

人肝癌裸鼠移植模型的研究进展

叶 翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华

■背景资料

为了研究人类肝癌发生、发展以及抗癌药物的作用和机制, 需要建立肝癌动物模型, 1966年Flanagan发现细胞免疫功能缺陷的裸小鼠, 从而大大降低了人癌裸鼠移植的免疫排斥反应, 使人癌裸鼠移植成为可能, 人肝癌裸鼠移植模型已成为迄今人体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 因此成为肝癌实验研究理想的动物模型。

叶翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 张淑玲, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科. yp_breezy@yahoo.com.cn
电话: 027-85726360
收稿日期: 2006-06-14 接受日期: 2006-08-10

Research progress of human hepatocellular carcinoma models in nude mice

Pian Ye, Shu-Ling Zhang, Sheng-Hua Jie, Ji-Hua Dong

Pian Ye, Shu-Ling Zhang, Sheng-Hua Jie, Ji-Hua Dong, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Shu-Ling Zhang, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yp_breezy@yahoo.com.cn
Received: 2006-06-14 Accepted: 2006-08-10

Abstract

Animal models, which can factually simulate the natural growth, invasion, and metastasis *in vivo*, are needed in basic and clinical research on liver cancer. At present, nude mice with transplanted human hepatocellular carcinoma are the best models of human liver cancer *in vitro*, and it takes less time to establish the model, with a higher success rate. Mouse model of human hepatocellular carcinoma can be obtained by subcutaneous transplantation, *in situ* transplantation, and intraperitoneal transplantation. Metastasis model was also one of them. The following aspects, including the characteristics of human hepatocellular carcinoma cells or surgical specimens, transplanted location, numbers of the transplanted cells, strains and week age of nude mice, and growing environment, etc, are the influential factors for the establishment of this model.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Nude mouse; Transplantation; Animal Model

Ye P, Zhang SL, Jie SH, Dong JH. Research progress of human hepatocellular carcinoma models in nude mice.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(36):3500-3503

摘要

肝癌的基础与临床研究迫切需要能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型。目前, 人肝癌裸鼠移植模型是体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 并且造模时间短, 成功率高, 按移植部位可以分为皮下移植、原位移植、腹腔移植以及转移模型。影响裸鼠移植模型建立的因素主要有人肝癌细胞或外科标本的特性、移植部位及移植癌细胞数量、裸鼠的品系和周龄以及生长环境和其他因素的影响。

关键词: 肝癌; 裸鼠; 移植; 模型

叶翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华. 人肝癌裸鼠移植模型研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3500-3503
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3500.asp>

0 引言

研究人类肝癌需要建立肝癌动物模型, 目前, 人肝癌裸鼠移植模型是体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 因此成为肝癌实验研究理想的动物模型。裸小鼠是1966年由Flanagan发现的一种无毛小鼠, 1969年Rygaard^[1]和Pocvlsen通过实验证实裸鼠由于先天性胸腺发育不良, 致T细胞生成障碍, 细胞免疫功能缺陷, 从而在理论上保证了人癌裸鼠移植的可能性。1976年, 日本Shimosato *et al*^[2]首先报道了包括肝癌在内的一系列裸鼠人癌模型的建立, 近30 a来, 国内外学者建立的人肝癌裸鼠模型从最初的皮下移植模型发展到腹腔移植模型、原位移植模型, 近几年又创造了人肝癌裸鼠转移模型。

1 几种常见的人肝癌裸鼠移植模型

1.1 皮下移植模型

1.1.1 肝癌外科标本移植 早期的移植瘤材料来源是人肝癌外科标本^[3-4], 一般取新鲜切除标本的肿瘤边缘癌细胞生长较快的部分, 去除纤

维组织和坏死组织后, 将癌组织剪成直径为1-2 mm的小块, 取2-3块在离体40 min内尽快用套管针接种于裸鼠皮下, 移植时严格按无菌操作, 外科标本移植成功率较低, 只有11%左右. 但移植后的人肝癌仍保持原先的形态和功能, 且较过去人肝癌的实验研究只能借助于动物自发、诱发以及同种移植性肝癌或人肝癌细胞系已经开辟了新的前景.

1.1.2 肝癌细胞株移植 后来发展为将已建立的人肝癌细胞株以包含 10^6 - 10^7 个处于对数生长期的瘤细胞的0.1-0.2 mL细胞悬液接种于裸鼠皮下^[5], 其成功率要高于外科标本. 目前, 大多数肝癌移植基本上都采用皮下接种^[6-7], 以躯干近头侧的成功率高, 其中又以腋下为最, 并且腋下皮肤松弛使瘤体长的较大, 宿主寿命也相对延长^[8]. 另外将肝癌细胞株种植在裸鼠背侧部皮下操作和观察都比较方便, 研究者们也较常采用^[9]. 1 wk左右皮下瘤可以触及(直径为2-3 mm), 10 d左右可以成瘤(直径为5 mm). 皮下移植成功率为70%-100%. 皮下移植瘤操作简便, 易于观察且成功率高, 因此常用作抗肝癌药物的研究和原位移植前的瘤源准备.

1.2 原位移植模型 相对于皮下移植模型来说, 人肝癌裸鼠原位移植模型可较好保持人肝癌的生物学特性. 移植方法同皮下移植模型, 移植部位一般在肝左叶, 刺破肝包膜后植入1-2块瘤组织^[10-11], 也可以将浓缩的瘤细胞株注入肝实质内^[12], 最后全层关腹. 2 wk末可用B超观察到种植瘤, 原位移植成功率较高, 可达100%. 但涉及到裸鼠的麻醉, 开关腹等手术操作, 故实施起来较皮下移植复杂许多. 虽然如此, 原位移植模型仍然很受研究者的欢迎, 因为肝癌最具特征性的生物学行为, 如腹腔浸润转移、腹水等表现仅仅见于原位移植瘤模型.

1.3 腹腔移植模型 腹腔移植瘤位置较深, 不利于观察和测量, 但是操作较简单, 且可出现一定比例的浸润、转移和腹水, 方法是将建立的裸鼠人肝癌组织模型剪成的小块或者人肝癌细胞株以0.3 mL注入裸鼠右下腹腔内^[13-14]. 裸鼠前侧腹壁比背侧更有利于人类移植瘤的生长. 腹腔移植模型可以局部侵袭到肌肉组织、肠、胰、肾和睾丸等, 发生肝内转移或者转移到肺及远处器官, 腹腔移植成功率也较高, 可达100%.

1.4 皮下-原位移植模型 也称为间接原位移植模型, 首先制作好皮下移植模型, 待移植瘤稳定传代后, 再植入同种裸小鼠肝内^[14]. 待肿瘤长到

1 cm³时, 切取供瘤鼠皮下肿块剪成1-2 mm³的肿瘤微块后, 再按照原位组织块移植法将肿瘤块植入到肝包膜下. 间接肝原位移植瘤模型能稳定传代, 移植瘤存活率达100%, 明显高于直接肝原位移植瘤模型, 此模型容易发生局部或远处转移, 甚至发生腹水和黄疸, 局部侵袭率接近100%, 自发转移率>50%.

1.5 皮下-肾包膜下移植模型 同皮下-原位移植模型, 首先也是制作好皮下移植模型, 只是将肿瘤块植入到裸鼠两侧肾包膜下^[15]. 肾包膜下是缺乏免疫监视的部位, 同时由于血供丰富, 为瘤细胞的存活和生长提供了充足的血液供应, 有利于移植瘤的转移, 其接种的成功率也高于皮下.

1.6 转移模型 肝癌术后复发转移是进一步延长肝癌患者生存的障碍, 而要研究肝癌转移复发的机制及其干预, 以利于提出有效的防治对策, 必需要有裸鼠人肝癌转移模型.

1.6.1 皮下-转移模型 用本身就具有自发转移潜能的肝癌细胞系如MHCC97-H, 经过体内筛选得到独特的拥有多发转移特性的细胞系HCCLM3接种于裸鼠皮下^[16]. 接种35 d后, 受种裸鼠100%发生明显的肺部转移.

1.6.2 原位-转移模型 采用组织学完整的人肝癌标本或者具有自发转移潜能的肝癌细胞系^[11,17], 以裸鼠肝被膜下植入的方法, 将肝癌组织或肝癌细胞系直接移植于裸鼠肝脏内, 观察移植瘤的生长情况, 筛选出1株人肝癌高转移瘤株. 接种后, 当裸鼠处于濒死状态时, 处死裸鼠, 系统解剖, 取转移灶植入新裸鼠皮下扩增, 被扩增的转移瘤重新移植到裸鼠肝被膜下, 鼠间连续原位传代, 非传代裸鼠长期观察肿瘤的转移^[14,18-19]. 由此获得的肝癌转移瘤株通过原位传代维持, 将瘤株在裸鼠体内进行纯化筛选后得到的瘤株再次植入裸鼠肝内, 便可建立高转移人肝癌裸鼠模型. 此种模型成功率也较高, 移植成功率和转移率均可达100%.

2 裸鼠成瘤的关键因素

经过国内外学者们多年来的实验摸索, 虽然人肝癌裸鼠移植模型已经比较成熟, 但仍会有移植成功率不高、潜伏期长以及难以连续传代等情况出现. 影响移植成功的因素主要有: 人肝癌细胞本身的特性、移植部位和数量、裸鼠的品系和大小以及环境因素的影响.

2.1 肝癌细胞或外科标本的特性 培养传代的细胞制成悬液后较分散, 容易被裸鼠机体免疫清

■研究前沿

肝癌的基础与临床研究都迫切需要能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型. 而人肝癌完整组织块裸鼠原位移植模型因保留了人肝癌的组织结构特征及具备侵袭转移潜能而成为目前最接近人体内肝癌生物学演化和特性的建模方法, 成为近年来肝癌建模的热点. 严格把握好影响模型成功的几种关键因素, 使模型的移植成功率接近100%是建模的重点. 然而裸鼠由于缺乏T细胞免疫功能而难以进行与免疫有关的抗转移研究.

■应用要点

本文总结各种肝癌裸鼠移植模型建立的方法要点、成功率、用途和意义,对于基础和临床动物实验研究具有指导意义。

除,因此较原发肝癌组织难以形成移植瘤。人肝癌外科标本恶性程度与移植成功率大致呈正相关,一般分化程度低、复发性肿瘤以及转移瘤的移植成功率高,具高侵袭和转移潜能的癌细胞更易移植成功。

2.2 移植部位及移植癌细胞数量 移植部位通常选用皮下、腹腔内、原位移植。皮下接种部位多在背部靠近头部皮下,也可采用腋下,由于血管丰富且皮下游离空间大,既易使肿瘤成活又能使肿瘤长大也不影响裸鼠本身的活动,也有报道接种在背部靠近左或右后肢皮下,便于操作且更易于观察。细胞系接种时的细胞数量对成瘤率很重要,一般需要 10^6 数量级以上的细胞才能成瘤,常用的方法是每一接种部位种植含 1×10^6 - 1×10^7 的瘤细胞悬液0.1-0.2 mL。由于移植的细胞经过酶处理后可导致细胞结构被破坏,进一步引起肿瘤生物学行为的改变,影响瘤细胞的移植生长和转移,且细胞悬液本身就已失去了肿瘤的组织结构特点,因此皮下移植的肝癌不易发生转移,故目前研究肝癌转移特性时倾向于进行新鲜组织块原位移植法。

2.3 裸鼠的品系和周龄 裸鼠虽无胸腺、缺乏T细胞免疫,但体内尚存在NK细胞、巨噬细胞及抗原提呈细胞,故仍具一定的免疫功能,不同品系的裸鼠免疫力有差异,因此肝癌移植成功率也会有所不同,因此人肝癌裸鼠移植时要严格使用同一品系的裸鼠。目前国内外研究者们最常用的是BALB/c-nu/nu裸鼠。近年来也有报道用严重联合免疫缺陷(SCID)鼠(T、B细胞联合免疫缺陷)来代替裸鼠进行人肝癌移植实验^[20-21]。由于SCID鼠几乎完全丧失T和B淋巴细胞免疫功能,也就几乎不具备任何排斥反应,因此肿瘤成活率与生长率更高,但是他们也更易发生感染,死亡率较高,故采用不多。另外,裸鼠的周龄也是影响移植成功的重要因素之一,新生鼠免疫功能尚未完全建立,故肿瘤生长更容易且更迅速,随着裸小鼠周龄的增长或环境因素等(如感染)的影响,裸小鼠体内的正常T细胞可能会增加,免疫力增强从而易于发生排斥反应,故通常选用4-6周龄的裸鼠作为移植模型。裸鼠的性别对肝癌移植模型的建立影响不大。

2.4 生长环境及其他因素的影响 裸鼠是胸腺发育不良而致T细胞免疫缺陷的动物,因而非常易受致病菌感染,如饲养于普通环境,容易受到细菌或病毒感染,受抗原刺激后裸鼠体内的NK细胞、巨噬细胞及抗原提呈细胞等可被大量启动

且数量和活性升高,产生主动免疫力和排斥移植瘤的反应,从而易导致人肝癌移植失败。因此裸鼠宜饲养于无特定病原体(SPF级)的环境中,严格掌握温度和湿度。饥饿、声音、光线等刺激也会影响裸鼠的生长而最终破坏动物模型的建立。另外,当对裸鼠辅以X线照射或免疫抑制剂处理时,可增加移植成功率。

总之,肝癌的基础与临床研究都迫切希望能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型。裸鼠由于免疫缺陷使人肝癌组织或细胞移植成为可能,是目前人体外最接近人类肝癌的整体实验模型,而人肝癌完整组织块裸鼠原位移植模型因保留了人肝癌的组织结构特征及具备侵袭转移潜能而成为目前最接近人体内肝癌生物学演化和特性的建模方法,且其造模时间短,成功率高,因此是研究人肝癌生长、侵袭及转移较为理想的模型,如果能严格把握好影响模型成功的几种关键因素,该模型的移植成功率可接近100%。然而裸鼠由于缺乏T细胞免疫功能而难以进行与免疫有关的抗转移研究。

3 参考文献

- 1 Rygaard J. Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77: 761-762
- 2 Shimamoto Y, Kameya T, Nagai K, Hirohashi S, Koide T, Hayashi H, Nomura T. Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 1251-1260
- 3 汤钊猷, 马曾辰, 薛琼, 林芷英, 应越英, 徐元鼎, 孙聆善, 袁新华. 裸鼠人体肝癌移植模型的研究(I): 模型的建立及其血清学与形态学特征. *上海第一医学院学报* 1982; 9: 21-25
- 4 Ma ZC. Transplantation model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. II. Establishment of the LTNM2 human liver cancer model in nude mice and observation on the growth of the transplanted tumor. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1985; 7: 405-407
- 5 Ma H, Liu Y, Liu S, Xu R, Zheng D. Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice. *Hepatology* 2005; 42: 1355-1363
- 6 Zhao J, Zhang X, Shi M, Xu H, Jin J, Ni H, Yang S, Dai J, Wu M, Guo Y. TIP30 inhibits growth of HCC cell lines and inhibits HCC xenografts in mice in combination with 5-FU. *Hepatology* 2006; 44: 205-215
- 7 Li Y, Tang ZY, Tian B, Ye SL, Qin LX, Xue Q, Sun RX. Serum CYFRA 21-1 level reflects hepatocellular carcinoma metastasis: study in nude mice model and clinical patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 515-520
- 8 Sun F, Tang Z, Liu K. Growth pattern and metastatic behaviour of orthotopically metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude

- mice. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1995; 75: 673-675, 710
- 9 Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Rocken C, Malfertheiner P, Farrell GC. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2006; 43: 134-143
- 10 Gao YS, Chen XP, Li KY, Wu ZD. Nude mice model of human hepatocellular carcinoma via orthotopic implantation of histologically intact tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3107-3111
- 11 Guan M, Rodriguez-Madoz JR, Alzuguren P, Gomar C, Kramer MG, Kochanek S, Prieto J, Smerdou C, Qian C. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res* 2006; 66: 1620-1629
- 12 Ogawa K, Nakanishi H, Takeshita F, Futakuchi M, Asamoto M, Imaida K, Tatematsu M, Shirai T. Establishment of rat hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential in nude mice. *Int J Cancer* 2001; 91: 797-802
- 13 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 630-636
- 14 Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye SL, Liu YK, Tang ZY. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive *in vivo* selection and studies on metastatic characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 460-468
- 15 Gu Y, Zhu CF, Iwamoto H, Chen JS. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6512-6517
- 16 Yang J, Qin LX, Li Y, Ye SL, Liu YK, Gao DM, Chen J, Tang ZY. Molecular cytogenetic characteristics of the human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 with high metastatic potential: comparative genomic hybridization and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158: 180-183
- 17 Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6269-6276
- 18 Li Y, Tang Y, Ye L, Liu B, Liu K, Chen J, Xue Q. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through *in vivo* selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 43-51
- 19 Li Y, Tang Z, Ye S, Liu Y, Chen J, Xue Q, Huang X, Chen J, Bao W, Yang J, Gao D. Establishment of human hepatocellular carcinoma cell line with spontaneous pulmonary metastasis through *in vivo* selection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 601-605
- 20 Su ZJ, Chen HB, Zhang JK, Xu L. Effects of dendritic cells from cord blood CD34+ cells on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402 *in vitro* and in SCID mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2502-2507
- 21 Elinav E, Abd-Elnabi A, Pappo O, Bernstein I, Klein A, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice via leptin, is associated with inhibition of tumor cell growth and natural killer cell activation. *J Hepatol* 2006; 44: 529-536

■同行评价

1995年《中华医学杂志》、1998年《中华外科杂志》、2004年《第四军医大学学报》等都有人肝癌裸鼠移植模型的单一方法学研究报告,但综述不多,本文的刊出对于临床实验有一定的指导意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰