

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2016.11.20

MNNG 诱导胃癌前病变模型的探讨

周 晶, 黄柳向, 喻 斌, 伍玉南, 李小鹏, 胡 莉, 匡秀青, 李 玲

(湖南中医药大学第一附属医院 消化内科, 长沙 410007)

关键词:胃癌前病变; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; 动物模型

中图分类号: R735.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-038X(2016)11-0888-03

近年胃癌发病率升高使人们对胃癌前病变研究更为关注。目前胃癌前病变模型的建立主要包括^[1]生物造模、化学诱变剂造模、免疫损伤造模及反复胃黏膜理化刺激造模法,但以化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为主的造模方法更为常用。现结合其实际操作中可能出现的部分问题,进行探讨。

1 实验动物选取

目前以 Wistar 及 SD 这两种品系的雄性大鼠常用,雌性则因激素、遗传特性等因素的干扰而使诱变率降低基本不予考虑。笔者在实践中发现,Wistar 雄鼠相较 SD 雄鼠性情温顺,争斗少,死伤率低,对禁食、灌胃等刺激性操作耐受力更强,可行性更高,而对药物敏感度无特殊差异。年龄方面,理论上越小的大鼠由于胃黏膜的保护机制缺乏,细胞分化程度低,增殖快,更易形成癌前病变。有少数研究^[2]用新生大鼠短期灌胃也成功复制出模型,但此种模型与人类胃癌前病变(好发于中老年)的发生相似性过低,毒性反应大,操作复杂,且最终成模时间至少需要 26 周。鉴于造模周期普遍较长,综合大鼠的诱变率、后期病死率及饲养难度等因素考虑,笔者采用的是刚断乳,4 周龄,70 g 左右的 Wistar 雄鼠,效果理想。

2 MNNG 的配制及浓度

自由饮水时,多数实验使用的浓度介于 50~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,认为浓度过低则成模时间长,成模率低,过高可并发肝脏、十二指肠或其他肠道病变等。灌胃浓度普遍较自由饮用浓度高,多数介于 80~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。笔者发现,自由饮水时,药物浓度越高,大鼠饮水量也相应减少,如能寻找到上述区间中最佳浓度,可大大减少药物浪费及污染。MNNG 水溶性极低,为 0.1%^[3],一般情况下,水溶解后最大浓度仅为 1 g/L 左右。不少研究为了使用方便,采用了表面活性剂,如吐温 20,吐温 80,羟基

纤维素等,将高浓度原液制成混悬液;或添加助溶剂,如甲醇、丙酮等。如谢晶日等^[4]的研究采用 40℃ 50% 的无水乙醇溶液 75 ml 与 175 ml 蒸馏水混合,配成 10 g/L 的无沉淀溶液。笔者分别按照相应文献所述,发现使用吐温 20 或无水乙醇,并放置于 4℃ 冰箱中避光保存后,二者均为混悬液,并出现不同数量的沉淀,但相同浓度下,以吐温 20 沉淀为少,缺点是混匀后产生泡沫较多,不利于准确量取。但加入饮水稀释至相同浓度后,大鼠饮水量无明显差别。而使用二甲基亚砜(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)溶液作为溶剂时则药物全部溶解,药液呈淡黄色透明态。且同样浓度下,大鼠的饮水量明显提高,可能是口感更佳所致。笔者的做法是,先使用 DMSO 作为溶剂将 MNNG 配成 20% 溶液,继而加无菌蒸馏水稀释至 10 g/L,置于 4℃ 冰箱中避光保存。应避免使用塑料瓶身,因观察到 DMSO 可少量吸附于瓶身造成药液损失。

有研究表明^[4-5],使用增溶剂较单独蒸馏水配制的模型诱变率提高,认为一定浓度的表面活性剂不仅有增溶作用,还可促进胃黏膜局部对致癌药物吸收、分布或者破坏胃黏膜屏障,造成直接损伤,为癌前病变形成提供条件。但其所使用的表面活性剂或助溶剂浓度范围有限,尚不清楚其他范围内该物质的确切作用^[6],究竟是促进或抑制成模。笔者认为,可设置单独溶媒组,溶媒加药物组,药物组,且溶媒浓度多梯度对比,进行探究。

3 禁食间隔时间

为模拟人类发病,许多实验施加了饥饱相间的实验因素。多数采取饱食 2~3 d,禁食 1 d 的模式。由于大鼠随时取食,夜间活动量大,建议投喂时间设定在傍晚,以避免争夺食物造成伤亡。笔者通过解剖饱食 1 d,禁食 36 h 后正常成年大鼠的胃发现,其中仍有三分之一的食物残渣。考虑到后期模型大鼠食量下降等表现征象的出现,说明禁食一日甚至更长的间隔可行。投喂量可参考正常摄食量,一般成年后的大鼠每 24 h 采食量为 5 g/100 g 体重,未成年大鼠因生长需要可适当增加。采取自由饮用时大

鼠总体药物摄入量明显与投喂量相关,禁食时大鼠饮水量极其少。由于大鼠采食量与饮水量的比例接近 1:2,为减少浪费及污染,配备水量应稍高于食物量的两倍为宜。但不能忽略因禁食而减少的药物饮用量与饥饿本身对胃黏膜造成的刺激的综合影响;且操作时应循序渐进,禁食间隔从短逐渐延长到目标天数,使模型适应。

4 复合造模中使用的药物

早期的研究^[7]已经表明,单独使用 MNNG 造成的胃癌前变化为异型增生。苏琦等^[8]对 MNNG 诱癌的动态观察显示该过程为胃黏膜糜烂-再生性增生-腺瘤性增生或者不典型增生-早期癌-浸润癌,并未按照慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌这一人类典型胃癌发展模式出现。考虑到癌前病变由多因素诱发,不少实验将肠上皮化生之前的模式补充进来,使用常见以下方式造模:无水乙醇、热糊等攻击造成急性胃黏膜损伤;高浓度氨水模拟 Hp 感染后产氨;去氧胆酸钠模拟胆汁返流;高渗热盐水^[9]促使胃黏膜腺体萎缩;雷尼替丁抑制胃酸分泌;非甾体类抗炎药物降低胃黏膜损伤修复作用。上述因素的施用应避免药物间的拮抗作用,如雷尼替丁作为抑制胃酸,治疗胃炎药物,不宜与其他损伤胃黏膜的药物共同使用;以 0.03% 比例加入饲料中,能明显抑制进食时引起的胃酸分泌,且操作简单;改制成高盐饮食亦能同时促进自由饮用时 MNNG 的摄取;其他损伤胃黏膜药物则宜在空腹时行灌胃,增强对胃黏膜刺激。

5 给药途径与病变部位

5.1 给药途径

常见灌胃、自由饮用或者二者结合的方式。由于 MNNG 具有热不稳定性,在水中伴随缓慢的降解,见光易分解等性质,部分研究采用避光条件下新鲜配制的药液定时灌胃。但由于癌前病变形成缓慢,导致其工作量大,大鼠伤亡率高。采用自由饮用可控性较灌胃差,但整体药量摄入大大提高,在一定程度上弥补了药物不稳定性产生的损耗,但缺点不容小觑:MNNG 价格较为昂贵,投入成本大;其毒性对长期实验人员有影响且剩余药液容易造成污染。笔者认为二者结合的方式则介于两者之间,是较为谨慎的选择。在大鼠可触及水瓶身时,其避光不宜使用锡箔纸,因大鼠指甲锋利,喜啃咬。以黑漆涂黑晾干后无明显气味后可行。

5.2 病变部位

大鼠胃中隆起界嵴将与食管相接的前胃及腺胃(后胃)两部分分开,由于前胃被覆鳞状上皮,有学者认为大鼠前胃与人类食管或者食管-胃交界处尚可

等同。但是严格说来,前胃并不与人类任何器官具有相似可比性。人类超过 95% 的胃癌为腺癌,这就意味着,我们理想的动物模型病变部位应当在腺胃,发生于前胃的病变与人类缺乏相似可比性。由于 MNNG 诱癌作用不依靠酶而直接作用于胃黏膜,这使得局部作用显得尤其重要。实际上,有报道^[10]指出 MNNG 因为甲基化程度的原因对腺胃更具亲和力。朱正纲等^[7,11]采用单一自由饮水的方式造模时发现病变几乎都发生在腺胃。说明在接近自然因素接触 MNNG 时的模型更理想。但是纵观近年来该模型的制备,几乎所有含灌胃操作的造模,尤其含有高浓度的给药操作^[12],使病变在前胃发生率提高,国外学者^[13]的研究也提到了这一点。值得注意的是,新生大鼠^[2,14]似乎不受影响。我们认为,前胃更接近食管,结合面积上的绝对优势,使之在毒药物面前的暴露率明显上升;再加上平时采用的灌胃体积 1%~2% 已经是大鼠承受范围的极限,这样造成药液的长时间停留以及反流,长期刺激前胃,加上高剂量药物直接接触这一系列的因素导致前胃病率上升。新生大鼠的特殊性可能与其未成熟的生理及防御机制有关。有许多研究并未将仅发生与前胃的模型剔除,甚至倾向于前胃部取材,这样不仅混淆了实际的造模成功率,间接干扰到腺胃的病变率,还采取了许多与人类胃缺乏可比性的标本,导致出现实验结果不准确甚至错误的结论。模型的制备除了力图简单,省时省力外,具有人类的相似可比性也很重要。添加各种复合条件灌胃造模一定程度上能缩短成模时间,但也相对的降低了腺胃的癌前病变率。减少灌胃体积,降低灌胃频率及药物浓度,或者通过食物、饮水添加使吸收方式接近正常,或许能避免上述情形。

综上所述,MNNG 诱导胃癌前病变大鼠模型的过程中,建议:①选取刚断乳的 Wistar 雄性大鼠;②可用一定浓度 DMSO 溶液配制 MNNG;缺点是尚不清楚溶剂 DMSO 浓度对模型的影响,可增加溶剂组等实验进一步探讨。③在保证药物摄入量的前提下,禁食时间间隔循序渐进,可长至 36 h;④复合造模中药物雷尼替丁单独使用,可配合高盐饲料促进 MNNG 摄入;⑤以提高腺胃病率为目标,可以适当减少灌胃频率、灌胃体积及其药物浓度,尽量以接近正常吸收的方式增加造模药物的摄入。

参考文献

- [1] 谢晶日,孙芳,梁国英.胃癌前病变动物模型的研究进展[J].中华中医药学刊,2012,30(11):2377-2379.
- [2] 陈飞松,施波,车建途,等.芪龙方防治大鼠胃癌癌

- 前疾病的作用[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(2):68-71.
- [3] EICHLER G, HABS M, SCHMAHL D. Induction of tumors of the forestomach in rats by oral application of N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 1983, 105:194-196.
- [4] 谢晶日, 王业莉, 张 扬, 等. 复合造模法建立大鼠胃癌前病变模型的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(11):2341-2342.
- [5] 吕岩红, 李玉兰, 董国刚, 等. 多因素诱导构建大鼠胃癌模型[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2005, 39(3):226-227.
- [6] 张良运, 彭 军, 宋 颖, 等. 吐温化合物对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2004, 32(1):20-25.
- [7] 朱正纲, 燕 敏, 尹浩然, 等. 甲硝基亚硝胍诱发大鼠胃癌的实验研究[J]. *上海第二医科大学学报*, 1992, 35(2):121-124.
- [8] 苏 琦, 甘润良, 罗招阳, 等. 实验性胃癌及癌前病变的病理生物学与防治系列研究[J]. *医学研究通讯*, 2004, 33(9):20-21.
- [9] 江 梅, 李 汀, 张 沥, 等. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎血清和胃黏膜组织 SOD 和 MDA 的动态变化[J]. *中国消化内镜*, 2009, 3(2):34-38.
- [10] KOBORI O, SCHMEROLD I, LUDEKE B, et al. DNA methylation in rat stomach and duodenum following chronic exposure to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the effect of dietary taurocholate [J]. *Car-cinogenesis*, 1988, 9(12):2271-2274.
- [11] 基础部组织胚胎教研组. N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱发大白鼠腺胃腺癌的实验研究[J]. *北京医学院学报*, 1979, 25(1):11-13, 75-76.
- [12] 朱晓东, 林庚金, 许祖德, 等. 高盐饲料配合甲基硝基亚硝基胍诱发大鼠胃癌[J]. *上海实验动物科学*, 2003, 23(2):85-88, 97.
- [13] PROCTOR DM, GATTO NM, HONG SJ, et al. Mode-of-action framework for evaluating the relevance of rodent forestomach tumors in cancer risk assessment [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 98:331-326.
- [14] 邓大君, 朱少侠, 陈 强, 等. MNNG 诱发新生大鼠腺胃胃癌模型的建立及其在胃癌发病机制研究上的应用[J]. *中华病理学杂志*, 1994, 40(5):293-295.

(上接第 887 页)

- [15] ASSIMAKOPOULOS S F, VAGIANOS C E, PAT-SOUKIS N, et al. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats[J]. *Acta Physiol Scand* 2004;180:177-185.
- [16] PANDE C, KUMAR A, SARIN S K. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009, 29:1273-1281.
- [17] GUNNARSDOTTIR S A, SADIK R, SHEV S, et al. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension[J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98:1362-1370.
- [18] YAMAGUCHI J, TOLEDO A, BASS B L, et al. Taurodeoxycholate increases intestinal epithelial cell proliferation through c-myc expression[J]. *Surgery*, 2004, 135:215-221.
- [19] TURNER D J, ALAISH S M, ZOU T, et al. Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-kappaB-mediated XIAP expression[J]. *Ann Surg*, 2007, 245:415-425.
- [20] YANG R, HARADA T, LI J, et al. Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism. [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31:709-717.
- [21] 陈意生, 史景泉. 多器官功能障碍综合症的病理学变化[J]. *诊断病理学杂志*, 2014, 21(6):355-360.
- [22] 吴孟超, 吴在德. 黄家骊外科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社, 2008:400-429.
- [23] KURU B, DINC S, ALTINOK G, et al. Effect of different enteral nutrients on bacterial translocation in experimental obstructive jaundice [J]. *Eur Surg Res*, 2004, 36:45-52.
- [24] LI W, CHAN A C, LAU Y, et al. Superoxide and nitric oxide production by Kupffer cells in rats with obstructive jaundice; effect of internal and external drainage[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19:160-165.
- [25] SANO T, AJIKI T, TAKEYAMA Y, et al. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAd-CAM-1 expression in jaundiced rats[J]. *Surgery*, 2004, 136:693-699.
- [26] 赵增虎, 李成云, 张建宇, 等. 阻塞性黄疸对肠道微生态环境影响的实验研究[J]. *山东医药*, 2006, 46(31):19-20.
- [27] 李兰娟. 感染与微生物生态学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:295-300.
- [28] WHITE J S, HOPER M, PARKS R W, et al. The probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* species 299 reduces intestinal permeability in experimental biliary obstruction[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42:19-23.