维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0073-04

快速建立裸鼠胶质瘤模型的实验研究

李承科[1],霍 钢[1],郑履平[1],唐文渊[1],肖 刚[1],兰胡翔[1],张旭东[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016;2. 重庆医科大学公共卫生学院卫生统计教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨快速建立裸鼠 C6 型脑胶质瘤动物模型的方法及在科研实验中应用的可行性。方法:将 C6 型鼠胶质瘤细胞悬液分别接种至雌雄裸鼠皮下,或用瘤组织块行异体移植至雌雄裸鼠皮下,观察裸鼠皮下移植瘤长出时间,并研究肿瘤的病理组织学及免疫组织化学特征。结果:(1)两种方法所建肿瘤模型其成功率均为 100%,肿瘤生长状况良好,肿瘤病理组织学及免疫组织化学检查均符合胶质瘤细胞的形态学特征;(2)采用细胞接种法建立裸鼠脑胶质瘤模型所需的时间长,在雌雄裸鼠皮下生长速度不一,差别有统计学意义,$P<0.05$;(3)采用瘤组织块行异体移植法建立的肿瘤模型,其所需时间均较细胞接种法明显缩短,雌雄裸鼠肿瘤组织块生长速度基本相同,差别没有统计学意义,$P>0.05$。结论:(1)利用肿瘤组织块移植的方法可快速建立裸鼠皮下移植瘤模型,并能作为研究胶质瘤发病机制、生物学特性以及基因治疗的可靠动物模型;(2)利用肿瘤组织块异体移植的方法,可以缩短肿瘤研究中用于建立动物模型的时间,节约经济成本。

【关键词】神经胶质瘤;疾病动物模型;裸小鼠;病理及免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Experimental study on the rapid establishment of nude mice glioma model

LI Cheng-ke, et al

(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the rapid establishment of nude mice-C6 glioma model and its application feasibility in research experiments. *Methods*: C6 mice glioma cell-suspension was inolulated to the male and female nude mice subcutaneously. The period for tumor tissue to grow out was detected and the histological and immunohistochemical features of tumor were observed. Tumor tissue was used to do allograft transplant for the male and female nude subcutaneously. The sprouted time of subcutaneous transplant tumor in nude mice was detected. Pathological and immunohistochemical features of tumor were studied. *Results*: (1)Success rates of both two methods were 100%, tumor grew in good condition, and the histological and immunohistochemical examination results of tumor were consistent with glioma cell morphology; (2)The method of cell inoculation to establish model took a long time. Tumor growing speeds in male and female nude mice were different and the difference had statistical significance($P<0.05$); (3)Tumor tissue allograft transplant took shorter timer. Tumor growing speeds in male and female basically the same, without statistical significant difference($P>0.05$) *Conclusion*: (1)Tumor tissue transplant can establish subcutaneous xenograft model quickly, and to provide the reliable animal model for studying of glioma、biological characteristics and gene therapy; (2)Tumor tissue allograft can shorten the establishment time of animal models saving the cost of scientific research。

【Key words】 Glioma; Disease animal model; Nude mice; Pathology and immunohistochemistry

无胸腺裸鼠作为一种新的动物模型,广泛应用于肿瘤学、免疫学、毒理学等各个领域的研究工作中,因此利用裸鼠建立肿瘤模型是人们研究人类肿瘤生物特性以及肿瘤治疗常用的实验模型。本实验为探索一种新的建立神经胶质瘤动物模型的方法而制作了荷大鼠胶质瘤的裸小鼠模型,并研究其病理组织学及免疫组织化学特征,现报道如下。

1 材料与方法

作者介绍:李承科(1981-),男,硕士,
主要研究方向:恶性胶质瘤的基础与临床。

通讯作者:霍 钢(1963-),男,副教授,联系电话:023-89011147。

基金项目:重庆市卫生局科研项目:微泡造影剂协同增强聚焦超声治疗胶质瘤的探讨(编号:05-2-202)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及器材 大鼠胶质瘤细胞是 C6 细胞株,由第三军医大学卞修武教授惠赠;1640 培养基,胰蛋白酶,新生小牛血清:重庆辛创生物制品公司;胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)单抗,DAB 显色试剂盒:北京中杉生物制品公司。0.1ml 微量注射器,游标卡尺,眼科剪,眼科镊及眼科专用非吸收型无菌无损伤爱尔康康明医用缝线(尼龙,10-0)。实验动物外科用手术包。

1.1.2 动物 BALR/c 裸小鼠:♀,鼠龄 5~6 周,体重 15~20g;♂,鼠龄 5~6 周,体重 18~24g;购于北京维通利华实验动物技术有限公司〔SCXK(京)2002-003〕,饲养于重庆医科大学动物实验中心〔SCXK(渝)20020001〕。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大鼠 C6 胶质瘤细胞培养于含 10%血清的 1640 培养基(青霉素 10^5U/L,链霉素 100mg/L)中,置于 37℃、5%CO_2 孵箱培养至对数生长期。

1.2.2 肿瘤接种

1.2.2.1 瘤细胞悬液接种法 取对数生长期细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化,离心去上清液,而后用无血清 1640 培养液离心洗涤 2 次,计数细胞数,调整细胞浓度,将细胞悬浮于 PBS(0.01mol/L、pH7.4)中,细胞浓度为 2.5×10^5 个/L。然后用 100μl 的微量注射器抽取细胞悬液 100μl,接种于裸鼠背部皮下。该组接种雌雄裸鼠各 6 只。

1.2.2.2 瘤组织块接种法 经细胞接种而成功的移植瘤,进行裸鼠肿瘤异体移植。按每 100g 裸鼠注射 0.2ml 的剂量,将 2.5%戊巴比妥溶液注入裸鼠腹腔,在严格无菌的条件下于超净工作台上切取适当大小的肿瘤组织,修剪肿瘤组织,去除脂肪和坏死肿瘤组织,将其剪成约 $1mm^3$ 大小的瘤组织块,待接种时用。用 0.9%的 NaCl 将 200mg 的硫酸阿米卡星配制成 1ml 溶液备用。接种前,用碘酊和乙醇消毒接种部位的皮肤,先用眼科剪将要接种的裸鼠背部皮肤剪开约 5~8mm,然后用眼科镊钳取一小瘤块,沿已经剪开的皮肤处进入皮下,用已准备好的眼科专用缝线缝合皮肤。该组接种雌雄裸鼠各 6 只。

1.2.3 肿瘤的观察和测量 裸鼠接种完毕后,每只裸鼠腹腔注入已配制好的硫酸阿米卡星溶液 0.1ml,置恒温(25℃±2℃)、恒湿(45%~50%)、无菌净化屏障系统内饲养,定期观察裸鼠精神、饮食和排便,用游标卡尺测量肿瘤结节的直径 D,根据公式计算肿瘤体积,$V=1/6\pi D^3$,求其平均值绘制肿瘤组织块的体积表。

1.2.4 病理组织学检查 处死裸鼠,详细观察移植瘤的大体形态。并取肿瘤组织固定于 4%的多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,组织切片,常规 HE 染色,作病理学检查。

1.2.5 免疫组化检测 GFAP 蛋白的表达 采用细胞接种法及采用肿瘤组织移植法建立的动物模型常规应用免疫组化(SP 法)检测 GFAP 蛋白的表达,阳性细胞呈现胞浆棕黄色着染,胞核苏木精复染。

2 结 果

2.1 病理学特征

在采用细胞接种及皮下移植的雌雄裸鼠背部均可见到肿瘤组织块,肿瘤组织随时间的延长而增大,处死裸鼠后肉眼分离见肿瘤组织呈结节状、灰白色,与皮肤不粘连,切面可见鱼肉状,部分肿瘤组织中心有坏死现象。光镜下形态特点:HE 染色切片中均可见肿瘤细胞多呈圆形或多角形,均匀分布,致密排列,细胞核呈圆形和椭圆形,染色质丰富,深

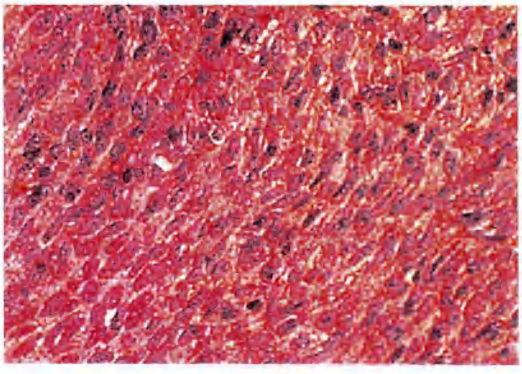


图 1.1 雌鼠肿瘤组织病理切片(HE×400)(细胞接种法)

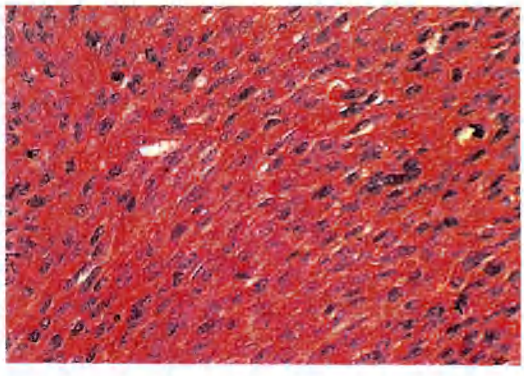


图 1.2 雌鼠肿瘤组织病理切片(HE×400)
(肿瘤组织异体移植法)

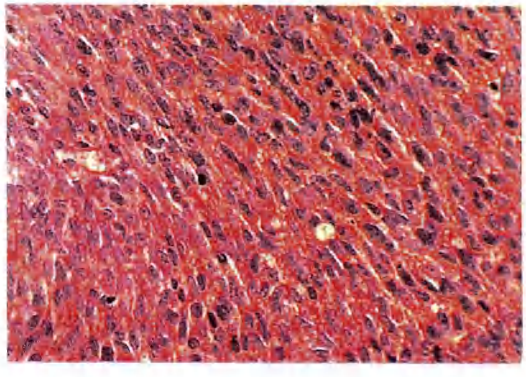


图 2.1 雄鼠肿瘤组织病理切片(HE×400)(细胞接种法)

维普资讯 http://www.cqvip.com

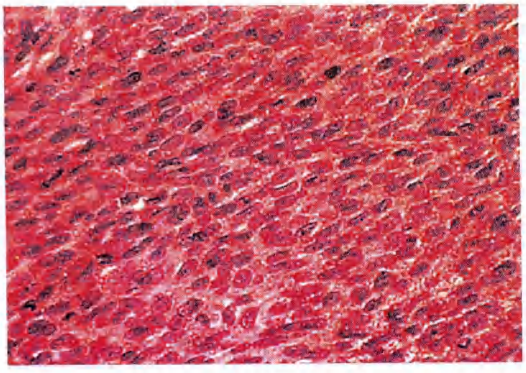


图 2.2 雄鼠肿瘤组织病理切片（HE×400）
（肿瘤组织异体移植法）

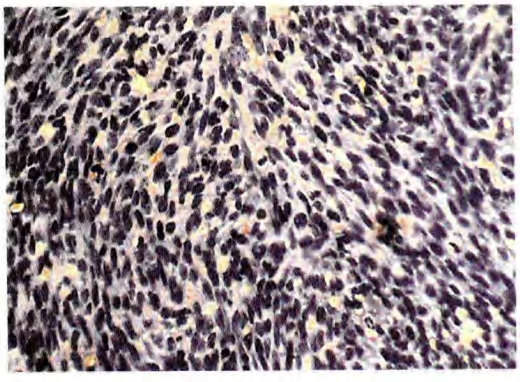


图 3.2 雄鼠细胞接种法（DAB 染色 ×400）

染，分裂像多见，呈异质性，胞浆较少，略嗜伊红，细胞间质少见（图 1.1、1.2，图 2.1、2.2）。

2.2 免疫组化检测 GFAP 蛋白的表达

在经细胞接种法形成的肿瘤组织中 GFAP 高表达（图 3.1、3.2），在经异体肿瘤组织移植形成的裸鼠胶质瘤组织 GFAP 也呈高表达（图 4.1、4.2）从而说明肿瘤细胞为胶质源性肿瘤，形成的裸鼠体内肿瘤的遗传性没有改变。

2.3 肿瘤组织的生长速度表

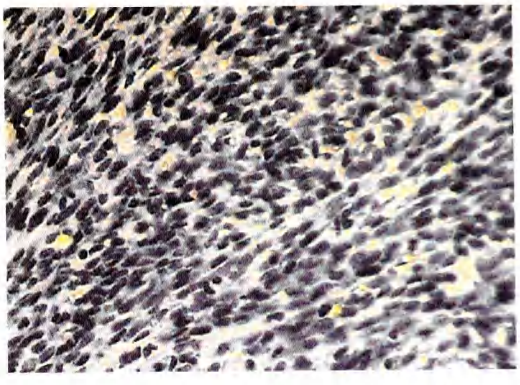


图 4.1 雌鼠异体肿瘤组织移植法（DAB 染色 ×400）

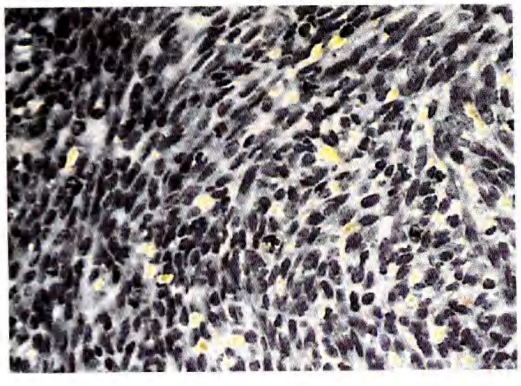


图 3.1 雌鼠细胞接种法（DAB 染色×400）

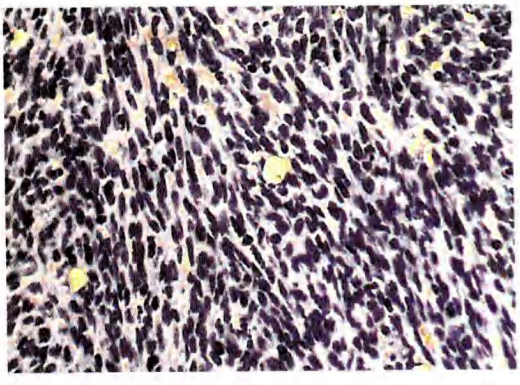


图 4.2 雄鼠异体肿瘤组织移植法（DAB 染色 ×400）

表 1 瘤细胞悬液接种法裸鼠肿瘤生长表

	n	6d	9d	12d	15d	18d
雄	6	0.79 ± 0.26	1.67 ± 0.65	4.08 ± 1.62	12.65 ± 3.80	39.28 ± 12.16
雌	6	0.08 ± 0.03	0.16 ± 0.08	0.54 ± 0.22	2.38 ± 0.96	8.66 ± 2.13
	n	21d	24d	27d	30d	
雄	6	95.73 ± 22.44	218.53 ± 42.85	474.22 ± 80.17	1023.48 ± 135.81	
雌	6	30.35 ± 7.38	81.06 ± 16.31	192.07 ± 37.91	471.00 ± 72.36	

F=68.77，P<0.01，差别有统计学意义。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 瘤组织块移植法裸鼠肿瘤生长表

	n	2d	4d	6d	8d	10d	12d
雄鼠	6	1.03 ± 0.13	8.54 ± 1.06	36.54 ± 1.99	121.79 ± 5.04	411.31 ± 46.22	831.99 ± 53.34
雌鼠	6	0.71 ± 0.23	7.19 ± 1.75	35.30 ± 3.62	120.86 ± 6.97	394.40 ± 52.27	803.74 ± 49.56

F=0.65, P>0.05, 差别有统计学意义。

细胞悬液接种法，需待肿瘤细胞增殖达一定数量时，才能观察到裸鼠背部出现凸起的肿瘤组织块。因此，肿瘤组织块的出现需经过一定的潜伏期，且随肿瘤类型、注射量的不同而不同。本实验每只裸鼠接种大鼠 C6 胶质瘤细胞约为 2.5×10^5 个，肿瘤形成的潜伏期平均为 6d，全部形成皮下胶质瘤，肿瘤组织块的形成及生长情况见表 1。所有数据均采用 SAS8.2 软件进行统计分析，数据分析采用重复测量资料的方差分析，不同性别的裸鼠在肿瘤生长上的差异具有统计学意义。

瘤组织块接种法，移植后经过 48 ~ 72h 左右可见皮肤伤口愈合并拆线，但行肿瘤组织异体移植后次日即可见皮下移植瘤形成，见表 2。

3 讨 论

裸小鼠是 1966 年发现和培育的一种小鼠突变株，此类小鼠先天无毛、无胸腺、T 淋巴细胞功能完全缺乏，对异种移植不产生排斥反应。因此，裸小鼠可作为一种新的动物模型，应用于肿瘤学、免疫学、毒理学等各个领域的研究工作中，尤其在肿瘤免疫、移植免疫、免疫生物学、免疫病理学、病毒和细菌免疫等领域，为实验肿瘤学、实验免疫学提供了新的有效的动物模型。1969 年 Rygaard 和 Povlsen 首次将人类结肠癌移植于裸小鼠皮下，成功地建立了裸鼠皮下移植瘤动物模型[1]。此后，人们相继建立了乳腺癌、肺癌、宫颈癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、黑色素瘤等肿瘤的裸小鼠肿瘤动物模型，并且移植肿瘤能够良好生长和传代。我国 1985 年开展脑肿瘤的裸小鼠的移植研究，实验证明移植的肿瘤仍保持原肿瘤的染色体组型、组织学形态以及肿瘤的生物学行为[2]。研究表明，理想的胶质瘤动物模型应具备：(1)肿瘤细胞具有胶质瘤细胞和恶性细胞的生物学特性，且体外能培养生长；(2)肿瘤能在较短时间内形成，能够测定肿瘤的生长率；(3) 肿瘤应具备与人脑胶质瘤相似的生长特征；(4) 模型动物应较小且经济；(5)用于治疗的动物模型应能够模拟人脑胶质瘤的治疗过程[3]。因此，在颅内肿瘤的基础研究实验中，建立可靠的胶质瘤动物模型是探讨胶质瘤发病机制以及开展各种治疗方法在体实验的基础。

大鼠 C6 胶质瘤细胞是国际上通用的胶质瘤细胞系，它与人类脑胶质母细胞瘤病理特征一致，常作为人们研究胶质瘤的细胞株之一[4]。本研究所制作的胶质瘤模型是将大鼠 C6 胶质瘤细胞移植到 BALR/c 系裸小鼠皮下，形成裸鼠皮下移植瘤。瘤细胞悬液接种法和瘤组织块接种法制作的胶质瘤模型其成功率均为 100%，且裸鼠生长状况良好。所有动物模型均经病理组织检查证实为典型的胶质瘤细胞特征，与采用细胞接种法所形成的肿瘤组织基本一致。GFAP 是一种胶质细胞所特有的细胞骨架蛋白，经免疫组化证实它是星形胶质细胞及其肿瘤的特异性标记物。本实验经 GFAP 检测证实 2 组实验动物的肿瘤模型均为胶质源性肿瘤，是进行胶质瘤研究的一种理想模型。

2 种方法相比较，在采用细胞接种法建立裸鼠胶质瘤模型时，接种于雄鼠的肿瘤组织块生长速度明显优于雌鼠，这可能与雌激素对肿瘤细胞生长的抑制作用有关[5,6]。目前，国内外有关雌激素对胶质瘤细胞生长产生抑制的报道甚少，本研究仅就此方面进行探讨。在进行瘤组织块移植建立模型时，雌雄裸鼠皮下肿瘤组织块的生长速度基本相同，但均优于细胞接种法。产生这一结果似乎未体现雌激素对胶质瘤组织的生长产生抑制作用，与采用细胞悬液接种法得到的结果相矛盾。国内外众多学者已经通过实验发现，胶质瘤细胞经过一定的生长周期后，其生长活性下降，细胞传代所需的时间延长；与细胞悬液接种法相比，进行异体移植组织块中的胶质瘤细胞经历了更多的生长周期，这可能是造成这一差异的一个原因，但具体的作用机制还有待进一步研究。当然，瘤细胞悬液接种法的肿瘤生长速度与细胞接种的数量密切有关，随着注射量的增加，其移植瘤的生长速度也会增加。国内绝大多数研究工作者在建立同样或同类的实验动物模型时，其接种的细胞浓度大约为 $(0.5\sim1.0) \times 10^6$ 个 /L，其形成组织块的潜伏期和生长至同样体积所用时间均较本实

(下转第 81 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

层细胞的密度要求较高。饲养层细胞密度过高,在与胚胎干细胞竞争养分的同时细胞本身易老化,易发生卷层现象,将胚胎干细胞包裹其中,无法分离。饲养层细胞密度过低,分泌分化抑制因子不足,胚胎干细胞易发生分化。由于种植的饲养层是经过丝裂霉素 C 处理后生长抑制的饲养层,所以饲养层的种植密度显得格外重要。实验证实 4 孔板或 24 孔板内 1×10^5~2×10^5 个/孔种植密度适中。

有关丝裂霉素 C 处理饲养层的研究报道较多,但结果差异较大[8,9],可能与丝裂霉素 C 的产地不同、各实验者操作具体方法不同有关。本实验为了建立可靠的胚胎干细胞培养平台,对实验所用丝裂霉素 C 的作用浓度、时间作了较为详细的筛选。实验表明丝裂霉素 C 抑制胎鼠成纤维细胞生长与作用浓度和时间均相关。浓度太小或时间太短对 MEF 抑制不够,浓度太大或时间太长会造成 MEF 死亡。一定范围内,低浓度丝裂霉素 C 延长作用时间与高浓度短时间作用效果相近。在我们的实验中丝裂霉素 C10μg/ml 作用 2.5~3.5h、20μg/ml 作用1.5~2.5h 抑制效果较好。结合胎鼠成纤维细胞对照组与丝裂霉素 C 处理组 1~7d 的生长曲线可看出实验制备的饲养层在 7d 内完全能维持在稳定水平,支持胚胎干细胞生长。

本实验探讨了饲养层制备的最适宜实验条件,成功分离克隆了从小鼠囊胚 ICM 来源的 ES 细胞,为本课题组成功搭建了胚胎干细胞实验操作平台。

参 考 文 献

[1] Evans M J,Kanfman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature,1981;292(5 819):154-156.

[2] Mataui Y,Zsebo K,Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. Cell,1992;70(5):841-847.

[3] Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998;282(5 391):1 145-1 147.

[4] Shamblott M J,Axelman J,Wang S,et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(23):13 726-13 731.

[5] Piedrahita JA,Anderson GB,BonDurant RH. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines[J]. Theriogenology,1990;34(5):865-877.

[6] 叶鑫生,许 田,汤锡芳,等.干细胞与发育生物学[M]. 北京:军事医学科学出版社,2000.185-190.

[7] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养 [M]. 西安: 兴界图书出版公司,2004.68-71.

[8] 熊吉信,刘小春,杨春江,等.小鼠胚胎干细胞饲养层的制备及两种不同饲养层的比较[J]. 江西医学院学报,2006;46(4):5-9.

[9] 时伟红,安志兴,董婉维.由体外受精囊胚获得 ICR 小鼠 ES 细胞[J]. 动物医学进展,2002;23(4):97-99.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 76 页)

验短[7],而在本研究中,由于接种的细胞浓度低,进行细胞培养的时间明显缩短,实验所花费的成本也得到明显降低,节约了科研成本。

当然,如能直接将胶质瘤组织移植到裸鼠颅内可能与基础及临床研究更为密切。但是,裸鼠颅内肿瘤不便于观察、测量,同时,也由于肿瘤组织生长迅速,较早产生颅内高压,使实验动物较早死亡。所以,裸鼠皮下移植瘤也不失为研究胶质瘤的生物学特性及其药物治疗等的重要实验模型,它可用于研究胶质瘤在体内的生物学行为,探讨肿瘤的发生机制以及胶质瘤的药物治疗、放射治疗,以及应用于基因治疗的相关研究。我们可以推断,利用裸鼠皮下肿瘤组织块移植法能够建立胶质瘤的动物模型,也可以利用相同的方法建立其他颅内肿瘤的实验动物模型,并能保证其肿瘤细胞的生物学特性不变,由此可以缩短肿瘤研究过程中用于建立动物模型的时间,降低建立动物模型的经济成本。

参 考 文 献

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

[2] 杜子威.人脑胶质瘤的研究[M]. 北京:原子能出版社,1992.1-10.

[3] 黄 强.脑肿瘤分子外科学[M]. 北京:中国科学技术出版社,1998.203-217.

[4] Peterson DL,Sheoilam PL,Brown WE. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions[J]. J Neurosurg,1994;80(5):865-876.

[5] Tedeschi-Blok N,Lee M,SiSon JD, et al. Inverse association of antioxidant and phytoestrogen nutrient intake with adult glioma in the San Francisco Bay Area: a case-control study[J]. BMC Cancer,2006;6:148.

[6] Mhyre AJ,Shapiro RA,Dorsa DM. Estradiol reduces nonclassical transcription at cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response elements in glioma cells expressing estrogen receptor alpha. Endocrinology[J]. 2006;147(4):1 796-1 804.

[7] 牛朝诗,徐纪文,罗其中.裸鼠胶质瘤模型的建立及其病理[J]. 安徽医科大学学报,2000;35(2):98-100.

(责任编辑:冉明会)