

## RESEARCH ON CREATING HUMAN LIVER CANCER TUMORS USING HEP-3B CANCER CELL LINE IN EXPERIMENTS

Nguyen Song Hai\*, Luu Truong Thanh Hung

*Military Institute of Traditional Medicine - 442 Kim Giang, Dai Kim Ward, Hoang Mai Dist, Ha Noi City, Vietnam*

Received: 06/08/2024

Revised: 19/09/2024; Accepted: 16/10/2024

### ABSTRACT

**Objective:** To generate human liver cancer tumors in immunodeficient mice (nude mice) using the human liver cancer cell line Hep-3B.

**Methods:** Cultivation and proliferation of Hep-3B human liver cancer cells, transplantation of 106 Hep-3B cells under the skin of each nude mouse thigh, monitoring mouse condition, formation and development tumor for 35 days. Determine the tumor growth rate, tumor regression rate, tumor volume, survival - death rate, and pathological images of the tumor.

**Results:** Successfully cultured and proliferated human liver cancer cells of the Hep-3B line, enough cells to serve tumor grafting on nude mice. When transplanting human liver cancer cells from the Hep-3B line, the tumor appearance rate reached 87.5% after 7 days of transplantation, the tumor regression rate was 0%, the average tumor volume after 35 days of transplantation was 774.8 mm<sup>3</sup>. No mice died due to technical errors and throughout the experiment, the pathological images were similar to human tumors. Conclusion: Creating an immune-deficient mouse model carrying human liver cancer of the Hep-3B line.

**Keywords:** Hep-3B, liver cancer, Nude mice.

---

\*Corresponding author

**Email:** nsonghai@gmail.com **Phone:** (+84) 985481685 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v65i6.1684**

# NGHIÊN CỨU TẠO KHỐI UNG THƯ GAN NGƯỜI BẰNG DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ HEP-3B TRÊN THỰC NGHIỆM

Nguyễn Song Hải\*, Lưu Trường Thanh Hưng

Viện Y học cổ truyền Quân đội - 442 Kim Giang, P. Đại Kim, Q. Hoàng Mai, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 06/08/2024

Chỉnh sửa ngày: 19/09/2024; Ngày duyệt đăng: 16/10/2024

## TÓM TẮT

**Mục tiêu nghiên cứu:** Tạo ra khối ung thư gan người trên cơ thể chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột nude) bằng dòng tế bào ung thư gan người Hep-3B.

**Phương pháp nghiên cứu:** Nuôi cấy và tăng sinh tế bào ung thư gan người Hep-3B, ghép liều 106 tế bào Hep-3B dưới da mỗi đuôi chuột nude, theo dõi tình trạng chuột, sự hình thành và phát triển khối u trong 35 ngày. Xác định tỷ lệ mọc u, tỷ lệ thoái u, thể tích khối u, tỷ lệ sống - chết, hình ảnh giải phẫu bệnh lý của khối u.

**Kết quả:** Đã nuôi cấy và tăng sinh thành công tế bào ung thư gan của người dòng Hep-3B, đủ số lượng tế bào phục vụ ghép tạo khối u trên chuột nude. Khi ghép tế bào ung thư gan người dòng Hep-3B tỷ lệ xuất hiện khối u đạt 87,5 % sau 7 ngày ghép, tỷ lệ thoái u 0 %, thể tích khối u trung bình sau 35 ngày ghép 774,8 mm<sup>3</sup>, không có chuột nào chết do lỗi kỹ thuật và trong suốt quá trình thí nghiệm, hình ảnh giải phẫu bệnh tương đồng như khối u trên người.

**Kết luận:** Tạo được mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư gan người dòng Hep-3B.

**Từ khóa:** Hep-3B, ung thư gan, chuột Nude.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam nằm trong số những quốc gia có tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) cao nhất thế giới, phù hợp với tỷ lệ nhiễm virus viêm gan B và C rất cao. UTBMTBG ở Việt Nam là loại ung thư đứng đầu số ca mắc mới và tử vong [1].

Cho tới nay, phẫu thuật hoặc ghép gan vẫn được xem là phương pháp điều trị tối ưu cho UTBMTBG. Phương pháp này chỉ có thể áp dụng cho khoảng 20-30% số trường hợp do phần lớn số trường hợp phát hiện bệnh ở giai đoạn không còn chỉ định phẫu thuật, thời gian sống có thể đạt tới 5 năm, tuy nhiên 70% trong số đó sẽ tái phát. Đối với giai đoạn trung gian không mổ được, điều trị tại chỗ bằng nút mạch giúp cải thiện thời gian sống trung bình có thể đến 2 năm, tuy nhiên khả năng thất bại điều trị cao và đối diện nguy cơ suy gan trên nền gan xơ đã có sẵn. Riêng đối với ung thư gan giai đoạn tiên triển nếu không điều trị thời gian sống chỉ đạt 3 tháng. Ở giai đoạn này ít các lựa chọn điều trị, hoá trị toàn thân không chứng minh được lợi ích. Sorafenib là thuốc chứng minh được nhiều lợi ích vượt trội trong điều trị bước 1 ung thư gan nguyên phát giai đoạn bệnh tiên triển. Tuy nhiên gánh nặng từ chi phí điều trị lớn, nguy cơ xuất

hiện nhiều độc tính trên nền xơ gan mạn tính, chỉ định sorafenib cần được cân nhắc xem xét thận trọng cho từng trường hợp cụ thể, việc phối hợp sorafenib với các phương pháp điều trị khác đa số mang lại kết quả âm tính [2]. Vì vậy, việc tìm kiếm những phương pháp điều trị phối hợp nhằm nâng cao hiệu quả điều trị cũng như cải thiện chất lượng cuộc sống của bệnh nhân là vấn đề thực tiễn đặt ra cần giải quyết.

Để nghiên cứu các thuốc mới điều trị ung thư gan, rất cần có các mô hình ung thư gan trên động vật thực nghiệm để đánh giá hiệu quả kháng ung thư của các thuốc chống ung thư và các thuốc tăng cường hỗ trợ miễn dịch cho bệnh nhân ung thư. Các mô hình ung thư động vật ở nước ta trước đây chủ yếu được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài, chẳng hạn dùng tế bào ung thư của chuột ghép cho chuột [3]. Tuy nhiên, hạn chế của mô hình đó là các khối u không mang đặc tính sinh học giống như khối u trên người, điều này tạo nên hạn chế rất lớn trong nghiên cứu. Bên cạnh đó đáp ứng miễn dịch trên chuột bình thường rất khỏe cho nên tỷ lệ mọc u thấp và tỷ lệ u tự thoái triển cao [3]. Hoặc mô hình sử dụng hóa chất gây ung thư thì động vật

\*Tác giả liên hệ

Email: nsonghai@gmail.com Điện thoại: (+84) 985481685 <https://doi.org/10.52163/yhc.v65i6.1684>



thường chết sớm. Sử dụng chuột nude là một bước đột phá trong nghiên cứu ung thư, đã cho phép nghiên cứu ung thư người trên cơ thể động vật động vật bị ung thư mang các đặc tính sinh học ung thư là nguyên bản của tế bào ung thư người [3].

Mục tiêu: Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm tạo ra mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch mang khối ung thư gan người dòng Hep-3B nhằm thử nghiệm thuốc hỗ trợ điều trị ung thư gan.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả thực nghiệm.

### 2.2. Địa điểm, thời gian thực hiện

- Địa điểm nghiên cứu: Trung Tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm- Học viện Quân y.

- Thời gian nghiên cứu: từ 3/2021- 5/2021.

### 2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Tế bào ung thư gan dòng Hep-3B.

- Chuột thiếu hụt miễn dịch (nude mouse), 6-8 tuần tuổi: 8 con chuột, trọng lượng trung bình 18-30g/con.

### 2.4. Vật liệu và phương tiện nghiên cứu

- Môi trường nuôi cấy tế bào RPMI; Bỏ sung Penicillin/ Streptomycin 1%, FBS 10% (ATCC, Hoa Kỳ).

- Tủ ấm CO<sub>2</sub>, kính hiển vi soi ngược, phòng nuôi tế bào, phòng nuôi chuột đúng tiêu chuẩn kỹ thuật. Các dụng cụ và vật tư tiêu hao bảo đảm tăng sinh tế bào, ghép tế bào lên chuột, chăm sóc và theo dõi chuột (cân điện tử, thước NSK).

### 2.5. Phương pháp

#### Kỹ thuật nuôi cấy tế bào ung thư gan người dòng Hep-3B

Dòng tế bào ung thư người được nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy tế bào đường kính 10 cm bằng môi trường nuôi cấy tương ứng là RPMI có bổ sung 10% FBS và 1% Penicillin và Streptomycin. Tế bào đều bám dính vào bề mặt đĩa nuôi, được thay môi trường 3 ngày 1 lần cho đến khi số lượng tế bào phủ kín trên 80% diện tích đáy đĩa nuôi cấy tế bào sẽ được tách khỏi chai nuôi bằng Trypsin EDTA 0,04% và cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy mới. Chu trình được lặp lại hoàn toàn tương tự cho đến khi thu được lượng tế bào đủ để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Tế bào thu được được đem bảo quản trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh bổ sung 5% DMSO và được lưu trữ ở trong bình chứa Nitơ lỏng [3].

Thu hoạch tế bào nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy tế bào đường kính 10 cm bằng Trypsin EDTA, sau đó li tâm

để loại bỏ môi trường, thu tế bào và hòa đều vào trong môi trường tương ứng. Các tế bào này được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Mật độ tế bào trong môi trường được xác định bằng cách sử dụng buồng đếm Neubauer và kính hiển vi quang học [3].

#### Tạo khối ung thư gan người trên chuột thiếu hụt miễn dịch

Chuột thiếu hụt miễn dịch được nuôi trong điều kiện phòng sạch, không khí được lọc và có áp lực dương tính ( $25 \pm 0,50C$ , độ ẩm  $52 \pm 5\%$ ), ánh sáng được tự động điều khiển bật lúc 7h00, tắt lúc 19h00. Thức ăn và nước uống được tiệt trùng trước khi sử dụng. Chuột thiếu hụt miễn dịch được nuôi ổn định ít nhất 3 ngày trước lúc tiến hành thí nghiệm. Cố định và tiêm dịch chứa  $2 \times 10^6$  tế bào Hep-3B/con ( mỗi đùi tiêm  $1 \times 10^6$  tế bào). Quá trình thao tác được thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

Chuột được ăn uống theo chế độ ăn bình thường; theo dõi tại chỗ tiêm và toàn thân chuột hàng ngày; đo kích thước khối u 2 lần/1 tuần và cân trọng lượng 2 ngày 1 lần x 30 ngày.

Kích thước khối u: Khối u được đánh giá theo dõi sự phát triển tại vị trí tiêm (đùi phải) 2 lần mỗi tuần, kích thước u được tính theo công thức:  $V = D \times R^2 \times 0,5$  (V: thể tích khối u, D: chiều dài khối u, R: chiều rộng khối u) [3]. Trọng lượng chuột: Cân hàng tuần bằng cân điện tử có độ chính xác 10-3.

#### Phân tích mô bệnh học khối u hình thành trên chuột

Khối u sau khi bóc tách được bảo quản trong dung dịch Formalin 10% trong vòng 24 - 48 giờ. Tiếp theo, khối u được đúc khối paraffin, cắt lát dày 5µm, nhuộm HE và đọc phân tích kết quả mô ung thư hình thành dưới kính hiển vi quang học. Phân tích những đặc điểm về hình thái học tế bào, cấu trúc mô hình thành, mạch máu, xâm lấn... Kỹ thuật được tiến hành tại khoa Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện 103, Học viện Quân Y.

#### 2.6. Biến số, chỉ số

Kết quả nuôi cấy tế bào Hep-3B, tỷ lệ mọc u, thể tích khối u, tỷ lệ thoái u, tỷ lệ sống - chết, hình ảnh giải phẫu bệnh lý của khối u.

#### 2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và SPSS 20.

#### 2.8. Đạo đức trong nghiên cứu

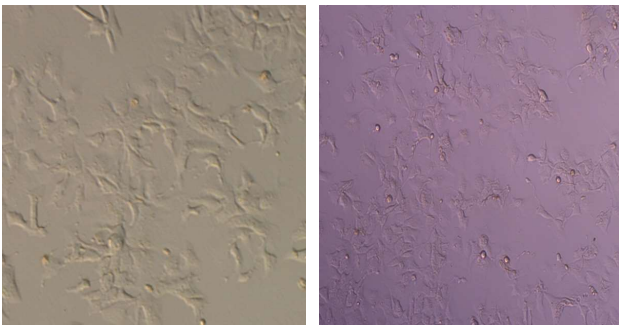
Động vật trong nghiên cứu được chăm sóc tại phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn, các nghiên cứu thực hiện dưới sự hướng dẫn của Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm - Học viện Quân y. Chúng tôi cam kết không xung đột lợi ích từ kết quả nghiên cứu.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả nuôi cấy tế bào Hep-3B

Sau 24 giờ, tế bào đã bám đều trên bề mặt đáy chai nuôi. Thay môi trường nuôi cấy 3 ngày 1 lần. Tốc độ tăng sinh gấp đôi của dòng tế bào Hep-3B khoảng 21 - 24h. Theo dõi tế bào phát triển khi đạt khoảng 80% diện tích đáy đĩa sẽ được chuyển sang đĩa nuôi cấy mới.

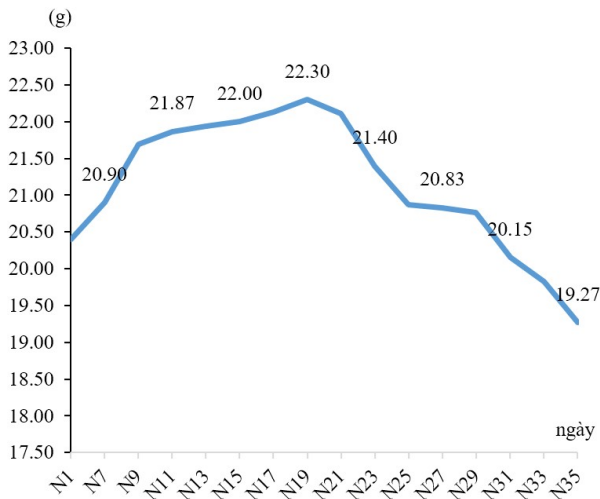
Tế bào ung thư được thu hoạch bằng cách dùng Trypsin-EDTA 1X. Cho 2 - 3ml môi trường nuôi cấy, lấy 10µl nhuộm trypan blu và cho vào buồng đếm tế bào xác định tỷ lệ tế bào sống. Số lượng tế bào sống lớn hơn hoặc bằng 98% tổng số tế bào trong huyền phù mới sử dụng cho thí nghiệm. Điều chỉnh môi trường để đạt 10<sup>6</sup> tế bào/ 0,1 ml.



Hep-3B-10X

**Hình 1. Hình ảnh tế bào ung thư gan**

Trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu



**Biểu đồ 1. Trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu (g)**

*Ghi chú: Trọng lượng chuột ngày 1 là trọng lượng chuột được cân ngay trước lúc tiêm tế bào Hep-3B.*

Từ ngày 1 đến ngày 19 sau khi tiến hành ghép tế bào ung thư Hep-3B, chuột ăn uống, hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, da bình thường, mắt trong, hậu môn khô, chuột tăng cân. Từ ngày 19 đến ngày 35 có một số chuột lưng cong vồng, da tím tái, giảm vận động, hậu ướt, chuột giảm cân. Toàn bộ số chuột vẫn sống đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

#### Tình trạng tại chỗ tiêm tế bào Hep-3B



**Hình 2. Ghép tế bào ung thư Hep-3B lên chuột nude**



**Hình 3. Khối ung thư Hep-3B trên chuột nude ngày thứ 7**

**Bảng 1. Tỷ lệ xuất hiện khối u gan Hep-3B**

Mã chuột NC	Số vị trí ghép u trên 1 chuột	Số u ngày thứ 5 (N5)	Số u ngày thứ 7 (N7)
9	2	2	2
10	2	2	2
11	2	2	2
12	2	1	2
13	2	1	1
14	2	1	1
15	2	1	2
16	2	2	2
Số chuột ghép u: 8	Tổng số vị trí ghép u: 16	Tỷ lệ xuất hiện u N5: 75%	Tỷ lệ xuất hiện u N7: 87,5%

Ngày thứ 5 một số chuột xuất hiện khối u với tỷ lệ 75%, ngày thứ 7 tỷ lệ xuất hiện u 87,5%. Da trên bề mặt không khác biệt so với vùng da lân cận. Tại thời điểm ngày 35 có một số u màu sắc chuyển từ hồng nhạt sang tím đen.

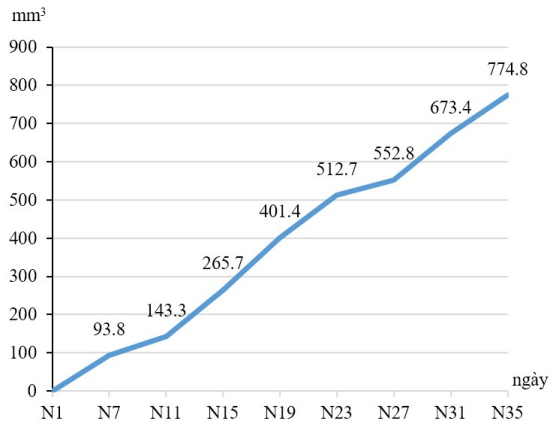




**Bảng 2. Tỷ lệ chuột thoái u**

	Ngày				
	N10	N15	N20	N25	N35
Tỷ lệ thoái u (%)	0	0	0	0	0

Không có chuột nào mất u tự nhiên, không có chuột nào bị vỡ khối u, không có chuột chết trong quá trình thí nghiệm.



**Biểu đồ 2. Thể tích trung bình khối u (mm³)**

*Ghi chú: N1 là ngày chuột được tiêm tế bào Hep-3B*

Thể tích trung bình khối u chuột tăng dần đều theo thời gian. Tại thời điểm 7 ngày sau tiêm tế bào Hep-3B, khối u dưới da có thể tích trung bình khoảng 93,8 mm<sup>3</sup>. Khi ở thời điểm ngày thứ 35 thể tích khối trung bình 774,8 mm<sup>3</sup> quá trình theo dõi kích thước khối u dừng, tiến hành thu thập mẫu để đánh giá hình ảnh giải phẫu bệnh.

**3.3. Hình ảnh đại thể và vi thể khối ung thư gan người Hep-3B trên chuột nude**

**Hình ảnh đại thể**

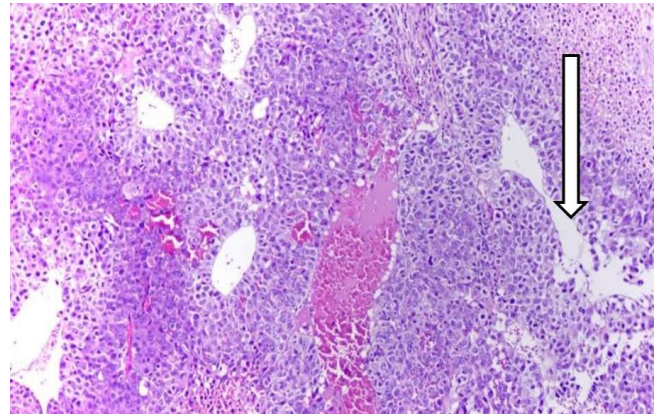
Những ngày đầu khối u có ranh giới rõ, mật độ chắc, di động, đến giai đoạn cuối khối u dính vào khối cơ đùi, xuất hiện nhiều mạch máu dưới da xung quanh vùng u, mật độ cứng chắc, ranh giới rõ, di động kém hơn. Da phía trên khối u không có sự thay đổi màu sắc. Khối u giai đoạn đầu có màu hồng giai đoạn sau một số u chuyển thành màu tím đen do có hiện tượng xuất huyết trong u.



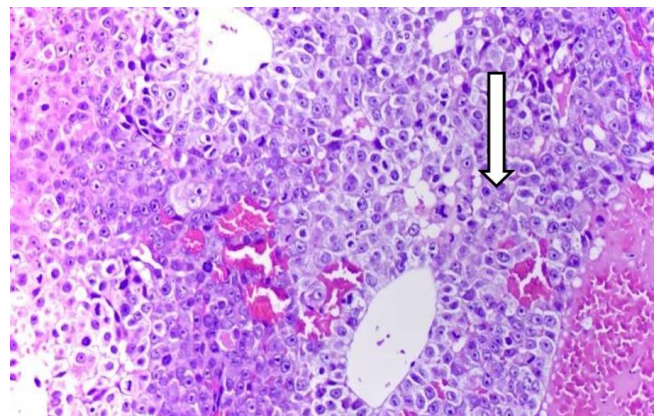
**Hình 4. Hình ảnh đại thể ung thư gan người Hep-3B trên chuột nude**

**Hình ảnh vi thể**

Dưới chân bì da có u, cấu trúc u gồm các đám, các dải tế bào biểu mô tăng sinh với nhân không đều, tăng sắc, hạt nhân rõ, nhiều nhân chia bất thường. U có vùng hoại tử rộng. Mô đệm u tăng sinh mạch máu, xâm nhiễm ít tế bào viêm.



1



2

**Hình 5. Hình ảnh vi thể khối ung thư gan Hep-3B trên chuột nude**

Một số u bị hoại tử trung tâm (mũi tên đen), dạng hoại tử đồng do tốc độ tế bào u phát triển quá mạnh, nên vùng trung tâm thiếu nuôi dưỡng (hình 5.1)

Các tế bào u sắp xếp sát nhau, bào tương hẹp, nhân tế bào không đều, tăng sắc mạnh, có hình nhân chia bất thường (mũi tên xanh) (hình 5. 2)

**4. BÀN LUẬN**

Các mô hình ung thư động vật trước đây chủ yếu được tạo ra trên động vật có nguồn gốc đồng loài, hạn chế của mô hình đó là các khối u không mang đặc tính sinh học giống như khối u trên người, điều này tạo nên hạn chế rất lớn trong nghiên cứu. Bên cạnh đó đáp ứng miễn dịch trên chuột bình thường rất khỏe cho nên tỷ lệ mọc u thấp và tỷ lệ u tự thoái triển cao. Hoặc mô hình sử dụng hóa chất gây ung thư thì động vật thường chết sớm [3,4,6,8]. Chuột nude được bắt đầu tạo ra từ năm 1966 bởi Flanagan, chuột BALB/c nude có biểu hiện bên ngoài khác biệt là không có lông, suy giảm hoặc

mất chức năng tuyến ức và có đôi tai lớn. Chuột nude có một gen bị đột biến đồng hợp tử (homozygous), gen này qui định sự phát triển của lông và tuyến ức. Chuột nude thiếu vắng của tuyến ức dẫn đến sự suy giảm hệ miễn dịch nghiêm trọng, các tế bào lympho T nguồn gốc tuyến ức thiếu hụt còn gây ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của các tế bào lympho B và tế bào gốc tủy xương. Do vậy, chuột nude được áp dụng rộng rãi trong nghiên cứu hệ miễn dịch, bệnh bạch cầu cũng như các khối u đặc hoặc ghép dị loài. Sau khi tạo thành công chuột thiếu hụt miễn dịch, chúng nhanh chóng được sử dụng khắp nơi trên thế giới, hứa hẹn một bước đột phá trong nghiên cứu ung thư khi tiến hành ghép tế bào ung thư người lên các dòng chuột này. Đã có rất nhiều dòng tế bào ung thư người được cấy ghép lên chuột thiếu hụt miễn dịch và phát triển tốt, vẫn giữ được những đặc điểm sinh học và hình thái giống các khối u tương tự trên người [3].

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tăng sinh và ghép thành công tế bào Hep-3B trên chuột nude, trong vòng 5 ngày sau ghép một số chuột đã xuất hiện khối u dưới da, sau 7 ngày tỷ lệ mọc u đạt 87,5% và không có chuột chết do lỗi kỹ thuật so với McLemore TL và cs (năm 1987) thì tỷ lệ chuột chết sau ghép là 5%. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả đã công bố: tỷ lệ thành công trong kỹ thuật ghép dị loài từ 85 - 100% [3,4,6,7,8]. Bên cạnh đó, một ưu điểm nữa của kỹ thuật này là thời gian thực hiện nhanh, trong 1-1,5 tuần đã có thể đánh giá hiệu quả tạo khối ung thư người trên động vật.

Kỹ thuật tiêm tế bào ung thư gan người Hep-3B vào dưới da đùi chuột nude cho phép tạo ra các khối u với kích thước tương đối đồng đều, cùng ở một vị trí ngay dưới da. Vì vậy, tạo thuận lợi cho quá trình theo dõi phát triển, của khối u hàng ngày bằng các biện pháp không can thiệp. Điều này có ý nghĩa trong nghiên cứu bởi vì để đánh giá khối u phát triển trên động vật rất phức tạp, nếu khối u không ở các khu vực ngoại vi sẽ rất khó khăn trong theo dõi. Kỹ thuật này cho phép tạo ra khối u tương đồng về mặt mô bệnh học, về các biểu hiện gen cũng như gen tương tự như khối u trên bệnh nhân. Vì thế đây là mô hình lý tưởng cho nghiên cứu các phương pháp điều trị, hỗ trợ điều trị ung thư gan trên thực nghiệm.

## 5. KẾT LUẬN

Đã nuôi cấy và tăng sinh thành công tế bào ung thư gan của người dòng Hep-3B, đủ số lượng tế bào phục vụ ghép tạo khối u trên chuột nude. Đã tạo được khối ung thư gan người dòng Hep-3B dưới da đùi chuột nude.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Hoài Thương, Trần Ngọc Ánh, Đậu Quang Liêu, Một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan tại Bệnh viện Đại học y Hà Nội, Tạp chí Nghiên cứu y học, 2021, 147 (11), tr 92-100.
- [2] Nguyễn Thị Thu Hương, Đánh giá kết quả điều trị của thuốc sorafenib trên bệnh nhân ung thư gan nguyên phát, Luận án tiến sĩ, Đại học y Hà nội, 2020, tr 3-5.
- [3] Bùi Khắc Cường, Hồ Anh Sơn, Nguyễn Lĩnh Toàn, Nghiên cứu tạo khối ung thư đại tràng người trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài, Tạp chí Y Dược học quân sự, 2012, (9), tr 53-57.
- [4] Siegel RL et al, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA Cancer J Clin, 2021, 71(3), tr 209-249.
- [5] Giulio Alessandri et al, Single-Shot Local Injection of Microfragmented Fat Tissue Loaded with Paclitaxel Induces Potent Growth Inhibition of Hepatocellular Carcinoma in Nude Mice. Cancers 2021, 13(21), 5505-5512.
- [6] Liu J, Johnston MR, Experimental animal models for studying lung cancers, SurgOncol, 2002, 11(4), 217-27.
- [7] Céspedes MV, Espina C, García-Cabezas MA et al, Orthotopic microinjection of Human Colon Cancer Cells in Nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastasis site, Am J Pathol, 2007, 170 (3), 90-97.

