

两种小鼠结肠癌肝转移造模方法的比较

杨 扬¹, 李乃卿², 李兰芳³, 邢光明⁴, 贾立群⁵, 周成帆², 丁治国², 田 明², 宁小晶²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京 100700;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 大连医科大学第二附属医院, 辽宁 大连 116027;
5. 卫生部中日友好医院肿瘤科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 寻求最佳的小鼠结肠癌肝转移模型为基因表达谱检测提供足够组织量。方法: 选用 BALB/C 小鼠, 采用脾脏注射切脾法和脾脏注射保脾法 2 种方法制造结肠癌肝转移模型, 比较小鼠肝转移情况。结果: 2 组肝转移率均为 100%, 但保脾组转移瘤较小无法满足较大组织量的需要。结论: 脾脏注射切脾法制造小鼠结肠癌肝转移模型是基因表达谱检测取材的最佳造模方法。

[关键词] BALB/C 小鼠; 动物模型; 结肠癌肝转移模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)04-0053-03

随着分子生物学的深入研究, 基因芯片作为基因组及后基因组时代的主要研究技术, 已成为揭示中药作用机理的重要方法。基因芯片检测技术的前提是成功而适用的动物模型, 首先需要获得足够的 RNA 检测量, 所以成功的造模方法是研究课题成败的关键所在。下面就我们近期进行的结肠癌肝转移的造模方法总结如下:

1 材料

1.1 实验动物 小鼠为(4~6)周龄体重(20~24)g 的雄性 BALB/C 小鼠(由北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 在 II 级动物实验室饲养。

1.2 瘤株 小鼠结肠癌 C26 细胞株(美国引进, 广安门医院肿瘤实验室惠赠)。经 3 次皮下接种传代后, 无菌条件下摘取瘤体, 生理盐水洗涤, 剪成小块, 匀浆, 离心后取沉淀, 反复 3 次, 培养于 10% 新生牛血清和 RPMI 1640 培养液(含青霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$), 置 37°C 、含 5% CO_2 培养箱中 3 d,

[收稿日期] 2007-11-15

[通讯作者] * 杨 扬, Tel: 13164221950; E-mail: yy4dr@126.com

每日换液。将细胞液机械吹打成单个细胞,离心取沉淀,加生理盐水调整细胞浓度为 $6 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,观察细胞活力 > 95%,备用。

2 方法

2.1 分组 造模小鼠共 80 只,随机分为 2 组,1 组 41 只,为保脾组,2 组 39 只,为切脾组。

2.2 造模方法

2.2.1 脾脏注射切脾法 小鼠称重,采用 0.5% 的戊巴比妥钠, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,腹腔内注射麻醉, (3~ 5) min 麻醉成功后,用胶布固定小鼠于手术台上。安尔碘皮肤消毒,左侧腋后线肋缘下纵行切口,长约 (0.5~ 1) cm,进腹后于腹外侧找到柳叶状脾脏,牵出腹腔外,用 1 mL 注射器从脾下极进针,将瘤细胞液 0.2 mL 注射于脾内,拔针后,酒精棉球按压针眼,轻轻按揉脾脏 5 min,使瘤细胞经脾静脉进入肝脏,注射区苍白隆起消失后,结扎脾血管及胃短动静脉,切除脾脏,查无出血,依次间断缝合肌肉、皮肤,关腹。术后继续在 II 级动物实验室饲养。

2.2.2 脾脏注射保脾法 造模方法基本同切脾法,拔出针头后酒精棉球压迫注射部位 (1~ 2) min,0 号丝线逐层关腹。

2.3 统计学方法 实验数据采用[中国医学百科全书·医学统计学]统计软件包 PEMS3.1 进行数据分

析。

2.4 观察指标 小鼠体重、活动情况、生存期。中间自然死亡者,进行剖腹观察腹腔肿瘤生长情况以及肝转移程度。于造模后第 12 d 和第 15 d 两个时间点,脱颈椎处死小鼠。第 12 d 处死 23 只,其中 2 组 8 只,1 组 15 只。第 15 d 处死小鼠 22 只,其中 2 组 10 只,1 组 12 只。

3 结果

BALB/C 小鼠经脾注射瘤细胞液后,8 d 内活跃如常,形体无改变,8 d 后开始消瘦,精神差,行动渐迟缓,摄食量下降,腹部渐膨隆。自然死亡 35 只,生存时间 (9~ 15) d,平均 (12.49 ± 0.93) d。尸检 2 组 21 只,肝脏均有较多转移灶,转移率为 100%;1 组 14 只,肝转移率为 100%。

造模后 12 d,15 d 两次处死小鼠共 45 只。两组均有转移瘤,转移率为 100%。2 组 18 只,小鼠肝各叶皆布满大小不一的瘤结节,最大者 (1.34×0.87) cm,基本无正常肝脏组织存在;1 组 27 只,肝内转移灶明显较少,可见散在针尖及米粒大小的白色结节,多数用游标卡尺无法计量大小,肝脏形态变化不大。血性腹水 2 组为 11 只,发生率为 61.1% (11/18);1 组 4 只,发生率为 14.81% (4/27)。详见表 1。

表 1 BALB/C 小鼠结肠癌 C26 细胞株经脾注射肝内转移情况(处死小鼠)

组别		切脾组									
编号		1	5	11	12	15	14	3	4		
时间点 1 (造模后 12 d)	肝内转移情况	满布	多发	全肝无正常组织	全肝无正常组织	满布	全肝无正常组织	全肝无正常组织	全肝无正常组织		
	瘤最大者重量(g)	0.2	0.01	5.42	5.24	2.5	3.79	3.87	3.9		
	长径×横径(mm)	0.90× 0.80	0.47× 0.42	0.80× 0.70	-	0.90× 1.10	-	-	-		
	血性腹水	有	无	有	无	无	无	有	有		
编号		2	13	6	10	16	7	8	9	25	19
时间点 2 (造模后 15 d)	肝内转移情况	全肝弥漫转移	广泛转移	全肝弥漫转移	全肝弥漫转移	全肝弥漫转移	全肝无正常组织	全肝弥漫转移	广泛转移	全肝无正常组织	全肝无正常组织
	瘤最大者重量(g)	2.31	2.98	3.43	2.44	2.01	5.2	2.03	0.06	2.98	2.47
	长径×横径(mm)	-	-	-	1.20× 0.75	0.77× 0.75	-	1.34× 0.87	0.54× 0.49	-	-
	血性腹水	有	有	有	有	有	有	无	无	无	有

组别		未切脾组															
时间点 1 (造模后 12 d)	编号	2	3	5	1	12	6	11	4	7	10	13	14	15	17	19	
	肝内转移情况	米粒大, 少量散在	米粒大, 散在	米粒大, 少量散在	米粒大, 少量散在	米粒大, 散在	米粒大, 少量散在	米粒大, 散在	米粒大, 单发	米粒大, 少量散在	米粒大, 少量散在	米粒大, 少量散在	米粒大, 单发	米粒大, 单发	米粒大, 少量散在	米粒大, 散在	
	瘤最大者重量(g)	-	0.02	-	-	0.06	-	0.01	-	0.01	-	-	-	-	-	-	
	长径×横径 (mm)	0.41×0.26	0.55×0.5	0.37×0.25	0.35×0.3	0.79×0.39	0.23×0.17	0.42×0.40	0.30×0.30	0.38×0.42	0.17×0.13	0.47×0.33	0.20×0.11	0.18×0.12	0.32×0.32	0.43×0.32	
	血性腹水	无	无	无	无	无	无	无	有	无	无	无	无	有	无	无	
时间点 2 (造模后 15 d)	编号	9	16	18	24	25	27	8	20	23	26	21	22				
	肝内转移情况	大量散在	少量散在	散在	散在	散在	散在	散在	大量散在	大量散在	少量散在	少量散在	散在				
	瘤最大者重量(g)	0.09	-	-	-	0.03	-	0.05	0.04	0.07	0.03	-	0.11				
	长径×横径 (mm)	0.70×0.54	0.20×0.20	0.47×0.43	0.44×0.47	0.50×0.34	0.20×0.20	0.67×0.51	0.55×0.46	0.80×0.50	0.50×0.42	0.20×0.20	0.66×0.53				
	血性腹水	无	无	有	无	无	无	无	无	无	有	无	无				

4 讨论

4.1 结肠癌肝转移模型的优点 尸检报道^[1], 大肠癌(结、直肠癌)死亡的患者, 约 60%~70% 存在肝转移, 针对大肠癌具有较高肝转移的特点, 提出了行大肠癌肝转移的动物造模。

结肠癌肝转移模型的建立为研究大肠癌肝转移的生物学行为、癌细胞的异质性、肿瘤转移机理以及抗癌药物的筛选提供了重要的基础试验方法。我们体会脾脏切除法建立肝转移模型的优点在于: ①更好地模拟了大肠癌根治术后血行转移肝脏的途径和过程; ②此模型肝转移高达 100%; ③肝转移为弥漫性各叶转移, 结节最大直径达 1.34 cm, 能满足各种检测方法取材的需要, 尤其基因芯片取材时需要近 500 mg 组织; ④在切断脾蒂前已将脾脏完全显露, 便于脾下极进针注射瘤细胞液及结扎脾蒂切脾, 不易引起脾脏大出血; ⑤肝转移癌的组织学特点、超微结构的生物学行为与结肠癌大体一致, 且保持了 CEA(癌胚抗原)的诸多特点。

4.2 小鼠自然生存期 不同癌株和不同的接种方法, BALB/C 小鼠的生存时间是截然不同的。

邱红明组^[2]以脾脏注射保脾法用人大肠癌 HT-29 瘤株为 8 只小鼠造模, 待小鼠自然死亡, 生存期为(30~35) d, 平均为(32±2.1) d; 许勤组^[3]以脾脏注射保脾法用小鼠结肠癌 C26 瘤株为 18 只小鼠造模, 待小鼠自然死亡, 生存期为(15~21) d, 平均为(18.2±1.8) d; 左国华组^[4]以脾脏注射切脾法用人大肠癌 HCC 瘤株为 8 只小鼠造模, 待 20 d 处死小鼠; 笔者以脾脏注射保脾法用小鼠结肠癌 C26 瘤株为 41 只小

鼠造模, 生存期为(9~15) d, 平均为(11.64±1.49) d, 其中 27 只为处死; 笔者以脾脏注射切脾法用小鼠结肠癌 C26 瘤株为 39 只小鼠造模, 生存期为(11~15) d, 平均为(13.05±0.71) d, 其中 18 只为处死。

4.3 实验方法的选用原则 本实验方法较好的模拟了大肠癌根治术后血行肝转移的过程, 支持肿瘤细胞转移具有器官特异性的观点。但在实验选用造模方法和细胞瘤株时, 应特别注意小鼠的自然生存期, 脾脏注射后保留脾脏时, 脾脏转移较肝内明显加快, 动物因脾瘤自然生存期较短, 平均约 11.64 d 左右, 不适用于验证周期较长的药物实验, 对于基因芯片检测的多时间点也应合理选择。人的大肠癌 HT-29 细胞株和 HCC 细胞株, 小鼠的自然生存期均可达到 30 d 以上, 较适合抗癌药的筛选试验。

选择结肠癌肝转移的造模方法, 应以经脾注射后切除脾脏的方法最佳, 这是一种可靠而稳定的动物模型, 适用于化疗药物的筛选, 大肠癌肝转移的免疫治疗及腹腔灌注化疗等试验研究。

[参考文献]

[1] Cady B, Stone MD. The role of surgical resection of liver metastases in colorectal carcinoma [J]. *Seminars Oncol*, 1991, 18: 399-406.
 [2] 邱红明, 杨学皆, 邓永键, 等. 实验性人大肠癌裸鼠肝转移模型的建立[J]. *第一军医大学学报*, 1996, (16) 4: 319-320.
 [3] 许勤, 吴文溪, 马利民, 等. 小鼠结肠腺癌肝转移模型的建立[J]. *实用癌症杂志*, 2000, (15) 9: 456-457.
 [4] 左国华, 葛海燕. 人结肠癌裸小鼠肝转移模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 1999, (16) 4: 373.