

# 注射法制作 ICR 小鼠肝癌模型及其改进

张煜<sup>1</sup> 徐涵文<sup>1</sup> 张太平 张鹤云\*

(南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要** 应用直接注射法制作 ICR 小鼠原发肝癌模型并成功地进行方法改进。对模型小鼠进行了体重监测、原位移植成功率统计和病理检查, 结果表明改进后的直接注射法制作小鼠原发肝癌模型的成功率显著提高, 并成功模拟出肿瘤的多器官转移及人类肝癌常见的临床症状、体征。模型可以很好的满足抗肿瘤药物开发、肝癌发生发展机制研究的需要。同时, 直接注射法改进方案和理念解决了直接注入细胞产生返漏的技术难题, 为进一步建立其他脏器的原发或继发性癌症移植模型打下了基础。

**关键词** ICR 小鼠; 动物模型; 肝癌

原发性肝癌(HCC)是我国常见恶性肿瘤之一, 目前它在中国癌症患者死亡顺序中居第 2 位<sup>[1]</sup>。理想的肝癌动物模型是抗肝癌药物开发、肝癌发生发展机制研究、肝癌介入治疗及诊断研究的必备工具。肝癌动物模型一般采用诱导法和移植法制作。诱导法制作肝癌动物模型具有周期长(3~6 月)、成本高、成功率低、不易同时得到病程和肿块大小相对均一的模型、肿瘤细胞形态不稳定等缺点。以移植的方法制作肝癌模型是国际上普遍接受的研究人类癌症生长、侵袭和转移的重要手段。移植性肝癌模型根据植入物可分为瘤组织块肝原位移植和细胞悬液肝原位注射。二者中细胞悬液肝原位注射较瘤组织块肝原位移植具有成瘤时间短、成瘤率高、简便、易行, 更值得推广应用。目前有关细胞悬液肝原位注射模型报道大多是用 Wistar 大鼠<sup>[2]</sup>、SD 大鼠<sup>[3]</sup>或裸小鼠<sup>[4]</sup>建立, 而用 ICR 小鼠建立模型尚未见报道。ICR 小鼠具有价廉、易获得、易饲养等优点, 因此我们就直接注射法制作 ICR 小鼠肝癌模型进行了尝试, 并对此方法进行了改进。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及瘤株

清洁级 ICR 小鼠 110 只, 雄性, 购于南京医科大学实验动物中心。小鼠到达后随机转移至装有锯屑垫料的塑料笼内(每笼 5 只小鼠)饲养于南京大学医学院动物房, 饲养条件为室温 21~24 °C, 相对湿度 40%~60%, 每天 12 h 光照。小鼠自由取食进水至体重达到 25~30 g 时, 分为空白对照组(10 只)、损伤对照组(10 只)、腹腔对照组(10 只)、参考文献组(40

只)、改进实验组(40 只)进行实验。鼠源肝癌细胞株 HepS 腹水癌小鼠, 由中国科学院上海药物研究所引进, 江苏省肿瘤医院传代保种。

### 1.2 实验材料

DMEM(高糖)培养基购自 Invitrogen 公司; 自制的小鼠固定板 1 只; 麻醉药品采用戊巴比妥钠, 按 70 mg/kg 进行腹腔注射麻醉; 粘合剂; 手术器械(眼科剪、有齿镊、持针器、止血钳、缝针、线), 50  $\mu$ l 微量注射器, 5 ml、1 ml 注射器, 安尔碘, 抗生素药膏等。

### 1.3 肿瘤细胞悬液制备

从 HepS 腹水癌小鼠抽取癌性腹水约 1 ml, 加入 4 ml Hanks 液, 1 000 r/min 离心 5 min, 重复洗涤 3 次后加入含 10% 小牛血清的 DMEM(高糖)细胞培养基制成 HepS 细胞悬液, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个/ml 备用。

### 1.4 模型制作

改进实验组: 小鼠术前 12 h 禁食, 6 h 禁水。将 ICR 小鼠腹腔麻醉后, 取仰卧位, 用橡皮筋固定四肢于实验板上, 刮去腹部体毛, 安尔碘消毒后, 剪开皮肤和腹膜, 使肝左叶突出腹腔。用微量注射器抽取 5  $\mu$ l HepS 细胞悬液, 针尖刺入小鼠肝脏注入细胞悬液, 注入后拔出针头, 立即用 75% 酒精棉签按压针孔至肝脏表面不再渗血, 随即用少量粘合剂涂抹于针孔处, 待干后用生理盐水冲洗暴露的肝脏表面。将肝叶送回腹腔, 缝合关腹。以 75% 酒精擦拭切口后, 涂

收稿日期: 2006-11-21 接受日期: 2006-12-29

<sup>1</sup> 并列第一作者

\* 通讯作者。Tel: 025-83592335, E-mail: cflab@126.com

抹一层抗生素药膏。

参考文献组: 根据文献<sup>[2,3]</sup>提供的直接注射法, 不采用粘合剂封闭针孔、75%酒精棉签按压针孔、生理盐水冲洗暴露的肝脏表面等在改进实验组中的改进方案, 其他具体步骤同改进实验组。

空白对照组: 小鼠不做任何处理。

损伤对照组: 按改进组的方法制作, 肝内注入 5  $\mu$ l DMEM 培养基。

腹腔对照组: 在制作损伤对照组的基础上, 再在腹腔内注射 5  $\mu$ l HepS 细胞悬液。

## 1.5 观察指标及方法

在建模手术后随即在每日 18 时称取各组体重, 观察受体小鼠体重及受体小鼠移植后并发症及存活期, 必要时予以剖腹探查和尸检。取肝组织及疑为有肿瘤转移的脏器固定于 10% 甲醛液内, 常规取材, 脱水, 石蜡包埋切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 进行病理组织学光学显微镜观察并出具病理报告, 确定模型移植成功率。

## 2 结果

### 2.1 体重变化

空白对照组生理情况正常, 体重平稳缓慢增长。其余各组在建模手术后第二天平均体重降低(2 $\pm$ 0.2) g, 术后第三天恢复至术前水平, 其后持续稳定上升。损伤对照组术后平稳缓慢增长, 与空白组无异。腹腔对照组手术一周后体重因腹水生成开始明显增加,

第 10 天可见大量腹水, 体重明显增加时间为 4~5 天(平均每天增重约 1.5 g), 此后到死亡前尽管小鼠自身已经因恶液质严重消瘦, 但其体重却因腹腔内的大量腹水而基本维持在较高水平, 直至小鼠死亡时体重无明显增加或略有回落。参考文献组体重变化情况多与腹腔对照组相似; 改进实验组三周后若出现腹水, 此后体重变化与腹腔对照组类似, 若不出现腹水, 到 4 周左右体重开始下降, 直至死亡。

### 2.2 生存期及成瘤率(表 1)

改进实验组: 肿瘤移植成功率为 100% (40/40)。肝脏接种处均为肿瘤单发病灶(图 1, 图 2), 结节可达 2.0 cm  $\times$  1.5 cm, 体积为 2.25 cm<sup>3</sup>[根据公式  $V=ab^2/2$  计算瘤体最长径(a), 最短径(b), 肿瘤体积(V)]<sup>[5]</sup>。种植瘤表面呈结节状或粗颗粒状, 多数与周围组织有黏连。模型平均生存期为 5~6 周。病程中小鼠可见消瘦、水肿、肝脾肿大(图 3, 图 4)、腹水、黄疸、癌灶转移、肝破裂出血等临床症状和体征<sup>[6]</sup>。

参考文献组: 肿瘤移植成功率为 47.5% (19/40)。肝脏接种处均为肿瘤单发病灶, 但结节较小。模型平均生存期为 3 周。病程中小鼠均见消瘦、水肿, 血性腹水。

### 2.3 病理组织学观察

原位移植瘤形态相对规则, 成圆形或椭圆形, 肿瘤有包膜或包膜不完整, 表面呈大小不等结节状改变, 以浸润性生长为主(图 5), 外周有明显增粗血管; 肝内有大量肿瘤组织生长, 种植瘤细胞形成肿块, 肿块内

表 1 各组的生存期和成瘤率

组别	样本量(只)	平均生存期(天)	出现腹水率(%)	成瘤率(%)
空白对照组	10	-	0	0
损伤对照组	10	-	0	0
腹腔对照组	10	18	100	0
参考文献组	40	22	100	47.5
改进实验组	40	33	27.5	100



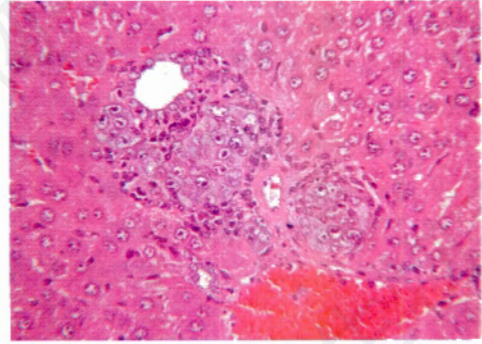
图 1 改进实验组小鼠腹腔全照  
剑突下肝左叶注射部位可见白色肿瘤结节。



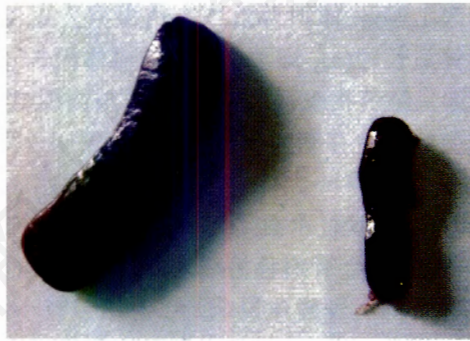
图 2 改进实验组小鼠腹腔近照  
肿瘤结节境界不清, 附近有附生的小节节。



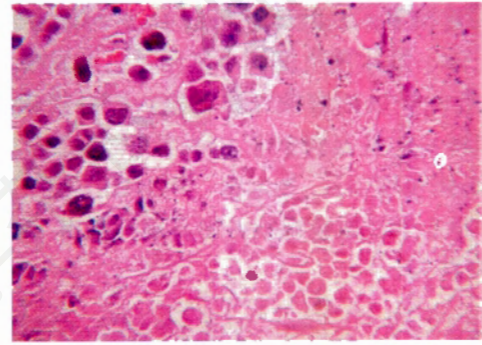
**图3 肝左叶对照**  
左为改进实验组小鼠肝左叶，右为损伤对照组小鼠肝左叶。



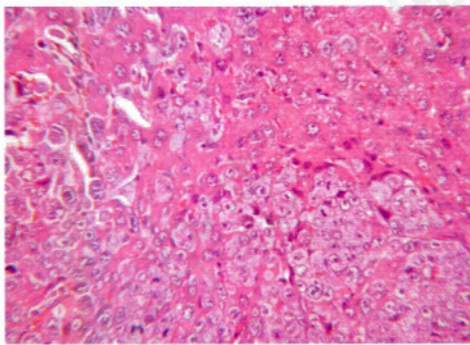
**图7 肿瘤侵入远离肿块的门管区门管(200 ×)**



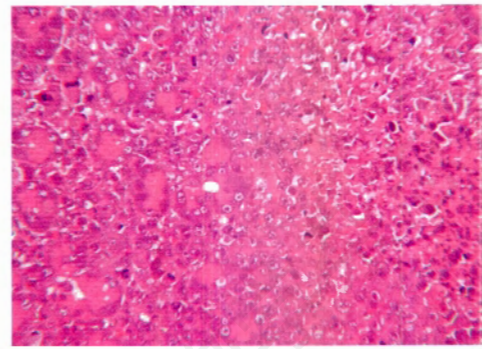
**图4 脾脏对照**  
左为改进实验组脾脏，右为损伤对照组小鼠脾脏。



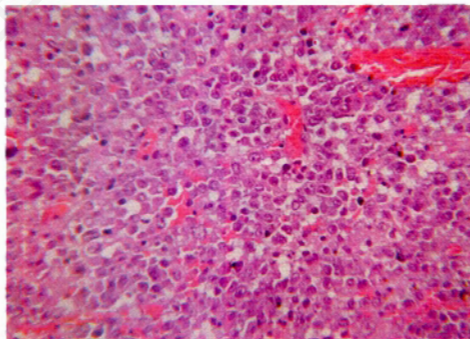
**图8 肿瘤坏死区(200 ×)**  
肿瘤细胞发生变性坏死。



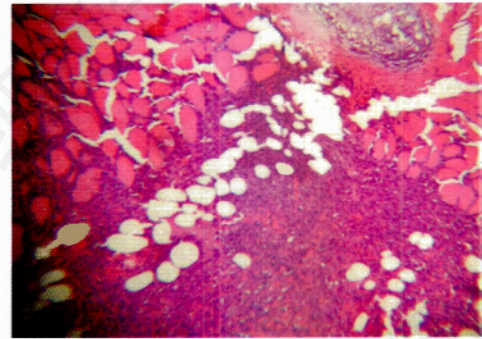
**图5 肿块周边部肿瘤组织(200 ×)**  
肿瘤细胞在肝内浸润生长。



**图9 肿瘤侵入胰腺在其内生长(200 ×)**  
胰腺腺泡面可见大小、形态不一的肿瘤细胞。



**图6 肿瘤组织内多量血管(200 ×)**  
肿瘤细胞大小、形态不一，间质血管丰富。



**图10 肿瘤侵入胸廓(100 ×)**

瘤细胞异型性明显,大小、形态不一,核大、深染、核分裂相易见。肿瘤内有血管浸润丰富(图6)。肿瘤细胞排列紧密,与周围的肝组织分界较为明显,但有的部位瘤细胞已形成小团块浸润于远离肿瘤的门管区和正常肝小叶内(图7)。肿瘤组织坏死明显(图8),呈大片凝固性坏死,少数区域有少量出血,出血区或肿瘤与正常肝组织交界处有少量单核细胞及中性粒细胞浸润。出现肝内(图7)、胰腺(图9)、胸廓(图10)转移灶。

我们将移植法中常用直接注射法应用于 ICR 小鼠原位肝癌模型的制作,并进行了改进性研究,提出了改进方案。改进后的方法制作出的小鼠肝癌模型具有肿瘤形成周期短(14天)、肿瘤移植成功率高(100%)、成本低、瘤体一致性好、个体差异小、制作方法简便易行等优点,是建立移植性肝癌模型的理想选择。

### 3 讨论

长期以来实验小鼠作为肿瘤动物模型的首选材料,在研究化学致癌物,筛选新的抗癌药物,探知众多致癌基因、抑癌基因的功能中发挥了重要作用。理想的肿瘤动物模型应当在肿瘤生物学的基础研究和药物筛选中反映人类癌症真实情况,同时也应具备制作简便、迅速、成功率高、价格低廉且可以大批制作的特点,以满足科学研究和制药工业的需要。我们的研究中选用了 HepS 腹腔种植肿瘤鼠作为瘤源。HepS 是鼠源肝癌细胞株,在小鼠体内增殖传代,这样使细胞提前适应鼠体,从而大大提高了细胞注射入肝脏后的成活率,使其很快能在受体鼠肝脏中迅速生长增殖,缩短肿瘤形成周期、提高肿瘤移植成功率。我们多次用 Hanks 清洗细胞而不直接采用浓缩腹水,去除腹水中的其他成分(如血细胞、细胞因子、巨噬细胞等),只将肿瘤细胞注入肝脏以减少其不明因素影响肿瘤的发生。

我们的研究表明,根据文献报道直接注射法

制作的模型小鼠多数在种植后一周左右出现腹水,生存期短,肿瘤原位移植成功率低,与腹腔对照组的情况很类似。这说明穿刺进针后注入的肿瘤细胞流入腹腔,造成腹腔内广泛转移灶,形成血性腹水后衰竭而死,从而导致肿瘤原位种植不成功。针对这个原因,我们为避免肿瘤细胞流入腹腔提出方法的改进方案:其一,减小注射细胞悬液的体积,防止在推进注射器时溢出。经过多次实验我们选定  $5\ \mu\text{l}$  作为注射细胞悬液的体积,同时增高细胞浓度至  $1 \times 10^7$  个/ml 以保证肿瘤在较短的时间内原位生成,缩短了肿瘤形成周期。其二,尽量降低肿瘤细胞返流进入腹腔的可能。我们采用 75% 酒精棉签按压针孔、粘合剂封闭针孔、生理盐水冲洗暴露的肝脏表面三个步骤达到此目的。注射后撤出针头后随即用 75% 酒精棉签按压针孔止血,避免了肿瘤细胞的流出。用少量粘合剂封闭针孔防止肿瘤细胞在肝脏放回腹腔后漏出。由损伤对照组的实验结果表明 75% 酒精棉签按压和所用粘合剂并未对小鼠产生明显毒性。我们以生理盐水冲洗暴露的肝脏表面,尽可能洗去漏出的细胞后再将肝脏送回腹腔。采用改进方案的实验组肿瘤细胞只在肝脏内生长,肿瘤移植成功率显著提高,两周左右就可以出现明显的结节。小鼠生存期延长得以出现消瘦、水肿、肝脾肿大、腹水、黄疸、癌灶转移、消化道出血、肝破裂出血等肝癌病人常见的临床症状、体征。同时,我们提出的直接注射法改进方案和理念解决了直接注入细胞漏出这一技术难题,为进一步建立其他脏器的原发或继发性癌症移植模型打下了基础。

### 参考文献(References)

- [1] Yang L et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, **14**: 243
- [2] 邵成伟等. *中国医学影像技术*, 2002, **18**: 731
- [3] 李琦等. *第二军医大学学报*, 2002, **23**: 1074
- [4] 徐静等. *实用肝脏病杂志*, 2005, **8**: 116
- [5] 顾伟等. *中西医结合学报*, 2005, **3**: 136
- [6] Hussain S A et al. *Ann Oncol*, 2001, **12**: 161

## Establishment and Improvement of Primary Hepatocarcinoma ICR Mouse Model by Injection Method

Yu Zhang<sup>1</sup>, Han-Wen Xu<sup>1</sup>, Tai-Ping Zhang, He-Yun Zhang\*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract** Primary hepatocarcinoma ICR mouse model was successfully established with improved injection method. The model mice were analyzed by weight survey, success ratio of primary transplant and pathological analysis. Results demonstrated that the improved method increased the success ratio greatly, simulated multiple-organ metastasis and common symptoms of human liver cancer well. The model can satisfy the needs from exploitations of anti-cancer drugs and researches on cancer mechanism. In addition, the protocol and idea in the method not only solved the technical difficulty of injection method caused by tumor cells leaking but also laid the foundation for establishment of other primary and secondary cancer models.

**Key words** ICR mouse; animal model; hepatocarcinoma

---

Received: November 21, 2006      Accepted: December 29, 2006

<sup>1</sup>These authors share the first authorship

\*Corresponding author. Tel: 86-25-83592335, E-mail: cflab@126.com