

BOP 诱导叙利亚仓鼠胰腺癌动物模型建立和相关生物学特性的研究

卫积书,张 焱,任华建,吕 楠,蔡宝宝,吴鹏飞,彭云鹏,李 强,苗 毅*

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨 N-亚硝酸 2-双丙基胺[bis-(2-oxopropyl)-N-nitro samine, BOP]诱导建立叙利亚仓鼠胰腺癌动物模型的可行性和建模过程特点,初步分析模型胰腺癌的相关生物学特点,为胰腺癌动物模型研究提供一个可控性强、动态、全面的基础。**方法:**73 只叙利亚仓鼠随机分为实验组和对照组,实验组予以生理盐水稀释成 20 mg/ml 的 BOP 按照 20 mg/kg 体重腹壁皮下注射每周 1 次,连续 4 周;相同条件注射生理盐水为对照组。连续监测各组仓鼠体重,注射结束后 4 周开始每 2 周依次收集两组叙利亚仓鼠组织标本,观测其形态特点。**结果:**注射后 20 周实验组开始出现胰腺肿瘤,注射后 28 周开始成瘤明显增加,病理观测为低分化腺癌,复种实验成功,部分实验结果与既往报道不一致。**结论:**BOP 可以成功构建叙利亚仓鼠胰腺低分化腺癌动物模型,在注射后第 28 周后收集标本时间最佳,部分实验结果值得进一步深入研究。

[关键词] N-亚硝酸 2-双丙基胺;叙利亚仓鼠;胰腺癌;动物模型

[中图分类号] R735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1669-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131205

The biological characteristics related study of BOP-Induced syrian golden hamsters pancreatic cancer

Wei Jishu, Zhang Ye, Ren Huajian, Lv Nan, Cai Baobao, Wu Pengfei, Peng Yunpeng, Li Qiang, Miao Yi*

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of BOP [bis-(2-oxopropyl)-N-nitro samine]-induced Syrian hamsters pancreatic adenocarcinoma model, and explore the character of the modeling process. Preliminary analysis of related biology characteristics provides a controllable, dynamic and comprehensive foundation for BOP induced pancreatic animal model. **Methods:** Seventy-three syrian golden hamsters were treated with carcinogen, N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine weekly for 4 weeks (20 mg/kg, subcutaneous injection), and sacrificed at 2-week intervals after 4-week from the last injection. **Results:** The experimental group pancreatic tumors began to appear after 20 weeks after first injection, different from previous reports, and tumorigenicity was significant higher in 28 weeks after injection. Primary tumor specimen implantation verified tumorigenicity, parts of experimental results were inconsistent with previous reports. **Conclusion:** BOP can successfully induce Syrian hamsters poorly differentiated pancreatic adenocarcinoma, and the 28th week after first time injection was the optimally time for sample collection. Some experimental results are worthy of further in-depth study.

[Key words] BOP; Syrian golden hamster; pancreatic cancer; animal model

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1669-1673]

胰腺癌是预后极差的一类恶性肿瘤,胰腺癌的基础和临床研究都没有取得突破性进展^[1]。从上个世纪的 70 年代开始利用化学方法诱导胰腺癌动物

模型以来,经过数十年的发展,已经设计出多种胰腺癌动物模型并对其进行了大量的实验研究^[2-4]。我国胰腺癌动物模型研究现集中在二甲基苯蒽(DMBA)埋线和移植模型,对于相对能够模拟体内胰腺癌发生发展的 N-亚硝酸 2-双丙基胺[bis-(2-oxopropyl)-N-nitro Samine, BOP]诱导叙利亚仓鼠胰腺癌研究尚少^[5-6]。本研究旨在了解以 BOP 建立胰腺癌动物模

[基金项目] 国家自然科学基金(81272239);卫生公益性行业科研专项经费(201202007)资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail: miaoyi@njmu.edu.cn

型过程中的变化规律,初步了解其相关生物学特点,为胰腺癌的研究提供一个可控性强、动态、全面的平台。

1 材料和方法

1.1 材料

BOP(Nacalai 公司,日本)。2~3 周龄雌性叙利亚仓鼠购自中科院上海动物研究所,体重(118.66 ± 13.55)g,饲养于南京医科大学动物中心,给予颗粒饲料和清洁饮水并每周投放适量的维生素。

1.2 方法

1.2.1 模型建立

73 只实验仓鼠适应性饲养 1 周后,随机分 6 个实验组共 46 只,2 个对照组共 27 只。生理盐水稀释 BOP 到 20 mg/ml,20 mg/kg 体重腹腔皮下注射,每周 1 次,连续 4 周。对照组相同条件注射生理盐水。

1.2.2 标本收集

从给药后第 3 周起每隔 1~2 周称量各组仓鼠体重直至 33 周。于注射结束后第 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、33 周收集标本,方法如下:每次随机从 6 个实验组中抽取 3 组,从 2 个对照组中抽取 1 组,每组随机取仓鼠 1 只共 4 只。0.5% 的水合氯醛 0.5 ml/kg 体重麻醉,依次取出胰腺、肝脏、胃、十二指肠、双肾及全肺。

1.2.3 标本处理

肿瘤组织经拍照留档后,部分以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋垂直于胰腺长轴切片后常规 HE 染色,病理鉴定。其余标本冻存于液氮中。

1.2.4 胰腺肿瘤细胞复种

胰腺肿瘤组织标本经机械法制备成 1.0 mm × 1.0 mm × 1.0 mm 大小的肿瘤组织悬液,含 10% 胎牛血清的 DMSO 冻存组织于液氮罐中 1 个月,取出后 40℃ 水浴快速融化,洗去 DMSO 后 DMEM 培养液悬浮组织块,镊取 3 个 1.0 mm × 1.0 mm × 1.0 mm 大小的组织块种植于裸鼠腹部皮下,共 7 只。同时行正常胰腺组织和 DMEM 对照组,分别 7 只。种植后每周观测裸鼠。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件分析,各组比较采用曲线回归分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

实验过程中两组动物在毛皮色泽、活动、摄食、饮水无明显改变,体重变化无明显差异。整个实验

过程中成瘤率为 45.10%,总体胰腺成瘤为 17.64%,其中在 20 周前几乎不能诱导胰腺肿瘤,30 周后成瘤率明显增加达到 50%。实验过程中两组动物各有 1 只仓鼠因被自食未获得标本。

2.2 标本检测

整个实验过程中对照组在所取样本中未发现肿瘤,实验组的成瘤情况见表 1。在取材过程中我们发现,在注药后 16 周左右实验组胰腺较对照组颜色相比黯淡,脂肪化以及脂肪浸润严重,在多只发生胰腺癌的仓鼠体内均发现癌旁胰腺组织大部分被脂肪组织所取代。早期形成的胰腺肿瘤体积较小,外表光滑,与周围胰腺分界清楚,后期胰腺癌组织切面多为灰白色,质地坚硬,滋养血管较多,肿瘤周围组织粘连严重(图 1),如肿块较大常伴有坏死并伴有实验动物的肠梗阻及腹水。实验中获得最大胰腺肿瘤湿重为 2.023 g。在 BOP 注射 4 周后仓鼠的肝脏较对照组色泽黯淡,呈暗红色,颗粒粗大,20 周后几乎每只实验组仓鼠均出现不同程度的肝硬化,而对照组肝脏正常(图 2)。所有实验组仓鼠均未发现十二指肠和胃部肿瘤形成。

2.3 病理检查

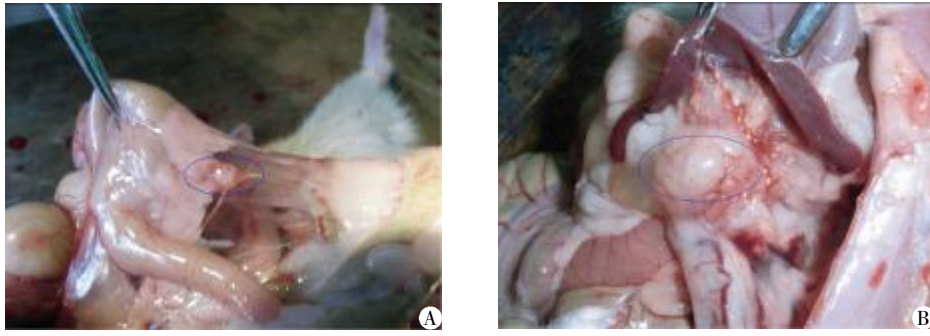
癌细胞呈腺管样分布,腺腔大小不一,核异型明显,并可见癌细胞巢(图 3),部分仓鼠形成的胰腺肿瘤,胰腺结构完全消失,被弥漫分布的肿瘤细胞取代,为低分化腺癌。所有肿瘤组织均经过病理科医师检测证实。

2.4 肿瘤组织复种

表 1 实验组仓鼠在不同时间段各脏器成瘤情况

Table 1 The tumor formation of BOP administered hamster during experiment period (n)

时间	胰腺癌	肝癌	肺癌	腹腔转移	肾癌
第 4 周	0	0	0	0	0
第 6 周	0	0	0	0	0
第 8 周	0	0	0	0	0
第 10 周	0	1	0	0	1
第 12 周	1	0	0	0	0
第 14 周	0	1	0	0	0
第 16 周	0	0	0	0	0
第 18 周	0	1	1	0	0
第 20 周	1	1	1	0	0
第 22 周	2	0	0	1	0
第 24 周	1	1	0	0	1
第 26 周	0	2	1	1	0
第 28 周	1	2	1	0	0
第 30 周	1	2	0	0	0
第 33 周	2	1	1	0	0



A: BOP 诱导早期胰腺肿瘤小而且规整, 与周围正常胰腺分界清楚; B: 后期胰腺肿瘤大, 与周围脏器粘连分界不清。

图 1 BOP 诱导叙利亚仓鼠胰腺肿瘤大体观察

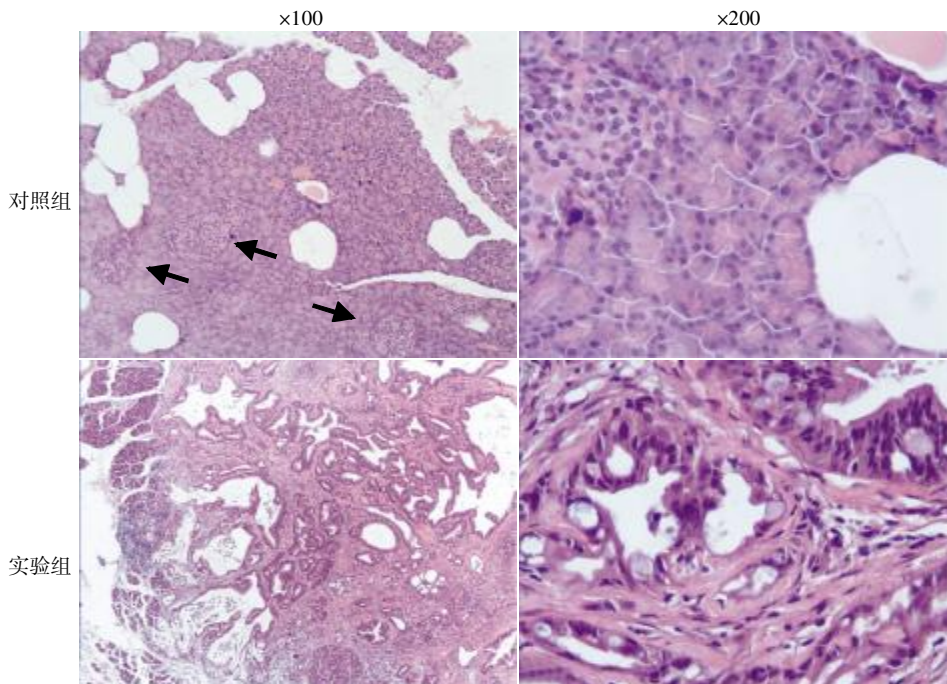
Figure 1 BOP-induced Syrian hamsters pancreatic cancer



A: 对照组仓鼠肝脏色泽鲜红, 质地均匀柔软; B: BOP 诱导成瘤肝脏各叶比例失调, 肿瘤形成并突出肝脏表面, 呈灰白色; C: BOP 诱导后期, 肝脏质地不均匀, 表面布满大小不等质硬结节。

图 2 BOP 诱导叙利亚仓鼠肝脏肿瘤大体观察

Figure 2 BOP-induced Syrian hamsters liver cancer



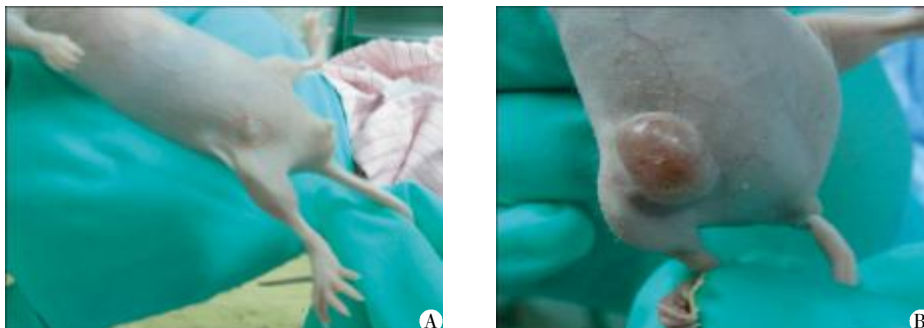
HE 染色发现对照组仓鼠胰腺结构清晰, 胰岛散在分布其中(黑色箭头), 腺体结构完整, 细胞排列规则, 核型正常, 实验组胰腺肿瘤组织见腺体结构不清, 细胞排列紊乱, 核异型多见。

图 3 BOP 诱导叙利亚仓鼠胰腺肿瘤标本病理学检查(HE)

Figure 3 HE staining of the pancreatic neoplasm induced by BOP

种植后第2周开始可以触及实验组裸鼠种植部位有质硬肿块形成,逐步增大(图4),HE染色证实

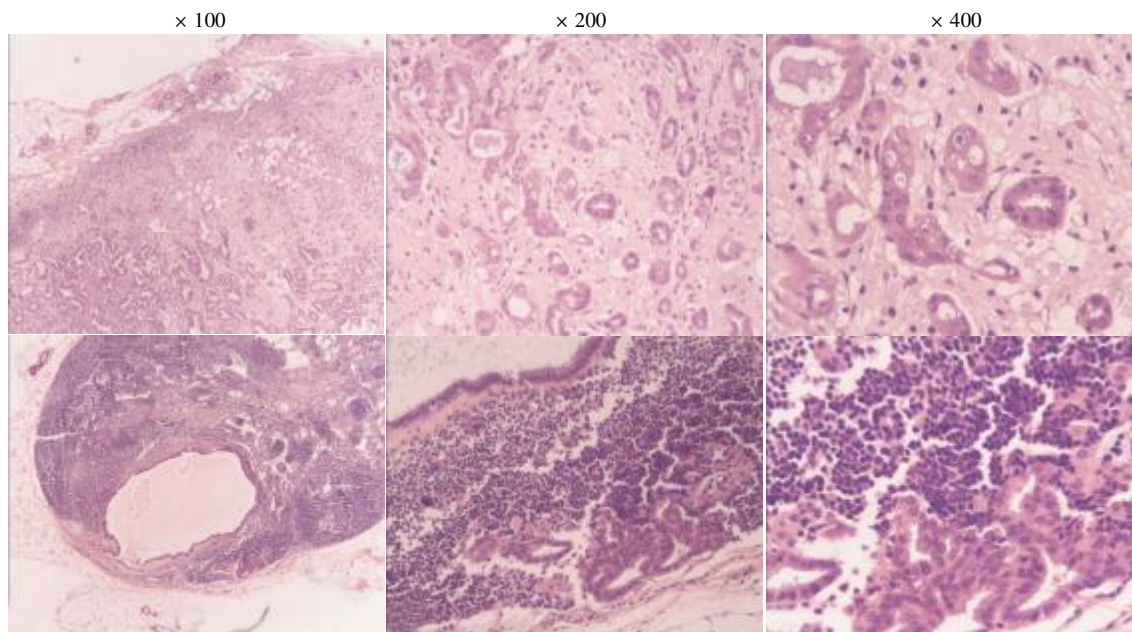
为低分化腺癌伴周围淋巴结转移(图5)。正常胰腺组织对照组和DMEM组未见任何肿块形成。



A:胰腺肿瘤组织块种植裸鼠皮下2周,可见有绿豆大小质硬包块形成;B:16周后明显增大,无炎症反应表现。

图4 胰腺肿瘤细胞复种后的表现

Figure 4 Primary pancreatic cancer specimen implantation in nude mice



胰腺肿瘤组织块种植裸鼠皮下16周成瘤后,病理复切染色证实仍为低分化腺癌伴肿瘤旁淋巴结转移。

图5 胰腺肿瘤细胞复种后肿瘤组织病理学检查(HE)

Figure 5 HE staining of the neoplasm from xenograft models

3 讨论

目前实验性胰腺癌动物模型建立主要方法为化学诱导法、长期胃十二指肠反流诱导法、各种移植法、基因工程法,化学诱导法主要包括胆囊收缩素(CCK)诱导、酒精烟草诱导、DMBA和BOP诱导等,这些方法各有优缺点,化学诱导方法缺点是:周期长,成功率偏低等,但是优点也很突出,主要包括:目前最能模拟人类胰腺癌发生发展过程,可以动态观测发病过程,研究胰腺癌发病机制,评估各种治疗方法效果和费用低,条件相对简单等^[7]。

本研究采用经典BOP诱导叙利亚仓鼠胰腺肿瘤,注射后12周实验组开始出现胰腺肿瘤,注射后20周,实验组动物平均成瘤率为38.1%。对照组全程未发生胰腺肿瘤。由于BOP是“广谱致癌物质”,其全身作用表现在实验各阶段还出现了腹腔巨大肿瘤、肾癌和肺癌。有趣的是,所有的实验组动物均未诱导出胃部肿瘤,这和Clapper等^[8]研究结果不一致,值得进一步扩大样本或者进行机制研究。有研究证明,叙利亚仓鼠可能存有基因缺陷从而可自发胰腺肿瘤。本实验中,所有对照组仓鼠均未发现有任何腹腔脏器的肿瘤形成。BOP诱导叙利亚仓鼠胰腺肿

瘤机制尚未完全明了^[9],但已有研究证明 BOP 在体外能够诱导叙利亚仓鼠正常胰岛细胞成为破骨巨细胞甚至胰腺癌细胞^[5,10],本研究推测 BOP 可能诱导正常多能干细胞成为肿瘤干细胞,循环进入多血供器官形成相应部位的恶性肿瘤,发挥“广谱”致癌作用。

BOP 皮下或者腹腔注射诱导叙利亚仓鼠的胰腺癌动物模型已经有四十余年的历史,是经典胰腺癌动物模型,本研究发现 BOP 注射后第 20 周,胰腺肿瘤成瘤率较前明显增加,与部分文献报道基本一致^[5,11],但此时成瘤率不够稳定,肿瘤体积偏小,本研究认为 28 周后收集样本为佳。实验组仓鼠在 BOP 诱导 20 周后,胰腺的损害包括腺泡纤维化和腺体萎缩,但最显著的变化还是胰腺导管上皮细胞不典型增生(结果尚未发表),并没有发现 BOP 能够诱导出胰腺肿瘤肝脏转移灶。肝脏则主要表现为囊性变、肝硬化和肝脏低分化腺癌的形成,病理切片和免疫组化结果均不能证实肝脏低分化腺癌为胰腺癌转移灶。

[参考文献]

- [1] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, et al. Recent progress in pancreatic cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(5): 318-348
- [2] Lanza-Jacoby S, Yan G, Radice G, et al. Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D;Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 238(7): 787-797
- [3] Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, et al. Mouse models of pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol,

- 2012, 18(12): 1286-1294
- [4] Andrén-Sandberg A. Pancreatic cancer: Animal model and molecular biology [J]. N Am J Med Sci, 2011, 3(10): 441-450
- [5] Kitahashi T, Yoshimoto M, Imai T. Novel immunohistochemical marker, integrin α (V) β (3), for BOP-induced early lesions in hamster pancreatic ductal carcinogenesis [J]. Oncol Lett, 2011, 2(2): 229-234
- [6] Nozawa F, Yalniz M, Saruc M, et al. Effects of porcine pancreatic enzymes on the pancreas of hamsters. Part 2: carcinogenesis studies [J]. JOP, 2012, 13(5): 482-487
- [7] El-Ghamari M, Bergmann F, Schmied BM, et al. Islet cells contribute to pancreatic carcinogenesis in an animal model [J]. Pancreas, 2011, 40(2): 242-246
- [8] Clapper ML, Wood M, Leahy K, et al. Chemopreventive activity of Oltipraz against N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP)-induced ductal pancreatic carcinoma development and effects on survival of Syrian golden hamsters [J]. Carcinogenesis, 1995, 16(9): 2159-2165
- [9] Matsuzaki H, Schmied BM, Ulrich A, et al. In vitro induction of giant cell tumors from cultured hamster islets treated with N-nitrosobis (2-Oxopropyl)amine [J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 439-443
- [10] Müller SA, Bläuer K, Ergin G, et al. Long-term in vitro culture of hamster pancreatic β -cells and induction of adenocarcinoma by treatment with N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine [J]. Pancreatol, 2012, 12(4): 380-387
- [11] Hori M, Kitahashi T, Imai T, et al. Enhancement of carcinogenesis and fatty infiltration in the pancreas in N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine-treated hamsters by high-fat diet [J]. Pancreas, 2011, 40(8): 1234-1240

[收稿日期] 2013-05-29

欢迎投稿 欢迎订閱