

人卵巢癌高转移细胞株裸鼠原位移植瘤模型

张 骄, 于廷和

重庆医科大学生物医学工程系, 重庆 400016

摘要 卵巢癌仍是病死率最高的妇科恶性肿瘤。理想的动物模型对于卵巢癌生物学行为及治疗方法的探索等方面均有重要作用。肿瘤原位模型因具有相对较高的仿真性而成为动物实验研究的首选。本研究选用人卵巢癌高转移细胞株 HO-8910PM 作为成瘤细胞, 拟建立裸鼠卵巢癌原位移植瘤模型, 并对相关生物学特性进行研究。首先, 将 HO-8910PM 细胞 (细胞数约 2×10^6) 注射到雌性裸鼠皮下。待皮下成瘤后再通过显微外科手术将瘤体小块转移到其他裸鼠卵巢内, 追踪观察原位肿瘤的生长和体内的转移情况, 在荷瘤鼠处于濒死状态时将其处死, 取原位和转移病灶处的肿瘤组织做光镜及电镜的病理检查。共 14 只裸鼠接受了原位移植手术, 经追踪观察, 有 8 只原位成瘤, 成功率为 57.14%。通过尸检发现有 5 只荷瘤鼠出现了远处器官的转移 (转移率为 83.33%), 转移器官为肺、肝脏、膈肌、胃表面、肠管表面、胰脏、后腹膜、对侧卵巢、髂窝淋巴结等处, 以膈肌和肝脏较为普遍。本研究成功地建立了裸鼠原位移植瘤模型, 其生物学特性在某种程度上与人类卵巢癌更为相似, 为卵巢肿瘤的研究提供了一种理想的动物模型。

关键词 卵巢癌; 原位移植; 裸鼠

中图分类号 R73

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)12-0032-04

An Orthotopic Ovarian Carcinoma Model with Metastasis in Nude Mice

ZHANG Jiao, YU Tinghe

Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Ovarian cancers are the leading cause of death among gynecologic tumors. Animal models are necessary for experimental cancer research and play an important role in the development of diagnostic and therapeutic modalities. The improvement of animal models to better simulate the conditions in patients is important for its role in the treatment for ovarian cancers. Orthotopic implantation is an attractive technique. Unlike heterotopic implantation, it allows a more accurate expression of the biologic nature of a human tumor, including growth, morphology and metastasis. The aim of the present study was to establish an orthotopic ovarian cancer model with high metastasis in nude mice. Human ovarian carcinoma cells HO-8910PM, a subline with highly metastatic potential, were inoculated subcutaneously in female nude mice to form solid tumors. The exuberantly growing tumor were removed, sliced and introduced into ovaries of other nude mice by microsurgical techniques. The growth and metastasis of the orthotopic lesion were followed, and pathological examinations were performed. Ovarian cancers formed in animals with an incidence of 57.14%. Metastatic lesions were detected in the lung, diaphragm, liver, stomach, intestine, pancreas, peritoneum, contralateral ovary and lymph nodes located in the iliac fossa, with an occurrence rate of 83.33% in animals. Transplanting tissues into the ovary of a nude mouse can form an orthotopic cancer model, and the manner how cancer spreads was similar to that of human lesions, which offers a remarkable model to explore ovarian cancers.

Keywords nude mouse; ovarian cancer; orthotopic transplantation

0 引言

目前, 裸鼠已成为研究人类肿瘤的理想动物模型和进行各项实验研究的重要工具^[1]。人肿瘤原位移植瘤模型可以客观地再现人类肿瘤的临床发展过程, 自然模拟肿瘤在人体内

的浸润和转移过程, 现已成为肿瘤移植模型的首选^[2]。囿于操作技术难度的限制, 构建人卵巢癌裸鼠原位移植瘤模型在国内少有成功。本实验选用人卵巢癌高转移细胞株 HO-8910PM 成功构建了人卵巢癌裸鼠原位移植瘤模型。

收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (10774198)

作者简介: 张骄, 硕士研究生, 研究方向为妇产科学、生物医学工程, 电子信箱: chongyizhangjiao@gmail.com; 于廷和 (通信作者), 研究员, 研究方向为肿瘤学、妇产科学、生物医学工程等, 电子信箱: tingheyu@163.com

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

裸鼠购自第三军医大学实验动物中心, 鼠龄 4~8 周, 体重 16~20g, 雌性。在重庆医科大学实验动物中心无特殊病原体(SPF)条件下饲养。

HO-8910PM 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 医用生物蛋白胶购自广州倍绣生物技术有限公司(主要成分为纤维蛋白原与凝血酶)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HO-8910PM 细胞培养于 RPMI 1640 完全培养基(10%热灭活胎牛血清), 100U/mL 青霉素, 100U/mL 链霉素, 置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养, 约每隔 3~4d 用 0.1%胰蛋白酶溶液消化传代。待处于对数生长期时将细胞经胰蛋白酶消化、离心收集、计数后重悬于无血清 RPMI 1640 培养基中, 配制成 1×10⁷ 浓度的肿瘤细胞悬液, 备用。

1.2.2 裸鼠皮下移植瘤的建立

取裸鼠 2 只, 于肩胛区皮下注射 1×10⁷ 浓度的 HO-8910PM 胞悬液 0.2mL (约含细胞数为 2×10⁶), 注射后每天观察瘤体生长情况。如接种成功, 可于 4 周后观察到皮下瘤长出并逐渐增大。

1.2.3 裸鼠原位移植瘤的建立

取 1 只皮下移植瘤构建成功的裸鼠, 以戊巴比妥钠 (40mg/kg 体重) 麻醉成功后将瘤体取出, 选择活力好的瘤组织浸入 4℃ 的无菌生理盐水中漂洗, 并切成 1mm×1mm×1mm 大小的组织块待用。取待原位移植裸鼠, 麻醉成功后, 以左(或右)侧卧位固定, 在肋骨与股骨之间的空虚部位靠近脊椎骨约 0.8cm 处做平行于脊椎的纵切口, 长约 1cm, 暴露腹腔, 可见切口下方为裸鼠右(或左)侧肾脏, 肾周可见一直径约为 0.5cm 的脂肪团块, 用眼科镊小心将脂肪团块牵出腹腔, 则右侧子宫输卵管和右侧卵巢亦被随之牵出。转解剖显微镜下操作, 镜下观察裸鼠输卵管呈粉红色外观, 迂曲盘绕在子宫的外上方, 靠近卵巢, 卵巢呈淡红色外观, 椭圆形, 表面可见澄清透亮的卵泡。以镊子夹住上述脂肪团块, 借以固定输卵管及卵巢的位置, 以眼科手术剪刀小心剪开卵巢皮质, 见有血

液流出, 取上述已准备好的皮下瘤组织小块, 塞入卵巢破口深处, 表面滴注少许医用生物蛋白胶固定, 等待 1min, 待蛋白胶凝固后, 查无活动性出血, 将右侧子宫及附件还纳入腹, 关腹。待麻醉清醒后置回鼠笼继续饲养。

1.2.4 裸鼠原位移植瘤模型的术后观察

术后, 每 3d 为一个周期, 观察原位移植裸鼠的生存状况, 记录身长、体重、腹围, 触诊腹部的肿瘤生长状况, 用游标卡尺测量肿瘤的大小, 待荷瘤鼠消耗至濒死状态时处死后立即行尸体解剖, 观察卵巢原位的肿瘤生长情况和转移状况, 进行病理检查。光镜取材后尽快固定于 10% 的中性福尔马林溶液中, 待脱水后石蜡包埋切片 (5μm), 用苏木精伊红染色后置于光镜下观察。电镜取材后 1min 内固定于 2.5% 的戊二醛溶液 (含 1% 四氧化锇), 以环氧树脂包埋后行超薄切片, 乙酸铀酰及柠檬酸铅染色后置于透射电镜下观察。

2 结果

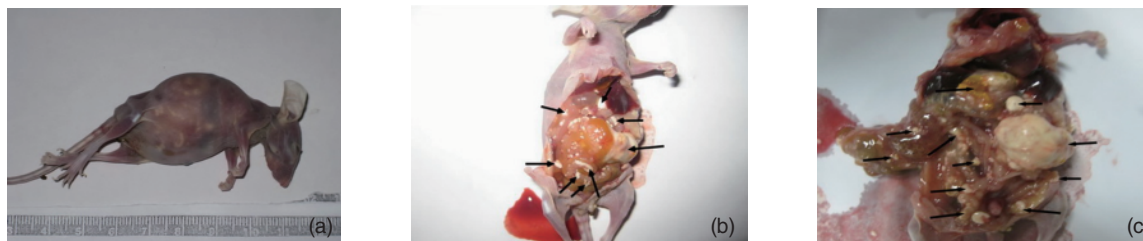
2.1 肿瘤原位移植的生长及远处转移情况

共有 14 只裸鼠接受了卵巢原位的皮下瘤块移植手术, 经过追踪观察, 8 只裸鼠在原位成瘤成功, 成瘤率为 57.14%。术后 4 周, 可在裸鼠下腹部触及肿物团块, 直径 3~5mm, 随着时间推移, 卵巢原位的肿瘤逐渐增大, 荷瘤鼠逐渐消瘦, 腹围增加, 皮下脂肪减少, 活动减少, 对外界反应迟钝, 直至衰竭死亡, 术后平均生存期为 99.13±38.21d。

有 6 只荷瘤鼠接受尸检。尸检可见卵巢原位肿瘤呈椭圆形, 多数直径会超过 2cm, 白色外观, 质硬, 表面凹凸不平, 与周围器官粘连, 活动度较差, 将肿瘤切开后, 内部或可见液化坏死区域。5 只荷瘤鼠出现了不同程度的远处转移, 转移率为 83.33%, 转移病灶为白色外观, 呈粟粒样结节, 直径几毫米至几厘米不等, 转移器官为肺脏、膈肌、肝脏、胰脏、胃、肠管、后腹膜、髂窝淋巴结、对侧卵巢等处, 以肝脏和膈肌较为普遍。本实验追踪观察的荷瘤鼠中, 未见有腹水的形成。(见图 1~图 4, 表 1)

2.2 光镜和电镜检查结果

光镜下观察卵巢原位以及转移灶的肿瘤细胞均呈浸润性生长, 细胞核大深染 (图 5), 细胞核与细胞浆的比例大, 核分



(a) 荷瘤鼠在进行尸检前的大体外观
(a) General inspection before autopsy

(b)、(c) 荷瘤鼠腹腔内肿瘤多发转移情况, (c) 为 (b) 的放大图,
黑色箭头所指为左卵巢原位肿瘤或腹腔内转移病灶

(b)(c) Metastatic foci (arrow) in abdominal cavity, (c) is detail with enlarged scale

图 1 左卵巢原位移植肿瘤成功的裸鼠

Fig. 1 Illustration of orthotopic ovarian cancers in nude mouse

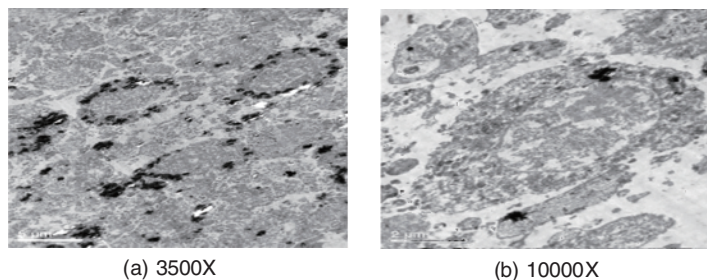


图 10 卵巢原位肿瘤电镜观察结果

Fig. 10 Electron microscopy examination of ovarian orthotopic carcinoma

注:镜下观察细胞广泛坏死,钙盐沉积,内质网扩张,考虑原位成瘤的时间过长,肿瘤组织已经坏死失活。
Notes: Cells are necrotized, with calcium deposition and endoplasmic dilatation.

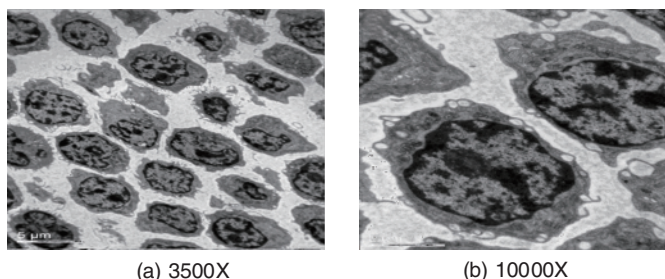


图 11 右髂窝转移淋巴结电镜观察结果

Fig. 11 Electron microscopy examination of metastatic tumor in lymph node of right fossa iliaca

注:镜下观察肿瘤细胞生长旺盛,核大,核仁发达,常染色质丰富,细胞内线粒体较多,游离核糖体较多,并可看到线粒体肿胀。
Notes: Carcinoma cells are in the state of vigorous growth, the nucleus is large, there are many mitochondrial and ribosome in the cytoplasm.

今尚不清楚。卵巢癌具有起病隐匿,转移率高,复发率高,预后差等特点,在女性生殖系统恶性肿瘤中其死亡率高居首位^[4]。原位移植瘤在一定程度上能客观地模拟人体系统,更符合人体内卵巢肿瘤发生发展和转移的过程,是一种理想的动物模型。1993 年,世界上第一例卵巢癌原位移植-转移裸鼠模型构建成功^[5],2003 年,中国开始有卵巢癌原位种植成功的报道^[6]。但是至今将近 8 年的时间里,该领域的研究在国内发展十分缓慢,相关报道很少,在有限的科研文献中,又缺乏足够的翔实的图片,数据等资料。

4 结论

本实验成功地构建了人卵巢癌细胞株裸鼠原位移植瘤模型,并追踪观察了原位肿瘤在胸腹腔内的转移情况,积累了一定的光镜电镜图片,为国内本领域的发展提供了一定的理论依据和实验数据。根据 K. W. Lo 等^[7]的报道,卵巢癌移植瘤裸鼠模型的成功率为 18%~77%。本实验中,裸鼠原位移植瘤的成功率为 57.14%,转移率为 83.33%,相对而言,成功率较高。

由于实验条件所限,本实验所采用裸鼠数量不多(皮下移植瘤裸鼠 2 只,卵巢原位移植瘤裸鼠 14 只)。另外,因缺乏活体成型系统等相关设备,无法对荷瘤鼠的肿瘤生长以及转移情况进行实时追踪和检测,因此所得到的实验数据也较为有限,有待于在下一步的研究中进行更深入具体的探索。

参考文献 (References)

- [1] Byrne H M. Dissecting cancer through mathematics: From the cell to the animal model[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(3): 221-230.
- [2] Yi X F, Yuan S T, Lu L J, *et al.* A clinically relevant orthotopic implantation nude mouse model of human epithelial ovarian cancer - based on consecutive observation[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2005, 15(5): 850-855.
- [3] Hanna N, Davis T W, Fidler U. Environmental and genetic factors determine the level of NK activity of nude mice and affect their suitability as models for experimental metastasis [J]. *International Journal of Cancer*, 1982, 30(3): 371-376.
- [4] Kathleen R C. Ovarian cancer update: Lessons from morphology, molecules, and mice[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2009, 133(11): 1775-1781.
- [5] Fu X, Hofman R M. Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patients specimens[J]. *Anticancer Research*, 1993, 13: 283-288.
- [6] 李静, 邢辉, 高庆蕾, 等. 人卵巢癌裸鼠原位移植瘤模型的建立及其生物学特性研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38(6): 376-378.
Li Jing, Xing Hui, Gao Qinglei, *et al.* *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2003, 38(6): 376-378.
- [7] Lo K W, Kwong J, Hui A B, *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Research*, 2001, 61: 3877-3881.
- [8] Buschard K. The thymus-dependent immune system in the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Animal model and human studies[J]. *Dan Med Bull*, 1985, 32(3): 139-151.

(责任编辑 王芷)