

小鼠 H22、S180 腹水模型临床检查特征研究

姜一朴^{1,2}, 滕晋莹², 胡金芳², 杜芬芬³, 张锐², 邸志权^{2*}

1. 安徽医科大学 药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

3. 天津中医药大学, 天津 300301

摘要: **目的** 建立小鼠腹水瘤模型, 研究其临床指标的变化情况, 探讨小鼠癌性腹水模型的特征。 **方法** 制备小鼠肝癌(H22)、骨肉瘤(S180)腹水瘤模型, 观察腹水生长及小鼠的体质量、进食、饮水量、自主活动等一般状态; 待腹水生长至第12天, 眼眶采血、抽取腹水, 应用全自动血液分析仪、生化分析仪、电解质分析仪进行血液学、血清生化、腹水常规、生化及电解质检查; 取少量腹水涂片后瑞氏染色镜检; 使用试剂盒测定血清及腹水中乳酸(LD)水平。 **结果** 小鼠腹水形成率为100%, 腹部逐渐膨胀明显, 活动变得迟缓, 毛发不荣, 进食及饮水量均减少; 与对照组比较, H22和S180组小鼠于腹水接种第4天起体质量显著升高($P < 0.01$); 血中白细胞(WBC)数量显著升高($P < 0.01$), 红细胞(RBC)、血小板(HGB)呈不同程度的降低; 腹水中少见血象细胞; 丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、乳酸脱氢酶(LDH)、LD水平显著升高, 肌酐(CREA)、白蛋白(ALB)、血糖(GLU)水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01); 电解质紊乱。 **结论** H22、S180小鼠腹水瘤模型多种检测指标异常, 且与临床表现基本一致, 具有典型的恶性腹水特征。

关键词: 癌性腹水; H22; S180; 腹水细胞; 血清生化; 腹水常规; 电解质; 临床检查

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)08-1386-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.004

Clinical characteristics of H22 and S180 ascites in mice model

JIANG Yipu^{1,2}, TENG Jinying², HU Jinfang², DU Fenfen³, ZHANG Rui², DI Zhiquan²

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the changes of clinical indicators in mice with ascites tumor, and to explore the characteristics of the model of cancerous ascites in mice. **Methods** H22 and S180 ascites tumor model of mice was established. The general state of ascites growth, body mass, feeding, drinking water and autonomous activity were observed. After the ascites grew to 12 days, hematology, serum biochemistry, ascites cells, biochemistry and electrolytes were examined by automatic hematology analyzer, biochemical analyzer and electrolyte analyzer. A small amount of ascites smear was taken and reelson staining microscopy was used. The LD levels in serum and ascites were measured with kits. **Results** The incidence of ascites in mice was 100%, the abdominal swelling was obvious, the activity became slow, the hair was not proud, and the amount of food and drinking water decreased. Compared with control group, the body mass of H22 and S180 mice increased significantly ($P < 0.01$) after fourth days of ascites. The number of WBC in the blood of H22 and S180 mice increased significantly ($P < 0.01$), and the RBC and HGB were reduced in varying degrees. The hemogram cells were rare in the ascites. The levels of ALT, AST, BUN, LDH and LD in the blood and ascites all increased, and the levels of CREA, ALB and GLU were all decreased ($P < 0.05$ and 0.01) and electrolyte disturbance. **Conclusion** H22 and S180 mouse ascites tumor model has a variety of abnormal detection indexes, which are consistent with the clinical manifestations, and have typical malignant ascites characteristics.

Key words: malignant ascites; S180; H22; ascites cells; serum biochemistry; electrolyte; clinical examination

收稿日期: 2018-01-11

第一作者: 姜一朴(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向药学。E-mail: jyipu94@163.com

*通信作者: 邸志权, 副研究员, 从事药理、毒理学研究。E-mail: dizq@tjipr.com Tel: (022)84845264

小鼠腹水瘤模型广泛用于抗肿瘤药物药效学初步筛选或初步有效性评价研究,而其相关实验研究多局限于监测小鼠生存期、体质量、腹围、腹水量的改变^[1-2],模型小鼠的腹水血细胞及生化指标变化情况至今未见报道。本研究建立了小鼠肝癌(H22)、骨肉瘤(S180)腹水瘤模型,检测其血常规、血清生化、腹水血细胞及生化指标,并与临床癌性腹水做对比,以期对肿瘤的治疗评价提供更为丰富的观测指标。

1 材料

1.1 细胞

小鼠 H22 腹水、小鼠 S180 腹水,来自本实验室冻存,冻存前及复苏后均进行了相关生物学鉴定。

1.2 动物

SPF 级雌性 ICR 小鼠,体质量 18~21 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号 SCXK(京)2016-0006。饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼(屏障环境,AAALAC 认证),实验动物使用许可证号 SYXK(津)2016-0009。

1.3 主要试剂

乳酸(LD)含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20171115);血常规、血液生化、电解质检测试剂均使用仪器配套试剂包。

1.4 主要仪器

Varioskan Flash 酶标仪(Thermo Scientific);ADVIA2120 全自动血液分析仪(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.);7180 全自动生化分析仪(日本日立高新技术株式会社);EX-180 电解质分析仪(日本常光株式会社)。

2 方法

2.1 模型的建立

参照文献方法^[3],将 H22、S180 腹水 37 °C 复苏后,以生理盐水 1:4 稀释,ip 给予 ICR 小鼠,0.2 mL/只。接种 6~7 d 后将腹部膨大,腹水明显生长,但动物一般状态正常、活跃的小鼠脱颈处死,于无菌环境下抽取腹水,尽快传代接种于小鼠腹腔内,传代 2 次后进行正式实验,组别设置为 H22 组、S180 组、对照组,每组 8 只。

2.2 指标检测

自接种当日开始,隔日称量小鼠体质量,观察腹水生长及小鼠的进食、饮水量、自主活动等一般状态。待腹水生长至第 12 天,眼眶采血、抽取腹水,

应用全自动血液分析仪、生化分析仪、电解质分析仪进行血液学、血清生化、腹水常规、生化及电解质检查,并计算相应指标的腹水/血比值;取少量腹水涂片后瑞氏染色镜检;使用试剂盒测定血清及腹水中 LD 水平。

2.3 统计分析

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 20.0 统计软件分析,先进行方差齐性检验,方差齐时以单因素方差分析进行整体比较,两两比较采用 Dunnett' *t* 检验,方差不齐采用非参数检验进行整体比较,两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验。

3 结果

3.1 一般观察

小鼠腹水形成率为 100%,H22 组和 S180 组分别于接种第 4 天、第 3 天出现第一只腹水瘤小鼠,于第 7 天、第 5 天全部小鼠生长出腹水。接种小鼠随着腹部逐渐膨胀明显,活动变得迟缓,毛发不荣,进食及饮水量均减少。

3.2 对小鼠体质量的影响

如图 1 所示,与对照组比较,腹水瘤小鼠体质量增长迅速,H22 组和 S180 组小鼠体质量变化曲线于第 4 天开始与对照组有明显的分离,显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

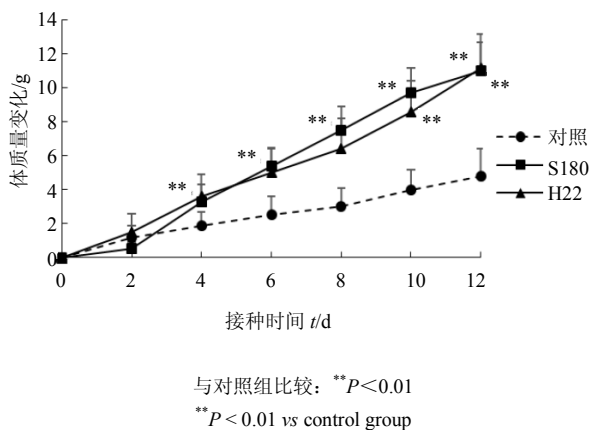


图 1 各组小鼠体质量变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Change curve of body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 对血液及腹水血细胞的影响

如表 1 所示,与对照组比较,H22 小鼠血中白细胞(WBC)数量显著增加 ($P < 0.01$),红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)数量有降低趋势但差异无显著性,其中 HGB 降低较 S180

表1 外周血及腹水中血细胞计数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table1 Blood cell count in peripheral blood and ascites ($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	组别	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	RBC/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB/($g \cdot L^{-1}$)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
血液	对照	6.39 $\pm$ 2.14	9.63 $\pm$ 0.50	154 $\pm$ 9	1405 $\pm$ 272
	H22	31.93 $\pm$ 7.60**	9.36 $\pm$ 0.24	102 $\pm$ 52	1226 $\pm$ 429
	S180	25.60 $\pm$ 5.75**	9.00 $\pm$ 0.38*	133 $\pm$ 12**	1401 $\pm$ 582
腹水	H22	111.48 $\pm$ 65.83 [#]	0.04 $\pm$ 0.02 ^{##}	2 $\pm$ 1 ^{##}	54 $\pm$ 3 ^{##}
	S180	85.94 $\pm$ 6.34 ^{##}	0.05 $\pm$ 0.02 ^{##}	2 $\pm$ 1 ^{##}	58 $\pm$ 32 ^{##}
腹水/血清比	H22	3.83 $\pm$ 1.77	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.03
	S180	3.53 $\pm$ 0.95	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.08

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与同组别血液中水平比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs blood levels

小鼠更为明显, 由于标准差较大使得统计结果无显著性; S180 小鼠血中 WBC 数量显著增加 ($P<0.01$), RBC、HGB 数量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), PLT 数量无明显变化。

血液分析仪检测 H22、S180 小鼠腹水中 WBC 数量均显著高于血液中数量 ($P<0.01$), 结合涂片检查, 发现其实际为肿瘤细胞; RBC、HGB、PLT 在腹水中几未检出。

3.4 对血清及腹水生化指标的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, H22 小鼠血清中 8 项生化指标水平均发生显著变化, 其中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、尿素氮

(BUN)、乳酸脱氢酶 (LDH)、LD 水平显著升高, 肌酐 (CREA)、白蛋白 (ALB)、血糖 (GLU) 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); S180 小鼠血清中 ALT、AST、BUN、LDH 水平均显著增加 ($P<0.01$), LD 水平有增加趋势, CREA、ALB、GLU 水平显著降低 ($P<0.01$)。

H22、S180 小鼠腹水中 CREA、ALB、GLU 水平均显著低于血清含量 ($P<0.01$), LD 水平显著升高 ($P<0.01$), ALT、AST、BUN、LDH 水平变化不明显。两组小鼠 AST、LDH、LD 腹水/血清比均 >1 , 其余 5 项生化指标腹水/血清比均 <1 , 其中, GLU 腹水/血清比 <0.1 。

表2 血清及腹水生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Biochemical indexes of serum and ascites ($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	组别	ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	BUN/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	CREA/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	ALB/ ($g \cdot L^{-1}$)	GLU/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	LDH/ ($U \cdot L^{-1}$)	LD/ ($mmol \cdot L^{-1}$)
血清	对照	27.3 $\pm$ 4.6	100.8 $\pm$ 26.2	7.39 $\pm$ 1.55	39.7 $\pm$ 5.8	23.0 $\pm$ 1.3	7.44 $\pm$ 1.10	552.4 $\pm$ 147.3	10.4 $\pm$ 2.4
	H22	105.6 $\pm$ 59.5**	724.0 $\pm$ 467.9**	11.92 $\pm$ 2.40**	34.1 $\pm$ 4.3*	12.8 $\pm$ 1.5**	4.01 $\pm$ 2.12**	4 730.0 $\pm$ 2 338.0**	15.7 $\pm$ 2.5**
	S180	193.4 $\pm$ 89.1**	741.1 $\pm$ 287.5**	13.75 $\pm$ 1.99**	28.6 $\pm$ 2.8**	10.8 $\pm$ 0.9**	4.58 $\pm$ 0.47**	5 104.3 $\pm$ 1 208.6**	11.1 $\pm$ 1.2
腹水	H22	94.5 $\pm$ 57.5	987.2 $\pm$ 693.6	11.09 $\pm$ 2.34	21.3 $\pm$ 3.1 ^{##}	8.3 $\pm$ 0.9 ^{##}	0.10 $\pm$ 0.07 ^{##}	4 959.7 $\pm$ 2 430.9	24.0 $\pm$ 3.3 ^{##}
	S180	137.0 $\pm$ 73.2	967.2 $\pm$ 573.0	12.56 $\pm$ 1.98	17.6 $\pm$ 3.7 ^{##}	6.6 $\pm$ 1.3 ^{##}	0.09 $\pm$ 0.07 ^{##}	5 495.4 $\pm$ 1 983.5	20.5 $\pm$ 4.1 ^{##}
腹水/血清比	H22	0.89 $\pm$ 0.24	1.29 $\pm$ 0.36	0.93 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.16	0.65 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.01	1.07 $\pm$ 0.25	1.56 $\pm$ 0.34
	S180	0.76 $\pm$ 0.39	1.26 $\pm$ 0.59	0.91 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.10	0.02 $\pm$ 0.02	1.06 $\pm$ 0.24	1.88 $\pm$ 0.45

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与同组别血液中水平比较: ^{##} $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs blood levels of same group

3.5 对电解质的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, H22 小鼠血清中 Cl^- 显著降低 ($P<0.05$), K^+ 、 Na^+ 无显著变化; 腹水中 K^+ 、 Na^+ 分别显著高于、低于血清中水平 ($P<0.05$), Cl^- 变化不明显。 Cl^- 、 K^+ 腹水/血清比 ≥ 1 , Na^+ 腹水/血清比 <1 。

与对照组比较, S180 小鼠血清中 3 者均显著变化, 其中 Cl^- 、 Na^+ 显著降低, K^+ 显著升高 ($P<0.05$); 腹水中三者与血清水平比较无明显变化。 Cl^- 、 K^+ 腹水/血清比 <1 , Na^+ 腹水/血清比 >1 。

3.6 瑞氏染色结果

如图 3 所示, H22、S180 小鼠腹水内细胞的胞

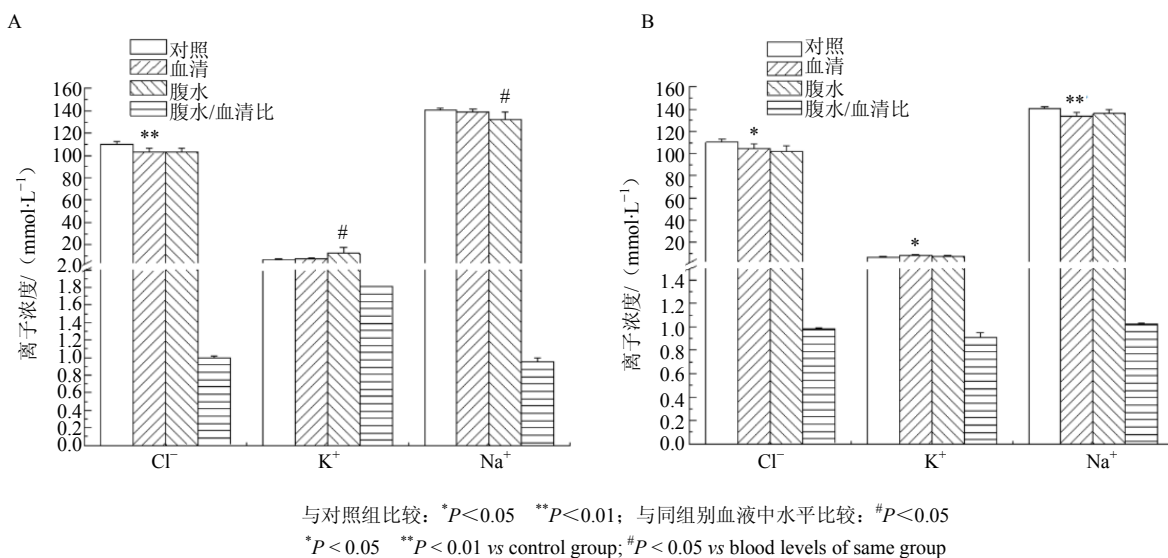


图2 H22 (A) 和 S180 (B) 小鼠电解质变化

Fig. 2 Changes of electrolytes in H22 (A) and S180 (B) mice

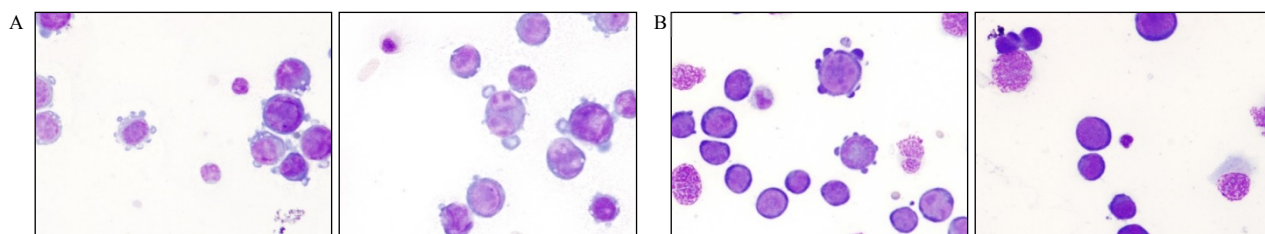


图3 H22 (A) 和 S180 (B) 腹水细胞瑞氏染色结果 (100×)

Fig. 3 Wright 's staining results of H22(A) and S180(B) ascites cell (100×)

膜外存在多个突起,胞质蓝染,细胞核呈深紫色,核膜清晰,靠近核膜处,染色质间隔较为均匀呈向外辐射状排列,其中 H22 细胞核染色不均, S180 胞核内多个核仁。腹水中偶见白细胞。

4 讨论

研究结果显示, H22、S180 小鼠自生长腹水,其体质量变化明显高于对照组,提示腹水瘤小鼠体质量增长与腹水量的增加具有明显的相关性,通过小鼠体质量变化可间接反映腹水的产生速度。临床癌性腹水血细胞计数中 WBC、RBC、HGB 数量降低^[4-5],本研究模型小鼠血中 RBC、HGB 均不同程度降低, WBC 升高,这可能由于临床患者出现腹水时多处于晚期,而非临床动物模型多是为人为干预诱导肿瘤模型,因此外源性的引入肿瘤细胞导致小鼠免疫炎症反应亢进造成上述与临床特征相反的情况出现。

结合涂片检查结果,常规分析中 H22 和 S180

小鼠腹水中 WBC 数量显著高于血液,而实际上腹水中含大量癌细胞,受血液分析仪对白细胞的检测原理所限,将 H22、S180 癌细胞识别为白细胞,存在仪器的误判使得腹水中 WBC 计数异常高于血中 WBC 数量。实际上,腹水中白细胞仅有少量存在,这一结果与临床 ($0.06 \times 10^6 \sim 3.8 \times 10^6$)/L 相同^[6]。

临床上,由于疾病产生的腹水使肝肾功能受到损伤,其生化指标 ALT、AST、BUN 水平升高, ALB 水平降低^[5, 7]。机体任何组织的损伤都会导致体液中 LDH 增多,癌组织中伴随的组织坏死、浸润以及癌细胞中糖的无氧酵解增强,引起 LDH 进一步升高^[8-10],当 LDH 腹水/血清比 > 0.6 时则高度提示恶性腹水^[11-12]。在恶性腹水中葡萄糖的含量降低,可能是腹水中中性粒细胞、细菌和肿瘤细胞等利用葡萄糖增加^[13-14],恶性胸腹水中的糖浓度常不及血糖浓度的一半^[15]。本研究中,两组小鼠血液及腹水中 ALT、AST、BUN、LDH、LD 水平均升高,

ALB、GLU 水平均降低, LDH 腹水/血清比 >1 , GLU 腹水/血清比 <0.1 , 与临床一致。

S180 和 H22 腹水瘤模型亦存在差异: 1) H22 腹水瘤小鼠平均腹水形成时间略迟于 S180 小鼠; 2) H22 小鼠血清中 LD 水平显著高于对照组, S180 组无显著变化, 考虑 H22 组血糖水平比 S180 组更低趋势, 可能与肝癌 H22 的代谢更为旺盛有关; 3) 与对照组比较, S180 小鼠血清 K^+ 显著升高、 Na^+ 显著降低, H22 组无显著变化; 与各自血清中含量比较, H22 小鼠腹水 K^+ 显著升高, Na^+ 显著降低, S180 组均无明显变化, 两模型小鼠 Cl^- 、 K^+ 、 Na^+ 腹水/血清比亦不同。上述指标的差异可能由于 H22 为肝癌细胞株, 而 S180 为骨肉瘤细胞株, 细胞来源不同导致。

综上, 本研究检测了小鼠 H22、S180 腹水瘤模型血液及腹水中多项指标, 并与临床癌性腹水特征比较, 发现两者具有明显的相似性, 与炎性腹水存在明显的区别。本研究丰富了腹水瘤模型的观测指标, 该模型用于抗癌药物的研发时可从更开阔的视野去评价药物特点, 可不再仅局限于生存期、死亡率指标, 但其不适合于评价治疗炎性腹水药物。这将拓宽腹水动物模型的应用, 为非临床研究提供更可靠更全面的实验依据。

参考文献

- [1] 韩有明, 贾勇圣, 佟仲生. 含笑内酯对 H22 肝癌腹水瘤模型小鼠腹腔积液的治疗作用 [J]. 天津医药, 2017, 45(4): 368-371.
- [2] 彭登付, 胡冰, 何义富, 等. 腹腔内应用重组人血管内皮抑制素治疗艾氏腹水瘤的实验研究 [J]. 安徽医科

大学学报, 2014, 49(9): 1218-1221.

- [3] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] 杨勤龙. 抗癌利水方联合西药治疗癌性腹水 40 例临床观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(6): 85-87.
- [5] 董学彩, 杨静, 段树锋. 妇科恶性肿瘤合并癌性腹水患者应用腹腔热灌注化疗的疗效观察 [J]. 肿瘤基础与临床, 2017, 30(3): 206-208.
- [6] 卢青霞. 癌性胸腔积液 52 例临床分析 [J]. 中国卫生产业, 2014, 11(6): 9-11.
- [7] 温微微, 王三虎, 杨子玉, 等. 保肝利水汤治疗晚期肝癌合并腹水的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(4): 613-616.
- [8] 雷立军. 腹腔积液常用生化指标在基层医院的诊断价值 [J]. 实用医技杂志, 2016, 23(9): 990-991.
- [9] 刘芯宇. 生化分析对于腹水病因鉴别诊断的意义 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(9): 1095-1096.
- [10] 高河元. 腹水鉴别诊断的进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 1991, 7(2): 68-71.
- [11] 丁汉梅, 毕竞. 血清、腹水三项生化指标腹水性质的鉴别价值 [J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2256-2257.
- [12] 袁孟彪. 良、恶性腹水的鉴别诊断 [J]. 山东医药, 1992, 32(5): 45-46.
- [13] 张洁, 俞赞临. 良、恶性腹水生化检测诊断进展 [J]. 上海交通大学学报, 2007, 27(11): 1389-1392.
- [14] 许晓琼, 肖创清, 张一帆. 多项指标检测对恶性胸腔积液的鉴别诊断价值 [J]. 山西医药杂志, 2014, 43(6): 609-610.
- [15] 张淑艳, 熊慧顺. 胸腹水与血液中生化指标联合检测对良恶性胸腹水鉴别的诊断价值 [J]. 临床军医杂志, 2011, 39(3): 472-473.