DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.003
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0287-04

论著

人CHG-5胶质瘤细胞裸鼠原位移植模型的建立及其生物学特性分析

徐承平,卞修武 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立人脑胶质瘤裸鼠脑内原位移植动物模型并探讨其生物学特性。方法 采用瘤细胞悬液接种法,将人脑CHG-5胶质瘤细胞接种于裸鼠大脑实质内。分别于接种后8、14、19、24和30 d处死动物并行病理检查、胶质纤维酸性蛋白免疫组化、染色体核型分析及透射电镜检查。结果 肿瘤移植成瘤率为100%,肿瘤生长稳定,肿瘤病理学检查符合人脑胶质瘤细胞的形态学特征和免疫表型。结论 本移植瘤模型能作为研究胶质瘤发生、生物学特性以及治疗研究的可靠动物模型。接种后14 d左右是利用该模型进行实验的最佳时机。

关键词:胶质瘤;动物模型;原位移植;裸鼠
中图法分类号:R-332;R73-352;R730.264 文献标识码:A

Establishment of orthotopic implantation model of human CHG-5 glioma cell line in nude mice and analysis of its biological features

XU Cheng-ping, BIAN Xiu-wu (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish an orthotopic implantation model of human glioma in nude mice and investigate its biological features. **Methods** The human CHG-5 glioma cells were inoculated into brains of nude mice. The animals were sacrificed at day 8, 14, 19, 24 and 30 after inoculation. The tumors were examined with light microscope, electron microscope, karyotype analysis and immunohistochemical stain for glial fibrillary acidic protein. **Results** Gliomas were formed in 100% in nude mice, and the growth of tumors was stable. The tumors showed the morphological features of human glioma with the immunophenotype. **Conclusion** The glioma model in nude mice is a reliable animal model for the study of the tumorigenesis and biological characteristics and therapy. The 14th day after inoculation might be suitable for experimental study.

Key words: glioma; animal model; orthotopic implantation; nude mice

恶性胶质瘤是最常见的中枢神经系统肿瘤之一,其侵袭性强、发病率高、位置特殊、预后差,严重威胁着人类健康。建立一个可靠的胶质瘤异种移植瘤模型,是研究胶质瘤生物学特性和各种体内实验研究的基础。近年研究表明,肿瘤的原位移植(Orthotopic implantation)动物模型是目前最为理想而可靠的肿瘤模型[1],但在脑部进行胶质瘤的原位移植瘤实验难度较大。为此,我们采用本室已建立的人脑恶性胶质瘤细胞系CHG-5细胞接种于免疫缺陷动物裸鼠脑内,建立了一种人脑胶质瘤原位移植动物模型。

1 材料与方法

1.1 胶质瘤细胞来源及培养

人脑间变性星形细胞瘤细胞系CHG-5由本室建立[2],按本室常规方法培养,即用含10%小牛血清(河南郑州产品)的RPMI1640(Hyclone公司)完全培养基,另添加适量HEPES、双抗(100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素)、3%谷氨酰胺,置37 ℃、5% CO_2混合气体孵箱中培养,细胞换液时间为1~2 d,每3~5 d传代1次,传代前用0.25%胰酶消化。

1.2 瘤细胞悬液的制备

取对数生长期的单层培养CHG-5细胞以0.25%胰酶消化,收集细胞,离心去上清,用无菌生理盐水离心洗涤2次,将细胞悬浮于生理盐水中,台盼蓝染色细胞活力测定大于90%,并进行细胞记数,调整细胞浓度为2×10^6/ml,置于冰上备用。接种细胞量1×10^4/只。

1.3 实验动物和接种方法

使用本校实验动物中心引进的近交系雌性BALB/c nu/nu无胸腺裸小鼠14只,体重15~20 g。鼠龄5~7周,饲养于SPF级无菌净化室内。接种部位为裸鼠右侧大脑尾状核。整个接种过程在层流超净台中进行。裸鼠经1%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,俯卧位固定头颅,75%酒精消毒头顶部皮肤后,接种部位的确定参照文献[3]并作适当修改,即在裸鼠额部距颅中线右侧2.5 mm,冠状缝前1 mm处先用直径为1 mm的牙科钻小心钻穿颅骨,然后用吸有5 μl瘤细胞悬液的微量进样器经孔垂直进入脑实质中,进针深度为针尖距颅骨表面3.5 mm,注射前

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
作者简介:徐承平(1972-),男,重庆市涪陵人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤诱导分化治疗和血管生成方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-08-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

将针稍微退回约0.5~1 mm，将瘤细胞悬液缓慢注入，除针前停留2 min，然后缓慢拔针。术后无须抗感染。

1.4 移植瘤生长的观察和测量

定期观察裸鼠的精神、饮食、排便、体重和活动等情况，并分别在接种后8 d(2只)，14 d(3只)，19 d(3只)，24 d(4只)，30 d(2只)用1%戊巴比妥钠腹腔麻醉并行4%多聚甲醛心内灌注后进行病理解剖，检察肿瘤形成的部位和大小等情况，方法为取出脑组织后沿接种点作冠状切面，测量移植瘤的最长径和与之垂直的最宽径，依据计算公式：V(体积)=L×W²/2(L为肿瘤最长径，W为与L相垂直的最宽径)求得移植瘤的体积。

1.5 病理形态学及免疫组化检查方法

留取瘤组织、肝脏、肺脏、肾脏置4%多聚甲醛固定并作HE染色和免疫组化标记。试剂为迈新公司的胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein，GFAP)单抗和UltraSensiveTM S-P Kit以及DAB显色试剂盒。同时对CHG-5胶质瘤细胞和移植瘤组织进行染色，操作步骤按试剂盒说明书进行。取1只23 d的移植瘤组织按电镜要求取材、固定、制片，本校中心实验室PHILIPS TECNAI 10透射电镜观察。

1.6 染色体G显带分析

取原位移植瘤组织进行原代培养72 h后加入秋水仙素(终浓度0.08 μg/ml)继续培养5 h，收集细胞，离心，去上清，逐滴加入0.075 mol/L KCl溶液，37℃水浴30 min，加入甲醇∶冰醋酸(3∶1)室温固定30 min，滴片，干燥，0.025%胰酶消化10 min，Giemsa染色，油镜下观察计数、拍照。

2 结果

2.1 CHG-5细胞形态及GFAP免疫组化特点

体外传代培养的CHG-5细胞在倒置显微镜下呈圆形、星形和梭形，以梭形和星形为主，一般有2~3个突起，胞浆中等，核圆或椭圆。免疫组化染色见瘤细胞胞浆呈GFAP阳性表达，见图1。

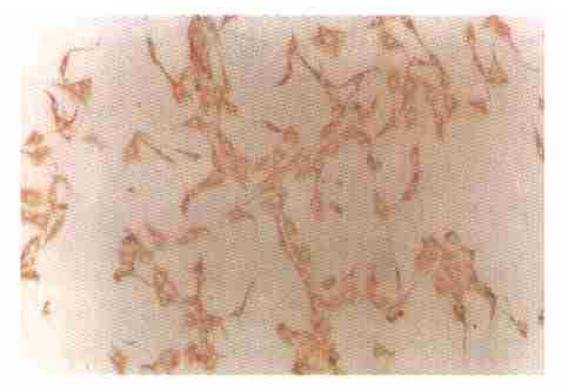


图1 CHG-5细胞胞浆呈GFAP阳性染色 (S-P×200)

Fig 1 Positive staining for GFAP protein in the cytoplasm of CHG-5 cells (S-P×200)

2.2 移植瘤形成与动物生存情况

本实验14只裸鼠在接种后全部存活，穿刺点无出血感染，也未出现手术损伤神经的症状。裸鼠在接种后8 d肉眼未见瘤结节，自14 d起可见明显瘤结节形成并迅速进入快速生长期，在23 d后大多数裸鼠开始出现体重明显下降、消瘦，面容不洁，活动减少，并很快发展为恶病质，同时伴有弓背、偏瘫、激惹等神经受损症状。生存最长的2只在28 d后也开始出现了上述同样的症状。测得接种后14，19，24，30 d移植瘤的平均体积分别为0.41，5.50，14.30，32.15 mm^3。除1只穿刺点头皮下有一粟粒大瘤结节形成外，所有裸鼠的颅内接种点、肝、肾、肺等主要脏器均未见明显的肿瘤病灶。

2.3 移植瘤组织学检查

所有裸鼠脑内均见瘤组织形成，移植瘤组织位于右大脑实质内，早期常围绕小血管呈局灶性浸润性生长，排列呈束状、小团块状，随着接种时间的增加，瘤细胞团逐渐连接成片，间质血管逐渐增加。瘤细胞胞浆中等，嗜酸性；核大小不一，深染，呈卵圆形、梭形，核分裂像少见，见图2。瘤组织内未见明显出血、坏死，瘤周组织轻度水肿，未见包膜形成。

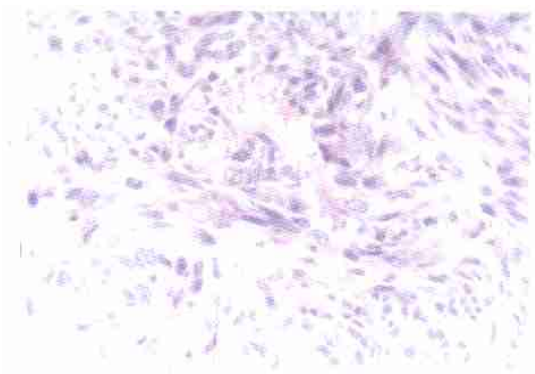


图2 移植瘤细胞核呈梭性，圆形，核大深染，瘤组织内可见较多微血管 (HE×400)

Fig 2 Grafted tumor cells show spindle or round shapes with large and darkly stained neuclei. Microvessels can easily be identified in the xenograft (HE×400)

2.4 免疫组化观察

免疫组化见移植瘤细胞胞浆内GFAP蛋白表达呈散在弱阳性，见图3。

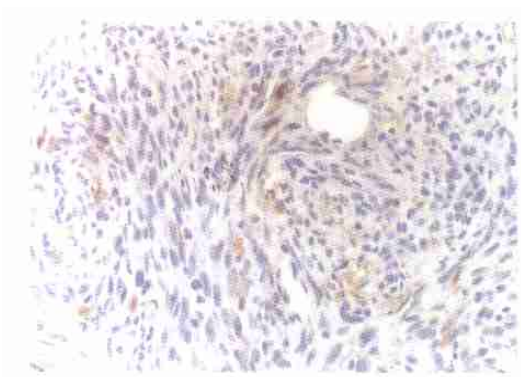


图3 免疫组化染色显示移植瘤细胞GFAP蛋白弱阳性表达 (S-P×200)

Fig 3 Weak expression of GFAP protein in grafted tumors by immunohistochemical staining (S-P×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5　电镜观察

移植瘤细胞为胶质源性, 胞浆突起内中间丝较正常减少, 但仍可见明确的中间丝, 见图 4。瘤细胞核浆比例明显增大, 核不规则, 呈梭形, 卵圆形, 可见明显核膜凹陷、核沟形成, 以常染色质为主, 部分可见染色质边集。胞浆内可见较多线粒体, 内质网, 其余细胞器较少。瘤组织内血管丰富。



图 4　移植瘤细胞突起内可见中间丝, 核不规则　(TEM× 17 000)

Fig 4　Irregular neuclei and intermediate filaments can be seen in grafted tumors　(TEM× 17 000)

2.6　染色体 G 显带分析

移植瘤染色体显示为人体肿瘤细胞染色体的特征, 呈中或亚中着丝粒染色体, 染色体数目 50～100, 超二倍体占 70 %, 超三倍体占 24 %, 超四倍体占 6 %, 以短臂染色体增加为主。

3　讨论

恶性胶质瘤因其对人类身体健康的高度危害性而一直备受人们的广泛关注, 但在其治疗上至今尚无明显的实质性进展。建立一个能模拟人体肿瘤微环境以及生物学特性的胶质瘤动物模型是进行各项实验研究的基础和前提条件。目前, 国外已相继建立了多种人脑胶质瘤动物模型, 包括异种异位(肾被膜下、皮下等)和异种原位(脑内), 广泛应用于各种试验性研究。皮下移植简单方便, 易于观察, 并且成功率高, 最为常用。原位移植技术难度高, 操作复杂、费时, 观察困难, 在一定程度上限制了其应用, 由于实验技术条件等多种原因, 人胶质瘤原位移植动物模型的国内报道甚少[4]。近年, 随着分子生物学以及各种实验技术的迅速发展, 原位移植引起了众多研究者的浓厚兴趣, 并且逐渐成为当前各种肿瘤动物移植研究的重点和热点之一。随着研究的深入展开, 越来越多的资料表明原位移植瘤和异位移植瘤在血管生成、浸润性、转移性、瘤细胞生物活性物质的表达、瘤组织微环境渗透压等许多生物学行为上存在明显差异[1,5]。根据肿瘤发生的"种子-土壤"微环境学说以及许多原位移植瘤所表现出的特有生物学行为特点提示肿瘤的原位移植更能体现和模拟人体肿瘤的各种生物学特性, 在肿瘤研究中具有更加重要的作用。人脑胶质瘤因其本身位置的特殊性且具有独特的生物学行为, 建立人脑胶质瘤原位异种移植动物模型, 对于研究胶质瘤的各种生物学特性, 尤其是在胶质瘤的各种实验性治疗(如药物、血管生成和基因治疗等)研究以及寻找、筛选有效的抗胶质瘤新药等方面具有十分重要的意义和价值[6～9]。

Jaworski 等[10] 将同一胶质瘤细胞株分别接种于脑组织和腹腔内发现其移植瘤组织 BEHAB(Brain enriched hyaluronan binding)表达具有明显差异, 提示胶质瘤原位移植与异位移植具有不同的生物学行为特点。人脑恶性胶质瘤细胞系 CHG-5 为本室采用人脑胶质瘤手术标本建立, 组织学类型为混合性少突-星形细胞瘤(WHO Ⅱ级)。本室既往采用 CHG-5 瘤细胞悬液接种法接种于裸鼠皮下, 发现移植瘤呈结节状, 无明显浸润性。为探讨 CHG-5 瘤细胞在脑内的成瘤情况, 本实验采用 CHG-5 瘤细胞悬液接种法建立了人胶质瘤原位移植动物模型, 结果也发现该动物模型与皮下移植模型具有明显不同的生物学特性。14 只裸鼠全部成瘤, 移植成瘤率 100 %, 与国内外报道基本一致[3,4]。移植瘤在脑实质内呈高度浸润性生长, 无包膜形成, 血管丰富, 瘤细胞异型性明显; 免疫组化标记和电镜观察符合星形细胞来源的肿瘤; 染色体显带分析为人特征性的中和亚中着丝粒染色体, 证实了移植瘤的人源性而非鼠源性。本动物模型在接种后 2 周即可见明显的肿瘤形成, 且生长明显加快, 3 周后动物开始出现消瘦, 偏瘫、弓背等神经症状, 并迅速出现恶病质而死亡, 与临床具有良好的模拟性。根据本模型的生物学特性, 提示接种后 2 周左右为利用此模型的最佳时期。同时本模型操作简单, 重复性好, 移植瘤生长稳定, 实验周期短, 有利于进行各项实验性研究。

在本实验中, 我们认为建立人脑胶质瘤原位异种移植实验动物模型的关键在于准确定位接种点和严格控制接种量, 同时特别注意注射和拔针的速度以及停针时间。只有保证了瘤细胞的接种位置和接种数量的一致性, 才能确保移植瘤生长的一致性、稳定性和可比性。另外, 实验采用的动物为免疫缺陷动物, 饲养条件高, 价格昂贵, 因此, 无菌操作观念, 技术熟练程度, 接种后勤观察等也是实验成功的重要保证。

参考文献:

[1] Antunes L, Angioi-Duprez K S, Bracard S R, *et al*. Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy[J]? J Histochem Cytochem, 2000, 48(6): 847—858.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[2] 陈自强,卞修武,辛 格,等. 人脑胶质瘤细胞系CHG-5的建立及其生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 880-883.
[3] Lal S, Lacroix M, Tofilon P, *et al*. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals[J]. J Neurosurg, 2000, 92: 326-333.
[4] 黄 强,徐庚达,杜子威,等. 人脑胶质瘤细胞系裸小鼠实体瘤模型NHG-1的建立及其特征的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1987, 9(4): 269-272.
[5] Brekken C, Bruland O S, de Lange Davies C. Interstitial fluid pressure in human osteosarcoma xenografts: significance of implantation site and the response to intratumoral injection of hyaluronidase[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5B): 3503-3512.
[6] Mukai S, Kondo Y, Koga S, *et al*. 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4461-4467.
[7] Goldbrunner R H, Wagner S, Roosen K, *et al*. Models for assessment of angiogenesis in gliomas[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2): 53-62.
[8] MacDonald T J, Taga T, Shimada H, *et al*. Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist[J]. Neurosurgery, 2001, 48(1): 151-157.
[9] Zagzag D, Amirnovin R, Greco M A, *et al*. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis[J]. Lab Invest, 2000, 80(6): 837-849.
[10] Jaworski D M, Kelly G M, Piepmeier J M, *et al*. BEHAB(brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines[J]. Cancer Res, 1996, 56(10): 2293-2298.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)04-0290-01

左肺粘液脂肪肉瘤1例

A case report of myxoliposarcoma of the left lung

吴 蔚,杨 康 (第三军医大学附属西南医院胸心外科,重庆 400038)

原发于肺部的脂肪肉瘤(临床报道)罕见,现将收治的1例报告如下。

1 临床资料

某男,44岁,因痰中带血1周,发现左下肺包块2 d于2000年5月入院。查体:浅表淋巴结未扪及肿大,肺心腹未见异常。胸部CT示左下肺前段见8.3 cm×6.2 cm×8.0 cm密度增高块影,边界清楚,密度不均匀,内有密度增高条状影,入院后多次在CT引导下行经皮肺穿刺活检,最后一次活检抽出少量暗红色、粘稠物质,病检示"良性间叶肿瘤",考虑诊断为左下肺间叶肿瘤。在全麻下行剖胸探查术,术中见胸腔有约200 ml血性胸水,原发肿瘤位于左下肺,质中,约12 cm×9.0 cm×6.0 cm大小,与左上肺粘连浸润不能分开,左上肺舌叶上段有3 cm×3 cm包块,肺门、隆突下、肺动脉旁未见淋巴结肿大,手术予以完整切除左全肺,术后患者恢复出院,病理观察:瘤细胞呈圆形、卵圆形,星芒状,胞浆丰富,淡染,核圆形、卵圆形、梭形,大而深染,分裂像可见,瘤细胞弥漫片状排列,分布于粘液样基质中,病理诊断为"左肺粘液型脂肪肉瘤"。

2 讨论

脂肪肉瘤多发于大腿及腹膜后,肺原发性脂肪肉瘤罕见。脂肪肉瘤起源原始间充质细胞,生长缓慢,病程可长达数年,多位于深部组织[1]。临床上主要表现为无痛性肿块,细胞穿刺活检敏感度底仅63%~80%,且有20%假阳性[2]。CT与MRI可显示肿瘤大小、部位及与邻近器官组织解剖关系,明确诊断一般靠术中切除病灶送组织学病检。根据其病理学特征可分为5型:分化良好脂肪肉瘤;粘液脂肪肉瘤;圆形细胞脂肪肉瘤;多形性脂肪肉瘤;去分化脂肪肉瘤。治疗首选手术切除,至少应切除肿瘤边缘2~3 cm以上的正常组织,因其较少发生淋巴转移,故不必常规行淋巴结清扫,放疗对粘液型和分化差型者敏感,化疗单独运用效果不佳,常作为手术和放疗的辅助治疗。出现复发病变及手术切除边缘不充分等因素影响肿瘤的局部复发率,而病理分级、肿瘤深度、大小等因素与肿瘤的远处转移密切相关,本例患者手术切除病灶后2个月入院化疗即发现已有颈部及腹部多个转移病灶,故我们认为肺部脂肪肉瘤治疗应建立在早期诊断,积极手术,术后早期联合化疗放疗,以提高治疗效果。

关键词:肺;脂肪肉瘤
中图法分类号:R730.262 文献标识码:B

参考文献:

[1] 刘复生,刘彤华. 肿瘤病理学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997. 1047-1054.
[2] 徐光炜. 临床肿瘤学[M]. 沈阳:辽宁教育出版社, 1999. 1711-1731.

(编辑 陈聪连)

作者简介:吴 蔚(1975-),男,重庆市人,医师,主要从事心脏移植方面的研究。电话:(023)65387414
收稿日期:2002-03-06;修回日期:2002-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net