

## 建立符合肝癌肝移植术后肝癌复发病规律的大鼠模型

陈颖华<sup>1</sup>, 蔡常洁<sup>1</sup>, 陆敏强<sup>1</sup>, 郭中敏<sup>2</sup>, 杨 扬<sup>1</sup>, 陈规划<sup>1</sup>

( 1. 中山大学附属第三医院肝脏移植中心 // 器官移植研究所, 广东 广州 510630,

2. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080 )

**摘要:** 【目的】建立能反映肝癌肝移植特点的肝癌复发病动物模型。【方法】选用 Wistar 大鼠, 实验组大鼠给予肝移植术后常规联合免疫抑制方案(MP+CSA), 对照组仅同法使用生理盐水, 两组均接受经门静脉系统接种 walker-256 肿瘤细胞株手术, 观察 60 d, 死后剖腹探查取病理检查。【结果】实验组手术时间为 (22.6 ± 0.6) min, 对照组为 (22.1 ± 0.7) min, 两组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组生存时间为 (14.8 ± 2.3) d, 对照组为 (40.9 ± 5.3) d, 两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。实验组大鼠体重减轻量 (53.5 ± 2.6) g, 较对照组体重减轻量 (34.6 ± 5.8) g 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 实验组大鼠肿瘤复发率为 95% (19/20), 对照组为 40% (8/20), 实验组大鼠肿瘤的复发率明显高于对照组大鼠 ( $P < 0.05$ )。【结论】该模型能够有效模拟肝癌肝移植术后肿瘤复发的主要特征, 可以作为研究肝癌肝移植术后肿瘤复发的理想大鼠模型。

关键词: 模型; 动物; 肝癌; 肝移植; 复发

中图分类号: R 657.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0640-04

### A New Rat Model According with Recrudescence Mechanism after Liver Transplantation

CHEN Ying-hua<sup>1</sup>, CAI Chang-jie<sup>1</sup>, LU Min-qiang<sup>1</sup>, GUO Zhong-min<sup>2</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, CHEN Gui-hua<sup>1</sup>

( The Organ Transplantation Research Institute and Liver Transplantation Center // Institute of Liver Transplantation, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Animal Center of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To establish a new animal model for investigating the recrudescence mechanism after liver transplantation for hepatocellular cancer. 【Methods】The 40 wistar rats were chosen and randomly divided into 2 groups, immunosuppression group and control group. The walker-256 cell line was injected via portal venous in both groups. Immunosuppression group received the combined immunosuppression regime (MP+CSA). Control group was applied NS simultaneity. Pathologic anatomic characters of the livers were collected by exploratory laparotomy after death or 60 days after the above treatment in both groups. 【Results】The operation time of immunosuppression group was (22.6 ± 0.6) min, while control group (22.1 ± 0.7) min. No significant difference was found between them ( $P > 0.05$ ). The weight loss in immunosuppression group was higher than control group, which was (53.5 ± 2.6)g and (34.6 ± 5.8)g respectively ( $P < 0.05$ ). Survival time were (14.8 ± 2.3) days in immunosuppression group, shorter than control group (40.9 ± 5.3) days ( $P < 0.05$ ). The percentage of recrudescence rate was 95% (19/20) in immunosuppression group, higher than control group, 40% (8/20) ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】This model is an optimal clinical model to mimic the natural recrudescence characters of hepatocellular carcinoma in human body after liver transplantation.

Key words: models; animal; hepatocellular carcinoma; liver transplantation; recrudescence

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):640-643]

肿瘤复发是影响肝癌肝移植术后长期疗效的

主要原因<sup>[1,2]</sup>。但目前采用的诱癌-移植大鼠模型并

收稿日期: 2006-06-05

基金项目: 科技部 973 计划基金资助项目 (2003CB515507); 广东省自然科学基金资助项目 (04105344); 广东省科技基金资助项目 (2005B30501005); 广州市科技计划基金资助项目 (2005Z3-E0101)

作者简介: 陈颖华 (1978-), 男, 广东广州人, 博士生, 主要从事肝脏移植的临床与基础研究; 陈规划, 教授, 导师, 通讯作者。E-mail: sumscyh@163.com

不能良好模拟出肝癌肝移植术后肿瘤复发的特征。本实验通过使用联合免疫抑制与循环肿瘤细胞攻击肝脏的大鼠模型模拟肝癌肝移植术后复发,建立符合肝癌肝移植术后肿瘤复发规律的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂及细胞株 环孢素注射液(cyclosporine, 瑞士诺华制药公司), 250 mg/瓶;注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(solu-medrol, 美国辉瑞公司), 40 mg/瓶。Walker-256 肿瘤细胞株购买自武汉大学生物材料和培养物中心。

1.1.2 实验动物 无特定病原体(SPF)级 Wistar 成年雄性大鼠 40 只, 体质量 240~280 g, 购自中山大学实验动物中心, 许可证号: 粤监证字 2005A055。

### 1.2 实验方法

1.2.1 肝转移癌大鼠模型(经门静脉系统接种肿瘤细胞株) 于 SPF 手术室内将 walker-256 肿瘤细胞株接种于大鼠腹腔传代以获取对数生长期的肿瘤细胞<sup>[3]</sup>, 在相差显微镜下进行计数, 分装每个样本肿瘤细胞约  $2 \times 10^6/0.5$  mL 备用。使用体积分数 10%水合氯醛注射液按 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉后, 取大鼠平卧位, 采用小的腹正中切口进腹, 游离、暴露门静脉、肠系膜上静脉, 用 29 号针头将事先配好的 walker-256 肿瘤细胞悬液 ( $2 \times 10^6/0.5$  mL) 吹吸混匀后, 经肠系膜上静脉接近汇合部直视下注入。注入后缓慢退针, 出针后迅速压迫针口止血。确切止血后以灭菌注射用水冲洗腹腔, 逐层关腹。

1.2.2 实验分组及模拟肝移植后免疫抑制状态 40 只大鼠肝转移癌大鼠模型按随机数法随机等分为实验组和空白对照组(每组 20 只)。实验组: 免疫抑制方案为 MP+CSA, 即术前术后每天经大鼠尾静脉注射甲泼尼龙琥珀酸钠 20 mg/kg, 术前及术后每天经大鼠尾静脉注射环孢素 20 mg/kg。通过联合免疫抑制方案模拟同种异体肝移植术后免疫抑制状态。空白对照组: 仅相应注射生理盐水或以生理盐水灌胃以作空白对照。

1.2.3 术后处理 术后复温至苏醒, 置于 SPF 环境, 分笼单独饲养, 自由进食饮水。术后 7 d 内, 实

验组及对照组大鼠每天均注射青霉素钠 100 000 U/kg 以预防感染。死后探查肝脏, 标本做常规切片病理检查, 60 d 后将余下动物处死, 同法处理。

### 1.3 统计学分析

计量资料数据均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 使用 SPSS 13.0 软件包进行分析。实验前后体质量比较、手术时间比较使用两组完全随机化设计资料均数的 t 检验, 实验后体质量比较及其变化比较使用两组完全随机化设计均数的 t 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 生存期比较采用 log-rank 法。复发率比较使用 Fisher's 确切概率法进行比较。检验水准,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 手术情况

实验组及对照组大鼠手术过程顺利, 两组均无术中死亡的大鼠。实验组的手术时间为  $(22.6 \pm 0.6)$  min, 对照组的手术时间为  $(22.1 \pm 0.7)$  min, 两组手术时间比较差异无统计学意义。术后两组大鼠均无明显并发症。

### 2.2 一般情况及存活情况

手术后, 实验组大鼠与对照组大鼠均出现饮水量减少、活动度下降等表现, 但是两组大鼠在第 3 到第 7 天之间饮水量及活动度均逐步恢复至正常。两组大鼠在实验期间 10 d 内均存活, 差异无统计学意义; 死后体质量变化差异有统计学意义(表 1)。

表 1 实验大鼠实验前后体质量的变化

Table 1 Changes of body mass in the rats before and after the operation

Group	n	$(\bar{x} \pm s)$ , m/g		
		$m_{b,b}$	$m_{b,a}$	$m_b(m_{b,b} - m_{b,a})$
Immunosuppression	20	258.0 $\pm$ 2.0	204.5 $\pm$ 2.4	53.5 $\pm$ 2.6
Control	20	257.9 $\pm$ 2.2	223.3 $\pm$ 5.0	34.6 $\pm$ 5.8
t or t		0.03	-3.40 <sup>1)</sup>	2.96 <sup>1)</sup>
P		>0.05	<0.05	<0.05

$m_{b,b}$ : average body mass before operation;  $m_{b,a}$ : average body mass after operation as dead;  $m_b(m_{b,b} - m_{b,a})$ : changes of average body mass before and after operation as dead. 1) t

### 2.3 肿瘤复发情况

死后解剖探察。大体标本见肿瘤复发阳性的肝脏明显增大。表面大小不等颗粒状肿瘤组织, 呈

弥漫性改变。镜下见明显异形性肿瘤细胞,瘤细胞间形态差异小,成团灶样分布,散布于各肝叶,被侵犯的肝内组织结构破坏。实验组 20 只大鼠中,有复发的为 19 只,复发率 95%,对照组 20 只大鼠中,有复发的为 8 只,复发率为 40%,实验组大鼠肿瘤复发率明显高于对照组 (Fisher's exact test,  $P=0.00$ )。

#### 2.4 实验大鼠生存分析

根据 Kaplan-Meier 法作出生存曲线,如图 1 所示,实验组生存时间为 (14.8 ± 2.3) d, 对照组为 (40.9 ± 5.3) d, 两组差异有统计学意义 (log-rank 法  $\chi^2=12.30$ ,  $df=1$ ,  $P=0.00$ )。

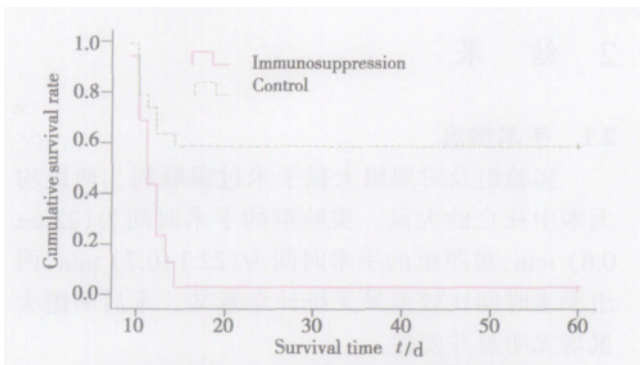


图 1 实验大鼠术后的 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig. 1 Survival curve of the rats after operation (Kaplan-Meier)

### 3 讨论

肝癌肝移植术后肿瘤复发是目前肝移植研究的热点问题之一<sup>[4-8]</sup>, 目前研究载体多采用诱癌-移植的大鼠模型<sup>[9-11]</sup>。该模型存在以下问题: 国内多使用同种属大鼠进行移植, 且术后不给予免疫抑制剂, 不能反映肝移植术后的免疫抑制特点; 化学诱发性肿瘤分期及细胞分化程度参差不齐, 实验对象缺乏同一性; 化学诱癌诱导期长, 诱癌后存活的实验步骤本身就是对实验动物的人为选择过程, 使实验对象的随机性受到置疑; 诱癌-移植模型的大鼠腹腔内粘连严重、结构不清, 手术步骤繁复, 手术时间较长, 手术死亡率高, 模型不稳定; 荷毒大鼠体内 DENA 水平超出一般肝移植大鼠, 存在机体残存的剂重新诱导新肝新发肿瘤的可能, 成为致癌性混杂因素。因此, 该模型非实验干预性影响因素众多。

肝癌病人门静脉系统残存的肿瘤细胞在肝移

植术后经门脉在移植肝及肝外转移、播散是肝癌肝移植术后肿瘤复发的主要机制之一, 因此本研究放弃诱癌而采用经门静脉肿瘤细胞注射的形式, 模拟肝癌肝移植术后的肿瘤复发途径。本实验组大鼠接种肿瘤后体重减轻程度明显高于对照组, 而病理解剖结果也证实实验组大鼠肿瘤复发率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且生存期明显短于对照组 ( $P < 0.05$ )。提示联合免疫抑制会明显加速肿瘤细胞的倍增以及复发, 进而缩短生存时间, 是研究肝移植术后肿瘤复发不可忽视的主要影响因素之一。而在免疫监视下调时, 通过肝-门静脉系统在移植肝的侵犯、播散与转移这种血道转移机理正是临床肝癌肝移植术后复发最为重要的机制之一<sup>[12-14]</sup>。

本实验肿瘤大体标本相似, walker-256 肿瘤细胞分化程度、阶段均较为接近, 易于识别, 提示采用成株化的肿瘤细胞株, 生物行为学表现稳定, 有较好的同一性。此方面优于诱导肝癌的动物模型, 有利于作为对不同实验干预因素进行比较的载体。而且本实验实验组在免疫抑制状态下肿瘤复发率为 95%, 提示该动物模型的肿瘤复发成功率较诱癌-移植模型复发率 0~12.5% 为高<sup>[10, 11]</sup>。更适于用以研究术后肿瘤复发的影响因素。本模型手术时间均控制在 30 min 内, 实验组与对照组手术时间差异无统计学意义。手术操作时间明显短于常规大鼠肝移植手术时间, 对手术打击较小, 围手术期死亡率较低, 并发症少见, 模型较为稳定。

术后实验组大鼠肿瘤复发过程与晚期肝癌肝移植复发过程较为接近, 而且两者主要机制相若。故此通过用经门静脉系统接种肿瘤细胞株, 配合经典的联合免疫抑制方案能真实反映出肝癌肝移植术后肿瘤复发的生物学特征, 而且模型稳定、便于比较且无化学诱癌等干扰因素。可以作为研究肝癌肝移植术后肿瘤复发的动物模型。

#### 参考文献:

- [1] 陆敏强, 陈规划, 杨扬, 等. 影响肝癌肝移植疗效的危险因素分析[J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24(1): 50-53.
- [2] SCHWARTZ M, ROAYAIE S, LLOVET J, et al. How should patients with hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation be treated? [J]. J Hepatol, 2005, 43(4):584-589.
- [3] 李卫国, 陈伟良, 蒋立坚, 等. 小剂量顺铂联合~(32)

- P玻璃微球对 S180 瘤细胞的细胞毒作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1):65- 68.
- [4] 陈规划, 杨 扬, 陆敏强, 等. 肝移植治疗原发性肝癌 60 例[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(7):413- 416.
- [5] 李锦清, 李国辉, 张亚奇, 等. 降低原发性肝癌术后复发率的研究[J]. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 161- 164.
- [6] 刘允怡. 肝移植在肝癌治疗中的地位与评价[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(5):265- 267.
- [7] KARAKAYALI H, MORAY G, SOZEN H. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Transplant Proc, 2006, 38 (2):575- 578.
- [8] OLTHOFF K M. Surgical options for hepatocellular carcinoma: resection and transplantation [J]. Liver Transpl Surg, 1998, 4(5 Suppl 1):98- 104.
- [9] 王孟龙, 朱 斌, 杨甲梅, 等. 肝癌大鼠原位肝移植模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7):S15- 16.
- [10] 李齐根, 杨广顺, 卫立辛, 等. 大鼠肝癌肝移植模型的建立[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(3):191- 195.
- [11] MATSUZAKI T, MURASE N, YAGIHASHI A, et al. Liver transplantation for diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Transplant Proc, 1992, 24(2):748- 751.
- [12] SCHLITT HJ, NEIPP M, WEIMANN A, et al. Recurrence patterns of hepatocellular and fibrolamellar carcinoma after liver transplantation [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(1):324- 331.
- [13] TAMURA S, KATO T, BERHO M, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation [J]. Arch Surg, 2001, 136(1):25- 30.
- [14] JONES S, BECHSTEIN W, STEINMULLER T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2001, 33(5):1080- 1086.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 633 页 from page 633)

科杂志, 2003, 36(6): 443- 446.

- [3] FERRARI G, CUSELLA - DE ANGELIS G, COLETTA M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors [J]. Science, 1998, 279 (5365): 1528- 1530.
- [4] CORTI S, STRAZZER R, DEL BO R, et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse [J]. Exp Cell Res, 2002, 277(1): 74- 85.
- [5] LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury [J]. Cell, 2002, 111(4): 589- 601.
- [6] CORBEL SY, LEE A, YI L, et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle [J]. Nat Med, 2003, 9(12): 1528- 1532.
- [7] HAGIWARA H, OHSAWA Y, ASAKURA S, et al. Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy [J]. FEBS Lett, 2006, 580(18): 4463- 4468.
- [8] 陈松林, 张 成, 黄 文, 等. 骨髓干细胞移植对 dystrophin/utrophin 基因双敲除鼠骨骼肌微观结构的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1): 16- 19.
- [9] EBIHARA S, GUIBINGA G H, GILBERT R, et al. Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophin (mdx) mice [J]. Physiol Genom, 2000, 3(3): 133- 144.
- [10] AHMAD A, BRINSON M, HODGES B L, et al. Mdx mice inducibly expressing dystrophin provide insights into the potential of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9( 17): 2507- 2515.
- [11] BENABDALLAH B F, BOUCHENTOUF M, TREMBLAY J P. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal[J]. Transplantation, 2005, 79(12):1696- 1702.

(编辑 刘清海)