

## · 实验研究 ·

人肝癌裸小鼠原位移植模型的建立与鉴定<sup>①</sup>彭宝岗<sup>1,②</sup> 丁健<sup>2</sup> 吕明德<sup>1</sup>陈陵际<sup>2</sup> 黄洁夫<sup>1</sup> 陆丽娟<sup>2</sup>

(1 中山医科大学附属第一医院肝胆外科;广州,510080 2 中国科学院上海药物研究所)

**提 要** 人肝癌裸小鼠原位移植模型的制备,是将肿瘤切除标本先接种到裸小鼠(BALB/CA)皮下,待移植瘤稳定传代后,再植入同种裸小鼠肝内。皮下和原位移植瘤经光镜、电镜观察均保留人肝癌组织形态学特点,免疫组化染色显示人 AFP 及 HBsAg 阳性,细胞图像分析 DNA 含量呈异倍体。但是肝癌最具特征性的生物学行为,如腹腔浸润转移、腹水等表现仅见于原位移植瘤模型。本模型的建立方法实用可靠,同时表明原位移植瘤模型在肝癌研究中更为理想。

**主题词** 肝肿瘤;肝细胞瘤;肿瘤移植;疾病模型,动物;小鼠,裸

**中图分类号** R 735.7

1993年5月至1994年12月,我们进行了人肝癌切除标本裸小鼠原位移植模型的建立和鉴定工作,现报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 移植瘤源

为手术切除组织标本,代号 HC-93,来自一 59 岁男性原发性肝癌患者,术前患者血清 AFP 13 000  $\mu\text{g/L}$ ,肿瘤病理学诊断为梁索型的高分化肝细胞性肝癌。

### 1.2 实验动物

为 4 周~8 周龄的雌性 BALB/CA 裸小鼠,由中国科学院上海药物研究所提供(合格证号:中科动管第 004 号)。在 SPF 条件下饲养,无菌实验操作。

### 1.3 肿瘤移植及传代

将 0.3 cm 的人肝癌组织块接种于两只裸小鼠腋部皮下,瘤块长至 1 cm 时,用套管针作腋部皮下插块传代,观察移植瘤的接种成活率、生长潜伏期、两代间隔时间和有无自然消退。用游标卡尺每周测量移植瘤的大小,按(长 $\times$ 宽 $\times$ 高 $\times$  $\pi/6$ )计算平均每周几何直径净增值。测定荷瘤 1 个月后血清中 AFP 浓度并观察荷瘤鼠平均生存时间。

### 1.4 移植瘤肝内原位接种

移植瘤皮下稳定传代 8 代后行原位移植。取 8 周龄裸小鼠麻醉后作左肋下横切口,用套管针将移植瘤块植入左肝叶实质中后缝合伤口。观测指标同皮下移植瘤模型。

### 1.5 裸小鼠皮下、肝内移植瘤组织的鉴定

**1.5.1 光镜和电镜检查** 光镜标本 HE 染色后检查。电镜样品经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色后,在 ZEISS-902 型透射电镜下观察。

**1.5.2 免疫组织化学染色** 用 AFP(1:500)、Ferritin(1:50)、HBsAg(1:750)、EMA(1:40)、CEA(1:300)5 种抗原、ABC 染色法检测。试剂均为 DAKO 公司生产的单克隆抗体。染色结果评价:(-)阴性、(+)阳性细胞 $<50\%$ 、(++)阳性细胞 $>50\%$ 。

**1.5.3 细胞图像分析(ICM)** 组织作厚度 5  $\mu\text{m}$  的切片。采用 Feulgen 改良法行 DNA 特殊染色(CAS Feulgen Azure A Kit)。使用 CAS-200 细胞图像分析仪、CAS 公司 QPA 软件测定细胞核 DNA 含量和细胞周期各时相细胞的比例。每张切片随机测量 100 个细胞核,以正常裸小鼠肝组织 G/G 期细胞的 DNA 含量作为二倍体对照值,得出 DNA 指数(DI 值)和各期细胞比例。

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者,1963 年出生,男,主治医师

## 2 结果

### 2.1 生长特点

原人肝癌组织接种于裸小鼠腋部皮下后 28 d, 两鼠均长至 1 cm 左右后传代, 以后各代间隔维持在 30 d 左右。从各种观察指标(表 1)可见皮下移植瘤成活率高、荷瘤鼠生存时间短。而肝内接种潜伏期短、生长速度快、血清 AFP 浓度较高。两者均无自发消退且呈浸润性生长, 但在相同单位时间内尤以原位移植瘤的增长速度快, 甚至可大至直径 7 cm 左右布满全肝。原位移植瘤直径超过 3.0 cm 时 100% 出现腹腔浸润、转移, 同时并发腹水。皮下移植模型未见上述情况

表 1 人肝癌裸小鼠移植瘤两种不同移植途径的比较

项 目	移植途径	
	皮下(n=23)	肝内(n=31)
移植成功率(%)	100	90.5
潜伏期(t/d)	10~15	7~14
平均每周几何直径净增值(d/mm)	2.38	2.83
荷瘤鼠生存时间(t/d)	59.3	83.1
AFP 浓度( $\mu\text{g}/10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	673.9	804.3
自然消退率(%)	0	0

### 2.2 组织学观察

皮下和原位移植瘤组织学所见与原人肝癌(图 1)相同, 由多角形的癌细胞组成, 核大深染, 核仁明显, 核分裂像多见。癌细胞呈梁状或巢状排列, 梁巢间血窦丰富, 可见腺管样结构。传代过程中移植瘤逐

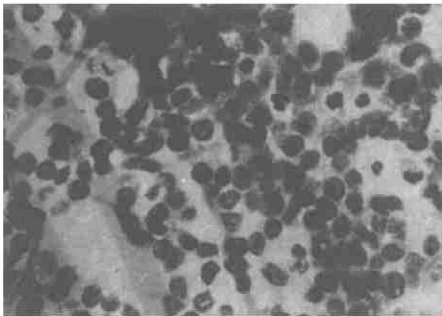


图 1 原人肝癌组织学图像  
HE,  $\times 400$

渐呈低分化倾向, 表现为瘤细胞大小不等, 核分裂像明显增多, 细胞呈实体片状排列, 腺管样结构减少(图 2)。

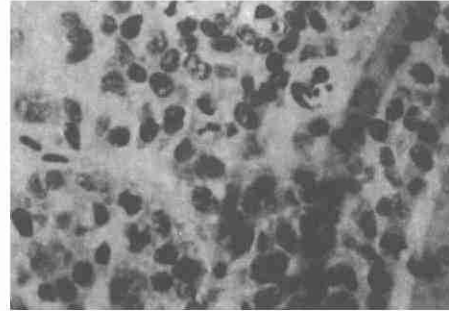


图 2 HCC-93 移植瘤第 13 代  
HE,  $\times 400$

### 2.3 电镜超微结构观察

经两种途径移植的瘤细胞类似原人肝癌细胞, 胞浆内粗、滑面内质网及核糖体丰富, 线粒体发达。部分细胞中见较多的脂滴和毛细胆管, 个别胞质中还可可见高电子密度胆色素小体。腔面有从瘤细胞发出的微绒毛, 形成毛细胆管, 与近腔面紧密连接(图 3)。

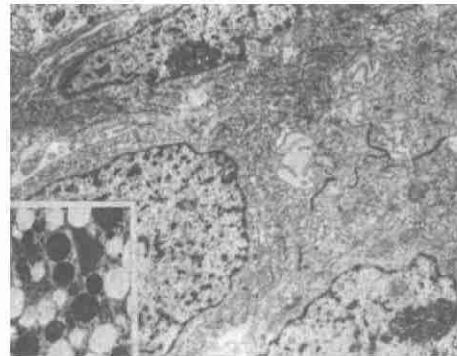


图 3 HCC-93 移植瘤的超微结构  
为移植瘤的第 13 代,  $\times 800$ ; 左下插图示胆色素小体  
与脂滴混杂在一起,  $\times 14,000$

### 2.4 免疫组织化学

HCC-93 移植瘤不论是取自皮下还是肝内, 免疫组化均呈现 AFP 和 HBsAg 阳性(表 2), 而 EMA、CEA 和 Ferritin 则为阴性反应, 与原人肝癌组织的结果一致。

表2 HCC-93免疫组化染色结果

	AFP <sup>1)</sup>	Ferritin	HBsAg	EMA <sup>2)</sup>	CEA <sup>3)</sup>
原人肝癌	++	--	+	-	-
移植瘤(代)					
3	++	--	++	-	--
5	+	--	+	-	--
7	++	-	++	-	--
10	+	--	+	-	--
13	+	--	+	-	--
15	++	-	++	-	--

1)AFP:甲胎蛋白;2)EMA:上皮细胞膜抗原;3)CEA:癌胚抗原

## 2.5 细胞图像分析

HCC-93为一异倍体肿瘤,平均DI值3.36。DNA分布图显示移植瘤代间DNA含量相对稳定,细胞增殖能力高(表3)。

表3 HCC-93细胞细胞图像分析

移植瘤(代)	DI <sup>1)</sup>	G <sub>0</sub> +G <sub>1</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> +m(%)
1	3.90	51.34	37.00	11.66
3	3.28	37.15	49.52	13.33
7	3.23	39.82	42.71	17.47
10	3.60	34.35	45.45	20.20
13	3.30	38.16	43.33	18.51
16	2.83	30.01	44.28	25.71

1)DI:DNA指数

## 3 讨论

人肝癌切除标本裸小鼠移植模型,是人类肝癌研究理想的实验材料。由于移植部位微环境对再现肿瘤组织细胞原有的特征有一定的影响<sup>[1]</sup>,原位移植(orthotopic transplantation),可获与原肿瘤更为近似的生态环境,在形态及生物学特征上能高度模拟人类肿瘤。包炎明等比较人肝癌裸大鼠皮下、腹腔和肝内移植模型,发现肿瘤在生长、浸润与转移,荷瘤鼠周围血AFP浓度等方面与移植部位和生长环境有关,原位移植虽然较其他两者操作难度高,但可能更接近人肝癌的实验情况<sup>[2]</sup>。同时原位移植模型的另一个优点是可以开展经肝血管治疗的实验性研究,这对目前临床上广泛应用的肝癌局部治疗进行深入的基础性探讨以及开拓新的治疗方法等研究的指导意义是不言而喻的。但裸大鼠价格昂贵,饲养管理困难,实际应用受到一定限制。1991年脱朝伟<sup>[3]</sup>等

将人肝癌手术切除标本直接种植到裸小鼠肝内。本研究采用的是经皮下接种过渡的原位移植,对模型除了作常规观测外,进而在免疫原性、DNA含量和细胞增殖动力学等方面进行了鉴定。肿瘤皮下接种较肝内原位移植操作简单,无须再麻醉手术即可直接观察其生长特性和取材作各种指标的检验,也可为原位移植提供大量瘤源。因此,将人原肝癌先接种于裸小鼠皮下,待稳定传代后再移植入肝内,则使原位模型的成功建立有可靠的保证并可满足实验标本数量的需要。经皮下接种过渡的原位移植模型同样能高度模拟人肝癌的形态学特点和生物学行为,证明了这种方法的可行性,使在为肝癌研究提供实验材料方面有了更方便的途径。

两种途径移植的肿瘤均与原人肝癌的形态学表现相符,但是在传代过程中,移植瘤逐渐呈低分化倾向。肿瘤细胞群体中的干细胞对瘤体的增殖起着关键性作用,肿瘤呈干细胞生长模式<sup>[4]</sup>,在细胞群体演进过程中持续性的克隆进化使分化更差的干系被选择并成为主要的干系成份,主导着肿瘤的生长<sup>[5]</sup>。临床上大肝癌往往比小肝癌的恶性程度要更高,移植瘤在传代中的细胞低分化倾向可能正是揭示了人肝癌在增殖过程中存在细胞分化程度的阶段性变化,但是这需要进一步证明。

无论是皮下还是原位移植瘤,均保留了原人肝癌的细胞生物学及增殖动力学特征。同时两者也都能表达原人肝癌的抗原特性,能继续合成肝癌特异性蛋白,确认了裸鼠周围血中的AFP来源。虽然表达程度两者是相同的,但原位移植瘤模型的血AFP浓度却显著高于皮下模型,在使用裸大鼠作为宿主时也见到类似情况。这固然可能与肝脏血窦丰富、营养好有关,也不排除肝内微环境中某些因子参与作用。本研究皮下和原位移植瘤模型最显著的差异是移植瘤的生长特点。除了原位移植瘤潜伏期短、生长

速率快等之外,更表现为高度的浸润性生长,高发生率的转移和腹水。皮下移植瘤模型虽然在许多方面能够模拟人类肝癌,但在肝癌最具特征性的生物学行为方面却未能再现,这表明原位移植瘤模型较之其他途径接种的模型更具实用价值。

### 参 考 文 献

1 Fidler IJ. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*,1986,5 : 29

- 2 包炎明,汤钊猷,马曾辰,等. 人肝癌在裸大鼠皮下、腹腔和肝内移植的比较. *中华肿瘤杂志*,1989,11 : 329
- 3 脱朝伟,丁 铭,唐德媛,等. 人肝细胞癌裸小鼠肝内移植模型的超微结构观察. *中国医学影像技术*,1991,11 : 260
- 4 江希明,邓 树,丁仁瑞. *肿瘤生物学*. 杭州:浙江科学技术出版社,1990. 40~43
- 5 Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Research*,1986,46 : 2203

(1995-10-11 收稿 1996-01-06 修回)

## A MODEL OF ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN MOUSE ;ITS ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION

Peng Baogang Ding Jian Lu Mingde Chen Lingji Huang Jiefu Lu Lijuan

(Department of Hepatobiliary Surgery,First Affiliated Hospital,Sun Yat-sen University of Medical Sciences,Guangzhou,510080)

Authors established a model of orthotopic transplantation of human hepatocellular carcinoma (HCC) in nude mouse (BALB/CA). A surgical specimen of HCC was initially inoculated into subcutis of the mice and after growing by the eighth passage the xenografts were transplanted into liver of the same species of mice. Both subcutaneous and intrahepatic xenografts were demonstrated as preserving morphological characteristics of HCC by histological and ultrastructure study, positive human AFP and HBsAg with immunohistometry test, aneuploidy DNA distribution and high proliferation on cytometry image analysis. However, the most typical biological behaves of HCC such as intraperitoneal invasion, metastasis as well as ascites were only observed in mice bearing liver tumor. The model of orthotopic transplantation of human HCC reported here is simple and reliable for establishing and it is more value than that of heterotopic transplantation on HCC research.

**Subject headings** liver neoplasms hepatoma; orthotopic transplation; disease model; animal; mice, nude