



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.010
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4132.shtml

· 基础研究 ·

小鼠活体肠镜平台的建立及其在肠道微腺瘤小鼠模型中的应用

刘志鹏, 欧阳国庆, 熊力, 刘忠涛, 邓小峰, 苗雄鹰, 文宇

(中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011)

摘要

目的: 建立小鼠活体肠镜平台, 为肠道肿瘤在小鼠模型中的研究提供新的手段。

方法: 将URF-V电子输尿管镜安装于内镜系统上, 构建小鼠活体肠镜平台。取44只6~14周龄APC^{Min/+}小鼠(具有自发性肠道多发性腺瘤特征)行麻醉下结直肠镜检查, 观察小鼠肠道腺瘤的大小与数量, 并行镜下肿瘤评分及取病变组织活检。

结果: 44只小鼠实施58例次操作, 3只死亡, 未见肠穿孔, 成功率为99.71%。1只未发现肿瘤, 其余小鼠发现明显的肿块, 肿瘤数量为(3.60±1.52)个, 肿瘤评分为3.26±1.29。活检病理结果显示, 病变为肠道管状腺瘤。

结论: 该研究建立的小鼠活体肠镜平台可安全、有效地应用于小鼠结直肠镜检查。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(12):1652-1657]

关键词

结直肠肿瘤; 结肠镜检查; 小鼠

中图分类号: R735.3

Establishment of living-mice colonoscopy platform and its application in intestinal adenoma mouse model

LIU Zhipeng, OUYANG Guoqing, XIONG Li, LIU Zhongtao, DENG Xiaofeng, MIAO Xiongying, WEN Yu

(Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Corresponding author: WEN Yu, Email: wenyu2861@163.com

ABSTRACT

Objective: To establish the living-mice colonoscopy platform, for providing a novel approach to study intestinal tumor in mice model.

Methods: The living-mice colonoscopy platform was constructed by installing an URF-V fiber ureteroscopy in the endoscope system, and then, 44 Apc^{Min/+} mice of 6- to 14-weeks old (characterized by spontaneous development of multiple intestinal adenomas) were used to conduct colonoscopic examination under anesthesia. The size and number of the adenomas were observed, and colonoscopic tumor scoring as well as tissue biopsy of the lesions were also performed.

Results: Colonoscopic examination was performed 58 times in the 44 mice, 3 mice died, no intestinal perforation was observed, and the success rate was 99.71%. No tumor formation was discovered in only one mouse, while significant tumor was observed in all the other mice, and the mean tumor number and score was 3.60±1.52

收稿日期: 2014-10-09; 修订日期: 2014-11-25。

作者简介: 刘志鹏, 中南大学湘雅二医院硕士研究生, 主要从事肝胆胃肠外科方面的研究。

通信作者: 文宇, Email: wenyu2861@163.com

and 3.26 ± 1.29 , respectively. Biopsy pathological examination showed that the lesions were intestinal tubular adenomas.

Conclusion: The living-mice colonoscopy platform established in this study can be safely and effectively applied in colonoscopic examination for mice.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(12):1652-1657]

KEYWORDS Colorectal Neoplasms; Colonoscopy; Mice

CLC number: R735.3

众所周知, 肠镜下对病变的直视观察具有不可替代的优势, 已成为临床上重要的肠道疾病诊疗手段^[1-2]。而作为医学研究的主要实验动物, 小鼠的肠道与人类的肠道相比有直径小、管壁薄、活动度差等特点, 因此肠镜检查未能常规应用于小鼠, 只能通过处死小鼠观察小鼠肠道黏膜病变, 或通过体质量减轻、饮食、便血等间接指标评估小鼠肠道疾病的严重程度^[3]。2001年 Huang 等^[4]首次提出小鼠肠镜可以在不处死小鼠的情况下安全地观察肠道病变、获取样本。由于缺乏合适的结直肠小鼠模型, 发展较慢。随后有作者改进了小鼠肠镜技术, 其可以在 1 h 内获得高分辨率的影像数据^[5]。2013年 Kodani 等^[6]使用一套可弯曲肠镜, 用于观察小鼠结肠炎和肠道肿瘤, 图像清晰度高, 可对病变进行内镜下评分。目前国内尚无活体小鼠肠镜技术报道, 笔者采用临床常用的电子输尿管镜等搭建了活体小鼠肠镜平台, 以小鼠自发肠道腺瘤模型为研究对象, 配合色素内镜技术, 实现了活体观察 Apc 基因突变小鼠 (Apc^{Min/+}) 肠道腺瘤的生长规律^[7], 并建立评分系统, 为将来进一步进行小鼠肠镜下研究干预打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Apc^{Min/+} (C57/BL6J-Apc^{Min/+}) 小鼠购自南京大学模式动物研究所, 野生型小鼠 (C57/BL6J) 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买获得, 4 只雄性 Apc^{Min/+} 小鼠, 8 只雌性 C57/BL6J 小鼠, 6~8 周龄, Apc^{Min/+} 雄性成年小鼠和野生型雌性 C57 成年小鼠以 1:2 的比例杂交, SPF 环境中饲养扩大种群。

1.1.2 主要设备与试剂 Olympus Visera OTV-S7 监视系统、Olympus CLV-S45 冷光源、Olympus

电子输尿管镜, 病检钳 (美国 Cook 公司), Sony 高清液晶监视器, ALC-HTP101 动物恒温系统 (上海奥尔科特生物科技有限公司), 小型动物呼吸机 DW3000-B (上海柯准仪器有限公司), 蛋白酶 K 及 dNTP 购自 Sigma 公司, PCR 引物由 invitrogen 合成, Taq 酶、Tris 饱和酚、氯仿从长沙捷欣公司订购。

1.2 实验方法

1.2.1 Apc^{Min/+} 小鼠鉴定 取小鼠趾头行 PCR 鉴定小鼠基因型, APC^{Min/+} 小鼠引物序列分别为野生型条带: 上游引物 5'-GCCATCCCTTCACGTTAG-3', 下游引物 5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC-3', 扩增长度为 600 bp; Apc 突变条带: 上游引物 5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC-3', 下游引物 5'-TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA-3', 扩增长度为 340 bp。反应条件为: 94 °C 变性 2 min、94 °C 30 s、50 °C 30 s、72 °C 1 min 充分延伸, 30 个循环 (图 1)。取 44 只 6~14 周龄 Apc^{Min/+} 小鼠 (雄: 雌 = 1:1) 行肠镜观察。

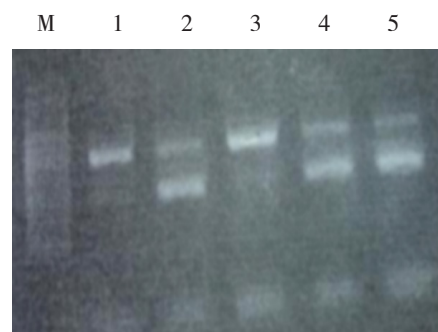


图 1 Min 基因 PCR 鉴定图 M: DNA 标记; 2、4、5: Min 基因阳性; 1、3: Min 基因阴性

Figure 1 PCR identification for Min gene M: DNA marker; 2, 4, 5: Min gene positive; 1, 3: Min gene negative

1.2.2 建立活体小鼠肠镜平台 麻醉小鼠之前, 根据说明书安装好内镜系统。电子输尿管镜为单工作通道, 视野范围为 0~85°, 前端外径为 6 F (1.2 mm),

工作长度为 680 mm；弯曲角度：向上：180°、向下：275°。调焦距及光源强度使距离 3~5 mm 的物体清晰成像^[7]。70% 酒精纱布消毒镜头，并用石蜡油润滑肠镜。将装满空气注射器连接于肠镜器械通道，进镜过程中注气不宜过快过多，以每次注气 1 mL，总量 2~3 mL 为适，注气时观察小鼠腹部膨胀程度。

1.2.3 麻醉 术前不禁食，经腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.4 mL/10 g)^[8]，以刺激小鼠下肢无挣扎为宜，麻醉成功后，予定容型正压呼吸，呼吸频率为 130 次/min，潮气量为 130 mL，吸呼比为 1:3，使用护眼膏保护小鼠的角膜。

1.2.4 观察肠道黏膜病变 将麻醉成功的小鼠取仰卧位固定于干净操作台上，使用一次性 3 mL 移液管经肛门注入生理盐水反复冲洗肠道，清除肠道内大便^[9]。助手显露小鼠肛门后，操作者手持肠镜经肛门插入，在显示肠壁的情况下，循腔进镜、适当滑进、轻柔到达结肠末端脾曲，距离肛门约 4~5 cm，进镜过程中注气不宜过快过多。退镜时开始录像，此时能清晰显示肠道黏膜，同时通过软件采集图片，抓拍图片供后期分析使用，退出肛门后，停止录像及拍照^[10]。

1.2.5 肿瘤的评分 在肠道充气的情况下观察肿瘤，根据肿瘤的大小对肿瘤进行评分，肿瘤平均体积意味着肿瘤发展的进程，需计数肠镜下观测所有肿瘤，肿瘤大小分 5 级，1 级：很小，镜下可见；2 级：肿瘤侵犯 1/8 肠壁；3 级：肿瘤侵犯 1/4 肠壁；4 级：肿瘤侵犯 1/2 肠壁；5 级：肿瘤侵犯 1/2 以上肠壁^[11-12] (1 级记为 1 分)。通过测量

进入肠镜的距离，可以计算每个瘤子的具体部位，为下次评估进行精确定位。

1.2.6 术中取活检 插入肠镜到达病变部位，经活检孔道插入活检钳，使活检钳处于视野中央，距离病变部位合适距离，助手辅助张开活检钳并取病变组织。为了避免损伤正常肠壁，活检钳张开角度不宜过大，以 60~80° 为宜。样本经常规 10% 中性福尔马林固定，脱水，石蜡包埋，连续 4 μm 厚切片，二甲苯脱蜡，乙醇梯度水化，HE 染色后进行病理学观察。

1.2.7 色素内镜检查 退出肠镜的同时，经肠镜操作孔注入 1% 亚甲蓝 0.5 mL，使用生理盐水冲洗活检孔内残留亚甲蓝，3 min 后，再次插入肠镜达可疑病变部位，观察直结肠隐窝及黏膜改变^[13-15]。肠镜观察结束后，将小鼠置于恒温板上复苏，复苏后独立饲养。

2 结果

2.1 模型概况

44 只 APC^{Min/+} 小鼠进行了 58 次肠镜检查，每只小鼠行肠镜检查需 3~5 min，其中 1 只小鼠在实施肠镜过程中死亡，2 只小鼠术后 24 h 内死亡，成功率为 99.71%，解剖死亡的 3 只小鼠未见肠穿孔。43 只小鼠发现明显的肿块，小鼠肿瘤个数为 (3.60 ± 1.52) 个，肿瘤评分为 3.26 ± 1.29。其中 14 只为第 2 次肠镜检查，间隔时间为 1 周，第 2 次肠镜后 14 只小鼠均存活。小鼠肿瘤数目、肿瘤评分与周龄的关系见图 2。

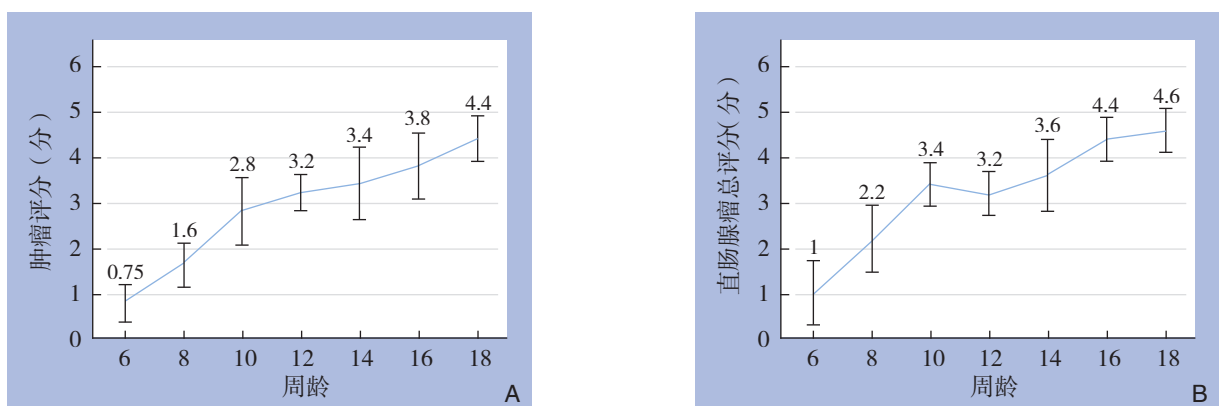


图 2 Apc^{Min/+} 小鼠直肠腺瘤发展规律 A: 小鼠周龄与肿瘤数目的关系; B: 小鼠周龄与肿瘤评分的关系

Figure 2 Development of intestinal adenoma in Apc^{Min/+} mice A: Relationship between weeks of age and tumor number of the mice; B: Relationship between weeks of age and tumor score of the mice

2.2 肠道黏膜所见

镜下正常小鼠肠道黏膜光滑、半透明、有光泽, 而且血管纹路清晰 (图 3)。肠道腺瘤生长部位黏

膜增厚, 外生为椭球状或带蒂息肉, 质地较致密, 失去原有的光泽、血管变形甚至会有出血 (图 4)。

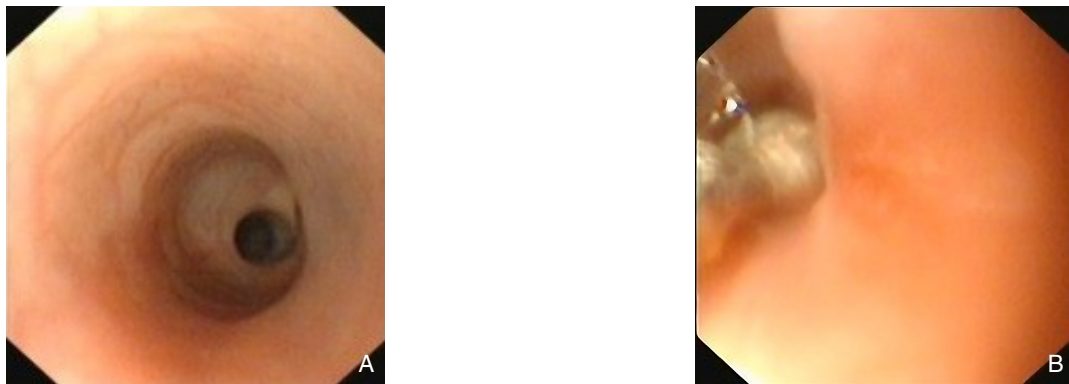


图 3 镜下所见
Figure 3 Colonoscopic findings
A: 正常肠道黏膜; B: 活检钳进入结肠
A: Normal intestinal tract; B: Biopsy forceps entering the colon

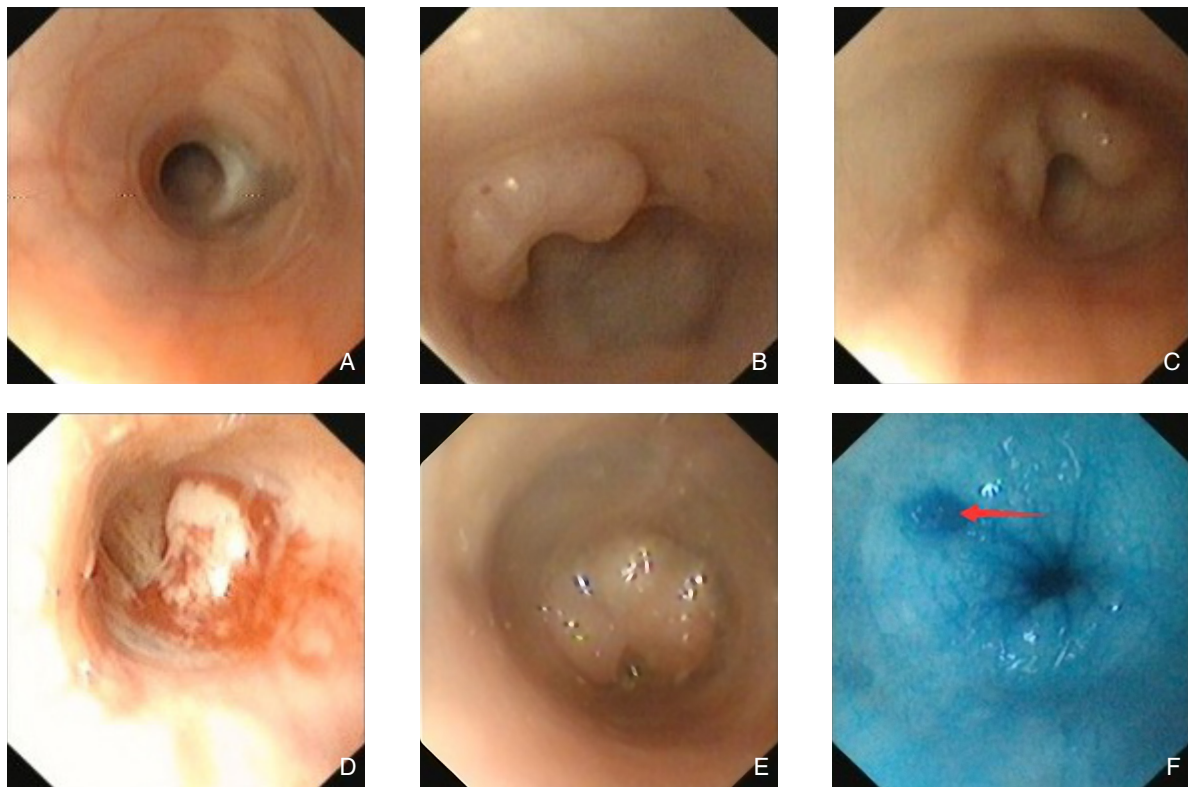


图 4 内镜下肿瘤的分级 A: 1 级 (镜下可见); B: 2 级 (肿瘤侵犯 1/8 肠壁); C: 3 级 (肿瘤侵犯 1/4 肠壁); D: 4 级 (肿瘤侵犯 1/2 肠壁); E: 5 级 (肿瘤侵犯 1/2 以上肠壁); F: 直肠黏膜亚甲蓝染色 (箭头指示染色内镜下早期肿瘤)
Figure 4 Tumor grading under colonoscope A: Grade 1 (visible under colonoscopy); B: Grade 2 (1/8 intestinal wall invasion); C: Grade 3 (1/4 intestinal wall invasion); D: Grade 4 (1/2 intestinal wall invasion); E: Grade 5 (more than 1/2 intestinal wall invasion); F: Rectal mucosal methylene blue staining (arrow showing the tumor of early-stage under colonoscope)

2.3 活检病理切片

行肠镜检查前, 需确定小鼠已完全麻醉, 避免造成小鼠肠壁黏膜损伤, 小鼠肠壁有炎症或者肿瘤会导致肠壁增厚, 一般不会因取活检导致穿孔, 显

微镜下观察样本组织病理形态可见其腺管呈现不规则分支, 有共壁现象, 瘤细胞具有复层化, 核具有明显异型性, 上浮至腔缘, 极向消失, 黏膜下层未见腺体侵袭浸润, 符合肠道管状腺瘤 (图 5)。

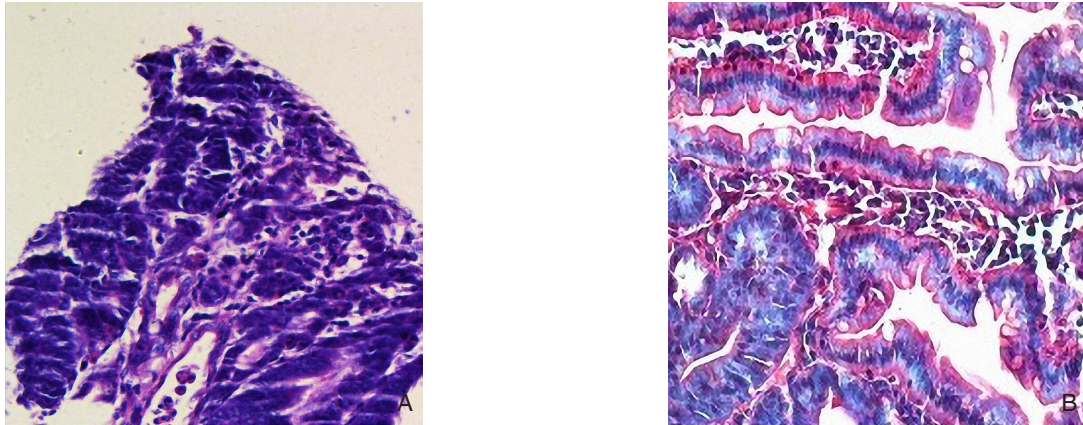


图 5 小鼠肠道腺瘤 HE 染色 A: 20 倍; B: 40 倍

Figure 5 HE staining for the intestinal adenoma of the mice A: 20-fold image; B: 40-fold image

3 讨论

由于小鼠繁殖力强、成熟早、饲养方便,因此小鼠模型成为研究人类各种疾病的重要工具。研究人员已经建立了多种肠道炎症及结直肠肿瘤的实验模型,其中较多的是人结直肠癌移植瘤动物模型,而对结直肠癌自发瘤模型的研究较少。本实验使用的 $Apc^{Min/+}$ 小鼠品系,是在小鼠同源 APC 基因第 850 位点发生无义突变,造成其肠道多发腺瘤,被认为是一种良好的家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 小鼠模型^[16]。CT、MRI 等多种动物活体成像系统已研发,而肠镜是诊断肠道疾病、评估治疗效果的金标准^[17]。

本研究中,笔者在 Becker C 尝试的小鼠肠镜实验方案的基础上^[10],借助临床胆道镜系统和电子输尿管镜,通过改良后建立了活体小鼠肠镜平台,并初步应用于 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠微腺瘤模型,观察小鼠肠道腺瘤的大小、质地、部位、数量,并留取视频和高清图片。不处死小鼠通过肠镜活检孔取样本供进一步分析,可以动态的监控小鼠肠道病变严重程度,评估治疗早期的疗效,这个方法能有效控制实验所需小鼠数量。

小鼠肠镜成功率为 97.71%,跟相关文献报道一致^[4-5],本次实验中 2 只小鼠麻醉后 24 h 内死亡,与疾病晚期及体质量下降,麻醉耐受降低有关。麻醉前对小鼠的全身状况进行评估,经腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.4 mL/10 g) 开始,而后再按 (0.15 mL/10 g) 逐渐追加麻醉剂量,但麻醉不宜过浅,麻醉不足会引起小鼠挣扎而导致肠穿孔。1 只小鼠于实施肠镜过程中死亡,由于肠道过度充

气,引起腹内高压和膈肌上抬,小鼠呼吸循环障碍引起死亡。因此操作过程中充气时以每次 1 mL 为适,总量约 2~3 mL,小鼠腹部胀气明显,则立即减慢充气的速度或停止操作。考虑到肠镜检查低死亡率,对疾病晚期小鼠仍是安全的。

肠道的肿瘤分布在肠道,小鼠肠道从肛门到结直肠左肾水平呈直线向上,至此以 90° 角直转右上腹部 (图 6),肠镜只能到达距肛门 4~5 cm 处,不能对更深的肠管进行观察。采用 Becker C 肿瘤评分方法,评分结果与实际大小成明显相关性^[18],但各级波动范围大,超大型腺瘤也归于 5 级。小鼠肠镜同样也存在着学习曲线,随着操作者经验的积累,操作时间更短,每只小鼠行肠镜检查仅需 3~5 min,避免耗时过长导致不必要的伤害。

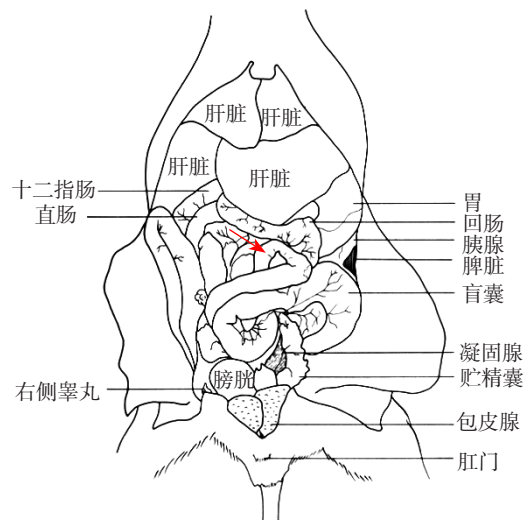


图 6 小鼠解剖模式图 (箭头所指为肠镜到达部位)

Figure 6 Anatomic sketch of mouse (arrow showing the reaching site of the colonoscope)

综上所述, 本研究已经建立一套能通过小鼠肠镜观察、诊断肠道病变、不处死小鼠通过肠镜活检孔对肠道病变组织取活检。可以动态的监控小鼠肠道病变发生及发展, 评估干预早期的疗效, 这个方法能有效的控制实验的小鼠数量, 从而控制实验的费用。小鼠肠镜与 CT 仪器相比价格便宜^[19-20], 还可以通过肠镜与治疗方法相结合的方法用于肠道肿瘤的治疗, 如光动力治疗。小鼠肠镜是安全、可重复, 快速的, 值得推广。

参考文献

- [1] Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, et al. A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(24):1766-1772.
- [2] Gollub MJ, Schwartz LH, Akhurst T. Update on colorectal cancer imaging[J]. *Radiol Clin North Am*, 2007, 45(1):85-118.
- [3] Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2000, 15(3):144-160.
- [4] Huang EH, Carter JJ, Whelan RL, et al. Colonoscopy in mice[J]. *Surg Endosc*, 2002, 16(1):22-24.
- [5] Becker C, Fantini MC, Wirtz S, et al. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy[J]. *Gut*, 2005, 54(7):950-954.
- [6] Kodani T, Rodriguez-Palacios A, Corridoni D, et al. Flexible colonoscopy in mice to evaluate the severity of colitis and colorectal tumors using a validated endoscopic scoring system[J]. *J Vis Exp*, 2013, 16(80):e50843. doi: 10.3791/50843.
- [7] Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene[J]. *Science*, 1992, 256(5057):668-670.
- [8] 吴伟芳, 林剑鸣, 张南文. 水合氯醛在 C57BL/6 小鼠麻醉中的应用研究 [J]. *海峡药学*, 2013, 25(9):43-44.
- [9] Olson TJP, Halbeg RB. Experimental small animal colonoscopy[J]. *Colonoscopy*, 2011, 19:309-327.
- [10] Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(6):2900-2904.
- [11] Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling[J]. *Immunity*, 2004, 21(4):491-501.
- [12] Wang CS, Hsueh S, Chao TC, et al. Prognostic study of gastric cancer without serosal invasion:reevaluation of the definition of early gastric cancer[J]. *J Am Coll Surg*, 1997, 185(5):476-480.
- [13] Peitz U, Malfertheiner P. Chromoendoscopy: from a research tool to clinical progress[J]. *Dig Dis*, 2002, 20(2):111-119.
- [14] Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4):880-888.
- [15] Jung M, Kiesslich R. Chromoendoscopy and intravital staining techniques[J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 1999, 13(1):11-19.
- [16] McCart AE, Vickaryous NK, Silver A. Apc mice: models, modifiers and mutants[J]. *Pathol Res Pract*, 2008, 204(7):479-490.
- [17] Bond JH. Colon polyps and cancer[J]. *Endoscopy*, 2003, 35(1):27-35.
- [18] Adachi T, Hinoi T, Sasaki Y, et al. Colonoscopy as a tool for evaluating colorectal tumor development in a mouse model[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2014, 29(2):217-223.
- [19] Druke BY, Shinki K, Newton MA, et al. Longitudinal assessment of colonic tumor fate in mice by computed tomography and optical colonoscopy[J]. *Acad Radiol*, 2009, 16(12):1475-1482.
- [20] Hull CC, Stellato TA, Ament AA, et al. Endoscopic and radiographic evaluation of the murine colon[J]. *Cancer*, 1990, 66(12):2528-2532.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘志鹏, 欧阳国庆, 熊力, 等. 小鼠活体肠镜平台的建立及其在肠道微腺瘤小鼠模型中的应用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(12):1652-1657. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.010

Cite this article as: LIU ZP, OUYAN GQ, XIONG L, et al. Establishment of living-mice colonoscopy platform and its application in intestinal adenoma mouse model [J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(12):1652-1657. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.010