

Orthotropic Transplantation to Establish H22 Hepatocellular Carcinoma Model in Mice

Chen Han^{1,2}, Hengxiao Wang^{1,2*}, Zhaoxia Wang³

¹Department of Immunity, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan

²School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan

³Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan

Email: *wanghengxiao@aliyun.com

Received: Nov. 24th, 2014; revised: Dec. 22nd, 2014; accepted: Dec. 30th, 2014

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To establish a liver orthotropic transplantation tumor model with H22 cells, for the further development of the related experimental study. **Methods:** A certain number of H22 cells were directly injected in the left lobe of the liver in C57BL/6 mice, establishing a transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma *in situ*. **Results:** After 7 days of surgery, the liver surface appeared irregular size nodules, nodules increased with the prolongation of time increases, the late abdominal organs appeared invasion, adhesion, ascites was increased. Histopathological examination of liver tumor tissues and adjacent tissues of cancer showed that liver orthotropic transplantation tumor formation rate was 100%, no spontaneous regression. **Conclusions:** Orthotropic injection of H22 cell established orthotropic transplantation tumor formation in the liver, and the tumor formation time was relatively short, tumor formation processes associated with organ metastasis and ascites. This model was reasonable to simulate the pathological and physiological body of liver cancer in human, and could satisfy the requirement of research on liver cancer.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Orthotropic Transplantation, Experimental Animal Models

原位移植法建立肝脏H22肝癌细胞移植瘤小鼠模型

韩琛^{1,2}, 王恒孝^{1,2*}, 王朝霞³

*通讯作者。

¹山东省医学科学院基础医学研究所免疫室, 济南
²济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 济南
³山东省医学科学院基础医学研究所病理室, 济南
Email: [*wanghengxiao@aliyun.com](mailto:wanghengxiao@aliyun.com)

收稿日期: 2014年11月24日; 修回日期: 2014年12月22日; 录用日期: 2014年12月30日

摘要

目的: 建立H22肝癌细胞小鼠肝脏原位移植瘤模型, 为进一步开展相关实验研究做准备。**方法:** 直接注射一定数量的H22肝癌细胞于C57BL/6小鼠肝脏左叶, 构建肝癌原位移植瘤模型。**结果:** 术后7天小鼠肝脏表面出现大小不一结节散在分布, 随着时间延长结节增多增大, 后期腹腔脏器出现浸润、粘连, 腹水增多。肝脏瘤组织及癌旁组织进行组织病理学检查, 肝脏原位成瘤率100%, 无自发消退。**结论:** 原位注射H22肝癌细胞株能在肝脏局部形成原位移植瘤, 且成瘤时间相对较短, 成瘤过程中伴有脏器转移、腹水形成等, 较好的模拟了机体原发性肝癌的病理生理学过程, 能满足对肝癌相关研究的要求。

关键词

肝细胞癌, 原位移植, 实验动物模型

1. 引言

建立肿瘤动物模型是研究肿瘤发病机制及开展肿瘤治疗相关研究的重要手段, 动物模型应该尽可能的接近人类肿瘤的自然生物学过程, 包括肿瘤的发生、发展、浸润和转移[1]。目前在肝癌研究中多采用异体移植法将肿瘤细胞株注射到动物皮下形成局部瘤块来构建移植瘤模型, 相比机体原发性肝癌的形成及病理生理学变化仍有一定不同。本研究通过将一定数量的 H22 肝癌细胞直接注入具有完全免疫能力的 C57BL/6 小鼠肝脏实质, 观察其原位移植瘤成瘤的过程及状态, 能较好的模拟人体肝癌生长过程, 为进一步抗肝癌免疫研究提供实验动物模型。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验动物

雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 6~8 周龄, 体重 (20±2) g, 购自山东大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK(鲁)20090001, 饲养于山东省医学科学院基础研究所实验动物房 IVC(智能型独立送回风净化笼具)中, 动物在室温(22±2)℃、相对湿度 50%条件下自由摄取食水, 两周后开始试验。鼠源性 H22 腹水型肝癌细胞株由本室在液氮中长期保存。

2.1.2. 主要试剂

无菌生理盐水, 磷酸盐缓冲液(PBS), 水合氯醛, 10%中性甲醛。

2.2. 方法

2.2.1. 复苏细胞株腹腔接种

自液氮罐中取出冻存管, 在 38℃温水中快速摇动使细胞融化, 吸取细胞悬液至无菌生理盐水中混匀,

1000 rpm/min, 离心 5 分钟, 弃去上清, 用无菌生理盐水重悬细胞, 调节细胞浓度至 1×10^7 /mL。碘伏消毒 C57BL/6 小鼠腹部皮肤, 采用 1 ml BD 注射器抽取 0.2 ml 细胞悬液腹腔注射小鼠, 约一周后形成腹水。无菌抽取腹水进行传代, 采用第 3 代传代细胞进行肝脏注射。

2.2.2. 小鼠肝癌原位移植瘤模型的建立

无菌抽取腹腔接种 H22 肝癌细胞株的小鼠腹水, 加入 PBS 液混匀, 1000 rpm/min, 离心 5 分钟, 弃去上清, 反复 PBS 洗涤、离心 2 次。无菌生理盐水重悬细胞, 显微镜下细胞计数, 经台盼蓝染色法检测细胞存活率 >95%, 调节细胞浓度至 1.2×10^7 /mL, 置于冰上待用。采用 5% 水合氯醛(0.6 ml/100 g)小鼠腹腔注射进行麻醉, 取仰卧位, 固定于实验板上, 碘伏消毒皮肤, 剑突下沿腹中线纵行切口, 逐层剪开皮肤和腹膜, 充分暴露肝左叶。用 50 μ L 微量注射器抽取 50 μ L H22 细胞悬液(含细胞数 6×10^6 个), 20°角刺入肝脏实质约 0.5cm 缓慢注入细胞悬液, 停留片刻, 注射完毕拔出针头, 立即用无菌纱布轻压针孔至肝脏表面不再渗血, 逐层关腹。术后继续饲养, 自由进食、进水。

2.3. 观察指标及方法

2.3.1. 肿瘤移植的观察

分别于术后 7 天、14 天、21 天处死 7 只小鼠, 肉眼观察移植瘤的大体形态及与周围器官粘连、腹水形成情况。

2.3.2. 组织病理学检查

肝脏肿瘤组织经 10% 中性甲醛固定, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 4 μ m 连续切片, HE 染色, 在光学显微镜下进行病理检查。

2.3.3. 荷瘤小鼠的自然生存期观察

9 只荷瘤小鼠未进行任何干预处理, 观察自然生存期及肿瘤的自发消退率。

2.4. 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差表示, 利用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

3. 结果

3.1. 小鼠原位移植瘤模型建立

术后 7 天、14 天、21 天处死小鼠, 观察均形成肝原位瘤, 肝原位成瘤率为 100%(30/30), 肿瘤自发消退率为 0 (0/30), 无手术相关死亡。荷瘤小鼠自然生存期为 21~28 天。

3.2. 组织病理分析

术后 7 天处死 7 只小鼠, 取出肝脏进行观察, 肉眼可见 7 只小鼠肝左叶均出现散在 0.5~2.5 mm 乳白色点状结节。术后 14 天处死 7 只小鼠, 未见肿瘤自发消退, 乳白色结节增多, 散在分布, 且体积明显增大, 可见有 2 只出现少量淡黄色腹水, 肿瘤结节部分与腹腔脏器有轻微粘连。术后 21 天处死 7 只小鼠, 肿瘤组织呈鱼肉状, 连接成片, 与正常肝组织分界不清, 肝脏质地轻度变硬, 与腹腔胃、肠管等脏器粘连严重, 4 只形成大量腹水, 占 57.1%, 颜色呈乳白色或血色(图 1 所示)。原位移植瘤在术后第 14 天左右进入快速增殖期, 至 21 天后肿瘤体积增长速度明显加快。

光镜下观察, 正常肝小叶结构消失, 瘤细胞异型性明显, 大小不等, 形状各异, 可见瘤巨细胞, 染色质明显增多, 细胞核深染, 呈现分叶、多核等病理性核分裂, 肿瘤细胞排列紧密, 呈浸润性生长(图 2 所示)。



Figure 1. The liver on the 14 days after surgery with C57BL/6 mice orthotopic transplantation tumor
图 1. C57BL/6 小鼠肝癌原位移植术后 14 天肝脏

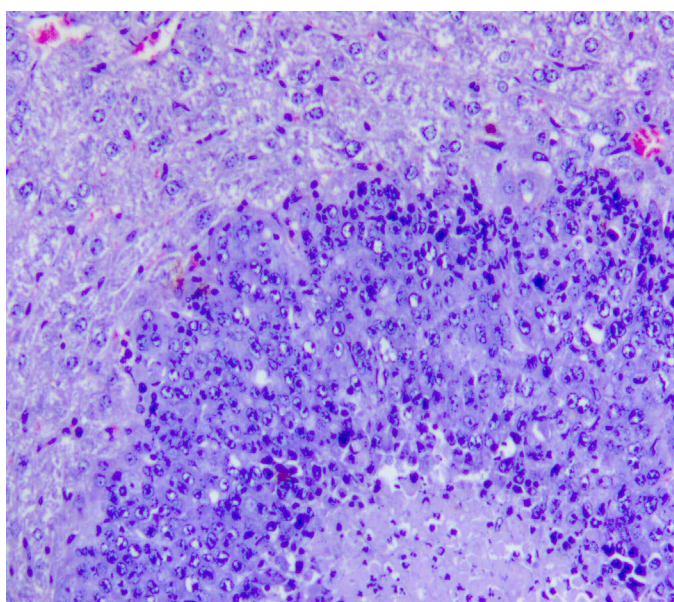


Figure 2. The tissue of C57BL/6 mice orthotopic transplantation tumor (HE \times 200)
图 2. C57BL/6 小鼠肝脏原位移植瘤组织切片(HE \times 200)

4. 讨论

原发性肝细胞癌是临床常见的恶性肿瘤之一，每年我国发病约 36 万例，死亡约 35 万例，且呈上升趋势，是仅次于胃癌和肺癌的第三大恶性肿瘤，严重影响人类健康和生活质量[2]。原发性肝癌在肿瘤形成早期因没有明显的症状而常易被忽视，患者就医时多已经处于中晚期，其治疗仍以手术切除为主，但术后易复发，各种综合治疗效果不佳[3]。肝脏被认为是机体最大的免疫器官，含大量的免疫淋巴细胞，

如 NK 细胞、NKT 细胞、T 细胞，是天然免疫反应的重要组成部分，在抗感染免疫、抗肿瘤免疫中发挥重要作用[4] [5]。通过中西医药物联合，调节机体自身免疫应答，增强抗肿瘤免疫也成为目前肝癌治疗的研究热点及临床用药靶点。

建立良好的肝癌动物模型对于模拟人体肝癌形成及抗肿瘤免疫应答研究中具有很好的替代作用。目前实验室中常用的是采用移植型肝癌模型，是指用肝癌组织或细胞移植到动物体内(肝脏、肝外组织或器官)或非肝脏来源的恶性肿瘤移植到动物的肝脏所形成的肝癌动物模型[6]。移植型模型根据移植瘤所在部位可分为原位型和异位型。异位型多见于在实验动物背部皮下注射一定量的肝癌细胞形成肿瘤，皮下瘤操作简单容易掌握，成功率高，且肿瘤体积变化易于测量，容易给予局部干预[7]。但瘤块生长过程中因肿瘤新生血管的形成不能满足瘤块组织的营养供给，在后期容易形成破溃及中心组织坏死。皮下移植瘤模型忽略了肿瘤与周围正常组织器官的相互关系[8]，局限在皮下局部，被膜相对完整，缺乏周围组织浸润及远处淋巴结转移，不能较好的模拟肝癌后期肿瘤浸润及转移的病理生理学过程，且不能完全反应机体整体免疫变化，因此具有一定的局限性[9] [10]。

原位移植法是将一定浓度的肿瘤细胞悬液或微小肿瘤组织直接接种或包埋于肝脏实质中，形成原位移植瘤。从理论上讲，原位移植模型能够更理想地模拟人体的状态，更客观地再现肿瘤发生发展和转移的过称[11]。直接注射法常用于 SD 大鼠、裸鼠等动物，对于裸小鼠文献报道选用具有先天性 T 淋巴细胞免疫缺陷的裸小鼠肝脏注射肿瘤细胞构建原位移植瘤模型易于成功[12]，但因裸小鼠免疫能力不完全，不能有效的模拟人体肝癌对机体免疫应答的影响变化。

本研究采用具有完全免疫能力的 C57BL/6 小鼠接种 H22 细胞株，弥补了裸小鼠免疫功能缺陷的不足，更好的反映了机体在发生肿瘤过程中免疫应答的过程，利于开展相关免疫功能性的研究。在本实验过程中，麻醉后暴露肝脏，注射部位明确，且注意增加按压时间，有效地避免了肝脏出血及肝癌细胞的腹腔外漏。通过术后观察发现肝脏成瘤时间相对较短，7 天即可肉眼观察到肝脏表面形成白色结节，随着时间延长，原发性肝癌的特性表现更充分，白色结节增多，在肝脏形成占位性病变，炎性细胞大量浸润，与正常肝脏组织分界不清，与腹腔其他脏器、腹膜发生粘连，形成腹水等，这些均是人体原发性肝癌发生过程中普遍存在的病理生理学过程，实验表明此模型能较好的模拟并呈现，与皮下移植瘤相比具有较大的优势，有利于开展进一步的肿瘤实验研究。

该模型在构建时熟练的外科手术操作技术是成功的关键，注意麻醉和手术无菌操作，同时还应注意以下几点：1) 细胞悬液调节合适浓度，过少则成瘤较少，过多易注射渗漏；2) 选用合适注射器，针孔过细可能发生细胞悬液堵塞影响注射，针孔过大易造成肝脏表面渗血增多；3) 肝脏质地柔软易出血，操作时动作轻柔，进针角度约为 20°进入肝实质后轻推注射器，注射完毕后缓慢拔针，并轻轻按压至无血渗出，避免细胞悬液漏入腹腔形成广泛种植转移。

基金项目

本文受国家自然科学基金青年基金资助项目(81303077)，山东省医药卫生科技发展计划项目(2013WS0369)资助。特此感谢。

参考文献 (References)

- [1] Fu, X. and Hofman, R.M. (1993) Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Research*, **13**, 283-286.
- [2] Chen, J.G. and Zhang, S.W. (2011) Liver cancer epidemic in China: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, **21**, 59-69.
- [3] Matar, P., Alaniz, L., Rozados, V., Aquino, J.B., Malvicini, M., Atorrasagasti, C., Gidekel, M., Silva, M., Scharovsky,

- O.G. and Mazzolini, G. (2009) Immunotherapy for liver tumors: Present status and future prospects. *Journal of Biomedical Science*, **16**, 30.
- [4] Emoto, M. and Emoto, Y. (2009) Intracellular bacterial infection and invariant NKT cells. *Yonsei Medical Journal*, **50**, 12-21.
- [5] Pegram, H.J., Haynes, N.M., Smyth, M.J., *et al.* (2010) Characterizing the antitumor function of adoptively transferred NK cells *in vivo*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **59**, 1235-1246.
- [6] 陶莹, 于玮等 (2012) 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型的建立. *北京医学*, **34**, 1065-1067.
- [7] 叶翩, 张淑玲, 揭盛华等 (2006) 人肝癌裸鼠移植模型的研究进展. *世界华人消化杂志*, **14**, 3500-3503.
- [8] Tang, W., He, Y., Zhou, S., *et al.* (2009) A noval *Bifidobacterium infantis*-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits anti-tumor activity in a rat model of bladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **28**, 155.
- [9] Taghian, A. and Huang, P. (1995) The nude and SCID mice as a tumor model in experimental cancer biology. *Cancer Journal*, **8**, 52-58.
- [10] 罗明华, 唐慰萍, 黄培根 (1997) 人癌裸鼠原位移植瘤模型的研究及应用进展. *广东医学院学报*, **15**, 345-349.
- [11] 李静, 邢辉, 高庆蕾等 (2003) 人卵巢癌裸鼠原位移植瘤模型的建立及其生物学特性研究. *中华妇产科杂志*, **38**, 376-378.
- [12] 白俊文, 杨成旺, 苏秉忠等 (2006) 利用 α -氰基丙烯酸烷基酯医用胶建立人肝癌裸鼠皮下-肝原位移植瘤模型的实验研究. *肿瘤研究与临床*, **18**, 442-444.

汉斯出版社为全球科研工作者搭建开放的网络学术中文交流平台。自2011年创办以来，汉斯一直保持着稳健快速发展。随着国内外知名高校学者的陆续加入，汉斯电子期刊已被450多所大中华地区高校图书馆的电子资源采用，并被中国知网全文收录，被学术界广为认同。

汉斯出版社是国内开源 (Open Access) 电子期刊模式的先行者，其创办的所有期刊全部开放阅读，即读者可以通过互联网免费获取期刊内容，在非商业性使用的前提下，读者不支付任何费用就可引用、复制、传播期刊的部分或全部内容。

