

3,4- 苯并芘支气管灌注构建猪肺癌模型的实验研究

陈锦润¹⁾, 杨立民¹⁾, 张震¹⁾, 王维¹⁾, 赵珍²⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨 3,4- 苯并芘经气管导管支气管灌注构建猪肺癌模型的可行性. **方法** 购置 24 头实验猪, 随机分为模型组、对照组, 每组 12 头. 实验猪麻醉满意后行气管插管, 经气管导管向模型组支气管内注入 3,4- 苯并芘 - 玉米油混合液, 对照组注入等量玉米油. 每周灌注 1 次, 连续 16 周. 于第 16 周、32 周、48 周对全部实验猪行肺部 CT 扫描, 观察肺部有无病灶. 第 48 周解剖实验猪肺、食管、胃肠道、肝及脑等脏器, 观察有无肿瘤形成, 并对肿块及实验猪的肺组织切片进行苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色分析. **结果** 对照组肺部 CT 及解剖均未发现肺部肿瘤. 模型组中, 8 头肺部 CT 显示有不同部位、大小不等的占位性病变, 病理学均证实为恶性肿瘤, 其中 3 头中分化腺癌, 2 头高分化鳞癌, 1 头肺泡细胞癌, 2 头腺鳞癌. 4 头肺部 CT 无异常, 其中一头食管距声门 2 cm 处有一 2 cm × 1.5 cm × 1.0 cm 肿块, 标本送病理检查证实为食管磷癌. 另外 3 头及对照组肺部 CT 及解剖均未发现肿瘤. 模型组实验猪 1 a 内成功诱发恶性肿瘤, 总成瘤率 75%, 肺部成瘤率为 66.66%. **结论** 经气管导管支气管内灌注 3,4- 苯并芘是一种简便、安全可靠的肺癌动物模型的构建方法.

[关键词] 支气管灌注; 3,4- 苯并芘; 实验猪; 肺癌; 动物模型

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 12-0015-04

Experimental Study on Lung Cancer Model Induced by Bronchial Perfusion of 3, 4-benzopyrene in Pigs

CHEN Jin-run¹⁾, YANG Li-min¹⁾, ZHANG Zhen¹⁾, WANG Wei¹⁾, ZHAO Zhen²⁾

(1) *The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101;* 2) *Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China*)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of pig lung cancer model induced by bronchial perfusion of 3,4-benzopyrene. **Methods** 24 experimental pig were randomly divided into model group and control group, each containing 12 cases. Experimental pigs were under the anaesthetic state, pigs in the model group were given endobronchial infusion of 3,4 - benzopyrene - corn oil mixture, pigs in control group were injected with equal capacity of corn oil. Perfusion 1 times a week for 16 weeks. In week 16, 32 and 48, all experimental pig were given lung CT scans, then the lung lesions were observed. After 48 weeks, the pig lung, esophagus, and gastrointestinal tract, liver and brain and other organs were dissected, the presence of tumor formation was observed, and the mass, and experimental pig lung biopsy were given hematoxylin and eosin staining analysis. **Results** Lung cancers were not found in control group by both CT lung cancers and anatomy. In the model group, pulmonary CT showed space-occupying lesions with different location and size in lungs of 8 pigs, and the space-occupying lesions were confirmed as malignant tumors by pathology, including 3 cases of moderately differentiated adenocarcinoma, 2 cases of highly differentiated squamous cell carcinoma, 1 case of alveolar cell carcinoma, 2 cases of adenosquamous carcinoma. Three other pigs and pigs in the control group were not found with tumor by both lung CT and anatomy. Pigs in model group were induced successfully to malignant tumor in 1 year, the total tumor formation rate was 75%, lung tumor formation rate was 66.66%. **Conclusion** The trachea bronchial perfusion of 3,4 - benzopyrene is a simple, safe and reliable way to construct animal models of lung cancer.

[Key words] Bronchial perfusion; 3,4 - benzopyrene; Experimental pigs; Lung cancer; Animal models

[基金项目] 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD177)

[作者简介] 陈锦润 (1988~), 男, 云南文山市人, 在读硕士研究生, 主要从事胸外科临床及科研工作.

[通讯作者] 杨立民. E-mail:13700607972@163.com; 赵珍. E-mail:1270889070@qq.com

肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。近 50 a 来许多国家都报道肺癌的发病率和死亡率均明显增高。肺癌的病因至今尚不完全明确,建立理想的肺癌疾病模型对肺癌发生发展过程及转移机制的研究,对肺癌的早期诊断、治疗及预后评价都具有非常重要的临床意义。不同物种的遗传学、解剖学和生理学差异导致动物疾病模型具有局限性,尽管这样,只要研究设计和适当的解释,成功建立各种疾病的动物模型将不断推进我们对某些重要疾病发病机理的认识和理解,从而开发出新的治疗方法^[1]。笔者在 2012 年 9 月至 2013 年 9 月成功实现对实验猪肺癌动物模型的复制,并在多普勒腔内超声探头引导下胸腔镜下猪病灶楔形切除术和肺叶切除术。本文主要探讨经气管导管支气管灌注 3,4- 苯并芘构建猪肺癌模型的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 健康滇南小耳猪 24 头,购自昆明医科大学实验动物中心。猪龄均为 4 月,体重(10±0.1) kg,均为雌性,随机分成模型组、对照组,每组各 12 头。2 组分圈管理,常规饲料喂养,自由摄食。

1.1.2 主要试剂及器械 3,4- 苯并芘购自 Sigma 公司。丙泊酚中 / 长链脂肪乳注射液(规格:20 mL: 0.2 g) 德国 Kabi 公司生产,玉米油。3,4- 苯并芘于 4℃ 温度密封保存。麻醉喉镜 1 副,儿童一次性气管导管。

1.2 方 法

1.2.1 灌注时机 灌注当日早晚实验猪禁食禁饮,以免麻醉及灌注过程中误吸窒息致死,减少实验猪尿便排泄,便于操作及尽可能保持操作台洁净。

1.2.2 灌注步骤 助手 1 人,戴防护口罩、帽子、手套。助手双手固定实验猪,将猪耳略加搓揉,用手指轻弹血管,使猪耳血流增加,并在耳根将耳缘静脉压迫,以使其血管怒张。待静脉充盈后,右手持装有丙泊酚中 / 长链脂肪乳注射液的注射器使针头由静脉末端刺入,顺血管方向向心端刺约 1~1.5 cm,放松左手拇指和食指对血管的压迫,右手试推注射器针芯,若注射阻力不大且局部无肿胀,将丙泊酚中 / 长链脂肪乳注射液以 2 mg/kg 徐徐注入,待实验猪肌肉松弛,无力抵抗,下颌肌肉松弛,呼吸平稳,视为麻醉满意。实验猪取

仰卧位,行气管插管:助手分开实验猪下颌,一人借助麻醉喉镜,找到声门观察实验猪声门开闭情况,将气管导管通过声门先插至气管分叉处,用轻羽毛置于气管导管外口,判断气管导管是否插入气管。趁其吸气瞬间,模型组经气管导管推注 2 mL 3,4- 苯并芘玉米油混合液(含 3,4- 苯并芘 10 mg/kg),同法,对照组实验猪注入 2 mL 玉米油。灌药后取头高脚低位竖立 2 min,尽可能保证支气管灌注成功,观察至实验猪麻醉清醒。

1.3 实验猪肺部 CT 扫描

灌药至第 16 周,实验猪用同样麻醉方法麻醉,取仰卧位,四肢固定于自制木板上,行肺部 CT 扫描。以后分别于第 32 周,第 48 周行肺部 CT 扫描,记录肺部病变情况。

1.4 病理检查

实验猪肺部 CT 扫描后,解剖实验猪肺、食管、胃肠道、肝及脑等脏器,观察有无肿瘤形成,并对肿块及全部实验猪的肺组织切片进行苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色分析。

2 结 果

2 组实验猪在接受麻醉、气管插管、经气管导管灌注 3,4- 苯并芘玉米油混合液、玉米油后均无因麻醉过度、窒息、感染等并发症而死亡者。对照组接受玉米油支气管注 16 周,经观察 1 a,全部存活,肺部 CT 及解剖均未发现肺部肿瘤(图 1)。切除肺叶行病理检查提示均为正常肺组织(图 2)。模型组中,8 头实验猪在第 16 周时出现肺部 CT 异常,4 头于 3 周肺部出现占位病变,第 48 周时又有 1 头出现肺部 CT 异常。1 a 内模型组共出现 8 头肺部 CT 显示有不同部位,大小不等的占位性病变(图 3),其中 3 头中分化腺癌(图 4),2 头高分化鳞癌,1 头肺泡细胞癌,2 头腺鳞癌。4 头肺部 CT 无异常,其中 1 头食管距声门、cm 处有一 2 cm×1.5 cm×1.0 cm 肿块,标本送病理检查证实为食管磷癌。另外 3 头及对照组肺部 CT 及解剖均未发现肿瘤。模型组实验猪 1 a 内成功诱发恶性肿瘤,总成瘤率 75%,肺部成瘤率为 66.66%,与 CT 检查结果吻合。2 组实验猪成瘤情况如表 1、表 2。

3 讨 论

3.1 致癌剂的合理选择

目前,国内外已有很多成功构建肺癌动物模

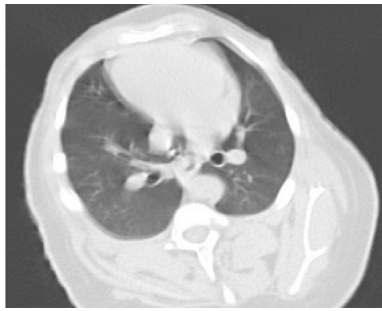


图 1 对照组肺部 CT: 无病灶

Fig. 1 The control group lung CT:no lesions

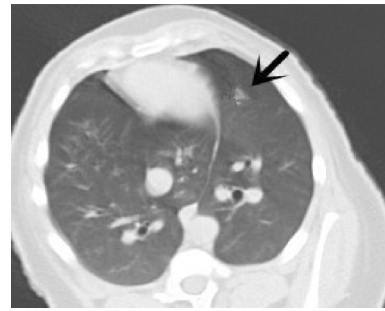


图 3 模型组肺部 CT: 箭头示左上肺占位

Fig. 3 The model group lung CT:the arrows showed lung occupying lesion

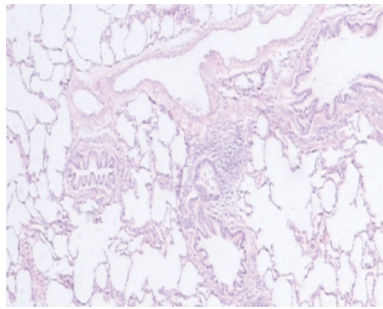


图 2 对照组正常肺组织切片

Fig. 2 The control group: normal lung tissue biopsies

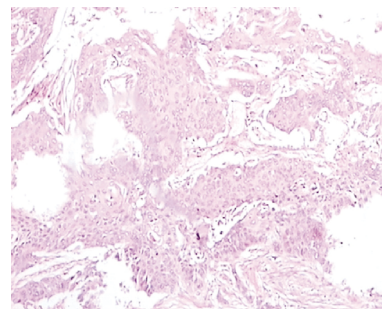


图 4 模型组肺组织切片: 中分化腺癌

Fig. 4 The model group lung tissue biopsies: moderately differentiated squamous carcinoma

表 1 2 组实验猪肺部占位情况 (%)

Tab. 1 The location of tumors in lungs of pigs in two groups (%)

组 别	左肺上叶	左肺下叶	右肺上叶	右肺下叶	无占位	占位率 (%)
对照组	0	0	0	0	12	0.00
模型组	3	1	2	2	4	66.66

表 2 2 组实验猪肺部成瘤情况 (%)

Tab. 2 The tumors formation in lungs of pigs in two groups (%)

组 别	中分化腺癌	高分化鳞癌	肺泡细胞癌	腺鳞癌	食管癌	肺部成瘤率 (%)	成瘤率 (%)
对照组	0	0	0	0	0	0.00	0
模型组	3	2	1	2	1	66.66	75

型的报道, 如诱发性肺癌动物模型、移植性肺癌动物模型、转基因肺癌动物模型等^[2]。动物肺癌模型的建立则需合适的致癌剂。我们得知, 苯并芘是一种广泛存在于烟草、烟熏食品、煤焦沥青、汽车尾气以及工业废气之中, 与人肺癌关系密切, 是吸烟及大气污染致癌的主要致癌物之一^[3]。目前认为其致癌性主要是通过其代谢终产物二氢二醇环氧苯并芘[benzo(a)pyrene-trans-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, BPDE]的致癌活性得以体现。BPDE可以与生物高分子共价结合形成加合物, 从而引起生物高分子的结构和功能的改变, 引发 DNA 损伤修复、细胞周期校正等信号转导通路的激活及相

关靶基因的表达改变。而基因表达改变, 特别是调控细胞周期的基因表达改变, 在细胞癌变的进展中起重要作用^[4]。经苯并芘代谢产物处理的人支气管上皮细胞转代培养 15~30 代即发生恶性转化^[5]。苯并芘的几种同分异构体中, 3,4-苯并芘的致癌性最强, 国内有经大鼠胸壁穿刺肺内直接注射 3,4-苯并芘 [benzo(a)pyrene, BP] 法制备肺癌模型, 结果出现低分化肺鳞癌、肺腺癌^[6]。笔者选择 3,4-苯并芘作为致癌剂, 用来诱发实验猪产生肺癌。

3.2 经气管导管支气管灌注诱发肺癌模型的优越性

诱发性肺癌动物模型的构建方法有吸入、口

服、肺内或支气管灌注、支气管粘膜注射致癌剂等方法^[7],吸入法通过支气管造口术或直接将实验动物持续暴露于粉尘或烟雾中,支气管造口对术者的操作技能要求高,对实验动物来说,手术创伤应激导致其生理生化改变,且术后易感染,导致实验动物死亡.直接将实验动物持续暴露于粉尘或烟雾中,实验动物的吸入剂量难于控制和检测,且对实验装置要求高,致癌制剂的泄漏增加管理人员的误吸危险,目前,这种方法常用于职业病防治、流行病学以及吸烟与肺癌关系的研究,应用不广.口服致癌制剂导致实验动物胃肠道肿瘤发生,很大程度上不能区分实验动物肺部肿瘤是转移灶还是原发灶,目前只用于消化道肿瘤的研究.胸壁穿刺肺内直接注射,因多次穿刺造成气胸,血胸,感染等引起实验动物死亡率增加.经气管导管支气管灌注的 3,4- 苯并芘直接与气管、支气管粘膜接触,且致癌制剂的灌注量容易控制,致癌剂 3,4- 苯并芘与玉米油混合,使其在支气管粘膜停留时间长,不易排除,灌注引起的肺癌发病率高,不污染环境,保障实验者安全.

3.3 选择滇南小耳猪的优点

由于制备方法及其研究目的的不同,制备人类疾病动物模型,应选择其结构、功能、代谢和人类尽量相似的实验动物,以达到充分模拟人类疾病的目的.一般来说,动物进化程度越高,其结构、功能越复杂,反应也越接近于人类^[7].与啮齿类小型实验动物模型相比,小型猪因其解剖学、生理学、疾病发生等方面与人类极为相似,且价廉、无伦理问题等方面的原因,在生物医学研究领域中具有广阔的应用前景,尤其在人类疾病动物模型制作、新药安全性评价、异种器官移植等领域应用更广^[8].滇南小耳猪是已经进行实验动物化的小型猪品种之一^[9],因此笔者选择滇南小耳猪构建肺癌模型.猪肺癌动物模型的成功建立,除了使笔者在筛选和评价化疗、放疗等干预措施等方面将具有较好的应用价值外,因滇南小耳猪体积较大,可以对实验猪进行二次实验,比如笔者在成功建立猪肺癌动物模型之后,顺利完成多

普勒腔内超声探头引导下胸腔镜下猪肺叶切除术和病灶楔形切除术,使笔者认识到,用多普勒腔内超声可以对不能看到和触摸到的肺内微小病灶准确定位,从而解决胸腔镜手术中肺微小病灶难以定位的问题,可以很好地应用推广于临床.

综上所述,经气管导管支气管灌注 3,4- 苯并芘构建猪肺癌动物模型简便、安全、可靠;气管插管、经气管导管支气管灌注致癌剂诱发猪肺癌的方法,以及实验动物的选择上,具有其独特的优势及较好的运用前景,有可能在肺癌研究中发挥比较重要的作用.

[参考文献]

- [1] CHRISTOPHER S STEVENSON, MARIA G BELVISI. P-reclinical animal models of asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2008, 2(5): 631 - 643.
- [2] 余琛琳, 崔淑芳. 肺癌动物模型的制备与应用[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(6): 470 - 474.
- [3] 顾其华, 陈琼. 吸烟与肺癌p53基因突变的关系[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2002, 22(6): 563 - 565.
- [4] 李永红, 金银龙. 苯并[a]芘致癌机制研究新进展[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(8): 152 - 154.
- [5] 蒋义国, 陈家堃, 陈学敏. 苯并(a)芘代谢物反式二羟环氧苯并芘诱发人支气管上皮细胞恶性转化[J]. *卫生研究*, 2001, 30(3): 129 - 130.
- [6] 顾其华, 胡成平, 夏莹, 等. 3,4-苯并芘肺内注射构建大鼠肺肿瘤模型的实验研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(3): 172 - 175.
- [7] 余琛琳, 崔淑芳. 肺癌动物模型的制备与应用[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(6): 470 - 474.
- [8] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(2): 108 - 111.
- [9] 商海涛, 魏泓. 小型猪品系资源状况初浅分析[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(1): 70 - 75.

(2013 - 11 - 14 收稿)