

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.20.023

幽门螺杆菌联合 MNU 灌胃法制备 balb/c 小鼠胃癌模型研究*

孙艳珍¹, 张涛¹, 陈良荣¹, 欧超², 黄晓燕³, 杨杰¹, 陈远能^{1△}

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科, 南宁 530011; 2. 广西壮族自治区肿瘤防治研究所检验科, 南宁 530021; 3. 广西中医药大学第一附属医院消化内科, 南宁 530023)

[摘要] **目的** 探讨幽门螺杆菌联合 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)灌胃法制备 balb/c 小鼠胃癌模型。**方法** 80 只 balb/c 小鼠, 适应性喂养 1 周后, 分成 4 组, 即正常组、模型 I 组、模型 II 组、模型 III 组, 每组 20 只。模型 I 组、模型 II 组、模型 III 组, 先予幽门螺杆菌菌液 CFU=10⁹/mL 灌胃, 隔天 1 次, 共 5 次; 然后依次分别给予新鲜配制的 MNU 溶液 0.15、0.30、0.60 mL 灌胃, MNU 和纯水配置比为 5 mg:3 mL, 每周灌胃 1 次, 持续 10 周。**结果** 模型 II 组 66.67% 腺癌, 模型 I 组小鼠全部胃炎伴轻度不典型增生, 模型 III 组小鼠全部死亡。**结论** 此法能够制备胃癌模型。

[关键词] N-甲基-N-亚硝基脲; 螺杆菌, 幽门; balb/c 小鼠; 胃肿瘤

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)20-2806-03

Helicobacter pylori combined with MNU gavage for preparing balb/c mouse gastric cancer model^{*}

Sun Yanzhen¹, Zhang Tao¹, Chen Liangrong¹, Ou Chao², Huang Xiaoyan³, Yang Jie¹, Cheng Yuanneng^{1△}

(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute of Tumor Prevention and Control, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. First Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China)

[Abstract] **Objective** To investigate Helicobacter pylori combined with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) gavage for preparing balb/c mouse gastric cancer model. **Methods** Eighty balb/c mice were randomly divided into four groups after 1-week adaptive feed, normal group, model group I, II and III, 20 cases in each group. The model group I, II and III were given Helicobacter pylori bacteria liquid (CFU=10⁹/mL) gavage, once every other day for 5 times; then, the freshly configured MNU solution 0.15, 0.3, 0.6 mL gavages were in turn given, MNU and pure water allocation ratio was 5mg:3mL. Once gavage per week for continuous 10 weeks. **Results** The model group II had 66.67% adenocarcinoma, the model group I were gastritis with mild atypical hyperplasia, and all mice in the model group III died. **Conclusion** This method can prepare the gastric cancer model.

[Key words] N-methyl-N-nitrosourea; Helicobacter pylori; balb/c mice; stomach neoplasms

胃癌的发病率在逐年下降, 但癌症相关的死亡原因仍然是全球第 2, 每年导致 750 000 人死亡, 是第 2 常见的癌症^[1]。幽门螺杆菌(Hp)的高阳性率基本显示与胃内病变的一致性。数年内的感染多数仅能引起轻度的浅表性胃炎, 但数十年的长期感染易出现糜烂、萎缩性胃炎甚至胃肿瘤^[2]。1994 年世界卫生组织已将 Hp 定为 I 类致癌因子。Hp 感染后胃癌的发生遵循“慢性胃炎→胃黏膜萎缩→肠上皮化生→不典型增生→胃癌”模式^[3]。目前虽不能肯定 Hp 感染与胃癌有直接因果关系, 但大量的流行病学、临床和实验研究支持 Hp 是胃癌的始动因素, 亦是胃癌发生、发展过程中的启动、促进因子^[4]。胃癌在亚洲东部发病率最高, 是欠发达国家人口癌症死亡的主要原因^[5], 世界卫生组织最近发布的《World Cancer Report 2014》表明, 2012 年中国胃癌新增病例和死亡人数高居世界首位, 约占 40%^[6]。显然, 一个理想的 Hp 诱导的胃癌模型对胃癌癌变机制的研究非常重要。

1 材料与方 法

1.1 动物 SPF 级雄性 balb/c 小鼠 80 只, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘)2001-0003, 合格证号: 0060892, 实验单位使用许可证编号: SCXK(桂)2010-

0001。动物饲养于广西中医药大学实验动物中心, 恒温(23±2)℃, 恒湿(50±10)%, 昼夜循环(12 h:12 h)条件下适应性喂养 1 周后, 再开始正式分组实验。小鼠组织取材于广西中医药大学实验动物中心实验室内进行, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

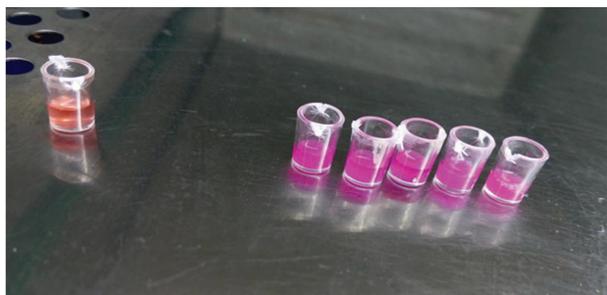
1.2 试剂与仪器 Hp 悉尼菌株 SS1 由南昌大学第一附属医院消化疾病重点实验室惠赠; 锥形瓶、牛皮纸、氧产气袋、离心管(15 mL)、接种环(10 μL)、巴氏吸管(3 mL)、90 mm 一次性塑料培养皿、MGC 厌氧产气袋、哥伦比亚血琼脂基础(货号 CM911)、无菌脱纤维绵羊血(北京索莱宝科技有限公司); N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)[美国 Sigma 公司(货号 N136701)]; 10% 中性福尔马林固定液、0.9% 生理盐水; 恒温水浴锅、手术器械、弯灌胃针、一次性注射器(1, 50 mL)、纯水; RM2135 Leica 切片机(德国)、倒置光学显微镜(日本 OLYMPUS CKX41, U-CTR30-2)等。

1.3 方法

1.3.1 Hp 培养 哥伦比亚血琼脂基础培养基 8.8 g 溶于 200 mL 纯水的锥形瓶中, 牛皮纸密封锥形瓶, 120℃、20 min 高压锅灭菌后, 待温度降至 50~60℃时在超净台中将 7% 脱纤维

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360531); 广西卫生厅重点项目(重 2012030)。 作者简介: 孙艳珍(1990-), 硕士, 主要从事消化系统疾病诊治方面研究。 △ 通信作者, E-mail: cyn60668@aliyun.com。

绵羊血 14 mL 滴入琼脂培养基中,混匀,迅速倒板,每个培养皿约 20 mL,静置使凝固。将冻存于-80 °C 冰箱的 Hp-SS1 菌株取出,放入恒温水浴锅中,温度设置为 37 °C,水浴加热 1 min,至融化。用接种环蘸取冻存管中的菌液,将细菌接种于 7% 琼脂羊血培养基中,之后将其放入厌氧培养罐内,放入一包厌氧产气袋,将厌氧培养罐盖好,放回 37 °C 细菌培养箱内,培养 48 h 后,超净台中打开培养罐,可见培养皿针尖样菌落长出,接种环将细菌刮下,溶于布氏肉汤,制成 Hp 菌液,紫外分光光度计测浓度, Hp 菌液 CFU=10⁹/mL。Hp 培养成功见图 1。



左 1 为溶于布氏肉汤制成的 Hp 菌液做快速尿素酶试验,右边的 5 瓶为培养皿中刮下的 Hp 做的快速尿素酶试验,3 min 内可见明显的紫红色反应

图 1 Hp 培养



A: 2 只小鼠胃组织快速尿素酶试验; B: 小鼠 1 胃组织快速尿素酶试验; C: 小鼠 2 胃组织快速尿素酶试验

图 2 Hp 定植成功检测

1.3.5 小鼠胃病理改变情况的观察和损伤评分 将已用 10% 中性福尔马林固定液固定好的小鼠胃取出,然后切取病变处,经用蒸馏水冲洗,放入生物脱水机进行逐级脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋切片 4 μm,常规 HE 染色,封片,光镜下观察炎症和癌变情况。组织学变化和分级依据 2012 年中国慢性胃炎共识意见研讨会^[8],组织学变化包括 5 项: Hp 感染、慢性炎症(单个核细胞浸润)、活动性(中性粒细胞浸润)、萎缩(固有腺体减少)、肠化生(肠上皮化生); 4 个分级包括 0 为无, + 为轻度, ++ 为中度, +++ 为重度; 胃黏膜萎缩程度分期,见表 1。

表 1 胃黏膜组织学变化和分级

胃窦	胃体			
	无萎缩 (0 分)	轻度萎缩 (1 分)	中度萎缩 (2 分)	重度萎缩 (3 分)
无萎缩 (0 分)	0 期	I 期	II 期	III 期
轻度萎缩 (1 分)	I 期	II 期	III 期	IV 期
中度萎缩 (2 分)	II 期	III 期	IV 期	
重度萎缩 (3 分)	III 期	IV 期		

1.3.2 造模方法 80 只雄性 5 周龄 balb/c 小鼠,室温适应性喂养 1 周后,分为模型 I、II、III 组和正常组,每组 20 只。将制作好的 Hp 菌液给模型组小鼠灌胃,每只 0.8 mL,隔天 1 次,共 5 次。将 MNU 溶于纯水中, MNU 与纯水的配比为 5 mg : 3 mL。除正常组同步饲养外,造模动物分别予 0.15、0.30、0.60 mL 灌胃,每周 1 次,持续 10 周;同时注意观察各小鼠死亡、体质量、毛发、耗食量、活动等情况。开始灌胃或第一次灌胃至 38 周所有小鼠同等条件下正常饲养,因胃癌化学诱导模型所需时间长,成功率低,符合人的发病规律。

1.3.3 标本采集 第 38 周末时,将全部动物脱椎处死,用组织剪沿腹中线将腹腔剪开,暴露腹腔脏器,将胃剪下(食管末端至十二指肠球部之间),沿胃大弯将胃剪开,0.9% 生理盐水冲洗,剪刀剪取 1/2 的胃组织做快速尿素酶试验;剩余 1/2 的胃组织冲洗干净,迅速将其放到 10% 的中性福尔马林固定液中,密封保存待光镜检测。

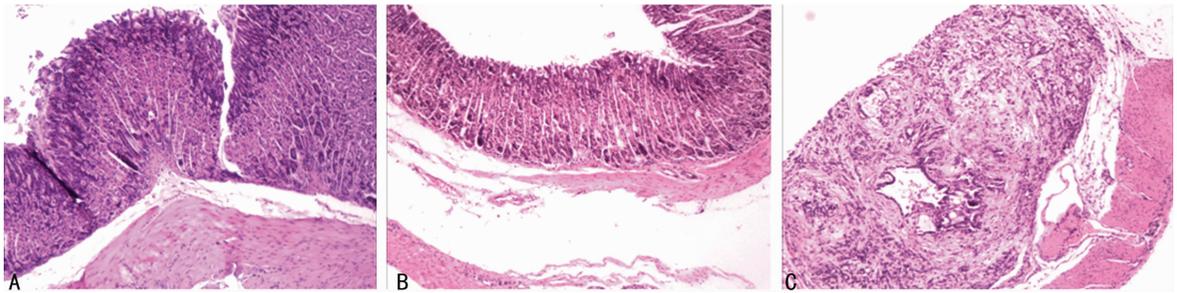
1.3.4 Hp 感染的检测方法 感染的诊断:符合下述 3 项其中 1 项可判断为 Hp 现症感染。(1) 胃黏膜组织 RUT、组织切片染色或细菌培养 3 项中任 1 项阳性;(2) ¹³C-或 ¹⁴C-UBT 阳性;(3) HpSA 检测阳性^[7]。将小鼠胃组织剪下,取 1/2 的胃组织做快速尿素酶试验,10 min 内可见紫红色反应,证实小鼠胃 Hp 定植成功。见图 2。

1.4 统计学处理 用 SPSS19.0 for windows 软件进行数据处理与分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料选择非参数检验,计量资料符合正态分布选择参数检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠一般情况变化 模型组小鼠造模 13 周开始,出现部分小鼠耗食量减少、毛发稀疏、嗜睡、懒动、乏力、拱背、互咬尾巴等现象。正常组小鼠 1 只小鼠死亡,模型 I、II 组小鼠各 2 只小鼠死亡。模型 III 组 20 小鼠全部死亡,经解剖发现,部分死亡小鼠有腹腔脏器穿孔、腹腔脏器粘连,部分死亡的小鼠肝脏局部黑变。

2.2 肉眼及光镜下观察胃黏膜损伤情况 肉眼可见模型组各小鼠胃黏膜充血、水肿。正常组小鼠胃黏膜未发现异常改变;模型 I 组充血肿胀,糜烂明显,未见溃疡及结节样改变;模型 II 组胃黏膜充血肿胀,糜烂明显,可见溃疡样变化,底披少许苔。光镜下:正常组黏膜完整,各层结构清晰,未见炎细胞浸润及上皮异型增生;模型 I 组局部正常黏膜脱落,黏膜充血、黏膜下层增宽,少许炎性细胞浸润,部分呈低级别-中级别上皮内瘤



A: 正常组; B: 模型 I 组; C: 模型组 II 组

图 3 各组小鼠胃黏膜组织形态学变化(×10)

表 2 各组胃黏膜组织学变化和分级情况

组别	n	Hp 感染	慢性炎	活动性炎	萎缩	肠化生	癌变率
正常组	19	0	0~+	0	0	0	0
模型 I 组	18	++~+++	-	+~++	+~++	+~++	0
模型 II 组	18	++~+++	-	++~+++	++~+++	++~+++	66.67%

- : 此项无数据

表 3 各组胃黏膜萎缩程度的比较

组别	n	胃窦			胃体		
		轻度萎缩	中度萎缩	重度萎缩	轻度萎缩	中度萎缩	重度萎缩
正常组	19	0	0	0	0	0	0
模型 I 组	18	0.11(2/18)	0.83(15/18)	0.06(1/18)	0.89(16/18)	0.11(2/18)	0
模型 II 组	18	0.06(1/18)	0.28(5/18)	0.67(12/18)	0.67(12/18)	0.11(2/18)	0.22(4/18)

变;模型 II 组局部正常黏膜脱失,纤维组织增生,较多炎性细胞浸润,内见不规则异型腺体增生,符合中分化腺癌改变。见图 3,表 2,3。

3 讨论

现阶段,关于胃癌的动物模型建立研究主要集中在原位移植法、移植瘤法、免疫抑制剂法、转基因法和诱导法 5 大类^[9];前者因操作复杂、成本高而较难推广,化学物理法造模因操作过多过杂,不确定因素多,与人类胃癌的形成过程不接近,故使用不多。笔者采用 MNU 联合 Hp 制备胃癌模型,造模周期 38 周。balb/c 小鼠呼吸功能脆弱,呼吸道癌发病率 2.5%,易患慢性胃炎,且随着年龄的增长,患肺癌等其他消化道癌症外疾病的概率增大,肺癌发生率约 27.5%。本实验在造模期间死亡的动物经检验未发现肺癌等消化道外癌症,造模期间动物的高死亡率排除 balb/c 小鼠因罹患其他癌症死亡的可能性。与前两种造模方法相比,Hp 联合 MNU 灌胃法制备 balb/c 小鼠胃癌模型具有如下优点:(1)采用灌胃的方法简单易行,且易于推广;(2)实验重现性高,所需费用相对较少;(3)致癌原理与人类胃癌相似;(4)无需外科手术,损伤小,可排除人为干扰因素的影响。笔者通过 Hp 菌液 CFU=10⁹/mL 灌胃,隔天 1 次,共 5 次;后给予新鲜配制的 MNU 溶液灌胃,MNU 和纯水配置比为 5 mg:3 mL,每周 1 次,持续 10 周的方法成功制备胃癌模型,此方法值得应用和推广。

MNU 是强有力的致癌物质,致癌的能力已被多人证实^[9],是经典的用于致癌性实验的阳性对照物,可经皮、食入、吸入等方式吸收,是一种常用的致癌物。Hp 是一种对生长环境要求十分苛刻的微需氧革兰阴性杆菌;已被证实是活动性胃炎、消化性溃疡等胃病的原因之一,同时也可能是胃癌的发病

因素之一,所以 Hp 联合 MNU 灌胃法制备 balb/c 小鼠胃癌模型具有合理、可行性。

MNU 为黄色晶体,可溶于水,应储存于 -20 °C 冰箱中;20 °C 室温下,溶液 pH=4 时,MNU 半衰期为 125 h,pH=9 时,半衰期不足 2 min;通常将 MNU 溶于 pH=5 的溶剂中,并在 3 h 内用完,pH 越高则促进 MNU 与水反应,以排除污染^[10]。故使用 MNU 灌胃应现配现用,不宜久置,避免使用分解的 MNU 灌胃,否则会引起较大实验误差,使灌胃次数增多、造模时间延长,浪费宝贵的时间和实验耗材,甚至引起实验动物中毒死亡。笔者通过 MNU 联合 Hp 灌胃法成功制备胃癌模型,予 0.6 mL 灌胃时,小鼠病死率达 100%,验证了大剂量 MNU 灌胃可提高致死率,也验证了 MNU 的毒力及致畸作用。

参考文献

- [1] Senol K, Ozkan MB, Vural S, et al. The role of inflammation in gastric cancer[J]. *Advances Expe Med Biol*, 2014, 816:235-257.
- [2] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2010, 15(5):265-270.
- [3] Correa P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis [J]. *Am J Surg Pathol*, 1995, 19(Suppl 1):s37-43.
- [4] 时昭红,刘浩. 幽门螺杆菌感染与胃癌[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(32):3327-3331.
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108. (下转第 2811 页)

表 2 没食子酸加样回收实验结果

样品量(g)	样品中含量(μg)	加标量(μg)	测定结果(μg)	回收率(%)	RSD(%)
0.251 8	4 254.30	5 362.13	9 626.53	100.2	
0.251 1	4 221.05	5 362.13	9 500.20	98.4	
0.251 9	4 288.90	5 362.13	9 598.78	99.0	1.1
0.250 1	4 260.27	5 362.13	9 487.69	97.5	
0.251 5	4 340.28	5 362.13	9 721.04	100.4	
0.250 4	4 244.12	5 362.13	9 512.12	98.2	

表 3 不同生产厂家样品中党参炔苷和没食子酸的水平比较

厂家(生产批号)	党参炔苷(mg/g)	没食子酸(mg/g)
青海格拉丹东藏药厂(批号:1507101)	1.083 5	15.334 0
西藏昌都藏药厂(批号:150601)	0.628 9	15.159 5
西藏藏医学院(批号:150405)	0.306 5	8.762 7

3 讨 论

本实验就十八味党参丸中党参炔苷和没食子酸的提取方法和色谱条件中流动相系统进行了考察。由于传统醇类回流提取耗时较长、操作相对繁杂,本实验采取了超声方法和浸泡的方法提取党参炔苷和没食子酸。在考察党参炔苷的提取方法时,结合查阅的文献^[9-11],采用是否浸泡再超声、不同量的甲醇及不同的提取时间进行提取,结果发现提取效率较高,针对所选用的色谱柱,流动相选用乙腈:0.4%冰醋酸水溶液(21:79),分离度最好,能用于十八味党参丸中党参炔苷水平检测。在考察没食子酸的提取方法时,用30%、50%、75%甲醇进行提取,结果发现用30%甲醇提取效果最好,结合所查文献^[12-14],针对所选用的色谱柱,选用甲醇:0.4%冰醋酸水溶液(1:99)分离度最好,可用于没食子酸的水平测定。

本实验的结果表明不同厂家的十八味党参丸中这两种有效成分水平差别较大,说明不同厂家可能在源头上选用的中药材质量存在着差异,或是生产设备及其工艺参数等的不同导致有效成分提取不完全,从而造成这样的差异。这些差异很可能不同程度影响着药品的疗效。提示必须进一步加强对民族药品质

量控制研究,增加有针对性的检验项目,尤其对配方中的名贵药味。本实验由于实验材料购买不便,所用不同药厂的药品均只有一批,按照本文的检测方法,是否同一药厂药品原本就存在较大的批间差异尚需进一步验证。

参考文献

- [1] 张喜民,张怡沛,赵良功.二十五味松石丸的质量标准研究[J].中成药,2009,31(5):815-816.
- [2] 由文峰,白树军.藏药十三味红花散合十八味党参丸治疗过敏性紫癜 15 例小结[J].甘肃中医,2001,14(1):61-62.
- [3] 龙巴.藏医藏药治疗风湿病 88 例临床观察[J].医学文选,2001,20(1):64-65.
- [4] 赵秀花.藏医药浴治疗类风湿性关节炎 78 例临床体会[J].中国民族民间医药,2012,21(12):4.
- [5] 李毛先.藏医药浴治疗强直性脊柱炎的观察与护理[J].青海医药杂志,2013,43(8):42-43.
- [6] 彭毛东,胡燕芹,娘毛才,等.藏医药浴治疗关节病性银屑病 24 例临床分析[J].青海医药杂志,2009,39(6):79-80.
- [7] 冯德海,更桑,安维梅.藏药治疗银屑病 60 例临床疗效观察[J].民族医学,2012,25(5):46-47.
- [8] 拉青才让.藏医治疗牛皮癣的体会[J].医学文选,2005,24(6):954-955.
- [9] 李颖,张宽,叶华,等.高效液相色谱法测定两种不同来源党参中党参炔苷的含量[J].海峡药学,2014,26(6):47-49.
- [10] 孙鑫,张伟,寇文龙,等.秦岭党参质量控制标准研究[J].陕西中医学院学报,2013,36(2):98-107.
- [11] 刘书斌,张樱山,李硕,等.甘肃不同产地党参中表征成分党参炔苷的含量分析[J].甘肃中医学院学报,2014,31(5):15-19.
- [12] 李晓梅,赵琪钟,罗松.HPLC 法测定藏药余甘子中没食子酸的含量测定[J].中国民族医药杂志,2006(5):70-74.
- [13] 王艳萍,赵琪钟,王丽莎.HPLC 法测定余甘子喉片中没食子酸的含量[J].中国药师,2009,12(9):1226-1228.
- [14] 冀静,杨继家,廖琦,等.藏药余甘子中三种黄酮类成分的 HPLC 含量测定研究[J].中药与临床,2013,3(4):14-19.

(收稿日期:2017-02-13 修回日期:2017-04-25)

(上接第 2808 页)

- [6] Stewart BW, Christopher P. World cancer report 2014 [M]. The World Health Organization: IARC Nonserial Publication,2014.
- [7] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌研究协作组,刘文忠,谢勇,等.第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J].中华消化杂志,2012,32(10):655-661.
- [8] 房静远,刘文忠,李兆申,等.中国慢性胃炎共识意见[J].

现代消化及介入诊疗,2013,18(2):119-128.

- [9] 李艳,王东林.胃癌动物模型构建的研究进展及多因素比较分析[J].医学研究杂志,2016,45(10):9-11.
- [10] Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Oliveira PA, et al. N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent [J]. Tumour Biol,2015,36(12):9095-9117.

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-12)