

Walker-256 大鼠移植性肝癌模型探讨

朱 峰 杨小伟 汤永辉 罗天平 段云飞

摘 要 **目的** Walker-256 细胞质肝内接种制备大鼠移植性肝癌模型。**方法** 取体重 150 ~ 180g 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 72 只, 随机分为实验组和对照组: 实验组 ($n=60$) 肝内接种 Walker-256 细胞质; 对照组 ($n=12$) 肝包膜下注射相同剂量的生理盐水, 1 周后观察肿瘤大小、并进行病理学检测。**结果** 实验组大鼠共有 15 只大鼠死亡, 而移植瘤肝癌模型出瘤率为 100% (45/45), 大多数大鼠伴有肺以及腹腔转移, 并且均经过病理学证实。**结论** Walker-256 细胞质肝内接种可以成功建立适宜临床研究的肝癌模型。

关键词 Walker-256 肝癌 动物模型

The Establishment of Transplantation Model of Liver Cancer in Walker-256 Tumor-bearing Rats. Zhu Feng, Yang Xiaowei, Tang Yonghui, Luo Tianping, Duan Yunfei. Hepatobiliary Surgery, The Third Affiliated Hospital of Soochou University, Jiangsu 213003, China

Abstract Objective To establish the transplantation model of liver cancer in Walker-256 tumor-bearing rats. **Methods** Walker-256 tumor cells were injected into Sprague-Dawley (SD) rats ($n=60$) through liver vaccination, and the rats in the control group were injected with PBS. **Results** About 15 rats died and the models of liver cancer were established successfully in the other 45 rats after 14 days. The tumor was formed and migrated to lung and peritoneal cavity in the early stage. **Conclusion** The model of liver cancer is an ideal experimental model for clinical medicine study.

Key words Walker-256; Liver cancer; Animal model

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其起病隐匿、病程短、病死率高^[1]。动物模型是进行实验研究的重要平台和手段, 通过建立肝癌的动物模型可以探讨肝癌发生发展规律, 探索治疗肝癌的有效方法。其中, 移植性大鼠肝癌模型具有病死率低、肿瘤生长快、患鼠生存期短、肿瘤生物学特性稳定而均一等优点而适用于肝癌实验研究, 本实验主要通过 Walker-256 细胞质肝内接种制备大鼠移植性肝癌模型, 以便探索出简易、方便的实验途径用于肝癌的实验研究^[2]。

材料与方法

1. 实验动物以及试剂: 实验动物: 清洁级 SD 雄性大鼠 (8 周龄左右) 72 只, 体重 150 ~ 180g 购自江苏大学实验动物中心。所有大鼠分笼饲养, 采用标准化光照, 自由进食, 定期更换垫料, 适应环境 1 周。另外, 健康的 SD 幼鼠 15 只, 体重 60 ~ 80g, 用于腹腔传代以及皮下荷瘤模型制备。大鼠 Walker-256 肿瘤细胞株由中科院肿瘤研究所提供。

2. Walker-256 细胞复苏、腹腔内传代以及荷瘤鼠制备: 取出冻存 Walker-256 细胞株解冻后, 加入 PBS 配制成密度约 1×10^8 /ml 细胞悬液, 分别取 0.3ml 注入 5 只雄性 SD 幼鼠腹腔内, 7 天后可见腹腔积液形成, 复苏成功。抽取幼鼠腹腔积液, 1000r/min 离心 3min, 弃上清, PBS 洗 3 次, 再制成密度

约 2×10^7 /ml 细胞悬液, 分别取 0.5ml 悬液注射至幼鼠皮下, 约 1 周后, 处死种植幼鼠, 取皮下肿瘤组织, 并切成 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 60 块, 置于 PBS 中, 匀浆机匀浆后, 1000r/min 离心 3min, 弃上清, PBS 洗 3 次, 备用。

3. 动物分组以及模型制备: SD 大鼠随机分组: 实验组 (60 只): 大鼠用 2% 戊巴比妥钠 0.4ml 腹腔注射麻醉, 常规消毒后, 剑突下沿正中中线剪开腹壁约 2cm, 暴露肝左叶, 用 1ml 注射器沿与肝表面 $30^\circ \sim 45^\circ$ 角度穿刺 1cm, 接种细胞质, 完毕后明胶海绵压迫止血 3min, 关腹缝合; 对照组 (12 只): 其他处理措施与实验组相同但是最后注射相同剂量的生理盐水。

4. 大体观察: 每日随时观察动物的精神、毛色、饮食、活动情况, 在第 3、7、10 天, 随机抽取实验组 3 只大鼠打开腹腔, 观察肝脏大小、色泽、质地及有无肿瘤结节形成, 无癌灶者, 取肝组织; 出现癌灶者取肉眼癌结节及距癌灶边缘 0.5 ~ 1cm 癌旁组织, 14 天后处死所有的动物。对照组于相应时间分别取 2 只, 予以同样处理。

5. 病理分析: 所取的肝脏组织、肝癌组织以及肺转移灶等标本, 4% 甲醛缓冲液固定 24h, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察。

6. 统计分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Mann-Whitney U 检验比较两组间差异。当 $P < 0.05$ 时具有明显的差异。

结 果

1. 大体情况: 对照组大鼠饮水、活动以及毛发没

有明显异常,未见死亡。实验组大鼠 3 天后出现饮水、活动减少、精神萎靡、毛发光泽改变以及竖毛等表现,1 周后大鼠开始出现死亡,10 天后出现肺、腹腔转移以及血性腹腔积液,至实验结束时,约 15 只大鼠死亡,最后大鼠移植肝癌模型出瘤率为 100% (45/45),肿瘤组织呈灰白鱼肉状,与周围正常肝组织分界尚清晰。

2. 大鼠体重以及肿瘤直径大小:试验中,对照组大鼠饮食、活动正常,体重增加;而实验组大鼠第 3 天后,饮食、营养状态等欠佳,14 天时体重较对照组明显下降($213.3 \pm 16.2\text{g}$ vs $193.3 \pm 12.7\text{g}$, $P < 0.01$)。但是,实验组大鼠肝脏肿瘤逐渐变大(表 1),而对照组大鼠肝脏未见明显变化。

表 1 实验组大鼠肝癌直径

	3 天	7 天	10 天	14 天
实验组 (mm)	-	5.25 ± 0.47	$9.55 \pm 0.51^*$	$14.89 \pm 0.54^{* \#}$

与 7 天相比, $^* P < 0.01$; 与 10 天相比, $^{\#} P < 0.01$

3. 病理改变:光学显微镜下观察结果显示:肿瘤细胞呈条索及团块状排列,胞核大浓染,异型性明显,胞质量少;肺以及腹腔内转移灶均加以病理证实。

讨 论

大鼠肝癌模型的制作有自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植性肝癌模型、人类肝癌的异种移植模型以及转基因肝癌模型^[3]。其中,移植性肝癌模型具有移植性大鼠肝癌模型肿瘤生长快、患鼠生存期短、肿瘤生物学特性稳定而均一等优点而适用于肝癌实验研究,目前该模型采用 Walker-256 瘤株,一般可以通过腹腔接种、皮下注射以及肝内接种等途径建立肝癌模型,其中以肝内接种建立的模型表现为肿瘤在肝内呈膨胀性和浸润性生长,在瘤体直径 $< 3\text{mm}$ 时主要由门静脉供血,瘤体生长至直径 $> 3\text{mm}$ 时,主要由肝动脉供血,与临床肝癌病例最为相似^[4]。

目前肝内接种方式:瘤块肝内种植、肝包膜下注射。其中,瘤体肝内种植较为普遍,但是其可能有以下注意事项:操作过程较繁琐,在操作过程中容易污染切口导致感染,影响大鼠病死率;种植时可能损伤血管,导致出血或瘤块被冲入腹腔而出现种植;另外,手工切除的瘤体具有一定随意性可能导致瘤体差异性较大,可重复性欠佳。而肝包膜下注射虽然操作简单,但是其可能容易出现细胞悬液漏至腹腔导致种植转移;细胞悬液中肿瘤细胞活性可能差异性较大,从

而导致瘤体差异性较大等^[5~8]。因此,本实验中通过制备 SD 幼鼠的瘤体细胞质,再予以肝内接种,探讨移植性大鼠肝癌模型的建立以及特点。

实验中,我们选取生长活跃的瘤体,制备出悬液后肝内接种,一方面收集的肿瘤细胞来源于生长活跃的瘤体,保证肿瘤细胞的活性较强;另一方面采用细胞质肝内接种,避免出血或瘤体种植到腹腔。Walker-256 种植瘤细胞质肝内接种 7 天后成功建立了移植性大鼠肝癌模型,其具有以下特点:①操作简单、可重复性强、避免肝脏出血以及腹腔种植等;②出瘤率高:肝内接种后出瘤率为 100%;③肿瘤形成时间早:在接种后 7 天左右可见肝内肿瘤生长;④转移发生早:早期可出现肺转移以及血性腹腔积液形成;⑤荷瘤鼠病死率高:我们发现大鼠 1 周后出现死亡,排除自然死亡原因,考虑可能与肿瘤转移早、肝功能不全等有关。但是,实验也有一定的局限性:瘤体的选择具有一定的主观性;肝内接种时也可能出现细胞悬液漏出的可能。

总之,荷瘤鼠瘤体制备的 Walker-256 细胞质肝内接种能成功建立移植性大鼠肝癌模型,能模拟肿瘤肝内生长的特点,具有操作方便、简易、出瘤率高、肿瘤活性强,侵袭力强等特点,能适用于临床肝癌的实验研究。

参考文献

1 袁利超,袁双锁,程延安. 肝癌的靶向治疗. 世界最新医学信息文摘, 2003, 2(6):881-883

2 严德辉,严律南. SD 大鼠移植性肝癌模型建立的几个问题探讨. 中国普外基础与临床杂志,2003,10(1):128-130

3 马曾辰. 可供临床研究的常用鼠肝癌模型. 国外医学肿瘤学分册, 1982, 1(1):13

4 徐静,李旭. 肝癌动物模型的建立. 实用肝脏病杂志,2005,8(2):116-118

5 彭永海,李琦,刘庆. 大鼠肝包膜下接种 Walker-256 瘤株肺转移的观察. 第二军医大学学报,2002,23(10):1084-1122

6 李琦,孟庆莉,彭永海,等. 大鼠移植性肝癌模型的制作. 第二军医大学学报, 2002, 23(10):1074

7 Wu HP, Feng GS, Tian Y. Hepatic artery infusion of antisense oligodeoxynucleotide and lipiodol mixture transfect liver cancer in rats. World J Gastroenterol, 2005, 11(16):2408-2412

8 Li X, Feng GS, Zheng CS, et al. Influence of transarterial chemoembolization on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in rat with Walker-256 transplanted hepatoma: an experimental study. World J Gastroenterol, 2003, 9(11):2445-2449

(收稿:2010-04-02)