

甲基丙烯酸甲酯灌注法在制作金黄地鼠颊囊微血管铸型中的应用

周 磊

(广东医学院附属医院 湛江 524001)

摘要 本文介绍了应用甲基丙烯酸甲酯灌注法,制作金黄地鼠颊囊微血管铸型的方法及其在肿瘤研究中的初步应用。制作之铸模清晰地显示了该组织微血管的立体构筑并能较好地显示血管新生的功能性变化和肿瘤情况下微血管系统的病理性改变。是一种研究微血管构筑及病理情况下微血管变化的理想方法。

关键词 血管构筑,血管生成,动物实验,扫描电镜

金黄地鼠 (*Mesocricetus auratus*) 颊囊是微循环研究中常用的动物模型,并由于其特殊的解剖生理学特性,在肿瘤研究中也常使用它作为肿瘤移植,化学诱癌实验的动物模型^[1]。近年来发现肿瘤生长过程中,释放肿瘤血管生成

因子 (Tumor angiogenesis factor TAF) 促进血管生成,血管的生成又反过来促进肿瘤的生长并与肿瘤的恶性生物学行为有关^[2,3,5]。由于金黄地鼠颊囊既是微循环研究中较理想的模型,又是肿瘤实验的理想动物模型,其在肿瘤生

长与血管生成关系研究中的应用更是日渐广泛^[1]。为了较好地观察金黄地鼠颊囊微血管的形态学特点及其在病理状况下的变化,我们应用甲基丙烯酸甲酯灌注法制作血管铸型,成功地作出扫描样品,为研究金黄地鼠颊囊微血管的立体构筑提供了一种较理想的方法,也为其在肿瘤的血管生成现象观察提供了一种理想的手段。

1 材料和方法 本文实验于1989年5月—1990年10月进行。

1.1 实验对象 6—8周龄叙利亚金黄地鼠,体重60—80g,饲以鼠用颗粒料,不喂水,每日给青菜适量补充水分。

1.2 血管铸型的制备及观察 预聚体预备按下列比例量取试剂于锥形瓶中:

1.2.1 甲基丙烯酸甲酯(Methyl methacrylate) 85%

1.2.2 丙烯酸甲酯(Methyl acrylate) 10%

1.2.3 过氧化苯甲酰(Benzoyl peroxide) 5%

混匀后水浴加温至80—85℃,见溶液逐渐变稠,当粘稠度呈蛋清状时停止加热,迅速流水冷却,加入0.1%苏丹III使呈红色,置入冰箱内备用。其中商品甲基丙烯酸甲酯含有阻聚剂对苯二酚,应用前须用2%氢氧化钠溶液洗涤去除,再用蒸馏水洗至呈中性,用无水亚硫酸钠去水。

灌注方法: 用1%戊巴比妥钠按50mg/kg体重腹腔内注射将动物麻醉后,仰卧固定于手术板上,打开胸腔显露心脏,经左心室插入导管至升主动脉,丝线结扎固定,再结扎降主动脉。先用肝素生理盐水灌流,剪开双侧锁骨下静脉引流,待引流液为清亮液体时,以0.5%戊二醛10ml灌流固定。然后先灌入少量单体再将预聚体加入1%二甲基苯胺(Dimethylaniline),混匀后以120mmHg压力于5分钟内灌入,至引流口处流出预聚体为止,分别结扎双侧锁骨下静脉及升主动脉。将动物置入60℃水中4小时,促进树脂硬化。

扫描电镜样本的制作及观察 将硬化后的标本取下,置入20%氢氧化钠水溶液中,室温

下腐蚀一周,流水清洗后,于解剖显微镜下检查,见无残存组织为止。冷空气吹干,常规喷金后,于Ammrry-1000B型扫描电镜下观察及拍照。

2 结果 金黄地鼠颊囊毛细血管呈鱼网状排列,血管表面平滑,排列均匀稀疏,可见其与深部大血管相连接(图1见封3,下同)。

本文还对化学致癌过程中的颊囊毛细血管铸型进行了观察。在化学诱癌早期肿瘤未出现前(癌前病变阶段)即可见血管密度增加以及呈尖锥状或囊状新生毛细血管瘤芽(见图2)。

癌变动物的微血管构筑则可见毛细血管极度扩张变形,互相融合成片块状,腔窦状(见图3)。

3 讨论

3.1 本实验方法的优点:

3.1.1 该铸型剂粘度低,流动性好,可满意地充盈整个微血管系统。

3.1.2 方法简单,不需要特殊设备。

3.1.3 完成之铸型能显示正常状况下微血管系统的立体构筑外,对病理状态下的微血管系统变化能直观地显示。对毛细血管功能性活动中的生成反应,本法可以显示新生毛细血管瘤的立体状态,其图象的直观和清晰是其他任何方法都难以相比的。对肿瘤微血管形态观察可以显示其形态上的明显异常,丧失基本的血管形态,由之不难推断,肿瘤组织存在微循环功能上的障碍。目前临床上对肿瘤进行局部高温治疗机制的假说之一,就是认为肿瘤血管存在变异,不能行使正常的功能,在热疗过程中不能通过血液将热量及时带走,造成肿瘤区域温度高于周围的正常组织,从而杀灭肿瘤细胞^[2]。本实验结果验证了这一假说。另外,由于扫描电镜可对较大范围的标本进行立体观察,对肿瘤生长过程中血管生成反应与肿瘤的关系,使用这种方法就能较客观、较全面地反映整个标本中血管的真实状态。

3.2 实验注意事项

3.2.1 灌注前使用0.5%戊二醛灌流的目的是使血管壁蛋白凝固,管腔变硬,从而保持其自然

的大小和形状,不致在灌注预聚体时出现膨胀或塌陷。但戊二醛灌注后,常要影响预聚体进入,所以先用单体灌注,让单体先取代戊二醛溶液充盈管腔,然后再灌入预聚体,这样就能保证预聚体充盈整个微血管系统。

3.2.2 灌注时预聚体内加入二甲基苯胺是起促进聚合的作用,其量的多少,直接与聚合速度有关,如过量可导致反应过快引起“爆聚”,影响铸型质量。一般气温下按本法的1%量即可,如夏天气温较高时用量应酌减。

3.2.3 灌注之液量要适宜,否则压力过高,灌流量超过引流口之引流量时,可致铸型剂外溢,出现假象(见图4)。

3.2.4 腐蚀,冲洗要反复多次,腐蚀完全后流水冲洗应充分,否则NaOH遗留在标本上形成结晶,影响铸型的外观(见图5)。

3.2.5 制作好之铸型标本,保存在3%—5%盐

酸或氢氧化钠溶液中,切勿在酒精中保存。干燥标本应置于干燥器内保存。

参 考 文 献

- 1 Ferguson W. and AC. Smillie. Vascularization of premalignant lesions in carcinogen-treated Hamster cheek pouch. *JNCI*, 1979, 63(6):1382—1392.
- 2 Folkman J. Tumour angiogenesis. *Advan Cancer Res* 1974, 19: 331—358.
- 3 Nicosia RF., R. Tchao and J. Leighton. Angiogenesis-independent tumour spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res*, 1983, 43:2159—2161.
- 4 Odukoya O., and G. Shklar. Two-phase carcinogenesis in hamster buccal pouch. *Oral Surg*.1982, 54: 547—552.
- 5 Sekiya S., T. Oosaki and H. Takamizaw. Tumour angiogenesis activity of human choriocarcinoma cells grown in vitro. *Genecol Oncol*, 1986, 25: 271—280.
- 6 Storm FK., WH. Harrison, RS, Elliott et al. Normal tissue and solid tumour effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res*, 1979, 39:2245—2251.

《甲基丙烯酸甲酯灌注法 在制作金黄地鼠颊囊微血 管铸型中的应用》

一文之附图 (正文见第 44 页)

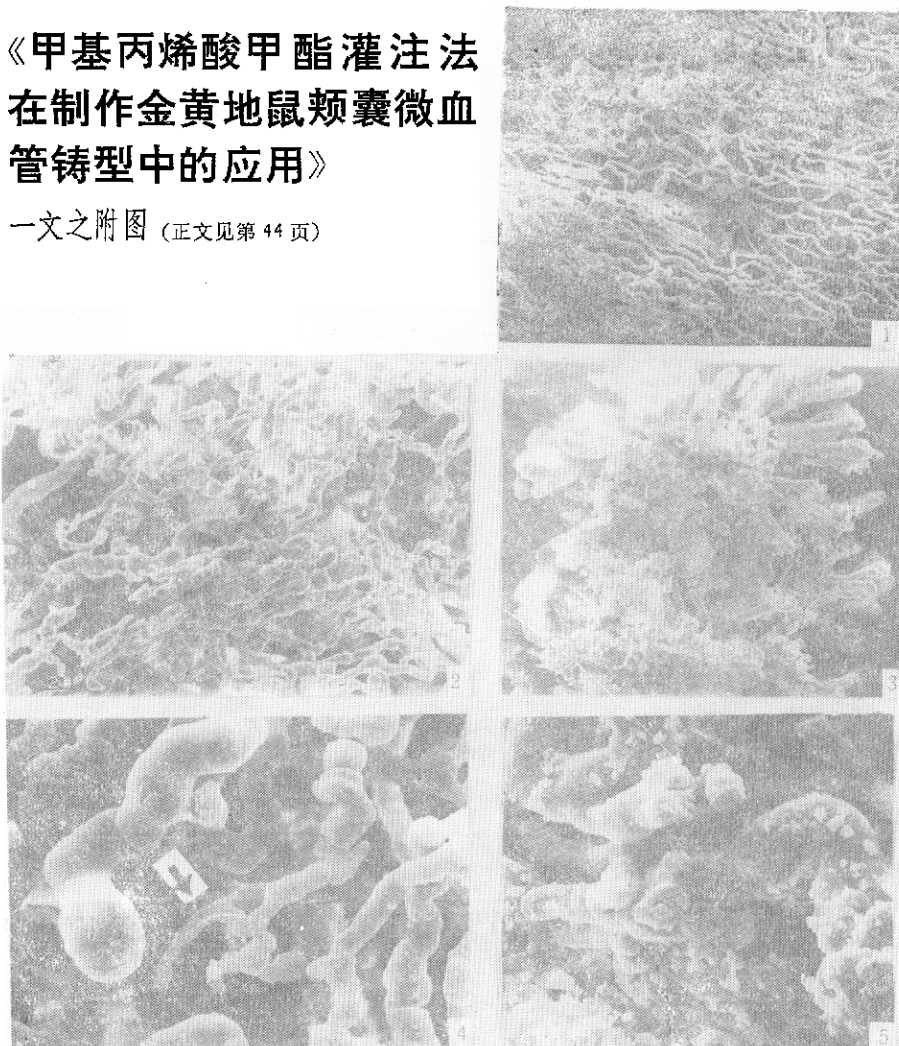


图 1 正常金黄地鼠颊囊 毛细血管呈鱼状排列,血管表面平滑,排列均匀稀疏,可见与深部大血管相连接,×64; **图 2 化学诱癌早期(癌前病变阶段)** 血管增生变密,出现散在尖锥形及囊球形新生毛细血管芽,×160; **图 3 癌变动物的微血管构筑** 可见毛细血管极度扩张变形,互相融合成片状,腔窦状,×40.4; **图 4 灌注压力过大致血管破裂,铸型剂外溢(箭头所示)**,×400; **图 5 冲洗不足致氢氧化钠残留形成结晶**,×480。