

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, 郅一贺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级大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

factors play a key role in establishment of animal disease models.

【Key words】 Diet; Diethylnitrosamine; Hepatocellular carcinoma; Mice

Corresponding author: WANG Li-jing. E-mail: wanglijing62@163.com

在生命科学领域常常利用实验动物建立研究模型,以模拟人类疾病发生发展的过程。各类疾病动物模型被广泛用来研究人类疾病的发生发展机制、药物筛选以及治疗评价等^[1]。选用适合的造模方法和严格规范的操作是建立动物疾病模型的关键。然而,实验动物的自身质量是成功建立动物疾病模型的先决条件。影响实验动物质量的因素是多方面的,如遗传、环境、饮水、饲料等。其中实验动物饲料质量是与实验动物质量密切相关的重要条件,也是保证动物实验顺利进行和实验结果准确可靠的基础^[2]。不同饲料对实验动物生长和繁殖性能、生化指标均有不同程度的影响^[3,4],但饲料因素在肿瘤模型建立过程中的作用还未见报道。本研究在建立 DEN 诱导的小鼠肝癌模型过程中,使用了两种不同配方饲料分别喂养实验小鼠:商品化的 SPF 级大小鼠全价配合维持饲料和 AIN-93G 配方合成饲料,探讨使用不同配方饲料喂养对建立 DEN 诱导的小鼠肝癌模型的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠雌雄各 8 只,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】。动物实验在广东药科大学实验动物中心屏障环境内进行【SYXK(粤)2012-0125】,并按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 试剂

二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)购自美国 Sigma 公司,产品编号:N0756,浓度为 0.95 g/mL。AIN93-G 配方合成饲料(AIN93-G 饲料)原料及配比为:酪蛋白,200 g/kg;蔗糖 100 g/kg;豆油,70 g/kg;纤维素,50 g/Kg;玉米淀粉,397.5 g/kg;麦芽糖糊精,132 g/kg;DL-蛋氨酸,3.0 g/Kg;混合矿物质 93-G,35 g/kg;混合维生素 93-G,10 g/kg;氯化胆碱,2.5 g/kg。SPF 级小鼠大鼠全价配合饲料(全价饲料)主要原料为:玉米、面粉、麸皮、秘鲁鱼粉、豆粕、磷酸氢钙、石粉、植物油、盐、赖氨酸、蛋氨酸、维生素和复合矿物质等。全价饲料为商品化饲料,购自广东省医学实验动物中心,AIN93-G 饲料委托

广东省医学实验动物中心以 SPF 级饲料生产标准合成。

1.2 方法

1.2.1 实验小鼠的饲养繁育

将 6~8 周龄 C57 小鼠按雄性和雌性 1:1 比例合笼配种,每天密切观察配种小鼠状态,准确记录子代小鼠出生日期。所有小鼠饲养于 SPF 级环境中,以全价饲料喂养;饮用水、垫料经高温高压灭菌,每周更换一次垫料。

1.2.2 DEN 诱导小鼠肝癌

子代小鼠成长到 14 日龄时,从中选择发育正常的雄性幼鼠,称重;DEN 原液以 1:600 比例用无菌生理盐水稀释,每只雄性幼鼠用胰岛素注射器通过腹腔一次性注射 DEN 溶液,给药量为 25 mg/kg 体重,实际注射 DEN 剂量(1:600)按以下公式计算:小鼠体重克数 $\times 16 =$ 每只小鼠注射 DEN(1:600)微升数(μL)。给药后的小鼠放回原笼内继续接受哺乳至离乳。

1.2.3 分笼分组喂养

子代小鼠成长至 21 日龄后需离乳,雌雄幼鼠分笼,此时将相同年龄并接受过 DEN 注射的雄性幼鼠分为 2 组,每组 8 只,一组继续以全价饲料喂养,另一组以 AIN93-G 饲料喂养,每周各添加两次饲料,每次约 100~150 g。其他饲养条件不变。

1.2.4 肝脏组织取材和 HE 染色

实验小鼠饲养至 9 月龄,称体重;脱臼法处死小鼠,剥离肝脏组织,称重,观察肿瘤生长状况并拍照。将肝脏组织于 4% 多聚甲醛固定液中固定过夜,常规脱水及石蜡包埋。4 μm 切片,苏木素伊红染色。于 4 倍光学显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism5 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 AIN-93G 饲料与全价饲料主要营养成分比较

通过对比,AIN93-G 饲料实测各主要营养成分含量基本等于或接近配方理论含量;AIN93-G 饲料的蛋白质、赖氨酸含量(实测)与全价饲料相当,脂肪含量(实测)略高于全价配合饲料;AIN93-G 饲

料钙、磷、钠、铁、碘、锰等微量元素含量(实测)略低于全价饲料含量,锌含量基本持平;维生素含量中,全价饲料中维生素 A(实测),K, B1, B2(理论)

含量较高, AIN93-G 饲料中维生素 D 含量较高, 维生素 B6(实测)持平。此外, 全价饲料有更高的叶酸含量。

表 1 两种饲料营养成分的比较

Tab. 1 Comparison of nutritional components between the two kind of diets

营养成分 Nutritional ingredients	单位 Unit	全价配合饲料 Cereal-based diet	AIN93-G 饲料(理论) AIN93-G diet (theoretical)	AIN93-G 饲料(实际) AIN93-G diet (actual)
蛋白质 Protein	%	18	19.4	17.9
脂肪 Fat	%	4	7.0	7.0
粗纤维 Crude fiber	%	5	4.7	5
灰分 Ash	%	8	4.5	4.2
赖氨酸 Lysine	%	1.32	1.49	1.30
钙 Calcium	%	1.0 ~ 1.8	0.47	0.50
磷 Phosphorus	%	0.6 ~ 1.2	0.35	0.30
钠 Sodium	%	0.2	0.15	0.10
铁 Iron	mg/kg	100	68	45
铜 Copper	mg/kg	10 ~ 100	7.0	—
碘 Iodine	mg/kg	0.5	0.2	0.2
锰 Manganese	mg/kg	75	19	10
锌 Zinc	mg/kg	30	46	38
维生素 A Vitamin A	IU/k	7000	4000	4000
维生素 D Vitamin D	IU/k	800	1000	1000
维生素 K Vitamin K	mg/kg	3	1	0.09 (维生素 K3 Vitamin K3)
维生素 B1 Vitamin B1	mg/kg	8	6.1	—
维生素 B2 Vitamin B2	mg/kg	10	6.3	—
维生素 B6 Vitamin B6	mg/kg	6	7	6
叶酸 Folic acid	mg/kg	4	2	2

2.2 AIN-93G 饲料对 DEN 诱导肝癌小鼠体重的影响

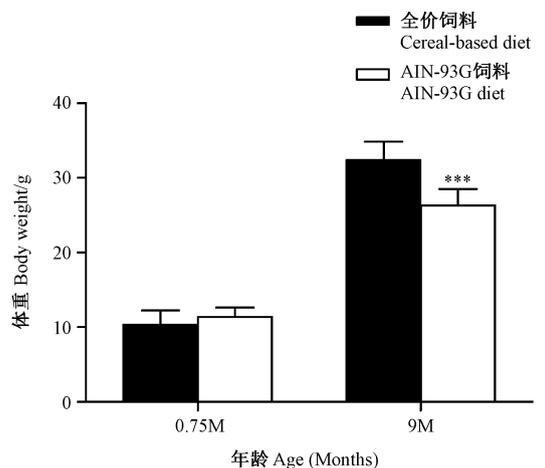
两组小鼠于 3 周龄(0.75 月龄)时分笼, 此时两组小鼠体重差异无显著性($P > 0.05$); 两组小鼠分别以全价饲料和 AIN93-G 饲料喂养至 9 月龄, 取材前称重, 此时 AIN-93G 组小鼠体重明显低于全价饲料组, 差异有显著性($P < 0.001$) (图 1)。

2.3 AIN-93G 配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝重量的影响

分别取两组小鼠肝组织称重, 结果显示 AIN93-G 饲料组小鼠肝重量明显低于全价饲料组, 差异有显著性($P < 0.01$) (图 2A); 通过计算发现, AIN93-G 饲料组小鼠肝重比(肝脏重量/体重 $\times 100\%$)也明显低于全价饲料组, 差异有显著性($P < 0.05$) (图 2B)

2.4 AIN-93G 配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌的影响

AIN-93G 饲料喂养 DEN 诱导的小鼠, 肝肿瘤结节体积, 数量均小于全价饲料组, HE 染色显示, AIN-93G



注: 全价饲料组与 AIN-93G 饲料组体重相比较, $***P < 0.001$ 。

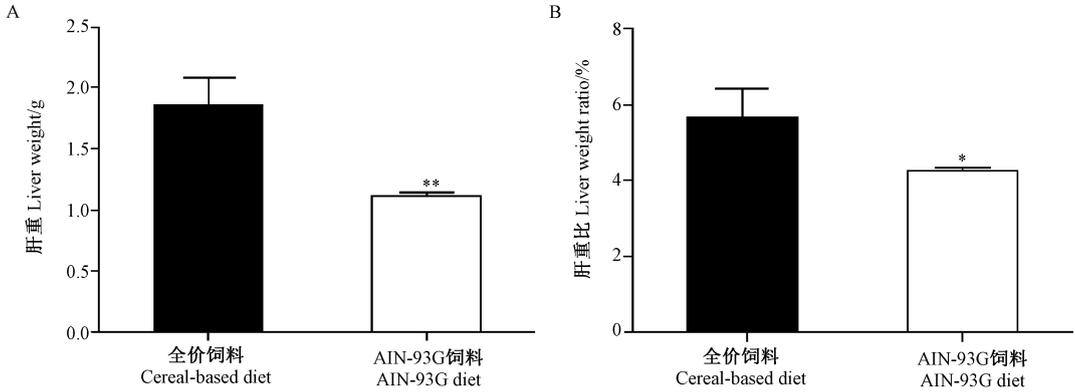
图 1 AIN-93G 饲料对 DEN 诱导小鼠体重的影响

Note. Compared with the body weight of AIN-93G diet group, $***P < 0.001$.

Fig. 1 Effect of AIN-93G diet on the body weight of DEN-treated mice

饲料组肿瘤区域面积也小于全价饲料组(图 3A)。AIN-93G 饲料同时影响了 DEN 诱导小鼠肝癌的发生

率,全价饲料组小鼠在 9 月龄时全部产生肝癌,而 AIN-93G 饲料组小鼠肝癌发生率仅为 37.5%(图 3B)。



注: A. 全价饲料组与 AIN-93G 饲料组肝重量相比较, ** $P < 0.01$;

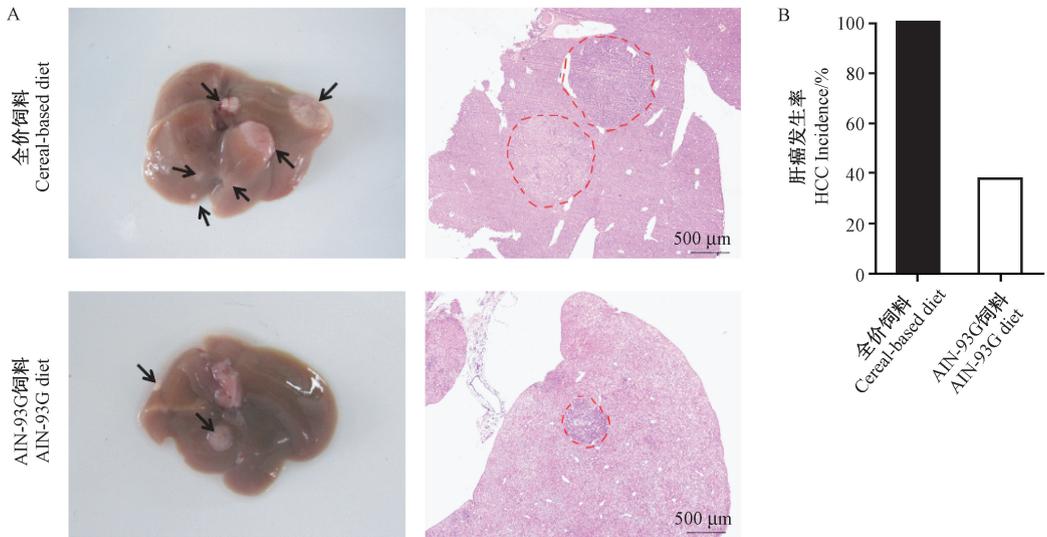
B. 全价饲料组与 AIN-93G 饲料组肝体重比相比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 AIN-93G 饲料对 DEN 诱导小鼠肝重的影响

Note. A. Compared with the liver weight in the AIN-93G diet group, ** $P < 0.01$;

B. Compared with the liver weight ratio in the AIN-93G diet group, * $P < 0.05$.

Fig. 2 Effect of AIN-93G diet on liver weight in the DEN-treated mice



注:A. 不同饲料喂养 DEN 诱导小鼠的肝外观和 HE 染色($\times 4$); B. 不同饲料喂养 DEN 诱导小鼠肝癌的发生率。

图 3 AIN-93G 饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌的影响

Note: A. Liver appearance and HE staining histology of DEN-induced mice with different diet;

B. Incidence of DEN-induced HCC in mice with different diet

Fig. 3 Effect of AIN-93G diet on liver cancer formation in the DEN-treated mice

3 讨论

本研究在建立 DEN 诱导的小鼠肝癌模型过程中,意外发现使用不同配方的饲料喂养模型小鼠,小鼠的荷瘤情况发生很大差异。采用常规全价饲料喂养的小鼠,在 9 月龄时,按照预期成功产生了肝癌,

肝表面肉眼可见多个大小不一的白色结节,经 HE 染色后分析病理结构,确定其为肝细胞癌。而由 AIN93-G 饲料喂养的模型小鼠,部分肝表面未见肿瘤结节,部分生长肿瘤的小鼠,与对照组相比,结节数量少,体积较小。统计结果显示,AIN93-G 饲料喂养的小鼠,并没有全部产生肝癌,产生肝癌的个体

中,肿瘤发展程度也明显低于对照组,提示 AIN-93G 饲料喂养的小鼠肝癌的发生发展受到了抑制。

DEN 是一种 N-亚硝基有机化合物,具有较强的肝毒性,导致肝细胞 DNA 损伤突变从而诱发肝癌,与人类肝癌发病过程相近^[5],因此常被用作建立大小鼠肝癌模型的诱导剂^[6,7]。在非常幼小的小鼠中,DEN 是完全的致癌剂,但在更成熟的个体中,需要额外给予促癌剂,通过多种机制共同作用才能形成肝癌^[8]。在多个文献报道中,通常选用 14~15 日龄雄性小鼠腹腔一次性注射 DEN 来建立小鼠肝癌模型^[9-11]。本研究中采用 14 日龄雄性小鼠腹腔注射 DEN,给药量 25 mg/kg 体重,常规全价饲料喂养的个体,9 月龄时 100% 产生肝癌,与以往报道结果一致^[12]。

AIN-93G 饲料配方由美国营养科学学会(American Society of Nutritional Sciences, ASNS)研制开发,是 AIN-76A 饲料配方的改良型,该配方经过深入研究,能够维持生长期啮齿类动物的长期健康^[13]。本实验 AIN-93G 饲料委托广东省医学实验动物中心根据该配方合成,经测定其主要营养成分基本等于或接近配方理论数据。但在本实验中,经此 AIN-93G 饲料喂养的小鼠,在肝癌生长受到抑制的同时,小鼠体重明显下降,肝重量也明显低于对照组,在一定程度上说明该饲料对小鼠的营养健康或免疫产生影响。另一方面,通过对比两种饲料营养成分的差异,初步推测 AIN-93G 饲料中某些成份不利于诱导肿瘤的形成,其中各种微量元素含量普遍低于全价饲料,然而是否微量元素或其他某种未测得成分在其中扮演了具体角色,需要进行更深入的研究。

现在还无法证明,是否由于原材料和加工等因素,使得 AIN-93G 合成饲料质地硬度不同于全价饲料,造成小鼠采食量产生差异^[14,15],进而造成小鼠营养摄入不足。由于原实验设计初衷仅为造模,并没有考虑饮食因素,因此暂时缺少采食量数据;接下来实验将进一步测定饲料硬度,并记录详细采食量,以排除是否由于采食量减少造成营养摄入不足导致了小鼠体重下降。

本研究的结果证明了在建立实验动物疾病模型过程中,环境因素,尤其是饮食因素起到了关键性作用。适宜的生活环境,合理的饮食是动物实验成功的基础。本研究中并未证实实际体重和肝重减轻外,小鼠肝功能是否还有其他变化;小鼠体重的下降与

肝癌生长受到抑制是否有直接关系,以及这一现象的原因和意义有待更深入的探讨。

参 考 文 献

- [1] 薛丽香,张凤珠,孙瑞娟,等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望[J]. 中国科学:生命科学,2014,44(9): 851-860.
- [2] 郑长生,詹纯列,王姣,等. 浅谈实验动物饲料对实验动物质量的影响[J]. 实验动物科学,2009,26(5): 61-63.
- [3] 林玮,谢金东,刘德强,等. 2 种不同来源的饲料对 KM 小鼠生长和繁殖性能的影响[J]. 福建中医学院学报,2010,20(4): 38-39.
- [4] 刘苏,陈昱凯,吴敬红,等. 两种不同商品饲料对 BALB/c 小鼠生长和繁殖性能的影响[J]. 实验动物科学与管理,2006,23(2): 19-21.
- [5] Verna L, Whysner J, Williams G M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA gene adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation[J]. Pharmacol Ther, 1996, 71(1-2): 57-81.
- [6] 赵彤,李柏. 二乙基亚硝胺在小鼠诱发肝癌模型中的应用[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(1): 76-80.
- [7] 张斌,李琦,殷佩浩,等. 二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌组织 CLDN1 基因表达及其甲基化[J]. 中国实验动物学报,2013,21(1): 81-83.
- [8] Sarma DS, Rao PM, Rajalakshmi S. Liver tumour promotion by chemicals: models and mechanisms[J]. Cancer Surv, 1986, 5(4): 781-798.
- [9] Maeda S, Kamata H, Luo JL, et al. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis[J]. Cell, 2005, 121(7): 977-990.
- [10] He G, Dhar D, Nakagawa H, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling[J]. Cell, 2013, 155(2): 384-396.
- [11] Scaiewicz V, Nahmias A, Chung RT, et al. CCAAT/enhancer-binding protein homologous (CHOP) protein promotes carcinogenesis in the DEN-induced hepatocellular carcinoma model[J]. PLoS One, 2012, 8(12): 81065-81065.
- [12] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. Science, 2007, 317(5834): 121-124.
- [13] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutrition, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [14] 凌娟,钟浩,姚方,等. 不同饲料硬度对小鼠饲料耗损量及血液生化指标的影响[J]. 饲料研究,2013,(2): 7-9.
- [15] 赵伟健,黎雄才,汪鹏丽等. 饲料硬度对 BALB/c 裸小鼠生长性能的影响[J]. 实验动物科学,2014,31(2): 49-51.