



人源性肝癌细胞小鼠原位移植瘤模型的建立及特点的比较研究

尹君^{1,2}, 李景丁莎², 左从林², 张惠铭², 余锐萍^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 北京昭衍新药研究中心股份有限公司, 北京 100176)

【摘要】 目的 选择3株人源性肝癌细胞, 原位接种于4种不同免疫功能缺陷的小鼠肝组织内, 建立人源性肝癌细胞原位移植瘤模型并进行比较。**方法** 将人 HepG2、HUH-7 和 QGY-7703 细胞悬液, 分别接种于不同免疫功能缺陷的小鼠(BALB/c 裸鼠、NOD SCID 小鼠、NOG 小鼠和 NPG 小鼠) 肝组织内。最终统计模型小鼠死亡时间、死亡率、肝重量, 应用 B 超以及组织学检查等方法, 分析比较不同免疫功能缺陷小鼠肝癌模型的特点。**结果** B 超和大体解剖观察结果显示各实验组小鼠均可见肝组织内有肿瘤结节形成; 肝接种 HepG2 细胞悬液各组动物于实验 20 d 左右全部死亡, NOG 和 NPG 小鼠生存时间显著低于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠 ($P < 0.001$); HUH-7 和 QGY-7703 接种肝的各实验组动物分别于实验第 92 天和 104 天进行解剖, 发现 NOG 和 NPG 模型小鼠肝体积显著增大并形成巨大肿瘤团块, 而 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠仅可见肝组织出现较小的肿瘤结节; HUH-7 及 QGY-7703 接种肝的 NOG 和 NPG 小鼠肝重量显著高于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠 ($P < 0.05$); 组织学检查可见各实验组动物肝组织内均出现肿瘤细胞生长伴大面积坏死, 部分动物肺组织发生肿瘤细胞转移。**结论** 与 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠比较, 肝癌细胞在 NOG 和 NPG 小鼠肝组织内生长更为迅速, 最终表现为生存期短, 肝体积大, 重量增加。NOG 和 NPG 小鼠可以在较短时间内完成人源性肝癌细胞的恶性增殖, 缩短模型研究周期, 因此 NOG 和 NPG 小鼠人源性肝细胞原位移植瘤是抗肝癌药物的研发的较为理想的模型。

【关键词】 原位移植瘤; 肝癌; 动物模型; NOG 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0068-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.012

Establishment of mouse orthotopic transplantation tumor models of human hepatoma and comparison of their characteristics

YIN Jun^{1,2}, LIJING Dingsha², ZUO Conglin², ZHANG Huiming², SHE Ruiping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. JOINN Laboratories(China) CO., LTD, Beijing 100176)

【Abstract】 Objective Three human hepatoma cell lines were injected into liver tissue of four mice with different immune function defects to establish orthotopic xenograft models of human hepatoma for comparison. **Methods** Human HepG2, HUH-7, and QGY-7703 cell suspensions were injected into the livers of mice with different immune function defects [BALB/c nude, non-obese diabetic (NOD) SCID, NOG (NOD. Cg-PrkdcscidH2rg^{tm1Sug}/JicCr1), and NPG

【基金项目】 G20 工程龙头企业培育项目(Z141100005314003)。

【作者简介】 尹君(1981—), 男, 硕士研究生。专业: 基础兽医学。E-mail: yinjun@joinn-lab.com

【通信作者】 余锐萍(1957—), 女, 教授, 博士研究生导师。研究方向: 黏膜免疫与分子病理学。E-mail: sheruiping@126.com

mice]. Survival time, mortality, liver weight, B-mode ultrasound, and histology were used to analyze and compare the characteristics of liver cancer models in the various immunodeficient mice. **Results** B-ultrasonography and gross anatomical observations indicated that all experimental animals showed tumor nodule formation in liver tissue. Moreover, all animals injected with a HepG2 cell suspension into the liver died at about 20 days. The survival time of NOG and NPG mice was significantly shorter than that of BALB/c and NOD SCID mice ($P < 0.001$). Experimental groups with injected HUH-7 and QGY-7703 cell suspensions into the liver were autopsied at day 92 and 104, respectively. The liver volumes of NOG and NPG model mice were increased significantly and formed large tumor masses, whereas BALB/c nude and NOD SCID mice showed only small tumor nodules in liver tissues. The weights of NOG and NPG mouse livers were significantly higher than those of BALB/c nude and NOD SCID mouse livers ($P < 0.05$). Histological examination showed that all groups of animals exhibited tumor cell growth with large areas of necrosis and some animal lung tissues had tumor metastasis. **Conclusions** Compared with BALB/c nude and NOD SCID mice, hepatoma cells grow more rapidly in the liver tissues of NOG and NPG mice, and the survival time is short, the liver volume is large, and the weight is increased. The human hepatoma cell lines can complete malignant proliferation in NOG and NPG mice in a short time for time-efficient model study. Therefore, human-derived hepatocyte xenografts in NOG and NPG mice are an ideal model for the development of anti-hepatoma drugs.

[Keywords] in situ orthotopic carcinoma; animal model; liver cancer; NOG mice

肝细胞癌是最为常见的一种恶性肿瘤,我国每年约有 38.3 万人死于肝癌,约占全球肝癌死亡总数的 51%^[1]。2015 年中国癌症流行病学统计表明,我国肝癌的发病及病死率均居于第 3 位^[2]。肝癌恶性程度较高,病情进展快,大部分患者($> 80\%$)就诊时已为晚期,不适合手术切除。即便可以手术切除的肝癌,2 年复发率也高达 50%。传统化疗后平均中位生存期仅为 3~5 个月^[3]。肝癌治疗药物主要集中于传统化疗药物—细胞毒性药物的研究,以及通过研究肝癌发病机制开发其他类型的新药,如基因药物以及分子靶向药物等^[4]。因此,选择成熟并有价值的动物肝癌模型进行研究,显得极为重要。目前,可用于药物研发用的肝癌动物模型种类很多,其中肝内移植肿瘤细胞的动物模型是最接近人类原发肝癌的模型,由于其对技术要求较高,且需要用到免疫缺陷小鼠作为动物载体,因此在治疗肝癌药物的研发中的应用还不是十分广泛^[5]。本实验应用三种不同人源性肝癌细胞原位移植于不同程度免疫缺陷小鼠肝内,通过对比分析肝肿瘤发生率、肿瘤大小以及动物死亡情况,以建立较为成熟并有价值的肝癌细胞移植模型,为抗肝癌药物的研发提供一定的数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 裸鼠 30 只[SCXK(京)2012-0001],体重 14~16 g,4~5 周龄。SPF 级 NOD-

SCID 小鼠 30 只[SCXK(京)2012-0001],体重 14~16 g,4~5 周龄。SPF 级 NOG 小鼠 30 只[SCXK(京)2011-0011],体重 14~16 g,4~5 周龄。SPF 级 NPG 小鼠 30 只[SCXK(京)2014-0001],体重 14~16 g,4~5 周龄。均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物饲养及无菌手术于本中心 SPF 级动物房[SYXK(京)2014-0006]中进行。本实验 IACUC 编号为:ACU16-219。实验操作过程中遵循 3R 原则。

1.1.2 人源肝癌细胞

人肝癌细胞 HepG2:购自上海南方模式生物研究中心,培养条件为 DMEM(高糖)+10% FBS,37℃、5% CO₂ 培养;人肝癌细胞 HUH-7:来源于中国科学院上海生命科学研究细胞资源中心,培养条件为 DMEM(高糖)+10% FBS,37℃、5% CO₂ 培养;人肝癌细胞 QGY-7703:购自中国典型培养物保藏中心细胞库,培养条件为 1640+10% FBS,37℃、5% CO₂ 培养。

1.2 主要试剂与仪器

全封闭式组织脱水机(Asp300,LAICA,美国)、组织包埋机(EG1150H,LAICA,美国)、半自动轮转切片机(RM2235,LAICA,美国)、摊片烤片一体机(CS-VI,LAICA,美国)、全自动染色封片一体机(CV5030,LAICA,美国)、恒温烤箱(DRP-9082,中国)、生物显微镜(CX31,奥林巴斯,日本)、便携式彩色多普勒超声诊断仪(S8Exp,深圳开立生物医疗科技股份有限公司,中国)。二甲苯、乙醇(北京化工厂,中国)、苏木素、伊红(北京世济合力生物科技

有限公司,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

BALB/c 裸鼠、NOD SCID 小鼠、NOG 小鼠和 NPG 小鼠每个种属 30 只动物分成 12 组,每组 10 只,分别接种 HepG2 细胞、HUH-7 和 QGY-7703 细胞。(表 1)

1.3.2 实验操作

用基质胶调整 HepG2 细胞至 $8.5 \times 10^7/\text{mL}$, HUH-7 细胞调整至 $4.7 \times 10^7/\text{mL}$, QGY-7703 细胞调整至 $1.25 \times 10^8/\text{mL}$,然后分别以每只 0.06 mL 原位接种于动物肝。将待接种动物戊巴比妥钠麻醉后,腹部切口暴露肝左外叶,使用无菌注射器将细胞悬液接种于肝组织中,单点注射,干棉球压迫止血后缝合肌肉和皮肤切口。

应用小动物 B 超成像仪对接种肿瘤动物进行观察,确认是否有肿瘤组织生长。对实验期间死亡动物以及计划安乐死动物(第 92 天和第 104 天)进行大体解剖,对主要脏器进行观察。并取材各主要脏器(包含肝、心、脾、肺、肾、脑),用于组织病理学检查,以观察肝肿瘤和其他脏器的肿瘤转移发生情况。统计小鼠生存时间和脏器重量。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 软件对实验数据进行统计。生存时间和脏器重量数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。生存时间的统计应用 Kaplan-Meier 生存分析法绘制生存时间曲线,脏器重量统计方法使用单因素方差分析比较组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物死亡情况

本实验中,各实验组动物在手术过程中均出现死亡,由于死亡动物数量较少(不超过 30%),因此认为手术中动物的死亡不影响本实验研究。(表 2)

2.2 移植瘤模型的建立

应用小动物 B 超成像仪,在实验开始 1 个月以后,对接种肿瘤动物进行超声检查,确定实验动物肝组织区域均可见密度增强区域(参见图 1a)。对死亡动物及安乐死动物进行大体解剖,发现小鼠肝均可见肿瘤结节,多呈结节状突起,色泽苍白,肿瘤组织与周围肝组织界限较为清楚。切面呈灰白色,质软。结合 B 超成像结果(参见图 1b)以及大体解剖观察,确认成功造模,三种肿瘤细胞均可成功移植。

表 1 实验动物分组

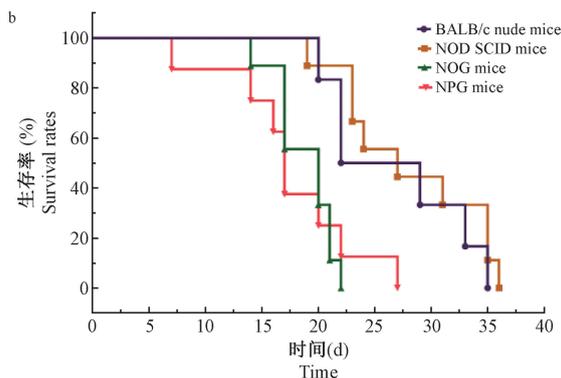
Table 1 Grouping of the experimental animals

组别 Groups	肝癌细胞 Hepatoma cells	动物品系 Animal strain	动物数 Animal number
1	HepG2	BALB/c 裸鼠	10
2	HepG2	NOD SCID 小鼠	10
3	HepG2	NOG 小鼠	10
4	HepG2	NPG 小鼠	10
5	HUH-7	BALB/c 裸鼠	10
6	HUH-7	NOD SCID 小鼠	10
7	HUH-7	NOG 小鼠	10
8	HUH-7	NPG 小鼠	10
9	QGY-7703	BALB/c 裸鼠	10
10	QGY-7703	NOD SCID 小鼠	10
11	QGY-7703	NOG 小鼠	10
12	QGY-7703	NPG 小鼠	10

表 2 手术实施过程中动物死亡统计表

Table 2 Animal death during operations

组别 Groups	BALB/c	NOD SCID	NOG	NPG
HepG2	1/10	1/10	1/10	2/10
HUH-7	0/10	3/10	0/10	1/10
QGY-7703	0/10	2/10	3/10	3/10
死亡率 Mortality	1/30	6/30	4/30	6/30



注: a: B 超结果显示小鼠肝处长度为 6.77 ~ 4.51 mm 区域密度增强, 确认为肿瘤结节区域; b: NOG 和 NPG 小鼠生存时间显著低于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠。

图 1 肝 B 超图片和 HepG2 肝癌细胞悬液注射不同免疫缺陷小鼠生存曲线图

Note. a: B-mode ultrasonography showed that the density of the mouse liver at the region of 6.77 to 4.51 mm was increased and confirmed as the tumor nodule region; b: Survival curves of the various immunodeficient mice injected with HepG2 hepatoma cell suspensions showed that the survival time of NOG and NPG mice was significantly shorter than that of BALB/c nude and NOD SCID mice.

Figure 1 Mouse liver B-mode ultrasonography and survival curves of the various immunodeficient mice injected with HepG2 hepatoma cells

2.3 组织学检查

各实验组动物肝组织均可见大量的人源性肝癌细胞, 并具有大量病理核分裂像, 同时组织中心部位大面积坏死(参见图 2)。

2.4 HepG2 组实验结果

各实验组小鼠均于实验第 20 天左右发生死亡。其中 NOG 小鼠和 NPG 小鼠平均生存时间显著低于 BALB/c 裸鼠以及 NOD SCID 小鼠。中位生存时间也显著低于 BALB/c 裸鼠以及 NOD SCID 小鼠。

各实验组小鼠动物肝均可见肿瘤细胞生长, 因各组实验动物生存时间不同, 不再进行脏器重量的统计。(表 3 ~ 4)

2.5 HUH-7 及 QGY-7703 组实验结果

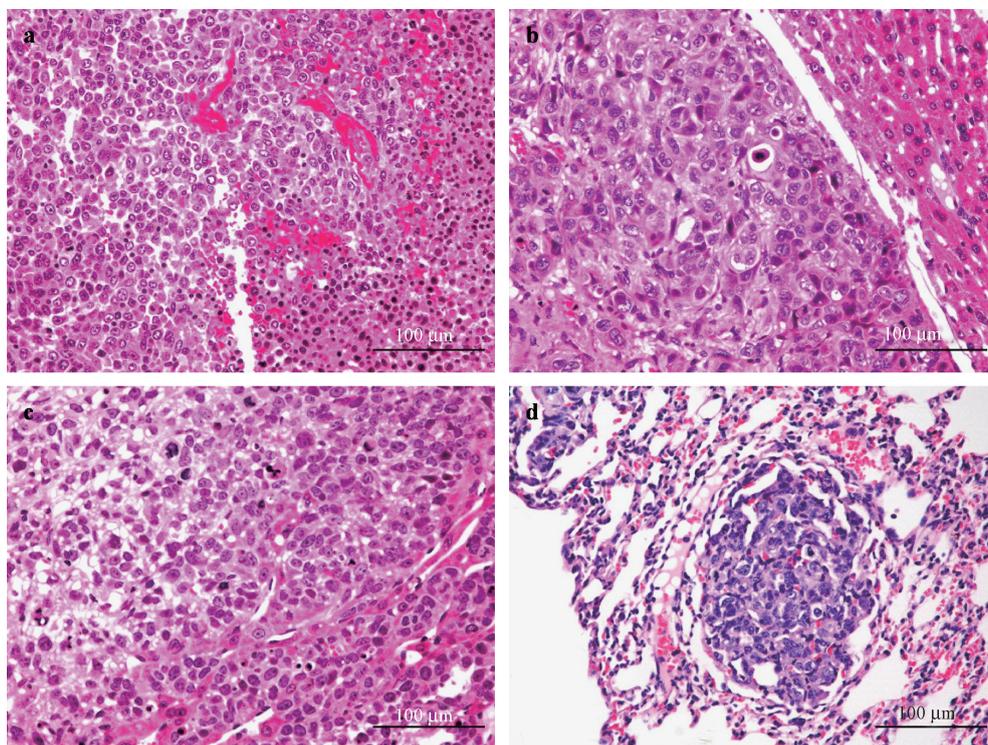
各实验组仅 BALB/c 裸鼠未发生意外死亡, 且随着动物免疫缺陷程度越高, 动物死亡率也就相应增加, 因此动物死亡与免疫缺陷程度呈一定的相关性。

HUH-7 和 QGY-7703 肝癌细胞接种动物后, NOG 小鼠和 NPG 小鼠肝重量显著大于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠, 差异显著(参见表 5, 图 3)。说明 HUH-7 和 QGY-7703 肿瘤细胞在 NOG 小鼠和 NPG 小鼠肝中生长更加迅速。

3 讨论

原位移植瘤模型是近年发展的新热点, 可以模拟肝癌的发生、发展及结局, 是最接近人类原发性肝癌的动物模型^[6]。朱瑞东等^[7]将人 HepG2 细胞移植于小鼠皮下并成瘤, 然后用此移植瘤组织再接种于小鼠肝内, 建模成功率为 90%; 韩客起等^[8]使用肝癌细胞株 H22 建立异位移植模型, 肝原位移植瘤成模率达到 95.6%。除原位接种肿瘤细胞以外, Soares 等^[9]从脾门静脉中注射肿瘤细胞, 从而建立小鼠肝肿瘤原位移植模型, White 等^[10]经超声引导下, 经皮植入肿瘤细胞从而建立兔肝肿瘤模型。综合上述文献报道已知, 国内外已经有很多学者致力于肝癌动物模型的研究, 但是基本还是以正常动物或者免疫缺陷程度有限的裸鼠等作为肝癌动物载体, 这些动物自身具有一定的免疫力, 肝癌细胞的生长受到一定的抑制作用, 因此很难满足在新药研究实验中对模型动物建模周期短, 肝癌恶性程度大的要求。

BALB/c 裸鼠是由于基因突变造成的, 缺乏成熟 T 细胞, 但 B 淋巴细胞正常。NOD SCID 小鼠第 16 对染色体上存在单个隐性突变基因以及 VDJ 重组酶活性异常, 可以阻止功能性 T、B 淋巴细胞的分化, 造成细胞和体液免疫功能均缺陷。NOG 小鼠由日本实验动物研究所通过杂交 NOD SCID 小鼠和 γ -链 IL-2 受体敲除小鼠而建立, 这种小鼠主要缺乏 T、B 淋巴细胞以及 NK 细胞。NPG 小鼠是维通达自主研发的基因缺陷小鼠, 也是通过杂交 NOD SCID 小鼠和 γ -链 IL-2 受体敲除小鼠, 与国外 NOG 小鼠一致。上述动物模型因其存在不同程度的免疫缺陷, 在实际应用中也存在一定的差异, 如死亡时间、成瘤大小、肿瘤增殖程度等, 目前国内对于不同免疫缺陷模型动物肝癌模型的比较研究还缺乏数据研究。



注:a;HepG2 细胞接种 NOG 小鼠肝组织照片,可见大量肿瘤细胞,伴有病理核分裂像及大面积坏死;b: HUH-7 细胞接种 NOG 小鼠肝组织照片,可见大量肿瘤细胞,伴有病理核分裂像。c: QGY-7703 细胞接种 NOG 小鼠肝组织照片,可见大量肿瘤细胞,伴有病理核分裂像。d:小鼠肺组织照片,各实验组小鼠均有部分动物肺组织出现肿瘤转移结节。

图 2 小鼠肝和肺 HE 染色照片(×200)

Note. a: A NOG mouse liver injected with HepG2 cells showing a large number of tumor cells with pathological mitosis and a large necrotic area. b: A NOG mouse liver injected with HUH-7 cells showing a large number of tumor cells with pathological mitosis. c: A NOG mouse liver injected with QGY-7703 cells showing a large number of tumor cells with pathological mitosis. d: The lung tissue of a mouse showing a tumor metastatic nodule.

Figure 2 Histological changes of the mouse livers and lungs(HE staining)

表 3 HepG2 细胞接种组小鼠生存时间统计表
Table 3 Survival time for mice injected with HepG2 cells

组别 Groups	1 组 BALB/c 裸鼠 Group 1 BALB/c nude mice	2 组 NOD SCID 小鼠 Group 2 NOD SCID mice	3 组 NOG 小鼠 Group 3 NOG mice	4 组 NPG 小鼠 Group 4 NPG mice
数量 Number	9	9	9	8
平均生存时间(d) Average survival day	26.9 ± 5.5	28.1 ± 6.3	18.8 ± 2.6 ^{▲△}	17.5 ± 5.9 ^{▲△}
中位生存时间(d) Median survival day	28	27	20	17

注:1 组和 2 组比较,▲ $P < 0.001$;1 组和 2 组比较,△ $P < 0.01$ 。

Note. Compared the group 1 with group 2, ▲ $P < 0.001$. Compared the group 1 with group 2, △ $P < 0.01$.

表 4 HUH-7 及 QGY-7703 组小鼠死亡情况统计表
Table 4 Mice deaths in the HUH-7 and QGY-7703 groups

组别 Groups	BALB/c 裸鼠 BALB/c nude mice	NOD SCID 小鼠 NOD SCID mice	NOG 小鼠 NOG mice	NPG 小鼠 NPG mice	死亡率 Mortality
HUH-7 组	0/10	1/7	2/10	1/9	4/36
QGY-7703 组	0/10	1/8	2/7	3/7	6/32

表 5 HUH-7 细胞及 QGY-7703 细胞接种小鼠肝重量统计表
Table 5 Liver weights of the HUH-7 cell-injected mice

组别 Groups	BALB/c 裸鼠 BALB/c nude mice	NOD SCID 小鼠 NOD SCID mice	NOG 小鼠 NOG mice	NPG 小鼠 NPG mice
HUH-7 组	动物数 Number	10	6	8
	肝脏重量(g) Liver weights	1.361 ± 0.249	1.512 ± 0.190	4.916 ± 3.882 *
QGY-7703 组	动物数 Number	10	7	5
	肝脏重量(g) Liver weights	1.323 ± 0.203	1.469 ± 0.393	7.669 ± 2.171 **

注:5 组和 6 组比较, * $P < 0.05$ 。9 组和 10 组比较, ** $P < 0.05$ 。

Note. The group 5 compared with group 6, * $P < 0.05$. The group 9 compared with group 10, ** $P < 0.05$.



注:a: HUH-7 细胞接种动物肝大体观察照片;第 7 组(NOG 小鼠)和第 8 组(NPG 小鼠)动物肝体积显著大于第 5 组(BALB/c 裸鼠)和第 6 组(NOD SCID 小鼠)动物肝。b: QGY-7703 细胞接种动物肝大体观察照片;第 11 组(NOG 小鼠)和第 12 组(NPG 小鼠)动物肝体积显著大于第 9 组(BALB/c 裸鼠)和第 10 组(NOD SCID 小鼠)动物肝。除 5 组和 9 组外,各实验组均有部分小鼠在手术移植肝癌细胞期间死亡(未形成肝癌结节)或者在实验期间意外死亡,未能收集到肝肿瘤标本,但是肿瘤结节随免疫缺陷程度增加而逐渐增大。

图 3 小鼠肝大体观察照片

Note. a: Livers from HUH-7 cell-injected mice. Liver volumes of group 7 (NOG mice) and group 8 (NPG mice) were significantly greater than those of group 5 (BALB/c nude mice) and group 6 (NOD SCID mice). b: Livers injected with QGY-7703 cells. Liver volumes of group 11 (NOG mice) and group 12 (NPG mice) were significantly larger than those of group 9 (BALB/c nude mice) and group 10 (NOD SCID mice). Except for groups 5 and 9, some mice in each group died during surgical transplantation of hepatocellular carcinoma cells (no hepatocarcinoma nodules were formed) or died unexpectedly during the experimental period. Therefore, hepatic tumor specimens could not be collected. However, tumor nodules were increased gradually with the degree of immunodeficiency.

Figure 3 Gross observation of the mouse livers

本实验应用不同程度免疫缺陷的 BALB/c 裸鼠、NOD SCID 小鼠、NOG 小鼠和 NPG 小鼠原位接种三种人肝癌细胞并进行比较研究。直接注射人肝癌 HepG2 细胞后, 各组小鼠均在短期内发生死亡, 死亡时间大多在 20 d 左右。项亮亮等^[11] 曾用昆明小鼠注射肝癌 H22 细胞建立小鼠肝癌原位和异位移植模型, 模型动物的平均自然生存期为 28 d。王书杰等^[12] 利用 Wistar 大鼠将 Walker-256 瘤株分别进行注射、原位移植和改良注射方法制备人源化肝肿瘤模型, 结果显示模型鼠存活时间较短, 50% 以上大鼠在第 18 天发生死亡。赵然等^[13] 利用 BALB/c 裸鼠进行 HepG2 细胞皮下接种和原位接种的比较研究, 结果显示 HepG2 皮下接种和原位细胞接种成瘤率均为 100%, 整个实验周期内 (50 d) 未见小鼠发生死亡。直接注射细胞法的接种肿瘤细胞的动物生存期一般较短, 一般取决于肝癌细胞恶性增殖的程度 (如 HepG2 细胞), 恶性程度较高的肿瘤细胞可使动物在短期内迅速死亡; 另一方面肿瘤细胞注射后, 随肝血液系统进行分散定植, 极易形成其它脏器的转移。而恶性增殖程度较低的 HUH-7 和 QGY-7703 细胞, 则一般可存活至实验周期结束 (大致 90 天左右)。因此在进行抗肿瘤药物的评价时, 需要考虑肿瘤细胞接种量, 动物生存期以及给药途径和给药周期。

本实验中 HepG2 细胞组的 NOG 和 NPG 小鼠存活时间要明显短于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠, 可见对于免疫系统缺陷程度更高的模型鼠来讲, 更利于肿瘤细胞生长并可以导致模型动物快速死亡, 缩短实验研究周期。HUH-7 和 QGY-7703 细胞组的 NOG 和 NPG 小鼠肝重量显著大于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠, 且死亡率也高于 BALB/c 裸鼠和 NOD SCID 小鼠, 因此 NOG 和 NPG 小鼠是更为理想的模型动物。

总之, 本实验研究系统地比较了三种肝癌细胞直接注射不同免疫缺陷小鼠肝的方法, 观察比较不

同动物在肝癌细胞移植后的各种指标变化, 为抗肝癌药物的筛选实验提供了更为科学的动物模型, 为进一步研究肝癌提供了有价值的资料。

参考文献:

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. *Hepatology*, 2014, 60 (6): 2099 - 2108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 66(2): 115 - 132.
- [3] 贾晋斌, 倪淑欣. 肝癌治疗新药临床研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2011, 6(2): 131 - 133.
- [4] 杨绍梅, 张娜, 等. 肝癌治疗药物的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2015, 34(2): 93 - 97
- [5] 刘嘉, 申恒巧, 顾红梅, 等. 肝癌动物模型的构建及其应用现状 [J]. *肿瘤药学*, 2013, 3(1): 13 - 16.
- [6] Furukawa T, Fu X, Kubota T, et al. Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(5): 1204 - 1208.
- [7] 朱瑞东, 冯骥良, 赵大伟, 等. 裸鼠原位肝癌移植模型的建立及其生物学观察 [J]. *北京医学*, 2016, 38(9): 921 - 923.
- [8] 韩克起, 顾伟, 胡侠, 等. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及生物学特性 [J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(5): 372 - 374.
- [9] Lee WY, Hong HK, Ham SK, et al. Comparison of colorectal cancer in differentially established liver metastasis models [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(7): 3321 - 3328
- [10] White SB, Chen J, Gordon AC, et al. Percutaneous ultrasound guided implantation of VX2 for creation of a rabbit hepatic tumor model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123888.
- [11] 项亮亮, 侯杰, 王婕, 等. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及其意义的研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2015, 38(6): 48 - 49.
- [12] 王书杰, 韦艾凌, 张永琴, 等. 三种大鼠移植性肝癌原位模型制作的对比研究 [J]. *实验动物科学*, 2012, 29(2): 11 - 14.
- [13] 赵然, 刘羽, 高丽丽, 等. HepG2 细胞皮下接种与肝原位接种成瘤的比较研究 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2010, 44(3): 205 - 211.

[收稿日期] 2018 - 06 - 05