

胃癌动物模型构建的研究进展及多因素比较分析

李 艳 王东林

摘 要 目前胃癌动物模型的制作方法主要包括:诱导法、原位移植法、移植瘤法、免疫抑制法、转基因法等,这些制作方法各有利弊。本文从致癌因素、动物品系、制作方法、成瘤时间、成瘤率、以及适用范围等多因素角度,对胃癌模型的不同建模方法进行综述,比较和分析其优缺点,以期为不同需要的研究者提供有用的建模信息。

关键词 胃癌 动物模型 建模方法

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.003

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,患者就诊时多数已发生转移,根治术后5年生存率较低,且术后患者的生活质量受到明显影响^[1,2]。鉴于对胃癌的发生机制和治疗方法的进一步探索,需要建立相应的动物模型,用于胃癌相关的基础研究。目前胃癌模型的制作方法多采用诱导法、原位移植法、移植瘤法、免疫抑制法、转基因法等,这些制作方法各有利弊。本文从致癌因素、动物品系、制作方法、成瘤时间、成瘤率、以及适用范围等多因素角度,对胃癌模型的不同建模方法进行比较和分析,总结其利弊,以期为临床工作者和科研人员在动物模型的使用方面提供一些参考信息。

一、良好动物模型的标准

无论是何种肿瘤,其相应动物模型的构建均遵循一些共性的标准,主要包括:①操作简便,成本不高,生物学性质稳定,易于推广;②模型成瘤率高,能模拟临床肿瘤学行为,即原位肿瘤特异性发生、发展,并有局部浸润、远处转移;③适用于相关肿瘤的各种科学研究,并具有良好的重复性。

二、现有的造模方法及多因素比较

1. 诱导法:该法采用致癌剂建立胃癌模型。常用的诱导剂有N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)、化学酸(硝酸或盐酸)、乙醇、幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)等^[3-7]。上述诱导剂可单独或联合应用,属于化学、生物类致癌因素。Hp是各种

慢性胃病的重要病因,在Hp的长期刺激下,胃黏膜发生慢性炎症,继而导致胃壁上皮细胞受损,并逐渐突变为癌细胞,故采用Hp诱癌与临床胃癌发生的病因一致。研究显示,单独使用某一诱导剂成瘤率不高,联合应用可提高成瘤率,但动物病死率高^[3,5]。

最常用的3种诱导法(MNNG、化学酸、Hp)使用的动物品系有所不同。MNNG诱导多采用大鼠^[3,5,8]。Hp具有动物专一性,只能使用蒙古沙田鼠。不同研究者分别采用蒙古沙田鼠诱导的胃癌模型,成功率基本相似(35%~40%),明显高于其他鼠类,究其原因,认为可能是动物种系不同,器官的敏感度也不同。化学酸诱导胃癌模型使用大、小鼠均可^[4,6,7]。

诱导法采用喂食的途径进行。MNNG诱导通过长期喂食含MNNG饮用水,肿瘤诱发时间约需要7个月左右^[8-10],不同实验室报道的成瘤率各不相同,徐晶莹等^[8]采用MNNG诱发胃癌成瘤率为63.3%(19/30)。Hp诱导法采用口服Hp感染胃黏膜,肿瘤诱发周期也很长,约10个月左右,成瘤率为40%左右^[9,11]。化学酸多与其他诱导方法联合使用,可提高胃癌发生率,缩短诱癌周期^[4]。

诱导法的优缺点如下:操作简单,主要通过喂食途径;可用于胃癌发生、发展机制、治疗方面的实验研究;模拟了临床胃癌发病的过程,即从黏膜层浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌形成,浸润或突破浆膜层→淋巴或远处转移。但诱导法在诱导过程中常发生动物意外死亡,模型不够稳定,周期过长,不适于短期实验的应用。

2. 原位移植法:原位移植法即肿瘤细胞移植到与肿瘤原发部位相似的组织或脏器中^[12]。胃癌原位移植法即将瘤组织块移植入胃黏膜层或浆膜层中,移植

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172387);重庆市科委基金资助项目(CSTC2015jcyjB0614)

作者单位:400030 重庆市肿瘤研究所肿瘤内科

通讯作者:王东林,教授,博士生导师,电子信箱:xiaolianbei@sina.com

com

部位可为胃大弯或小弯,移植方法有缝挂法、医用胶粘贴法,成瘤周期多为 12 周左右。目前 SGC-7901 胃癌模型构建最成熟^[13, 14]。近年多采用粘贴法种植瘤块在胃大弯的浆膜层建立胃癌模型^[13, 15, 16]。

原位移植法的致癌因素(即移植材料)来源于细胞悬液或肿瘤组织块,属于生物类因素。研究表明用瘤组织块建立的肿瘤模型明显优于细胞悬液,表现在成瘤率和转移率高。Furukawa 等^[17]分别用瘤块和瘤细胞悬液构建裸鼠胃癌模型,发现前者的成瘤率为 100%,淋巴结转移率为 100%,远处转移率为 69.2%,而后者分别为 50%、6.7%、0。另外,采用瘤块进行原位移植,转移率也明显高于传统方法,Chen 等^[13]采用 OB 胶粘贴瘤组织块法建立胃癌模型,远处转移率均高于采用传统“胃囊法”、“皮下移植法”(87.5% vs 50%、0)。Li 等^[18]采用 SGC-7901 瘤块建立胃癌模型,成瘤率 100%,淋巴结转移率为 58%,肝转移率 78%,肾转移率 39%。原位移植法多使用裸小鼠做为荷瘤载体,周龄 5~8 周不等,与各实验室使用不同的胃癌细胞株有关^[15, 19-21]。原位移植法的优缺点:操作简便,可模拟临床胃癌患者的肿瘤生长转移;成瘤周期相对较短,适合短期研究。但是不能复制胃癌的病理组织学发展过程即黏膜层癌前病变→胃癌→浆膜层浸润→转移,原位移植法没有模拟癌前病变的阶段。

3. 移植瘤法:移植瘤法是通过注射胃癌细胞悬液或种植瘤块,形成肿瘤的过程,移植部位常选择皮下。其致癌因素(即移植材料)也来源于细胞悬液或肿瘤组织块,属于生物类因素。无论采用哪种移植材料,成瘤率较高,最高可达 100%,但罕有转移发生,主要是因为肿瘤纤维包膜限制了肿瘤的浸润、转移^[22, 23]。该法常使用裸鼠等免疫缺陷动物,周龄没有严格要求,一般 6~8 周均可。移植瘤法的操作过程极其简单,实验周期较短,常为 1~4 周。移植瘤法优缺点为:操作简单,易推广;动物品种选择较多;实验周期短。但不能模拟临床胃癌生物学行为,罕见转移发生,对研究结果的适用性有一定的局限。

4. 免疫抑制法:免疫抑制法主要是先用免疫抑制剂或射线⁶⁰Co 处理实验动物,然后再接种细胞悬液或肿瘤瘤块至动物皮下或肾包膜下,成瘤周期多为 1~4 周^[24, 25]。免疫抑制法的致癌因素为细胞悬液或肿瘤瘤块联合免疫抑制方法,属于物理、化学因素结合生物因素的范畴。常用的免疫抑制方法有射线⁶⁰Co、环磷酰胺(CTX)或阿糖胞苷。

该法可使用小鼠或 Wistar 大鼠^[24, 25]。王瑜等^[25]采用 CTX 腹腔注射免疫抑制小鼠后,将人胃体腺癌手术新鲜标本移植到肾包膜下,移植瘤的体积和微血管密度均高于正常免疫力小鼠(9.85 ± 3.61 vs 5.54 ± 2.17 , 3.72 ± 1.57 vs 1.73 ± 0.84 , $P < 0.05$);张昆和等^[24]用改良的 Steel 法建立胃癌模型,即先用阿糖胞苷腹部皮下注射,48h 后再行钴⁶⁰Co 全身照射,然后将人胃癌细胞株 BGC-823 接种到大鼠皮下,成瘤率为 87.5%。免疫抑制法的优点与移植瘤法基本相同,主要适用于短期的动物实验。但缺点较多,例如:操作麻烦;同移植瘤一样无法形成转移;随着动物免疫力的恢复会对肿瘤形成免疫排斥反应并致其消失。

5. 转基因法:转基因法是把来源于细胞和病毒中的癌基因和原癌基因植入大鼠的胚胎组织中,继而形成肿瘤的方法。转基因法建模的致癌因素主要是导入癌相关基因,属于分子生物学范畴。研究中已采用的基因有 INS-GAS、CEA/SV40 T、MTH1 knockout、TFF1 knockout、Smad4 +/ -, 其中成瘤率较高的为 CEA/SV40 T (100%)、Smad4 +/ - (100%)、INS-GAS (75%), MTH1 knockout 基因转导的成瘤率最低,仅有 3%。绝大多数基因的成瘤周期均较长,5~18 个月不等,仅 CEA/SV40 T 基因成瘤周期最短(50 天)。该法使用的实验动物主要为鼠类。转基因法形成的肿瘤形态学特征同人类自然发生的肿瘤具有相似性,并保持肿瘤的特异性。Koike 等转导 Ad12 E1A/E1B 基因制做胃癌模型,病理组织学发现 CD-1 小鼠胃黏膜的基底层不规则增厚,核分裂象增多,腺癌细胞浸润至肌层下。

转基因法制作模型的优缺点:①转基因法模型是所有模型中最理想的动物模型,但是胃癌的发生与多种癌基因或抑癌基因的缺陷有关,导入基因的选择缺乏特异性,常常需要多种基因共同导入实现。另有研究发现若只导入某种基因往往可诱导出多种肿瘤。Donehower 等研究发现 p53 基因敲除后大鼠中有 34.6% (9/26) 形成了多种肿瘤,76.9% (20/26) 形成了淋巴瘤,肉瘤也非常多见。由此可见寻找特异性的转导基因是建立胃癌动物模型的关键;②转基因法模型能否模拟临床肿瘤行为尚存在争议,Koike 等构建的胃癌转基因模型不但原位肿瘤发生、发展,而且有淋巴结及肺等远处转移,符合临床胃癌的生物学行为。而 Zhu 等研究发现转基因结肠癌模型仅转移至淋巴结,而不转移至肝;Guy 等发现转基因乳腺癌模

型发生高肺转移,但不转移至骨。后两者的研究结果均与临床肿瘤学行为有一定差异;③转基因法操作复杂,生物学技术要求高,费用昂贵,成瘤周期长,目前不易推广。

三、胃癌模型的发展方向

现阶段绝大多数胃癌模型均建立在原位移植技术上,国内外众多研究者分别采用瘤组织块原位移植法构建了成功的胃癌动物模型,并广泛应用于胃癌基础研究^[13-15]。但胃癌原位移植法构建的模型也存在一定的局限性,因为该法建立的胃癌模型没有复制癌前病变的阶段。随着生物学技术的快速发展和普及,更多肿瘤相关基因的发现和深入研究,以及特异性基因的筛选和鉴定,未来胃癌模型应该是以转基因法作为主导。随着胃癌特异性基因的发现,特异性的转基因模型的构建势必成为胃癌动物模型的发展方向。

参考文献

- 1 Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, *et al.* Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions [R]. *Ann Surg*, 2005, 241(1):27-39
- 2 Stadlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer [R]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(12):2195-2208
- 3 Ohgaki H, Kawachi T, Matsukura N, *et al.* Genetic control of susceptibility of rats to gastric carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1983, 43(8):3663-3667
- 4 周本杰, 陈蔚文, 王建华, 等. 硝酸结合 MNNG 攻击大鼠胃癌模型与评价 [J]. *中国药理学通报*, 2001, 17(1):111-112
- 5 宋伯根, 李义清, 石红军, 等. 胃粘膜上皮“适应性细胞保护”机制防止胃肿瘤发生的作用 [J]. *肿瘤*, 1993, 13(5):201-204
- 6 Watanabe T, Tada M, Nagai H, *et al.* Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(3):642-648
- 7 Honda S, Fujioka T, Tokieda M, *et al.* Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19):4255-4259
- 8 徐晶莹 李益民, 李玉兰, 等. MNNG 诱导大鼠胃癌模型的建立 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2003, 37(2):104-106
- 9 Pritchard DM, Przemek SM. Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? [R]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 19(8):841-859
- 10 Kossoy G, Ben-Hur H, Elhayany A, *et al.* The morphological pathway for mouse forestomach cancer [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(2):479-483

- 11 Sugiyama T, Hige S, Asaka M. Development of an H. pylori-infected animal model and gastric cancer: recent progress and issues [J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(Suppl 13):6-9
- 12 杨彩虹, 曾恒, 陈安民. 骨肉瘤动物模型研究的进展 [R]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(2):108-110
- 13 Chen YL, Wei PK, Xu L, *et al.* Nude mouse model of human gastric carcinoma metastasis constructed by orthotopic transplantation using organism glue paste technique [J]. *Ai Zheng*, 2005, 24(2):246-248
- 14 刘秋珍, 脱朝伟, 张宁, 等. 人胃癌裸鼠原位移植高转移模型的建立 [J]. *消化外科*, 2002, 1(2):89-92
- 15 Bhargava S, Hotz B, Buhr HJ, *et al.* An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2009, 24(1):31-39
- 16 Shi J, Wei PK, Zhang S, *et al.* OB glue paste technique for establishing nude mouse human gastric cancer orthotopic transplantation models [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(30):4800-4804
- 17 Furukawa T, Fu X, Kubota T, *et al.* Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(5):1204-1208
- 18 Li Y, Li B, Zhang Y, *et al.* Serial observations on an orthotopic gastric cancer model constructed using improved implantation technique [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(11):1442-1447
- 19 Takemura S, Yashiro M, Sunami T, *et al.* Novel models for human scirrhus gastric carcinoma in vivo [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(11):893-900
- 20 Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, *et al.* Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(4):389-398
- 21 Rashidi B, Gamagami R, Sasson A, *et al.* An orthotopic mouse model of remetastasis of human colon cancer liver metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(6):2556-2561
- 22 耿敬姝, 薛英威, 刘秀华, 等. 人消化道癌裸鼠移植瘤株及体外细胞系的建立 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2000, 14(3):162-164
- 23 Gu B, Wu D, Lu H, *et al.* Potentiation of docetaxel antitumor activity by batimastat against mouse forestomach carcinoma [J]. *Chin Med Sci J*, 2001, 16(4):223-226
- 24 张昆和, 祝金泉, 王崇文, 等. 改良 steel 法建立人胃癌动物模型 [J]. *实用肿瘤杂志*, 1998, 13(5):291-293
- 25 王瑜, 田晶, 李科, 等. 免疫抑制小鼠肾包膜下胃癌移植瘤模型的建立及微血管观察 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(6):571-573

(收稿日期:2016-03-09)

(修回日期:2016-03-23)