



PLC ϵ 基因敲除小鼠移植性肝癌模型的建立与分析

李晓娟¹, 靳雪源², 白冰珂¹, 李 蓓¹, 侯 俊¹, 李瑞生¹

(1. 解放军第 302 医院实验技术研究保障中心, 北京 100039; 2. 解放军第 302 医院国际肝病诊疗中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 利用 PLC ϵ 基因敲除小鼠建立移植性肝癌动物模型, 以探讨 PLC ϵ 基因在肝肿瘤生长发育过程中的作用。**方法** 选取 PLC $\epsilon^{+/+}$ 小鼠 15 只为对照组, 选取 PLC $\epsilon^{+/+}$ (野生型) 和 PLC $\epsilon^{-/-}$ (敲基因型) 小鼠各 15 只为模型组 I 和 II, 沿腹中线开腹后将 H22 细胞接种到模型组小鼠肝脏实质内, 对照组注射生理盐水。于注射后第 15 天行剖腹探查, 观察各组成瘤率及肿瘤体积, 并进行肿瘤病理学分析。**结果** 各组小鼠的存活率均为 100%。模型组 I 肿瘤移植成功率为 100%, 肿瘤体积平均为 $(65.21 \pm 5.25) \text{ mm}^3$ 。模型组 II 的肿瘤移植成功率为 53.3%, 肿瘤体积平均为 $(23.46 \pm 3.47) \text{ mm}^3$ 。模型组 I 的肿瘤平均体积明显大于模型组 II ($P < 0.05$)。模型 I 组和 II 组病理检查均证实为原位肝细胞瘤。**结论** 成功建立了 PLC ϵ 敲基因小鼠移植性肝癌动物模型, 验证了 PLC ϵ 敲基因小鼠具有抑制肝肿瘤生长的特性。

【关键词】 基因敲除; PLC ϵ ; 移植性肝癌; 模型; 小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0005-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.004.002

Establishment and analysis of a PLC ϵ knockout mouse model of transplanted liver cancer

LI Xiao-juan¹, JIN Xue-yuan², BAI Bing-ke¹, LI Bei¹, HOU Jun¹, LI Rui-sheng¹

(1. Experimental Research Support Center, 2. International Center for Liver Disease Treatment, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To investigate the PLC ϵ gene function during growth and development of liver tumor using PLC ϵ knockout mouse models of transplanted liver carcinoma. **Methods** Fifteen PLC $\epsilon^{+/+}$ mice were selected randomly as control group, and 15 PLC $\epsilon^{+/+}$ (wild type) and 15 PLC $\epsilon^{-/-}$ (knockout genotype) as the model groups I and II. H22 liver carcinoma cells were inoculated into the liver parenchyma of mice of the model groups by laparotomy. The mice of control group were injected with saline. Fifteen days after tumor cell inoculation, the rate of tumor formation and tumor volume were observed, and the tumors were examined by pathology. **Results** The survival rate of mice in all groups was 100%. In the model group I, the tumor transplantation success rate was 100% and the mean tumor volume was $(65.21 \pm 5.25) \text{ mm}^3$. In the model group II, the tumor transplantation success rate was 53.3% and the mean tumor volume was $(23.46 \pm 3.47) \text{ mm}^3$. The average tumor volume of the model group I was significantly greater than that of the model group II ($P < 0.05$). Pathological examination confirmed hepatocellular carcinoma in the model groups I and II. **Conclusion** A PLC ϵ gene knockout mouse model of transplanted liver cancer is successfully established, and it demonstrates the property that PLC ϵ gene knockout has an inhibitory effect on liver tumor growth.

【Key words】 Gene knock-out; PLC ϵ ; Transplanted liver cancer; Model, mouse

[作者简介] 李晓娟(1980-), 女, 硕士, E-mail: sxily55@163.com; 靳雪源(1966-), 女, 博士研究生, E-mail: cherry723@126.com。

[通讯作者] 李瑞生(1969-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事人类疾病动物模型研究, E-mail: lrsheng@sohu.com; 侯俊(1973-), 女, 博士, 副主任技师, E-mail: houjun5757@sina.com。

原发性肝癌是我国乃至全球的高发恶性肿瘤之一,死亡率很高^[1],目前仍缺乏有效的治疗手段,因此阐明肝癌的发病机制对于研发新的药物治疗靶点具有十分重要的意义,而肝癌动物模型又是研究肝癌致病机理和抗癌新药的重要平台^[2-3]。研究发现磷脂酶 C ϵ (PLC ϵ)是癌基因产物 Ras 及抑癌基因产物 Rap 的新效应蛋白^[4]。Kataoka 实验室利用敲基因技术建立了 PLC ϵ 敲基因小鼠,并且发现 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠的皮肤乳头瘤发生率明显下降^[5]。为了进一步了解 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠的抗癌特性。本实验利用 PLC ϵ 敲基因型(PLC $\epsilon^{-/-}$)和野生型(PLC $\epsilon^{+/+}$)小鼠进行肝内注射的方法来建立移植性肝癌动物模型,以期再次验证 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠具有抗癌的特性,从而为深入研究肝癌致病机制提供了良好的研究平台,也为临床肝癌的新药研发提供了新的研究方向。

1 材料和方法

1.1 实验动物

PLC ϵ 基因敲除小鼠由日本合作引进到解放军第 302 医院动物实验室,该实验室饲养环境为 SPF 级,实验动物使用许可证【SYXK(军)2012-0010】。随机选取 PLC $\epsilon^{-/-}$ (敲基因型)15 只和 PLC $\epsilon^{+/+}$ (野生型)小鼠 30 只,6~8 周龄,单鼠体质量(18~20)g,均为雄性。

1.2 细胞株制备

H22 肝癌细胞株由中心实验室提供,将 H22 肝癌细胞株复苏后腹腔接种于小鼠体内,7 d 后无菌抽取 H22 肝癌细胞株腹水,生理盐水洗涤,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,台盼蓝染色计数,生理盐水调整癌细胞数至 1×10^8 /mL 备用。

1.3 实验分组及肝癌模型制备

随机选取 15 只 PLC $\epsilon^{+/+}$ 小鼠为对照组,选取 15 只 PLC $\epsilon^{+/+}$ 鼠为模型组 I,15 只 PLC $\epsilon^{-/-}$ 鼠为模型组 II。造模方法:小鼠用速眠新(1 mg/kg)麻醉,仰卧位固定,备皮,在胸骨下缘 2 cm 处沿腹中线向

上剪开皮肤约 1 cm,分离并剪开腹膜,暴露肝脏,轻压腹部挤出肝脏左叶,湿纱布垫于肝叶下方以保护,用注射器吸取 H22 细胞悬液 0.2 mL,刺入肝被膜下的肝实质内,刺入深度约 2~3 mm,缓慢注入后拔出针头,用棉球轻压注射部位,防止细胞外溢及出血。将肝脏回纳入腹腔,缝合切口^[6]。对照组以同样的方法注入生理盐水。术后正常采食饮水。

1.4 形态学观察

术后需每日观察各组小鼠的活动状态,第 15 天处死全部小鼠,观察模型组肝脏肿瘤生长情况,用游标卡尺测量肝脏肿瘤长、短径,按公式^[7]计算肿瘤体积(V): $V = a \times b^2/2$ (a 为长径,b 为短径)。选取对照组正常肝脏组织与两个模型组的肝脏肿瘤组织置入 4% 甲醛固定,石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察其形态学。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对模型组 I 与模型组 II 的肿瘤体积进行两组独立样本 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 PLC ϵ 敲基因小鼠肝移植瘤成功率分析

手术后各组小鼠状态均良好。对照组、模型组 I 和 II 的小鼠均未出现死亡,存活率均为 100%。在手术后第 15 天处死全部小鼠,开腹观察,小鼠均未出现腹水。模型组 I 的 15 只小鼠肝脏表面全部有单个灰白色病灶,肿瘤移植成功率为 100%。模型组 II 的 15 只小鼠有 8 只小鼠的肝脏表面有单个灰白色病灶,肿瘤移植成功率为 53.3%(表 1)。

2.2 PLC ϵ 敲基因小鼠肝移植瘤观察分析

对照组小鼠肝脏外观正常,未发现有结节病灶。模型组 I 的 15 只小鼠的肝脏表面全部有单个灰白色病灶,肿瘤体积平均为 $(65.21 \pm 5.25) \text{ mm}^3$ 。模型组 II 的 15 只小鼠中有 8 只小鼠的肝脏表面有单个灰白色病灶,肿瘤体积平均为 $(23.46 \pm 3.47) \text{ mm}^3$ 。模型组 I 的肿瘤平均体积明显大于模型组 II

表 1 模型组小鼠肝癌肿瘤移植成功率及肿瘤体积分析

Tab. 1 Analysis of the success rate of liver cancer transplantation and gross tumor volume in the model groups

组别 Groups	基因型 Genotype	存活数 Survived mice	存活率 Survival rate	移植成功数 Successful transplantation	移植成功率 Success rate of transplantation	肿瘤体积(mm^3) Tumor volume(mm^3)
模型组 I Model group I	PLC $\epsilon^{+/+}$	15	100%	15	100%	65.21 ± 5.25
模型组 II Model group II	PLC $\epsilon^{-/-}$	15	100%	8	53.3%	$23.46 \pm 3.47^*$

注:与模型组 I 比较: * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group I, * $P < 0.05$.

($P < 0.05$), (表 1), 各组小鼠的肝脏外观(图 1, 见彩插 2)。

2.3 PLC ϵ 敲基因小鼠肝移植瘤组织形态学分析

光镜下对照组小鼠肝细胞索结构完整, 肝小叶结构清晰, 肝细胞胞浆均匀, 无坏死和炎性浸润。而模型 I 组和 II 组光镜下可见肿瘤组织呈巢状, 肝小叶组织已经完全破坏, 肿瘤灶内瘤细胞丰富, 排列拥挤。瘤细胞异型性明显, 胞浆丰富, 嗜酸性, 核圆形, 核仁清楚, 核分裂像多见。局灶见坏死, 瘤细胞间可见裂隙样血管, 部分瘤细胞围绕血管生长, 局部见瘤细胞侵犯血管壁(图 2, 见彩插 2)。

3 讨论

原发性肝癌临床上还缺乏有效的治疗手段, 因此建立一个优质的动物肝癌模型对于探索人类肝癌治疗新方法有很大的价值和意义^[8]。目前建立移植性小鼠肝癌动物模型方法主要有皮下移植和原位移植, 皮下移植虽然制备过程简单方便, 易于观察, 但瘤细胞的生长环境与肝脏内部肿瘤存在很大差异^[9-10]。而肝癌的原位移植能够较好地模仿人肝癌体内的血供和生长环境, 提供与肝癌病人相似的肝癌生物学特性, 更好地反映出抗癌基因和药物的药效学指标^[11-12]。因此本实验采用原位移植的方法, 以期建立 PLC ϵ 敲基因小鼠移植性肝癌动物模型。

PLC ϵ 是 PLC 家族新成员, 具有特异性的 Ras 相关结构域和氨基端 Ras 鸟苷交换因子(GEF)结构域^[13]。Bai 等^[5]在化学致癌物诱导皮肤癌过程中发现 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠具有抑癌作用, 姜泰茂等^[14]研究发现化学诱导膀胱癌的过程中 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠也具有抑癌作用, 提示 PLC ϵ 可能参与了肿瘤的形成过程。因此本实验采用 PLC ϵ 敲基因型(PLC $\epsilon^{-/-}$)和野生型(PLC $\epsilon^{+/+}$)小鼠进行肝内注射的方法来建立移植性肝癌动物模型并进行对比分析, 结果显示 PLC $\epsilon^{+/+}$ 组和 PLC $\epsilon^{-/-}$ 组形成的肝脏肿瘤具有典型性, 均呈单个灰色结节状, 而且病理结果显示呈肝细胞癌病变。但 PLC $\epsilon^{-/-}$ 组的肿瘤移植成功率为 53.3%, 明显低于 PLC $\epsilon^{+/+}$ 组的肿瘤移植成功率 100%, 而且 PLC $\epsilon^{-/-}$ 组的肿瘤体积也显著小于 PLC $\epsilon^{+/+}$ 组($P < 0.05$)。由此可见, 再次证实 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠具有抗癌特性, 提示 PLC ϵ 在肿瘤的发生发展过程中发挥着非常重要作用。此结果与崔智^[15]等采用化学致癌物诱导建立 PLC $\epsilon^{-/-}$ 小鼠肝

癌模型的结果相一致, 但本实验采用的肝内移植方法建立的肝癌动物模型, 显著缩短了成模的时间, 能够更快速有效地为肝癌疾病的研究提供模型动物, 这样大大缩短了研究周期且提高了研究效率。

参考文献:

- [1] Rampone B, Schiavone B, Confuorto G. Current management of hepatocellular cancer [J]. Curr Oncol Rep A, 2010, 12(3): 186-192.
- [2] 崔智, 李晓娟, 白云峰, 等. PLC ϵ 基因敲除小鼠微卫星 DNA 遗传监测分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, (10): 19-22.
- [3] Lee IJ, Li ZS, Lee YN, et al. Hepatocellular carcinoma model cell lines with two distinct migration modes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(4): 1217-1227.
- [4] 谢建红, 罗春丽. 磷脂酶 C ϵ 信号转导及调控机制的研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2007, 4(8): 744-746.
- [5] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, et al. Crucial role of phospholipase Cepsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development [J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8808-8810.
- [6] 李银鹏, 朱惠明, 吴本华. C57BL/6J 小鼠原位肝癌模型的建立及高频超声对原位癌的监测 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(2): 145-147.
- [7] 张海英, 李艳茹, 王健君, 等. 小鼠原位移植性肝癌模型的建立及生物学特性 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(1): 5-8.
- [8] 白建华, 李立, 李晓延, 等. BALB/c 裸鼠与 SCID 小鼠皮下种植人肝癌模型的比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(31): 5843-5845.
- [9] Salvi A, Arici B, Alghisi A, et al. RNA interference against urokinase in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice [J]. Tumour Biol, 2007, 28(1): 16-26.
- [10] 申凤鸽. 肝癌动物模型的研究及进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 12264-12266.
- [11] 赵文秀, 张正奇, 许雅苹, 等. 不同流式抗体分选小鼠原位肝癌模型中髓系来源抑制性细胞的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(4): 42-46.
- [12] 唐晓勇, 唐迎雪, 唐由君. 复肝注射液对 H22 肝癌模型小鼠作用的实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(3): 248-250.
- [13] 赵懿, 罗春丽, 郭永灿, 等. RNA 干扰 PLC ϵ 诱导人膀胱癌 BIU287 细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(2): 135-139.
- [14] 姜泰茂, 杨志军, 白云峰, 等. 诱发 PLC ϵ 基因敲除小鼠膀胱癌发生过程中病变细胞超微结构改变 [J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(4): 286-288.
- [15] 崔智, 李瑞生, 李晓娟, 等. DEN 诱发 PLC ϵ 基因敲除小鼠肝癌模型的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 17-20.

[修回日期]2014-01-15