

胰腺癌裸鼠皮下异种移植动物模型建立研究*

于春波 孙 鹏 张小伟 于书红 董志伟

(河北省承德市丰宁县医院 河北 承德 068350)

摘要 目的: 用人体胰腺癌细胞株, 建立小鼠胰腺癌细胞株 (pGHAM-1) 移植性胰腺癌模型, 并研究其生物学特性。方法: 将 pGHAM-1 细胞培养后配成 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 取 0.2 mL 接种于小鼠皮下。于接种后 20、30、40 天观察肿瘤的生长、转移及腹水量。接种 40 天后处死动物, 解剖取出移植瘤, 用游标卡尺测量肿瘤大小, 再进行 HE 染色的组织病理学检查, 免疫组织化学检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)及肿瘤转移相关蛋白(nm23-H1)的表达。结果: 分别于 20、30、40 天测量肿瘤体积为 $84.1 \pm 21.9 \text{ mm}^3$, $413.7 \pm 208.4 \text{ mm}^3$, $2187.3 \pm 1882.8 \text{ mm}^3$, 后者与 10 d 前比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。HE 染色结果显示肿瘤组织呈条索状或小梁状排列, 肿瘤组织与正常组织交界处有少量淋巴细胞浸润, 肿瘤组织中血管生成罕见。免疫组织结果显示 VEGF 和 nm23-H1 蛋白在肿瘤组织中均呈阴性表达。结论: 异位裸鼠人胰腺癌移植瘤模型易复制, 时间短, 成功率高, 为胰腺癌体内研究提供了理想的动物模型。

关键词 胰腺癌; 裸鼠; 异种移植; 动物模型

中图分类号: Q95-33 R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)09-1648-03

The Animal Model Study of Pancreatic Cancer Xenograft in Nude Mice*

YU Chun-bo, SUN Peng, ZHANG Xiao-wei, YU Shu-hong, DONG Zhi-wei

(Fengning County Hospital, Hebei, Chengde, 068350)

ABSTRACT Objective: To establish heterotopic model with pancreatic cancer cell lines (pGHAM-1) in nude mice, and study their biological characteristics. **Methods:** The tumor cell lines (pGHAM-1) were cultured, and cell suspension of $1 \times 10^7/\text{ml}$ cells in 0.2 ml RPMI1640 was injected into the subcutaneous dorsa along the proximal midline in the mice. Detected the tumor growth, metastasis and ascites at 20, 30, 40 days after inoculation. Animals were killed and remove the tumor anatomy on day 40. Tumor size was measured with a caliper, then HE staining of histological examination, and immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor metastasis-associated protein (nm23-H1) expression. **Results:** The tumors volume were $84.1 \pm 21.9 \text{ mm}^3$, $413.7 \pm 208.4 \text{ mm}^3$, $2187.3 \pm 1882.8 \text{ mm}^3$ after 20, 30, 40 days, respectively, suggesting that there was were significant statistically between that and 10d before ($P < 0.01$). The results of HE staining showed that tumor tissue showed cord-like or trabecular arrangement of tumor tissue and normal tissue at the junction of a small amount of lymphocytic infiltration, and tumor angiogenesis is rare. The results of immunohistochemistry showed that VEGF and nm23-H1 protein expression in tumor tissue were negative. **Conclusions:** Establishment of heterotopic model with pancreatic cancer in nude mice was relatively easy, quickly, and especially with high successful rate. So it can be considered as an ideal animal model for study on pancreatic cancer in vivo.

Key words: Pancreatic cancer; Nude mouse; Xenografts; Animal model

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1648-03

胰腺癌是一种恶性程度较高、预后较差的恶性肿瘤, 其死亡率位于癌症死亡前列, 平均 5 年生存率低于 5%^[1]。而且其临床表现无特异性, 早期诊断及手术治疗困难^[2,3]。临床上很难获得新鲜的、不同时期的胰腺癌组织标本, 从而不可能在临床上观察其发生发展过程。随着裸鼠移植瘤细胞系的建立, 通过建立胰腺癌实验动物模型, 可为深入研究胰腺癌的发生发展以及浸润转移的机制奠定基础^[4-6]。

1 材料和方法

1.1 材料

裸鼠, 体重 60-80g, 由承德市附属医院实验动物基地提供

(合格证号: 2003-0003); 人体胰腺癌细胞株(pGHAM-1)由南京市第一医院提供; DMEM 培养液、胎牛血清为美国 Gibco 公司产品; 青霉素、链霉素为 Sigma 公司产品; 抗大鼠血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆抗体(即用型), 批号: 090100, 抗大鼠 nm23-H1 多克隆抗体(即用型), 批号: 090100, 均为武汉博士德生物技术有限公司产品; TIKON TKY-TYS 生物组织自动脱水机, TIKON TKY-BMA 电镜生物组织包埋机, 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; Shandon Finesse® 325 石蜡切片机, 英国 Shandon(珊顿)公司。

1.2 方法

1.2.1 人体胰腺癌细胞株 (pGHAM-1) 移植性胰腺癌模型制作

* 基金项目 河北省承德市科技局资助(201021091)

作者简介: 于春波(1975-), 主管技师, E-mail: yuchunbo617@126.com, 电话: 18603143620

(收稿日期: 2011-08-15 接受日期: 2011-09-20)

将人体胰腺癌细胞株(pGHAM-1)培养后配成 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 取 0.2 mL 接种于裸鼠皮下, 4wk 后成瘤。分别于 20、30、40 天用游标卡尺测量肿瘤大小。根据公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积[V = 肿瘤体积, a = 瘤体最长径, b = 瘤体最短径]^[7]。肉眼观察肿瘤的转移与腹水产生情况。

1.2.3 病理学观察 接种 40 天后处死动物, 解剖取出移植瘤, 取材用 100 g/L 中性甲醛固定, 病理解剖检查肿瘤外观及内部切面, 用石蜡包埋切片, HE 染色, 进行组织病理学观察。

1.2.4 VEGF 及肿瘤转移相关蛋白 nm23-H1 的免疫组织化学检测 免疫组化测定采用迈新 Maxvision 快捷型检测法。切片常规脱蜡、水化, 高温柠檬酸盐修复, 去除内源性过氧化物酶, 以山羊血清封闭 10 min, 加入稀释的一抗, 4℃ 过夜;

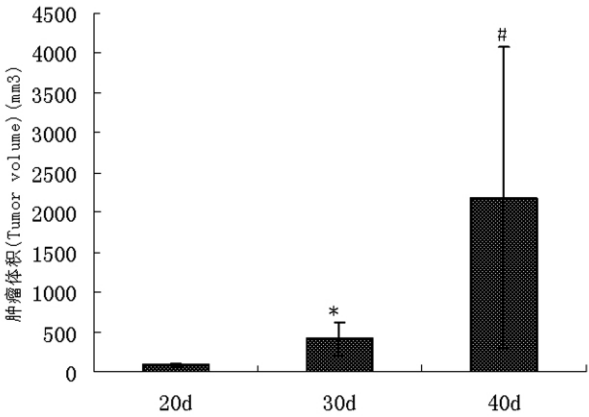
依次滴加快捷型酶标羊抗鼠 / 兔 IgG 聚合物, DAB 显色、苏木精轻度复染, 脱水、透明、封片, 在高倍镜($\times 400$)下计数阳性细胞数目及染色强度比较。

2 结果

2.1 移植瘤体积变化监测

接种后第 20、30、40 天, 测量肿瘤体积分别为 $84.1 \pm 21.9 \text{ mm}^3$, $413.7 \pm 208.4 \text{ mm}^3$, $2187.3 \pm 1882.8 \text{ mm}^3$ 。结果显示后者与 10 d 前比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。解剖结果发现其中有 3 只荷瘤裸鼠的肿瘤内出现液化灶且面积增大, 同时伴有血性腹水。

2.2 病理学检查



注: 与 20d 比较 * $P < 0.01$; 与 30d 比较 # $P < 0.01$

Note: Compared with 20d * $P < 0.01$; Compared with 30d # $P < 0.01$

图 1 肿瘤体积变化(mm^3)

Figure 1 Changes in tumor volume (mm^3)

肿瘤外观呈扁卵圆形或近似圆形, 境界清楚; 切开肿瘤, 3 只裸鼠胰腺瘤中可见液化坏死灶。HE 染色的组织切片镜下所见: 为低分化胰腺癌, 肿瘤组织呈条索状或小梁状排列, 肿瘤组织与正常组织交界处有少量淋巴细胞浸润, 肿瘤组织中血管生成罕见。

2.3 VEGF 及肿瘤转移相关蛋白 nm23-H1 的表达

免疫组织化学法检测肿瘤组织中 VEGF 和 nm23-H1 的表达, 结果显示 VEGF 和 nm23-H1 蛋白在肿瘤组织中均呈阴性表达(见图 2)。

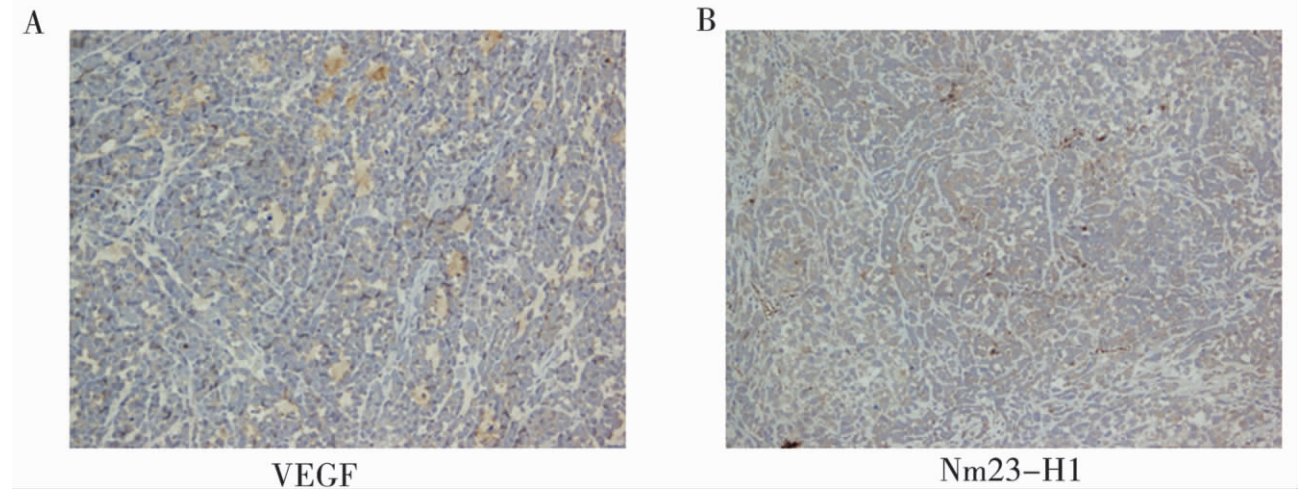


图 2 肿瘤组织中 VEGF 及 nm23-H1 蛋白的表达($\times 200$)

Figure 2 Expression of VEGF and Nm23-H1 Protein in tumor($\times 200$)

3 讨论

由于裸鼠在形态学、生物学及免疫学等方面与人有许多相似之处, 目前研究显示其可用于人类心血管疾病、原虫感染、病毒感染以及肿瘤等多种疾病的动物模型制作^[8-10]。研究表明裸鼠对移植瘤的接受性较强, 对可以诱发肿瘤的病毒也很敏感, 并可以移植某些同源正常组织细胞或者肿瘤细胞, 从而具有较广的应用范围^[11-13]。毛庭枝等应用裸鼠 pGHAM-1 细胞株建立

了裸鼠移植性肝癌模型^[14]。本研究在此基础上建立裸鼠移植性胰腺癌模型, 并研究该模型的生长规律与 VEGF、肿瘤转移相关蛋白表达等生物学特性的关系。通过游标卡尺定期检测移植瘤体积结果分析可见, 移植瘤从第 20 天开始, 每 10 d 分别以 4.9 和 5.3 倍的速度生长。解剖结果发现其中有 3 只荷瘤裸鼠的肿瘤内出现液化灶且面积增大, 同时伴有血性腹水。免疫组化结果表明在移植瘤中 VEGF 呈阴性表达, 提示该胰腺癌模型肿瘤转移性较弱。免疫组织化学结果表明在移植瘤中

nm23-H1 亦呈阴性表达,分析可能是因为 nm23-H1 基因并非在所有肿瘤中都发挥转移抑制作用。

通过本实验的分析,总结建立胰腺癌模型成功的关键因素存在以下几点: (1)裸鼠的选择 根据我们预实验结果提示,裸鼠应选择 3-4 wk,体重为 60-80 g。裸鼠太小,存活率降低,而裸鼠太大,免疫功能与排异反应较强,成瘤率偏低^[15]。(2)移植瘤细胞的选择:胰腺癌细胞株(pGHAM1)培养后用不含血清的培养基配成 $1 \times 10^7/\text{ml}$,取 0.2mL 接种于裸鼠皮下 4 wk 后成瘤。该模型成瘤率较高,可为胰腺癌的治疗研究提供了一个新的平台,为人类攻克胰腺癌提供新的途径。

参考文献(References)

- [1] 王春友,赵刚.胰腺癌实验研究的现状与展望[J].中华实验外科杂志, 2004 21(8):903
Chunyou Wang, Zhao Gang. Status and Prospects of experimental study in pancreatic [J]. Journal of Experimental Surgery, 2004 21 (8): 903
- [2] McKenna S, Eatock M. The medical management of pancreatic cancer [J]. Oncologist, 2003,8(2):149-160
- [3] Earle CC, Agboola O, Maroun J, et al. Cancer care ontario practice guidelines initiative's gastrointestinal cancer disease site group. The treatment of locally advanced pancreatic cancer: a practice guideline [J]. Can J Gastroenterol, 2003,17(3):161-167
- [4] Haller DG. Future directions in the treatment of pancreatic cancer[J]. Semin Oncol, 2002,29(6):31-39
- [5] Cattell E, Arance A, Middleton M. Assessing outcomes in palliative chemotherapy [J]. Expert Opin Pharmacother, 2002,3(6):693-700
- [6] 叶燕丽,周昕熙,王莲桂.裸小鼠的繁殖及在肿瘤学中的应用[J].实验动物科学与管理,2005,22:6-8
Yanli Ye, Xin-Xi Zhou, Liangui Wang. The application in oncology and breeding of nude mice [J]. Laboratory Animal Science and Management, 2005,22:6-8
- [7] 宋红,包素珍,郑小伟,王颖,张勇军.血管内皮细胞生长因子在 Lewis 肺癌组织中表达的意义及十全大补汤对其干预作用 [J]. 中华中医药杂志,2008, 23:684-687
Song Hong, Bao Su-zhen, Zheng Xiao-wei, Wang Ying, Zhang Yong-jun. Vascular endothelial growth factor expression in Lewis lung carcinoma and the intervention role of SDT [J]. Chinese Medical Journal, 2008, 23: 684-687
- [8] 于勇.小鼠肿瘤模型及其在胰腺癌治疗研究中的应用[J].肿瘤研究与临床,2003,15(2):139-143
Yu Yong. Mouse tumor model and its application in pancreatic cancer therapy[J]. Research and Clinical Oncology, 2003,15 (2):139-143
- [9] 高进,李敏民.中国人类恶性肿瘤在免疫缺陷动物体内的模型建立及现存问题[J].中华肿瘤杂志,1999,21:69-72
Gao Jin, Li Min-min. Chinese human malignant tumors in immuno-compromised animals model building and the existing problems [J]. Journal of Oncology, 1999, 21: 69-72
- [10] Celinski SA, Fisher WE, Amaya F, et al. Somatostatin receptor gene transfer inhibits established pancreatic cancer xenografts. J Surg Res, 2003,15(1):41-47
- [11] Jia L, Zhang MH, Yuan SZ, et al. Antiangiogenic therapy for human pancreatic carcinoma xenografts in nude mice [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(3):447-450
- [12] Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, et al. A novel "patient-like" treatment model of human pancreatic cancer constructed using orthotopic transplantation of histologically intact human tumor tissue in nude mice[J].Cancer Res,1993,53(13):3070-3072
- [13] 刘秋珍,脱朝伟,张龙石.人胰腺癌裸小鼠胰腺内原位移植模型的建立及其生物学特性的研究[J].中华肿瘤杂志,1992,14:403
Qiuzhen Liu, Chaowei Tuo, Longshi Zhang. Human pancreatic cancer nude mouse orthotopic pancreas transplantation model and its biological characteristics[J]. Chinese Journal of Cancer,1992,14:403
- [14] 毛庭枝,周巧灵,梁荣感,等.裸鼠胰腺癌细胞株移植性肝癌模型的建立[J].世界华人消化杂志,2009,17(18): 1827-1831
Tingzhi Mao, Qiaoling Zhou, Ronggan Liang, et al. Pancreatic cancer cell lines in nude mice transplanted liver cancer model [J]. World Journal of Gastroenterology, 2009,17 (18): 1827-1831
- [15] Mohammad RM, Dugan MC, Mohamed AN, et al. Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents [J]. Pancreas, 1998, 16:19-25