

· 论 著 ·

昆明种小鼠肺肿瘤模型的建立

金伟¹, 雷林²

1.四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 2.四川省自然资源科学研究所

摘要: **目的** 采用尿烷和二丁基羟基甲苯建立昆明种小鼠肺肿瘤短期诱发模型。**方法** 200只SPF级昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机纳入低、中、高3个剂量组和对照组。低、中、高剂量组小鼠分别一次性腹腔注射50、100、200 mg/kgbw尿烷, 1周后每天喂饲含0.75%二丁基羟基甲苯的软饲料, 连续2周; 对照组注射蒸馏水, 每天喂饲普通软饲料。第15周末处死小鼠并取出肺脏, 计数各叶肺表面肿瘤数并固定; 将肿瘤逐个取材, 余下肺组织切成1~2 mm厚的组织块, 行常规石蜡切片、HE染色并在光镜下观察。**结果** 低、中、高剂量组和对照组小鼠肿瘤发生率分别为14.00%、24.00%、38.00%和2.00%, 发生肿瘤数分别为8、22、47和1个, 肿瘤恶化率分别为12.50%、18.18%、27.66%和0。中、高剂量组小鼠肺肿瘤发生率、肿瘤数均大于对照组 ($P < 0.05$); 各剂量组小鼠肺肿瘤发生率、肿瘤数和肿瘤恶化率均随尿烷剂量增加而增加, 呈剂量-反应关系 ($P < 0.05$)。**结论** 昆明种小鼠肺肿瘤短期诱发模型建模成功, 剂量-反应关系明显, 成瘤率较高。

关键词: 肺肿瘤; 尿烷; 二丁基羟基甲苯; 小鼠模型

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 12-1225-04

The establishment of Kunming mouse models of lung tumor

JIN Wei*, LEI Lin

**Sichuan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan 610041, China*

Abstract: Objective To establish Kunming mouse models of lung tumor rapidly induced by urethane and butylated hydroxytoluene (BHT). **Methods** Two hundred Kunming mice of SPF grade were randomly assigned to one control group and three experimental groups. The mice in the experimental groups were intraperitoneally injected with urethane at the dosage of 50, 100 and 200 mg/kg (low, medium and high dose), after one week, they were fed with fodder containing 0.75% BHT every day for two weeks; while the mice in the control group were injected with distilled water and were fed with normal fodder without BHT. At the 15th week, the lungs of all the mice were removed, tumors were counted and collected. The remaining lung tissue was cut into blocks of 1-2 mm thick, followed by paraffin section, HE staining, and was observed under light microscope. **Results** The incidence rates of lung tumors in Kunming mice of the low-, medium-, high-dose group and the control group were 14.00%, 24.00%, 38.00% and 2.00%; the number of tumors were 1, 8, 22, 47; the proportion of malignant tumors were 12.50%, 18.18%, 27.66% and 0. The incidence rate and the number of tumors in medium- and high-dose group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The incidence rate, the number of tumors and the proportion of malignant tumors increased with the dosage of urethane, which indicated a dose-response relationship ($P < 0.05$). **Conclusion** The Kunming mouse models of lung tumor rapidly induced by urethane and BHT were established successfully, with significant dose-response relationship and tumorigenesis.

Key words: Lung tumor; Urethane; Butylated hydroxytoluene; Mouse model

目前我国肺癌发生率呈逐年上升趋势, 已成为人群恶性肿瘤死亡的主要原因^[1-2]。通过对肺癌组织学类型的研究发现, 腺癌已成为人类肺癌的主要类

型^[3-4], 但腺癌在临床上缺乏早期病变特征, 借助肺肿瘤动物模型更便于认识其发生发展规律, 并在较短时间内对受检物的致癌性作出初步判断^[5-6]。制备肺肿瘤动物模型的方法很多, 分为诱发性、移植性和转基因性^[7-11], 目前多使用多环烃类、亚硝胺类、氨基甲酸酯、烷化剂等化学物质诱发肺癌模型, 因该类

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.12.008

作者简介: 金伟, 硕士, 副主任医师, 主要从事卫生毒理工作

通信作者: 金伟, E-mail: qgmw6970@163.com

肺癌模型与人体肺癌的病理特征相似^[12]。尿烷诱导的小鼠肺肿瘤模型由于诱癌时间较短、成瘤率较高而成为相对理想的模型^[13-14]，但目前尿烷诱导的小鼠肺肿瘤模型主要为单次染毒模型，与人类可能的暴露途径有所不同。二丁基羟基甲苯 (butylated hydroxy-toluene, BHT) 是一种强氧化剂，可以提高食品稳定性，延长食品贮存期^[15]，也常作为促癌剂用于肺肿瘤诱发研究^[16]。本研究拟采用尿烷和二丁基羟基甲苯建立昆明种小鼠的肺肿瘤模型，现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 氨基甲酸乙酯 (尿烷)，分析纯，天津市光复精细化工研究所生产，用 0.9%NaCl 配成适当溶液待用。BHT，分析纯，美国 Sigma 公司生产。染毒当天用食用油配成 0.75% 的混悬液，按比例混于饲料中喂饲。

1.2 实验动物 昆明种小鼠 200 只，SPF 级，雌雄各半。由四川省中医药科学院实验动物中心提供，实验动物生产许可证号：SCXK (川) 2013-19。动物房为屏障系统，温度为 20~25℃，相对湿度为 40%~70%，使用许可证号：SYXK (川) 2016-043。

1.3 方法 200 只昆明种小鼠随机分为对照组和低、中、高剂量组，每组 50 只，雌雄各半。低、中、高剂量组小鼠分别一次性腹腔注射 50、100、200 mg/kgbw 的尿烷，对照组小鼠注射蒸馏水；1 周后各剂量组小鼠每天喂饲含 0.75%BHT 的软饲料，对

照组小鼠每天喂饲不含 BHT 的普通软饲料，连续 2 周。第 15 周末处死所有小鼠并取出肺脏，计数各叶肺表面的肿瘤数并固定；将肿瘤逐个取材，剩余肺组织切成 1~2 mm 厚的组织块，常规石蜡切片，HE 染色，光镜下观察。

1.4 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件统计分析。定量资料不服从正态分布，组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验；定性资料以相对数描述，组间比较采用 χ^2 检验；进一步两两比较采用 Bonferroni 法调整检验水准，剂量和观察指标间的相关关系采用 Kendall 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠肺肿瘤发生情况 4 组小鼠肺肿瘤发生率、肿瘤数差异均有统计学意义 ($\chi^2=22.265$ 、 25.328 ，均 $P<0.001$)。两两比较结果显示，中、高剂量组小鼠的肿瘤发生率均高于对照组 ($\chi^2=10.698$ ， $P=0.001$ ； $\chi^2=21.760$ ， $P<0.001$)；中、高剂量组小鼠产生的肿瘤数均高于对照组 ($Z=3.350$ ， $P=0.001$ ； $Z=4.476$ ， $P<0.001$)。小鼠的肺肿瘤发生率、肿瘤数随着尿烷剂量的增加而增加，呈现出一定的剂量-反应关系 ($r=0.991$ ， $P=0.009$ ； $r=0.995$ ， $P=0.005$)。各剂量组出现了对照组没有的恶性肿瘤，并且随着尿烷剂量增加，肿瘤恶化率逐渐增大，尿烷剂量与恶性肿瘤数量、肿瘤恶化率之间均存在剂量-反应关系 ($r=0.973$ ， $P=0.027$ ； $r=0.969$ ， $P=0.031$)。见表 1。

表 1 各组小鼠肺肿瘤发生和恶化情况

组别	受试小鼠数	荷瘤小鼠数	肿瘤发生率 (%)	肿瘤数	恶性肿瘤数	肿瘤恶化率 (%)
对照组	50	1	2.00	1	0	0
低剂量组	50	7	14.00	8	1	12.50
中剂量组	50	12	24.00	22	4	18.18
高剂量组	50	19	38.00	47	13	27.66

2.2 病理诊断结果 光镜下观察小鼠肺部病理学切片，发现的良性肿瘤为腺瘤和乳头状腺瘤，恶性肿瘤有腺癌、乳头状腺癌、腺瘤恶变和乳头状腺瘤恶变。腺癌细胞排列紊乱，呈腺管状或实体巢状；细胞大小不一，呈多形性，核质比例倒置，可见病理性核分裂，见图 1。乳头状腺癌细胞呈乳头状排列，大小不一，形态不规则，胞核着色深，核质比例倒置，也可见病理性核分裂，见图 2。腺瘤恶变和乳头状腺瘤恶变均系相应的瘤结节内部有部分区域呈现相应的癌病变，见图 3 和图 4。

3 讨论

世界卫生组织指出机体对致癌物有一种或多种反应：和对对照组相比，试验组肿瘤发生率增加；试验组发生对照组没有的肿瘤类型；试验组肿瘤发生时间早于对照组；试验组平均肿瘤数多于对照组，即肿瘤的多发性增加^[17]。以上是化学物质能够诱发肿瘤的判定标准，也是致癌试验阳性的判定标准。小鼠肺肿瘤不像体表肿瘤易于察觉，除非在试验的不同时间分批剖杀才能观察到肿瘤的发生时间，因此本研究未对小

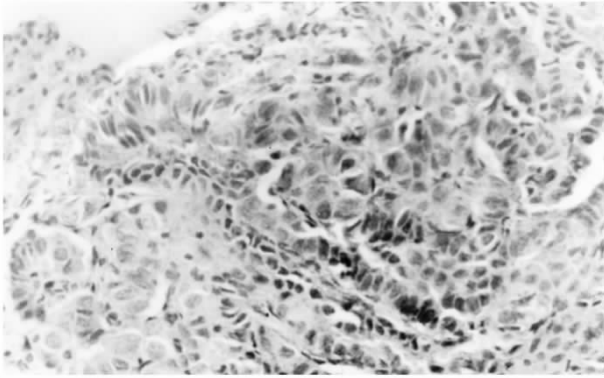


图1 尿烷诱导的昆明种小鼠肺腺癌
(HE染色, ×200)

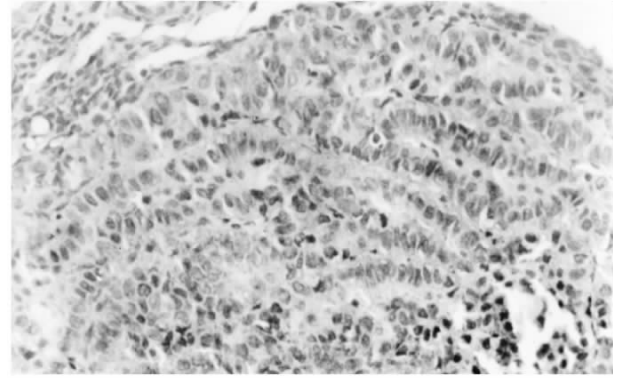


图2 尿烷诱导的昆明种小鼠肺乳头状腺癌
(HE染色, ×200)

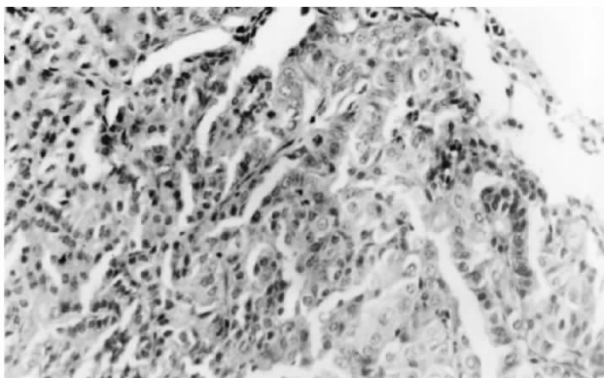


图3 尿烷诱导的昆明种小鼠肺腺癌恶变
(HE染色, ×200)

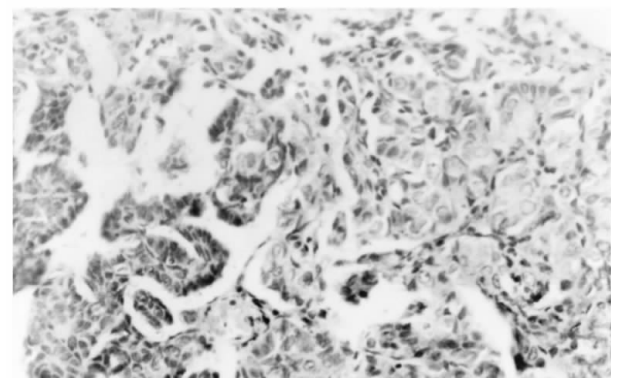


图4 尿烷诱导的昆明种小鼠肺乳头状腺癌恶变
(HE染色, ×200)

鼠肺肿瘤发生时间进行分析。本研究结果显示,中剂量组和高剂量组小鼠肺肿瘤数目和肿瘤发生率均高于对照组,各剂量组出现了对照组没有的恶性肿瘤,肿瘤多发性和对照组相比也明显增加,并且各剂量组小鼠肺肿瘤发生率、肿瘤数和肿瘤恶化率与尿烷剂量均存在剂量-反应关系,提示该昆明种小鼠肺肿瘤模型建模成功。

小鼠肺肿瘤模型揭示了尿烷诱导细胞产生不可逆的改变,并在BHT的作用下选择性地促使启动细胞生长,并抑制周围细胞。由于BHT是一种抗氧化剂,其毒作用的靶器官是肺,故BHT的给药途径不提倡通过腹腔注射方式,而宜采用喂饲途径,且在尿烷之后每天喂饲含0.75%BHT的食物,至少需要连续喂饲2周,使最低有效摄入量达到5.5 g/kgbw才有统计学意义^[18]。0.75%BHT为国外文献推荐的最高剂量^[18-19],浓度偏大,可适当降低,改为0.5%BHT连续喂饲3周;或者浓度不变,改为间日喂饲,使BHT的总量达到最低有效摄入量即可,须在后续试验中对BHT的不同浓度进一步探讨。

根据既往建模经验,本次实验HE切片的取材方

式是将解剖镜下所见肿瘤逐个取材包埋,余下肺组织包埋在一起,从而呈现出良好的剂量-反应关系,故建议小鼠肺肿瘤短期诱发试验HE切片的取材采用该方法。本次昆明种小鼠肺肿瘤模型建模成功,可作为长期动物致癌试验模型的良好替代。

参考文献

- [1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13 (5): 488-493.
- [2] 张晓,杨琼英,林国桢,等. 大气污染与居民肺癌发病及死亡灰色关联分析 [J]. 中国公共卫生, 2014, 30 (2): 165-170.
- [3] DEVESA S S, BRAY F, VIZCAINO P, et al. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising [J]. Int J Cancer, 2005, 17 (2): 294-299.
- [4] FONTHAM E T, CORREA P, REYNOLDS P, et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women: a multicenter study [J]. JAMA, 1994, 271 (22): 1752-1759.
- [5] VIKIS H G, RYMASZEWSKI A L, TICHETAAR J W. Mouse models of chemically-induced lung carcinogenesis [J]. Front Biosci, 2013, E5 (3): 939-946.

(下转第1232页)