

[文章编号] 1000-1182(2007)01-0012-03

人成釉细胞瘤裸鼠皮下移植瘤模型的建立

张磊涛, 黄洪章, 曾东林, 张彬

(中山大学附属第二医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 建立人成釉细胞瘤的裸鼠皮下移植瘤模型。方法 采用组织块直接贴壁法将新鲜成釉细胞瘤组织进行原代细胞培养,反复贴壁法和胰酶消化法使之纯化。然后将纯化的成釉细胞瘤细胞接种于裸鼠颈背部皮下。观察接种成瘤后瘤组织大体生长情况以及常规病理切片观察瘤细胞的侵袭生长情况。结果 成釉细胞瘤细胞可以在裸鼠皮下存活,接种后第23天见有移植瘤形成,成瘤率为25%。病理切片显示瘤细胞可向裸鼠肌间生长,保持了其侵袭性生长的特性。结论 初步建立了人成釉细胞瘤的裸鼠皮下移植瘤模型,为进一步研究成釉细胞瘤的侵袭生长特性奠定了基础。

[关键词] 成釉细胞瘤; 裸鼠; 移植瘤模型

[中图分类号] R739.81 **[文献标识码]** A

Establishment of Subcutaneous Xenotransplanted Tumor Model of Human Ameloblastoma in Nude Mice
ZHANG Lei-tao, HUANG Hong-zhang, ZENG Dong-lin, ZHANG Bin. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective To establish an subcutaneous xenotransplanted tumor model of human ameloblastoma in nude mice. Methods Ameloblastoma cells were absorbed by primary culture, repeat attachment and pancreas proteolytic enzyme were both used to purify them. Then, the purified cells were implanted subcutaneously into the nude mice. The specimens were respectively investigated by microscope in different spots after implanting. Results Ameloblastoma cells can survive in all of the 8 nude mice. The xenograft can be found on 23 days after implanting. The rate of successful inoculation is 25%. The subcutaneously xenotransplanted tumor cells can be found with microscope in the inter-muscle tissues of nude mice. Conclusion The subcutaneously xenotransplanted tumor model of human ameloblastoma in nude mice was successfully established and it may benefit to further studies on this tumor.

[Key words] ameloblastoma; nude mice; xenotransplanted tumor model

成釉细胞瘤(ameloblastoma, AM)是最常见的良性牙源性颌骨肿瘤,但具有局部侵袭性生长的特性,手术后易复发,多次手术可给患者带来严重的面部畸形和心理障碍。故对其侵袭性的研究一直是口腔颌面外科医师所关注的焦点之一。本实验将AM细胞接种于裸鼠颈背部皮下,通过对接种后不同时期的病理切片观察以了解AM的侵袭生长特点,从而初步建立AM的裸鼠皮下移植瘤侵袭模型,为深入研究AM的侵袭机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和纯化

成釉细胞瘤标本来源于中山大学光华口腔医院

口腔颌面外科1例32岁男性住院患者,术后病理证实为滤泡型AM。通过常规小组织块贴壁培养和胰酶消化法收集单细胞悬液进行原代培养。培养基为RPMI-1640(GIBCO公司,美国)培养液,含10%血清(Hyclone),培养皿用3 g/L胶原I(Roche)预包被。在5%CO₂, 37℃恒温恒湿培养箱中培养。联合应用反复贴壁法和胰酶消化法去除成纤维细胞以纯化AM细胞,常规胰酶消化传代。倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.2 实验动物

实验用8只BALB/c-nu/nu裸小鼠均由中山大学实验动物中心提供和饲养(许可证号:粤监证字2004A084),雌雄不限,鼠龄4-6周,体重18-23 g。饲养环境:SPF(specific-pathogen free)级。笼具、垫料、饮用水和食料均经灭菌处理,按标准方式给予。裸鼠自由活动及进食。

[收稿日期] 2006-10-11; [修回日期] 2006-12-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471896)

[作者简介] 张磊涛(1974-),男,河南人,博士研究生

[通讯作者] 黄洪章 T: 020 81332507

1.3 细胞接种

取3~4代已纯化的AM细胞以PBS液配置成细胞悬液进行接种。接种细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 每只裸鼠接种量为0.2 mL。接种前以碘伏消毒裸鼠皮肤, 以1 mL注射器抽取细胞悬液, 分别接种至8只裸鼠的颈、背部皮下。

1.4 观察指标

1.4.1 大体观察 观察移植瘤形态、体积、颜色及与周围组织的关系。

1.4.2 常规苏木精-伊红染色观察 10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色。

2 结果

2.1 原代培养和纯化的AM细胞

组织块贴壁培养24 h后, 可见有细胞爬出, 逐渐铺开成片状, 有的呈铺路石状排列(图1)。1周后有成簇的细长梭形纤维细胞出现。经过反复贴壁和胰酶消化传代, 成纤维细胞消失, 至第3~4代AM细胞可被纯化。细胞形态为多角形, 体积较大, 细胞突起相连接(图2)。

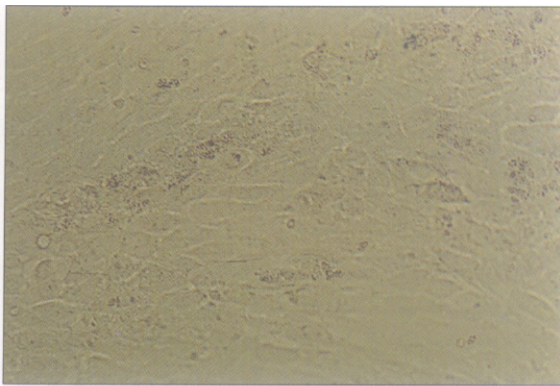


图1 AM细胞铺路石状排列 倒置相差显微镜 $\times 100$

Fig 1 Slabstone-shaped primary cultured cells of ameloblastoma inverted phase-contrast microscopy $\times 100$

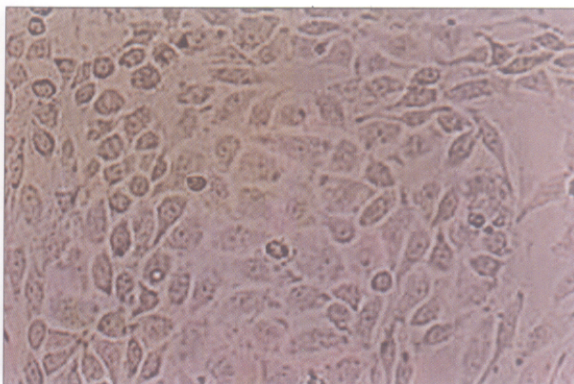


图2 纯化的AM细胞 倒置相差显微镜 $\times 100$

Fig 2 Purified AM cells inverted phase-contrast microscopy $\times 100$

2.2 移植瘤观察

接种后23 d, 8只接种裸鼠中有2只的颈侧及背

部皮下出现肉眼可见的移植瘤(移植瘤成功率25%), 将裸鼠处死取材分别进行下列观察。

2.2.1 大体观察 移植瘤大小约0.8 cm, 质地较结实, 皮肤表面无破溃, 色泽与皮肤颜色接近, 稍显红色(图3)。剖面观察见肿瘤粉红色, 中间有坏死液化, 有粘液状物, 可拉丝。

2.2.2 病理切片苏木精-伊红染色观察 瘤细胞体积较大, 为多边形, 形态单一, 核深染。瘤细胞排列成团片状或不规则状排列, 未见有典型的滤泡状结构。可见团片状瘤细胞向裸鼠肌间生长, 未见有瘤组织向皮肤方向侵袭生长(图4)。



图3 移植瘤大体观察

Fig 3 The subcutaneous xenograft

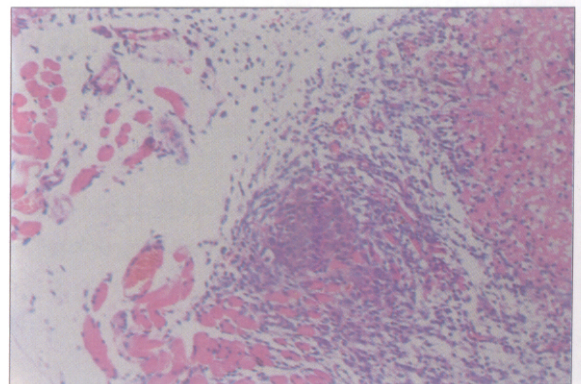


图4 移植瘤镜下观察 HE $\times 100$

Fig 4 The xenograft under microscopy HE $\times 100$

3 讨论

肿瘤侵袭是指瘤细胞侵犯和破坏周围正常组织, 也指瘤细胞在继发组织器官中定位生长。侵袭的主要过程有细胞的增殖和扩展, 细胞的分离和脱落, 细胞的定向运动和趋化, 血管形成与侵袭等。肿瘤的侵袭过程涉及多个步骤, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解是肿瘤侵袭性的标志, 故以模拟人体基底膜的基本成分, 含有胶原、层粘连蛋白等的Matrigel胶的Boyden小室及Transwell小室等常用来做肿瘤侵袭的体外模型^[1]。多种动物和人体组织被用来研究癌细胞的侵袭机制。

如人的胎盘、鼠的膀胱、鸡胚绒膜尿囊和牛的晶状体等^[2]。利用免疫缺陷动物如裸鼠等建立人类肿瘤侵袭的体内模型也比较常用^[3]。

成釉细胞瘤虽然是良性牙源性肿瘤，但其生物学行为与其他良性肿瘤的膨胀性生长不同，常见侵袭性生长。目前，对AM侵袭性的研究主要集中于AM自身的增殖活性及各种基因及蛋白的表达，尚缺少适宜的AM侵袭模型^[4-5]。本实验将AM细胞接种于裸鼠颈背部皮下，通过对接种后不同时期的病理切片观察以了解AM的侵袭生长特点。在接种后第23天见有AM移植瘤形成，病理切片可见瘤细胞向裸鼠肌肉间侵袭生长。提示，裸鼠皮下移植瘤可以作为AM侵袭研究的体内侵袭模型。

自1969年Rygaard在裸鼠体内成功进行人结肠癌移植以来，裸鼠人瘤模型已经成为研究肿瘤生物学特点和药物筛选不可缺少的工具之一。用裸鼠作为移植瘤实验有许多优点，如方法简单，无需对动物做特殊处理。相对于本课题组曾建立的裸鼠肾包膜下AM移植瘤模型来讲，裸鼠皮下移植瘤的操作简单，具有接种过程无需麻醉、操作时间仅半分钟、术中无出血等优点。这样就降低了手术难度和术后动物的死亡率，易于推广。据报道，裸鼠移植瘤成功率很高，本课题组曾以新鲜组织块接种裸鼠肾包膜下，移植成功率为100%。本研究中移植瘤成功率仅为25%，可能和接种细胞的浓度以及接种裸鼠数量过少和观察时间较短有关，有待在下一步的实验中改进。裸鼠移植瘤模型的优点还在于绝大多数的移植瘤组织能保持其原有的形态和生长特性^[6]，并且可以一直在裸鼠身上生长。本研究也发现AM移植瘤细胞向裸鼠肌间生长，很好的保持了AM的侵袭生长特性，可以作为其侵袭研究的模型之一。关于该移植瘤的生物学特性的研究，还需要进一步的诸如免疫组织化学检测等才能日臻完善。

以本次研究的体会而言，在初步建立人成釉细胞瘤的过程中还有2点需要注意：细胞浓度和量是决定移植成功的关键。本实验选择细胞浓度为

1×10^7 个/mL，移植率为25%，可考虑增加细胞的浓度以提高移植成功率。需要说明的是以提高接种的液体量来提高细胞量的方法是不可取的，笔者在实验中发现裸鼠的荷细胞悬液量以0.2 mL为宜，多则不利于裸鼠生长，鼠龄小其接种量应该减少为宜。

裸鼠宜选择4~6周或者更小，超过8周的最好放弃。因为裸鼠虽先天缺失胸腺，但仍有部分细胞具有免疫功能。鼠龄过大，免疫能力相应增强，移植成功率会下降。若要长时间观察可考虑附加放射线和使用免疫抑制剂。

【参考文献】

- [1] 曾益新. 肿瘤学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003 241-245.
(ZENG Yi-xin. Oncology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 241-245.)
- [2] 黄洪章, 唐海阔. 血管内皮生长因子C对舌鳞癌周淋巴管的促增殖作用[J]. 中华口腔医学杂志, 2005, 40(2): 126-128.
(HUANG Hong-zhang, TANG Hai-kuo. Interaction of vascular endothelial growth factor-C over-expression tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 with peri-carcinoma lymphatics[J]. Chin J Stomatol, 2005, 40(2): 126-128.)
- [3] 张彬, 黄洪章, 陶谦, 等. 人成釉细胞瘤裸鼠移植瘤的建立及其生物学特性研究[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2004, 2(4): 270-273.
(ZHANG Bin, HUANG Hong-zhang, TAO Qian, et al. Establishment and biological behavior of human ameloblastoma xenograft in nude mice[J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2004, 2(4): 270-273.)
- [4] Kumaamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of p63 and p73 in ameloblastoma[J]. J Oral Pathol Med, 2005, 34(2): 220-226.
- [5] Sandra F, Hendarmin L, Kulita T, et al. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: A possible role of ameloblastoma in expanding in the bone[J]. Oral Oncology, 2005, 41(6): 637-644.
- [6] 吴细丕, 钱林法. 实验动物与肿瘤研究[M]. 北京: 中国医药技术出版社, 2000: 197.
(WU Xi-pei, QIAN Lin-fa. Research animal and tumor research [M]. Beijing: China Medicine Press, 2000: 197.)

(本文编辑 汤亚玲)

本刊对一稿两投问题处理的声明

为维护本刊的声誉和广大读者的利益，现将本刊对一稿两投问题的处理声明如下：本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管两篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处，但这些文稿的主要数据和图表是相同的。请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。凡来稿在接到编辑部回执后满3个月未接到退稿，则表明稿件仍在处理中，作者欲投他刊，应事先与本刊编辑部联系并申述理由。编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时，将认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者，在做出决定之前请作者就此问题做出解释。一稿两投一经证实，将在本刊中刊出作者单位和姓名以及撤销该论文的通告；2年内将拒绝在本刊发表该作者的文稿；就此事件向作者所在单位通报。

《华西口腔医学杂志》编辑部