

韦武,郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 119-123.

Wei W, Guo HX. Research progress in establishing rat liver cancer models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 119-123.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.020

大鼠肝癌模型建立的研究进展

韦武¹, 郭红星^{2*}

(1.天津市血液灌流技术企业重点实验室,天津市紫波高科有限公司,天津 300170;

2.卫生部人工细胞工程技术研究中心,天津市肝胆疾病研究所,天津市第三中心医院,天津 300170)

【摘要】 肝癌动物模型是研究肝癌的重要依据,其在揭示肿瘤发病机制、评估治疗方法中的角色不可或缺。近年来,研究人员借助不同类型的动物模型不断获得有关肝癌及其治疗预后的丰富数据。本文通过总结常用的诱发性 and 移植性大鼠肝癌的建模方式及应用,以呈现近年来在构建大鼠肝癌模型实践中的进展。

【关键词】 大鼠;肝癌;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 01-0119-05

Research progress in establishing rat liver cancer models

WEI Wu¹, GUO Hongxing^{2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Hemoperfusional Technology Enterprise, Tianjin Zibo High-Tech Co. Ltd., Tianjin 300170, China.

2. Technology Research Center of Artificial Cell Engineering, Ministry of Health, Tianjin Institute of Hepatobiliary Diseases, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170)

Corresponding author: GUO Hongxing. E-mail: kuohx@hotmail.com

【Abstract】 Animal models are necessary for studying liver cancer as they play a vital role in exploring tumor pathogenesis and evaluating therapeutic methods. In recent years, abundant data from liver cancer studies and treatment prognoses have been obtained via various animal models. Here, we summarize the commonly used rat liver cancer models, which are mainly constructed by induction or transplantation, and discuss the progress made in establishing rat liver cancer models.

【Keywords】 rat; liver cancer; animal models

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在国内有着很高的关注度。作为人类常见恶性肿瘤之一,2015年的国内癌症流行病学统计显示肝癌发病率位列第4位,病死率位列第3位^[1],为此,对于肝癌的研究一直是国家重点支持的项目。肝癌动物模型在实验研究中起着十分重要的作用。因此,构建理想的肝癌动物模型,往往是决定实验成败的关键因素。在实验动物选择上,大鼠体型较大、易

于饲养、成本低廉、可获取较大标本量,因此是公认的研究肝癌的主要动物模型之一。本文对近年来文献中常用的大鼠肝癌动物模型进行回顾总结,并概要介绍建模方法及应用。

1 大鼠肝癌模型分类

根据构建模型方法不同,大鼠肝癌模型常见为以下三种:自发性、诱发性、移植性肝癌。尽管大鼠

【基金项目】天津市卫生局攻关项目(2013-GG-05);天津市科技支撑重点研究计划项目(15ZCZDGX00280)。

Funded by Tianjin Municipal Health Bureau Research Project(2013-GG-05), and Tianjin Science and Technology Support Key Research Project (15ZCZDGX00280).

【作者简介】韦武(1990—),男,本科,助理工程师。Email: 15822556549@163.com

【通信作者】郭红星,男,博士,助理研究员,研究方向:药理学。Email: kuohx@hotmail.com

是常用的自发性肿瘤动物模型,但多见于乳腺纤维腺瘤和垂体腺瘤等,鲜有自发性肝癌报道,故而仍以诱发性和移植性两种应用最为广泛,本文也主要介绍这两种类型。

2 常用建立模型方法

2.1 实验大鼠品系

目前,常用于构建大鼠肝癌动物模型的大鼠品系主要有 SD、Wistar、Fisher344 和 Buffalo 等,其中应用最为广泛的品系为 SD 和 Wistar 大鼠^[2]。至于胸腺缺陷型的裸鼠,虽然肿瘤易于成活,但由于成本较高,应用于构建肝癌动物模型报道并不多见^[3-4]。

2.2 诱发性模型

诱发性肝癌动物模型通常是利用单一或联合应用多种化学药物、生物毒素等直接或间接作用于大鼠肝,使之在数月内发生肝癌。该方法操作简单,癌变率高且易于操控,是构建肝癌动物模型的理想方法之一。通常采用如下几种药(毒)物诱导大鼠肝癌。

2.2.1 用于诱导的化学物质

常用的化学物质如二乙基亚硝胺(N-nitrosodiethylamine, DEN)、3'-甲基-4-二甲氨基偶氮苯(3'-methyl-4'-dimethylaminoazobenzene, 3'-Me-DAB)、2-乙酰氨基苄(2-acetamidofluorene, 2-AAF)、四氯化碳(CCL₄)、黄曲霉素(aflatoxin B₁, AFB₁)等。

2.2.2 给药途径

主要分为经典饮水给药法和腹腔注射给药法两种,可单独使用或联合应用。其中,饮水法操作简单,但因个体差异会造成饮水量不同导致摄入药物差别较大;注射法通常选用腹腔注射途径,该方法虽可以更准确地控制注射药物量,减少个体差异,但需要多次注射操作,增加了工作量,因而实验成本较高。

2.2.3 给药方案

由于可用于诱发的化学药物有多种,且实验目的不同,因此,虽然有推荐的方案,但仍可在文献中见到多种衍生方案。最常见的 DEN 给药方案有,如(1)单独采用饮水给药法诱导,通常按照估算最终摄入剂量为达到 500 mg/kg 以上。将 DEN 投入大鼠饮水中,进行 3 ~ 6 个月的持续诱导^[5-7]。(2)单独采用腹腔注射 DEN 诱导的方法,近年来有较多文

献报道^[8-11]。通常单次给予 DEN 剂量为 20 ~ 70 mg/kg,每周给药 2 ~ 3 次,持续 2 ~ 4 个月。(3)采用腹腔注射药物后辅以饮水或饲料维持给药的方式进行诱导,方案可采用 50 ~ 200 mg/kg DEN 单次或多次腹腔注射,其后辅以饮食中摄入 DEN 或苯巴比妥或 2-AAF 等进行饲养;也有随后用 CCL₄ 腹腔注射维持诱导的方法,均可在数月内诱发肝癌^[12-16]。

再如较常见的 2-AFF 给药方案,多为掺入饲料中诱导方式。赵鲁箴等^[17]诱导方法为 6% 的 3'-Me-DAB 花生油溶液与精制大米按照 1:49 的比例配置成诱癌饲料,然后按照 2 次/日,每次 5 g 进行饲养 3 个月,3 月后改为普通大鼠饲料。Yan 等^[18]用浓度为 0.06% 的 3'-Me-DAB 饲料喂养大鼠,20 周后诱癌成功。

至于 AFB₁ 给药方案,已经不再局限于传统的口服饲料中大剂量掺杂黄曲霉素的方法,也可采用诸如(1)持续灌胃法,如 Johnson 等^[19]对 F344 大鼠按照每日 200 μg/kg 的实验方案持续灌胃 AFB₁ 4 周,诱癌成功率高达 96%。(2)低频次腹腔注射:每周进行 1 ~ 3 次腹腔注射,浓度为 100 ~ 200 μg/kg,55 周左右诱癌成功^[20-21]。(3)高浓度腹腔注射辅以口服饲料诱导:段小娴等^[22]以 0.75 ~ 1.5 g/kg 的剂量腹腔注射,其后正常饲养,两周后将饲料换为 0.015% 的 2-AAF 饲料,连续饲养 4 周,可成功建模。

2.2.4 诱发周期

除个案文献报道外,多数药物诱导方案需要的时间较长。通常约为 3 ~ 6 个月。

2.2.5 构建模型成功率及主要影响因素

除了构建与雌激素水平密切相关的乳腺癌、卵巢癌模型要选择雌性大鼠外,肝癌建模多选择对于化学诱发因素更为敏感的雄性大鼠^[23]。同时,选择幼龄大鼠作为实验动物模型也能够提高成功率。

2.3 移植性模型

移植性肝癌模型是指将肝癌细胞株、肝癌组织块(来源于人或动物)或非肝组织来源的恶性肿瘤(如乳腺癌、结直肠癌等)接种于实验动物肝所形成的肝癌动物模型。主要包括同种原位移植(肿瘤细胞类型与宿主物种属一致)、异种原位移植(如人源肝癌接种到大鼠肝)、异位移植(同种或异种非肝癌细胞移植于大鼠肝)三种^[24]。将肝癌细胞或者组织直接植入于肝内,其在微环境、形态学以及对后

续治疗的反应上更加符合肝癌的相关特征^[25];而异位移植将非肝癌细胞或者组织块植入肝,因无法保证提供与肿瘤来源器官相同的微环境,会对异位移植肝癌的发展产生不利影响^[26]。因此,异位模型的治疗效果必须通过与原位移植对比进行再次确认。目前,多数学者通过异位模型确认肿瘤生长情况(如先接种于皮下后再将成长的组织块移植到肝),然后构建原位移植模型,以此提高原位移植模型的建模成功率。下面简单介绍常见移植性模型的构建方法。

2.3.1 经皮下种植获得组织块后通过手术移植

此种方法通常选用体外培养扩增、生长状态良好的 2~3 代肿瘤细胞或癌种鼠的腹水癌细胞悬液进行皮下注射,注射点通常为表浅、易于观察且有充足生长空间的部位。例如将 1×10^7 以上细胞悬液注射于大鼠皮下,接种 10 d 左右即可触摸到瘤块,此时即可进行手术切除。将切除的肿瘤块处理为 1 mm^3 左右的组织块后,用于肝内种植^[27]。

2.3.2 开腹进行肝内注射肿瘤细胞

通常采用小切口显露肝叶,将细胞悬液注射到肝内形成肿瘤^[28]。肿瘤细胞的来源除了体外培养,还可采用癌性腹水离心后收集的细胞悬液注射的方法^[29],以期获得更好的种植效果。该方法存在穿刺针孔渗漏导致腹腔播散肿瘤的可能性,但形成的肿瘤定位明确,往往是单一肿块,便于通过外科切除或者超声射频消融治疗。

3 构建大鼠肝癌模型方法的探索改进

3.1 注意操作细节以提高成功率

近年来的文献报道中,在传统的饮水或饲料口服给药诱导方式之外,也出现了较多腹腔注射给药方式,目的是更为准确地控制给药剂量,同时缩短诱导成瘤的时间。在构建移植性肝癌模型过程中,注重缩短操作时间以保持植入肿瘤细胞或组织块的活性;采用异氟烷、七氟烷等气体麻醉而不是氯仿、苯巴比妥钠等腹腔注射麻醉方法;用小切口微型开腹手术、采用金属钉快速关闭手术切口以减少丝线缝合线的异物刺激等操作细节都有益于成功建立模型。

3.2 超声、MRI 引导注射建模

随着超声等影像设备普及,为了尽可能减少有创操作带来的大鼠创伤应激反应,借助超声等进行微创注射移植的报道逐渐增多。引入影像技术不

仅降低了有创操作对于大鼠免疫系统的影响,而且对于肝肿瘤的演变过程,可以更为及时地通过超声、MRI^[30]等进行动态观察,获取影像资料进行对比。

研究表明,大鼠的体液免疫会形成不利于肿瘤细胞生存的细胞因子环境,进而导致肿瘤移植失败。因此,避免传统的手术切开缝合操作对于大鼠的创伤刺激,弱化不利于移植细胞生存的局部组织微环境,一定程度上将提高移植肿瘤的存活率。这种建模方式,需要借助精准的超声设备及专业技术人员的娴熟操作技巧,并未广泛普及但已经在肝癌动物模型实验中予以采用。如 Buijs 等^[31]在超声引导下,将 N1-S1 细胞和 McA-RH7777 两种细胞经皮穿刺直接接种于 SD 大鼠肝内,一周后超声可检测癌组织存活并生长。Chu 等^[32]将 N1-S1 大鼠肝癌细胞通过超声引导植入雄性 SD 大鼠肝内,10 d 后检测到有肿瘤组织块。Pan 等^[33]在超声引导下,将肝癌细胞经皮注射到大鼠肝叶内,并与开腹手术注射方法相对比。尽管两种方法的成瘤率相差不大,但影像学辅助减小了大鼠创伤反应,无疑更有利于研究动物负荷肿瘤情况下的体液免疫变化等。

3.3 免疫抑制措施辅助建立肝癌模型

大鼠的免疫排斥作用是导致构建肿瘤模型失败的因素之一,而采用射线辐照、注射或口服免疫抑制药物(如环磷酰胺、糖皮质激素、他克莫司、环孢菌素等)的方法,则可以强化对宿主免疫系统的抑制作用,从而提高移植成功率。

4 大鼠肝癌模型应用中值得关注的问题

4.1 选择化学药物诱导模型时的实验设计

DEN 诱导法是构建大鼠肝癌模型的一种有效方法,其对肝的诱导作用相对专一,肝细胞癌占比较大且诱癌成功率高(约 76.67%)^[8,34]。DEN 诱癌过程中,由于实验动物个体差异,对 DEN 的耐受性不同,存在动物死亡或者无肿瘤生长的情况而导致诱癌成功率的差异。因此,在 DEN 诱癌实验中,应考虑到剔除诱导失败大鼠的样本数量。同时,诱导过程中可密切关注大鼠状态,便于发现异常及时调整诱导方案,不应盲目地固定诱导周期,而应在动物存活前提下提高诱导成功率。

DEN 诱发的肝癌模型,发病过程较接近人类,病理结果表现为癌组织呈现弥漫性结节,合并肝硬化。在诱癌过程中药物剂量及给药途径易于调整,

多重复性良好且成功率较高。不足之处为诱发所需时间通常需几个月甚至更长。此类模型动物的肝功能、免疫状态及时间因素在设计实验宜予以考虑。

4.2 移植性肿瘤的自发消除现象

如果不抑制大鼠的免疫系统功能,那么即使将同源的肝癌细胞接种于健康大鼠皮下或者肝,多数因受到大鼠自体免疫排异的影响,而出现瘤块逐渐自行消退现象。因此,如果实验目的为短期内进行手术切除或者观察肿瘤演变的动态变化等,选择移植模型仍有参考价值。若用于肝癌治疗效果的观察,则必须考虑到大鼠自身免疫排斥作用对肿瘤的清除作用,而不宜将肿瘤消退或者缩小的效果仅仅归因于治疗作用。

5 结语

可以说,构建大鼠肝癌模型的手段正在不断增加,传统的口服及腹腔注射给药途径之外,超声引导穿刺、微创手术、联合免疫抑制等辅助手段也逐渐被研究人员采用。按照实验目的选择适宜方法构建高质量的大鼠肝癌模型,有助于肝癌研究的学术发展。

参 考 文 献(References)

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 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.

Liu KX. The basis of liver disease and its experimental animal model [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2003: 44 - 81.

[3] Hanada M, Baba A, Tsutsumishita Y, et al. Intra-hepatic arterial administration with miriplatin suspended in an oily lymphographic agent inhibits the growth of tumors implanted in rat livers by inducing platinum-DNA adducts to form and massive apoptosis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(3): 473-483.

[4] Enomoto T, Oda T, Aoyagi Y, et al. Consistent liver metastases in a rat model by portal injection of microencapsulated cancer cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(23): 11131-11139.

[5] 李笑岩,白威勇,刘同慎,等.二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的建立及病理学改变 [J]. 滨州医学院学报,2007, 30(6): 401-403.

Li XY, Bai XY, Liu TS, et al. Establishment of a rat model of liver cancer induced by diethylnitrosamine and pathological changes [J]. J Binzhou Med Univ, 2007, 30(6): 401-403.

[6] 朱艳志,孔宪炳,颜朗,间断给药 DEN 诱导大鼠肝癌模型建立及病理研究[J]. 重庆医科大学学报,2010, 35(12): 1843-1846.

Zhu YZ, Kong XB, Yan L. Intermittent administration of DEN induced rat liver cancer model establishment and pathological study [J]. J Chongqing Med Univ, 2010, 35(12): 1843-1846.

[7] Abd El-Moneim OM, Abd El-Rahim AH, Hafiz NA. Evaluation of selenium nanoparticles and doxorubicin effect against hepatocellular carcinoma rat model cytogenetic toxicity and DNA damage [J]. Toxicol Rep, 2018, 5: 771-776.

[8] 周侗,陈勇,尤楠,等. 二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌模型的建立及评价 [J]. 现代生物医学进展,2010, 10(20): 3812-3815.

Zhou T, Chen Y, You N, et al. Establishment and evaluation of rat liver cancer model induced by diethylnitrosamine [J]. Progr Mod Biomed, 2010, 10(20): 3812-3815.

[9] Pan LC, Xiao HY, Yin WJ, et al. Correlation between HSD17B4 expression in rat liver cancer tissues and inflammation or proliferation [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3386-3393.

[10] Jiang W, Wen D, Cheng Z, et al. Effect of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, against DENA-induced liver cancer in rats mediated via NF- κ B activation and inflammatory cytokines [J]. J Biochem Mol Toxicol 2018 Sep 15: e22220.

[11] 夏宁,高媛,王兴,等. 血清及肝组织 miR-200a 在大鼠肝癌发生过程中的动态表达分析 [J]. 中华肝脏病杂志 2014, 22(6): 440-444

Xia N, Gao Y, Wang X, et al. An expression analysis of miR-200a in serum and liver tissue during the process of liver cancer development in rats [J]. Chin J Liver Dis, 2014, 22(5): 440-444.

[12] Solt DB, Medline A, Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis [J]. Am J Pathol, 1977, 88(3): 595-618.

[13] Ghosh MK, Patra F, Ghosh S, et al. Antisense oligonucleotides directed against insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids delay the progress of rat hepatocarcinogenesis [J]. J Carcinog, 2014, 13: 2.

[14] Akshatha GM, Raval SK, Arpitha GM, et al. Immunohistochemical, histopathological study and chemoprotective effect of Solanum nigrum in N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats [J]. Vet World, 2018, 11(4): 402-409.

[15] Saad ED, Fouad H, Rashed LA, et al. Impact of mesenchymal stem cells and vitamin D on transforming growth factor beta signaling pathway in hepatocellular carcinoma in rats [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(4): 905-912.

[16] Dai ZJ, Wu WY, Kang HF, et al. Protective effects of Scutellaria barbata against rat liver tumorigenesis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(1): 261-265.

[17] 赵鲁筋,刘小北,郭宏伟. 3'-Me-DAB 诱发大鼠肝癌模型的建立与病理研究 [J]. 中国实验诊断学,2004,8(3): 243-245.

Zhao LJ, Liu XB, Guo HW. 3'-Me-DAB induced rat liver cancer model establishment and pathological study [J]. Chin J Lab

- Diagn, 2004, 8(3): 243-245.
- [18] Yan Y, Zeng ZZ, Higashi S, et al. Resistance of DRH strain rats to chemical carcinogenesis of liver: genetic analysis of later progression stage [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(1): 189-196.
- [19] Johnson NM, Egner PA, Baxter VK, et al. Complete protection against aflatoxin B1-induced liver cancer with a triterpenoid: DNA adduct dosimetry, molecular signature, and genotoxicity threshold [J]. *Cancer Prev Res*, 2014, 7(7): 658-665.
- [20] 蒿艳蓉, 杨芳, 曹骥, 等. 银杏叶提取物(EGb761)阻断 AFB1 致大鼠肝癌及其机制研究 [J]. *中药材*, 2009, 32(1): 92-96.
- Hao YR, Yang F, Cao J, et al. Ginkgo biloba extract (EGb761) blocks AFB1-induced liver cancer in rats and its mechanism [J]. *J Chin Med Mat*, 2009, 32(1): 92-96.
- [21] 刘东璞, 卢凤美, 姚海涛, 等. 黄曲霉毒素 B1 诱导大鼠肝癌模型的建立 [J]. *黑龙江医药科学*, 2012, 35(6): 47-48.
- Liu DP, Lu FM, Yao HT, et al. Aflatoxin B1 induces the establishment of rat liver cancer model [J]. *Heilongjiang Med Sci*, 2012, 35(6): 47-48.
- [22] 段小娴, 覃柳亮, 覃国忠, 等. 单剂量黄曲霉毒素 B1 致大鼠肝癌作用的短期实验模型 [J]. *癌症*, 1996, 15(1): 21-23.
- Duan XX, Qin LL, Qin GZ, et al. Short-term experimental model of single-dose aflatoxin B1-induced liver cancer in rats [J]. *Cancer*, 1996, 15(1): 21-23.
- [23] Peraino C, Staffeldt EF, Carnes BA, et al. Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a)pyrene within one day after birth [J]. *Cancer Res*, 1984, 44(8): 3340-3347.
- [24] Troiani T, Schettino C, Martinelli E, et al. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 65(3): 200-211.
- [25] Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(3): 513-523.
- [26] Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(6): 852-857.
- [27] Chen LC, Lee WC, Ho CL, et al. Biodistribution, pharmacokinetics and efficacy of ¹⁸⁸Re(1)-tricarboxyl-labeled human serum albumin microspheres in an orthotopic hepatoma rat model [J]. *In Vivo*, 2018, 32(3): 567-573.
- [28] Su Z, Wang X, Zheng L, et al. MRI-guided interventional natural killer cell delivery for liver tumor treatment [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(5): 1860-1869.
- [29] Sun B, Chen Y, Xiang T, et al. The Chinese herb contributes to the regulation of OATP1B2 and ABCG2 in a rat model of orthotopic transplantation liver cancer pretreated with food restriction and diarrhea [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 752850.
- [30] 杨炜, 冉立峰, 周崑, 等. Wistar 大鼠 CBRH-3 肝癌模型的构建 [J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(14): 2131-2133.
- Yang W, Ran LF, Zhou K, et al. Construction of CBRH-3 liver cancer model in Wistar rats [J]. *Mod Med Health*, 2018, 34(14): 2131-2133.
- [31] Buijs M, Geschwind JF, Syed LH, et al. Spontaneous tumor regression in a syngeneic rat model of liver cancer: implications for survival studies [J]. *J Vasc Int Radiol*, 2012, 23(12): 1685-1691.
- [32] Chu TH, Chan HH, Hu TH, et al. Celecoxib enhances the therapeutic efficacy of epirubicin for Novikoff hepatoma in rats [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2567-2580.
- [33] Pan HB, Wang EM, Sun CK, et al. Rapid induction of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats by non-invasive ultrasound-guided cells implantation [J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10: 83.
- [34] Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, et al. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats [J]. *J Hepatol*, 2002, 37(1): 22-30.

[收稿日期] 2018-09-19