

技术通报#445

Corning® Matrigel® Matrix 植入小鼠和组织固定的方法

¹Kazuo Ohashi, M.D., Ph.D., ¹Takashi Yokoyama, M.D., ¹Yoshiyuki Nakajima, M.D., Ph.D., and ²Marshall Kosovsky, Ph.D.

¹Nara Medical University, Nara City, Nara JAPAN; ²Corning Incorporated, Tewksbury, MA, USA

引言

康宁基底膜基质是从EHS(Engelbreth-Holm-Swarm)小鼠肉瘤中抽提得到的可溶性的基底膜抽提物,此种肉瘤富含细胞外基质蛋白。其主要成份是层粘连蛋白,还有胶原IV、硫酸肝素糖蛋白和巢蛋白。康宁基底膜基质对于正常转锚依赖性上皮细胞和其他类型细胞的粘附和分化有效作用。

康宁基底膜基质被广泛应用于各种研究,包括3D细胞培养、细胞侵袭和迁移试验、药物代谢/毒理学、体内或体外血管再生试验。本文描述了康宁基底膜基质在体内的应用,例如在小鼠中进行血管再生和人肿瘤细胞植入。

1. 康宁基底膜基质(货号354234和356234)作为支架支持各种肿瘤细胞的移植。在需要减少生长因子组分的研究中您可以使用低生长因子(GFR)康宁基底膜基质(货号354230和356230)。
2. 无酚红康宁基底膜基质(货号356237)和低生长因子无酚红康宁基底膜基质(货号356231)通常用于血管再生试验中测量血红蛋白含量(红褐色吸收测量)的氰化正铁血红蛋白法。康宁基底膜基质已经被证明能提高体内血管再生的过程。
3. 高浓度(HC)康宁基底膜基质(货号354248)适合体内高蛋白质浓度增加肿瘤生长的应用。在小鼠皮下注射后,高蛋白质浓度(18-22 mg/mL)也允许康宁基底膜基质的插入来维持它的完整性。这样可以用原位杂交分析注射的肿瘤组织和/或血管生成化合物的定位和/或未来的切除。

程序

向小鼠皮下注射康宁基底膜基质

1. 因为康宁基底膜基质在高于10℃时会形成凝胶,康宁基底膜基质溶液应该保存在低温下,并且在注射之前所有的设备和试剂(注射器、注射针、康宁基底膜基质溶液等)应该在冰上冷冻。
2. 在康宁基底膜基质和细胞悬液混合之后[注释1],康宁基底膜基质混合物被注射入小鼠皮下[注释2](图1)。应该选择适当大小的针头(21-25G)以防止破坏细胞。为了增加注射的康宁基

Corning Restricted

底膜基质混合物进入皮下组织的接触面积，在常规皮下插入之后，通过左右摇动针头应该形成一个扩张的皮下囊肿。之后康宁基底膜基质混合物将被注入囊肿中。当康宁基底膜基质混合物没有通过摇动针头的方式注入特定的区域时，混合物将形成一个大的细胞团，并且由于团块核心内营养物质到细胞的无效灌注，可能产生随后的生长缺陷。

注释1：在这个实验中，未稀释的康宁基底膜基质被单独注入小鼠。为了肿瘤的移植，大约 2×10^7 个细胞/mL的细胞悬液应该与康宁基底膜基质混合，并且细胞浓度为 10^6 个细胞/mL。为了防止小鼠中不完全凝胶的形成，请不要将康宁基底膜基质的浓度稀释到低于4 mg/mL。

注释2：在这个实验中，注射了0.7 mL的康宁基底膜基质。康宁基底膜基质的注射体积需要考虑到进入组织的康宁基底膜基质吸收，并需要考虑到合成组织“栓”的容易清除。请根据您的实验的需要来决定最佳的注射量。

虽然给小鼠注射0.1 mL康宁基底膜基质混合物可能已经足够加强肿瘤生长，但是在体内血管再生研究中推荐至少注射0.5 mL。



图1 皮下注射位置

从小鼠体内切除康宁基底膜基质栓

3. 在一个合适的培养周期后[注释3]，麻醉小鼠并使用剪刀切除组织方形的部分。为了确保血栓的完全切除，请比植入位置的全侧宽~5 mm切下。为了维持康宁基底膜基质栓的形状，请切除皮下组织、腹膜和皮肤。随后用福尔马林固定这些组织。图3显示了切除后从腹膜处观察的植入的康宁基底膜基质。在体内由于康宁基底膜基质的吸收和部分降解，相比于注射的体积，植入的康宁基底膜基质的体积会减小。切除的康宁基底膜基质栓通常是清晰的淡黄色。如果在康宁基底膜基质栓内形成血管，那么康宁基底膜基质将会呈现出红色。

注释3：在这个实验中，一周之后切除康宁基底膜基质栓。考虑到血红蛋白的数量通常用于评价血管再生术，含有血管内皮生长因子和肝素康宁基底膜基质应该被注射来促进血管再生。大约3天之后，含有新形成血管的康宁基底膜基质栓能被容易的切除。

CORNING

康宁生命科学（吴江）有限公司
江苏省吴江市经济开发区
庞金路 1801 号 T03/17
www.corning.com/lifesciences/china



图2 箭头表示康宁基底膜基质注射的位置。方形表示样品切除的区域。



图3 切除后从腹膜处观察植入的康宁基底膜基质

Corning Restricted

CORNING | FALCON® AXYGEN® GOSSELIN® PYREX®



图4 从皮下组织切除的康宁基底膜基质栓

含有康宁基底膜基质的组织的固定

4. 离体的组织需要伸展并且用一张厚纸(例如, 海报纸)包裹以避免皱着的形成。组织随后被放置在一个尼龙袋中用以保护。请在室温下使用10%的福尔马林至少固定组织一天[注释 4]。这样的处理会使组织变硬, 为样品的切片做好准备(图6)。应当注意确保切片的厚度足以保留植入的康宁基底膜基质栓。

注释4: 在8 °C下Corning® Matrigel®的固定可能造成基底膜基质的解聚。因此, 康宁基底膜基质应该在室温下固定。

5. 固定的康宁基底膜基质栓能被包埋入石蜡, 用以准备组织化学染色的切片。图7显示了一个苏木精-伊红(HE)染色的康宁基底膜基质栓切片。在苏木精-伊红染色后, 康宁基底膜基质呈现出粉红色到浅红色。



Corning Restricted

图5 切除的组织固定在尼龙袋上。皮肤侧朝上。

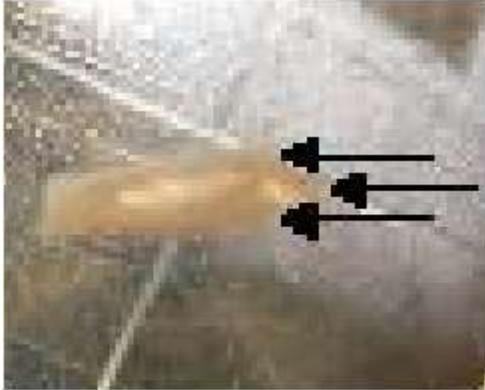


图6 箭头表示固定的康宁基底膜基质栓的切面。(上部箭头=皮肤，中间箭头=康宁基底膜基，下部箭头=肌肉层)

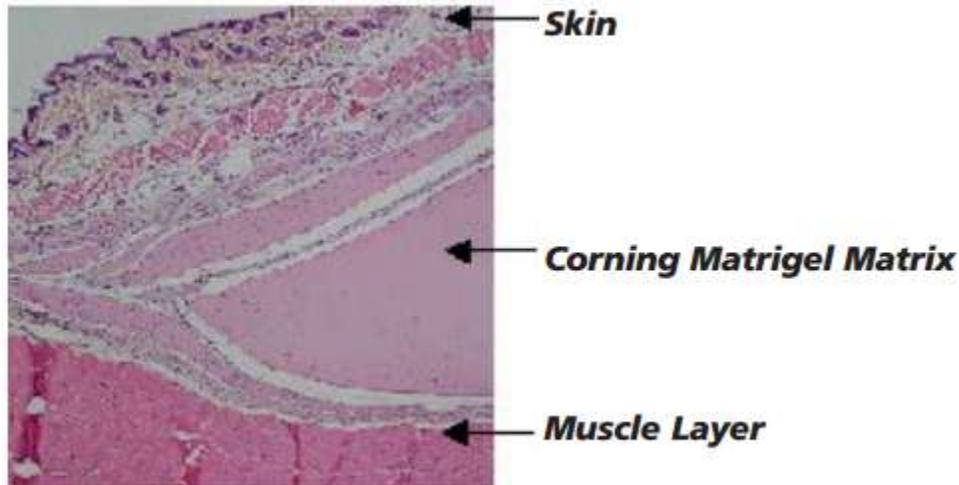


图7 苏木精-伊红染色图

参考文献

1. Passaniti, A., et al., A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 67:519 (1992).
2. Kragh, M., et al., In vivo chamber angiogenesis assay: An optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity. *Int'l Journal of Oncology* 22:305 (2003).
3. Bandyopadhyay, A., et al., Extracellular domain of TGFbeta type III receptor inhibits

Corning Restricted



CORNING

康宁生命科学（吴江）有限公司

江苏省吴江市经济开发区

庞金路 1801 号 T03/17

www.corning.com/lifesciences/china

- angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene* 21:3541 (2002).
- Noel, A., et al., Heterotransplantation of primary and established human tumor cells in nude mice. *Anticancer Res.* 15:1 (1995).
 - Glondou, M., et al., A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 20:6920 (2001).
 - Yue, W., et al., Tumor cells implantation. MCF-7 human breast carcinomas in nude mice as a model for evaluating aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44(4-6):671 (1993).
 - Isaji, M., et al., Angiogenesis evaluation by measuring hemoglobin content. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *British Journal of Pharmacology* 122:1061 (1997).
 - Ohashi, K., et al., Hepatocytes implantation. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nature Medicine* 6(3):327(2000).

数据由奈良医科大学的Kazuo Ohashi博士和Takashi Yokoyama博士提供。

Corning Restricted

CORNING | FALCON® AXYGEN® GOSSELIN® PYREX®