

人肝癌组织裸鼠移植瘤模型建立及其应用

王全凯¹, 杨全会², 郭静², 谢广云¹, 崔涛¹, 许荣焜², 许建宁^{1*}

1. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050

2. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005

摘要: 目的 建立人肝癌组织裸鼠移植瘤模型, 对其特性进行鉴定, 并应用于抗肿瘤药物制剂疗效的观察。方法 将人原发肝癌手术新鲜组织移植于 BALB/c 裸鼠皮下, 建立人肝癌组织裸鼠移植瘤动物模型; 于同体移植后第 15 天连续 ig 给予长科制剂 (CKBM), 通过观察动物日常状况、接种部位出现肿块时间, 测定瘤体体积和质量、抑瘤率以及进行组织病理学观察, 初步评价 CKBM 的抗肿瘤疗效。结果 人肝癌组织裸鼠移植瘤保持了人肝癌组织特性, 并能通过同体移植传代; 观察发现 CKBM 对人肝癌荷瘤裸鼠的抑瘤率达 45.71%, 对癌细胞生长有一定的抑制作用。结论 在成功建立人肝癌组织裸鼠移植瘤模型基础上, 观察发现 CKBM 具有一定的抗肿瘤疗效。

关键词: 肝癌; 裸鼠; 移植瘤; 动物模型; 抑瘤率

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0398-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.018

Establishment and application of implantation model of human hepatocellular carcinoma in nude mice

WANG Quan-kai¹, YANG Quan-hui², GUO Jing², XIE Guang-yun¹, CUI Tao¹, XU Rong-kun², XU Jian-ning¹

1. National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

2. Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Abstract: Objective The human hepatocellular carcinoma model was established by implantation in BALB/c nude mice. Its characteristics were certified in the model which was used for the observation of antitumor efficacy. **Methods** Human hepatocellular carcinoma were sc implanted to BALB/c nude mice for the establishment of the implantation model of the human hepatocellular carcinoma in BALB/c nude mice. The nude mice were exposed to the pharmaceuticals from CK Life Sciences Limited by ig on day 15 after the implantation to find out its healing efficacy through the animal reflecting, the occurring time, volume, weight of tumors, the rate of tumor inhibited, and pathological histology. **Results** The characteristics of human hepatocellular carcinoma could be kept with passaging by autograft. The tumor inhibiting rate of the pharmaceuticals was 45.71%, showing the certain inhibitory effect on growth of tumor cells. **Conclusion** A certain antitumor efficacy of the pharmaceuticals made by CK Life Sciences Limited is found out on the basis on the human hepatocellular carcinoma model in nude mice established successfully.

Key words: hepatocellular carcinoma; nude mice; implanted tumor; animal model; tumor inhibitory rate

人类肝癌的基础和临床实验研究多数都借助于实验动物模型。目前, 以人肝癌组织移植裸鼠建立的动物移植瘤模型是最接近人类肝癌的整体实验模型, 是肝癌基础和临床实验研究理想的动物模型。人肝癌组织裸鼠移植瘤模型是指把人肝癌组织块接种于裸鼠皮下建立的实验动物模型, 常用于筛选抗肿瘤药物和制剂、实验性治疗和抗肿瘤机制研究^[1]。基于为肝癌实验和临床研究以及药物筛选提供体内

实验系统的目的, 本研究建立了人肝癌组织裸鼠移植瘤模型, 对其特性进行鉴定, 并应用于抗肿瘤药物长科制剂 (CKBM) 疗效的观察。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c (nu/nu) 裸小鼠 (由北京维通利华实验动物技术有限公司提供)。饲养于中国医学科学院基础医学研究所/中国协和医科大学基础医学部

收稿日期: 2013-06-03

作者简介: 王全凯 (1977—), 男, 北京人, 主管技师, 研究方向为毒理学。Tel: (010)83132199 E-mail: kylewang@sina.com

*通信作者 许建宁, 硕士生导师, 研究方向为毒理学。Tel: (010)83132592 E-mail: jnx999@263.net

SPF 屏障系统动物室, 鼠龄 5~6 周龄, 体质量 18~20 g, 雄雌各半。

1.2 药品

长科制剂 (CKBM), 香港长江生命科技有限责任公司研制, 药物组成包括人参、五味子、酸枣仁、山楂、大豆、酵母菌等^[2]。

1.3 人肝癌组织

选用经病理确诊的肝癌患者手术切除的新鲜肿瘤组织, 立即置培养液中, 尽快移植。

1.4 癌组织移植^[3]

在超净台中用培养液反复数次冲洗新鲜的癌组织, 去除明显坏死或可疑坏死的组织, 将其切成大小适宜 (2~3 mm³) 的小块, 直接接种于裸鼠肩部、腋下皮下部位。每例肝癌患者癌组织标本接种雄、雌性裸鼠各 2 只。尽可能缩短取得癌组织到移植的过程时间。裸鼠间传代方法依此同样进行。

1.5 动物体内肿瘤生长情况测定

癌组织移植完成后, 每日观察动物的活动、进食及饮水情况, 并记录异常情况; 分别于实验开始、结束及每周称量动物体质量; 详细观察记录移植部位有无感染, 肿瘤/肿块出现的时间; 每隔 3~7 天, 用卡尺测量皮下移植瘤的最大长径 (*a*) 和横径 (*b*), 按公式计算瘤体积 (*V*) = $ab^2/2$ 。

1.6 血清甲胎蛋白 (AFP) 测定

采用上海科华生物工程股份有限公司生产的甲胎蛋白定量检测试剂盒 (酶联免疫法) 测定裸鼠全血中 AFP 的量。

1.7 组织病理学检查

动物处死时进行大体解剖观察, 肉眼观察移植瘤形态, 以及有无腹水、胸水和各脏器表面有无转移瘤结节; 取肿瘤、脑、肺、心、肝、脾、肾、胃、肠及区域淋巴结 (双腋下、双腹股沟、颈前和肺门), 以 10% 福尔马林固定、石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察肿瘤转移和各脏器病理变化及淋巴结窦性组织细胞增生情况。

1.8 模型初步应用^[4]

应用第 3 代同体移植的荷瘤裸鼠模型, 对 CKBM 的抗肿瘤疗效进行初步观察。同体移植雄、雌性各 15 只动物, 分为模型组和给药组, 移植部位为背部、一侧腋部皮下。给药组的雄雌各 8 只动物于同体移植后第 15 天开始每日 ig 给药 20 mg/kg (临床拟使用剂量) 的 CKBM, 每日观察动物日常状况、接种部位出现肿块时间, 每周测定动物体质量、瘤

体大小 2 次, 连续给药 45 d, 实验结束时测定瘤质量和主要脏器质量, 对瘤体和动物主要脏器进行组织病理学检查, 并计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \frac{\text{给药组瘤质量}}{\text{模型组瘤质量}}$$

2 结果

2.1 人肝癌组织原代移植

本研究用 2 例临床确诊的肝癌患者手术切除标本 (具体情况见表 1) 进行裸鼠皮下移植, 每例接种雄、雌性各 2 只动物, 有 1 例获得移植成功, 原代移植成功率为 12.5%, 原代移植瘤潜伏期为 56 d, 并可在同种动物连续传代。

2.2 移植瘤传代

当动物皮下瘤体达 1 cm³ 时, 进行同种间移植瘤传代, 成功率达 100% (表 2)。移植瘤连续传代, 自第 3 代同体移植开始瘤体生长潜伏期为 25 d; 不同代荷瘤裸鼠全血中 AFP 量均值高于检测灵敏度 20 ng/mL 的 100 倍以上。

表 1 2 例人肝癌组织临床资料

Table 1 Clinical data of hepatocellular carcinoma in two cases

编号	性别	年龄	肿瘤病理类型	AFP / (ng·mL ⁻¹)
1*	男	59	肝右叶肝细胞肝癌	99 940.0
2	男	57	肝右后叶中度分化肝细胞肝癌	433.8

*移植成功

*implanted successfully

表 2 人肝癌移植瘤传代情况

Table 2 Passaging condition of human implanted hepatocellular carcinoma

代数	数量 / 只	潜伏期 / d	出瘤率 / %
原代	8	56	12.5
1	6	35	100
2	6	25	100
3	6	25	100

2.3 病理学检查

对原代和不同代移植裸鼠均进行大体解剖观察和病理组织学检查。移植瘤组织形态和病理组织学检查与原人肝癌组织相似 (表 3)。

2.4 人肝癌裸鼠移植瘤模型初步应用

2.4.1 CKBM 毒性评价 根据测定的动物体质量的变化对药物毒性进行评价, 即实验末体质量 (FBW) / 实验初体质量 (IBW) ≥ 0.80 时为无毒性反应, FBW/IBW < 0.80 时为有毒性反应。从表 4、5

表 3 肝癌组织病理学检查结果

Table 3 Histopathology of hepatocellular carcinoma

组织类型	病理组织学检查结果
人肝癌组织	肝脏正常组织结构消失, 可见到形状似球腺泡状的癌巢, 被周围的结缔组织包绕; 癌巢由癌细胞组成, 癌细胞形态大小不一, 呈现圆形、椭圆形、锥形及不规则形, 细胞界限模糊, 癌细胞排列较为松散; 癌细胞的核仁较大, 染色质浓染, 胞浆所占比例小, 可见到核分裂像
同体移植第 1 代 癌组织	癌组织破坏了肝脏的正常结构, 可见到形似球腺状聚集的癌巢; 癌巢由癌细胞组成, 癌细胞形态各异, 呈现圆形、椭圆形、锥形及不规则形, 癌细胞大小不一; 癌细胞的核仁较大, 染色质浓染, 胞浆所占比例小, 可见到核分裂像
同体移植第 2 代 癌组织	肝脏正常组织结构消失, 癌组织排列紧密, 生长旺盛; 可见有较大范围的出血现象; 癌细胞的形态差异很大, 有圆形、椭圆形、索形、多边形及不规则形等多种形态, 细胞的大小差异很大; 癌细胞染色质染色很深, 核仁明显增大, 胞浆部分较少, 同时可以见到明显的核分裂像
同体移植第 3 代 癌组织	癌组织呈浸润式分布, 排列紧密, 生长旺盛; 可见有较大范围的出血现象; 癌细胞的形态差异大, 有圆形、椭圆形、索形、多边形及不规则形等多种形态, 细胞的大小差异也较大; 癌细胞染色质染色很深, 核仁明显增大, 胞浆部分较少, 可以见到明显的核分裂像
同体移植第 4 代 癌组织	肝脏正常组织结构消失, 可见大片肝脏组织坏死; 癌组织呈腺管状, 排列紧密, 生长旺盛, 癌细胞的形态差异很大, 有圆形、椭圆形、索形、多边形及不规则形等多种形态, 细胞的大小差异大; 癌细胞可见 2 个或多个核仁, 染色质染色深, 浓集, 核仁明显增大, 胞浆部分较少; 同时可以见到较明显的核分裂像

表 4 雄性小鼠体质量变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes of body weight of male mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	移植不同时间小鼠体质量 / g									
	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天	第 17 天	第 21 天	第 25 天	第 28 天	
模型 ($n=7$)	20.67±1.05	22.07±1.03	23.67±1.63	24.19±1.82	24.23±2.08	24.03±2.05	24.07±2.24	23.79±2.45	24.56±2.46	
给药 ($n=8$)	19.81±0.94	20.65±0.94*	22.70±1.39	23.74±1.94	23.79±2.13	23.74±2.46	23.64±2.44	23.44±2.21	23.61±2.23	

组别	移植不同时间小鼠体质量 / g									
	第 32 天	第 35 天	第 39 天	第 42 天	第 46 天	第 49 天	第 53 天	第 56 天	第 60 天	
模型 ($n=7$)	24.53±2.41	23.04±2.74	22.60±2.60	22.61±2.41	22.64±2.27	21.76±2.32	22.03±2.62	22.49±3.08	22.67±3.61	
给药 ($n=8$)	24.04±2.26	22.20±2.53	22.00±2.60	21.63±2.83	21.48±2.55	20.93±2.45	19.45±2.26	19.27±2.77	20.68±2.19	

与模型组比较: * $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs model group, same as below

表 5 雌性小鼠体质量变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Changes of body weight of female mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	移植不同时间小鼠体质量 / g									
	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天	第 17 天	第 21 天	第 25 天	第 28 天	
模型 ($n=7$)	18.64±1.70	18.21±0.67	19.47±0.72	19.36±0.85	19.23±0.89	19.60±1.10	18.97±1.62	18.30±1.64	18.86±1.78	
给药 ($n=8$)	18.58±0.78	18.85±0.81	19.90±1.06	20.43±1.83	20.71±1.59*	20.70±1.91	19.30±1.57	19.39±1.87	20.19±1.95	

组别	移植不同时间小鼠体质量 / g									
	第 32 天	第 35 天	第 39 天	第 42 天	第 46 天	第 49 天	第 53 天	第 56 天	第 60 天	
模型 ($n=7$)	19.06±1.92	18.06±2.06	17.46±2.05	17.57±2.04	18.01±2.03	17.63±2.19	16.26±3.05	18.17±2.00	18.40±2.12	
给药 ($n=8$)	20.31±2.02	19.43±1.92	18.86±1.85	19.01±1.93	18.89±1.88	18.33±1.66	17.49±1.66	17.12±2.38	17.63±2.46	

可见两组不同性别小鼠体质量增长无显著性差异 ($P>0.05$), 且给药组 FBW/IBW 均大于 0.80, 表明 CKBM 对动物无毒性反应。

2.4.2 肿瘤情况分析 分析肿瘤在不同性别动物出现时间和部位。经 Fisher 精确概率法统计分析, 给药组肿瘤发生动物数、出现肿瘤数量与模型组比较均无显著性差异 ($P>0.05$)。给药组动物瘤体积与模型组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.4.3 抑瘤率 两组小鼠瘤质量测定结果见表 6。经计算可知, CKBM 对人肝癌荷瘤裸鼠的总抑瘤率达 45.71%; 按性别分组的结果显示, 对雄、雌性小鼠抑瘤率分别为 50.30% 和 38.19%; 按部位分组的

结果显示, 背部和腋下抑瘤率分别为 24.88%、58.43%。

2.4.4 病理组织学检查结果 模型组实体样瘤组织, 癌细胞弥散性生长, 细胞大小一致, 胞浆呈嗜酸性, 癌组织血窦丰富; 给药组实体样癌组织, 癌细胞大小一致, 癌细胞在血窦周呈腺体样排列, 胞浆嗜酸, 核嗜碱, 核分裂相少, 胞浆透明, 嗜酸性, 胞核嗜碱性; 给药组癌组织基本结构和癌细胞形态与模型组比较未发现明显变化, 所不同之处是癌组织多发生坏死, 癌细胞核分裂相相对减少, 这表明 CKBM 对癌细胞生长有一定的抑制作用。荷瘤裸鼠各脏器未见癌细胞转移灶。结果见图 1。

表 6 两组小鼠瘤质量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Weight of carcinoma in mice of two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	雄性小鼠瘤质量 / g		雌性小鼠瘤质量 / g	
	背部	腋下	背部	腋下
模型 ($n=7$)	1.082 ± 2.150	2.025 ± 1.105	0.611 ± 0.283	1.092 ± 0.740
给药 ($n=8$)	0.691 ± 0.814	0.800 ± 0.503*	0.603 ± 0.511	0.465 ± 0.079

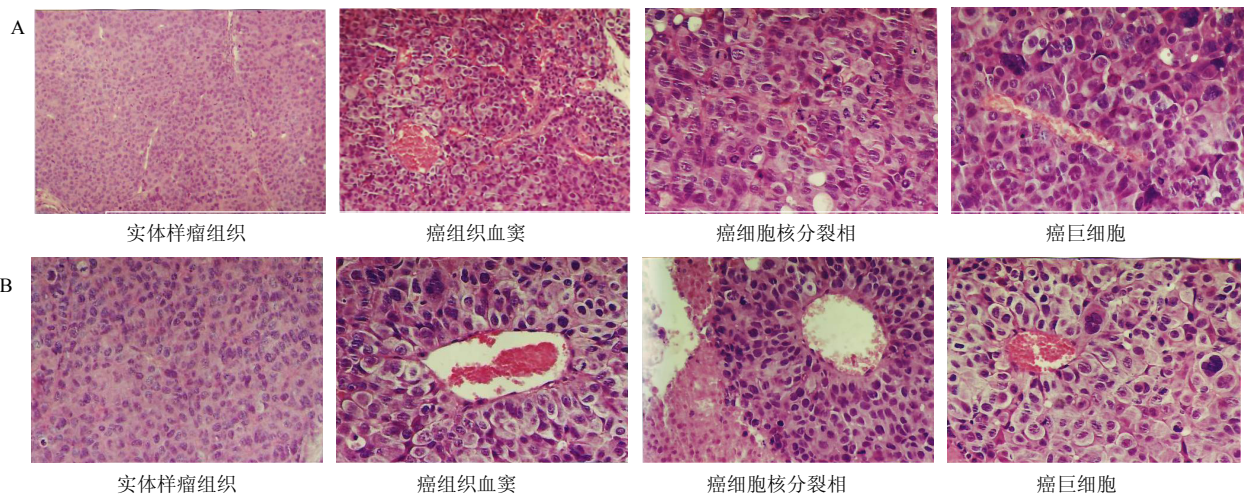


图 1 模型组 (A) 与给药组 (B) 瘤组织病理学观察结果

Fig. 1 Observation of tumor histopathology in model group (A) and treatment group (B)

3 讨论

自 1976 年 Shimosato 等^[5]报道人肝癌组织在裸鼠皮下移植成功后, 由于该模型是体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 且具备建立模型相对时间短、成功率高、瘤组织保持原人肝癌的形态和功能等特点, 故被广泛应用于人肝癌实验和临床研究以及抗肿瘤药物筛选。

不同的人组织类型肿瘤裸鼠皮下移植成功率不

同^[6-8], 其中肝癌组织最不易移植成功。人肝癌组织移植成功与癌组织分化程度、组织类型等密切相关, 肿瘤分化程度低、复发瘤或转移瘤的原代移植成功率高。此外, 瘤源组织的质量、切除组织处理和移植皮下的时间、皮下移植方法 (如直接组织块包埋、直接组织块皮下注射、组织消化注射)、操作技术等都对原代移植成功率有很大的影响。本研究考虑到手术标本取材到裸鼠皮下移植时间可能会超过以往

文献报道 1 h 内的实际情况, 将手术取的癌组织直接放入冰冷无菌细胞培养液中保存, 接种前再用细胞培养液反复清洗新鲜组织, 从而大大延长离体癌组织原代移植间隔时间, 该法能使离体 5 h 人肝癌组织原代移植成功。另外, 在进行移植传代时, 选用瘤体达 1 cm^3 左右以及较先达到此标准的作为下一代移植的瘤源, 可人为选择, 使生长较活跃的保持癌特性细胞群体传给下一代, 并获得继续生长。

AFP 是肝癌患者血清中检测出的一种糖蛋白, 正常情况下, 这种蛋白主要来自胚胎的肝细胞, 胎儿出生约 2 周后, AFP 从血液中消失, 故成人体内 AFP 的量通常低于 20 ng/mL ^[9]。但当肝细胞发生癌变时, 又恢复了产生这种蛋白质的功能, 大量的临床统计资料表明, 若以 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ 为阳性标准, 则急性肝炎的阳性率为 31%~52%, 慢性肝炎的阳性率为 15%~58%, 肝硬化的阳性率为 11%~47%。肝细胞癌(HCC)患者血清 AFP 与其肿瘤大小及病理分级有明显关系, 肿瘤越小, AFP 的阳性率越低。AFP 在其他病理类型的原发性肝癌中也有不同程度的阳性率。其中, 胆管细胞癌为 3.6%~5.2%, 混合细胞癌为 17.1%~37.4%, 纤维板层型肝癌通常只有低浓度的 AFP。而 84.6%~100%的肝母细胞瘤患者 AFP 则有可能高于 $1\ 000\text{ }\mu\text{g/L}$ ^[10]。

本研究使用的 AFP 检测试剂是一种一步法体外免疫层析试剂^[11], 可直接用血浆定性地检测 AFP, 灵敏度为 20 ng/mL , 操作简便。选择该项指标高的癌源大大提高了移植成功率, 也是建立模型后抗肿瘤药物筛选、药效评价等重要的参考指标。

人肝癌组织移植至裸鼠皮下, 其肿瘤组织基本保存了原先人肝癌的形态、结构与功能特点, 且裸鼠体内 AFP 指标同样升高, 提示模型是一种最接近人的肝癌模型。一般皮下移植成功率低于原位移植, 但就建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤而言, 相对与原位

移植模型操作简便, 且模型肿瘤组织保留了人肝癌细胞特点。该模型缺点是不发生浸润及转移。

本研究应用人肝癌裸鼠移植瘤模型对 CKBM 抗癌效果进行了初步观察, 结果进一步提示, 受试物对肿瘤生长有一定抑制作用, 且所建立的裸鼠移植瘤模型适用于抗肿瘤药物筛选、抑瘤效果评价。

参考文献

- [1] 叶 翮, 张淑玲, 揭盛华, 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.
- [2] 庞锦江, 单惠敏, 许建宁, 等. 长科制剂增强试验动物的免疫功能 [J]. 世界临床药物, 2004, 25(7): 444-448.
- [3] 孙昉究, 汤钊猷, 刘康达, 等. 裸鼠人肝癌原位移植模型的生长特性剂转移潜能 [J]. 中华医学杂志, 1995, 75(11): 673-675.
- [4] 陈陵际, 丁 健. 运用人癌裸小鼠移植瘤模型进行抗癌新药评价 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(4): 247-250.
- [5] Shimosato Y, Kameya T, Nagai K, *et al.* Transplantation of human tumors in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1976, 56: 1251-1260.
- [6] 张东兴, 颜登国, 赵丙波, 等. 人大肠癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(3): 247-250, 254.
- [7] 白飞虎, 郭新宁, 杨 力, 等. 人胃癌裸鼠胃原位移植转移模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(10): 873-875.
- [8] 许 玲, 陈亚琳, 苏晓妹, 等. 裸鼠人胃腺癌 SGC-7901 原位移植模型的构建及其生物学特性 [J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(5): 476-478.
- [9] 常彬霞, 辛绍杰. 甲胎蛋白及其临床应用研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(6): 576-580.
- [10] 钦伦秀. 肿瘤的分子诊断与预测 [M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2004.
- [11] 陈季武, 范培昌. 快速检测甲胎蛋白的免疫层析试条的研制 [J]. 分析科学学报, 2002, 18(4): 273-276.