

人胃粘液腺癌裸鼠移植瘤株的建立及其生物学特性的研究*

甘润良 胡萍玲 李一琴 曾庆彪 匡希文

(衡阳医学院肿瘤研究所 湖南 421001)

建立人体肿瘤在裸小鼠的移植模型,对于深入研究肿瘤的生物学特性、宿主与肿瘤相互作用、癌细胞生物学标志和基因表达、以及人癌实验治疗等发挥了巨大的作用。粘液膜癌是胃肠道恶性肿瘤中的一种常见组织学类型,现已有人结直肠粘液腺癌的裸鼠移植瘤模型^[1,2],但人胃粘液腺癌裸鼠移植瘤尚未见报道,我室于1991年6月将一例外科手术切除的人胃粘液腺癌组织移植于裸鼠体内获得成功,现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

一、实验动物

BALB/c裸小鼠,由中国科学院上海细胞生物学研究所动物室提供。鼠龄6—14周,体重15—25克,雌雄兼用。在单独动物室的空气洁净层流架内饲养,鼠盒加过滤空气罩,室内保持恒温、恒湿。饮水、饲料、垫料和笼具均经高压灭菌,并在无菌条件下适时更换。

二、标本

肿瘤来源于一例30岁女性胃癌手术切除标本。原始人体肿瘤在肉眼观察呈溃疡型外观,切面为灰白色,有半透明胶冻样粘液。肿瘤已浸润胃壁肌层。病理组织学类型为粘液腺癌,伴有分化不良的粘液细胞癌。

三、移植方法和传代

在无菌条件下,在胃壁肿块处切开胃壁浆膜层和外肌层,取肌层内浸润癌组织数块,大小约为0.5—1.0厘米,放于平皿内,用RPMI 1640培养液冲洗3次。再将肿瘤组织剪成1—2毫米的小块。置于套管针内,移植到裸鼠腋窝及背部皮下,分别接种2只裸鼠。接种工作在标本离体后45分钟内完成。逐日观察移植部位以了解肿瘤生长的潜伏期和生长速度。待肿

瘤长至1×1.5厘米时,拉断脊髓处死动物,取出移植瘤继续传代,每次接种至少2—3只动物。对于未处死的荷瘤动物留作长期观察。

四、人胃癌移植瘤(GC-916)的检查项目

1. 解剖学和组织学检查:所有处死和自然死亡的动物均进行详细的尸体解剖检查,观察移植瘤局部生长情况及是否发生转移。取肿瘤组织和裸鼠心、肺、肝、脾、肾和淋巴结等脏器,经10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,经HE染色,然后在普通光学显微镜下观察。

2. 粘液组织化学染色:重点观察肿瘤的粘蛋白分泌类型,以AB(pH 2.5)/PAS染色区别酸性和中性粘液,以高铁二胺(HID)显示硫酸粘蛋白。

3. 免疫病理学检测:利用单克隆抗体检测原发人体胃癌和裸鼠移植瘤①癌基因产物ras P₂₁、c-erbB-2和P₅₃癌蛋白的表达,②癌胚抗原(CEA)的分布,并以正常人胃粘膜作为对照观察。所用试剂为丹麦DAKO公司产品。切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化后用TBS缓冲液清洗2次,小鼠肝粉饱和溶液处理5分钟,TBS清洗2次。取原发人体胃癌及第1、3、6代裸鼠移植瘤的4张组织切片分别滴加ras P₂₁(5 μg/ml)、c-erbB-2(3 μg/ml)、P₅₃(2 μg/ml)和CEA(1 μg/ml)抗血清,以后步骤用ABC免疫细胞化学方法^[3]。每项检查的实验步骤中均取一张组织切片,用TBS代替“一抗体”作对照试验。

4. 染色体分析:采用体外直接分散制片法,Giemsa染色镜检,分别对第1、4、8代处于快速生长的移植瘤组织及裸鼠骨髓细胞进行染色体检查。

5. 电镜观察:肿瘤组织样品用2.5%戊二醛固定和1%锇酸再固定,逐级丙酮脱水,环氧树脂812包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,日立H-

* 国家自然科学基金资助课题,项目编号39070921。

500 透射电镜观察。

结 果

一、移植瘤(GC-916)的成活与传代

人胃粘液腺癌接种于两只裸鼠皮下, 移植瘤均成活并生长。取移植瘤进行鼠间传代, 相继已传 15 代, 共接种 80 只裸鼠。移植成活率为 99% (79/80 只)。移植瘤在裸鼠背部皮下和腋窝接种均可生长。既可用小块法接种, 每只裸鼠接种一块大小为 1—2 mm 瘤组织; 也可用瘤组织匀浆制成细胞悬液进行接种, 每只裸鼠接种 1×10^7 个活的瘤细胞。

肿瘤从人体移植到裸鼠皮下, 其潜伏期较长, 经 27 天后才可在接种处观察到肿瘤生长。以后在裸鼠间移植传代的潜伏期缩短, 其中前三代为 21~23 天, 第四代后潜伏期稳定在 14 天左右。荷瘤裸鼠最长存活时间为 160 天, 平均为 89 天。

二、移植瘤的生长曲线

取第五代移植瘤同时接种 8 只裸鼠右背部皮下, 移植后每周定时测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b), 按 $V = 0.4 \times ab^2$ 的公式⁽⁴⁾, 求得肿瘤的近似体积。以每周测得的 8 只裸鼠移植瘤的体积计算平均值, 连续观察 9 周 (9 周出现明显坏死), 绘制出移植瘤的生长曲线图。从生长曲线图可见肿瘤的生长速度分为三个阶段: (1) 潜伏期, 从接种后至 2 周末, 接种处隆起基本维持原移植时小块瘤组织的大小; (2) 缓慢生长期, 第 3—4 周可见裸鼠移植瘤增大, 但生长缓慢; (3) 快速生长期, 从第 5 周开始后, 移植瘤生长速度加快, 呈直线上升。

三、病理组织学观察

移植瘤包膜完整, 外观呈结节状, 最大者可达 $4.2 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$ 。肿瘤切面呈胶冻状, 质软, 较大瘤结中央可见坏死。实验晚期, 移植瘤体表面皮肤溃破, 可形成溃疡。组织学观察癌细胞胞浆透明, 多数癌细胞形成腺腔结构, 部分癌细胞成团排列, 似印戒细胞癌 (图版图 1), 这与侵入胃壁的人体原发肿瘤形态基本

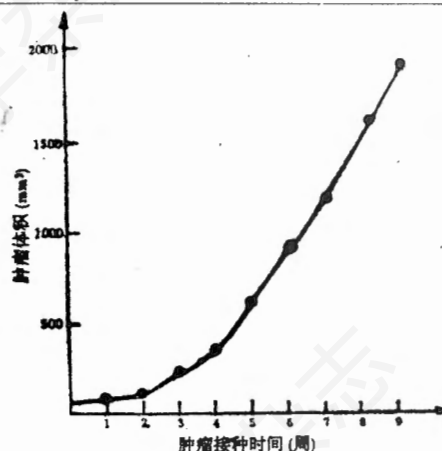


图 人胃粘液腺癌裸鼠移植瘤生长曲线

一致。至于肿瘤团巢的周围反应, 在人体时有较多的间质和淋巴细胞, 而在裸鼠皮下生长的移植瘤, 癌细胞团巢周围只有极少的结缔组织及中性粒细胞。检查荷瘤裸鼠主要脏器, 均未发现肿瘤转移灶。

四、粘液组织化学染色

AB(pH 2.5)/PAS 和 HID 染色在原发瘤与移植瘤的结果完全一致。在 AB/PAS 染色中, 以蓝色的 AB 反应为主, 红色的 PAS 反应较少。表明人胃粘液腺癌分泌有大量的酸性粘液, 而中性粘液的含量较少。HID 染色证实, 肿瘤中的酸性粘液主要为 HID 染色阳性的硫酸粘蛋白 (图版图 2)。

五、免疫细胞化学检测

原发人体胃癌及其裸鼠移植瘤表达突变型 P_{53} 蛋白均为阳性, 癌细胞核染成棕黄色 (图版图 3), 但 $rasP_{21}$ 和 $c-erb B-2$ 癌蛋白却为阴性反应。原发肿瘤和移植瘤中癌细胞的癌胚抗原分布广泛, 主要存在于癌细胞腺腔面胞膜及顶部胞浆, 腔内分泌物也显阳性 (图版图 4)。

六、染色体分析

每一代移植瘤各选 100 个分散适度, 显带清楚的中期核分裂象观察计数, 染色体数目 < 44 占 13.8%, 46 占 0.4%, 46—49 占 60.3%, > 69 的多倍体占 25.5%。G 显带结果表明, 带型均属人类的染色体 G 带带型, 没有混杂裸鼠染色体。

七、透射电镜观察

肿瘤细胞形态不规则,胞浆内线粒体丰富,内质网中等量,有高尔基复合体,胞浆游离缘可见多数突出表面的微绒毛。胞浆内常见大量絮状粘液空泡,还可见较大的粘液分泌颗粒,癌细胞显示分泌型腺细胞的特点(图版图5)。人体肿瘤与各代移植瘤细胞的超微结构基本相同。

讨 论

我们建立的人胃粘液腺癌裸鼠移植瘤株GC-916已传至15代,历时22个月。其组织学和超微结构均保持腺癌的形态和分泌粘液的功能。移植成活率高,可移植性好,荷瘤裸鼠有较长生存时间可供实验观察。此外,经免疫病理学检测,发现供体胃癌及其裸鼠移植瘤细胞都具有表达突变型P₅₃蛋白及产生癌胚抗原(CEA)的特性。这为进一步研究人胃癌分子生物学和实验治疗提供了较好的动物模型。

影响裸鼠人癌移植成功的因素很多,严格控制裸鼠饲养和实验环境、采用新鲜标本和无菌操作,以及准确给予裸鼠接种一定数量、具有增殖活力的癌细胞等是提高人癌组织移植成功率的关键。肿瘤来源和性质的不同,移植成功率明显不同。人癌活组织移植成功率平均为30%左右,而人癌细胞株可达60—70%⁽²⁾。以胃肠道肿瘤为例,结肠癌最高,胰腺癌居中,肝癌和胃癌移植成功率较低^[5]。本实验采用人胃粘液腺癌浸润胃壁癌组织接种于BALB/c裸小鼠皮下,在洁净的近于SPF级饲养条件下选用不同性别、鼠龄(6—14周)、体重(15—25克),范围较宽的裸鼠移植获得成功率为99%的结果,这在文献报道中尚不多见。

转移是人类恶性肿瘤的主要特征之一。然而当人癌组织和细胞株移植到裸鼠后,转移率却大大降低。Sharkey将106种人癌细胞株移植到1045只裸鼠,仅有14只出现转移,转移率为1.3%⁽⁶⁾。本实验对80只接种人胃癌组

织的荷瘤裸鼠进行详细的解剖学和组织学检查,移植瘤包膜完整,未见癌细胞侵袭邻近组织和器官,更没有发现有远处器官的转移瘤灶。裸鼠移植瘤的这一现象曾经使得利用它进行肿瘤研究受到限制,尤其成为探讨人癌转移机理的障碍^[7]。为了克服这一不足,最近报道利用人胃癌组织在裸鼠胃壁浆膜下进行的原位移植(orthotopic implantation),发现裸鼠移植瘤的转移率可大大增加^[8,9],这提示人癌组织移植到裸鼠体内后是否发生转移与移植瘤的接种部位、局部生长的微环境有关。

摘 要

将手术切除的原发性人胃癌新鲜组织移植于BALB/c裸鼠皮下获得成功,并已传至15代。建立的人胃粘液腺癌裸鼠移植瘤株(GC-916)具有移植成功率高,带瘤时间长的特点。总移植成活率99%,生长潜伏期14天,荷瘤裸鼠最长存活时间为160天,平均带瘤存活时间为89天。经组织学、组织化学、免疫病理学和超微结构观察,证实裸鼠移植瘤保持了原发人体胃癌的结构和功能,并具有表达突变型P₅₃蛋白及产生癌胚抗原的特性。该移植瘤株的建立为进一步研究人胃癌的基础理论和临床治疗提供了较理想的实验动物模型。

图 版 说 明

1. 普通光学显微镜观察,移植瘤为粘液腺癌,肿瘤间质及癌细胞内存在较多粘液,呈透明样。HE染色×400
2. HID染色为阳性,显棕黑色,表明瘤细胞产生的粘液含有大量硫酸粘蛋白。粘液组织化学染色,普通光学显微镜观察×600
3. 移植瘤表达突变型P₅₃蛋白,定位在癌细胞核内。免疫细胞化学染色,普通光学显微镜观察×400
4. 癌胚抗原广泛分布于瘤组织内,尤其是癌细胞的腔面细胞膜及腺腔内分泌物显强阳性。免疫细胞化学染色,普通光学显微镜观察×400
5. 胃癌细胞形态不规则,胞浆内可见大量内质网及大小不一的粘液分泌颗粒。透射电镜观察×6000

参 考 文 献

- [1] Leith JT, et al., 1991, *Cancer Res*, 51: 5139—5143.
- [2] 许沈华, 等, 1989, 中华病理学杂志, 18: 47—49.
- [3] Kerns BJM, et al., 1992, *J Histochem Cytochem*, 40: 1047—1051.
- [4] 甘润良, 等, 1993, 上海实验动物科学, 13: 83—86.
- [5] Shimosato Y, et al., 1976, *JNCI*, 56: 1251—1260.
- [6] Sharkey FE, et al., 1979, *Int J Cancer*, 24: 733—738.
- [7] Kyrizis AP, et al., 1981, *Cancer Res*, 41: 3995—4000.
- [8] Toshiharu F, et al., 1993, *Cancer Res*, 53: 1204—1209.
- [9] Furukawa T, et al., 1993, *Int J Cancer*, 53: 608—612.

RNA 聚合酶活性变化在 DEN 诱发大鼠肝癌细胞核体外转录中的调节作用

柳君泽* 易禄康

(第三军医大学生化教研室 重庆 630038)

真核细胞的 RNA 生物合成是在 RNA 聚合酶催化下所进行的复杂过程。研究表明,不同肿瘤细胞 RNA 生物合成不仅异常活跃,而且存在着与正常细胞不同的 RNA 转录合成过程的调节机制。本文利用 DEN 诱发的大鼠肝癌模型,观察了肝癌细胞核 RNA 体外转录活性,以期探讨 RNA 聚合酶对转录的调节作用和肿瘤发病的分子机制。

材 料 与 方 法

一、材料

大鼠肝癌模型:健康雄性 Wistar 系大鼠,体重 50—70 克,饮水含 100 ppm 二乙基亚硝胺 (DEN),12 周后改为正常水。实验 18 周时断头处死大鼠,解剖见肝脏增大,表面布满结节,经病理切片鉴定为肝细胞肝癌。

主要试剂: DEN 为 Sigma 产品, Poly (dA-dT) 和 α -鹅膏蕈碱 (α -amanitin) 系 Boehringer-Mannheim 公司产品, 聚乙烯亚胺纤维素 (PEI-cellulose) 为 Serva 公司产品, ^3H -UTP (22 Ci/mmol) 为中科院原子能研究所产品。

二、方法

1. 大鼠正常肝及肝癌细胞核的分离:按 Yu^[1]的

方法进行。沉淀的细胞核按 1 mg/ml 的 DNA 悬浮于 0.34 mol/L 蔗糖溶液中,制成核悬液。

2. 模板结合型及游离型 RNA 聚合酶活性测定:结合型 RNA 聚合酶的活性测定按 Goodlad 的方法^[2]稍加改进。反应总体积为 250 μl , 含 70 mmol/L (NH_4)₂SO₄, 0.5 u 肌酸激酶, 0.03 mmol/L UTP, 2 μCi ^3H -UTP, 其他成分同文献报道。应用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 α -amanitin 以区别不同种类的 RNA 聚合酶。加入 100 μg DNA 的核悬液启动反应,于 35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温育 30 分钟, 10% TCA—20 mmol/L Na₄PO₄ 终止反应。酸不溶物收集于玻璃纤维膜上,乙醇抽洗晾干后,加闪烁液于液闪计数器中测量。

游离型 RNA 聚合酶测定体系总体积 150 μl , (NH_4)₂SO₄ 为 35 mmol/L, ^3H -UTP 1.2 μCi , 其他成分同结合酶活性测定。加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌素 D 以抑制 DNA 模板,并应用 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的外源性模板 Poly (dA-dT), 通过加入 60 μg DNA 的核悬液启动反应,于 35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温育 30 分钟终止反应,其后处理同上所述。

3. 转录活性酶相对分子数 (relative numbers of transcriptionally active enzyme molecules) 和转录延长速度 (elongation rates) 测定:结合型 RNA 聚合酶

* 现在第三军医大学病理生理教研室。