

裸小鼠肝癌原位移植模型的建立

田树红,王日超,邢桂兰,肖敏,符健*

(海南医学院 海南省药物安全性评价研究中心,海口 571199)

【摘要】 目的 建立一种 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型。**方法** 采用异氟烷气化对实验动物进行全身麻醉,分别用“包埋法”和“夹心法”建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植瘤模型。手术后用小动物活体成像系统对肿瘤组织的生长情况进行检测,4 周后对肝及肿瘤组织进行组织病理学检查。**结果** 采用夹心法建立的肝癌原位移植 BALB/c 裸小鼠模型,具有操作时间短,难度低,成瘤率高的特点,肿瘤组织生长良好,在腹腔内未出现肿瘤广泛种植现象,组织病理学检查无异常,动物死亡率低等特点。**结论** 与包埋法相比,夹心法更具优势,可快速制备大批量小鼠肝癌原位移植模型,为肝癌原位药效学及其他研究提供更便利的平台。

【关键词】 BALB/c 裸鼠;肝癌;原位移植;小动物活体成像系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0239-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.004

Establishment of an orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice

TIAN Shu-hong, WANG Ri-chao, XING Gui-lan, XIAO Min, FU Jian*

(Hainan Research Center for Drug Safety Evaluation, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

【Abstract】 Objective To establish a new orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in BALB/c nude mice. **Methods** The nude mice were under general anesthesia with isoflurane inhalation. Hepatocellular carcinoma was induced by subcutaneous inoculation of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells in nude mice. The orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice was established by orthotopic implantation of small pieces of the liver cancer tissues into the mouse liver by either a sandwich method or embedding method. The post-operative tumor growth was determined by a small animal in vivo imaging system. Histopathological examination of the liver and tumor tissues was performed at four weeks after modelling. **Results** The orthotopic hepatocellular carcinoma model of nude mice established by the sandwich method had several distinct advantages: shorter operative time, less operational difficulties, with a high rate of tumor formation, no wide-spread peritoneal tumor dissemination, well-preserved tumor histological structure, and low animal mortality. **Conclusions** Compared with the embedding method, the sandwich method can save much time for preparation of this orthotopic implantation model of hepatocellular carcinoma in nude mice, and provide a more convenient platform for research of liver cancer pharmacodynamics and other biological studies.

【Key words】 BALB/c nude mice; Liver cancer; Orthotopic implantation; Small animals living imaging system

Corresponding author: FU Jian, Email: Fujian.hnmc@163.com

2015年2月3日,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发表了《全球癌症报告2014》,研究称2012年全球癌症患者和死亡病例都在急剧

增加,新增癌症病例有近50%出现在亚洲,而中国占了其中的大部分。“国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)”报告

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(NO 81160408)。

[作者简介]田树红(1980-),男,助理研究员,硕士,主要从事药理学与毒理学、抗肿瘤药效学研究。

[通讯作者]符健,(1960-),男,博士,教授,研究方向:药理毒理学,E-mail: Fujian.hnmc@163.com, Tel:0898-66982118

预测全球癌症病例将呈现急剧增长态势,将由 2012 年的 1400 万人(死亡 820 万人)逐年递增至 2025 年的 1900 万人,预计到 2035 年将达到 2400 万人。2014 年中国卫生统计提要数据表明,肝癌高居各种恶性肿瘤相关死亡原因的总体第 2 位。在全球范围内,每年约有 75 万新增肝癌病例,同时又有约 70 万例肝癌死亡病例,其中我国所占比例超过 50%^[1]。

肝癌具有恶性程度高、治疗复杂和生存时间短等特点,是目前临床上最常见的恶性肿瘤之一,目前,常见的肝癌移植模型按接种部位分主要有皮下移植和原位移植,按接种类型又可分为细胞混悬液法和肿瘤组织块法^[2]。常见的肿瘤组织块原位移植模型的建立方法(包埋法)是用套管针在动物肝脏扎入约 2~3 mm 深,塞入肿瘤组织块(约 1~2 mm³),无菌干棉签按压止血或用医用止血贴止血,逐层缝合皮肤^[3-4]。但由于动物肝脏比较脆弱,操作过程中容易造成肝脏大量出血,操作时间较长,在大批量建立该模型时需要耗费大量的时间和精力。因此,本研究建立了一种新的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型,即夹心法。该方法具有操作简单、手术时间短、成瘤率高、肿瘤组织生长良好和动物死亡率低等特点。此外,在动物腹腔内未出现肿瘤广泛种植现象,组织病理学检查无异常。能为大批量制备肝癌原位模型节约大量时间,为肝癌原位药效学及其他研究提供更便利和有效的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验分组

SPF 级 BALB/c 裸小鼠,6~8 周龄,雄性,体重 18~22 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】。实验地点为海南省药物安全性评价研究中心【SYXK(琼)2012-0013】。皮下移植模型使用了 4 只裸小鼠,30 只裸小鼠用于肝癌原位移植模型的建立,分为包埋法和夹心法模型组,每组 15 只。

1.2 肿瘤细胞株、实验器材、试剂及主要仪器

生物发光标记的肿瘤细胞株人肝癌细胞 Bel-7402 购自上海乐晨生物科技有限公司。手术器械:手术剪,弯镊,直镊,持针钳,缝合针(4×10),0#缝合线;试剂:异氟烷购自 RWD,瑞沃德公司,D-荧光素钾盐购自 Synchem 公司,PBS 缓冲液、RPMI 1640 培养液和胰酶消化液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;主要仪器:IVIS Ki-

netic 小动物活体成像系统购于美国 Caliper 精诺真公司;VIP 3000 型气体麻醉系统购于 MatrX 公司;BX41 显微镜系统购于奥林巴斯公司。

1.3 术前麻醉

在建立肝癌原位移植模型时需要使用气体麻醉系统^[5]将裸小鼠进行术前麻醉,麻醉剂为异氟烷。该麻醉系统是用具有一定气压的纯氧气带动异氟烷,形成气化的异氟烷和氧气的混合气体。将裸小鼠放入一个相对密闭的透明有机材料制作的盒子内,然后持续通入该混合气体。

1.4 肝癌皮下移植模型的建立

将体外培养好的肝癌细胞 Bel-7402 用无菌 PBS 缓冲液冲洗 2 次,再用无菌 PBS 缓冲液制备成浓度为 10⁷ 个细胞/mL 的细胞混悬液。取 0.2 mL 该细胞混悬液,接种于 4 只裸小鼠右侧腋窝皮下,待成瘤后备用。

1.5 肝癌原位移植模型的建立

建立肝癌原位模型时,将动物分为包埋法组和夹心法组,每组各 15 只。其主要操作步骤如下:取生长良好的皮下移植瘤,用眼科剪剪成大小约为 2 mm × 2 mm × 1 mm 的肿瘤组织块备用。实验采用 MatrX VIP 3000 型气体麻醉系统对实验动物进行气体麻醉,麻醉剂为异氟烷。该麻醉系统有 1 根通向小动物活体成像系统的管路,以确保动物在活体成像仪内进行发光检测时能持续麻醉。将此管路改造成一个独立的麻醉装置,用于动物手术时的持续麻醉。动物麻醉后,取仰卧位,用组织剪逐层剪开皮肤,开口长度约为 1 cm,暴露出肝脏。包埋方法是在肝左叶中间部位轻轻戳一个约 3 mm 深度的隧道,用无菌棉签局部轻压止血,将准备好的人癌组织小心塞入,再用棉签轻压止血,亦可用生物胶(OB 胶)粘合伤口^[6-9];夹心法是用 0#手术线将肿瘤组织块直接缝在肝右叶内侧:先用带缝合线的缝合针(4×10)穿过肿瘤组织,再从肝右叶内侧穿至外侧,然后打一个手术结,轻轻拉紧,剪断手术线即可。这样肿瘤组织刚好可以夹在肝右叶和肝左叶之间,不会与其他组织黏连,最后逐层缝合好腹腔,创口消毒,小心饲养。

1.6 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植肿瘤生长情况的检测

目前,小动物原位移植癌在体检测方法是先将肿瘤细胞进行荧光标记或生物发光标记,再把标记好的肿瘤细胞移植到动物体内,然后通过小动物活

体成像系统进行在体检测^[10-12]。本研究是将生物发光标记好的肝癌细胞 Bel-7402 制备成细胞混悬液,接种到 BALB/c 裸小鼠皮下,待成瘤后挑选生长良好的实体瘤,制备成肿瘤组织块原位接种于动物肝脏部位,检测时腹腔注射 30 mg/mL 的底物 D-荧光素钾盐,注射体积为 0.1 mL/10 g 体重,5~10 min 后用小动物活体成像系统进行生物发光检测。

1.7 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植肿瘤组织病理检查

小鼠肝癌原位移植 4 周时,颈椎脱臼处死,取肿瘤组织,4% (mL/mL) 甲醛溶液固定,修块、脱水、浸蜡、包埋、切片,HE 染色,镜下观察肿瘤细胞的生长情况。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行单因素方差分析,计算结果用 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立

在采用包埋法和夹心法制备肝癌原位移植模型时,对两者所需的手术时间、死亡动物数和肿瘤脱落数进行了比较,包埋法完成 1 只动物的手术时间为 8~10 min,夹心法则只需要 4~5 min,在时间上比前者缩短了近 1 倍。这主要是因为包埋法需要在肝脏上开一个小洞,在整个操作过程中容易造成动物

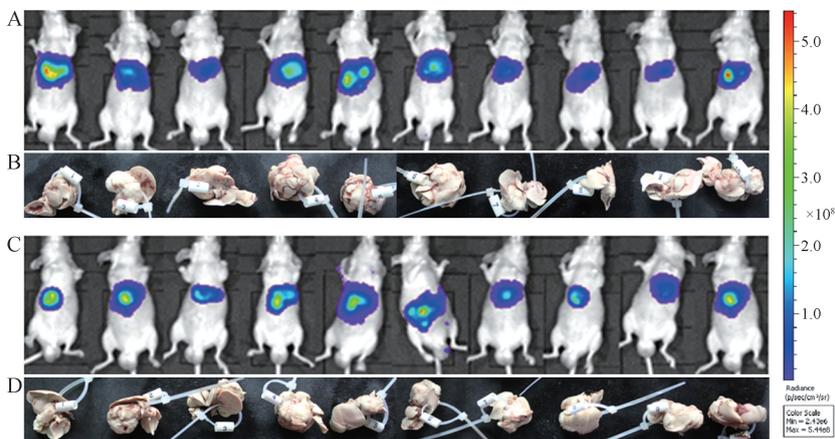
肝脏大量失血,止血时间过长,而且操作不便。夹心法只需将肿瘤组织块小心缝挂在肝右叶内侧即可,基本上不用止血。在实验过程中,包埋法由于动物失血过多而死亡 2 只,肿瘤脱落到腹腔 2 只,手术时间为 (9.3 ± 1.4) min,而夹心法接种动物均存活且未出现肿瘤组织块脱落。此外,夹心法手术时间为 (4.6 ± 0.7) min,与包埋法比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.2 小动物活体成像系统检测小鼠肝癌原位移植肿瘤生长情况

建立小鼠肝癌原位移植模型后,用小动物活体成像系统对动物体内肿瘤生长情况进行实时监控。图 1 中 A 和 C 为模型建立 4 周时的肿瘤在体生物发光检测,只有活的肿瘤细胞才能被检测到。图 1 中 B 和 D 为动物肝脏及实体瘤。结果表明,用新方法建立的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型与常用的方法比较,肿瘤生长良好,无明显差异,成瘤率均为 100%,且均未形成肿瘤在腹腔内广泛种植的现象。

2.3 常用方法和新方法建立小鼠肝癌原位移植瘤病理检查

BX41 显微镜系统 100 倍光镜下观察肿瘤组织标本,结果表明,包埋法和夹心法建立的小鼠肝癌原位移植瘤肿瘤细胞及组织生长良好,未出现坏死,细胞形态一致,癌细胞成癌巢状分布,癌巢周围为纤维结缔组织(图 2)。

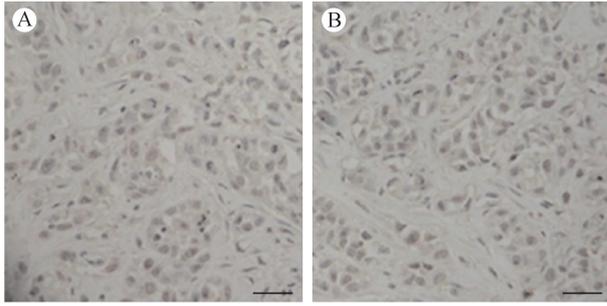


注: A 和 C 分别为包埋法和夹心法建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型的小动物活体成像检测图,右边的颜色棒说明不同颜色代表不同数量的肿瘤细胞,从下到上表示肿瘤细胞的数量越来越多;B 和 D 分别为包埋法和夹心法建立的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植实体瘤。

图 1 荷瘤裸小鼠的生物发光检测和实体瘤

Note. A and C: The orthotopic transplantation tumor models were established by embedding and sandwich, respectively. The color bar at right shows numbers of tumor cells by different colors representing the increasing numbers of tumor cells from bottom to top. B and D: The solid tumor models established by embedding and Sandwich, respectively.

Fig. 1 Bioluminescence detection of the solid tumors of tumor-bearing nude mice



注:A 和 B 分别为包埋法和夹心法建立 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植瘤的病理照片。两种方法建立的肝癌原位瘤实体瘤生长良好,癌细胞形态一致,成巢状分布,未出现坏死。

图 2 实体瘤组织病理切片观察(HE 染色, $\times 100$)

Note. A and B are the pathological picture of orthotopic transplantation hepatocellular carcinoma in the mice generated by embedding and sandwich, respectively. Both the two types of tumors grow well, show uniform cancer cells, form nest distribution, and without necrosis.

Fig. 2 Histological appearance of the solid tumor tissues. HE staining, $\times 100$

3 讨论

在动物麻醉时,由于常用的麻醉剂如戊巴比妥钠、水合氯醛、乌拉坦和氯醛糖等麻醉时间过长(2~4 h),因此,我们采用气体麻醉系统对实验动物进行麻醉,麻醉剂为异氟烷。与常用的这些麻醉剂相比,异氟烷麻醉具有麻醉条件简单,麻醉深浅度可以随时进行控制,麻醉动物苏醒快,使用成本不高,动物不易发生死亡等特点。在刚开始麻醉时可将麻醉范围调至最大使动物迅速麻醉,待动物被麻醉时,再将麻醉范围调至适中,一般调至中间范围。

在建立细胞混悬液皮下移植瘤模型时,细胞浓度不宜过小,一般为 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/mL^[8,10]。如果是贴壁细胞,1 瓶规格为 25 cm² 的细胞培养瓶长满约 90% 时,细胞消化离心后用 0.9% (g/mL) 氯化钠注射液稀释到 0.2 mL,接种 1 只动物腋窝皮下;如果是悬浮肿瘤细胞,可根据离心收集后沉淀于离心管底部的细胞体积进行初步判断。

建立肝癌原位瘤模型是将肿瘤组织块直接接种于动物的肝脏部位。因此,首先应选择生长良好的皮下移植瘤。皮下移植瘤的生长时间不宜过长,一般选用接种后 4 周的实体瘤,如果生长时间过长(如 6~8 周)则肿瘤内部组织会出现坏死,这样的肿瘤组织接种到原位时会出现生长缓慢或生长不良。其次,应尽量使肿瘤组织块大小保持一致,这样可以使原位接种后肿瘤组织生长大小控制在一定的范围内。另外,在将肿瘤组织缝挂于左、右肝叶直接

时,缝线不能拉得太紧,否则容易撕裂肝脏,造成肝脏大量失血。在建立肝癌原位移植模型时,我们也采用过细胞混悬液注射法,细胞浓度约为 10^6 个细胞/mL,但成瘤率较低,仅为 60%,而且成瘤所需时间也较组织块法长,建议可将细胞浓度增加至 $10^7 \sim 10^8$ 个细胞/mL。

在使用皮下移植瘤动物模型进行药效学评价时,在给药过程中可根据测量肿瘤体积来计算相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = TRTV/CRTV \times 100\%$ 。(TRTV:治疗组 RTV, CRTV:溶媒对照 RTV。RTV = V_t / V_0)。其中 V_0 为分组给药时(即 d0)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。疗效评价标准: $T/C\% > 40\%$ 为无效; $T/C\% \leq 40\%$,并经统计学处理 $P < 0.05$ 为有效。然而这种方法由于实体瘤的不规则性和测量时的人为误差,得出的结果不够精确,误差较大,可靠性也大为降低。在使用原位瘤动物模型进行评价时,通常需要先对肿瘤细胞进行荧光标记或生物发光标记,接入原位后再用小动物活体成像系统进行检测和分析,可对存活肿瘤细胞的多少进行量化分析,结果更为精确和可靠。在原位移植瘤试验中,通常对肿瘤细胞进行生物发光标记,因为荧光在体内更容易受到动物组织自发荧光的干扰,而且荧光在体内的穿透力会受到一定程度的影响。

目前,国内外所采用的裸小鼠肝癌原位移植模型主要是包埋法和细胞混悬液接种法^[2]。但是这些方法都有各自的缺点:包埋法溶液造成动物肝脏大量出血并引起动物死亡,手术时间较长,具有较大的操作难度,在人员有限的情况下不适用于制备大批量的肝癌原位移植动物模型;细胞混悬液接种法成瘤率较低,且形成实体瘤时间较长,肿瘤生长较慢,并且注入肝脏的细胞混悬液溶液溢出,造成肿瘤腹腔内广泛种植。通过比较分析,我们所建立的夹心法是一种比包埋法操作更加简便、高效,重现性更好的 BALB/c 裸小鼠肝癌原位移植模型。该方法除了具有操作简单、手术时间短、成瘤率高、肿瘤组织生长良好和动物死亡率低等特点以外,在手术时不会造成动物肝脏大量出血,如果操作熟练,几乎不会造成肝脏出血现象。动物出血少,术后恢复就很快,死亡率也会大大降低。此外,在接种过程中要注意将待接种的肿瘤组织块用 0.9% (g/mL) 氯化钠注射液或 PBS 缓冲液漂洗 2~3 次,在接种时肿瘤组

(下转第 137 页)

态模型中,除了重复低剂量注射匹罗卡品、联用胆碱受体拮抗剂以及根据实验需要选择适当的止惊剂来提高大鼠存活率以外,对 SE 后纠正水电解质平衡的紊乱,预防低血糖对降低实验大鼠 SE 后急性期死亡率具有重要意义。SE 后 24 h 内用改良 ORS 液灌胃能有效改善实验动物死亡率,是有效提高其生存率的方法。

参 考 文 献

- [1] Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2001, 46(1): 111 - 119.
- [2] 胡越, 蒋莉. 控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J]. *儿科药杂志*, 2003, 9(4): 5 - 8.
- [3] 陈子怡, 陈树达, 周珏倩, 等. 匹罗卡品诱发癫痫持续状态模型的改良和鉴定[J]. *解剖学研究*, 2011, 33(2): 131 - 134.
- [4] 张小东, 黄敏, 许可, 等. 氯化锂-重复低剂量匹罗卡品致大

鼠癫痫模型制作[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(1): 63 - 65.

- [5] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 143 - 157.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281 - 294.
- [7] 王冬梅, 孙艺平, 徐静, 等. 降低氯化锂-匹罗卡品大鼠癫痫模型死亡率的实验研究[J]. *大连医科大学学报*. 2010, 32(2): 177 - 178.
- [8] Goodman JH. Experimental models of status epilepticus [M]. CRC Press; Boca Raton, 1998. 95 - 102.
- [9] Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats [J]. *Exp Brain Res*, 1995, 102(3): 423 - 428.

[收稿日期] 2015-12-29

(上接第 132 页)

织块要避免与接种部位以外的组织和器官接触,以确保肿瘤接种部位的一致性,避免肿瘤在动物腹腔内出现广泛种植。夹心法能为大批量制备肝癌原位模型节约大量时间,为肝癌原位药效学及其他生物学研究提供更便利和有效的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Yang L, Xu J, Ou D, et al. Hepatectomy for huge hepatocellular carcinoma: single institute's experience [J]. *World J Surg*. 2013, 37(9): 2189 - 2196.
- [2] Zhou GX, Gao C, Xu P, et al. Replication Methodology of Animal Models for Human Disease[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press, 2008.
- [3] 陶莹, 于玮, 王珏, 等. 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型的建立[J]. *北京医学*, 2012, 34(12): 1065 - 1067.
- [4] 陈爽, 谢艳, 王春晖, 等. 奥曲肽致裸鼠肝癌原位移植瘤坏死的实验研究[J]. *癌症*, 2009, 28(7): 673 - 678.
- [5] 贺仕才, 仇广林, 王泽兴, 等. 小鼠左肺原位移植模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 115 - 118.
- [6] 陶文照, 何德华, 康俊升, 等. 裸小鼠人肝癌移植瘤组织的体内侵袭和转移的病理观察[J]. *第二军医大学学报*, 1989,

10: 9 - 13.

- [7] 张海英, 李艳茹, 王健君, 等. 小鼠原位移植性肝癌模型的建立及生物学特性[J]. *吉林大学学报*, 2009, 35(1): 5 - 9.
- [8] 熊伟, 任正刚, 刘珊, 等. 奥沙利铂化疗对荧光 HepG2 肝癌细胞裸鼠原位移植瘤侵袭转移潜能的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(8): 6 - 8.
- [9] Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 516 - 520.
- [10] 孙萍, 王怡, 孙志东, 等. 利用萤光素酶标记的肿瘤细胞建立肝癌原位移植模型及其活体成像[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(3): 383 - 385.
- [11] 曹阳, 韩炜, 刘洋, 等. 活体荧光成像对裸鼠肝癌细胞系 MHCC97-H 原位移植模型的动态量化分析[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(7): 1232 - 1234.
- [12] 陈惠, 李坤雨, 陈斐, 等. 用于活体成像的小鼠肝癌移植瘤模型的建立[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 10 - 15.

[收稿日期] 2015-11-23