

罗晓琴,丁冠茗,郑旭,等. 小鼠肝癌原位移植性肿瘤动物模型的改良 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 16-22.
Luo XQ, Ding GM, Zheng X, et al. Improved mouse model of orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 16-22.
doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 003

小鼠肝癌原位移植性肿瘤动物模型的改良

罗晓琴,丁冠茗,郑旭,金京燕,刘阳,张楠,王靖宇*,王爱国*

(大连医科大学实验动物中心,辽宁 大连 116044)

【摘要】 目的 探索建立一套高效、稳定的肝原位移植性肿瘤动物模型的技术方法。**方法** 采用 10 μ L 微量注射针将 5 μ L 含有 5×10^5 个 H22 细胞溶液沿肝叶长轴种植于小鼠肝左叶,在退出针头避免 H22 细胞向外溢漏的关键步骤上,分别采用了棉压和热封两种方法,接种后在第 19 天检测肝肿瘤的大小、重量及病理学变化,比较这两种方法在制备稳定、均一肝原位移植瘤中的效果差异。**结果** 两种方法的肝肿瘤形成率均为 100%。两组小鼠的肿瘤大小、重量及病理表现上虽无统计学差异,但与棉压组相比较,热封组肝移植瘤的大小均一,肿瘤重量的波动性小。特别是,在剖检时发现,棉压组出现了高比率的腹水(36.4%)和腹壁瘤(36.4%),而热封组没有出现上述现象,两组统计学差异显著($P<0.05$)。说明棉压组的肿瘤细胞从注射孔溢漏的情况显著增高,这也是棉压组肝移植瘤大小波动性较大的根本原因。另外,在棉压组还发现 1 只发生腹水的小鼠同时也出现肝内多个肿瘤结节,这可能是腹水瘤细胞通过脉管系统形成的肝转移现象。**结论** 本研究成功摸索出一套制备均一、稳定肝原位移植性肿瘤的技术方法和实施要点,具有时间短,易操作,模型稳定等特点,为相关的科研人员提供了良好的借鉴。

【关键词】 肝癌;H22;肝原位移植;热封

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0016-07

Improved mouse model of orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma

LUO Xiaoqin, DING Guanming, ZHENG Xu, JIN Jingyan, LIU Yang, ZHANG Nan, WANG Jingyu*, WANG Aiguo*
(Laboratory Animal Center of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

【Abstract】 Objective To establish a high-efficiency and stable mouse model of liver orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma. **Methods** A 5 μ L solution containing 5×10^5 H22 cells was injected into the left liver lobe using a 10 μ L micro-syringe. In the key step of sealing the pinholes on the liver surface, two method were used to prevent cell leakage: cotton-pressed and heat-sealed. The size, weight, and pathology of liver tumors were examined on the 19th day after inoculation in preparation for establishing a stable and uniform liver orthotopic transplantation model. **Results** The liver tumor formation rate of both method was 100%. Although there was no statistically significant difference in tumor size, weight, or pathological performance between the two groups, the size and weight of the transplanted liver tumors were more uniform and showed smaller fluctuation in the heat-sealed than cotton-pressed group. In particular, significantly high rates of ascites (36.4%) and abdominal tumors (36.4%) were found in the cotton-pressed group ($P < 0.05$). However, these abnormalities did not develop in the heat-sealed group. This finding indicates that the tumor cells more easily leaked from the pinholes in the cotton-pressed group, which may have been the main cause of the larger fluctuations in the size and

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30872950)。
[作者简介] 罗晓琴(1995-),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤分子生物学。E-mail: 18434371872@163.com
[通信作者] 王爱国(1970-),男,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子生物学。E-mail: wangaiquol@hotmail.com
王靖宇(1964-),男,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤分子生物学。E-mail: wangjingyus@163.com * 共同通信作者

weight of orthotopic transplanted liver tumors. In addition, one mouse with multiple abdominal tumors in the cotton-pressed group also exhibited tumor nodules, which may have been the result of metastasis from abdominal or ascitic tumor cells through the vasculature. **Conclusions** In the present study, we established a method for preparing a uniform and stable mouse model of liver orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma and described the key implementation points. The merits of short time, an easy operation, and stability provide a good reference for liver cancer research.

【Keywords】 liver cancer; H22; orthotopic liver transplantation; heat-sealing

在我国,原发性肝细胞癌是仅次于胃癌和肺癌的第三大恶性肿瘤,因其患病人数多、生存期短、病死率高,被称为“癌中之王”,是我国医疗卫生事业的重要攻关课题^[1]。建立体内肿瘤动物模型是研究肿瘤发生、发展、浸润、转移及肿瘤治疗的重要方法,在肿瘤的基础和临床前研究方面,以及加快抗肿瘤药物的研发和促进肿瘤的转化医学研究等方面都具有重要的意义^[2-3]。

肝的解剖位置和生理功能的特殊性决定了其不仅是人体最大的消化和代谢器官,也是重要的免疫器官。由于肝直接接收来源于消化道的大量复杂营养物质,因而肝不仅要对病毒、细菌等有害抗原及时启动免疫应答,同时还要免疫耐受绝大多数无害性抗原。肝特殊的免疫耐受状态被认为是肝癌发生发展的重要病因^[4]。因而,肝的特殊生理学特点决定了肝原位移植性动物模型是研究肝癌病理机制和探索治疗方案的重要体内模型。因此,建立肝原位移植性动物模型是肝癌的发病机制、侵袭、转移,以及治疗等研究的重要技术方法。

但在实际操作过程中,却常因肝肿瘤细胞易从肝组织中溢漏,发生腹壁瘤、腹腔积液等情况,致使因肝内接种的肝肿瘤细胞数量不一致和实验鼠体况差异增大,进而导致肝移植肿瘤大小不一、实验结果的误差波动范围大和不确实等现象,无论是在动物福利方面,还是在动物实验中人、财、物和时间的投入方面都是重要的损失^[5]。因此,摸索出一套稳定、高效、简便易行的技术方法,是建立肝原位移植性肿瘤动物模型的实际需要。本研究旨在建立一套高效、稳定的建立肝原位移植性肿瘤动物模型的技术方法,以兹同行参考和交流。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄鼠 24 只,12 周龄,体重(23±2)g,购买于大连医科大学重大疾病基因工程模式动物研究所[SCXK(辽)2018-0003]。小鼠饲养于

大连医科大学实验动物中心[SYXK(辽)2018-0007]。实验和饲养条件严格按照 SPF 级实验动物的规范要求。饲喂的鼠粮为 SPF 级小鼠 AIN-93M 标准饲料(脂肪占 4%;碳水化合物占 72.7%;蛋白质占 12.5%),饮用水为灭菌的纯净水。小鼠按照简单随机法分为两组,每组 12 只,分别为棉压组和热封组。本实验经过大连医科大学实验动物伦理委员会批准(AEE19065)。实验过程中严格遵守 3R 原则,且严格按照伦理要求控制移植肿瘤的长径小于 2 cm,体积小于 2 cm³。

1.1.2 实验细胞

小鼠肝癌细胞株 H22 由大连医科大学张宏颖教授赠予。

1.2 主要试剂与仪器

1640 培养基(Gibico);FBS(Gibico);1%青霉素和链霉素(碧云天公司);1.75%阿弗丁(2, 2, 2-Tribromoethanol, 75-80-9, Sigma 公司);4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司);低生长因子 Matrigel 基质胶(康宁公司)等。二氧化碳培养箱(MCO-20AIC);超净工作台(ESCO, AC2-6S1);倒置显微镜(NOVEL, 河南兄弟仪器设备有限公司);Vortex 振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

(1)一次性无菌医用棉棒(江西松鹤医疗器械有限公司);1 mL 和 10 mL 注射器(镇江康利医疗器械有限公司);10 μL 微量注射针(上海高鸽工贸有限公司);微创手术剪;微创镊子;止血钳;宠物剃毛器;体视显微镜;针型电烙铁(深圳市白光电子科技有限公司);缝合针;医用真丝编织线(缝合线,规格 4-0,黑色,产品标准号 YZB/沪 0645-65-2005,上海浦东金环医疗用品有限公司)。

(2)自制手术辅助工具:直径为 0.5 cm 的垫背小木棒;撑开胸腔的带线小金属细弯钩;长度为 1 cm 的固定小棒(图 1)。

1.3 实验方法

1.3.1 H22 细胞的准备

将 H22 细胞从液氮罐中取出,在 37℃ 水浴锅中

晃动将细胞解冻,把细胞悬液移入含有 7~8 mL 的 37℃ 完全培养液的 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入新的培养液,吹打混匀,移入培养瓶在 CO₂ 培养箱(37℃,5% CO₂)中培养,连续培养 3 代后,当细胞处于旺盛、稳定的生长状态,可用于肝原位移植性实验。调整细胞浓度:每毫升 1×10⁸ 个,和 Matrigel 基质胶按照 4:1 混合均匀,置于冰上等待后续注射实验,使用前 Vortex 振荡混匀。

1.3.2 肝原位移植性肿瘤动物模型的制备

(1)小鼠在手术前提前禁水粮 4 h,小鼠称重,按 0.25 mL/10 g 体重腹腔注射麻醉药阿弗丁,麻醉后使用宠物剃毛刀剃去腹部手术部位的毛,将小鼠固定于泡沫板制成的手术台上(图 2)。

(2)剃毛并依次使用碘伏和 75%乙醇对腹部备皮部位进行消毒,用眼科剪沿腹部正中线从剑突向下做一约 1.5~2.0 cm 的纵向切口,暴露剑突(图 2)。

(3)用带线小金属细弯钩将切口两侧皮层与肌层一同分别拉向切口两侧,固定拉钩。将一个直径为 2 cm 的小棒垫于小鼠背部肝上缘以便充分暴露肝,观察小鼠肝的解剖结构是否正常,手指轻压两侧肋弓以挤出部分肝左叶(图 2)。

(4)调整立体显微镜的焦距,使肝左叶清晰地暴露在显微视眼下,使用 Vortex 将细胞振荡混匀后,使用规格为 10 μL 的微量注射针缓慢吸取 5 μL 细胞液。微量注射针的针头与肝表面呈 20 度角进针,进针后使针头与桌面平行,平行推进约 1 cm(针尖的最终位置不宜太过靠近肝叶边缘薄处),缓慢注入 5 μL H22 细胞悬液,可观察到注射区域大部肝叶颜色迅速变浅(白斑)或出现浑浊的半透明空泡。

(5)注射后针体停留 1 min,再缓慢退出白斑或空泡区域,退出该区域后等待 2~4 min,退出全针。

为防止肿瘤细胞从针孔溢漏,我们依据采用的应对方法的不同,分为棉压组和热封组。棉压组小鼠在退针后迅速使用无菌棉签压迫进针口,直至无出血情况后移走棉签。热封组小鼠在退针后使用无菌棉签迅速压迫进针口的同时,使用针型电烙铁轻轻灼烧封闭针孔。

(6)用蘸取 75%乙醇的棉棒轻轻擦拭肝叶表面后,将肝左叶轻轻地移回腹腔。

(7)根据称量的小鼠体重值,向腹腔注射浓度为 8 μg/μL 的庆大霉素(5 mL/kg),使用 4-0 非吸收性缝合线依次缝合腹膜和皮肤。

(8)缝合完毕后,使用 75%乙醇擦拭缝合的切口及周围的皮肤,将小鼠放置于 35℃ 加热垫上待其复苏。完全复苏后,移入饲养盒内进行常规饲养。

1.3.3 术后观察及检测

(1)日常观察:小鼠术后的生活状态,进食、饮水、活跃健康状况,异常死亡情况等。

(2)样本取材:第 19 天处死小鼠,解剖取出肝称重拍照,分离肿瘤组织称重并拍照,同时使用游标卡尺测量每只小鼠肿瘤的长径(a)和短径(b),按公式:V=ab²/2 计算肿瘤体积。

(3)病理学检测:肿瘤组织标本用 4%多聚甲醛固定后做病理学检测,常规取材、脱水、石蜡包埋、制片(4 μm),HE 染色,光学显微镜下观察。

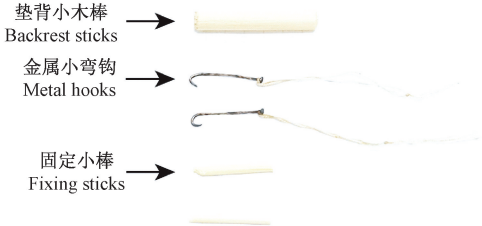


图 1 自制手术辅助工具

Figure 1 Self-made auxiliary tools for surgery

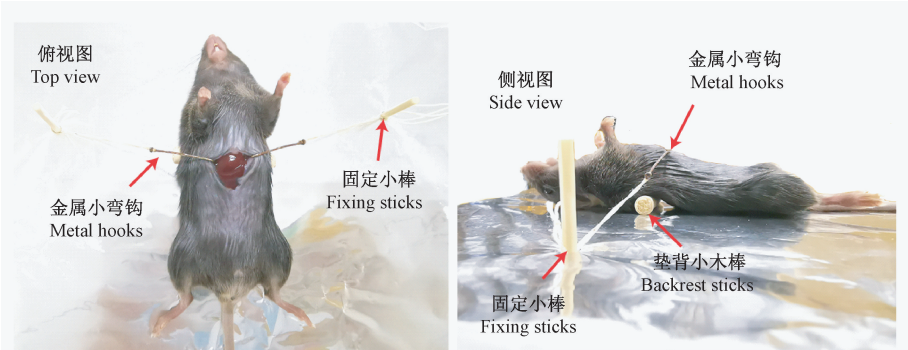


图 2 手术小鼠固定方法

Figure 2 Fixation method of surgical mice

1.4 统计学方法

肝重数据采用 t 检验进行统计学分析。两组比例差异应用卡方检验进行统计学分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型鼠的存活状态

在术中均未见死亡,并于术后 2~3 h 后苏醒。模型鼠术后存活状况良好,1 d 后活动正常,5 d 后手术刀口恢复。在 5~18 d 的饲养过程中,棉压组和热封组小鼠的存活率均为 91.7%,各有 1 只小鼠在后期的饲养过程中死亡,剖检时发现死亡小鼠的结肠内有大量内容物聚集,结肠肿胀,可能是由于麻醉时针刺损伤、麻醉药作用、术中机械牵拉刺激或肿瘤压迫等因素导致排便功能异常或麻痹性肠梗阻所致,食物残渣不能正常排出,导致代谢功能紊乱而最终死亡。

2.2 模型鼠肝肿瘤成瘤情况

接种后第 19 天对模型鼠进行剖检,观察肝移植瘤的成瘤情况。肝内肉眼可见明显的移植瘤,瘤形状相对规则,呈白色的椭圆或者长条形(图 3、图 4)。结果表明,移植瘤小鼠的成瘤率为 100%。

肿瘤测量结果显示,棉压组小鼠的肿瘤最大直径为 1.83 cm,平均体积为 $(0.27 \pm 0.16) \text{ cm}^3$,平均

重量为 $(0.19 \pm 0.07) \text{ g}$;热封组小鼠的肿瘤最大直径为 1.75 cm,平均体积为 $(0.34 \pm 0.09) \text{ cm}^3$,平均重量为 $(0.18 \pm 0.02) \text{ g}$ 。两组小鼠的肿瘤大小和肿瘤重量虽无统计学差异,但与棉压组相比较,热封组的肝移植瘤的大小均一,肿瘤重量的波动性小(图 4)。另外,在剖检时发现,棉压组出现了高比率的腹水(36.4%)和腹壁瘤(36.4%)(图 5),而热封组没有出现上述现象,两组统计学差异显著(表 1)。说明棉压组的肿瘤细胞从注射孔溢漏的情况显著增高,这也是棉压组肝移植瘤大小波动性较大的根本原因。另外,在棉压组还发现 1 只发生腹水的小鼠出现肝内多个肿瘤结节(图 6),这可能是腹水瘤细胞通过脉管系统形成的肝转移现象。

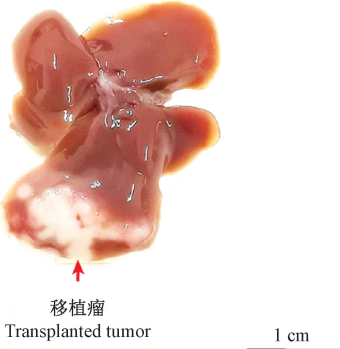
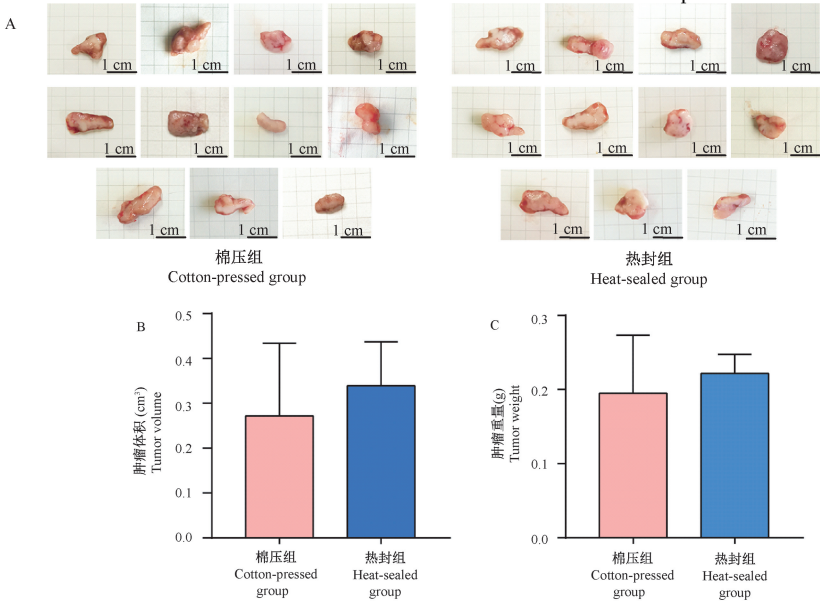


图 3 移植瘤实体表现

Figure 3 A representative physical photograph of transplanted liver tumor



注:A:移植瘤的实体照片;B:移植瘤体积的波动范围;C:移植瘤重量的波动范围。

图 4 移植瘤大小及重量的波动范围

Note. A, Physical photographs of transplanted tumors. B, Fluctuation range of transplanted tumor volume. C, Fluctuation range of transplanted tumor weight.

Figure 4 Fluctuation ranges of size and weight of the transplanted tumors

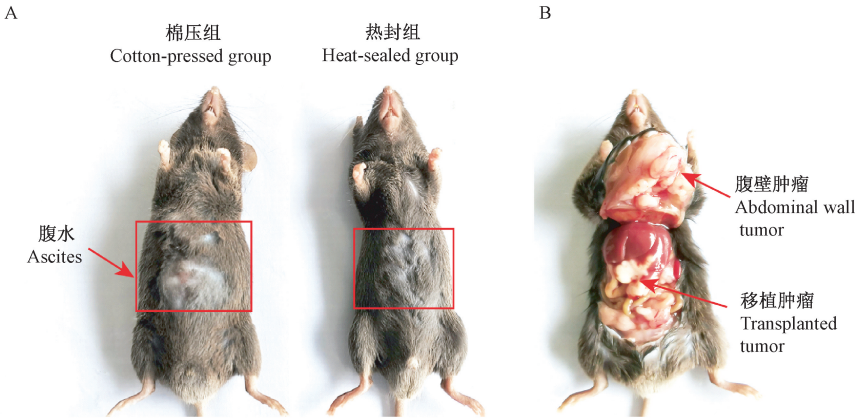
2.3 病理学检测

病理学检测结果表明(图 7),虽然棉压组与热封组在肿瘤大小的波动性上有明显的不同,但在病理学表型上没有显著差异。HE 染色光镜下观察,癌细胞排列紧密,表面不规则,异型性明显,分化程度差,核深染,呈现分叶及多核现象,游离核糖体增多,肿瘤边缘浸润肝组织。

3 讨论

动物模型应该尽可能地接近人类肿瘤的自然生物学过程。肿瘤模型主要包括自发性、移植性、化学性诱发性和转基因肿瘤模型,这些肿瘤动物模

型已经被广泛地应用于肿瘤发生和发展分子机制的研究中^[6-8]。因自发性和转基因肿瘤模型具有遗传性特征,局限于特定的遗传特质或人为遗传修饰的动物模型,应用范围有限。由于移植性和化学性诱发性肿瘤动物模型的建立具有易于获取实验动物和相对技术难度小等特点,是目前实验室普遍应用的肿瘤动物模型。虽然诱发性肿瘤动物模型与自然肿瘤发生过程相近,但具有实验周期长、个体差异大、致死性高、实验动物用量大等缺点^[9]。而移植性肿瘤动物模型因其具有实验周期短、个体差异小、致死性低、实验动物用量少等优点,已成为实验室最常用的肿瘤动物模型^[10]。



注:A:棉压组腹水;B:棉压组腹壁肿瘤。
图 5 棉压组出现的腹水和腹壁瘤
Note. A, Ascites in the cotton-pressed group. B, Abdominal wall tumor in the cotton-pressed group.

Figure 5 Ascites and abdominal tumor appeared in the cotton-pressed group

表 1 棉压组和热封组小鼠生存和肿瘤情况的比较

Table 1 Comparison of survival and tumor status of mice between cotton-pressed group and heat-sealed group

分组 Groups	存活率 Survival rate	腹水出现率 Ascites rate	腹壁瘤出现率 Abdominal wall tumor rate	肝内转移率 Intrahepatic metastasis rate
棉压组 Cotton-pressed group	11/12(91.7%)	4/11 (36.4%)	4/11 (36.4%)	1/11(9.1%)
热封组 Heat-sealed group	11/12(91.7%)	0/11 (0.00%)	0/11 (0.00%)	0/11 (0.00%)
P 值 P value	1.00	0.027	0.027	0.306

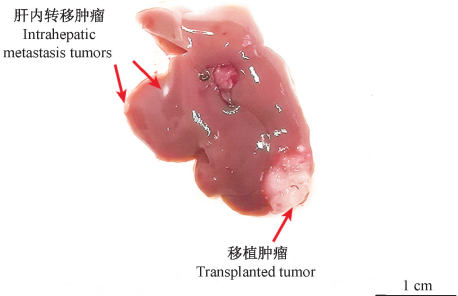


图 6 肿瘤细胞的肝内转移

Figure 6 Intrahepatic metastasis of tumor cells

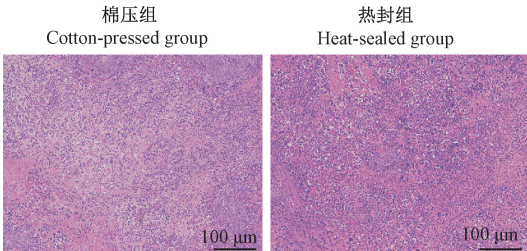


图 7 肝原位移植性肿瘤的病理学检测
Figure 7 Pathological examination of orthotopic liver transplanted tumors

移植性肿瘤动物模型主要分为皮下移植性和原位移植性两种^[11]。与原位肿瘤移植模型相比,虽然皮下肿瘤移植模型操作简单、技术难度小、成功率高、易于观测和局部干预,但存在因血液供应不足而发生后期的皮肤破溃和中心组织坏死;因被膜相对完整而局限于皮下,缺乏周围组织浸润及远处淋巴结转移,不能很好地模拟肿瘤浸润和转移的病理生理学过程等缺点^[12-13]。特别是忽略了肿瘤与周围正常组织的相互作用关系,在组织细胞的生物学环境、免疫环境、肿瘤形成、病理生理学变化等方面仍存在较大的差异,不能很好地模拟肿瘤的自然生物学过程,有一定的局限性^[14-16]。原位移植性肿瘤模型可有效克服皮下移植瘤的缺点,是目前肿瘤研究中较为理想的基础体内动物模型。

由于野生型小鼠具有完全的免疫能力,因而应用 H22 等鼠源性肝癌细胞制备野生型小鼠的肝原位移植性肝癌动物模型是实验室常用的研究方案^[17-18]。但 H22 肝癌细胞属于种植腹水型肝癌细胞,具有扩增速度快,容易扩散的特点。在制作肝原位移植性肿瘤动物模型过程中,除了因为无法很好地解决肝肿瘤细胞浓度、注射体积、压迫肝止血和防止肿瘤细胞溢漏等问题,从而导致肝原位移植瘤大小不均一的现象,还常出现腹水和腹壁瘤等附加异位接种等情况,极大地影响了最终实验结果的统计和判定^[19]。有些学者为了避免上述现象,采用先建立皮下移植肿瘤,然后取出皮下移植的肿瘤组织将其切成小块(2 mm × 2 mm × 1 mm 左右),再采取肝内隧道植入法移植到肝内。但这个操作方法难度大,容易造成动物肝大量出血并引起动物死亡,同时手术时间较长,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原位移植性肿瘤动物模型,影响荷瘤成功率^[20]。

为解决上述难点,本研究通过对实验方法和细节的不断摸索和多次改进,建立了一种简易、有效、稳定、可行性高的原位移植性肝癌的方法,总结经验要点如下:

(1) 保持高细胞活性。体外培养 H22 悬浮细胞可保证细胞的高纯度和高活性。

(2) 手术视野要宽阔。腹部切口适度(1.5~2 cm),同时用自制器材拉开腹皮,以便充分暴露肝,便于操作。

(3) 选择微量注射器。使用细的微量注射针将细胞缓缓注入小鼠肝,可减轻针头对肝的损伤,减少针口面积,提高实验成功率。

(4) 严格控制注射体积。为避免注入肝的细胞

混悬液因压力过大而发生溢漏,形成腹壁瘤或腹腔积液的现象,可使用 10 μL 微量注射针向肝注射 5 μL 细胞悬液,尽可能减少注射体积。

(5) 应用 Matrigel 基质胶。将细胞悬液和 Matrigel 基质胶混匀,可避免在原位接种细胞悬液的弥散,有效地形成实体瘤。

(6) 注意进针的角度和深度。C57BL/6J 小鼠肝较薄,进针角度过大极易穿透肝,从而引起腹腔种植,导致接种的失败。在实验过程中需将针尖与肝表面呈 20 度进针,针尖行程约为 1.0 cm,可有效保证所注射的细胞位于肝左外侧叶实质内。

(7) 选择合适大小的小鼠。在小鼠的选取上,尽量使用自然生长环境下的雄性 C57BL/6J 小鼠,出生在 12~15 周,体重在(23 ± 2)g 为宜,避免肝叶太小影响细胞注射过程增大手术难度,也可避免性激素可能对肝移植瘤生长的影响。

(8) 清除残余肿瘤细胞。使用针型电烙铁灼烧针孔后,要用酒精棉球轻擦针孔周围及肝表面,防止少量遗漏的肿瘤细胞异位种植于腹壁或腹腔内。

(9) 术前禁水禁粮。在进行手术前 4 h 对小鼠禁水禁粮,避免麻醉时的不良反应。

(10) 谨慎柔和操作。在手术操作的过程中要轻柔、谨慎,避免损伤其他脏器。

(11) 缝合打结后线头要留 0.3 cm 左右。小鼠腹皮缝合时,缝合打结后,线头要留的长一些,避免小鼠苏醒后在活动或啃咬中解开,导致胃肠和肝暴露而死亡。

本研究探索出制备均一、稳定肝原位移植性肿瘤动物模型的技术方法并总结其实施要点,具有时间短,易操作,模型稳定性高等特点,以兹与肝癌研究的同仁进行交流和相互借鉴。

参考文献:

- [1] Omata M, Cheng AL, Kokudo N, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(4): 317-370.
- [2] Shang F, Liu M, Li B, et al. The anti-angiogenic effect of dexamethasone in a murine hepatocellular carcinoma model by augmentation of gluconeogenesis pathway in malignant cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(5): 1087-1096.
- [3] 臧文华, 黄显章, 卞华, 等. 黄芪、莪术联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤内微血管的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(12): 2858-2861, 3093.
- [4] Obeid JM, Kunk PR, Zaydfudim VM, et al. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma patients: is it ready for prime time? [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(2): 161-174.

[5] 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, 2015, 38(6): 48-49.

[6] Zhang N, Zhu H, Dong YH, et al. Establishment of an insufficient radiofrequency ablation orthotopic nude mouse model of hepatocellular carcinoma to study the invasiveness and metastatic potential of residual cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 18 (3): 2548-2553.

[7] 韦武, 郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 119-123.

[8] Ellerkamp V, Armeanu-Ebinger S, Wenz J, et al. Successful establishment of an orthotopic hepatoblastoma in vivo model in NOD/LtSz-scid IL₂R γ null mice [J]. PLoS One, 2011, 6 (8): e23419.

[9] 仲鑫汝, 许龙, 田睿, 等. 二乙基亚硝胺联合四氯化碳诱发 C57BL/6 小鼠肝癌模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (1): 12-16.

[10] Akimoto J, Nakayama M, Takagi S, et al. Efficient intrahepatic tumor generation by cell sheet transplantation to fabricate orthotopic hepatocarcinoma-bearing model mice for drug testing [J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(5): 1071-1079.

[11] 田树红, 王日超, 邢桂兰, 等. 裸小鼠肝癌原位移植模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 239-242, 247.

[12] 叶翩, 张淑玲, 歇盛华, 等. 人肝癌裸鼠移植模型的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(36): 3500-3503.

[13] 韩琛, 王恒孝, 王朝霞. 原位移植法建立肝脏 H22 肝癌细胞移植瘤小鼠模型 [J]. 世界肿瘤研究, 2015, 5(1): 15-20.

[14] Tang W, He Y, Zhou S, et al. A novel bifidobacterium infantis-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28(1): 155.

[15] Taghian A, Huang P. The nude and SCID mice as a tumor model in experimental cancer biology [J]. Cancer J, 1995, 8: 52-58.

[16] 罗明华. 人癌裸鼠原位移植瘤模型的研究及应用进展 [J]. 广东医学院学报, 1997, 15(4): 345-349.

[17] Zhu M. Inhibitory effects of bortezomib in a subcutaneous tumor model of H22 mouse hepatocarcinoma cells [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(6): 152388.

[18] Yuan P, Li J, Aipire A, et al. Cistanche tubulosa phenylethanoid glycosides induce apoptosis in H22 hepatocellular carcinoma cells through both extrinsic and intrinsic signaling pathways [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18 (1): 275.

[19] 陈雄, 侯师, 郑申, 等. 不同剂量 H22 肝癌细胞株对 C57BL/6J 小鼠原位肝癌造模的影响研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2016, 39(4): 8-13.

[20] 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.

[收稿日期] 2020-08-18

SARS-CoV-2 感染加重患有心血管疾病和糖尿病的小鼠疾病表型

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 疫情肆虐全球, 已对全球人类健康造成严重威胁。患有基础性疾病的病人在感染新冠后表现出更强的致病性和更高的致死率, 但具体原因并不清楚。

中国医学科学院医学实验动物研究所基因工程技术课题组、病理课题组和感染性疾病课题组的研究人员, 通过构建携带人源 ACE2 的腺病毒, 结合已有的心肌病小鼠模型和糖尿病小鼠模型, 快速建立新冠病毒感染的共病小鼠模型, 研究已有基础性疾病对新冠病毒感染的影响和机制。

研究使用了阿霉素诱导的心肌病小鼠模型、CTnTR141w 心肌病转基因小鼠模型和 ob/ob 糖尿病小鼠模型, 在利用携带人源 ACE2 的腺病毒感染小鼠肺部 5 天后, 感染 SARS-CoV-2, 观察小鼠的体重变化、病毒载量, 肺组织病理等。结果发现, 相对于对照小鼠, 具有基础性疾病的小鼠在感染 SARS-CoV-2 后, 表现出更严重的肺炎和肺组织病理学改变。

在心肌病共病小鼠模型中, 心肌损伤相关标志物表达显著上调, 心肌组织表现出更严重的组织学损伤表型, 包括心肌纤维化程度、心肌纤维以及神经纤维断裂等。并 40% 的感染心肌病共病小鼠心肌组织中可检测到新冠病毒存在。对 SARS-CoV-2 感染引起的病理改变的信号机制分析, 检测到 ROS 累积以及线粒体介导的凋亡信号的激活可能诱发了心肌损伤的加剧。

在糖尿病小鼠模型中, 检测到感染 SARS-CoV-2 后, 空腹血糖升高, 胰岛素应答受损, 并且共病小鼠表现出骨质疏松表型, 通过信号机制分析, 这可能是 PI3K/AKT/mTOR 信号途径受损所致。

综上, 该研究建立了三种心肌病、糖尿病感染 SARS-CoV-2 的共病小鼠模型, 为基础性疾病感染 SARS-CoV-2 后的病理进程和机制研究提供了动物模型。该工作受到了国家自然科学基金、传染病重大专项、医科院创新工程以及北京市自然基金项目的支持。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Model & Experimental Medicine*, 2021, 4: 2-15)。