

DEN诱导仓鼠肝癌模型的建立及其异种成瘤性

赵婉, 梁荣感, 徐庆

赵婉, 梁荣感, 徐庆, 桂林医学院药理教研室 广西壮族自治区桂林市 541004

赵婉, 在读硕士, 主要从事病理学的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81260354

作者贡献分布: 此课题由徐庆设计; 实验过程由赵婉与梁荣感操作完成; 实验所用试剂及分析工具由徐庆提供; 数据分析由赵婉完成; 本论文写作由赵婉完成.

通讯作者: 徐庆, 教授, 541004, 广西壮族自治区桂林市环城北路109号, 桂林医学院药理教研室. xq5895801@163.com

收稿日期: 2014-08-11 修回日期: 2014-09-05

接受日期: 2014-09-17 在线出版日期: 2014-11-08

Establishment of a hamster model of diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma

Wan Zhao, Rong-Gan Liang, Qing Xu

Wan Zhao, Rong-Gan Liang, Qing Xu, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260354

Correspondence to: Qing Xu, Professor, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, 109 Huancheng Second North Road, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xq5895801@163.com

Received: 2014-08-11 Revised: 2014-09-05

Accepted: 2014-09-17 Published online: 2014-11-08

Abstract

AIM: To establish a hamster model of diethylnitrosamine (DEN) induced hepatocellular carcinoma.

METHODS: Twenty-four hamsters, weighing from 70 to 100 g, were randomly divided into either an experimental group ($n = 12$) or a control group ($n = 12$). The experimental group was injected with DEN *via* the abdominal cavity and simultaneously administered DEN in drinking water. In the control group, DEN was replaced with normal saline. Pathological morphology was observed after HE staining.

RESULTS: Pathology results confirmed that hepatocellular carcinoma was successfully induced in 8 hamsters of the experimental group, and the

incidence rate of liver cancer was 66.7% (8/12). The rate of xenograft tumor formation in nude mice was 62.5% (5/8).

CONCLUSION: A hamster model of DEN induced hepatocellular carcinoma has been established successfully, and the incidence of hepatocellular carcinoma is high. This model can be used as a new and dynamic animal model.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Diethylnitrosamine; hepatocellular carcinoma; Animal model

Zhao W, Liang RG, Xu Q. Establishment of a hamster model of diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(31): 4795-4799 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4795.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i31.4795>

摘要

目的: 建立二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导仓鼠肝癌模型的方法.

方法: 取体质量为70-100 g的叙利亚仓鼠24只, 随机分为实验组($n = 12$)和对照组($n = 12$), 造模组采用腹腔注射与饮用DEN水溶液诱发仓鼠肝癌, 对照组给予等量生理盐水腹腔注射及正常饮水, 常规病理HE染色检查.

结果: 病理检查证实仓鼠肝癌为肝细胞癌, 肝癌发生率为66.7%(8/12). 裸鼠成瘤率为62.5%(5/8).

结论: DEN可成功诱导仓鼠肝癌, 方法简单, 诱癌成功率高. 同时该模型能够较好地模拟人类肝癌发展的过程, 可作为动态研究肝癌发生的新动物模型.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 二乙基亚硝胺; 肝癌; 动物模型

背景资料

肝癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 具有发病隐匿、病程短、死亡率高等特点. 肝癌动物模型是研究肝癌的基础, 化学致癌剂诱发的动物模型癌变过程具有多阶段、多步骤的特点, 与人类肝癌形成的过程相仿.

同行评议者

王阁, 教授, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

研究前沿

二乙基亚硝胺(diethylmitrosamine, DEN)诱发肝癌模型的特点是成功率高,对肝脏专一,肝细胞癌所占比例大,是迄今应用最广泛的一种化学性药物诱发肝癌模型。其诱导的动物肝癌模型经历肝损伤期-肝硬化期-肝癌期的变化,与人类肝癌形成过程相仿,为肝癌的研究提供了很好的平台。但是此类模型耗时长、动物死亡率高还有待改善。

核心提示: 二乙基亚硝胺(diethylmitrosamine, DEN)是目前常用的一种化学诱癌剂,其诱发的肿瘤多为肝细胞癌,成功率高,并很好的模拟了人类肝癌的发生发展过程。本实验采用腹腔注射与饮用DEN水溶液的方法诱发仓鼠肝癌形成,以期建立一种新型的肝癌动物模型。

赵婉, 梁荣感, 徐庆. DEN诱导仓鼠肝癌模型的建立及其异种成瘤性. 世界华人消化杂志 2014; 22(31): 4795-4799 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4795.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i31.4795>

0 引言

肝癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤,具有发病隐匿、病程短、死亡率高等特点^[1]。肝癌动物模型是研究肝癌的发生发展及治疗的基础。目前已报道的肝癌模型有自发性、诱发性及移植性等。其中,化学致癌剂诱发的动物模型癌变过程具有多阶段、多步骤的特点,与人类肝癌形成的过程相仿,为动态研究肝癌的发生、转移及治疗提供了理想的平台。此类肝癌模型常用动物为大鼠及小鼠,也有应用其他动物(豚鼠、兔、旱獭、恒河猴)诱发肝癌的报道^[2]。仓鼠(Syrian Hamster, 叙利亚金色仓鼠)在形态学、生物学以及免疫学等方面与人有相似之处^[3],可用于制作人类肿瘤^[4]等多种疾病的动物模型。Chen等^[5]通过皮下注射和饮用二乙基亚硝胺(diethylmitrosamine, DEN)水溶液诱发具转移性的仓鼠诱发性肝癌模型,但其诱导成瘤率较低且造模动物死亡率较高。本研究通过腹腔注射和饮用DEN水溶液诱导仓鼠诱发性肝癌模型,探讨仓鼠肝脏病变的形态学演变过程及其异种成瘤性,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级叙利亚仓鼠,由上海斯莱克实验动物有限公司提供;裸鼠,由广西医科大学动物实验中心提供;DEN,纯度99.9%,美国Sigma公司产品(批号:1019827361)。

1.2 方法

1.2.1 仓鼠诱发性肝癌模型建立: 仓鼠24只,3 wk,体质量70-100 g,雌雄各半,分笼饲养,标准饲料喂养,定期更换垫料,适应性饲养3 d,采用完全随机分实验组($n = 12$,雌雄各半)和对照组($n = 12$,雌雄各半)。实验组:按10 mg/kg给予腹腔注射DEN水溶液(生理盐水配制),每周连续给

药3 d,连续3 wk。第4周起给予0.01%的DEN水溶液(蒸馏水配制),自由饮水。对照组给予等剂量的生理盐水腹腔注射及蒸馏水自由饮水。每日观察动物的一般情况(精神、饮食、毛色及活动等),如动物出现精神萎靡,活动减少及饮食减少,体质量下降等情况,暂停给药,好转后再继续给药。分别在11、23、34、37 wk处死实验组仓鼠1只,44 wk处死所有仓鼠。

1.2.2 仓鼠肝癌标本收集和处理: 1%戊巴比妥钠麻醉后除去腹部被毛、消毒、开腹,肉眼观察肝脏病变后,确认有肿块形成者处死动物,摘取肝脏固定于40 g/L中性甲醛溶液中,24 h后进行常规石蜡包埋切片,HE染色并观察、拍照。如动物自然死亡,处理方法同上。

1.2.3 裸鼠移植性肝癌模型建立: 35 wk后仓鼠肝脏形成明显肿瘤,分离肿瘤,取鱼肉状瘤组织,切成1.0 mm³大小备用;裸鼠8只,体质量18 g \pm 2 g,适应性饲养3 d,0.1%戊巴比妥钠100 mg/kg腹腔注射麻醉,消毒,在剑突下沿腹正中线做长1 cm切口;用手指挤压裸鼠腹腔,挤出一叶肝脏,用手术刀片于肝脏接种部位以30度做一斜切口:0.5 cm(宽) \times 0.5 cm(深);用镊子将1.0 mm³大小的瘤组织植入切口,消毒棉签轻压切口止血固定,常规缝合关腹。全程均为无菌操作。

1.2.4 裸鼠移植性肝癌标本收集和处理: 手术后12 wk,处死裸鼠,开腹,肉眼观察肝脏病变后,摘取肝脏固定于40 g/L中性甲醛溶液中,24 h后进行石蜡包埋切片,HE染色并观察、拍照。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示,采用SPSS19.0软件进行统计分析,检验方法采用One-way ANOVA分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仓鼠一般情况观察 实验开始时,仓鼠进食、饮水好,好活动,背毛柔顺有光泽。诱癌6 wk后,实验组仓鼠进食量下降,行动迟缓,体质量较对照组增长缓慢,停用DEN溶液,第8周仓鼠一般情况好转重新开始喂食DEN溶液。诱癌7 wk时,实验组开始出现死亡,未见尸体,死前体质量未见明显减轻,考虑为仓鼠互斗互食。第13周,死亡1只,解剖时见少量腹水,肝脏肿大,表面不光滑。第17周,死亡数量最多,共3只,解剖时已可见到肝脏有大小不等的白色结节。44 wk处死所有仓鼠,实验组肝癌发生率为66.7%(8/12);对照

相关报道

国内外已有应用DEN诱导多种动物形成肝癌模型的报道,常用动物为大鼠,也有应用小鼠、豚鼠、兔、旱獭、恒河猴诱导肝癌的报道。



图1 仓鼠肝脏表面形成大小不等的结节, 并有明显肿物形成。

组无肝癌发生。统计实验组死亡率33.3%(4/12), 对照组死亡率25%(3/12)。

2.2 仓鼠体质量 诱癌开始时, 实验组仓鼠体质量与对照组无明显差异($P>0.05$); 15 wk时, 实验组仓鼠体质量较对照组增长缓慢, 但仍无明显差异($P>0.05$); 30 wk时, 实验组明显低于对照组($P<0.05$)。

2.3 仓鼠巨检发现 实验组仓鼠在第1-13周, 死亡及处死仓鼠肝脏肉眼观病变不明显。第14-24周, 肝脏肿大, 表面粗糙, 肝脏已出现小米粒大小淡黄色斑点。第25-44周, 肝脏肿大, 表面粗糙, 肉眼可见直径0.2-1.5 cm大小的灰白色癌结节(图1)。肝脏质地变脆, 癌结节质硬, 内部可见坏死。其中3只出现腹水。

2.4 仓鼠病理学变化 对照组仓鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐。实验组肝脏病变大致可分为3期。第1-13周为肝硬变前期: 肝小叶结构完整, 但可见坏死灶内炎性细胞浸润并可见肝细胞嗜酸性变; 第14-23周为肝硬变期: 正常肝小叶结构破坏, 由广泛增生的纤维组织将肝小叶分割包绕成大小不等的圆形肝细胞团, 可见典型的假小叶结构。假小叶内肝细胞索排列紊乱, 小叶中央静脉缺如; 第24-44周为癌变期: 出现肝癌, 癌细胞呈现多形性, 异型性明显, 细胞核增大, 胞质少, 嗜碱性, 可见较多病理核分裂象、畸形核及多核巨细胞(图2)。

2.5 裸鼠一般情况观察 裸鼠于接种手术后6 wk出现疑似肿块生长, 第9周时已有明显肿块形成, 第12周时处死所有裸鼠。移植瘤形成率62.5%(5/8), 无死亡。

2.6 裸鼠肿块肉眼观及病理学检查 处死裸鼠, 开腹, 见肝脏表面光滑, 可见明显肿块形成, 肿块与周围组织界限清楚(图3)。病理检查确认为

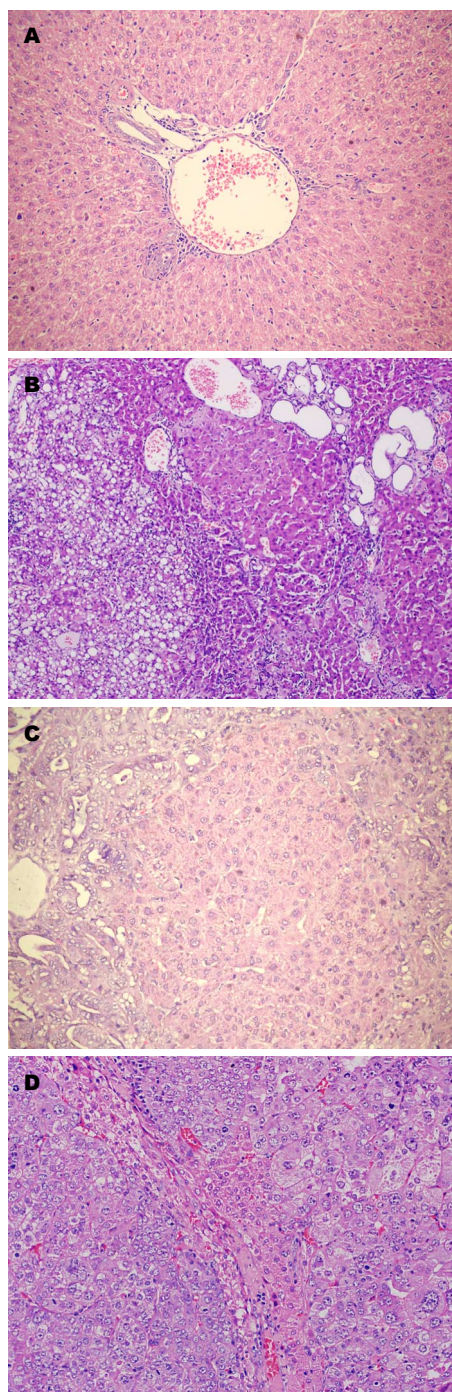


图2 仓鼠肝脏病理变化过程(HE × 200)。A: 正常肝脏; B: 肝损伤期 - 肝细胞脂肪变性, 小叶内可见灶状坏死伴有炎性细胞浸润, 细胞水肿; C: 肝硬化期 - 正常肝小叶结构被破坏, 由增生的纤维组织将其分割包绕成大小不等的肝细胞团, 可见典型的假小叶结构, 假小叶内肝细胞索排列紊乱, 小叶中央静脉缺如; D: 仓鼠肝癌期 - 肝细胞异型性明显, 胞核增大, 胞质少, 嗜碱性, 可见较多畸形核, 多核巨细胞和病理核分裂象。

移植性肝癌(图4)。

3 讨论

诱发性肝癌模型在肿瘤基础研究、致癌物质促

创新盘点
本研究通过腹腔注射和饮用DEN水溶液的方法成功诱发仓鼠形成肝癌, 成瘤率高, 并具有很好的异种成瘤性。

应用要点
本研究所用实验动物在生物学、免疫学等方面与人类有相似之处,可用于建立多种疾病的模型。可为肝癌的治疗研究提供新的模型。



图3 裸鼠移植瘤肉眼观。肿瘤与正常肝组织界限清晰。

癌作用研究、临床中的诊断和治疗以及影像学检查方面是不可替代的,而且广泛被应用于从多角度研究肝癌的发生、发展规律及分子机制。DEN具有很强的化学毒性,所含的亚硝胺基具有中毒剂和诱癌剂的双重效应^[6],而且DEN诱发的肿瘤多为肝细胞癌,与人类肝细胞癌较为相似^[7]。DEN诱发肝癌模型的特点是成功率高,对肝脏专一,肝细胞癌所占比例大,是迄今应用最广泛的一种化学性药物诱发肝癌模型^[8]。本实验通过实验组不同时间的仓鼠肝脏病理学检查发现病理过程分3个阶段:诱癌早期第1-13周表现为中毒性肝炎;第14-23周为肝硬变期;第24-44周为癌变期。与相关报道^[9-15]的基本一致,经历肝炎、肝硬化阶段进而形成肝癌,很好的模拟了人类肝癌的发生发展过程。因仓鼠对环境要求较高,且生性好斗,饲养时经验不足,造成对照组仓鼠出现死亡。实验需要注意下列方面:(1)动物的选择:根据我们的实验结果提示,应选择3-4 wk的仓鼠,雌雄成瘤率无明显差别;(2)仓鼠饲养:仓鼠生性好斗,每笼动物不能过多,2-3只为佳,勤换垫料,防止动物生病。本模型操作方法简便,周期较短,诱癌23 wk以后,病理结果证实仓鼠已经形成肝癌,并且所形成的肿瘤有很好的异种成瘤性,为肝癌的诊断和治疗提供了新的实验平台。

4 参考文献

- 1 朱艳志,孔宪炳,颜朗. 间断给药DEN诱导大鼠肝癌模型建立及病理研究. 重庆医科大学学报 2010; 35: 1843-1846
- 2 李雁,汤钊猷. 我国肝癌模型研究的历史和现状. 中华实验外科杂志 2001; 18: 479-480
- 3 van der Weyden L, Bradley A. Mouse chromosome engineering for modeling human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7: 247-276 [PMID: 16824018 DOI: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115741]
- 4 Fukumasu H, Avanzo JL, Heidor R, Silva TC, Atroch A, Moreno FS, Dagli ML. Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 862-867 [PMID: 16406177]
- 5 Chen G, Dai ZK, Liang RG, Xiao SJ, He SQ, Zhao HL, Xu Q. Characterization of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in Syrian golden hamsters. *Exp Ther Med* 2012; 3: 285-292 [PMID: 22969883]
- 6 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 [PMID: 12479937 DOI: 10.1016/S1386-6346(02)00143-2]
- 7 罗明,贺平,吴孟超,崔贞福,李琳芳,郭亚军. 苦参碱和氧化苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防阻断作用. 肿瘤防治杂志 2000; 7: 561-563
- 8 Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Imazu H, Yanase K, Kuriyama S, Fukui H. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol* 2002; 37: 22-30 [PMID: 12076858 DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00104-6]
- 9 Qian Y, Ling CQ. Preventive effect of Ganfujian granule on experimental hepatocarcinoma in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 755-757 [PMID: 14991955]
- 10 程延安,袁利超,党双锁,陈云茹,张正国. 间断小剂量DEN诱发大鼠肝癌模型研究. 肿瘤防治杂志 2005; 12: 806-808
- 11 崔智,李瑞生,李晓娟,胡燕,戴广海,白云峰. DEN诱发PLCε基因敲除小鼠肝癌模型的建立. 中国比较医学杂志 2013; 23: 17-20
- 12 寿旗扬,陈方明,赵泓舒,满曼,张利棕,周卫民,陈民

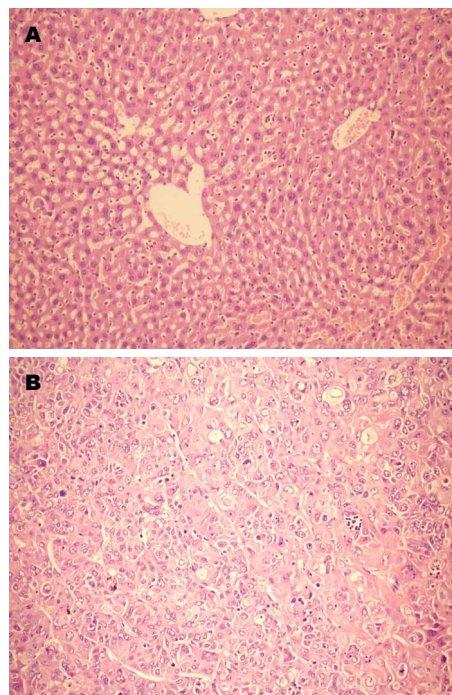


图4 裸鼠移植瘤(H&E × 200)。A: 正常裸鼠肝脏; B: 裸鼠移植瘤 - 肝细胞异型性明显, 胞核大, 可见畸形核及病理性核分裂象。

- 利. 二乙基亚硝胺诱发C3H/HeN小鼠肝癌模型的研究. 浙江中医药大学学报 2012; 36: 543-547
- 13 Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res* 1987; 47: 4460-4464 [PMID: 3607775]
- 14 毛庭枝, 周巧灵, 梁荣感, 戴支凯, 罗伟生, 肖胜军, 徐庆. 仓鼠胰腺癌细胞株移植性肝癌模型的建立及其生物学特性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1827-1831
- 15 郇永顺, 陈孝平, 张志伟, 张万广, 李开艳, 吴在德. 裸鼠肝内种植人肝癌组织的肿瘤特征. 世界华人消化杂志 2004; 12: 563-566

编辑 郭鹏 电编 都珍珍



同行评价
 本文研究DEN诱导仓鼠肝癌模型, 整个课题设计合理, 可行性高, 数据较真实, 但是目前DEN诱导鼠成瘤实验已经很明确, 国外在20世纪70-80年代的文章都有报道, 我国也有多篇相似文章发表, 因此整个课题的创新性一般。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T, V_{max}不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CT*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.