DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.004
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0109-03

SW-480裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性

张胜本,黄显凯,饶本强 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要 目的:建立生物学特性稳定的结肠高分化腺癌裸小鼠移植瘤模型。方法:建立人结肠高分化腺癌细胞株SW-480裸小鼠移植瘤模型,并确定移植瘤生长情况、组织学变化及细胞动力学改变等生物学特性。结果:移植瘤体内传代稳定,潜伏期7~8 d;保留了人结肠腺癌的组织学特征;细胞动力学检测显示以四倍体细胞为主;移植瘤细胞具有分泌CEA的功能。结论:本移植瘤模型是一个生物学特性较稳定的人结肠高分化腺癌裸小鼠移植瘤模型。

关键词 结肠肿瘤;移植瘤;SW-480细胞
中图法分类号 R73-354;R730.261;R735.35 文献标识码 A

Establishment of model of transplanted tumor of human highly differentiated colonic carcinoma cell line SW-480 in nude mice

ZHANG Sheng-ben, HUANG Xian-kai, RAO Ben-qiang (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To establish a model of transplanted tumor of highly differentiated colonic carcinoma with stable biological features. Methods: The model of transplanted tumor of highly differentiated colonic carcinoma cell line SW-480 was established in nude mice. Then the growth and histological and cytodynamic changes of the transplanted tumor were observed. Results: The transplanted tumor delivered steadily and the incubation period was 7~8 d. Histological investigation revealed that the pathological characteristics of human highly differentiated colonic adenocarcinoma remained in the transplanted tumor. Cytodynamic detection showed that the tetraploid cells were the majority. The transplanted tumor cells secreted a great quantity of carcino-embryonic antigen. Conclusion: The model established in this study has stable biological features.

Key words colonic neoplasm; transplanted tumor; SW-480 cell

本实验建立人结肠高分化腺癌裸小鼠移植瘤模型,并对移植瘤的生物学特性进行鉴定,旨在为大肠癌肿瘤生物学特性的研究、抗肿瘤药物的筛选、导向治疗及基因治疗等提供一个生物学特性较稳定的结肠癌裸小鼠移植瘤模型。

1 材料与方法

1.1 肿瘤细胞株

人结肠高分化腺癌细胞株SW-480由美国纪念斯隆-凯特林癌症中心制备,重庆医科大学病理生理学教研室提供。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39270656)
作者简介:张胜本(1933.4),男,四川省富顺县人,主任医师,教授,主要从事肛肠疾病方面的研究,发表论文56篇。电话:(023)68757298
收稿日期:1999-03-02,修回日期:1999-10-12

1.2 动物和饲养环境

第三军医大学实验动物中心提供BALB/c-nu/nu无胸腺裸小鼠,鼠龄5~7周,体重(20±2)g,雌雄不拘;饲养于净化室内,饲料、饮水、笼具和操作器材及其它用品均灭菌处理后使用,实验时按无菌原则操作。

1.3 移植瘤模型建立

初代移植瘤采用对数生长期SW-480细胞消化后,调整细胞浓度至4×10^5/ml,取0.2 ml接种于裸小鼠腹部或颈背部皮下,共3只。初代肿瘤长至1 cm×1 cm×1 cm时,选择接种成功的1只裸小鼠拉颈椎处死,无菌剥离瘤体,用含双抗的Hank's液洗2次,剪成1 mm×1 mm×1 mm至2 mm×2 mm×2 mm大小瘤块,经套管针接种于裸小鼠上述部位进行传代。如此传代6次,每次接种裸小鼠2~3只。每次将剩余肿瘤组织按常规处理后冻存于液氮中。

1.4 移植瘤生物学特性鉴定

1.4.1 移植瘤生长曲线 第6、7代移植瘤自接种日起,每

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

周测量 1 次肿瘤长径(b),短径(a),按公式 $V=1/2\ a^2b$ 计算肿瘤体积,共观察 6 周,绘制生长曲线图。

1.4.2 组织学观察 取 1、3、5 代移植瘤组织,10%福尔马林固定,石蜡包埋,常规切片作 HE 染色,光镜下观察。

1.4.3 超微结构观察 切取 3~4 块 1 mm×1 mm×1 mm 大小的第 5 代移植瘤组织,2.5%戊二醛和 1%OsO_4 后固定,丙酮脱水,Epon-812 包埋,超薄切片(500~700 Å),铀-铅双染色,在 300 X 型透射电子显微镜(SEM)下观察。

1.4.4 细胞周期动力学检测[1] 单细胞悬液制备:获取第 6 代肿瘤组织,Hank's 液冲洗 3 次,清除血污、脂肪及坏死组织,将肿瘤剪切成 1 mm×1 mm×1 mm 碎块,Hank's 液冲洗 2 次,消化液(0.25%胰蛋白酶与 0.05%胶原酶 1∶1)37℃ 恒温箱中消化 20~30 min。800 r/min 离心 5~8 min,Hank's 液漂洗 2~3 min。加入 RPMI1640 培养液,300 目钢筛网以除去未充分消化的组织,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^6/ml,4℃、70%乙醇固定。

染色:选用碘化丙啶(PI)DNA 染色法,取浓度为 1×10^5/ml 的单细胞悬液,加入 PBS 液洗去固定液,加入 PI 一步染液 1 ml,室温放置 30 min,上机分析。

流式细胞仪测定:仪器为 FACS star^{plus}型号流式细胞仪,测定前调整仪器变异系数(*CV*)在 3%以下。测定时以 70 mV 的氩离子激光器为激发光源,激发波长为 488 nm。测定物质(DNA,蛋白质)的荧光强度后,HP 900/340 型计算机工作站收集样本的 10 000 个细胞数据进行分析和处理,然后以频道数直方图和数字显示结果,并自动绘图。

采用 Bartogie 细胞同期分析法,将处于不同时期的细胞分为 3 部分:G_0/G_1 期、S 期、G_2/M 期细胞。以正常组织对照按公式计算 DNA 指数(DNA index,DI):

$$DI=\frac{\text{肿瘤 } G_0/G_1 \text{ 峰值}}{\text{正常组织 } G_0/G_1 \text{ 峰值}}$$

DI 反映 DNA 的“倍性(Ploidy)”关系,正常组织细胞 DI=1.0,为二倍体;DI=0.5 为单倍体,DI=2.0 为四倍体。

1.4.5 CEA 测定 第 2、4、6 代荷瘤裸小鼠处死时眼球放血,分离血清,用放射-免疫法(CEA-RIA 法)测定血清 CEA 含量并与正常小鼠血清对比;同时将移植瘤剥离称重后充分剪碎,加入定量 PBS 液,反复冻融 3 次,离心取上清测定肿瘤组织 CEA 含量。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学处理采用本校数学教研室编制的 SPMR 程序包,进行 t 检验。

2 结果

2.1 移植瘤生长情况

初代移植瘤接种成功 2 只,第 2 代以后接种成功率 10%,至第 6 代以后肿瘤生长速度稳定。潜伏期 7~8 d,第 2 周末长径可达 0.5~0.6 cm,第 3 周肿瘤生长加快,至第 5 周末长径平均可达 1.9~2.2 cm,此时表面呈结节状,个别肿瘤表面有破溃及出血。

2.2 移植瘤组织学变化

1、3、5 代移植瘤形态相似。瘤细胞呈巢状分布有腺腔样结构,瘤细胞大小不等,多为柱状,核分裂相多见,可见癌细胞向细胞外分泌粘液,符合结肠高分化腺癌的特点,见图 1。

2.3 移植瘤超微结构变化

第 5 代移植瘤,细胞外形不规则,少数呈椭圆形及梭形,细胞表面有许多胞浆突起及微绒毛,细胞核不规则,核膜凹陷明显,核大而清晰,以常染色质为主,近腔面有丰富的线粒体、粗面内质网、多聚核糖体。部分癌细胞近腔面胞浆内见大量分泌泡,泡内有较多的粘液物质,常见泡内内容物向腺腔分泌。细胞之间可见紧密连接,见图 2。

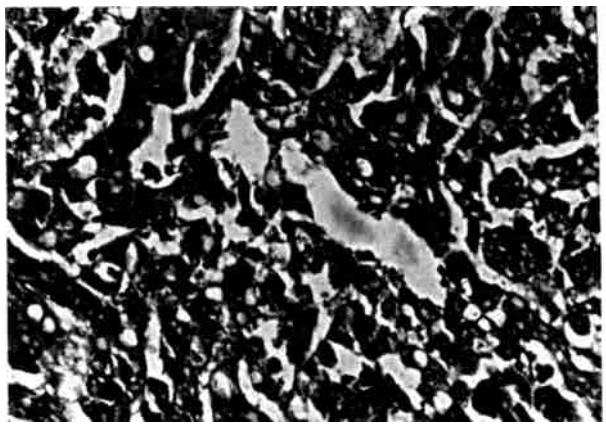


图 1 第 5 代移植瘤组织,瘤细胞呈巢状分布,有腺腔样结构,瘤细胞大小不等,多为柱状,核分裂相多见,可见瘤细胞向细胞外分泌粘液 (HE×400)

Fig 1 The fifth generation of xenografted tumor. The tumorous cells distributed like nest, with column shape, inconsistent size and glandular cavity structure, and secreted mucus. Nuclear fission was common (HE×400)

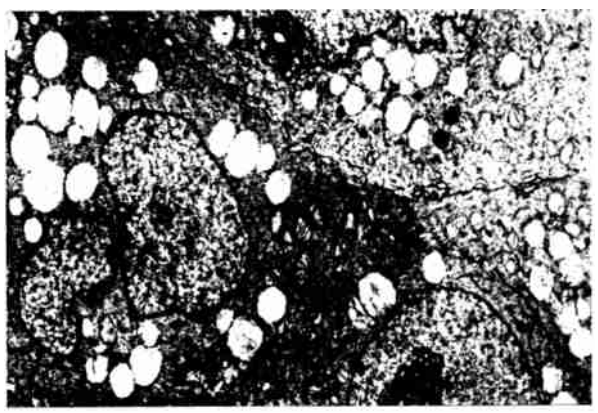


图 2 第 5 代移植瘤细胞,细胞核不规则,核大而清晰,以常染色质为主,近腔面有丰富的线粒体、粗面内质网和分泌泡,细胞之间可见紧密连接 (SEM×5 000)

Fig 2 The fifth generation of xenografted tumor. The tumorous cells linked closely, with large clear and irregular nuclei, and abundant mitochodria, rough surfaced endoplasmic reticulum and secrete bubbles near cavosurface (SEM×5 000)

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

2.4　移植瘤的细胞动力学改变

第 6 代移植瘤第 6 周末 G_0/G_1、S、G_2/M 期细胞分别占 66.9%、16.7%、16.4%。以四倍体细胞为主。

2.5　移植瘤及裸小鼠血清 CEA 含量变化

CEA-RIA 法测定正常裸小鼠及荷瘤裸小鼠血清及癌组织内 CEA 含量见表 1。正常裸小鼠血清 CEA 含量为 2.2 μg/L，荷瘤裸小鼠血清 CEA 含量三代平均 15.2 μg/L，移植瘤组织内含量三代平均 10.7 μg/L，3 次测定结果，均有随代数增加而升高趋势。

表 1　荷瘤小鼠血清和移植瘤组织中 CEA 含量($\rho_B/\mu g \cdot L^{-1}$)

Tab 1　CEA level in xenografted tumor and serum of nude mice($\rho_B/\mu g \cdot L^{-1}$)

Generation	Serum	Tumor
2	10.2 ± 0.32#	7.1 ± 0.42#
4	16.3 ± 0.46#	11.4 ± 0.53#
5	19.1 ± 1.22#	13.6 ± 0.62#
Normal	2.2 ± 0.31	——

#：$P < 0.01$ *vs* normal

3　讨论

人结肠腺癌裸小鼠移植瘤模型具有可连续传代、代间差异小及能长期保持原始肿瘤特征等优点，是目前较为理想的人结肠腺癌异种移植模型。但人结肠高分化腺癌是较难移植成功的恶性肿瘤之一。国内目前仅有结肠中分化、低分化腺癌裸小鼠移植瘤模型成功建立的报道[2]。本研究采用培养的人结肠高分化腺癌细胞株 SW-480 细胞皮下接种传代、接种实验成功率高，第 2 代以后皆为 100%，而且潜伏期短，肿瘤生长速度稳定。为实验提供了实用、可行的移植瘤动物模型。

能否保持肿瘤的原有特征是移植瘤模型成功的关键。Blum 等[3]观察到人肺癌裸小鼠移植瘤在传代过程中生物学特征不稳定，在移植过程中原有标志物丢失，或产生了新的标记物，所以寻找和建立生物学特性稳定的裸小鼠移植瘤，对开展人类肿瘤的研究十分重要。本实验所建立的人结肠高分化腺癌裸小鼠移植瘤除在组织学、超微结构、倍性分析上与结肠高分化腺癌一致外，并且始终保持了产生 CEA 的功能。由此，可以认为是一个生物学特征较稳定的人结肠高分化腺癌裸小鼠移植瘤模型。对于肿瘤生物学特性的研究，抗肿瘤药物的筛选，导向治疗、基因治疗的研究具有一定的意义。

参考文献

[1] 张胜本，张连阳．肿瘤化学治疗敏感性与抗药性[M]．成都：四川科学技术出版社，1995. 91－95.

[2] 郑　杰．免疫缺陷型动物实验研究的现状和展望[J]．上海实验动物科学，1989, 9(1)：87－89.

[3] Blum U. Immunohistochemical detection of tumor markers in lung carcinomas：change of markers after heterotransplantation of the carcinomas in thymus aplastic mice[J]. Int J Immunopharmacol, 1995, 17(2)：257－259.

（编辑　张大春）

文章编号：1000-5404(2000)02-0111-01

经验与短篇

切眉法治疗纹眉失误 63 例

Excision of brow area for badly-tattooed brow：63 cases

李刚玉，钱　江，陈清华，周艳梅　　（第三军医大学附属新桥医院整形美容科，重庆 400037）

我科自 1995 年来，采用切眉法治疗纹眉失误（并发症）者 63 例，取得医患均满意效果，成功率 100%，现报道如下。

1　一般资料

纹眉失误（并发症）者 63 例，均为女性，年龄 22～53 岁之间，要求治疗。其中纹眉变蓝者 43 例，眉形不美者 11 例，洗眉后形成瘢痕 9 例。

作者简介：李刚玉(1955. 6)，女，吉林省长春市人，主要从事整形美容方面的研究，发表论文 4 篇。电话：(023)68755114-74647

收稿日期：1999-12-01；修回日期：2000-01-15

2　治疗方法

眉部常规消毒铺巾，依据纹眉边缘用美蓝描出切口线，眉头部成三角形，眉尾线与眉尾造行一致，尽量保留正常眉部组织。0.5%利多卡因加盐酸肾上腺素少许，局部浸润麻醉，沿切口线切至眉部皮下剥离切除眉部组织（或疤痕）削平切口的基底部，疤痕组织及色素剔除干净，修齐切口两边缘，使之高度一致，用 7-0 医用无损伤缝线，对齐紧密间断缝合后，外涂金霉素眼膏，纱布加压包扎，第 2 天去除纱布，每天用 75%酒精消毒后外涂金霉素眼膏，暴露创面，5 d 后折线。

（下转 114 页）

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