

裸鼠肺癌脑转移模型中血脑屏障超微结构的观察

陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 陈正伟, 李鸿茹, 钟秀容, 周琳瑛

(福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001)

【摘要】 目的 通过硝酸镧示踪电镜技术观察裸鼠肺癌脑转移模型中血脑屏障的超微结构。**方法** 从 8 只 BALB/c 裸鼠随机选取 6 只经左心室注射的方法, 接种处于对数期生长的人肺腺癌细胞 PC-9 ($1 \times 10^6/0.1 \text{ mL}$), 作为模型组; 另 2 只裸鼠未经任何处理作为空白组。接种后观察裸鼠状态, 在第 4 周行硝酸镧示踪电镜技术观察血脑屏障的超微结构, 并留取肺、脑脏器, 病理 HE 染色观察。**结果** 模型组裸鼠于第 3 周开始出现体重减轻, 并逐渐出现恶液质, 全部裸鼠于第 4 周处死。肉眼取材时, 胸廓、肺、脑、脏器均未见到转移灶。HE 染色示: 模型组裸鼠均出现大小不一的多发脑转移灶。硝酸镧示踪电镜示, 模型组可见硝酸镧颗粒侵入到血管腔外, 稀疏或者弥漫地分布在脑组织中, 空白组镧颗粒仅沉积在血管腔内。**结论** 弥散分布地镧颗粒说明了模型中血脑屏障结构的不完整性, 而肺癌脑转移的发生伴随着血脑屏障结构的破坏。

【关键词】 肺癌脑转移; 血脑屏障; 硝酸镧; 透射电镜; 左心室注射; 裸鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0494-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.010

Ultrastructural observation of blood-brain barrier in the nude mouse model of brain metastases from lung cancer

CHEN Yu-sheng*, TU Xun-wei, YU Mei-e, CHEN Zheng-wei,
LI Hong-ru, ZHONG Xiu-rong, ZHOU Lin-ying

(Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To observe the ultrastructure of blood-brain barrier in the nude mouse model of brain metastases from lung cancer by transmission electron microscopy using lanthanum nitrate tracing. **Methods** PC-9 cells ($1 \times 10^6/0.1 \text{ mL}$) in logarithmic phase were respectively injected into six nude mice (model group) selected from eight nude mice randomly via the left ventricle, the other two mice without any treatment as the control group. The general status of the mice was observed after implantation. In the fourth week all the mice were sacrificed and brain tissue samples were taken and prepared for transmission electron microscopic observation using lanthanum nitrate tracing. besides, the lung and brain were removed and stained with HE to detect the presence of tumor metastasis. **Results** Mice in the model group began to lose weight almost simultaneously in the third week and became moribund slowly, and were all sacrificed at the fourth week when showing clear signs of cachexia. At autopsy, the thoraxes were clear, with normal lungs. Histology showed evidence of brain metastasis in all the six mice. The electron microscopy showed that lanthanum nitrate tracer was escaped from the capillaries and diffusely or sparsely distributed in the brain tissues of the model group mice, however lanthanum nitrate tracer was still confined in the capillary lumen in the mice of control group. **Conclusions** The diffuse lanthanum nitrate tracer in the brain parenchymal tissue indicates the impairment of blood-brain barrier in the nude mouse model of lung cancer brain metastasis and the formation of these metastases is accompanied with the destruction of blood brain barrier.

【Key words】 Brain metastasis, lung cancer; Blood-brain barrier; Lanthanum nitrate; Transmission electron mi-

【基金项目】 国家卫生和计划生育委员会科研基金 (WKJ-FJ-17, 2013-2016); 福建省立医院优秀青年医师项目 (2014YNQN03); 福建省自然科学基金 (2015J01376)。

【通讯作者】 陈愉生 (1957 年 -), 女, 教授, 博士生导师。E-mail: slyyywb@126.com

croscopy; Left ventricular injection; Nude mice

Corresponding author: CHEN Yu-sheng. E-mail: slyyywb@126.com

肺癌最常见的远处转移部位之一是脑部,肺癌脑转移的发生率为 23% ~ 65%,是脑转移性肿瘤中最常见的类型^[1]。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是位于脑组织与血液间的一个复杂系统,它能阻止血流中的大多数物质进入中枢神经系统,在维持中枢神经系统内环境的稳定中起着十分重要的作用。相关研究表明^[2-4],外伤、缺血缺氧、感染、免疫、肿瘤发生及理化因素的改变等均可引起血脑屏障紧密连接的结构与功能发生改变,造成 BBB 的损害,进而导致中枢神经系统的相关病变。本研究首先通过建立肺癌脑转移实验动物模型,然后行硝酸镧示踪电镜技术观察脑转移过程中血脑屏障超微结构的变化情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 裸鼠与细胞

BALB/c 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-002】,8 只,体重(16 ± 2)g/只,4 ~ 6 周龄,均为雌性,饲养于福建医科大学动物实验中心 SPF 级动物室【SYXK(闽)2012-0001】;所用的饲料、水、垫料都经过严格灭菌处理,并按动物实验的 3R 原则给予人道的关怀。PC-9 人肺腺癌细胞系由华中科技大学同济医学院同济医院分子医学中心惠赠。

1.1.2 试剂与设备

RPMI 1640 培养基(HyClone,美国)、胎牛血清(杭州四季青,中国)、0.25% Trypsin-EDTA(Gibco,美国)、Pen-strep(Gibco,美国)、硝酸镧 LaNO₃(成都,西亚)、25% 戊二醛水溶液(上海,Alfa Aesar)、二甲砷酸钠(成都,西亚)、氢氧化钠(汕头,西陇)、多聚甲醛(天津,科密欧)、倒置显微镜(奥林巴斯,日本)、生物安全柜和 CO₂ 培养箱(三洋,日本)、EM208 型透射电子显微镜(Philips,荷兰)。

1.2 方法

1.2.1 细胞准备

PC-9 细胞常规培养于 RPMI 1640 培养液(10% FBS + 1% 双抗 + 1% Glu)中,于 37℃ 含有 5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期的细胞,经胰酶消化制备细胞悬液,以 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入无血清的 1640 培养基,吹打、再次

1000 r/min 离心 5 min,以无血清培养基稀释至细胞密度为 1 × 10⁷ 个/mL 的单细胞悬液。

1.2.2 裸鼠肺癌脑转移实验动物模型的建立

6 只裸鼠经麻醉固定后,于胸骨左缘第二肋间旁开 2 mm 处进针(进针前调节好 BD 针头至滞留空气 0.05 mL 左右后,再吸取细胞液;进针 3 ~ 5 mm,以观察到血液喷射涌出作为进入左心室的标准;并在 10 s 内完成注射),注入肿瘤细胞悬液 0.1 mL(即 1 × 10⁶ 个肿瘤细胞),注射完毕后快速拔针,棉签按压进针点。接种后的裸鼠置于 SPF 环境内继续饲养,并密切观察裸鼠的精神状态、一般情况等。当裸鼠出现严重恶液质时行硝酸镧示踪电镜技术观察血脑屏障的超微结构,并予以处死,留取脑、肺脏器,经脱水固定、石蜡包埋、切片、HE 染色观察。

1.2.3 相关试剂的配置

1% LaNO₃ - 2% 多聚甲醛 - 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液(cacodylate buffer solution, CBS)灌注固定液的配置:称取硝酸镧 0.5 g 于烧杯中,加入蒸馏水 5 mL,用 1 mol/L NaOH 调制乳白色;再依次加入 8% 多聚甲醛 12.6 mL,0.2 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 25 mL,最后加蒸馏水定容至 50 mL 左右(注意:当加入多聚甲醛时,烧杯中会出现白色沉淀,期间可于 60℃ 水浴箱加热,并且不断搅拌,待白色沉淀逐渐减少,1 mol/L NaOH 调溶液 pH 值至 7.4 左右即可)。

1% LaNO₃ - 3% 戊二醛 - 1.5% 多聚甲醛 - 0.1 mol/L CBS 前固定液的配置:称取硝酸镧 0.5 g 于烧杯中,加入蒸馏水 5 mL,用 1 mol/L NaOH 调制乳白色;再依次加入 25% 戊二醛 6 mL,8% 多聚甲醛 9.5 mL,0.2 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 25 mL,最后加蒸馏水定容至 50 mL 左右。

1% LaNO₃ - 0.1 mol/L CBS 漂洗液的配置:先称取 2 g 硝酸镧溶于 100 mL 蒸馏水中,配成 2% LaNO₃ 溶液;再与等体积的 0.2 mol/L CBS 混合,即为 1% LaNO₃ - 0.1 mol/L CBS 漂洗液。

其他后固定、脱水液等试剂的配置都必须保证其内含有 1 份子水平的 LaNO₃。

1.2.4 硝酸镧示踪电镜技术

8 只裸鼠经 5% 水合氯醛 0.2 mL 腹腔麻醉后,打开胸腔,固定心脏,左心室进针,右心房开小口,先用 0.9% 生理盐水灌注约 10 mL 至右心房流出液体

变浅、肝脏变白,再经 1% LaNO_3 - 2% 多聚甲醛 - 0.1 mol/L CBS 灌注固定液灌注 5 mL 左右(小鼠出现四肢强直即可),开颅取出脑组织,随机剪取多个 1 mm^3 大小组织块,经 1% LaNO_3 - 0.1 mol/L CBS 漂洗液漂洗,1% LaNO_3 - 3% 戊二醛 - 1.5% 多聚甲醛 - 0.1 mol/L CBS 前固定液 4℃ 固定过夜,1% 锇酸 - 1% LaNO_3 后固定,系列酒精、丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋。超薄切片经铅染色后,EM208 型透射电子显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 裸鼠情况

模型组裸鼠于第 3 周普遍开始出现体重减轻,并逐渐出现恶液质(具体表现为弓背、消瘦、精神萎靡、呼吸急促、偏瘫等)(图 1-A),全部裸鼠于第 4 周处死。开胸后:胸腔视野未见异常(图 1-B);肺、脑脏器肉眼取材时未见到转移灶(图 1C-D)。病理 HE 示:模型组 6 只裸鼠均出现大小不一的多发脑转移灶(图 1E-F)。肺组织切片未见转移灶形成。

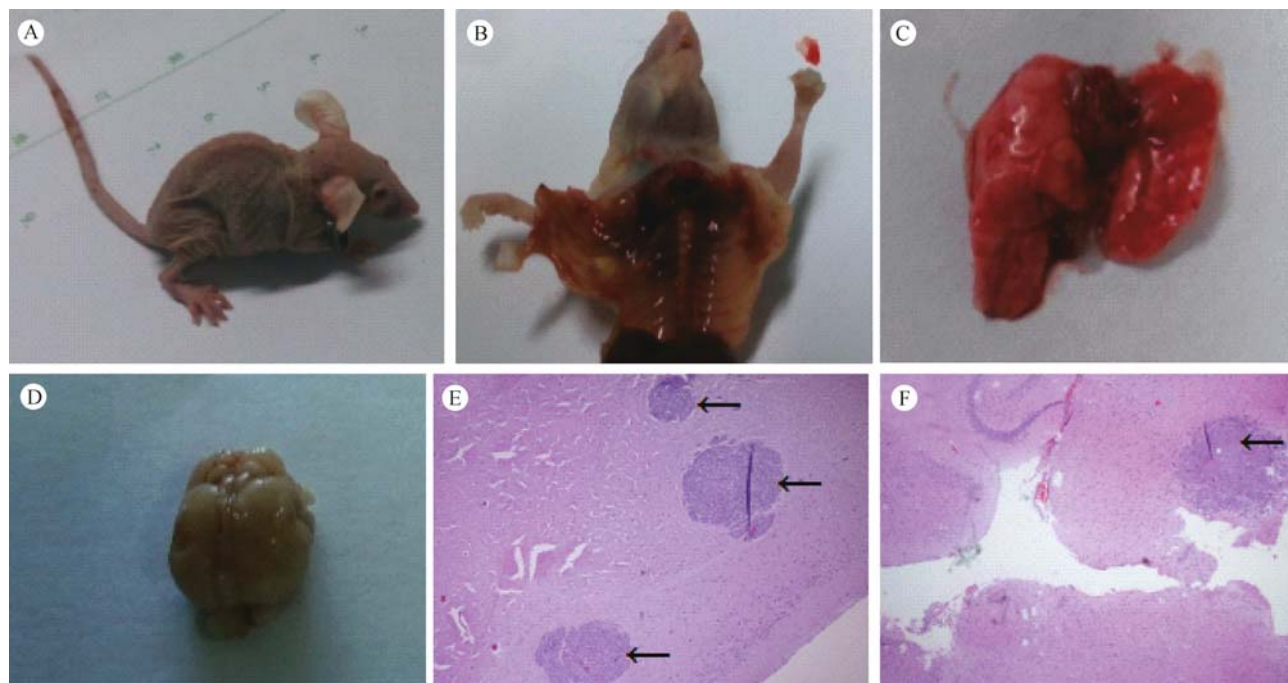
2.2 血脑屏障超微结构观察

血脑屏障主要是由脑微血管内皮细胞及其间的紧密连接、基底膜、星形胶质细胞组成。硝酸钡作为

小分子物质,正常情况下不能通过血脑屏障,进入脑组织内,所以硝酸钡可作为早期示踪剂用于判断 BBB 的完整性。如图 2A-B 可见硝酸钡颗粒稀疏或者成团点状地分布于血管腔内,内皮细胞间以及内皮细胞与基底膜间完整,钡颗粒并未渗透到管腔外、周围脑组织中,见于空白组,提示完整的 BBB 结构;图 2C-D 见于模型组脑组织中,可见硝酸钡颗粒部分残留于血管腔内,部分则稀疏或者弥散地分布在脑组织中,提示 BBB 结构的破坏。另外,在模型组取材时,幸运地取到带有结节灶的脑组织块,如图 2E-F 所示,可见成团分布的 PC-9 人肺腺癌细胞,期间尚可见到正常脑组织的髓鞘,而硝酸钡颗粒散落分布在 PC-9 细胞周围。

3 讨论

钡作为重金属元素,在电镜下因电子密度高而易见其沉淀物。硝酸钡颗粒分子量为 433 U,粒径约为 4 nm,在正常情况下,难以通过完整的细胞膜和紧密连接结构。在某些病变的早期,虽然未见细胞形态学改变,但细胞膜或者紧密连接结构已有部分破坏,此时钡颗粒可通过细胞膜和紧密连接为早期病变提供形态依据^[5]。血脑屏障主要由脑微血

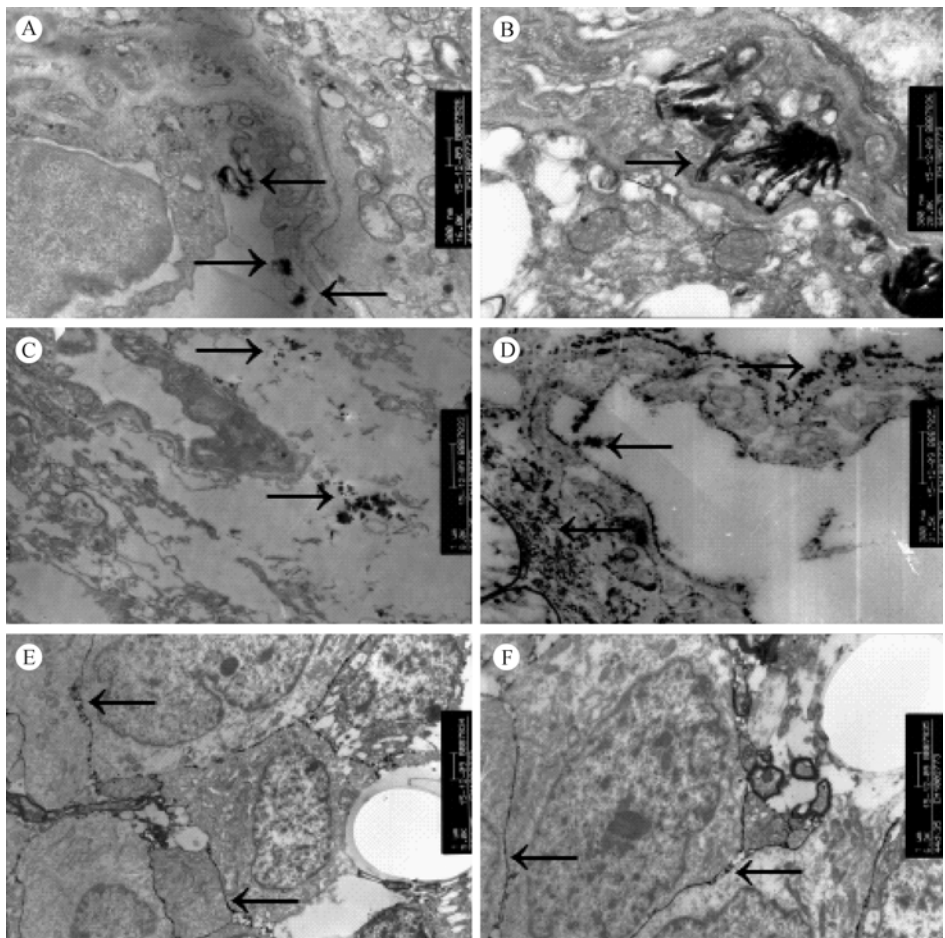


注: A. 第四周恶液质裸鼠(模型组); B、C、D. 裸鼠胸腔-肺-脑形态(模型组); E、F. 病理 HE 示多发脑转移灶(模型组)(HE 染色, $\times 10$)。

图 1 裸鼠解剖-病理形态

Note. A: A model nude mouse showing cachexia at the fourth week; B-D: Thorax, lung and brain at autopsy in a mouse of the model group; E-F: Metastatic lesions in the brain of a model mouse.

Fig. 1 Gross and histological features of the nude mice



注: A、B. 硝酸镧颗粒沉积在血管腔内(空白组); C. 硝酸镧颗粒弥散地分布在脑组织中, 伴脑组织水肿(模型组); D. 硝酸镧颗粒部分沉积在血管腔, 部分弥散到管腔外、脑组织中(模型组); E、F. PC-9 肿瘤细胞团(模型组)。

图 2 血脑屏障超微结构

Note. A-B: Lanthanum nitrate tracer remained in the inner wall of capillary in a control mouse. TEM, $\times 16000/20000$. C-D: Lanthanum nitrate tracer distributed sparsely or diffusely in the brain parenchymal tissues in the model mice. TEM, $\times 8000/31500$; E-F: Lanthanum nitrate tracer was seen between the tumor cells, TEM, $\times 5000/6300$. Arrows pointed to the lanthanum nitrate tracer).

Fig. 2 Ultrastructure of the blood-brain barrier

管内皮细胞、星形胶质细胞足突、周细胞和基底膜组成, 而脑微血管内皮及其间的紧密连接又是血脑屏障结构功能的基础。故本实验拟通过硝酸镧示踪技术观察裸鼠肺癌脑转移中血脑屏障结构情况。

根据课题组前期建模^[6]发现, 经左心室注射的方法可以保证 100% 的脑部成瘤率, 且裸鼠生存情况相对一致, 故在本次实验中选择建模第 4 周的裸鼠行硝酸镧示踪电镜技术观察血脑屏障超微结构的变化情况(此时, 裸鼠出现严重恶液质并且体重下降到原来 20%)。电镜结果显示: 空白对照组可见硝酸镧颗粒成团地、不规则地沉积在血管腔内, 但未渗透到管腔外、脑组织中, 切面中可见的内皮细胞及基底膜结构保持完整; 而模型组中, 硝酸镧颗粒除了部分沉积在血管腔内, 部分则稀疏或者弥漫地分布

在脑组织中, 但图中并未见到明显的内皮细胞或者基底膜的破坏, 我们考虑这可能与标本取材、切面方向等有关。另外, 我们幸运地取到带有转移灶的脑组织块, 虽然当时肉眼并未见到瘤结, 但电镜结果却看到了成团分布的 PC-9 肿瘤细胞, 细胞周围可见到正常髓鞘组织, 而硝酸镧颗粒零星地分布在肿瘤细胞周围, 并未进入肿瘤细胞内。再结合病理 HE 结果, 我们推测, 肺癌脑转移的发生伴随着血脑屏障超微结构的改变: 肿瘤细胞在破坏血脑屏障结构的完整性后, 才有可能穿过血脑屏障, 进入脑组织形成转移灶。而肿瘤细胞是如何引起血脑屏障紧密连接结构功能的改变? 脑转移形成的具体机制? 尚需进一步研究。有研究表明钙激活钾通道的激活^[7]能导致了 BBB 通透性的改变。

硝酸镧作为示踪剂,近年来被广泛用于观察体内某些生物屏障超微结构的变化情况^[8-14]。硝酸镧示踪电镜技术与常规电镜观察技术相比的优势,在于其能够早期发现病灶的微小变化。但是硝酸镧示踪电镜技术对材料试剂的准备、配置要求比较高;试剂的剂量、酸碱度、浓度值是影响实验结果的关键。由于电镜取材块大小要求在 1 mm³ 左右,故可将剩余组织用于病理 HE 染色观察成瘤情况。钟秀容等^[15]提到使用 1% LaNO₃-1% 戊二醛-1% 多聚甲醛-0.1 mol/L CBS 比例的灌流液,但考虑到戊二醛会影响光镜下病理 HE 染色的观察,故在本实验中考虑不使用戊二醛成分参与灌流液的配置,而相应地提高了多聚甲醛的浓度,故最终使用 1% LaNO₃-2% 多聚甲醛-0.1 mol/L CBS 的灌流液。

吴松笛等^[16]在研究急性脑缺血再灌注损伤中血脑屏障变化情况时,就通过硝酸镧示踪电镜的方法观察缺血再灌注不同时间点血脑屏障超微结构变化情况,结果动态地反应了镧颗粒渗透通过 BBB 的过程及细胞微结构的变化。而在本次实验中,我们仅对末期裸鼠进行硝酸镧示踪实验,倘若对同批裸鼠在分不同时间段进行硝酸镧示踪,是否能够进一步客观动态地观察到肺癌脑转移早、中期血脑屏障超微结构的变化:如硝酸镧颗粒渗透到内皮细胞间;渗透到内皮细胞层与基底膜间,内皮细胞及基底膜或者星形胶质细胞足突的破坏等。此外,吴波等^[17]在研究大鼠脑胶质瘤血脑屏障结构时,发现胶质瘤可以导致紧密连接开放,进而导致 BBB 通透性增大,而胶质瘤诱导屏障功能破坏的能力随其距肿瘤距离增加而减弱。而在本次实验中,由于肉眼取材时并不能见到转移灶,且取材块小,存在随机性,因此我们就脑转移灶与其附近微血管屏障结构功能的关系尚无法判断。但弥散分布在脑组织中的硝酸镧颗粒间接说明了血脑屏障紧密连接结构的破坏,因此我们推测,肺癌脑转移的发生伴随着血脑屏障结构的改变。

参 考 文 献

- [1] Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, et al. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies [J]. Acta Neuropathol, 2012, 123(2): 205-222.
- [2] Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood brain barrier: development, composition and regulation [J]. Vascul Pharmacol, 2002, 38: 323-337.
- [3] Hawkins BT, Davis TP. The blood brain barrier/neurovascular unit in health and disease [J]. Pharmacol Rev, 2005, 57: 173-185.
- [4] Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, et al. Molecular and cellular permeability control at the blood brain barrier [J]. Brain Res Rev, 2001, 36: 258-264.
- [5] 钟秀容,周琳瑛,陈文列,等. 三种电镜技术在细胞紧密连接研究中的应用 [J]. 福建医科大学学报, 2002, 36(1): 103-105.
- [6] 陈愉生,涂洵崴,俞梅娥,等. 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 490-494.
- [7] Ningaraj NS, Rao M, Hashizume K, et al. Regulation of blood brain tumor barrier permeability by calcium-activated potassium channels [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 301(3): 838-851.
- [8] 刘增波,梅长林,胡惠民,等. 镧示踪法透射电镜显示肾脏细胞糖萼的方法学研究 [J]. 临床肾脏病杂志, 2015, 15(1): 42-46.
- [9] 贾勤惠,贾国良,裴其应,等. 兔顿抑心肌局部 5-HT NE 血小板聚集率及心肌超微结构改变 [J]. 心肺血管病杂志, 2001, 20(1): 106-108.
- [10] 彭页,程义成,梅盛林,等. 电磁脉冲辐照对小鼠血-脑屏障早期影响及 TGFβ 表达意义 [J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(1): 11-15.
- [11] 邱萍,张作明,姜勇,等. 噪声暴露对大鼠视网膜屏障超微结构的损害 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(8): 499-501.
- [12] 孔武明,龚均,董蕾,等. 肠易激综合征患者肠道屏障-紧密连接改变的示踪电镜观察 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(8): 1167-1172.
- [13] 朱瑾,刘兆华. 水杨酸钠对豚鼠内耳血管通透性的影响 [J]. 临床耳鼻喉科杂志, 2002, 16(12): 687-688.
- [14] 崔光彬,魏经国,王玮,等. 博来霉素对大鼠肺微血管内皮细胞紧密连接改变及 Cx43 表达变化的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(2): 99-102.
- [15] 钟秀容,吴翊钦,陈文列,等. 大鼠松果体血脑屏障的电镜细胞化学实验观察 [J]. 解剖学杂志, 2001, 24(5): 440-443.
- [16] 吴松笛,万琪,夏峰,等. 大鼠急性脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的超微结构与血清 S100B 蛋白水平的动态变化 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(10): 902-904.
- [17] 吴波,游潮,黄光富,等. 大鼠 C6 脑胶质瘤血脑屏障的硝酸镧示踪电镜研究 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(1): 28-33.

[收稿日期] 2016-04-11