

小鼠颌下腺纤维肉瘤肺转移模型的建立及其生物学特性

葛淑芬 孙爱静 关晓峰

摘要 目的: 建立小鼠颌下腺纤维肉瘤肺转移模型, 并观察其生物学特性。方法: 应用诱发的小鼠颌下腺纤维肉瘤传代细胞, 分别以 $2 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ 及 $1 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ 单细胞悬液经尾静脉接种给 BALB/C 小鼠和 BALB/C nu/nu 裸鼠。结果: 接种后 4 周 BALB/C 小鼠肺内可见散在、较均匀分布的转移瘤结节, 位于肺表面及其实质内, 数目多, 呈粟粒状, 转移率达 100%。BALB/C nu/nu 裸鼠转移灶出现距接种时间稍长, 数目较少, 大小不等, 转移率为 50%。结论: 本研究建立的纤维肉瘤肺转移模型方法简洁, 重复性好, 成功率高。为研究肺转移的机理和防治提供了一种良好的实验动物模型。

关键词 实验性肺转移 纤维肉瘤 动物模型

转移是恶性肿瘤的特征之一。研究肿瘤转移的发生发展过程及其机制和生物学行为对探讨肿瘤转移的防治有重要意义。而动物模型则是进行上述研究不可缺少的手段和工具。本实验利用遗传背景大致相同的鼠的诱发纤维肉瘤细胞株, 通过尾静脉接种建立小鼠的肺转移模型, 为肿瘤药物筛选及其转移防治提供了良好的研究模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/C 小鼠 10 只, 鼠龄 10 周, 雄性; BALB/C nu/nu 裸鼠 10 只, 鼠龄 33 周, 雄性; 均在 SPF 环境中饲养。

1.2 纤维肉瘤传代细胞

利用 20-甲基胆蒽在 dd 系小鼠颌下腺诱发纤维肉瘤¹, 将其分离培养, 传代而得。

1.3 实验方法

取分离培养的纤维肉瘤细胞(第 75 代), 制成单细胞悬液。以 $2 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ 细胞数经尾静脉接种给 BALB/C 小鼠; 以 $1 \times 10^6/0.2 \text{ ml}$ 细胞数同法接种给 BALB/C nu/nu 裸鼠。分别在接种后第 4 周和第 5 周处死动物, 行 15% 黑墨汁磷酸缓冲液支气管内灌注, 取出的肺组织用 Fekete's 液漂白, 以使分散的肺转移结节在肺表面呈白色, 便于观察和发现很小的转移灶^{2,3}。

2 结果

2.1 肉眼观察

两种小鼠在瘤细胞接种后 3 周起逐渐食欲减

退、消瘦、体重下降, BALB/C 小鼠鼠毛失去光泽, 至第 4 周逐渐出现恶液质, 第 5 周时个别鼠开始死于肺转移, 第 7 周时全部死亡。相比之下 BALB/C nu/nu 裸鼠全身变化轻, 且出现较晚。

从接种瘤细胞第 4 周开始逐步处死动物。取肺脏标本, 见有的 BALB/C 小鼠的肺转移瘤侵袭胸壁, 甚者侵及气管, 经 Fekete's 液处理后的肺转移瘤清楚可见, 满肺均匀分布的致密的似粟粒样瘤结节, 界限清, 无明显包膜, 肺转移率(包括死亡尸检)达 100%; BALB/C nu/nu 裸鼠转移瘤结节在接种后 5~6 周才出现, 且转移灶少, 大小不等, 转移率为 50%。

2.2 光镜观察

BALB/C 小鼠: 低倍镜下可见肺组织内及胸膜下有多个大小不等的瘤结节, 界限清楚而无包膜, 瘤结节多位于肺小血管周围, 细胞浸润血管壁, 使血管管腔变窄, 甚至闭塞。部分血管腔内亦可见瘤细胞浸润, 形成瘤栓(图 1)。高倍镜下见瘤细胞梭形, 分化较低, 大小不等, 核大, 形态不规则, 核仁明显, 数目多, 可见多数核分裂象(图 2)。

BALB/C nu/nu 裸鼠: 瘤结节较大, 界限不清, 呈弥漫性生长, 瘤组织中心可见坏死; 瘤组织内可见多个小血管, 血管内有瘤细胞浸润, 部分血管壁

消失。瘤细胞呈梭形,大小不等,核大,分裂象多(图3)。细胞形态排列呈网状,胞浆内有空泡形成,在支气管周围表现明显。

2.3 电子显微镜观察

透射电镜下见两种鼠的肺转移瘤形态结构基本类同。肿瘤细胞由圆形、椭圆形、长梭形细胞构成,形态不规则,细胞核大,多核,常偏在,核膜凹凸不平呈锯齿状。胞核内常染色质突出,少量异染色质趋边,线粒体可见空泡变性,粗面内质网较发达,间质胶原纤维少,细胞间未见桥粒连接。

3 讨 论

利用小鼠和裸鼠来研究肿瘤转移的生物学行为及其防治措施,越来越引起国内外学者的兴趣。纤维肉瘤在口腔颌面部肉瘤中最为常见,易发生血行转移,而最易转移的器官是肺脏,预后不良。建立纤维肉瘤肺转移动物模型,研究该肿瘤转移的生物学机制,将具有重要意义。

鼠的自发瘤和诱发瘤复制肿瘤转移模型,其优点是:遗传背景相同;简便易行;可重复性强;接种的瘤细胞不用筛选;接种后转移灶形成时间短;瘤源容易获得,且较均匀一致。但是由于动物肿瘤生物学特性与人类肿瘤差异较大,从动物肿瘤实验研究中得出的结论并不一定完全适合于人类。而理想的方法是利用人类肿瘤细胞株接种到裸鼠身上以造成肺转移,建立人类肿瘤细胞肺转移模型。因为移植到裸鼠体内的人类肿瘤细胞保留了原有肿瘤的组织病理特征和肿瘤抗体的敏感性。但是建立上述模型有以下难点:肿瘤细胞株来源受限;接种到裸鼠体内的瘤细胞需要筛选转移性强的瘤细胞;实验周期长;接种同时往往需要附加条件,如选用幼鼠,放射线照射和使用ATS等免疫抑制剂;只能选用裸鼠为实验动物,其他小鼠不易成功。综上所述,应根据不同的研究目的选择不同的实验方法和实验动物。

肿瘤生长和转移取决于肿瘤细胞固有的生物学特性以及宿主因素的相互作用⁴。模拟鼠肺转

移模型成功率受诸多因素的影响,如鼠龄、性别、品系、遗传背景、转移瘤的接种部位、转移瘤自身的恶性潜能、宿主体内的免疫状态、接种的瘤细胞数目等等⁵。裸鼠因无胸腺,T细胞缺乏,是肿瘤移植研究中最理想的实验动物。但因裸鼠需要一个无特殊病原体(SPF)环境,成本高。为了提高人类移植瘤在裸鼠体内的转移率,可改变宿主免疫状态,如选用3周龄幼鼠,放射线照射以及使用ATS等免疫抑制剂等等⁶。本实验选用诱发的小鼠颌下腺纤维肉瘤细胞株,经尾静脉接种到BALB/C小鼠和BALB/C nu/nu裸鼠,无需筛选瘤细胞,未加任何附加条件,分别获得高达100%和50%的转移率。由于本实验选用10周龄的BALB/C小鼠和33周龄的BALB/C nu/nu老年裸鼠,加之接种给裸鼠的细胞数 $1 \times 10^6/0.2\text{ml}$,而接种给小鼠的细胞数为 $2 \times 10^6/0.2\text{ml}$,故获得了普通小鼠高于裸鼠肺转移率的结果。

综上所述,瘤细胞接种数量及实验动物的鼠龄与转移率有直接关系;利用遗传背景大致相同的鼠的诱发肿瘤细胞株造成实验性肺转移,其成功率高,可同时供应大量生长均匀的肿瘤,是转移防治研究,尤其是抗转移药物筛选的理想实验动物模型。

(本文图见中心插页15)

4 参考文献

- 1 葛淑芬,盐田觉 20-三甲基胆蕙诱发小鼠颌下腺纤维肉瘤及其超微结构的研究 中国医科大学学报,1994,23:319
- 2 Wexler H. Accurate identification of experimental pulmonary metastasis J Natl Cancer Inst, 1966,36:641
- 3 Naomoto Y, Kondo H, Tanaka N, et al Novel experimental models of human cancer metastasis J Cancer Res Clin Oncol, 1987,113:544
- 4 Fidler IJ, Peib R, Baum M, et al The biology of cancer invasion and metastasis Adv Cancer Res, 1978,28:149
- 5 黄培根综述 裸小鼠移植瘤的转移研究 癌症,1990,9:333
- 6 关晓峰,邱蔚六,何荣根 涎腺腺样囊性癌肺转移裸鼠模型的建立 华西口腔医学杂志,1995,13:147

(1998-02-27 收稿)

Establishment of Lung Metastasis Model of Mice Submandibular Gland Fibrosarcoma and Its Biological Properties

Ge Sufen, Guan Xiaofeng

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Hospital, China Medical University

Sun Aijing

Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University

Abstract

Objective: To explore prevention and treatment approaches against metastasis of tumor. **Methods:** Mice submandibular gland fibrosarcoma were induced with 20m ethylcholanthrene $2 \times 10^6/0.2ml$ and $1 \times 10^6/0.2ml$ cell suspension were injected intraveneously into BALB/C mice (10 weeks after birth) and BALB/C nu/nu nude mice (33 weeks after birth) respectively. **Results:** Scattered and uniform distribution of metastasis nodes were on the surface and parenchyma of BALB/C mice lungs. The metastatic rate was 100%. Compared with BALB/C mice, the metastatic nodes showed late appearance, less heterogenesis. The metastatic rate was 50%. **Conclusion:** The character of simple establishment procedure, favorable reproducibility and high rate of success shows that the model is a favorable research model of tumor metastasis prevention and treatment.

Key words: fibrosarcoma lung metastasis animal model

第一鳃裂囊肿鳃裂瘻 14 例

苏文泰 王海龙 牛玉英

第一鳃裂囊肿和鳃裂瘻是颌面部先天性胚胎发育畸形。鳃裂囊肿和鳃裂瘻易继发感染,如治疗不当,还可造成面神经损伤等严重并发症。现将我科诊治经病理检查证实为第一鳃裂囊肿和瘻的 14 例报告如下。

1 临床资料

第一鳃裂囊肿 5 例,鳃裂瘻 9 例,男性 8 例,女性 6 例,出生即见瘻 3 例,其余病例分别发现在 2~36 岁。主要症状是在胸锁乳突肌前缘,舌骨平面以上至外耳道区域出现囊肿和瘻。囊肿位于下颌角 3 例,位于腮腺筋膜内 1 例,腮腺峡部外 1 例。囊肿除 1 例呈哑铃状外均为圆形或椭圆形且呈单囊,囊肿表面光滑,界限清楚,有囊性感,内容物为豆渣样物,其中 2 例合并有胆固醇结晶及脓液。3 例单纯性囊肿均与茎突、外耳道关系密切。2 例囊肿合并瘻管,内瘻口在外耳道。5 例术中可见囊肿与腮腺及面神经关系密切。1 例在腮腺筋膜外越过面神经下行支深面,其余 4 例进入腮腺实质内,越过面神经总干浅面或深面。

9 例鳃裂瘻中,外瘻口在下颌角附近 8 例,耳垂下方 1 例,外耳道可见豆渣样物溢出 7 例,外耳道皮下染色 2 例,可见这 9 例第一鳃裂瘻内瘻口均在外耳道软骨。5 例瘻管通过腮腺及面神经总干浅面;2 例通过面神经总干深面;2 例瘻管合并囊肿,囊肿紧贴面神经。

第一鳃裂囊肿和瘻的发生部位在胸锁乳突肌前缘、外耳道至舌骨平面的范围内。途经腮腺筋膜或腮腺实质;通过面神经总干浅面或深面,紧贴外耳道;外耳道是内瘻口。第一鳃裂终极部在下颌角下方,后来此处发生退化阻塞,外耳道就成其末端开口,所以第一鳃裂囊肿和瘻好发于下颌角附近至外耳道这个区域,并与外耳道关系密切。面神经是由第二鳃弓胚胎发育而形成。第二鳃弓胚胎发育迅速,由颈部向上覆盖第一鳃弓区域,所以第一鳃裂囊肿和瘻也与面神经关系密切。

第一鳃裂囊肿和瘻的囊壁的管壁衬以复层鳞状上皮。纤维性囊壁内含大量的淋巴样组织形成淋巴滤泡,淋巴窦,囊内含有毛囊、汗腺、皮脂腺等皮肤附件,故内容物为皮脂样物。由此可与第二、三、四鳃裂囊肿区别。

鳃裂囊肿和瘻根据病史、部位、临床表现、穿刺 B 超、碘油造影等检查较易作出诊断。第一鳃裂囊肿应与腮腺腺淋巴瘤、表皮样囊肿、皮样囊肿等鉴别。第一鳃裂瘻应与淋巴结核瘻、皮脂腺囊肿瘻、甲状舌骨瘻等鉴别,也应与第二鳃裂瘻鉴别。目前认为,第一鳃裂囊肿和瘻采用手术彻底切除是最佳治疗方案。手术中应注意与面神经及腮腺组织的解剖关系,有的病例必要时可作面神经解剖、腮腺部份摘除术,以保护面神经。

(1998-05-28 收稿)

2 讨 论