

文章编号:1005-6947(2006)03-0177-04

· 实验研究 ·

人肝门部胆管癌转移动物模型的建立及生物学特性研究

周晋生^{1,2}, 吴小鹏¹

(1. 山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012; 2. 济南军区总医院 普通外科, 山东 济南 250031)

摘要:目的 利用人肝门部胆管癌细胞系(FRH-0201)接种裸鼠脾脏,建立肝、肺转移模型。方法 将FRH-0201细胞系(120代)接种于7只Balb/c裸小鼠脾脏。出现转移时,将转移瘤行组织病理学及超微结构观察。将转移的肿瘤行细胞培养,再次接种裸鼠脾脏,观察转移成瘤情况。结果 脾脏局部成瘤率为100%(7/7),转移瘤发生率14.3%(1/7)。转移瘤细胞再次接种于裸小鼠脾脏,转移发生率100%。转移瘤电镜显示典型恶性细胞特征。转移瘤细胞染色体众数19条,主流范围18~44条。结论 该实验所建立的肝门部胆管癌转移瘤,符合恶性肿瘤的特点,与人肝门部胆管癌生物学特性一致。

关键词:胆管肿瘤/动物模型;胆管肿瘤/病理

中图分类号:R735.8 **文献标识码:**A

Establishment and characteristics of metastatic tumor model of hilar cholangiocarcinoma

ZHOU Jin-sheng^{1,2}, WU Xiao-peng¹

(1. Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. Department of General Surgery, the General Hospital of Jinan Army of PLA, Jinan 250031, China)

Abstract: **Objective** To establish a novel liver and lung metastatic tumor model in nude mice by splenic inoculation of hilar cholangiocarcinoma cell line. **Methods** Human hilar cholangiocarcinoma cell line (FRH-0201 cells) was established and cultured with a fresh human hilar cholangiocarcinoma specimen. The spleen of 7 nude mice was injected with 0.1 ml of hilar cholangiocarcinoma cell suspension (1.5×10^7 cell). The tumor appearing time, tumor local and metastatic formation rate, histological, morphological and ultrastructure of metastatic tumor cell were observed. The sub-cell line was obtained by culture of metastatic specimen, and sub-cell line cells were again injected into the lower pole of the spleen and metastatic tumor formation rate was observed again. **Results** The overall local tumor formation rate in spleen was 100%, and metastatic tumor formation rate was 14.3%. The sub-cell line cells that were re-inoculated in mice spleen, had a metastatic tumor formation rate of 100%. Morphological observation of metastatic tumor showed the common features of cholangiocarcinoma. Chromosome number showed a variation of 18~44. **Conclusions** The hilar cholangiocarcinoma metastatic tumor model that was established in this laboratory had characteristics compatible with malignant tumor and had all the biological characteristics of human hilar cholangiocarcinoma.

Key words: Bile Duct Neoplasms/animal model; Bile Duct Neoplasms/pathol

CLC number: R735.8 **Document code:** A

胆管癌是胆道系统常见的恶性肿瘤,而肝门部胆管癌占胆管癌的半数以上,手术切除率低,而放

疗、化疗效果均差,预后最差^[1]。目前国内鲜见有可供研究用的、技术成熟的以肝门部胆管癌细胞系建立的转移模型。本研究采用肝门部胆管癌原发灶的细胞系,建立了肝门部胆管癌的脾脏成瘤和转移模型。旨在为研究肝门部胆管癌的生物学特性提供良好的动物模型。

基金项目:山东省科技厅基金资助项目(00313017)。

收稿日期:2005-08-31; **修订日期:**2006-02-27。

作者简介:周晋生,男,山东滕州人,山东大学齐鲁医院(现在解放军济南军区总医院)副主任医师,主要从事胆道肿瘤方面的研究。

通讯作者:吴小鹏 电话:0531-82169416。

1 资料与方法

1.1 材料

FRH-0201 人肝门胆管癌细胞系由山东大学齐鲁医院普外科吴小鹏建立^[2]。实验动物为 BALB/C nu 裸小鼠,购自山东大学实验动物中心;4~6 周龄,体重 10~20 g,雄性。无特殊病原菌(SPF)条件下饲养。

1.2 试验方法

1.2.1 转移模型的建立

1.2.1.1 原代移植 (1)收集细胞:FRH-0201 细胞传代培养至 120 代时,在其呈对数生长期时收集细胞,制成细胞悬液,浓度为 1.5×10^8 个活细胞/mL 悬液。(2)接种:裸鼠 7 只分次接种。用酒精消毒裸鼠腹部皮肤,0.25% 戊巴比妥钠 0.25 mL 腹腔注射麻醉后,取左上腹横切口;暴露脾脏中下极,用 1 mL 注射器从脾下极进针,缓缓注入 FRH-0201 细胞悬液 0.1 mL(含 1.5×10^7 个细胞);拔出针头后用明胶海绵轻轻压迫,关腹。术后继续 SPF 条件饲养。

1.2.1.2 转移病灶的移植 (1)原代移植的裸鼠出现恶液质时,处死并解剖裸鼠,取其肝、肺转移灶进行细胞培养。(2)细胞传代至第 50 代时,再次接种裸鼠 7 只,并作相应观察。

1.2.2 形态学研究 裸鼠原代、传代移植瘤组织、培养细胞常规制备样本,进行光镜观察,转移瘤电镜观察。

1.2.3 染色体分析 常规制备转移灶细胞的染色

体,确定其核型及众数。

2 结果

2.1 成瘤时间

2.1.1 原代移植 7 只动物均在术后 2~3 周出现腹部膨隆,腹部可见肿块且逐渐增大,裸鼠逐渐出现恶液质,6~8 周接近死亡。出现转移的裸鼠有 1 只在术后 48 d 时接近死亡(图 1)。

2.1.2 传代移植瘤情况 接种 4~7 d 后出现脾区结节,10 d 左右腹部可见明显膨隆,腹部肿块,裸小鼠消瘦,并迅速出现恶液质,2~3 周即接近死亡。肿瘤生长相对较慢的有 2 只,5 周接近死亡(图 2)。

2.2 成瘤率

2.2.1 原代成瘤率 脾脏局部成瘤率 100% (7/7),转移瘤发生率 14.3% (1/7)。

2.2.2 传代移植瘤成瘤率 脾脏局部成瘤率 100% (7/7);7 只裸鼠全部发生转移性肿瘤,总转移率 100%;其中肝转移发生率 85.7% (6/7),肺转移发生率 14.3% (1/7)。

2.3 形成的肿瘤特点

2.3.1 原代移植瘤的情况 7 只裸鼠脾脏局部均成瘤,肿瘤长径 3~4 cm,瘤体巨大,均与腹部或背侧皮肤粘连,可见较粗大的血管。瘤体均呈实性,切面红白相间。出现转移的裸鼠有 1 只解剖发现有肝、肺转移:肝转移灶 5 个,较小,灰白色,如针头大小;左肺转移灶 8 个,大者 0.6 cm,右肺 5 个,大者 0.3 cm,呈球形或椭球形,光滑如腊样(图 3,4)。腹水约 1.5 mL,血性,腹膜有粟粒样种植结节。

图 1 第 1 代转移瘤的裸鼠

图 2 第 2 代转移瘤的裸鼠

图 3 第 1 代肺转移瘤

图 4 第 1 代裸鼠肝转移瘤

2.3.2 传代移植瘤情况 脾脏局部成瘤 7 只,肿瘤大小形态等与原代肿瘤细胞所致肿瘤相似。6 只 (6/7) 发现肝转移,转移灶为多发,瘤体相互融合,

严重者肝脏几被肿瘤占据,仅存少许正常肝组织(图 5)。肺转移 1 只 (1/7),两肺各 1 个转移病灶,其中右肺转移灶较大,长径约 0.6 cm。

2.4 肿瘤病理学观察

2.4.1 肝、肺转移灶及脾脏种植肿瘤组织病理学检查 光镜下见:大量的梭形细胞,较杂乱,细胞核

大呈卵圆形或不规则形,核染色质粗,核仁清晰。少量大的圆形细胞,核大圆形,胞浆少(图6,7)。

图5 第2代肝转移灶

图6 肺转移瘤病理切片($\times 100$)

图7 肝转移瘤病理切片($\times 200$)

2.4.2 转移瘤透射电子显微镜观察 肿瘤细胞呈梭形和圆形,细胞表面可见微绒毛,胞浆减少,细胞核增大,双核,核不规则、畸形,核疏松、染色质边集、多核仁及核分裂相;线粒体水肿变性,可见大量粗面内质网,细胞间见桥粒连接。梭形细胞占大多数(图8)。

灶,不一定能完全代表原发灶癌细胞所有群体,而代表了浸润和转移能力较强的细胞群体^[4]。本实验所用FRH-0201细胞系,系自肝门部胆管癌组织取材培养而成,因而代表性更为全面。

裸小鼠体内建立人类肿瘤转移模型,已成为研究人癌转移机制和抗肿瘤转移治疗的重要试验方法。但常规的皮下置入途径少见转移^[5],其原因是异位置入环境不利于恶性肿瘤生物学特性的表达^[6]。原位移植可建成良好的转移模型,张国锋^[7]等用肿瘤组织种植于裸鼠结肠壁,取得良好的人结肠癌裸鼠原位种植瘤及转移模型。Kozlowski^[8]提出研究人类肿瘤肝脏转移的最佳模式是从脾内置入,肝和肺是消化系统血行转移的主要脏器。本实验模型应用类似的转移模式。目前,国外有肝门部胆管癌细胞建系,裸鼠脾脏接种发现肝转移的报道^[9];其细胞系来源是胆管癌肝门淋巴结转移灶,其接种发生转移率是25%,而且仅有肝转移,仅有1个转移病灶。

图8 肝转移灶扫描电镜显示细胞间桥粒连接及畸形细胞核($\times 8000$)

2.5 染色体分析

转移瘤细胞染色体众数为19条。主流范围在18~44,多为亚单倍体(图9)。

FRH-0201细胞第120代接种裸鼠脾脏,可见到肺和肝转移,但转移发生率较低,肿瘤生长较慢。应用其转移病灶再次细胞培养,第二代接种后,肿瘤生长明显加快,转移发生率高,转移广泛,转移程度严重。传代重复性良好。FRH-0201细胞经多次传代(本次使用的是第120代)仍能保持其高度的致瘤性特点,且有高度转移性。

图9 转移瘤细胞染色体($\times 1000$)

3 讨论

关于人肝门部胆管癌动物模型的建立,目前国内仅有范毓东^[3]建立皮下荷瘤鼠模型。该模型采用QBC939细胞系来源于胆管癌患者的肝转移病

病理检查显示:肝、肺肿瘤HE染色呈典型的转移瘤表现。转移病灶的梭形及圆形细胞来自FRH-0201中的梭形及圆形细胞。电子显微镜检

查特点也符合恶性上皮性肿瘤特性。

总之两代转移瘤外观、病理类型、超微结构均保持人胆管癌的特点。故认为,本实验所建立的转移瘤模型符合人肝门部胆管癌的一般规律,生长已稳定,重复性好,表现为极强的致瘤性。本结果为进一步研究肝门部胆管癌的生物特性提供了良好的研究平台。

参考文献:

- [1] 邹衍泰,李朝龙.影响胆管癌预后的因素[J].中国普通外科杂志,2001,10(1):71-73.
- [2] 吴小鹏,王占民,何晓冉,等.肝门部胆管癌细胞系(FRH-0201)的建立及生物学特性研究[J].中华医学杂志,2005,85(25):1784-1785.
- [3] 范毓东,李开宗,孙岚,等.人胆管细胞癌和瘤裸鼠模型的建立[J].中华肝胆外科杂志,2000,6(6):420.
- [4] 王曙光,韩本立,段恒春,等.肝外胆管癌细胞系的建

立[J].中华实验外科杂志,1997,14(2):67.

- [5] Manzotti C, Audisio RA, Pratesi G. Importance of orthotopic implantation for human tumors model systems: reference to metastasis and invasion [J]. Clin Exp Metastasis, 1993, 11(1):5-14.
- [6] Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G. H. A. clowes memorial award lecture [J]. Cancer Res, 1990, 50(19):6130.
- [7] 张国锋,王元和,王强.人结肠癌裸鼠原位种植瘤及转移模型的建立[J].中国普通外科杂志,2003,12(11):823-826.
- [8] Kozlowski JM, Fisler IJ, Campbell DE, et al. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse [J]. Cancer Res, 1984, 44(8):3522-3529.
- [9] Yamada N, Chung YS, Arimoto Y, et al. Establishment of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (OCUCh-LM1) and experimental liver metastatic model [J]. Br J Cancer, 1995, 71(3):543-548.

文章编号:1005-6947(2006)03-0180-01

· 病例报告 ·

横结肠系膜裂孔疝 1 例

戴普席, 夏开栋

(云南省宣威市人民医院 普通外科, 云南 宣威 654000)

关键词:腹内疝; 结肠系膜; 病例报告

中图分类号:R657.2 文献标识码:D

患者 男,26岁。无诱因因突发上腹阵发性绞痛伴停止排气、排便17h急诊入院,无外伤手术史。体查:体温38.5℃,脉搏74次/min,呼吸20次/min,血压100/70mmHg。一般情况可,神清,急性痛苦面容。腹稍胀,上腹剑突下可见肠型,压痛,无肌卫反跳痛。似可触及6cm×5cm×5cm大小包块,

边界欠清、光滑,活动可,质软,触痛,移动性浊音(-),肠鸣音活跃,可闻气过水声。腹透示:左膈下可见一宽大液平,左中上腹可见2个短小液平,为肠梗阻征象。B超示:腹腔内部份肠管扩张。血常规:白细胞 $14.1 \times 10^9/L$,中性粒细胞0.88,凝血4项(-),肝功能、血糖、电解质检查均在正常范围。入院诊断:机械性肠阻。经保守治疗未见好转,行手术治疗。术中见:距Treitz韧带80cm处有约40cm空肠从横结肠细根部裂孔通过胃后壁、胰腺后方至小网膜腔内形成闭袢嵌顿,肠管血运差。裂孔光滑、质

韧、入口约0.5cm,出口2cm,扩大裂孔,回纳肠管,回纳后,血运及蠕动恢复,行裂孔修补,术后治愈出院。

讨论 由腹内疝引起的肠梗阻占肠梗阻的0.22%~0.35%,但以先天性回肠系膜裂孔疝居多,后天性系膜裂孔疝由外伤、手术、炎症造成。本例无外伤手术史。术中见小网膜裂孔呈圆形光滑,质硬韧、属先天性系膜裂孔疝。先天性小网膜系膜裂孔疝极为罕见,术前很难做出正确诊断,术中才得以确诊。其治疗原则同机械性肠梗阻。

收稿日期:2005-04-28。

作者简介:戴普席,男,云南宣威人,云南省宣威市人民医院副主任医师,主要从事普通外科临床方面的研究。

通讯作者:戴普席 电话:0874-716414