

学校编码: 10384
学号: 24520121153179

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于改良后原发性大鼠肝癌模型的糖修饰 荧光胶束成像评价

Imaging of the primary hepatocellular carcinoma with
glycosylated micelles in modified rats model

刘 达

指导教师姓名: 刘平果 教授

专业名称: 外 科 学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩日期: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 06 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 摘要..... | I |
| Abstract..... | III |
| Abbreviations | III |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 动物肝癌模型..... | 1 |
| 2.1 肝癌靶向性荧光纳米材料..... | 4 |
| 3.1 本研究的目的、意义和思路..... | 9 |
| 第二章 材料与方..... | 10 |
| 2.1 主要仪器..... | 10 |
| 2.2 主要耗材..... | 11 |
| 2.3 实验动物..... | 12 |
| 2.4 常用试剂..... | 12 |
| 2.5 实验方法..... | 13 |
| 第三章 结果与分析..... | 18 |
| 3.1 原发性肝癌动物模型的改良..... | 18 |
| 第一部分小结 | 20 |
| 3.2 新型糖修饰荧光胶束成像评价..... | 20 |
| 第二部分小结 | 28 |
| 第四章 讨论 | 29 |
| 4.1 改良后 DEN 诱癌法提高成癌率的原理..... | 29 |
| 4.2 糖修饰荧光胶束对临床肝癌早期诊断和术中指导的意义..... | 29 |
| 参考文献..... | 31 |
| 致谢 | 35 |

Contents

| | |
|--|------------|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | III |
| Abbreviations | III |
| Perface | 1 |
| 1.1 Animal models of liver cancer | 1 |
| 2.1 Liver cancer targeting fluorescent nanomaterials | 4 |
| 3.1 Designment, purpose and significans of this research..... | 9 |
| Materials and Methods | 10 |
| 2.1 Instrutments | 10 |
| 2.2 Materials..... | 11 |
| 2.3 Animals | 12 |
| 2.4 Commonly used reagents | 12 |
| 2.5 Methods | 13 |
| Results and Analysis | 18 |
| 3.1 The modified primary hepatocellular carcinoma animal models | 18 |
| The summary of part one..... | 20 |
| 3.2 Imaging of glycosylated micelles | 20 |
| The summary of part two..... | 28 |
| Discussion | 29 |
| 4.1 Principle of modified DEN induced primary hepatocellular carcinoma..... | 29 |
| 4.2 Future of Glycosylated micelles in early diagnosis and intraoperative guidance of hepatocellular carcinoma | 29 |
| References | 31 |
| Acknowledgements | 35 |

摘要

本文针对二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱发性原发性大鼠肝癌模型的改良及基于该肝癌动物模型的新型肝癌靶向性荧光胶束肿瘤成像效率评价两个问题进行探讨, 共由二部分组成。

其中第一部分旨在对传统二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱导型原发性大鼠肝癌模型的改良。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC; 以下简称肝癌) 是全球第五大高发癌症, 全球每年新发 62.6 万例, 约 55 % 的新发肝癌病人在中国, 已成为我国第 2 位致死肿瘤。大约 80% 以上的肝癌都是由肝炎、肝硬化一步步发展成肝癌。在传统肿瘤靶向性药物的评价中, 所用的肝癌动物模型还局限于皮下成瘤模型和肝脏原位种植肿瘤模型, 这些动物模型都不能很好的模拟肿瘤所处的内环境, 对评价肿瘤靶向性药物存在一定的不足。现在原发性肝癌肿瘤模型越来越受到学者的亲睐, DEN 诱导型原发性大鼠肝癌模型凭借其诱发癌变的整个病理过程及肿瘤细胞所处的微环境均与人类正常肝癌组织有较高的相似度, 而成为理想的肝癌动物模型。本文在传统 DEN 诱导癌症方法的基础上进行改良, 采取低浓度 DEN 溶液与无菌水交替周期性饲养的方法, 实现了大鼠的 100% 成癌率和诱导过程中的零死亡率, 且由于降低了 DEN 使用浓度对实验人员更加安全。

第二部分主要是在改良后原发性大鼠肝癌模型的基础上, 对最近报道的一种酸敏感罗丹明功能化的含糖肝癌靶向性荧光材料评价。葡萄糖糖蛋白受体、甘露糖受体、半乳糖受体等一直都是细胞信号传导领域研究的热点, 但是糖受体参与的肿瘤靶向性荧光检测领域还有待研究。近期有文章报道了一种酸敏感罗丹明功能化的聚 (苯乙烯-马来酸) 荧光材料 (RST@P), 其重点根据肝癌细胞表面葡萄糖糖蛋白受体 (RST@P-Glu)、半乳糖受体 (RST@P-Gal)、甘露糖受体 (RST@P-Man) 的含量不同而进行肿瘤荧光检测成像, 在皮下肿瘤模型和肝脏原位种植肿瘤模型中表现出了较高的肿瘤靶向性和较低的背景信号。肿瘤微环境对肿瘤的发生、发展、转移和对抗癌药物的抵抗等都有重要的作用, 它由肿瘤细胞及其周围的组织液、微血管及间质细胞等组成, 与正常细胞微环境有较大的区别。皮下肿瘤模型和肝脏原位种植肿瘤模型不能很好的模拟出自然状态下肿瘤细

胞所处的微环境，对评价该荧光材料的靶向性等方面存在一些不足。而原发性大鼠肝癌模型对评价该荧光材料真正临床应用价值有重要意义。

关键词：原发性肝癌；二乙基亚硝胺（DEN）；糖修饰荧光胶束

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

In this thesis, we focused on imaging of the primary hepatocellular carcinoma with glycosylated micelles in a rat model. This thesis consists of three sections.

The first part aimed to modified the diethylnitrosamine (DEN) induced the primary rat model of liver cancer. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth high incidence cancer in the world. There are 13 million new cases every year and 7.6 million cases of death, about 55% of the new liver cancer patients so that HCC becomes the second fatal tumor in China. About more than 80% of the hepatocellular carcinoma under the background of liver cirrhotic. Hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis of the liver were regarded as the common development process. The tumor microenvironment and pathological conditions of animal xenograft tumor models employed for surgical evaluation are significantly different from the primary hepatocellular carcinoma models. As such, diethylnitrosamine (DEN)-induced primary hepatocellular carcinoma models are superior to evaluate the efficacy of tumor targeting drugs as compared to xenograft tumor models. Herein we report the development of an improved DEN-induced tumor method in mice with 100% cancer rate and zero mortality.

The second part mainly introduces the imaging of the primary hepatocellular carcinoma with a kind of acid sensitive rhodamine functional glycosylated fluorescence micelles in rats model. Much effort has been devoted to the use of glycan-bearing vectors for delivery of therapeutics by targeting cell surface lectins such as ASPGR, mannose receptors, Siglecs, etc. In contrast, there is a lack of effort on the use of glyco-probes for fluorescence-guided tumor detection. Recently an article reported a kind of acid sensitive rhodamine functionalization of the poly(styrene-maleic acid) (RST@P) fluorescence material, its key according to liver cancer cell surface receptors to sialic acid glycoprotein (RST@P-Glu), galactose

receptor (RST@P-Gal), mannose receptor (RST@P-Man) for different levels of tumor imaging fluorescence detection, is grown in the subcutaneous tumor model and in situ liver tumor model showed higher tumor targeting with low background signals. But the development of tumor and its internal environment, it is made up of tumor cells, mesenchymal cells and capillaries, tissue fluid, and a small amount of infiltrating cells to form, is different from the normal cells and its formed by the surrounding tissue microenvironment, they interact with the tumor, the cells become cancerous, the transfer of cancer cells, and the interference resistance and target of anticancer drugs, etc all have important role. Subcutaneous tumor model and in situ liver tumors grow model cannot very good mimic the natural state of tumor cell micro environment, to evaluate the target of the fluorescent material, etc, some deficiencies. And primary rat model of liver cancer to evaluate the real clinical application value of fluorescence materials have important significance.

Key words: Primary hepatocellular carcinoma; diethylnitrosamine (DEN); glyco-micelles

Abbreviations

- HCC: hepatocellular carcinoma, 肝细胞癌
- FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清
- ALT: Alanine Aminotransferase, 谷丙转氨酶
- DEN: diethylnitrosamine, 二乙基亚硝胺
- DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide, 二甲亚砜
- AML: acute myeloblastic leukemia, 急性粒细胞白血病
- NCI: National Cancer Institute, 美国国家癌症学会
- HBeAg: Hepatitis B e Antigen, 乙型肝炎病毒 E 抗原
- HBV: Hepatitis B Virus, 乙型肝炎病毒
- AFP: α -fetoprotein, 甲胎蛋白
- ALB: Albumin, 白蛋白
- IgG(M): Immunoglobulin G(M), 免疫球蛋白 G(M)
- HE: Hematology-eosin, 苏木精和伊红
- ALT: Alanine aminotransferase, 丙氨酸氨基转移酶
- AST: Aspartate aminotransferase, 门冬氨酸氨基转移酶
- ULN: The Upper Normal Limit, 正常值上限

第一章 前言

1. 动物肝癌模型

1.1 动物肝癌模型背景

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC; 以下简称肝癌)发病率高居世界第五的高致死率恶性肿瘤之一。近年来肝癌的病死率呈上升趋势,全球每年新发62.6万例,约55%的新发肝癌病人在中国,已成为我国第2位致死肿瘤^[1]。肝癌是由病毒、化学致癌物等多病因作用,因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些酶基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控而致癌变,经启动、促进和演变等多阶段的发病过程,并与基因调控和表达密切相关^[2],由此可见肝癌的发生发展过程是多因素作用的结果,目前肝癌的致病机理尚未研究清楚,尚未寻找到有效的治疗方法,因此深入阐明肝癌的致病机理对于研发新的药物治疗靶位和解决临床治疗难点具有十分重要的意义。肝癌动物模型主要通过自发形成、诱导、移植和转基因等方式进行构建。这些动物模型从不同的角度模拟出肝癌的发生、发展和致癌机理,也为今后寻求肝癌的有效诊断方法和药物评价提供了良好的平台。

1.2 自发性肝癌动物模型

自发性肝癌动物模型是指在自然状态下不经任何人工辅助措施,自发形成肿瘤的模式。近交系小鼠后代自发成癌的概率较高,但是由于种属、品系、近亲程度的不同,肿瘤发生的类型和发病率有很大不同,不利于后期实验的开展。有研究称14月龄以上的C3Hf系雄鼠、C3H系雄鼠和C3He雄鼠的发生率分别为72%、85%和80%^[3]。该动物模型最大的优点是无人工干预下自发成癌,与人类肝癌形成、微环境最相似,但是成癌率低,周期长,成瘤速度差别较大,造模困难程度较高。

1.3 诱发性肝癌动物模型

诱发性肝癌动物模型是指通过化学、物理、生物等方式对动物进行诱导产生癌症，其中化学性建模是最常用的方式，如亚硝胺类(DEN)、黄曲霉素类(AFB1)、氨基偶氮燃料类(3'-Me-DAB)、芳香胺类化合物(2-AAF)等。大鼠以其大体积大，利于后期实验操作的优点成为最常用的实验动物。目前常用的品系有：Wistar、Sprague-Dawley 和 Fisher344。影响大鼠成癌率的因素有很多，大鼠的年龄和性别和体重均对肿瘤形成情况有较大的影响，有研究证明鼠龄以 3 个月以内、体重 120 克以下的大鼠诱导成癌率明显高于月龄大的大鼠，而体重 200 克以上或 12 个月龄以上的大鼠诱导成癌率最低。

该肝癌动物模型特点为成癌率较高，但诱导过程中动物死亡率高、病程较长等是理想的肝癌动物模型。

1.4 移植性肝癌动物模型

移植性肝癌动物模型是指用人类或动物的肝癌组织或细胞移植到受体皮下、肝内或其他器官内。根据实验动物受体主要有正常动物和免疫缺陷动物。前者动物多为免疫功能正常的小鼠和大鼠，后者动物多为裸鼠、裸大鼠。

对于正常动物移植性肝癌模型，目前应用较多的为自发性肝外-肝同种移植性大鼠肝癌模型。有研究曾采用 Walker-256 瘤株(来源于 AFP 阴性的大鼠自发性乳腺癌，具有一定的肉瘤性质)，通过不同方法移植人大鼠的肝脏，从而形成大鼠移植性肝癌模型，实验动物一般选用雄性 Wistar 大鼠，也有用 SD 雄性大鼠^[4]。李琦等^[5]邵成伟等^[6]采用 Walker-256 细胞浆肝内注射建立大鼠移植型肝癌模型，简便、周期短、成功率高。

裸鼠不同的鼠龄对移植性肿瘤及其转移也有较大影响，主要与不同鼠龄老鼠体内 NK 细胞活性存在差异有关。移植受体选择年幼或新生裸鼠比移植在成年的裸鼠更易生长和形成转移，体内比体表更容易生长。根据原位移植理论建立起来的人癌瘤原位移植模型克服了这一缺陷，它不仅维持了原有瘤组织的结构，而且还保持了人体瘤的绝大部分生物学特性，特别是转移特性，在宿主体内能以类似于患者体内的方式显示其恶性行为^[7]。Sun 等^[8]建立的裸小鼠人肝癌原位转移模型 LCI—D20，自发转移率达 100%且转移早。郑建明等^[9]建立的人

肝癌裸鼠皮下一肝原位移植瘤模型也具有高存活率、高侵袭率和高转移率。李军等^[10] 采用皮下注射 HepG2 细胞株(1.2×10^6)建立裸鼠肝癌模型,运用瘤细胞活体种植法,不同于以往的反复进行瘤细胞体内外交替培养再种植的方法。周期短,成功率达 100%。

移植性肝癌动物模型有周期短,肿瘤的大小和位置较易控制的优点,但肿瘤是生长正常肝脏内,与正常肝癌内环境存在较大差异,且操作相对复杂技术要求高。

1.5 转基因动物肝癌模型

转基因动物肝癌模型是指借助基因工程手段将特定的外源基因导入动物的染色体,使其发生整合、遗传繁殖,并由此培养出携带外源基因的转基因动物所形成的肝癌模型:导入基因的方法常有显微注射、逆转录病毒感染、胚胎干细胞植入等方法。显微注射法是目前最广泛和最成功应用的方法。实验动物多为CD1、C57BL/6×DBA、C57BL/6×SJL等品系小鼠。

目前,国外已较多应用转基因肝癌动物模型来研究癌基因活性和肝癌发生等情况。Deane等^[11]将LFABP-cyclin D1转基因小鼠和A1b-TGF- β 1转基因小鼠杂交产生了 cvclin D1/TGF- β 1双转基因小鼠肝癌模型。结果显示 cyclin D1/TGF- β 1双转基因小鼠比同年龄匹配的LFABP-cyclin D1单转基因小鼠肝癌发病率明显提高,肿瘤的多样性、负荷量、异质性也明显增高,并证明TGF- β 1在cyclin D1过度表达的肝脏中启动了干细胞的活化和促进了肿瘤发展的进程。Dupuy等^[12]。

目前国外建立肝炎病毒转基因肝癌动物模型对HBV相关性肝癌做了较多的研究。Yu等^[13]应用C57BL/6×DBA小鼠建立了HBx转基因小鼠肝癌模型发现HBx启动了肝癌的形成,并在转基因肝癌鼠中有高度的HBx蛋白表达,说明HBx抗原作为HBV编码的病毒反式激活因子,与肝癌的发生有明显的相关性。Kojima等^[14]应用CD1小鼠也建立了HBx转基因小鼠模型,结果提示HBx的表达降低了肝细胞增殖过程中端粒酶的活性,从而在肝癌发生中起重要作用。但在其他的转基因研究中^[15,16],HBx基因并未引起动物肝癌。Temadillos等^[17]建立的 HBx/c-myc转基因小鼠肝癌模型证明HBx基因在WHV/c-myc小鼠肿瘤发生过程中可起加强作用。Lakhtakia等^[18]也通过 HBx/c-myc转基因小鼠肝癌模型证明HBx和c-myc基因的

协同作用导致了肝癌的发生。由于使用传统的显微注射法的外源基因靶向性不强,且不同的转基因小鼠具有不同的基因遗传背景,HBV基因整合后,有的鼠群出现较高的致癌率,有的却较低。Youliang等^[19]利用基因打靶技术,通过定点同源重组将HBsAg和HBx基因分别敲入小鼠的p21位点,建立了两个转基因小鼠肝癌模型。结果发现,雄性p21-HBsAg转基因小鼠在15~24月发展为肝癌;雄性和雌性p21-HBx转基因小鼠自18个月后均发展为肝癌。这些有利说明了HBx基因与肝癌发生有明显的相关性,HBsAg发挥了重要作用。转基因动物肝癌模型的构建对技术要求很高,而且价格比较昂贵,国内构建的较少。

2. 肿瘤靶向性荧光纳米材料

2.1 肝脏肿瘤诊治现状

肝癌是全球第五大高发癌症,也是世界范围内死亡率最高的恶性肿瘤之一。近年来肝癌的病死率呈上升趋势,全球每年新发62.6万例,约55%的新发肝癌病人在中国,已成为我国第2位致死肿瘤^[1]。肝癌早期没有特异性临床症状,出现症状时肿瘤一般已经增长至4~8 cm大小,由于肝癌诊断时肿瘤往往较大,虽然肝癌手术器械不断的革新,切除技术日臻完善,但是肿瘤根治切除率仍较低(约25%),5年生存率徘徊在38%~47%,术后的复发率高达61.5%,这些可能与肝癌早期诊断率低,术前、术中未能发现微小(直径小于5 mm)肝癌病灶有关^[20-24]。

美国国家癌症学会(National Cancer Institute)每年都会花费接近100亿美元用于研究、治疗癌症,足以看出世界科学家对癌症的重视^[25-26]。近年X线断层摄影术(CT)、磁共振成像(MRI),正电子发射断层扫描术(PET),单光子发射计算机断层成像术(SPECT)等高科技技术的普及应用,对肿瘤的早期诊断及治疗起到了很大的作用,但是肿瘤根治切除率仍较低,术后的复发率没有得到根本的改变。因此,术前发现肝癌微小病灶以及术中实时肿瘤显像,明确肿瘤范围及其微小癌灶以及区域淋巴结肿瘤转移情况,从而指导手术彻底切除肿瘤,保证手术切缘无肿瘤残留和区域淋巴等受侵犯的组织完全切除;同时保护好区域重要的血管和组织结构不受损害成为改善肝癌预后的有效策略之一。

2.2 肿瘤手术中实时成像现状

肿瘤的手术切除是治疗肿瘤的有效手段之一，根治性切除肿瘤及其可能侵犯的淋巴、神经等组织能够有效改善肿瘤病人预后，但是外科医生凭借肉眼观察、手指触摸，术中超声等方法来判断肿瘤的部位、数目及其可能的受肿瘤侵犯的淋巴结等采取相应的手术方式，可能导致两种不良后果：一是肿瘤虽彻底切除但切除范围过大，手术创伤大，术后并发症，康复时间长等，或者肿瘤切除不彻底，肿瘤残留，出现术后早期复发，加速病情恶化等。为了更好的彻底切除肿瘤，学者探索通过术中肿瘤显像的方法指导外科医生手术既能彻底切除肿瘤，又能最大限度的保存健康的组织器官和重要的管道、结构术中不受损伤，改善病人的预后。荧光分子成像（FMI）成为术前发现肝癌微小病灶以及术中实时肿瘤成像的理想工具，Hama等^[27]构建在酸性条件下荧光增强探针结合肿瘤特异抗体，实现肿瘤的发光显像，采用肺癌小鼠模型，结果发现该发光探针能够使研究人员用肉眼观察到了1毫米左右发荧光的肺癌，方便外科医生发现微小癌灶(图1)。

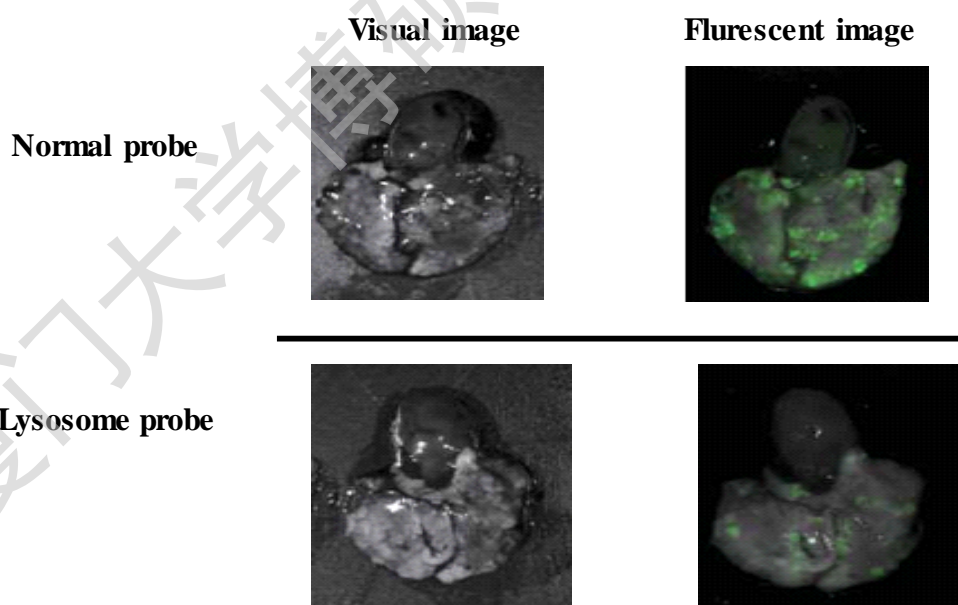


图 1 荧光探针在肺癌小鼠内成像^[27]

Figure 1. Fluorescent probe imaging of lung cancer in mice^[27]

Ntziachristos 等^[28]开发具有靶向癌组织显像的叶酸荧光素探针，临床应用中发现该探针帮助外科医生手术中找到微小肿瘤病灶，展现了光明的临床应用前

景（附带手术过程发光探针指示小尺寸癌块的位置，使得医生发现切除癌组织的录像）(图 2)。

因此，开发高敏感、低背景信号的肿瘤显象荧光材料，必将有助于术中指导外科医生彻底切除癌组织及其肿瘤侵犯的淋巴、神经等组织，最大限度的保存健康组织和重要的管道，防止术后的肿瘤复发和术后并发症的发生，具有重要的临床意义。该技术的成功与推广将造福患者和减少国民的医疗负担具有重要意义。

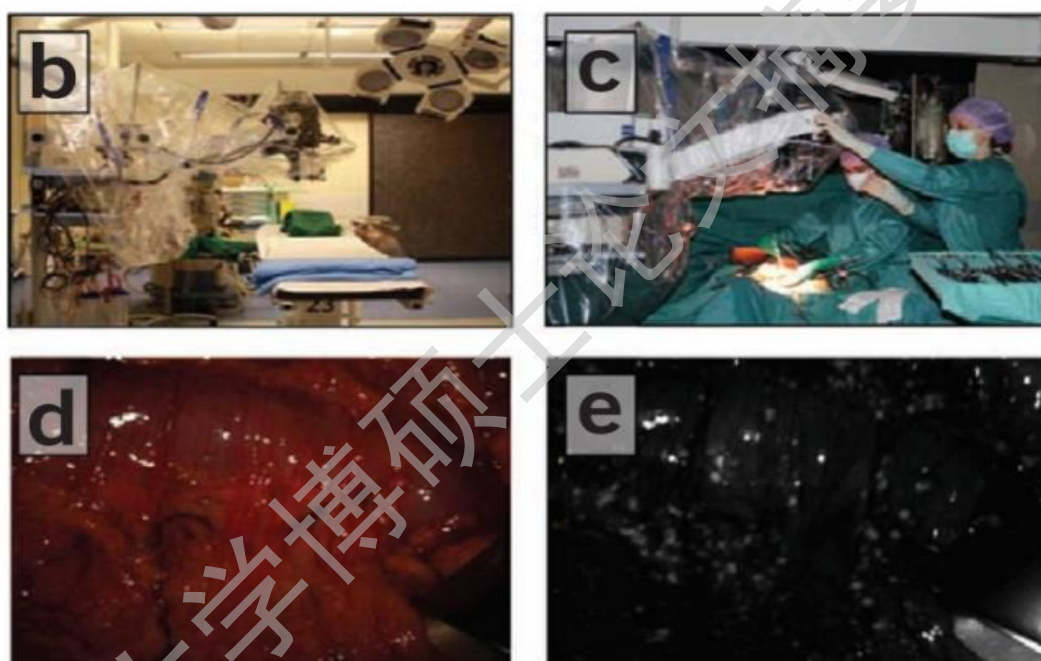


图 2 荧光探针帮助外科医生发现微小肿瘤^[28]

Figure 2. Fluorescent probe to help surgeons found small tumors^[28]

2.3 新型糖修饰荧光胶束肿瘤成像

肝脏疾病的药物治疗主要依靠药物分子到达病变部位而发挥作用，Enrilich 首先提出靶向给药的学说，肝靶向给药系统可将药物准确有效输送到肝脏病变部位，减少其全身分布，提高药物利用价值，降低全身不良反应，积极推动了肝脏疾病治疗的发展。重要的肝靶向途径有葡萄糖蛋白受体、甘露糖受体、半乳糖受体等^[29-39]，但是糖受体参与的肿瘤荧光检测领域还存在空白。近期有文

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.