



兔 VX2 肝癌模型制作改良及影像学评价

杜 童, 韩 琳, 牛洪欣, 张西坤

(山东省医学科学院附属医院普外科, 济南 250031)

【摘要】 目的 对兔 VX2 肝癌模型制作进行改良,以用于介入治疗学研究,同时探讨瘤灶的 CT 表现及 CT 在检测瘤灶中的作用。**方法** 将 VX2 瘤细胞接种于兔皮下使其成瘤并传代;新西兰兔 24 只,以改良嵌插法建立移植性肝癌模型,于建模后 7、14、21 d 分别行超声、CT 及血管造影检查,用于检测兔肝 VX2 瘤灶,评估瘤灶生长变化;随后处死动物,进行尸解,评估影像检查结果。**结果** 24 只(100%)动物以改良嵌插法建立移植性肝癌模型全部成功。瘤灶以种植后 2 周 CT 显示最清楚和典型,直径 1 cm ~ 2 cm 左右,平扫呈低密度或等密度,动脉早期明显强化,门脉期呈低密度,与周围肝组织分界较清楚。肝动脉造影显示肿瘤富血供。而种植后超过 3 周的肿瘤大部分发生坏死。**结论** 嵌插改良法是一种值得推广的建立移植性肝癌模型的方法;在对瘤灶进行影像学评价上应尽量选择 CT 检查,接种后 1 周左右的瘤灶较小而难以观察;2 周左右呈肝动脉源性血供丰富的约 1 cm ~ 2 cm 的实体瘤,造影征象为肿瘤血管与肿瘤染色;3 周以上瘤灶大多出现明显坏死;因此对 1 ~ 2 cm 大小的兔 VX2 肝癌瘤体,最适合行血管造影检查。

【关键词】 VX2 肿瘤; 肝癌模型; 兔; CT; 血管造影

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0029-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 002. 007

Improvement in the preparation of rabbit models bearing VX2 liver tumor for interventional therapy study and imaging evaluation

DU Tong, HAN Lin, NIU Hong-xin, ZHANG Xi-kun

(Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences. Jinan 250031, China)

【Abstract】 Objective To improve the preparation of rabbit models bearing VX2 hepatoma for interventional therapy study, and to investigate their CT features. **Methods** Eighty New Zealand white rabbits were implanted with VX2 hepatoma in the deep aspect of the left lobe of liver. CT scanning was performed in the experimental animals at 1, 2 and 3 weeks after implantation. The plain, early arterial phase and portal phase images were obtained. **Results** Twenty-four (100%) rabbits were successfully implanted with VX2 hepatoma in the liver. On CT scans taken at 2 weeks after implantation, the tumors showed most clear and typical images: 1 - 2 cm in diameter, hypodensity or isodensity on plain CT scans, markedly enhanced early arterial phase images, hypodensity on portal phase images, well discernible from the surrounding liver tissues. Hepatic angiography showed that the tumor was hypervascular. Necrosis was seen in most animals at 3 weeks after implantation. **Conclusions** The rabbit model bearing VX2 hepatoma is more suitable for interventional therapy study. CT is very useful in evaluating the tumors.

【Key words】 VX2 hepatoma; Liver cancer model; Rabbit; CT; Angiography

[基金项目] 山东省医学科学院资助项目(编号:200944)。

[作者简介] 杜童(1974 -), 女, 主管护师, 医学硕士, 研究方向: 肿瘤外科护理。

[通讯作者] 牛洪欣(1972 -), 男, 副主任医师, 医学硕士, 研究方向: 消化系统肿瘤。E-mail: sdblache@126.com。

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,由于其发病隐匿,临床发现往往已到晚期。近年来,随着肝癌实践的不断深入^[1],人们认识到其间存在着许多基础理论和临床问题,必须通过进一步的实验研究来证实和解决,而其中很多研究是利用动物肝癌模型进行的。兔 VX2 肝癌模型是目前理想的肝癌实验模型,被广泛用于肝癌肿瘤发生学、治疗学、放射生物学、抗肿瘤药物药代动力学及肿瘤影像学等实验研究。但我们在实验中发现,制作该模型时经常会出现移植瘤处肝表面及临近腹壁发生转移,进而影响实验结果。我们在实验过程中对兔 VX2 肝癌模型的制作方法做了一些探索和改良,并就其影像学进行评价。

1 材料和方法

1.1 动物、瘤株及主要设备

6~8 月龄普通级新西兰兔 24 只,体重 2.0 kg~2.5 kg,雌雄不限,购自山东省农科院(许可证号 SCXK20090013)。VX2 瘤细胞株由美国引进。日本阿洛卡超声诊断仪、德国西门子产 64 排 CT 机、大 C 臂 DSA,介入器械:3F 微导管及微导丝、自制股动脉导管鞘等。无菌手术在山东省医学科学院附属医院中心实验室及介入手术室进行,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 兔 VX2 细胞株的制备

将活细胞密度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL 的 VX2 瘤细胞悬液接种于兔大腿内侧近腹股沟部位皮下,使其成瘤并传代,2 周左右瘤体可长至 $(1 \sim 2) \text{ cm}^3$,手术取出传代瘤株,将肿瘤包膜剥脱干净,剔除坏死及纤维组织,取靠近边缘的鱼肉样肿瘤组织在平皿上剪成约 $(1 \sim 2) \text{ mm}^3$ 的小块,以生理盐水反复冲洗,作为瘤种备用。

1.3 睑板腺囊肿镊夹持固定瘤块植入法即改良嵌插法^[2]建立移植性肝癌模型

预接种兔经耳缘静脉先以安定 (0.25 mg/kg) 静脉注射,随之氯胺酮 (10 mg/kg) 麻醉后固定,剑突下正中倒 V 样小弧型切口长约 $1 \text{ cm} \sim 2 \text{ cm}$ 打开腹腔,剪除剑突,小拉钩牵引暴露肝脏。选择大小合适的睑板腺囊肿镊全层夹持肝叶(左中叶)并拖出腹腔外(图 1),力量以阻断局部血液循环为度,不可用力过大而夹碎肝脏,调整好固定螺丝。在拟接种的手术部位以尖刀刺破肝包膜,深约 $3 \text{ mm} \sim 5 \text{ mm}$,将一瘤块植入后以小块明胶海绵封闭创口,压

迫片刻无渗血,表面涂以 OB 胶,稍后凝固即可撤出睑板腺囊肿镊,肝脏还纳腹腔,两层缝合切口。上述操作均在无菌条件下进行,术后青霉素 80 万单位肌内注射,连续 3 d。

1.4 影像学评估和解剖观察

术后常规喂养,种植后第 1、2、3 周分别随机挑取 8 只实验兔逐只行超声、CT 及血管造影检查,用于检测兔肝 VX2 瘤灶,评估瘤灶生长变化。随后空气栓塞法处死动物,进行尸解。具体做法:依前法先将兔麻醉,耳缘静脉留置针不拔,以便随时追加麻药,腹部备皮。首先行普通超声检查。再行 CT 检查,选用非离子型对比剂优维显 (Ultravist, 300 mg/mL),对比剂量为 7 mL , 0.3 mL/s ,先行肝脏 CT 平扫,延迟 $10 \text{ s} \sim 12 \text{ s}$ 、 $40 \text{ s} \sim 50 \text{ s}$ 后分别行动脉早期和门脉期增强扫描,扫描条件为 120 kV , 180 mA , FOV 160 mm ,层厚 2 mm ,间距 3 mm 。然后行血管造影(第 2、3 周),采用传统 Seldinger 法:将实验兔固定后,腹股沟区备皮、消毒、铺巾,靠近腹股沟区沿股动脉纵行切开皮肤,暴露股动脉鞘并小心剪开,分离出 $1 \sim 2 \text{ cm}$ 长的股动脉,近远端分别用 4 号丝线穿过备用。提起近端丝线,保持适当张力以暂时阻断血流,用眼科剪在股动脉前壁剪一小“V”形口,将短导丝插入,成功后将自制导管鞘顺导丝插入股动脉并向近端送入约 4 cm ,结扎近端备用丝线以固定导管鞘。经鞘管引入 3F 微导管,寻找到腹腔动脉后行造影,确认肝固有动脉,超选择性插管至肝固有动脉,再次造影证实肝实质显影,并可进一步超选择肝左或肝右动脉进行造影^[3-5]。最后是尸解,观察肝脏成瘤情况、测量肿瘤直径并与最后的 CT 检查结果对比、瘤体内部坏死情况、有无腹壁及其他器官转移等。

2 结果

2.1 影像学评估

建模术后 1 周:B 超不能发现瘤灶;CT 扫描,瘤体较小或者图像上无法分辨瘤灶。术后 2 周:瘤体直径可达 $1 \text{ cm} \sim 2 \text{ cm}$,图像呈典型实体瘤表现,8 只实验兔中 B 超发现 6 只(6/8),CT 发现 8 只(8/8),B 超诊断率低于 CT(75% 对 100%)。术后 3 周:瘤体继续增大,中央出现液化坏死,呈囊腔表现。B 超及 CT 均能发现瘤灶,诊断率相当(均 100%)。

$1 \text{ cm} \sim 2 \text{ cm}$ 大小的兔 VX2 肝癌瘤体,其 CT 表

现与人肝细胞癌相似,平扫图像呈边界清楚的低密度结节,与周围正常肝组织分界清楚,动脉期明显强化(图 2),因该时期造影征像为肿瘤血管与肿瘤染色,呈肝动脉源性血供丰富的实体瘤,故此时最适合行血管造影检查;而 3 周以上瘤灶中央大多出现明显坏死,染色不明显,因此不适合行血管造影检查。

介入操作时除 1 只因麻醉浅致手术时挣扎,股动脉近心端被导管鞘意外穿破,大出血死亡外,其余均成功插管至肝固有动脉,部分可超选择至肝左或肝右动脉,插管成功率 87.5%。行 DSA 造影后主要表现为:胃左与肝总动脉共干,肝总动脉向右走行分出胃十二指肠动脉与肝固有动脉,肝固有动脉分为肝左与肝右动脉,肝左动脉较粗,肝右动脉相对较细,胆囊动脉主要由肝右动脉分出。瘤周血管粗大紊乱,有大量细小的异常血管,肿瘤呈均一、结节样或环行染色,瘤体较大时可见粗大的供瘤动脉被瘤体推压成“抱球状”,其外周可见肝左动脉分出的肿瘤滋养血管抵达肿瘤并绕行,密度高且粗大,

其分支进入肿瘤内部(图 3)。

2.2 尸检情况

24 只实验兔全部种植成功(100%)。第 1 周时一部分瘤灶虽然影像学检查未能检出,但尸检均发现移植瘤成活。瘤灶均位于肝左叶,呈单一团块状(图 4),无肝表面及腹壁转移。第 3 周时有 2 只发现肝表面及腹壁转移,1 只发现远处器官转移,1 只合并有腹水。大体解剖:肿瘤组织呈灰白色结节样,圆形或椭圆形,与周围组织分界清楚,剖面呈鱼肉状。测量肿瘤直径均与 CT 检查结果相符。直径 2 cm 以下的瘤灶多呈实质性,3 周后的瘤灶直径约 2.5 cm ~ 3.5 cm,中央多有液化性坏死灶并形成囊腔。

3 讨论

兔 VX2 肿瘤为从 Shop 病毒在兔皮肤诱发的鳞癌,经数十次传代建立的兔可移植性肿瘤,接种于肝内的成功率极高,接种成功的肝 VX2 瘤灶是主要由肝动脉供血的富血供性肿瘤,虽然其病理形态

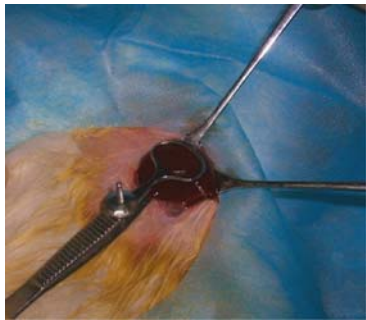


图 1 睑板腺囊肿镊夹持肝叶并固定
Fig. 1 Exteriorizing and fixing the liver lobe, and clamped and compressed with a chalazion forceps.



图 2 VX2 肝癌 CT 表现
Fig. 2 CT image of the VX2 hepatoma



图 3 DSA 造影后瘤体呈“抱球状”
Fig. 3 The tumor shows “holding a ball” after DSA angiography



图 4 肝左叶呈单一团块状瘤体
Fig. 4 The tumor is a single mass and located in the middle left liver lobe

学表现并非肝细胞癌,但已有的研究证明其适合用作于肝癌介入治疗的动物模型。

VX2 肝癌按接种所使用的瘤种形态可分为:①瘤细胞悬液接种,②瘤组织小块接种;用于研究原发性肝癌的多用开腹直视下肝实质瘤组织块接种法,用于研究肝转移瘤的多用经门静脉或脾脏瘤细胞悬液注入法。按接种的途径可分为:①经肝动脉注入接种,②经门静脉或肠系膜静脉注入接种,③肝实质接种。肝实质接种方法按手术方式可分为开腹直视下接种和利用影像学方法引导经皮穿刺接种^[6]。开腹直视下肝实质接种法又含有开腹直视下肝穿刺注入瘤小块与局部肝切开瘤小块包埋法,都属于嵌插法,不同之处在于植入瘤块后有的是以明胶海绵块堵塞,有的是缝合肝被膜。以影像学方法引导经皮穿刺接种法属于微创技术,优点是不需开腹,动物创伤小,但易形成穿刺部位肝以外的转移,且成功率低。

兔肝脏不易固定,血运丰富,术中容易出血且不易止,致术野不清,操作困难,容易造成移植瘤播散,增加手术难度,我们使用睑板腺囊肿镊,取得了理想的效果。睑板腺囊肿镊是眼科的一种专用器械,分大、中、小三号。具体方法是在拟接种的手术部位(肝左两叶呈叠瓦状排列,选择左中叶中央)以睑板腺囊肿镊全层夹持,力量以阻断局部血液循环为度,调整好固定螺丝;瘤块植入后,放置明胶海绵块,再涂以 OB 胶,稍后凝固即可撤出睑板腺囊肿镊,其他步骤均常规操作。此法优点是出血控制好,术野清除,操作方便,节省人力,不需助手,在整个瘤块植入操作过程中不至于引起其他部位的转移。而单纯塞明胶海绵在兔清醒后活动或挣扎时,海绵块往往会因为腹压的增加而脱出创口,使种植瘤长到肝边缘、腹壁或者形成远处转移,致使下步实验受影响。而经皮穿刺接种法、开腹嵌插法等因有不可避免的肝出血以及瘤组织相对暴露等原因易形成肝表面、腹壁或者远处的转移。我们的结果表明,嵌插改良法是一种值得推广的建立移植性肝癌模型的方法。

超声检查可用于兔肝 VX2 肿瘤的指导接种、生长观察、治疗后动态变化评估等。采用氟碳声学造影剂和二次谐波显像技术进行肝脏肿瘤声学造影

可大大提高超声对肝肿瘤的观察能力,肿瘤血管早期增强,可以提高对大于 1 cm 瘤灶的检出。灌注-延迟显像声学造影对直径 5 mm ~ 10 mm 内的肿瘤结节的检出率可高达 90% 左右。

CT 与 MRI 可用于检测兔肝 VX2 瘤灶,评估瘤灶生长变化。接种后 1 周左右的瘤灶较小而难以观察,2 周左右时表现典型,3 周以上瘤灶大多出现明显显示坏死。VX2 肝癌的 CT/MRI 表现与人肝细胞癌相似,CT 平扫多呈边界清楚的低密度结节,动脉早期明显强化,门静脉期呈较低密度与周围肝组织分界较清楚;MRI T1WI 与 T2WI 分别表现为均匀低信号和稍高信号,增强后瘤灶呈边缘环状强化。

血管造影时,由于兔肝血管细小,所能容纳造影剂的量很少,常规造影法不易观察,现在大都采用 DSA 造影。兔 VX2 肝癌虽是移植性肿瘤,但血管造影显示为肝动脉源性血供丰富的实体瘤,主要征像为肿瘤血管与肿瘤染色^[5,7]。在介入治疗时,必须先行造影证实插管在肝固有动脉内,并尽量超选择进入肝动脉分支,以避免化疗栓塞时造成胃肠异位栓塞、胆囊栓塞、肝脏大面积梗死等严重后果。

参考文献:

- [1] 范上达,邱宗祥,潘冬平. 肝癌的综合治疗 [J]. 中华消化外科杂志, 2011, 10(4):241-246.
- [2] 牛洪欣,徐忠法,王丽丽,等. 兔 VX2 肝癌模型制作技术改良 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(4):53-55.
- [3] Niu HX, Du T, Xu ZF, et al. Role of wild type p53 and double suicide genes in interventional therapy of liver cancer [J]. Acta Cir Bras. 2012, 27(8):522-528.
- [4] 杜童,牛洪欣,张西坤,等. Wtp53 基因联合双自杀基因介入途径治疗肝癌的实验研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2013, 19(8):606-610.
- [5] 牛洪欣,杨焕刚,张西坤,等. 兔肝癌动脉插管介入技术研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(9):1594-1595.
- [6] 陈胜利,徐兆栋. 兔 VX2 肝癌模型与实验性肝癌介入治疗 [J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2003, 9(4):371-377.
- [7] Chen JH, Lin YC, Huang YS, et al. Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver; comparison of two inoculation methods [J]. Lab Anim, 2004, 38(1):79-84.

[修回日期]2013-11-23