DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.008

不同转移特性人肺癌裸鼠移植瘤模型的建立及复制*

魏 泓 牛 荣 吴丰春 史景泉** 陈意生** (第三军医大学基础部实验动物学教研室)重庆,630038

提 要 以人肺巨细胞癌细胞系 PLA-801的两个细胞克隆 C株及 D株,建立了 PLA-801C及 PLA-801D裸鼠皮下移植瘤模型,以人肺腺癌裸鼠移植瘤培养细胞 Anip973,复制了 Anip973裸鼠皮下移植瘤及腹水瘤模型,对其生物学特性进行了研究。这4株移植瘤模型的淋巴结及肺转移率由低到高依次为 PLA-801C皮下瘤(0%,0%)、Anip973皮下瘤(8.6%,4.3%)、Anip973腹水瘤(100%,12.0%)、PLA-801D皮下瘤(100%,31.6%)。具有同源性的不同转移力人肺癌裸鼠移植模型的建立对肺癌转移机理的对比研究具有意义。

关键词 疾病模型,动物;裸鼠;肺肿瘤
中图法分类号 R363

恶性肿瘤转移是患者死亡的重要原因。由于转移过程只有通过整体观察才可证实和确认,须以整体研究为起始或归宿,故建立人类肿瘤转移动物模型具有重要意义。由于人类肿瘤皮下移植于裸鼠后一般难以形成转移,故目前国内外人肺癌裸鼠移植瘤转移模型极少[1,2],主要有2株报道,其一为吴秉铨等[3]以 PLA-801人肺巨细胞癌细胞系建立的 PG裸鼠移植瘤模型;其二为王吾如等[4]以 AGZY-83-a肺腺癌细胞系在裸鼠体内筛选建立的 Anip模型。作者用来自于 PLA-801细胞系的两个克隆 C株及 D株,建立了 PLA-801C低转移裸鼠皮下移植瘤模型及 PLA-801D高转移裸鼠皮下移植瘤模型,利用 Anip973裸鼠移植瘤培养细胞复制了 Anip973皮下移植瘤及腹水瘤模型,并对上述不同转移特性的4株模型进行了生物学特性研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c-nu/nu裸鼠,由本室自行提供,鼠龄为(6~8)周,雌雄兼用,其实验和饲养均在 SPF条件下的超净层流架中进行,灭菌处理的水和饲料供动物自由摄入。

1.2 肺癌细胞来源

PLA-801C及 PLA-801D均为人肺巨细胞癌 PLA801母系细胞系的克隆化细胞株[5,6],由解放军总医院病理科提供,Anip973肺腺癌裸鼠移植瘤培养细胞由哈尔滨医科大学病理学教研室提供[4,7]。

1.3 接种方法

将引入细胞系传代扩大培养至所需数量后,于培养细胞处于指数生长期时,将培养瓶中的 RPMI-1640培养液倾出,于培养瓶中加0.25%胰酶消化(1~5) min(PLA-801D可不经消化),加入培养液制成细胞悬液,经细胞计数器计数及0.1%台盼蓝染色证实活细胞比率大于90%后,以1000 r/min离心5 min,除去上清液,加入细胞培养液,将细胞吹打成细胞悬液,按5×10⁶细胞/ml的浓度于裸鼠腋部皮下或腹腔注射0.2 ml,接种后每周观察2次。原代移植成功后,皮下瘤无菌采取瘤体,剪成碎块,按1∶3的比例加入细胞培养液后,以组织研磨器制成悬液于裸鼠皮下注射0.2 ml,腹水瘤采取腹水0.2 ml直接腹腔注射,行鼠间传代。

1.4 移植瘤生物学特性观察

1.4.1 生长特性 接种后观察肿瘤移植成功率、生长潜伏期,每周测量瘤体长、宽、高各径。

1.4.2 大体和组织学观察 处死及自然死亡的裸鼠均进行全身解剖,测量双侧腋部及腹股沟部淋巴结体积,观察肺部转移情况,采取皮下移植瘤、腋部与腹股沟部淋巴结、各脏器,4%中性多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE染色,普通光镜观察。

1.4.3 电镜观察 采取1 mm³数块移植瘤、癌性腹水离心沉淀获取瘤细胞,以2.5%戊二醛固定,按常规程序制备标本,JEM-2000EX型透射电镜观察。

1.4.4 染色体分析 采取移植瘤组织及癌性腹水按常规染色体法制片,并以裸鼠骨髓细胞作染色体对照分析。

1.4.5 流式细胞分析 采取裸鼠接种后21 d的4株移植瘤液氮冻存的细胞悬液或腹水,经300目不锈钢网过滤,800 r/min离心沉淀,加入70%冷乙醇固定,按常规方法以美国BD公司 FACStar-PLus流式细胞仪进行细胞增殖周期定量分析,并计算细胞增殖指数:

$$PI=(G_2M+S)\div(G_0/G_1+S+G_2M)\times 100\%$$

1.4.6 移植瘤冻存及复苏 将每代皮下瘤部分标本在含30%小牛血清、5%二甲基亚砜的 RPMI-1640冻存液中剪成1 mm³的碎块或制成细胞悬液,腹水则直接加入冻存液,装入冻存管内密封,将其按4℃ 4 h以上→0℃ 1 h→-20℃ 30 min→液氮的顺序逐渐降温置液氮中保存。复苏时,将冻存管迅速投入37℃温水中解冻,将冻存液更换为细胞培养液后,皮下或腹腔接种于裸鼠。

* 重庆市中青年科技专家基金资助项目
** 病理学教研室 重庆,630038

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

2 结果

2.1 生长特性

PLA-801C裸鼠皮下移植瘤已传 13代,移植成功率 50%,潜伏期 3周,8周时体积约 0.5 cm× 0.8 cm× 1.0 cm; PLA-801D裸鼠皮下移植瘤前 5代移植成功率为 20%~ 80%,现已传 23代,其移植成功率已达 100%,潜伏期 7 d,4周时瘤体积约 1.7 cm× 0.8 cm× 0.5 cm; Anip973皮下移植瘤移植成功率一直为 100%,已传 21代,潜伏期 1周,4周时瘤体积约 1.8 cm× 1.5 cm× 0.8 cm; Anip973腹水瘤已传 25代,移植成功率均为 100%,前 5代移植时,常为血性腹水,在腹腔内出现乳糜样癌组织,以后逐渐过渡为乳白色癌性腹水,潜伏期约 5 d,3周时腹部明显膨大,见图 1

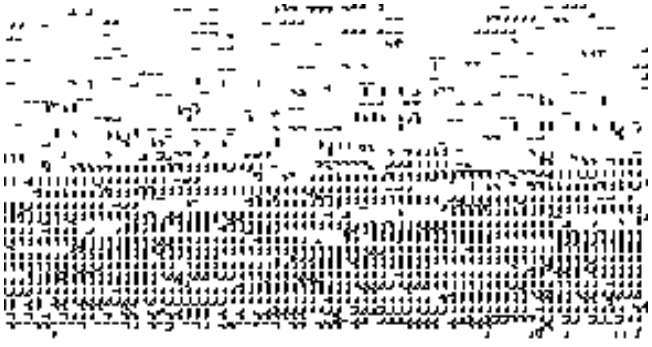


图 1 移植后 56 d的 PLA-801C裸鼠皮下瘤 (左上)、21 d的 PLA-801D裸鼠皮下瘤 (左下)、14 d的 Anip973裸鼠皮下瘤 (右上)及 21 d的 Anip973裸鼠腹水瘤 (右下)

Fig 1 Tumors manifested in nude mice 56 d after subcutaneous inoculation (SI) of PLA-801C (top left), 21 d after SI PLA-801D (bottom left), 14 d after SI Anip973 (top right), 21 d after intraperitoneal inoculation of Anip973 (bottom right)

2.2 病理形态学

2.2.1 PLA-801C皮下移植瘤　体外培养细胞为星状,多角形或梭形,见图 2移植瘤包膜完整,易与周围组织分离,组织学检查瘤细胞不侵袭周围组织,其细胞形态仍呈星状、多角形或梭形,见图 3电镜下,细胞排列较 PLA-801D细胞疏松,细胞间具有较多的胶原纤维,胞质内可见环状畸形线粒体、粗面内质网、高尔基体,核周界曲折凹陷或形成裂隙.

2.2.2 PLA-801D皮下移植瘤　体外培养的 PLA-801D细胞多呈圆形,见图 2其移植瘤难以与周围组织分离,组织学检查可见瘤细胞严重侵袭肌肉,瘤组织间质极少,瘤细胞仍多呈圆形或椭圆形,核/质比大,核深染,核仁明显,核分裂象多见,见图 3电镜下瘤细胞排列紧密,细胞质内可见粗面内质网、高尔基体、线粒体,偶见有单位膜包绕的高电子密度小体及大小不等的脂滴样结构,核膜明显,核周隙扩张,核外形曲折凹陷或形成裂隙.

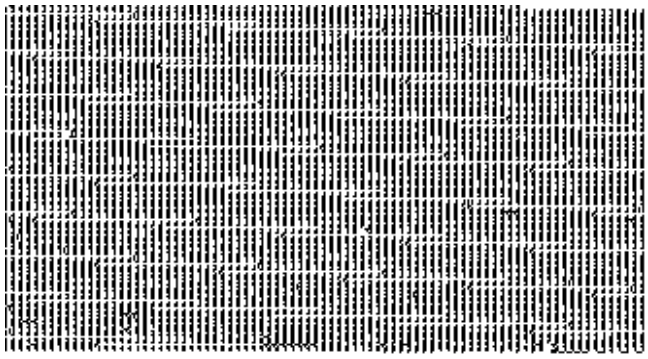


图 2 PLA-801C(左)、PLA-801D(右下)及 Anip973(右上)培养细胞 (× 200)

Fig 2 Monolayer culture of PLA-801C cells (left), PLA-801D cells (bottom right), Anip973 cells (top right) (× 200)

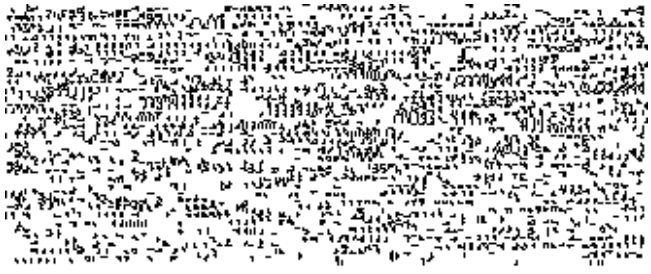


图 3 PLA-801C裸鼠皮下瘤不侵袭肌肉 (左), PLA-801D裸鼠皮下瘤明显侵袭肌肉 (右) (HE× 100)

Fig 3 No invasion of PLA-801C cells (left) and invasion of PLA-801D cells (right) to the muscular tissue (HE× 100)

2.2.3 Anip973皮下移植瘤　其培养细胞多呈三角形、椭圆形,见图 2移植瘤包膜完整、常由彼此相连的 3~ 5个小瘤体组成,质地较软,中心常坏死.光镜观察瘤细胞仍呈三角形或椭圆形,作腺管状排列,见图 4电镜下瘤细胞呈典型的腺癌细胞结构,癌细胞成片分布或形成原始腺腔,细胞表面出现粗细不等或微绒毛样突起,构成原始腺腔的胞间有复合连接,细胞的腔面有微绒毛,原始腺腔内有的可见不同电子密度的分泌物样圆形小体.细胞质内可偶见胞质内微腔,有粗面内质网、高尔基体及线粒体,可见核内包涵体,见图 5

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



图 4 Anip973裸鼠皮下瘤 (左)及腹水瘤 (右),前者呈典型腺癌结构 (HE× 200)

Fig 4 Photomicrograph of Anip973 subcutaneous tumor (left) and ascitic tumor (right) in nude mice, note the characteristic features of adenocarcinoma in subcutaneous Anip973 (HE× 200)



图 5 Anip973裸鼠皮下瘤 (左)及腹水瘤 (右),示原始腺腔 (左) (TEM× 20 000)

Fig 5 Electron micrograph of Anip973 subcutaneous tumor (left) and ascitic tumor (right) in nude mice, note the primary adenolumina (left) (TEM× 20000)

2.2.4 Anip973腹水瘤 光镜下腹水瘤细胞均呈圆形,大小不等,核大、深染,胞质仅占核周一小部分,易见多核瘤巨细胞,见图 4 电镜下,其腹水瘤细胞与皮下瘤细胞相似,细胞表面仍具微绒毛,但细胞游离,不形成原始腺腔,核畸形更为突出,表现为多核及核周界在多处形成复杂走向的裂隙,见图 5

2.3 染色体分析

4株移植瘤均呈现人类染色体形态,每一瘤细胞同时具有中央亚中央或端着丝粒染色体,而对照的裸鼠骨髓细胞染色体全部为端着丝粒染色体,见图 6



图 6 PLA-801C(左上)、PLA-801D(左下)、Anip973(右下)裸鼠皮下瘤与裸鼠骨髓细胞 (右上)染色体。小鼠染色体均为端着丝粒,而人肺癌细胞染色体为端着丝粒、中央和亚中央着丝粒 (× 400)

Fig 6 The chromosomes of PLA-801C (top left), PLA-801D (bottom left), Anip 973 (bottom right) growing subcutaneously in nude mice and that of bone marrow of mice (top right), showing that human cell chromosomes are metacentric, submetacentric and acrocentric while that of mouse cell are all acrocentric (× 400)

2.4 流式细胞分析见表 1

表 1 4株人肺癌裸鼠移植瘤细胞周期分布及增殖指数

Tab 1 Cell cycle and proliferation index of four strains of human lung carcinoma xenograft in nude mice

Type of xenograft	Proliferation Index	G_0/G_1	S	G_2+ M
Subcutaneous PLA-801C	48.9	51.1	31.6	17.3
Subcutaneous PLA-801D	55.0	45.0	40.5	14.5
Subcutaneous Anip973	67.9	32.1	47.1	20.8
Ascitic Anip973	46.8	53.2	21.7	25.1

2.5 移植瘤转移情况

4株裸鼠移植瘤淋巴结及肺转移情况见表 2,其它器官未发现转移。PLA-801D皮下瘤的肺转移形式主要表现为小血管内形成瘤栓 M,见图 7,少数突破血管形成血管外小转移灶,仅见 1例形成较大面积的肺转移灶。Anip973皮下瘤及腹水瘤的肺转移形式为小结节状转移,见图 8 PLA-801D的淋巴结转移程度严重,轻者淋巴结局部组织被瘤细胞侵占,严重者仅残存少量淋巴组织,且出现坏死性瘤组织区,见图 7 Anip973腹水瘤的淋巴结转移严重者被具腺管结构瘤细胞完全侵占,见图 8

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

表 2　4株人肺癌裸鼠移植瘤转移情况(%)

Tab 2　Metastases of four strains of human lung carcinoma xenograft in nude mice (%)

Type of xenograft	Lymph-node metastasis		Lung metastasis	
Subcutaneous PLA-801C	0/20	(0)	0/20	(0)
Subcutaneous PLA-801D	38/38	(100)	12/38	(31.6)
Subcutaneous Anip973	4/46	(8.6)	2/46	(4.3)
Ascitic Anip973	50/50	(100)	6/50	(12.0)

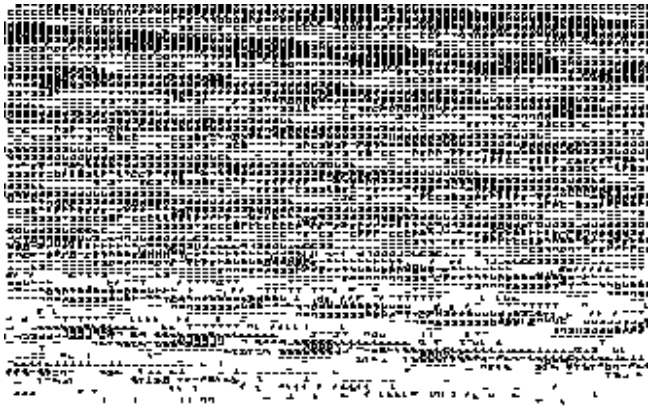


图 7　PLA-801D裸鼠移植瘤的淋巴结转移(左)及肺转移(右)　(HE× 200)

Fig 7　Lymph-node metastasis (left) and lung metastasis (right) of PLA-801D growing subcutaneously in nude mice　(HE× 200)

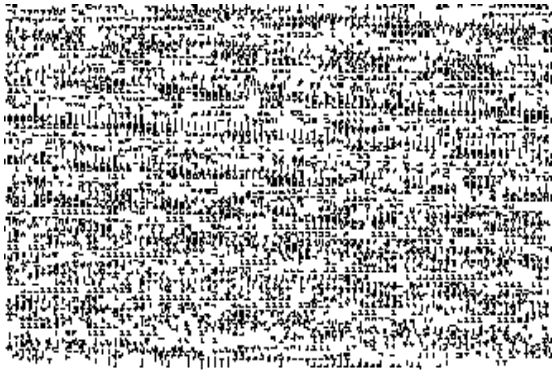


图 8　Anip973腹水瘤的淋巴结转移(左)及肺转移(右),淋巴结被腺癌组织取代　(HE× 100)

Fig 8　Lymph-node metastasis (left) and lung metastasis (right) of Anip973 in nude mice, showing replacement of lymph node by metastatic adenocarcinoma tissue　(HE× 200)

2.6　瘤株冻存及复苏

PLA-801D皮下瘤、Anip973皮下瘤及腹水瘤的冻存复苏成活率均为 5/5,而 PLA-801C的成活率为 2/5.

3　讨论

4株人肺癌裸鼠移植瘤模型的生长特性基本稳定。PLA-801D皮下瘤、Anip973皮下瘤及腹水瘤的移植成功率已达 100%,PLA-801C皮下瘤成功率 50%,病理形态学显示 PLA-801C及 PLA-801D符合肺巨细胞癌特点,Anip973皮下瘤及腹水瘤符合肺腺癌特点,染色体分析显示了其人染色体形态,冻存复苏成活率除 PLA-801C皮下瘤为 40%外,其余 3株均为 100%,表明 4株人肺癌裸鼠移植瘤模型的生物学特性稳定,说明了 PLA-801C及 PLA-801D裸鼠皮下移植瘤模型的成功建立以及 Anip973皮下瘤及腹水瘤模型的顺利复制.

4株移植瘤淋巴结及肺转移率由低到高依次为 PLA-801C皮下瘤、Anip973皮下瘤、Anip973腹水瘤、PLA-801D皮下瘤。转移率较高的 PLA-801D及 Anip973腹水瘤,表现为局部淋巴结的 100%转移,而肺转移率均较低,分别为 31.6%及 12.0%,PLA-801C皮下瘤则未发现淋巴结及肺的转移.由于小鼠淋巴结体积小,取材及制样受限,故建立高肺转移的人肺癌裸鼠移植瘤模型对于各种转移与抗转移作用定量实验研究更具有实用性.

3株裸鼠皮下移植瘤模型中,PLA-801C生长速度缓慢、细胞增殖指数、移植成活率及冻存复苏存活率均较低,与其低转移特点相符;而 Anip973皮下瘤生长速度、细胞增殖指数高于 PLA-801D皮下瘤,但其淋巴结及肺转移率与之相比均较低,表明其生长增殖速度与其转移力的相关性受不同瘤株的影响.

PLA-801C与 PLA-801D皮下瘤均来源于 PLA-801细胞系,Anip973皮下瘤及 Anip973腹水瘤均来源于以 AGzy-83a细胞系在裸鼠体内筛选建立的 Anip细胞,且国内较有影响的高转移人肺癌 PG裸鼠移植瘤模型也来源于 PLA-801细胞系[7],各模型虽具同源性,但其生长特性、病理形态、转移特性等存在不同程度差异。上述系列模型的建立及复制,对肿瘤转移机理及肿瘤异质性理论的对比研究具有重要意义.

参考文献

1 魏　泓.人类肿瘤免疫缺陷动物体内转移模型研究进展.中国实验动物学报,1994;2(2):121

2 魏　泓.人体肿瘤免疫缺陷动物体内移植模型.见:张胜本,

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

张连阳主编.肿瘤化学治疗敏感性与抗药性.成都: 四川科学技术出版社, 1995: 18~42
3 吴秉铨,孙毓恺,郑 杰等.裸鼠体内建立的人类高转移癌系.中华肿瘤杂志, 1985; 7(5): 324
4 王吾如,潘忠诚,袁孝纯等.裸鼠腹腔内筛选高转移人肺腺癌细胞及其生物学特性的研究.中华肿瘤杂志, 1987; 9(6): 412
5 陈乐真,黄靖香,游联壁等.人肺巨细胞癌细胞系(PLA801)的建立和生物学特性.中华肿瘤杂志, 1983; 4(6): 409
6 陆应麟,黄靖香,李向红等.人肺巨细胞癌 PLA-801母系细胞系及其克隆化细胞株(A C D E)裸鼠皮下种植后自发转移特性的研究.中华肿瘤杂志, 1989; 11(1): 3
7 史 历,刘 旭,唐亚莉等.人肺腺癌细胞在裸鼠体内脑、骨、肌肉转移模型的建立.中国实验动物学杂志, 1994; 4(1): 20

(收稿: 1996-08-01;修回: 1996-10-15)
(编辑 冷怀明)

Establishment and replication of human lung carcinoma metastasis models in nude mice

Wei Hong, Niu Rong, Wu Fengchun, Shi Jingquan, Chen Yisheng (Department of Laboratory Animal Science, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Two strains of human lung carcinoma metastasis models were established and two strains of human lung adenocarcinoma were replicated in nude mice in the following procedure: (1) The nude mice were inoculated subcutaneously with cellular colonal strains C and D isolated from a human lung giant carcinoma cell line PLA-801 to establish two models of subcutaneously transplanted carcinoma PLA-801C and PLA-801D; (2) Two models were replicated respectively through subcutaneous and intraperitoneal inoculation of human lung adenocarcinoma cell Anip973 cultivated from its transplanted xenograft. It was found that the biological characteristics of the four strains were stable and their metastatic rates to lymph node and lung were in order from low to high among subcutaneous PLA-801C (0%, 0%), subcutaneous Anip973 (8.6%, 4.3%), ascitic Anip973 (100%, 12.0%) and subcutaneous PLA-801D (100%, 31.6%). The establishment of transplanted models of human lung carcinoma from the same origin and with various metastatic potentials in nude mice is of great significance for the comparative study of mechanisms of lung carcinoma metastasis.

Key words disease models, animal; nude mouse; lung neoplasms

(上接 483页)

表现为一侧或双侧乳房内一个或多个散在的活动性肿块,肿块生长迅速,乳头无溢液,肿块边缘清楚,与皮肤无粘连且富有弹性,如具备以上特点,乳腺肿块应考虑为乳腺淋巴瘤,且最终诊断取决于病理,治疗方式以手术切除为主,根据组织病理学及免疫学特征,辅以化疗,放疗及免疫治疗。早期治疗,疗效好。例1经手术切除,辅以化疗,转移灶放疗,患者生存4年后失访。近期疗效较满意,与文献[2]报告相符。

乳腺纤维肉瘤较少见,来源于多向分化的乳腺间叶组织,诊断依赖于病理检查并结合免疫组化及电镜检查。治疗方式以手术切除为主,失败原因常为血道转移,局部切除不彻底时可局部复发,故术后补充放疗可降低复发率。例2采取手术加放疗,预后较好,已生存9年,无复发和转移,能从事一般的劳动。

关键词 乳腺肿瘤
中图法分类号 R737.9

参考文献

1 沈镇审.乳腺疾病.见: 石美鑫主编.实用外科学.第9版.北京: 人民卫生出版社, 1994: 518~519
2 赵 锦,许素玲.特殊类型的乳腺恶性肿瘤.中华放射肿瘤学杂志, 1995; 4(3): 198

(收稿: 1995-12-17;修回: 1996-09-26)
(编辑 刘 鹏)

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