

· 论 著 ·

人结肠癌 SW480 细胞裸鼠皮下移植瘤模型的建立

张胜行, 张诗兰, 兰小鹏

[摘要] **目的** 建立人结肠癌 SW480 细胞移植瘤模型, 研究其形态学及生物学特性。**方法** 将处于对数生长期的人结肠癌 SW480 细胞接种于 10 只裸鼠右侧背部皮下, 待瘤体生长至直径 1~2 cm 时处死裸鼠, 取出肿瘤组织, 将其磨碎并与培养基混合、过滤, 滤液与基质胶混合, 再将基质胶细胞悬液接种于 30 只裸鼠右侧背部皮下, 7 d 后处死裸鼠, 观察肿瘤大体特征, 光镜及电镜下观察肿瘤病理学特征。**结果** 接种 SW480 细胞的裸鼠于接种后 4 周有 3 只成瘤。接种基质胶细胞悬液的裸鼠在接种后 7 d 有 28 只成瘤, 瘤体形状规则, 肿瘤组织呈现典型癌变特征。**结论** 本实验成功建立了人结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型, 该模型成瘤率高, 瘤体形状规则, 病理学改变与临床非常相似, 为研究人结肠癌干预措施提供了较为理想的动物模型。

[关键词] 结肠癌; 裸鼠; 皮下移植; SW480 细胞; 模型

[中图分类号] R969.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)02-0108-03

The establishment of a subcutaneously transplanted tumor model with human colon cancer cell line SW480 in nude mice

ZHANG Sheng-hang, ZHANG Shi-lan, LAN Xiao-peng. People's Liberation Army Center of Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China

[Abstract] **Objective** To establish a human colon cancer nude mice model by transplanting SW480 cell line and study its morphological and biological properties. **Methods** Human colon cancer SW480 cells in logarithmic growth phase were injected subcutaneously on the back of 10 nude mice. When the diameter of transplanted tumors was 1~2 cm, the nude mice were killed. Tumor tissues were taken out, then grinded. The suspension of Matrigel and SW480 cells were injected subcutaneously on the back of 30 nude mice. The general features of the transplanted tumors were examined by visual inspection, and the pathological features of the transplanted tumors were examined with scanning electron microscopy and light microscopy. **Results** Transplanted tumors were observed in 3 nude mice incubated with SW480 cells after four weeks. Transplanted tumors were observed in 29 nude mice incubated with the suspension of Matrigel and SW480 cells after seven days. The transplanted tumors were of regular shape and of typical cancerous behavior with the classical pathological characteristics of cancer. **Conclusion** Human colon cancer nude mice model are established successfully. The transplanted tumors are of regular shape and of typical cancerous behavior. It provides an appropriate and useful animal model for studying human colorectal cancer.

[Key words] colon cancer; nude mice; subcutaneous transplantation; SW480 cell; model

结肠癌属四大最常见的恶性肿瘤, 发病逐年增多, 晚期患者预后差, 长期生存率低, 因此一直是临床研究的热点。建立适当的人结肠癌动物模型, 对进一步研究结肠癌的生物学特性、探讨结肠癌的发病机理与防治措施起到非常关键的作用。皮下移植

瘤模型操作简单, 成瘤率高, 应用广泛^[1], 目前研究者多采用细胞悬液注射法建立小鼠结肠癌模型, 结果不尽相同, 方法有待改进。本研究应用人结肠癌 SW480 细胞接种裸鼠, 鼠间异体移植建立人结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型, 并观察其形态学和生物学特性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂 2~3 周龄 BALB/c 裸鼠 40 只, 雌雄各半, 购于上海西普尔-必凯实验动物公司[动物合格证号为 SCXK(沪)2007-0007], SPF 级条件下饲养。人结肠癌细胞株 SW480 购自南京

基金项目: 福建省科技厅国际合作重点项目(2004I012)

作者简介: 张胜行(1976-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 免疫学和科研管理

作者单位: 350025 福建福州, 南京军区福州总医院全军检验医学研究所

通讯作者: 兰小鹏, E-mail: lanxp@sina.com.cn

凯基生物公司。胎牛血清购自杭州四季青生物公司。RPMI-1640 培养液购自奥地利 PAA 公司。基质胶购自 BD 公司。

1.2 细胞培养 SW480 细胞株培养于完全培养基中(RPMI-1640 培养液 + 10% 胎牛血清 + 40 U 胰岛素, pH 7.4), 置于 37 ℃ 5 % CO₂ 细胞培养箱内, 3 d 换液一次, 细胞至 70% ~ 80% 融合时, 以 0.25% 胰酶消化细胞, 进行传代。

1.3 SW480 细胞裸鼠皮下移植瘤模型的建立 随机选取 10 只裸鼠, 接种前 3 d 起每只腹腔注射环磷酰胺 100 mg/kg, 连续 2 d。隔天后, 将处于对数生长期的 SW480 细胞消化计数, 经台盼蓝染色, 细胞活性大于 95%; 离心后细胞重悬于 RPMI-1640 培养液中, 细胞密度为 1×10^7 /ml。用碘酊消毒裸鼠右侧背部皮肤, 用无菌一次性注射器将 0.2 ml 细胞悬液(2×10^6 个细胞)接种于裸鼠右侧背部皮下。待初代移植肿瘤长至直径 1 ~ 2 cm 时, 脱颈处死裸鼠, 取移植肿瘤在 75% 酒精中浸泡 2 ~ 3 min 后, 将瘤体移入培养皿中, 清除外周血块及结缔组织, 剪成小块之后用匀浆器稍微磨碎, 以 1:20 比例与完全培养基混合, 单层纱布过滤, 滤过的液体与等量的基质胶(10 mg/ml)混合, 制成基质胶细胞悬液。另取裸鼠 30 只, 接种前处理同前, 每只裸鼠均皮下注射 0.2 ml 基质胶细胞悬液^[2]。接种后每天观察裸鼠体重变化, 观察裸鼠接种点有无破溃红肿及种植瘤的生长情况, 并用游标卡尺隔日测量肿瘤大小一次, 以皮下结节直径大于 0.5 cm 为成瘤标准。

1.4 肿瘤组织的病理学观察 第二批裸鼠于接种后第 7 天断颈处死, 小心剥离肿瘤, 称取移植瘤的重量。将肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定, 制成石蜡切片, HE 染色, 在显微镜下观察肿瘤病理学变化。

1.5 透射电镜观察肿瘤组织的超微结构变化 修剪约 1 mm³ 的肿瘤组织块, 固定于 2.5 % 的戊二醛中, 用环氧树脂 812 包埋, 透射电镜下观察肿瘤细胞中细胞器损伤情况和细胞器数目与完整性改变。

2 结果

2.1 裸鼠及皮下移植瘤生长情况 第一批选取的 10 只裸鼠, 在无菌环境下生长, 状态良好, 接种点无红肿破溃。皮下注射肿瘤细胞 4 周后, 有三只裸鼠成瘤, 6 周左右肿瘤长至直径约 0.8 cm 大小, 边界清晰, 手指挤压可以活动。第二批 30 只裸鼠背部皮下接种后, 第 3 天即可见有肿瘤生长, 第 7 天 28 只裸鼠皮下肿瘤包块直径大于 0.5 cm, 包块无红肿无溃破, 边界清晰, 手指挤压可以活动(图 1); 1 只未

见肿瘤生长, 1 只肿瘤生长缓慢, 未达成瘤标准。全部裸鼠均健康、活泼, 生长状态良好。



图 1 皮下移植瘤生长情况

2.2 肿瘤组织的病理改变 裸鼠处死后取瘤体观察标本, 细胞实体瘤为球形结节状, 肿瘤为非浸润生长; 瘤体有完整的包膜包裹, 与周围组织分界清楚, 容易分离, 质地较脆, 剖面呈鱼肉状, 血供丰富(图 2)。HE 染色显示肿瘤细胞排列紧密, 瘤细胞生长活跃, 大小相对一致, 核质深染, 染色质粗, 核浆比例大, 部分区域可见腺腔形成。肿瘤细胞分泌黏液, 并侵犯周边结缔组织, 无大范围细胞损伤现象(图 3)。

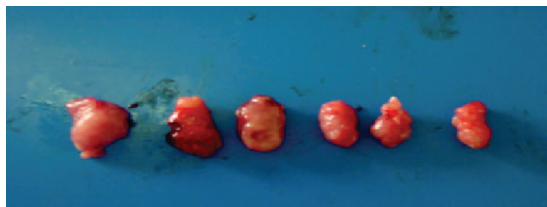


图 2 皮下移植瘤大体特征

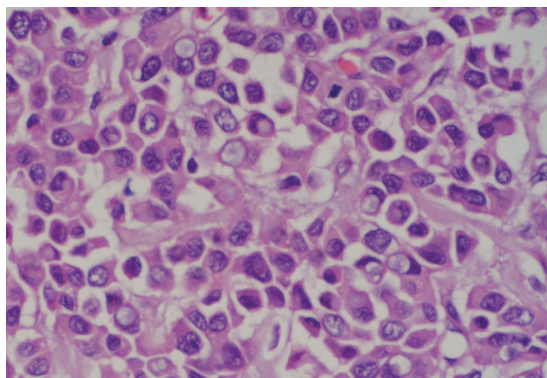


图 3 肿瘤组织的病理改变(HE × 400)

2.3 肿瘤组织的超微结构改变 透射电镜下观察, 肿瘤细胞不规则, 但核浆比例大, 核染色质较深, 细胞器数量较多, 线粒体丰富, 胞浆内可见大小不等的分泌小泡, 核膜完整(图 4)。

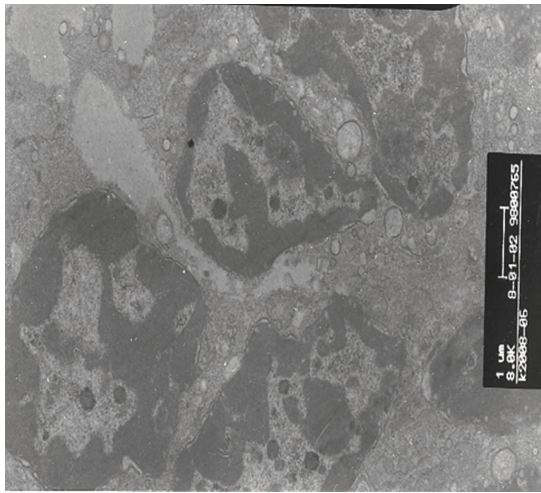


图 4 肿瘤组织的超微结构改变(透射电镜 $\times 10\ 000$)

3 讨论

目前,结肠癌动物模型可分为自发性、诱发性、移植性和转基因动物肿瘤模型,其中移植瘤模型因成功率高、生物学性状稳定、建立周期短,基本上能满足肿瘤的生物学行为研究、药物评价的需要而被广泛应用^[1]。

本研究选用人结肠腺癌细胞株 SW480,该细胞株具有恶性程度高、增殖旺盛、倍增时间短、传代迅速等特点,能很好地满足移植瘤的需要。BALB/c 裸鼠和 SCID 鼠均有免疫功能缺陷,常用于肿瘤动物模型的建立,而裸鼠对培养条件等要求低,易于动态观察肿瘤的生长状态^[3]。

移植瘤形成及动物模型建立受诸多因素影响,如实验动物的种系、健康状况、性别、育龄、细胞培养的条件、细胞的制备情况、细胞的数量及活力、接种的方法及部位等。本研究主要考虑以下影响因素:①鼠龄:一般宜选择 2~3 周龄的裸鼠进行实验^[4],鼠龄过大,裸鼠体内产生较多的 NK 细胞,影响肿瘤的移植成功率;②接种瘤细胞量:接种量过少,移植瘤不易成活;接种量过大,引起肿瘤的失控生长,对将来的实验干预带来负面影响;③裸鼠的营养状况:在本实验开始时仅用高压灭菌饲料喂养,裸鼠体重及肿瘤均生长缓慢;加喂灭菌葵花子和熟鸡蛋后,裸鼠体重及肿瘤生长均明显改观。

肿瘤移植的部位文献报道不同,皮下接种操作简单,肿瘤表浅,便于观察,潜伏期短,肿瘤生长速度较快,本研究第一批 10 只裸鼠接种细胞后 3 周,多数裸鼠可见类圆形的肿物生成,4 周时成瘤率为 70%,5 周时成瘤率为 80%,有两只裸鼠未长出肿

瘤。之所以没有达到文献报道的 100% 移植成功率,可能与肿瘤细胞接种数量偏差及裸鼠免疫活性的个体差异有关。之后改用体内和体外交替传代的方法,取第一批裸鼠皮下移植瘤细胞悬液接种于第二批裸鼠皮下,成瘤率即达 96%。

细胞皮下接种时,由于裸鼠皮肤组织较为松弛,细胞悬液流动性强,一般需要 30 d 左右才能观察到肿瘤的生长,而且肿瘤的形状很不规则,不利于对瘤体体积测量和计算,影响结果分析。因此本研究参考文献方法^[5],把细胞重悬于基质胶中。基质胶是一种细胞外基质复合物凝胶,其成分和哺乳动物的细胞基底膜类似^[6],具有促进细胞增殖、细胞分化、胶原分泌、血管生成、组织成型的作用^[7]。基质胶在低温时(0℃~4℃)是液状,而温度高于 25℃ 时即可成胶状,因此可以把细胞悬液固定在裸鼠皮下,防止细胞悬液向周围流动,益于细胞增殖。应用基质胶可显著提高肿瘤细胞在动物体内的致肿瘤性^[8-9]。本研究采用基质胶之后,细胞成瘤时间缩短,7 d 左右即可在接种部位观察到肿瘤,且形状规则。

本研究建模方法简便,成瘤率高,瘤组织形状规则易于测量,为较理想的模型制作方法,可为深入研究人结肠癌提供较为理想的动物模型。

【参考文献】

- [1] 周延杰,仇锦波.人结肠癌实验动物模型建立的研究进展[J].实验与检验医学,2011,29(1):60-62.
- [2] Allolio B, Fassnacht M. Adrenocortical carcinoma: clinical update [J]. Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(6):2027-2037.
- [3] 李卓.三种建立裸鼠人乳腺癌细胞移植模型方法的比较[J].中国医药导刊,2011,13(6):1040-1041.
- [4] 陈陵际.运用人癌裸小鼠移植瘤模型进行抗癌新药评价[J].上海实验动物科学,2001,21(4):247-250.
- [5] Labrie F. Current status of endocrine therapy in localized prostate cancer: cure has become a strong possibility[J]. Int Braz J Urol, 2004, 30(1):3-11.
- [6] Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity[J]. Semin Cancer Biol, 2005, 15(5):378-386.
- [7] Mondrinos MJ, Koutzaki S, Jiwanmall E, et al. Engineering three dimensional pulmonary tissue constructs[J]. Tissue Eng, 2006, 12(4):717-728.
- [8] 雷霞,伍津津.基质胶的生物学活性研究进展[J].口腔医学,2011,31(6):368-371.
- [9] Mullen P. The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts[J]. Methods Mol Med, 2004, 88(6):287-292.

(收稿日期:2011-12-28;修回日期:2012-02-03)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)