

人肾细胞癌原位移植裸鼠模型的建立及转移相关基因表达分析

谭晓洁¹, 侯建国², 贺松琴¹, 常文军¹, 刘世建¹, 余永伟³, 曹广文^{1*}

(1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433; 3. 长海医院病理科)

[摘要] **目的:** 建立原位移植裸鼠模型, 筛选同一标本来源的转移性和非转移性肾细胞癌(RCC)。**方法:** 采用皮下移植法、细胞悬液原位注射法、肾周筋膜内法、组织块原位移植肾包膜下法对 BALB/c 裸小鼠接种(或注射)RCC 组织块(或细胞悬液), 观察各种方法的成瘤及转移情况, 并采用免疫组化方法初步对比分析了 VEGF、bFGF、P16、Bcl-2、C-met 在裸小鼠体内的转移性和非转移 RCC 的表达情况。**结果:** (1) 组织块原位移植肾包膜下法成瘤率及转移率最高, 分别为 73.3%(11/15)、20%(3/15)。(2) 与原发灶相比, 转移灶中 VEGF 表达明显升高($P < 0.05$), C-met 表达明显降低($P < 0.05$), bFGF、Bcl-2、P16 表达降低但无统计学差异($P > 0.05$)。**结论:** 组织块原位移植肾包膜下法是切实有效的 RCC 转移模型制作方法。采用该法在裸鼠中获得了人转移性和非转移 RCC, 免疫组化分析证实了转移性 RCC 中新血管生成因子 VEGF 表达显著增加。

[关键词] 癌, 肾细胞; 肿瘤转移; 模型, 动物; 基因表达

[中图分类号] R 737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0263-05

Establishment of orthotopic mouse model of human renal cell carcinoma and expression analysis of metastasis-associated genes

TAN Xiao-jie¹, HOU Jian-guo², HE Song-qin¹, CHANG Wen-jun¹, LIU Shi-jian¹, YU Yong-wei³, CAO Guang-wen^{1*} (1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Pathology, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish orthotopic mouse models of human renal cell carcinoma and to separate metastatic or non-metastatic renal cell carcinoma (RCC) from the same source. **Methods:** Surgical specimens/cell suspensions were transplanted into the various tissues of BALB/c nude mice (subcutis, cellular orthotopic injection into renal capsule, perinephrium, surgical orthotopic implantation into renal capsule). Tumorigenicity and metastasis were subsequently evaluated. Immunohistochemical analysis was employed to determine the expression of VEGF, bFGF, P16, Bcl-2 and C-met in the metastatic and non-metastatic RCC xenograft. **Results:** The incidences of tumorigenicity and metastasis of orthotopic model were the highest, being at 73.3% (11/15) and 20% (3/15), respectively. Compared with the non-metastatic RCC, VEGF expression was upregulated in the metastatic RCC ($P < 0.05$), while the expression of C-met was downregulated significantly ($P < 0.05$); the expression of bFGF, Bcl-2 and P16 was also downregulated but without significance. **Conclusion:** Mouse orthotopic transplantation is the most effective way for the growth and natural metastasis of human RCC. Primary and metastatic RCC from the same patient has been successfully harvested. Expression of VEGF in the metastatic tumor tissues is significantly higher than that in the non-metastatic RCC.

[KEY WORDS] carcinoma, renal cell; neoplasm metastasis; model, animal; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 263-267]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)转移具有明显的不确定性, 预后极差。建立有效的人 RCC 动物模型是研究 RCC 的转移机制, 寻找转移标志物的基础。我们早期研究认为人肿瘤移植裸小鼠导致自然转移率很低, 通过改变肿瘤细胞的移植途径可提高转移效率^[1]。Orthotopic 移植是在充分考虑肿瘤与微环境相互作用的基础之上, 将人癌细胞移植到受体动物对应的组织或器官, 以期得到较高的成瘤率及自发转移率。本研究拟采用组织块原位移植肾包膜下法(surgical orthotopic implantation into

renal capsule, SOI), 同时以皮下移植法、细胞悬液原位注射法、肾周筋膜内法为对照建立裸小鼠 RCC 原位移植模型, 初步研究人新鲜 RCC 在裸鼠体内成瘤和自然转移情况, 并分析了原发灶、转移灶的肿瘤转移相关基因的表达情况。

[基金项目] 国家自然科学基金(30370788)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370788)。

[作者简介] 谭晓洁, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: gcao@smmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物 BALB/c 裸小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心。雄性,4~5 周龄,我校东方肝胆外科医院实验动物中心 SPF 级环境饲养。

1.2 标本来源 汉族人 RCC 新鲜组织取自就诊于长海医院泌尿外科的原发性肾癌行肾癌根治术患者,共 32 例,其中 18 例随机用于动物实验,病理诊断 3 例为颗粒细胞癌,1 例为乳头状细胞癌,14 例为透明细胞癌。

1.3 移植方法 将 18 例标本采用皮下移植法、细胞悬液原位注射法、肾周筋膜内法、组织块原位移植肾包膜下法对 90 只裸小鼠进行移植。

1.3.1 皮下移植法 RCC 临床新鲜标本经机械修剪到 3~4 mm³ 体积,于小鼠左后肢皮下包埋,共移植小鼠 7 只。

1.3.2 细胞悬液原位注射法 原代培养的 RCC 单细胞悬液调整密度为 5.5×10^6 /ml。1 ml 无菌注射器吸取细胞悬液从肾下极进针,穿过肾实质直到肾上极肾包膜下,以 0.01 ml/只注射。当看到肾实质肿胀、肾包膜颜色变白即为注射成功,退出注射器后检查有无局部出血及细胞悬液溢出。共移植小鼠 22 只。

1.3.3 肾周筋膜内法 打开肾周筋膜,夹取 RCC 组织块将其送入腹膜后肾窝,手术过程中可能伴有腹膜受损。共移植小鼠 39 只。

1.3.4 组织块原位移植肾包膜下法 根据 An 等^[2]的 SOI 建立裸小鼠 RCC 高转移模型的基本原理,在此基础之上有所改动进行肾包膜下原位移植。打开肾包膜,形成 2~3 mm 的小切口,夹取 RCC 组织块送入肾包膜下并远离切口。取肾周脂肪组织覆盖切口,加压缝合肾周筋膜。缝合皮肤。共移植小鼠 22 只。与 An 法相比,本研究不缝合肾包膜切口,而是采用肾周脂肪组织覆盖加压缝合肾周筋膜。

1.4 裸小鼠处死及解剖 小鼠瘦弱、精神萎靡濒死时,颈椎脱臼处死。凡发现可疑肿瘤灶或转移灶,常规进行体外培养和病理检查,并冻存;肉眼可见的较为明显的肿瘤灶除进行上述两项操作外,还进行裸小鼠体内 RCC 组织再移植。

1.5 转移相关基因的表达分析 分析成瘤鼠移植瘤组织及转移瘤组织中 VEGF、C-met、Bcl-2、bFGF、P16 的表达,并以相对应的人癌旁正常肾组织、

肾癌组织、移植鼠正常肾组织做对照。常规 4 μm 石蜡切片,贴在涂有切片粘合剂的干净载玻片上,58℃ 作用 18 h,常规二甲苯脱蜡至水。0.1 mol/L PBS (pH=7.4)洗 3 次,每次 3 min,抗原修复(AR)95℃ 10 min×2 次,自然冷却,PBS 洗 3 次,每次 3 min。滴加一抗(VEGF、bFGF、C-met、P16、Bcl-2 稀释度分别 1:100、1:50、1:80、1:50、1:100),4℃ 过夜,PBS 洗 3 次,每次 3 min。0.3% H₂O₂抑制内源性过氧化物酶。滴加 EnVision 或 M 二抗,37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min。0.05% DAB+0.03% H₂O₂显色 8~12 min,自来水充分冲洗终止反应。苏木精衬染 30 s,水洗,蓝化(37℃),0.5% 盐酸乙醇分化,水洗蓝化。常规树脂封片。观察:阳性产物为棕黄色或呈棕褐色,背景为紫蓝色。各种组织每个基因的表达随机选择 10 个视野,每个视野计数 200 个细胞的阳性细胞数。

1.7 统计学处理 采用第二军医大学卫生勤务学系统统计学教研室 SAS 9.12 软件,进行多个样本均数比较的方差分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成瘤率及转移率 到目前为止,90 只小鼠除组织块原位移植肾包膜下法剩余 7 只存活外,其余均已自然死亡或濒死处死。总成瘤率为 27.7% (23/83)。组织块原位移植肾包膜下法成瘤率最高 73.3% (11/15),其次是皮下移植法 42.9% (3/7)、肾周筋膜内法 23.1% (9/39),细胞悬液原位注射法成瘤率为 0 (0/22)。肾周筋膜内法由于在肾窝内固定不良,存在异位成瘤的情况,即原移植部位未发现肿瘤或移植组织,而是脾脏种植或其他腹腔种植等。若考虑肾周筋膜内法异位成瘤情况,异位成瘤率为 15.4% (6/39),其成瘤率 (38.5%, 15/39)与组织块原位移植肾包膜下法仍存在统计学差别 ($P < 0.05$)。总转移率为 3.6% (3/83)。皮下移植法、肾周筋膜内法、细胞悬液原位注射法未见肉眼可见的转移灶;组织块原位移植肾包膜下法 3 例均转移至肠系膜,转移率为 20.0% (3/15)。

2.2 原位移植模型的建立 细胞悬液原位注射法、肾周筋膜内法、组织块原位移植肾包膜下法均基于原位移植的思想。细胞悬液原位注射法成瘤率为 0,肾周筋膜内法与组织块原位移植肾包膜下法成瘤鼠从外观上均难以鉴别,肿瘤往往向腹腔浸润,大多出现恶液质。不同之处在于:组织块原位移植肾包

膜下法形成的肿瘤侵入肾实质较多,肿块体积较大,最大可至 2 mm×2 mm×6 mm,伴有肾脏萎缩,同时发生肠系膜转移;肾周筋膜内法多为微小肿瘤(平均 2~3 mm³),无肉眼可见的转移。此外,皮下移植法成瘤鼠,通常为接种组织在移植部位被一定程度吸收后再逐步增大。皮下成瘤后,肿块大多含有坏死液化灶,个别出现溃疡,无转移。转移小鼠濒死的时间最短为 48 d,最长为 110 d,平均为 75 d。

成瘤鼠移植瘤体外培养成功率 100%,爬出的细胞大小形态较一致,以梭形细胞为主,与相应的人 RCC 原代培养情况相似;接种组织体外培养未见明显的肿瘤克隆,多为形态各异的混杂细胞。体外培养细胞传代贴壁比较困难,可能与不能耐受消化有关,最长传至第二代,细胞逐渐老化。但人 RCC 临床标本经裸鼠体内致瘤后,体外培养细胞生长爬出较快,如 1 例致瘤鼠体外培养第 2 天即有细胞爬出,而相对应的人 RCC 原代培养至少需要 4 d。

2.3 转移相关基因的表达分析 人癌旁正常肾组织、人肾癌组织、该标本移植鼠正常肾组织、移植瘤组织及转移组织的 VEGF、bFGF、P16、Bcl-2、C-met 的表达情况分别见图 1。经病理证实,原发肿瘤组织及转移组织均为乳头状细胞癌。

VEGF 在转移瘤、小鼠正常肾组织的肾小球部位及人正常肾组织的肾小球部位阳性细胞数较高,三者之间没有统计学差异。胞膜、胞核均有表达。鼠移植瘤及人肿瘤表达量较低,与前三者两两比较有显著差异($P<0.05$)。

bFGF 在人肿瘤、鼠肿瘤及转移瘤表达量偏高,主要在胞核表达,人及小鼠正常肾组织未发现阳性细胞。P16 在人及小鼠正常肾组织中的表达量比其他 3 种略高,但表达差别无统计学意义($P>0.05$)。P16 主要在胞核及胞膜表面表达,染色较深。Bcl-2 主要在胞膜及胞核中表达,表达的阳性细胞数由小到大依次为人正常肾组织、人肿瘤组织、转移组织、小鼠正常肾组织、小鼠肿瘤组织。前两者与后三者两两比较,差别有统计学意义($P<0.05$)。

C-met 主要在胞膜中表达,表达的阳性细胞数由小到大依次为人正常肾组织、小鼠肿瘤组织、人正常肾组织,人肿瘤组织及转移组织未见阳性细胞。

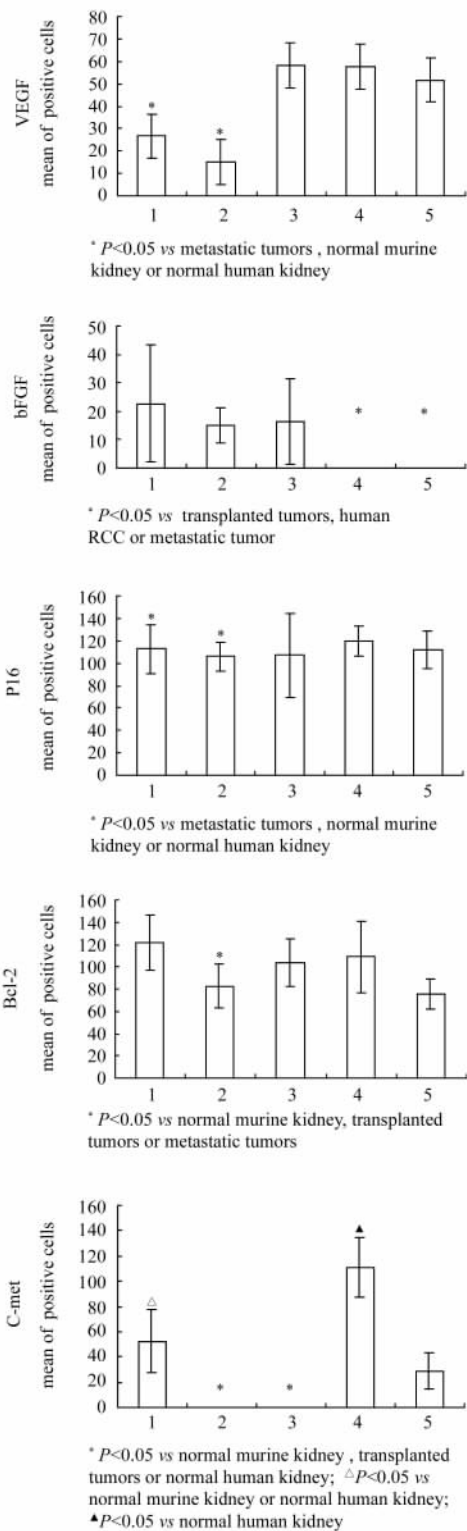


图 1 VEGF、bFGF、P16、Bcl-2、C-met 在各种组织的表达情况

Fig 1 Expression of VEGF, bFGF, P16, Bcl-2, C-met in different tissues

1: Transplant tumors in nude mice; 2: Human RCC; 3: Metastatic tumors in nude mice; 4: Normal murine kidney; 5: Normal human kidney

3 讨论

本研究参照 An 等^[2]采用 SOI 建立裸小鼠 RCC 高转移模型的基本原理,在此基础上有所改动进行肾包膜下原位移植。与 An 法相比,本实验中不缝合肾包膜切口,而是采用肾周脂肪组织覆盖加压缝合肾周筋膜。与以往移植方法相比,瘤体生长较充分,与周围组织粘连较多;未成瘤的接种组织也已嵌入肾实质内。完整组织块原位移植既有原位移植的优点,又保持了瘤组织的完整结构。故比肿瘤细胞悬液原位注射、皮下移植拥有较高的移植生长率,是一种更能接近临床患者征象的方法。近来陆续有文献报道,细胞悬液原位注射实验结果并不如人们预期的理想。原因可能是:经过酶解处理的肿瘤细胞,原有细胞结构被破坏,致使肿瘤生物学行为和自然属性改变,结果影响人类肿瘤细胞的移植生长与转移。此外,裸鼠体内致瘤效果与移植组织中有活性的肿瘤细胞的含量密切相关,成瘤存在着一定的偶然性。

实验过程中有部分小鼠因肝脏病变致死。从小鼠的临床表现及病理切片(肝细胞坏死、大量炎性细胞浸润)分析提示动物很可能感染小鼠肝炎(mouse hepatitis virus, MHV)。小鼠肝炎是实验小鼠最为重要的疾病之一,严重威胁着小鼠健康,也是制约本研究建立裸小鼠原位移植模型成瘤和转移的重要因素。移植过程中未成瘤小鼠平均存活时间比成瘤小鼠平均存活时间短,提示小鼠的健康状况较差,尚未成瘤即因其他原因死亡。不仅 MHV 感染造成的高死亡率影响了致瘤,而且 MHV 免疫与小鼠原位移植模型的低转移率密切相关。肾癌是为数不多的对免疫治疗有效的肿瘤,细胞因子的联合治疗及过继免疫疗法有效率平均为 30%^[3]。具有转移潜能的瘤细胞逃避宿主的免疫监督是转移的关键步骤。裸小鼠缺乏细胞免疫功能,但是其他免疫功能存在,或有代偿。在受过 MHV 感染的宿主细胞的免疫调控下,不仅成瘤困难而且很难形成转移,即便成瘤也可能因为动物的健康状况受到影响而终止。

与原发灶相比,转移灶中血管内皮生长因子 VEGF 表达明显升高($P < 0.05$);C-met 表达明显降低($P < 0.05$),bFGF、Bcl-2、P16 表达降低但无统计学差异($P > 0.05$)。结果与以往报道有所出入,可能是由于乳头状细胞癌有着有别于透明细胞癌所

致^[4]。

VEGF 是最重要的血管形成因子之一,肿瘤生长超过 1~2 mm³需要血管提供营养。肾透明细胞癌是血供丰富的实体肿瘤,它的发生与 VHL 突变有关。VEGF 的表达与 VHL 的表达呈负相关^[5]。乳头状细胞癌肾动脉造影表现为少血管或无血管性,与乳头状细胞癌相关的是 met 基因的激活突变^[6],所以乳头状细胞癌中很可能不存在上述 VEGF 的上调机制,因此 VEGF 在乳头状细胞癌中的表达较低,此外肾脏本身也是血供丰富的脏器,正常组织有相对较高的表达,这与本研究结果一致。但转移灶的阳性细胞数最高,说明转移灶中新血管形成较多。以往动物模型提示 bFGF 在 RCC 的侵袭和转移中起重要作用。在对 38 例转移性 RCC 的临床新鲜标本进行原位杂交时也发现 bFGF 过度表达^[7]。本研究结果提示人、小鼠肿瘤及转移组织表达量较正常组织略高,但染色为弱阳性,小鼠肿瘤与转移组织的表达不存在统计学差异。P16 的突变使细胞周期失控,其纯合性缺失与乳头状细胞癌的发生有关^[8]。免疫组化分析发现人及小鼠正常肾组织表达最高,染色较深;但原位肿瘤及转移灶也有较高表达,与正常组织相比差别没有统计学差异,需要进一步验证。Bcl-2 基因编码相对分子质量为 26 000 的线粒体内膜蛋白,该蛋白通过阻断细胞凋亡,维护正常细胞的内环境稳定。在正常肾组织中,Bcl-2 主要在肾小球上皮细胞、远曲小管、近曲小管、集合管中表达。但 Bcl-2 的过度表达可以致瘤,也可增强肿瘤对放疗、化疗的抗性^[9]。本研究中无论是人还是小鼠,其肿瘤组织的 Bcl-2 的表达水平较正常肾组织高($P > 0.05$),小鼠的 Bcl-2 的整体表达水平高于人。转移组织的 Bcl-2 表达水平比小鼠的原发灶低。Lee 等^[9]在对透明细胞癌的转移及原发灶的 Bcl-2 的免疫组化分析中发现 Bcl-2 的表达与转移部位有关;转移至脑的肾癌不表达 Bcl-2,转移至肝脏的于胞质中表达。C-met 基因定位于 7q31.2,其编码的蛋白是肝细胞生长因子的受体。C-met 是家族性乳头状肾细胞癌的癌基因^[10],其原癌基因通过错义突变导致 C-met 蛋白的持续激活及 HPRC 的发生。C-met 的过度表达与乳头状细胞癌相关($P < 0.05$)。本研究中人及小鼠正常肾组织均比瘤组织表达量高($P < 0.05$),但小鼠的 C-met 表达水平高于人。转移瘤 C-met 表达阴性,与文献报道相反。

综上所述,组织块原位移植肾包膜下法是切实有效的原位模型移植方法。本研究采用该法初步获得了遗传背景较一致的人 RCC 原发灶及转移灶,这为反复移植筛选高转移细胞株,并以非转移性细胞株做对照进行消减克隆转移分子标志物,进而在人群中筛选进行肿瘤遗传特征、设计合理的预防和治疗策略奠定基础。

[参考文献]

- [1] 侯建国,宝建中,曹广文,等. 裸鼠人肾透明细胞癌移植瘤株建立及其特性观察[J]. 中华实验外科杂志,1996,13: 239-240.
- [2] An Z, Jiang P, Wang X, et al. Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection [J]. Clin Exp Metastasis, 1999,17:265-270.
- [3] 侯建国,曹广文,李光辉,等. 联合应用 TIL 和 IL-2 治疗肾癌[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17: 279-281.
- [4] Schraml P, Muller D, Bednar R, et al. Allelic loss at the D9S171 locus on chromosome 9p13 is associated with progression of papillary renal cell carcinoma[J]. J Pathol,2000, 190:

457-461.

- [5] Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma[J]. BJU Int,2004,93:297-302.
- [6] Curti BD. Renal cell carcinoma[J]. JAMA,2004,292:97-100.
- [7] Fukata S, Inoue K, Kamada M, et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2005,103:931-942.
- [8] Kawada Y, Nakamura M, Ishida E, et al. Aberrations of the p14(ARF) and P16(INK4a) genes in renal cell carcinomas[J]. Jpn J Cancer Res, 2001,92:1293-1299.
- [9] Lee CT, Genega EM, Hutchinson B, et al. Conventional (clear cell) renal carcinoma metastases have greater Bcl-2 expression than high-risk primary tumors[J]. Urol Oncol, 2003,21:179-184.
- [10] Inoue K, Karashima T, Chikazawa M, et al. Overexpression of C-met proto-oncogene associated with chromophilic renal cell carcinoma with papillary growth[J]. Virchows Arch, 1998, 433:511-515.

[收稿日期] 2005-07-14

[修回日期] 2006-01-18

[本文编辑] 曹 静

SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1 beta *in vivo* and *in vitro*

Wang FM, Liu HQ, Liu SR, Tang SP, Yang L, Feng GS(Department of Embryology and Histology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Shp-2, an src homology (SH) two-containing phosphotyrosine phosphatase, appears to be involved in cytoplasmic signaling downstream of a variety of cell surface receptors. It also plays an important role in the control of cell spreading, migration, and cytoskeletal architecture. In our study, abrogation of SHP-2 catalytic activity with adominant-negative mutant (SHP-2C > S) displayed an increased number of focal adhesion, high expression of E-cadherin and phosphorylation of the focal adhesion kinase (FAK). Interestingly, the cells expressing SHP-2C > S showed reduced IL-1beta-stimulated chemotaxis compared with either mock- or SHP-2 wild type-transfected cells. We also found that SHP-2-GFP-transfected cell lines did not express E-cadherin nearly and produced high level of the matrix metalloproteinase MMP-9 in the supernatants. The loss of E-cadherin-mediated adhesion and the increase of MMP-9-induced migration had been shown to play an important role in the transition of epithelial tumors from a benign to an invasive state. These findings have raised the possibility that SHP-2 can promote the cancer cell to invasion the distant tissues. To determine whether SHP-2 promotes invasion and metastasis, we transfected MCF-7 breast cancer cell lines with SHP-2-GFP, SHP-2C > S-GFP and analyzed the effects of the SHP-2 on cell migration, invasion, and metastasis. *in vitro*, SHP-2-GFP-transfected cells migrated more efficiently, showed an increased invasion of Matrigel, and adhered less efficiently to monolayers of fibroblast cells. When injected into the abdominal cavity of nude mice, SHP-2-GFP-transfected cells metastasized widely to the lung, kidney, but MCF-7 with SHP-2C > S-GFP was not observed in the these organs. These results demonstrate that SHP-2 promotes invasion and metastasis of MCF-7 with the loss of E-cadherin, the dephosphorylation of FAK and the secretion of MMP-9 induced by IL-1beta.

[Breast Cancer Res Treat, 2005,89: 5-14]