

·实验研究 Experimental research·

肺癌 A549 裸大鼠移植瘤模型的建立及应用

曹 军, 何 阳, 刘洪强, 王赛博, 赵保成, 郑晓辉, 程英升

【摘要】 目的 探讨裸大鼠肺癌 A549 高效移植瘤模型的建立方法,为进行肿瘤的体内相关介入研究提供实验基础。**方法** 肺癌 A549 细胞接种于裸小鼠皮下,出瘤后制备单细胞悬液和组织块分别接种和塞入裸大鼠耳后皮下,观察初次培养细胞成瘤组、二次单细胞悬液成瘤组和二次组织块成瘤组的出瘤率和移植瘤的生长情况,流式细胞仪检测细胞周期的变化。**结果** 3 组中二次组织块成瘤组的出瘤率显著高于另外两组,细胞增殖快,移植瘤的变异小;细胞周期分析显示二次组织块成瘤组的细胞 S 和 G2/M 期比例增高,细胞增殖指数显著高于另外两组。**结论** 二次组织块成瘤可显著提高 A549 的成瘤率,是一种高效的裸大鼠移植瘤模型建立方法。

【关键词】 A549; 移植瘤模型; 裸大鼠

中图分类号:R734.2 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2014)-10-0901-05

Establishment of nude rat tumor xenograft model of human lung cancer cells A549: its clinical application CAO Jun, HE Yang, LIU Hong-qiang, WANG Sai-bo, ZHAO Bao-cheng, ZHENG Xiao-hui, CHENG Ying-sheng. Medical College, Soochow University, Suzhou, Jiangsu Province 215123, China

Corresponding author: CHENG Ying-sheng, E-mail: chengyingsheng@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the method for effective establishment of nude rat tumor xenograft model of human lung cancer cells A549 in order to provide the experimental basis for tumor-related interventional research in vivo. **Methods** A549 cell lines were subcutaneously transplanted in nude rats, then single-cell suspension or tumor tissue block were prepared when the tumor lesion was established. The single-cell suspension and tumor tissue block were transplanted into subcutaneous tissue behind ear in rats. The tumor formation rate, growth situation and cell cycle of primary xenograft tumor group, the secondary single-cell suspension group and the secondary tumor block group were evaluated. The results were analyzed. **Results** The tumor formation rate of the secondary tumor block group was significantly higher than that of the other two groups. The tumor cells quickly proliferated with less tumor variation. Tumor cell cycle analysis indicated that G2/M ratio of the secondary tumor block group was remarkably higher than that of the other two groups. **Conclusion** Transplantation with tumor tissue block can significantly increase the tumor formation rate of human lung cancer cells A549 in experimental rats. This technique is an effective method for the establishment of nude rat tumor xenograft model. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 901-905)

【Key words】 A549 cell line; xenograft tumor model; nude rat

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2014.10.016

基金项目:上海市自然科学基金(12ZR1428900);上海市卫生计生委科研项目(201114344);上海市卫生计生委青年科研项目(20124Y096)

作者单位:215123 苏州大学医学部[曹 军(现在上海市徐汇区大华医院,200237)];上海市徐汇区大华医院(何 阳、刘洪强、王赛博、赵保成、郑晓辉);上海交通大学附属第六人民医院(程英升)

通信作者:程英升 E-mail: chengyingsheng@hotmail.com

肺癌是世界上发病率和病死率最高的恶性肿瘤,2010 年美国肺癌患者达 22.2 万,死亡 15.7 万,居所有肿瘤之首^[1]。在所有肺癌病例中约 85%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),就诊时约有 2/3 患者已失去手术机会,临床上为Ⅲ~Ⅳ期^[2-3]。以往肺癌基础研究多用裸小鼠模型,但是,裸小鼠个体小,成瘤后,所获肿瘤组织较少,且血管纤细无法完成插管,难以行动脉介入方面的研究。为了弥补上述不足,便于开展肺癌介入方面的基础

研究,我们参照裸小鼠肿瘤模型建立方法^[4-5],建立一种高效肺癌 A549 细胞裸大鼠皮下移植瘤模型,并且进一步比较不同建立方法的可行性和有效性,为开展肿瘤介入相关药理及药效评价提供有效的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

1.1.1.1 裸大鼠:18 只,健康,雌雄各半,8~10 周龄,体质量(180 ± 15)g,饲养于复旦大学公共卫生中心实验动物所 SPF 级动物房,饲以高压灭菌水和饲料,各组鼠均同等自由饮水、摄食,饲养室相对湿度 40%~50%,温度 22~25℃,光照 12 h 明暗交替。

1.1.1.2 荷瘤裸小鼠:5 只,健康 BALB/C 裸小鼠,4~5 周龄,体质量(22.1 ± 2.1)g,购自上海市肿瘤研究所。在 SPF 级动物房适应性饲养,整个实验过程中,各组鼠均同等自由饮水、摄食,饲养观察室保持 22~25℃,相对湿度 40%~50% 的 SPF 层流室中。

1.1.2 细胞株 人肺癌细胞株(A549)购自上海市肿瘤研究所,人肺癌细胞 A549 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,其中加入 100 u/ml 青霉素及 100 u/ml 链霉素,培养箱温度为 37℃,CO₂ 的体积分数为 0.05。

1.1.3 实验药物及器械 麻醉剂盐酸氯胺酮系上海第一生化药业公司生产,按 10 mg/100 g 实验鼠体重腹腔注射麻醉。细胞培养过程中所需 10%小牛血清的 DMEM 培养基、胎牛血清等均由 Gibco 公司提供。显微外科实验手术器械购自上海市医疗器械总公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立

1.2.1.1 荷瘤裸小鼠皮下瘤模型的建立:将人肺癌 A549 株细胞复苏、含 10%小牛血清的 DMEM 培养液培养及传代,取生长良好指数的人肺癌 A549 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,离心,收集细胞用 PSB 稀释,浓度调整为 5×10^6 /ml,每只小鼠以 0.2 ml 接种于 5 只成年 BABL/c 裸鼠右腋皮下造模,正常饲养 8 d 后动物接种肿瘤成功。

1.2.1.2 裸大鼠皮下移植瘤模型的建立:根据裸大鼠移植瘤模型的建立方法不同,分为 3 组,A 组:初次培养细胞成瘤组;B 组:二次单细胞悬液成瘤组;

C 组;二次组织块成瘤组。每组 6 只裸大鼠,每只裸大鼠耳后接种一个点。A 组用培养的 A549 细胞 1×10^6 个/0.2 ml,接种于裸大鼠耳后皮下;B 组用荷瘤裸小鼠皮下移植瘤,待瘤块最长径 > 1 cm 时,将裸小鼠断颈处死,无菌条件下解剖分离瘤块,制成筛网法单细胞悬液移植于裸大鼠的耳后皮下;C 组用荷瘤裸小鼠皮下移植瘤,同上述方法解剖分离瘤块,切成 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$,再把瘤组织块移植于裸大鼠的耳后皮下,接种后 3 组隔天测量移植瘤的长短径,用游标卡尺测出肿瘤的直径(A)和横径(B),按公式 $V = 1/2 \times (A \times B^2)$ 计算肿瘤体积。

1.2.2 细胞周期测定 收集 1×10^6 细胞,用冰 PBS 洗两次,离心 $1\ 200 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$,弃上清液后再重悬于 75%乙醇中,测试前用冰 PBS 洗 2 次,加入 RNAase 及碘化丙啶(终浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$),37℃避光放置 15 min,Beckman Coulter 公司 Cytomics FC500 流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,吸收波长为 610 nm),每个样品测定 10 000 个细胞,ModFit LT 3.2 软件分析细胞周期,并计算增殖指数(PI), $PI = [(S + G2/M)/(G0/G1 + S + G2/M)] \times 100\%$ ^[6]。

1.3 统计分析

利用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,采用 χ^2 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸大鼠的一般情况

连续观察皮下瘤模型 56 d。肿瘤细胞皮下注射 4~5 d 后,8 只裸大鼠均在注射处触及芝麻大的结节。7 d 后呈直径 4~5 mm 的皮下结节,14 d 后肿块呈分叶状、质实、边界清、活动度可、无液化,28 d 后肿块增大伴中央液化。35 d 后荷瘤裸大鼠的肿块明显增大伴有波动感,体质量较同周龄鼠下降(10 ± 2)%。8 周后裸大鼠摄食、活动减少。

2.2 成瘤情况

A、B、C 组的出瘤率分别为:52.3%、63.4%和 100%,经 χ^2 检验显示:A 组与 C 组之间差异有统计学意义($P < 0.01$),而 A 组与 B 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果说明组织块比单细胞具有更好的成瘤性。

2.3 移植瘤的生长情况

C 组的移植瘤生长速度快于 A 组和 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。并且组织块形成的移植瘤大小均匀瘤体变异较小(图 1)。

2.4 裸大鼠皮下瘤病理学表现

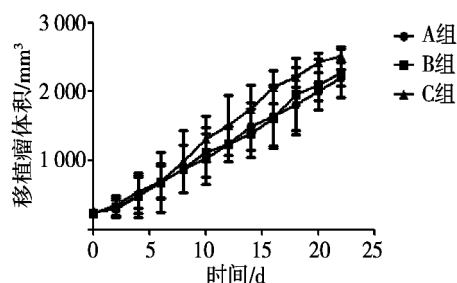


图 1 移植瘤生长曲线



2a 裸大鼠皮下移植瘤肉眼观

2b 移植瘤剥出后肿瘤表面光滑, 包膜完整, 质地中等

2c 裸大鼠皮下移植瘤移剖面观

2d 裸大鼠皮下移植瘤病理观察 (HE × 100)

图 2 移植瘤大体和组织病理观察

移植瘤细胞周期的变化见图 3。系碘化丙啶染色流式细胞仪分析的细胞周期结果,与初次培养细胞成瘤组比较二次悬浮细胞成瘤组和二次组织块成瘤组的细胞主要分布在 S 和 G2/M 期。图 3 显示它们的细胞增殖指数分别为: $(32.31 \pm 8.72)\%$ 、 $(47.68 \pm 4.72)\%$ 和 $(48.61 \pm 5.06)\%$,统计学分析显

2.4.1 肉眼观 14 d 时皮下肿瘤直径 10 ~ 12 mm, 外观呈分叶状, 色淡红, 与宿主组织界限清晰。肿瘤表面光滑, 包膜完整, 质地中等。21 d 后肿瘤进行性增大, 剖面组织色灰白, 似干酪样改变。

2.4.2 镜下观 肿瘤细胞排列紊乱, 细胞核异形明显, 核质比例增大, 染色质深且粗, 核大深染, 异常核分裂相易见(图 2)。

2.5 移植瘤细胞周期的变化

示初次培养细胞成瘤组的增殖指数与二次悬浮细胞成瘤组和二次组织块成瘤组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), 而二次悬浮细胞成瘤组与二次组织块成瘤组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。细胞周期分析的结果表明了移植瘤内的细胞增殖快于培养基中培养的细胞, 提示肿瘤细胞分裂活跃。

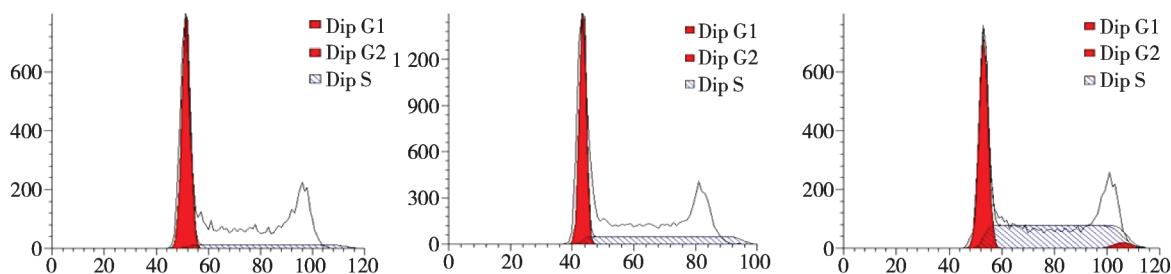


图 3 移植瘤细胞周期变化

3 讨论

目前国内学者研究人类肺癌的基础研究多选用裸小鼠, 但裸小鼠是一种缺乏胸腺、有免疫缺陷的啮齿类动物^[7-8]。为了弥补裸小鼠模型因个体小而不宜评价涉及血管等介入操作的药物评价缺陷, 我们选择与裸小鼠有类似免疫缺陷的裸大鼠来建立肺癌移植瘤模型。1977 年英国 MRC 实验动物中心建立了裸大鼠种群, 上海中山医院肝癌研究所早在 1983 年就引进该鼠种进行肝脏肿瘤的研究, 此后国内又有裸大鼠肠道肿瘤研究的报道。但由于裸大鼠较难饲养且研究成本较高^[9-10], 国内对其关注较少, 有关裸大鼠人肺癌 A549 细胞株的皮下瘤的研

究鲜见报道。

本研究采用人肺癌细胞株 A549, 选用裸大鼠作为研究对象, 将肺癌细胞株移植于裸大鼠皮下, 观察其成瘤率, 以便为肺癌介入治疗方面的基础实验研究提供理想的动物移植性肺癌模型, 这样可使一群动物同时接种同样量的瘤细胞或组织, 生长速率比较一致, 个体差异较小, 接种成活率高, 实验条件易于控制, 周期较短, 易于客观判断疗效^[11]。我们发现 8 ~ 10 周龄裸大鼠体积较大, 对颈外动脉解剖, 没有显微镜辅助, 也能插管操作, 为进一步血管介入治疗的动物实验研究提供了方便^[12]。

本研究发现, 荷瘤裸大鼠皮下移植瘤生长 2 周时行组织块成瘤法裸大鼠皮下移植, 成瘤率可达

100%。这与此时皮下肿瘤细胞生长活跃有关,形成的肿瘤组织不仅在形态上而且在生物学行为上更适宜移植^[13]。选取瘤块时应以近包膜的肿瘤组织为宜,避免选用肿瘤中央活性差的组织。因为恶性肿瘤生长较快,肿瘤中央组织常伴出血、坏死、纤维化或液化,而包膜处的瘤组织多含增殖活跃的肿瘤细胞。在对以裸大鼠为载体的肺癌移植瘤模型的研究过程中,我们总结了裸大鼠相对于裸小鼠作为动物肿瘤模型的优点:① 1 只接近性成熟期的裸大鼠体重是裸小鼠体质量的 3~4 倍,成年后体质量可相差 10~12 倍。因此在解剖、暴露动物内脏和血管介入等手术操作时体积大的裸大鼠比体积小的裸小鼠有优势;② 移植性肺癌模型肿瘤生长快,成功率高,为需大量肿瘤组织的基础研究提供了便利;③ 1 只裸大鼠可获得 6~10 ml 血液^[14],通过股动脉采血也可获得 1~2 ml 血液,且不影响生存;而 1 只裸小鼠只能获得 1~2 ml 血液。因此,应用裸大鼠人癌模型可同时检测生化免疫指标并观察各种指标的动态变化。

目前裸大鼠移植瘤模型多采用原位移植和皮下接种 2 种途径^[15],但行裸大鼠原位移植难度大、不易成功且营养血管较细,无法完成血管插管介入治疗。而皮下接种操作简单,创伤小,肿瘤表浅易于观察,所以我们选择皮下接种的方法,但很多肿瘤的异种移植成功率低,往往阻碍了后继实验的进行^[16]。本研究采用的 3 种方法成瘤率分别是 52.3%、63.4%和 100%。C 组接种成功率达 100%,该方法较简单、经济,直视下接种部位准确,种植 2~3 周,肿瘤体积可利于血管介入评价的实施。模型制作^[9,17-18]时应注意以下几点:① 接种部位选择裸大鼠耳后皮下,因该部位肿瘤生长速度快,不影响大鼠日常活动,且有利于目测肿瘤生长速度;② 行组织病理检查时取肿瘤鱼肉样组织,剥离后尽可能冲洗干净血液、将坏死组织及纤维组织剔除干净;③ 组织块不可过大或过小,进针深度要保证接种于皮下,而不是皮内或者肌肉组织内;④ 注意无菌操作,避免感染所致接种失败。实验结果证明二次组织块成瘤率高达 100%,显著提高了肺癌 A549 裸大鼠移植瘤的成功率,考虑与肿瘤组织块中稳态微环境分泌的细胞和生长因子保护并支持着肿瘤的发生、发展有关^[19]。C 组中肿瘤组织块中稳态微环境的形成可能是其具有较好的成瘤性和增殖能力的主要原因。

肺癌的介入治疗是目前治疗不可切除性肺癌的有效方法之一,它能直接进入靶血管提高局部抗

肿瘤药物的浓度,明显提高抗肿瘤药物的疗效^[20]。在这样理想和标准的应用裸大鼠肺癌动物模型上尝试各种介入治疗方案并相互比较疗效是非常有益的。本实验结果表明 A549 细胞株能在裸大鼠皮下建立可靠的肺癌移植瘤的模型,由于裸大鼠体型、器官、血管等都较裸小鼠大,更适用于人类肿瘤介入治疗的实验研究,具有操作简便安全、可血管介入插管操作的特点,为后续进行的肺癌模型的介入治疗提供了很好的实验模型基础。

[参考文献]

- [1] Jz D, Jy P, Prevalence WZ, et al. Treatment, and prognosis of intestinal metastasis of primary lung cancer: a comprehensive review[J]. Surg Oncol, 2014, 23: 72 - 80.
- [2] Liu Y, Chen LP. The regulation of cell polarity in the progression of lung cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2013, 9: S80 - 85.
- [3] 吴一龙. 非小细胞肺癌国际分期的修订和现代治疗策略[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1998, 25: 353 - 356.
- [4] 解亦斌, 王 铮, 韩志凯, 等. 裸鼠胰腺癌肝转移模型脂质体阿霉素介入化疗实验观察 [J]. 中华医学杂志, 2010, 90: 2126 - 2129.
- [5] 马春华, 郭 志. 重组人血管内皮抑制素注射液联合冷冻消融治疗肺腺癌 A549 移植瘤的实验研究 [J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 241 - 244.
- [6] Zhang JY, Tao LY, Liang YJ, et al. Secalonic acid D induced leukemia cell apoptosis and cell cycle arrest of G (1) with involvement of GSK-3 β /catenin/c-Myc pathway[J]. Cell Cycle, 2009, 8: 2444 - 2450.
- [7] 张春辉, 孙 平. 苣蓿素联合紫杉醇抑制肺癌 A549 细胞的增殖和荷瘤裸鼠肿瘤的生长研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34: 7 - 9.
- [8] 王春燕, 郑 辉. 紫杉醇脂质微球注射液对荷人肺癌 H460 裸鼠的抑瘤作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26: 49 - 51.
- [9] Soundararajan A, Dodd GD 3rd, Bao A, et al. Chemoradiation-clide therapy with 186Re - labeled liposomal doxorubicin in combination with radiofrequency ablation for effective treatment of head and neck cancer in a nude rat tumor xenograft model[J]. Radiology, 2011, 261: 813 - 823.
- [10] Jin H, Lou W, Sang J. Inhibitory effect of NF-kappaB p65siRNA on human laryngeal carcinoma xenograft model in nude mice[J]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2013, 27: 836 - 838.
- [11] Wu YJ, Muldoon LL, Gahramanov S, et al. Targeting α V - integrins decreased metastasis and increased survival in a nude rat breast cancer brain metastasis model [J]. J Neurooncol, 2012, 110: 27 - 36.
- [12] 许卫国, 杨建勇, 李鹤平, 等. 建立大鼠肝动脉插管途径的方法学研究[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 264 - 265.
- [13] Jia X, Yan B, Zhang Y, et al. Establishment of an intrahepatic

- xenograft tumor model in nude mice and its detection by in vivo fluorescence imaging system[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2013, 29: 426 - 429.
- [14] 马曾辰, 汤钊猷, 薛 琼, 等. 两株裸大鼠人肝癌模型的建立和生物学特性的观察[J]. 肿瘤, 1986, 6: 161 - 162, 2.
- [15] Tai JH, Tessier J, Ryan AJ, et al. Assessment of acute antivascular effects of vandetanib with High-Resolution dynamic Contrast-Enhanced computed tomographic imaging in a human colon tumor xenograft model in the nude rat [J]. Neoplasia, 2010, 12: 697 - 707.
- [16] 王树滨, 齐 静, 刘桂英, 等. 多药耐药细胞系 K562/A02 裸小鼠皮下移植瘤模型的建立与鉴定[J]. 中国肿瘤临床, 2006: 721 - 724.
- [17] Xiaofei, Jia Bo, Yan Yijie, et al. Regulation of estrogen receptors alpha and beta in human breast carcinoma by exogenous leptin in nude mouse xenograft model. Chinese journal of cellular and molecular immunology [J]. 2013, 29 (4): 426 - 429.
- [18] Hossain MA, Kim DH, Jang JY, et al. Aspirin induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model [J]. Int J Oncol, 2012, 40: 1298 - 1304.
- [19] 蒋建国, 胡国华. 肿瘤微环境在肿瘤淋巴转移中的作用研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39: 1141 - 1144.
- [20] Yan D, Zhou CW, Liu DZ, et al. Evaluation of the efficacy of bronchial arterial infusion chemotherapy for the treatment of central non-small cell lung cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2011, 33: 302 - 304.

(收稿日期:2014-07-09)

(本文编辑:李 欣)