

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.017

· 技术方法 ·

快速大容量尾静脉注射法构建循环肝癌细胞肝转移小鼠模型

时志龙^{1,2}, 孙斌², 陈磊², 钱海华², 张孝峰², 殷正丰^{1,2} (1. 苏州大学医学部临床医学院, 江苏苏州 215006; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤研究室, 上海 200438)

[摘要] **目的:**通过快速大容量尾静脉注射方法构建循环肝癌细胞肝内复发转移小鼠模型。**方法:**40只C57BL/6J小鼠采用随机数字表法随机分为对照组和实验组(20只/组),对照组采用传统的缓慢小容量尾静脉注射法(2×10^6 个肝癌Hepa1-6细胞/0.2 ml, 30 s内注射完毕),实验组采用改良的快速大容量尾静脉注射法(2×10^6 个肝癌Hepa1-6细胞/2 ml, 5 s内注射完毕)构建循环肝癌细胞肝内复发转移小鼠模型。4周后摘取肝、肺、肾、脾组织并行H-E染色,大体和镜下观察肝脏、肺脏、脾脏和肾脏的成瘤情况。**结果:**对照组小鼠只在肺脏有转移灶形成,成瘤率为95%(19/20),肝脏、肾脏、脾脏未见有转移灶形成。实验组小鼠在肝脏和肺脏同时形成转移灶,肺脏成瘤率为94.7%(18/19),肝脏成瘤率为100%(19/19),脾脏、肾脏未见转移灶形成。**结论:**快速大容量尾静脉注射法注射循环肝癌细胞构建的小鼠模型可以模拟肝癌根治性切除后残留的循环肝癌细胞导致早期肝癌肝内复发转移的过程。

[关键词] 循环肝癌细胞; Hepa1-6细胞; 肝转移; 快速大容量尾静脉注射; 动物模型

[中图分类号] R735.7; R730.2; R73-3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0574-04

Establishment of a mouse model of hematogenous dissemination of circulating hepatocellular carcinoma cells transplanted via rapid and vast tail vein injection

Shi Zhilong^{1,2}, Sun Bin², Chen Lei², Qian Haihua², Zhang Xiaofeng², Yin Zhengfeng^{1,2} (1. School of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Molecular Oncology Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a mouse model of intrahepatic recurrence and metastasis of circulating hepatocellular carcinoma cells transplanted via rapid and vast tail vein injection. **Methods:** C57BL/6J mice were randomly divided into a control group ($n = 20$) and an experimental group ($n = 20$). Animals in the control group were given 2×10^6 human hepatoma Hepa1-6 cells/0.2 ml through conventional speed (30 s) tail vein injection and those in the experimental group were given 2×10^6 Hepa1-6 cells/0.2 ml through rapid (5 s) and vast tail vein injection. Four weeks later, animals were sacrificed, liver, lung, kidney and spleen were collected for H-E staining, and tumor formation was evaluated grossly and microscopically. **Results:** In the control group, tumor nodules were seen in 19 (95%) mice and the metastatic lesions occurred only in the lung but not in liver, spleen and kidneys. In the experimental group, tumor nodules were present in the lungs in 18 (94.7%) mice and in the liver in 19 (100%) mice while no metastatic tumors were found in the spleen and kidneys. **Conclusion:** Rapid and vast tail vein injection of hepatoma carcinoma cells in to nude mice may mimic the process of hematogenous dissemination of the residual circulating hepatocellular carcinoma cells after curative resection, thus offering a potentially useful, simple, efficient and safe animal model to study the metastasis of the circulating residual hepatoma carcinoma cells after resection.

[基金项目] 国家传染病重大专项课题资助项目(No. 2012ZX10002012-10);国家自然科学基金资助项目(No. 81272669, No. 81301830)。Project supported by Grants from China National Key Projects for Infectious Disease (No. 2012ZX10002012-10), and the National Natural Science Foundation of China (No. 81272669, No. 81301830)

[作者简介] 时志龙(1988-)男,河南省通许县人,硕士生,主要从事肿瘤复发转移机制研究, E-mail: shizhilong@yeah.net

[通信作者] 殷正丰(Yin Zhengfeng, corresponding author), E-mail: yinzk@aliyun.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1512.011.html>

[**Key words**] circulating hepatocellular carcinoma cell; Hepa1-6; liver metastases; rapid and vast tail vein injection; animal model

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 574-577]

手术切除是肝癌的主要治疗手段^[1-2],而术后复发转移是影响肝癌疗效的根本原因^[3-4]。普遍认为,从原发灶或转移灶释放进入血液的循环肿瘤细胞是导致肝癌术后复发转移的主要根源,最好的例证就是肝癌肝移植后短期内在新的健康肝脏上又产生肝癌^[5-6]。因此,模拟循环肝癌细胞导致肝癌复发转移的过程,并在此基础上发展防治复发转移的新策略和新技术是肝癌研究领域的一个重要课题。然而,传统的经小鼠尾静脉注射肿瘤细胞的方法只能造成肺转移,不能形成肝转移,目前尚缺乏循环肝癌细胞导致肝内复发转移的动物模型。本课题组根据尾静脉注射水流动力学细胞传递(hydrodynamic cell delivery)原理,采用快速大容量尾静脉注射法构建多器官肿瘤转移模型的方法^[7-8],尝试建立肝癌细胞经血行途径形成肝内复发转移的小鼠模型,以模拟肝癌根治性切除后残留循环肝癌细胞导致早期肝癌肝内复发转移的临床现象。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 购自上海生命科学院。近交系 C57BL/6J 雄性小鼠,6~8 周龄,体重 20~22 g,购自第二军医大学实验动物中心【动物合格证号:SCXK(沪)2012-0002】。小鼠饲养在第二军医大学实验动物中心 SPF 条件下,室温控制在(22±2)℃,光照每 12 h 循环 1 次,自由进食和饮水。

1.2 制备肝癌 Hepa1-6 细胞悬液

采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 Hepa1-6 细胞。取对数生长期细胞,PBS 清洗细胞 2 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶(500 μl/孔)消化 3 min,加入 DMEM + 10% FBS 培养基(2 ml/孔),轻轻吹打细胞。细胞悬液 150 × g 离心 3 min,弃上清,加入 2 ml PBS 溶液重悬细胞后再次离心。锥虫兰染色鉴定细胞活率 ≥ 95%,细胞计数后制备成密度为 2 × 10⁶ 个/0.2 ml 和 2 × 10⁶ 个/2 ml 的细胞悬液。

1.3 小鼠尾静脉快速大容量注射 Hepa1-6 细胞构建循环肝癌细胞导致的肝内复发转移模型

40 只小鼠应用随机数字表法随机分为对照组和实验组,每组各 20 只。实验组采用快速大容量尾静脉注射法:将 2 × 10⁶ 个/2 ml 的 Hepa1-6 细胞悬液

经尾静脉快速注射进入小鼠体内,2 ml/只,5 s 内注射完毕。

对照组采用传统尾静脉缓慢小容量注射法:将 2 × 10⁶ 个/0.2 ml 的 Hepa1-6 细胞悬液经尾静脉注射进入小鼠体内,0.2 ml/只,30 s 内注射完毕。

1.4 组织病理学检查观察快速大容量尾静脉注射法构建肝癌转移模型的成瘤情况

4 周后,小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠,0.4 ml/只,麻醉处死。剖腹取材,称取肝、肺、肾、脾等器官质量,观察并记录各器官肿瘤转移情况,器官组织用 10% 甲醛溶液固定 48 h 后进行石蜡包埋、切片,行 H-E 染色,观察组织内转移灶形成情况。

2 结果

2.1 传统的尾静脉缓慢小容量注射法仅在肺脏形成肝癌转移灶

采用传统的尾静脉缓慢注射法的 20 只对照组小鼠仅在肺脏观察到转移灶,成瘤率为 95% (19/20)。转移灶呈多发结节状,白色、质地硬。肝脏、肾脏和脾脏未见有转移灶形成(图 1),H-E 染色结果(图 2)显示,转移灶呈典型的肝癌巢团状排列,中间可有部分坏死。肝脏、肾脏和脾脏组织镜下未见有肿瘤灶形成。

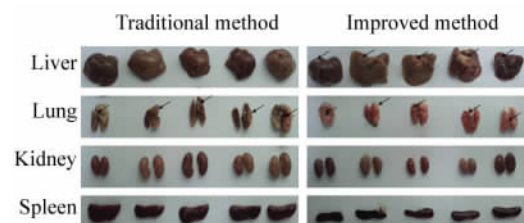


图 1 两种方法注射 Hepa1-6 细胞后形成肝癌转移灶的比较
Fig. 1 Comparison between the circular Hepa1-6 cells formed metastasis in the model mice treated with the traditional and improved method

2.2 改良的尾静脉快速大容量注射法在肝脏和肺脏均形成转移灶

采用快速大容量尾静脉注射法的 20 只实验组小鼠除 1 只在注射后猝死外,其余均在肝脏和肺脏同时形成转移灶(图 1),其肺脏成瘤率为 94.7% (18/19),肝脏成瘤率为 100% (19/19),脾脏和肾脏

未见转移灶形成。转移肿瘤灶呈点状弥散分布, 白色, 质地硬。H-E 染色结果(图 2)显示, 肝脏和肺脏

转移灶呈典型的肝癌巢团状排列, 未见肾脏和脾脏有肿瘤灶形成。

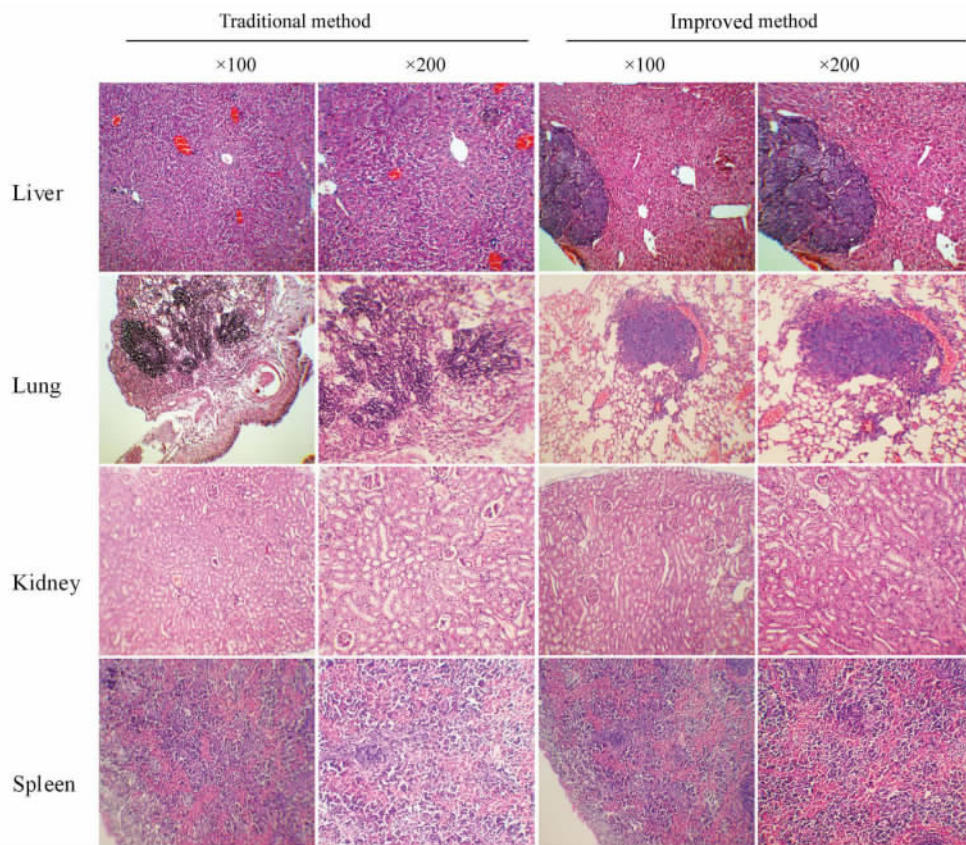


图 2 对照组和实验组小鼠的肝、肺、肾、脾组织切片的 H-E 染色
Fig. 2 The H-E staining of tissue sections from the lung, liver, kidney and spleen of mouse from the experimental group and the control group

3 讨论

近年来越来越多的研究^[9-11]表明, 术后残存在患者体内的循环肝癌细胞是肝癌术后复发的主要根源, 因此, 以循环肝癌细胞为靶点进行干预治疗或可有效降低肝癌术后复发率^[12-14]。而合适的循环肝癌细胞肝转移模型是研究循环肝癌细胞导致肝癌复发转移的基础, 在此基础上可以深入研究防治复发转移的新策略和新技术。

肝脏是肝癌最常见的复发部位, 而肺脏则是肝癌最常见的肝外转移部位^[15]。理想的循环肝癌细胞肝转移模型应具备以下条件: (1) 体内不存在原发瘤或转移瘤; (2) 可以稳定地在肝脏和肺脏形成转移灶; (3) 接种的肝癌细胞在体内经过血液循环过程; (4) 操作简便, 建模高效。然而, 现有的肝癌动物模型^[16-17], 无论是自发性肝癌、诱发性肝癌还是异位或原位移植性肝癌模型, 都难以满足上述要求。经门静

脉或脾脏接种肿瘤细胞的建模方法虽可通过血行途径形成肝脏转移灶, 但其血行距离和时间短, 接近于肝脏原位接种^[18]。传统的尾静脉缓慢小容量注射法可以模拟循环肝癌细胞血行转移情况, 但大部分肿瘤细胞回流到右心后进入肺脏, 由于肿瘤细胞较为黏稠, 多个细胞容易积聚成团, 加上肺脏毛细血管较细且血流速度慢, 因此, 肺脏像一张网一样几乎全部捕获了循环肿瘤细胞, 循环到其他器官的细胞极少, 无法造成包括肝脏在内的其他器官的转移, 只能在肺脏形成转移灶^[19]。本研究中对照组肝脏成瘤率极低也佐证了这一点。

基于水流动力学的注射技术是 Liu 等^[20]及 Zhang 等^[21]建立的一种用来体内流体传递质粒 DNA 的方法, 即在短时间内 (3 ~ 8 s) 向实验动物体循环系统内注射大容量质粒 DNA 溶液 (占小鼠体重 8% ~ 12%)。后来 Kang 等^[7]和 Li 等^[8]采用该技术经尾静脉接种 B16 黑素瘤细胞、4T1 乳腺癌细

胞和 Renca 肾腺癌细胞,成功构建了肝、肺、肾脏转移小鼠模型,这种方法被称为水流动力学细胞传递法。本研究应用该方法,经尾静脉将大容量的 Hepal-6 小鼠肝癌细胞快速注射到小鼠外周血中,由于小鼠心输出量有限,快速注入尾静脉的大容量细胞悬液在下腔静脉形成瞬时高压,使一部分细胞悬液经肝静脉逆流入肝脏,另一部分细胞悬液则由心脏泵出后进入肺脏,从而将肿瘤细胞传递到肝脏和肺脏,并在肝脏和肺脏稳定形成转移灶,因此建模效率很高。该方法操作简单,只需熟练掌握尾静脉注射技术。由于无创,实验动物耐受性好,死亡率低,实用性强。总之,快速大容量尾静脉注射法是构建循环肝癌细胞肝转移模型的合适方法。

在动物模型的构建过程中,本实验对快速大容量尾静脉注射技术进行了新的经验总结:(1)注射前用温水浸泡小鼠尾部,水温和浸泡时间都很重要,建议用 50 ℃ 温水浸泡 5~7 min,不仅使小鼠尾静脉充分扩张,而且有助于软化小鼠尾部皮肤,使进针更顺利,不易刺穿血管;(2)持针手势也很重要,用食指和中指夹持针筒,拇指轻轻接触针栓,进针后用拇指直接按压针栓进行注射,而不必再换成注射手势,以免换手时扭动针头,使原本已经进入血管的针头重新刺出血管外部。

本研究将快速大容量尾静脉注射法应用于循环肝癌细胞肝转移模型的构建,并首次成功地构建了循环肝癌细胞肝转移小鼠模型,为进一步研究循环肝癌细胞在肝癌复发转移过程中的作用提供了重要的实验动物平台。

【参考文献】

- [1] Dong W, Zhang T, Wang ZG, et al. Clinical outcome of small hepatocellular carcinoma after different treatments: A meta-analysis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(29): 10174-10182.
- [2] Fong ZV, Tanabe KK. The clinical management of hepatocellular carcinoma in the United States, Europe, and Asia: A comprehensive and evidence-based comparison and review [J]. *Cancer*, 2014, 120(18): 2824-2838.
- [3] Lee SC, Tan HT, Chung MC. Prognostic biomarkers for prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma: Current status and future prospects [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(12): 3112-3124.
- [4] Zhong JH, Zhong QL, Li LQ, et al. Adjuvant and chemopreventive therapies for resectable hepatocellular carcinoma: A literature review [J]. *Tumour Biol*, 2014 [Epub ahead of print].
- [5] Ravaioli M, Ercolani G, Neri F, et al. Liver transplantation for hepatic tumors: A systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18): 5345-5352.
- [6] Schlansky B, Chen Y, Scott DL, et al. Waiting time predicts survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A cohort study using the United Network for Organ Sharing registry [J]. *Liver Transpl*, 2014, 20(9): 1045-1056.
- [7] Kang JH, Mori T, Niidome T, et al. A syngeneic hepatocellular carcinoma model rapidly and simply prepared using a hydrodynamics-based procedure [J]. *Vet J*, 2009, 181(3): 336-339.
- [8] Li J, Yao Q, Liu D. Hydrodynamic cell delivery for simultaneous establishment of tumor growth in mouse lung, liver and kidney [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(8): 737-741.
- [9] Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1458-1468.
- [10] Fan ST, Yang ZF, Ho DW, et al. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: A prospective study [J]. *Ann Surg*, 2011, 254(4): 569-576.
- [11] Toso C, Mentha G, Majno P. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Five steps to prevent recurrence [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(10): 2031-2035.
- [12] Huang JW, Liu B, Hu BS, et al. Clinical value of circulating tumor cells for the prognosis of postoperative transarterial chemoembolization therapy [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9): 175.
- [13] Zhang Y, Shi ZL, Yang X, et al. Targeting of circulating hepatocellular carcinoma cells to prevent postoperative recurrence and metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 142-147.
- [14] Faltas B. Cornering metastases: Therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 68.
- [15] Hiraki T, Yamakado K, Ikeda O, et al. Percutaneous radiofrequency ablation for pulmonary metastases from hepatocellular carcinoma: Results of a multicenter study in Japan [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2011, 22(6): 741-748.
- [16] 徐玉音, 陈莉. 肝癌动物模型建立的方法 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(4): 405-409.
- [17] Wu L, Tang ZY, Li Y. Experimental models of hepatocellular carcinoma: Developments and evolution [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(8): 969-981.
- [18] 仲杨, 刘景丰. 肝癌转移模型的研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(1): 152-153.
- [19] Yang X, Belosay A, Du M, et al. Estradiol increases ER-negative breast cancer metastasis in an experimental model [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(6): 711-721.
- [20] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(7): 1258-1266.
- [21] Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(10): 1735-1737.

【收稿日期】 2014-04-25

【修回日期】 2014-08-30

【本文编辑】 黄静怡