

· 实验研究 Experiment research ·

兔 VX2 肝种植肿瘤模型制作的完善及综合影像学评价

陈 晟, 邓 钢, 牛焕章, 何仕诚, 方 文, 汪盛齐, 马占龙,
郭金和, 李国昭, 滕皋军

【摘要】 目的 进一步完善兔 VX2 肝种植肿瘤模型的制作, 比较种植肿瘤的 CT、MRI 及 DSA 影像表现, 评价各影像检查对瘤体显示的优越性。方法 实验动物为新西兰大白兔(前期实验 12 只, 后期实验 24 只)采用动物后肢皮下注射接种传代保存瘤种。模型前期制作采用包埋法接种, 后期采用针头注入法接种于兔肝左叶, 并于术前 1 d 及术后 1、3 d、1、2 周检查肝肾功能的动态变化情况。接种 2 周后行 CT、MR 成像, 随后行经股动脉肝动脉超选择 DSA 及纳米磁性粒子介入治疗。结果 前期实验肿瘤种植成功率 66.7%, 后期实验种植成功率 100%。术后 ALT、AST 有一过性增高, 无统计学意义, BUN、Cr 无明显变化。术后 CT 平扫肿瘤为略低密度病灶, 强化不明显, 境界清晰, MR 平扫呈长 T1、长 T2 信号, EPI 序列 T2WI 呈略高信号影, DWI 成像见高亮信号影, 显示清晰, 介入术中 DSA 造影可见肝左叶孤立的丰富血管肿瘤, 供血动脉增粗, 经超选择注入纳米磁性粒子, 肿瘤内密度明显增高。结论 兔 VX2 肝种植肿瘤模型是介入治疗实验研究理想的动物模型。VX2 瘤粒针头注入法较包埋法成功率更高, 其建立过程对兔肝肾功能无明显影响。CT 平扫增强, MR 平扫, EPI 序列及 DWI 成像对于肿瘤的影像评价互有优势, EPI 及 DWI 成像可更灵敏地显示肿瘤, DSA 可清晰地显示肿瘤的供血及肝内有无转移。

【关键词】 肝肿瘤; VX2 动物模型; 影像学评估

中图分类号: R73.354 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2007)01-0048-05

Consummation in making rabbit model bearing VX2 liver tumor and multiple imaging evaluation

CHEN Sheng, DENG Gang, NIU Huan-zhang, HE Shi-cheng, FANG Wen, WANG Sheng-qi, MA Zhan-long, GUO jin-he, LI Guo-zhao, TENG Gao-jun. Department of Radiology, Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To consummate the creation of rabbit model bearing VX2 liver tumor ulteriorly, compare the imaging performance of CT, MRI and DSA in rabbit bearing VX2 liver tumor and evaluate the superiority of each imaging for demonstrating the tumors. **Methods** Thirty-six New Zealand white rabbits were enrolled including 12 designated in the fore stage experiment and 24 in the late stage experiment. The grafted VX2 carcinoma was maintained through serial transplantation into the hind limb of the rabbit by subcutaneous injection. In the fore stage experiment, the rabbits were embedded with VX2 tumor while in the late stage experiment, the rabbits were injected with VX2 tumor in the left lobe of the liver. Liver and kidney functions were checked 1 day before the operation and 1 d, 3 d, 1w and 2 w after the operation in the late stage experiment. CT and MR imaging were performed in all of the rabbits 2 weeks later, together with the transcatheter arterial super-selection DSA and nanometer magnetic fluid interventional therapy. **Results** The successful rates of implantation were 66.7% in the fore stage experiment and 100% in the late stage experiment. Temporarily elevation of the serum ALT, AST levels was observed but reversed within a week with no statistical significance. Bun and Cr also showed no significant changes. The tumors demonstrated as low density on plain CT scan, inconspicuous enhancement on arterial phase image but well discernible from the surrounding liver tissue. On MR imaging the tumors appeared as low signal intenrts on T1WI, slightly high on T2WI (EPI) and

基金项目: 国家自然科学基金(30470507) 江苏省社会发展基金(7790003034)

作者单位: 210009 南京 东南大学附属中大医院放射科

通讯作者: 邓 钢

markedly high on DWI. DSA revealed the isolated tumor with abundant tumor vessels supplied by enlarged feeding arteries in the left lobe of the liver and high density in the area of tumor after super-selective injection of the nanometer magnetic fluid. **Conclusion** The rabbit model with VX2 liver tumor is suitable for interventional experimental study. The injection method is superior to the embedded method with no obvious abnormal changes in the liver and kidney functions. CT (with-and without-contrast enhancement) and MRI (T1WI/T2WI, EPI/DWI) were of benefits to the image evaluation of tumor with their own superiority, especially the T2WI (EPI) and DWI of MRI. DSA not only show the arterial details of the tumor but also metastasis in liver clearly (J Intervent Radiol, 2007, 16: 48-52)

【Key word】 Hepatic neoplasms; VX2; Animal model; Imaging evaluation

经过 20 多年的发展,以肝动脉栓塞化疗为主的介入技术已成为肝癌非手术治疗的首选方法。然而,介入治疗的疗效也远非理想^[1-3]。如何改进介入技术,提高肝癌治疗的生存期仍是目前肝癌治疗的重要研究方向。本文对兔 VX2 肝种植肿瘤模型进行了深入研究,并探讨比较 CT、MRI 及 DSA 影像评价,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验器材和药品

自制兔台,自制铺巾,推毛剪,各型手术器械及相关工作用品;超净台及相关工作用品;1%戊巴比妥钠,各型号注射器及生理盐水,PBS 缓冲液等实验用品。

1.2 实验动物

荷瘤兔 2 只购自同济医科大学附属协和医院。实验兔为新西兰大白兔,雌雄不拘,体重 4~6 kg,购自江苏省农科院种兔场,许可证号 SCXK(苏)2002-0025。前期实验 12 只,后期实验 24 只。

1.3 实验步骤

1.3.1 荷瘤兔取肿瘤 1%戊巴比妥钠麻醉荷瘤兔后,大腿外侧取出完整肿瘤块,泡于盛有 4℃ PBS 缓冲液的平皿中,在超净台下剔除血管及坏死组织,取肿瘤块外围新鲜鱼肉样组织,PBS 缓冲液冲洗 3 遍,用眼科剪剪成尽可能小的瘤粒,用 1ml 注射管抽吸 1ml 备用。

1.3.2 荷瘤兔传代 1%戊巴比妥钠,按 30 mg/kg 麻醉新西兰大白兔,取含瘤粒悬浮液的 1 ml 注射管,换用 50 ml 注射管所配的注射针头,两后腿分别皮下注入 1 ml。注射时针尖可稍微穿透肌肉,以使肿瘤生长旺盛。一般 1 周后即可触及绿豆样大小的肿瘤块,2~3 周后可明显增大,平均直径 3 cm 左右,最大 1 只兔直径达 7 cm。一般 3 周左右可再次传代,3 周后肿瘤普遍有中心坏死。

1.3.3 VX2 肝种植肿瘤模型建立 术前动物手术

室紫外线消毒 25 min。1%戊巴比妥钠,按 30 mg/kg 麻醉新西兰大白兔,兔仰卧于自制平台上,固定四肢,剑突下腹部备皮,碘伏消毒。前期行腹部正中切口,暴露肝脏后于肝左叶包埋瘤粒,明胶海绵压迫并内置。后期自剑突下偏左侧划开 1.5 cm 切口,钝性分离后,暴露肝脏。用生理盐水湿润的纱布轻柔地将兔肝左叶拉出体外,取含瘤粒悬浮液的 1 ml 注射管,换用 50 ml 注射管所配的注射针头,斜角度刺入后平推约 1.5 cm,注入瘤粒悬浮液,拔出时用纱布按压片刻,确认无出血后回纳肝脏,按腹膜、肌肉、皮肤逐层缝合。缝合后碘伏消毒。术后连续 4 d(含手术当天)大腿外侧肌注青霉素,第 1 天注射 80 万 u,其后 3 d 各注射 40 万 u。动物房保持 24℃ 恒温,干燥、通风。

1.4 肝肾功能检查

后期实验于肿瘤种植术前 1 d 和术后 1、3 d、1、2 周分别自耳缘静脉抽血 2 ml 于生化管内,4000 g 离心 8 min,送实验室检查血清 ALT、AST、BUN 和 Cr 等 4 项。

1.5 影像综合评价

1.5.1 CT 检查 使用 GE 公司的 Hi-Speed 单排螺旋 CT,于肝种植肿瘤模型建立 2 周后行螺旋 CT 平扫检查,增强经耳缘静脉快速手推注入优维显 4 ml 后扫描。扫描参数:电流 200 mA,层厚 3 mm, pitch 1.5 mm, FOV 480 mm。

1.5.2 MR 检查 使用 Marconi 公司的 Eclipse 1.5 T 超导磁共振扫描,于肝癌模型建立 2 周后行常规 MR 检查。MR 参数:RF-FAST 序列,头部线圈,层厚 7 mm, GAP0 mm, FOV 36 mm, T1WI (TE 4.5/TR 291), EPI 序列, T2WI (TE 80/TR 15000), DWI 成像检查参数:SE-EPI 序列, TE 55~98 ms, TR 4000~4500 ms, b 值取 300 或 500,层厚 5 mm, FOV 40 mm, ROI 面积为 $(20 \pm 5) \text{ mm}^2$ 。

1.5.3 DSA 造影 使用 GE 公司 Innova 3100 平板 DSA 机,动物全麻下经股动脉置入 4 F 导管鞘,沿鞘选入 4 F 单弯导管,选入腹腔干行 DSA,明确肝

动脉走行后经同轴导管技术将 Boston 公司 3 F Renegade 导管超选入肝动脉,手推注入安其格拉芬约 2 ml,采集帧数 4/s,摄影明确肝种植肿瘤的供血情况,然后行纳米磁性粒子介入治疗术(纳米磁性粒子:东南大学生物医学与工程系制作,直径 20 nm 左右,主要成分 Fe_3O_4 ,混合比例为 1 ml 超液化碘油含纳米磁性粒子 80 mg)。

2 结果

2.1 模型建立情况

前期实验 12 只兔,4 只未成功:1 只存活 2 d,死于肝破裂;1 只存活 9 d,死于感染腹泻;2 只存活 11 d,死于切口疝。8 只成功,2 周后影像检查发现 2 处病灶 3 只,余均为 1 处病灶。后期实验 24 只,均成功建立肝种植肿瘤模型,2 周后影像检查发现 2 处病灶 1 只,余均为 1 处病灶。两期实验比较,差异有显著性($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 模型建立前后肝肾功能变化

表 1 VX2 肝种植肿瘤模型建立情况 费歇尔精确概率
单侧检验 SPSS 11.5

实验分期	总数	模型建立成功	模型建立失败	成功率	病灶数	
					1	2
前期实验	12	8	4	66.7%	5	3
后期实验	24	24	0	100%	23	1

两者成功率比较: $P < 0.01$

表 2 VX₂ 肝种植肿瘤模型建立对肝肾功能的影响

血清生化指标	术前	术后(d)			
		1	3	7	14
ALT u/L	28.00 ± 3.38	47.85 ± 8.12	34.60 ± 7.25	29.10 ± 5.69	27.45 ± 4.20
ADT u/L	42.42 ± 6.27	70.04 ± 11.29	61.55 ± 12.28	45.38 ± 6.98	45.51 ± 5.29
BUN mmol/L	6.39 ± 2.14	7.11 ± 2.03	6.52 ± 1.88	6.57 ± 2.01	6.64 ± 2.31
Cr umol/L	96.75 ± 11.00	99.08 ± 10.23	88.49 ± 14.56	86.01 ± 12.96	97.74 ± 15.00

配对 t 检验 SPSS 11.5 ALT、AST 术前、后比较: $P > 0.05$

后期实验 24 只肿瘤种植术后 ALT、AST 有一过性增高,但不具统计学意义($P > 0.05$),1 周已基本恢复正常。BUN、Cr 无明显变化。VX2 肝种植肿瘤模型的建立对肝肾功能无明显影响(表 2)。

2.3 VX2 肝种植肿瘤模型综合影像学评价

2.3.1 CT 评价 CT 平扫可见结节样不甚均匀略低密度灶,与周围边界尚清晰,平均直径 2.3 cm。增强后强化不明显,与正常肝组织分界清晰,内部有坏死部分可呈更低密度(图 1、2)。

2.3.2 MR 评价 MR 平扫见肿瘤组织呈较长 T1,长 T2 信号,在 T1WI 上为略低信号影,与周围组织境界清晰,EPI 序列 T2WI 上呈高信号影,不甚均匀。内部有囊变坏死灶时可呈长 T1,长 T2 信号影,在 T1WI 上呈低信号影,而在 EPI 序列 T2WI 上呈高信号影(图 3、4)。

2.3.3 DWI 评价 DWI 成像见肿瘤组织呈高亮信号影,周围呈相对低信号影或无信号。肿瘤组织境界不甚清晰,分界不明显(图 5)。

2.3.4 DSA 评价 DSA 造影可见胃肠道供血动脉较肝动脉明显粗,肝左叶动脉较正常之肝右动脉略增粗,肿瘤血管不规则、紊乱,实质期肿瘤染色明显,内部染色不均匀,可见“血池”征。注入与碘油混合的纳米磁性粒子后可见纳米磁性粒子沉积于瘤区,聚集明显(图 6)。

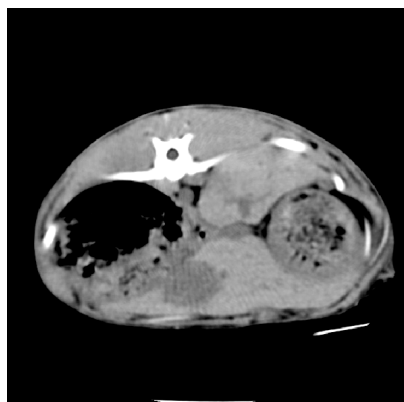


图 1 CT 平扫见肝左叶孤立境界尚清的类圆形较低密度病灶

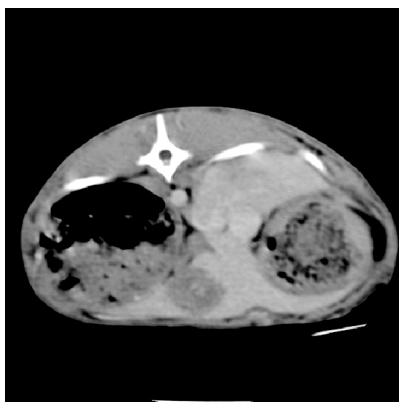


图 2 增强后未见显著强化,内部有不均匀的点状强化

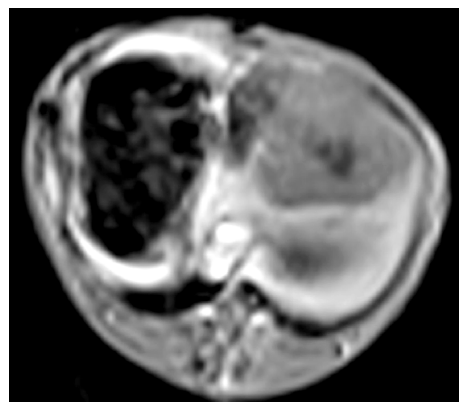


图 3 T1WI 见低信号肿瘤影,内部有囊变坏死灶信号更低

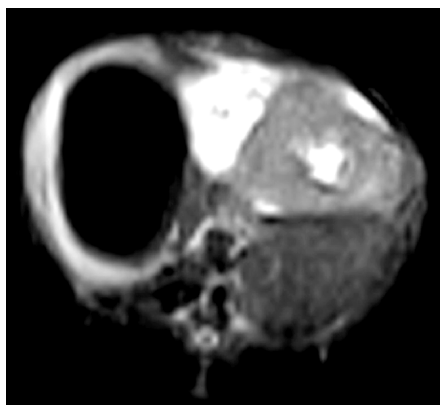


图 4 EPI 序列 T2WI 见肿瘤信号略高, 而坏死部分呈更高信号, 周围亦有高信号影, 考虑水肿可能

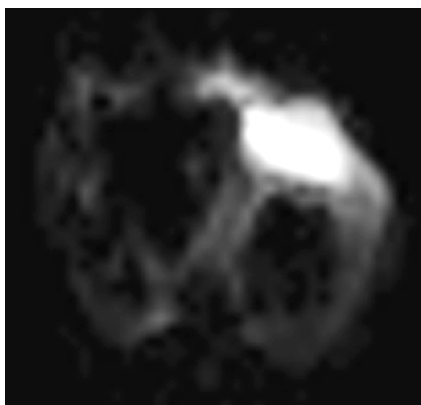


图 5 DWI 呈高亮信号影, 内部不甚均匀, 于周围正常组织分界不明显



图 6 3F 导管超选择至肝固有动脉, 见纳米磁性粒子缓慢飘向病灶, 在肿瘤内部聚集明显

3 讨论

3.1 VX2 及其传代

兔 VX2 肝种植肿瘤是目前作为肝癌治疗最常用的和较为理想的动物模型。VX2 肿瘤是由 Shope 病毒在野兔皮肤诱发的鳞癌经数十次传代而建立的, 最初见于 Shope 等^[4]于 1933 年的报道。1952 年 Kidd 等^[5]报道新西兰种属兔缺乏针对该肿瘤的抗体, 并确定为稳定的可移植细胞株。目前倾向于动物自身接种传代, 有学者提出动物自身多次传代的肿瘤会较早出现坏死, 且坏死明显, 其恶性程度明显增加^[6]。我们的预实验传代了 8 次, 并未发现肿瘤恶性程度有显著变化。在传代过程中, 我们认为从兔后腿皮下注射瘤粒时, 需略微穿透肌肉层, 如果单作皮下注射, 肿瘤往往生长缓慢, 延长实验周期; 而肌肉层注射太多, 肿瘤往往早期出现转移, 不利于实验。

3.2 兔 VX2 肝种植肿瘤模型

兔 VX2 肝种植肿瘤模型一般有 2 种植方法: ①兔后肢外侧接种成瘤传代, 以瘤粒的形式进行肝脏种植; ②肿瘤细胞培养传代, 以细胞悬液的形式进行肝脏种植。后者的制作受诸多因素影响, 远没有前者简单、经济。使用瘤粒种植又可分为瘤粒包埋法和瘤粒悬浮液针头注入法。曾晓华等^[7]提出利用动脉穿刺针将瘤粒直接注入肝内, 亦不失为一种方法。许多学者提到了采用包埋法, 种植过程中需注意止血, 使用明胶海绵或生物胶^[8-10]。我们在前期实验亦采用包埋法, 但结果不甚满意, 动物存活率低, 可能与手术创伤大有关。在后期实验时我们采用开小切口(位置很关键!一般在剑突下偏左方)用纱布轻柔拉出肝左叶, 直接注射瘤粒悬浮液, 使用 50 ml 注射器所配的针头。注射完毕后用纱布按压见无出血后即可关腹。

技术熟练后从开腹到完成种植开始缝合只需 5 min。且基本无出血, 小切口除轻柔拉出的部分肝左叶, 其余均没有暴露在体外。这样使手术相对简化, 节省了时间, 成功率达到 100%。

种植过程有如下体会: ①取出肿瘤组织后, 在超净台下无菌分离, 要仔细剔除肌肉、血管及内部坏死的组织, 选取外围生长旺盛呈鱼肉样富有弹性的组织; ②严格无菌操作, 防止感染; ③术后皮肤缝合建议采用褥式缝合, 可有效防止兔舔咬伤口; ④重视术后护理, 肌注抗生素预防感染, 兔房安装空调, 保持干燥和通风。

3.3 兔 VX2 肝种植肿瘤的血供

兔 VX2 肝种植肿瘤血供是否丰富, 直接关系到该模型能否作为介入治疗模型。目前在这一点上尚有争议, 持肯定观点者认为 DSA 可见明显肿瘤染色和碘油沉积, 超声表现及病理表现也均支持此观点^[11-14]; 持否定观点者则认为 CT 增强扫描见强化不明显, 动脉期所见乃是肿瘤边缘丰富的血管或血窦样结构^[15, 16]。本实验综合影像学表现, 倾向于前一观点, 理由是: ①虽然肿瘤在 CT 上强化不甚明显, 但 DWI 上却呈明显高亮信号, 而 DWI 主要是对血供丰富肿瘤敏感^[17]; ②DSA 证实肿瘤供血动脉明显增粗, 肿瘤血管丰富、染色明显。持否定观点者认为 CT 增强扫描未见明显强化, 说明肿瘤血管不丰富。我们造影发现, 兔的胃肠道动脉较粗大、供血丰富, 而肝动脉相对明显细小, 导致肝内血流量相对明显减少, 腹腔干动脉 DSA 很难显示肝脏的染色, 这是 CT 增强时肿瘤相对强化不明显的主要原因。经肝动脉超选择插管后 DSA 见肿瘤供血动脉较正常肝动脉明显增粗, 并见不规则的大量肿瘤血管及明显的肿瘤染色, 说明 VX2 肝种植肿瘤依然属于血供丰富型。

3.4 兔 VX2 肝种植肿瘤的影像评价

CT 平扫 + 增强可以显示肿瘤与正常组织的密度差异, 并且检查时间最短, 但显示效果没有 MR 平扫效果好。MR 的 T1WI 和 EPI 序列 T2WI 基本可以反映肿瘤的生长情况, 且在瘤体出血、坏死囊变等不同成分的识别上具有一定优势, 但扫描时间稍长。而 DWI 的原理是利用水分子布朗运动导致质子周围局部磁场相位分布发生变化, 通过外加一极性、快速切换的扩散梯度脉冲来扩大这种相位分布的变化, 从而在活体内监测水分子的扩散运动。对水分子扩散明显受限的 VX2 肿瘤可呈高亮信号^[17, 18]。由于 DWI 独特的成像原理, 在反映肿瘤内部的水分子运动和病灶发展方面有独特的价值。DSA 可清晰地显示肿瘤血供及染色, 可更直观地显示肿瘤的分布, 对治疗有极大的参考价值^[19]。我们认为 CT、MR 平扫 EPI 序列和 DWI 互有优势, 各自从不同角度对肿瘤影像作出评价, 可对介入治疗后肿瘤作出较准确评估, DSA 可以比较真实地反映肿瘤血供情况, 对介入治疗作出全面评估。

[参 考 文 献]

- [1] 贾雨辰, 程红岩, 陈 栋, 等. 原发性肝癌的介入治疗[J] 肝胆外科杂志, 1998, 6 : 316 - 318.
- [2] Camma C, Schepis F, Orlando A, et al. Transcatheter chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials[J] Radiology, 2002, 224 : 54 - 57.
- [3] Livraghi T. Radiofrequency ablation, PEIT, and TACE for hepatocellular carcinoma[J] Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003, 10 : 67 - 76.
- [4] Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology[J] J Exp Med, 1933, 58 : 607 - 624.
- [5] Rous P, Kidd JG, Smith WE. Experiments on the cause of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the VX2 carcinoma of the power to immunize hosts against the papilloma virus[J] J Exp Med, 1952, 96 : 159 - 174.
- [6] 邵国良, 周康荣, 王建华, 等. 介入治疗实验研究中兔 VX2 肝癌模型制作的改进 CT 评价[J] 临床放射学杂志, 2000, 19 : 653 - 654.
- [7] 曾晓华, 冯敢生, 王颂章, 等. 建立免移植性 VX2 肝癌模型的改进[J] 介入放射学杂志, 2004, 13 : 551 - 553.
- [8] 柳 曦, 李 欣, 赵俊功, 等. 兔 VX2 肝癌模型制作及综合影像评价[J] 实用放射学杂志, 2002, 18 : 132 - 134.
- [9] 吕朋华, 王 杰, 苗 毅, 等. 兔肝 VX2 转移瘤模型的建立及影像学表现[J] 南京医科大学学报(自然科学版), 2003, 23 : 545 - 547.
- [10] 刘瑞宝, 徐 克, 李 枫, 等. 耐药 VX2 肝癌模型的建立[J] 介入放射学杂志, 2004, 13 : 354 - 357.
- [11] Miao Y, Ni Y, Mulier S, et al. Treatment of VX2 liver tumor in rabbits with "wet" electrode mediated radio-frequency ablation[J] Eur Radiol, 2000, 10 : 188 - 194.
- [12] Pauser S, Wagner S, Lippmann M, et al. Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by MR imaging therapy monitoring: an experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver[J], Cancer Res, 1996, 56 : 1863 - 1867.
- [13] 蔡 萍, 张 琳, 丁仕义, 等. 兔 VX2 肝移植瘤模型的建立及 CT 评价[J] 第三军医大学学报, 2004, 26 : 1924 - 1927.
- [14] 张洪新, 王执民, 曹 伟, 等. 兔 VX2 移植性肝癌模型的建立及其影像学表现[J] 介入放射学杂志, 2002, 11 : 193 - 196.
- [15] Kuszyk BS, Bluemke DA, Choti MA, et al. Contrast-enhanced CT of small hypovascular hepatic tumor: effect of lesion enhancement on conspicuity in rabbits[J] AJR, 2000, 174 : 471 - 475.
- [16] 贾洪顺, 全显跃, 曾 盛, 等. 兔 VX2 肝癌 CT、MRI 动态评价[J] 第一军医大学学报, 2002, 22 : 141 - 144.
- [17] Geschwind JH, Artemov D, Abraham S, et al. Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis[J] J Vasc Interv Radiol, 2000, 11 : 1245 - 1255.
- [18] 袁友红, 肖恩华. 肝脏磁共振扩散成像及进展[J] 实用放射学杂志, 2003, 19 : 945 - 948.
- [19] 吴红英, 冯敢生, 梁惠民, 等. DSA 技术在兔肝脏介入实验中的应用研究[J] 临床放射学杂志, 2005, 24 : 84 - 85.

(收稿日期 2005-12-20)