker-256 瘤株肺转移的观察 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 10(23):1084 - 1122.
- [7] 刘馨,伍治平,左曙光,等. 小鼠 Lewis 肺癌原位模型的构建 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 1(1):42 - 47.

[修回日期]2012-02-15

(上接第 63 页)

- [10] Howard RB, Mullen JB, Pagura ME, et al. Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat [J]. Clin Exp Metastasis, 1999, 17:157 - 162.
- [11] 徐彩菊,姚亚萍,孟佳,等. S180 荷瘤小鼠血液中指标的变化 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17: 2033 - 2035.
- [12] 李建鹏,朱图志,巩克亭,等. 顺铂为基础的联合化疗对非小细胞肺癌患者血糖影响的临床观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(23):1878 - 1880.
- [13] 张奉梅,龚继勇,龚继梅,等. 加味当归补血汤对荷瘤小鼠血液流变学及免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010,

21(9):2247 - 2248.

- [14] 周雪瑞,黄选东. 免疫缺陷动物裸鼠 [J]. 生物学教学. 2007, 32(3):2 - 4.
- [15] Velthuis J H, de Bont HJ, Medema JP, et al. Interleukin-2 activated NK cells do not use the CD95L-and TRAIL-pathways in the rapid induction of apoptosis of rat colon carcinoma CC531s cells [J]. Immunobiology, 2003, 207 (2): 115 - 127.
- [16] 李帅,王小平. 肿瘤细胞疫苗研究进展 [J]. 现代肿瘤医学. 2010, 18:618 - 620.

[修回日期]2012-02-20