维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)05-0585-03

兔 VX2 肝癌模型的建立及超声影像监测的研究

王 莽[1], 王 佚[2], 王少春[1], 王 珊[2], 金先庆[2]

(1.重庆医科大学儿科学院超声科,2.重庆医科大学儿科学院外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨高成瘤率兔 VX2 肝癌模型建立的方法及超声技术对肿瘤的监测。方法:采用瘤块移植法建立起兔 VX2 肝癌模型,病理切片检查验证 VX2 瘤株在兔肝脏的成瘤情况;采用超声技术检测肝脏实质回声,肝内肿瘤的大小和回声变化,瘤内血管生成及变化情况以了解肿瘤的生长特征。结果:采用瘤块移植法成功建立起稳定的兔 VX2 肝癌模型,成瘤率为 100%;超声能准确测量肿瘤的大小,能实时、准确地监测肝内肿瘤的回声变化及肿瘤血管的分布情况。结论:瘤块移植法是一种操作简单、成瘤率高的建立兔 VX2 肝癌模型的方法;超声技术能准确、方便、无创地监测肝脏肿瘤及肿瘤血管;采用超声影像技术对兔 VX2 肝癌生长特征的监测结果为临床利用该模型来评价诊治肝癌的新技术、新疗法的疗效提供了监测方法和参考指标。

【关键词】兔;VX2 肝癌;超声技术

【中国图书分类法分类号】R445.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-09-10

Research on establishing of rabbit VX2 carcinoma model and monitoring with color Doppler energy ultrasound technique

WANG Qiao, et al

(*Department of Ultrasound, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To explore a method of high successful rate to establish the rabbit VX2 carcinoma model, and monitor the tumor with ultrasound technique. *Methods*: Tumor block transplanting method was used to make the rabbit VX2 carcinoma model, and verify the tumor in rabbit's liver with pathological section. Ultrasound technique was applied to detect liver echo, size and echo of tumor, generation and changing of blood vessels in tumor and to find out the characters of the rabbit VX2 carcinoma. *Results*: The rabbit VX2 carcinoma model was made successfully with tumor block transplanting method, and the success rate was 100%. The ultrasound technique could measure the size of tumor exactly, and it could monitor the changes of the echo and tumor blood vessels in carcinoma exactly at the right time. *Conclusion*: Tumor block transplanting method is a simple method to make rabbit VX2 carcinoma model with high successful rate. The ultrasound technique is an accurate、convenient and non-invasive method to monitor the carcinoma and blood vessels in tumor. The results provide experimental evidence in evaluating the efficacy of new techniques and therapeutics for liver carcinoma.

【Key words】 Rabbit; VX2 carcinoma; Ultrasound technique

在世界范围内,原发性肝癌的发病率列人类最常见恶性肿瘤的第 8 位。临床上肝癌的治疗常采用手术、放疗、化疗和介入治疗等综合治疗措施,但预后极差,尤以中晚期肝癌为甚。尽管目前治疗技术在不断改进,但关于肝癌的治疗研究尚存在诸多基础和临床上的问题有待进一步的明确和解决,这就需要建立能较好模仿人类肝癌的较大的动物模型以及能准确、方便监测肝脏肿瘤情况的方法。本研究采用改良的瘤块移植法建立起稳定的兔 VX2 肝癌模型,并采用超声技术对兔 VX2 肝癌的自然病程进行监测,旨在为临床评价肝癌治疗疗效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新西兰大白兔 10 只,体重 1.5~2.0kg,雌雄不限,由重

作者介绍:王 莽(1970-),女,主治医师,硕士,主要研究方向:肿瘤的超声研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

庆医科大学实验动物中心提供;兔 VX2 肿瘤株由日本京都 Funabshi Farm 公司提供;超声仪选用美国 Acuson 公司生产的 Acuson Sequoia512 型彩色多普勒超声诊断仪。

1.2 实验方法

1.2.1 改良兔 VX2 肝肿瘤模型的建立 实验兔腹部备皮后,将 VX2 肿瘤株种植在腹部皮下制成荷瘤种兔;2 周后可扪及腹部皮下 1 实质性包块,手术剥离荷瘤种兔腹部皮下的实质性包块,取瘤块边缘生长旺盛的鱼肉样组织制成 $1mm^3$ 瘤块,置于低温 RPMI-1640 培养液中。选取体重为 1.5~2.0kg 的新西兰大白兔(雌雄不分)用 8% 硫化钠腹部脱毛。用速眠新(0.1ml/kg)全麻后,固定于手术台上,常规消毒铺巾。于兔上腹部剑突下约 2cm 处作一纵行切口,长约 2.5cm;逐层切开组织各层,暴露出肝脏,将肝脏右中央叶牵出体外,在距其下缘 2cm 处用眼科镊在肝脏内打一隧道;用眼科镊将 $1mm^3$ 肿块植入肝脏内,纱布压迫止血后,观察无活动性出血后,将肝脏放回腹腔,逐层缝合切口;术后青霉素 20 万 U/只/日预防感染,连用 3 日。

1.2.2 肿瘤的超声监测 选用 Acuson Sequoia 512 型超声仪,15L8W 宽频线阵探头,频率为 8.0~13.0MHz,定期对实验兔进行多切面扫查。用二维超声观察肝脏实质回声及肝内肿瘤的大小、回声特点,注意有无液化坏死区域的出现及范围,用所测数据计算肿瘤体积($V=0.5a\times b^2$,a 和 b 分别是最大和最小直径)和肿瘤生长率(tumor growth rate, TGR $=(a_2b_2-a_1b_1)/a_1b_1\times 100\%$)。选择最佳的肿瘤超声切面,启动彩色能量多普勒显像(color Doppler energy imaging, CDEI),观察病灶内部和周边血管分布特征并用脉冲频谱多普勒检测血流动力学参数。因兔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;连续监测腹腔淋巴结变化。

1.2.3 病理检查 解剖处死和自然死亡的实验兔,取肝脏原发瘤灶及淋巴结、肺脏可疑转移灶组织用 10% 甲醛溶液固定 48h 以上,石蜡包埋,连续 5μm 切片,HE 染色,光学显微镜观察。

2 结 果

2.1 成瘤率

10 只实验兔解剖发现 VX2 肿瘤全部移植成功,病理切片证实肿瘤成功移植到肝脏并存活(见图 1,图 2),成瘤率为 100%。

2.2 肿瘤生长指数

荷瘤 10 天后,肿瘤体积、直径较前增长迅速,TGR 为 291.2%,与前后各期相比其差别有显著性($P<0.05$);荷瘤 30 天后,肿瘤体积、直径较前增长缓慢,TGR 为 4.5%,与前比较差别有显著性($P<$



图 1 镜下见 VX_2 肝肿瘤细胞肝细胞侵润(HE×200)



图 2 杂乱分布的 VX_2 肝肿瘤细胞(HE×400)

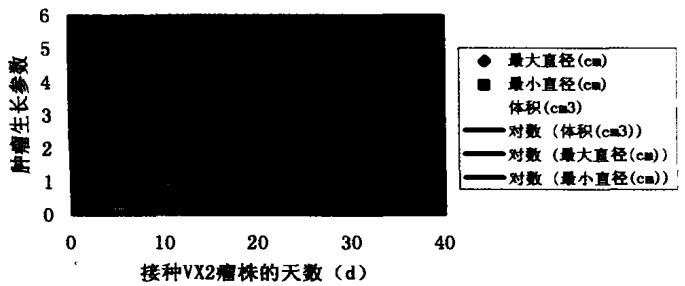


图 3 肿瘤生长直径、体积与荷瘤时间的关系

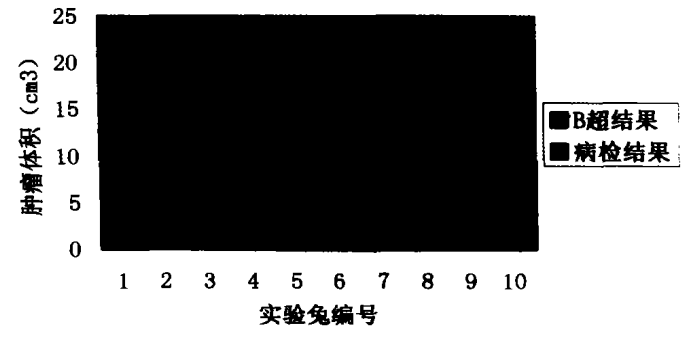


图 4 能量多普勒超声与病理解剖检测肿瘤体积大小比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

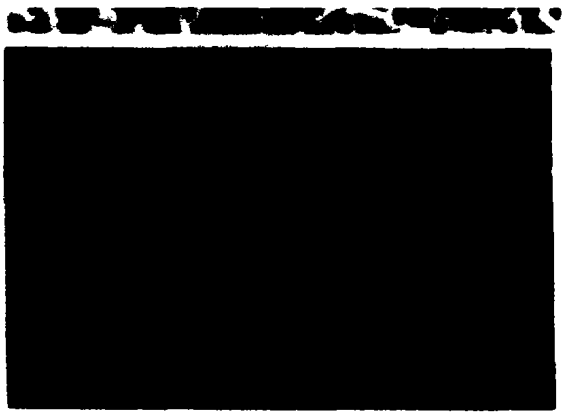


图 5 彩色多普勒显示 VX_2 肝肿瘤血供丰富

表 1 不同荷瘤时间肿瘤体积、直径及生长率

荷瘤时间 /天	最大直径 a/cm	最小直径 b/cm	体积 /cm^3	TGR /%
5	0.95±0.04	0.79±0.06	0.34±0.05	—
10	1.87±0.05	1.57±0.02	2.47±0.08	291.2
12	1.96±0.02	1.69±0.07	2.87±0.05	12.8
14	2.07±0.04	1.78±0.08	3.34±0.04	11.2
18	2.26±0.07	1.87±0.08	4.01±0.06	14.7
23	2.39±0.08	2.04±0.09	5.02±0.08	15.4
30	2.41±0.07	2.15±0.02	5.55±0.02	4.5

* 统计方法：Student's test, Mann - Whitney U test, $P<0.05$ 有统计学意义

0.05)。肿瘤体积、直径呈对数性生长（见图 3），于接种 1 周后生长迅速，接种 30 天后生长减缓(见表 1)接种天数(d)与肿瘤体积(cm^3)关系公式：$y=2.9418Ln(x)-4.3877$, $R^2=0.9967$；接种天数(d)与肿瘤最大直径(cm)关系公式：$y=0.8155Ln(x)-0.1637$, $R^2=0.9128$；接种天数(d)与最小直径(cm)关系公式：$y=0.7361Ln(x)-0.243$, $R^2=0.9439$。

2.3 超声检测肿瘤大小的准确性

超声能密切随访肿瘤的大小。将超声结果与处死或自然死亡的实验兔解剖结果进行比较，经统计学处理发现，超声测得的肿瘤体积与病检结果之间的差异没有显著性意义($P>0.05$)。说明超声技术是一种快速、方便、无创、准确的监测肿瘤的方法(见表 2，图 4)。

2.4 CDEI 血流信号检测结果

本组 10 例肿瘤的 CDEI 均可检出血流信号，表现为瘤体内星点状、短条状或多条血管分支，肿瘤周围有粗大的血管呈弧形包绕，多数可见血管分支植入瘤内(见图 5)。通过频谱多普勒还可以明确血流性质(动脉/静脉血供)及血流指数。

表 2 能量多普勒超声与病理解剖检测肿瘤体积大小(cm^2)的比较

兔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B 超	0.49	2.10	2.77	3.29	6.17	13.54	16.34	16.56	22.26	22.41
病检	0.61	2.23	2.69	3.33	6.88	15.30	16.79	17.28	20.25	23.24

统计方法：配对 t 检验，$P>0.05$ 无统计学意义。

3 讨 论

1933 年，Shope 等人用 shope 病毒在兔身上诱发出乳头状瘤；1935 年 Rous 等人报道乳头状瘤恶变为鳞癌。此后研究发现是兔缺乏针对该肿瘤的抗体，并确定为稳定的、可移植细胞株。移植性兔 VX2 肝癌模型具有许多优点，它是目前国内最大的实验性动物肝癌模型[1]；实验证明该肿瘤富含滋养血管成份，以肝动脉血供为主[2]；在动物体内，肝癌表现为巨块型实体瘤，生长较迅速，转移早，与人体巨块型肝癌相似。该模型制作简单，成瘤率高，实验周期短。

目前采用兔 VX2 瘤株制作兔肝癌模型的方法和途径较多，瘤细胞在体内种植成功主要依赖于肿瘤细胞浓度和种植环境两个条件，肿瘤细胞浓度要在 10^9 个/L 以上[3]，而瘤细胞种植的部位应在供血充足的部位如肝脏、肌肉等处。采用肿瘤细胞悬液直接种植成功率可达 100%，但较费时、费力：本研究将瘤细胞先接种在皮下制作荷瘤种兔，方便随时观察肿瘤生长情况，选取肿瘤生长最为活跃而又没有发生坏死时切除肿瘤，将肿瘤切成 $1mm^3$ 大小的瘤块移植到肝脏制成肝癌模型，这种方法既简单又方便，选取的瘤块生长旺盛且肿瘤细胞数量充足，故成瘤率可达 100%。

本组实验观察到，瘤株于肝脏内成活后，呈对数生长，接种 10～24 天生长最为旺盛，其体积迅速增长，由于此期为供瘤血管形成期[4,5]，肿瘤血管供血较为充足，故较少发生坏死；2 周后逐渐出现腹腔淋巴结转移，本组腹腔淋巴结转移最早出现在 2 周，3 周后全部均发生腹腔淋巴结转移，4 周后出现肺转移；4 周后由于肿瘤生长过快，血供逐渐不足，肿瘤中心出现液化坏死；6～7 周后由于血管增生减缓，瘤体血管处于退化期而发生瘤体大片(下转第 611 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

定。国外多数实行 USI 国家的低碘地区都经历了甲亢发病率增加这个过程[9],他们未加干预,目前这些地区的甲亢患病率并无升高[10]。所以我们认为在碘缺乏地区应当坚定地实行 USI 政策,与防治 IDD 的意义相比,对于碘缺乏地区不能因为补碘引起甲亢的发病率增加而放弃 USI 的实施[11]。但是对于甲状腺功能亢进症患者、和甲状腺自身抗体阳性人群、甲状腺自身免役异常的患者和具有高度遗传易感性的 Graves' 多发家系均不宜补碘[12]。同时加强对人群碘摄入量的监测,及时调整食盐碘含量,使碘摄入量维持在安全剂量范围内,力争避免出现补碘过多或补碘不足的情况。

参 考 文 献

[1] Lind P, Langsteger W, Molnar M, et al. Epidemiology of thyroid diseases in iodine sufficiency[J]. Thyroid, 1998;8:1179-1193.

[2] 胡亚军,邓佳云,杨小静. 由于食盐卤源改变四川部分地区出现甲状腺肿流行[J]. 中国地方病学杂志, 1992;11(1):49.

[3] 蒋诗国,李心术,肖邦忠. 重庆市补碘前后儿童碘营养状况评价[J]. 中国地方病学杂志, 1999;18(2):127.

[4] 王 斐,赵世华. 尿碘测定方法进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2000;20(4):211-212.

[5] 于志恒,范淑香. 我国碘缺乏病防治出现的问题及改进措施[J]. 中华预防医学杂志, 2000;34(5):261-265.

[6] 全国碘缺乏病监测组. 1999 年全国碘缺乏病监测资料汇总分析[J]. 中国地方病学杂志, 2000;19(4):269-271.

[7] 滕卫平. 再论碘摄入量增加对甲状腺疾病的影响[J]. 中华内分泌代谢, 2001;20(1):72.

[8] 于志恒. 从 1999 年全国碘缺乏病监测报告看当前我国碘缺乏病防治中存在的问题[J]. 中国地方病学杂志, 2000;20(1):70-71.

[9] Hollowell J, Satehling NW, Hannon WH, et al. Iodine nutrition in the United States. Trends and public health implications: iodine excretion data from national health and nutrition examination surveys Ⅰ and Ⅲ (1971-1974 and 1988-1994)[J]. Clin Endocrinol Metab, 1998;83:3401-3408.

[10] 吴艺捷,谢福康,蔡 黎,等. 碘摄入量增加对甲状腺功能亢进症发病率的影响[J]. 中华内分泌代谢, 2000;16:139-142.

[11] Stanbury JB, Ermans AE, Boudoux P, et al. Lodine-induced hyperthyridism: occurrence and epidemiology[J]. Thyroid, 1998;8(1):83-92.

[12] Delange F, Lecomte P. Iodine supplementation: benefits outweigh risks[J]. Drug Saf, 2000;22(2):89-95.

(上接第 587 页)坏死[4,5]。所以利用该模型进行实验研究时宜在 3~4 周进行,以免肿瘤坏死或转移影响实验结果。但该模型为移植性肝癌模型,并非继发于肝硬化等后的肝细胞性肝癌,故限制了其应用。

CDEI 成像技术对低速血流敏感,且不受血流方向、速度及角度的影响,有较高的分辨率,无混叠现象,可全面显示肿瘤周边及内部血流信号,尤其是可将肿瘤内部粗细不均弯曲绕行的血管显示出来。本组资料显示 CDEI 对肝肿瘤病灶检测的灵敏度与病理检查相同,对肝肿瘤血管的检出率高。本组 10 例病灶内均可检出血流信号,随着瘤体的增大,病灶内血管增多并迂曲扩张,尤以瘤周明显,常见增粗的血管包绕瘤周,并有分支植入瘤体内,由此可反映出肝肿瘤生长的一些特征,从而提示 CDEI 能准确地检测肝肿瘤血管,间接地反映肿瘤生物学行为的变化,为临床治疗和预后判断提供了一种准确、无创的科学方法。如何消灭滋养血供是治疗肿瘤的关键之一,通过彩色多普勒对肿瘤进行定量分析,可较好地评价肿瘤的治疗效果,为抗肿瘤血管药物疗效判定提供了无创性指标。

参 考 文 献

[1] 曾蒙苏,张宏伟,周康荣,等. 供影像诊断实验的大鼠移植性肝模型的可行性研究[J]. 临床放射学杂志, 1996;15:56-58.

[2] Chamberlain MN, Gray BN, Heggie JCP, et al. Hepatic metastases-a physiological approach to treatment[J]. Br J Surg, 1983;70:596-601.

[3] Swistel AJ, Bading JR, Raaf JH. Intraarterial versus intravenous Adriamycin in the rabbit VX2 tumor system[J]. Cancer, 1984;53(6):1397-1404.

[4] Morgon J, Pake H. Metastases: mechanisms, pathways and cascades[J]. AJR, 1995;164(5):1075-1082.

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