基础研究 文章编号:0253-3626(2011)09-1025-04

快速微创建立弥漫型兔 VX2 肺癌模型及其生物学行为研究

刘 宇[1],兰作平[1],张福军[2],李 伟[1],程训官[1],王 杰[1],何 亚[1],余 瑜[1]
(1. 重庆医科大学药物化学与生物材料研究室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索一种快速、微创且能大批量制作弥漫型兔 VX2 肺癌模型的方法,为展开具有肺靶向抗肺癌药物及其制剂的研究奠定基础。方法:采用微创胸腔穿刺接种肿瘤的方法,将兔 VX2 肿瘤组织块移植于兔的右肺。采用螺旋 CT 技术检测 VX2 肿瘤在兔肺部的生长情况,并结合大体解剖及组织病理学检查评价模型的成功率以及观察肿瘤生长、转移等生物学行为。结果:该模型成功率为 100%。VX2 肿瘤在兔右肺的成瘤时间为 5~10 d;其右胸腔内播散转移时间为 20~25 d,左肺、肝及肾等转移时间为 30~34 d,荷瘤兔中位生存期为 32 d。结论:该方法具有简便快速、易于大批量制作、术后不良反应轻微以及模型成功率高等优点,利用本方法所制得的兔 VX2 肺癌模型与人类原发性肺癌有着相似的生物学行为,这可满足肺靶向抗肺癌药物及其制剂药效学研究之需。

【关键词】微创;弥漫型肺癌;VX2 肿瘤;动物模型
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-23

Study on establishment of rabbit VX2 diffuse lung cancer model with minimally invasive surgery and biological behavior of the tumor

LIU Yu[1], LAN Zuo-ping[1], ZHANG Fu-jun[2], LI Wei[1], CHENG Xun-guan[1], WANG Jie[1], HE Ya[1], YU Yu[1]
(1. Department of Pharmacochemistry and Biomaterial; 2. Department of Oral-maxiuofacial, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore a minimally invasive surgery technique for establishing rabbit VX2 diffuse lung cancer model, so as to lay a foundation for the evaluation of the effect of lung-targeting anticancer drugs. *Methods*: The VX2 tumor blocks were implanted into the pulmonary parenchyma of rabbit via pleuracentesis. Spiral computer tomography, gross anatomy and histopathology examination were performed to evaluate the success rate of the model and the biological behavior of the tumor. *Results*: The rabbit VX2 diffuse lung cancer model was established successfully, and the success rate was 100%. The tumor formed in right lung from 5 to10 days. Right thoracic cavity was invaded by tumor from 20 to 25 days, and the metastasis was observed in left lung and liver or kidney from 30 to 34 days. The median survival time of rabbits was 32 days. *Conclusion*: Tumor blocks implantation via pleuracentesis is a simple and effective method to make rabbit VX2 diffuse lung cancer model with a high success rate. The adverse effect of the operation is mild. The VX2 tumor and human primary lung cancer have similar features, so the model is suitable for evaluating the effect of lung-targeting anticancer drugs.

【Key words】minimally invasive surgery; diffuse lung cancer; VX2 tumor; animal model

目前,在全球范围内,肺癌的发病率和死亡率已位居各种恶性肿瘤的首位,据 WHO 统计,全世界每年有超过 120万新增肺癌病例,死亡约 110 万人。自 20 世纪 70 年代以来,我国的肺癌发病率及死亡率一直呈上升趋势。从 2000 年至 2005 年,我国肺癌男性患者从 26 万增至 33 万,女性从 12万增至 17 万。据 WHO 预测,到 2025 年,我国每年新增肺癌病例将超过 100 万。

在肺癌的各种治疗手段中,化学治疗占有极其重要的地位,但目前用于肺癌治疗的药物及其制剂均不同程度地存在对胃肠道、骨髓、神经、肝、肾等组织器官的毒副作用,从而极大地限制了药物及其制剂的使用和疗效的发挥。为了提高抗肺癌药物及其制剂的治疗作用,降低其毒副作用,肺靶向抗肺癌药物及其制剂研究日益受到人们的关注,而理想的肺癌动物模型无疑是开展此项研究工作的重要工具。

作者介绍:刘 宇(1974-),女,主管药师,硕士,研究方向:生物制药与生物医用材料。
通信作者:余 瑜,男,教授,Email:yuyu3519@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81172097);国家科技重大专项资助项目(编号:2010ZX09401-306-1-1);重庆医科大学重点资助项目(编号:XBZD201004)。

就实验研究的肺癌动物模型而言，主要可分为诱发型和移植型肺癌动物模型。其中前者能较好地模拟人类吸入粉尘、烟尘以及挥发性化学致癌剂致后自然发生肺部肿瘤的过程，其不足之处在于肿瘤的发生时间和部位不易控制；而后者能较好地保持原肿瘤细胞的生物学特性，建模的重现性和稳定性好，因而被广泛采用。用于移植型肺癌模型的实验动物主要有鼠、兔和犬等，其中采用鼠建模的国内外报道较多[1-3]，用犬建模的国外也有报道[4]，但用鼠或犬建模主要存在异体移植物的免疫排斥反应、建模过程复杂、成模率不高且难以大规模制作等问题。相对于鼠和犬，兔拥有自身 VX2 肿瘤细胞株，该细胞株具有高侵袭性和高转移性的特点，其形态学和生物学特征与人类肿瘤相似[5]，且对兔无免疫原性，具有建模成功率高等优点，因而 VX2 肿瘤细胞株被广泛应用于兔的肺部、肝脏、皮肤和软组织等部位制作肿瘤模型[6-11]。

据文献报道[9-11]，兔 VX2 肺癌动物模型的制作方法主要有 VX2 细胞悬液注射法、VX2 组织块悬液注射法和 VX2 组织块埋植法等。前 2 种方法将 VX2 肿瘤细胞悬液或组织块悬液直接注射到兔肺部，肿瘤在兔肺部呈弥漫型生长，但当手术中拔针时容易导致肿瘤细胞悬液从接种部位溢出，极易造成广泛胸腔内种植。组织块埋植法采取开胸手术，将 VX2 组织块直接缝合到兔肺右叶，该方法肿瘤接种率高、易形成单一局部肿瘤，不发生邻近组织种植，但对实验人员手术技能要求高，兔容易发生气胸而导致死亡，不宜于快速且大量制作兔肺癌模型。

综上所述，本研究拟采用胸腔微创穿刺法，将经胶原蛋白海绵保护的 VX2 瘤组织块接种于兔的右肺，构建弥漫型兔 VX2 肺癌模型，同时对荷瘤兔的病理过程及肿瘤生物学行为进行研究，以期得到模拟人类原发性肺癌的动物模型，为肺靶向抗癌药物及其制剂的药效学及治疗学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西兰大白兔 20 只，4~6 月龄，2.5~3.0 kg，雌雄不限，由重庆医科大学实验动物中心提供[证号：SCXY（渝）2007-0001；SYXK（渝）2007-0001]；VX2 荷瘤种兔由重庆医科大学医学超声工程研究所提供。

1.2 实验器材及药品

18G 硬膜外穿刺针配相应的平头针芯（上海普益医疗器械有限公司）；无菌器械包；SW-CJ-2FD 型洁净工作台（苏州苏净安泰公司）；lightspeedVCTct99 型 64 层螺旋 CT 机（美国通用电器公司）；XS-800i 型血细胞分析仪（日本 SYSMEX 公司）；无菌胶原蛋白海绵（北京科劳得生物制品技术开发有限公司，批号 20090618）；聚维酮碘溶液（山东利尔康消毒科技有限公司，批号 20090409B）；头孢拉定注射剂（山东鲁抗医药股份有限公司，批号：C100411）；3%戊巴比妥溶液（本研究室配制，批号 20100222）。

1.3 兔 VX2 肺癌模型的建立

荷 VX2 种兔用 3%戊巴比妥溶液（30 mg/kg）经耳缘静脉注射麻醉后，无菌操作摘取肿瘤，置于生理盐水中。将肿瘤制成大小约 1 mm^3 肿瘤块，取 1 肿瘤块用新鲜生理盐水漂洗 2 次后，前后各用 1 条长约 0.5 cm 的胶原蛋白海绵条夹成“三明治”状，再推入穿刺针针管中部，备用。

实验兔用 3%戊巴比妥溶液（30 mg/kg）经耳缘静脉注射麻醉后，右胸部脱毛，仰卧固定于手术台上，手术野常规消毒铺巾。取备用穿刺针，以兔右胸第 4~5 肋间肩胛骨前缘为穿刺点作胸腔微创穿刺，待针尖刺入肺组织后，固定穿刺针鞘，以平头针芯推入瘤块后拔针，用无菌纱布压迫穿刺点约 30 s 后结束手术。术后实验兔接受肌肉注射头孢拉定（0.25 g/d×3 d），以预防感染。

1.4 荷瘤兔病理过程及肿瘤生物学行为观察

实验兔接种肿瘤后，每天定量给予标准饲料，逐日观察、记录动物进食、活动、呼吸情况，每 3 d 测量动物体重及体温各 1 次，并于肿瘤接种前 1 d、接种后第 4 天及 CT 影像确认肺内有肿瘤生长后分别经耳缘静脉采血做血常规检查。

实验兔随机分为 2 组，第 1 组 6 只，第 2 组 14 只。第 1 组 6 只实验兔于接种肿瘤后第 10、30 天分别接受肺部 CT 平扫，扫描层厚、层间距均为 5 mm，扫描参数为：电压 120 kV，电流 240 mA，螺距 0.516，转速 0.6 s/r，视野 90~140 mm，矩阵 512×512，肺窗 W 1 200 HU，L 400 HU，纵隔窗 W 300 HU，L 25 HU。第 2 组 14 只实验兔分别于接种肿瘤后第 5、10、15、20、25、30、35 天各随机处死 2 只，进行大体解剖，并以福尔马林液固定双肺，石蜡包埋，作组织切片，HE 染色后作肺部肿瘤组织病理学检查。第 1 组 6 只实验兔继续饲养至其自然死亡后进行大体解剖和组织病理学检查。

2 结 果

2.1 兔肺部成瘤率及其模型成功率

肿瘤接种手术平均耗时为 13 min，全部实验兔于麻醉后 2.5~3 h 苏醒，进食、活动正常，没有动物因手术操作死亡。20 只实验兔定期处死或自然死亡后经大体解剖确认全部有肺内肿瘤生长，肺部成瘤率及模型成功率均为 100%。

2.2 兔 VX2 肺癌的 CT 影像

实验兔于接种VX2肿瘤后第10天接受肺部CT平扫，可见兔右下肺局部软组织密度影像，CT 值为（40.65±5.11）Hu，肿瘤结节边界清楚，密度均匀，见图 1。实验兔于接种 VX2 肿瘤后第 30 天接受肺部 CT 平扫，可见兔双侧肺实质遍布软组织密度影像，肿瘤结节明显增大，向胸腔突出生长，与心缘分界不清，结节边缘出现毛刺，内部密度不均匀，见图 2。

2.3 大体解剖结果

接种 VX2 肿瘤的实验兔大体解剖可见，肿瘤结节在兔右肺形成的时间为 5~10 d，肿瘤生长早期为单一或数个散在米粒状结节，结节呈灰白色，无包膜，质地较硬。肿瘤生长后期，结节呈弥漫型生长，部分融合成片状，表面呈鱼肉样，见图 3。

表 1 兔肺部肿瘤的生长转移情况

动物编号	解剖时间（d）	肺部肿瘤生长方式	右胸腔转移	右胸腔积液	左肺转移	双侧胸腔积液	心包积液	肝肾转移	脑、骨转移	死亡原因
01-CT	21	右肺弥漫	+	+	-	-	-	-	-	呼吸衰竭
02-CT	32	双肺弥漫	+	/	+	+	+	-	-	呼吸衰竭
03-CT	45	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	呼吸衰竭
04-CT	28	双肺弥漫	+	/	+	+	+	-	-	呼吸衰竭
05-CT	46	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	呼吸衰竭
06-CT	32	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	呼吸衰竭
07	5	右肺单一	-	-	-	-	-	-	-	处死
08	5	右肺单一	-	-	-	-	-	-	-	处死
09	10	右肺单一	-	-	-	-	-	-	-	处死
10	10	右肺散在	-	-	-	-	-	-	-	处死
11	15	右肺散在	-	-	-	-	-	-	-	处死
12	15	右肺散在	-	-	-	-	-	-	-	处死
13	20	右肺散在	-	-	-	-	-	-	-	处死
14	20	右肺弥漫	+	+	-	-	-	-	-	处死
15	25	右肺弥漫	+	+	-	-	-	-	-	处死
16	25	双肺弥漫	+	+	+	+	-	-	-	处死
17	30	双肺弥漫	+	/	+	+	-	-	-	处死
18	30	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	处死
19	35	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	处死
20	35	双肺弥漫	+	/	+	+	+	+	-	处死

备注："右肺单一"指肿瘤细胞仅在右肺一叶形成单一结节；"右肺散在"指肿瘤细胞形成多个结节，但仍局限在右肺一叶生长；"右肺弥漫"或"双肺弥漫"指肿瘤细胞形成的结节数量众多，且漫延到右肺或双肺各肺叶

细血管生成，即为肿瘤血管形成期；接种后第 20~25 天，肿瘤膨胀性生长，瘤体的生长快于血管的生长，即为肿瘤血管稳定期，此时瘤体中心因缺血而坏死，肿瘤开始侵犯周围邻近组织；接种后第 30~34 天，肿瘤逐渐充满整个胸腔，瘤体大片坏死，形成囊腔并伴有双侧胸腔积液以及心包积液，同时出现远处转移，此为肿瘤血管退化期。

本文所构建的兔 VX2 肺癌模型，肿瘤结节在肺部呈弥漫型生长，癌组织沿肺泡蔓延扩展，其病理过程，肿瘤生长转移方式以及肿瘤病理组织学特征等方面与人类支气管肺癌的弥漫型或原发性肺泡细胞癌极为相似，这为肺靶向抗癌药物及其制剂的药效学及治疗学评价奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] March T, Marron-terada P, Belinsky S. Refinement of an orthotopic lung cancer model in the nude rat[J]. Vet Pathol, 2001, 38(5): 483-490.

[2] Howard R, Chu H, Zeligman B, et al. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers[J]. Cancer research, 1991, 51(12): 3274-3280.

[3] McLemore T, Liu M, Blacker P, et al. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice[J]. Cancer research, 1987, 47(19): 5132-5140.

[4] Kamran A, Madoff D, Gupta S, et al. Development of a large animal model for lung tumors[J]. Journal of vascular and interventional radiology, 2002, 13(9): 923-928.

[5] Kidd J, Rous P. Cancer deriving from the virus papillomas of wild rabbits under natural conditions[J]. The journal of exper-imental medicine, 1940, 71(4): 469-494.

[6] 阮祥燕，顾美礼，王智彪. 兔外阴 VX2 鳞癌模型的建立及其生物学行为研究[J]. 中华临床医药，2000，1(3)：24-27.

[7] 张景峰，王仁法，张玉琴，等. 兔大腿 VX2 软组织肿瘤模型的建立与介入放射学研究[J]. 中国临床医学影像杂志，2005，16(4)：218-220.

[8] Yoon C, Chung W, Park J, et al. Transcatheter arterial chemoembolization with paclitaxel-lipiodol solution in rabbit VX2 liver tumor[J]. Radiology, 2003, 229(1): 126-131.

[9] 刘德森，倪才方，秦 涌，等. 兔 VX2 肺癌模型的建立和螺旋 CT 评价[J]. 介入放射学杂志，2007，16(4)：266-268.

[10] 马连君，张向华，祁彦君. 兔 VX2 肺癌模型的建立及评价[J]. 解放军医学杂志，2007，32(9)：916-918.

[11] 薛 强，屈 谦，杜永洪，等. 兔 VX2 肺癌模型的建立及生物学特性观察[J]. 中华实用外科杂志，2001，18(5)：478.

[12] 肖 杭，杨勇年，唐玲芳，等. 吸收性明胶海绵和止血绫在家兔肌肉、血管与脑组织中吸收性观察[J]. 中国生化药物杂志，1997，18(4)：200-202.

[13] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.

（责任编辑：冉明会）