论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0874-04

人卵巢癌顺铂耐药细胞SCID小鼠腹腔移植模型的建立及其生物学特性的实验研究

张 辉[1],左连富[2],王晓玲[3],王永军[3],贾金华[1],康 山[1],赵 群[4] (河北医科大学第四医院:[1]妇产科,[2]肿瘤研究所,[3]病理科,[4]外科,石家庄 050011)

提 要:目的 建立人卵巢癌顺铂耐药细胞严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠腹腔移植动物模型,探讨其生物学特征。**方法** 以卵巢癌SKOV3细胞作对照,将SCID小鼠腹腔注射人卵巢癌SKOV3/CDDP细胞1×10^7/ml,建立SCID小鼠顺铂耐药卵巢癌腹腔移植模型,观察小鼠活动、原位移植成瘤率、肿瘤生长以及形态学特征。免疫组化检测卵巢癌相关抗原CA125以及耐药相关基因GST-π和Topo-Ⅱ的共表达率。**结果** 两组SCID小鼠均100%成瘤,病理组织和免疫组化检测,从移植瘤细胞形态学、生长特性和分泌CA125等方面未见明显改变。SKOV3/CDDP组耐药相关基因GST-π和Topo-Ⅱ共表达明显增高($P<0.05$)。**结论** 该卵巢癌SKOV3/CDDP细胞SCID小鼠腹腔移植模型,模拟了人卵巢癌腹腔播散的生物学行为,且能保持细胞的耐药性,是研究卵巢癌生物治疗较理想的动物模型。

关键词: 卵巢癌;耐药;SCID鼠

中图法分类号: R-332; R73-354; R737.31 **文献标识码:** A

Biologic characteristics of intraperitoneal transplantation model of human ovarian carcinoma cisplatin-resistant cell in SCID mice

ZHANG Hui[1], ZUO Lian-fu[2], WANG Xiao-ling[3], WANG Yong-jun[3], JIA Jin-hua[1], KANG Shan[1], ZHAO Qun[4] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Institute of Tumor, [3]Department of Pathology, [4]Department of General Surgery, The Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To develop the animal model of human ovarian carcinoma SKOV3/CDDP cell implantation intraperitoneally in severe combined immunodeficiency (SCID) mouse and to study its biologic characteristics. **Methods** Sixteen CB17 SCID mice were randomly divided into 2 groups. Human ovarian carcinoma SKOV3 (served as control) and SKOV3/CDDP cells were injected intraperitoneally into female SCID mice respectively. Pathological diagnosis and immunohistochemical staining were used to examine the behaviors of mice, tumor growth and morphology, cancer antigen 125(CA125), GST-π and Topo-Ⅱ gene expression. **Results** The bearing rates of the SKOV3 and SKOV3/CDDP groups were both 100%. The morphology, growth pattern and CA125 secretion of SKOV3/CDDP group remained as the same as those of SKOV3 group. Immunohistochemical staining showed the ovarian associated antigen CA125 were both positive. Compared with SKOV3 group, GST-π and Topo-Ⅱ gene expression level in SKOV3/CDDP group were significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** The model of human ovarian carcinoma SKOV3/CDDP implantation intraperitoneally in SCID mice has been estaolished successfully. It may be an ideal animal model for biotherapy research of ovarian carcinoma as it can simulate the biological behavior of peritoneal metastasis of human ovarian carcinoma and maintain the drug tolerance.

Key words: ovarian carcinoma; drug-resistant; SCID mice

卵巢癌的广泛的盆腹腔种植和转移使手术难以切除干净。其中顺铂(CDDP)耐药是卵巢癌患者化学治疗中颇为棘手的问题。由于SCID鼠T淋巴细胞、B淋巴细胞严重缺陷,因此常被用作免疫功能缺陷及重建免疫功能的理想动物模型。本研究拟建立荷人卵巢癌SKOV3/CDDP耐药细胞SCID小鼠腹腔移植模型,为进一步开展卵巢癌的实验研究提供动物模型。

基金项目:河北省卫生厅科技攻关项目(2003/03086)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Public Health Department of Hebei Province (2003/03086)

作者简介:张 辉(1969-),女,河北省石家庄市人,博士,主治医师,主要从事妇科肿瘤的基础与临床方面的研究,发表论文10篇。电话:13831120917,E-mail: zhanghui516@126.com

通讯作者:赵 群,电话:(0311)88820516,E-mail: zhaoqun516@126.com

收稿日期:2005-02-01;修回日期:2005-03-26

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　C.B17/SCID 纯系小鼠 16 只，6～8 周龄，雌性，体质量 15～18 g。购自中国药品生物制品检定所实验动物中心，合格证号为 SCXK(京) 2000-0010。饲养于 SPF 无特殊病原体的环境中(河北医科大学实验动物中心)，饲料、饮水等均经无菌消毒。

1.1.2　细胞　　人卵巢浆液性乳头状腺癌 SKOV3 细胞株由复旦大学妇产医院研究所惠赠；SKOV3/CDDP 耐药细胞由北大人民医院妇产科实验室惠赠。

1.1.3　主要试剂　　DMEM 细胞培养基购自北京中山生物技术有限公司；新生牛血清购自杭州四季青公司；人 CA125 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司；GST-π 和 Topo-Ⅱ鼠抗人单抗 Santa Cruz Biotechnology 公司产品。S-P 免疫组化试剂盒为北京中山生物工程有限公司产品。分别用已知的正常组织或肿瘤组织阳性片作阳性对照。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　取对数生长 SKOV3 和 SKOV3/CDDP 细胞用 DMEM 细胞培养基加 2 mmol/L L-谷氨酰胺和青、链霉素各 100 U/ml 及 20%新生牛血清在 37℃含 5% CO_2 的孵箱中常规传代培养。待细胞生长至对数期时，用 0.25%胰酶消化收集细胞，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤重悬，调整细胞浓度为 2×10^7/ml。

1.2.2　动物分组、动物模型的建立　　参照潘子民等[2]的方法，选择合格 C.B17/SCID 鼠共 16 只，用随机数字表法分为 2 组。第 1 组 8 只，为 SKOV3 腹腔移植组，注射 SKOV3 细胞 1×10^7 个/只(0.5 ml)；第 2 组 8 只，为 SKOV3/CDDP 腹腔移植组，注射 SKOV3/CDDP 细胞 1×10^7 个/只(0.5 ml)。

1.2.3　各组荷瘤 SCID 小鼠的生物学特性的观察

1.2.3.1　大体观察　　每天观察荷瘤 SCID 小鼠对外界的反应、行动、饮食变化，了解腹内肿瘤生长情况，40 d 后所有小鼠摘眼球处死并进行大体解剖。

1.2.3.2　病理组织学观察　　两组 SCID 小鼠处死前禁食 16 h，剖腹后肉眼观察各组移植肿瘤变化；用 10%甲醛固定、石蜡包埋、5 pm 切片，经苏木精-伊红染色，在光学显微镜下观察；另取同样组织 1 mm^3 大小，4%戊二醛固定，4 ℃保存，常规电镜制片，透射电镜观察。

1.2.3.3　卵巢癌相关抗原 CA125 检测　　两组移植肿瘤经石蜡包埋、切片后，行卵巢癌相关抗原 CA125 的免疫组织化学染色；光镜下观察肿瘤细胞。若胞浆内含棕黄色颗粒，则为阳性，否则为阴性。

1.2.3.4　耐药相关基因 GST-π 和 Topo-Ⅱ检测　　每个蜡块切 4 μm 厚切片 5 张，1 张苏木精-伊红常规染色，1 张用 0.1 g/L PBS 代替一抗作为阴性对照，另 2 张分别行 GST-π 和 Topo-Ⅱ抗体标记，在相同条件下应用过氧化物酶标记链霉卵白素染色法(S-P 法)染色。在肿瘤细胞浆或细胞核上 GST-π 和 Topo-Ⅱ分别呈棕黄色为阳性，根据肿瘤细胞染色强度和阳性细胞百分率得分之和评估其基因蛋白的表达阳性率。

1.3　统计学处理

用 SPSS 12.0 软件行 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法。

2　结果

2.1　荷瘤 SCID 鼠生物学特征

两组 SCID 小鼠均 100%成瘤，各组小鼠以腹部出现可触及的包块作为成瘤标志，成瘤后呈现不同程度的行为迟钝、目光呆滞、腹部膨隆或蛙形腹、消瘦明显。

SKOV3 腹腔移植组小鼠均出现腹部包块，移植瘤呈椭圆形、灰白色、质硬，部分有坏死，分布以盆腔、横隔、肝周为主，直径约 3～10 mm。大网膜、肠系膜、腹膜表面上多处有肿瘤种植，肿块增大相互融合成片；SKOV3/CDDP 腹腔移植组 40～60 d 腹腔成瘤，与 SKOV3 腹腔移植组相比，肿瘤分布欠广泛，肿块增大融合现象不多。

2.2　荷瘤 SCID 小鼠肿瘤病理组织学特征

两组 SCID 小鼠肿瘤组织细胞光镜下表现相似，均为核大、深染、核质比大、多见核分裂，这些肿瘤细胞形成大小不等的癌巢，以肿瘤实质为主，周缘有少量纤维结缔组织，均保持了人卵巢浆液性乳头状腺癌的特点。

两组 SCID 小鼠肿瘤组织细胞透射电镜观察：SKOV3 腹腔移植组 SCID 小鼠肿瘤组织细胞呈椭圆形，胞膜及核膜完整、光滑，核质比大，染色质分布均匀，胞质内细胞器分布均匀，线粒体高度空泡化，粗面内质网扩张；SKOV3/CDDP 腹腔移植组 SCID 小鼠肿瘤组织细胞核高度畸形，核仁大、明显，常染色质丰富，线粒体水肿，部分或大部分嵴排列紊乱或溶解消失，部分有脱颗粒现象，游离核糖体增多。耐药组与亲本细胞腹腔组比较，差异无显著性。

2.3　卵巢癌相关抗原 CA125 表达

两组 SCID 小鼠的腹腔肿瘤均表达 CA125，表现为细胞膜和细胞浆呈棕色阳性染色(图 1)。

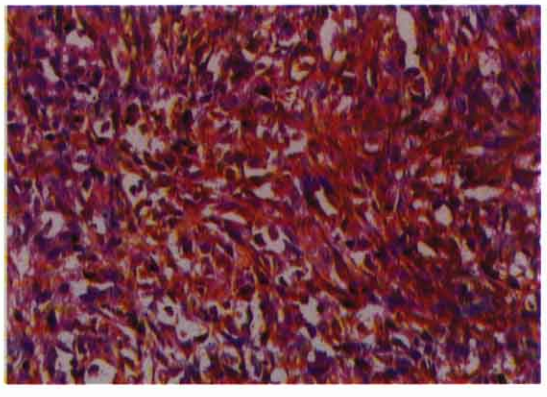


图 1　SKOV3/CDDP 组 SCID 小鼠肿瘤组织细胞 CA125 的表达
(S-P×400)

Fig 1　CA125 expression in tumor mass in SKOV3/CDDP group
(S-P×400)

2.4　耐药相关基因 GST-π 和 Topo-Ⅱ共表达

GST-π 和 Topo-Ⅱ抗原分别表达于阳性细胞的细胞膜、细胞

浆、细胞核。它们共同在 SKOV3/CDDP 腹腔移植瘤组小鼠肿瘤结节高表达阳性率为 40.5%，与 SKOV3 腹腔移植瘤组相比具有显著性差异（$P<0.01$）。见表 1、图 2、3。

表 1 荷瘤 SCID 小鼠肿瘤耐药相关基因 GST-π 和 Topo-Ⅱ的共表达

Tab 1 The coexpression of GST-π 和 Topo-Ⅱ in SCID mouse model bearing SKOV3/CDDP

Group	n	Low expression	High expression	High expression rate (%)	P
SKOV3 Group	8	8	0	0	<0.05
SKOV3/CDDP Group	8	4	4	50	

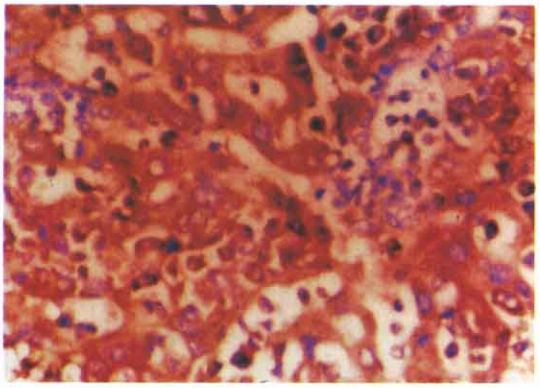


图 2 SKOV3/CDDP 组肿瘤组织细胞 GST-π 的表达 (S-P×400)

Fig 2 GST-π expression in tumor mass in SKOV3/CDDP group (S-P×400)

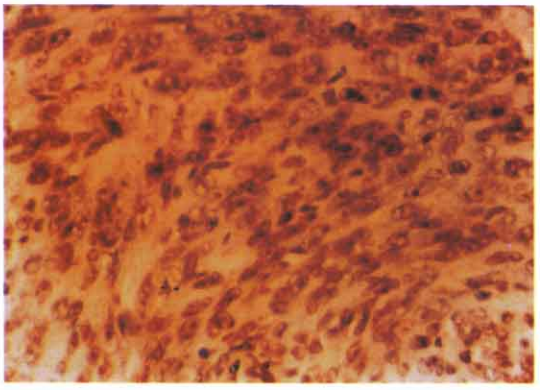


图 3 SKOV3/CDDP 组肿瘤组织细胞 Topo-Ⅱ 的表达 (S-P×400)

Fig 3 Topo-Ⅱ expression in tumor mass in SKOV3/CDDP group (S-P ×400)

3 讨论

近年来，国内外已陆续出现多种荷人卵巢癌 SCID 鼠移植模型，主要有皮下移植、原位移植、腹腔移植等几种方式。葛海良等[3]建立了人卵巢癌 SCID 小鼠移植瘤模型；Xu 等[5]曾将卵巢癌新鲜组织标本移植入 SCID 鼠的性腺脂肪垫上，成功建立原位移植模型，并且所有的肿瘤均表现出了一定程度的浸润，但原位移植后仅少数小鼠出现腹腔转移灶及腹水。潘子民等[2]在 SCID 鼠腹腔注射人 SKOV3 卵巢癌细胞，建立了荷人卵巢癌细胞株 SKOV3 严重联合免疫缺陷小鼠（SCID）动物模型，发现肿瘤细胞在形态、生长、分泌 CA125 功能方面均与原细胞株保持一致，能较好地模拟人卵巢癌腹腔播散的生物学特征。

多药耐药（multidrug resistance，MDR）是恶性肿瘤存在的普遍现象，其耐药机制复杂，主要原因在于多种基因共同参与其耐药物性的形成。导致卵巢癌治疗失败的主要原因之一就是对化疗药物耐药，临床耐药的产生与多种耐药相关基因有关，了解耐药基因在肿瘤细胞中的表达，对于治疗方案的选择和逆转措施的实施具有重要的指导意义。

在卵巢癌组织中 mRNA 和蛋白水平均可检测到 MDR1 的表达，Schondorf 等[6]分别用 3 种抗癌药：顺铂、紫杉醇、柔红霉素诱导细胞产生耐药株，采取 RT-PCR 方法进行研究后认为：抗肿瘤药诱导细胞 MDR1 表达是导致卵巢癌化疗失败的主要原因，但存在个体差异。P-gp 是多药耐药基因 MDR1 的表达产物，为一能量依赖型药泵，在耐药发生的早期阶段，GST-π 非特异性的结合作用可协助药物通过 P-gp 形成的药物排流泵而外流，GST-π 与 P-gp 共同介导了早期耐药的产生。从卵巢正常组织、良性病变到癌变的过程中，GST-π 阳性表达率逐渐增加，肿瘤分化程度越低以及临床分期越晚其表达越强，能很好地预测卵巢癌化疗耐药。

Topo-Ⅱ是蒽环类和鬼臼毒素类药物的靶酶，耐药细胞通过调节酶的含量及活性来维持耐药表型，Topo-Ⅱ所介导的耐药与细胞内药物靶酶活性改变或 DNA 修复机制有关，即非典型多药耐药（atypical MDR，at-MDR）。Topo-Ⅱ含量高的肿瘤可选择 Topo-Ⅱ抑制剂进行针对性治疗，这对提高疗效很有帮助[7]。

共同表达是耐药相关基因受共同因子调控的证据[8]。GST-π 和 Topo-Ⅱ在卵巢癌中共同表达分别介导典型 MDR 和 at-MDR，从一个侧面反映了卵巢癌多药耐药机制的复杂性，这也是卵巢癌多年来化疗未取得实质性进展的重要原因，同时亦为耐药逆转剂的研究提出新的课题。

研究表明，两组 SCID 小鼠均 100%成瘤，从移植瘤细胞形态学、生长特性和分泌 CA125 等方面未见明显改变。组织病理和免疫组化检测，证实卵巢癌 SKOV3/CDDP 细胞 SCID 小鼠腹腔移植后仍保持了卵巢浆液性癌的形态特点，并表达卵巢癌相关抗原 CA125，且耐药相关基因 GST-π 和 Topo-Ⅱ共表达明显增高。因此我们认为已成功建立人卵巢癌 SKOV3/CDDP 细胞

SCID 小鼠腹腔移植模型。一方面很好地模拟了人体卵巢癌腹腔播散的生物学行为，为研究卵巢癌盆腹腔种植性转移机制提供了较理想的工具；另一方面也为研究卵巢癌耐药细胞的腹腔内化疗或免疫治疗开辟了新的实验基础，对卵巢癌治疗的临床前研究更有意义。

当然人卵巢癌 SKOV3/CDDP 细胞 SCID 小鼠腹腔移植模型也有其局限性。主要问题是 SCID 鼠体内缺乏 T、B 淋巴细胞，不能发挥人体的正常免疫功能。其次，此外，SKOV3/CDDP 细胞以形成腹腔肿瘤包块为主。基本不伴腹水，与大多数晚期卵巢癌患者伴有腹水的临床表现稍有出入，有待进一步研究改进。

参考文献：

[1] 张盈华，张志培，赵佐庆. 免疫缺陷鼠重建免疫后抑制移植瘤生长的研究[J]. 免疫学杂志，2002，18(6)：430－436.
[2] 潘子民，叶大风，谢 幸，等. 荷人卵巢癌严重联合免疫缺陷鼠腹腔移植模型的建立[J]. 浙江大学学报(医学版)，2003，32 (5)：423－426.
[3] 葛海良，冯 荻，马安伦，等. 人卵巢癌 SCID 小鼠移植瘤模型、细胞系建立及其生物学特性研究[J]. 中国实验动物学报，2001，9 (3)：134－138.
[4] 崔 恒，李 艺，童春容，等. 免疫重建荷人卵巢-癌严重联合免疫缺陷小鼠模型的建立[J]. 北京医科大学学报，2000，32(6)：488－491.
[5] Xu Y, Silver D F, Yang N P, *et al*. Characterization of human ovarian carcinomas in a SCID mouse model[J]. Gynecol Oncol, 1999, 72(2): 161－170.
[6] Schondorf T, Kurbacher C M, Gohring U J, *et al*. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines[J]. Anticancer Res, 2002, 22(4): 2199－2203.
[7] 栾英姿，李 力. 拓扑异构酶与卵巢恶性肿瘤耐药关系的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册，2003，30(4)：220－223.
[8] Szakacs G, Jakab K, Antal F, *et al*. Diagnostics of multidrug resistance in cancer[J]. Pathol Oncol Res, 1998, 4(4): 251－257.

(编辑 栾 嘉)

文章编号：1000-5404(2005)09-0877-01

个案与短篇

原发性纤毛不动综合征 1 例

A case report of primary ciliary dyskinesia

彭东红[1]，刘恩梅[1]，黄 英[1]，陈坤华[1]，肖桃元[2] ([1] 重庆医科大学附属儿童医院呼吸科，重庆 400014；[2] 第三军医大学高原军事医学系中心实验室，重庆 400038)

患儿，男，9 岁 9 个月，因反复咳嗽 1 年加重伴胸痛 1 个月入院。1 年前患儿受凉出现流涕、鼻塞、咳嗽，不伴喘息、气促、青紫、发热、咯血，自行口服抗炎药可好转。1 个月前受凉后又出现上述症状且活动后心累、乏力、胸闷、阵阵胸痛。入院前 10 天咳嗽加重伴右侧胸痛，活动后述心慌、心累。胸片示双肺炎症并左肺中叶不张，右位心。故门诊以"肺炎、左肺不张、右位心"收入院。患儿有新生儿肺炎病史，平素常感冒、发热。入院查体：体温 36.8 ℃，脉搏 92 次/min，呼吸 22 次/min，血压 105/70 mmHg，体质量 22 kg，反应好，唇无发绀，双下肺呼吸音稍低，可闻及少许干湿啰音，心前区无隆起，最大右心界位于右侧第 5 肋间右锁骨中线内 0.5 cm，心音右侧较左侧有力，心律不齐，腹平软，肝脾未扪及，无杵状指。入院后进一步腹部 B 超：腹腔脏器转位。胸部 CT：①全内脏转位；②左肺中叶不张；③右下肺内基底段肺炎，未见支气管扩张征象。心脏彩超：镜面右位心。耳鼻喉科会诊：鼻窦炎成立。副鼻窦横断位＋冠状位扫描：双侧上颌窦、筛窦、蝶窦炎症，中下鼻甲肥大。纤支镜检：左、右支气管开口异常，左中、下叶、右舌叶阻塞。

入院诊断：肺炎，左肺不张，鼻窦炎、副鼻窦炎，全内脏转位，原发性纤毛不动综合征。经鼻粘膜活检、电镜检查：鼻粘膜上皮细胞立方状，主要为单层、细胞排列稀疏、间隔宽缺乏连接，表面有较多长短不一的细突起，偶见单根短小纤毛及细胞内纤毛根，其内微管数少，排列杂乱，胞质内见发育不好的线粒体及其他细胞器，上皮下基板不连续。电镜结论为纤毛形成障碍(图 1)。最终诊断：原发性纤毛不动综合征。

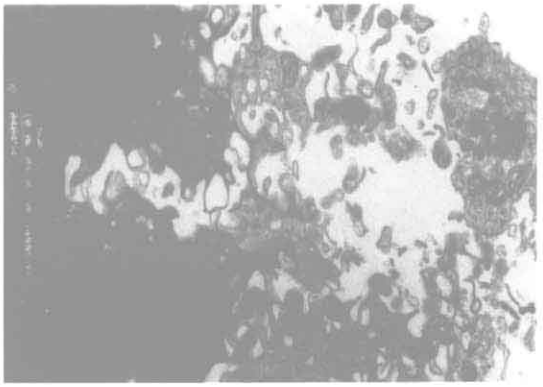


图 1 鼻粘膜活检电镜图 (EM × 10 000)

作者简介：彭东红(1968－)，女，四川省蓬安县人，硕士，主治医师，讲师，主要从事小儿呼吸系统哮喘方面的研究。电话：(023)63624074

收稿日期：2004-12-01；修回日期：2005-02-06

(下转 880 页)