

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.020

· 技术方法 ·

人胃癌裸鼠原位移植瘤模型的建立及其活体荧光成像检测

曹钟元^a, 赵振凯^a, 相庚^a, 倪清蓉^a, 才延辉^b, 席宇菁^c, 赵晶^c, 阎博^c(第四军医大学 a. 学员旅; b. 西京医院麻醉科; c. 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的:** 建立可动态实时监测的人胃癌裸鼠原位移植瘤模型。 **方法:** 将稳定表达荧光素酶的人胃癌细胞 SGC-7901^{fluc+} 注入裸鼠后肢根部皮下形成皮下移植瘤。待皮下移植瘤肿块长至直径 0.5 cm 时, 剥取肿瘤组织, 应用叠合法将瘤块原位移植于裸鼠胃小弯处, 形成原位移植瘤模型。利用小动物活体荧光成像系统, 每 4 日监测移植瘤的进展情况。荷瘤 3 周后, 解剖荧光成像阳性小鼠, 利用 H-E 染色、光镜下观察移植瘤的形态。 **结果:** 应用小动物活体荧光成像系统, 可在荷瘤裸鼠胃部检测到逐渐增强的荧光信号。荷瘤裸鼠胃部存在肿瘤包块贴附于胃壁, 包块直径为 0.5 ~ 1.0 cm, 包块周围与相邻组织器官边界清晰, 未见粘连, 检查腹腔未见转移, 未见腹水形成。应用叠合法构建人胃癌裸鼠原位移植瘤模型成功率为 95% (19/20)。对荷瘤胃组织 H-E 染色后, 可见异常肿瘤细胞, 肿瘤包膜完整, 符合胃癌组织学特征。 **结论:** 成功建立了操作简便、成瘤率高的可动态监测的人胃癌裸鼠原位移植瘤模型, 为研究胃癌发生机制、研发抗癌药物提供了理想的实验工具。

[关键词] 胃原位移植瘤模型; 活体荧光成像技术; SGC-7901 细胞株

[中图分类号] R392-33, R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0704-05

Establishment of an endogastric xenograft tumor model in nude mice and its detection by *in vivo* fluorescence imaging system

CAO Zhongyuan^a, ZHAO Zhenkai^a, XIANG Geng^a, NI Qingrong^a, CAI Yanhui^b, XI Yujing^c, ZHAO Jing^c, YAN Bo^c (a. School of Student Brigade; b. Department of Anesthesiology, Xijing Hospital; c. Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an endogastric xenograft tumor model in nude mice which can be dynamically monitored by *in vivo* fluorescence imaging system. **Methods:** The SGC-7901^{fluc+} cell line stably expressing luciferase was injected subcutaneously into nude mice to develop transplanted tumor. Subcutaneously transplanted tumor (with diameter of 0.5 cm) was collected and orthotopically overlapping sutured into lesser gastric curvature of nude mice. Tumor growth in rats was monitored using *in vivo* fluorescence imaging system every 4 days. At 3 weeks post-tumor implantation, the fluorescence-positive mice were sacrificed and H-E staining was performed to observe the morphology of endogastric xenograft tumor. **Results:** Using *in vivo* fluorescence imaging system, gradually enhanced fluorescence signal could be detected on the gastric area of tumor bearing nude mice. Tumor block grew locally around the lesser gastric curvature, with typical gastric carcinoma morphology as assessed by H-E staining. The diameter of the tumor block was 0.5-1 cm. The boundary of tumor and adjacent tissue was clear. No adhesion, no metastasis was found in the abdominal cavity, and no formation of ascites was found. The successful rate of endogastric xenograft tumor model of human gastric carcinoma in nude mice was 95% (19/20). **Conclusion:** The endogastric xenograft tumor model in nude mice was successfully established. This model provided an ideal experimental tool for studying the mechanism of human gastric carcinoma and the development of anticancer drugs.

[Key words] endogastric xenograft tumor model; *in vivo* fluorescence imaging; SGC-7901 cell line

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 703-707. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.020]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81372459)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372459)

[作者简介] 曹钟元(1994-),男,河南商丘人,本科生,主要从事肿瘤靶向治疗的研究, E-mail:15829750025@163.com

[通信作者] 阎博(YAN Bo, corresponding author), E-mail: yb5870@163.com; 赵晶(ZHAO Jing, co-corresponding author), E-mail: zhaojing@fmmu.edu.cn

癌症的高发病率与高死亡率严重威胁人类的生存和健康。胃癌以其全球发病率第二和晚期极高的致死率成为主要的癌症死因^[1-2]。建立能够模拟人体胃癌生物学特征的动物模型,用于胃癌发病机制研究及相关药物开发十分必要。早期的胃癌模型多采用化学诱变法^[3],但该方法成功率低、成瘤周期长。在裸鼠皮下植入人胃癌细胞的皮下移植瘤模型^[4-8],具有成瘤率高、操作简单等优点。但由于皮下组织与胃组织结构特征存在较大差异,皮下移植瘤模型无法用于肿瘤原位生长相关机制的研究^[9-11]。将胃癌细胞接种于动物胃部的原位移植瘤模型,能够模拟肿瘤生长、侵袭、转移等特征,具有更广阔的应用范围^[12]。活体荧光成像技术能够无创、实时地观察肿瘤生长,具有灵敏度高、无放射性等优点^[13-14]。本实验应用表达荧光素酶的人胃癌细胞 SGC-7901^{Luc+},建立人胃癌裸鼠原位移植瘤模型,利用活体荧光成像技术对荷瘤模型进行无损伤动态监测,旨在建立一个成瘤率高、能够连续监测肿瘤生长状态的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

SGC-7901^{Luc+} 细胞为第四军医大学生物化学与分子生物学教研室构建^[15];4~6 周 BALB/c 裸鼠购自西安第四军医大学动物实验中心。IVIS[®] Kinetic 小动物成像系统、小动物气体麻醉系统为 Caliper 公司产品。DMEM 为 HyClone 公司产品;荧光素为 Caliper 公司产品。山羊抗荧光素酶抗体购自 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 抗体购自 GeneTex 公司;近红外荧光 IRDye 800CW 标记的驴抗山羊 IgG、IRDye 800CW 标记的山羊抗兔 IgG 购自 LI-COR Biosciences 公司。

1.2 Western blotting 法检测 SGC-7901^{Luc+} 细胞株中荧光素酶表达

取 SGC-7901 亲本细胞和 SGC-7901^{Luc+} 细胞制备蛋白样品,经过 120 $\mu\text{g/L}$ SDS-PAGE 后转膜,50 $\mu\text{g/L}$ 脱脂奶粉封闭 1 h;山羊抗荧光素酶抗体(1:5 000)或兔抗人 GAPDH 抗体(1:5 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;1 \times TBST 洗涤后,近红外荧光 IRDye 800CW 标记的驴抗山羊 IgG(1:10 000)或山羊抗兔 IgG(1:15 000),室温孵育 30 min,1 \times TBST 洗涤后荧光扫描判读结果。

1.3 小动物活体成像系统检测 SGC-7901^{Luc+} 细胞株体外活性

胰酶消化 SGC-7901^{Luc+} 细胞株,进行细胞计数后按照设定细胞数加入 96 孔板内,培养液补足至 100 μl 每孔;向各孔加入 100 μl 荧光素(0.3 mg/ml);2 min 后将孔板置于小动物成像系统内,以 8 bin 的分辨率采集信号 1 min,记录结果。

1.4 应用叠合法构建人胃癌裸鼠原位移植瘤模型

使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 作为人胃癌细胞 SGC-7901^{Luc+} 的培养液,于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内常规培养。取对数生长期 SGC-7901^{Luc+} 细胞,胰酶消化,以无血清培养液重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$;以注射器吸取 100 μl 细胞悬液,注射至裸鼠后肢根部皮下,建成裸鼠皮下移植瘤模型。待裸鼠皮下移植瘤瘤块长至直径 0.5 cm 时,5% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉皮下荷瘤裸鼠,剥取皮下肿瘤组织,剔除纤维包膜,选取生长良好、呈淡红色的移植瘤组织,切成 2 mm \times 2 mm \times 2 mm 组织块。肿瘤原位移植裸鼠术前禁食 12 h,腹腔注射 5% 水合氯醛 150 μl 麻醉后,沿左侧正中旁线开腹,小心牵拉出胃壁。取新鲜的肿瘤组织块缝挂于胃小弯处,再将瘤块四周胃壁缝合,使肿瘤组织包裹在胃壁中。将鼠胃轻柔地还纳入腹腔,关腹(图 1)。动物苏醒后,放回笼中 SPF 条件饲养,每天观察术后状态。



图 1 人胃癌裸鼠原位移植瘤模型构建的手术步骤

Fig. 1 Operation procedures of constructing endogastric xenograft tumor modal in nude mice

A: Surgical incision of abdominal wall; B: Exposure of the lesser gastric curvature;

C: Sutring of tumor block; D: Overlapping suture of gastric wall; E: Suture of peritoneum and epidermis

1.5 应用小动物活体成像系统检测人胃癌裸鼠移植瘤的生长情况

自手术操作完毕当天起,每4 d应用荧光成像系统观察荷瘤部位荧光强度变化。荷瘤裸鼠腹腔注射200 μ l 荧光素底物(1.5 mg/ml),10 min后,腹面朝上置于成像系统暗箱内,以4 bin分辨率采集荧光1 min。

1.6 应用H-E染色鉴定胃原位移植瘤

荷瘤手术3周后,处死裸鼠,开腹取出鼠胃,用游标卡尺(精度0.05 mm)测量移植瘤块大小,观察转移情况,将荷瘤部位进行冰冻切片、H-E染色,光学显微镜下鉴定胃原位移植瘤,并拍照。

2 结果

2.1 人胃癌SGC-7901^{Luc+}细胞高表达荧光素酶

Western blotting检测结果(图2A)显示,SGC-7901^{Luc+}细胞大量表达荧光素酶蛋白(M_r 70 \times 10³)。其稳定表达高水平的荧光素酶,能够应用小

动物成像系统进行检测(图2B)。

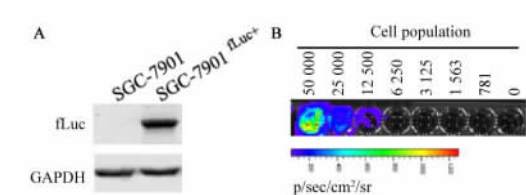


图2 SGC-7901^{Luc+}细胞高表达荧光素酶

Fig. 2 SGC-7901^{Luc+} cells highly express luciferase

A: Western blotting; B: *In vitro* fluorescence assay

2.2 成功构建人胃裸鼠原位移植瘤模型

裸鼠胃肿瘤原位移植手术当天(0 d),以小动物成像系统对术后裸鼠进行观察。在手术部位能够检测到荧光信号,证明肿瘤组织块已成功接种在胃壁上(图3)。随着时间推移,裸鼠胃部荧光信号强度逐渐升高,范围逐步扩大。所有荷瘤裸鼠在术后3周内均检测到稳步增强的荧光信号。

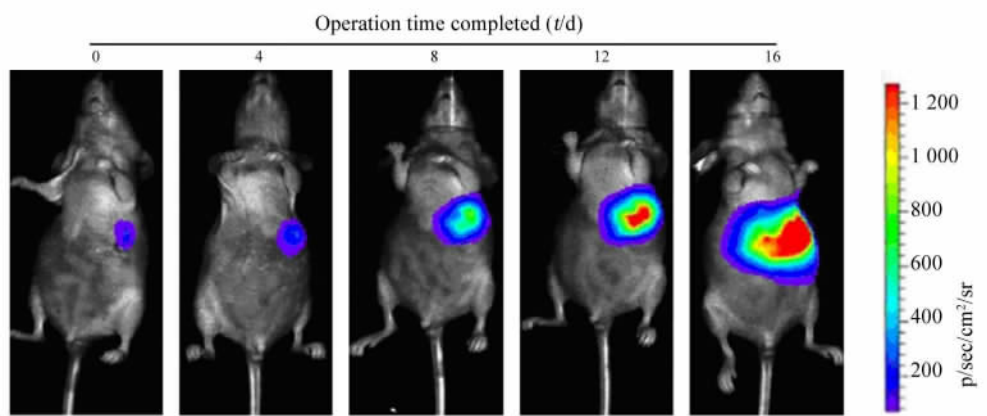


图3 应用活体荧光成像技术实时动态监测胃原位移植瘤的生长情况

Fig. 3 The endogastric xenograft tumor progression was monitored using *in vivo* fluorescence imaging system

胃肿瘤原位移植手术3周后处死荷瘤裸鼠,可见裸鼠胃部有明显异常包块,包块周围与相邻组织器官边界清晰,未见粘连,检查腹腔未见转移,未见腹水形成。将裸鼠胃取出,测量异常包块直径为0.5~1.0 cm,异常组织成球样生长在胃壁处,贴合紧密。手术裸鼠成瘤率95%(19/20),均可见肿瘤包块贴附于胃壁(图4)。

H-E染色结果(图5)显示,胃壁组织结构清晰,肿瘤包膜完整,瘤组织细胞深染,细胞形态呈椭圆形,切片符合人胃癌细胞的病理形态。

3 讨论

1969年Rygaard等^[16]将人结肠癌细胞注射到裸鼠皮下,首次成功地建立了人类肿瘤裸鼠皮下移植瘤模型。移植瘤在裸鼠皮下生长时,肿瘤脱离了原发部位的组织环境,通常被纤维膜包裹,干扰肿瘤血管的生成,阻碍了其进一步的生长和血行转移,因此皮下接种无法真实模拟肿瘤生物学行为和自然属性。采用肿瘤原位移植技术可以更好的模拟肿瘤在原发部位的生长状况,能够更真实的模拟肿瘤生长的特点及转移过程。

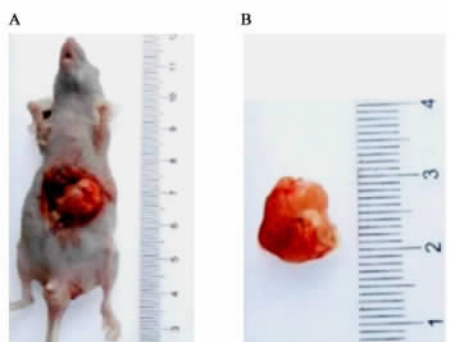


图 4 人胃癌裸鼠移植瘤大体形态

Fig. 4 The morphology of the endogastric xenograft tumor in nude mice

A: Anatomy of nude mice; B: Separated tumor tissue

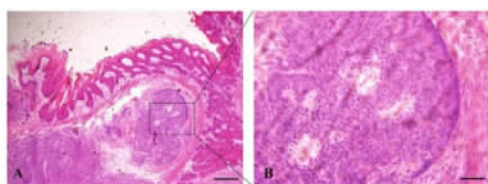


图 5 人胃癌裸鼠移植瘤 H-E 染色结果

Fig. 5 H-E staining of the endogastric xenograft tumor

A: Tumor-bearing gastric tissue, scale bar = 400 μm ;

B: Partial enlarged view of A, scale bar = 100 μm

Yamashita 等^[17]最早将胃癌细胞悬液注射到裸鼠胃壁,利用悬液法制作裸鼠胃癌原位移植瘤模型。悬液法制备模型简单,因缺少皮下成瘤过程从而造模周期缩短,但其成瘤率低,生长缓慢^[18-19]。Furukawa 等^[20]利用缝线将新鲜的瘤组织块缝挂于裸鼠损伤的胃壁,使肿瘤在胃壁间浸润性生长,保证了成瘤的高效性。随后又形成了多种肿瘤组织块种植在裸鼠胃壁的造模方法,如缝挂法、OB 胶粘法、荷包缝合法等^[21-25]。缝挂法是早期胃癌原位移植使用的常规方法,操作步骤简单,但本身存在缺陷。缝挂于胃壁外的肿瘤组织由于无法与胃黏膜有效接触,造成瘤组织在胃壁外生长,易导致瘤组织脱落入腹腔,降低成瘤率^[26]。荷包缝合法能使肿瘤在人造的荷包口袋内生长,避免肿瘤在胃壁外与腹膜、肠等组织摩擦而发生脱落,因而成瘤率较高,但荷包缝合需要操作上密切配合,造模手术时间耗费长。本研究使用叠合法造模,结合了原有缝挂法和荷包缝合法的优点,消除了肿瘤暴露在胃壁外生长的弊端,同时操作简便,荷瘤成瘤率达到 95%,H-E 染色显示出典型的胃癌形态。在建立模型的手术操作过程中,

将肿瘤组织有效的包裹在胃壁中是关键步骤。做到缝扎要牢,防止肿瘤组织在腹腔中自行滑脱;同时也要注意包裹肿瘤应尽量减少缝扎次数,降低手术对鼠胃的损伤。以叠合法制作裸鼠原位移植模型,能够有效的使瘤组织固定在胃壁上,提高成瘤率,降低操作难度。即便如此,手术过程中也应做好止血、器官复位、腹腔清洗等步骤,待完全无出血后再进行关腹操作,以提高模型建立的成功率。

本研究结果表明,裸鼠胃部在进行 SGC-7901^{fluc+} 细胞组织块移植后,荷瘤处可见荧光信号强度随瘤体积增大而增强,鼠胃内存在异质团块,H-E 染色显示出典型的胃部肿瘤形态。该模型的建立为研究胃癌发生机制、研发抗癌药物提供了理想的实验模型。

[参 考 文 献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] 许春花, 杨磊, 汤旭秦, 等. 人源性胃癌移植瘤模型的初步建立及其评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(4): 259-265. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2014.04.001.
- [3] NARESSE L E, KOBAYASI S, RODRIGUES M A. Carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract induced by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine and reflux of duodenal contents in the rat [J]. Acta Cir Bras, 2009, 24(2): 112-117. DOI: 10.1590/s0102-86502009000200007.
- [4] MANU K A, SHANMUGAM M K, LI F, et al. Simvastatin sensitizes human gastric cancer xenograft in nude mice to capecitabine by suppressing nuclear factor-kappa B-regulated gene products [J]. J Mol Med, 2014, 92(3): 267-276. DOI: 10.1007/s00109-013-1095-0.
- [5] 郝淑兰, 刘丽坤, 王晞星, 等. 人胃癌 SGC7901/VCR 裸鼠移植瘤模型的建立及耐药性检测 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(4): 358-360. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6613.2013.04.012.
- [6] 李科伟, 姜政. 慢病毒载体介导 Nanog 小分子干扰核糖核酸抑制人胃癌裸鼠移植瘤的生长 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(1): 18-22. DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.007199.
- [7] 靳俊峰, 欧小波, 阮媛, 等. 人胃癌 HGC-27 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 遵义医学院学报, 2015, 38(1): 29-31. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2015.0007.
- [8] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6790.2013.02.025.
- [9] 王吾如. 关于癌转移分子病理学的研究 [J]. 中华病理学杂志, 1994, 23(4): 197-199. DOI: 10.3760/j.issn:0529-5807.1994.04.001.
- [10] FIDLER I J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G. H. A. Clowes memorial award lecture [J].

- Cancer Res, 1990, 50(19): 6130-6138.
- [11] 刘平, 赵志泉, 张小勇, 等. 人胃癌组织块裸鼠原位移植/转移模型的建立 [J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(1): 15-16. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.38.
- [12] ILLERT B, OTTO C, BRAENDLEIN S, et al. Optimization of a metastasizing human gastric cancer model in nude mice [J]. Microsurgery, 2003, 23(5): 508-512. DOI: 10.1002/micr.10184.
- [13] LEBLOND F, DAVIS S C, VALDES P A, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: review of instruments, methods and applications [J]. J Photochem Photobiol B, 2010, 98(1): 77-94. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
- [14] LIU L, YIN J, LIU C, et al. In vivo molecular imaging of gastric cancer in human-murine xenograft models with confocal laser endomicroscopy using a tumor vascular homing peptide [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 891-898. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.036.
- [15] 贾小飞, 闫博, 张熠杰, 等. 肝原位移植瘤裸鼠模型的建立及活体荧光成像检测 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 426-429. DOI: 10.13423/j.cnki.cjemi.006781.
- [16] RYGAARD J, POVSEN C O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice [J]. APMIS, 2007, 115(5): 604-608. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_689a.x.
- [17] YAMASHITA T. Manifestation of metastatic potential in human gastric cancer implanted into the stomach wall of nude mice [J]. Jpn J Cancer Res, 1988, 79(8): 945-951. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1988.tb00059.x.
- [18] 孙培鸣, 金润森, 杜晓辉, 等. 工程化人胃癌裸鼠原位模型的建立及其活体荧光成像观察 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(12): 1718-1721. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.12.008.
- [19] HU H, LIU J, YAO L, et al. Real-time bioluminescence and tomographic imaging of gastric cancer in a novel orthotopic mouse model [J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1937-1943. DOI: 10.3892/or.2012.1713.
- [20] 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.
- [21] 刘秋珍, 脱朝伟, 张宁, 等. 人胃癌裸鼠原位移植高转移模型的建立 [J]. 消化外科, 2002, 1(2): 89-92. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2002.02.005.
- [22] SHI J, WEI P K, ZHANG S, et al. OB glue paste technique for establishing nude mouse human gastric cancer orthotopic transplantation models [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(30): 4800-4804. DOI: 10.3748/wjg.14.4800.
- [23] 白飞虎, 郭新宁, 杨力, 等. 人胃癌裸鼠胃原位移植转移模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(10): 873-875. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2790.2003.10.004.
- [24] 许玲, 陈亚琳, 苏晓妹, 等. 裸鼠人胃腺癌SGC-7901原位移植模型的构建及其生物学特性 [J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(5): 476-478. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5269.2003.05.009.
- [25] BHULLAR J S, MAKARAWO T, SUBHAS G, et al. A true orthotopic gastric cancer murine model using electrocoagulation [J]. J Am Coll Surg, 2013, 217(1): 64-70. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.01.062.
- [26] 孙永强, 臧宏, 王强, 等. 人胃癌裸鼠胃原位种植转移模型的建立和改进 [J]. 南通大学学报(医学版), 2005, 25(03): 169-170. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7887.2005.03.005.
- [收稿日期] 2016 - 03 - 26 [修回日期] 2016 - 06 - 24
[本文编辑] 党瑞山