基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.018

2种人卵巢癌裸鼠移植瘤模型的生物学特性比较研究

蒲才秀，常淑芳，孙江川，刘红霞，朱　轶，陈　佳
（重庆医科大学附属第二医院妇产科，重庆　400010）

【摘　要】目的：建立人卵巢癌裸鼠腹腔及皮下移植瘤模型，比较2种模型的生物学特性。方法：采用细胞悬液注射法将人上皮性卵巢癌细胞A2780/DDP注射于裸鼠皮下或腹腔，建立人卵巢癌裸鼠移植瘤模型，观察模型动物肿瘤的生长规律及组织学特性，流式细胞术分析细胞周期分布，免疫组化检测促黄体激素释放激素受体(Luteinzing-hormone releasing hormone receptor，LHRH-R）表达情况。结果：裸鼠腹腔及皮下移植瘤模型的成瘤率均为100%，2组荷瘤鼠中位生存时间分别为（30.000±1.095）d和（41.000±0.894）d，2组移植瘤细胞周期分布与原代细胞周期分布相仿，且2种模型的组织形态学和超微结构相似，免疫组化显示均表达LHRH-R。结论：人卵巢癌细胞株A2780/DDP裸鼠皮下和腹腔移植瘤模型易于建立，腹腔移植瘤模型能更好地模拟人卵巢癌腹腔播散的生物学行为，是研究卵巢癌治疗较理想的动物模型。

【关键词】上皮性卵巢癌；动物模型；裸鼠；促黄体激素释放激素
【中国图书分类法分类号】R737.31　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-08-20

Comparative study of the biological characteristics of two human ovarian carcinoma models in nude mice

PU Cai-xiu, CHANG Shu-fang, SUN Jiang-chuan, LIU Hong-xia, ZHU Yi, CHEN Jia
(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish intraperitoneal (IP) injection model and subcutaneous (SC) injection model of human ovarian carcinoma in nude mice and compare their biological characteristics. *Methods*: The cell suspension derived from A2780/DDP were injected intraperitoneally or subcutaneously in nude mice to establish human epithelial ovarian carcinoma models, and their growth behavior and biological characteristics were observed. Distribution of cell cycles were analyzed by flow cytometry (FCM). Expression of LHRH-R were investigated by immunohistochemistry. *Results*: The human ovarian carcinoma models were established successfully. The success rate of transplantation in both groups were 100%. The median survival time lengths in IP group and SC group were 30.000±1.095 days and 41.000±0.894 days, respectively. FCM analysis showed the distribution of cell cycles of xenografted tumors in two groups were the same as those of A2780/DDP cells. Histology and electron microscopy showed the same characteristics and morphological properties in the two groups, and immunohistochemistry staining of LHRH-R were both positive. *Conclusion*: Human ovarian carcinoma models in nude mice are easy to establish. And the IP model may be an ideal model for treatment research of ovarian carcinoma as it simulates the intraperitoneally dessiminating behavior of human ovarian carcinoma in the patients.

【Key words】epithelial ovarian carcinoma; animal model; nude mice; luteinzing-hormone releasing hormone (LHRH)

卵巢癌的死亡率在妇科恶性肿瘤居首位[1]，而目前常规的手术、化疗和放疗难以进一步提高患者的生存率，因此，抗肿瘤药物靶向治疗卵巢癌倍受关注。近年来靶向给药系统的研究已经成为国内外药剂学研究的重点之一，选择合适的靶点成为肿瘤靶向治疗的关键。促黄体激素释放激素受体(Luteinzing-hormone releasing hormone receptor，LHRH-R)是近年发现的卵巢癌细胞表面的一种标志物，并成为卵巢癌新的治疗靶点[2,3]。具有高特异性表达LHRH-R的动物模型是研究卵巢癌LHRH-R靶向药物治疗的基础，本研究利用高表达LHRH-R的卵巢癌细胞株A2780/DDP[4,5]建立了人卵巢癌裸鼠的皮下和腹腔移植瘤模型，并对模型的生物学特性和LHRH-R的表达情况进行了观察，现报道如下。

作者介绍：蒲才秀(1983-)，女，硕士，
研究方向：卵巢癌的靶向治疗。
通信作者：常淑芳，女，副教授，Email: shfch2005@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：30801228)；重庆市自然科学基金资助项目(编号：CSTC,2008BB5405)；重庆市卫生局资助项目(编号：07-2-098)。

1　材料与方法

1.1　材料

细胞株：人上皮性卵巢癌细胞株A2780/DDP由华中科技大学同济医学院协和医院王泽华教授馈赠[6]。

动物：BALB/c-nu/nu 裸小鼠，雌性，4~5 龄，体重 14~17 g，SPF 级，购自中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所，合格证号为 SCXK（京）2009-0004，实验动物饲养在重庆医科大学实验动物中心独立送风隔离笼具（Individual Ventilated Cages，IVC）内。所需垫料、饲料和饮水均经灭菌处理，高效过滤器每小时换气 10~15 次，相对湿度保持在 46%~60%，每日保持 10 h 的光照，14 h 无光的阴暗周期。

主要试剂：RPMI1640 细胞培养基（Hyclone），新生小牛血清（哈森），兔抗人 LHRH-R 抗体（博奥森），SP 法免疫组化试剂盒（北京中杉），DAB 显色剂（北京中杉）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　A2780/DDP 细胞用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基，在 37℃，5%CO_2 细胞培养箱内培养。细胞培养箱内培养至对数生长期，细胞贴壁达 80%以上时，用 0.25%胰酶消化，制备细胞悬液，调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml 和 4×10^7 个/ml（即 0.2 ml 细胞悬液中含 A2780/DDP 细胞 4×10^6 个和 8×10^6 个）用于建模。

1.2.2　实验动物分组和动物模型建立　将裸小鼠共 12 只随机分为 2 组，即皮下移植瘤组和腹腔移植瘤组，每组 6 只。在超净台内，将皮下移植瘤组裸鼠在其右臀部皮肤用 75%乙醇消毒后，皮下注射 0.2 ml（2×10^7 个/ml）的 A2780/DDP 细胞悬液；将腹腔移植瘤组裸鼠在其腹部皮肤用 75%乙醇消毒后腹腔内注射 0.2 ml（4×10^7 个/ml）的 A2780/DDP 细胞悬液。建模后 21 d 每组随机处死 1 只裸鼠，余下的观察生存期。

1.2.3　一般特性观察　观察小鼠的活动、精神状态、体重变化、腹围改变等一般情况；记录皮下移植瘤组裸鼠肿瘤生长情况及腹腔移植瘤组裸鼠腹部可触及包块的形成时间，并用注射器试抽判定腹水生成时间；注意观察注射部位有无红肿、感染等改变，记录生存期。小鼠死亡后尸解，肉眼观察移植瘤生长部位、直径、质地、活动度、播散范围及脏器转移、腹水情况。

1.2.4　流式细胞术分析　机械法制备两组移植瘤细胞悬液，70%乙醇 4℃固定细胞，依次加 RNAase 和 PI 试剂，4℃避光孵育 20 min 后在流式细胞仪上检测，以 A2780/DDP 细胞做对照。

1.2.5　HE 染色观察　2 组裸鼠在建模后 21 d 随机每组选择 1 只处死，剥取移植肿瘤及卵巢，4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、5 μm 切片，经苏木精-伊红染色，在光学显微镜下观察。

1.2.6　免疫组织化学染色　移植肿瘤经石蜡包埋、切片后，行 LHRH-R 的免疫组织化学染色：一抗为兔抗人 LHRH-R 抗体，二抗为生物素标记羊抗兔 IgG，DAB 显色；染色步骤按试剂盒说明操作。

1.2.7　电镜观察　部分瘤组织用戊二醛-锇酸双重固定、脱水、浸透、包埋、切片、染色后，透射电镜下观察。

2　结　果

2.1　细胞培养结果

细胞复苏后第 1 天，复苏的细胞贴壁、伸展，2 d 后生长活跃，3~4 d 铺满瓶底，需传代培养。倒置显微镜下观察，A2780/DDP 细胞边缘清晰，均匀，呈梭形或不规则形（图 1）。

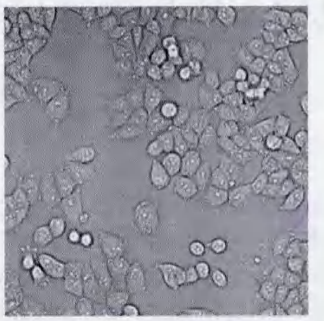


图 1　A2780/DDP 倒置显微镜下细胞形态（×200）

2.2　肿瘤形成情况

皮下移植瘤组（图 2）：接种后 2~3 d 可见界限清晰质软的“假瘤样”皮下结节，即炎性反应，潜伏期 7~10 d。接着裸鼠局部皮下出现球形或结节状突起，直径约 3 mm 质地略软，张力较大，外被包膜，瘤体与周围组织界限清，易分离，肿瘤生长速度快；部分肿瘤出现坏死，表面呈暗紫红色，有的肿瘤可见表面血管；当肿瘤直径达 1.5 cm 以后，生长速度变缓慢，荷瘤鼠渐呈消瘦、精神萎靡及恶病质状态。成瘤率 100%（6/6），生存期约 37~43 d，尸检未见胸、腹腔脏器肿瘤转移灶及腹水生成。



图 2　皮下移植瘤模型（建模 15 d）

腹腔移植瘤组（图 3）：接种后的 2 周左右，小鼠腹部可扪及瘤结节。建瘤后 3 周剖腹探查：见腹腔内广泛散布多个大小不等的实性瘤结节，米粒至大黄豆粒大小。尤肠系膜上多见，并有少量淡黄色腹腔积液形成。尸解可见典型的肿瘤模式：腹膜表面，肠系膜上及肠管周围散在小肿瘤结节，大网膜上肿瘤融合成片，肝和脾的脏面形成瘤块，但肝实质没有受到侵犯，也没有发现肺部及肾脏的播散，裸鼠卵巢上未见肿瘤形成。裸鼠最终死于盆腹腔内肿瘤的广泛播散以及腹水造成的恶性消耗。成瘤率 100%（6/6），生存期为 26~34 d，80%（4/5）有血性腹水生成，腹水量在 0.5~2.1 ml 不等，最早在接种后 23 d 穿刺抽见。与皮下移植瘤组相比，肿瘤分布更广泛，肿块增大相互融合成片。2 组小鼠均 100%成瘤，成瘤潜伏期腹腔移植瘤组稍长，但腹腔移植瘤组裸鼠由于更易形成腹水，生存期明显缩短（见表 1）。



图 3 腹腔移植瘤模型（建模 21 d），见腹腔散在分布大小不均的肿瘤

表 1 2 组裸鼠接种肿瘤细胞后情况

项目	皮下移植瘤组	腹腔移植瘤组
平均成瘤潜伏期（d）	8.2 ± 1.3	13.8 ± 1.3
成瘤率（%）	100（6/6）	100（6/6）
中位生存时间（d）	41.000 ± 0.894	30.000 ± 1.095
平均腹水量（ml）	-	1.075 ± 0.714
腹水形成率（%）	0（0/5）	80（4/5）

2.3 瘤细胞周期测定

瘤细胞生长活跃，皮下移植瘤组 25%的细胞处于 S 期，15%的细胞处于 G_2–M 期；腹腔移植瘤组 29%的细胞处于 S期，12%的细胞处于 G_2–M 期，2 种模型瘤细胞周期的分布与对照细胞相仿（图 4、表 2）。

表 2 流式细胞仪检测人卵巢癌细胞周期分析（%）

	G_0–G_1	S	G_2–M	G_2/G_1	CV
A2780/DDP细胞	53.71	32.78	13.52	1.86	12.70
腹腔	59.44	28.82	11.75	1.86	12.79
皮下	60.30	24.91	14.79	1.90	11.71

2.3 肿瘤组织病理学检查

两组荷瘤鼠肿瘤组织光镜及电镜下表现相似，病理诊断为大细胞未分化癌。光镜下（图 5）见瘤细胞核大、深染、核分裂象多见，核质比大，这些肿瘤细胞具有上皮性细胞成片状生长特点，围绕较大血管生长，但无纤细的纤维脉管轴心形成，而间质来源细胞通常呈梭形，没有有成片生长的特性，细胞之间的联系不紧密。电镜下观察瘤细胞不规则形，核大，异形，核仁增多，胞质内可见线粒体，细胞间排列紧密，可见上皮性细胞特征性的紧密连接（桥粒）结构（图 6）。

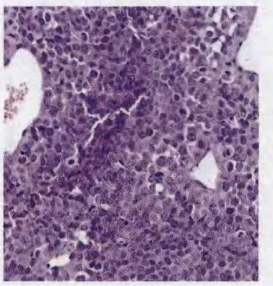


图 5 移植瘤组织学特征（HE × 200）

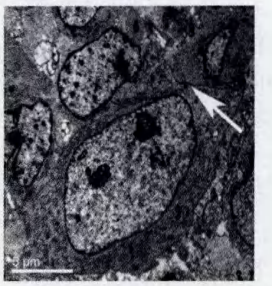


图 6 移植瘤透射电镜观察（× 4000），箭头所示为细胞间桥粒连接

2.4 裸鼠卵巢 HE 染色结果

光镜下见裸鼠卵巢（图 7）呈扁椭圆形，表面为单层扁平上皮或单层立方上皮，其实质分为皮质和髓质，二者无明显界限，皮质很厚，内含不同发育阶段的卵泡，两组裸鼠卵巢组织未见癌细胞浸润。

2.5 免疫组织化学结果

两组荷瘤鼠肿瘤组织均表达 LHRH-R，与抗 LHRH-R抗体特异结合，表现为细胞膜呈棕色染色（图 8）。

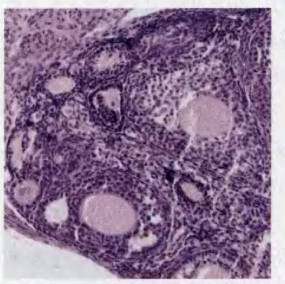


图 7 裸鼠卵巢光镜图片（HE × 200）

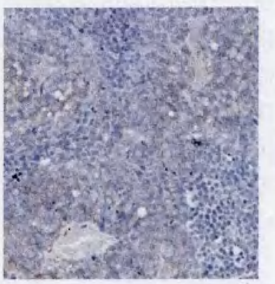
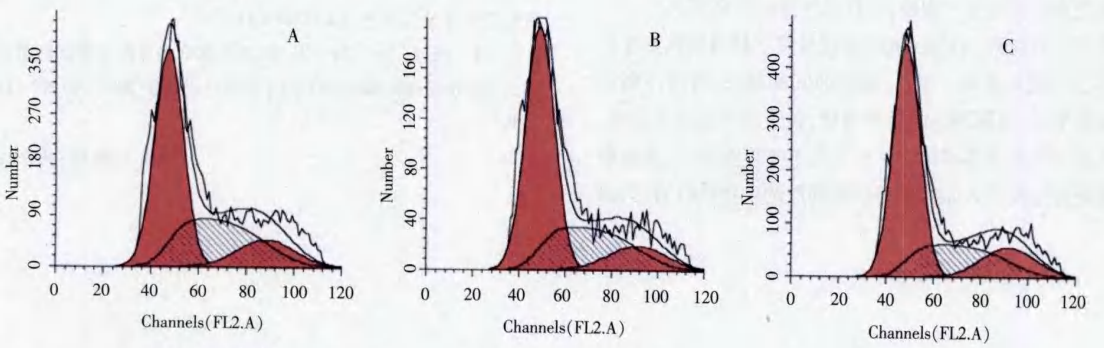


图 8 移植瘤 LHRH-R 的表达（× 200）

3 讨 论

自 1969 年 Rygard 等[7]首次将人结肠癌移植于裸鼠获得成功以后，裸鼠便广泛地应用于人类肿瘤的基础理论和临床



A. A2780/DDP 细胞　B. 腹腔移植瘤细胞　C. 皮下移植瘤细胞

图 4 人卵巢癌细胞 A2780/DDP 及其移植瘤细胞分布

治疗的实验性研究。人肿瘤裸鼠移植瘤模型模拟了体内肿瘤的特点，更接近人体内情况。裸鼠不仅具有 T 淋巴细胞免疫缺陷的特点，而且因为其具有近交系特点，个体间可保持相同的遗传学和生物学特性，最大限度的减少了个体差异，使实验结果更加准确可靠，可比性和重复性更好。

按照肿瘤来源，卵巢癌的动物模型有自发型、诱发型、移植型和基因工程型 4 种（移植型又包括人卵巢癌切除标本和人卵巢癌细胞株两种）。前两者均属于非人源性模型，生物学特性与人源性肿瘤有很大的区别，且建模时间长，Silva 等[8]曾报道用雌激素诱发了豚鼠卵巢上皮癌，潜伏期长达 6~10 个月。国内学者[9]近年将含有二甲基苯蒽的棉线局部植入 Fischer344 大鼠卵巢中成功诱导了大鼠卵巢癌，其成瘤时间约为 8 周。人卵巢癌切除标本和人卵巢癌细胞株移植的方法均保留了人肿瘤的遗传学及生物学特性，其中以细胞株培养后建模的方法相对简单，潜伏期短，移植成功率高；手术切除标本的移植瘤模型组织病理结构更接近原人卵巢癌，但建模时间长，难度大，原代移植成功率低，国内外文献报道成功率在 28%~40%[10]。我们选用卵巢癌 A2780/DDP 细胞株建立的 2 种卵巢癌模型，其成瘤率达 100%，经光镜、电镜下观察组织形态和超微结构基本特征相似，流式细胞术分析与原代肿瘤细胞周期分布相仿，且腹腔模型的腹水形成率达 80%。文献报道卵巢癌细胞株腹水瘤制备的细胞数不尽相同，代军等[11]建立的卵巢癌 3AO 细胞株裸鼠腹腔移植瘤伴腹水形成，其接种细胞数为 4×10^6 个；马杰等[12]建立的人卵巢癌 HO-8910 腹水模型所用的细胞数为 2.0×10^6 个，成瘤率为 100%。本实验选择 A2780/DDP 细胞株建立的腹腔移植瘤模型，腹水形成所用的细胞数为 8×10^6 个。

裸鼠移植瘤模型种植成功除了与移植细胞的浓度和数量及细胞的增殖能力有关，此外还与接种途径、接种部位、裸鼠的鼠龄、品系及健康状况有关。从实验中我们体会到在细胞接种法中需注意以下事项：(1)为提高成瘤率，细胞活力是至关重要的，首先要选择对数生长期细胞；(2)在收集细胞时使用消化液消化细胞的时间要把握好，不能消化过度；(3)从收集细胞到细胞接种应在较短的时间（小于 40 min）内完成，保证细胞活力；(4)为保证建模时细胞液不渗漏，皮下模型进针距离稍长后再推注细胞液，腹腔模型最好先在腹部皮下进针一段距离后再垂直入腹腔，退针后注意按压穿刺点。

通过实验观察，A2780/DDP 细胞株皮下移植瘤模型在原接种部位形成并呈单一生长，随着时间的推移，肿瘤不断向周围膨胀生长，与周围组织分界清楚，易于手术剥离和切除，因此更便于实验观察和检测。但与皮下瘤模型相比，腹腔瘤模型能更好地模拟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，也为研究腹腔内化疗开辟了新的实验空间，对卵巢癌治疗的实验研究更有意义。卵巢癌是性激素依赖性肿瘤，我们建立的两种卵巢癌细胞株模型均有 LHRH-R 的表达，LHRH-R 在癌组织的高表达可用于定向靶细胞化疗，从而增强传统化疗方法的抗肿瘤效应，为研究针对 LHRH-R 的靶向治疗卵巢癌建立了良好的动物模型。

参 考 文 献

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[2] Dharap S S, Wang Y, Chandna P, et al. Tumor specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 12962-12967.

[3] Ko S Y, Guo H, Barengo N, et al. Inhibition of ovarian cancer growth by a tumor-targeting peptide that binds eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(13): 4336-4347.

[4] Dharap S S, Qiu B, Williams G C, et al. Molecular targeting of drug delivery systems to ovarian cancer by BH3 and LHRH peptides[J]. Journal of Controlled Release, 2003, 91(1-2): 61-73.

[5] Taratula O, Garbuzenko O B, Kirkpatrick P, et al. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery[J]. J Control Release, 2009, 140(3): 284-293.

[6] 胡 沙，王 静，李智敏，等. EZH2 基因在人卵巢癌顺铂耐药株中的表达及其对细胞耐药性的影响[J]. 肿瘤，2010，30(9)：748-752.

[7] Rygaard J, Povlsen C O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice[J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 1969, 77(4): 758-760.

[8] Silva E G, Tornos C, Deavers M, et al. Induction of epithelial neoplasms in the ovaries of guinea pigs by estrogenic stimulation[J]. Gynecol Oncol, 1998, 71(2): 240-246.

[9] 邱丽楠，韩凤娟，范明明，等. 两种诱发 Fischer344 大鼠卵巢癌动物模型建立方法的比较[J]. 世界中西医结合杂志，2010，5(6)：488-490.

[10] 何国平，褚 芳，孙玉芳，等. 两种人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型的比较研究[J]. 实验动物与比较医学，2008，28(5)：328-330.

[11] 代 军，刘培淑，侯 萍，等. 人卵巢癌 3AO 裸鼠移植瘤模型的研究[J]. 医学研究杂志，2009，38(3)：36-37.

[12] 马 杰，赵卫东，马 娟，等. 基因修饰的自然杀伤细胞对荷人卵巢癌腹水瘤裸鼠模型的疗效[J]. 中国妇幼保健，2011，26(20)：3137-3139.

（责任编辑：冉明会）