

中西医结合研究



系列丛书

中西医结合 10个病种病证结合研究

The Research of Ten Diseases by Integrative Traditional and Western Medicine: Based on Disease-Syndrome Combination

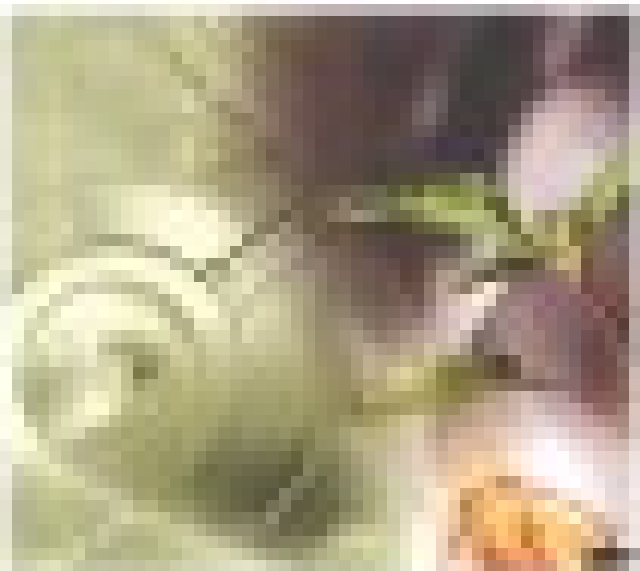


刘献祥 总主编
蔡晶 主编

 北京科学技术出版社

中国国别与 10个国别实证结合研究

王元龙



中西医结合研究系列丛书

中西医结合

10个病种病证结合研究

刘献祥 总主编
蔡 晶 主 编

北京科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

中西医结合 10 个病种病证结合研究/蔡 晶主编. —北京:
北京科学技术出版社, 2011. 9

(中西医结合研究系列丛书)

ISBN 978-7-5304-5333-9

I. ①中… II. ①蔡… III. ①中西医结合疗法—研究
—医学院校—教材 IV. ①R45

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 155546 号

中西医结合 10 个病种病证结合研究

主 编:蔡 晶

责任编辑:吴翠姣 尤玉琢

责任校对:黄立辉

责任印制:张 良

封面设计:耕者设计工作室

出 版 人:张敬德

出版发行:北京科学技术出版社

社 址:北京西直门南大街 16 号

邮政编码:100035

电话传真:0086-10-66161951(总编室)

0086-10-66113227(发行部)

0086-10-66161952(发行部传真)

电子邮箱:bjkjpress@163.com

网 址:www. bkjpress. com

经 销:新华书店

印 刷:三河国新印装有限公司

开 本:720mm × 1020mm 1/16

字 数:250 千

印 张:14. 25

版 次:2011 年 9 月第 1 版

印 次:2011 年 9 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5304-5333-9/R · 1376

定 价:38. 00 元



京科版图书,版权所有,侵权必究。

京科版图书,印装差错,负责退换。

这些年来,经常和福建中西医结合研究院的同仁一起工作,因此当福建中医药大学副校长、福建中西医结合研究院副院长刘献祥教授拿来《中西医结合研究系列丛书》书稿,请我主审并做序时,我感到十分欣慰。

中西医结合是在提高临床疗效的前提下,将传统中医中药与西医西药的知识和方法结合起来,进而阐明机制,获得新的医学认识。它是我国医疗卫生事业长期实行的一项工作方针,是我国医学事业发展的特色和亮点,也将是我们缩短与医学发达国家之间的差距并以自己的特色赶上甚至超过世界医学先进水平的优势所在。

福建中医药大学早在 20 世纪 80 年代中期就开展了中西医结合专业教育,并陆续开展了硕士、博士学位教育,是国内较早开展中西医结合教育的高校之一。2005 年 7 月,又成立了全国高等中医院校首家中西医结合研究院,致力于中西医结合研究,在基础设施、学科建设等方面不断发展,相继获批福建省重点实验室、国家中医药管理局重点学科、国家特色专业,2011 年国务院学位委员会批准其为中西医结合一级学科博士点,取得了良好的成绩。

该丛书从中西医结合发展史入手,总结该校中西医结合学科建设、人才培养的经验,探讨中西医结合临床科研思路与方法,并就该校中西医结合临床治疗具有特色和优势的 10 个病种进行天然药物治疗研究、诊疗方案临床优化、病证结合研究以及临床康复治疗研究,形成了较为完整的中西医结合研究系列。

该丛书不同于以往的中西医结合专业著作,对中西医结合的思考延伸到医学发展、学科建设、人才培养等多方面,涵盖了药物、诊疗、康复等临床多个关键环节。作为对中西医结合领域的一次全方位的探讨,对中西医结合发展的贡献自是难能可贵。

是为序。

陈可冀

2011 年 8 月

序

在人类的发展史中,对生命奥妙的探索、对疾病的认识与治疗、对益寿延年的期望,形成了不同的医学流派,它们在各个历史时期均有不同的贡献。

中国传统医学从它的理论形成发展至今已有两千多年的历史,在“天人合一”的认识观中形成的“阴阳五行”理论,应用于对疾病的认识,提出了“辨证论治”的治病原则,至今这些理论仍在充实与发展;而西医在近 200 多年发展中,紧密地与当代的科学技术结合,并在现代取得突飞猛进的进展,对“人”的研究越来越深入。医学发展到今天,已经有能力来逐渐整合不同的医学流派对疾病的认识与观点,创造出新的医学。

中医已在 100 多年前开始探索“衷中参西”;而西医也在数十年前寻找与传统医学的结合之路,并且都取得了很多成果;近年来对许多疾病,特别是新出现的一些疾病,应用“扶正培本”“活血化瘀”……的治疗原则均取得明显疗效,中西医都发挥了各自的优势。但中西医结合已经提出五十多年,走到今天仍然争论甚多,诸如中西医该如何结合?其理论基础是什么?对中医的理论该如何看待?中药是如何达到治病的目的?等等。如何看待上述诸多问题,本书的作者们尝试从中西医结合发展史、学科建设、人才培养、科研、临床以及药物等方面进行一次回顾性的探索,想找出一些规律性的东西,为中西医结合的发展添砖加瓦,为推动中西医结合作出积极的贡献。

在本系列丛书即将付梓之际,欣闻国务院学位办学科专业目录:中西医结合基础、中西医结合临床,将再分设若干学科,这对中西医结合的发展、对中西医结合人才的培养,将会起到大大的推动作用。

杜建

2011 年 8 月

2005年7月3日福建中西医结合研究院的成立,标志着福建的中西医结合研究有了一个新平台,福建中医药大学中西医结合研究也上了一个新台阶。特别是聘请了我国中西医结合的奠基人之一、中国科学院院士陈可冀教授担任福建中西医结合研究院院长,使研究院的发展思路更加清晰,研究目标更加明确,在相关研究领域取得较快发展。相继中西医结合老年性疾病重点实验室成为福建省重点实验室,中西医结合临床成为国家中医药管理局重点学科,中西医临床医学成为国家特色专业,中西医结合一级学科博士点获得国务院学位委员会批准。

中西医结合学科是我校的传统优势学科,通过长期的教学、科研和临床实践,在中西医结合人才培养、科学研究、临床诊疗等方面积累了丰富的经验。特别是研究院成立以来,在陈可冀院士、杜建教授的带领下,保持优势的同时不断创新,在全国中西医结合领域产生了一定的影响。今天,我们重新梳理和研究中西医结合发展史、学科建设、人才培养、临床科研思路与方法等,并对我校中西医结合临床治疗具有特色和优势的10个病种(肝癌、结肠癌、慢性肾小球肾炎、肾病综合征、糖尿病、脂肪肝、血管性痴呆、帕金森病、骨性关节炎、骨质疏松症)进行全方位的探索,希望为中西医结合工作者提供一些可供参考的资料,于是成就了这一套共8本的《中西医结合研究系列丛书》。

该丛书包括肖林榕研究员主编的《中西医结合发展史研究》,林燕萍教授主编的《中西医结合学科建设研究》,杨敏研究员、施红教授主编的《中西医结合人才培养研究》,郑国华博士主编的《中西医结合临床研究思路与方法》,吴锦忠教授主编的《中西医结合10个病种天然药物研究》,郑健教授主编的《中西医结合10个病种诊疗方案临床优化研究》,蔡晶教授主编的《中西医结合10个病种病证结合研究》,苏友新教授主编的《中西医结合10个病种临床康复治疗研究》。这是我们在中西医结合研究领域的一次跋涉,其

间遇到了很多问题和困难,虽经多方努力,每每请教中西医结合研究领域的各方专家,但终因我们的学术和临床水平有限,差错和失误在所难免,恳请读者多提宝贵意见,以助我们不断完善。

丛书编写和出版过程中,得到学校领导的高度重视,陈立典校长亲临指导,给予了方方面面的关心和支持;各分册的主编和编委们利用业余时间,不辞辛苦,认真编撰;北京科学技术出版社的编辑也为本书编辑出版付出了心血。在丛书出版之际,谨向他们致以深切的谢意。

福建中医药大学 刘献祥

2011年8月

「内容简介」

辨证论治是中医认识疾病和治疗疾病的基本原则和方法,是中医临床的特色和优势。在现实的医疗实践中,现代医学的“病”与中医的“证”相结合的“病证结合”诊疗模式已成为当今中西医结合临床的重要模式,对促进中医药现代化和中医药的发展具有重要意义。医学界已经应用“病证结合”思路开展了大量研究,如疾病的证候分类治疗规范、病证双重诊断下的中医临床研究、明确疾病前提下的中医证候差异性比较、“病证结合”的动物模型及实验研究、中西医病证理论异同探讨等,获得了一定的研究成果。本书从病证结合动物模型、病证结合证型客观指标、病证结合临床证型流行病学调查、病证结合治疗(同病异证、异病同证)等几方面,对福建中医药大学中西医结合临床治疗具有一定优势和特色的10个病种进行资料收集整理和探索,以期更加深入地开展10个病种中西医结合的研究。

第一章 肝癌	1
第一节 肝癌病证结合动物模型研究	1
第二节 肝癌证型客观化研究	9
第三节 肝癌中西医病证结合临床研究	14
第二章 结肠癌	27
第一节 结肠癌病证结合动物模型研究	27
第二节 结肠癌证型客观化研究	29
第三节 结肠癌中西医病证结合临床研究	37
第三章 慢性肾小球肾炎	45
第一节 慢性肾小球肾炎病证结合动物模型研究	45
第二节 慢性肾小球肾炎证型客观化研究	50
第三节 慢性肾小球肾炎中西医病证结合临床研究	56
第四章 肾病综合征	67
第一节 肾病综合征病证结合动物模型研究	67
第二节 肾病综合征证型客观化研究	69
第三节 肾病综合征中西医病证结合临床研究	79
第五章 糖尿病	91
第一节 糖尿病病证结合动物模型研究	91
第二节 糖尿病证型客观化研究	93
第三节 糖尿病中西医病证结合临床研究	102

第六章 脂肪肝 113

- 第一节 脂肪肝病证结合动物模型研究 113
- 第二节 脂肪肝证型客观化研究 114
- 第三节 脂肪肝中西医病证结合临床研究 123

第七章 血管性痴呆 135

- 第一节 血管性痴呆病证结合动物模型研究 135
- 第二节 血管性痴呆证型客观化研究 139
- 第三节 血管性痴呆中西医病证结合临床研究 142

第八章 帕金森病 151

- 第一节 帕金森病病证结合动物模型研究 151
- 第二节 帕金森病证型客观化研究 156
- 第三节 帕金森病中西医病证结合临床研究 161

第九章 骨性关节炎 169

- 第一节 骨性关节炎病证结合动物模型研究 169
- 第二节 骨性关节炎证型客观化研究 173
- 第三节 骨性关节炎中西医病证结合临床研究 184

第十章 骨质疏松 193

- 第一节 骨质疏松病证结合动物模型研究 193
- 第二节 骨质疏松证型客观化研究 197
- 第三节 骨质疏松中西医病证结合临床研究 204

肝 癌

第一节 肝癌病证结合动物模型研究

肝癌是我国常见的恶性肿瘤,具有发展快、预后差的特点。动物模型是动物实验研究的基础,由于种属之间的差异及人类肝癌形成过程中的多因性,建立一个完全反映人类肝癌的动物模型比较困难,但可依据不同的实验目的选择相应的动物实验模型。其中,病证结合肝癌动物模型既有肝癌证的各种表现,又有肝癌病的体征,能很好地体现肝癌中医“证”的阶段性和动态性,选择对证治疗药物,从方证对应的角度着手用药,可深入系统地阐明中药复方治疗肝癌的体内作用机制,符合中医理论和临床实践。

但是,以证候为内容的模型评价体系尚不健全,血瘀、气滞、湿热、脾虚、阴虚等这些辨证类型的标准是什么,并无统一定论。此外,肝癌病证结合动物模型以证为内容的客观评价指标特异性、重现性都较差,缺乏量化指标。随着肝癌的转基因技术、基因敲除技术、克隆技术等分子技术的日益深入和发展,肝癌动物模型也将不断的改进、完善,最终必将为中药抗肝癌的新药研制和开发、中西医结合治疗肝癌提供坚实的实验基础。

一、脾虚证肝癌动物模型

模型 1:雌性 BALB/c 小鼠,以大黄芒硝合剂灌胃 9 天后,在小鼠腹外侧皮内接种腹水型肝癌(HAC) 6×10^6 个细胞,小鼠于胃饲大黄芒硝合剂后第 2~3 天起出现便软、溏,并持续腹泻,第 4~5 天起形体消瘦,少活动,毛散乱无华,四肢冷,形成一系列类似脾虚的症状,接种 HAC 后脾虚小鼠 2~3 天可触及瘤块。

模型 2:给大鼠灌服大黄水煎剂(1g/ml),4ml/次,2 次/天,连续 14 天,

然后用 Walker-256 瘤株复苏,注入大鼠腹腔,生长癌性腹水;取癌性腹水离心弃上清,将浓缩癌性腹水注入大鼠肝脏,模型大鼠出现精神萎靡、皮毛张开、食欲减退、体重减轻、腹泻、动作无力、成群蜷卧、毛疏散竖立等脾虚症状。造模 1 周后 B 超检查多数造模大鼠肝内可见到 1 个或数个高密度回声区,大鼠被处死后剖腹探查,观察肝脏成瘤情况。

二、湿热证肝癌动物模型

模型 1:将 Walker-256 肿瘤细胞株注入大鼠皮下,长出皮下实体瘤,取瘤体周边组织剪成 2mm^3 小块,将瘤块植入肝脏包膜下,同时给予高糖高脂饲料饲养,置于高温高湿环境。模型大鼠出现毛发蓬松、倦怠呆卧、进食少、饮水少、行动呆滞等湿热证症状。造模 1 周后 B 超检查多数造模大鼠肝内可见到 1 个或数个高密度回声区,大鼠处死后剖腹探查,肝脏内发现直径 $0.5 \sim 1.0\text{cm}$ 大小不等的实体肿瘤。

三、兔肝癌模型

模型 1:新西兰大白兔,普通级,雌雄不限。将大腿携有 VX2 鳞状细胞癌的荷瘤兔全麻(10%水合氯醛 2.5ml/kg ,安定 2.5mg/kg ,腹腔注射),无菌条件下剥离肿瘤,切取靠近包膜的灰白色鱼肉样肿瘤组织,剔除坏死组织及纤维组织,用眼科剪将肿瘤组织剪碎至 2mm^3 左右大小的瘤块,置于盛有生理盐水的无菌培养皿中备用。实验兔全麻(用药及剂量同前)后,仰卧固定于手术台上,手术前常规剪毛,8%硫化钠脱毛,消毒铺巾,取上腹正中切口,长约 2cm ,逐层切开腹壁各层,暴露肝脏,以平镊将肝左叶拉出体外,于其组织较厚处,以眼科剪做一长约 3mm 的小切口,经切口在肝内潜行分离,形成一个 $3\text{mm} \times 5\text{mm}$ 大小的腔隙,将一备用的瘤块植入其中,明胶海绵封闭肝脏切口,将肝脏回纳腹腔,4 号丝线逐层缝合腹壁切口各层,关闭腹腔。待实验兔复苏后,送回动物中心饲养。术后肌内注射青霉素及庆大霉素(青霉素 40000U/kg ,庆大霉素 2000U/kg),每天 1 次,共 3 天,以预防感染。接种后采用 CT 扫描监测兔 VX2 肿瘤生长情况。

模型 2:新西兰大白兔,雌雄不限,兔龄 ≥ 3 个月,体重 $2.5 \sim 3.0\text{kg}$ 。无菌剥离接种于荷瘤兔后腿内侧肌肉内的 VX2 肿瘤,切开肿块,于肿块边缘切取生长旺盛的肿瘤组织,剔除坏死组织及纤维组织,生理盐水冲洗后,置于无菌培养皿内。方法一(A 组):用眼科剪将肿瘤组织剪成细小的组织碎块(约 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$),倒入生理盐水,制成混悬液;方法二(B 组):用眼科剪将肿瘤组织剪为约 $5\text{mm} \times 2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 大小的瘤块(组织条),滴入少量生

理盐水,将瘤块浸于其中备用。超声仪采用百胜-DU8 型超声仪(配备穿刺系统),探头型号 6L3,频率 4.0~6.0MHz。接种用针具采用 18G 引导针,钳断针尖及前端部分针杆,将针芯改制为平头针芯,长度以完全放入引导针后较引导针长 3~5mm 为宜。另同法制备一较引导针短 8~10mm 的平头针芯。

超声引导下肿瘤接种:将兔仰卧位固定,常规腹部脱毛,戊巴比妥钠(0.3ml/kg)自耳缘静脉滴入。超声检查兔肝,选择具有一定厚度且避开血管处肝实质为接种区。标记体表穿刺点。标记处皮肤消毒、铺巾、局麻。超声引导下,A 组采用 18G 穿刺套管针穿刺进入预定部位,拔出针芯,观察片刻,无血液及胆汁流出,用注射器抽取 0.5ml 的瘤组织混悬液经穿刺针缓慢注入肝实质,超声监视下可见液体翻滚,注射局部肝实质内出现较弥散的强回声,拔针后棉棒压迫针道约 3 分钟。术后给予庆大霉素 20 万 U 肌注,观察 15 分钟后送回兔笼。B 组以小镊子夹取 3~5 个瘤块置于套管针前端,用平头针芯推入引导针内距前端 5mm 左右,套入改制成的短针芯,超声引导下将引导针插入到预定部位后后退稍许,退出短平头针芯,使用长平头针芯将瘤块推入到预定部位,超声显示在接种部位出现一团状高回声。接种后于第 7、14、21 和 28 天时采用超声观测两组成瘤过程并记录。

模型 3:新西兰白兔,普通级,体重 2~3kg,雌雄不限。采用 CT 引导下经皮穿刺法在兔肝左叶内种植 VX2 肿瘤组织块。动物术前禁食 12 小时,用速眠新全麻,仰卧位,固定兔四肢于手术板上。CT 扫描兔肝脏,确定肝左叶待接种部位,用带尖头穿刺针芯的 18G 穿刺针穿入肝脏预定位置,拔出针芯,用眼科镊夹 1 块 VX2 瘤块(大小 1mm³)放入针鞘内,平头穿刺针芯将瘤块推入肝内,同理再分别放入 2 块组织块(共放 3 块)。如未成功,可再重复上述操作。将一小块明胶海绵用平头穿刺针芯推入肝内封堵针道。局部按压 3 分钟,并用创可贴封伤口。14 天以后进行 CT 或 MRI 影像学检查。

模型 4:新西兰大白兔,体重 2.5~3.0kg,雌雄不限。取 VX2 细胞株悬液 0.5ml 注射于兔后肢肌内,观察肿瘤生长至长径 2~3cm。病理切片观察。

四、鼠肝癌模型

(一)小鼠肝癌模型

模型 1:ICR 小鼠。小鼠术前 12 小时禁食,6 小时禁水。将小鼠腹腔麻醉后,取仰卧位,用橡皮筋固定四肢于实验板上,刮去腹部体毛,安尔碘消毒后,剪开皮肤和腹膜,使肝左叶突出腹腔。用微量注射器抽取 0.2ml HepS 细胞悬液,针尖刺入小鼠肝脏注入细胞悬液,注入后拔出针头,立即用 75% 酒精棉签按压针孔至肝脏表面不再渗血,随即用少量黏合剂涂抹于针孔处,待

干后用生理盐水冲洗暴露的肝脏表面。将肝叶送回腹腔,缝合关腹。以75%酒精擦拭切口后,涂抹一层抗生素药膏。对模型小鼠进行体重监测、统计原位移植成功率和病理检查。

模型2:SPF-VAF级ICR小鼠,雄性。取H22传代第7天的腹水小鼠作为本次实验的瘤源动物。在无菌条件下,抽取腹水加灭菌生理盐水配制成接种用瘤液,皮下注射接种用瘤液0.2ml。待移植瘤生长至直径约1cm时,取出肿瘤,放入少量生理盐水中,切成1~2mm³小块备用。小鼠用10%水合氯醛0.15ml腹腔注射麻醉后,沿胸骨下缘0.5cm处做3cm横切口剪开皮肤分离至腹腔,挤出肝脏,显露肝左叶,在肝左叶切一长3mm的切口,用止血棉轻压,将瘤块植入,用康派特医用胶粘住切口,见肿块植入无出血后逐层关腹。接种10天后解剖小鼠,观察肝脏表面成瘤情况,病理切片。

模型3:清洁级近交系小鼠BABL/C(H2Kd),雄性;CB6F1(BABL/C×C57BL/6的杂交子一代,H2Kd/b,简称F1),雄性。在F1小鼠的成瘤实验复苏后的H22细胞在37℃、体积分数为0.05的CO₂下用完全培养液培养3天,以无血清RPMI-1640培养液调整细胞浓度为1×10⁷/ml,取0.2ml注入BABL/C小鼠腹腔内。7天后将小鼠颈椎脱臼处死,于75%酒精浸泡1~2分钟后抽取腹水,用生理盐水(NS)稀释,吸管充分吹打均匀,1000r/min离心5分钟,倾出上清,加NS配制成1×10⁷/ml的瘤细胞悬液,移入50ml玻璃瓶内,将玻璃瓶放于冰水槽里冰浴。注射器抽取H22细胞前先将玻璃瓶内瘤细胞悬液水平直线振摇,每只F1小鼠右腋皮下接种0.2ml(2×10⁶个细胞)。均在超净台内操作。观察小鼠出现肿瘤的时间以及小鼠的体重变化、生存状况、死亡时间、死亡时肿瘤质量、成瘤率。

(二)大鼠肝癌模型

模型1:

1)瘤块制备:皮下移植瘤Wistar大鼠,予环孢素A(CsA)5mg/kg皮下注射,7天后取大鼠肝癌细胞CBRH-7919经传代培养,制成细胞悬液0.3ml,无菌条件下接种于鼠膝部皮下。2周后形成直径(0.94±0.21)cm肿瘤,麻醉后无菌条件下取出肝癌组织,选择边缘的癌组织,用眼科剪剪成1mm×1mm×1mm瘤块,置于RPMI-1640培养基,37℃孵箱中备用。

2)肿瘤种植模型的制作:①采用肝内隧道植入法。麻醉后取上腹部正中切口1.5cm进腹,将肝左叶挤出切口,左手示指和中指捏住肝叶,套管针内置入已准备好的1mm³瘤块1块,于肝表面斜行穿刺肝脏,形成深3~5mm的隧道,将针芯推入植入瘤块,退出套管针,用明胶海绵止血后复原肝脏。

②原位肝移植在乙醚吸入麻醉下,采用改良的 Kamada 法,以 SD 大鼠为供体,Wistar 大鼠为受体的肝移植术(SD→Wistar)。观察各组大鼠的成瘤率,在 B 超下观察肿瘤生长情况,绘制生长曲线。

模型 2: Buffalo 大鼠,雄性,250 ~ 320g。将约 McA-RH7777 瘤细胞注入大鼠肝左叶。7 天后,通过剖腹探查术确认大鼠肝内肿瘤结节形成情况。分别在注射后第 7 天、第 14 天、第 21 天处死。处死后立刻收集大鼠肿瘤组织,病理切片观察。

模型 3: Wistar 大鼠。采用改良口服二乙基亚硝胺(DENA)诱导制备肝硬化大鼠。

1)瘤块的制备:取 CBRH-7919 细胞株,制成 2×10^6 ml 细胞悬液,接种于裸鼠腹股沟。待皮下肿瘤长至 1cm 后,麻醉下完整取出肿瘤,剔除周围结缔组织,取肿瘤边缘生长旺盛的组织,接种在另一只裸鼠的腹股沟,依此法传代 3 次。传 3 代后得到肿瘤,将生长旺盛的肿瘤组织切成直径 2mm 的瘤块。

2)原位种植:乙醚吸入法麻醉大鼠,常规消毒皮肤,取左肋缘下切口进腹,暴露肝脏;将肝左叶提出腹腔,用眼科剪剪一斜行切口,将瘤块放入;同时切取小块肝组织(1.3mm × 1.5mm × 1.8mm),凝胶海绵加压止血后,将肝左叶轻轻放回腹腔,观察肝脏及腹腔无明显出血后逐层关腹。接种后观察各组大鼠肝癌原位种植瘤形成率和病理情况。

模型 4: SD 大鼠。术前禁食 6 ~ 8 小时,2% 戊巴比妥钠按 40mg/kg 剂量腹腔注射麻醉成功后仰卧固定于自制的手术板上,备皮、脱毛、局部安尔碘消毒,用 1ml 注射器先抽取空气 0.1ml 再使注射器垂直,抽取浓缩的瘤细胞悬液 0.05ml,在 B 超引导下针头与肝脏表面呈 30°角斜刺入鼠肝左外叶约 0.8cm,在超声监视下缓缓注入瘤细胞悬液 0.05ml 后继续推入空气 0.03ml,然后快速拔针以防止瘤细胞悬液顺针道逆流,穿刺点用棉签适当压迫 5 分钟,再次局部消毒。用 B 超观察种植的成功率、肿瘤的生长方式、生长速度。

(三) 其他

模型: 仓鼠。胰腺癌细胞株(pGHAM-1)移植性肝癌模型制作:将仓鼠胰腺癌细胞株(pGHAM-1)培养后配成 4×10^{10} /L,取 0.5ml 接种于仓鼠皮下 4 周后成瘤;分离、取出鱼肉状瘤组织,切成 1mm³ 大小备用;仓鼠适应性饲养 3 天,10g/L 戊巴比妥钠 100mg/kg 腹腔注射麻醉,腹部脱毛、消毒,在剑突下沿腹正中线做 1.5cm 切口;用手指挤压仓鼠腹腔,挤出一叶肝脏,用手术刀片于肝脏接种部位以 30°做一斜切口为 0.5cm × 0.5cm;消毒棉签蘸 10g/L 凝血酶止血;用镊子将 1mm³ 大小的瘤组织植入切口,消毒棉签轻压切口止血固定,常规缝合关腹,全程均为无菌操作。用 B 超观察种植的成功率、肿瘤

的生长方式、生长速度。

五、基因工程小鼠在肿瘤研究中的应用

(一) 血管形成转基因小鼠

1. RIP-Tag 基因工程小鼠 RIP-Tag 基因工程小鼠,是胰岛 β 细胞肿瘤,由癌基因 SV40Tag 诱导,受胰岛素基因调控区控制。该小鼠模型在胚胎期的第 8 天开始直到 3 周龄为癌基因表达阶段;继而出现零散的增生胰岛,其中 50% 成为高度增生的胰岛,在组织学上,具备肿瘤细胞特性。其中 20% 有明显的血管生成,10% 可成为实体肿瘤。

2. K14-HPV16 基因工程小鼠 K14-HPV16 小鼠是表皮鳞癌模型,癌细胞源于基底角质细胞,主要表达人乳头状瘤病毒 16 型癌基因,由角蛋白 14 基因调控区控制。K14-HPV16 小鼠在肿瘤形成的各阶段都伴有激活血管形成的表现:1 月龄的 K14-HPV16 小鼠,其真皮层可见毛细血管密度略有增加,而在其增生不良的早期以及进展期时,可见毛细血管无论是数目还是分布密度均明显增加。该模型小鼠浸润性变化与人体鳞癌细胞十分类似,其恶变的时间为 9 ~ 12 个月,癌变发生率低,约有 20% 的转基因鼠可发生癌变。此类模型可作为针对激活血管形成治疗的动物模型,一旦形成肿瘤则可作为治疗上皮肿瘤及转移的动物模型。

3. VEGF 基因工程小鼠 VEGF 对肿瘤血管生成的作用已被许多异体移植瘤和转基因模型证实。1998 年,LarcherF 等建立了角蛋白 K6 基因调控序列控制下表达 VEGF120 的转基因小鼠。新生小鼠全身散发性出现红斑及肿胀的结节,致死率较高。对这些转基因鼠的皮肤进行组织学检查,证明血管数量明显升高而且水肿导致皮肤架构崩解。这种转基因小鼠为体内研究皮肤血管生成过程以及肿瘤发生过程中血管的生成提供了非常有价值的模型。

4. FGF 基因工程小鼠 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)是成纤维生长因子家族中的一员,在体内分布广泛,存在于来源于中胚层及神经外胚层的细胞及多种肿瘤细胞中,对这些细胞有促增殖分化功能,参与胚胎发育、血管生成、损伤修复、神经再生、肿瘤生长等多项生理及病理过程。

(二) 细胞凋亡转基因小鼠

1. p53 基因工程小鼠 p53 基因位于人类 17 号染色体短臂上(17p53),大约有 2 万个碱基。p53 蛋白是一条 53kD 的由 393 个氨基酸组成的富含磷酸基的核蛋白(因此命名为 p53)。p53 蛋白有 11 个外显子,其中 5 个决定野生型 p53 蛋白正常功能的进化保守区段分别位于 1、4、5、7 和 8 外显子上。