临床病理研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1921-03

小鼠肝 S180 肉瘤种植性肿瘤的生物学特性

戴支凯,梁荣感,周巧灵,徐 庆,罗伟生
(桂林医学院药理学教研室,桂林 541004)

【摘 要】目的:建立小鼠肝 S180 肉瘤种植性肿瘤模型,观察其生物学特性,为肝肿瘤的实验研究提供动物模型平台。方法:采用 S180 肉瘤瘤块肝内种植的方法建立小鼠肝肿瘤模型,观察 S180 小鼠免疫器官指数、肿瘤大小、肿瘤转移及荷瘤小鼠寿命。采用 HE 染色观察肝肿瘤组织的形态结构。免疫组织化学检测肿瘤组织血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和肿瘤转移抑制蛋白 nm23 (nm23)的表达。结果:小鼠肝 S180 种植性肿瘤模型建立的成功率为 100%。S180 肝肿瘤小鼠寿命为(22.80 ± 5.87) d。随时间延长,S180 肝肿瘤小鼠体重逐渐增加、肿瘤体积逐渐增大、胸腺指数下降,出现腹水及转移的小鼠逐渐增多,无自发性消退现象。肿瘤组织生长旺盛,VEGF 呈阳性表达,nm23 呈阴性表达。结论:小鼠肝 S180 肉瘤种植性肿瘤模型是一种良好的肝肿瘤实验动物模型。

【关键词】小鼠;S180 肉瘤;肝肿瘤模型;生物学特性
【中国图书分类法分类号】R73-35+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-17

Biological characteristics of liver tumor in mice implanted with S180 sarcoma

DAI Zhi-kai, et al
(*Department of Pharmacology, Guilin Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To provide an animal model platform of experimental study on liver cancer by establishing a liver tumor model implanted with S180 sarcoma in mice and observing their biological characteristics. *Methods*: Intrahepatic implantation method was used to establish liver tumor model with S180 tumor piece in mice. Immune organ index, tumor size, tumor metastasis, and life-time of tumor-bearing mice were observed. Tumor tissue morphology was observed by HE staining. Immunohistochemistry was used to detect protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nm23 in tumor tissue. *Results*: Modeling achievement ratio of transplantation hepatocarcinoma model with S180 in mice was 100%. The average life expectancy of tumor-bearing mice was 22.80 ± 5.87 days. Body weight and tumor volume increased gradually in a time-dependent manner, but thymus index of the liver tumor mice tended to descend, and the number of mice with ascites and metastasis was gradually increased. Tumor tissue grew strongly; VEGF expression was positive and nm23 was negative in the tissue. *Conclusion*: The liver tumor model implanted with S180 sarcoma in mice is a good experimental animal model for experimental study on liver tumor.

【Key words】Mice; S180 sarcoma; Liver tumor model; Biological characteristics

作者介绍:戴支凯(1971-),副教授,硕士,研究方向:肿瘤药理。
通讯作者:罗伟生,男,教授,E-mail:Wsluo58@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30760281);广西教育厅科研项目(编号:桂教科[2006]26 号)。

目呈正相关,提示慢性乙肝患者家庭功能与其健康状态有相互影响关系,即家庭功能越好,患者的健康状态越好。当今医学模式逐渐由单一的生物模式向生物 - 心理 - 社会医学模式转变,人们逐渐重视各种社会因素在人体发病中的作用,它们在人类疾病的发生、发展、预后和转归中的作用是不容忽视的[5]。慢性乙肝作为一种慢性传染病,除了疾病本身及并发症对健康造成的危害外,患者的家庭功能对健康状态的影响是不可忽视的因素。医护人员不仅要重视患者本身在恢复健康中的作用,还应重视家庭功能与慢性乙肝患者健康状态之间的相互影响,要充分利用社会各方面的力量,尤其是家庭功能在促进患者康复中的重要作用。通过家庭功能评估发现患者家庭功能障碍的根源,有针对性的开展家庭主要成员及患者的咨询,帮助患者家属认识到家庭支持功能在患者康复中的重要性,鼓励家庭成员与患者沟通交流,帮助慢性乙肝患者与家庭建立亲密合作的关系,充分发挥家庭支持功能对健康状态的正态影响效应,从而提高患者的生活质量和健康水平,促进患者身心全面康复。

参 考 文 献

[1] 王绍锋,汪婉南,汤 雄,等. 健康教育对慢性乙型肝炎合并抑郁症患者的影响[J].中国健康教育,2006,22(5):376-377.
[2] 吕 繁,顾 媛. 家庭 APGAR 问卷及其临床应用[J]. 国外医学.医院管理分册,1995,2(2):56-59.
[3] 黄宏云,谢万忠,张淑梅,等. 晚期血吸虫病患者家庭功能与健康状态的关系[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(3):232-233.
[4] Smilkstein G.The physician and family function assessment[J]. Fam System Med, 1984,2(2):263-278.
[5] 温书敏,罗林丽. 38 例慢性乙肝患者的心理健康情况调查分析[J]. 现代预防医学,2008,35(3):527-528.

(责任编辑:关蕴良)

原发性肝癌是常见恶性肿瘤之一,居中国癌症患者死亡顺序的第 2 位。理想的肝癌动物模型是抗肝癌药物开发、肝癌发生发展机制研究、肝癌介入治疗及诊断研究的必备工具。肝癌动物模型分为自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植性肝癌模型以及转基因动物肝癌模型。其中,采用移植方法制作肝癌模型是国际上普遍接受的研究人类癌症生长、侵袭和转移的重要手段。小鼠具有价廉、易获得、易饲养等优点,已成为肝癌模型制作不可忽视的动物源。张煜等[1]应用鼠源肝肿瘤细胞株 HepS 采用注射法建立了小鼠肝肿瘤模型,韩克起等[2]应用腹水型肝肿瘤细胞株 H22 的瘤块建立了小鼠肝肿瘤原位移植模型,但尚未见应用 S180 肉瘤建立小鼠肝肿瘤模型的报道。本研究采用 S180 瘤块接种的方法建立了小鼠肝肿瘤模型,并对其生物学特性进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料

昆明种小鼠,(20 ± 2) g,雌雄各半,50 只,由桂林医学院 SPF 级动物中心提供,并在 SPF 实验室内完成本研究。S180 细胞株购自中科院上海细胞生物学研究所。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)、肿瘤转移抑制蛋白 nm23(nm23)的Ⅰ抗和Ⅱ抗均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 S180 肉瘤块的准备 复苏 S180 细胞株,经离心、PBS 洗涤后,制成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液,接种于小鼠腋后线皮下,每只 0.5 ml。肿瘤长至 1 cm 左右时(约 10 d),无菌状态下完整取出瘤组织,放入预冷的 RPMI-1640 溶液中,剔除外周纤维组织、血管及中央坏死组织,取鱼肉状组织切成 2 mm × 1 mm 瘤块备用。

1.2.2 小鼠肝原位移植性肿瘤模型的建立 采取肝内隧道植入法。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,60 mg/kg。将小鼠仰卧,固定于鼠板。常规消毒,沿腹中线剪开,暴露肝叶,挤出肝左外叶。用直眼科镊在肝左外叶中间部位沿肝叶平面约 20°角轻戳 1 个约 3 mm 深的隧道。用棉签轻压止血。用弯眼科镊夹取 1 瘤块,小心送入隧道内,用浸泡凝血酶的棉签轻压 1 min。缝合关闭腹腔,皮肤用碘酒消毒。

1.2.3 实验分组及一般指标观察 实验分为 5 组,即 7、12、17 d 和 22 d 的观察组和寿命观察组,每组 10 只。分别于接种后的第 7、12、17、22 d,小鼠称重,处死各肿瘤观察组的荷瘤小鼠,取出肝肿瘤,游标卡尺测肿瘤大小,根据公式($V=ab^2$,a 为瘤体的最长径,b 为最短径)计算瘤体积[3]。同时取出胸腺和脾脏,计算胸腺指数和脾脏指数。同时观察是否存在腹水生成和肿瘤转移情况。自瘤块接种之日起,观察寿命观察组小鼠的寿命。

1.2.4 肝肿瘤的组织学观察 瘤组织经 10%福尔马林固定,行石蜡切片,HE 染色,镜下观察瘤组织形态结构。免疫组化检测:石蜡切片经脱蜡、灭活、透明、修复后,BSA 封闭,加入一抗,4℃过夜。加入二抗,滴加 SABC,DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间均数比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 肝肿瘤模型小鼠寿命

以 S180 肝肿瘤模型小鼠建立之日起计算,S180 肝肿瘤小鼠寿命观察组的小鼠寿命平均为(22.80 ± 5.87) d。小鼠死亡后,开腹观察,均见有肝内肿瘤存在。

2.2 肝肿瘤模型小鼠一般生物学特性

所有受试小鼠均见肝肿瘤产生。于 S180 肝肿瘤模型小鼠建立的第 22 d 的肿瘤观察组中,1 只小鼠于第 21 d 死于肝肿瘤及腹水,未纳入统计范围。S180 肝肿瘤模型小鼠建立后,随时间的延长,小鼠体重逐渐增加,肝内肿瘤的体积逐渐增大,胸腺指数下降($P<0.01$,与 7 d 组比),脾指数无明显变化;腹水动物数和出现肿瘤转移的动物逐渐增多,有些带有血性腹水,部分小鼠有消化道出血,多数小鼠出现消瘦等临床特征[4]。肿瘤的转移部位主要为肠系膜和腹膜,个别小鼠肝内出现多个结节状的肿瘤转移灶(表 1)。

瘤组织呈灰白色,与周围肝组织界限清晰,组织的质地较硬,晚期肿瘤切面见肿瘤中央出现坏死(图 1A)。取瘤组织,4%福尔马林固定,石蜡切片,HE 染色。可见肝组织细胞较疏松,肝细胞排列规则;肿瘤细胞致密、均匀,成束和水流样的结构,肿瘤细胞圆形、椭圆形或不规则,胞浆染色较深,核大呈多形性,可见核分裂现象(图 1B)。

2.3 免疫组化

VEGF 和 nm23 蛋白位于细胞质,肿瘤细胞胞浆出现棕黄色颗粒即为阳性染色。在模型小鼠肝肿瘤组织切片中未见到明显着色细胞,即 nm23 呈阴性表达。而 VEGF 呈现阳性表达(图 2)。

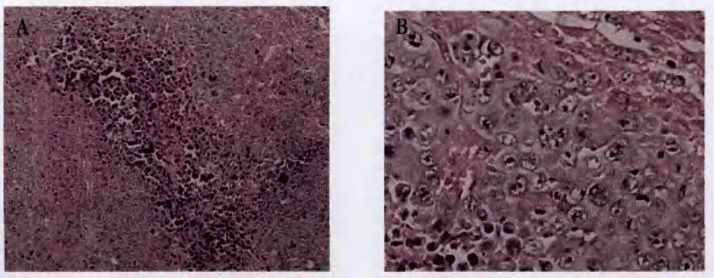


图 1 小鼠种植性 S180 肝肿瘤组织 HE 染色(A.100×,B.400×)

表 1 不同时间 S180 肝肿瘤小鼠的免疫器官指数、肿瘤大小及转移情况

组别	动物数(只)	体重(g)	胸腺指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)	肿瘤体积(mm^3)	腹水动物数	转移动物数
7 d	10	27.00 ± 2.79	4.10 ± 1.15	5.62 ± 1.40	24.03 ± 21.15	0	0
12 d	10	31.70 ± 2.06**	2.72 ± 0.69**	5.09 ± 1.98	51.94 ± 43.05	3	0
17 d	10	34.10 ± 4.53**	1.94 ± 1.79**	4.42 ± 2.13	104.67 ± 2.24**	4	4
22 d	9	38.33 ± 4.39**##	2.65 ± 0.81**	4.44 ± 1.11	334.19 ± 170.87**##ΔΔ	5	3

**P<0.01 与 7 d 组比；##P<0.01 与 12 d 组比；ΔΔP<0.01 与 17 d 组比。

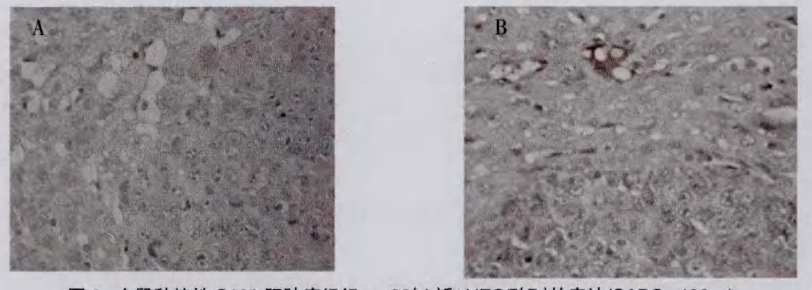


图 2 小鼠种植性 S180 肝肿瘤组织 nm23(A)和 VEGF(B)的表达(SABC，400×)

3 讨 论

肝肿瘤移植模型的建立，为人类更好地研究肝肿瘤的转移机制和抗肿瘤药物筛选提供了理想的工具。小鼠与人类基因同源性高，其繁殖周期短、经济、易得、易饲养，因此成为肿瘤动物模型的首选。

本研究选用 S180 细胞株作为瘤源，在小鼠皮下形成肉瘤，使其提前适应鼠体，提高了细胞种植肝脏后的成活率，在受试小鼠肝脏中肿瘤迅速生长增殖，成瘤周期大大缩短，种植成功率为 100%。该模型小鼠平均寿命为(22.80 ± 5.87) d。瘤块移植后，可见肿瘤逐渐生长，于种植后的第 7、12、17 d 和 22 d 小鼠肝肿瘤直径分别为(0.39 ± 0.19)、(0.57 ± 0.26)、(0.66 ± 0.21) cm 和 (1.06 ± 0.23) cm。瘤组织切片见肿瘤细胞生长旺盛，细胞分裂相明显。临床上肝肿瘤病人晚期常出现恶性肿瘤的全身性表现(如进行性消瘦、发热、食欲不振、乏力、营养不良和恶病质等)以及转移灶症状。本研究结果显示，随小鼠生存期延长，出现消瘦、腹水、肿瘤灶转移、消化道出血等，表明该模型是一种良好的肝肿瘤动物模型。

肿瘤的血管生成是一个局部微环境、癌基因与抑癌基因等因素共同参与，最后通过影响血管生成正负因子之间的平衡状态进行调节的复杂的病理生理过程。其中，VEGF 和 nm23 在其中起重要的作用。VEGF 是目前已知作用最强的促血管生成因子，在肿瘤组织中表达上调[5]，通过促进肿瘤新生血管的形成、诱导淋巴管增生和扩张，使肿瘤的生长加快，肿瘤细胞进入淋巴管和淋巴结导致转移，VEGF 还可通过抑制树突状细胞成熟诱导免疫抑制，使肿瘤细胞发生免疫逃逸。VEGF 已成为多种肿瘤治疗的靶点[6]。nm23 是公认的转移抑制基因[7]，其编码的 NDPK 通过调节蛋白介导的信号细胞传导反应，参与细胞发育和肿瘤发展。nm23 阳性表达与乳腺癌的低复发、低转移有关[8]。Chen 等[9]研究发现，CYP2J2 抑制剂具有促进 nm23 的表达，产生抑制 MDA-MB-435 细胞移植动物模型肿瘤生长、减少肿瘤肺转移的作用。研究结果提示，S180 肝肿瘤组织 nm23 呈阴性表达，而 VEGF 呈现阳性表达。提示，S180 肝肿瘤组织的生长、浸润与腹腔转移等特征可能与 VEGF 和 nm23 的表达相关。

理想的肿瘤动物模型应当能在肿瘤生物学的基础研究和药物筛选中反映人类癌症真实情况，同时也应具备制作简便、迅速、成功率高、价格低廉且可以大批制作的特点。本研究建立的小鼠肝肿瘤模型具有肿瘤形成周期短、肿瘤移植成功率高(100%)、成本低、瘤体一致性较好、制作方法简便易行等优点，一般接种后 2 周即可用于肝肿瘤的实验研究，是建立移植性肝肿瘤模型的理想选择。

参 考 文 献

[1] 张 煜，徐涵文，张太平，等. 注射法制作 ICR 小鼠肝癌模型及其改进[J]. 细胞生物学杂志，2007，29(3)：434-438.

[2] 韩克起，顾 伟，胡 侠，等. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及生物学特性[J]. 中西医结合学报，2004，2(5)：372-374.

[3] 顾 伟，沈 婕，翟笑枫. 大鼠移植性肝癌模型生物学行为与分期的初步探讨[J]. 中西医结合学报，2005，3(2)：136-138.

[4] Hussain S A，Ferry D R，El-Gazzaz G，et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Ann Oncol，2001，12(2)：161-172.

[5] Ghosh S，Sullivan C A W，Zerkowski M P，et al. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1，VEGFR-2，neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer[J]. Human Pathology，2008，39(12)：1835-1843.

[6] Chen C，Yu D C，Teng L S. Development of anti-tumor drugs gargeting VEGF/VEGFR：a progress[J]. Chinese Journal of Canner Biotherapy，2007，14(3)：297-296.

[7] Zhang C，Lv F，Zhou L，et al. Effect of verapamil on the expression of EGFR and NM23 in A549 human lung cancer cells[J]. Anticancer Res，2009，29(1)：27-32.

[8] 孙治君，周 鑫，姚榛祥，等. P-gp 和 nm23、P53 在多原发乳腺癌组织的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报，2003，32(2)：134-137.

[9] Chen C，Li G，Liao W，et al. Selective inhibitors of CYP2J2 related to terfenadine exhibit strong activity against human cancers in vitro and in vivo[J]. J Pharmacol Exp Ther，2009，329(3)：908-918.

(责任编辑：张学颖)