

# 肝癌动物模型的研究进展

刘煌, 刘静

刘煌, 刘静, 中国人民解放军第175医院(厦门大学附属东南医院)普外科 福建省漳州市 363000

作者贡献分布: 刘煌与刘静对此文所作贡献均等; 本综述由刘煌撰写完成; 刘静审校。

通讯作者: 刘静, 副教授, 副主任医师, 博士, 硕士生导师, 363000, 福建省漳州市漳华中路269号, 中国人民解放军第175医院(厦门大学附属东南医院)普外科. liujdoctor@hotmail.com  
电话: 0596-2975769

收稿日期: 2010-10-30 修回日期: 2011-04-13

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-04-28

## Animal models of liver cancer: progress and prospects

Huang Liu, Jing Liu

Huang Liu, Jing Liu, Department of General Surgery, the 175<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA (Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University), Zhangzhou 363000, Fujian Province, China

Correspondence to: Associate Professor Jing Liu, Department of General Surgery, the 175<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA (Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University), 269 Zhanghua Zhong Road, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. liujdoctor@hotmail.com

Received: 2010-10-30 Revised: 2011-04-13

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-04-28

## Abstract

Primary liver cancer remains one of the most lethal malignancies worldwide. As this disease is lethal in most cases, research has to be done to improve our understanding of the disease and to offer insights for possible treatment options. Animal models have been widely used in the research of primary liver cancer. Here, we review the progress and prospects for the development of animal models of primary liver cancer, highlighting the best candidates for future preclinical investigations.

Key Words: Primary liver cancer; Mouse model; Genetically engineered mice

Liu H, Liu J. Animal models of liver cancer: progress and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1275-1278

## 摘要

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一。由于其死亡率高, 现已有很多研究为其临床的治疗提

供基础依据。在这些研究中, 肝癌动物模型的使用很广泛。以下我们回顾现今常用的肝癌动物模型, 并对未来肝癌动物模型的发展做一重点介绍。

关键词: 原发性肝癌; 小鼠模型; 基因工程小鼠

刘煌, 刘静. 肝癌动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(12): 1275-1278

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1275.asp>

## 0 引言

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是居全球第6位的常见肿瘤, 并且在肿瘤相关性死亡中排第3位<sup>[1]</sup>。我国是PHC的高发国, 每年有11万人死于肝癌, 占全世界肝癌年死亡总数的45%。因而明确PHC的发病机制、生物学特性及实现对肝癌的防治是我国医学工作者面临的非常迫切的课题。肝癌动物模型是肝癌基础与临床研究工作中的重要材料, 目前尚没有哪一种模型能够满足理想肝癌动物模型的所有标准, 因此对于特定的问题我们需要选择其最适合的模型。本文简要回顾现今常用的各种肝癌动物模型, 并对未来肝癌动物模型的发展做一重点介绍。

## 1 动物肝癌模型的分类

自20世纪初获得小鼠自发性肝癌动物模型以来, 人们对肝癌动物模型研究的不断深入, 用来建立模型的动物也各种各样, 主要有鼠、兔、猪、犬、树鼯等。目前进行各种肝癌实验最常用的动物是大、小鼠。主要的致癌方法有自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植型肝癌模型、转基因肝癌模型等。其中以诱发型和移植型应用最为广泛, 近年来转基因型肝癌模型在国内外发展很快, 成为动物实验研究的热点。

## 2 自发性肝癌模型

自发性肝癌模型是指实验动物未经任何有意识的人工处置, 在自然情况下所发生的肿瘤。该模型最大的优点是, 完全在自然条件下发生的疾

## ■背景资料

肝癌动物模型是肝癌基础与临床研究工作中的重要材料, 目前尚没有哪一种模型能够满足理想肝癌动物模型的所有标准, 因此对于特定的问题需要选择其最适合的模型。

## ■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

## ■ 研发前沿

近年来转基因型肝癌模型在国内发展很快,成为动物实验研究的热点。

病,排除了人为因素,肝癌的发生、发展与人类肝癌相似,主要是反映动物的肿瘤易感性、环境致癌物质和促癌物质的积聚程度,多发生在近交系小鼠,发生的时间与比例和品系、性别、环境、饲养有关。但是肿瘤发生率低且不稳定,发生时间较难预测且参差不齐,荷瘤动物个体在动物(性别、体质量、肿瘤发生时间等)和肿瘤(大小、数目、部位等)两方面差异较大。由于自发性肝癌模型的局限,现在该模型已少用,被其他肝癌模型所取代<sup>[2]</sup>。

## 3 诱发性动物肝癌模型

诱发性肝癌模型是指用化学、物理或生物的致癌因素作用于动物而形成肝癌。其中化学药物诱导法最常用,可以用单一化学药物,也可用多种药物与不同的促癌剂、肝大部分切除等多种因素按不同的顺序组合成不同的综合诱发肝癌方案。很多种化学物能够诱发动物肝癌的形成,如亚硝胺类(diethylnitrosamine, DEN)、黄曲霉素类、氨基偶氮燃料类(3'-Me-DAB)、芳香胺类化合物(2-AAF)等<sup>[3,4]</sup>。迄今为止,用得最多的是二乙基亚硝胺和苯巴比妥(phenobarbital, PB),虽然PB的效果还有待商榷<sup>[5]</sup>。实验动物的选择以Wistar、SD和F344大鼠最常用,也有应用其他动物(小鼠、豚鼠、兔、旱獭、恒河猴)诱发肝癌的报道。Vesselinovitch等<sup>[6]</sup>采用DEN(5 mg/kg体质量)注射到12-15 d B6C3F1  $\delta$  小鼠腹腔,44 wk后其成瘤率达到100%。国内多选用敏感性较高的如Wistar、SD等纯系大鼠,其周龄不大于5-6 wk,体质量在150 g左右,每周用0.25% DEN水溶液灌胃1次,量为10 mg/kg体质量,而剩余6 d用0.25% DEN水溶液由其自由饮用,约4 mo可诱发出肝癌,5-6 mo诱癌率达80%以上,亦可用0.05% DEN饮水喂养8 mo诱发肝癌;Takeuchi等<sup>[7]</sup>利用体质量200g的 $\delta$  Wistar大鼠按照200 mg/kg体质量一次性腹腔注射DEN,然后给予0.05%的DEN自由饮水,12 wk诱癌成功;Okubo等<sup>[8]</sup>采用体质量200 g的 $\delta$  Wistar大鼠,给予100 mg/kg体质量的DEN水溶液任其自由饮用,16 wk诱癌成功。

诱发性动物肝癌模型的整个诱癌过程(启动肝细胞-肝细胞增生灶-肝细胞增生结节-肝细胞癌)接近人类肝癌的发病特点,多用于肝癌病因学、发生学、发病机制、遗传学方面的研究。但是由于其周期长(3-6 mo),成本高,成功率低,并且有肿瘤生长不稳定等缺点,研究人员应当根据研究目的以及客观条件选择<sup>[9,10]</sup>。

## 4 移植型动物肝癌模型

移植型动物肝癌模型指把肝癌组织块(来源于动物或人)、肝癌细胞株或非肝脏来源的恶性肿瘤(乳腺癌,结直肠癌等)接种于实验动物体内所形成的荷肝癌动物模型。主要包括同种移植(模型动物之间)和异种移植(人和裸鼠之间)两种。最早使用的移植模型是同种移植模型,但是发展到今天,这种模型已经很少使用,因为人们发现同种移植肝癌模型的研究结果并不能对临床进行有效预测(如抗癌药物实验),其次是能获得的鼠肝癌细胞系也较少<sup>[11]</sup>。现今,这种模型主要用来研究那些靠激活免疫系统而起作用的抗癌药物(如免疫治疗)<sup>[11-13]</sup>。以下我们重点介绍现在使用的最多的异种移植肝癌模型。

异种移植肝癌模型是将人肝癌细胞株或肝癌组织块直接移植到免疫缺陷鼠而建立的模型。其中使用最广泛的是裸鼠。除此之外,也有使用重症联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficient mice, SCID)<sup>[14]</sup>。自从1963年第1例人类肝细胞癌细胞系建立以来<sup>[15]</sup>,许多人类肝细胞癌细胞系相继报道,其中HepG2, Hep3B, SMMC-7721和HuH7被广泛应用。并从最初的皮下移植模型发展到腹腔内移植模型。(1)异位移植:即把肝癌细胞或组织块种植于皮下的方法。该法由于其成瘤时间短,劳动力需要少,相对来说不贵,非侵入性测量方便的优点主要用于抗癌药物的临床前评估<sup>[12,13]</sup>。然而,近来的很多实验证明肿瘤细胞生物学行为与微环境之间关系非常密切(如:许多肿瘤细胞系当皮下移植时不发生转移,而当原位移植时发生转移),异位移植的方法忽略了微环境对肝癌发生发展的影响<sup>[12-16]</sup>。因此,该模型所获得的治疗结果必须再通过原位移植的结果证明;(2)原位移植模型:他是一种模拟人类肝癌的更好的方法,主要通过手术或在B超的引导下把肝癌细胞或癌组织块种植于肝脏,他在形态学、微环境、转移潜力和对抗癌药物的反应上更加符合人类肝癌<sup>[17,18]</sup>。其主要缺点在于原位移植需要更复杂和更昂贵的手术移植过程,肿瘤的生长和对药物的反应也不能很好的观察。

现已有实验证实异位或原位异种移植模型对药物抗肿瘤效果的预测并不满意,主要原因可能是注射的肿瘤细胞经常培养了很长时间,由于培养选择压力,这些肿瘤细胞不再持有原始患者肿瘤细胞的分子特性。现认为直接使用肝癌患者的肝癌组织能够更好的解决这个问题。

移植型动物肝癌模型被广泛地运用于抗癌药物的临床前评估, 并已成为研究人类恶性肿瘤转移机制和抗转移治疗的重要实验方法。

## 5 转基因动物肝癌模型

转基因动物是指动物接受外源基因后, 此基因在其染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物, 是当今生物技术的热点。利用转基因技术建立的动物肝癌模型, 为肝肿瘤的病因学研究开辟了一个新的领域。转基因动物模型主要用来研究特殊基因的功能和不同基因在肝细胞癌发展过程中的相互作用(例如: 癌基因和抑癌基因), 也可用于研究特殊基因与肝特异性致癌物之间的关系。

5.1 乙型肝炎病毒转基因肝癌模型 已有充分证据表明乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是人类肝炎和肝癌发生的重要原因<sup>[19]</sup>, 为了制作一个包含完整HBV基因组的转基因鼠来研究肝癌, 学者们付出了很多的努力, 但到目前为止并没有成功<sup>[20,21]</sup>。如今用得最多的肝炎病毒转基因肝癌模型是Chisari等<sup>[22]</sup>的HBsAg转基因小鼠模型和Kim等<sup>[23]</sup>的HBx转基因小鼠模型。这些模型可以用来研究肝癌发生的机制; 也可用于研究化学致癌物与HBV感染之间的关系; 还可以用于双转基因小鼠模型(bitransgenic mouse models)[如敲入(knock-in)感兴趣基因(*c-myc*、*TGF- $\alpha$* )的同时敲入HBsAg或者HBx, 来研究他们之间的关系]<sup>[24,25]</sup>。

5.2 猴病毒40转基因动物肝癌模型 自20世纪80年代末, 对猴病毒40(sv40)转基因小鼠肝癌模型的研究开始兴起, sv40的基因组编码两个致癌蛋白(T-Ag和t-Ag), 通过灭活宿主细胞抑癌基因(*p53*、*Rb*)致癌<sup>[26,27]</sup>。不同启动子的sv40转基因动物可以发生不同部位的细胞, 研究发现启动子/增强子抗凝血酶-III(antithrombin-III, AT-III)<sup>[28]</sup>、白蛋白(albumin, Alb)<sup>[29]</sup>、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶( $\alpha$ -1-antitrypsin, AAT)可使sv40 T-Ag在小鼠肝脏特异性表达。Dubois等<sup>[30]</sup>利用人AT-III基因和sv40抗原序列构建的外源DNA, 建立了sv40转基因小鼠肝癌模型, 研究发现在8 mo时小鼠生瘤率为100%, 同时有10%的小鼠发生肺转移。

5.3 TGF转基因小鼠模型 Factor利用构建的猪Alb/TGF $\beta$ 1基因建立了TGF $\beta$ 1转基因小鼠模型, 该模型肿瘤的平均潜伏期为16-18 mo, 肿瘤发生率为59%。

这些模型对于研究特殊基因在肝癌形成过程中的作用和研究肝细胞癌发展的多步骤过程

非常有用, 但其缺点在于转基因表达在所有的肝脏细胞, 包括肿瘤微环境细胞。另外, 这种基因突变在胚胎形成时已经存在, 因此可能激活一些代偿的分子通路<sup>[9]</sup>。其次, 由于转基因动物肝癌模型制作技术要求极高, 价格昂贵。所以虽然转基因动物肝癌模型可以诱导肝癌的发生, 但其主要还是用于研究基因改变对肝癌形成的影响。目前转基因模型在国内的开展还比较少, 但其为肝癌的基础理论和临床应用研究开辟了更理想的研究途径, 具有广阔的前景, 是肝癌动物模型未来发展的方向。

## 6 其他动物肝癌模型

兔肝癌动物模型是目前世界上最大的肝癌动物模型。该癌模型有以下优点: (1)为目前最大的动物可接种肝肿瘤模型; (2)为富血管肿瘤, 其供血动脉主要为肝动脉; (3)病理上肿瘤为巨块型实体瘤, 浸润性生长, 血供丰富, 类似于人巨块型肝癌; (4)模型制作简单, 价格相对低廉, 接种成功率高, 实验周期短, 一般为2-3 wk后, 肿瘤生长即可达1-3 cm。适用于插管等局部治疗肝肿瘤影像学诊断及介入放射治疗的实验研究。目前多选用为体质量2.0-3.0 kg的新西兰或日本大白兔。主要为肝外-肝同种移植型的肝癌模型, 采用的瘤源为VX2肿瘤细胞株(起源于Shope病毒诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞癌, 经过72次移植传代后正式建株)接种到兔的肾脏、肝脏等部位, 制成原位肿瘤动物模型<sup>[31,32]</sup>。其缺点在于: 兔发生的是移植性肝癌, 缺乏肝硬化背景, 且VX2肿瘤极易转移和播散。除兔之外, 也有应用其他动物(树鼯、旱獭、麻鸭、恒河猴等)制作肝癌模型的报道<sup>[33,34]</sup>。

## 7 结论

理想的肝癌模型应符合以下条件: (1)肿瘤生长与血供特征与人类肝癌相似; (2)简单而易于复制; (3)价廉。上述各类动物模型均有其优缺点, 每位研究者应根据各自研究的目的、实验室的条件等来建立合适的肝癌动物模型<sup>[2]</sup>。寻找一种与人类近缘的体型小, 易于实验室饲养的动物建立肝癌模型, 使其诱癌过程类似于人原发性肝癌的发生过程, 且诱癌率高, 实验重复性好便于进行药物干预和疗效分析, 是我们今后研究的方向。

## 8 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer

### ■相关报道

Okubo等采用体质量200 g的♂Wistar大鼠, 给予100 mg/kg体质量的DEN水溶液任其自由饮用, 16 wk诱癌成功。

## ■同行评价

本文内容全面、详实,具有一定的新颖性和学术参考价值。

- 2 statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 3 陈华, 赵德明. 肝癌动物模型. *实验动物科学与管理* 2005; 22: 32-35
- 4 Hann B, Balmain A. Building 'validated' mouse models of human cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 778-784
- 5 Wogan GN. Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 201-210
- 6 Lee GH. Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2000; 28: 215-225
- 7 Vesselinovitch SD, Mihailovich N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* 1983; 43: 4253-4259
- 8 Takeuchi Y, Sugimoto M, Ochiai K, Ito K. Expression of P-glycoprotein in rat hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine and the modulation by anti-cancer drugs. *Hepatol Res* 2002; 22: 107-118
- 9 Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat. *Hepatol Res* 2002; 24: 385-394
- 10 Leenders MW, Nijkamp MW, Borel Rinkes IH. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6915-6923
- 11 李翠云, 段小嫻. 肝癌动物模型研究进展. *医学研究杂志* 2006; 35: 71-73
- 12 Troiani T, Schettino C, Martinelli E, Morgillo F, Tortora G, Ciardiello F. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 65: 200-211
- 13 Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 279-284
- 14 Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005; 22: 16-25
- 15 Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 2001; 22: 386-393
- 16 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun SL, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 597-601
- 17 Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 251-265
- 18 Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005; 26: 513-523
- 19 Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 2004; 40: 852-857
- 20 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044
- 21 Bagis H, Arat S, Mercan HO, Aktoprakligil D, Caner M, Turanli ET, Baysal K, Turgut G, Sekmen S, Cirakoglu B. Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice until F10 generation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2006; 305: 420-427
- 22 Halverscheid L, Mannes NK, Weth R, Kleinschmidt M, Schultz U, Reifenberg K, Schirmbeck R, Nassal M, Blum HE, Reimann J, Geissler M. Transgenic mice replicating hepatitis B virus but lacking expression of the major HBsAg. *J Med Virol* 2008; 80: 583-590
- 23 Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59: 1145-1156
- 24 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-320
- 25 Jakubczak JL, Chisari FV, Merlino G. Synergy between transforming growth factor alpha and hepatitis B virus surface antigen in hepatocellular proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 3606-3611
- 26 Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, Buendia MA. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 395-404
- 27 Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 15-23
- 28 Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005; 24: 7729-7745
- 29 Kitagawa T, Hino O, Lee GH, Li H, Liu J, Nomura K, Ohtake K, Furuta Y, Aizawa S. Multistep hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring SV40 T-antigen gene. *Princess Takamatsu Symp* 1991; 22: 349-360
- 30 Sepulveda AR, Finegold MJ, Smith B, Slagle BL, DeMayo JL, Shen RF, Woo SL, Butel JS. Development of a transgenic mouse system for the analysis of stages in liver carcinogenesis using tissue-specific expression of SV40 large T-antigen controlled by regulatory elements of the human alpha-1-antitrypsin gene. *Cancer Res* 1989; 49: 6108-6117
- 31 Dubois N, Bennoun M, Allemand I, Molina T, Grimber G, Daudet-Monsac M, Abelanet R, Briand P. Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J Hepatol* 1991; 13: 227-239
- 32 Lee KH, Liapi E, Buijs M, Vossen JA, Prieto-Ventura V, Syed LH, Geschwind JF. Percutaneous US-guided implantation of Vx-2 carcinoma into rabbit liver: a comparison with open surgical method. *J Surg Res* 2009; 155: 94-99
- 33 Cao W, Wan Y, Liang ZH, Duan YY, Liu X, Wang ZM, Liu YY, Zhu J, Liu XT, Zhang HX. Heated lipiodol as an embolization agent for transhepatic arterial embolization in VX2 rabbit liver cancer model. *Eur J Radiol* 2010; 73: 412-419
- 34 Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH, Lee YI. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. *Gene* 2000; 251: 73-80
- 35 Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, Jacob JR, Menne S, Hornbuckle WE, Schinazi RD, Korba BE, Cote PJ, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2004; 127: S283-S293

编辑 曹丽鸥 电编 何基才