

## ·实验研究 Experimental research·

## 兔肝癌改良接种模型的生长特性研究

杨康健, 赵思源, 赵斌羽, 曹 玮, 李 超, 杨清峰, 王执民, 张洪新

**【摘要】 目的** 通过改良接种方式建立兔肝癌模型,分析并观察该肿瘤的生长特性。**方法** 经肝包膜植入瘤组织块(约  $10^6 \sim 10^8$  个瘤细胞)接种于 20 只兔的肝左叶,建立兔肝癌模型。观察:①肿瘤在实验兔中生长 7、10、14、17 和 21 d 时的体积(B 超测),并计算肿瘤生长率。②大体及光镜下观察瘤组织形态特征。**结果** 瘤体呈指数性生长,在接种 17 d 后生长迅速。组织病理表明该瘤在肝组织中浸润式生长,肿瘤体积增长快于直径增长,其性状与 VX2 鳞状细胞癌特征相似。**结论** 瘤块种植是建立兔肝癌模型的首选方式,该模型是肝癌的基础及临床的理想动物模型。

**【关键词】** 兔 VX2; 肝癌; 移植方式; 生长特性

中图分类号:R735.7 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-03-0211-03

**The growing features of rabbit VX2 hepatic carcinoma model prepared with modified inoculation method** YANG Kang-jian, ZHAO Si-yuan, ZHAO Bin-yu, CAO Wei, LI Chao, YANG Qing-feng, WANG Zhi-min, ZHANG Hong-xin. Department of Interventional Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an, Shaanxi Province 710038, China

Corresponding author: ZHANG Hong-xin

**【Abstract】 Objective** To establish a rabbit VX2 liver tumor model by transplanting tumor tissue mass into the rabbit's liver, to analyze and observe the growing features of the liver tumor. **Methods** The tumor tissue mass (about  $10^6 - 10^8$  VX2 liver tumor cells) was inoculated into the left hepatic lobe in 20 rabbits to establish rabbit VX-2 hepatic carcinoma model. The observation included the following two respects. (1) The tumor's volume at 7, 10, 14, 17 and 21 days after the procedure was measured by ultrasonography and the growth rate of tumor was calculated. (2) The morphological feature of the tumor was inspected both macroscopically and microscopically. **Results** The growing pattern of the tumor was compatible with the exponential curve. Seventeen days after transplantation the increase rate of the tumor volume was much higher than that of the tumor diameter. Histopathologically, the growing pattern of the tumor took the form of infiltrative way, with its appearance being quite similar to the VX2 squamous cell carcinoma. **Conclusion** Transplantation of tumor tissue mass is the technique of first choice to establish the VX2 liver carcinoma model in rabbits. This experimental model is a very ideal animal form for both clinical and fundamental studies of liver carcinoma. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 211-213)

**【Key words】** rabbit VX2 transplanted tumor model; hepatic carcinoma; transplanting method; growing feature

有效评价新的介入技术及其治疗效果的动物模型是影响介入医学发展的重要因素。原发性肝癌的介入性治疗已成为中晚期肝癌的首选治疗方案,研究肝癌介入治疗的动物模型成为关注的重点,而对于动物模型的生长特点及性状的熟悉亦是重中之重<sup>[1-2]</sup>。本研究利用我们已建立的改良肝癌接种模型,观察和分析其生长特点及性状,为介入性基础

实验研究的开展提供可靠的数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

20 只新西兰白兔,每只体质量 2.5 ~ 2.7 kg,雌雄各半,由第四军医大学动物实验中心提供。癌株种类为 VX2 鳞状细胞癌,由日本京都 Funabashi Farm 公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 模型制作 瘤块取自兔后腿外侧肌肉接种瘤株 2 周后的实质性包块,切取包块边缘生长旺盛的鱼肉样组织,用眼科剪剪为  $0.2 \sim 0.3 \text{ mm}^3/\text{块}$ ,与生理盐水混悬  $10^6 \sim 10^8$  个瘤细胞/ml。实验兔经戊巴比妥钠( $30 \text{ mg/kg}$ )静脉麻醉后,取上腹部正中切开腹腔,将兔肝左中央叶充分暴露。挑开肝包膜,将悬液用 16 号针头注入肝实质内接种。

1.2.2 观察指标 ①利用 B 超监测肿瘤在 7、10、14、17 和 21 d 时的体积变化。②瘤组织大体及镜下形态学观察。

1.3 Student's *t* 试验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 实验兔接种瘤块后不同时间肿瘤体积、肿瘤直径及生长率(TGR)

接种 17 d 的肿瘤体积、直径较前增长迅速, TGR 为 93.9%, 与前比较差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 接种 21 d 的肿瘤体积、直径较前增长缓慢, TGR 为 60.6%, 与前比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表 1、图 1 为肿瘤生长曲线。

表 1 不同接种时间的肿瘤体积、肿瘤直径及生长率  
( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

时间(d)	a(cm)	b(cm)	V( $\text{cm}^3$ )	TGR(%)
7	$0.76 \pm 0.03$	$0.53 \pm 0.06$	$0.111 \pm 0.030$	-
10	$0.97 \pm 0.03$	$0.66 \pm 0.04$	$0.213 \pm 0.046$	58.9
14	$1.26 \pm 0.02$	$0.82 \pm 0.05$	$0.44 \pm 0.088$	61.4
17	$1.67 \pm 0.04$	$1.20 \pm 0.05$	$0.852 \pm 0.135$	93.9 <sup>a</sup>
21	$2.35 \pm 0.13$	$1.37 \pm 0.07$	$2.21 \pm 0.267$	60.6

TGR =  $(a_2b_2 - a_1b_1) / a_1b_1 \times 100$ , <sup>a</sup> 与 14 d 时比较  $P < 0.05$

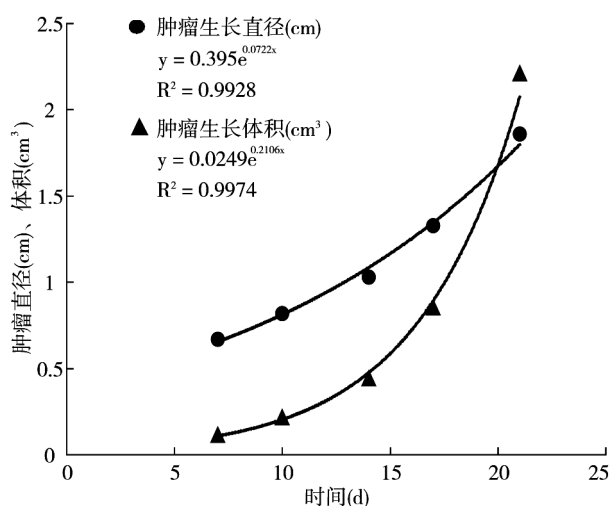


图 1 肿瘤生长直径、体积与接种天数间的关系

2.2 肿瘤形态学观察

2.2.1 大体观察 肿瘤在肝实质内呈圆形, 结节

状, 无包膜。肿瘤结节呈灰白色, 鱼肉样, 质硬, 其内可见丰富的供瘤血管。

2.2.2 光学显微镜所见 可见肝内浸润性瘤巢, 与肝实质无明显边界, 间质分界不清, 结缔组织较少, 瘤巢边缘分布着被浸润的肝索结构。肿瘤细胞弥散排列, 可见纤维间隔, 新生毛细血管丰富(图 2)。

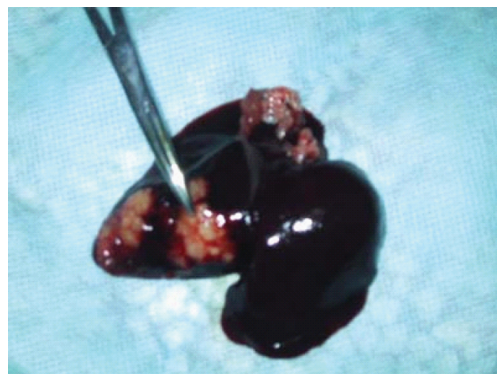


图 2 兔 VX2 肝癌的标本图片

## 3 讨论

本肿瘤细胞株起源于 Shope 病毒诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞癌, 经过 72 次移植传代后正式建株, 命名为 VX2。它是一种可移植的瘤株, 生物学性质稳定, 并具有高转移的特性, 可接种到兔的肾脏、肝脏, 肌肉等组织器官内, 制成原位肿瘤动物模型<sup>[3]</sup>。国外文献多利用瘤细胞接种复制模型<sup>[4-6]</sup>, 本实验采用瘤块注射法复制出的 VX2 兔肝癌模型, 具有接种方法简单、成功率高、重复性好、模型性状稳定的特点。

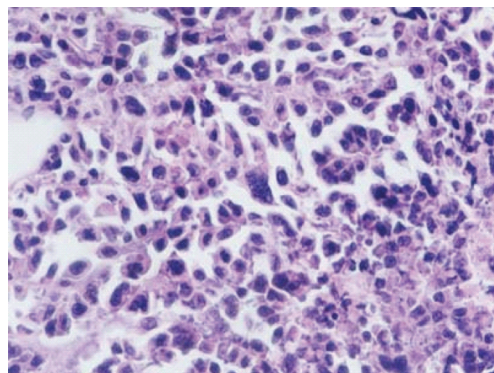


图 3 兔 VX2 肝癌的组织病理切片(HE 染色)HE × 200

本实验结果显示, 瘤株种植于肝脏成活后呈指数性生长, 2 ~ 3 周生长最旺盛, 其体积迅速增大, 切面呈实质性, 中心无变性坏死。4 周后肿瘤中心出现变性坏死灶, 并有肺和腹腔淋巴结转移, 6 ~ 7 周肿瘤中心呈大片液化坏死灶并形成囊腔。故进行肿瘤传代、模型制作及进行实验研究时, 不宜太晚, 一般以 4 周为宜, 以免因肿瘤坏死和转移影响实验结果。

可供介入实验的肝癌动物模型, 是进行介入基

础实验研究的前提。文献报道瘤细胞浓度最好在  $10^6$  个/ml 以上<sup>[7]</sup>,局部环境为血供充足,营养丰富的组织,如肌肉、肝脏等。本研究证实通过瘤块种植法建立的兔肝癌模型病理形态学表现为肝鳞状细胞癌,而非肝细胞癌,但为血供丰富的实体瘤,肿瘤内含有丰富的滋养血管,无明显的血窦腔。虽其组织形态、生物学特性与原发肝癌有所不同,但可用作有关肝癌治疗学及肝癌影像学等的临床前期研究<sup>[8-11]</sup>。

#### [参 考 文 献]

- [1] 严惠芳,傅文君,任文龙.可移植性动物肿瘤株的冻存和复苏[J].医药工业,1986,17:28-29.
- [2] Prat F, Centarti M, Sibille A, et al. Extracorporeal high-intensity focused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit[J]. Hepatology, 1995, 21: 832-836.
- [3] Swistel AJ, Bading JR, Raaf JH. Intraarterial versus intravenous Adriamycin in the rabbit VX2 tumor system[J]. Cancer, 1984, 53: 1397-1404.
- [4] Matsumura T, Moriyasu F, Kono Y, et al. Contrast-enhanced power Doppler imaging of the liver-preliminary animal study [J]. Nippon Rinsho, 1998, 56: 985-989.
- [5] Leander T, Harada T, Yuri Y, et al. CT and MR imaging of the liver using liver-specific contrast media. A comparative study in a tumor model[J]. Acta Radiol, 1996, 37: 242-249.
- [6] Kigure T, Harada T, Yuri Y, et al. Ultrasound-guided microwave thermotherapy on a VX2 carcinoma implanted in rabbit kidney[J]. Ultrasound Med Biol, 1995, 21: 649-655.
- [7] Okada M, Kudo S, Miyazaki O, et al. Antitumoral efficacy and pharmacokinetic properties of pirarubicin upon hepatic intra-arterial injection in the rabbit VX2 tumor model[J]. Br J Cancer, 1995, 71: 518-524.
- [8] 曹 玮,万 毅,张洪新,等.脉冲式温热灌注对肿瘤血管渗透性的影响[J].介入放射学杂志,2008,17:266-268.
- [9] 李广琪,陈毓秀,康 军,等.兔肝 VX2 移植瘤改良模型的建立[J].武警医学院学报,2007,16:369-372.
- [10] 曹 玮,彭建明,王执民,等.60℃碘油栓塞对兔肝 VX2 肿瘤血供的影响[J].实用放射学杂志,2008,24:837-839.
- [11] 曹 玮,吴发伟,刘毅勇,等.高强度聚焦超声对中晚期肝癌患者机体免疫细胞及其活性的影响 [J]. 介入放射学杂志,2009,18:308-310.

(收稿日期:2010-02-25)

# 兔肝癌改良接种模型的生长特性研究

作者：[杨康健](#), [赵思源](#), [赵斌羽](#), [曹玮](#), [李超](#), [杨清峰](#), [王执民](#), [张洪新](#), [YANG Kang-jian](#), [ZHAO Si-yuan](#), [ZHAO Bin-yu](#), [CAO Wei](#), [LI Chao](#), [YANG Qing-feng](#), [WANG Zhi-min](#), [ZHANG Hong-xin](#)

作者单位：[西安第四军医大学唐都医院介入放射科, 710038](#)

刊名：[介入放射学杂志](#) [ISTIC](#) [PKU](#)

英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)

年, 卷(期): 2010, 19(3)

被引用次数: 0次

## 参考文献(11条)

1. [严惠芳, 傅文君, 任文龙](#) [可移植性动物肿瘤株的冻存和复苏](#) 1986
2. [Prat F, Centarti M, Sibille A](#) [Extracorporeal highintensity focused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit](#) 1995
3. [Swistel AJ, Bading JR, Raaf JH](#) [Intraarterial venus intravenous Adriamycin in the rabbit VX2 tumor system](#) 1984
4. [Matsumua T, Moriyau F, Kono Y](#) [Contrast-enhanced power Doppler imaging of the liver-preliminary animal study](#) 1998
5. [Leander T, Harada T, Yuri Y](#) [CT and MR imaging of the liver using liver-specific contrast media.A comparative study in a tumor model](#) 1996
6. [Kigure T, Harada T, Yuri Y](#) [Ultrasound-guided microwave thermotherapy on a VX2 carcinoma implanted in rabbit kidney](#) 1995
7. [Okada M, Kudo S, Miyazaki O](#) [Antitumoral efficacy and pharmacokinetic properties of pirarubicin upon hepatic intraarterial injection in the rabbit VX2 tumor model](#) 1995
8. [曹玮, 万毅, 张洪新, 曹晓明, 刘毅勇, 李文献](#) [脉冲式温热灌注对肿瘤血管渗透性的影响](#)[期刊论文]-[介入放射学杂志](#) 2008(4)
9. [李广琪, 陈毓秀, 康军, 张洪新](#) [兔肝Vx-2移植瘤改良模型的建立](#)[期刊论文]-[武警医学院学报](#) 2007(4)
10. [曹玮, 彭建明, 王执民, 张洪新, 杨利, 吕发勤, 刘婧](#) [60℃碘油栓塞对兔肝VX2肿瘤血供的影响](#)[期刊论文]-[实用放射学杂志](#) 2008(6)
11. [曹玮, 吴发伟, 刘毅勇, 万毅, 齐连君, 张洪新](#) [高强度聚焦超声对中晚期肝癌患者机体免疫细胞及其活性的影响](#)[期刊论文]-[介入放射学杂志](#) 2009(4)

## 相似文献(10条)

1. 期刊论文 [曹玮, 王执民, 张洪新, 梁志会, 齐连君, 李文献, 倪代会](#) [兔VX2肝癌模型的移植方式及生长特性的研究](#) -[实用放射学杂志](#)

2003, 19(2)

目的:探讨不同肿瘤方式建立兔VX2肝癌模型的成功率,并分析该肿瘤的生长特性.方法:60只新西兰白兔随机分3组,每组20只.将VX2瘤细胞(5×10<sup>7</sup>个)经肝动脉或经肝包膜分别接种于2组兔的肝左叶,第3组经肝包膜植入瘤组织块(约含106~109个瘤细胞)建立肝癌模型.观察:①不同组肿瘤的成活率.②肿瘤7 d、10 d、14 d、17 d、21 d时的体积(B超测),并计算肿瘤生长率.③大体及镜下(光镜和电镜)瘤组织形态特征.④VX2移植性肝癌的DSA影像特征.结果:3组植瘤成活率分别为7/20、10/20、19/20,第3组瘤块植瘤成活率最高(P<0.05),瘤体呈指数性生长,组织病理及电镜表明该瘤在肝组织中浸润式生长,其性状与VX2鳞状细胞瘤特征相似.DSA影像显示该移植性肝癌具有丰富的血供.结论:瘤块种植是建立兔肝癌模型的首选方式,该模型是肝癌的基础及临床的理想动物模型.

2. 学位论文 [汪俊萍](#) [兔VX2种植性肝癌模型不同生长期的MR扩散加权成像及与病理对照研究](#) 2008

目的:建立实验性兔VX2种植性肝癌模型,行不同时间点不同b值下的肿瘤MR扩散加权成像(DWI)检查,从中筛选出合适的b值;比较不同时间点肿瘤DWI检查结果的差异及其病理基础,以初步探讨DWI检查对监测兔VX2种植性肝癌模型生长特点的价值;比较不同时间点肿瘤实性部分ADC值和eADC值的差异及其演变规律,分析不同时间点兔VX2种植性肝癌模型的肿瘤实性部分ADC值、eADC值与其细胞密度和增殖细胞核抗原(PCNA)指数的相关性,进一步探讨不同时间点肿瘤实性部分ADC、eADC值差异的病理基础。

材料与方法:新西兰实验兔44只,采用开腹直视下肿瘤组织块穿刺接种法建立兔VX2种植性肝癌模型,每只实验兔只接种一个部位,均种植在肝左叶,成功建立模型38只.将实验兔随机分为两组,每组19只,分别于接种后第14天和22天行磁共振检查,使用美国GE公司生产的1.5T TwinSpeed Infinity with Excite II 超导型磁共振成像系统,应用3英寸表面线圈,先行常规T1WI和T2WI检查,DWI检查采用单次激发SE-EPI序列,同时在X、Y、Z轴三个方向上施加敏感梯度脉冲,取0、200s/mm<sup>2</sup>、0、400s/mm<sup>2</sup>、0、600s/mm<sup>2</sup>、0、800s/mm<sup>2</sup>和0、1000s/mm<sup>2</sup>五组b值,得到各b值下不同时间点兔VX2种植性肝癌模型肿瘤的DWI图像及工作站处理后的ADC图和eADC图,并分别测量各b值组的不同时间点肿瘤实性部分的ADC值及eADC值.MRI检查完毕后获取全部实验兔肝脏标本并按扫描方向切层,行常规HE染色和免疫组织化学PCNA染色.采用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统,细胞密度的计数方法是计算每个采集野内肿瘤细胞核总面积与细胞核外其余部分(包括肿瘤细胞胞浆、细胞外间隙)的面积比值,兼顾肿瘤组织细胞内及细胞外空间分布的总体致密程度,取5个视野的平均值作为肿瘤的细胞密度,以百分比表示;PCNA染色采用单克隆抗体二步法标记细胞核,选择PCNA染色阳性细胞分布最密集的区域,采集并计数PCNA染色阳性细胞数和肿瘤细胞总数,计算肿瘤PCNA指数(PCNA阳性细胞/月中瘤细胞总数),取5个视野的平均值作为肿瘤的PCNA指数,以百分比表示.分析指标包括:①观察不同时间点VX2种植性肝癌模型肿瘤的体积变化、倍增时间以及T1WI、T2WI和DWI图像的信号特点;②分析不同b值组DWI图像的肿瘤、肝实质信号强度比(SIR)、信噪比(SNR)和肿瘤、肝实质对噪声比(CNR),评价DWI图像质量,选取最佳b值;③重点观察和分析不同时间点肿瘤DWI图、ADC图和eADC图的表现及其差异;并与大体病理进行对照;④进一步分析和比较不同时间点肿瘤实性部分ADC值和eADC值的差异及其演变规律;⑤重点分析不同时间点兔VX2种植性肝癌模型实性部分ADC值、eADC值与肿瘤细胞密度及PCNA指数之间的相关性。

结果:①采用开腹直视下肿瘤组织块穿刺接种法建立兔VX2种植性肝癌模型的成功率为86%(38/44),均于肝左叶形成孤立性肿瘤,22天组与14天组比较,肿瘤体积增大明显,前者平均体积约为0.32cm<sup>3</sup>,后者平均体积约为1.76cm<sup>3</sup>,倍增时间为3.2天;②所有肿瘤在MRT1WI呈稍低信号,在T2WI上呈稍高信号,边界清楚,22天组中有4个肿瘤中心可见斑片状T2信号;③不同b值组所有肿瘤在DWI图像上均呈明显高信号,并与周围肝实质形成鲜明对比;④随b值的升高,DWI图像SIR逐渐增加,SNR和CNR逐渐下降,然而当b值为1000s/mm<sup>2</sup>时仍可清楚分辨肿瘤,并可进行实性部分ADC值和eADC值测量;⑤14天组所有肿瘤的ADC图、eADC图信号均匀,大体病理显示所有肿瘤质地均匀,无坏死囊变区,与ADC图和eADC图表现一致;22天组所有肿瘤中心部分在ADC图、eADC图上均可见斑片状坏死囊变区的信号,且与大体病理所显示的坏死囊变区范围基本一致,而在常规T2WI上仅有4例肿瘤中心可见斑片状高信号;⑥同一时间点不同b值组肿瘤实性部分ADC值随b值增大而下降,eADC值随b值增大而升高;⑦在各b值组22天组兔VX2种植性肝癌模型的肿瘤实性部分ADC值均较14天组下降,eADC值均较14天组升高,而细胞密度和PCNA指数较14天组上升.两个时间点肿瘤实性部分的ADC值与其细胞密度、PCNA指数呈负相关,(r=-0.695,p=0.000;r=-0.698,p=0.000);而eADC值则与其细胞密度、PCNA指数呈正相关,且以b值取0、1000s/mm<sup>2</sup>时相关性最强(r=0.673,p=0.000;r=0.682,p=0.000)。

结论:①采用开腹直视下肿瘤组织块穿刺接种法建立兔VX2种植性肝癌模型成功率较高,该模型具有容易复制,生长迅速,较易出现坏死囊变等特点;②在兔VX2种植性肝癌模型的DWI成像参数中以选择b值为1000s/mm<sup>2</sup>比较合适;③MRDWI检查的ADC图和eADC图能早期检出兔VX2种植肝癌模型肿瘤的坏死囊变区,在动态追踪肿瘤发生、发展和生长特性方面具有重要的价值,是常规MR检查的有益补充;④随着肿瘤种植时间的延长,肿瘤实性部分ADC值减低,eADC值升高,具有一定的规律性;⑤在影响兔VX2种植性肝癌模型肿瘤实性部分ADC值及eADC值的因素中,细胞密度可能起关键作用,而肿瘤恶性程度与其细胞密度、PCNA指数密切相关,通过测量肿瘤实性部分ADC值及eADC值,有可能为在体推测肿瘤恶性程度和病理分级提供新的方法。

3. 期刊论文 [张克勤, 张积仁, 魏红梅, ZHANG Ke-qin, ZHANG Ji-ren, WEI Hong-mei](#) [氩氮刀冷冻消融和射频、微波热凝固治疗兔VX2肝癌的对比](#)



目的 通过观察肿瘤残留和转移情况、治疗前后免疫功能变化以及兔的生存期并加以对比,探讨氩氦刀冷冻、射频消融(RFA)及微波凝固(MCT)治疗兔VX2肝癌的疗效.方法 将45只兔VX2肝癌模型随机分为五组,每组9只,即氩氦刀冷冻组(A组)、射频消融组(B组)、微波凝固组(C组)、手术切除组(D组)和对照组(E组).观察肿瘤转移情况(肝内转移、肺部转移、腹腔淋巴结转移和腹腔种植转移)和可溶性白介素-2受体(sIL-2R)变化及生存期等.结果 ①肝内肿瘤残留:在A、B、C、D、E组分别为2、4、5、0、9只,差异有显著性( $\chi^2=20.700$ , $P=0.000$ );肝内转移分别为1、3、4、6、9只,差异有显著性( $\chi^2=15.652$ , $P=0.004$ );腹腔种植转移率分别为2、5、6、0、1只,差异有显著性( $\chi^2=13.894$ , $P=0.008$ );肺部及腹腔淋巴结转移各组均为9只,差异无显著性.②各组治疗前sIL-2R无明显差异,治疗后各组间差异有显著性( $F=31.58$ , $P=0.000$ );各组内治疗前后比较,A组、B组、C组和D组差异均无统计学意义,E组差异有显著性( $t=10.119$ , $P=0.000$ ).③平均生存期:氩氦刀冷冻、RFA、MCT和手术切除组与对照组比较有显著性差异( $F=73.084$ , $P=0.000$ );氩氦刀冷冻和手术切除组显著高于RFA、MCT组;氩氦刀冷冻和手术切除组之间、RFA和MCT组之间无显著性差异.结论 在治疗兔VX2肝癌中,无论是在减少肿瘤残留和转移方面,还是在增强机体免疫力方面及延长实验兔生存期方面,氩氦刀冷冻治疗均优于RFA和MCT;而RFA和MCT疗效相当.

4. 期刊论文 邱晏.陈保东.韩庆.QIU Min.CHEN Bao-dong.HAN Qing 兔VX2肝癌模型的改良制作及其生长特性 -现代医药卫生2006, 22 (13)

目的:探讨兔VX2肝癌模型的改良种植方式,并分析该肿瘤的生长特性.方法:将30只新西兰白兔随机分为3组,每组10只.再将瘤块组织经剖腹途径植入肝脏,观察肿瘤7、14、21、28、35天时的体积(B超测),并计算肿瘤生长率,大体及镜下(光镜)瘤组织形态特征以及VX2移植性肝癌的CT影像特征.结果:2~3周生长最旺盛,其体积迅速增大,进行实验研究时,不宜太晚,一般不超过4周为宜,以免因肿瘤坏死和转移影响实验结果.结论:改良的肿瘤种植方式是建立兔肝癌模型的可靠方式,该模型是肝癌的基础及临床的理想动物模型.

5. 学位论文 杜乐辉.Fe<3>O<4>纳米磁流体介导的50℃局部热疗对兔VX2肝癌作用的实验研究 2009

第一部分兔VX2肝癌模型的建立及超声影像评价

目的:建立兔VX2肝癌模型,探讨该模型的超声影像学表现并进行比较评价,为该模型的应用提供实验依据。

方法:开腹直视下穿刺法将VX2瘤组织块种植于20只日本大耳白兔肝左叶,建立兔肝癌模型。分别于接种后2周、4周行彩色多普勒、能量多普勒及超声造影检查,半定量分级法分别比较三种超声对肿瘤血流检测率的敏感性,每次超声检查后随机处死10只荷瘤兔,测量肿瘤的实际大小取标本进行病理学鉴定,并与超声结果进行对照。

结果:兔肝癌种植成功率为100%,且该法建立的兔VX2肿瘤大小较一致,同期间比较无显著性差异( $P>0.05$ )。超声与实际测得肿瘤的最大径比较差异无显著性( $P>0.05$ ),两者具有很好的-致性。彩色多普勒、能量多普勒及超声造影均能敏感的检出肿瘤内血流信号,种植2周的小肿瘤以瘤周供血为主,能量多普勒对血流的检出率明显高于彩色多普勒,而种植4周的较大肿瘤血管丰富,表现为瘤周粗大的供血血管或散在弥漫分布的点、条状血流,以高速低阻血流为主,彩色多普勒和能量多普勒均显示以三级病灶为主,无显著性差异,种植2周和4周的肿瘤超声造影显示“快进快出”的增强模式,可见完整、细致的肿瘤血管分支及其微小血管。VX2瘤细胞呈团片状或巢状浸润性分布,可见多个核分裂相,与肝实质无明显边界。

结论:瘤组织块穿刺种植法建立的兔VX2肝癌模型复制成功率高且稳定,实验可比较好。超声能有效的监测肿瘤大小及其变化。彩色多普勒和能量多普勒能敏感的检测出肿瘤血流,但能量多普勒对低速血流敏感,尤其是对小肿瘤,而超声造影可更有效的反映大小肝癌瘤内微血管分布及血流灌注情况。

第二部分磁流体介导的50℃局部热疗兔VX2肝癌的可行性研究和对肿瘤生长的影响

目的:评估Fe3O4纳米磁流体的体内外升温性能,初步评价磁流体局部热疗兔VX2肝癌模型的可行性及其对肿瘤生长的影响。

方法:将纳米磁流体进行透射电镜检测体和体外不同电流强度下的升温实验。将接种14天的荷瘤兔随机分为5组:即假治疗对照组(PT组)、生理盐水对照组(NS组)、磁流体对照组(MF组)、磁流体热疗I组(MFH1组)、磁流体热疗II组(MFH2组)。MFH1组在直接瘤内注射磁流体后立即暴露于交变磁场,50℃加热30min,MFH2组在5天后再重复加热一次。注射磁流体后第1天和第14天进行CT扫描。所有荷瘤兔分别于第一次热疗前和第一次热疗后5天、14天取血检查血常规及肝肾功能。种植后3周热疗组各处死2只实验兔病理学检查,4周后处死所有实验兔,测量肿瘤大小,计算肿瘤的体积抑制率,大体观察标本并进行病理学检查。

结果:磁流体粒径分布尚均匀,10nm左右,有部分聚集。体外磁流体升温速率随电流增大而增大,在电流为100A即磁场强度为47.95Gs时,磁流体先快速上升至70℃后变缓慢最后维持在80℃不上升。磁流体体内可在5~10min内升至50℃,通过手动调节磁场强度可将肿瘤温度控制在相对稳定的范围内50℃±2℃,而正常肝组织和直肠几乎不升温。CT可清晰地显示体内磁流体局限性的高密度影。热疗前后各组间同时间点及同组间不同时间点的血常规、肝肾功能比较均无明显差异( $P0.05$ )。种植后4周各组肿瘤最大径分别(4.25±0.68)cm、(4.70±1.12)cm、(4.16±0.88)cm、(2.83±0.51)cm、(2.03±0.34)cm,肿瘤体积分别为(25.82±11.92)cm<sup>3</sup>、(32.01±13.14)cm<sup>3</sup>、(23.35±12.17)cm<sup>3</sup>、(7.43±1.86)cm<sup>3</sup>、(2.62±1.35)cm<sup>3</sup>。MFH1组和MFH2组的肿瘤体积抑制率分别为68.19%~76.79%和88.8%~91.87%,肿瘤生长受到明显抑制,与各对照组间比较差异均具有显著性( $P<0.05$ )。大体观察热疗组肿瘤区域可见明显的凝固性坏死,与周围组织分界清楚,磁流体滴布于瘤内,MFH1组可见局灶的结节状或环形新鲜肿瘤组织残存,MFH2组几乎全部坏死,呈豆腐渣样或液化。显微镜下对照组肿瘤细胞密集,生长活跃,可见散在小坏死灶,MF组瘤内磁流体呈团状分布,热疗组肿瘤大片坏死呈暗红色的颗粒状或无结构组织,部分肿瘤细胞碎裂、核固缩,磁流体呈放射状弥漫分散于瘤内,可见摄取磁流体的肿瘤细胞及淋巴细胞浸润,坏死组织周围形成厚的纤维组织包裹,MFH1组尚可见局灶性或周围环形的活肿瘤细胞残存,MFH2组肿瘤组织几乎完全坏死,甚少见活肿瘤细胞残存。

结论:Fe3O4纳米磁流体在体内外均具有良好的升温性能,在体内可使肿瘤区成功的获得较均匀分布的50℃热消融温度,而正常组织不升温。磁流体对细胞无明显毒性;50℃的MFH可导致肿瘤组织明显坏死,显著抑制肿瘤生长;同时,热疗可促进瘤内磁流体的分散,实现热疗的旁效应;兔VX2瘤细胞可摄取磁性纳米粒子;磁热疗对肿瘤组织的杀伤作用与热疗次数相关;CT可作为敏感地检测体内磁流体分布的手段。一次性注射磁流体后,磁流体介导的50℃热疗兔VX2肝癌安全、可行、有效,靶向性好,且可进行重复热疗,具有潜在的临床应用价值。

第三部分磁流体介导的50℃局部热疗兔VX2肝癌的超声造影评价和对血管作用的研究

目的:探讨超声造影对磁流体热疗兔VX2肝癌的疗效评估价值,探讨磁流体热疗对兔VX2肝癌营养血管及对血管生成因子VEGF表达的影响。

方法:将接种14天的荷瘤兔随机分为5组及PT组、NS组、MF组、MFH1组、MFH2组,分组处理后于种植后4周行超声造影检查,观察肿瘤内血供情况及测量肿瘤坏死率,并与病理学检查相比较,同时进行血管壁弹力纤维染色及VEGF的免疫组化检测。

结果:各组超声造影测得的肿瘤坏死率分别为17.89±7.45%、20.52±6.58%、16.78±8.92%、72.93±10.45%、94.28±3.54%。热疗组的坏死率明显高于各对照组,MFH1组可见局灶的结节状或环形强化,与肉眼及病理观察的肿瘤存活区一致,MFH2组几乎完全坏死,未见残存的活肿瘤组织,超声造影与病理测得的肿瘤坏死率比较无显著性差异,具有很好的-致性。磁热疗可使肿瘤滋养血管的血管壁破坏,弹力纤维断裂、散乱,血管管径越小效果越好,管径小于50μm的效果最好,MFH2组对血管的破坏程度明显大于MFH1组。种植后4周各组肿瘤VEGF的表达阳性率分别为63.87±7.24%、59.44±8.89%、65.25±10.04%、28.57±5.66%、5.84±2.97%,热疗组明显低于各对照组,差异具有显著性( $P<0.01$ ),以MFH2组更低。

结论:超声造影可准确的反映磁流体热疗引起兔VX2肝癌凝固性坏死的范围及活肿瘤组织的残存,可作为评价磁流体热疗疗效的有效手段。磁流体介导的50℃热消融可有效的破坏肿瘤滋养血管,抑制VEGF的表达,可能是其治疗肿瘤的重要机制之一。

6. 期刊论文 刘俊.刘志苏.艾中立.何跃明.唐胜利.胡军.LIU Jun.LIU Zhisu.AI Zhongli.HE Yueming.TANG Shengli.HU Jun 改良兔VX2肝癌模型及其生长特性 -武汉大学学报(医学版) 2006, 27 (3)

目的:探讨改良的肿瘤种植方式,建立兔VX2肝癌模型,并分析该肿瘤的生长特性.方法:30只新西兰白兔随机的分为3组,每组10只.再将瘤块组织经剖腹途径植入肝脏,观察肿瘤7、10、14、21、28、34 d 时的体积(B超测量),并计算肿瘤生长率,大体及光镜下瘤组织形态特征以及VX2移植性肝癌的CT影像特征.结果:2~3周生长最旺盛,其体积迅速增大.进行实验研究时,不宜太晚,一般不超过4周为宜,以免因肿瘤坏死和转移影响实验结果.结论:改良的肿瘤种植方式是建立兔肝癌模型的可靠方式,该模型是肝癌的基础及临床的理想动物模型.

7. 学位论文 钟灵 兔VX2肝癌模型的肝动脉插管技术改良及其介入治疗术后的实验研究 2007

背景

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌)是我国常见的恶性肿瘤之一,居我国癌症发病率的第二位,每年有13万人死于肝癌,尤以东南沿海地区高发。经导管动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是目前中、晚期肝癌非手术疗法中的首选方法,近20年对肝癌的介入治疗取得了长足的进步,但肿瘤的复发和转移仍严重制约着患者的预后。目前认为细胞外基质(extracellular malcrix, ECM)在肿瘤的侵袭和转移过程中起着关键性的作用。基质金属蛋白酶(matrix metallonroteinases, MMPs)通过对ECM的降解而促进癌细胞对周围组织的浸润,其中MMP-2和MMP-9在MMPs家族中与肿瘤的关系更为密切。本研究尝试通过显微外科手术方法对兔VX2肝癌模型肝动脉插管技术进行改良,并观察兔VX2肝癌的影像学表现及介入治疗后其病理形态学的改变,研究介入治疗对兔VX2肝癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响。

研究目的

1. 制备兔VX2肝癌模型,并探讨对兔VX2肝癌模型肝动脉插管技术的改良;
2. 观察兔VX2肝癌的影像学表现及介入治疗后其病理形态学的变化;
3. 研究介入治疗对兔VX2肝癌模型MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响。

材料和方法

1. 兔VX2肝癌模型的制备及兔肝动脉插管方法新西兰大白兔(雌雄不限)40只按外科手术方法开腹种植VX2瘤块于兔肝左叶,成功制作36只兔VX2肝癌模型。瘤株接种2周后,实验组(26只)采取改良显微外科手术直接行肝动脉插管法介入治疗,对照组(10只)采用传统经股动脉、肝动脉插管的方法作对比研究。
2. 动物分组采取改良显微外科手术行肝动脉插管的26只模型经DSA造影证实插管成功23只。将23只模型随机分为三组,即单纯碘油性塞组A组(8只),碘油性塞及化疗组B组(8只),对照组C组(7只)。A组及B组分别采取不同方式的介入治疗并结扎肝动脉后关腹,C组不予处理,直接关腹作对照。
3. 影像学、病理形态学观察及免疫组织化学检测介入术前及术后一周行CT检查比较三组模型肝左叶的肿瘤体积增长率;介入术后1周处死三组动物后立即取出肝脏,采用常规HE染色观察各组模型的病理形态学变化,及采用免疫组化染色方法分别研究各组模型的MMP-2和MMP-9蛋白表达情况。
4. 统计学处理(应用SPSS10.0软件包)采用 $\chi^2$ 检验(Fisher's精确概率检验)比较两种肝动脉插管方法的成功率差异;采用单向方差分析(One-way ANOVA)比较三组模型介入术后肿瘤体积增长率的差异;采用R×C表的 $\chi^2$ 检验分别比较三组模型的MMP-2和MMP-9蛋白表达。

结果

1. 肿瘤种植成功率经CT扫描证实36只(90%)兔VX2肝癌模型种植成功,麻醉过量死亡2只,肿瘤腹腔广泛种植导致种植失败2只。种植成功的VX2瘤灶位于肝左叶,呈单一瘤块,CT扫描呈低密度软组织影,大体标本外观呈灰白色结节样,与周围组织分界清楚。

2. 两种插管方法成功率的比较改良显微外科手术肝动脉插管的成功率为88% (23/26); 传统股动脉-肝动脉插管的插管成功率为40% (4/10), 两组比较有非常显著的统计学差异 (P=0.006), 可认为实验组肝动脉插管的成功率明显高于对照组。

3. DSA造影对肿瘤血供的观察实验组和对对照组共插管成功27只, 造影检查可清楚显示兔模型肝动脉的次级分支走行及肿瘤实质染色现象。可观察到明显的肿瘤实质染色的VX2瘤灶占89% (24/27), 接种于肝脏深部的瘤体染色情况较好, 肿瘤呈均一或结节样染色, 其外周可见由肝动脉分出的粗大滋养血管抵达肿瘤并绕行, 瘤周异常血管密度较高; 肿瘤接种部位较表浅的模型中有3例: DSA表现仅为瘤周血管增粗紊乱、大量细小的异常血管。27只模型均可通过肿瘤染色或瘤周血管的轮廓观察到瘤体的血供情况。

4. 介入治疗术后各组模型肿瘤体积变化的比较介入治疗术前及术后一周CT扫描显示各组肿瘤体积随时间延长均有增大, 肿瘤增长率分别为 (111.98±57.40)%、(87.87±64.70)%、(194.07±109.87)%; 三组模型肿瘤体积增长率的差异有显著性 (F=3.645, P=0.045), 其中碘油栓塞及化疗组B组的肿瘤体积增长率显著低于对照组C组 (P=0.017)。

5. 介入治疗组与对照组病理形态学观察 (1) 对照组VX2肝癌组织病理学观察对照组模型肝脏结构大致正常, 肝细胞呈索状排列, 少数肝细胞可见脂肪变性, 血窦轻度扩张, 汇管区内可见少量淋巴细胞浸润; 肝左叶肝组织内可见接种的呈片状分布的VX2瘤细胞团, 细胞异型明显, 分裂象及病理性核分裂象多见, 核圆, 卵圆形, 可见瘤巨细胞; 瘤组织周边可见少量肝细胞变性、肝细胞小灶性坏死及散在的淋巴细胞浸润。

(2) 介入治疗组VX2肝癌组织病理学观察肝左叶肝组织内巢状分布的VX2瘤细胞团内可见大片坏死区, 部分瘤细胞核固缩及核碎裂, 周边可见残留少许瘤组织, 间质血管扩张、充血, 局部有出血, 间质纤维组织增生肿胀, 坏死灶周围有较多炎症细胞浸润, 以中性粒细胞为主。其中碘油栓塞及化疗组 (B组) 肿瘤内部及周边组织的细胞坏死较单纯碘油栓塞组 (A组) 更为明显; 二组均可见部分近肿瘤周围的肝细胞变性、水肿, 提示碘油等栓塞剂对瘤周正常肝组织有损害作用。

6. 三组模型MMP-2蛋白表达结果的比较免疫组化染色结果显示MMP-2蛋白表达主要定位于癌细胞胞浆, 血管内皮细胞有弱阳性表达。正常组织及癌旁组织无表达。三组模型的MMP-2蛋白表达有显著性差异 ( $\chi^2=12.259$ , P=0.002); 其中单纯碘油栓塞组A组与碘油栓塞及化疗组B组的MMP-2蛋白表达阳性率无显著性差异 ( $\chi^2=2.000$ , P=1.000); 介入治疗组 (合并A组与B组) 的MMP-2蛋白表达阳性率显著低于对照组C组 ( $\chi^2=6.674$ , P=0.010)。

7. 三组模型MMP-9蛋白表达结果的比较免疫组化染色结果显示MMP-9蛋白表达主要定位于癌细胞胞浆, 血管内皮细胞有弱阳性表达。正常组织及癌旁组织无表达。三组模型的MMP-9蛋白表达有显著性差异 ( $\chi^2=10.022$ , P=0.007); 其中单纯碘油栓塞组A组与碘油栓塞及化疗组B组的MMP-9蛋白表达阳性率无显著性差异 ( $\chi^2=2.000$ , P=1.000); 介入治疗组 (合并A组与B组) 的MMP-2蛋白表达阳性率显著低于对照组C组 ( $\chi^2=6.572$ , P=0.010)。

结论

1. 兔VX2肝癌模型制备简单, 是一种理想的肝癌研究的动物模型;
2. 采用改良显微外科手术直接行肝动脉插管法对兔VX2肝癌行介入治疗成功率较高, 实验人员可较大幅度地避免辐射, 是值得推广的实验方法;
3. 介入治疗能延缓VX2肿瘤生长, 并减低其MMP-2、MMP9蛋白的表达;
4. 碘油等栓塞剂可损伤正常组织, 在治疗过程中应尽量避免或减少其进入正常组织。

## 8. 期刊论文 张克勤. 张积仁. 魏红梅. 氩氦刀冷冻、射频消融和微波凝固对兔VX2肝癌消融作用的对比 - 广东医学 2008, 29 (2)

目的 探讨氩氦刀冷冻、射频消融及微波凝固对兔VX2肝肿瘤消融的作用机制. 方法 取成功制作VX2肝癌模型新西兰大白兔 (接种VX2细胞株后3周) 27只, 随机分为3组, 每组9只, 分别给予氩氦刀冷冻、射频消融和微波凝固. 3 d后处死全部兔子, 观察并估计肿瘤的大小, 切下肿瘤标本, 送作病理检查. 结果 ①消融靶区横径在A组 (氩氦刀冷冻组) 为 (2.28±0.12) cm, B组 (RFA组) 为 (1.96±0.09) cm, C组 (MCT组) 为 (1.93±0.10) cm, A组与B组和C组比较差异有显著性 (P<0.001), B组与C组比较差异无显著性 (P>0.05). ②消融靶区平均面积在A组为 (5.79±1.34) cm<sup>2</sup>, B组为 (4.40±0.43) cm<sup>2</sup>, C组为 (4.31±0.59) cm<sup>2</sup>, A组与B组和C组比较差异有显著性 (P<0.01), B组与C组比较差异无显著性 (P>0.05). ③肿瘤完全消融率 (消融靶区完全覆盖整个肿瘤区) 在A组为88.9% (8/9), B组为44.4% (4/9), C组为33.3% (3/9), A组完全消融率与B组和C组比较差异有显著性 (P<0.05); B组与C组之间比较差异无显著性 (P>0.05). ④消融靶区肿瘤细胞残留率在A组为22%, B、C组均为77.8%, A组肿瘤细胞残留率与B、C组比较差异有显著性 (P<0.05); B组与C组之间比较差异无显著性 (P>0.05). ⑤A组消融靶区中肿瘤细胞完全坏死率 (66.7%) 高于B组和C组的50.0%. 但差异无显著性 (P>0.05). 结论 3种微创治疗在消融兔VX2肝癌中, 无论是在消融靶区面积和横径方面、消融靶区肿瘤完全消融率方面, 还是在消融靶区肿瘤细胞残留率方面和消融靶区中肿瘤细胞完全坏死率方面, 氩氦刀冷冻均优于RFA和MCT. 而RFA和MCT效果相当.

## 9. 期刊论文 张勇. 王志刚. 康娟. 李攀. 任建丽. 谢昭鹏. 许川山. 兔VX2肝癌模型的建立及超声监测 - 中国超声医学杂志 2008, 24 (9)

目的 探讨兔VX2肝癌模型建立的方法及超声技术对肿瘤的监测. 方法 采用瘤块肝内种植法建立起兔VX2肝癌模型, 病理解剖验证VX2瘤株在兔肝脏的成瘤情况; 用2D、CDFI及超声造影观察肿瘤的大小、回声、血流灌注及生长特点. 从而评估超声在兔VX2肝癌模型监测中的应用价值. 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93.33%; 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; 超声造影肿瘤为典型的“快速快出”表现. 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.

## 10. 期刊论文 罗仕华. 郑传胜. 冯敦生. 梁惠民. 周国锋. 夏向文. 重组人p53腺病毒基因经介入后在兔VX2肝癌中表达 - 世界华人消化杂志

2010, 18 (5)

目的: 探讨重组p53腺病毒基因 (rAd-p53, 1×10<sup>12</sup>VP/支) 经介入在兔VX2肝癌中的表达特点, 为临床应用提供理论依据. 方法: 将30只新西兰大白兔采用移植法建立兔VX2移植性肝癌模型, 于移植术11 d行MRI、CT检查. 随机抽取27只移植成功的荷瘤兔, 平均分成3组: A组: 经肝动脉单纯灌注rAd-p53 (5×10<sup>6</sup>VP); B组: rAd-p53 (5×10<sup>6</sup>VP)+超液态碘油 (每只0.5 mL) 经肝动脉灌注; C组: 瘤内rAd-p53 (5×10<sup>6</sup>VP) 直接导入. 所有荷瘤兔术中均行DSA. 介入术后24、72 h, 6 d分别处死实验兔, 免疫组织化学方法检测肿瘤组织及瘤周P53和Bax、Bcl-2蛋白的表达. 结果: 30R大白兔均经MRI及CT检查, 证实有27只肿瘤成功, 成功率95%. 免疫组织化学检测各组中P53和Bax蛋白均有表达, 于72 h达到最高峰, 以C组表达率最高, 与其他两组有显著性差异 (P53: 70.3%±3.4% vs 62.4%±3.2%, 65.4%±2.1%; Bax: 43.7%±2.1% vs 35.7%±1.3%, 37.6%±2.4%, 均P<0.05); C组对Bcl-2蛋白表达率最低, 在72 h达最低点, 与其他两组有显著性差异 (12.0%±2.6% vs 18.0%±4.3%, 16.2%±3.1%, 均P<0.05). 结论: P53、Bax、Bcl-2蛋白在兔VX2肝癌模型中的表达呈现时间曲线关系: 不同rAd-p53介入导入方式P53蛋白表达不同, 以瘤内及瘤周直接注射方式表达最高, 超液态碘油混合灌注及单纯肝动脉灌注次之.

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz201003013.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz201003013.aspx)

授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: 757476d7-90aa-416e-92ec-9de900bc4c11

下载时间: 2010年9月6日