

## 结肠癌肝转移模型构建方法的优化

王理, 文西年, 高华, 许新才, 李涛, 张文斌(新疆医科大学第一附属医院胃肠外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

### 文章亮点:

实验特色的改变了传统的左腹部肋缘下切口, 采用背侧正中中线旁切口进行脾脏注射切脾法成功建立操作简便的具有可重复性的结肠癌肝转移瘤模型, 为深入研究高转移高侵袭性肝转移机制提供了较为理想的动物模型; 在脾脏注射后按压 3 min, 期间用生理盐水湿润, 然后切除脾脏, 可以避免术后脾脏原位成瘤影响小鼠生存期。

### 关键词:

实验动物; 组织构建; 结肠癌肝转移; 动物模型; 脾脏注射; 切脾法; 肝转移瘤; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

### 主题词:

结肠肿瘤; 肿瘤转移; 模型; 动物; 脾切除术

### 基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2014211C036)

### 摘要

**背景:** 结肠癌转移途径主要有血行转移、腹膜转移和淋巴结转移等, 最常转移的器官是肝脏, 建立一个简单、合适的动物模型对于研究结肠癌肝转移的生物学行为、癌细胞的异质性、肿瘤转移机制至关重要。

**目的:** 通过切脾注射法建立结肠癌肝转移的动物模型。

**方法:** 将人结肠癌细胞株 HT29 孵育培养, 通过建立 BALB/c 小鼠皮下移植瘤与脾脏注射并切除脾脏相结合的方法建立结肠癌肝转移瘤模型, 观察肿瘤生长及转移情况, 肝转移瘤组织病理学变化, 以及肝转移瘤 DNA 含量和细胞周期。

**结果与结论:** 实验采用背侧正中中线旁切口进行脾脏注射切脾法成功建立了人结肠癌肝转移瘤模型, 成瘤率达 8/8(100%)。移植瘤组织切片观察显示肿瘤为腺癌 I-II 级。流式细胞术检查分析 DNA 倍体为异倍体。该模型为结肠癌转移的生物学研究提供了一个良好的技术平台。

王理, 文西年, 高华, 许新才, 李涛, 张文斌. 结肠癌肝转移模型构建方法的优化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(36):5855-5860.

## Optimizing a method of establishing colon cancer liver metastasis models

Wang Li, Wen Xi-nian, Gao Hua, Xu Xin-cai, Li Tao, Zhang Wen-bin (Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The metastasis ways of colon cancer include blood metastasis, peritoneal metastasis and lymph node metastasis. Among them, the most common metastasis organ is the liver. It is necessary to establish a simple, suitable animal model to study the biological behavior of the colon cancer liver metastasis, the heterogeneity of cancer cells, and the mechanism of tumor metastasis.

**OBJECTIVE:** To establish animal model of colon cancer liver metastasis with splenectomy injection method.

**METHODS:** Human colon cancer cell lines HT29 were cultured, and subcutaneously transplanted tumor was produced in BALB/c mice. Models of colon cancer liver metastases were established through spleen injection and excision of spleen method. The tumor growth and metastasis, the pathology of transplanted tumor, DNA content and cell cycle of the transplanted tumor were all determined.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In this study, we successfully established the model of colon cancer liver metastases through the spleen injection via the dorsal midline incision, the tumor formation rate reached 8/8 (100%). Observation of tissue slice showed that the transplanted tumor was adenocarcinoma I-II. Flow cytometry analysis results showed that DNA ploidy was heteroploid DNA. This model provides a good technical platform for biology research for colon cancer metastasis.

**Subject headings:** colonic neoplasms; neoplasm metastasis; models, animal; splenectomy

**Funding:** the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2014211C036

Wang L, Wen XN, Gao H, Xu XC, Li T, Zhang WB. Optimizing a method of establishing colon cancer liver metastasis models. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(36):5855-5860.

王理, 男, 山东省临沂市人, 满族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事消化道肿瘤研究。

通讯作者: 张文斌, 博士, 副主任医师, 新疆医科大学第一附属医院胃肠外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.36.020  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2014)36-05855-06  
稿件接受: 2014-07-09

Wang Li, Studying for master's degree, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhang Wen-bin, M.D., Associate chief physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-07-09

## 0 引言 Introduction

恶性肿瘤已经成为导致死亡的主要原因, 病死率居第1位, 其中结直肠癌病死率占恶性肿瘤的第5位。结肠癌转移途径主要有血行转移、腹膜转移和淋巴结转移等, 最常转移的器官是肝脏, 在首次入院病例中有10%–25%已合并肝转移, 并且行结肠癌根治术后肝转移率也可达到20%–25%<sup>[1-2]</sup>。目前临床上高分辨CT对于诊断直径>1 cm的肝转移病灶的敏感度及特异度仅为90%–95%<sup>[3-4]</sup>。

结直肠癌肝转移患者预后极差, 尽管现在结直肠癌的手术治疗效果较前明显提高, 但仍有近50%的患者死于肿瘤复发及肝转移, 术后5年的生存率从10%到58%不等<sup>[5-6]</sup>。因此要深入探讨结肠癌临床发病过程以及肝转移的形成机制, 建立一个简单、合适的动物模型对于研究结肠癌肝转移的生物学行为、癌细胞的异质性、肿瘤转移机制是必须的。

理想的动物模型应该能模拟人临床发病、转移及发展的所有方面, 应包括以下标准: ①肿瘤细胞需要具有活力和转移潜质。②肿瘤细胞需要能够达到并侵入肝脏组织, 最后生长成为肿瘤结节。③模型的有效性。④模型的可重复性。⑤模型的实用性。1959年, Leduc<sup>[7]</sup>首次在小鼠体内通过脾注射肿瘤细胞后成功发现并描述肝肿瘤的形成, 学者常将其描述为结肠癌肝转移模型。

此外不同模型中动物与细胞系的选择也至关重要, 普遍认为具有高转移能力的肿瘤细胞决定更高的转移率<sup>[8-10]</sup>。目前国内外学者建立的结肠癌肝转移模型主要根据注射或接种部位是否经由结肠可分为异位移植、肝内异位种植、原位移植的自发性肝转移模型和原位异种移植的肝转移模型, 还包括转基因模型的建立<sup>[11-16]</sup>。经过几十年的研究论证, 不同的建模方法都有各自的优缺点, 要根据实验者具体的实验要求和目的选择模型, 如果需要建立一个可切除的肝转移瘤, 那么就选择能产生孤立肿瘤的模式, 肝脏异位种植模型就是一个很好的选择; 如果需要建立弥漫性肝转移模型, 可进行原位异种移植在盲肠壁, 但该模型的建立对手术要求极高, 术中极易导致肠痿及腹腔种植发生; 脾脏注入法可以很好的模仿血行转移, 能达到100%的肝转移率<sup>[17-21]</sup>。

本实验将HT29细胞株接种到BALB/C小鼠皮下建立皮下移植瘤, 并稳定传代后, 行脾脏注射后切除脾脏的方法建立有效的具有可重复性的高转移高侵袭性结肠癌肝转移模型。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 细胞学体外观察实验。

**时间及地点:** 实验于2013年3月至2014年4月在新疆医科大学第一附属医院实验室完成。

**材料:**

**细胞系:** 结肠癌HT29细胞株购自中国科学院上海细胞研究所。

**实验动物:** 6–8周龄的雄性BALB/c小鼠16只, 体重18–22 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证: SCXK(新)2003-0001。所有动物研究已通过新疆医科大学第一附属医院动物实验中心伦理审查委员会审查。

结肠癌肝转移模型构建实验主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
CO <sub>2</sub> 培养箱	美国NAPCO公司
吸光度仪、ELISA酶标仪	Bio-Rad公司
流式细胞仪	美国Beckman Coulter公司
β液闪仪	300SL自动TDCR液闪计数仪, 芬兰
体积分数为10%胎牛血清、LG-DMEM培养液、RPMI 1640基础培养液	美国Gibco公司
<sup>3</sup> H-thymidine	中国科学院上海核技术开发公司
二甲基亚砜	美国Sigma公司
倒置显微镜	日本Olympus公司

### 实验方法:

**细胞培养:** 解冻人结肠癌HT29细胞株, 用生理盐水洗涤2次, 接种于含体积分数为10%新生牛血清(56 °C灭活30 min)的RPMI1640培养液中, 在37 °C, 含体积分数为5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 隔日换液, 待细胞长到铺满培养瓶底80%以上时, 胰蛋白酶消化, 细胞计数, 调整细胞浓度为每0.2 mL培养液中含有2×10<sup>7</sup>个细胞(即1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>), 观察细胞活力(锥虫蓝染色活细胞率)>95%, 备用。

**腋下法建立皮下移植瘤模型:** 6–8周龄的BALB/c小鼠8只。左手持小鼠, 用大拇指将小鼠右前肢上推, 暴露腋下接种部位, 用中指垫在小鼠身体下方让接种区域保持平整。接种部位用乙醇棉球消毒。将含有HT29细胞混悬液的1 mL注射器取锐角角度从腋下进针, 缓慢注射0.2 mL。沿皮下向背侧走形约0.5 cm后左右摆动, 轻轻回吸无回流物, 缓慢推注, 注射后缓慢拔针, 用棉签按压针眼3 min以防外漏。放置于SPF环境下自由饮食。待瘤体体积生长到1.5 cm<sup>3</sup>时切除进行原代培养, 并将原代细胞传至第3代。

**切脾法建立结肠癌肝转移动物模型:** 6–8周龄的BALB/c小鼠8只, 地西洋10 mL/kg腹腔麻醉后取俯卧位, 常规备皮消毒, 取腹背侧正中偏左侧切口, 长5–10 mm, 用无齿镊轻挑脾脏暴露脾脏下极, 取第3代皮下移植瘤细胞0.1 mL注射在脾脏被膜下(图1), 注射后可见脾脏被膜肿胀, 变白, 注射完毕后缓慢拔针, 棉签按压3 min, 结扎止血后切除脾脏, 逐层关闭腹腔。术后继续饲养于SPF环境下, 自由饮食。

**解剖学和病理组织学观察:** 待荷瘤小鼠十分羸弱时脱颈处死, 或将已经死亡的小鼠进行详细的解剖并取材, 检查肝转移及其他器官转移情况。取出肝转移瘤用体积分数为10%中性甲醛固定, 经脱水、透明、石蜡包埋、切片、

苏木精-伊红染色及封固, 光镜下观察、照相。

**流式细胞仪检测:** 调整肝转移瘤细胞浓度到 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 左右, 用1 mL冰冷的PBS洗涤离心, 800 r/min离心5 min, 离心后弃去上清液。用100  $\mu\text{L}$ 冰冷的PBS重悬后, 往细胞悬液中加入体积分数为75%乙醇200  $\mu\text{L}$ ( $-20^\circ\text{C}$ 预冷)固定1 h。加入含有碘化丙啶(终质量浓度50 mg/L)和无DNA酶污染的RNA酶(终质量浓度50 mg/L)的PBS 1 mL,  $37^\circ\text{C}$ 染色30 min-1 h, 混匀。上机用细胞周期ModFit软件作细胞DNA含量及细胞周期分析。

**主要观察指标:** 观察HT29细胞及皮下移植瘤细胞的培养情况, 经脾脏注射成瘤后小鼠的生存及成瘤情况, 肝转移瘤组织病理学变化, 肝转移瘤DNA含量和细胞周期。

**统计学分析:** 运用SPSS 17.0软件进行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组数据间的比较用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 细胞培养结果** 所培养的人结肠癌细胞株HT29细胞生长在含体积分数为10%胎牛血清、青霉素、链霉素的RPMI1640培养液中, 置于 $37^\circ\text{C}$ 含体积分数为5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养, 细胞生长良好, 少量聚团(图2)。

**2.2 皮下移植瘤模型的建立** 经腋下注射HT29细胞株建立的皮下瘤, 最初发现瘤体时间和生长到 $1.0 \text{ cm}^3$ 所需平均时间分别为7.4 d和16.6 d。大体观可见瘤体呈串珠状浸润性生长, 质硬, 易碎(图3)。

**2.3 脾脏注射肝转移瘤模型的建立** 连续观察5周, 第1, 2周实验动物活动自如, 饮食正常, 形体无改变; 2周后逐渐开始出现消瘦, 行动渐迟缓, 饮食量下降; 第4周, 小鼠行动明显缓慢, 部分小鼠无进食, 1号小鼠右下腹可触及较硬肿物, 大小为 $(0.5 \pm 0.2) \text{ cm}^3$ , 其中4号、7号、8号小鼠出现腹部膨隆; 第5周小鼠活动量均明显减少, 1号小鼠肿块明显增大, 4号、7号、8号自然死亡后, 解剖发现腹腔内血性腹水伴腹腔脏器广泛转移。同时处死并解剖其余小鼠, 最终结果为出现腹水37.5%(3/8), 腹腔种植率37.5%(3/8), 肝转移率100%(8/8), 未见肠梗阻, 肝转移瘤为多个散在结节, 最大体积为 $1.2 \text{ cm}^3$ , 最小体积为 $0.4 \text{ cm}^3$ 。

**2.4 组织大体及病理组织切片检测** BALB/C小鼠肝脏表面肉眼可见散在分布的微小病灶, 部分小鼠呈多发粟粒样结节, 难以计数, 肝表面转移多以右叶为主, 肝体积变小, 质硬(图4)。组织切片表现为低分化, 无明显腺体结构存在, 癌组织形态不一, 多呈椭圆形, 胞浆丰富, 核大、畸形、深染, 核分裂象多见, 呈弥漫性、浸润性生长, 癌细胞间有结缔组织浸润(图5)。

**2.5 流式细胞术检测** 通过对HT29细胞株、脾脏注射肝转移瘤进行DNA周期分析及倍体分析, 得出结果均为异倍体(表1), 证实为肿瘤细胞。

表1 流式细胞术检测 HT29 细胞株、脾脏注射肝转移瘤细胞周期  
Table 1 The cycle of tumor cells detected by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ )

样本	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> (%)	G <sub>2</sub> -M(%)	S(%)	DNA 指数
HT29 细胞	61.20 $\pm$ 1.55	11.41 $\pm$ 3.26	20.73 $\pm$ 1.29	5.34 $\pm$ 0.23
脾脏注射肝转移瘤	62.29 $\pm$ 3.37	18.82 $\pm$ 8.84	17.51 $\pm$ 9.23	4.84 $\pm$ 0.76

表注: 由DNA周期分析及倍体分析得出为异倍体, 证实为肿瘤细胞。

## 3 讨论 Discussion

结肠癌转移途径主要有血行转移、腹膜转移和淋巴结转移等, 最常转移的器官是肝脏, 根据肿瘤的“种子与土壤学说”, 肿瘤发生转移需要细胞与细胞之间, 细胞与基质之间相互作用, 激活细胞分泌蛋白降解酶类, 降解基质膜及间质基质, 诱导血管生成, 激活肿瘤细胞的移动和侵袭转移机制<sup>[22]</sup>; 因此建立结肠癌肝转移模型需要寻找合适的肿瘤细胞及肿瘤生长环境尤为重要。

本研究选用人结肠癌细胞株HT29, 是因为该细胞株与人体内的结肠癌同源, 可以更好的模拟肿瘤在人体内的原发过程。此外, 早期的实验研究证实, 结肠癌HT29细胞株具有较强的侵袭性, 且生存能力较强, 增殖能力旺盛, 对细胞培养液及生存环境要求尚不苛刻, 可以短时间内进行大量的繁育和增殖<sup>[23-25]</sup>。BALB/C小鼠具有生存能力强, 体型小, 便于饲养, 且价格较低, 已经被广泛应用于动物实验<sup>[26-31]</sup>。

对于肿瘤模型建立的术式有很多种<sup>[32-34]</sup>, 每种方法都有各自有的优缺点, 最终作者选择了切脾法注射, Lafreniere等<sup>[35]</sup>将MCA18细胞注射到C57B1/6小鼠脾脏后1 min, 切除脾脏, 导致100%肝转移率, 而且还发生20%的胰腺肿瘤, 左国华等<sup>[36]</sup>将人结肠癌细胞株LS174T注入裸鼠脾上极5 min后切除脾脏关腹, 结果证实此法肝转移率为100%。黄平等<sup>[37]</sup>同样利用切脾法成功建立人结肠癌细胞株Iovo肝转移模型, 随后利用Alu(人类特有的DNA序列, 裸鼠DNA序列内无)探针进行DNA斑点杂交试验, 测定肝转移瘤的DNA含量, 从基因水平上证明了切脾法建立结肠癌肝转移动物模型的较高可行性。切脾法被证实是一种可靠而稳定的结肠癌肝转移模型, 适用于化疗药物筛选, 结肠癌肝转移的免疫治疗及腹腔灌注化疗等实验研究。

对于结肠癌肝转移模型的建立, 实验改变了传统的腹部正中切口<sup>[38-40]</sup>, 选择了从背侧正中偏左侧切口行脾脏注射后3 min切除脾脏的方法, 这样既避免了脾脏注射法导致脾脏原位成瘤过大影响小鼠生存期, 也减少了原位异种移植接种时术中针对肠壁的损伤, 避免了肠痿及腹腔种植的发生, 实验结果显示, 肝脏成瘤率为100%(8/8), 且经免疫组化证实肝转移瘤为结肠来源, 流式细胞检测证实符合异倍体细胞。在操作中作者的经验为: ①细胞悬液浓度应大于 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 因为细胞浓度较小或注射较少时, BALB/C小鼠的自身免疫力可以产生免疫逃逸。②手术切

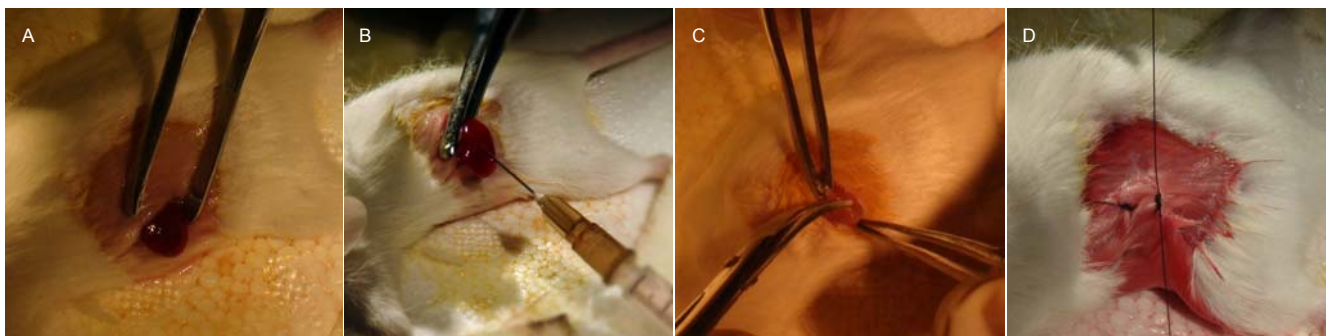


图1 经背侧切口脾脏注射模型

Figure 1 The spleen injection model through a dorsal incision

图注: 图中A为消毒后取出脾脏; B为小鼠麻醉后经背侧切口行脾脏注射法; C为脾脏切除后; D为手术切口的逐层缝合。

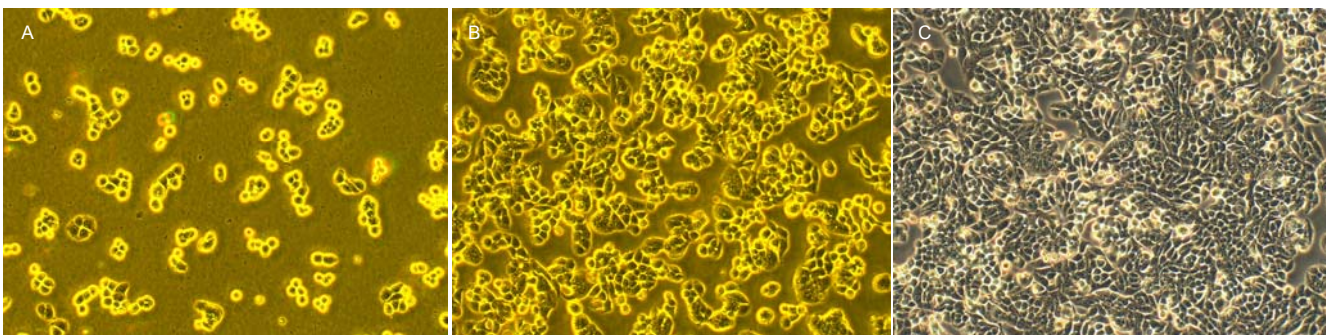


图2 人结肠癌 HT29 细胞株呈指数生长期

Figure 2 Morphology of human colon cells HT29 in exponential phase of growth

图注: 图中A为HT29细胞系培养1d后, 可见散在的少量细胞株, 形态均一( $\times 100$ ); B为HT29细胞系培养4d后, 可见细胞形态均一, 细胞增殖能力活跃, 细胞呈簇分布( $\times 100$ ); C为HT29细胞系培养6d后, 可见细胞紧密分布, 生长迅速( $\times 100$ )。



图3 皮下肿瘤大体观

Figure 3 General view of subcutaneous tumor

图注: 图中A为腋下建立皮下移植瘤外观, 可见腋下微微隆起; B为皮下移植瘤体, 大体观为局限分布的白色团块, 质硬; C为皮下移植瘤正面观, 可见肿瘤浸润性生长。

口从背侧进入并且选择小切口, 与传统的左上腹肋缘下切口相比, 有创伤小、恢复快、易暴露脾脏等优势。③脾脏注射时应缓慢, 以免压力过大导致脾脏被膜破裂以及瘤细胞外漏。④脾脏注射后按压3 min, 期间用生理盐水湿润, 然后切除脾脏, 可以避免术后脾脏原位成瘤影响小鼠生存期。⑤手术时间应控制在5 min以内, 可以减少小鼠的手术应激反应。⑥该方法建立的肝转移模型, 肝转移瘤为100%, 且瘤体较大, 可满足各种基因检测方法取材的需要。

本研究通过改变了传统的左腹部肋缘下切口, 采用背

侧正中中线旁切口进行脾脏注射切脾法成功建立操作简便的具有可重复性的结肠癌肝转移瘤模型, 为深入研究高转移高侵袭性肝转移机制提供了较为理想的动物模型, 也为后续实验提供了一个良好的动物模型及平台。

**致谢:** 感谢新疆医科大学第一附属医院, 感谢导师张文斌副教授及王云海主任的指导和意见。

**作者贡献:** 王理负责文章主要撰写, 对实验部分采用盲法评估, 张文斌对文章整体进行审校及修改。



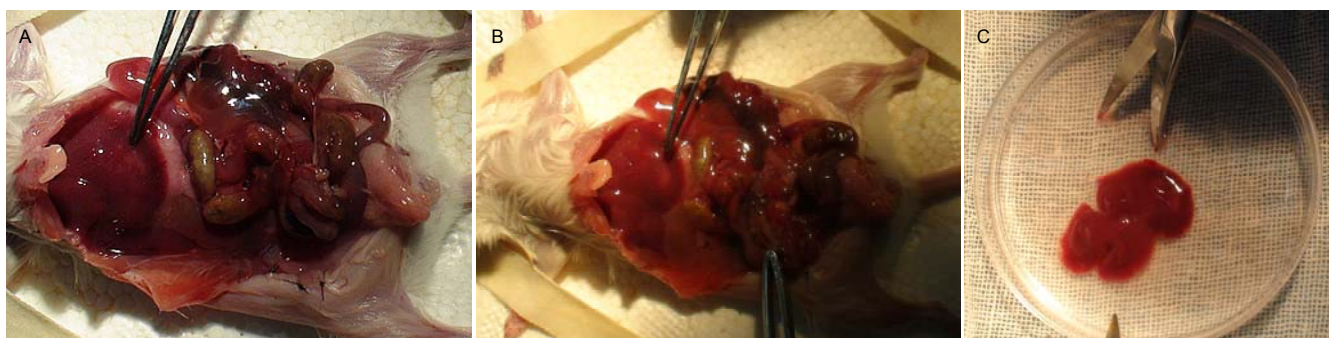
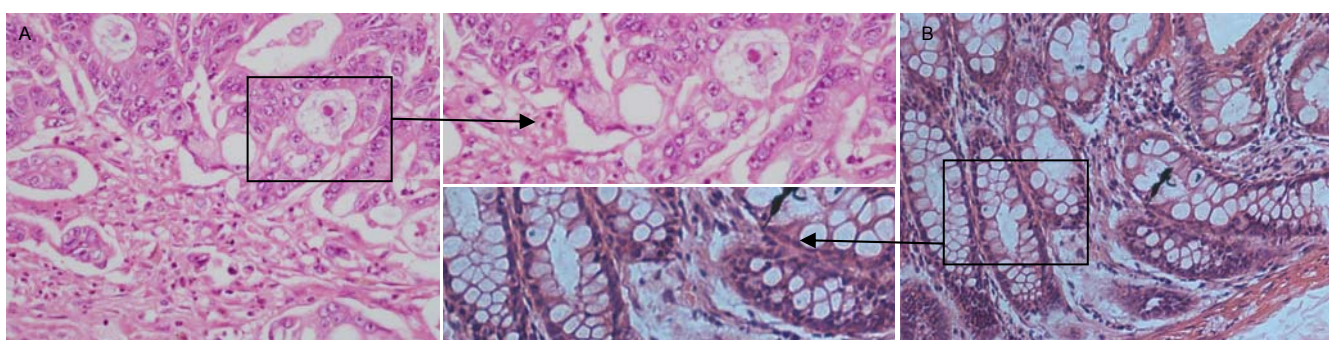


图4 肝脏肿瘤大体观

Figure 4 General view of liver tumor

图注: 图中 A 为 2 号小鼠脾注射术后 4 周可见肝转移瘤, 大体观为散在分布的灰白色结节, 质硬; B 为 4 号小鼠脾注射术后 4 周可见肝转移瘤, 大体观呈局部分布; C 为肝转移瘤整体切除后大体观, 可见流体局限分布。

图5 肝脏转移瘤苏木精-伊红染色( $\times 100$ )Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of the liver metastases tumor ( $\times 100$ )

图注: 图中可见癌组织形态不一, 多呈椭圆形, 胞浆丰富, 核大、畸形、深染, 核分裂象多见, 呈弥漫性、浸润性生长, 癌细胞间有结缔组织浸润。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 肿瘤转移-恶性肿瘤细胞从原发部位, 经淋巴道, 血管或体腔等途径, 到达其他部位继续生长, 称肿瘤转移。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2012年全国卫生统计年报资料, 2012: 54-55.
- [2] Tan EK, Ooi LL. Colorectal cancer liver metastases - understanding the differences in the management of synchronous and metachronous disease. *Ann Acad Med Singapore*. 2010;39(9):719-732.
- [3] Tuech JJ, Pessaux P, Regenet N, et al. Detection of occult liver metastases in colorectal cancer by measurement of biliary carcinoembryonic antigen concentration: a prospective study. *J Surg Oncol*. 2004;88(1):27-31.
- [4] Sadahiro S, Suzuki T, Ishikawa K, et al. Recurrence patterns after curative resection of colorectal cancer in patients followed for a minimum of ten years. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(53):1362-1366.
- [5] House MG. Safely expanding the criteria for resectability of hepatic colorectal metastases. *Ann Surg*. 2011;253(6):1080-1081.
- [6] Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, et al. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(29):3875-3882.
- [7] Leduc EH. Metastasis of transplantable hepatomas from the spleen to the liver in mice. *Cancer Res*. 1959;19:1091-1095.
- [8] Otchy D, Hyman NH, Simmang C, et al. Practice parameters for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004; 47(8):1269-1284.
- [9] Dorrance HR, McGregor JR, McAllister EJ, et al. Bile carcinoembryonic antigen levels and occult hepatic metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2000; 43(9):1292-1295.
- [10] Donigan M, Norcross LS, Aversa J, et al. Novel murine model for colon cancer: non-operative trans-anal rectal injection. *J Surg Res*. 2009;154(2):299-303.
- [11] Devaud C, Rousseau B, Netzer S, et al. Anti-metastatic potential of human V $\delta$ 1(+)  $\gamma\delta$  T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(7):1199-1210.
- [12] Chen HJ, Yang BL, Chen YG, et al. A GFP-labeled human colon cancer metastasis model featuring surgical orthotopic implantation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4263-4266.
- [13] Thalheimer A, Korb D, Bönicke L, et al. Noninvasive visualization of tumor growth in a human colorectal liver metastases xenograft model using bioluminescence in vivo imaging. *J Surg Res*. 2013;185(1):143-151.

- [14] Donigan M, Loh BD, Norcross LS, et al. A metastatic colon cancer model using nonoperative transanal rectal injection. *Surg Endosc.* 2010;24(3):642-647.
- [15] Hackl C, Man S, Francia G, et al. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut.* 2013;62(2):259-271.
- [16] Mathur A, Ware C, Davis L, et al. FGFR2 Is Amplified in the NCI-H716 Colorectal Cancer Cell Line and Is Required for Growth and Survival. *PLoS One.* 2014;9(6):e98515.
- [17] Kruse J, von Bernstorff W, Evert K, et al. Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28(10):1337-1349.
- [18] Cho YB, Hong HK, Choi YL, et al. Colorectal cancer patient-derived xenografted tumors maintain characteristic features of the original tumors. *J Surg Res.* 2014;187(2):502-509.
- [19] Huang X, Zou Y, Lian L, et al. Changes of T cells and cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-10 in mice during liver metastasis of colon carcinoma: implications for liver anti-tumor immunity. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(7):1283-1291.
- [20] Lim C, Broqueres-You D, Brouland JP, et al. Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumor growth in a mouse model of colorectal liver metastases. *J Surg Res.* 2013;184(2):88-897.
- [21] Chang YJ, Hsu WH, Chang CH, et al. Combined therapeutic efficacy of 188Re-liposomes and sorafenib in an experimental colorectal cancer liver metastasis model by intrasplenic injection of C26-luc murine colon cancer cells. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(3):380-384.
- [22] Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer.* 2011;128(11):2527-2535.
- [23] Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, et al. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(29):3875-3882.
- [24] Nowakowska M, Pospiech K, Lewandowska U, et al. Diverse effect of WWOX overexpression in HT29 and SW480 colon cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2014. [Epub ahead of print].
- [25] Cai SR, Garbow JR, Culverhouse R, et al. A mouse model for developing treatment for secondary liver tumors. *Int J Oncol.* 2005;27(1):113-120.
- [26] Kim HW, Cai QY, Jun HY, et al. Micro-CT imaging with a hepatocyte-selective contrast agent for detecting liver metastasis in living mice. *Acad Radiol.* 2008; 15(10):1282-1290.
- [27] Chowdhury S, Ongchin M, Sharratt E, et al. Intra-tumoral heterogeneity in metastatic potential and survival signaling between iso-clonal HCT116 and HCT116b human colon carcinoma cell lines. *PLoS One.* 2013;8(4):e60299.
- [28] 杨剑锋,张森,高枫,等.结直肠癌肝转移动物模型的建立[J].结直肠肛门外科,2009,15(3):139-143.
- [29] 袁岱岳,郭忠莹,赵任,等.人结肠癌裸鼠肝转移模型的建立[J].肿瘤防治研究,2011,38(1):28-30.
- [30] 朱薇莹,张学利,陈宗佑,等.小鼠结肠癌肝转移模型的建立及其活化肝星状细胞的表达[J].复旦学报:医学版,2010,37(3):274-277.
- [31] Hwang JE, Shim HJ, Park YK, et al. Intravenous KITENIN shRNA injection suppresses hepatic metastasis and recurrence of colon cancer in an orthotopic mouse model. *J Korean Med Sci.* 2011;26(11):1439-1445.
- [32] Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, et al. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature.* 2010;465(7295):227-230.
- [33] Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, et al. Polyethylene Glycol (PEG) Linked to Near Infrared (NIR) Dyes Conjugated to Chimeric Anti-Carcinoembryonic Antigen (CEA) Antibody Enhances Imaging of Liver Metastases in a Nude-Mouse Model of Human Colon Cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e97965.
- [34] Urosevic J, Garcia-Albéniz X, Planet E, et al. Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nat Cell Biol.* 2014; 16(7):685-694.
- [35] Lafreniere R, Rosenberg SA. A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. *J Natl Cancer Inst.* 1986;76(2):309-322.
- [36] 左国华,葛海燕.人结肠癌裸鼠肝转移模型的建立[J].中华实验外科杂志,1999,16(4):373.
- [37] 黄平,楼荣灿,张学栋,等.脾切除法建立人结肠癌细胞肝转移模型[J].上海实验动物科学,1999,19(3):137-139.
- [38] Nano R, Barni S, Chiari P, et al. Efficacy of boron neutron capture therapy on liver metastases of colon adenocarcinoma: optical and ultrastructural study in the rat. *Oncol Rep.* 2004; 11(1):149-153.
- [39] 杨扬,李乃卿,李兰芳,等.两种小鼠结肠癌肝转移造模方法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(4):53-55.
- [40] 吴振杰,张森,欧阳君,等.两种异位种植结肠癌肝转移动物模型的比较[J].结直肠肛门外科,2012,18(1):4-7.