❖实验研究

# Combining H22 liver cancer cells and suspension Matrigel for establishing mouse subcutaneous liver cancer model

SUN *Weirong*[1,2], ZHANG *Guohui*[3], YAO *Dixiao*[4], LI *Jing*[3], ZHANG *Xiaobo*[2], ZHANG *Xiao*[2], HE *Xiaofeng*[2], ZHANG *Xin*[2], WEI *Yingtian*[2], ZHANG *Zhongliang*[2], WANG *Zhenjun*[2], XIAO *Yueyong*[2*]

(1. *Department of Radiological Diagnosis*, *the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100091, *China*; 2. *Department of Radiological Diagnosis*, *the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100853, *China*; 3. *Department of Radiological Diagnosis*, *Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force*, *Tianjin* 300162, *China*; 4. *Medical Imaging Center*, *the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University*, *Qiqihar* 161006, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To explore the value of H22 liver cancer cells suspension combining with Matrigel for establishing mouse subcutaneous liver cancer model. **Methods** Twelve male BALB/c mice were randomly divided into groups A and B. Subcutaneously injection of 150 μl of H22 liver cancer cells suspension (approximately $1\times10^7$ cells) with Matrigel (group A) or without Matrigel (group B) on the lateral side of the right thigh were performed, respectively. On the 7th day after vaccination, MR examination was performed to observe the success rate of transplantation and metastasis or not. The longest diameter (L) and short diameter (W) of the tumor were measured, and tumor volume ($V=0.5\times L\times W^2$) and morphological regularity (L/W) were calculated. T1 values of the tumor was compared, and the coefficient of variation (CV) was calculated to evaluate the homogeneity of tumor. Then hierarchical grading method was used to quantitatively score the local invasion ability of the tumor based on anatomical level of invasion. Finally the mice were sacrificed, and pathological manifestations of the tumors were observed. **Results** Mice subcutaneous liver cancer models were successfully established in both group A and B. No significant difference of tumor volume was found between groups ($t=-0.561$, $P=0.587$), but the standard deviation of tumor volume of mice in group A was smaller than that in group B (14.92 and 22.67). Five mice were found with tumor invaded the connective tissue and 1 with invaded surface of muscle layer in group A, while 1 mouse was found with tumor invaded surface of muscle layer and 5 with tumor invaded deep muscle layer in group B, and the invasion ability of tumor in group B was stronger than that in group A ($P<0.05$). CV of T1 value in group A was lower than that in group B [18.39% and 31.44%, $F=7.268$, $P<0.05$]. MR T2WI showed regular tumor morphology in group A, with clear boundaries, and T1 mapping pseudocolor images showed relative even signals inside the tumor in group A, but irregular tumor morphology, unclear boundaries and uniform signals inside tumor in group B. **Conclusion** Mouse subcutaneous liver cancer model could with relative regular shape, good homogeneity and less invasive could be successful established using H22 liver cancer cells combined with Matrigel.

[**Keywords**] models, animal; carcinoma, hepatocellular; ablation techniques; magnetic resonance imaging

**DOI**: 10.13929/j.issn.1003-3289.2025.12.008

[第一作者] 孙维荣(1987—),男,江苏盐城人,在读硕士,主治医师。研究方向:介入诊断与治疗。E-mail: sunweirongys@126.com

[通信作者] 肖越勇,中国人民解放军总医院第一医学中心放射诊断科,100853。E-mail: xiaoyueyong@vip.sina.com

[收稿日期] 2025-05-15　　[修回日期] 2025-07-22

# H22 肝癌细胞联合基质胶用于建立小鼠皮下肝癌模型

孙维荣[1,2]，张国辉[3]，姚籴霄[4]，李　竞[3]，张啸波[2]，张　肖[2]，何晓锋[2]，
张　欣[2]，魏颖恬[2]，张忠亮[2]，王振军[2]，肖越勇[2*]
（1. 中国人民解放军总医院第八医学中心放射诊断科，北京　100091；2. 中国人民解放军总医院第一医学中心放射诊断科，北京　100853；3. 中国人民武装警察部队特色医学中心放射诊断科，天津　300162；4. 齐齐哈尔医学院附属第二医院医学影像中心，黑龙江 齐齐哈尔　161006）

［摘　要］ **目的**　观察利用 H22 肝癌细胞联合基质胶建立小鼠皮下肝癌模型的价值。**方法**　将 12 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 A、B 组，分别于其右侧大腿外侧皮下注射含基质胶（A 组）或不含基质胶（B 组）的 H22 肝癌细胞混悬液 150 μl（约 $1\times10^7$ 个细胞）。于接种后第 7 天行 MR 检查，评估移植成功率及有无转移，测量肿瘤最长径（L）、短径（W），计算肿瘤体积（$V=0.5\times L\times W^2$）及 L/W 比值（代表形态规则程度），比较肿瘤 T1 值，计算变异系数（CV），据以评估肿瘤均质性；采用分级法，根据肿瘤细胞侵犯解剖层次进行量化评分，评估肿瘤局部侵袭能力。之后处死小鼠，观察肿瘤病理表现。**结果**　2 组小鼠均建模成功，观察期内均未出现明显远处转移。组间肿瘤体积差异无统计学意义（$t=-0.561$、$P=0.587$），而 A 组肿瘤体积标准差小于 B 组（14.92 *vs.* 22.67）。A 组 5 只肿瘤侵入结缔组织、1 只侵入肌层表面，B 组 1 只肿瘤侵入肌层表面、5 只侵入深层肌层；B 组肿瘤侵袭能力强于 A 组（$P<0.05$）。A 组肿瘤 T1 值 CV 小于 B 组［18.39% 和 31.44%，$F=7.268$、$P<0.05$］。MR T2WI 示 A 组肿瘤形态较规则、边界清晰，T1 mapping 伪彩图示瘤体内信号较均匀；B 组肿瘤形态欠规则、边界欠清，T1 mapping 伪彩图示瘤体内信号欠均匀。**结论**　以 H22 肝癌细胞联合基质胶能获得形态较规则、内部较均质、侵袭能力相对较弱的小鼠皮下肝癌模型。

［**关键词**］ 模型，动物；癌，肝细胞；消融技术；磁共振成像
［**中图分类号**］ R-332；R445.2　［**文献标识码**］ A　［**文章编号**］ 1003-3289(2025)12-1976-04

肝细胞癌是常见恶性肿瘤，确诊时多已处于中晚期，手术切除率仅 20%～30%[1]。介入治疗凭借微创、精准等优势在治疗肝癌领域中占据重要地位[2-3]。近年来消融技术广泛用于治疗肝脏恶性肿瘤[4]，已成为外科手术之外最有可能实现根治的手段，使得评估消融肿瘤疗效随之成为重要临床课题[5-6]；而建立良好的动物模型是研究消融治疗肿瘤效果的重要基础[7]。在动物模型荷瘤形态学方面，圆形或类圆形肿瘤更利于实现完全消融[8]，肿瘤形态不规则可能导致消融不完全；而在生物学行为方面，侵袭性较强肿瘤易于发生远处转移，将使生存时间缩短而导致结果偏倚。小鼠体型小、繁殖率高，易于操作管理，是肿瘤相关研究的常用动物模型[9]；但以传统方法制备的小鼠皮下肝癌模型肿瘤形态常不规则、坏死较多或呈浸润生长，影响评估消融效果的准确[10]。为此本研究尝试利用 H22 肝癌细胞联合基质胶建立小鼠皮下肝癌模型，观察以之获得形态较规则、内部较均质、侵袭能力相对较弱的小鼠皮下肿瘤的价值。

## 1　材料与方法

1.1　实验动物　12 只 6～8 周龄雄性 BALB/c 小鼠，体质量 17～22 g，购自北京维通利华公司，饲养于中国人民解放军总医院实验动物中心，室温（23±2）℃、相对湿度 60%，12 h 明昏交替，可自由采食、饮水。将 12 只小鼠随机均分为 A、B 组，每组 6 只。本研究通过医院动物伦理委员会批准（2019-D15-23）。

1.2　肿瘤细胞培养　H22 小鼠腹腔积液肝癌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司，以含 10% 胎牛血清、100 μg/ml 青链霉素的 RPMI 1640 培养液培养，置于 37 ℃含 5% $CO_2$ 的细胞培养箱中，每 2 天换液。

1.3　建立小鼠皮下肝癌模型　以无菌磷酸盐缓冲液洗涤 H22 肿瘤细胞，去除培养基，离心收集细胞沉淀，重悬细胞，获得细胞浓度为 $1\times10^7$ 个的 150 μl 细胞混悬液（混悬液 1）。重复上述方法，调节细胞数量为 $2\times10^7$ 个的 75 μl 细胞混悬液，取基质胶（Matrigel，美国康宁公司）于冰面上，均匀混合 H22 细胞混悬液与基质胶（按体积比 1∶1），获得细胞数量为 $1\times10^7$ 个的 150 μl混悬液（混悬液 2）。将小鼠置于密闭树脂箱中，以 3% 异氟烷诱导麻醉后保定于检查台，对右侧大腿外侧备皮后以碘伏消毒；对 A 组于皮下注射混悬液 2，B 组则注射混悬液 1。

1.4　评估模型　于接种细胞后第 7 天行 MR 检查。采用 Siemens Magnetom Verio 3.0T MR 仪扫描小鼠右后肢。参数：T1 mapping，TR 2 000 ms，TE 13、26、39、52、65 和 78 ms，层厚 2.50 mm，层间距 0.25 mm， FOV 164 mm ×164 mm。观察肿瘤成活及有无转移，测量肿瘤长（L）、短径（W），计算肿瘤体积（V），$V=0.5\times L\times W^2$；以 L/W 比值评估肿瘤形态；比较组间肿瘤内 4 个象限 T1 值均数的差异，计算肿瘤 T1 值均数的变异系数（coefficient of variation，CV）据以判断肿瘤均质性；根据肿瘤细胞侵犯层次，采用分级法对肿瘤局部侵袭能力进行量化评分：1 分指仅侵犯结缔组织如筋膜、脂肪层，2 分为肿瘤侵犯肌肉边缘如肌膜或浅层肌纤维，3 分为肿瘤侵犯肌肉深层如肌束或肌肉实质。

1.5 病理学检查 MR 扫描结束后以断颈法处死小鼠，剥离肿瘤并以 4%多聚甲醛固定，制作石蜡切片并进行 HE 染色。于光镜下观察肿瘤病理表现。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。以 $\bar{x}\pm s$ 表示符合正态分布的计量资料，组间行 $t$ 检验、单因素方差分析或非参数检验。以频数描述计数资料，利用 Fisher 精确概率法进行组间比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 建立模型 对 2 组均顺利完成建模，建模成功率 100%（12/12）。观察期内小鼠均未出现明显远处转移。

2.2 所获肿瘤表型 小鼠肿瘤体积组间差异无统计学意义［（125.5 ± 22.67）mm³ 和（119.30 ± 14.92）mm³，$t=-0.561$、$P=0.587$］，但 A 组小鼠肿瘤体积标准差相比 B 组（14.92 *vs.* 22.67）呈缩小趋势。A 组小鼠肿瘤 L/W 小于 B 组［1.20±0.11 和 1.43± 0.18，$t=2.586$、$P<0.05$］。在肿瘤侵袭能力方面，A 组 5 只肿瘤侵入结缔组织、1 只侵入肌层表面，B 组 1 只肿瘤侵入肌层表面、5 只侵入深层肌层；A 组肿瘤侵袭能力弱于 B 组（$P<0.05$）。2 组肿瘤 4 个象限的 T1 值见表 1。A 组肿瘤 T1 值的 CV 小于 B 组［18.39% 和 31.44%，$F=7.268$、$P<0.05$］。MR T2WI 示 A 组小鼠肿瘤形态较规则、边界清晰，B 组小鼠肿瘤形态欠规则、边界欠清；T1 mapping 伪彩图示 A 组瘤体内信号较均匀而 B 组瘤体内信号欠均匀。见图 1。

2.3 病理学表型 A 组肿瘤内部坏死较少，细胞结构相对完整，细胞器形态基本正常；B 组肿瘤向周围侵犯明显，光镜下见肿瘤内部坏死较多，细胞结构破坏较严重。见图 1。

## 3 讨论

常用肿瘤动物模型多服务于药物研究，肿瘤体积、形态及侵袭能力等差异对于评价治疗效果的影响较小。

表 1 肿瘤 4 个象限 T1 值（ms）

| 编号 | T1 值 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 右上 | 左上 | 右下 | 左下 |
| A1 | 1 258.07 | 912.71 | 935.36 | 1 122.43 |
| A2 | 812.34 | 956.86 | 1 058.79 | 1 168.96 |
| A3 | 866.25 | 1 038.00 | 926.50 | 957.56 |
| A4 | 1 352.69 | 1 461.89 | 1 289.69 | 1 479.16 |
| A5 | 1 084.68 | 1 242.06 | 900.08 | 1 133.92 |
| A6 | 1 401.12 | 1 377.26 | 1 392.81 | 1 378.40 |
| B1 | 2 319.71 | 1 946.55 | 2 683.00 | 2 379.00 |
| B2 | 1 839.00 | 1 246.00 | 1 534.49 | 1 367.93 |
| B3 | 929.65 | 1 132.79 | 905.00 | 965.50 |
| B4 | 1 402.51 | 1 210.27 | 1 443.71 | 1 532.11 |
| B5 | 1 456.40 | 1 418.98 | 1 336.85 | 2 019.10 |
| B6 | 1 158.58 | 1 377.95 | 1 215.22 | 1 123.26 |

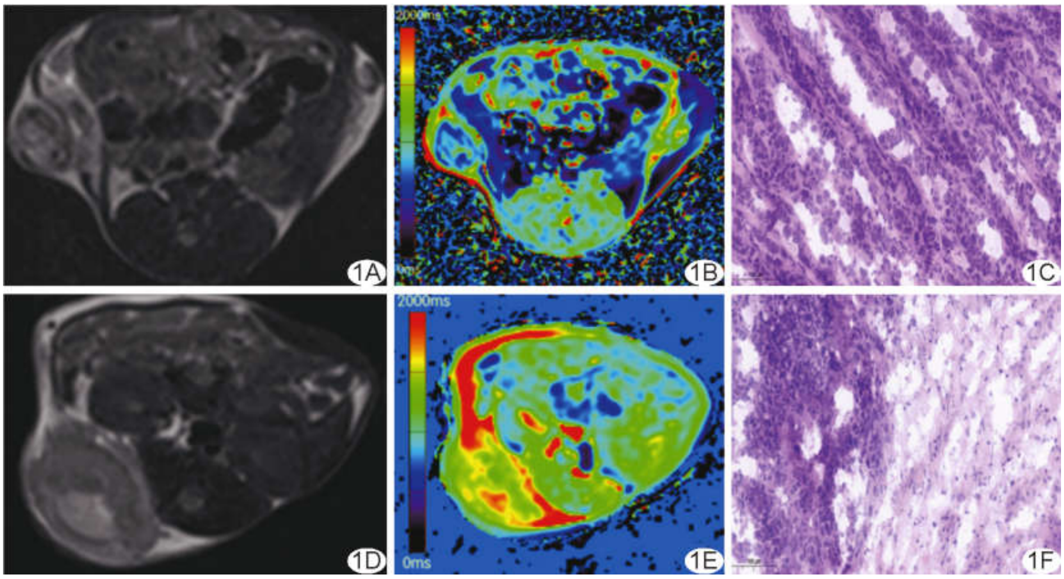


**图 1** 接种 7 天后小鼠肿瘤影像学及病理表现 A～C. A 组小鼠 MR T2WI（A）、T1 mapping 伪彩图（B）示肿瘤形态较规则、信号较均匀，边界清，病理图（C，HE，×40）示肿瘤内部坏死较少，细胞结构相对完整、细胞器形态基本正常；D～F. B 组小鼠 MR T2WI（D）、T1 mapping 伪彩图（E）示肿瘤形态欠规则、信号欠均匀，向周围侵犯，病理图（F，HE，×40）示肿瘤内部坏死较多，细胞结构破坏较严重

但对于消融治疗相关肿瘤研究,动物模型所荷肿瘤的上述表现至关重要。消融依赖温度或电场,利用不同方式进行消融,产生的消融区具有不同形态:冷冻消融形成的消融区呈椭圆形,微波消融的消融区为葫芦形,而射频消融的消融区呈现前冲的纺锤形。这些形态特征要求动物模型能较好地模拟真实肿瘤,以便准确评估消融治疗效果;肿瘤形态不规则常致消融不完全,可诱导免疫抑制并加速肿瘤进展。

基质胶是于富含胞外基质蛋白的 EHS 小鼠肿瘤中提取的可溶性基底膜制备物,能较好地在体外模拟肿瘤微环境[11],并具有独特的胶凝质地和黏弹性,可高度模拟体内细胞外基质的部分关键特性[12];利用基质胶营造的均一的物理支撑和营养物质扩散环境有助于维持肿瘤细胞周围微环境稳定。将基质胶与肿瘤细胞混合后注射至皮下可在局部形成稳定的三维结构,为肿瘤细胞生长提供物理支撑[13],同时限制肿瘤细胞无序扩散,引导其在相对规整的空间内增殖,以使肿瘤形成较为规则的形态。另外,基质胶的组织张力亦可影响细胞,低张力基质胶可致肿瘤细胞更圆且松弛,减少肿瘤细胞基质张力可使肿瘤细胞恶性表型趋于正常化[14];同时,作为一种物理屏障,基质胶能隔离肿瘤细胞与周围皮下组织,减少肿瘤细胞向周围组织侵袭和弥散[15]。本研究 A 组通过于皮下注射基质胶与 H22 肝癌细胞混悬液制备的小鼠模型荷瘤形态一致性高而肿瘤侵袭力较弱,MRI 示肿瘤形态较规则、边界清晰,瘤体内信号较均匀。本研究组间建模成功率及肿瘤体积均无明显差异,但 A 组小鼠体积差异较小、肿瘤组织较稳定,提示联合应用基质胶建模有助于维持肿瘤组织稳定性,或可满足评估消融肿瘤治疗效果需要。

综上所述,利用 H22 肝癌细胞联合基质胶能获得形态较规则、内部较均质、侵袭能力相对较弱的小鼠皮下肝癌模型。

利益冲突:全体作者声明无利益冲突。

作者贡献:孙维荣查阅文献、撰写文章;张国辉研究实施;姚余霄统计分析;李竞修改文章;张啸波和张肖研究设计;何晓锋和张欣图像分析;魏颖恬查阅文献;张忠亮和王振军图像处理;肖越勇审阅文章。

## [参考文献]

[1] PIÑERO F, DIRCHWOLF M, PESSôA M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: Diagnosis, prognosis and treatment response assessment[J]. Cells, 2020,9(6):1370.

[2] 董畅,李威,满文玲,等.比较 TACE+微波消融+程序性死亡受体-1 与 TACE+微波消融治疗原发性肝癌[J].中国介入影像与治疗学,2024,21(1):7-11.

[3] 胡舟朝,张晓东,俞南南,等.弥散加权成像联合动态增强 MRI 预测肝细胞癌经 TACE 联合射频消融治疗后复发[J].中国介入影像与治疗学,2024,21(1):17-21.

[4] 中国抗癌协会肿瘤介入学专业委员会,中国医师协会介入医师分会,中国临床肿瘤学会放射介入治疗专家委员会,等.冷热多模态消融治疗肝脏恶性肿瘤操作规范专家共识[J].中国介入影像与治疗学,2021,18(1):23-27.

[5] HAN J, FAN Y C, WANG K. Radiofrequency ablation versus microwave ablation for early stage hepatocellular carcinoma: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020,99(43):e22703.

[6] ZHANG X, ZHANG X, DING X, et al. Novel irreversible electroporation ablation (Nano-knife) versus radiofrequency ablation for the treatment of solid liver tumors: A comparative, randomized, multicenter clinical study[J]. Front Oncol, 2022, 12:945123.

[7] 韩赫,贾峰林,王玉杰,等.脉冲电压、电极与消融部位距离对脉冲场消融效果及消融部位温度的影响:实验研究[J].中国介入影像与治疗学,2023,20(4):228-232.

[8] PAOLUCCI I, BULATOVIĆ M, WEBER S, et al. Thermal ablation with configurable shapes: A comprehensive, automated model for bespoke tumor treatment[J]. Eur Radiol Exp, 2023,7(1):67.

[9] ELY Z A, MATHEY-ANDREWS N, NARANJO S, et al. A prime editor mouse to model a broad spectrum of somatic mutations in vivo[J]. Nat Biotechnol, 2024,42(3):424-436.

[10] 陈泉玮,孙元栋,龚小龙,等.热消融在肝细胞癌治疗中的应用及研究进展[J].中国肿瘤,2025,34(7):574-581.

[11] XU R, ZHOU X, WANG S, et al. Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions[J]. Pharmacol Ther, 2021,218:107668.

[12] CHAUDHURI O, COOPER-WHITE J, JANMEY P A, et al. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour[J]. Nature, 2020,584(7822):535-546.

[13] ANGUIANO M, CASTILLA C, MAŠKA M, et al. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis[J]. PLoS One, 2017,12(2):e0171417.

[14] MCKENZIE A J, HICKS S R, SVEC K V, et al. The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation [J]. Sci Rep, 2018,8(1):7228.

[15] LEE H J, MUN S, PHAM D M, et al. Extracellular matrix-based hydrogels to tailoring tumor organoids[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2021,7(9):4128-4135.