维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0541-05

兔 VX2 肺癌(鳞癌)模型的建立及鉴定

张会军,王莎莉

(重庆医科大学基础医学院生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨兔 VX2 肺鳞癌模型的建立方法及其生物学特性。方法:自身接种传代保存的 VX2 肿瘤组织块,移植到健康兔肺内,建立兔肺鳞癌模型。通过肺部 X 片观察肿瘤生长情况,待其不同时间死亡后进行大体标本肺、心、肝、肾、脑和淋巴结形态学观察。结果:(1)建模成功率为 100%。(2)形态学显示肺部肿瘤呈弥漫性分布,大小不等,呈结节样,表面鱼肉样。接种肿瘤 6d 时除脑组织外,心脏、淋巴结、肝脏和肾脏均见明显的转移瘤,并呈侵润性生长。(3)病理组织学和免疫组化证实为来源于上皮组织的鳞状细胞癌。结论:采用组织块移植法建造兔 VX2 肿瘤动物模型,不仅具有方法简单、无感染和成瘤率高的特点,而且 VX2 肿瘤的生物学行为与人类肿瘤相似,恶性程度高,对于大型动物建立肺癌模型具有较高的指导意义。

【关键词】VX2;肺癌;模型

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-10

Establishment and evaluation of VX2 lung cancer model(squamous cancer) in rabbits

ZHANG Hui-jun, et al

(*Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the establishment method and bionomics of VX2 lung cancer models in rabbits. *Methods*: VX2 tumor fragments, preserved from autoinculation rabbits into the lungs of healthy rabbits to establish the models, and then the tumorous growth was observed through the imageology and the morphology of the samples including the lung, the cardia, the liver, the kidney, the brain and lymphatic gland after death at different time. *Results*: (1) the achievement ratio of modeling was 100%。(2)The VX2 tumor discovered evidently in lung were displayed for diffuse, inequality of size, tuberculum and fish surface. It was visible that metastatic tumor , which were invasion, were discovered evidently in all six organs except for the brain after vaccination for six days. (3)Squamous cell carcinoma, which was originated from epithelial tissue, was confirmed through pathologic histology and immunohistochemistey. *Conclusions*: The construction of VX2 tumor animal models in rabbits by applying organism fragments not only is simple in method, free from infection and high in achievement ratio but also the biological behaviour of VX2 is similar to human tumors, with high level of malignancy. This study provides valuable guidance for the construction of the large animal models of the lung cancer.

【Key words】VX2; Lung cancer; Model

VX2 肿瘤是实验室常用的肿瘤之一,它是一种来源于 shope 病毒所诱发的乳头瘤恶变后经过兔传代而形成的鳞状上皮细胞恶性肿瘤[1],常用于模拟人类恶性肿瘤,多用于肿瘤动物模型制作。近年来,国内外有大量的 VX2 肿瘤种植于肝、肺、脑、肾、肌肉、骨、皮肤、膀胱、等部位,建立了相应的原位肿瘤动物模型[2~7]。其中在建立肺癌模型时,多采用悬液注射法,但在实验过程中暴露出一些不足之处。因此,本文就较新的肿瘤组织块移植法建立动物模型进行较详细的介绍,并观察其生物学特性,同时也为以后的动物模型科学研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康新西兰大白兔 12 只,雌雄不限,3~5 个月龄,体重

作者介绍:张会军(1980-),男,硕士,
研究方向:中药药理与中药抗肿瘤。
通讯作者:王莎莉,女,教授,E-mail:YPWang@public.cta.cq.cn。
基金项目:重庆市科委攻关项目〔编号:渝科发计字(2005)50 号文〕。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.5～2.5kg,由重庆医科大学实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(渝)2002001]。

VX2(鳞癌)实体肿瘤组织块,购于重庆医科大学超声研究所。

1.2 方法与步骤

无菌操作下从荷瘤种兔肝脏上取下实体 VX2 肿瘤,并剪切成 1mm³ 左右的小组织块放入无菌的生理盐水中待用。

将已脱毛的麻醉兔(速眠新 0.1～0.2ml/kg),在无菌条件下沿右胸 3～4 或 4～5 肋间做 2～3cm 的切口,钝性分离肌肉及软组织,剪断 2cm 肋骨,暴露肺组织。显微镊轻轻夹出右肺下叶(此操作一定要认真仔细,不能伤到肺组织),眼科剪在肺尖部剪开一约 0.1～0.3cm 的切口,将准备好的 VX2 肿瘤组织块放入其中。然后根据解剖结构逐层缝合伤口(注意一定要缝合密实,尽量不要漏气,防止术后发生气胸)。当肌肉缝合完毕时立刻用 10ml 的无菌注射器刺入已缝合的胸腔内,开始往外抽气,直到抽不动,说明胸腔内已成负压即实验兔已经恢复正常呼吸。最后用 1 号线和棱针缝合皮肤并用酒精棉球再次消毒手术区域。

术后每只兔注射 20 万 U 的青霉素抗感染。

1.3 实验设计

将 12 只实验兔编号,随机分为 2 组,实验组(6 只)进行 VX2 肿瘤移植;空白对照组(6 只)不进行处理;分别观察 2 组兔的肿瘤生长情况。

1.4 鉴定指标

1.4.1 一般情况观察 每日定时观察记录实验兔的体重、呼吸、精神、活动、毛色、四肢以及粪便等情况的变化。

1.4.2 肺部 X 片观察 在手术后的第 5、10、15d 给兔拍摄肺部正位 X 片(7cm×5cm)观察肿瘤的生长变化情况。

1.4.3 病理学观察

1.4.3.1 大体标本观察 待模型兔不同时间自然死亡后,立即解剖取材肺组织,观察肿瘤的大小、形状、色泽、质地以及是否发生转移并摄片。

1.4.3.2 组织学观察 待模型兔自然死亡后立即取动物的心、肝、肺、肾、脑和淋巴结等组织,常规病理切片(HE 染色)组织学观察。

1.4.4 免疫组织化学染色 应用抗细胞角蛋白(CK)多克隆抗体,对肿瘤组织病理切片进行免疫组织化学染色,光学显微镜下观察。

1.5 统计学方法

实验数据均以均值±标准差表示,组间比较采用两样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般情况及肿瘤表现(图 1,表 1~3)

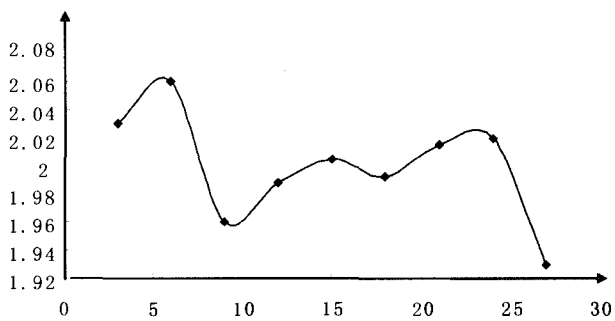


图 1 模型兔平均体重变化图(kg/d)

2.2 肺部 X 片

从术后所拍摄的 X 片可以看出,与对照组的正常兔相比,模型兔的肺部有轻微的肺纹理增多和炎性表现,而且在第 5、10、15d 的 X 片上可以看到散发的、大小不同、形态各异的高密度白色阴影,从而证明 VX2 肿瘤已经存活并发生转移(见图 2)。

2.3 病理学观察

表 1 一般情况表现(n=6)

时间(d)	精神 活动度 呼吸 大小便
1～7	眼睛有神,发育良好;活动敏捷,反应灵敏;呼吸节律规则,频率正常;大小便形态色泽正常
8～14	体态丰满,被毛光亮,活动自如,食欲良好,呼吸正常
15～21	体重略有下降,个别兔稍有脱毛,活动度开始下降
22～28	躯体消瘦,触摸兔的骨感很明显,精神状态差,在死亡前 1、2d 出现明显的喘式呼吸、鼻翼煽动、唇鼻紫绀和呼吸困难,且鼻部未见分泌物

表 2 肿瘤特点及生存期

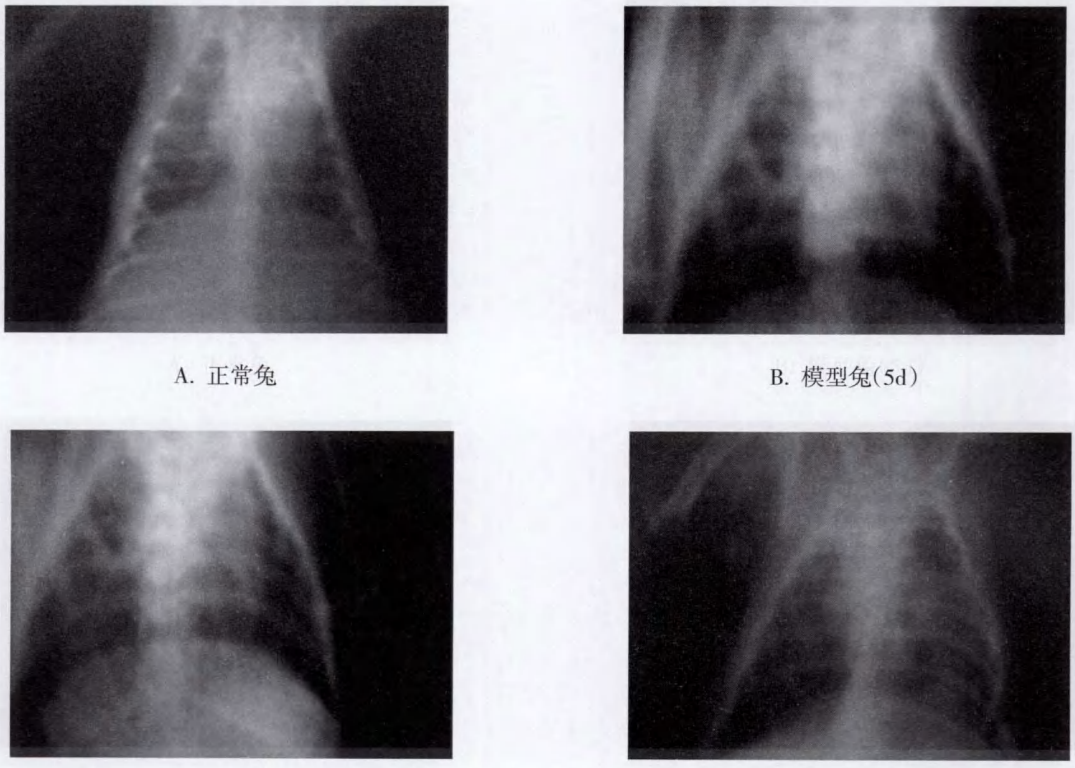
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号
瘤重(g)	148	150	160	132	125	145
直径(mm)	1～9	1～11	2～10	1～15	1～9	1～11
生存期(d)	23	24	23	25	26	25

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 肿瘤转移情况

	n	肺	肝	肾	心	脑	淋巴结
肿瘤组	6	+++	++	++	++	-	+
对照组	6	-	-	-	-	-	-

注:"+++"表示肿瘤广泛转移;"++"表示肿瘤部分转移;"+"表示肿瘤少量转移;"-"表示无转移。



A. 正常兔　B. 模型兔(5d)　C. 模型兔(10d)　D. 模型兔(15d)

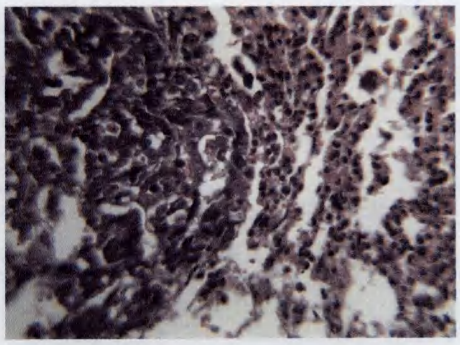
图 2 模型兔与对照兔肺部 X 片

2.3.1 大体标本观察 模型兔不同时间死亡后解剖发现,胸部表面伤口愈合处肿瘤逐渐增大,形态比较规则,形成一较明显的凸起,与周围分界明显。大体标本切开后发现肿瘤呈弥漫性分布,大小不等,呈圆形、椭圆形或不规则形的结节样,部分病灶融合,质地中等,表面呈鱼肉状。肺叶上可见大小均匀的白色点状转移瘤,有的模型兔肿瘤呈高度侵润性生长,大体标本已经无法辨认肺组织及周围组织,而且可以观察到胸壁、气管和支气管、胸膜等处有大小不等的白色转移瘤。有的模型兔的心包膜和肝叶上也见到非常明显的白色、圆形或不规则形、大小不等(0.1 ~ 2cm)的颗粒状转移瘤,肾脏大体为突出于肾脏表面的结节样包块,大小不等,圆形或不规则形,与周围分界清楚,有完整包膜形成,质地较硬,切面呈鱼肉样。从大体上未能看出脑和淋巴结上有明显异常,分析可能与实验兔的个体差异、生物学特性以及对肿瘤的耐受性和易感性有关。

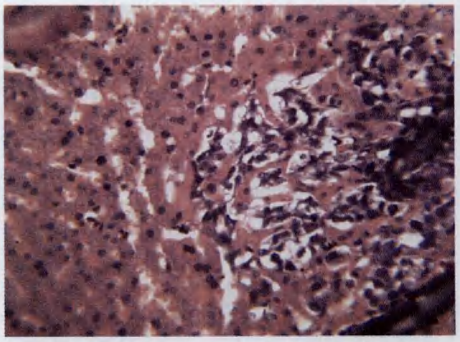
2.3.2 组织学观察 与正常肺组织比较,VX2 肿瘤细胞紧密排列呈实体巢状,与间质界限清楚,瘤细胞大小和形态不一,细胞核染色较深,包浆丰富,淡红染色,染色质粗;相邻瘤细胞间未见明显的细胞间桥和角化珠,说明是中低分化的鳞癌可能性较大;核膜清楚,核仁的大小不一,形态不规则,染色浓淡不匀,瘤细胞呈明显的异性性并见较多的核分裂像,病理分型证实为来源于上皮组织的鳞癌(图 3-A)。

肝、心、淋巴结和肾的转移瘤细胞,呈侵润性生长,堆积状增生,聚集成团,核染色质深,包浆粉红

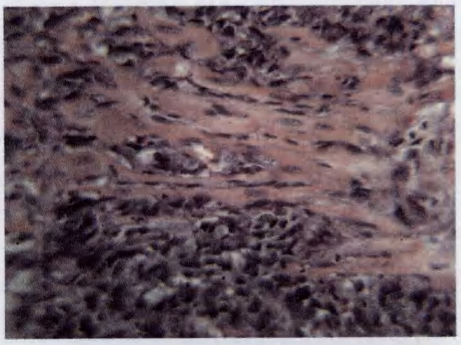
维普资讯 http://www.cqvip.com



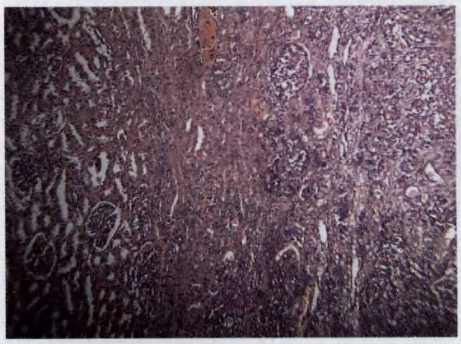
A. 肺癌,HE 染色(×400)



B. 肝转移癌,HE 染色(×400)

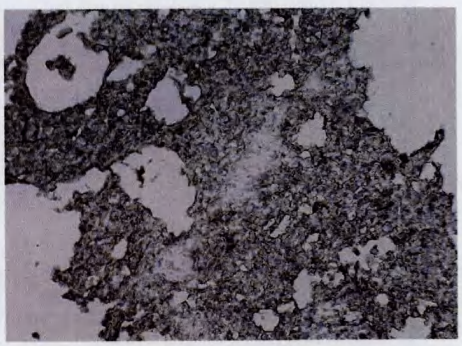


C. 心肌转移癌,HE 染色(×400)

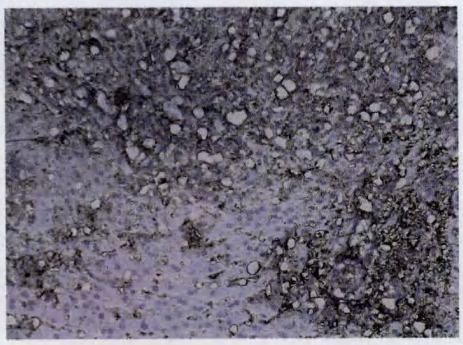


D. 肾转移瘤,HE 染色(×400)

图 3 VX2 肿瘤组织学表现



A. 肺组织免疫组织化学染色阳性(×400)



B. 肝组织免疫组织化学染色阳性(×400)

图 4 抗细胞角蛋白(CK)免疫组织化学表现

染色,瘤细胞异型性明显,大小不等,形状不一,大多呈梭形或多角形,并可见多核瘤巨细胞,核大,胞质少,核浆比例增大,胞核着色深。其中肝转移瘤与正常组织界限较清,肝小叶被破坏,结构紊乱(图 3-B)。心包膜转移瘤可见包膜被癌组织大片状侵润,与周围界限不清,心肌结构被破坏,癌细胞染色较深(图 3-C)。淋巴结内瘤细胞与周围组织分界不清,淋巴小结结构紊乱,无法辨认。肾脏的肾小球被癌细胞广泛侵润,界限清晰,结构清楚,呈多个境界清楚的圆形结节,瘤结节周围无纤维性包膜(图 3-D)。脑组织的病理切片中未发现明显的肿瘤存在。

2.3.2 免疫组织化学观察 细胞质中可以观察到抗细胞角蛋白(CK)免疫组织化学染色阳性(图 4-AB)。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

VX2 肿瘤是得到广泛承认的兔可移植性肿瘤，建株于 1940 年[8]而后由美国 Cornell 医学院 Rous 等[9]于 1947 年在第 4 次国际癌症会议上报告并得以承认。此肿瘤是由家兔皮肤乳头状瘤经Shope 病毒诱导恶变后经 72 次移植传代培养而形成的一种间变性鳞癌，该瘤株具有诱导时间短，种植成功率高，生物学性质稳定，具备血管生成能力等特点，因而可重复性较高[10]。因此 VX2 肿瘤是一种较稳定的可移植的肿瘤细胞株，可接种到兔的肝脏、肾脏、肺脏、肌肉、皮肤等部位制成原位肿瘤动物模型。

目前，在我国此种肿瘤较少，仅部分地区和院校由国外引进后在新西兰大白兔自身身上传代保存至今。因此对建立 VX2 肺癌模型的研究也比较少，其中薛强等[11]研究比较了建立 VX2 肺癌模型的 3 种不同方法，发现悬液注射法造模易播散性生长，闭式引流法易感染和发生并发症，虽然均有较高的成瘤率，但不能反映原位肿瘤的特性，而且使动物的生存时间降低，暴露很多不足之处。吴安乐等[12]采用Ⅳ型胶原酶解离释放细胞，经细胞培养后制成单细胞悬液，经耳缘静脉注射建立转移性肺癌模型，成功率尚可，但是方法较繁琐，要求控制癌细胞数量以及易发生感染。而本实验中所采用的组织块埋植法在整个手术过程皆按照严格的无菌操作进行，且在术后直接缝合切口，同时采用无菌注射器及时抽出胸腔内残余的气体，立即恢复动物的自主呼吸，基本不会造成动物的死亡。而且模型兔在生长过程中体重整体上呈下降趋势，在死亡前 1、2d 饮食下降，呼吸系统发生非常明显的改变，主要是喘式呼吸、鼻翼煽动和鼻唇紫绀，说明 VX2 肿瘤在实验兔体内能够较好的存活与生长。脑组织中未发现肿瘤存在，耿左军等[13]研究发现肺鳞癌不如腺癌容易发生转移，可能是其原因之一。所以该法不仅成瘤率较高，稳定性强，而且方法简单、容易控制、不易发生感染，可以提高动物平均生存时间。由于早期只局限于肺部生长，肿瘤生长良好，容易发生转移，且生物学特性与人类肿瘤具有一定程度的相似性。因此，本实验所采取的方法建模是研究肺部肿瘤非常理想的动物模型，为研究较大的动物造模提供了一定的理论指导和参考意义，也为人类肺部肿瘤疾病的诊断、治疗提供了实验研究的科学基础。

综上所述，在肿瘤的实验研究中，适用的肿瘤动物模型应当在发生部位，组织学类型、病因、发病机制等方面尽量模拟所需研究的人类肿瘤，本实验通过肿瘤组织块移植法能够成功的建立 VX2 肺癌动物模型，主要是因为 VX2 瘤株在其生化学、形态学和生物学行为上与人类恶性肿瘤具有较高的相似性，而且不会产生特异性的抗体，能较好的体现原位癌的特点。因此，本模型的成功建立必将对肺癌动物模型的建立提供科学的指导意义、对基础医学的研究和发展与对人类肺癌疾病的防治研究起到一定的促进作用。

参 考 文 献

[1] Kidd JG, Rous P. Cancer deriving from virus papillomas of wild rabbits under natural conditions[J]. J Exp Med, 1940; 71(4): 469-494.

[2] LING R, CHEN JH, YAO Q, et al. A metastatic breast cancer model in rabbit: tumor growth and metastasis[J]. China oncology, 2005; 15(1): 9-11.

[3] 康立清，张云亭，孙世梅.兔 VX2 脑瘤的模型建立及病理学、影像学初步研究[J]. 中华放射学杂志，2005；39(3)：306-309.

[4] 吴文娟，崔慧先，李海涛，等.兔 VX2 肝癌模型的建立及超声观察[J]. 中华超声影像学杂志，2005；14(2)：147-150.

[5] 张黎峰，徐世正，梁 虹，等.可移植性兔皮肤肿瘤模型的建立[J].中国皮肤性病学杂志，2004；18(17)：585-587.

[6] HU XY, WANG GM, XU YQ, et al. Ultrasonographic Study of High Intensity Focused Ultrasound in Rabbit VX2 Renal Tumor[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2005; 32(6): 703-707.

[7] LI F, FENG H, LIN JK, et al. Establishment of a Rabbit Model of Brain Tumor by VX2 Tumor Implantation[J]. Acta laboratorium animals scientia sinica, 2006; 14(3): 193-197.

[8] Kidd JG, Rous P. Cancer deriving from virus papillomas of wild rabbits under natural condition[J]. J Exp Med, 1940; 71(4): 469-494.

[9] Rous P, Kidd JG, Smith WE. Experi ments on the cause of rabbit carcinoma derived from virus-induced papillomas[J]. J Exp Med, 1952; 9(6): 159.

[10] Zagzag A, Brem S, obert F, et al. Neovascularization and tumor growth in the rabbit brain[J]. Am J Pathol, 1988; 1(31): 361-372.

[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]. 中华实验外科杂志，2001；18(15)：478.

[12] 吴安乐，颜志平，周康荣，等.兔 VX2 瘤转移性肺癌动物模型的建立及生物学特性研究[J]. 中华放射学杂志，2003；37(2)：166-170.

[13] Geng ZJ, Zhang YT. M RI Diagnosis of Brain Metastases of Lung Cancer[J]. Chinese journal of neuro-oncology, 2004; 2(3): 166-170.

（责任编辑：谭乐勤）