

文章编号:1005-6947(2007)07-0657-04

· 基础研究 ·

C57BL/6J 小鼠肝癌动物模型的建立

匡志鹏, 谢裕安, 杨帆, 梁安民, 罗小玲, 吴继宁

(广西肿瘤防治研究所 生物医学研究中心, 广西南宁 530021)

摘要:目的 建立 C57BL/6J 小鼠肝癌动物模型, 为深入开展肝细胞癌的实验研究打下基础。方法 取 90 只 C57BL/6J 小鼠, 联合采用二甲亚硝胺 (DEN)/四氯化碳 (CCl₄)/乙醇诱导 20 周, 观察其肝癌的发生情况。另取 10 只同种小鼠作为正常对照组。RT-PCR 法检测病变肝组织中 AFP 基因表达。结果 实验组 90 只小鼠共死亡 8 只; 病理学检查发现, 存活的 82 只小鼠中有 71 只发生肝癌, 诱癌成功率为 78.9% (71/90), 肝癌小鼠的肝癌组织学类型以中、高分化为主; 另 11 只有不同程度的药物中毒性肝炎或肝硬化 (12.2%); 对照组小鼠肝脏均未发现明显异常。成癌组中的肝癌组织 RT-PCR 检测可见 AFP 基因表达, 非肝癌组织及对照组于组织中无 AFP 表达。结论 采用 DEN/CCl₄/乙醇联合能诱导出 C57BL/6J 甲胎蛋白分泌型小鼠肝癌, 诱导时间相对较短, 癌变率高, 部分病变肝组织中伴有肝炎、肝硬化病理学改变, 是较理想的研究肝癌的实验动物模型。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(7): 657-660]

关键词: 肝肿瘤, 实验性; 疾病模型, 动物, 小鼠

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

Establishment of C57BL/6J mouse liver cancer model

KUANG Zhi-peng, XIE Yu-an, YANG Fan, LIANG An-min, LUO Xiao-ling, WU Ji-ning
(Biomedicine Research Center, Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To establish a stable primary hepatocellular carcinoma (HCC) model of C57BL/6J mice, and establish a basis for in-depth laboratory research in hepatocellular cancer. **Methods** Ninety C57BL/6J mice were induced to establish HCC models by combination of diethylnitrosamines (DEN), carbon tetrachloride (CCl₄) and ethanol for twenty weeks, then the occurrence and development of HCC were observed, and other 10 C57BL/6J mice were used as normal control (no drug was given). RT-PCR method was used to observe AFP mRNA expression in liver tissues and tumor tissues. **Results** seventy-one of 90 mice developed HCC (78.9%), cirrhosis was observed in 11 of 90 mice (12.2%), and 8 of them died of toxic hepatitis and acute hepatocellular necrosis. AFP mRNA was expressed only in liver cancer tissues. No obvious liver pathologic changes were observed in the control group. The histo-pathologic changes of HCC were high or middle differentiation. **Conclusions** An AFP-secreting C57BL/6J mouse liver cancer model was established by induction with combination of DEN, CCl₄ and ethanol in a relatively short time. The rate of cancerous change was high, and some of the hepatic changes included hepatitis and cirrhosis. This is a rather ideal animal model for the study of liver cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(7): 657-660]

Key words: Liver Neoplasm, Experimental; Disease Model, Animal, Mouse

CLC number: R735.7 **Document code:** A

小鼠自然肝癌发生的频率与种属有关^[1];

C3H/HeJ, CBA/J 等小鼠自然肝癌发生率高, 而 C57BL/6J 小鼠自然肝癌和乳腺癌发病率均较低。前两种属自然肝癌发生率约为后一种属的 50 倍。虽有学者^[2]报道用四氯化碳 (CCl₄) 和乙醇能诱发小鼠肝癌, 但成功率不高, 却在诱癌过程中死亡率很高。因此诱发 C57BL/6J 小鼠肝癌,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360114)

收稿日期: 2007-05-19; **修订日期:** 2007-07-11。

作者简介: 匡志鹏, 男, 湖南祁东人 广西肿瘤防治研究所生物医学研究中心副教授, 主要从事肿瘤免疫与基因治疗方面的研究。

通讯作者: 谢裕安 E-mail: xieyuan6411@yahoo.com.cn

目前还没有成熟的经验可借鉴。据报道,单纯应用二甲基亚硝胺(DEN)在20周内能成功诱发大鼠肝癌^[3-5],但本研究在预实验中发现,单纯DEN并不能诱发出C57BL/6J小鼠肝癌,而且可能同时诱发出肝、肺和消化道等多种肿瘤。为此,笔者参考文献并作改良,采用DEN/CCl₄/乙醇联合诱导,以期建立稳定的AFP分泌性C57BL/6J小鼠肝癌动物模型,为了解肝癌的自然发生发展过程及开展肝癌的基因治疗提供实验模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J 雄性健康小鼠:6~8周龄,体重23~28g,购自四川医学科学院实验动物研究所,符合国标GB14922-94 SPF级质量标准。所有动物实验均符合四川医学科学院实验动物研究所管理委员会动物管理和使用的有关标准执行。

1.1.2 主要试剂 DEN和CCl₄购自天津化学试剂研究所;乙醇和橄榄油购自北京化学试剂公司;苏木精、伊红为上海化学试剂厂产品,多聚甲醛购自天津;Trizol和M-MLV购自Invitrogen公司;Pyrobest DNA polymerase和Oligao(dT)15购自TaKaRa公司。

1.2 实验方 法

1.2.1 诱癌方法 参考有关文献^[2-3],并作了改进。将动物随机分为2组,即实验组90只和对照组10只。实验组小鼠首先用DEN1次腹腔注射100mg/kg(生理盐水配制);3d后开始以CCl₄和橄榄油(配制体积比20:80)灌胃,0.05mL/10g,2次/周;第3周再次腹腔灌注DEN1次(50mg/kg),同时开始给予含有9%乙醇的饮用水。第4周开始加大CCl₄剂量至0.08mL/10g。实验期间喂以小鼠颗粒饲料。对照组小鼠仅以小鼠颗粒饲料喂养,并自由饮用灭菌普通水。观察两组小鼠的生长情况,精神食欲改变及体重等变化。连续20周后处死全部小鼠。

1.2.2 标本的收集与处理 取实验组肝癌组织及对照组正常肝组织,用3%中性多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,制成5μm厚的连续切片;苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察。另留取小块新鲜肝

肿块组织和正常肝组织快速冷冻,用于检测小鼠甲胎蛋白(AFP)分子的表达。

1.2.3 AFP基因表达的检测 从肿块远端正常肝组织(距离癌肿20mm以上)和小鼠肝癌组织中分别抽提总RNA,操作按Trizol试剂说明进行。AFP扩增引物为:上游引物5'-CTGGCGATGGGTCTTAG-3';下游引物5'TGTTGTTGCTGGAGGT-3'(由北京赛百盛生物工程公司合成),预计目的片段474bp。扩增条件:94℃4min,94℃30s,56℃45s72℃2min;30个循环后72℃延伸5min,1%琼脂糖凝胶电泳观察并照相。

2 结 果

2.1 小鼠肝癌发生情况

实验组90只小鼠在诱癌过程中死亡8只,主要发生在头1~2个月。死亡小鼠早期主要病理表现为肝脏充血、出血、水肿、大量炎细胞浸润、肝细胞变性坏死明显、部分肝纤维组织增生。实验过程中,对照组10只小鼠饮食及精神状态均无异常,平均体重有所增加(27.45g)。而实验组在不同时期有不同程度的食欲减退,体重下降(平均体重23.76g),精神状态不佳。

20周处死小鼠时发现,对照组心、肺、肝、脾、肾等均无异常;82只存活小鼠有71只(86.6%)发生了肝癌,诱癌成功率为78.9%(71/90)。71只中59只(83.1%)的肿瘤呈多灶性病变,肝脏表面肉眼可见散在1.5~2.5mm左右的细颗粒状灰白色斑点,肝脏质地轻度变硬,较大的单个结节直径可达25mm,质硬。检查肺、肾、心、胰腺、肠、纵隔及腹腔淋巴结,未发现明显转移灶(附表)。镜下显示均为中、高分化肝细胞癌(HCC)(图1-2);细胞排列结构紊乱,染色质明显增粗,细胞大小、形状各异,可见瘤巨细胞和病理性核分裂。另11只虽未成癌,但出现了不同程度的药物性肝炎,肝纤维化,肉眼观,肝脏可见粟粒样灰白色斑点,部分可见表面凹凸不平;镜下表现为不同程度的肝细胞点状坏死,充血,大量淋巴细胞浸润或肝细胞非典型增生,胆管上皮细胞增生明显,可见假胆管,部分肝小叶结构改建,小叶周边肝纤维组织增生,提示有肝硬化改变(图3-4)。

附表 实验组C57BL/6J小鼠肝癌发生情况(n=90)

病变性质		HCC 肿块平均直径(cm)		HCC 肿块个数		肝外侵犯	死亡例数(%)
HCC 例数(%)	非 HCC 例数(%)	≤1.0 例(%)	≥1.0 例(%)	≤2 例(%)	≥3 例(%)		
71(78.9)	11(12.2)	58(81.7)	13(18.3)	12(16.9)	59(83.1)	0	8(8.9)

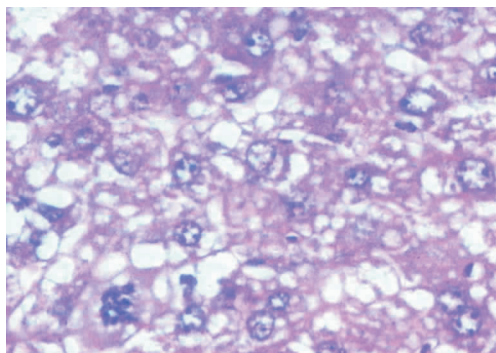


图1 高分化肝细胞癌,可见病理性核分裂(HE×400)

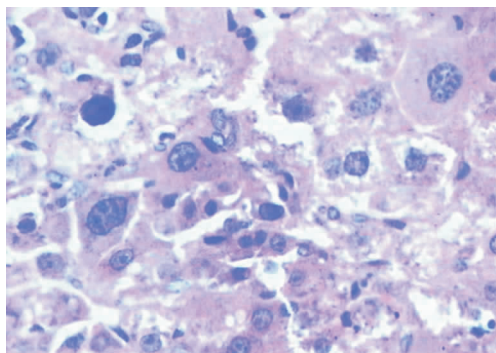


图2 中分化肝细胞癌,细胞分化程度中等,细胞异型性明显,可见瘤巨细胞(HE×400)

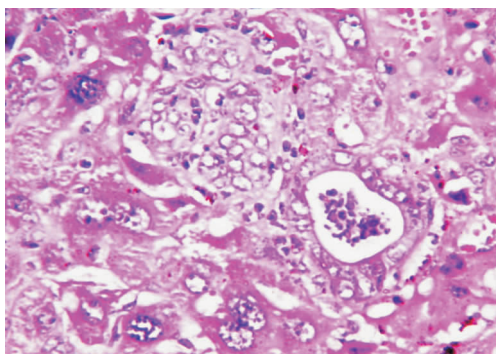


图3 早期肝硬化,部分胆小管上皮细胞高度增生,假胆管形成(HE×400)

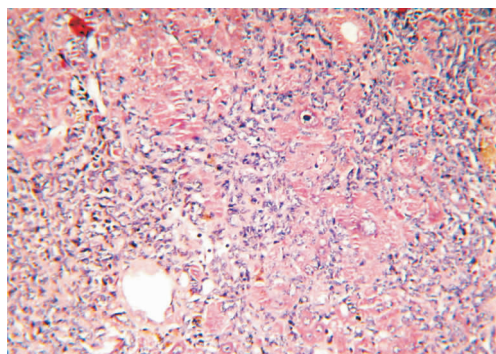


图4 肝硬化病变,肝脏大量纤维结缔组织增生,肝小叶结构破坏(HE×100)

2.2 肝癌组织中 AFP 的表达

逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测发现,成癌的 71 只 C57BL/6J 小鼠肝癌组织中可检测到高水平的 AFP mRNA 的表达(图 5),而肿瘤远端的肝组织无 AFP 基因表达。

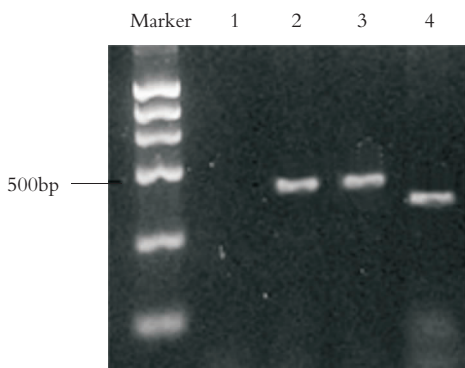


图5 AFP 基因表达检测 1:小鼠癌远端正常肝组织,无 AFP mRNA 表达;2,3:小鼠肝癌组织,可见 AFP mRNA 表达(474bp);4:内参照

3 讨论

肝癌动物模型是进行肝癌实验研究的最基本

条件。自 20 世纪初获得小鼠自发性肝癌模型以来,对肝癌动物模型的研究不断深入,逐步建立了动物自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植性动物肝癌模型、人类肝癌的异种移植模型以及转基因动物肝癌模型^[6-9]。其中自发性肝癌模型仍然是其他模型不可替代的,因为该种模型与人的肝癌发生过程比较相似,经历了从肝炎、肝纤维化、非典型增生到肝癌的相似阶段,因而对于开展人肝癌的研究有着重要的意义。

DEN 已经较成功地用于诱导大鼠肝癌,而且比较特异地局限于肝脏^[3-4]。笔者等在预实验中发现,DEN 除了诱发出小鼠肝癌外,还可见胃肠道、腹腔和肺等都有肿瘤形成,因而肿瘤的来源很难界定。CCl₄ 可造成动物肝损伤,目前认为主要是与 CCl₄ 自身和其自由基代谢产物有关。CCl₄ 自身的溶酶作用可导致肝细胞损伤,其主要物质自由基 CCl₃ 是造成肝损伤的主要机制^[1,5]。CCl₄ 还可激活肝星状细胞并导致胶原纤维沉积,因而造成肝纤维化。长期给予乙醇也可造成肝损伤,包括脂肪肝、肝纤维化和肝癌等。若单独使用某种诱癌药物则剂量过大,容易引起急性功能损害、急性肝坏死和心肺功能损伤,极易导致动物

死亡。小剂量长期诱癌虽可产生致癌效果,但自然肝癌诱癌周期太长,有的可长达1年余,而小鼠的自然寿命只有2年多,因此不利于开展肝癌研究。为了能快速、稳定地建立小鼠肝癌动物模型,笔者采用三者联合,通过调节剂量和改良给药方法,在20周内诱导出了AFP分泌性肝癌,同时最大限度地减少在诱癌过程中小鼠的病死率。这对于建立稳定的小鼠肝癌模型至关重要。

性别和诱癌敏感性有一定的关系^[10]。一般认为雄性较雌性诱癌的成功率高,摘除睾丸的大鼠可明显减少肝癌的发生。提示雄激素在大鼠实验性肝癌的发生发展过程中起重要作用。本研究全部采用雄性C57BL/6J小鼠乃是基于提高肝癌的发生率,减少种群之间的差异。

本实验在诱癌过程中,诱癌组死亡8例,病死率为8.9%(8/90),与文献^[2]报道的52.2%(47/90)有较大差异。说明本实验极大地降低了小鼠在诱癌过程中的病死率,且死亡的小鼠均在头2个月之内。由于个体差异,个别小鼠对致癌药物的耐受性差。主要是由于DEN和CCl₄有较大的肝脏毒性作用,再加上乙醇对肝脏的毒性,使小鼠肝细胞出现急性重度炎症反应,肝细胞变性坏死。经调整剂量和给药方法后,诱癌后期未见小鼠死亡。本研究经过20周的DEN/CCl₄/乙醇联合诱癌,90只小鼠中,71只出现了典型的肝癌病灶,诱癌成功率为78.9%(71/90),另11只出现不同程度的慢性药物中毒性肝炎和/或肝硬化病变,故如继续诱癌可能进展为HCC。实验组的不同动物的病理学检查发现,肝脏的病变包括肝炎,肝硬化,非典型增生及肝癌四种主要病理变化,但是否为序贯发生仍有待进一步实验证实,需分期分批杀鼠观察其诱癌过程中不同阶段的病理变化。

本研究还发现,所有肝癌组织中均有AFP基因高表达,而在正常小鼠肝组织中不表达。故认

为,本实验成功建立了DEN/CCl₄/乙醇诱发的C57BL/6J小鼠甲胎蛋白分泌型肝癌模型,且与人类肝癌的发生发展过程非常相似,癌变率高,且83.1%(59/71)的肿瘤呈多灶性,未见肝外转移。该诱癌方法简单易行,模型稳定,为后续研究靶向性转基因树突状细胞瘤苗对原发性肝癌自然发生发展的影响打下基础。

参考文献:

- [1] 刘克辛. 肝疾患基础及其实验动物模型[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 44-81.
- [2] 徐新保, 冷希圣, 杨晓, 等. 一个新的原发性肝细胞癌模型的建立及相关基因表达测定[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(8): 931-934.
- [3] 姜幼纯, 董奇男, 肖邦良, 等. 非坏死剂量二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的研究[J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(4): 555-558.
- [4] 张立新, 史景泉, 卞修武, 等. DEN诱发大鼠肝癌变的病理形态与细胞增殖活性的定量研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 304-307.
- [5] 郝光荣. 实验动物学[M]. 第2版. 上海: 第二军医大学出版社, 2002. 201-213.
- [6] Thorgeirsson SS, Facotr VM, Snyderwine EG. Transgenic mouse models in carcinogenesis research and testing[J]. Toxicol Lett, 2000, 112(113): 553-555.
- [7] Li Y, Tian B, Yang J, et al. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(8): 460-468.
- [8] Yang JH, You TG, Li N, et al. Relationship between the imaging features and pathologic alteration in hepatoma of rats[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(1): 69-72.
- [9] Ha WS, Kim CK, Song SH, et al. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat; development of hepatotumorigenesis[J]. J Vet Sci, 2001, 2(1): 53-58.
- [10] Nakatani T, Roy G, Fujimoto, et al. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuporelin[J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92(3): 249-256.