

李晓娟, 李兴杰, 孙慧伟, 等. 基于 Image J 软件对 BALB/c 突变卷毛鼠肝肿瘤的定量分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (11): 16-20.

Li XJ, Li XJ, Sun HW, et al. Quantitative comparative analysis of liver tumors in BALB/c mutant curly mice by Image J software [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 16-20.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.003

基于 Image J 软件对 BALB/c 突变卷毛鼠肝肿瘤的定量分析

李晓娟^{1#}, 李兴杰^{1#}, 孙慧伟¹, 姜棋予¹, 柴燕涛¹, 高 蓉¹, 李 润¹,
李瑞生^{1*}, 汤紫荣^{2*}

(1. 解放军总医院第五医学中心感染病医学部, 北京 100039; 2. 解放军总医院第五医学中心住院与病案管理科, 北京 100039)

【摘要】 目的 探讨 BALB/c 突变卷毛鼠与正常 BALB/c 小鼠构建经肝门静脉注射肿瘤模型间的差异, 同时建立基于 Image J 软件的肿瘤图像定量分析方法。**方法** 将 H₂₂ 细胞分别经两组小鼠的肝门静脉注入肝, 21 d 后摘取肝。选择最大肝叶弥散病灶, 首先拍照获得垂直视角肿瘤外观图进行比较, 然后利用 Image J 软件对肝肿瘤进行图像定量分析比较。**结果** 两组小鼠的肝均形成了多发性弥散性肿瘤。外观显示: 卷毛鼠组肿瘤的多发和弥散程度显著高于正常小鼠组, 且肿瘤与周边的正常肝组织浸润关系更加密切。Image J 软件分析结果显示两组小鼠肝比例之间不具有显著性差异, 但卷毛鼠的肿瘤比例和肿瘤占肝的比例均显著大于正常小鼠 ($P < 0.01$)。**结论** 成功模拟了进展期肝肿瘤动物模型。BALB/c 突变卷毛鼠在经门静脉注射肿瘤细胞成模能力显著优于正常 BALB/c 小鼠, 同时建立了基于图像分析软件 Image J 的图像定量分析方法。

【关键词】 卷毛鼠; 肝进展期肿瘤模型; 图像分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0016-05

Quantitative comparative analysis of liver tumors in BALB/c mutant curly mice by Image J software

LI Xiaojuan^{1#}, LI Xingjie^{1#}, SUN Huiwei¹, JIANG Qiyu¹, CHAI Yantao¹, GAO Rong¹, LI Run¹, LI Ruisheng^{1*},
TANG Zirong^{2*}

(1. Department of Infectious Disease medicine, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China.
2. Inpatient and Medical Record Management Department, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039)

【Abstract】 Objective To investigate the difference between BALB/c mutant curly mice and normal BALB/c mice in the establishment of tumor models by hepatic portal vein injection and establish a quantitative analysis method of images using Image J software. **Methods** H₂₂ cells were injected into the liver through the portal vein of the two groups and livers were removed 21 days later. The largest diffuse lesion of the liver lobe was selected for analysis. The vertical view of the tumor appearance was obtained by acquiring images, and then Image J software was used for quantitative analysis and comparison of liver tumor images. **Results** Multiple diffuse tumors were found in both groups. The multiple and diffuse degree of tumors in the curly mice group was significantly higher than that in the normal mice group, and the tumors in

【基金项目】 军队实验动物专项基金面上项目 (SYDW[2016]005, SYDW[2020]05)。

【作者简介】 李晓娟 (1980—), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物模型。E-mail: sxlily55@163.com

李兴杰 (1988—), 男, 技师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 710988681@qq.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 汤紫荣 (1980—), 女, 副主任技师, 研究方向: 医院病案管理。E-mail: 110975300@qq.com

李瑞生 (1969—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 实验动物模型研究。E-mail: lrsheng@sohu.com

* 共同通信作者

curly mice group were more closely related to the surrounding normal liver tissue infiltration than that in normal mice group. The result of Image J software analysis showed that there was no significant difference between the two groups, but the proportions of tumors and tumors in the liver of curly mice were significantly higher than those in normal mice ($P < 0.01$).

Conclusions The animal model of advanced liver tumors was established successfully. The ability of BALB/c mutant curly mice to model tumor cells via portal vein injection was significantly better than that of normal BALB/c mice. Moreover, a quantitative analysis method of images was established using Image J software.

【Keywords】 curly hair mice; liver advanced tumor model; image analysis

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国乃至全世界最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年升高,对我国公共卫生事业提出了重大挑战^[1]。受到肝癌诊断与临床治疗技术的限制,大多数患者直到发展为进展期或晚期才确诊,肝肿瘤已呈多发或弥散性肿瘤病灶,同时转移与侵袭能力较强^[2-3],因此进展期肝癌的各项研究逐渐成为了热点。而动物模型在研究过程中起到非常重要的作用,但目前尚未有最合适的进展期肝癌动物模型,因此需建立更加直观且便捷的动物模型。同时在肝癌建模的评价中,对肿瘤定性研究使用较多,对肿瘤组织等图片进行定量分析则较少见。BALB/c 卷毛鼠是本实验室发现的自发突变小鼠,前期研究表明突变基因对该鼠的各个系统尤其是免疫系统产生了一定的影响^[4-5]。因此本实验利用 BALB/c 突变卷毛鼠与正常 BALB/c 小鼠构建经肝门静脉注射后形成多发与弥散的肝肿瘤病灶,利用 Image J 软件直观地对两组小鼠的肿瘤病灶比例进行定量分析与对比分析,以期了解突变鼠与正常小鼠在构建进展期肝癌肿瘤模型之间的差异性,为今后更好得开发和利用本突变鼠作为具有优势的进展期肝癌动物模型提供坚实的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

KM 小鼠,3 只,SPF 级,雌性,6 周龄,体重 18~20 g;BALB/c 小鼠 10 只,SPF 级,雌性,5~6 周龄,体重 16~18 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2016-0002]。BALB/c 卷毛鼠 10 只,SPF 级,雌性,5~6 周龄,16~18 g,来源于本实验室近交培育。动物饲养在解放军总医院第五医学中心动物实验中心[SYXK(军)2017-0016]。本实验严格按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,通过了解放军总医院第五医学中心动物伦理委员会审查(IACUC-2017-006)。

1.1.2 细胞

H₂₂肝癌细胞株来自本院中心实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

胰蛋白酶、DMEM 培养基、胎牛血清等购自美国 Hyclone 公司;吸入性麻醉剂异氟烷购自上海玉研科技有限公司;全套解剖手术器械由本实验室提供,购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂;图像分析软件为 Adobe Photoshop(CS6)和 Image J 软件(美国国立卫生研究院,1.51j8)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养实验

在 KM 小鼠体内腹腔注射复苏后的 H₂₂细胞株,待小鼠腹部隆起后,用无菌注射器抽取腹水,用生理盐水洗涤后经 1000 r/min 离心(5 min),弃上清液。用生理盐水将 H₂₂肝癌细胞数调整至每毫升 1×10^7 个备用。

1.3.2 构建进展期肝癌模型

将两组小鼠依次使用异氟烷进行麻醉。在小鼠胸骨下缘正中处开一个 1.5 cm 的竖形开口。将肝叶轻轻挤出并上翻放置于预置的湿润纱布上,即可清晰地看到与下腔静脉伴行的肝门静脉。使用 1 mL 灭菌注射器吸取备用细胞悬液,轻轻扎入肝门静脉,缓慢注射。注射体积为 100 μ L,细胞量约为 1×10^6 个。注射完毕,轻压止血后,快速将肝叶置入腹腔内,缝合消毒伤口。术后每日观察两组小鼠的恢复状态,待 21 d 后采集肝。

1.3.3 利用 Image J 软件对肝弥散病灶进行定量分析

选择获得的两组肝组织的最大肝叶,首先拍照获得垂直视角图片。进而对拍照所得的肝照片进行图像定量分析,具体分析步骤参考姜棋予等^[6]的方法。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验进行两组分析比较, $P < 0.05$ 与 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝多发弥散性肿瘤外观对比结果

结果显示:卷毛鼠组和正常小鼠组在相同的造模时间内均形成了多发性弥散性的肝肿瘤。肉眼观察发现卷毛鼠组的弥散性肿瘤占据肝的比例显著多于正常小鼠组,而且观察到肿瘤与周边的正常肝组织浸润关系更加密切(图 1)。

2.2 肝多发弥散性肿瘤病灶图像定量对比分析

结果显示:首先用 Photoshop 软件沿肝边缘截取得到肝整个背景图片(图 2A),再用 Image J 软件获得了图片的 RGB 象限分析结果(图 2B、2C、2D),选择对比度相对高的图 2D 进行分析。分别获得了卷毛鼠和正常小鼠肝整体比例图与肝肿瘤比例图(图 3)。其中一只卷毛鼠的肝占图片总面积的 37.54%,肿瘤组织占图片总面积的 21.23%(图 3A),而一只正常小鼠肝占图片总面积的 35.19%,肿瘤组织占图片总面积的 11.84%(图 3B)。建立了基于图像分析软件 Image J 的肝照片定量分析方法。

2.3 肝多发弥散性肿瘤比例对比分析

结果显示:两组小鼠的肝比例不具有显著性差异,而卷毛鼠的肿瘤比例和肿瘤占肝的比例均显著大于正常小鼠($P < 0.01$)(见表 1)。

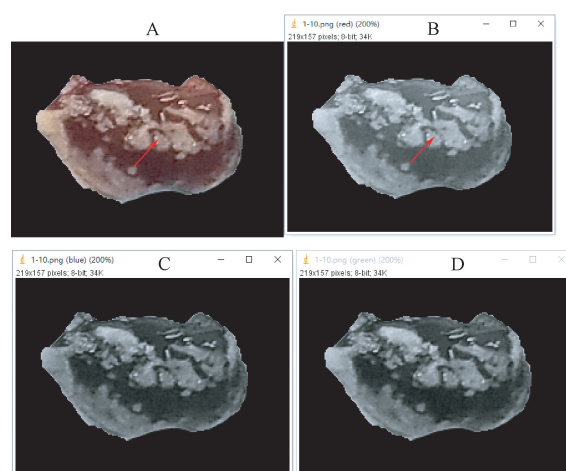
3 讨论

依托实验动物建立肝细胞癌模型是肝细胞癌分子靶向治疗研究以及分子药理学研究的基础^[7]。近年来可见利用门静脉注射方法构建进展期或转移性肝癌模型。刘毅等^[8]建立肝癌细胞门静脉转移模型,研究发现部分机制可能是通过上调基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达实现。柴燕涛等^[9]利用肝门静脉注射不同肝癌细胞系建立新型进展期肝肿瘤模型,为肝癌相关临床药物的筛选奠定了坚实基础。同时,研究者更倾向于利用各种成熟的图像成像技术来反映肿瘤的进展情况。余琦等^[10]利用 Image J 软件对家兔动脉粥样硬化病变图像进行定量分析,能够准确和有效的评估动脉粥样硬化病变程度。张鑫等^[11]利用 Image J 软件建立白癜风白斑面积的数字化测量方法,为临床客观评价皮损的严重程度及其动态变化提供可靠且简便易行的图形面积数字化操作流程。而利用门静脉注射肿瘤细胞构建自发突变小鼠进展期肝细胞癌模型,并利用 Image J 软件对肿瘤进行观察的报道尚未见到。



图 1 两组小鼠肝弥散性肿瘤外观对比结果

Figure 1 Comparison of the appearance of liver diffuse tumor between the two groups

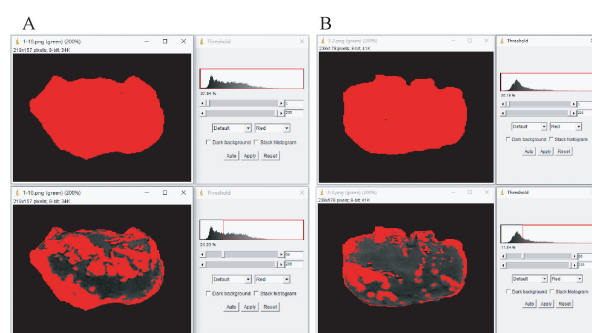


注:A:选定肝的全部区域;B(红色)、C(蓝色)、D(绿色):3个 RGB 象限分析结果;红色箭头示肝中的多发与弥散肿瘤病灶。

图 2 肝照片的选定及像限分析结果

Note. A, All areas of liver organs were selected. B (Red), C (Blue), D (Green), Analysis results of three RGB image limits. Red arrow shows multiple and diffuse tumors in the liver.

Figure 2 Selection of liver photos and results of image limit analysis



注:A:卷毛鼠肝比例(上)与肿瘤比例图(下);B:正常小鼠肝比例(上)与肿瘤比例图(下)。

图 3 肝总面积和肿瘤病灶识别预算定量分析

Note. A, Liver ratios(top)and tumor ratios(bottom) in curly mice. B, Liver ratios(top)and tumor ratios(bottom) in normal mice.

Figure 3 Quantitative analysis of total area of liver organs and budget of tumor focus identification

表 1 两组小鼠弥散性肿瘤比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of diffuse tumor between the two groups

组别 Groups	肝比例(%) Liver ratio	肿瘤比例(%) Tumor ratio	肿瘤占肝比(%) Ratio of tumor to liver
卷毛鼠 Curly mice	37.82 $\pm$ 1.31	20.43 $\pm$ 4.03 *	53.79 $\pm$ 9.11 *
正常小鼠 Normal mice	36.21 $\pm$ 1.85	9.20 $\pm$ 2.01	25.35 $\pm$ 5.16

注:与正常小鼠相比, * $P<0.01$ 。Note. Compared with normal mice, * $P<0.01$.

因此,本研究在前期发现突变卷毛鼠与正常小鼠构建皮下移植和原位肝移植模型之间存在显著差异的基础上,应用门静脉注射肿瘤细胞构建进展期肝细胞癌模型,进而对两组小鼠的差异性进行比较。结果显示:两组小鼠的肝均形成明显的弥散性肿瘤。但卷毛鼠组弥散性肿瘤占据肝的比例显著多于正常小鼠组,而且肿瘤与周边的正常肝组织浸润关系更加密切,与前期其他方式移植肿瘤的研究结果相一致^[12]。现研究中肿瘤转移动物模型多采用经尾静脉注射,肿瘤细胞经下腔静脉回心后经由肺动脉抵达肺部^[13],难以到达肝,很难直观反映与模拟进展期肝肿瘤的特性^[14-15]。而本实验选择经肝门静脉直接注射肿瘤细胞,肿瘤细胞不仅可随肝内部丰富的血流迅速到达肝各个部位,还可长时间留驻肝内部,尤其在接近肝包膜处毛细血管丰富,能够很好形成多发弥散性的肿瘤病灶。同时皮下肿瘤和原位肿瘤模型多为单个,可通过测量计算其肿瘤体积进行量化分析,获得照片等图像信息也较为容易。但对于多发性及弥散性肿瘤的量化分析则有难度。曾有研究者以高内涵等为代表的图像采集与分析系统,但整个工作站价格昂贵,而且对于图形文件格式的要求较为严格,因此普及性较差^[16-17]。本实验采用 Image J 软件可直观的对弥散性肿瘤图片进行定量分析,得出卷毛鼠与正常小鼠肝比例分别为(37.82 $\pm$ 1.31)%和(36.21 $\pm$ 1.85)%、肿瘤比例分别为(20.43 $\pm$ 4.03)%和(9.20 $\pm$ 2.01)%、肿瘤占肝比分别为(53.79 $\pm$ 9.11)%和(25.35 $\pm$ 5.16)%,卷毛鼠与正常小鼠的肝比例不具有显著性差异,而卷毛鼠的肿瘤比例和肿瘤占肝的比例均显著大于正常小鼠($P<0.01$),不仅建立了 Image J 软件对弥散性肿瘤进行图像定量分析的方法,而且进一步验证了卷毛鼠的肝癌成模能力强于正常小鼠。

综上所述,BALB/c 突变卷毛鼠经门静脉注射肿

瘤细胞形成多发弥散性肿瘤的能力优于正常 BALB/c 小鼠,同时利用 Image J 软件对弥散性肿瘤进行定量分析,进一步验证了 BALB/c 突变卷毛鼠在肝肿瘤成模方面的优势所在,以期该突变卷毛鼠能够成为开展肝癌动物模型各项研究的成熟实验平台。

参考文献:

- [1] Polaris OC. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383-403.
- [2] Xie H, Yu H, Tian S, et al. What is the best combination treatment with transarterial chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma? A systematic review and network meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 100508-100523.
- [3] Dong J, Zhai B, Sun W, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185088.
- [4] 李晓娟, 张巧云, 李蓓, 等. BALB/c 突变卷毛小鼠部分生长发育指标初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(11): 36-39.
- [5] 李晓娟, 张巧云, 汤紫荣, 等. BALB/c 突变卷毛小鼠免疫学特性指标的分析 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(3): 25-28.
- [6] 姜棋予, 陈艳, 李瑞生, 等. 基于 Image J 软件的裸鼠肝脏原位肿瘤图像定量分析方法 [J]. 生物技术通讯, 2018, 29(4): 541-546.
- [7] Rajyaguru DJ, Borgert AJ, Smith AL, et al. Radiofrequency ablation versus stereotactic body radiotherapy for localized hepatocellular carcinoma in nonsurgically managed patients: analysis of the National Cancer Database [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(6): 600-608.
- [8] 刘毅, 王进, 陈雨信, 等. 基质金属蛋白酶-9 在小鼠肝脏部分缺血再灌注并肝细胞癌门静脉转移模型中的表达及临床意义 [J]. 中华外科肝胆杂志, 2014, 20(11): 810-815.
- [9] 柴燕涛, 姜棋予, 冯帆, 等. 基于肝门静脉注射肿瘤细胞的新型进展期肝脏肿瘤动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 55-60.
- [10] 余琦, 陈颖, 韩莉娟, 等. 利用 Image J 软件对家兔动脉粥样硬化病变图像进行定量分析的方法 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 24(4): 297-301.
- [11] 张鑫, 王海红, 王晨, 等. Image J 软件测量白癜风白斑面积及与 Photoshop 的比较 [J]. 实用皮肤病学杂志, 2017, 10(1): 4-8.
- [12] 李晓娟, 冯帆, 孙慧伟, 等. BALB/c 突变卷毛小鼠肝癌移植模型对比分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 85-88.
- [13] Liang Y, Xu X, Wang T, et al. The EGFR/miR-338-3p/EYA2 axis controls breast tumor growth and lung metastasis [J]. Cell

- Death Dis, 2017, 8(7): e2928.
- [14] Krasko JA, Žilionyte K, Darinskas A, et al. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5098-5104.
- [15] Wu JY, Wang ZX, Zhang G, et al. Targeted codelivery of Beclin 1 siRNA and FTY720 to hepatocellular carcinoma by calcium phosphate nanoparticles for enhanced anticancer efficacy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1265-1280.
- [16] 冯帆, 王莉莉. 利用高内涵分析技术快速识别环境雌激素物质对雌激素受体 α 的激动作用 [J]. *军事医学*, 2015, 39(1): 12-17.
- [17] 冯帆, 龙隆, 李微, 等. 应用高内涵分析技术识别雄激素受体激动剂 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(1): 42-51.
- [收稿日期]2020-12-02

综述:囊性纤维化在基础和临床研究中的进展

囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)是白种人常见的常染色体隐性遗传病,患者寿命普遍缩短,属于单基因病,且中国患病儿童的基因变异与白种人存在差异。来自首都医科大学北京儿童医院呼吸科的研究者从囊性纤维化的发病机制、囊性纤维化的临床特点、囊性纤维化的诊断和囊性纤维化的动物疾病模型进行总结,对目前囊性纤维化的基础与临床研究两方面的研究进展作一综述。

文中提到囊性纤维化是由位于 7 号染色体单个基因的突变导致的跨膜传导调节因子异常所致,可分为 5 种不同的类型,导致氯离子转运异常,且不同突变位点的临床表现不同, I - III 类突变可引起更严重的疾病。通过对新生儿基因的筛查,CF 突变基因也存在于非白种人群中,其中,中国 CF 患儿 CFTR 基因突变谱与欧美国家存在较大差异,最常见的 CFTR 基因突变是 c.2909G>A, c.1766+5G>T,且该突变位点未在白种人中发现。

关于 CF 发病后出现的临床特点,本文通过 5 个方面进行了介绍,分别为呼吸系统出现持续的排痰性咳嗽、肺野过度充气;鼻窦出现慢性鼻充血、头痛、慢性鼻后滴漏所致咳嗽,以及睡眠障碍;消化系统出现胰腺外分泌功能不全;生殖系统中出现精子转运缺陷导致的男性 CF 患者不育,但精子发生不受影响;此外,由于 CF 患者的骨矿物质含量降低,可出现营养及生长发育障碍,如骨折和脊柱侧后凸的发生率增加。此外,本文对 CF 的诊断标准、汗液试验的操作步骤及诊断面临的挑战均进行了介绍。

文中最后对介绍了 4 种 CF 模型,分别为小鼠 CF 模型、猪 CF 模型、雪貂 CF 模型和兔 CF 模型,将不同动物模型与人类囊性纤维化疾病进行对比,总结了不同模型的优缺点,介绍了 CF 动物模型制作的前景。

综上所述,本文首先对 CF 基因突变的临床和遗传特征进行总结,比较了中国人与白种人囊性纤维化在基因突变中存在的差异;同时,对囊性纤维化在基础研究与临床研究中的进展情况进行详细汇总,总结了目前用于模拟该病的动物模型及特点,以及临床表现及诊断、治疗和预后,对 CF 的研究进展进行了全面总结。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 4(3): 220-232; <https://doi.org/10.1002/ame2.12180>)。