基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.015

高频超声监测 SD 大鼠肾上腺区人神经母细胞瘤移植瘤模型

刘 沁[1],王 荞[1],全学模[1],王 珊[2],向 娟[2],白 洁[2]
(重庆医科大学儿童医院 1. 超声科;2. 肿瘤外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨高频超声在 SD 大鼠肾上腺区人神经母细胞瘤(Neuroblastoma,NB)移植瘤模型中的应用价值,分析超声测量结果与肿瘤实际生长情况的相关性。方法:建立 SD 大鼠荷瘤模型 53 只。肿瘤接种后分别于 5 d~6 周,每 4 d 随机选取 5 只 SD 大鼠行高频超声检查,观察肿瘤的形态、回声和边界,测量肿瘤大小,彩色多普勒超声观察肿瘤内血流分布情况。每次超声检查后剥离肿瘤,测量肿瘤实际大小,并行病理活检,对比两者的相关性。结果:肿瘤成瘤率为 100%;超声观察肾上腺区移植肿瘤呈类椭圆形中低回声团块,5~13 d 肿瘤生长旺盛,其内血供丰富,>13~17 d 生长速度减缓,>17 d 肿瘤开始逐渐缩小,29 d 后肿瘤内部出现液化坏死和钙化,血供减少;高频超声测量结果与肿瘤实际生长情况呈高度正相关(r=0.993,P<0.001)。结论:高频超声能较准确监测 SD 大鼠肾上腺区人 NB 移植瘤模型的建立及成瘤后肿瘤生长情况,具有较高的实用价值。

【关键词】彩色多普勒;高频超声;神经母细胞瘤;大鼠
【中国图书分类法分类号】R445.1;R739.43 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-10

High frequency ultrasound in immunocompetent mouse model of xenograft neuroblastoma

LIU Qin[1], *WANG Qiao*[1], *QUAN Xue-mo*[1], *WANG Shan*[2], *XIANG Juan*[2], *BAI Jie*[2]
(*Department of Ultrasonography, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To assess the value of high frequency ultrasound in monitoring the growth of xenograft neuroblastoma in immunocompetent sprague dawley(SD) mouse model. *Methods*: Fifty-three SD mice were implanted with human neuroblastoma(SK-N-SH) cell suspension. All of the mice were injected retroperitoneally in adrenal area. Five mice were chosen randomly and the size, internal echo and blood supply of tumor were observed by high frequency ultrasound at 5 d~6 weeks after the first injection. After the examination, the mice were dissected under narcotics and the tumors were dissociated immediately. The transversal and sagittal diameter was measured by high frequency ultrasound and straightedge. Tumors were fixed for HE staining. *Results*: The SD mouse model of xenograft neuroblastoma was made successfully, and the success rate was 100%. The volume of tumor measured by high frequency ultrasound and straightedge had strong correlation(r=0.993, P<0.001). High frequency ultrasound could also observe blood supply and necrosis of the tumors at real-time. The fast period of tumor growth with the richest blood supply appeared 5~13 days after injection. *Conclusion*: High frequency ultrasound provides an accurate, practical method to monitor the growth of xenograft neuroblastoma in SD mouse model.

【Key words】ultrasonography; color doppler; neuroblastoma; mouse

小儿神经母细胞瘤(Neuroblastoma,NB)恶性程度高,亦可转化为良性神经节细胞瘤,为探讨该疾病的病理机制,需对其生物学行为进行深入研究。本研究使用高频彩色多普勒超声监测 SD 大鼠肾上腺区人 NB 移植瘤模型,观察其移植成功率及肿瘤生长特点,并与解剖后肿瘤实体标本结果对比研究,旨在探讨高频超声在 SD 大鼠肾上腺区人 NB 移植瘤模型建立监测中的价值。

作者介绍:刘 沁(1985-),女,硕士,研究方向:小儿超声诊断。
通信作者:王 荞,女,副主任医师,Email:wqiao70@yahoo.cn。

1 资料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠 53 只,雌雄不限,鼠龄 4 周,体质量 90~110 g,由重庆医科大学实验动物中心提供;人 NB 细胞系 SK-N-SH 细胞由中国医学科学院肿瘤细胞库提供。

1.2 实验方法

1.2.1 荷瘤鼠模型的制作 体外培养人 NB SK-N-SH 细胞至对数生长期,收集细胞,调节浓度为(1~3)×10^7 个/ml,备用;无菌条件下 10%水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉 SD

大鼠，侧卧位固定于鼠板，沿左侧肋脊角脊柱旁约 1 cm 处纵行切开皮肤、皮下筋膜及肌肉，暴露左侧肾脏和肾上腺，在左侧肾脏与肾上腺之间的肾深筋膜内注入 0.2 ml 细胞悬液，建立人 NB 幼年 SD 大鼠模型。

1.2.2 高频彩色多普勒超声检查 西门子公司 Acuson Sequia-512 彩色多普勒超声诊断仪，线阵探头 15L8W，探头频率 14.0 MHz。仪器所有条件设置为同一标准。检查前首先用脱毛器脱去肾上腺区体毛，待动物麻醉显效后将其固定。于肿瘤接种后第 5 天~6 周，每 4 d 分别随机选取 5 只大鼠行高频超声检查。用二维超声多切面观察肿瘤的形态、回声和边界等，测量肿瘤大小，注意有无液化坏死区域或钙化点的出现及范围；彩色多普勒超声观察肿瘤内部及周边的血流分布并监测腹腔淋巴结变化及脏器转移。因 SD 大鼠的心率及呼吸节律较快，故适当增大滤波功能以最大限度的减少心脏跳动和呼吸所致伪像。每次检查测量 3 次，取平均值作为超声测量结果。由公式：肿瘤体积=短径^2×长径×0.523 6 计算肿瘤体积[1]。

1.2.3 病理学检查 每次超声检查后，解剖大鼠，分离出肾上腺区肿瘤组织，测量肿瘤的长径与短径，取 3 次测量的平均值，按上述公式计算肿瘤体积。然后固定肿瘤组织，石蜡包埋，行 HE 染色。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。各项计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。*Pearson* 相关分析评价超声测量结果与实体标本测量结果的相关性，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成瘤率

53 只实验鼠解剖发现荷瘤全部成功，并经病理切片证实肿瘤成功存活，成瘤率为 100%。

2.2 移植瘤体外观察

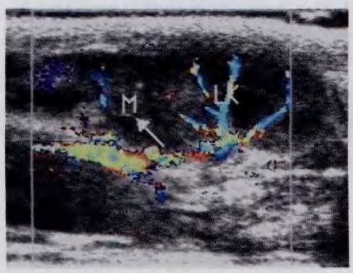
53 只 SD 大鼠中 50 只为接种部位肿瘤生长，未发生转移；3 只既有接种部位肿瘤又有全腹转移，并因明显恶病质分别于接种后第 10、13、14 天 死亡，未纳入超声检查样本。种植 5 d，42 只可在移植部位触摸到绿豆大小结节，质韧；5~17 d 肿块持续生长，呈不规则椭圆形；>17 d 剩余的 30 只荷瘤鼠移植部位触摸到肿瘤逐渐缩小，29 d 后 5 只荷瘤鼠种植区肿瘤质地较之前变软，局部皮肤无溃疡及坏死。

2.3 超声观察结果

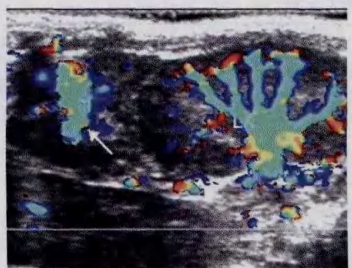
肿瘤呈不规则椭圆形，边缘尚清楚，被膜显示完整，肿瘤内为不均质中低回声，5~13 d 肿瘤生长旺盛，肿瘤内可见丰富的星点状或短条状血流信号（图 1A、B），2 只荷瘤鼠肿瘤周边有粗大的血管呈弧形包绕，>13~17 d 肿瘤生长减缓；>17 d 肿瘤开始逐渐缩小，29 d 后肿瘤中心部位可逐渐形成不规则液性无回声区和点状高回声钙化点（图 1C），血流信号随之

表 1 肾上腺区移植瘤超声与解剖后实体标本测量的结果比较

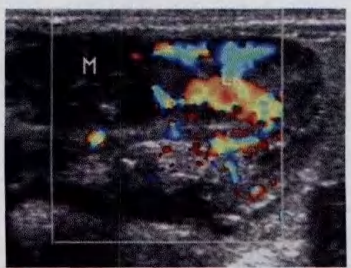
时间（d）	超声测量			实体标本测量		
	长径（mm）	短径（mm）	体积（mm^3）	长径（mm）	短径（mm）	体积（mm^3）
5	4.10 ± 1.63	3.20 ± 1.61	33.00 ± 36.70	4.04 ± 1.54	3.30 ± 1.52	33.34 ± 36.83
9	10.67 ± 2.22	7.19 ± 3.54	381.80 ± 359.52	10.30 ± 2.39	7.00 ± 3.64	361.72 ± 362.89
13	16.48 ± 2.35	11.06 ± 1.95	1 108.28 ± 555.33	16.50 ± 2.42	11.00 ± 1.90	1 101.27 ± 569.76
17	19.84 ± 2.50	14.62 ± 1.60	2 280.26 ± 762.11	19.90 ± 2.63	14.60 ± 1.67	2 284.52 ± 792.39
21	16.43 ± 1.48	9.53 ± 2.09	816.84 ± 409.78	16.70 ± 1.89	9.50 ± 2.15	823.20 ± 435.11
25	12.88 ± 3.68	7.78 ± 1.45	452.41 ± 308.60	13.90 ± 4.02	8.20 ± 1.40	534.58 ± 330.10
29	9.98 ± 4.34	6.01 ± 2.00	226.34 ± 152.87	10.10 ± 4.56	6.30 ± 1.82	247.47 ± 168.41
33	7.83 ± 2.97	4.81 ± 1.90	110.23 ± 108.19	8.00 ± 2.74	4.70 ± 1.89	110.32 ± 117.32
37	6.42 ± 1.87	4.51 ± 1.26	80.71 ± 67.08	7.50 ± 1.97	4.80 ± 1.48	106.34 ± 85.04
41	6.00 ± 1.24	3.67 ± 0.53	44.52 ± 18.51	6.70 ± 2.11	3.80 ± 0.57	54.57 ± 27.36



A. 建模后第 9 天的超声图像，内部回声不均，CDFI 可见星点状血流信号



B. 建模后第 13 天的超声图像，CDFI 可见丰富的短条状血流信号



C. 建模后第 29 天的超声图像，肿瘤中心部位可逐渐形成不规则液性无回声区，CDFI 未见明显血流信号

图 1 人 NB 移植瘤超声图像

减少；3 只荷瘤 SD 大鼠可见大量腹水及腹腔淋巴结转移。超声测量结果见表 1。

2.4 病理学观察结果

解剖后，肿瘤呈粉白色（图 2）。肿瘤实体标本测量结果见表 1。HE 染色可见肿瘤细胞在肾上腺内呈无序生长，细胞排列紊乱，后期可出现液性坏死区或钙化区（图 3）。



图 2 肾上腺区人 NB 移植瘤实体标本图



图 3 肾上腺区人 NB 移植瘤病理切片图（HE 染色，×100）

2.5 高频超声与实体标本测量结果

对比高频超声与肿瘤实体标本测量结果两者呈高度正相关，体积 *Pearson* 相关系数为 0.992（$P<0.001$，图 4）。

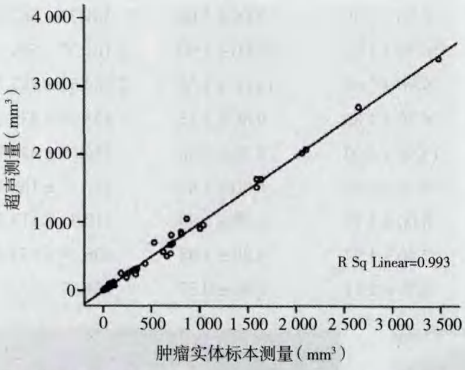


图 4 超声与肿瘤实体标本测量 NB 瘤体积的相关性

3 讨 论

NB 是小儿腹膜后最常见的恶性实体肿瘤之一，发病率仅次于白血病及中枢神经肿瘤，占小儿恶性肿瘤的 8%~10%。NB 起源于胚胎发育中脊髓外层的神经母细胞或原始交感神经嵴，肿瘤可发生在有胚胎交感神经母细胞存在的任何部位，常发生于肾上腺髓质和腹膜后交感神经链。NB 恶性程度高，具有很强的侵袭性，部分病例具有自然消退的特点。如何成功建立肿瘤活体模型并研究 NB 细胞分化消退及其相关发生机制，是当今肿瘤届研究的焦点问题[2,3]。

成功建立稳定、有效的 NB 动物模型，是基础和临床研究的基础。裸鼠和 SCID 鼠对异种移植不产生免疫排斥反应，成活率高，常做为 NB 动物模型[4,5]，但是由于裸鼠和 SCID 鼠异种移植瘤模型存在非免疫活性缺陷，瘤细胞生物学行为与临床不一致[6]，且饲养条件要求高，实验费用昂贵，故应用受限。何文飞等[7]研究表明 5 月龄内的C57BL/6j系小鼠免疫系统尚不健全，肿瘤细胞逃逸监控和杀灭机率大，可用于人 NB 免疫活性异种移植瘤模型的建立。本实验采用 4 月龄免疫系统尚未健全的 SD 大鼠，成功建立人 NB 免疫活性异种移植瘤模型，相比于 C57BL/6j 系小鼠，SD 大鼠模型动物肿瘤体积大，取材较容易，并可多次取材。本实验构建肾上腺区人 NB 免疫活性 SD 大鼠移植瘤模型成瘤率 100%，具有成瘤率高和稳定性好等优点，为研究其生物学特性、分化消退机制和治疗打下良好的基础。

Lindskog 等[8]利用 MRI 监测裸鼠的皮下移植 NB 生长情况，并测量肿瘤的体积，能较好地做出纵向监测；但 MRI 监测成本高、耗时长等缺陷限制了其在动物实验中的应用。随着超声工程学的发展和超声成像技术的不断进步，使分辨率大大提高，加上无创伤、操作简便、操作时间短及费用低廉等特点，近年来日益受到广泛关注。本研究利用 14 MHz 高频超声线阵探头，动态观察 4 月龄 SD 大鼠肾上腺区人 NB 异种移植瘤模型，结果表明 5~13 d 肿瘤呈快速生长，1 月后肿瘤有消退和坏死的趋势，利用该模型进行实验研究时宜在 1~2周进行，以免肿瘤坏死或转移影响实验结果。接种后 2 周内，肿瘤快速生长，移植瘤与宿主免疫系统达到一个平台期[7]。临床上人体内 NB 存在自然消退现象，高度恶性的 NB 可转变为良性的神经节细胞瘤，其发生机制尚不清楚。本实验 SD 大鼠 17 d 后肿瘤开始逐渐缩小甚至消失，有学者认为可能与大鼠免疫系统逐渐发育成熟，参与排斥反应有关[9]。超声测量结果与肿瘤实体标本测量结果呈高度正相关，监测 SD 大鼠肾上腺区移植瘤的大小准确，能清晰地显示荷瘤鼠的 NB 结节内部回声变化，且能获得血流供应情况，为移植瘤的生物学特征、分化消退和疗效提供更多的信息，是一种较理想的监测肿瘤生长的手段。本实验病理组织检测部分仅为常规HE染色，其他检测方法如免疫组化检测 NB 特异性标志物的表达还有待于研究，以探讨其病理机制。在此基础上可增加样本量，并描绘出肿瘤的生长曲线，计算肿瘤体积倍增时间和生长率，为药物及局部瘤体的物理（如 HIFU 治疗）干预治疗提供可靠的监测手段。

4 结 论

本试验中超声检查能确定肿瘤位置，测定肿瘤径线的大小，判断肿瘤为实性或伴有囊性及钙化，了解周围脏器有无受累。超声可以为动物模型的监测提供方便、快捷的评估，在

基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.016

小剂量紫杉醇联合重组人血管内皮抑素对乳腺癌 MCF-7 细胞抑制作用的实验研究

饶明月，张幸平，程　丽，周涛琪，杨　敏，何阳科
（重庆医科大学附属第一医院肿瘤科，重庆　400016）

【摘　要】目的：观察小剂量(40 μg/ml)紫杉醇(Paclitaxel，PTX)联合重组人血管内皮抑素(Recombinant human endostatin，rh-ES)对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长及其血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor，VEGF)表达的抑制作用。方法：实验分为对照组(A 组)、PTX 组(B 组)、rh-ES 组(C 组)及 PTX+rh-ES 组(D 组)。用细胞计数板计数法测定各组药物作用于 MCF-7 细胞 24 h 后的细胞存活数并计算细胞抑制率。免疫细胞化学 SABC 法检测各组 VEGF 蛋白表达，RT-PCR 法检测各组 VEGF mRNA 表达。结果：D 组的细胞抑制率明显高于 C 组(P=0.002)，但与 B 组比较无统计学差异(P=0.57)。D 组的 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达较其余 3 组明显减少，差异具有统计学意义(P<0.05)。细胞抑制率的增加与 VEGF 表达减少之间具有线性相关性(r=0.564，P<0.001)。结论：小剂量 PTX 与 rh-ES 联合应用可明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长及其 VEGF 表达，提示两者联用在抑制肿瘤血管生成方面具有协同作用。

【关键词】乳腺癌；紫杉醇；抗血管生成化疗；重组人血管内皮抑素；血管内皮生长因子
【中国图书分类法分类号】R737.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-12

Inhibitory effect of low-dose paclitaxel combined with recombinant human endostatin on breast cancer MCF-7 cell line

RAO Ming-yue，ZHANG Xing-ping，CHENG Li，ZHOU Tao-qi，YANG Min，HE Yang-ke
(*Department of Oncology，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*：To observe the low-dose(40 μg/ml) paclitaxel(PTX) combined with recombinant human endostatin(rh-ES) in inhibiting the growth of human breast cancer MCF-7 cell line and suppressing the gene expression of vascular endothelial growth factor(VEGF). *Methods*：The experiment had four groups：control group(group A)，group PTX(group B)，group rh-ES(group C) and group PTX + rh-ES(group D). It enumerated the surviving MCF-7 cells after 24 h，which were treated with the four

作者介绍：饶明月(1986-)，男，硕士，
研究方向：肿瘤临床及基础研究。
通信作者：张幸平，女，教授，Email:zhang.xinping@163.com。

对大鼠等小动物的无创性检查上具有其独特的优势，对评价 SD 大鼠肾上腺区人 NB 异种移植瘤造模有较高价值。

参　考　文　献

[1] Teicher B A.Tumor models for efficacy determination[J].Mol Cancer Ther，2006，5(10)：2435-2443.

[2] Pastorino F，Loi M，Sapra P，et al.Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38 (EZN-2208)，a novel topoisomerase I inhibitor[J].Clin Cancer Res，2010，16(19)：4809-4821.

[3] 鹿洪亭，董　蒨，高　强，等.神经母细胞瘤细胞系裸鼠转移模型及局部皮下荷瘤模型的建立[J].中华肿瘤杂志，2010，32(4)：258-261.

[4] 郝希伟，董　蒨，鹿洪亭，等.神经母细胞瘤荷瘤鼠模型建立的实验研究[J].中华小儿外科杂志，2005，26(7)：372-375.

[5] Krieger-Hinck N，Schumacher U，Müller A，et al.The effect of the PPAR-gamma agonist rosiglitazone on neuroblastoma SK-N-SH cells in a metastatic xenograft mouse model[J].Oncol Res，2010，18(8)：387-393.

[6] 廖美焱，周云峰，冯茂辉，等.高致瘤性人肺癌裸鼠模型的建立[J].中华实验外科杂志，2009，26(9)：1216-1217.

[7] 何文飞，何大维，马　超，等.人神经母细胞瘤免疫活性小鼠移植瘤模的建立[J].重庆医科大学学报，2010，35(11)：1627-1629.

[8] Lindskog M，Kogner P，Ponthan F，et al.Noninvasive estimation of tumour viability in a xenograft model of human neuroblastoma with proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS)[J].Br J Cancer，2003，88(3)：478-485.

[9] 何文飞，何大维，马　超，等.C57BL/6j 小鼠异种移植瘤模型的建立[J].中华实验外科杂志，2011，28(1)：145-147.

（责任编辑：冉明会）