



人胃癌裸鼠转移模型的建立及鉴定

发布时间: 2018-09-10 11:31:13 分享到:

摘要: 小鼠人胃癌转移模型是研究人胃癌转移生物学机制的重要工具之一。在本文中,我们建立了裸鼠人胃癌转移小鼠模型,该模型比现有模型具有更高的肿瘤形成和转移率。

方法: 为了建立人胃癌转移小鼠模型,将胃癌手术患者的新鲜肿瘤组织皮下移植到裸鼠的左右侧腋窝。当植入组织生长至1立方厘米时,将小鼠处死,并对肿瘤组织进行检查和切除。将肿瘤组织移植到裸鼠体内,进行细胞角蛋白8/18 (CK8/18)、E-钙粘蛋白、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)和细胞间粘附分子-1 (ICAM-1)的病理检查、免疫组化染色和实时PCR检测。通过组织病理学检查分析小鼠腹膜、腹腔和内脏器官的转移。

结果: 经10代移植后,所有小鼠在移植部位均发生肿瘤生长,94%的小鼠发生腹膜后和内脏转移。移植瘤和转移瘤在各代均保持相同的组织学特征,在食管、胃、脾、肝、肾、肾上腺、肠和胰腺均有转移。这些转移性肿瘤没有检测到CK8 / 18、E-钙粘蛋白、VCAM-1和ICAM-1的表达。

结论: 该模型将了解人类胃癌的转移过程提供有价值的工具。

关键词: 表征 胃癌 转移 小鼠模型

背景: 胃癌是世界上最常见的第四种恶性肿瘤,也是仅次于肺癌的第二大癌症死亡原因。虽然目前诊断和治疗方法已明显延长了早期胃癌患者的预后,但各期胃癌患者确诊后5年生存率均<50%。转移是胃癌的高死亡率的部分原因。死于腹膜转移的胃癌患者比例约为50%。因此,转移已成为许多胃癌研究的热点。转移是一个非常复杂的过程,涉及多个连续的步骤。与细胞粘附、运动、增殖、存活、代谢和信号转导相关的基因在肿瘤转移中起着重要作用。这些蛋白质如何共同作用以促进转移仍然知之甚少。迄今为止报道的转移性人胃癌的小鼠模型具有多重挑战,裸鼠原位移植需要手术,移植的肿瘤组织来源于人胃癌细胞系而不是患者。其结果是,手术过程冗长,可能导致小鼠大量出血和死亡。此外,虽然原位肿瘤形成率接近80~100%,但转移率不高,肝肿瘤转移率为45~60%,腹膜转移率仅为40%。因此,这些小鼠模型的建立可以从改进的方法中获益,这将使移植更容易,并导致更强大的转移。在这份报告中,我们描述了一个转移性人胃癌的小鼠模型,该模型解决了以前小鼠模型中的问题。我们通过皮下移植直接来源于胃癌患者的肿瘤组织来建立转移性胃癌的小鼠模型。与先前描述的其他小鼠模型相比,该小鼠模型以较高的速率形成肿瘤,并且更重要的是,显示出稳健的转移。

方法: BALB/C裸鼠4~6周龄,雌雄体重16~18g,新鲜肿瘤组织切除后立即植入。新鲜肿瘤组织皮下植入裸鼠的实验研究:将胃癌患者切除的新鲜肿瘤组织切成1立方毫米,用DMEM稀释液稀释,无菌条件下用16G针皮下植入裸鼠的左右腋窝和腹股沟。每个样品植入四只小鼠,每只小鼠5~6片(0.8毫升)。一旦裸鼠身上的肿瘤生长到1立方厘米,小鼠就被颈椎脱臼杀死,在无菌条件下检查和切除肿瘤组织。将每只小鼠的肿瘤组织分成三部分,一部分用于另一轮裸鼠移植瘤,另一部分固定在10%甲醛中进行病理学检查和免疫组织化学(IHC)染色,分别检测CK8/18、E-钙粘蛋白、VCAM-1和ICAM-1,第三部分存储在液氮-80°C中,进行实时PCR分析CK8/18、E-钙粘蛋白、VCAM-1和ICAM-1。解剖并检查小鼠的腹膜、腹腔、肝脏、脾脏、胃、肠、肾脏、肺和脑内的肿瘤转移。收集的组织用10%甲醛固定,进行病理检查。

转移性胃癌小鼠模型的建立与鉴定: 在无菌条件下,将切除的肿瘤组织以每只小鼠5-6片(0.8mL)皮下移植到5只裸鼠的左右侧腋窝。如上所述,对肿瘤组织的切割和稀释、对裸鼠肿瘤的生长进行检查和切除、植入的肿瘤组织、转移肿瘤组织进行检查处理。

种植部位对转移率的影响: 如上所述,在无菌条件下,将裸鼠移植的人胃癌组织皮下移植到三组不同部位的裸鼠皮下。平均每只小鼠植入5-6片,其中一组右侧和左侧腋窝接受组织,另一组右侧和左侧腋窝接受组织,第三组背部两个部位接受组织。如上所述,在裸鼠中进行肿瘤的生长检查和切除。进一步分析包括:不同部位肿瘤生长的检测、腹膜和腹腔转移。

人胃癌组织中冻存和传代的裸鼠移植与转移: 将从第四代和第八代传代移植到裸鼠体内的人胃癌组织,保存在液氮中,并如上所述,皮下移植到裸鼠右侧和左侧腋窝。进一步分析包括不同部位的肿瘤生长和腹膜和腹腔转移。

裸鼠移植和转移胃癌组织的病理学观察: 用10%甲醛固定、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色(HE)观察人胃癌裸鼠移植和转移的情况。

免疫组化染色: 采用免疫组织化学方法检测裸鼠移植瘤和转移瘤组织中E-钙粘蛋白、VCAM-1、ICAM-1和CK8/18的表达水平。用于染色的切片取自手术标本、植入和转移肿瘤组织以及含有转移肿瘤的组织。用于染色的试剂有SP-9000组氨酸加试剂盒、3-3'-二氨基联苯胺四氯化物(DAB)试剂盒、抗E-钙粘蛋白的原代小鼠单克隆抗体(1:200稀释)、ICAM-1(1:500稀释)和抗VCAM-1的原代多克隆抗体(1:500稀释)。IHC染色切片由两名病理学家独立评估,决定结果的任何差异均通过协商一致解决。染色强度被评定为阴性、弱、中度或强。

总RNA提取与实时PCR: 用Trizol从裸鼠体内生长的移植和转移肿瘤组织和用于移植的外科标本中提取总RNA。通过逆转录酶合成cDNA。SyBR预混液探针用于实时PCR。20μL反应物中含有10μL的SyBR预混液Ex TaqTM、1μL DNA模板、0.4μL各引物和8.2μL灭菌水。PCR循环条件为:37°C 5 min,

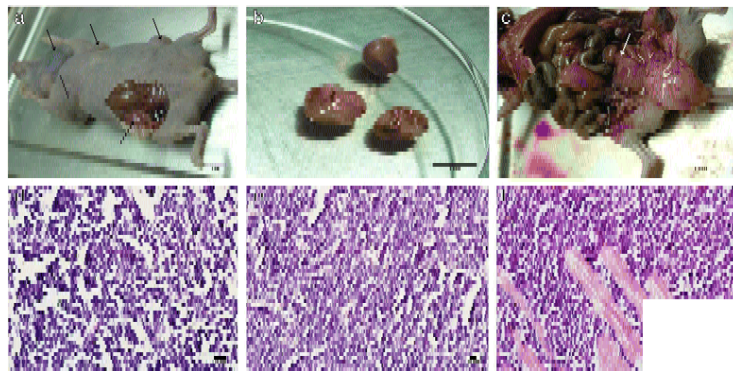
结论：肿瘤形成与转移：在第一个手术标本植入的四只小鼠中，76天时只有一个在植入部位发生肿瘤。二十五天后，小鼠颈椎脱臼并对肿瘤进行分析。肿瘤组织平均大小为1立方厘米，显示完整的包膜和坚硬的纹理。经目视检查发现腹膜后转移。腹膜、腹腔、肝、脾、胃、肠、肾、肺、脑无转移。病理分析显示移植瘤和转移瘤组织由低分化癌细胞组成，只有少量间质和血管。在涉及将肿瘤组织植入4只小鼠中的平行研究中，获得了类似的结果；在植入后26天，只有一只小鼠发生肿瘤。腹膜、腹腔、肝、脾、胃、肠、肾、肺、脑未见转移。植入第二和第四手术标本的其他小鼠没有肿瘤生长。

植入肿瘤经多代传代后的稳定性：第一例手术标本的肿瘤传代十代。肿瘤的生长率为100%，腹膜后和内脏转移率为80~100%（平均94%），不论原发组织是否新鲜或冷冻。在食管周围淋巴结，胃粘膜下，浆膜胃，脾，肝门区，中央静脉和肝窦，肝实质，肝胶囊，肾门，肾实质，肾上腺，肠浆膜，胰腺和输精管发现转移。

不同部位肿瘤的转移率：不同部位种植对肿瘤转移率的影响，而不是肿瘤生长率。腹股沟内种植导致94%的腹膜后和内脏转移，背部种植导致30%的腹膜后转移和10%的内脏转移。腋窝植入术后无腹膜后转移和20%脏器转移。发生时间为：腹股沟肿瘤植入16天，背部肿瘤植入20天，腋窝肿瘤植入14天。转移脏器包括肝脏（50%）、肾脏（44%）、肠（28%）、食管（12%）、胰腺（12%）、胃（6%）、脾脏（6%）和输精管（6%）。

移植和转移肿瘤的特征：IHC和实时PCR结果显示，ICAM-1、VCAM-1和CK8/18在原发性和第一代植入性肿瘤中主要表达，而E-钙粘蛋白不表达。原发性和第一代肿瘤对VCAM-1和CK8/18呈阳性染色，但随后几代对这些蛋白呈弱染色：VCAM-1染色在第一代中表现为中度阳性（++），弱信号（+），CK8/18染色为第一代弱信号（+）。各期肿瘤E-钙粘蛋白染色均为阴性，而各代转移瘤E-钙粘蛋白、ICAM-1、VCAM-1和CK8/18染色均为阴性。

结论：肿瘤转移是一个复杂的多阶段过程。虽然许多基因和因子与肿瘤转移有关，但其确切的分子机制仍不清楚。在本研究中，我们建立了具有强转移表型的转移性人胃癌小鼠模型，这将有助于理解这一过程的分子机制。



来源：BMC Cancer December 2016,

联系我们 | 人才招聘

© 版权所有 中国实验动物学会 京ICP备14047746号 京公网安备11010502026480

地址：北京市朝阳区潘家园南里5号（100021） 电话：010-67776816 传真：010-67781534 E-mail: calas@cast.org.cn

技术支持：山东瘦课网教育科技股份有限公司

| 站长统计

