

小鼠循环肝癌细胞模型的建立与评价

罗桂芳¹, 张娟娟¹, 邓青¹, 曾贵荣¹, 姜德建¹, 信红亚^{2*}

(1. 湖南省药物安全评价研究中心, 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331; 2. 中南大学湘雅医院血液科, 长沙 410008)

【摘要】 目的 采用小鼠肝癌 Hepa 1-6 细胞建立小鼠肝癌循环肿瘤细胞 (CTCs) 模型。**方法** 采用雄性 C57BL/6 小鼠 108 只, 按照体重分为 3 组, 每组 36 只。3 个组分别每只尾静脉接种 0.2 mL 的浓度为 1×10^6 、 5×10^6 和 1×10^7 个/mL 的小鼠肝癌 Hepa 1-6 细胞单细胞悬液。各组分别于接种后第 1、5、9、13、17、21 天检测采血, 采用流式细胞术检测, 计算 2 万个有核细胞中 CTCs 数目及比例、相对 CTCs 抑制率, 记录动物死亡率。②采用雄性 C57BL/6 小鼠 80 只, 按体重分为 2 组, 分别为模型对照组、甲苯磺酸索拉菲尼组, 每组 40 只。每只尾静脉接种 0.2 mL 的浓度为 5×10^6 个/mL 的 Hepa 1-6 细胞单细胞悬液, 接种后第 2 天开始灌胃给予甲苯磺酸索拉菲尼 (50 mg/kg), 连续 21 d, 并于给药第 3、8、15、21 天采血进行 CTC 检测。**结果** ①接种浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液后, 第 1、5、9、13、17、21 天的动物 CTCs 比例为: 25.1%、18.1%、8.9%、4.4%、2.9%、0.3%, 未出现动物死亡; 接种浓度为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液后, 第 1、5、9、13、17、21 天的动物 CTCs 比例为: 40.4%、35.4%、15.4%、9.0%、6.6%、4.1%, 未出现动物死亡; 接种浓度为 1×10^7 个/mL 的细胞悬液后, 第 1、5 天的动物 CTCs 比例为: 39.1%、33.5%, 在接种完毕之后立即出现动物死亡, 且所有动物在接种后第 7 天全部死亡。②甲苯磺酸索拉菲尼给药期间 D_3 、 D_8 、 D_{15} 、 D_{21} 相对循环肿瘤细胞清除率分别为: -7.5%、4.6%、55.3%、-94.5%, 与模型对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 采用浓度为 5×10^6 个/mL 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 悬液尾静脉注射可建立小鼠肝癌 CTC 模型, 可用于抑制循环肿瘤细胞药物的筛选与评价。

【关键词】 肝癌; 循环肿瘤细胞; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0301-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.012

Establishment and evaluation of a mouse model of circulating hepatoma cells

LUO Gui-fang¹, ZHANG Juan-juan¹, DENG Qing¹, ZENG Gui-rong¹, JIANG DE-JIAN¹, XIN Hong-ya^{2*}

(1. Hunan Center for Safety Evaluation And Research of Drugs, Hunan Key Laboratory for Drug Pharmacodynamics and Safety Evaluation, Changsha 410331, China; 2. Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of circulating tumor cells (CTCs) by applying mouse hepatoma Hapa 1-6 cells. **Methods** 108 healthy male C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups according to their body weights. Hepa 1-6 cell suspension was intravenously injected to each mouse in the three groups at a concentration of 1×10^6 , 5×10^6 and 1×10^7 /mL, 0.2 mL per mouse, respectively. Blood samples were collected from the mice on the 1st, 5th, 9th, 13th, 17th and 21st days after tumor cell injection. The number, ratio and relative inhibition rate of CTCs were calculated in 20,000 nucleated cells. The mortality of mice was recorded. ②80 male C57BL/6 mice were averaged

[基金项目] 湖湘青年创新创业平台专项(2014); 湖南省科技计划重点项目(2012TT1002)。

[作者简介] 罗桂芳(1987-), 男, 实习研究员, 研究方向: 肿瘤药理学及遗传毒理学研究。E-mail: luoguifang@hnse.org

[通讯作者] 信红亚(1976-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 血液病研究。E-mail: xinhongya@163.com

into 2 groups according to their body weight: control and sorafenib tosylate groups. 0.2 mL of Hepa 1-6 single cell suspension was injected to each mouse through the caudal vein at a concentration of $5 \times 10^6/\text{mL}$. The mice were gavaged with sorafenib tosylate (50 mg/kg) for 21 days and blood samples were collected at the 3rd, 8th, 15th, and 21st days for CTC assessment. **Results** For the $1 \times 10^6/\text{mL}$ group, the CTC inhibition rate was 25.1%, 18.1%, 8.9%, 4.4%, 2.9% and 0.3% on the 1st, 5th, 9th, 13th, 17th and 21st days, respectively, and all the mice were alive. For the $5 \times 10^6/\text{mL}$ group, the CTC inhibition rate was 40.4%, 35.4%, 15.4%, 9.0%, 6.6% and 4.1% on the 1st, 5th, 9th, 13th, 17th and 21st days, respectively, and all the mice were alive. For the $1 \times 10^7/\text{mL}$ group, the CTC inhibition rate was 39.1% and 33.5% on the 1st and 5th days, respectively. Some mice died immediately after intravenous injection and all mice died within 7 days. ②The relative clearance of CTCs was -7.5%, 4.6%, 55.3% and -94.5% on the 3rd, 8th, 15th and 21st days of sorafenib tosylate administration. Compared with the control group, there were significant differences among the three groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** A mouse model of circulating hepatoma cells has been established by intravenous injection of 0.2 mL of $5 \times 10^6/\text{mL}$ mouse Hepa 1-6 cell suspension. This mouse model can be used for screening and evaluation of drugs for circulating tumor cell inhibition.

【Key words】 Hepatoma; Circulating tumor cells; Mouse model

Corresponding author: XIN Hong-ya. E-mail: xinhongya@163.com

根据世界卫生组织(WHO)的数据,原发性肝癌(HCC)是世界上发生率最高的癌症之一,占癌症发病率第五位、死亡率第三位,中国肝癌的发病率就占了全球的50%以上^[1]。从原始肿瘤上脱落癌细胞入血形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),能够随血液转移至其他组织或器官,是原发性肝癌术后出现复发和远处转移的重要机制^[2-7]。通过药物减少肝癌CTCs数目,有助于改善肝癌术后患者的预后,因此研究减少CTCs的药物是抗癌药物开发的热点之一^[2]。CTCs在外周血中的数量稀少, $10^6 \sim 10^7$ 个外周血单核细胞中才发现一个CTCs,且检测CTCs的技术要求高而且价格昂贵,在药效学动物实验研究上应用较为有限。本实验室根据肝癌细胞的特性,采用甲胎蛋白(AFP)标记肝癌细胞,采用流式细胞术进行检测,探索建立小鼠肝癌循环肿瘤细胞模型,旨在为建立一个简单、经济和可靠的循环肝癌细胞动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级C57BL/6小鼠,雄性,188只,体重13~15 g,购自于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2011-0003】,饲养于湖南省实验动物中心【SYXK(湘)2016-0010】。

1.1.2 仪器设备

DMIL型倒置显微镜(德国Leica公司),3111型CO₂培养箱(美国Thermo公司),CJ-1F型医用净化工作台(苏州冯氏实验动物设备有限公司),

Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.1.3 细胞及试剂

小鼠肝癌细胞Hepa 1-6购自于中科院细胞库,高糖DMEM培养基、胎牛血清购自于HyClone公司,小鼠甲胎蛋白流式抗体Mouse alpha-Fetoprotein/AFP Antibody购自于R&D公司,甲苯磺酸索拉菲尼(德国Bayer Schering Pharma AG)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝癌Hepa 1-6细胞的培养及细胞悬液制备

采用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养Hepa1-6细胞,每2 d以1:3比例进行传代培养。取对数生长期细胞,PBS清洗细胞2遍,加入0.25%胰蛋白酶(每瓶500 μL)消化3 min,加入DMEM+10% FBS培养基(每瓶2 mL),轻轻敲打细胞,将Hepa 1-6细胞消化成单个细胞悬液,用1000 r/min离心3 min,弃上清,加入2 mL PBS溶液重悬细胞后再次离心。细胞计数后制备细胞悬液。

1.2.2 不同接种细胞浓度对小鼠肝癌循环肿瘤细胞模型成模率的影响

108只雄性C57BL/6小鼠,按体重随机分为3组,每组36只。常规培养Hepa 1-6细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 个/mL 3个浓度,将不同浓度的细胞液,经尾静脉注射分别接种于3组动物体内,每只小鼠接种0.2 mL,即分别接种 2×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 个细胞/只动物。观察动物死亡情况,并分别于接种后第1、5、9、13、17、21天分别采血进行CTC检测。

1.2.3 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 循环肿瘤细胞模型建立及分组给药

80 只雄性 C57BL/6 小鼠,按体重随机分为模型组和甲苯磺酸索拉菲尼组,每组 40 只。取对数生长期的 小鼠肝癌 Hepa 1-6 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,再用生理盐水重悬后计数,调整细胞浓度为 1.2.2 中最适宜浓度的细胞液,经尾静脉接种于 C57BL/6 小鼠体内,每只小鼠接种 0.2 mL(即 1×10^6 个细胞/只)。接种后第 2 天开始灌胃给予甲苯磺酸索拉菲尼(50 mg/kg),连续 21 d,并于给药第 3、8、15、21 天采血进行 CTCs 检测。

1.2.4 动物生存质量及存活时间评价

试验期间每天观察动物的饮食、饮水、行为活动的状况,并于每次处死动物前记录各组动物的体重变化及死亡情况。

1.2.5 CTCs 的测定和计算

模型建立过程中,从接种后第 1、5、9、13、17、21 天经眼眶采血,EDTA-K₂ 抗凝,AFP 流式抗体标记后,用流式细胞仪进行 AFP 阳性细胞检测,并计算 CTCs 比例。相对循环肿瘤细胞清除率=(模型对照组平均循环肿瘤细胞数-给药组平均循环肿瘤细胞数)/模型对照组平均循环肿瘤细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学资料采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理。多组间比较方差齐时用单因素方差分析,两两比较,采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示有统计学意义,*P* < 0.01 表示所检验的差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 不同接种细胞浓度对小鼠肝癌 CTCs 模型成

表 1 小鼠肝癌 Hepa 1-6 循环肿瘤细胞模型的建立($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.1 Establishment of a mouse model of circulating hepatoma cells

AFP 检测时间 Test times of AFP	接种细胞浓度(1×10^6 个/mL) Injection concentration of CTC		接种细胞浓度(5×10^6 个/mL) Injection concentration of CTCs		接种细胞浓度(1×10^7 个/mL) Injection concentration of CTCs	
	循环肿瘤细胞数 Number of CTCs	循环肿瘤比例/% CTC ratio	循环肿瘤细胞数 Number of CTCs	循环肿瘤比例/% CTC ratio	循环肿瘤细胞数 Number of CTCs	循环肿瘤比例/% CTC ratio
D1	5017.8 $\pm$ 861.8	25.1 $\pm$ 4.3	8075.2 $\pm$ 1359.4	40.4 $\pm$ 6.8	7810.5 $\pm$ 1513.5	40.1 $\pm$ 21.0
D5	3617.7 $\pm$ 533.2	18.1 $\pm$ 2.7	7072.7 $\pm$ 1570.9	35.4 $\pm$ 7.9	—	—
D9	1783.7 $\pm$ 441.7	8.9 $\pm$ 2.2	3072.8 $\pm$ 631.9	15.4 $\pm$ 3.2	—	—
D13	889.2 $\pm$ 611.8	4.4 $\pm$ 3.1	1795.3 $\pm$ 338.9	9.0 $\pm$ 1.7	—	—
D17	587.0 $\pm$ 691.5	2.9 $\pm$ 3.5	1327.8 $\pm$ 833.7	6.6 $\pm$ 4.2	—	—
D21	54.8 $\pm$ 52.4	0.3 $\pm$ 0.3	820.5 $\pm$ 1014.2	4.1 $\pm$ 5.1	—	—

注:循环肿瘤细胞数为在 20 000 个有核细胞中的 AFP 阳性细胞数目。“—”表示动物已经在得到数据前已经死亡。
Note. The number of CTCs is AFP-positive cells in 20 000 nucleated cells. “—” indicates that the animal died before the day of blood collection.

模率的影响

如表 1 所示:经尾静脉接种浓度为 1×10^6 个/mL 细胞的动物,接种后第 1、5、9、13、17、21 天循环肿瘤细胞比例为:25.1%、18.1%、8.9%、4.4%、2.9%、0.3%,未出现动物死亡。经尾静脉接种浓度为 2×10^6 个/mL 细胞后第 1、5、9、13、17、21 天的动物循环肿瘤细胞比例为:40.4%、35.4%、15.4%、9.0%、6.6%、4.1%,未出现动物死亡。经尾静脉接种浓度为 1×10^7 个/mL 细胞后第 1、5 天的动物循环肿瘤细胞比例为:39.1%、33.5%,在接种完毕之后立即出现动物死亡,且所有动物在接种后第 7 天全部死亡。见图 1。

2.2 甲苯磺酸索拉菲尼对小鼠肝癌 Hepa 1-6 CTCs 模型体重的影响

小鼠灌胃给予甲苯磺酸索拉菲尼(50 mg/kg),连续 21 d,小鼠的外观体征、行为活动及动物的一般状况未见明显异常,经大体解剖肉眼观察未见明显的异常脏器。造模并给药后体重未出现明显下降,模型组及给药组体重分别为:D₃ 体重为(14.8 $\pm$ 0.9)g、(15.0 $\pm$ 0.8)g;D₈ 体重为(16.4 $\pm$ 0.9)g、(16.4 $\pm$ 0.8)g;D₁₅ 体重为(18.0 $\pm$ 0.9)g、(18.0 $\pm$ 0.8)g;D₂₁ 体重为(19.3 $\pm$ 0.9)g、(19.4 $\pm$ 0.8)g。除定期处死动物外,给药期间未出现动物死亡。

2.3 甲苯磺酸索拉菲尼对小鼠肝癌 Hepa 1-6 CTCs 的影响

如表 2 所示,甲苯磺酸索拉菲尼能明显降低给药后 D₁₅ 相对 CTCs 清除率,与模型对照组比较差异有显著性(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。甲苯磺酸索拉菲尼组给药期间 D₃、D₈、D₁₅、D₂₁ 相对 CTCs 清除率分别为 D₃ 为-7.5%;D₈ 为 4.6%;D₁₅ 为 55.3%;D₂₁ 相对 CTCs 清除率为-94.5%。见图 2、3。

表 2 甲苯磺酸索拉菲尼对小鼠肝癌 Hepa 1-6 循环肿瘤细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

		D ₃		D ₈		D ₁₅		D ₂₁	
组别 Groups	剂量 mg/kg Doses	细胞数 Number of CTCs	比例/% CTCs ratio	细胞数 Number of CTCs	比例/% CTCs ratio	细胞数 Number of CTCs	比例/% CTCs ratio	细胞数 Number of CTCs	比例/% CTCs ratio
模型对照组 Control group	—	7320.0 ± 3119.0	36.6 ± 14.7	4236.1 ± 1476.3	21.4 ± 7.4	928.5 ± 122.7	4.6 ± 0.6	891.4 ± 1014.8	4.5 ± 5.1
甲苯磺酸 索拉菲尼组 Sorafenibtosylate group	50	7560.0 ± 4271.9	37.8 ± 16.1	4093.1 ± 1173.5	20.5 ± 5.9	415.2 ± 133.4 ^{▲▲}	2.1 ± 0.7	1733.7 ± 1189.4	8.7 ± 5.9

注:循环肿瘤细胞数为在 20 000 个有核细胞中的 AFP 阳性细胞数目,每个时间点各组 10 只动物。与模型对照组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. The number of CTCs is AFP-positive cells in 20 000 nucleated cells, 10 mice in a group at each time point. Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$.

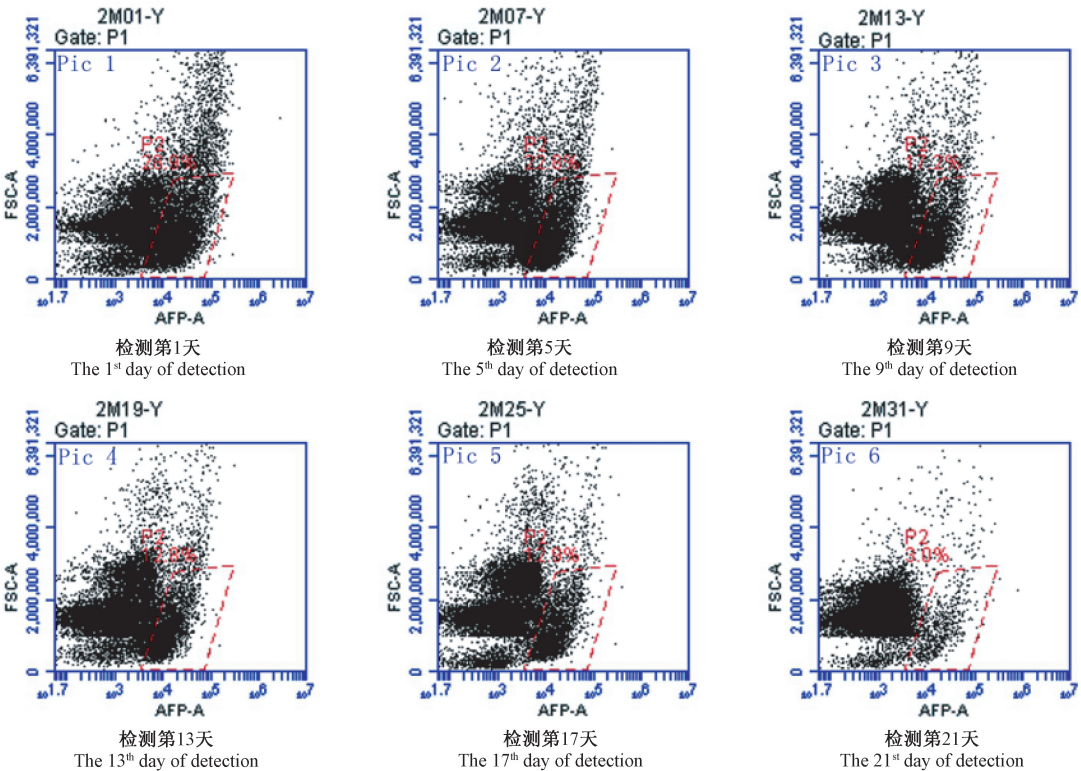


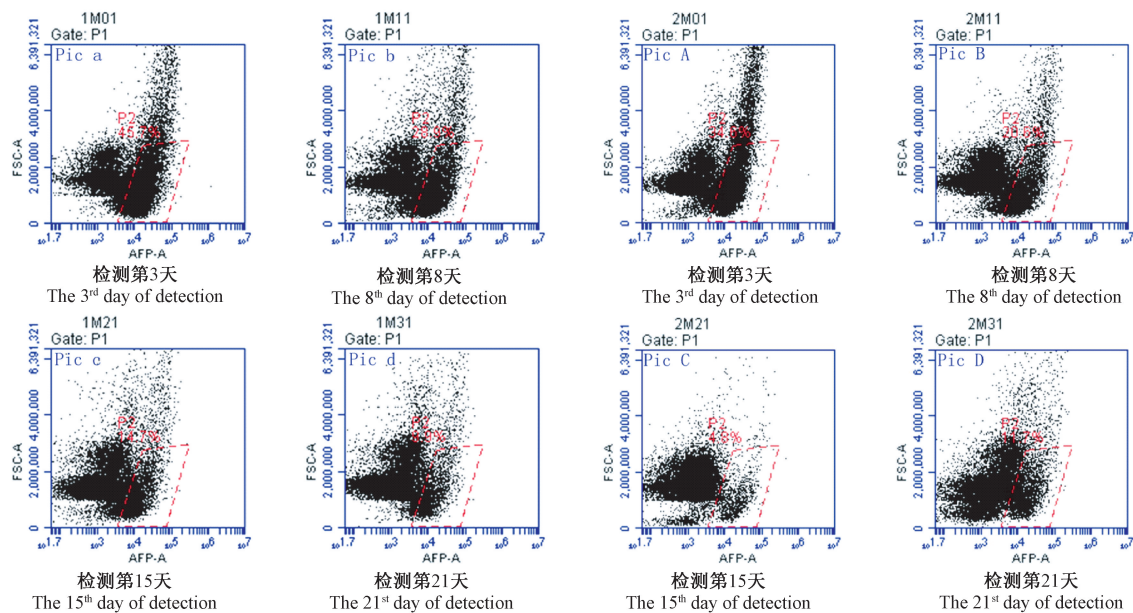
图 1 小鼠肝癌 Hepa 1-6 循环肿瘤细胞模型的建立 (C57 L/6 小鼠循环系统中 AFP 阳性细胞随时间的变化(接种细胞浓度为 5×10^6 /mL))

Fig.1 Establishment of a mouse model of circulating hepatoma cells. Changes of AFP-positive cells in the circulatory system of the C57 L/6 mice (5×10^6 /mL of Hepa 1-6 cells was injected)

3 讨论

肝癌的发病率非常高,且死亡率在常见癌症中排在第三位,如果肝癌患者没有接受有效治疗,大部分患者将在 3~6 个月内死亡^[3]。在患者接受了肝移植或肝切除等手术等有效治疗后,而肝癌复发及

转移的概率依然非常高,导致预后差。据有关报道,肝切除术后 5 年内肝癌的复发率高达 61.5%,而肝移植术后的 1 年内肝癌复发率也达到了 10%,一旦复发,则病情进展非常快,并且段时间内死亡^[4]。大量研究证实,肝癌的复发与 CTCs 有密切关系^[5],在治疗前后,CTCs 在血液中的数量变化与肝癌的治



注: Pic a、b、c、d 为模型对照组 AFP 阳性细胞随着时间的变化, Pic A、B、C、D 为甲苯磺酸索拉菲尼组 AFP 阳性细胞随着时间的变化。

图 2 AFP 阳性细胞检测结果

Note. Pic a, b, c, d are the changes of AFP-positive cells in the control group,
Pic A, B, C, D are the changes of AFP-positive cells in the Sorafenib Tosylate group.

Fig. 2 Results of detected AFP-positive cells

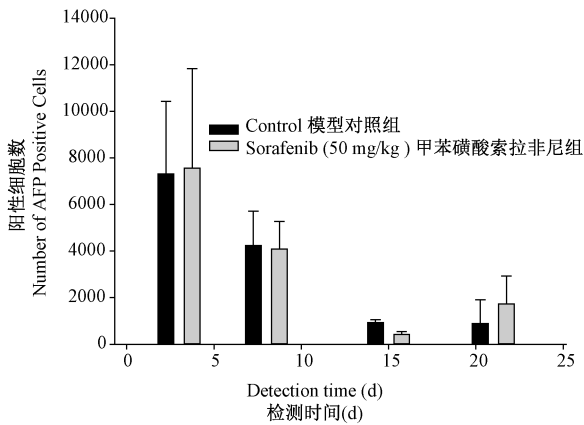


图 3 模型对照组与甲苯磺索拉菲尼组 AFP 阳性细胞检测结果

Fig. 3 Comparison of AFP-positive cells in the control group and sorafenib tosylate group

疗敏感度、复发率、增殖速度有密切关系^[6]。通过靶向治疗等治疗手段的患者可通过检测 CTCs 的变化,来判断疗效。

关于癌症动物模型中检测循环肿瘤细胞的研究则很少报道,而建立一个方便、可靠的 CTC 动物模型在 CTC 的病理生理作用以及相关的药物开发中起重要作用。本实验通过 C57BL/6 小鼠尾静脉接种不同浓度的小鼠肝癌细胞,采用流式细胞术标记 AFP 蛋白检测 CTCs 的数量变化结合动物生存率的

观察,发现 C57BL/6 小鼠静脉注射 5×10^6 个/mL 浓度肝癌 Hep1-6 细胞不仅能很好的检测出循环癌细胞,而且不影响动物的生存率,是造模最佳的细胞浓度。从造模后不同时间点来看,静脉注射肝癌细胞后 21 d 内循环中可检测的 AFP 蛋白阳性细胞逐渐减低,从第 1 天的 $(40.4 \pm 6.8)\%$ 降低到第 21 天的 $(4.1 \pm 5.1)\%$,因此观察药物疗效宜在注射细胞后 21 d 之内。在给予靶向药物甲苯磺酸索拉菲尼后能检测出随给药时间的增加 CTCs 的变化。在给予甲苯磺酸索拉菲尼后 15 d 内对 CTCs 进行多次检测,得出随着给药时间的推移,CTCs 在血液中的清除率明显增加,说明该靶向药物有效,但随着时间推移,在第 21 天检测发现 CTCs 反跳升高,说明在长时间给药过程中 CTCs 已经产生耐药。

本实验采用的小鼠肝癌细胞注射是避免异种排斥反应,但与临床有一定差距。接下来,我们拟采用联合免疫缺陷小鼠进行人源化的肿瘤细胞进行建模,更好的反映临床。此外,本实验我们采用 AFP 标记 Hepa 1-6 细胞来检测 CTCs,甲胎蛋白是最早发现的用于诊断原发性肝癌的特异性肿瘤标记物。在原发性肝癌中 AFP 与肿瘤大小、数目等密切相关^[8],但是 AFP 在肝炎病人中的阳性率也很高,同时 AFP 在检测小肝癌时不敏感,高达 30%~40%的

(下转第 315 页)

不同配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌模型建立的影响

何晓东¹, 邹一贺¹, 黎冰林¹, 邓慧君¹, 李江超¹, 乔梁², 王丽京^{1*}

(1. 广东药科大学基础学院血管生物学研究所, 广州 51006; 2. 澳大利亚悉尼大学肝病研究中心)

【摘要】 目的 建立二乙基亚硝胺(DEN)诱导的小鼠肝癌模型并使用两种不同配方饲料:SPF 级小鼠大鼠全价配合饲料和 AIN93-G 配方合成饲料分别喂养,探讨不同饲料喂养对构建 DEN 诱导小鼠肝癌模型的影响。**方法** 14 日龄雄性 C57BL/6 小鼠腹腔一次性注射 DEN 溶液,给药量 25 mg/kg 体重,建立小鼠肝癌模型。小鼠离乳后分为两组,一组以常规 SPF 级小鼠全价配合饲料喂养,另一组以 AIN-93G 配方合成饲料喂养。模型小鼠生长至 9 月龄时处死,取肝脏组织称重,观察并记录肝癌生长情况。**结果** 全价饲料组小鼠肝脏全部产生肿瘤,AIN-93G 组小鼠体重和肝脏重量明显低于全价饲料组小鼠,肝癌发生率、肿瘤结节数量和大小也明显低于全价饲料组小鼠。**结论** 全价饲料喂养的小鼠 DEN 诱导肝癌模型造模成功,而 AIN-93G 饲料喂养的小鼠诱导肝癌的发生发展受到抑制,同时小鼠体重明显下降,提示了饮食因素在动物疾病模型建立中起到的关键作用。

【关键词】 饲料;二乙基亚硝胺;肝癌;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0306-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.013

Effect of different formula diets on mouse model with DEN-induced hepatocellular carcinoma

HE Xiao-dong¹, GUI Yi-he¹, LI Bing-lin¹, DENG Hui-jun¹, LI Jiang-chao¹, QIAO-Liang², WANG Li-jing^{1*}

(1. Vascular Biology Research Institute, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Storr Liver Centre, The Westmead Institute for Medical Research, The University of Sydney, Westmead NSW 2145 Australia)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of diethylnitrosamine(DEN)-induced hepatocellular carcinoma(HCC), and to explore the effects of two different diet formulas on the establishment of DEN-induced HCC model. **Methods** SPF C57BL/6 mice (8 males and 8 females) were injected intraperitoneally with 25 mg/kg DEN at day 14 to establish a HCC model. The mice were divided into two groups after weaning. One group was fed with the SPF class rodents cereal-based diet, another group was fed with AIN-93G formula diet. The mice were sacrificed at the age of 9 months. The livers were weighed and the growth of liver cancer was observed and recorded. **Results** All the mice in the cereal-based diet group developed HCC as expected. The body weight and liver mass of the mice in the AIN-93G diet group were significantly lower than that of the cereal-based diet group. The incidence of HCC, and the number and size of tumor nodules were also significantly lower in the AIN-93G diet group than that in the cereal-based diet group. **Conclusions** DEN-induced HCC model has been successfully established in mice fed with cereal-based diet, while mice fed with AIN93-G diet prevented the development of DEN-induced HCC, and their body weight was decreased significantly, suggesting that dietary

【基金项目】广东省医学科研基金(编号:B2014207)。

【作者简介】何晓东(1983-),男,助理研究员。研究方向:基因工程小鼠疾病模型。E-mail: hexiaodong1234567@163.com

【通讯作者】王丽京(1962-),女,教授。研究方向:肿瘤分子生物学。E-mail: wanglijing62@163.com

消化杂志,1998,6(7): 612-613.

[6] Stanghellini V, De Giorgio R, Barbara G, et al. Delayed gastric emptying in functional dyspepsia[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2004,7(4):259-264.

[7] Miwa H, Watari J, Fukui H, et al Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011,26(Suppl 3):53-60.

[8] 李景南,钱家鸣. 胃肠激素与消化系统疾病[J]. 中华消化杂志,2005,25(4): 253-254.

[9] 刘未艾,刘密,何亚敏,等. 功能性胃肠病脑肠肽的研究进展[J]. 中国中医急症,2012,21(6): 951-953.

[10] Luiking, YC, Akkermans LM, Peeters TL, et al. Effects of motilin on human interdigestive gastrointestinal and gallbladder motility, and involvement of 5HT3 receptors[J]. Neurogastroenterol Motil, 2002,14(2):151-159.

[11] Kamerling IM, van Haarst AD, Burggraaf J, et al. Exogenous motilin affects postprandial proximal gastric motor function and visceral sensation[J]. Dig Dis Sci, 2002,47(8):1732-1736.

[12] Baile CA, McLaughlin CL, Della-Fera MA. Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake[J]. Physiol Rev, 1986,66(1):172-234.

[13] Chua AS, Keeling PW. Cholecystokinin hyperresponsiveness in functional dyspepsia[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(17): 2688-2693.

[14] 杨凤江,郝悦,李小丽,等. 功能性消化不良患者血浆胃肠激素水平的变化[J]. 武警医学,2003,14(10): 614-615.

[15] 陈淑芬. 脾虚证与血清胃泌素、D-木糖排泄率及 T 细胞亚群关系探讨[J]. 四川中医,1999,17(11): 6-7.

[16] 杨维益,梁嵘,李峰. 脾气虚证与乳酸代谢[J]. 河南中医, 1997,17(1): 23-24.

[17] Liu LS, Winston JH, Shenoy MM, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation[J]. Gastroenterology, 2008, 134(7):2070-2079.

[收稿日期] 2016-11-21

(上接第 305 页)

患者 AFP 检测为阴性,另外亦有部分原发性肝癌不分泌 AFP^[9],因此采用 AFP 阳性细胞检测 CTCs 存在一定的局限性。因此,建立多标记蛋白联合标记进行检测 CTC 的方法更有临床意义。

参 考 文 献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.

[2] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework [J]. Cell, 2006, 127(4): 679-695.

[3] Shariff MI, Cox J, Gomaa AI, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics [J]. Hepat Med Evidence Res, 2009, 3(4): 353-367.

[4] Wang JH, Wang CC, Hung CH, et al. Survival comparison between surgical resection and radiofrequency ablation for patients in BCLC very early/early stage hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2012, 56(2): 412-418.

[5] Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. Sci Translat Med, 2010, 2(25): 25ra23-25ra23.

[6] Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(5): 931-939.

[7] Liberko M, Kolostova K, Bobek V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice [J]. Crit Rev Oncol/hematol, 2013, 88(2): 338-356.

[8] Fujiki M, Takada Y, Ogura Y, et al. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin in selection criteria for living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Am J Transplant, 2009, 9(10): 2362-2371.

[9] Zhao L, Mou DC, Wu ZA, et al. Diagnostic value of cancer-testis antigen mRNA in peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(32): 4072-4078.

[收稿日期] 2016-10-14