

裸鼠皮下种植性肝癌模型的建立☆

白建华^{1,2}, 李立², 李晓延², 陈刚², 朱新锋²

Establishment of nude mouse models of subcutaneously implanted hepatocellular carcinoma

Bai Jian-hua^{1,2}, Li Li², Li Xiao-yan², Chen Gang², Zhu Xin-feng²

Abstract

BACKGROUND: There have been more reports describing subcutaneous implantation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells into BALB/c nude mice to induce hepatocellular carcinoma, but little is known about the stability after tumor formation.

OBJECTIVE: To establish nude mouse models of stable subcutaneous hepatocellular carcinoma.

METHODS: 1.5×10^6 Huh7 hepatocellular carcinoma cells were subcutaneously implanted into nude mice. After tumor formation, hepatocellular carcinoma stability and pathological characterization were performed in terms of body mass, gross anatomy, and tumor growth by reverse transplantation-polymerase chain reaction, hematoxylin-eosin staining, and immunohistochemical staining.

RESULTS AND CONCLUSION: The latency of tumor formation was about 12 days, and success rate of tumor formation was 92.8%. In the tumor group, the body mass of nude mice was less compared with the control group, tumor developed rapidly, α -fetoprotein gene and protein expression was strongly positive, and hepatocellular carcinoma cells divided obviously. These findings suggest successful establishment of nude models of subcutaneously implanted hepatocellular carcinoma.

Bai JH, Li L, Li XY, Chen G, Zhu XF. Establishment of nude mouse models of subcutaneously implanted hepatocellular carcinoma. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(44): 8255-8258. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前采用 Huh7 肝癌细胞在 BALB/c 裸小鼠皮下种植性成瘤的报道较多, 但对其成瘤后稳定性的研究较少。

目的: 建立稳定的皮下种植性裸鼠肝癌模型。

方法: 取 1.5×10^6 个对数期细胞 Huh7 肝癌细胞, 种植于裸鼠皮下。成瘤后从体质量、大体形态, 肿瘤生长情况, 反转录-聚合酶链式反应, 苏木精-伊红染色及免疫组织化学多方面进行稳定性及病理学特征鉴定。

结果与结论: 肿瘤形成的潜伏期约 12 d, 肿瘤成功率为 92.8%。种植肿瘤组小鼠体质量较正常对照小鼠明显减轻, 肿瘤生长迅速, 甲胎蛋白基因及蛋白强阳性表达, 细胞分裂明显。表明成功建立了稳定的裸鼠皮下种植性肝癌模型。

关键词: 肝癌模型; Huh7; 裸鼠; 肿瘤; 甲胎蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.44.022

白建华, 李立, 李晓延, 陈刚, 朱新锋. 裸鼠皮下种植性肝癌模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(44): 8255-8258. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

原发性肝癌是最常见的肿瘤之一, 占中国肝细胞癌的91.5%, 其病死率为20.4/10万, 占恶性肿瘤的18.8%。中国每年约11万人死于肝癌占世界肝癌死亡人数的45%^[1]。且大多数患者发现时已经为中晚期, 失去了手术的机会, 且其对化疗及放疗不敏感, 预后极差, 因此寻找一种有效的非手术治疗方法成为当今一个热点。肝癌动物模型是进行肝癌实验研究的重要平台和手段^[2]。裸鼠皮下种植性肝癌模型是研究人类肿瘤生物特性及肿瘤治疗常用的实验模型, 适用于异种动物组织的移植和人类肿瘤异种移植。这种模型可以保持原发肿瘤本身所具有的形态特征和遗传性, 为肝癌的研究提供了良好的模型, 已成为体内研究恶性肿瘤生物学特性和筛选抗癌药物的理想工具^[3]。

人肝癌-裸鼠模型被认为是目前实验中最能反映人类肝癌生物学特性的“活试管”^[2], 本实验于裸鼠皮下种植Huh7肝癌细胞, 成瘤后经苏木精-伊红染色, 免疫组织化学及RT-PCR等方法进行模型的鉴定, 为进一步的实验建立稳定的肝癌模型。

1 材料和方法

设计: 建立稳定的裸鼠皮下种植性肝癌模型。

时间及地点: 于2011-02/04在昆明医学院无特定病原体(SPF)级实验室完成。

材料: 4~6周龄雄性BALB/c裸小鼠20只, 体质量17~22g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2006-0009。Huh7肝癌细胞购于昆明中科院动物研究所。

¹Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China; ²Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Kunming First People's Hospital, Kunming 650011, Yunnan Province, China

Bai Jian-hua☆, Studying for doctorate, Physician, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China; Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Kunming First People's Hospital, Kunming 650011, Yunnan Province, China jianhuabai3448@sina.com

Correspondence to: Li Li, Doctor, Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Kunming First People's Hospital, Kunming 650011, Yunnan Province, China ynkmlili@yahoo.com

Received: 2011-05-16
Accepted: 2011-06-15

¹昆明医学院, 云南省昆明市 650031; ²昆明市第一人民医院肝胆胰外科, 云南省昆明市 650011

白建华[☆], 男, 1980年生, 山西省大同市人, 汉族, 昆明医学院在读博士, 医师, 主要从事肝胆胰外科及肝移植研究。jianhuabai3448@sina.com

通讯作者: 李立, 博士, 昆明市第一人民医院肝胆胰外科, 云南省昆明市 650011 ynkmlili@yahoo.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)44-08255-04

收稿日期: 2011-05-16
修回日期: 2011-06-15
(20110503029/GW · S)

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
反转录试剂盒	MBI Fermentas
PCR 引物	上海生工合成
rabbit anti AFP 一抗	epitomics
HRP 标记 羊抗兔二抗	KPL
PCR 扩增仪、电泳槽	美国 Bio-Rad 公司

甲胎蛋白引物: F: 5'-GTT GCC AAC TCA GTG AGG AC-3'; R: 5'-AGC TTG GCA CAG ATC CTT A-3'; β -actin 引物: F: 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3'; R: 5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT-3.

实验方法:

Huh7细胞培养: 将复苏的Huh7细胞接种在含体积分数10%胎牛血清, 青霉素、链霉素各100 U/mL的DMEM培养基中, 置37 °C、体积分数5%CO₂、相对湿度90%的培养箱中培养, 细胞生长良好, 呈单层贴壁生长。传代时用0.25%胰蛋白酶消化, 倒置显微镜下观察, 细胞形态良好。

Huh7细胞细胞传代: 传代前24 h换培养液1次, 镜下观察80%~90%细胞融合后, 倒出原培养液, PBS冲洗一二次, 于培养瓶中加入约1 mL 0.25%胰蛋白酶, 使其完全覆盖瓶内细胞生长面。并轻微摇晃培养瓶使消化液与细胞充分接触, 置37 °C的培养箱中预热1~3 min, 倒置显微镜下观察细胞已离开瓶壁、细胞已基本呈游离状态, 以吸管吸取细胞培养液加入培养瓶, 以终止消化。

建立种植性裸鼠肝癌模型^[4]: 取BALB/c裸小鼠14只。取第4~6代对数期肝癌细胞胰酶消化后, 离心5 min, 1 000 r/min, 弃掉培养液, 生理盐水重悬并计数, 调整细胞浓度为1.0×10¹⁰L⁻¹, 抽取细胞悬液150 μ L(1.5×10⁶个), 接种于裸鼠颈背部皮下。

肿瘤的观察和测量: 裸鼠接种完毕后, 置恒温(25±2) °C、恒湿45%~50%、无菌净化屏障系统内饲养, 取6只成瘤裸鼠, 分别于种植后第15, 18, 24, 30天测量肿瘤的最长径a和最短径b, 根据公式计算肿瘤体积, 计算公式V= $\pi ab^2/6$ (V: 体积, a: 肿瘤长径, b: 肿瘤短径), 绘制裸鼠瘤体体积-时间曲线。取6只对照组(不做任何处理)及6只成瘤裸鼠(实验组), 分别于第13, 15, 18, 24, 30天称两组裸鼠体质量。

RT-PCR检测甲胎蛋白基因表达:

总RNA提取: 取约100 mg肝癌组织, 放入

1 mL Trizol溶液中, 进行匀浆, 室温静置5 min。每1 mL Trizol中加0.2 mL氯仿。盖紧样品管盖, 用手用力摇晃试管15 s, 使其充分混匀, 室温静置5 min。后12 000 r/min离心15 min。将上层水相转入新的1.5 mL EP管中, 加入0.5 mL异丙醇, 混匀后, 室温放置10 min。12 000 r/min离心10 min。倒掉上清, 留取沉淀。加1 mL现配的体积分数75%的乙醇(预冷)振荡洗涤RNA沉淀1次, 后8 000 r/min离心5 min。小心倒掉上清, 室温干燥RNA 5~10 min。再在管中加30 μ L的DEPC水溶解, 在55~60 °C下孵育5 min助溶。提取的RNA保存于-70 °C超低温冰箱中, 或立即用于反转录。

反转录: ①反应体系: RNA 2 μ L, oligoT 1 μ L, DEPC水9 μ L, RevertAid™ Reverse Transcriptase 1 μ L, RiboLock™ RNase Inhibitor 1 μ L, 5X Reaction Buffer 4 μ L, dNTP Mix, 10 mmol/L 2 μ L, 轻轻混匀并离心。②反转录条件: 42 °C 60 min, 70 °C 5 min终止反应。反转录产物存贮于-20 °C或立即用于PCR。

PCR: ①反应体系: 在冰上加入下列试剂: buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP 1 μ L, 引物F 1 μ L, 引物R 1 μ L, cDNA 2 μ L, Taq酶0.2 μ L 加水至25 μ L, 轻轻混匀并离心。②PCR条件如下: 最初变性 95 °C 1 min 1个循环; 变性: 95 °C 30 s 30个循环; 退火: 60 °C 30 s 30个循环; 延长: 72 °C 45 s 30个循环; 最终延长: 72 °C 5 min 1个循环; 终止反应: 4 °C 5 min。

DNA琼脂糖凝胶电泳: 配制2%琼脂糖凝胶(含溴己淀), 电泳液盖住凝胶, 电压100 V, 时间30 min。

病理组织学检查: 肿瘤细胞接种后12 d, 脱臼处死6只成瘤裸鼠。①苏木精-伊红染色: 取肿瘤组织大小约0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm, 固定于体积分数10%甲醛溶液中, 石蜡包埋, 组织切片, 常规苏木精-伊红染色, 组织病理检查。②免疫组织化学检测甲胎蛋白的表达。裸鼠移植瘤组织, 免疫组织化学检测甲胎蛋白的表达, 阳性细胞呈现胞浆及膜棕黄色着染。

统计学分析: 应用统计软件SPSS 13.0进行统计分析, 两组裸鼠体质量比较采用两样本t检验, 以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 皮下种植性裸鼠肝癌肿瘤体积-时间生长曲线 见图1。

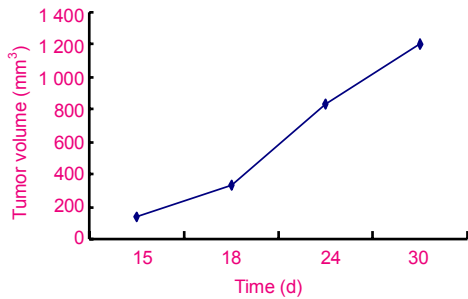


Figure 1 Volume-time growth curve of subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma
图1 裸鼠皮下种植 Huh7 肝癌细胞肿瘤体积时间生长曲线

种植15, 18, 24, 30 d后, 裸鼠皮下种植HUH7肝癌细胞肿瘤体积分别为(135.0±28.7), (372.9±134.3), (800.1±203.0), (1 198.5±311.3) mm³。

肿瘤细胞悬液接种法, 需待细胞增殖达一定数量时, 才能在裸鼠皮下观察到肿瘤, 因此肿瘤的出现有一定的潜伏期, 且因肿瘤类型、注射量的不同而不同。实验每只裸鼠接种Huh7肝癌细胞 1.5×10^6 个, 肿瘤形成的潜伏期约为12 d, 皮下成瘤率为92.8%(13/14)。

2.2 正常对照组与皮下种植Huh7肝癌细胞裸鼠体质量的变化 正常对照组与皮下种植Huh7肝癌细胞裸鼠体质量分别为(23.87±0.71), (22.55±1.97) g。两组相比, 差异有显著性意义($P=0.004 < 0.05$)。

2.3 RT-PCR检测裸鼠皮下种植瘤甲胎蛋白表达结果 总RNA的提取 RNA电泳出现3条清晰条带, $A_{260nm}/A_{280nm}=1.92$ 。DNA琼脂糖凝胶电泳在正确的位置显示出良好的条带, 见图2, 3。

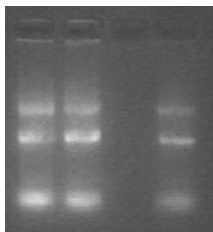


Figure 2 Total RNA expression of nude mice subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma
图2 裸鼠皮下 Huh7 肝癌细胞种植瘤总 RNA 的表达

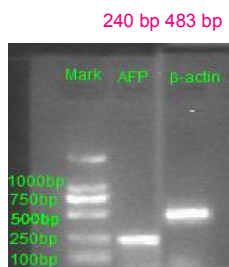


Figure 3 Alpha-fetoprotein expression of nude mice subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma
图3 裸鼠皮下 Huh7 肝癌细胞种植瘤甲胎蛋白表达

2.4 裸鼠皮下Huh7肝癌细胞种植瘤病理学特征

大体形态: 在裸鼠接种的12 d左右, 颈背部可见到蓝紫色肿块, 质地软, 活动度好, 脱臼处死裸鼠后大体可见肿瘤组织呈暗红色, 与皮肤不粘连, 部分肿瘤中心有坏死现象, 见图4。



Figure 4 Picture of nude mice subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma
图4 裸鼠皮下 Huh7 肝癌细胞种植成瘤图片

苏木精-伊红染色: 光镜下可见肿瘤细胞核呈圆形和椭圆形可见多核细胞, 分裂相多见, 呈异质性, 胞浆较少, 略嗜伊红, 细胞质少见, 见图5。

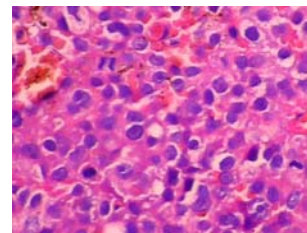


Figure 5 Hematoxylin-eosin staining after nude mice subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma (x400)
图5 裸鼠皮下 Huh7 肝癌细胞种植成瘤苏木精-伊红染色 (x400)

免疫组织化学检测甲胎蛋白的表达: 甲胎蛋白表达于胞浆及细胞膜, 呈棕黄色, 见图6。

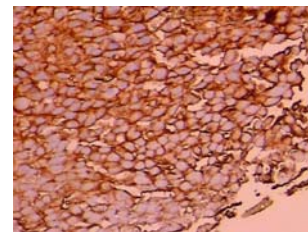


Figure 6 Alpha-fetoprotein expression after nude mice subcutaneously implanted Huh7 hepatocellular carcinoma (Immunohistochemical staining, x200)
图6 裸鼠皮下 Huh7 肝癌细胞种植成瘤后甲胎蛋白的表达 (免疫组织化学染色, x200)

3 讨论

由于原发性肝癌不易被早期诊断, 进展迅速, 术后容易复发、转移, 因此预后较差, 具有极高的发病率和

肿瘤相关死亡率^[5-8],且在全球包括西方肝细胞肝癌发病率在不断上升^[9],现为世界上排名第5位的常见恶性肿瘤^[10]。传统的化疗、放疗对肝癌疗效欠佳,目前仍缺乏行之有效的化学预防和治疗靶位,因此有必要寻找新的治疗手段。建立一个合适的动物肝癌模型对于探索人类肝癌治疗新方法有很大的价值^[11]。

移植性肝癌模型是指把肝癌组织块(来源于动物或人)、肝癌细胞株或非肝脏来源的恶性肿瘤(乳腺癌,结肠直肠癌等)接种于实验动物体内所形成的荷肝癌动物模型。主要包括同种移植(模型动物之间)和异种移植(人和裸鼠之间)两种^[12]。①移植性大鼠肝癌模型:此种模型一般只能用于同种动物间的肿瘤移植。②移植性小鼠肝癌模型:移植性小鼠肝癌模型远少于移植性大鼠肝癌模型,但小鼠饲养方便,操作简单,更适用于药物筛选及较大规模的实验性治疗。③裸鼠人肝癌移植模型:将人肝癌细胞株或肝癌组织块直接移植到裸鼠体内而建立的模型,属于人鼠异种移植。裸鼠人肝癌模型的建立使得在动物身上研究人类肝癌成为可能,保留了原发人肝癌的形态和功能及分泌甲胎蛋白等特征,是最接近人的一种肝癌模型。移植部位根据实验目的和实验条件的不同可采用腹腔移植、皮下移植和肝内移植。移植瘤细胞DNA分析与染色体检查及病理形态学特征均维持来源人肝癌细胞的特征,甲胎蛋白阳性,此模型是目前研究人肝癌转移机制及抗转移治疗较为理想的高转移模型。裸鼠已成为体内研究恶性肿瘤生物学特性和筛选抗癌药物的理想工具^[3,13-16]。

裸鼠先天无毛、无胸腺、T淋巴细胞功能完全缺乏,对异种移植不产生排斥反应,因此移植肿瘤能够良好生长和传代,裸鼠肿瘤模型可作为研究恶性肿瘤的一种较为理想的模型系统^[17]。

甲胎蛋白是肝癌细胞合成的特异性很高的蛋白质,不存在于正常人器官中,但是存在于一些胎体器官、增殖的肝细胞及一些成人的癌细胞中^[18],是迄今为止发现最早而且应用最广的肝癌标志物,在临床上被认为是肝癌诊断的金标准。

本实验所制作模型是将人Huh7肝癌细胞种植到裸鼠皮下,形成裸鼠皮下移植瘤,瘤细胞悬液接种法构建肝癌模型其成功率为92.8%,且裸鼠生长状况良好。种植性肿瘤成功后,从体质量、大体形态,肿瘤生长情况,RT-PCR,苏木精-伊红染色及免疫组织化学多方面进行其稳定性及病理学特征鉴定,为肝癌的研究提供稳定的模型。两组裸鼠体重相比,成瘤组体质量明显减轻,肿瘤生长迅速。从RT-PCR及免疫组织化学证实甲胎蛋白基因及蛋白高表达,苏木精-伊红染色示细胞分裂增殖旺盛并可见部分坏死,符合恶性肿瘤的特征。目前虽然有许多皮下种植性肝癌模型报道,但是同时从体质量变化、大体形态,肿瘤生长情况,RT-PCR,苏木精-

伊红染色及免疫组织化学等多方面详细的报道不多,尤其是HuH7肝癌细胞。本实验皮下种植成瘤后,见肿瘤呈蓝紫色、质软,极似出血,当时怀疑出血,后经上述检查证实为恶性肿瘤。查阅文献未见如此详细的报道,相信此模型的详细报道将会对需要进行此方面实验的学者提供有用的价值。

4 参考文献

- [1] Chen WQ,Zou XN,Zhang SW.Shiyong Zhongliuxue Zazhi. 2008; 22(3):201-203.
陈万青,邹小农,张思维.中国肝癌死亡率地理分布分析[J].实用肿瘤学杂志,2008,22(3):201-203.
- [2] Chen Q,Sun H,Li Q. Zhonghua Shiyuan Waikexue Zazhi. 2006;23(3):377.
陈谦,孙慧,李强.医学实验肝癌动物模型的研究进展[J].中华实验外科杂志,2006,23(3):377.
- [3] She Y,Lee F,Chen J,et al.The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. Clin Cancer Res.2003; 37 73-78
- [4] Huang J,Tang T,Lin JS,et al.Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2008;18(4):403.
黄锦,唐滔,林菊生,等.靶向PEG10的siRNA真核表达载体对裸鼠肝癌移植瘤生长的影响[J].中国现代医学杂志,2008,18(4):403.
- [5] Sherman M,Klein A.AASLD single-topic research conference on hepatocellular carcinoma: Conference proceedings.Hepatology. 2004;40(6):1465-1473.
- [6] Bruix J,Sherman M.Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2005;42(5):1208-1236.
- [7] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008.J Hepatol.2008;48(suppl 1): S20-37.
- [8] Rampone B,Schiavone B,Confuorto G. Current management of hepatocellular cancer.Curr Oncol Rep.2010;12(3):186-192.
- [9] Bosch FX,Ribes J,Diaz M,et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends.Gastroenterology.2004;127(5):S5-S16.
- [10] Gomaa AI,Khan SA,Toledano MB,et al.Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis.World J Gastroenterol.2008;14(27):4300-4308.
- [11] Lee IJ,Li ZS,Lee YN,et al. Hepatocellular carcinoma model cell lines with two distinct migration modes.Biochem Biophys Res Commun. 2006;346(4):1217-1227.
- [12] Li Y,Tang ZY.Zhonghua Shiyuan Waikexue Zazhi. 2001;18(5):479-480.
李雁,汤钊猷.我国肝癌模型研究的历史和现状[J].中华实验外科杂志,2001,18(5):479-480.
- [13] Roy J,Couillard S,Gutman M,et al.A novel pure SERM achieves complete regression of the majority of human breast.Breast Cancer Res Treat.2003; 81(3):223-229.
- [14] Celinski SA,Fisher WE,Amaya F,et al.Somatostatin receptor gene transfer inhibits established pancreatic cancer xenografts. J Surg Res.2003; 115(1):41-47.
- [15] Frydman B,Blokhin AV,Brummel S,et al. Cyclopropane-containing polyamine analogues are efficient growth inhibitors of a human prostate tumor xenograft in nude mice.J Med Chem.2003;46(21): 4586-4600.
- [16] Katz MH,Takimoto S,Spivack D,et al.A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics.J Surg Res.2003;113(1): 151-160.
- [17] SITU ZQ,Wu JZ.Xian:Shijie Tushu Chubang Gongsi. 2004:205-208.
司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2004:205-208.
- [18] Ishigami S,Natsugoe S,Nakashima H,et al. Biological aggressiveness of alpha-fetoprotein (AFP)-positive gastric cancer. Hepatogastroenterology. 2006;53:338-341.

来自本文课题的更多信息一

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计,实验实施为第一、五作者,实验评估为第一、三作者,资料收集为第一、四、五作者,第一作者成文,第二作者审校,第一、二作者对文章负责。

致谢: 感谢昆明市第一人民医院检验科邵剑春老师在细胞培养及 RT-PCR 方面的指导。