

小鼠 Lewis 肺癌原位模型的建立

李宁, 张晓晔, 蒋中秀, 刘洋, 李雪娇

(中国医科大学附属盛京医院, 沈阳 110004)

【摘要】 目的 利用 Matrigel 与 Lewis 制备细胞混悬液注射于小鼠左肺内, 建立小鼠 Lewis 肺癌原位模型, 评价其肿瘤生长情况、转移情况, 以期建立更稳定、更接近于人肺癌生长情况的小鼠肺癌原位模型。方法 将处于对数生长期的 Lewis 肺癌细胞混悬于 Matrigel 中, 接种于 C57BL/6 近交系小鼠左肺内。分别于第 4、7、10、13、16 天各处死 5 只小鼠, 观察其局部成瘤率、肿瘤生长情况、中位生存期及肿瘤转移情况, 并对各阶段小鼠行肺部、肝脏、肾脏、脾脏病理切片检查。结果 术后第 7 天解剖的 5 只小鼠中, 3 只小鼠肺上可见小的瘤结节形成, 其余 2 只肺上未见肉眼成瘤, 行病理 HE 染色检查在显微镜下可见 2 只小鼠肺脏有小的瘤结节形成。术后第 10 天以后处死的所有小鼠肺上均有肉眼成瘤, 术后第 13 天, 所有小鼠肺原位成瘤并伴有血性胸腔积液、胸腔内转移。术后第 25 天, 有 1 只小鼠出现上述转移的同时还出现了心包膜转移及肾脏远处转移。5 只小鼠生存期分别为 17 d、20 d、22 d、22 d、25 d, 小鼠中位生存期为 21.2 d (17 ~ 25 d)。成瘤率 100%。结论 利用 Matrigel 法成功建立小鼠 Lewis 肺癌原位模型, 稳定性好, 成瘤率高, 并具有远处转移的特性, 更接近于人肺癌的发生、发展过程。

【关键词】 小鼠; 肺癌; 动物模型; Matrigel; Lewis 细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0079-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.018

Establishment of a mouse model of orthotopic Lewis lung cancer

LI Ning, ZHANG Xiao-ye, JIANG Zhong-xiu, LIU Yang, LI Xue-jiao

(Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of orthotopic Lewis lung carcinoma using Matrigel, to evaluate the tumor growth and metastasis, and to provide a more stable mouse model of orthotopic lung cancer, which is more similar to human lung cancer. **Methods** Logarithmic phase of cultured Lewis lung cancer cells were suspended in Matrigel, vaccinated into the left lung of inbred C57BL/6 mice. Five mice were killed on the 4th, 7th, 10th, 13th, and 16th days, respectively, and to observe the median survival, tumor formation rate, tumor growth, and metastasis. Pathological changes of the mouse lung, liver, kidney and spleen were examined. **Results** In 5 mice killed on the 7th postoperative day, small tumor nodules were observed on the lung in three mice and no tumor was visible by gross inspection in the other two mice, but small tumor nodules were observed under the microscope. For all the mice killed on the 10th postoperative day, tumors were visible to the naked eye on the lung of all the five mice. On the 13th day, orthotopic tumor was observed on the lung with bloody pleural effusion and pleural metastasis in all the five mice. On the 25th day, in addition to the pleural metastasis, one mouse had pericardial metastasis and renal metastasis. The survival periods of the 5 mice were 17 d, 20 d, 22 d, 22 d, and 25 d, respectively, with a median survival period of 21.2 d (17 - 25 d), and the tumor formation rate was 100%. **Conclusions** Mouse models of orthotopic Lewis lung carcinoma is successfully established using injection of tumor cells suspended in Matrigel. This model is more similar to the growth of human lung cancer, with good stability, high tumor formation rate and characteristics of distant metastasis, therefore, is worthy of further application.

【Key words】 Mouse; Lung Cancer; Animal model; Matrigel; Lewis lung cancer cells

[作者简介] 李宁 (1987 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤学。E-mail: liningkybisheng@126.com

[通讯作者] 张晓晔 (1965 -), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 肿瘤学。E-mail: zh_yd@126.com

目前,在肺癌的动物实验中,大多使用小鼠皮下种植肺癌细胞系,在皮下形成肺癌肿瘤结节的动物模型,如孙秋艳等^[1]用体外培养的 Lewis 细胞悬液注射于小鼠左侧腋下,形成皮下肿瘤;Xu 等^[2]应用 A549 肺癌细胞悬液加入等量的 Matrigel 中,注射至裸鼠的皮下组织亦可形成肿瘤模型。但是,这种肺癌模型小鼠出现的症状、并发症、一般状态及转移情况与临床患者的实际情况存在很大的差别。建立一种简便易行、经济、接近于人原发性肺癌的动物模型,对肺癌体内研究的具有重要意义。本实验通过将 Matrigel 与 Lewis 制备细胞混悬液注射于小鼠左肺内,建立小鼠 Lewis 肺癌原位模型,具有经济、简便、快速成瘤等优点,而且所建立的肺癌原位模型更接近于人类肺癌自然过程,具有更好的研究利用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂与仪器

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(中科院上海细胞库,中国)、10% 胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶(均为 Hyclone 公司产品,美国)、Matrigel (BD 公司,美国)、细胞培养箱、超净台、电子称等均由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供。

1.1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6 纯系小鼠,6~8 周龄,雄性,体重 19~21 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2009-0004】,在中国医科大学附属盛京医院实验动物中心实验室无特定病原体(specific pathogen free, SPF)的饲养间饲养和进行无菌手术【SYXK(辽)2010-0008】。所有实验操作程序均经过中国医科大学附属盛京医院实验动物中心批准,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及处理

将小鼠 Lewis 肺癌细胞置于含 10% 胎牛血清及高糖 DMEM 的完全培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 1~2d 更换培养液 1 次,每 3 d 用 0.25% 胰酶消化传代一次。细胞汇合率达 90% 时(如图 2),收集细胞,离心去上清,加入 PBS 吹打,使细胞悬浮于 PBS 中,台盼蓝染色细胞活力测定大于 95%,并进行细胞计数,调整细胞浓度为 4×10^7 /mL 的细胞悬液备用。

1.2.2 注射前 Matrigel 的准备

Matrigel 置于 -20℃ 长期保存,用时将其置于冰浴放入 4℃ 冰箱中过夜融化,将已融化的 Matrigel 和 4×10^7 /mL 浓度的细胞悬液按 1:1 混匀,这一操作在冰浴中进行。

1.2.3 原位肺癌动物模型的建立

①分组:小鼠共 30 只,其中 25 只用于观察肿瘤的生长情况,分别在术后的第 4、7、10、13、16 天各处死小鼠 5 只,另外 5 只用于生存曲线的测定。②麻醉:水合氯醛溶液 10 mg/mL,按 0.05 mL/10 g 体重剂量对小鼠进行麻醉。③接种:将小鼠麻醉后,右侧卧位置于操作台上,对小鼠腋下剪毛并用乙醇消毒,在左腋前线肋弓上约 1.5 cm 处作一个 5 mm 大小的切口,分离皮肤及皮下组织,暴露胸壁,至能看到肺叶随呼吸上下活动为止,将 50 μL 混有 Matrigel 的细胞悬液用微量进样器在室温下放置 2min 后,再注射至左肺上,进针深度约 3 mm,注射后停针数秒,拔针后缝合切口。

1.3 病理学检测

留取小鼠肺脏、肿瘤、肝脏、肾脏、脾脏行病理检测,病理 HE 染色按常规制备病理切片,二甲苯 I 10 min,二甲苯 II 20 min,100% 乙醇 5 min,95% 及 85% 乙醇各 1 min,自来水冲洗片刻,苏木素染色 10 min,自来水冲洗 15 min,0.5% 伊红染色 1 min,自来水冲洗,95% 乙醇片刻,100% 乙醇 I、II 各 10 min,二甲苯 I、II 各 10 min,中性树脂胶封片,显微镜下观察小鼠肿瘤灶。

2 结 果

2.1 小鼠的一般情况

每日 8:00~9:00 用电子秤测量,精确到 1/100 g,小鼠体重变化曲线(图 1)。小鼠在术后体重逐渐下降,在第 4 天下降至最低点,此时的体重下降考虑因手术创伤所致,饮食及饮水减少,之后体重又逐渐上升,在术后第 14 天,体重达到最重,考虑随着手术创伤的恢复,小鼠饮水、进食恢复,生长正常,未影响小鼠发育。此后体重再次逐渐降低,考虑是由于肿瘤负荷增加,小鼠的消耗增加所致。随着肿瘤的进一步增大,小鼠进食、进水量少,逐渐出现恶病质的现象,直至死亡。随着病情的进展,小鼠活动减少,皮毛失去光泽,有卷曲脱落的现象,在后期出现弓背,说明其呼吸困难,并伴有呼吸加深加快的现象(图 2,彩插 14)。

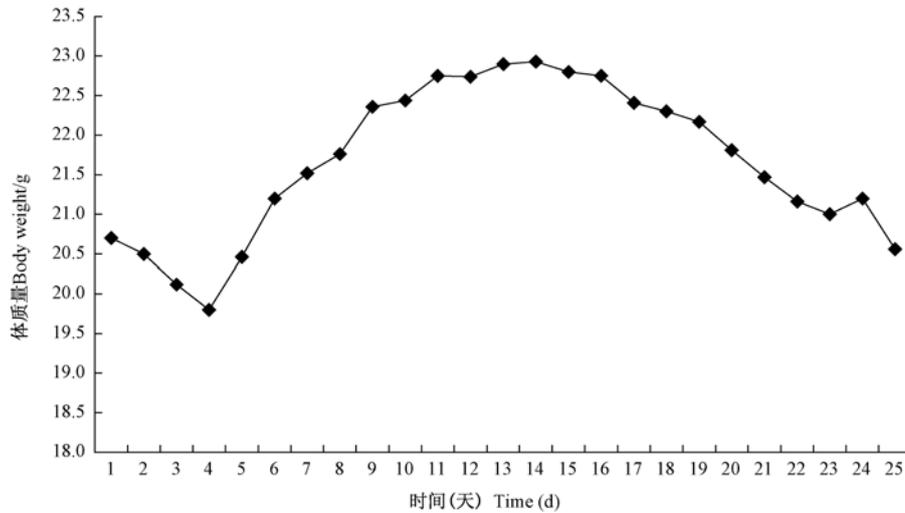


图 1 小鼠体重变化曲线

Fig. 1 Body weight change curve of the mice.

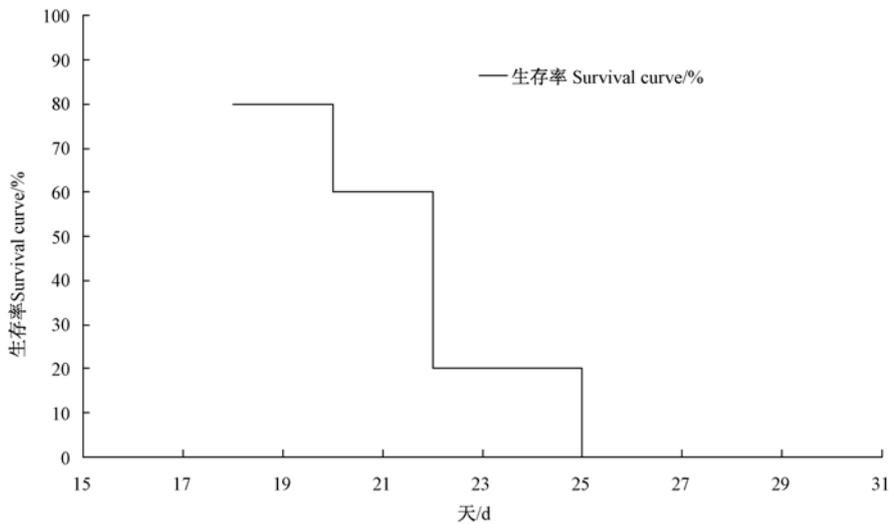


图 3 5 只小鼠生存曲线图

Fig. 3 Survival curve of 5 mice.

2.2 原位肺癌的形成与小鼠的生存情况

肺内肿瘤接种后第 4 天,小鼠肺组织内无肿瘤形成,接种后第 7 天处死的 5 只小鼠中,3 只肺表面肉眼可见小的瘤结节形成,其余 2 只肺表面未见肉眼瘤结节形成,但可在病理 HE 染色检查的显微镜下发现肺内有小的瘤结节形成。肺内肿瘤接种后第 10 天处死的所有小鼠肺表面肉眼均可见瘤结节形成,接种后第 13 天,尚可见胸膜转移和血性胸腔积液。接种后第 25 天,有 1 只小鼠出现上述转移的同时还出现了心包膜转移及肾脏远处转移。5 只小鼠生存期分别为 17、20、22、22、25 d(图 3),小鼠中位生存期为 21.2 d(17 ~ 25 d), (图 3)。成瘤率 100%。解剖情况见图 4(彩插 14)。

2.3 病理学检测结果

肺原位肿瘤周围看到肺泡受压萎缩、肺周围组织遭受浸润、肺泡壁增厚、炎性细胞增多。肺原位肿瘤细胞形成大小不等、形状不一、排列不规则的癌巢。细胞分化差,核大,深染,核质比增大,核分裂相多见。图 5 为腺癌病理特点(图 5 见彩插 15)。

3 讨论

目前,小鼠肺癌模型的建立方法多种多样。多采用诱发性,移植性或转基因动物模型,其中移植性动物模型又分为原位移植模型及异位移植模型。国内应用移植动物模型的较多,以异位移植动物模型最多见。

诱发性动物模型:在 mouse-inbred 鼠系中,自发性肺肿瘤的发病率和易感性很高,此品系的小鼠对于化学诱导肺癌也是非常敏感的,例如,曝光、吸烟、焦油或其他化学致癌物质。应用化学致癌物诱导肺肿瘤可重复性好,几乎无一例外的导致腺瘤和腺癌。目前,诱发性肺癌动物模型的复制方法有吸入致癌物诱发肺癌,口服致癌物诱发肺癌,肺内或支气管灌注致癌物诱发肺癌等^[3]。但诱发性动物模型也存在着不可忽视的问题,此种动物模型成瘤时间长,如张朝晖等^[4]用 BALB/c 小鼠吸入烹调油烟诱导肺癌,成瘤周期为 8 个月,有些实验诱导成瘤周期甚至为十几个月,而且由于饲养时间长,实验费用也随之增加,实验者在予以动物长期致癌物暴露的同时,自己也会暴露于致癌物下,由此可造成不可估量的后果,因此在动物实验中不易推广。

随着转基因技术的兴起,将人类肺癌中发现的癌基因导入鼠系肺组织,或者运用基因敲除技术将抑癌基因敲除来制造肺癌模型即为转基因肺癌动物模型^[5]。然而,经典的转基因敲除技术所制造出的小鼠不能反映出潜在的散发肿瘤的生长事件,为此人们制造了第二代基因鼠,第二代基因鼠运用癌基因或抑癌基因的等位基因突变技术使鼠肺肿瘤的生长更接近散发肿瘤生长流程,即在肺已完全发育的成年鼠中仅一个亚群的细胞获得突变^[3]。此种动物模型要求技术条件高,并且此方法小鼠肿瘤发生率为散发,成瘤率低,由于其为自然成瘤,所以在成瘤周期上也相对较长。

异位移植动物模型目前在国内外应用最为广泛,以皮下注射瘤细胞为主,其优点是操作简单,易于接种及观察成瘤情况等。如 Keshamouni 等^[6]将 A549 瘤细胞注射至小鼠任意一侧背部皮下制作肺癌模型。但如前所述,这种模型小鼠出现的症状、并发症、一般状态等与临床患者情况存在一定的差距,很难如实反映肿瘤的自然发生发展情况。

原位移植肺癌动物模型是将肿瘤细胞或组织块原位移植到动物呼吸系统的组织内,使之产生肿瘤及形成自发性转移灶。Zou 等^[7]用细针将人肺癌细胞系 H358 和 H460 送至裸鼠的气管内构建肺癌原位移植模型,但其肿瘤生长部位、数目及大小都不稳定。魏淑珍等^[11]运用 EGFP 标记的人肺癌细胞接种于 BALB/c (nu/nu) 裸鼠皮下,待肿瘤长大后将其剥离,剪碎成 1 mm 大小瘤块缝合于小鼠左肺,关闭胸腔用注射器抽吸胸腔空气成负压,此种方法操作

较本实验更为复杂,手术时间长,术中死亡 4 只,其余 16 只安全度过手术,死亡率高,小鼠术后恢复慢,尤其在裸鼠中,易形成术后感染而死亡。本实验所建模型同属于原位移植模型,在前人的基础上,在 Lewis 细胞悬浮液中加入 Matrigel 胶,更好的在肺原位形成肿瘤,减少手术时间,操作简化,不用开胸手术,降低因手术所致的死亡率,肿瘤的发生、发展更趋近于人类肺癌的自然过程。

Matrigel 是从能产生基底膜的 ESH 小鼠肉瘤中提取的蛋白质。其主要成分由层粘连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成,还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。Matrigel 基底膜基质在室温条件下,聚合形成具有生物学活性的三维基质,模拟体内细胞基底膜的结构、组成、物理特性和功能,有利于体外细胞的培养和分化,以及对细胞形态、生化功能、迁移、侵袭和基因表达的研究。目前,Matrigel 主要用于肿瘤细胞体外 3D 培养;肿瘤异种移植模型的建立;筛选高侵袭力肿瘤细胞。Olsen 等^[8]在体外,利用 Matrigel 及多条件培养基 3D 立体培养人的乳腺癌细胞,并得出结论:人的乳腺纤维细胞可以在 3D 培养的条件下,激发乳腺癌细胞的侵袭性,并增加体外小鼠异位移植模型中基质的生成。McDaniel 等^[9]利用人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 混入 Matrigel 注射于裸鼠乳腺脂肪垫内,形成原位乳腺癌异种移植模型。Soto-pantoja 等^[10]利用人肺癌 A549 细胞悬液按 1:1 与 Matrigel 混用,注射于裸鼠侧腹,并用这一模型进行两种药物的比较。Matrigel 在高侵袭力肿瘤细胞筛选的原理为,细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 被具有侵袭力的肿瘤细胞分泌的多种丝氨酸蛋白酶以及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 降解,细胞因此穿过 Matrigel 到达胶的另一面,培养一段时间后,胶的另一面所出现的细胞即为具有侵袭力的细胞,多次重复这一实验,可筛选出高侵袭力的肿瘤细胞。本实验利用 Matrigel 在室温下短时间可形成三维基质结构,使肿瘤细胞在肺原位固定生长,并且 Matrigel 组成成分中,如各种蛋白及生长因子等,均为肿瘤形成不可或缺的营养成分,有益于肿瘤细胞的快速生长。

Xu 等^[2]应用 A549 肺癌细胞悬液加入等量的 Matrigel 中,注射至裸鼠的皮下组织中,本实验优化其方法,将 Lewis 细胞悬液加入等量的 Matrigel 中,注射至 C57BL/6 小鼠的左肺上,以建造其原位模型。本实验优点在于应用免疫正常的小鼠做实验,

更好的模拟了人的免疫反应,并且避免因裸鼠较贵,而使实验成本增高;Lewis 细胞种于肺上后,如图 5 所见,肺原位肿瘤细胞形成大小不等、形状不一、排列不规则的癌巢。细胞分化差,核大,深染,核质比增大,核分裂相多见,与人类肺癌特点相似^[12];利用 Matrigel 构建了细胞生长的三维立体空间结构,有利于其早期成瘤,缩短实验时间,相对于其他实验没有用 Matrigel 而直接用氯化钠悬浮细胞注射肺部的原位模型,其中位生存期长,且直接用氯化钠悬液会至细胞分散,细胞悬液大多漏入胸腔中,形成多个结节;本实验从成瘤至中位生存期(21.2 d)长,便于实验目标的观察;本实验对于注射入小鼠肺的细胞液体量做过预实验,预实验中细胞悬液及 Matrigel 的总量为 100 μ L,解剖小鼠发现,其肺部成瘤小,而胸腔内转移多,考虑相对于小鼠肺的大小来说细胞液体量偏大,有部分液体在还未因 Matrigel 凝固前,已流入胸腔内,故此模型操作时,混悬液需在室温下放置 2min 左右,注射入肺的过程需缓慢,注射后停针数秒再拔针,可有效避免该情况的发生。本实验也有不足之处,由于是肺内原位成瘤,不如皮下成瘤便于观察肿瘤大小情况,如果想确切观察其全身肿瘤转移情况,可利用影像进行观察;由于小鼠成瘤率高,成瘤时间短,不易出现远处转移,本实验肉眼观察可见有胸腔内及肺上、心脏转移,远处转移仅见于肾脏,其余远处转移未见;另外,由于手术创伤性比较大,会在术中或术后几天内,小鼠因创伤等原因死亡现象,尤其在操作不熟悉时,易发生;并且操作难度高,要求技术纯熟。

综上所述,利用 Matrigel 建立 Lewis 肺癌原位模型,虽操作难度高,但由于其能更好的模拟人肺癌的发生、发展过程,故此方法有进一步推展的价值。

(本文图 2,4 见彩插 14,彩 5 见彩插 15。)

参 考 文 献

- [1] 孙秋艳,刘艳,汪茜,等. 绿原酸对 Lewis 肺癌小鼠及人 A549 肺癌的实验研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(5):536-538.
- [2] Xu XY, Glenn D. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model[J]. Cancer, 2010, 116(7):1739-1750.
- [3] Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer[J]. Genes Dev, 2005,19:643-664.
- [4] 张朝晖,陈锋,罗招阳,等. 烹调油烟诱发小鼠肺癌的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2001, 13(4):265.
- [5] Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4):251-265.
- [6] Keshamouni VG, Reddy RC, Arenberg DA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(1):100-108.
- [7] Zou Y, Fu H, Ghosh S, et al. Antitumor activity of hydrophilic Paclitaxel copolymer prodrug using locoregional delivery in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft models[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(21):7382-7391.
- [8] Olsen CJ, Moreira J, Lukanidin, et al. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts[J]. BMC Cancer, 2010, 10:444.
- [9] McDaniel SM, Rumer KK, Biroc SL, et al. Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis[J]. Am J Pathol, 2006,168(2):608-620.
- [10] Soto-pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(6):1676-1683.
- [11] 魏淑珍,孙宇,杨志坚,等. EGFP 标记的人肺癌裸鼠原位移植模型的建立[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 7(13):670-675.
- [12] 王恩华. 病理学[M]. 北京:高等教育出版社, 2003. 99.

[收稿日期] 2014-03-28