

·实验研究 Experimental research·

SD 大鼠原位肝癌模型构建及影像学检查

李 鑫, 刘凤永, 袁宏军, 管 阳, 付金鑫, 王茂强

【摘要】 目的 探讨一种成瘤周期短、操作便捷、安全性高、适用于肝癌治疗研究的 SD 大鼠原位种植型肝癌模型制作方法,同时进行彩色超声、增强 CT、MR 等 3 种影像学检查和诊断。**方法** 20 只 SD 大鼠随机分为 McA-RH7777 组和 N1S1 组,每组 10 只。称重后将 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌细胞分别注入两组大鼠肝左中叶内,术后连续 3 d 腹腔注射青霉素(20 万 U/只)和地塞米松(2.5 mg/只),以抗感染和免疫抑制治疗。术后 7 d,采用彩色超声、增强 CT、MR 鉴别肝脏肿瘤,记录模型鼠体重,取出肿瘤组织进行形态学观察和病理学检查。**结果** 术后 7 d,McA-RH7777 组、N1S1 组大鼠分别死亡 2 只、1 只,影像学检查显示成活大鼠全部成瘤,建模成功率分别为 80%(8/10)和 90%(9/10),差异无统计学意义($P=0.86$);大鼠体重分别减轻(50.00 ± 24.93) g、(36.44 ± 7.75) g;肿瘤体积分别为(316.43 ± 265.84) mm³、(188.58 ± 137.47) mm³。两组大鼠处死后,尸检结果与影像学检查一致;肉眼观察 McA-RH7777 肝癌外观呈团块状,N1S1 肝癌呈结节状。HE 染色显示 McA-RH7777 肝癌为高分化肝癌,N1S1 肝癌为低分化肝癌。**结论** 该方法能成功、高效地构建 SD 大鼠原位肝癌模型,同时通过不同影像学技术实现诊断和评价,为肿瘤介入治疗研究提供了一种可供选择的实验工具。

【关键词】 肝癌;大鼠;McA-RH7777 肝癌细胞;N1S1 肝癌细胞;动物模型;彩色超声;增强 CT;磁共振成像

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2018)-12-1177-05

The establishment of in situ liver cancer model in SD rats and its imaging examinations LI Xin, LIU Fengyong, YUAN Hongjun, GUAN Yang, FU Jinxin, WANG Maoqiang. Department of Interventional Radiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Fengyong, E-mail: fengyongliu@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the establishment method of in situ hepatocellular carcinoma (HCC) models in SD rats that have the advantages of short tumorigenic cycle, simple manipulation and high safety, for which three kinds of imaging examination and diagnosis (Doppler ultrasound, enhanced CT and MRI) can be employed. **Methods** A total of 20 SD rats were randomly divided into McA-RH7777 group and N1S1 group, with 10 rats in each group. After weighing, McA-RH7777 HCC cells and N1S1 HCC cells were injected into the left-middle hepatic lobe of the rats of McA-RH7777 group and N1S1 group respectively. After the injection of HCC cells, intraperitoneal injection of penicillin (200 000 units/day/per rat) and dexamethasone (2.5 mg/day/per rat) was given for 3 days to make anti-infection and immunosuppression therapy. Seven days after the treatment, Doppler ultrasound, enhanced CT and magnetic resonance imaging (MRI) examinations were performed to identify the formation of liver tumor; the weight of each rat model was recorded, and the tumor tissues were taken out for morphological observation and pathological examination. **Results** Seven days after the treatment, 2 rats in McA-RH7777 group and one rat in N1S1 group died. Imaging examinations indicated that successful tumor formation was achieved in all the surviving rats, the success rates of modeling in McA-RH7777 group and in N1S1 group were 80% (8/10) and 90% (9/10) respectively, the difference between the two groups was not statistically significant ($P=0.86$). In McA-RH7777 group and in N1S1 group, the body weight of SD rats were reduced by (50.00 ± 24.93) g and by (36.44 ± 7.75) g

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.12.014

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81671800)、北京市自然科学基金面上项目(7172204)

作者单位:100853 北京 解放军总医院介入放射科

通信作者:刘凤永 E-mail: fengyongliu@aliyun.com

respectively, the tumor volumes were $(316.43 \pm 265.84) \text{ mm}^3$ and $(188.58 \pm 137.47) \text{ mm}^3$ respectively. After the rats were sacrificed, the autopsy results were consistent with imaging findings. Macroscopic observation showed that the appearance of McA-RH7777 HCC lesion took the shape of a lump, while N1S1 HCC lesion was nodular in shape. Microscopic examination with HE staining revealed that McA-RH7777 HCC was highly differentiated, while N1S1 HCC was lowly differentiated. **Conclusion** The technique used in this study can successfully and efficiently establish in situ HCC model in SD rats, besides, its diagnosis and evaluation can be conducted with different imaging techniques. The method provides an alternative experimental model for the research of interventional therapy of tumors. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 1177-1181)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; SD rat; McA-RH7777 hepatocellular carcinoma cell; N1S1 hepatocellular carcinoma cell; animal model; Doppler ultrasound; enhanced CT scan; magnetic resonance imaging

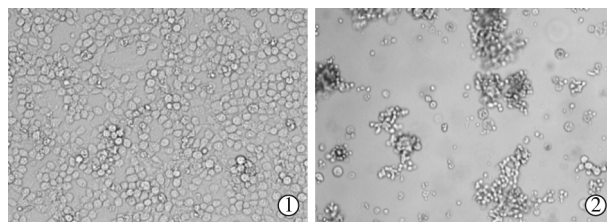
目前临床上尚未出现原发性肝癌有效治疗方法,其发生、治疗、预后及进展等始终是医学研究热点和重点^[1-2]。大鼠具有基因与人类高度同源、生存能力强、成本低等特点,因此大鼠肝癌模型是研究肝癌相关问题的重要工具^[3]。大鼠肝癌模型主要有自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植肝癌模型及转基因肝癌模型^[4]。自发性肝癌可高度模拟人类肝癌发生、发展及相关基因改变,但成瘤时间长、成瘤率低、个体差异较大^[5],除非有特殊要求,一般很少应用。诱导性肝癌模型主要用于化学物质致癌性及肝癌发生背景等相关研究^[6],但成瘤数量不可控、位置不确定性、成瘤周期较长等使应用受限^[5]。随着一系列肝癌细胞系培育,McA-RH7777 和 N1S1 细胞移植性肝癌模型在肝癌治疗研究中得到广泛应用^[7]。近年以经导管动脉化疗栓塞术(TACE)为代表的腔内介入术对外科不可切除肝癌的治疗效果显著^[8],介入术治疗肝癌实验研究逐渐增多^[9-10]。小鼠和裸鼠体积小、血管细,作为肝癌模型用于肝癌介入治疗研究难度较大,而相关大鼠肝癌模型构建研究鲜见报道。本研究采用改良方法较高效地构建出上述两种适用于肝癌介入治疗研究的大鼠原位种植性肝癌模型,并通过彩色超声、增强 CT、MR 等影像学检查手段实现诊断和监测。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

在生物安全柜(美国 Thermo Fisher 科技公司)中,将 McA-RH7777 肝癌细胞(美国菌种保藏中心 ATCC,上海弘顺生物工程公司)和 N1S1 肝癌细胞(ATCC,北京中原领先科技公司)复苏后,分别置于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 Dulbecco 极限必需培养基(DMEM)和 Iscove 改良 Dulbecco 培养基(IMDM)

中于 37℃、5%CO₂ 孵育箱(美国 Thermo Fisher 科技公司)培养。约 4 d,贴壁细胞(McA-RH7777 细胞)用胰酶消化后和悬浮细胞(N1S1 细胞)(图 1)分别用磷酸缓冲液(PBS)提取制成细胞悬液。



①McA-RH7777 细胞为贴壁细胞;②N1S1 细胞为悬浮细胞

图 1 10 倍光学显微镜下观察两种细胞

1.2 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌模型构建

本实验获得解放军总医院伦理委员会审核并批准。20 只无特定病原体(SPF)级 Sprague-Dawley (SD)大鼠(雄性,12 周龄,350~400 g)由解放军总医院动物实验中心(合格证:SCXK 2016-0006)提供,随机分为 McA-RH7777 组和 N1S1 组,每组 10 只。大鼠称重、腹腔注射 3%戊巴比妥($0.2 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)麻醉后,腹部备皮,消毒,铺巾;沿胸骨柄下方腹中线切一长 1~1.5 cm 切口,暴露肝左中叶;1 mL 注射器于肝中叶中下部斜向上方向进针约 0.5 cm 深度,缓慢注入 0.2 mL 细胞悬液 $[(4 \sim 5) \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}]$,肝脏表面肉眼可见一近似圆形透明凸起,凸起点所在位置即建模成功后肝癌所在大体位置,随后固定注射器 2 min 让肝癌细胞沉淀,防止撤针时肝癌细胞从注射点大量流出,导致肝癌细胞种植于肝外部位;撤针后棉球压迫进针点 5 min,防止肿瘤细胞从穿刺点流出,导致肿瘤肝外生长;待注射部位停止出血后,3.0 F 缝合线分层缝合切口,并肌内注射青霉素(20 万 U/只,山东鲁抗医药公司)和地塞米松(2.5 mg/只 ,河南润弘制药公司)。术后连续 3 d 按上

述剂量腹腔注射青霉素和地塞米松,以抗感染和免疫抑制治疗。两组大鼠按照上述步骤分别注入 McA-RH7777 细胞和 N1S1 细胞。

1.3 影像学检查

术后 7 d,采用 Sonix Touch 彩色超声仪(加拿大 Ultrasonix 医疗公司)浅表部位探头检测肝脏肿瘤。增强 CT 检查采用 Somatom Emotion 型 16 排螺旋 CT 机(德国 Siemens 公司),24 G 静脉留置针(德国 B.Braun 公司)穿刺尾静脉,碘普罗胺注射液(德国 Bayer 公司)0.5 mL 于 0.9%氯化钠溶液稀释 1.5~2 倍(扫描参数:130 kV,44 mA,动脉期 3~4 s,延迟期 13~17 s,层厚 3.0 mm,螺距 0.75~0.95,矩阵 512×512)。MR 检查采用 1.5 T 超导型 MR 扫描仪(美国通用公司),小柔线圈,快速自旋回波(FSE)序列 T1 加权成像(TR 400~500 ms,TE 15 ms,矩阵 256×192)和 T2 脂肪抑制序列扫描(TR 4 500~5 000 ms,TE 102 ms,矩阵 256×256),肝脏轴位扫描野(FOV)均为 8~10 cm,层厚 3.0 mm、层间距 0 mm。记录模型鼠体重,肿瘤最大长径(a)和最大横径(b),体积(V)计算公式: $V=ab^2/2$ 。

1.4 肿瘤大体形态观察与病理学检查

影像学检查筛选出建模成功大鼠,腹腔注射过量(3~4 mL)10%水合氯醛处死大鼠,观察两种肿瘤

大体形态特征,同时对两种肿瘤作常规苏木精-伊红(HE)染色,进行病理学检查。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

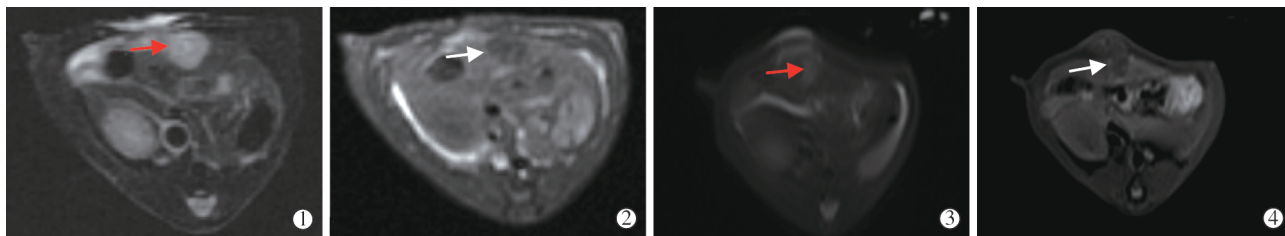
2 结果

2.1 一般状况

两组大鼠术前术后饮食和活动正常。McA-RH7777 组($n=10$)大鼠术前平均体重(382.00 ± 16.02) g,术后 7 d 死亡 2 只,8 只影像学诊断全部成瘤,体重减轻(50.00 ± 24.93) g,建模成功率为 80%;N1S1 组($n=10$)大鼠术前平均体重(373.30 ± 11.60) g,术后 7 d 死亡 1 只,9 只全部成瘤,体重减轻(36.44 ± 7.75) g,建模成功率为 90%。两组肝癌模型构建成功率差异无统计学意义($P=0.86$)。

2.2 影像学表现

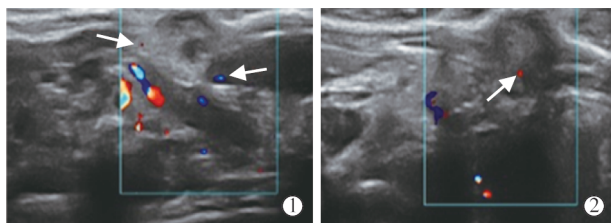
MR 检查显示,两组大鼠肝中叶有单个肿瘤形成,均为 T1 低信号,T2 高信号(图 2);McA-RH7777 组肿瘤最大横径为(10.20 ± 3.46) mm,体积为(316.43 ± 265.84) mm³;N1S1 组肿瘤最大横径为(7.98 ± 2.03) mm,体积为(188.58 ± 137.47) mm³。



①McA-RH7777 肝癌 T2 呈高信号;②T1 呈低信号;③N1S1 肝癌 T2 呈高信号;④T1 呈低信号

图 2 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌 MR 检查影像

彩色超声检查显示,两组肿瘤均为强回声结节,部分内部呈低回声;多普勒分析显示肿瘤存在血液供应(图 3)。



①McA-RH7777 肝癌超声检查肿块呈强回声结节(蓝方框),多普勒分析示肿块存在血供(箭头);②N1S1 肝癌超声检查肿块呈强回声结节(蓝方框),多普勒分析示肿块存在血供(箭头)

图 3 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌彩色超声检查影像

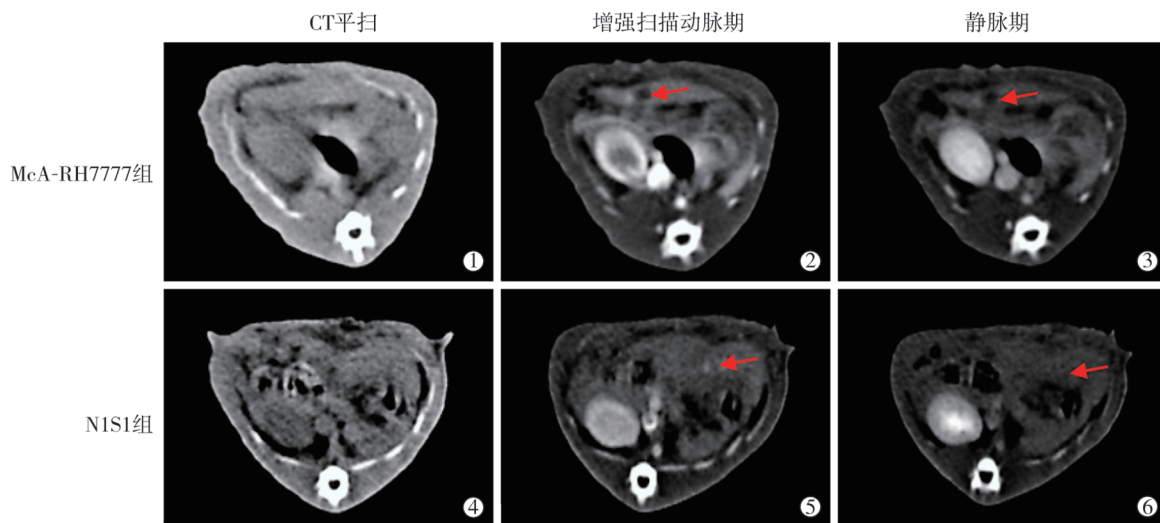
CT 平扫未见两组肿瘤病灶(图 4①④);增强扫描肿瘤呈“快进快出”特点,两组肿瘤病灶动脉期边缘强化呈高信号,内部坏死呈低信号(图 4②⑤),静脉期有明显廓清现象(图 4③⑥)。

2.3 肿瘤大体形态

病理检查结果与上述 3 种影像检查结果一致,肝中叶注射瘤细胞处均形成单一肿瘤,其中 McA-RH7777 肝癌外观呈团块状,N1S1 肝癌呈结节状(图 5)。

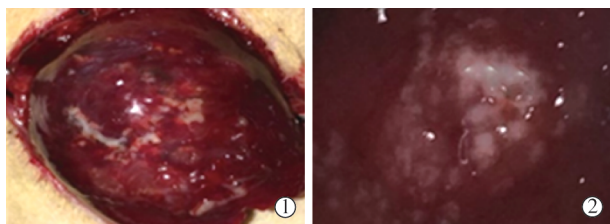
2.4 病理学检查

术后 7 d HE 染色结果显示,McA-RH7777 肝癌为高分化肝细胞癌,肿瘤细胞类圆形或多边形,大小不一,癌细胞呈结节状排列;N1S1 肝癌为低分



①④CT 平扫未见肿瘤病灶;②⑤增强扫描动脉期示肿瘤病灶;③⑥静脉期示肿瘤病灶

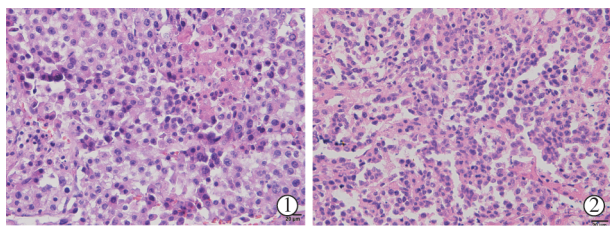
图 4 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌增强 CT 检查影像



①McA-RH7777 肝癌呈团块状;②N1S1 肝癌呈结节状

图 5 McA-RH7777 和 N1S1 肝癌形态特征

化肝细胞癌,癌细胞多边形,胞质丰富,核大深染,癌细胞排列呈小梁状。两种癌细胞均存在坏死现象,McA-RH7777 肝癌细胞坏死数较多于 N1S1 肝癌细胞(图 6)。



①McA-RH7777 肝癌;②N1S1 肝癌

图 6 HE 染色结果

3 讨论

移植性鼠肝癌模型相比其它鼠肝癌模型,具有肿瘤位置可控、数量可调、成瘤时间短等优点,是肝癌研究的重要工具。移植性肝癌分为异种移植和同种移植,异种移植通常将人源性肝癌细胞或其它异源性肝癌细胞接种至免疫缺陷型裸鼠皮下,在转化医学领域中应用广泛^[11-12];同种移植通常将鼠源性肝癌细胞接种至鼠体内,构建肝癌模型。同种移植性肝癌模型高度模拟肝癌免疫机制及肿瘤微环境

改变^[13],是研究肝癌治疗的主要工具。随着医学进步,介入技术在临床上已广泛应用于肝癌治疗^[14]。因此,大鼠原位型肝癌模型是肝癌介入治疗实验研究的理想模型^[15]。Jin 等^[16]通过将癌细胞种植于裸鼠皮下获得瘤组织,随后在 Wistar 大鼠肝脏内种植瘤块方法构建 CBRH-7919 肝癌细胞原位肝癌模型,但该方法操作复杂,建模需时 4 周,周期较长。本研究通过向 SD 大鼠肝脏直接注射瘤细胞联合腹腔注射地塞米松方法,成功构建了 McA-RH7777 和 N1S1 两种大鼠原位型肝癌模型。该方法与瘤块埋植法相比,操作简单便捷,省略瘤组织培养过程,且成瘤时间短,构建相似大小肿瘤模型仅需约 1 周时间,即在建模成功率相当情况下大大缩短了建模周期。Guo 等^[17]将 McA-RH7777 细胞和 N1S1 细胞注入 SD 大鼠肝脏,7 d 后成功构建两种大鼠肝癌模型,但成功率仅为 75%。本研究通过改良方法构建 SD 大鼠肝癌模型,7 d 后达到相似大小肿瘤体积,而建模成功率提高至 85%(17/20)。此外,通过改良法构建的两种肿瘤模型高度模拟人类肝癌恶变质,McA-RH7777 肝癌模型于建模第 10 日左右出现肝外转移,N1S1 肝癌模型则于建模第 14 日左右出现肝外转移,转移常见部位为胃肠道、腹腔及淋巴结;同时,肿瘤转移伴随一系列肿瘤相关性并发症,如食欲下降、体重减轻、精神萎靡、癌性腹水等。

此外,本研究采用临床上常用影像学检查手段对构建的两种原位型肝癌模型进行诊断筛查,结果显示 McA-RH7777 和 N1S1 两种肝癌模型影像学表现与人类肝癌影像学表现相似。因此认为,可通过影像学检查观察两种肝癌模型肿块治疗效果。本研

究总结认为,3 种影像学检查手段中彩色超声最为便捷,可用于初步筛查肿瘤模型构建是否成功,判断肿瘤血供情况,同时初步判断肿瘤大小;MR 检查最为准确,通过 T1 和 T2 加权成像即可实现肝癌诊断,且可准确测量肿瘤大小,是治疗后定期观察肿瘤大小变化的首选检查工具;CT 平扫不易诊断体积较小大鼠肿瘤,须行增强 CT 扫描,而动脉期捕捉时间较短,对比剂有一定肝、肾毒性等缺点,因此除特殊需要,一般不建议通过增强 CT 评价肿瘤大小。本研究两组大鼠肿瘤 7 d 后,通过体重减轻程度、MR 测量肝癌体积大小、彩色超声和增强 CT 分析模型血供以及肝癌大体形态、出现转移时间观察,组织病理学检测,得出 McA-RH7777 肝癌比 N1S1 肝癌生长更迅速,血供更丰富,恶性程度更高。这一结论与 Guo 等^[17]对两种肿瘤组织病理检测后得出的结论一致。

本研究采用改良法成功高效地构建了两种 SD 大鼠原位肝癌模型,建模过程有几点经验和教训:①注射细胞悬液时斜向上方向进针可改变进针角度,有效防止撤针后进针点大量出血。②应确保注射细胞悬液时肉眼可观察到肝脏表面有水肿凸起出现,切记不能将肝脏表面撑破,否则会引起肿瘤细胞流出肝外;依据凸起点可初步确定成瘤位置,为后续影像学检查提供初检位置。③地塞米松注射量应个体化。实验中大鼠死亡原因很可能是地塞米松注射剂量过高,致使大鼠免疫力下降,最后死亡。

综上所述,本研究采用改良法成功构建 SD 大鼠原位 McA-RH7777 团块状肝癌模型和 N1S1 结节状肝癌模型,具有降低肿瘤难度,简化操作步骤,实现高效快速建模,缩短实验周期的特点,并通过彩色超声、MR、增强 CT 成功诊断和评价肿瘤,为肿瘤介入治疗研究提供了一种可选择的实验工具。

[参考文献]

- [1] Li B. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 49: 33-64.
- [2] Saraswat VA, Pandey G, Shetty S. Treatment algorithms for managing hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Exp Hepatol, 2014, 4(Suppl 3): S80-S89.
- [3] Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90: 367-386.
- [4] Newell P, Villanueva A, Friedman SL, et al. Experimental models of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2008, 48: 858-879.
- [5] Wu L, Tang ZY, Li Y. Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 969-981.
- [6] Ikawa-Yoshida A, Matsuo S, Kato A, et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet[J]. Int J Exp Pathol, 2017, 98: 221-233.
- [7] 管阳, 刘凤永, 付金鑫, 等. 肝癌动物模型与介入实验操作应用[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 1046-1051.
- [8] El-Serag HB, Zhu AX, Johnson MS. The treatment path in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2017, 15(Suppl 9): 1-20.
- [9] Li J, Zhou M, Liu F, et al. Hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres for photothermal ablation-chemoembolization therapy in rats[J]. Radiology, 2016, 281: 427-435.
- [10] Burke CT, Cullen JM, State A, et al. Development of an animal model for radiofrequency ablation of primary, virally induced hepatocellular carcinoma in the woodchuck[J]. J Vasc Interv Radiol, 2011, 22: 1613-1618.
- [11] Shen HJ, Wang YH, Xu J. Suppression of the growth of subcutaneous transplanted human liver cancer and lung metastasis in nude mice treated by sorafenib combined with fluorouracil[J]. Zhonghua zhong liu za zhi, 2013, 35: 98-102.
- [12] Liu X, Lin X, Wu M, et al. SPION@Cu 2-xS nanoclusters for highly sensitive MRI and targeted photothermal therapy of hepatocellular carcinoma[J]. J Mater Chem B, 2016, 4: 4119-4129.
- [13] Feng L, Qin L, Guo D, et al. Immunological mechanism of low-dose priming radiation resistance in walker-256 tumor model mice[J]. Exp Ther Med, 2017, 14: 3868-3873.
- [14] European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56: 908-943.
- [15] Aravalli RN, Golzarian J, Cressman EN. Animal models of cancer in interventional radiology[J]. Eur Radiol, 2009, 19: 1049-1053.
- [16] Jin Y, Tong DY, Shen JJ, et al. Establishment of experimental implantation tumor models of hepatocellular carcinoma in Wistar rats[J]. Tumor Biology, 2014, 35: 9079-9083.
- [17] Guo Y, Klein R, Omary RA, et al. Highly malignant intra-hepatic metastatic hepatocellular carcinoma in rats[J]. Am J Transl Res, 2010, 3: 114-120.

(收稿日期:2018-01-31)

(本文编辑:边 皓)