

· 临床研究 ·

# 人胃癌完整组织块裸鼠原位种植转移模型的建立

## Development of tumor metastasis model by implanting human stomach tumor in situ in nude rats

苏晓妹<sup>1\*</sup>, 许玲<sup>2</sup>, 陈亚琳<sup>2</sup>, 张涛<sup>1</sup>, 魏东<sup>1</sup>, 程朋<sup>1</sup>, 刘建华<sup>1</sup>

(1. 成都军区总医院肿瘤科, 成都 610083; 2 第二军医大学长征医院中医科, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 建立人胃癌完整组织块裸鼠原位种植高转移模型。方法: 人胃腺癌SGC-7901细胞株, 裸鼠皮下注射( $2 \times 10^6/L$  细胞悬液), 成瘤后反复传代形成实体瘤, 以第6代瘤源为组织材料, 打开腹腔, 通过“生物胶粘贴法”用OB医用生物胶将瘤块粘贴在裸鼠胃壁胃大弯血管分布稠密处; 待荷瘤鼠出现衰竭体征濒临死亡时处死解剖检查。结果: 术后3~4周左右, 上腹可触及0.1~0.4 cm 结节, 5~6周时逐渐增大。8~10周时肿块明显增大, 局部包块透壁可见, 直径约1.0~1.9 cm。此后动物极度消瘦, 部分动物腹水形成, 活动受限, 逐渐衰竭, 濒临死亡。解剖见原位肿瘤成瘤率100%, 病理学检查胃周淋巴结转移率100%, 肝脏转移率72.7%, 部分动物腹膜、胰腺转移。结论: 人胃癌完整组织块通过“生物胶粘贴法”原位种植于裸鼠胃壁, 能较好地重现胃癌的临床转移过程, 为人类胃癌生长、转移机制及抗转移治疗方面的研究提供了一种较理想的动物模型。

**[关键词]** 胃肿瘤; 原位种植; 裸鼠; 转移模型

**[中图分类号]** R 735.2

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 0258-879X (2004)09-1042-02

\* 对肿瘤的浸润和转移机制方面的研究及探索阻断肿瘤转移的方法, 前提是建立能反映临床人胃癌转移的模型。本实验运用OB医用生物胶将人胃癌组织块原位种植裸鼠胃壁, 成功地建立了人胃癌高转移模型。

### 1 材料和方法

1.1 皮下种植瘤模型的建立和传代 BALB/c nu/nu 裸鼠24只由中国科学院国家啮齿类上海实验分中心提供, 动物合格证号: SYXK(沪)2002-0033, 雄性, 6周龄, 体质量18~20 g, SPF级条件下饲养。人胃腺癌细胞株SGC-7901, 由中国科学院上海细胞生物研究所提供。  $2 \times 10^6/L$  细胞悬液裸鼠皮下注射, 成瘤后反复传代形成实体瘤, 本组瘤源为第6代。

1.2 人胃癌组织块裸鼠原位种植模型的建立 实验动物术前禁食12 h, 氯胺酮50 mg/kg 腹腔麻醉, 常规消毒, 选择左侧正中旁切口进腹, 暴露胃壁, 在胃大弯处近胃窦旁用1 ml 无菌空针头划破胃壁浆肌层, 用无齿镊将破损处向内推压, 使局部胃壁形成凹窝, 植入1块瘤组织块, 并在瘤表面滴上1滴OB生物胶(由广州白云医用胶公司提供), 使其覆盖组织表面, 约40 s 凝固后将胃壁回纳入腹腔, 0号丝线缝合腹膜及皮肤, 关腹。整个过程严格遵循无菌操作。所有模型动物无麻醉意外, SPF级饲养。术后1周内, 死亡2只。

定时观察所有裸鼠全身状况、运动情况、腹部体征。当荷瘤鼠出现明显消瘦、弓背、精神萎靡等衰竭体征时, 脱颈椎处死解剖, 取原位瘤体、肿大淋巴结、胸腹腔内脏器, 收取腹水。所取标本以10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, H-E 染色, 作组织病理学检查。按照文献<sup>[1]</sup>行实体瘤细胞染色体鉴定。

### 2 结果

2.1 大体解剖观察 术后3~4周左右裸鼠上腹可触及0.1~0.4 cm 结节肿块; 5~6周时逐渐增大; 8~10周时肿块明显增大, 局部包块透壁可见, 直径约1.0~1.9 cm, 表面呈

结节状, 质地较硬; 此后动物极度消瘦, 部分动物腹水形成, 活动受限, 逐渐衰竭, 濒临死亡。种植肿瘤成瘤率100% (22/22), 肿瘤呈实质性, 圆形或椭圆形, 表面结节状突起, 切面呈鱼肉状, 瘤体较大者切开中央有小片坏死区。大部分荷瘤鼠腹腔内淋巴结肿大, 波及范围各异, 腹膜转移率为59.1% (13/22), 肝脏转移率为72.7% (16/22)。多数荷瘤鼠肝脏可见数个灰白色粟粒样小结节, 81.8% (18/22) 荷瘤鼠出现血性腹水。部分可见肺、胰腺上转移灶。中位生存期为12周。

2.2 病理学检查和染色体鉴定 种植瘤体组织切片为低分化腺癌, 细胞为圆形、椭圆形, 胞质丰富, 核大畸形, 核仁深染, 核分裂相多见。癌细胞排列成索状、巢状, 在胃壁中呈浸润性生长, 细胞间有结缔组织。转移灶及腹水涂片细胞组织形态学同原位瘤体(图1A、1B)。

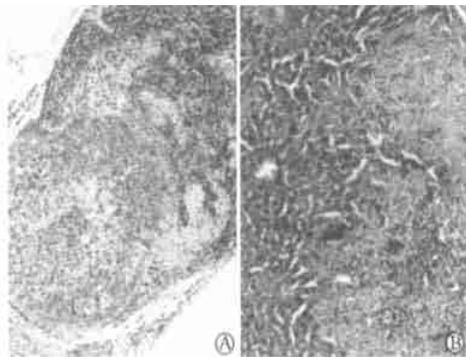


图1 胃癌腹腔淋巴结(A)和肝(B)转移灶组织(H-E)

A:  $\times 100$ ; B:  $\times 200$

胃肿瘤组织及转移灶组织细胞染色体为中央、亚中央、亚近端及近端着丝点, 无一端着丝点, 证明来源于人。而且一个细胞的染色体条数远远超过46条, 证明是恶性肿瘤细胞。

\* [作者简介] 苏晓妹(1975-), 女(汉族), 硕士生

\* Corresponding author: E-mail: Lisusu2003@hotmail.com

胞异常突变引起,表明原位及转移灶肿瘤均源于所种植的人类胃癌。

### 3 讨论

体外实验虽然能在一定程度上反映胃癌细胞的运动能力和侵袭能力,但是不能完全替代体内胃癌转移的器官环境及转移效果,因此体内移植模型成为肿瘤实验研究的主要方法。以往多是皮下移植,但可能因皮下纤维包膜的包绕致转移较少。近年研究<sup>[2~4]</sup>表明,肿瘤细胞株原位种植裸鼠体内不能完全表达肿瘤的生物特性,而完整组织块原位移植可显著提高转移率。

人胃癌 SGC-7901 细胞株是低分化腺癌,适宜作转移模型材料。本实验以 SGC-7901 裸鼠皮下移植瘤块原位种植裸鼠建立转移模型,该模型完整地重现了胃癌的临床转移过程,为人类胃癌的生长、转移机制及抗转移治疗方面的研究提供了一种理想的动物模型。

人类染色体 46 条,每条染色体的着丝点位置是恒定的,按其着丝点位置可分为 4 类,即中央、亚中央、亚近端及近端着丝点,而鼠组织中全为端着丝点,因此人类组织细胞所形

成的肿瘤可用染色体鉴定的技术探测出来。这是一种简便、敏感而可靠的分析方法,可用于各种动物模型转移灶的探测。

### [参考文献]

- [1] 刘权章 人类染色体方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992 269
- [2] Furukawa T, Fu X, Kubota T, *et al*. Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(5): 1204-1208
- [3] Yashiro M, Chung YS, Nisimura S, *et al*. Peritoneal metastatic model for human scirrhus gastric carcinoma in nude mice [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1996, 14(1): 43-54
- [4] Daneker GW Jr, Ellis LM. Colon cancer model metastasis: biologic significance and therapeutic considerations [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 1996, 5(1): 173-189

[收稿日期] 2004-01-10

[修回日期] 2004-04-28

[本文编辑] 李丹阳

## · 研究简报 ·

# 两种方法测定猪血小板衍生生长因子相对分子质量的对比分析

Molecular weight determination of porcine platelet-derived growth factor by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and high performance liquid chromatography analysis

杨子江<sup>2</sup>, 任雨笙<sup>1\*</sup>, 张天奇<sup>2</sup>, 黄佐<sup>1</sup>, 潘晓明<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003; 2. 河南省济源市肿瘤医院, 济源 454650)

[关键词] 血小板衍生生长因子, 猪, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 高效液相色谱, 相对分子质量

[中图分类号] Q 516 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X (2004) 09-1043-02

\* 血小板衍生生长因子(PDGF)是对机体组织器官具有广泛调节作用的多肽<sup>[1]</sup>,对提取、纯化的PDGF的相对分子质量和纯度进行分析,是了解其理化性质和生物学特性的基础。在生物化学领域中,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和高效液相色谱(HPLC)技术已广泛用于氨基酸、蛋白质、多肽、酶、核酸等产物的分离和鉴定。本实验在已提取和纯化猪PDGF(pPDGF)<sup>[2]</sup>的基础上,应用SDS-PAGE和HPLC法<sup>[3]</sup>对其进行相对分子质量( $M_r$ )和纯度的测定,并将两种方法的结果进行比较。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂 pPDGF<sup>[2]</sup>(第四军医大学生物技术中心),十二烷基硫酸钠(SDS)(苏州市第二化工研究所),2-巯基乙醇(Sigma公司),中相对分子质量蛋白质标准品( $M_r$  14 300~ 96 720, Promega公司),蛋白标准品(Pharmacia公司):牛血清白蛋白( $M_r$  66 460),卵白蛋白( $M_r$  42 660),糜蛋白酶原( $M_r$  24 800),核糖核酸酶( $M_r$  13 590)。

1.2 主要仪器 Mini-Protean II型电泳槽(Bio-Rad公司),

SEC3000 高效凝胶过滤柱 7.5 mm × 300 mm (Beckman 公司), Beckman 高效色谱 168 系统(包括 125 泵、168 检测器、Gold 软件)(Beckman 公司), TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 pPDGF 的 SDS-PAGE 分析 根据蛋白标准品的  $M_r$  计算出待测样品蛋白 pPDGF 的  $M_r$ , 方法参见文献<sup>[2]</sup>。

1.4 pPDGF 的 HPLC 分析

1.4.1 样品预处理 各蛋白标准品( $M_r$  13 590~ 66 460)分别用 0.02 mol/L PBS (pH 6.8) 配制成浓度为 200  $\mu$ g/ml 的溶液, 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后备用。待测 pPDGF 样品溶于 0.1 mol/L 乙酸, 对 0.02 mol/L PBS 透析过夜, 1 500 × g 离心 5 min 后, 取样品。

1.4.2 色谱条件 根据 pPDGF 的结构、性质以及 HPLC 的特性, 选择正相色谱和色谱柱。流动相: 0.02 mol/L PBS;

\* [基金项目] 上海市科技发展基金攻关计划项目(014119072)。

[作者简介] 杨子江(1966-),男(汉族),主治医师

\* Corresponding author. E-mail: ys\_ren@citiz