

人乙状结肠管状腺癌移植裸鼠模型的建立及应用

解放军总医院病理科 黄靖香 纪小龙

单克隆室 韩冰

〔摘要〕 本文报导用人乙状结肠原发部位的管状腺癌组织块移植到裸鼠体内荷瘤后,在生物学研究和临床诊断治疗方面的应用,建立了一个有实用价值的动物模型,该模型先后传代20余次,因各种实验需要接种裸鼠125只,其形态及生物学特征和组织的抗原性仍保持不变,用鼠间传代第10代肿瘤组织做体外细胞培养,第5天就可见到单层细胞长出,呈腺样管状结构,在应用性实验中,用放射性核素标记的抗结肠癌单克隆抗体2C10在本模型裸鼠体内的放射免疫显像,为过渡到临床病人的定位诊断提供了必要的参数和依据,另外还用鼠间传代的肿瘤组织块,经液氮冻存28个月后再接种到裸鼠皮下肿瘤仍同样生长,并能传代,其形态特点与原发肿瘤基本一致,这对保持裸鼠肿瘤模型的延续性,减少鼠间传代的工作量和所需费用,为肿瘤实验研究工作的重复性,将有很明显的实际意义。

用人乙状结肠原发部位的管状腺癌组织块接种裸鼠建立肿瘤模型,国外Rygaard等1969年最先报道^[1]。国内吴秉铨等1982年报导过建立人结肠粘液腺癌裸鼠模型^[2]。1987年张宗显等建立过人直肠粘液腺癌裸鼠模型^[3]。我们于1987年4月因实验需要建立了人乙状结肠管状腺癌裸鼠模型,先后鼠间传代20余次,接种裸鼠125只,历时4年余,此模型现已冻存保留,定名为HCN—248。

材料和方法

患者于×,男,60岁,因乙状结肠管状腺癌于1987年4月25日行乙状结肠切除术,从切下的18cm结肠内可见5.5×3.5×1.5cm的环状溃疡型肿瘤,病理诊断为乙状结肠溃疡型管状腺癌,浸润到浆膜层(病理号169277),从手术标本的浆膜层消毒后,无菌取肿瘤组织二块,一块送冰冻切片,用抗结肠癌McAb—2C10^[5],免疫荧光间接法染色证明阳性反应后,将另一块组织用Hank's液(含庆大霉素400μg/ml)反复清洗5遍,剪成1mm³大小的小块放入套管针头内,移植到裸鼠腹外侧皮下血管丰富处。裸鼠购自中国医科院动物中心。遗传背景为BALB/C和615—nn,鼠龄5周,雄性,体重20克,饲养在SPF环境中。接种18天见肿瘤长或0.2×0.4cm大小的结节,65天肿瘤长到1×1.6cm时(图1),用氯胺酮(0.025mg/g裸鼠体重)腹腔内注射,5分钟麻醉后,无菌消毒,手术切下肿

瘤(留2mm³大小肿瘤组织块于切口内),丝线连续缝合。将切下的肿瘤组织块再以上述同样方法接种裸鼠5只,以此反复传代,第1—3代肿瘤生长较慢,从第4代后肿瘤生长速度加快,宿主带瘤生长最长达125天。取肿瘤组织做病理检查,同时做Schiff's试剂PAS反应和Aleian blue (AB)染色。我们还用癌胚抗原CEA—McAb(北京生物制品所生产),进行PAP免疫组化染色,上述染色均为阳性。组织学光镜形态:胞核兰染,呈圆形或卵圆形,细胞呈上皮样生长,有癌巢腺样管状结构,和病人的原发肿瘤组织结构一致(图2、3)定名为HCN—248。

应用实验:

1. ¹¹¹In标记抗结肠癌单抗在荷瘤HCN—248裸鼠体内的分布和放射免疫显像^[4]。

(1) ¹¹¹In—2C10在荷瘤裸鼠体内的分布:裸鼠20只,平均体重18克,移植瘤直径0.7—1.8cm,按肿瘤大小对应分为两组,分别接受¹¹¹In—2C10和¹¹¹InIgG,以1:11MBq(30μCi)/只(含抗体10μg,生理盐水稀释到0.2ml)的剂量,腹腔注射,给药后12、24、48、72、96小时每组取动物2只,取血后处死,取心、肺、肝、脾、肾等脏器和肿瘤组织,称重后以井型探测器行γ计数测量,计算均按常规方法。

(2) I照像机扫描肿瘤定位:荷瘤裸鼠5只,肿瘤直径0.8—1.2cm,随机取出3只,每只腹腔注

射 $^{111}\text{In}-2\text{C}10$ ($200\mu\text{Ci}$, $68\mu\text{g}$, 0.2ml)。另外2只以 ^{111}In 标记的正常B/C小鼠IGg进行对照,两组动物均于注射后24、48、72、96小时用乙醚麻醉,取俯卧位,在针孔准直器下用数字型大视野 γ 照像机(东芝50/S)进行 γ 照像。 ^{111}In 能量为172和245keV,采集计数500,000。

2. 将荷瘤裸鼠的肿瘤组织转到瓶中体外培养:用13代鼠间传代的肿瘤组织, $1 \times 1\text{cm}$ 大小,用Hank's液冲洗两次,眼科小剪剪成糊状,加Hank's液,用120目不锈钢筛网过滤,将筛网下的单细胞悬液离心弃上清,沉淀的细胞打散加1640培养液,含小牛血清15% (pH 7),分装到小方瓶中进行单层培养。筛网上的小组织块,用弯头吸管吸到方瓶中,均匀地贴到瓶壁上方,瓶下壁加培养液,2小时后将组织块轻翻到培养液中,于 37°C 温箱静止培养(图6a)。当细胞生长成单层后传代,用传代细胞传到盖玻片上培养3天,进行PAS和AB染色,用10代3天的单层细胞进行扫描电镜(图6b)和染色体观察分析。

3. 用肿瘤组织块冻存,可将肿瘤模型长期保存:

在实验工作中,建立一个裸鼠模型,需要不少人力、物力和时间,但保存好裸鼠模型,长期鼠间传代不丢失更为困难。为了解决这一难题,我们将鼠间传代到16代的瘤组织,无菌取出,经Hank's液洗2次,剪成 1mm^3 大小块,加冻存液(RPMI-1640培养液6份,小牛血清3份,二甲基亚砷1份),再把组织块和冻存液吸到冻存管中密封,装入自缝纱布口袋中, 4°C 3小时, -20°C 30分钟,液氮罐口下(-70°C , -90°C)、液面、上(-100°C),各30分钟后放入液氮中冻存。我们将冻存8个月的小组织块(R767)取出立即放到 38°C 水浴中复苏,将冻存液吸净弃之,加Hank's液洗2次后,把解冻组织块用直式无齿眼科镊送入套管针头内,接种到裸鼠皮下血管丰富处(R816),每只接种4—5块,一周测肿瘤大小一次。

结 果

1. HCN—248裸鼠模型的建立:利用手术切下的人结肠癌组织,建立了人乙状结肠溃疡型管状腺癌的裸鼠模型,此模型的建立:无论从形态,组织化学PAS和AB染色,免疫组化CEA单克隆抗体PAP染色结果证明:移植后肿瘤和原发肿瘤均为

阳性,组织形态和分化状况基本保持一致,鼠间传代20次后仍保持原有的抗原性。

2. $^{111}\text{In}-2\text{C}10$ 在荷瘤裸鼠体内的分布(图5):实验动物T/N比值的变化:T/N比值反应肿瘤组织与正常脏器浓集标记抗体的差异,其高低直接影响 γ 照像的显像效果,它在不同动物之间具有可比性,在给药24小时内,除肌肉、胃组织外,单位瘤组织与正常脏器的放射性强度相近,但都明显低于血液。随时间延长T/N值逐渐加大,96小时瘤/肌肉为10.48,瘤/血为3.94,瘤/大肠为5.18,但肝、脾、肾脏T/N值均小于2。

定位指数:定位指数反应抗体与肿瘤组织特异性结合程度,在给药后96小时,T/N比值与对照组相比有显著差异($P < 0.01$),肌肉为2.9,肝为3.0,血液2.4,大肠2.1。

肿瘤显像结果:实验组标记抗体24小时后可见肿瘤显像,96小时肿瘤部位清晰可见,大小与肿瘤相符,而对照组肿瘤均不显影(见图4),使用HCN—248模型注射 $^{111}\text{In}-2\text{C}10$ 单克隆抗体,获得了体内分布和显影定位的第一手资料,为后来16个病人的体内定位诊断中,提供了可靠的依据和参数。

3. 肿瘤组织转到瓶中体外培养:培养细胞在瓶中生长稳定,传代20次后冻存。并用3代细胞加秋水仙素进行染色体分析,为人的染色体,多倍体(图7)。用15代细胞 2×10^6 ,经离心后将细胞接种到裸鼠皮下,同样致瘤(R822)。肿瘤生长68天,体积为 $1 \times 1\text{cm}$ (图8),其形态和人的原发癌及裸鼠移植瘤基本保持一致(图9)。

4. 冻存组织块移植到B/C裸鼠体内,每只裸鼠接4块,共接种2只,至42天肿瘤长至 2×1.7 和 $1.2 \times 1.1\text{cm}$,形态和原供体一致(图10、11)。

讨 论

用人结肠癌组织移植到裸鼠体内荷瘤,为生物学的研究和临床诊断治疗方面的应用,建立了一个有实用价值的动物模型,该模型来自一乙状结肠溃疡型管状腺癌的手术标本。先后在裸鼠体内传代20余次,接种100余只裸鼠,从大体解剖检查未见有淋巴结转移及其他脏器转移,这与该模型以浸润为主的特点一致,另外从形态学和组化、免疫组化观察均为阳性,和病人原发肿瘤一致。

将此模型应用到实验研究上,如放射性核素

参 考 文 献

^{111}In 标记的McAb-2C10,在荷瘤裸鼠体内的分布, γ 照像扫描的定位,均优于正常对照组,为过渡到临床病人定位诊断和治疗,提供了必要的参数和依据。另外还采用HCN-248肿瘤模型的组织块,转移到瓶中体外培养,生长稳定,这也是其他所建立的模型所没有的。特别是用肿瘤组织块冻存后再复苏直接种到裸鼠体内,仍能继续生长,而且其生物行为不变,这对肿瘤模型的保存和延续性,减少体内传代的工作量和所需费用将大有益处。在国内建立结肠癌模型及其他裸鼠模型的报导不少,但不少都因模型的保存有困难不得不丢失。我们用液氮冻存保存动物模型的方法,在实际研究工作中,是有其实际意义的^[6]。(本文图见封3)

1. Rygaard I, et al. Heterotransplantation of a human malignant tumor to "Nude" mice. *Acta Pathol Microb. Scand.* 1989, 77: 758.
2. 吴秉铨,等。人结肠粘液腺癌的裸鼠移植瘤及其生物学特性的研究:北京医学院学报,1982,14: 205.
3. 张宗显,等。人直肠粘液腺癌裸鼠移植瘤株的建立及传代的初步小结,全国第二届免疫缺陷动物实验研究学术交流资料汇编,1987年5月;苏州.P84.
4. 韩冰等。 ^{111}In 标记抗结肠癌单克隆抗体在移植人结肠癌裸鼠体内的放射免疫显象,中华核医学杂志,1989,2: 72.
5. 刘成贵,等。一组抗结肠癌单克隆抗体及其特性鉴定,癌症,1986,3: 264.
6. 杨景山,等。低温生物学的现状与展望,生理科学进展,1985,16: 296.

用隐血珠初筛、纤维胃镜检查贲门部活检组织508例分析

扬中县人民医院 李茂生 耿昌友 王理伟
中国医科院肿瘤医院 王国清 秦德兴

扬中县是上消化道癌高发区,特别是贲门癌高发,为探讨其原因,作者在1990年3~4月对本地区居民用隐血珠初筛、纤维胃镜检查的普查工作中,对贲门部粘膜作常规活检,现对贲门部活检组织508例进行分析。

材 料 和 方 法

普查对象是本地区长期居民、年龄为35岁以上的男女自愿受检者,总人数为5646人,用秦氏隐血珠初筛,对“++”及“+++”阳性者作纤维胃镜检查,其中508例作常规贲门部活检。男性279人,女性229人,男:女为1:4:1,年龄为28~72岁,平均中位年龄为50岁。对活检标本用常规石蜡切片H-E染色,按全国胃粘膜病变诊断标准,由集体读片作出诊断。

结 果

在508例贲门部活检组织中经病理诊断为慢性浅表性炎者301例,占59.25%;慢性萎缩性炎者195例,占38.39%;贲门腺癌12例,占2.36%;慢性贲门炎有急性炎症病变者201例,占40.52%。慢性萎缩性炎伴急性炎症病变者占比例高达60.51%;伴有肠化者为56例,占11.2%;伴有异型增生者13例,占2.62%。

讨 论

(一)本地区居民贲门部病变的特点

1. 贲门部慢性炎症发病率高,特别是萎缩性胃炎所占比例高达38.39%,明显高于文献报道的其他地区的发病率。

2. 伴有急性活动者较高,平均占40.52%,尤其是慢性萎缩性炎中急性活动较多,高达60.51%,并且病变程度较重,许多活检组织中腺腔和腺上皮中有较多的中性白细胞浸润。

3. 伴肠化者较多(占11.29%)。

(二)本地区居民贲门部萎缩性炎与贲门癌的关系分析:慢性萎缩性炎是一种癌前状态已为大家所公认,本组资料结果表明,扬中县居民的贲门部萎缩性炎发病率高,且急性活动也多。由于慢性贲门炎的反反复发作导致了贲门部粘膜结构和功能的改变,粘液分泌减少,致使贲门部粘膜缺少粘液的保护易受细菌的侵袭而加重感染,慢性贲门炎常伴发慢性胃炎,由于游离酸的分泌减少,胃内细菌增加迅速,在细菌还原酶的作用下,可使硝酸盐还原为亚硝酸盐,使胃内亚硝酸根含量增加,同时胃内可被亚硝基化的含氮化合物的种类和含量也可随贲门粘膜病变的加重而增加。因而贲门慢性萎缩性胃炎可催化致癌因子亚硝基化合物在胃内的形成,这很可能是贲门癌发生的重要原因之一。

浆细胞样淋巴细胞的光学形态、超微结构及细胞化学观察

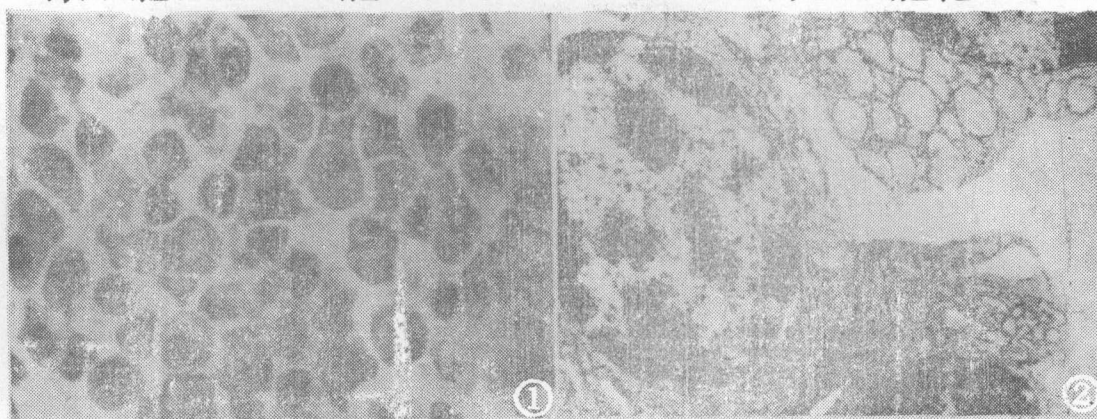


图1. 半薄切片 浆细胞样淋巴细胞×1000

图2. 浆细胞样淋巴细胞, 胞浆含多量粗面内质网, 核染色质呈粗块状, 有核仁(左上方); 核染色质凝聚, 无核仁(右下方)×10000

子宫内膜癌肉瘤的超微结构

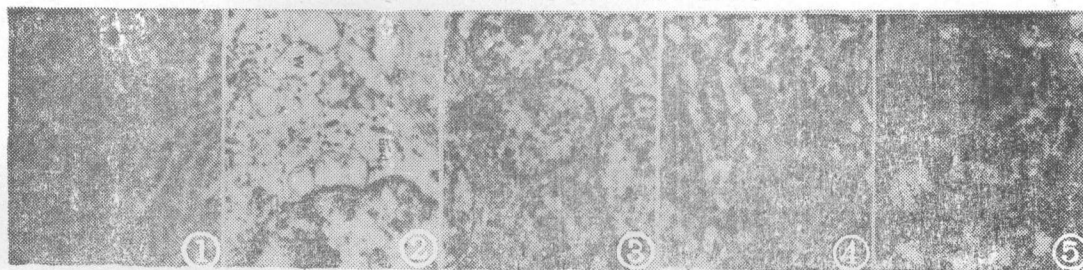


图1 呈索状排列的癌细胞区与肉瘤区的移行区。 HE×50

图2 癌细胞内线粒体(M)较多, 嵴短, 稀少, 基质电子密度较低, 粗面内质网(RER)呈短棒状。×12,000

图3 癌细胞内见胞浆包涵体(⇔)内含退化的细胞器, 细胞间见桥粒(→)。×4,600

图4 肉瘤细胞呈卵圆形, 核大, 形态不规则, 核仁明显。×4,900

图5 肉瘤细胞核膜轻度扩张, 线粒体(M)嵴短, 缺失, 基质电子密度低, 可见无定型结晶(箭头)。×11,800

人乙状结肠管状腺癌移植裸鼠模型的建立及应用

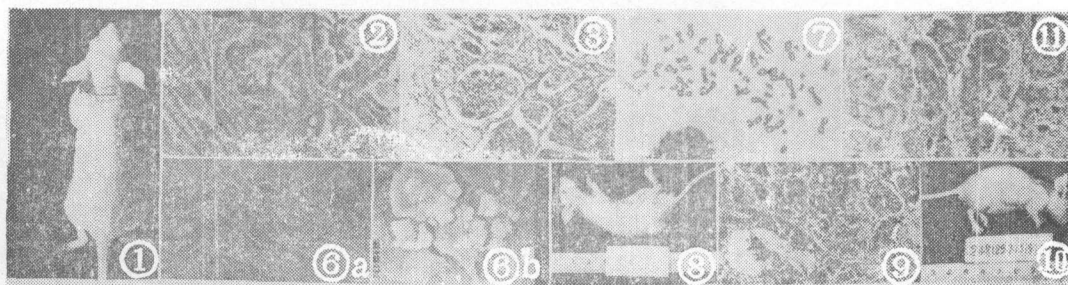


图1 HCN-243第一代65天的肿瘤 图2 病理169277光镜形态 HE×250

图3 第16代肿瘤光镜形态 HE×250 图6 a. 培养细胞原代(倒置镜10×20)

b. 培养C、SEM形态 图7 3代培养C的染色体(多倍体) 图8 15代培养C接种裸鼠致瘤

图9 R822致瘤后的光镜形态 HE×250 图10 肿瘤组织冻存后接种裸鼠致瘤

图11 致瘤后光镜形态 HE×400