

· 基础研究 ·

# 人颅咽管瘤裸鼠皮下移植瘤模型的初步建立\*

周 杰<sup>1</sup>, 漆松涛<sup>1△</sup>, 潘 军<sup>1</sup>, 颜小荣<sup>1</sup>, 张 超<sup>2</sup>

(南方医科大学南方医院: 1. 神经外科; 2. 病理科, 广州 510515)

**摘要:**目的 初步建立人颅咽管瘤(CP)的裸鼠皮下移植瘤模型。方法 采用胰蛋白酶消化法将新鲜颅咽管瘤组织进行原代细胞培养, 然后将纯化的第 3 代颅咽管瘤细胞接种于到 BALB/c 裸小鼠背部皮下。观察接种成瘤后瘤组织生长情况和特点, 明确肿瘤性质。结果 CP 细胞可以在裸鼠皮下存活, 接种后 8 d 可见有移植瘤形成, 成瘤率为 33.3%, 病理切片显示肿瘤样鳞状上皮细胞团增生。结论 利用颅咽管瘤细胞初步建立了人颅咽管瘤裸鼠皮下移植瘤模型, 为进一步研究颅咽管瘤的生长特性奠定了基础。

**关键词:** 颅咽管瘤; 裸鼠; 移植瘤模型

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.015

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)05-0455-03

## Establishment of subcutaneous xenotransplanted tumor model of human craniopharyngioma in nude mice\*

Zhou Jie<sup>1</sup>, Qi Songtao<sup>1△</sup>, Pan Jun<sup>1</sup>, Yan Xiaorong<sup>1</sup>, Zhang Chao<sup>2</sup>

(1. Department of Neurosurgery; 2. Department of Pathology, Nangfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guandong 510515, China)

**Abstract: Objective** To establish a preliminary subcutaneous xenotransplanted tumor model of human craniopharyngioma in nude mice. **Methods** Craniopharyngioma cells were primarily cultured by trypsin digestion. Then, the purified cells in third passage were implanted subcutaneously into the nude mice. The specimens were investigated by microscope. **Results** Craniopharyngioma cells could survive in the nude mice. The xenograft could be found on 8 d after implanting. The tumor formation rate was 33.3%. The disorder growth of the squamous epithelial tumor cells could be subcutaneously found with microscope in nude mice. **Conclusion**

The subcutaneously xenotransplanted tumor model of human craniopharyngioma in nude mice is successfully established by the craniopharyngioma cells, which may benefit to further studies on this tumor.

**Key words:** craniopharyngioma; nude mice; xenotransplanted tumor model

颅咽管瘤(craniopharyngioma, CP)是颅内最常见的先天性上皮来源性肿瘤之一,好发于鞍区,常见于儿童,约占所有颅内儿童肿瘤的 6.0%~9.0%<sup>[1-2]</sup>。在长期的研究过程中,对 CP 生物学特性、病理改变等方面尚不清楚,该肿瘤临床治疗效果不佳,术后患者并发症严重,术后易复发,体外、体内模型的建立有助于对 CP 进行更加深入的研究<sup>[3-7]</sup>。目前,CP 动物模型的报道尚不多见<sup>[8]</sup>。本研究拟采用 CP 细胞接种裸鼠皮下的方法建立人 CP 移植瘤模型,旨在为该肿瘤的研究提供更有有效的实验工具。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 主要试剂: DMEM 高糖培养基(Gibco Cat: 21063029 USA), DMEM/F12 培养基(Gibco Cat: 11330032 USA), 0.25% 胰蛋白酶和 0.05% 乙二胺四乙酸(EDTA)(Gibco Cat: 25200056 USA), 胰岛素(Sigma Cat: I8405 Germany), 转铁蛋白(Millipore Cat: 82-056-1 USA), T3(Sigma Cat: IRMM469 Germany), 皮质醇(Sigma Cat: H4001 Germany), 霍乱毒素(Sigma Cat: C8052 Germany), 表皮生长因子(R&D Systems Cat: 236-EG-200 USA), 胎牛血清(Gibco Cat: 10099-141 USA), 广谱角蛋白(CST Cat: # 4545 USA), 鼠二步法免疫组化试剂盒(中杉金桥 Cat: PV-6002 中国)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养及鉴定** 肿瘤组织来源于南方医科大学南方医院神经外科的住院患者 3 例,患者的基本资料见表 1。术中

标本经快速病理诊断为 CP,取新鲜肿瘤组织进行原代培养及纯化,随后石蜡切片证实 3 例均为造釉细胞型 CP(adamantinomatous craniopharyngioma, ACP)。

表 1 本次实验取材患者信息及临床资料

标本编号	性别	年龄(岁)	手术时间	原/复发	病理诊断
1	男	11	2010-11-20	原发	ACP
2	男	14	2010-12-05	原发	ACP
3	女	10	2011-01-18	原发	ACP

无菌条件下于术中取下肿瘤组织(实体成分)后以含 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)液浸泡肿瘤组织约 5min,立即置入 DMEM 培养基[含青霉素(100 U/mL)/链霉素(100 μg/mL), 10% 胎牛血清],迅速送往细胞培养室。用 PBS 液反复冲洗肿瘤组织,将组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小碎块,按体积加入 0.25% 胰蛋白酶/0.05% EDTA, 37 °C 静置消化 20~25 min。加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中止消化,60 μm 和 20 μm 尼龙滤膜(Millipore Cat No: NY6002500, NY2002500 USA)分次过滤细胞悬液纯化细胞,1 000 r/min 离心 5 min,去上清液将其置入含胰岛素(5 μg/mL),转铁蛋白(5 μg/mL),T3(2 ×

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072067);广东省自然科学基金资助项目(S2011010003063)。△ 通讯作者: zj000718@yeah.net。

$10^{-9}$  mol/L, 皮质醇 ( $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 霍乱毒素 ( $2 \times 10^{-9}$  mol/L), 青霉素/链霉素 ( $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}/100 \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 两性霉素 ( $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), L-谷氨酰胺 ( $2 \text{ mmol}/\text{L}$ ) 和 10% 胎牛血清的 DMEM 和 DMEM/F12 混合培养基中并反复吹打混匀, 接种于 25 cm 培养瓶。原代培养后 2 d 后换液, 并加入表皮生长因子 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[3]</sup>。

当原代细胞铺满培养瓶底 80%~90% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶/0.05% EDTA 消化, 按 1:2 比例传代于培养瓶中。第 3 代肿瘤细胞性状较为稳定, 取其进行裸鼠成瘤实验。

制成细胞爬片, 在 4% 甲醛固定液中固定; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  及 0.5% Triton 液中处理后进行染色。Pan-CK 抗体 (1:500), 采用免疫细胞化学两步法, 参照试剂说明书进行染色, DAB 显色<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 实验动物** 实验用 6 只 BALB/c 裸小鼠均由南方医科大学实验动物中心提供和饲养 (许可证号: SCXK 粤 20060015), 雌雄不限, 鼠龄 4 周, 体质量 19~23 g。饲养环境: 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 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。

**1.2.3 细胞接种** 取第 3 代已纯化的 CP 细胞以 PBS 配置成细胞悬液进行接种。接种细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ , 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, 每例标本细胞各接种至 2 只裸鼠的背部皮下。

**1.2.4 观察指标** (1) 观察各组小鼠的生存质量情况; (2) 大体观察观察移植瘤形态、大小、颜色及与周围组织的关系; (3) 常规苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin stain, HE) 染色观察 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE。

## 2 结 果

**2.1 原代培养和纯化的 CP 细胞** 原代细胞培养后 24 h 可见细胞贴壁, 瘤细胞成小片状散在分布。聚集的细胞大小不一, 多为多边形形状, 偶见单个长梭形细胞。细胞透亮, 折光性好, 呈上皮样“铺路石”样排列, 细胞增殖较快, 团状细胞可重叠生长, 一般 3~5 d 汇合率可达 80%~90%, 进行细胞传代 (封 3 图 1、2)。原代培养细胞经滤膜过滤纯化, 第 3 代细胞稳定, 可满足裸鼠成瘤需要。

**2.2 移植瘤观察** 接种后 8 d, 2 只接种裸鼠背部皮下出现肉眼可见的移植瘤 (移植瘤成功率 33.3%), 2 只成瘤裸鼠体质量略有增加, 饮食、饮水正常, 精神状态良好, 将裸鼠处死取材分别进行下列观察。

**2.2.1 大体观察** 移植瘤大小均约  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ , 质地稍韧, 肿瘤表面皮肤无破溃, 色泽与周围皮肤颜色接近, 稍显淡红色 (封 3 图 2)。处死裸鼠后观察见肿瘤呈淡黄色, 有包膜形成, 与周围筋膜、肌肉组织界限清楚, 肿瘤周围可见血管反应, 表面有新生血管形成, 未见脓肿形成 (封 3 图 3)。

**2.2.2 病理切片 HE 染色观察** 在真皮下和浅肌层上见上皮样肿瘤细胞呈巢状, 肿瘤细胞周围大量中性粒细胞、淋巴细胞及纤维细胞包裹。肿瘤细胞呈巢片状, 细胞大小相仿, 呈多边形, 核居中, 细胞质淡嗜酸性, 核未见异形 (封 3 图 4、5)。

## 3 讨 论

肿瘤动物模型是研究肿瘤生物学行为及肿瘤治疗的主要工具之一, 广泛应用于肿瘤生长、肿瘤免疫、抗肿瘤药物筛选等方面研究<sup>[9-11]</sup>。移植性肿瘤模型是目前应用最多的动物模型, 它是将外源性肿瘤细胞移植到实验动物体内生长而形成的肿瘤, 其中以原位移植模型和皮下移植模型最为常见。1986 年,

Morikawa 等<sup>[12]</sup>首先将人结肠癌细胞移植到裸鼠盲肠浆膜下, 建立了第一个大肠癌的原位移植模型, 之后又陆续出现了用各种方法建立移植瘤的报道, 并沿用至今。该方法操作最简单, 成瘤率高, 应用也很广泛。将细胞悬液接种于裸鼠, 肿瘤生长能模拟肿瘤成瘤的过程, 成瘤率高, 成瘤时间均一, 瘤体大小和质量容易测量, 且接种方式, 部位多样化, 容易进行基础和临床研究, 是目前研究最广泛的动物模型。

CP 是颅内最常见的儿童先天性肿瘤之一, WHO 分级属 I 级肿瘤, 但由于该肿瘤自身的生物学特性以及肿瘤与周围重要神经组织间复杂的相互关系, 术后常复发, 临床治疗效果不佳。尽管广大学者对 CP 进行了长期而深入的研究, 但对该肿瘤起源、发病机制、病理改变、细胞生物学性状等方面认识尚不清楚。限于细胞模型、动物模型尚未成熟的实验条件制约, CP 相关基础研究进展缓慢<sup>[13-14]</sup>。Xu 等<sup>[6]</sup>首次采用肿瘤组织块异种异位移植法对 CP 动物模型进行了初步探索, 肿瘤经过 2~3 周潜伏期逐渐生长, 其移植成功率约为 39.58%。瘤块无肿瘤包膜, 周围可见小血管生成, 血供欠丰富, 光镜下肿瘤基本保持了原有的肿瘤特点, 未见新的囊变或钙化生成。该模型肿瘤可建立新的血循环, 其微血管密度与肿瘤细胞增殖能力密切相关。

本课题组前期已对 CP 细胞进行原代培养, 建立了该细胞体外模型, 培养条件较为稳定。本实验中, 采用已纯化的 CP 细胞悬液, 通过裸鼠皮下种植的方式尝试建立 CP 移植瘤模型。所生成瘤块可见明显肿瘤样鳞状上皮细胞巢状生长, 可见肿瘤血管生成。该组动物成瘤时间最短为 8 d, 较 Xu 等<sup>[4]</sup>采用的组织块异位移植法成瘤时间明显缩短; 本组成瘤率为 33.3%, 与 Xu<sup>[4]</sup>报道较为接近; 该方法操作简便, 每只裸鼠操作不超过 1 min, 不用切开、缝合皮肤, 更有利于裸鼠正常生长, 减少术后感染的概率。同时, 尽管组织块法可以通过筛网过滤等方法尽量使种植组织块大小相等, 但该方法仍难以确保所种植肿瘤组织所含细胞量相当, 而纯化的细胞悬液皮下种植可在制作动物模型时量化所种植肿瘤细胞数目, 使实验基本条件尽可能统一, 更有利于不同实验组的后续观察、对比, 使实验结果更为可信。

针对与 CP 病理性状相近, 均呈类似“良性肿瘤恶性表现”的下颌骨成釉细胞瘤, 张磊涛等<sup>[15]</sup>通过原代培养成釉细胞瘤细胞, 采用皮下种植的方法初步建立该肿瘤动物模型。种植后 23 d, 移植瘤 HE 切片可见肿瘤细胞向肌间呈侵袭性生长, 保持了原有造釉细胞瘤的侵袭特性。现阶段, 国内外尚未见裸鼠皮下种植 CP 细胞建立体内模型的报道。本研究采用相同的方法成功建立了裸鼠移植瘤模型, 但实验过程中未见到 CP 细胞的异形性以及侵袭性生长的现象, 尚不能认为该肿瘤存在侵袭性生长等“恶性”肿瘤表现, 但考虑到本组成瘤时间较短, 在后续的研究中会延长肿瘤成瘤时间, 进一步探讨该肿瘤的自身生物学特性。

在本次研究过程中, 本课题组认为需要注意: (1) 原代培养 CP 细胞纯度高、细胞接种前状态良好是该移植瘤模型成功的最关键因素; (2) 本实验细胞密度选择为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ , 细胞密度小可能不利于该模型成瘤; 悬液注射量介于 0.15~0.2 mL 有利于该模型建立成功, 多则可能不利于裸鼠生长, 鼠龄小其接种量应该相应减少; (3) 肿瘤细胞消化后放置时间不宜过长, 尽量不超过 30~60 min, 细胞悬液初步储存于 4℃ 环境, 更有利于保持肿瘤细胞活性; (4) 由于裸鼠并不是毫无免疫功能, 模型所选裸鼠尽量选择 4~6 周龄为宜, 鼠龄太大不宜于模型建立

成功。随着鼠龄增长,裸鼠免疫功能逐渐增强,肿瘤可能逐渐消失。如需长期观察,可以在实验前进一步抑制裸鼠免疫功能,延长肿瘤生长时间。

本次研究通过 CP 细胞原代培养,裸鼠皮下种植纯化的肿瘤细胞悬液初步建立了 CP 移植瘤动物模型。该方法成瘤时间短、操作简便、损伤小、瘤体保持原有上皮表型,可以作为 CP 移植瘤模型的实验方法之一。但该方法目前相对成瘤率仍较低,以后实验可以通过提高细胞密度、增强细胞增殖活性或降低裸鼠免疫能力等方法,改善该移植瘤模型成功率。

#### 参考文献:

- [1] Garrè ML, Cama A. Craniopharyngioma: modern concepts in pathogenesis and treatment[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2007(19):471-479.
- [2] Müller HL. Childhood craniopharyngioma-current concepts in diagnosis, therapy and follow-up[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010(6):609-618.
- [3] Holsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, et al. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling[J]. *Acta Neuropathol*, 2010,119(5):631-639.
- [4] Wang KC, Hong SH, Kim SK, et al. Origin of craniopharyngiomas: implication on the growth pattern[J]. *Childs New Syst*, 2005,21(8/9):628-634.
- [5] Xia ZQ, Liu WQ, Li SD, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9, type IV collagen and vasmlar endo thelin growth factor in adamantinons craniopharyngion a[J]. *Neurochem Res*, 2011,36(12):2346-2351.
- [6] Xu J, You C, Zhou L, et al. The cell-cycle kinetics of craniophawngnioma and its clinical ilgificance[J]. *J Neuroon-*
- [7] 江成才,刘字更是,朱诚. 颅咽管瘤现代培养和博莱霉素的体外抑瘤实验[J]. *中华神经外科杂志*, 2001,17(1):29-31.
- [8] 徐建国,游潮,蔡博文,等. 颅咽管瘤动物模型的初步建立[J]. *中华神经外科杂志*, 2005,21(9):564-567.
- [9] Li Z, Huang X, Li J, et al. Human breast carcinoma xenografts in nude mice[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002,115(2):222-226.
- [10] Kohrt HE, Houot R, Goldstein MJ, et al. CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies[J]. *Blood*, 2011,117(8):2423-2432.
- [11] Marampon F, Bossi G, Ciccarelli C, et al. MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009,8(3):543-551.
- [12] Morikawa K, Walker S M, Jessup J M, et al. In vivo selection of highly metastatic cell from surgical specimens of different primary human colorectal carcinomas implanted into nude mice[J]. *Cancer Res*, 1988,48(9):1943-1948.
- [13] 周杰,潘军,漆松涛. 颅咽管瘤相关基础研究现状[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010,37(5):426-429.
- [14] Xu JG, You C, Zhang SZ, et al. Angiogenesis and cell proliferation in human craniopharyngioma xenografts in nude mice[J]. *J Neurosurg*, 2006,105 Suppl 4:S306-310.
- [15] 张磊涛,黄洪章,曾东林,等. 人成釉细胞瘤裸鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007,25(1):12-14.

(收稿日期:2011-09-23 修回日期:2011-10-20)

(上接第 454 页)

- [6] Lim LP, Lau NC, Garrett EP, et al. Microarray analysis shows that somemicroRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. *Nature*, 2005,433(17):769-773.
- [7] McDaniel TG. MicroRNA: mechanism of gene regulation and application to livestock[J]. *J Anim Sci*, 2009, 87 Suppl 14:E21-E28.
- [8] Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets[J]. *Nucleic Acid Res*, 2009,37(8):2419-2433.
- [9] Ray MM, Jiri V. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011,39(1):19-29.
- [10] Masashi I, Koji O, Naoto T, et al. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays; a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs[J]. *Carcinogenesis*, 2010,31(8):1354-1359.
- [11] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. *Science*, 2004,304(5671):734-736.
- [12] Pfeffer S, Sewer A, Laqos QM, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family[J]. *Nat Methods*, 2005,2(4):269-276.
- [13] Xu YP, Zhou XF, Zhang WX. MicroRNA prediction with a novel ranking algorithm based on random walks[J]. *Bioinformatics*, 2008,24(13):i50- i58.
- [14] Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a[J]. *Gastroenterology*, 2011,140(5):1618-1628.
- [15] Nikolov S, Vera J, Schmitz U, et al. A model-based strategy to investigate the role of microRNA regulation in cancer signalling networks[J]. *Theory Biosci*, 2011,130(1):55-69.

(收稿日期:2011-04-16 修回日期:2011-07-07)