论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1650-04

人结肠癌细胞系裸小鼠淋巴结转移的观察

涂经楷[1],傅仲学[1],叶晓莉[2],赵立波[3],王春毅[1],周建荣[1],汪 斌[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016;[2]重庆市西郊医院检验科,重庆 400050;[3]重庆市第三人民医院神经内科,重庆 400014)

摘 要:目的 建立人结肠癌细胞系裸小鼠爪垫淋巴道转移动物模型,并评价卡培他滨抗癌药物效果。**方法** 裸小鼠爪垫皮下注射人结肠癌 HCT-116 细胞,在 1~6 周及 8 周取材,进行 HE 染色及 CEA 免疫组化检测,观察种植瘤的成瘤率、生长情况、淋巴结转移规律,并口服卡陪他滨抗癌药物观察其疗效。**结果** 种植 1 周后成瘤率 100%。肿瘤在 3~4 周成指数生长。3 周时见第一级窝国腹股沟淋巴结转移(2/5),到 6 周时 100% 转移,其中腹股沟淋巴结转移阳性率 76.9%(10/13);5 周时见第二级髂血管旁淋巴结转移(1/5);到 8 周时见第三级肾门淋巴结转移(1/5),髂血管旁淋巴结转移(3/5),但均未见肝肺远处转移。淋巴结转移发生在肿瘤指数生长之前,HE 染色及 CEA 免疫组化染色证实淋巴结有弥漫性癌细胞转移浸润。口服化疗药物卡培他滨能有效抑制肿瘤生长及淋巴结转移。**结论** 成功建立了人结肠癌裸小鼠爪垫淋巴道转移模型。此模型快速简便、转移集中、转移率高,且应用此模型能够评价抗癌药物卡培他滨抗癌疗效。

关键词:人结直肠癌;淋巴道转移;裸鼠模型;卡培他滨
中图法分类号:R-332;R73-37;R735.3 **文献标识码:**A

Establishing lymphatic metastasis with human colon carcinoma cell line in nude mice

TU Jing-kai[1], FU Zhong-xue[1], YE Xiao-li[2], ZHAO Li-bo[3], WANG Chun-yi[1], ZHOU Jian-rong[1], WANG Bin[1] ([1]Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Laboratory Medicine, Chongqing Xijiao Hospital, Chongqing 400050; [3]Department of Neurology, The Third People's Hospital, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To establish the nude mouse model of lymphatic metastasis, and evaluate the anti-tumor effect of capecitabine in this model. Methods The nude mouse model of lymphatic metastasis was established by injecting human colon carcinoma cell line HCT-116 into the claw pad. The lymph nodes from popliteal fossa, inguinal groove, abdominal cavity collected at 1 – 6 and 8 weeks after tumor implantation were used to observe the tumor formation rate, growth and metastasis by HE staining and immunohistochemistry of CEA. Meanwhile, capecitabine was administered orally to some mice to observe its anti-tumor effect. Results The tumor formation rate was 100% 1 week after injection, and the exponential growth phase was at 3 – 4 weeks. The first lymph node metastasis to groin-popliteal fossa was found at the 3th week (2/5), and at the 6th week the metastasis rate was 100%, and the positive metastasis rate of lymph nodes at groin was 76.9% (10/13). At the 5th week, the second lymph node metastasis to ilio-blood-vessel side was found (1/5). The third lymph node metastasis to renal hilum was found at the 8th week (1/5), and meanwhile the rate of lymph node metastasis to ilio-blood-vessel side was 60% (3/5). No distant metastasis to the liver and lungs was found. Implanted tumors developed lymph node metastases before exponential growth phase. There was diffuse cancer cell metastasis in lymph nodes, which can be approved through HE staining and immunohistochemistry of CEA. Oral intake of capecitabine suppressed the volume of the implanted tumor and significantly inhibited the metastasis to lymph nodes. Conclusion The nude mouse model of lymphatic metastasis is successfully established through injecting human colon carcinoma cell line to the claw pad. The model is simple, of rapid and concentrated transfer as well as high transfer rate. In addition, this model can be used to evaluate the anti-tumor effect of capecitabine.

Key words: human colon carcinoma cell line; lymphatic metastasis; nude mouse model; capecitabine

作者简介:涂经楷,男,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事胃肠道肿瘤及便秘基础与临床方面的研究。E-mail:Tjk2005@yahoo.cn
通信作者:傅仲学,E-mail:fzx990521@sina.com
收稿日期:2007-11-08 修回日期:2008-03-02

淋巴道转移是人结直肠癌最常见的转移途径和方式，且淋巴结转移灶可以成为进一步血道转移的桥头堡[1]。在当前的治疗研究中，不单是针对手术治疗，也包括化疗预防结直肠癌，为了能够进一步研究结直肠癌转移机制、药物干预等抗转移治疗，适合的动物模型是必须的，然而目前尚缺乏人结直肠癌单纯性淋巴道转移有效的实验模型。卡培他滨是一种在结直肠肿瘤生长初期和淋巴结转移临床化疗中大量使用的药物。本研究采用人结肠癌细胞系接种于裸小鼠爪垫皮下建立单纯性淋巴道转移模型，探讨淋巴结转移规律，并初步评价了卡培他滨抗癌药物抑制肿瘤生长和淋巴结转移的效果。旨在为人结直肠癌淋巴道转移机制研究、寻找新的治疗方案以及药物干预等抗转移治疗提供理想的动物模型。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　肿瘤细胞　　人结肠癌细胞株 HCT-116，为低分化腺癌。由重庆医科大学附一院外科实验室提供。

1.1.2　实验动物　　BALB/c nu/nu 裸小鼠 51 只，由重庆医科大学实验动物中心提供（动物合格证：SCXK2007-0001）雄性，鼠龄 4 ~ 6 周，体质量 18 g 左右。

1.1.3　化疗药物　　卡培他滨（希罗达）5′-脱氧-5-氟-N［（戊氧基）羟基］－胞（嘧啶核）苷（瑞士罗氏制药）。

1.2　方法

1.2.1　人结肠癌细胞株 HCT-116 细胞的复苏与培养　　将冻存的人结肠癌 HCT-116 细胞株（本实验室提供）从液氮罐中取出后，迅速放入 37 ℃温水中复苏，并加入含 10% 新生小牛血清的 RMPI1640 细胞培养液进行培养，台盼蓝染色进行活细胞计数，活细胞数大于 95% 用于裸小鼠爪垫注射建模。

1.2.2　人结肠癌淋巴道转移裸小鼠移植模型的建立　　将 HCT-116 对数生长期的细胞制成浓度为 1×10^8 个/ml 的细胞悬液，实验动物以 1% 氯胺酮 0.3 ml/只腹腔麻醉，5 min 后消毒裸鼠右后肢爪垫皮肤，将 0.04 ml（4×10^6 个）的 HCT-116 细胞悬液用 2 号针头缓慢注射于裸鼠右后肢爪垫皮下接种。

1.2.3　观察项目

1.2.3.1　肿瘤生长及淋巴道转移情况　　定期观察爪垫肿瘤生长情况，全身状况，以及腘窝、腹股沟，腹腔等处淋巴结肿大转移情况。每周测量种植瘤块长短直径，肿瘤体积（mm^3）= 1/2 × 长 ×（宽）^{2}，此目的在于研究肿瘤生长和淋巴结转移间的关系。前期实验用 35 只裸鼠同时接种肿瘤细胞，每 5 只鼠在 1 ~ 6 周不同时间分批处死取材，余下 5 只观察至 8 周处死。完整解剖检查足垫淋巴引流各站淋巴结以及肝、肺等远处脏器转移情况。收集种植瘤块，腘窝、腹股沟、髂血管旁、肾门淋巴结以及肝、肺等组织，放置在 10% 福尔马林中固定，室温保持 24 h 后石蜡包埋，切片 HE 染色行组织学检查。

1.2.3.2　爪垫瘤块、转移淋巴结组织免疫组化检测人 CEA　　试剂购于中杉生物公司的浓缩型兔抗人 CEA 多克隆抗体及 S-P-9001 试剂盒，严格按照说明书操作。

1.2.3.3　动物成模标准的检测与方法　　①肉眼观察：发现回流路径区域淋巴结肿大；②淋巴结组织 HE 染色病检观察，确定转移的人结肠癌细胞；③接种瘤块、淋巴结转移灶组织人 CEA 检测阳性。

1.2.4　卡培他滨的抑制效果　　在 HCT-116 细胞裸小鼠爪垫模型上观察卡培他滨对肿瘤及淋巴结转移的抑制效果。

实验设口服给药 8 只裸鼠，于 3 周后开始灌胃，另设 8 只接受不含卡培他滨的水溶液的裸小鼠作为对照组。将卡培他滨溶于 5% 的阿拉伯胶糖中制成悬液，按剂量为 359 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 灌胃 2 周（1 ~ 5 d 和 8 ~ 12 d）[2]。在给药完成后 9 d（种植 6 周时）处死裸鼠取材腘窝腹股沟淋巴结。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，并行两独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　裸小鼠接种生长情况

裸小鼠爪垫接种瘤细胞 15 min 后苏醒，活动如常。此接种技术无手术死亡率，术后无死亡及并发症。肿瘤细胞接种 1 周后肉眼见肿瘤结节生长，所有接种的肿瘤细胞在裸小鼠爪垫注射部位全部成瘤，成瘤率 100%（图 1）。在接种后不同时间测量肿瘤体积大小，肿瘤体积随接种时间生长，其生长曲线见图 2。生长曲线表明肿瘤在 3 周后成指数生长，4 周后部分瘤块开始发黑糜烂，6 周后瘤块溃烂明显且几乎完全占据爪垫，瘤体生长趋于缓慢。



图 1　裸鼠接种 6 周时肿瘤细胞生长的瘤体

2.2　人结肠癌淋巴结转移成模情况

爪垫注射成瘤 2 周后可以在汇流的腹股沟区触及肿大的淋巴结，约米粒大小，质地偏硬，可以活动，有黏连感。4 ~ 6 周后转移的淋巴结增大至绿豆或黄豆大小。淋巴结转移规律：①腹股沟 LNM：1 ~ 2 周未见 LNM，3 周时见转移发生，转移率 40%［测量肿瘤体积（112 ± 32）mm^3］，6 周后所有接种裸小鼠均发生一级淋巴结转移，转移率 100%，见图 3A［测量肿瘤体积（1 460 ± 370）mm^3，见图 2］。②髂血管旁 LNM：5 周后可见部

分转移,5～8周转移率20%～60%,见图3B。③肾门LNM:6周前未见转移,8周时见部分转移,转移率20%,见图3C。但均未见肝肺远处转移,并观察到淋巴结转移发生在肿瘤指数生长之前。解剖取材肉眼观察到转移淋巴结见图4。

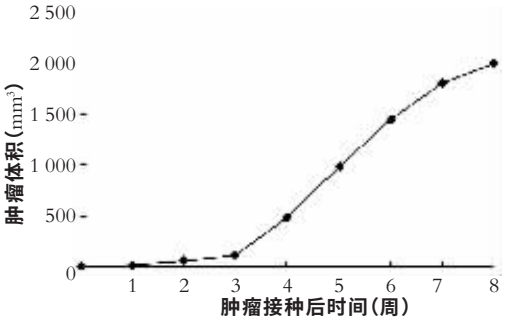
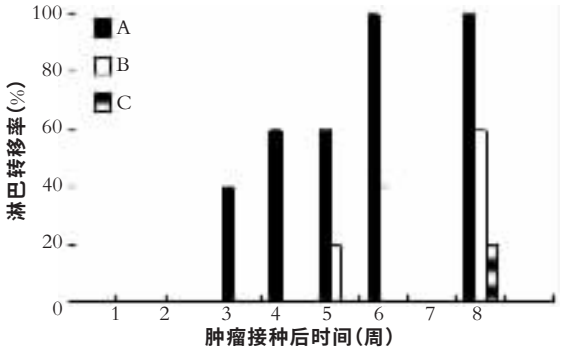


图2 肿瘤体积随接种后时间生长变化曲线



A:一级淋巴结转移率;B:二级淋巴结转移率;C:三级淋巴结转移率

图3 肿瘤细胞接种后1～8周各级淋巴结转移情况

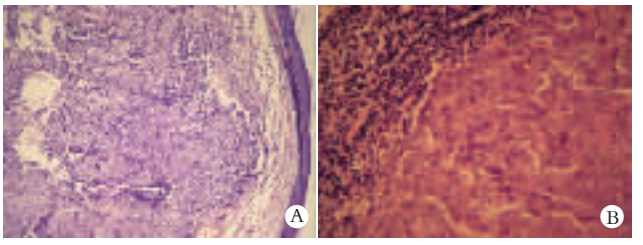


图4 爪垫种植6周取材肉眼见转移淋巴结

2.3 病理组织学观察

2.3.1 结肠癌爪垫种植瘤形态学观察 组织切片表现为未分化癌,癌组织多呈圆形、椭圆形,核大畸形、深染,核分裂相多见,呈弥漫性生长。癌组织排列呈团状或索状,无明显腺体结构存在,呈浸润性生长,见图5A。

2.3.2 淋巴结的形态学观察 肿瘤接种爪垫后转移淋巴结取材作HE染色在光镜下发现:在淋巴结的髓窦区域出现转移癌细胞形态异型性较大,呈圆形、椭圆形,核大畸形、深染,核分裂相多见,呈弥漫性和灶性浸润。此外,在髓窦区域以外的其他区域也有转移癌细胞浸润分布,见图5B。

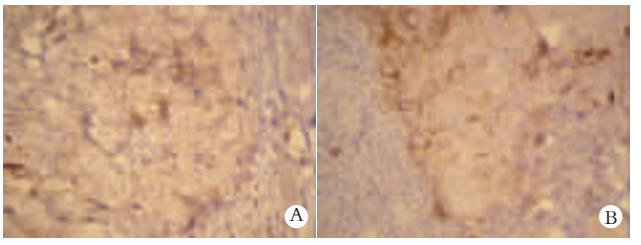


A:爪垫皮下瘤体(HE×200);B:转移淋巴结(HE×400)

图5 爪垫接种癌细胞6周光镜观察

2.4 免疫组化分析

使用抗人CEA抗体显示种植瘤以及转移淋巴结中肿瘤细胞表达人CEA蛋白,见图6。提示种植瘤及转移灶从人结肠癌HCT-116细胞得来。

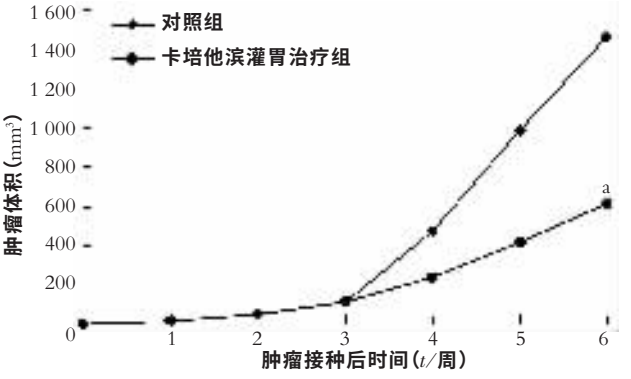


A裸鼠爪垫种植瘤人CEA蛋白表达;B:裸鼠转移淋巴结中人CEA蛋白表达

图6 肿瘤细胞接种裸鼠爪垫6周取材免疫组化检测 (S-P×400)

2.5 在HCT-116细胞裸小鼠爪垫模型上卡培他滨对肿瘤及淋巴结转移产生的效果

口服给药1周后观察到腹股沟淋巴结扪及明显变小、变软,2周后腹股沟淋巴结缩小不易扪及。在裸小鼠爪垫种植6周时取材测量肿瘤体积,给药组与对照组比较,卡培他滨明显抑制肿瘤的生长($P<0.01$),见图7。另外,在所有经过卡培他滨处理的裸小鼠中未发现淋巴结转移。



a:$P<0.01$,与对照组比较

图7 给药组与对照组肿瘤生长曲线

3 讨论

人结直肠癌与众多的恶性肿瘤一样,非常容易发

生淋巴道转移，且时间较早。目前一些结肠肿瘤的实验动物模型被建立，但并没有针对人结直肠肿瘤单纯的淋巴道研究模型。我们通过在裸小鼠爪垫注射人结肠肿瘤细胞，然后遵循其单向三级淋巴回流途径这一解剖学基础发生淋巴结转移，从而建立了一个有用的人结直肠癌淋巴道转移研究模型。而以往用新鲜人结直肠组织和细胞系所建立的裸小鼠皮下移植模型均不能发生深部浸润和转移[3]，脾内[4]、门静脉[5]或腹腔[6]注射人结直肠癌细胞系产生的肝转移灶模型，也只是血性转移过程，无淋巴道转移。目前广为应用的结直肠癌原位移植肝转移模型它虽然既有肿瘤的原位生长、又有区域淋巴结肿大及肝转移灶形成等优点[7,8]，但腹腔区域淋巴结深在，腹腔转移广泛、弥散，难于淋巴道转移实验研究的控制和量化，也不利于实验观察和抗转移治疗的处理，更不便于结直肠癌单纯淋巴道转移的相关研究。为此，我们模型的优势在于：①肿瘤局部生长便于观察，利于干预因素的处理。②转移呈单向性淋巴道转移且减少了影响因素，更适合单纯性淋巴道转移的研究。③操着简便且转移率高，可以满足大批量实验和推广应用。

本实验着重观察了人结肠癌细胞在淋巴道转移中的生物学特性和转移规律。我们在实验中，首先发现有肿大的淋巴结，其次常规的 HE 染色也发现有转移的上皮性癌细胞，转移的结肠癌细胞多聚集在淋巴结的髓窦区域，其他区域也有散在分布，生长方式表现为浸润性生长，转移癌细胞形态异型性较大，染色质深。镜下证实转移癌细胞存在，用时免疫组化检测结果显示肿瘤组织及转移灶人 CEA 蛋白表达，表明种植瘤及转移灶癌细胞均源于所种植的人类结肠癌细胞。因此，从不同层面上证实本研究模型是成功的。

另外，采取不同时间取材初步观察了淋巴结转移情况及规律，。我们发现在裸鼠爪垫注射人结直肠肿瘤细胞在局部形成肿瘤，继之发生淋巴结转移，所有标本第一站淋巴结均转移充分。6 周前主要集中在第一站，且转移率高，并且在转移形成中以腹股沟淋巴结转移阳性多见，而第二站，第三站转移率较低，这可能是观察转移时间不够以及与腹股沟淋巴结自身功能有关，机制尚待进一步研究。

为了调查此模型的有效性以及对抗肿瘤药物疗效的评价，我们检验了卡培他滨抗癌效果。从临床的观点，结直肠癌的主要治疗是外科手术，以及提倡对于进展期结直肠癌手术前后的化疗可以减少局部复发和转移[9]。卡培他滨是新一代口服 5-FU 的前体药物，是一种对肿瘤细胞有选择性活性的口服细胞毒制剂，在 TP 酶作用下才转化为 5-FU 而发挥抗肿瘤作用。我们在此模型上初步观察到口服卡培他滨投药可以抑制肿瘤生长，并且显著地抑制淋巴结转移。

本实验构建了人结肠癌细胞系裸小鼠单纯性淋巴道转移自发模型，并应用此模型能够评价卡培他滨抗癌效果。该模型能够模拟临床肿瘤淋巴道转浸润移的生物学特性和过程，可为进一步研究结直肠癌淋巴道转移机制以及评价新的抗转移治疗方案提供一定帮助。

参考文献：

[1] Sleeman J P. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors[J]. Recent Results Cancer Res, 2000,157:55 - 81.

[2] Seierstad T,Folkvord S,Roe K,*et al*. Early changes in apparent diffusion coefficient predict the quantitative antitumoral activity of capecitabine, oxaliplatin, and irradiation in HT29 xenografts in athymic nude mice[J]. Neoplasia, 2007, 9(5):392 - 400.

[3] Fidler I J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G. H. A. Clowes memorial award lecture[J]. Cancer Res,1990,50(19):6130 - 6138.

[4] Dvory-Sobol H, Kazanov D, Liberman E,*et al*. MF tricyclic and sulindac retard tumor formation in an animal model[J]. Int J Cancer, 2006, 118(1):11 - 16.

[5] Bouvet M, Tsuji K, Yang M, *et al*. In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases[J]. Cancer Res, 2006, 66(23):11293 - 11297.

[6] Watson S A,Morris T M,Crosbee D M,*et al*. A hepatic invasive human colorectal xenograft model[J]. Eur J Cancer,1993,29A(12):1740 - 1745.

[7] Cespedes M V, Espina C, Garcia-Cabezas M A,*et al*. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites[J]. Am J Pathol, 2007,170(3):1077 - 1085.

[8] Liu L, Zhang Q, Zhang Y, *et al*. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line[J]. Neoplasia, 2006, 8(11):917 - 924.

[9] Chau I, Chan S, Cunningham D. Overview of preoperative and postoperative therapy for colorectal cancer: the European and United States perspectives[J]. Clin Colorectal Cancer, 2003, 3(1):19 - 33.

（编辑　汪勤俭）