



人结肠癌细胞系绿色荧光蛋白裸鼠 移植瘤模型的建立与观察

胡文娟, 梁磊, 尤金炜, 方天, 刘彪, 陈莉, 贾春梅, 许龙祥, 恽时锋

(南京军区南京总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地, 全国科普教育基地, 南京 210002)

【摘要】 目的 建立绿色荧光蛋白(GFP)裸鼠结肠癌肿瘤模型,并与普通裸鼠结肠癌肿瘤模型进行比较,观察其在肿瘤形态学、生物学特性及病理学之间的差异。**方法** 将处于对数生长期的 KM12SM 人结肠癌细胞分别接种于 10 只 GFP 裸鼠和 10 只裸鼠的右侧腋窝皮下,观察成瘤时间,肿瘤体积及病理形态等情况。**结果** GFP 裸鼠平均成瘤时间约为 4~5 d,裸鼠约为 6~8 d;接种第 20 天,裸鼠组测得体积约为 $(3463.43 \pm 341.39) \text{ mm}^3$,GFP 裸鼠组肿瘤体积约为 $(4923.46 \pm 521.72) \text{ mm}^3$,存在显著差异。镜下见肿瘤细胞生长活跃,大小较为均匀,部分区域可见腺腔形成。**结论** 经比较研究,GFP 裸鼠在结肠癌肿瘤模型的成瘤时间,肿瘤质量等方面较裸鼠具有一定的优势,可为结肠癌转移的机制探讨和诊断治疗研究提供更为理想的动物模型。

【关键词】 绿色荧光蛋白裸鼠;KM12SM 细胞;模型;结肠癌

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0057-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.012

Establish and observe the human colon cancer cell lines with GFP nude in transplantation tumor model

HU Wen-juan, LIANG Lei, YOU Jin-wei, FANG Tian, LIU Biao, CHEN Li,

JIA Chun-mei, XU Long-xiang, YUN Shi-feng

(Comparative Medicine Branch in Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command,
Experimental Animal's Popularization of Science and Ethical Education Al Oaeda in the

Whole Army, National Popularization of Science and Education Al Oaeda, NanJing, China 210002)

【Abstract】 Objective To establish ectopic colon tumor model in GFP nude, make a comparative study of the differences between tumor morphology, biological characteristics and pathology with ectopic colon tumor model in BALB/c nude. **Methods** Use KM12SM colon cancer cells of the logarithmic growth phase seeded in right axillary subcutaneous on the GFP nude and BALB/c nude. Observed time of tumor formation, tumor volume, pathological conditions and other. **Results** The average time of tumor formation in GFP nude was 4~5 d, BALB/c nude was 6~8 d; The first 20 days after inoculation, tumor volume of BALB/c nude group was about $(3463.43 \pm 341.39) \text{ mm}^3$, GFP nude was about $(4923.46 \pm 521.72) \text{ mm}^3$. There are significant differences. Tumor cells growth activity, have relatively uniform size, some areas visible glandular formation on the microscope. **Conclusion** By comparison study, the GFP nude have certain advantages on the time of tumor formation, quality and other aspects in colon tumor model than the BALB/c nude. Provide more desirable animal model for investigating the mechanism of colon cancer lymph node metastasis, diagnosis and treatment.

【Key words】 GFP nude;KM12SM cells;Model;Colon cancer

动物模型是人类肿瘤学研究的重要工具之一,人类肿瘤裸鼠移植模型已成为肿瘤学研究的重要方法。在人类肿瘤移植于裸鼠受体前,远期排斥作用和受体动物容易死亡是人类肿瘤异种移植成功率低的主要原因^[1]。而且其还有操作复杂、观察困难等缺点。如今,裸鼠已能够广泛应用于肿瘤模型的建立与研究。

GFP 裸鼠是本科室将绿色荧光蛋白基因 (green fluorescence protein, GFP) 导入 BALB/c nude 小鼠而得来。GFP 现已成为细胞生物学和分子生物学中应用最广泛的分子标记之一。GFP 裸鼠因自身含有标记蛋白与普通裸鼠相比而具有明显的优势,国内外目前关于普通裸鼠肿瘤模型的建立已有不少,但还未曾有使用 GFP 裸鼠建立肿瘤模型的例子。因此,将 GFP 裸鼠与普通裸鼠在肿瘤模型的建立方面做比较研究具有较大的科学意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物准备

分别取雌性 SPF 级裸鼠及 GFP 裸鼠 (GFP nude) 各 10 只,约为 5~6 周龄,体重 15~20 g (裸鼠购于常州卡文斯实验动物有限公司【SCXK (苏) 2011-0003】), GFP 裸鼠为本科室提供【SCXK (军) 2012-0014】), 将实验动物均置于无菌条件下饲养【SYXK (军) 2012-0047】), 饲料和水自由摄入, 严格灭菌处理, 保持一定的温度与湿度。

1.2 肿瘤细胞培养及收集

将人类结肠癌肿瘤细胞株 KM12SM 采用含 10% 胎牛血清的培养基, 内含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL, 置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养。取处于对数生长期的细胞用胰酶消化制成单细胞悬液, 离心 3 min, 弃上清液, 经无血清的培养基液洗 3 遍, 细胞计数, 加无血清培养基调整细胞浓度为 1×10^7 /mL。

1.3 动物模型构建

使用 1 mL 无菌注射器将细胞悬液分别注入 GFP 裸鼠及普通裸鼠右侧腋窝皮下, 每只实验鼠的注射量为 0.2 mL, 约含细胞量 2×10^6 个。

1.4 成瘤情况观察

实验结束后, 观察两组实验鼠的一般情况 (饮食、饮水、睡眠、排泄、活动状态等), 成瘤时间 (以肉眼可见瘤结节为标准), 每 3 d 测量并记录实验鼠的体重, 测量瘤体长径、短径等, 计算肿瘤体积 (肿瘤体积 = 长径 $\times$ 短径²/2), 直至移植瘤全部坏死, 绘制肿瘤生长曲线。

1.5 病理检查

处死实验鼠, 剥取肿瘤组织及周围淋巴结, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 显微镜下观察肿瘤组织生长、浸润及转移情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件对测得的所有数据进行统计学处理, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同实验鼠之间采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 一般情况观察

GFP 裸鼠与裸鼠均未见死亡, 成瘤率 100%。实验初期两组实验鼠精神状态较好, 饮水、饮食正常, 反应敏捷; 随着后期瘤体的增大, 均出现进食, 活动减少, 反应迟钝等现象, 裸鼠体重下降较为明显。

2.2 肿瘤出现时间

GFP 裸鼠组于接种后 4~5 d 在右前肢腋窝皮下长出肉眼可见的肿瘤, 裸鼠组于接种后 6~8 d 在腋下长出可见肿瘤, 差异显著。

2.3 肿瘤生长情况

实验鼠均长出肉眼可见的移植瘤, 外观呈现不规则状, 质地较硬, 活动性好, 与周围组织界限较清楚, 并随着时间的推移而逐渐增大。根据表 1 及图 1 (肿瘤生长曲线图) 显示, 接种第 16 天开始, 两组实验鼠测得的肿瘤体积存在显著差异 ($P < 0.05$), 在成瘤后肿瘤生长速率方面, GFP 裸鼠肿瘤生长速度比裸鼠要快; 在接种第 20 天, 裸鼠组测得体积约为 $(3463.43 \pm 341.39) \text{ mm}^3$, GFP 裸鼠组肿瘤体积约为 $(4923.46 \pm 521.72) \text{ mm}^3$, 存在显著差异 ($P < 0.05$)。据图 2 可直观的看出 GFP 裸鼠移植肿瘤生长情况优于裸鼠。图 1, 图 2 彩插 4。

表 1 GFP 裸鼠与裸鼠皮下肿瘤的体积分析
Tab. 1 Analysis of the subcutaneous tumor volume in GFP nude and BALB/c nude

接种天数(d) Inoculate day	8	10	12	14	16	18	20
肿瘤体积(mm ³) Tumor volume							
GFP 裸鼠	806.47 ±	1245.06 ±	1810.344 ±	2367.76 ±	2867.45 ±	3886.92 ±	4923.46 ±
GFP nude	46.19	153.17	182.58	249.49	456.79	552.01	521.72
裸鼠	524.54 ±	904.31 ±	1344.44 ±	1710.22 ±	2115.12 ±	2748.98 ±	3463.43 ±
BALB/c nude	60.98	98.61	118.62	77.81	83.07 [△]	287.68 [△]	341.39 [△]

注:与 GFP 裸鼠比较;[△] $P < 0.05$.

Note: Compared with the GFP nude, [△] $P < 0.05$.

2.4 肿瘤组织病理学观察

实验鼠处死后,取瘤体观察,均为球形结节状,肿瘤为非浸润生长;瘤体有完整的包膜包裹,与周围组织分界清晰,容易分离,剖面呈鱼肉状,血供丰富,瘤块中央可见局灶性坏死,GFP 裸鼠瘤体体积比裸鼠瘤体更大一些。HE 染色显示肿瘤细胞排列紧密,瘤细胞生长活跃,大小较为均匀,核质深染,染色质粗,部分区域可见腺腔形成。根据图 3、图 4 所示(彩插 4),GFP 裸鼠移植瘤细胞比裸鼠瘤细胞排列更加紧密,可见瘤细胞生长情况更为活跃。肿瘤细胞分泌粘液,并侵犯周边结缔组织。

3 讨论

肿瘤已成为当前威胁人类最严重的常见病之一,每年死于肿瘤的人数以百万计,因此,建立肿瘤模型,进行防治研究,是基础医学研究中的重要课题^[2]。肿瘤模型对研究肿瘤的病因、发病机制、抗癌药物筛选机肿瘤防治等具有非常重要的意义^[3]。肿瘤分子生物学的迅猛发展迫切需要简便快速、成瘤时间短和稳定性好的动物模型,以此作为研究平台进行后续的药物或其他实验研究^[4]。皮下移植瘤种植操作较为简便,创伤小,且易于测量瘤体直径,因此本实验采取皮下移植瘤这一动物模型制作方法进行研究比较。理想的肿瘤动物模型应具备以下条件:(1)致癌方法简便易行;(2)经济快速;(3)指标客观明确;(4)对癌变器官的特异性高;(5)重复性好;(6)诱发肿瘤的病理类型、生物学行为、电镜下表现及组织化学改变应与人体肿瘤相似^[5]。结肠癌动物模型也应如此。

本实验采用细胞悬液直接腋窝皮下注射的方法分别构建了 GFP 裸鼠及裸鼠结肠癌动物模型。GFP 裸鼠组与裸鼠组均未见死亡,平均成瘤率 100%,GFP 裸鼠组于接种后 4~5 d 在右前肢腋窝皮下长出肉眼可见的肿瘤,裸鼠组于接种后 6~8 d

在腋下长出可见肿瘤,存在显著差异。随着后期瘤体的增大,两组均出现进食,活动减少,反应迟钝等现象,GFP 裸鼠组的精神状态较裸鼠组稍好一些。从接种第 16 天开始,两组实验鼠测得的肿瘤体积存在显著差异($P < 0.05$),在接种第 20 天,裸鼠组测得体积约为(3463.43 ± 341.39)mm³,GFP 裸鼠组肿瘤体积约为(4923.46 ± 521.72)mm³,存在显著差异($P < 0.05$)。根据肿瘤生长曲线,可直观显示成瘤后肿瘤生长速率方面,GFP 裸鼠肿瘤生长速度比裸鼠要快。这些数据与廖前进^[6]等报道的数据存在差异,可能与小鼠的品种,测量方法及生长环境等有关。

综上所述,可见 GFP 裸鼠在成瘤时间,精神状态,肿瘤质量等方面与裸鼠相比,具有一定的优势,肿瘤生长曲线图也可直观的看出 GFP 裸鼠组肿瘤生长情况优于裸鼠组。由于 GFP 裸鼠将绿色荧光蛋白基因导入 BALB/c nude 小鼠,使得自身含有标记蛋白,绿色荧光蛋白基因的导入可能改变了 GFP 裸鼠的蛋白表达,造成 GFP 裸鼠免疫功能与裸鼠比更为低下,还有待以后的进一步比较研究。通过本实验比较研究,我们可以看出 GFP 裸鼠较裸鼠而言,可为结肠癌淋巴转移的机制探讨和诊断治疗研究提供更为理想的动物模型。

参考文献:

- [1] 梁文丰,郑琳,冯韵恬,等. PDX 裸鼠模型研究进展[J]. 中国科技论文在线精品论文. 2014,7(5):398-402.
- [2] 赵勇,伍静,毛峰峰,等. 裸鼠荷瘤实验中常见问题的解析和总结[J]. 中国比较医学杂志. 2012,22(7):17-20.
- [3] 李桂园,陈龙邦,臧静,等. C57BL/6 小鼠黑色素瘤 B16 细胞株在 ICR 小鼠肿瘤模型的建立[J]. 医学研究生学报. 2003,16(4):262-266.
- [4] 唐杨琛,沈干,胡世莲,等. 两种方法建立人胃癌裸鼠移植瘤模型的比较[J]. 中国临床保健杂志. 2013,16(2):180-182.
- [5] 李友堂,李鸿茹,陈颖,等. 人肺腺癌裸鼠皮下移植瘤模型的

建立[J]. 福建医药杂志. 2010,32(1):80-82.

[6] 廖前进,苏坚,何洁,等. DADS 对人结肠癌 SW480 细胞裸鼠致瘤的影响[J]. 实用癌症杂志. 2010,25(3):225-227.

[修回日期]2014-10-20

关于在科学研究中防控埃博拉病毒的建议

自今年 2 月以来,从几内亚开始的新一轮埃博拉疫情正呈加速蔓延之势,8 月 8 日,WHO 正式宣布,西非埃博拉疫情是“国际关注的公共卫生突发紧急事件”,是近 40 年来这类疫情最复杂的一次暴发。截至 10 月 15 日,几内亚、利比里亚、塞拉利昂等国共报告埃博拉出血热病例 8997 例,死亡 4493 人。

埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)是由埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)引起的一种急性出血性传染病。世界卫生组织已将 EBOV 列为对人类危害最严重的第 4 级病毒,按照中华人民共和国卫生部制定的《人间传染的病原微生物名录》中的要求,EBOV 危害程度属于一类,“动物感染实验”必须在动物生物安全四级实验室(ABSL-4)内进行,可在生物安全三级实验室(BSL-3)内进行“未经培养的感染材料的操作”,可在生物安全二级实验室(BSL-2)内进行“灭活材料的操作”。

埃博拉病毒的自然宿主虽尚未最后确定,但已有多方证据表明猴子及猩猩等野生非人灵长类动物以及其他动物有 EBOV 感染现象,其在自然界的循环方式尚不清楚。接触传播是本病最主要的传播途径。有动物实验表明,埃博拉病毒可通过气溶胶传播,虽未证实,也应予以警惕,做好防护。

EBOV 包括五种亚型:扎伊尔埃博拉病毒(Zaire ebolavirus, EBOV),苏丹埃博拉病毒(Sudan ebolavirus, SUDV),本迪布焦埃博拉病毒(Bundibugyo ebolavirus, BDBV),塔伊森林埃博拉病毒(Tai forest ebolavirus, TAFV)和莱斯顿埃博拉病毒(Reston ebolavirus, RESTV)。这些不同种类的埃博拉病毒在致死率上有很大的差别,EBOV, SUDV, 和 BDBV 三种亚型可使人类感染后致死,其中扎伊尔埃博拉病毒的致死率最高,可达 60%~90%,其次为苏丹埃博拉病毒和本迪布焦埃博拉病毒。塔伊森林埃博拉病毒对黑猩猩有致死性,对人的毒力较弱,致病但不致死;莱斯顿埃博拉病毒对非人灵长类有致死性,人感染不发病。本轮爆发于西非的埃博拉疫情,病原体经证实为扎伊尔型埃博拉病毒。

尤其需要引起我国科研人员注意的是莱斯顿埃博拉病毒,它是唯一非洲之外发现的埃博拉病毒。1989~1996 年间美国从菲律宾进口的食蟹猴暴发埃博拉,分离到的毒株命名为莱斯顿埃博拉病毒。疫情致 1000 只猴子死亡或被实行安乐死,随后进一步检测发现菲律宾动物出口部门多位接触过这些动物的人员呈病毒抗体阳性,表明他们曾感染过该病毒。2008 年菲律宾几个猪场也分离到了该病毒,猪场工人体内有莱斯顿埃博拉病毒抗体,表明他们受到猪的传染。虽然莱斯顿埃博拉能引起食蟹猴发病和死亡,还没有人感染致发病的报道,但病毒可从猪传播到人的途径是确定的。

目前,中国内地和香港、澳门、台湾都还没有出现各类埃博拉病例,但目前世界各地交流频密,因此不能排除今后中国出现埃博拉个案的可能性。2014 年 8 月 4 日,国家质量监督检验检疫总局下发了《关于加强口岸埃博拉出血热疫情防控工作的通知》,要求各检验检疫局切实做好口岸卫生检疫工作,严防埃博拉出血热疫情传入我国。同时,我国也从科技方面做足了应急储备工作,包括病毒的检测、诊断试剂、抗体生产能力、以及疫苗的研发。