

胃癌前病变大鼠模型构建方法的探讨

袁红霞¹, 刘彩梅², 刘清君¹, 施伟东¹, 黄霞¹

(1.天津中医药大学,天津 300193;2.青岛市城阳区第二人民医院,山东青岛 266112)

[摘要] 目的:通过比较不同方法构建胃癌前病变大鼠模型的成功率,探寻更为科学的胃癌前病变动物模型,为深入开展该病的机制研究提供模型支撑。方法:将 60 只健康 Wistar 大鼠随机分为 3 组,即空白对照组、模型组和模型组,每组各 20 只,分别给予单纯应用 MNNG 溶液造模和多因素干预造模两种方法,造模 24 周后比较各组大鼠的成活率及模型成功率。结果:多因素干预造模方法的胃癌前病变模型成功率明显高于单纯 MNNG 溶液造模方法($P<0.05$)。结论:采用多因素干预造模方法构建胃癌前病变大鼠模型,更符合临床实际及科研要求。

[关键词] 胃癌前病变;动物模型;多因素方法

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-4721(2009)10(a)-009-02

胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)是一个病理性概念,包括肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)和异型增生(dysplasia, Dys),主要伴存于慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG),是从正常胃黏膜向胃癌转化过程中的一个重要阶段。在全世界,胃癌的发病率和死亡率居恶性肿瘤的第二位,严重威胁着人类的健康^[1]。胃癌是我国最常见的恶性肿瘤,每年死于此病者超过 16 万人,约占全部肿瘤死亡人数的 1/5^[2]。由于胃癌的病因学研究还不完全清楚,针对病因的一级预防比较困难,因此,对胃癌前病变的研究成为胃癌二级预防的重要内容。早期发现、及时治疗前病变成为降低胃癌发生率和死亡率行之有效的方法。

近年来医学界在防治本病的临床研究方面取得一定进展^[3-4],但因该病动物模型的构建存在成功率低及死亡率高等不足,所以针对该病因学及药物作用机制的研究较少。本文通过动物实验的方法观察不同造模方法的成功率情况,为该病动物模型的改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,体重(50±5)g,由卫生部生物制品检定所动物中心提供,置于南开医院动物实验室标准实验条件下[室温(24±2)℃,湿度(55±5)%]饲养。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 药品与试剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG):东京化成工业株式会社产品;乙醇:汕头市光华化工厂产品,批号:20060704。

1.2.2 主要仪器 石蜡切片机:德国 LEICARM2135 型;石蜡包埋机:德国 LEICARM2135 型;光学显微镜及显微摄像系统:

[基金项目] 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(No. 07JCZDJC08600)。

[作者简介] 袁红霞(1964-),女,汉族,教授,博士生导师,研究方向:中医脾胃病的临床及实验研究。

OLYMPUS 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与处理 将 60 只健康清洁级 Wistar 雄性大鼠随机分为 3 组,即空白对照组、模型组及模型组,每组 20 只,模型 I 组采用自由饮用 100 μg/ml 的 MNNG 溶液的方法造模,时间为 24 周;模型组起始用 100 μg/ml 的 MNNG 溶液灌胃,药量为 2 ml/100 g 体重,隔日 1 次,连续灌胃 4 周后,继续自由饮用 100 μg/ml MNNG 溶液 20 周,同时每只大鼠每 3 天给予 1 ml 无水乙醇灌胃 1 次,每进食 2 d 禁食 1 d,禁食当天下午自由饮用 20 mmol/L 的脱氧胆酸钠溶液,每周用钳子夹住大鼠尾部 1 次,使之保持激怒、争夺状态,持续 10 min,持续 24 周;空白对照组,每天自由饮水。上述各组均以混合饲料喂养 24 周,于第 24 周末予 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g 体重腹腔注射)麻醉大鼠后,暴露并游离其胃部,将胃沿胃大弯切开,依次从胃底、胃体、小弯、幽门、贲门处分别取材,4%中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察病理形态学变化。

1.3.2 病理诊断评定标准 病理诊断评定标准参照 2006 年上海全国第二届慢性胃炎共识会议通过的《中国慢性胃炎共识意见》进行诊断及分类。

以出现胃黏膜上皮非典型增生,肠上皮化生判断为胃癌前病变,诊断标准如下:①肠上皮化生:胃黏膜上皮细胞可见肠上皮的杯状细胞。②轻度上皮非典型增生:鳞状上皮增厚,有一定异形性,基底膜完整,腺体明显增多,腺腔扩大,腺细胞核亦增多,异形性不明显。③重度上皮非典型增生:鳞状上皮增厚,有一定异形性,偶见核分裂,基底膜完整,腺体明显增多,腺腔扩大,腺细胞核深染,有一定异形性,未见核分裂。

1.3.3 病理分级标准 病理分为四级:无肠化及异型增生(-);肠化(+);轻度异型增生(++);重度异型增生(+++)。

1.4 统计处理

实验数据应用 SPSS10.0 统计学软件进行数据处理,各组间率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

在实验中、后期,两模型组大鼠活动量逐渐减少,精神萎靡,毛发逐渐稀疏,失去光泽,且呈黄色,进食明显减少,大便稍稀,体重增长缓慢,尤以模型 组更为明显。空白组大鼠活动灵敏,毛发光亮,进食正常,体重增长较快。

2.2 大鼠存活情况

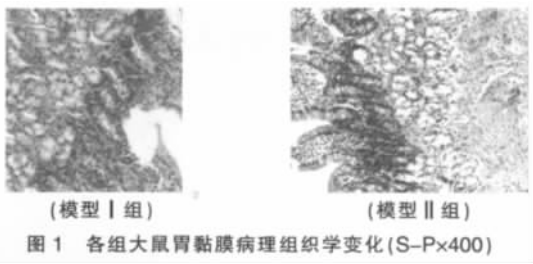
模型 组死亡 3 只;模型 组死亡 5 只,空白对照组无自然死亡。

2.3 胃黏膜大体肉眼观察

正常对照组胃黏膜呈粉红色,有光泽,被覆较多黏液,黏膜皱襞表面光滑,走向规则,胃壁弹性良好;模型 组和模型 组大鼠胃壁弹性减弱,黏膜层变薄,色泽苍白,皱襞变平或走向紊乱,甚至黏膜表面黄染,胃窦部可见数个灰白色结节,有的形成息肉状或菜花状隆起,质地偏硬,部分大鼠胃黏膜尚有糜烂灶或溃疡形成。

2.4 组织病理学变化

依次从胃底、胃体、小弯、幽门、贲门处分别取材,4%中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察病理形态学变化。空白对照组无肠化或异型增生;模型 组胃黏膜轻度萎缩伴肠化生 4 例,轻度异型增生 2 例,重度异型增生 1 例,其余 6 例表现为轻到中度胃黏膜炎症,4 例为大致正常胃黏膜;模型 组胃黏膜轻度萎缩伴肠化生 6 例,轻度异型增生 3 例,重度异型增生 2 例,其余 3 例表现为轻到中度胃黏膜炎症,1 例为大致正常胃黏膜。模型 组异型增生的发生率较模型 组更为明显($P<0.05$),各组大鼠病理组织学变化见表 1、图 1。



主要有以下几种:①胃黏膜反复刺激的造模方法;②免疫损伤的造模方法;③免疫损伤结合胃黏膜刺激的造模方法;④小剂量 X 线局部照射的造模方法;⑤致癌化合物损伤的造模方法。前四种方法存在操作复杂、成本高及周期长等弊端,所以目前研究中以致癌化合物损伤的造模方法最为常用。

大多致癌化合物在体内需经代谢酶激活后才能成为最终致癌物质,但 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(MNNG)发生致癌作用不需任何转化,是较为理想的造模药物。研究发现,MNNG 很容易渗透胃幽门部和胃底部黏膜,因此可作为胃癌前病变以及胃癌的特异性致癌物,其致癌机制可能是导致细胞 DNA 的损伤而引发癌症发生,故是常用的诱发实验性胃癌或癌前病变的药物。但我们在实验中发现,单纯在饮水中加入 MNNG 来诱导大鼠胃癌前病变,诱导时间周期较长,且造模成功率低。

因此,课题组改进了传统的造模方法,采用初始以 MNNG 灌胃给药的方法,确保药物稳定有效的作用,同时从临床实际出发,针对胃癌前病变的发病学特点,采用干预动物饮食、情绪变化等多因素的综合造模方法。结果表明,此种方法缩短了造模周期,提高了造模的成功率,能较好地反映胃癌前病变发生的临床实际,是该病的一种较为理想的动物模型。

[参考文献]

[1] 陈伟,刘华一.中医药防治胃癌前病变机制的实验研究进展[J].天津中医药大学学报,2007,26(1):54-56.
[2] 徐光炜.我国胃癌防治对策的探讨[J].中华肿瘤杂志,1991,31(3):235.
[3] 冯学瑞,袁红霞.善胃冲剂治疗胃癌前病变的疗效观察[J].中国中西医结合脾胃杂志,1999,7(2):103-105.
[4] 袁红霞,高金亮,闫小雪,等.善胃系列冲剂治疗胃癌前病变 122 例疗效观察[J].新中医,2001,33(5):20-21.

(收稿日期:2009-08-27)

表 1 各组大鼠胃黏膜病理组织学变化(只)

组别	有效动物数	异型增生			合计(%)
		+	++	+++	
模型 组	17	4	2	1	41●
模型 组	15	6	3	2	73▲●
空白对照组	20	0	0	0	0

与模型 组组比较,▲ $P<0.05$;与空白对照组比较,● $P<0.05$

3 讨论

目前建立胃癌前病变动物模型的方法较多,归纳起来

(上接第 8 页)

察[J].现代生物医学进展,2006,6(5):69-70.
[6] 张正中,张学军,杨森,等.瘢痕疙瘩一家系[J].中华医学遗传学杂志,2006,3:100.
[7] 舒春梅,何春涛,陈洪泽.瘢痕疙瘩的遗传流行病学研究进展[J].中国麻风皮肤病杂志,2006,9:58-60.
[8] 叶丽萍,李培英.曲安奈德皮损内注射加冷冻治疗瘢痕疙瘩效果观察[J].岭南皮肤性病科杂志,2005,2:88-91.
[9] 徐小红.瘢痕整形术后的康复指导[J].医药论坛杂志,2003,16:80-81.
[10] 杨贤金,张一鸣.CTGF 在病理性瘢痕中的表达及意义[J].中国美容医

学,2005,6:61-62.
[11] 翟晓翔,罗文辉.中医药治疗瘢痕疙瘩的现状 & 展望[J].湖南中医学院学报,2004,5:55-57.
[12] 师新华.手术切除当日注射曲安奈德治疗耳垂瘢痕疙瘩[J].临床和实验医学杂志,2006,5(8):48.
[13] 孙浩,王志强.整形手术联合放射性敷贴治疗瘢痕疙瘩的临床效果分析[J].中国现代医生,2008,46(28):26.
[14] 蔡尚厦,欧毅敏.曲安奈德局部注射联合冷冻治疗瘢痕疙瘩[J].中国医药导报,2006,3(36):86.

(收稿日期:2009-06-11)