

人胃癌裸鼠原位移植模型的 7T MRI 检测

黄菲菲¹, 王磊², 许庆华¹, 吴英³, 王昉彤^{4*}⁽¹⁾四川抗菌素工业研究所, 成都 610052; ⁽²⁾四川大学华西医院, 成都 610041;⁽³⁾四川普莱美行之生物科技有限公司, 成都 610041; ⁽⁴⁾成都大学, 成都 610106)

摘要 通过胶黏合法建立人胃癌裸鼠原位移植模型, 并使用 7T 核磁共振成像(7T MRI)动态检测原位肿瘤。将对数生长期人胃低分化腺癌 SGC-7901 细胞制成细胞悬液注射于裸鼠右腋下, 建立皮下移植模型; 以皮下移植瘤块为材料, 采用胶黏合法建立原位移植模型。造模约 20 d 后, 裸鼠进行 7T MRI 扫描, 并对胃部组织进行组织病理学检查。3 只裸鼠中 2 只胃部可见肿瘤疑似物, 组织病理学检查验证该疑似物为肿瘤, 成瘤率达 66.7%。实验结果表明, 7T MRI 对原位肿瘤可进行无创、动态的活体检测, 且无辐射伤害。MRI 检测有望用于临床前胃癌药物的研发以及临床胃癌的诊断。

关键词 SGC-7901 细胞; 胃癌; 原位移植瘤; 7T MRI; 检测

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)05-0625-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160521

引用本文 黄菲菲, 王磊, 许庆华, 等. 人胃癌裸鼠原位移植模型的 7T MRI 检测[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(5): 625-628.

Cite this article as: HUANG Feifei, WANG Lei, XU Qinghua, et al. MRI detection method for human gastric cancer orthotopic transplantation model in nude mice[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(5): 625-628.

MRI detection method for human gastric cancer orthotopic transplantation model in nude mice

HUANG Feifei¹, WANG Lei², XU Qinghua¹, WU Ying³, WANG Fangtong^{4*}

¹Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052; ²West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041; ³Sichuan Primed Shines Bio-tech Co., Ltd., Chengdu 610041; ⁴Chengdu University, 610106, China

Abstract The study aims to establish a human gastric cancer orthotopic transplantation model in nude mice and to use 7T MRI for detection. After poorly differentiated human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells were injected subcutaneously into the right flanks of nude mice, the model of in nude mice was established with orthotopic transplanted cancer of gastric tumor by the Compont[®] gel pasted method. 7T MRI scan was conducted on the mice after operating model about 20 days later. Histopathological examinations were carried out on the stomach. Two of three mice on which 7T MRI scan were performed showed visible suspected stomach tumor and their presence was verified again by histopathological examinations; tumor formation rate in the nude mice gastric orthotopic transplantation model was 66.7%. This study suggested that 7T MRI could be used in the live detection of *in situ* tumor and that MRI could be used for pre-clinical gastric cancer drug development and clinical gastric carcinoma diagnosis.

Key words SGC-7901 cells; gastric cancer; orthotopic transplantation tumor; 7T MRI; detection

在我国,胃癌居恶性肿瘤发病率及死亡率的第 3 位^[1]。尽管目前医疗技术高速发展,但胃癌仍然严重威胁人类生命。因此,建立一个理想的胃癌动物模型,对研究胃癌发病机制,寻找新的治疗方案

以及研发新型胃癌治疗药物具有至重要意义。

由于目前缺少合适方便的动态检测原位肿瘤大小的方法,致使人胃癌裸鼠原位移植模型在抗胃癌药物药效学研究中的应用受到极大限制,因此探

索一个动态准确方便的检测方法是临床前研究迫切需要解决的问题。临床应用的磁共振成像(MRI)磁场强度已逐步从 0.5T 发展到 3T,而目前 7T 的研究应用范围也不断扩大。相对于 3T MRI, 7T MRI 拥有更优越的空间分辨率、更高采集速度和更稳定的图像质量^[2]。本实验旨在建立人胃癌裸鼠原位模型,并初步探索 7T MRI 用于动态监测人胃癌原位移植模型的可行性,此外,MRI 在临床诊断胃癌的报道研究较少,本实验为 MRI 作为临床胃癌诊断检测手段提供一定的实验基础。

1 材料

1.1 试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、PBS 缓冲液(美国 Gibco 公司);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司);康派特医用胶(北京康派特医疗器械有限公司);造影剂 PB10(广州康臣药业有限公司);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.2 仪器

VIP3000 麻醉机(美国 Matrx 公司);BioSpec 70/30 USR 7T MRI(德国 Bruker 公司)。

1.3 动物

昆明小鼠 4 只,雌雄各半,6~8 周,雌性 20~25 g,雄性 23~25 g,购自成都达硕生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2013-24;BALB/c 裸小鼠 5 只,雌性,5~6 周龄,14~16 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。屏障系统下饲养[四川农业大学动物病原洁净实验室,动物实验室许可证号:SYXK(川)2014-187]。

1.4 细胞株

人胃低分化腺癌 SGC-7901 细胞购自南京科佰生物科技有限公司,该公司细胞株来自美国 ATCC 细胞库。

2 方法

2.1 人胃低分化腺癌 SGC-7901 组织块的制备及胃癌原位移植模型的建立

将人胃低分化腺癌 SGC-7901 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养至接种所需量时,收集细胞,显微镜下计数,用不含血清培养基稀释,最终使细胞含量为每毫升 1.05×10^7 个,取

0.2 mL 注入裸鼠右腋下。

当皮下移植瘤体积达 $1\,000\text{ mm}^3$ 以上时,将荷瘤鼠脱颈处死,无菌操作,从右腋下剥取肿瘤组织,剔除纤维包膜,切开选取生长良好的鱼肉状瘤组织,并切成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的小块,置于无血清培养基中备用。

裸鼠腹腔注射 60 mg/kg 的 0.5% 异戊巴比妥钠,常规皮肤消毒,沿左侧腹部正中旁线切开,切口约 1.5 cm,小心暴露腹膜、胃壁,用一次性注射针头轻微损伤胃大弯中部浆肌层,以出血为度。将 2 块肿瘤组织用康派特医用胶黏合在胃壁破损处。待胶干后逐层缝合。

2.2 动物体征观察

实验期间,每天对实验动物的体重变化、外观、行为、分泌物、排泄物、肿瘤生长情况、濒死和死亡情况等进行观察并记录。

2.3 7T MRI 扫描

2.3.1 成像条件选择 取 3 只正常昆明小鼠进行 7T MRI 扫描,实验前禁食 12 h,实验尝试不同线圈(小鼠体表线圈、大鼠体表线圈)、更换扫描序列(T2 序列、SE 序列、回波平面成像脉冲序列以及 T1 序列等)、调整参数以及增加呼吸门控,以得到最适宜成像条件,为后续实验的进行提供依据。整个实验过程中小鼠处于麻醉状态。

2.3.2 阴性对照 取正常昆明小鼠 1 只,实验前禁食 12 h,用 4% 异氟烷诱导麻醉,插胃管,进入 7T MRI 室,小鼠仰卧位固定,1% 异氟烷维持麻醉,采用大鼠体表线圈,行冠状面扫描,选择 T1 序列先行空白扫描,完成后缓慢灌胃造影剂 PB10 后立即进行扫描,扫描参数为:TR 200 ms,TE 8.3 ms,视野 $3.5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$,层厚 1.5 mm,层间距 1.5 mm,FA 180° ,矩阵 192×192 ,扫描时间 120 s。整个实验过程中小鼠处于麻醉状态。

2.3.3 人胃癌裸鼠原位移植瘤的 7T MRI 检测 胃癌原位移植瘤造模约 20 d 后(根据肿瘤生长情况而定),裸鼠禁食 12 h,3% 异氟烷诱导麻醉,插胃管,按“2.3.2”项下条件进行 7T MRI 检测。

2.4 解剖及组织病理学检查

对完成 7T MRI 扫描的动物进行解剖,观察胃部、肾脏、肝脏和膀胱是否有异常;取出胃部,将接种瘤块部位经 10% 甲醛固定,石蜡包埋、切片、HE 染色,做组织病理学检查。并取一只正常小鼠作为

阴性对照,将其胃部的相同部位同前法进行组织病理学检查。

3 结 果

3.1 瘤块生长情况

皮下移植模型:2 只裸鼠接种人胃腺癌 SGC-7901 细胞后肿瘤生长迅速,约 15 d 瘤块长至约 1 000 mm³ 时处死,取出瘤块。瘤块边界清晰,呈圆形或椭圆形,表面有结节状突起;切开,瘤组织呈鱼肉状,可见有大量血管增生,瘤块中心未出现坏死。

胃部原位接种瘤块后,每日肉眼观察及用手触摸胃部,1 只裸鼠于建模后第 10 天发现疑似肿瘤,其他裸鼠一直未发现肉眼可见或可触及的肿瘤,出现该情况的原因可能是由于肝脏将胃部肿瘤遮住,以至无法直观观察;胃癌原位移植瘤造模约 20 d 后进行 7T MRI 测定。

3.2 7T MRI 成象监测

对 3 只普通昆明小鼠进行 7T MRI 成像,探索最适成像条件可知:使用大鼠体表线圈和 T1 序列进行扫描,所得图像最清晰。普通昆明小鼠进行空白扫描时,小鼠胃部呈低信号,与周围组织信号强度相近,不易分辨;完成空白扫描后,灌胃造影剂扫描,小鼠胃部扩张,形态分明,整体呈高信号,与周围组织区分,且未见异物,见图 1。

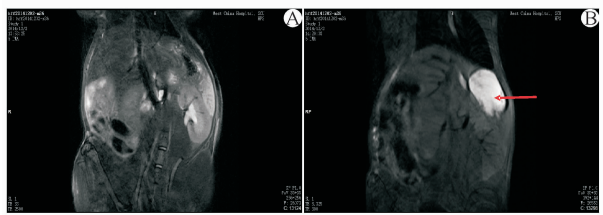


Figure 1 7T MRI detection of normal mouse
A: Before contrast agent gavage; B: After contrast agent gavage. Arrow points to the stomach

建立原位肿瘤移植模型的 3 只裸鼠进行 7T MRI 成像,空白扫描时,裸鼠胃部呈低信号,不易分辨;给予造影剂后,胃部扩张,整体呈高信号,两只裸鼠(2F03 和 3F01)胃部可见一低信号区域,判断为肿瘤疑似物,直径分别为 3.85 mm 和 4.25 mm,见图 2 和图 3;另 1 只裸鼠(3F03)胃部未见肿瘤疑似物。

3.3 解剖观察

对完成 7T MRI 扫描的 3 只裸鼠进行解剖后,

磁共振成像上见肿瘤疑似物的两只裸鼠(图 4-A 和 4-B)胃部接种部位可见瘤块明显生长;7T MRI 成像未见肿瘤疑似物的裸鼠(图 4-C),可见接种部位瘤块未生长。成瘤率为 66.7%。由于造影剂 PB10 为蓝色物质,故灌胃后导致胃部呈现蓝色。

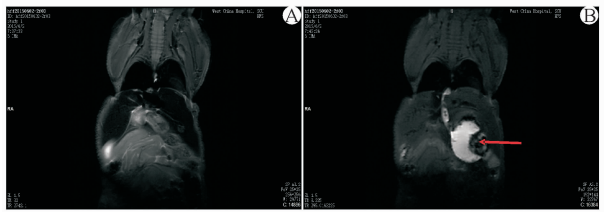


Figure 2 7T MRI detection of nude mouse 2F03
A: Before contrast agent gavage; B: After contrast agent gavage. Arrow points to the suspected tumor-like tissues

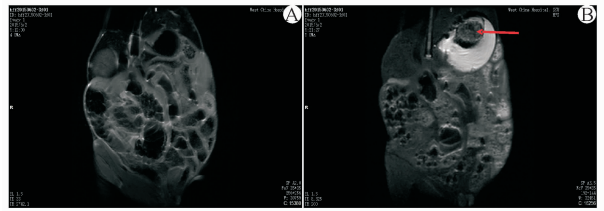


Figure 3 7T MRI detection of nude mouse 3F01
A: Before contrast agent gavage; B: After contrast agent gavage. Arrow points to the suspected tumor-like tissues

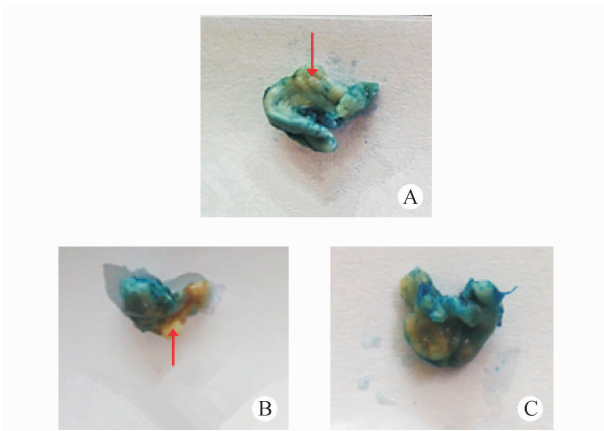


Figure 4 Anatomical structures of stomachs of nude mice 2F03 (A), 3F03(B) and the nude mouse without suspected tumor-like tissues detected by 7T MRI. Arrow points to the suspected tumor-like tissues

3.4 组织病理学检查

对小鼠进行病理学检查,HE 染色后置光镜下观察显示,与正常小鼠(图 5-A)相比,7T MRI 检测发现肿瘤疑似物的裸鼠(图 5-B),胃部接种部位细胞大量增生,排列杂乱,细胞核异形性明显、多见核分裂像,细胞变性坏死及凋亡,因其异型性明显,诊断为胃腺癌;7T MRI 检测未见肿瘤疑似物的裸鼠

(图5-C),胃底腺组织结构基本正常,轻度紊乱,局部可见淋巴细胞大量浸润,诊断为局部感染。

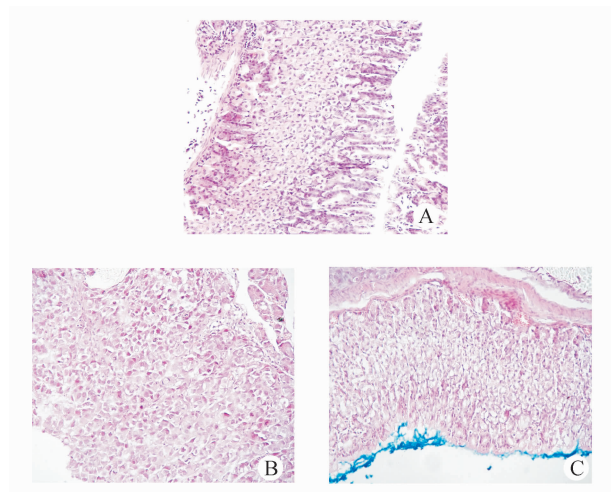


Figure 5 Histopathology of Stomach of mice (HE staining, $\times 200$)
A: Normal mouse; B: Nude mouse with suspected tumor-like tissues; C: Nude mouse without suspected tumor-like tissues

4 讨论

本实验通过原位移植建立人胃癌裸鼠原位模型,为避免缝合法、囊袋法等对动物造成较大伤害,本实验采用操作简单、创伤小、手术时间短、术中出血少、术后恢复快的胶粘合法^[3]建立本模型,从而提高模型成功率。由于本模型不受结缔组织包绕的影响,能形成血管新生,可比较真实地模拟临床肿瘤浸润转移过程,与胃癌的生物学行为比较相符。人胃癌裸鼠原位模型对于深入研究胃癌的转移机制和寻找新的治疗方法优于皮下移植模型,且该模型也为某些抗胃癌药物的筛选提供了方便。因此,进一步研究该动物模型具有良好的应用价值。

人胃癌原位移植模型用于抗胃癌药物药效的研究时,并无很好的动态监测肿瘤生长情况的检测手段,一般采用解剖^[4]或活体荧光成像^[5]技术,但 these 方法均不能很好地反映肿瘤实际生长情况。MRI 是一种简便、无创、有效的影像诊断手段,具有良好的时间和空间分辨率^[6]。已有研究采用 MRI 技术对肝癌治疗药物临床前药效进行评价,该研究表明, MRI 可作为临床前药效评价及肝癌检测的研究方法^[7],但目前鲜有 MRI 用于胃癌裸鼠移植模型检测的相关报道。而本实验采用的 7T

MRI 比 3T MRI 具有更高的信号噪音比和更高分辨率的图像,准确度更高。本实验通过 7T MRI 手段检测裸鼠原位胃癌,并通过解剖与组织病理学验证 7T MRI 结果,实验结果显示,7T MRI 检测结果与解剖、组织病理学相一致,表明本法对胃癌的判断准确度较高。7T MRI 采集图像中肿瘤清晰可见,并可测定其直径大小,能较为准确地判断肿瘤位置及生长情况。本检测方法操作简便,检测时间短,且无手术伤害,动物可根据实验需要,多次进行 7T MRI 扫描,观测肿瘤生长情况;且 7T MRI 检测,动物采用异氟烷诱导和维持麻醉,每次检测结束后,动物迅速苏醒,无需特殊照顾。

本实验成功地建立了人胃癌裸鼠原位模型,初步探索了 7T MRI 用于动态监测人胃癌原位移植模型的可行性,本检测方法还需要增加动物数进行进一步研究,为今后抗胃癌药物药效学研究以及临床胃癌检测提供一种新的检测方法。

参考文献

- [1] Chen WQ, Zhang SW, Zeng HM, *et al.* Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *China Cancer* (中国肿瘤), 2014, **2**(7): 61-61.
- [2] Sladky R, Baldinger P, Kranz GS, *et al.* High-resolution functional MRI of the human amygdala at 7T [J]. *Eur Radiol*, 2013, **82**(5): 728-733.
- [3] Shi J, Wei PW, 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.
- [4] Li Y, Li B, Xiang CP, *et al.* Characterization of gastric cancer models from different cell lines orthotopically constructed using improved implantation techniques [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, **18**(2): 136-143.
- [5] Hu H, Liu JT, Yao LP, *et al.* Real-time bioluminescence and tomographic imaging of gastric cancer in a novel orthotopic mouse model [J]. *Oncol Rep*, 2012, **27**(6): 1937-1943.
- [6] Giovagnoni A, Fabbri A, Maccioni F. Oral contrast agents in MRI of the gastrointestinal tract [J]. *Abdom Imaging*, 2002, **27**(4): 367-375.
- [7] Yao N, Zhang J, Huang JG, *et al.* Magnetic resonance imaging in evaluating the treatment of rat liver tumor with combretastatin A-4 phosphate [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(6): 558-562.