

潘蕊,喻崑,张海亮,等. 不同方法建立小鼠肝癌原位移植瘤模型差异性的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 329-336.

PAN R, YU K, ZHANG H L, et al. Different transplantation models of hepatocellular carcinoma in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 329-336.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.006

不同方法建立小鼠肝癌原位移植瘤模型 差异性的探讨

潘蕊^{1,3,4}, 喻崑¹, 张海亮^{1,4}, 郑永仁⁵, 赵笑雨¹, 唐钧泽¹, 吴健铭¹, 程欣^{1,2,4*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 昆明 650500; 3. 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 昆明 650500; 4. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 昆明 650500; 5. 云南中医药大学科学技术处, 昆明 650500)

【摘要】 目的 比较肿瘤细胞注射和肿瘤组织块移植方法建立小鼠肝癌原位模型的差异, 为小鼠肝癌原位模型的建立提供技术参考。方法 取健康雄性 KM 小鼠, 随机分为 4 组: A 组注射小鼠肝癌 H22 细胞; B 组注射腹水型肝癌 H22 细胞; C 组采用小鼠肝癌组织块移植法; D 组肝部注射生理盐水作为假手术组。定期观察各组小鼠活动情况、体重变化。记录 4 组小鼠的生存时间。观察各组小鼠肝部成瘤状况、肿瘤程度、与腹腔脏器粘连程度和转移情况, 并进行 B 超成像, 检测血清中甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)、异常凝血酶原 (des-gamma-carboxyprothrombin, DCP) 的浓度及苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理学变化。结果 A 组、B 组、C 组小鼠造模操作时间分别为 (3.36 ± 0.44) min、(3.30 ± 0.41) min、(5.68 ± 0.65) min。建模第 25 天, A 组、B 组、C 组小鼠成瘤率均 100.0%, A 组腹腔重度粘连率为 40.0%, B 组腹腔重度粘连率为 60.0%, C 组与 D 组均未出现重度腹腔粘连。A 组、B 组、C 组小鼠腹水出现率分别为 40.0%、100.0%、0.0%; 腹壁瘤出现率分别为 30.0%、60.0%、0.0%。B 组小鼠还存在肝转移情况 (40.0%)。B 超成像、血清 AFP 和 DCP 水平检测、组织病理学检查结果显示, 与 D 组小鼠相比, A 组、B 组、C 组小鼠肝边缘均不光滑, 回声欠均匀, 可见稍低回声包块; 保持 AFP、DCP 高分泌; 存在大量炎症细胞与肿瘤细胞。结论 在第 25 天时, 3 种方法均可以建立肝癌原位移植模型, 其中, 相较于肝癌组织块移植, 肿瘤细胞注射具有操作简单、肝内存在多个转移结节的特点。而肝癌组织块移植相较于肿瘤细胞注射, 则具有对腹腔等脏器影响较小等特点。

【关键词】 肝癌; 原位移植; 动物模型; B 超成像

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0329-08

Different transplantation models of hepatocellular carcinoma in mice

PAN Rui^{1,3,4}, YU Kun¹, ZHANG Hailiang^{1,4}, ZHENG Yongren⁵, ZHAO Xiaoyu¹,
TANG Junze¹, WU Jianming¹, CHENG Xin^{1,2,4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. the Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province, Kunming 650500, China; 3. College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Kunming 650500, China; 4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China; 5. Science and Technology Office, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: CHENG Xin. E-mail: chengxin920@126.com

【基金项目】 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目 (202001AZ070001-008), 云南省科技厅生物医药重大科技专项 (202002AA100007), 云南省科技人才平台计划 (202105AG070012), 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210ZD2207, 202210SS2205, 202210SS2206), 国家中医药管理局“十二五”重点学科-傣药学。

Funded by Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Yunnan University of Chinese Medicine Applied Basic Research Joint Project (202001AZ070001-008), Major Scientific and Technological Projects for Biomedical Industry of Yunnan Provincial Science and Technology Department (202002AA100007), Yunnan Province Science and Technology Talent Platform Plan (202105AG070012), Yunnan Province Key Laboratory of Dai Medicine and Yi Medicine Open Project (202210ZD2207, 202210SS2205, 202210SS2206), Key Discipline of Twelfth Five-Year Plan of State Administration of Traditional Chinese Medicine-Dai Pharmacy.

【作者简介】 潘蕊, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型。Email: panrui428@163.com

【通信作者】 程欣, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 纳米医药、药理等。Email: chengxin920@126.com

[Abstract] Objective To explore the otherness of orthotopic injection of cell suspensions and transplantation of tumor tissue blocks to establish orthotopic implantation models of hepatocellular carcinoma in mice, and to provide a technical reference for the establishment of an orthotopic implantation model. **Methods** Healthy KM mice were divided into four groups: group A, direct injection of H22 cells; group B, direct injection of H22 ascitic cells; group C, transplantation of tissues; and group D, direct injection of saline. Activity and weight changes were observed regularly in each group and survival times were recorded. Liver tumor formation, tumor size, abdominal organ adhesion degree, and metastasis were observed in all groups. B-ultrasound imaging was performed, concentrations of alpha fetoprotein (AFP) and abnormal prothrombin (DCP) were detected, and liver histopathological changes were detected by hematoxylin and eosin staining. **Results** Mice molding operation time in groups A, B, and C were (3.36 ± 0.44) min, (3.30 ± 0.41) min, and (5.68 ± 0.65) min, respectively. After modeling for 25 days, the rates of model formation in groups A, B, and C were all 100.0%. Severe abdominal adhesions occurred in 40.0% of mice in group A and 60.0% in group B, but in no mice in group C or D. Ascites occurred in 40.0%, 100.0%, and 0.0% and abdominal wall tumors in 30.0%, 60.0%, and 0.0% of mice in groups A, B, and C, respectively, while 40.0% of mice in group B also had liver metastasis. B-ultrasound imaging, detection of serum AFP and DCP levels, and histopathological result showed smooth liver margins, uneven echo and slightly lower echo mass, maintained high AFP and DCP secretion, and large numbers of inflammatory cells and tumor cells in mice in groups A, B, and C. **Conclusions** At day 25, all three methods can thus be used to establish orthotopic transplantation models of HCC. Among these, injection of cell suspensions demonstrated the advantage of simplicity in operation and the presence of multiple metastatic nodules within the liver, compared to transplantation of tumor tissue. Conversely, transplantation of tumor tissue showed the advantage of causing less impact on the abdomen and other organs when compared to injection of cell suspensions.

[Keywords] liver cancer; orthotopic transplantation; animal model; B-ultrasound imaging

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 是发生在消化系统中肝部的一种恶性肿瘤,也是我国最常见的恶性肿瘤之一,依据美国癌症协会数据显示,全球 PLC 年新发和死亡病例分别位居恶性肿瘤的第 6 位和第 3 位^[1]。2020 年肝癌在我国癌症新发病类型中排第 5,死亡病例中位列第 2。肝癌作为恶性肿瘤,致死率较高,已成为严重威胁我国人群健康的主要公共卫生问题之一^[2]。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是 PLC 中最为常见的类型,约占 75% ~ 85%,HCC 常起源于肝硬化,其与慢性肝病密切相关^[3]。其次胆管细胞癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是第二常见的原发性肝恶性肿瘤,起源于胆管上皮^[4]。肝癌动物模型一直是肝癌临床与基础研究工作的重要工具,目前有 2 种常用的模型,即皮下移植模型和原位移植模型。皮下移植模型,是将肝癌细胞悬液或组织接种到动物的腋下或背部皮下,具有操作简便、操作过程中不易导致动物死亡、易于观测肿瘤生长变化、很少发生局部浸润与远处转移,在肝癌皮下移植小鼠模型中,无法检测到腹水生成、肝转移等,不能完全模拟肝癌的自然生长环境与生物学特征,导致药物治疗效果出现假阳性^[5-6];原位移植模型,是采用手术

法直视下对肝进行接种,其能更准确地模拟人类肝癌的自然发展过程,因而常用于实验研究^[7]。本研究进行 3 种小鼠原位肝癌模型建立 (注射肝癌 H22 细胞悬液、注射肝癌 H22 腹水细胞、移植小鼠肝癌组织块),同时对小鼠的术后状态、肝部成瘤情况、肿瘤大小、腹腔脏器粘连程度及转移情况、B 超成像、血清生化、HE 染色观察肝组织等进行了研究分析,旨在比较肿瘤细胞注射和肿瘤组织块移植方法建立小鼠肝癌原位模型的差异,为研究肝癌的生长、侵袭、转移和药物治疗提供有用的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 80 只,4 周龄,体重 18 ~ 22 g,由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供【SCXK (京) 2019-0010】。饲养于云南中医药大学实验动物中心【SYXK (滇) K2022-0004】。实验和饲养条件严格按照 SPF 级实验动物的规范要求,实验期间小鼠自由饮水、摄食。室温 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%,12 h 光照与 12 h 黑暗交替的养

殖环境。本研究所涉及的所有动物实验,均经过云南中医药大学实验动物伦理委员会的审批(R-062022082)。

1.1.2 细胞

小鼠肝癌 H22 细胞株、腹水型肝癌 H22 细胞株均由云南中医药大学药剂实验室提供。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(上海达特希尔生物科技有限公司,2227147);青霉素-链霉素(双抗)(上海达特希尔生物科技有限公司,2233204);PBS 磷酸缓冲液(上海达特希尔生物科技有限公司,2237244);甲胎蛋白(AFP)ELISA 科研试剂盒(翰科生物科技有限公司,202305);小鼠脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)ELISA 科研试剂盒(翰科生物科技有限公司,202305)。PN 5190-1509 型 100 μ L 微量注射器(Agilent);医用缝合线(扬州市金环医疗器械厂);医用缝合针(上海小昱医疗器械有限公司);柳叶型烙铁(SIENIU);4750E 二氧化碳培养箱(美国 NUAIRE 公司);Vetus 7 型彩色多普勒超声诊断仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原位肝癌模型的建立

(1)注射肝癌 H22 细胞悬液法:该方法定义为 A 组,随机取 20 只小鼠。调整 H22 细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,制备成单细胞悬液。用异氟烷麻醉后,在小鼠腹部用脱毛膏脱毛,并对腹部进行消毒,将四肢固定在无菌手术台后,再次对腹部进行消毒,切开正中肌层、暴露肝部,将肝外翻。微量注射器取 H22 细胞悬液 100 μ L,于肝左叶接种 H22 细胞,驻针约 5 s,缓慢拔出针头,用电烙铁止血后,再用酒精棉签擦拭肝,依次缝合小鼠皮下层、皮层,解绑小鼠,观察至其恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(2)注射腹水型肝癌 H22 细胞法:该方法定义为 B 组,随机取 20 只小鼠。取腹水型肝癌 H22 细胞调整密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法进行接种,观察小鼠恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(3)小鼠肝癌组织块移植法:该方法定义为 C 组,随机取 20 只小鼠。小鼠皮下瘤的建立,取腹水型肝癌 H22 细胞调整密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 200 μ L 该腹水细胞接种至小鼠右前肢背部。接种后第 7 天,在小鼠接种部位可摸到质硬的肿瘤小块,无菌条件下将其切成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,并放入生理

盐水中备用。采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法暴露肝,并用眼科镊刺一隧道,植入肿瘤块,依次缝合小鼠皮下层、皮层,解绑小鼠,观察至其恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(4)假手术组:该组定义为 D 组,随机取 20 只小鼠,采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法进行手术操作,但不进行注射细胞,仅注射生理盐水 100 μ L。

1.2.2 小鼠原位肝癌模型的筛选

(1)术后小鼠一般情况:在建模后,每 2 d 观察小鼠的饮水、进食、精神行为状态,并称重。

(2)成瘤观察:接受原位移植瘤手术后第 25 天,随机处死各组 10 只小鼠,观察成瘤情况,统计各组小鼠的成瘤率。

(3)生存期考察:A 组、B 组、C 组、D 组各剩余 10 只小鼠留作生存期考察,使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制生存曲线图。小鼠存活率(%)=(此组小鼠存活只数/此组小鼠总数) $\times 100\%$ 。

(4)腹腔脏器粘连程度的分级判定:在参考文献^[8]的基础上改进,设立等级分级法。0 级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间无粘连;Ⅰ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有轻微粘连;Ⅱ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有粘连,可分离且出血少;Ⅲ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有较多粘连,不易分离且出血较多;Ⅳ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间紧密粘连,强行分离可致内脏器官撕裂。0 ~ Ⅱ级为轻度粘连;Ⅲ ~ Ⅳ级为重度粘连。

(5)肿瘤转移情况判断:观察是否产生腹水,检查腹腔、脾、肾、胃、肠、肺等脏器是否有肉眼可见肿瘤转移。

(6)超声检查:各组在接受原位移植瘤手术后第 25 天进行超声检查,采用 Vetus 7 型彩色多普勒超声诊断仪,使用频率为 FH 9.0 的 L 12-4 s 探头,进行超声成像。

(7)血清 AFP、DCP 水平检测:采用酶联免疫法分析测定术后第 25 天各组小鼠 AFP、DCP 水平。

(8)病理形态观察:切除各组小鼠肝部肿瘤组织,多聚甲醛固定,用石蜡进行包埋,制片,HE 染色,最终通过光学显微镜观察各组小鼠肝组织情况。

1.3 统计学分析

整理数据,使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方

差分析,计算结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肝癌原位移植模型建立

在采用 A 组、B 组、C 组 3 种方法制备肝癌原位移植模型时,对 3 种方法所需的手术时间、死亡动物数进行了比较,提前准备好细胞或肿瘤块、固定好小鼠后开始计时,至缝合结束,为整个手术时间。A 组制备方法和 B 组制备方法完成 1 只小鼠的手术时间为 2 ~ 3 min, C 组制备方法则需要 5 ~ 6 min,在时间上 A 组、B 组制备方法比 C 组缩短了 1 倍。主要原因是 A 组、B 组制备方法只需在暴露的肝部缓慢注射细胞即可,不会造成肝部大量出血。而 C 组制备方法需要在肝部划开较深隧道,在整个操作过程中易导致肝部大量出血,止血时间较长,导致操作难度提高。在整个手术过程中, C 组制备方法由于失血过多,导致 1 只小鼠死亡,且肿瘤易脱落到腹腔,手术时间为 (5.68 ± 0.65) min, A 组和 B 组制备方法动物均存活,手术时间分别为 (3.36 ± 0.44) min、 (3.30 ± 0.41) min,与 C 组制备方法比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 小鼠体重变化

术中 C 组 1 只小鼠失血过多导致死亡。术后 A、B、C、D 组小鼠均全部存活,小鼠状态良好,术后伤口愈合良好且未出现伤口感染等情况。每 2 d 对小鼠进行称重并记录,如图 1 所示, A 组小鼠前 13 d 体重变化平稳,第 13 ~ 25 天体重大幅度增加;在种

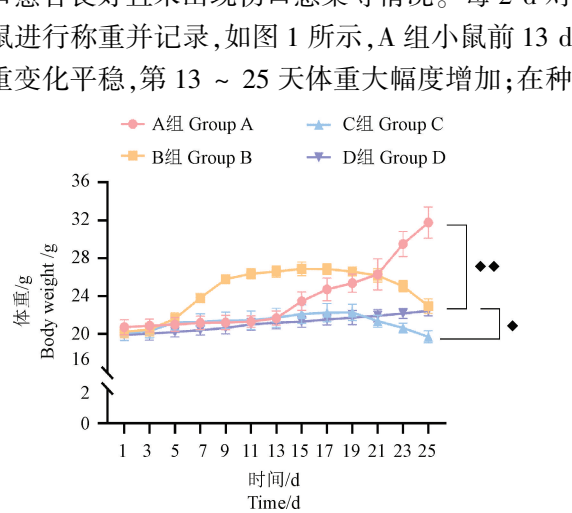
瘤第 25 天,小鼠体重达到最高,为 (31.8 ± 1.6) g,推测腹水的生成增加了小鼠体重。B 组小鼠在肿瘤第 17 天,小鼠体重达到最高,为 (26.9 ± 0.6) g,随后小鼠体重下降。C 组小鼠 20 d 内体重幅度小,增长较慢,第 21 天起体重呈下降趋势。推测 B 组、C 组小鼠后期体重下降原因:小鼠一般情况发生恶化,导致进食量减少,体重下降。D 组小鼠 25 d 内体重平稳增加。第 25 天时, A 组、C 组与 D 组小鼠体重相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), B 组与 D 组小鼠体重相比,无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 小鼠活动状态

建模后各组小鼠未受到明显影响,进食、活动如常。A 组小鼠在造模第 20 天毛发毛躁、无光泽、精神状态较萎靡、腹部肿大明显、活动减少; B 组小鼠第 12 天腹部肿大明显,第 18 天起进食量减少,随着时间推移,腹部肿胀程度增加,行动变得更加迟缓,更喜欢静止在饲养箱中某个角落,生命垂危; C 组小鼠较 A 组、B 组活跃,毛发也较有光泽,腹部未观察到肿胀; D 组小鼠最活跃,进食、饮水正常。

2.4 小鼠生存时间

如图 2 所示, D 组小鼠一直存活; A 组小鼠最长活到 37 d, 平均生存时间 (32.47 ± 3.79) d; B 组小鼠最长活到 30 d, 平均生存时间 (27.40 ± 1.89) d; C 组小鼠最长活到 38 d, 平均生存时间 (35.20 ± 2.73) d。但 A 组、B 组、C 组 3 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。



注:与 D 组相比, ◆ $P < 0.05$, ♦♦ $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Figure 1 各组小鼠体重变化图
Note. Compared with group D, ◆ $P < 0.05$, ♦♦ $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Body weight change of mice in each group

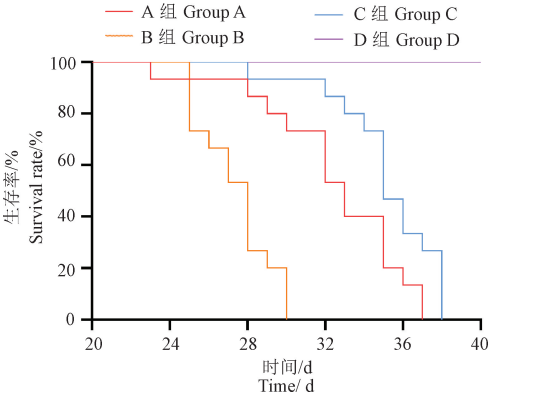


Figure 2 各组小鼠生存曲线
Figure 2 Survival rate of mice in each group

2.5 小鼠腹腔脏器粘连程度

各组小鼠腹腔粘连程度统计见表 1。A 组、B 组、C 组小鼠腹腔轻度粘连率分别为 60.0%、40.0%、100.0%;腹腔重度粘连率分别为 40.0%、60.0%、0.0%。D 组未出现轻、重度腹腔粘连。

表 1 各组小鼠腹腔粘连等级比较($n = 10, \%$)

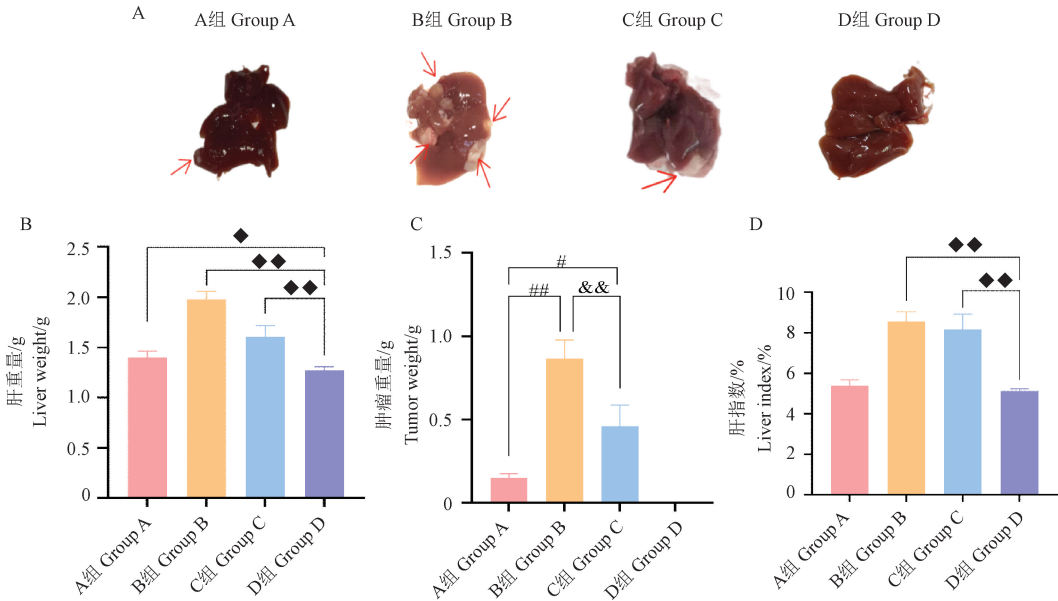
Table 1 Comparison of abdominal adhesion grade among the four groups($n = 10, \%$)

分组 Groups	0 级 Grade 0	I 级 Grade I	II 级 Grade II	III 级 Grade III	IV 级 Grade IV
A 组 Group A	0 (0.0%)	0 (0.0%)	6 (60.0%)	3 (30.0%)	1 (10.0%)
B 组 Group B	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (40.0%)	4 (40.0%)	2 (20.0%)
C 组 Group C	0 (0.0%)	3 (30.0%)	7 (70.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
D 组 Group D	10 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

2.6 小鼠肝样本肉眼观察及肝部肿瘤成瘤情况

接种后第 25 天对各组小鼠进行解剖,观察肝移植瘤的成瘤情况。A 组、B 组、C 组小鼠成瘤率均 100.0%。如图 3A 所示,4 组肝部外观有较大差异。A 组肝部表面较光滑,瘤块呈白色且分布较分散、不规则;B 组瘤体呈白色且巨大,并且其他肝叶也出现大片分散瘤体;C 组瘤形状相对规则,呈白色的椭圆;D 组肝表明光滑,质软,肝表面无疑似瘤块。如图 3B ~ 3D 所示,A 组小鼠的肝部平均重量为 (1.3985 ± 0.0652) g、肿瘤平均重量为 (0.1505 ± 0.0241) g、肝指数为 $5.3751\% \pm 0.2998\%$;B 组小鼠的肝部平均重量为 (1.9601 ± 0.0950) g、肿瘤平均重量为 (0.8652 ± 0.0112) g、肝指数为 $8.5530\% \pm$

0.4860% ;C 组小鼠的肝部平均重量为 (1.6045 ± 0.1123) g、肿瘤平均重量为 (0.4591 ± 0.1276) g、肝指数为 $8.1617\% \pm 0.7594\%$;D 组小鼠的肝部平均重量为 (1.2722 ± 0.0365) g、肝指数为 $5.1181\% \pm 0.1125\%$ 。A 组、B 组、C 组与 D 组小鼠肝重量相比具有显著性差异 ($P < 0.05$);A 组、B 组、C 组间肿瘤重量具有显著性差异 ($P < 0.05$);B 组、C 组与 D 组小鼠肝指数相比,具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。如表 2,在剖检时发现,A 组小鼠出现腹水 (40.0%) 和腹壁瘤 (30.0%);B 组小鼠出现腹水 (100.0%) 和腹壁瘤 (60.0%);C 组小鼠未出现上述现象。A 组、B 组可能存在肿瘤细胞从注射孔溢漏的情况,因此用电烙铁进行止血,尽量避免早期腹水的形成及腹



注:A:各组小鼠肝原位瘤;红色箭头:肿瘤结节;B:各组小鼠肝重量;C:各组小鼠肿瘤重量;D:各组小鼠肝指数;与A组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与B组相比, && $P < 0.01$ 。

图 3 不同造模方法成瘤情况

Note. A. Liver orthotopic tumor in each group. Red arrows. Cancer nodules. B. Liver weight of mice in each group. C. Tumor weight of mice in each group. D. Liver index of mice in each group. Compared with group A, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with group B, && $P < 0.01$.

Figure 3 Tumor formation by different molding methods

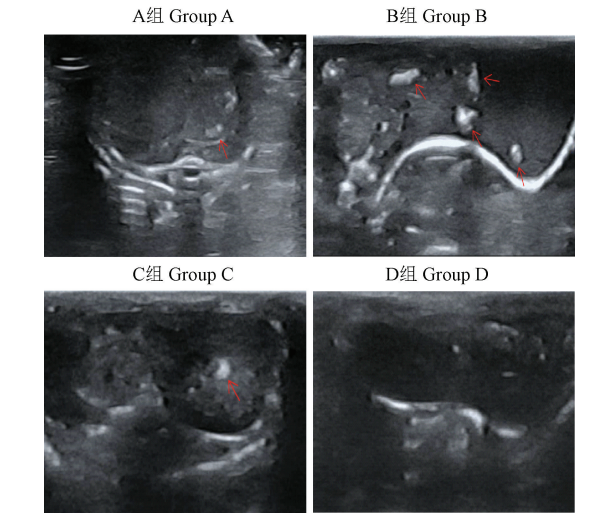
壁瘤的生成。A 组、B 组小鼠还发现肝内多个肿瘤结节,此外 B 组还发现腹水瘤细胞从肝转移至胃、肠情况,可能是肿瘤细胞通过脉管系统形成的肝转移现象^[9]。

表 2 各组小鼠肿瘤情况比较($n = 10, \%$)

Table 2 Comparison of tumor status of mice in each group($n = 10, \%$)			
分组 Groups	腹水出现率 Occurrence rate of ascites	腹壁瘤出现率 Incidence of abdominal wall tumor	肝转移率 Liver metastasis rate
A 组 Group A	4(40.0%)	3(30.0%)	0(0.0%)
B 组 Group B	10(100.0%)	6(60.0%)	4(40.0%)
C 组 Group C	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)

2.7 小鼠肝 B 超成像

如图 4 所示,D 组小鼠肝表面光滑,包膜较完整,形态大小正常,回声较均匀;A 组、B 组、C 组小鼠肝边缘均不光滑,内部回声欠均匀,于肝内探及稍低回声包块。对 A 组、B 组、C 组小鼠进行解剖,均发现小鼠肝部可见肿瘤结节,多呈结节状突起,色泽苍白。结合 B 超成像结果以及大体解剖观察,确认造模成功,3 种造模方式均可成功移植。



注:红色箭头:疑似肿瘤结节。

图 4 各组小鼠 B 超成像图

Note. Red arrows. Suspected cancer nodules.

Figure 4 Ultrasound imaging of mice in each group

2.8 小鼠血清 AFP、DCP 浓度的比较

如表 3 所示,血清 AFP、DCP 水平在肝癌模型小鼠中呈高表达。A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 AFP、DCP 浓度与 D 组小鼠相比显著升高($P < 0.01$)。

A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 AFP 浓度分别是 D 组小鼠的 13.97、18.60、14.41 倍;A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 DCP 浓度分别是 D 组小鼠的 5.79、8.38、6.06 倍。A 组、C 组两组小鼠血清中 AFP、DCP 浓度比较无显著性差异($P > 0.05$)。B 组小鼠血清中 AFP、DCP 浓度高于 A 组、C 组,且具有显著性差异($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠血清 AFP、DCP 水平($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Comparison of tumor status of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)		
组别 Groups	AFP/($\mu\text{g/L}$)	DCP/(ng/mL)
A 组 Group A	136.566 $\pm$ 13.726 ^{&&◆◆}	83.061 $\pm$ 15.000 ^{&&◆◆}
B 组 Group B	181.842 $\pm$ 16.575 ^{◆◆}	120.168 $\pm$ 24.460 ^{◆◆}
C 组 Group C	140.836 $\pm$ 3.595 ^{&&◆◆}	86.824 $\pm$ 15.630 ^{&&◆◆}
D 组 Group D	9.774 $\pm$ 1.767	14.338 $\pm$ 3.632

2.9 小鼠肝组织病理形态

如图 5 所示,D 组小鼠肝组织内肝叶结构正常,肝细胞核完整,肝细胞排列整齐,细胞着色正常,无肿瘤样或炎症细胞浸润现象。A 组、B 组、C 组 3 组小鼠肝组织分界不清晰,肿瘤细胞形态各异如:多边形、类圆形或其他形态、大小不同、排列不规则。大的肿瘤灶内部分区域可见片状坏死组织。综合病理切片结果与前述大体解剖观察和 B 超成像结果,提示 3 种造模方式均可成功。

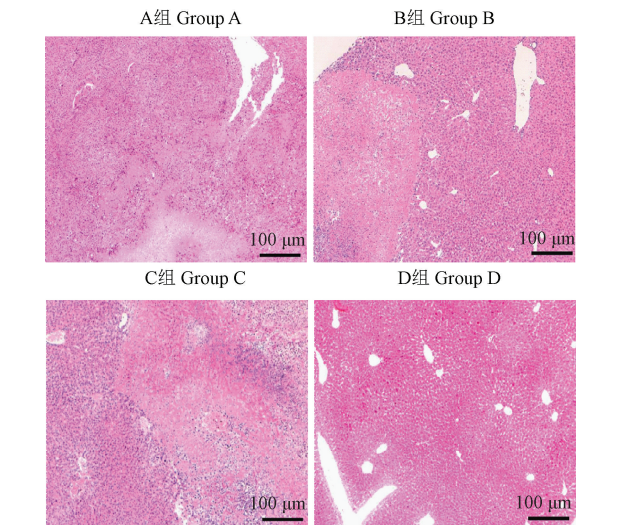


图 5 各组小鼠肝组织的 HE 染色

Figure 5 HE staining of liver tissues of mice in each group

3 讨论

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,病死率居我国恶性肿瘤的第 2 位,已严重威胁人们的生命安全。肝癌治疗近几年在多学科共同努力下有了很大的进展,但仍存在一定的局限性,如肝癌发展迅速、存在肝内转移、术后复发等隐患^[2,10]。因此,深入研究肝癌发生、转移机制,寻找抗肝癌新方法刻不容缓。

建立肝癌模型是深入研究肝癌的基础与保障。肝癌模型的建立方法有:化学诱导模型^[11]、基因工程小鼠模型^[12]、移植瘤模型^[13]。最常用的方法为移植瘤法,异位移植法操作简单、成瘤时间短、易于观察,一直作为首选方法。然而,肿瘤原发器官微环境会影响肿瘤细胞的生物学特征^[14]。异位移植瘤模型无法模拟肿瘤细胞在人体中迁移、侵袭行为^[15]。原位移植模型可以更好地模拟肿瘤细胞与宿主组织相互作用的情况,包括肿瘤侵袭、血管生成、免疫应答等,可以更准确评价药物、理解肿瘤生物学行为。本文分别通过注射肝癌 H22 细胞悬液、注射腹水型肝癌 H22 细胞、移植小鼠肝癌组织块 3 种不同的方法构建肝原位模型,同时设立肝部注射生理盐水的假手术组,对这 4 组小鼠进行观察,对比一般情况、肝部成瘤情况、肿瘤大小、腹腔脏器粘连程度及转移情况,并对比 3 组原位模型小鼠与假手术组的 B 超成像结果、AFP 与 DCP 水平、病理学差异。各组小鼠一般状况和生存情况结果表明,注射肝癌 H22 细胞悬液小鼠在观察的 25 d 内体重逐渐上升,观察至 34 d 仍有 40% 的小鼠存活;注射腹水型肝癌 H22 细胞组前 17 d 体重逐渐增加,随后体重逐渐下降,观察至 30 d 小鼠无一存活;移植肝癌组织块组小鼠前 20 d 体重变化幅度小,随后体重下降,观察至 36 d 仍有 40% 的小鼠存活;注射生理盐水组小鼠在观察的 25 d 内体重平稳,观察至 40 d 小鼠成活率仍为 100%。各组成瘤情况、腹腔脏器粘连程度及转移情况结果表明,注射肝癌 H22 细胞悬液组、注射腹水型肝癌 H22 细胞组、移植小鼠肝癌组织块组成瘤率均为 100.0%;腹腔脏器重度粘连率分别为 40.0%、60.0%、0.0%;注射腹水型肝癌 H22 细胞组还出现胃肠转移等现象;注射生理盐水组小鼠并未出现上述情况。肝癌 H22 细胞悬液注射法和腹水型肝癌 H22 细胞注射法具有操作简单、存活率高等优点。肝癌组织块移植法具有转移少、

腹腔粘连程度轻等优点。在目前肝癌临床诊断实践中,主要采取影像学检查结合 AFP 检测。AFP 在肝癌细胞中呈高表达,可作为肝癌诊断的辅助手段,但 AFP 灵敏度较低^[16-17]。多项肿瘤标志物指标联合检测可以通过综合考虑多个指标的阳性率,提高肝癌诊断的有效性与准确性。特别是在 AFP 呈阴性情况下,可以联合 DCP 提高肝癌诊断的灵敏性。因此本研究联合 B 超成像、血清 AFP、DCP 水平、组织切片等结果,显示上述 3 种方法均可在短时间内成功建立肝癌原位瘤小鼠模型。

综上所述,注射肝癌 H22 细胞悬液、注射腹水型肝癌 H22 细胞、移植小鼠肝癌组织块 3 种方法均可成功建立肝癌原位模型,其中,相较于肝癌组织块移植,肿瘤细胞注射具有操作简单、肝内存在多个转移结节的特点;而肝癌组织块移植相较于肿瘤细胞注射,则具有对腹腔等脏器影响较小等特点,这些可为肝癌的发病机制、病因、临床表现等相关研究提供可靠的动物模型,对肝癌预防、诊断和治疗相关动物模型的选择提供一定的参考依据。

参 考 文 献(References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] COLOTTA F, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(7): 1073-1081.
- [4] LIESHOUT R, FARIA A V S, PEPPELENBOSCH M P, et al. Kinome profiling of cholangiocarcinoma organoids reveals potential druggable targets that hold promise for treatment stratification [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 74.
- [5] 孔丽娟, 郝智慧, 王成, 等. 裸鼠肺癌原位模型的建立及肿瘤对裸鼠生理功能的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(10): 920-925.
KONG L J, HAO Z H, WANG C, et al. Establishment of orthotopic lung cancer model in nude mice and effects of tumor on physiological function of nude mice [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2019, 36(10): 920-925.
- [6] GREENLEE J D, KING M R. A syngeneic MC38 orthotopic mouse model of colorectal cancer metastasis [J]. Biol Methods Protoc, 2022, 7(1): bpac024.
- [7] STEWART E. Orthotopic implants in mice [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2226: 215-222.
- [8] 毛璐婧, 张娜娜, 刘昊, 等. 适用于微创消融治疗研究的小鼠胰腺癌原位模型建立方法及比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2): 127-134.
MAO L J, ZHANG N N, LIU H, et al. Establishment and comparison of mouse pancreatic cancer orthotopic model for

minimally invasive ablation therapy study [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2): 127-134.

[9] 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 X Q, DING G M, ZHENG X, et al. Improved mouse model of orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 16-22.

[10] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER P B, SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): epidemiology, etiology and molecular classification [J]. Adv Cancer Res, 2021, 149: 1-61.

[11] 周文斌, 郑越, 尚佳, 等. 二乙基亚硝胺诱导肝细胞癌模型鼠肠道微生态研究 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(4): 438-453.

ZHOU W B, ZHENG Y, SHANG J, et al. Intestinal microecology in mice bearing diethylnitrosamineinduced primary hepatocellular carcinoma [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(4): 438-453.

[12] 李文新. 基因工程融合蛋白疫苗的衍生化及肝癌转移动物模型的建立与鉴定 [D]. 西安: 第四军医大学; 2009.

LI W X. Derivatization of fusion protein and establishment and identification of animal model on human metastatic hepatocellular carcinoma [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University; 2009.

[13] ZHAO G J, XU L X, CHU E S, et al. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47): 7087-7092.

[14] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4557-4566.

[15] 马雪曼, 王笑民, 于明薇, 等. 小鼠 lewis 肺癌原位移植瘤和异位皮下移植瘤模型的对比研究 [J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(4): 523-526.

MA X M, WANG X M, YU M W, et al. Comparative study of imagable lewis lung carcinoma between orthotopic and ectopic murine models [J]. Pract J Cancer, 2018, 33(4): 523-526.

[16] 朱嫦琳, 陈展泽, 李启欣. 基于决策曲线分析评估血清异常凝血酶原和甲胎蛋白在原发性肝癌中的诊断价值 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(19): 2524-2529.

ZHU C L, CHEN Z Z, LI Q X. Diagnostic value of PIVKA-II and AFP in patients with primary hepatocellular carcinoma based on decision curve analysis [J]. J Pract Med, 2021, 37(19): 2524-2529.

[17] 陈琳, 张恒, 江斌. 血清 AFP、GGTI II、AFU 和 DCP 联合检测对肝癌的诊断价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(8): 1283-1286, 1291.

CHEN L, ZHANG H, JIANG B. The diagnostic value of combined detection of serum AFP, GGT II, AFU and DCP in liver cancer [J]. J Mol Diagn Ther, 2022, 14(8): 1283-1286, 1291.

[收稿日期] 2023-08-21