·论 著·

人肺腺癌裸鼠皮下移植瘤淋巴转移模型的构建与筛选

徐 翼,谭群友,陶绍霖,李松霖,于 杰,方春抒,王如文,蒋耀光 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科研究所,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 构建人肺腺癌的裸鼠皮下移植瘤模型,探讨不同注射部位对肿瘤生长和淋巴转移的影响。**方法** 20 只 BALB/c 裸鼠随机分为 4 组,每组 5 只。分别于左侧背部近腋窝、右侧背部近腋窝、左侧后肢和左后爪垫皮下注射 A549 细胞株,建立人肺腺癌移植瘤模型,考察各组裸鼠肿瘤生长和淋巴结转移情况。**结果** 各组裸鼠成瘤明显,模型构建成功。背部近腋窝种植 2 组裸鼠肿瘤比后肢和爪垫种植的肿瘤出现时间早,生长速度快($P<0.05$)。左侧背部近腋窝、右侧背部近腋窝、左侧后肢和左后爪垫皮下移植瘤的淋巴结转移率分别为 41.7%、42.9%、23.1% 和 21.4%。其中左侧背部近腋窝注射最为方便。**结论** 裸鼠左侧背部近腋窝皮下注射 A549 细胞操作方便,肿瘤易生长,淋巴转移率高,是构建人肺腺癌皮下移植瘤淋巴转移模型的优选方案。

[关键词] 肺腺癌;淋巴转移;裸鼠;动物模型

[中图分类号] R734.2;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)01-0001-03

Establishment and screening of lymphatic metastasis models of transplanted pulmonary adenocarcinoma in nude mice

XU Yi, TAN Qun-you, TAO Shao-lin, LI Song-lin, YU Jie, FANG Chun-shu, WANG Ru-wen, JIANG Yao-guang (Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish lymphatic metastasis models of transplanted human pulmonary adenocarcinoma in nude mice and to compare the effect of injection position on tumor growth and lymphatic metastasis. **Methods** Twenty BALB/c nude mice were divided equally into four groups. A549 cell was injected subcutaneously into the left back near axillar fossa, the right back near axillar fossa, the left hind limb and the left hind nail pad of nude mice in different groups respectively. Tumor size and lymphatic metastasis were dynamicly observed. **Results** Human transplanted pulmonary adenocarcinoma nude mice models were successfully established in each group. Tumors appear more early and grow faster ($P<0.05$) in the left and right back near axillar fossa groups than the other two groups. Lymph node metastasis rates were 41.7%, 42.9%, 23.1% and 21.4% in left near axillar fossa, right back near axillar fossa, left hind limbs and left nail pad groups, respectively. Injection into the left back near axillar fossa was the most convenient. **Conclusion** Subcutaneous injection of A549 cell in the left back approach axillar fossa of nude mice has the advantages of convenience, fast tumor growth, and high lymph metastasis rate. It might be an optimal animal model of human transplanted pulmonary adenocarcinoma lymphatic metastasis.

Keywords: pulmonary adenocarcinoma; lymphatic metastasis; nude mice; animal models

肿瘤的转移是患者生存的重要影响因素[1],淋巴转移是肿瘤转移的重要途径。建立肺腺癌动物模型,是研究淋巴结转移的主要方法之一。肺腺癌淋巴结转移模型构建影响因素复杂,其中以移植瘤应用最广泛。目前肺腺癌移植瘤构建方法难以较准确地考察肿瘤生长和淋巴转移情况。本实验以 BALB/c 裸鼠为研究对象,比较人肺腺癌 A549 细胞裸鼠不同部位皮下移植瘤模型的构建方法,并进行优化筛选,为研究肺腺癌淋巴结转移的作用机制和探讨治疗方案奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 BALB/c(nu/nu)裸鼠 20 只(6~9 周龄,体质量 20 g 左右),由第三军医大学大坪医院医学实验动物中心提供。随机分为左侧背部近腋窝种植组、右侧背部近腋窝种植组、左侧后肢种植组和左后爪垫种植组,每组 5 只。各组在无菌条件下饲养,保持一定的温度和湿度。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞加入含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 1×10^5 U/L 的 DMEM 培养液中,置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度恒温培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次,5~6 d 传代 1 次。

1.3 动物模型构建

取处于对数生长期的 A549 细胞,用冷的磷酸盐缓冲液

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201301001

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81172239);第三军医大学科研创新基金资助项目(2007XG60)

[通讯作者] 谭群友,E-mail:tanqy001@163.com

[收稿日期] 2012-11-24 [修回日期] 2012-12-12

(PBS)制成细胞悬液,调整最终细胞浓度为 2×10^7/mL,使用胰岛素注射器,将 A549 细胞分别接种于裸鼠左侧背部近腋窝、右侧背部近腋窝、左侧后肢和左后爪垫皮下,接种量为每只 0.05 mL,约含 0.1×10^7 个活细胞。

1.4 裸鼠带瘤体质量与肿瘤大小检测

注射后每天记录观察肿瘤注射部位皮肤改变、局部反应、硬结出现时间等情况,以肿瘤肉眼可见时记录为肿瘤出现时间。每隔 1 d 观察裸鼠的进食、精神状态和肿瘤生长情况。待成瘤后,观察、测量移植瘤的体积(V),$V=0.5ab^2$,其中 a、b 为移植瘤的长、短径。

1.5 肿瘤淋巴转移情况检测

于注射后 4 周时处死裸鼠,取移植瘤组织,中性福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,免疫组化检测移植瘤内的特异性指标 LYVE-1,考察有无新生淋巴管生成。取同侧及对侧颈部、腋窝、腹股沟、腘窝等部位淋巴结,中性福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜观察,比较各组裸鼠移植瘤淋巴结转移率。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 肿瘤出现时间

左、右侧背部近腋窝种植组于注射后 11 d 生长出可见肿瘤,左侧后肢和左后爪垫种植组于注射后 13 d 生长出可见肿瘤。

2.2 裸鼠身体情况

左、右侧背部近腋窝种植组与左侧后肢、左后爪垫种植组相比较,裸鼠较早出现精神萎靡、食欲不振、活动量减低、毛发光泽不良,两侧腋窝种植无明显差别。出现毛发光泽不良和消瘦后即为裸鼠即将死亡的征兆。左侧后肢、左后爪垫种植组裸鼠上述表现出现时间较晚,因此可以推测其寿命会较长。

2.3 裸鼠体质量变化和肿瘤生长情况

各组带瘤裸鼠体质量均有所下降,左、右侧背部近腋窝种植组比后肢和爪垫种植组体质量下降迅速($P<0.05$),见图 1。左、右侧背部近腋窝种植组比后肢和爪垫种植组肿瘤生长迅速($P<0.05$),见图 2。接种 4 周后处死裸鼠,用直尺测量肿瘤大小。左、右侧近腋窝种植组肿瘤体积明显大于左侧后肢和左后爪垫种植组($P<0.01$),见表 1。

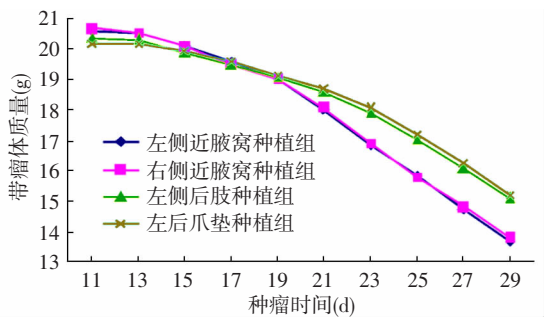


图 1 各组带瘤裸鼠的体质量变化

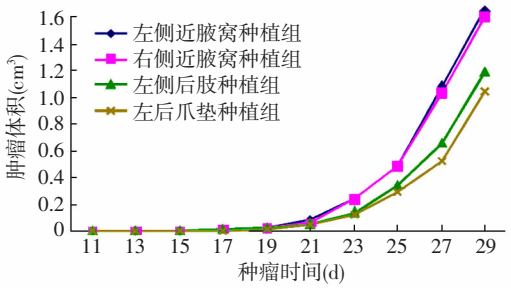


图 2 各组裸鼠肿瘤生长情况

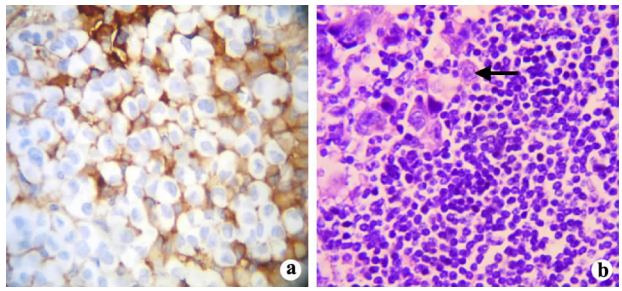
表 1 注射 4 周时移植瘤大小比较($\bar{x}\pm s$)

分组	数目	移植瘤大小(cm^3)
左侧近腋窝种植组	5	1.68 ± 0.11
右侧近腋窝种植组	5	1.60 ± 0.11 *
左侧后肢种植组	5	1.19 ± 0.09#
左后爪垫种植组	5	1.04 ± 0.04△

*:与左侧近腋窝种植组比较,$P>0.05$;#:与左侧近腋窝种植组比较,$P<0.05$;△:与左侧近腋窝种植组比较,$P<0.01$

2.4 肿瘤淋巴结转移情况

免疫组化检测移植瘤内的特异性指标 LYVE-1 证实均有新生淋巴管生成(图 3a)。HE 染色显示部分淋巴结有肿瘤转移(图 3b)。左、右侧背部近腋窝种植组、左侧后肢种植组和左后爪垫种植组的淋巴结转移率分别为 41.7%、42.9%、23.1% 和 21.4%。左、右侧背部近腋窝种植组以同侧颈部、腋窝淋巴结转移为主,后肢种植组以同侧腹股沟和腘窝淋巴结转移为主,爪垫种植组以同侧腘窝转移为主。



a:移植瘤免疫组化 LYVE-1 的表达(×400);b:淋巴结 HE 染色见异形细胞(×400)

图 3 移植瘤的淋巴结转移

3 讨论

肿瘤动物模型比细胞模型能更好模拟人体内的肿瘤生长环境[2],主要分为自发瘤模型、诱导瘤模型、移植瘤模型和转基因肿瘤动物模型等 4 种[3]。其构建方法各有优缺点,移植瘤模型因具有可操作性强,成瘤周期短,并且在一定程度上符合人类肿瘤形成的病理过程等特点,是应用最多的肿瘤动物模型构建方法[4]。皮下移植具有成功率高、易于动态观察的优点[5],不同的移植部位对瘤体的生长速度、发生淋巴结转移等

情况有影响。Oquni 等[6]建立了背部的G-361黑色素裸鼠皮下移植瘤模型,出现了较多的腋窝淋巴结和肺转移。Jia 等[7]建立了左后肢的结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型,同样用于观察淋巴转移和血管生成等情况。在乳腺癌[8]、胃癌[9]均有相关模型构建的报道。爪垫的皮下具有丰富的淋巴管,并呈单向淋巴引流,常见的淋巴转移方向为腘窝淋巴结和腹股沟淋巴结[10]。后肢作为移植瘤接种部位时,常见的转移部位是腘窝淋巴结,位置比较固定,而且可能只有这个位置[11]。转移率和转移程度与使用的细胞个数相关。但目前多数研究均采用单一部位的移植瘤模型,而缺乏关于不同部位的皮下移植瘤的构建可操作性、肿瘤生长浸润情况和淋巴转移等对比的报道,研究方法尚不统一,难以较准确地考察肿瘤生长和淋巴转移情况。因此,本实验以 BALB/c 裸鼠为研究对象,选取左侧背部近腋窝、右侧背部近腋窝、左侧后肢、左后爪垫等不同部位分别注射人肺腺癌 A549 细胞,建立了多组皮下移植瘤模型。

本实验结果发现,左侧背部近腋窝、右侧背部近腋窝、左侧后肢、左后爪垫等不同部位裸鼠均全部成瘤,成瘤率方面无差别。但左、右侧背部近腋窝种植组平均于 11 d 后可见成瘤,后肢种植组和左后爪垫种植组平均约 13 d 后可见成瘤;移植 4 周时背部近腋窝种植组比后肢和爪垫组的肿瘤体积大且更易于剥离,移植瘤造成裸鼠体质量和活动量明显降低,皮肤松弛度和消瘦程度更加明显,说明移植瘤的接种部位对产生的恶病质程度有一定影响。左右两侧背部近腋窝组比较无明显差异,而较后肢和爪垫种植组肿瘤生长迅速,说明注射部位对肿瘤的生长速度有一定影响,这与移植部位的血供是否丰富和周围组织是否疏松等相关[12],背部近腋窝处具有更丰富的血供和疏松的组织。

本实验通过免疫组化检测移植瘤内的特异性指标 LYVE-1 证实各组移植瘤均有新生淋巴管生成,说明人肺腺癌 A549 细胞注射构建的裸鼠皮下移植瘤均有产生新生淋巴管性能,可能导致淋巴转移。进一步收集各部位浅表淋巴结,显示部分淋巴结有肿瘤转移,左、右侧背部近腋窝种植组以同侧颈部、腋窝淋巴结转移为主,后肢种植组以同侧腹股沟淋巴结转移为主,爪垫种植组以同侧腘窝转移为主,这与不同部位的固有淋巴引流区域有关。左、右侧背部近腋窝种植组、左侧后肢种植组和左后爪垫种植组的淋巴结转移率有所不同。背部近腋窝种植组淋巴转移率明显高于后肢和爪垫种植组,这可能与背部皮下相对松弛,近腋窝处淋巴管网丰富且易于产生新生淋巴管有关。但各组皮下移植瘤淋巴结转移率均不算高,这可能与皮下移植方法本身淋巴转移发生率较低和接种细胞数较少及成瘤时间不长有关[13]。实验还发现,虽然左、右侧背部近腋窝种植组肿瘤生长和淋巴转移率无明显差异,但按通常的裸鼠抓持方法,左侧背部近腋窝种植注射肿瘤细胞较右侧操作更为方便。

综上所述,通过比较研究,我们筛选出了左侧背部近腋窝处皮下注射肿瘤细胞是构建人肺腺癌皮下移植瘤淋巴转移模型的优选方案。它可为肺腺癌淋巴转移的机制探讨和诊断治疗研究提供较理想的动物模型。

[参考文献]

[1] Reuben JM, Krishnamurthy S, Woodward W, et al. The role of circulating tumor cells in breast cancer diagnosis and prediction of therapy[J]. Expert Opin Med Diagn, 2008, 2(4): 339 – 348.

[2] 陈绍勤,林素勇,戴起宝,等. 肿瘤转移抑制基因 Kiss-1 对构建原代人结直肠癌裸鼠肝转移瘤模型的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(2): 209 – 211.

[3] 万继英,韩庶勇. 肿瘤实验动物模型的建立及应用研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(19): 2959 – 2961.

[4] Yah H, Blackburn AC, McLary SC, et al. Pathways contributing to development of spontaneous mammary tumors in BALB/c – Trp53 +/ – mice [J]. Am J Pathol, 2010, 176(3): 1421 – 1432.

[5] 宋 超,廖文彪,杨嗣星,等. 可发光可连续检测原位前列腺癌模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(6): 1192 – 1195.

[6] Oguni A, Umeda M, Shigeta T, et al. The influence of surgical procedure and the effect of chemotherapy on nodal and distant metastases of human malignant melanomas that have been grafted into nude mice[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010, 39(1): 42 – 49.

[7] Jia Y, Liu M, Huang W, et al. Recombinant human endostatin endostar inhibits tumor growth and metastasis in a mouse xenograft model of colon cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(2): 315 – 323.

[8] Pathak AP, Artemov D, Neeman M, et al. Lymph node metastasis in breast cancer xenografts is associated with increased regions of extravascular drain, lymphatic vessel area, and invasive phenotype[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5151 – 5158.

[9] Iwata C, Kano MR, Komuro A, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10181 – 10189.

[10] 李兰双,胡丽娜. 宫颈癌淋巴道转移模型的建立及 Prox-1 临床意义初探[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1585 – 1588.

[11] 李生娇,吕春堂,郭 伟,等. 125I 标记的 Flt4 多抗检测荷瘤小鼠前哨淋巴结的探讨[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2): 112 – 115.

[12] Lam P, Yang W, Amemiya Y, et al. A human bone NOD/SCID mouse model to distinguish metastatic potential in primary breast cancers[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(11): 1010 – 1017.

[13] Sartelet H, Durrieu L, Fontaine F, et al. Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice[J]. In Vivo, 2012, 26(1): 19 – 29.

(编辑:余汇洋)