

## • 实验研究 Experimental research •

## 犬传染性性病肿瘤肺癌模型的建立和生物学特性的观察

孙志超, 董伟华, 肖湘生, 朱瑞民, 陈墨繁, 王 智

**【摘要】 目的** 经皮犬传染性性病肿瘤(CTVT)细胞悬液注射法建立犬同种移植性肺癌模型并研究其生物学特性。**方法** 纯种比格犬 12 只,接种前 4 d 口饲环孢素。腹腔麻醉后,CT 引导下穿刺至犬肺中叶或后叶,注入 1.0 ml CTVT 细胞悬液(细胞活度:  $10^8/\text{ml}$ )。接种后即刻及第 2、4、5、6、8、10 周行胸部 CT 平扫,观察肿瘤生长及转移情况;每日观察动物的一般情况,包括精神状态、饮食、呼吸及活动等情况。待其自然死亡或于第 10 周处死,进行病理学检查。**结果** 12 只犬共接种 15 点。第 5 周 CT 扫描可见 2 只犬肺内成瘤,第 6 周 9 只犬肺内成瘤,观察至第 10 周共 9 只犬 10 个接种点肺内成瘤,接种点成瘤率 66.7%。第 6、8、10 周肿瘤最大层面均径分别为  $(1.059 \pm 0.113)\text{cm}$ 、 $(1.827 \pm 0.084)\text{cm}$  和  $(2.389 \pm 0.153)\text{cm}$ ,最大直径达 3.5 cm;所有成瘤犬最后均出现中至重度胸腔积液及纵隔淋巴结肿大。**结论** 经皮 CTVT 细胞悬液注射法可建立大动物肺癌模型,有助于肺癌的相关研究。

**【关键词】** 犬;犬传染性性病肿瘤;动物模型;肺肿瘤;计算机断层;生物学特性

中图分类号:R73-35 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-12-0972-05

**The establishment of transmissible venereal tumor lung cancer model in canine and the observation of its biological characteristics** SUN Zhi-chao, DONG Wei-hua, XIAO Xiang-sheng, ZHU Rui-min, CHENG Mo-fan, WANG Zhi. Department of Radiology, the Affiliated Changzheng Hospital, No.2 Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: DONG Wei-hua, XIAO Xiang-sheng

**【Abstract】 Objective** To establish an allogeneic transplanted lung cancer model in canine by percutaneously injecting canine transmissible venereal tumor (CTVT) cell suspension and to observe its biological characteristics. **Methods** Under CT guidance fresh CTVT cell suspension was inoculated into the middle or posterior lobe of lungs through percutaneous puncturing needle in 12 beagle dogs. Cyclosporin was administrated orally to obtain immunosuppression. Tumor growth and metastasis were judged by chest CT scanning at regular intervals (every 1-2 weeks). The daily mental and physical condition of the dogs was observed. Autopsy and pathological examination were performed when the animals died naturally or at the tenth week after the procedure when the animals were sacrificed. **Results** A total of 15 sites were inoculated in 12 dogs. The formation of tumor was observed in 2 dogs at the fifth week and in 9 dogs at the sixth week. Ten weeks after the inoculation the formation of tumor was detected in 10 inoculated points in 9 dogs, the inoculation success rate was 66.67%. The mean largest diameter of the tumor at 6, 8 and 10 weeks after the inoculation was  $(1.059 \pm 0.113)\text{cm}$ ,  $(1.827 \pm 0.084)\text{cm}$  and  $(2.189 \pm 0.153)\text{cm}$ , respectively. The largest diameter of the tumor nodule was 3.5 cm. Moderate to severe pleural effusion and mediastinal lymph nodes metastasis were found in all the dogs that showed the formation of the tumor. **Conclusion** Percutaneous CTVT cell suspension injection can establish an allogeneic canine lung cancer model, which is helpful for the experimental studies related to lung cancer. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 972-976)

**【Key words】** canine; canine transmissible venereal tumor; animal model; lung neoplasm; tomography, X-ray computed; biological characteristics

基金项目:本课题由国家自然科学基金(30770633)和上海  
市浦江人才计划资助

作者单位:200003 上海 第二军医大学附属长征医院  
影像科(孙志超、董伟华、肖湘生、王 智);台湾大学兽医系  
(朱瑞民、陈墨繁)

通信作者:董伟华 肖湘生

肺癌已经成为癌症死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。近年来,随着微创介入治疗方法(经血管化疗栓塞和经皮消融等)在肺部的广泛应用,给大多数肺癌患者带来了福音,但相关的实验研究进展相对缓慢。目前与人类属性接近的大动物肺癌模型仍然非常罕见<sup>[2-4]</sup>。为满足临床医学特别是介入医学需要,建立一个成瘤周期短、成功率高、可靠的大动物肺癌模型,成为目前实验研究的迫切要求。作者尝试经皮犬传染性性病肿瘤(canine transmissible venereal tumor, CTVT)细胞悬液注射法建立犬同种移植性肺癌模型,并研究其生物学特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

纯种比格犬(Beagle)12只,体重9.0~13.5 kg,雌雄不论,由上海交通大学农学院教学实验场提供,动物合格证编号SCXK(沪)2-7-000X,在上海市公共卫生临床中心动物实验中心隔离检疫和饲养。动物实验经第二军医大学实验动物伦理委员会批准。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞悬液的制备 对背部皮下传代的荷瘤犬施以腹腔麻醉(3%戊巴比妥钠,1 ml/kg),消毒、铺巾后取出瘤组织块,剔除周围包膜、肌肉、腱膜及血管,置入Hanks液中,剪制成细小组织块,细胞过滤筛分离细胞和组织,滤液以1 500 r/min速度离心10 min,弃上清液,沉淀物经Hanks液处理,锥虫蓝法细胞染色,行细胞活力测定后,调整活细胞浓度达到 $10^8$ /ml,1 ml针筒抽取1.0 ml肿瘤细胞悬液置于冰上待用。

#### 1.2.2 经皮犬肺内悬液植入

1.2.2.1 接种前准备:①实验犬术前4 d开始口服环孢素10 mg/kg(杭州中美华东制药有限公司),2次/d;2周后改为1次/d,剂量同前,至实验终止。②接种前晚犬禁食,禁水。③3%戊巴比妥1 ml/kg腹腔麻醉。④西门子16排螺旋CT机(SIEMENS SOMATOM Sensation 16 Germany)穿刺引导;矩阵 $512 \times 512$ ,原始层厚1 mm,重建层厚3 mm,视野:22 cm  $\times$  24 cm,120 kV,200 mA;肺重建算法。

1.2.2.2 接种过程:接种犬取仰卧位固定,CT胸部平扫,选择预接种点及理想穿刺位点。消毒铺巾后,用22 G Chiba针(Invatec Company, Italy)穿刺预定靶部位,将肿瘤细胞悬液1.0 ml缓慢、匀速注入,后以0.2 ml空气将针内液体推空,拔针后行重复CT扫描。接种时间控制在取瘤后2 h内。

1.2.3 接种部位及情况 以两肺中叶(又称心叶)或后叶(又称膈叶)为预接种点,共种植15点,其中10只犬接种于右侧肺,2只犬接种于左侧肺;3只犬单侧肺内接种2点。右肺中叶10个接种点;右肺后叶2个接种点;左肺中叶2个接种点,左肺后叶1个接种点。

1.2.4 观察方法 分别于接种后即刻、第2、4、5、6、8、和10周行胸部CT平扫(机器型号及扫描参数同上),观察有无肿瘤生长、肿瘤生长及转移情况。逐日观察记录动物的一般情况,包括精神状态、食欲和呼吸情况。肿瘤生长的动物待其自然死亡或于第10周进一步实验后处死,行尸检和病理学检查,观察肿瘤微观病理学变化。

## 2 结果

### 2.1 接种的并发症及处理情况

所有犬均按原计划接种成功。接种后CT平扫征象:各犬接种区肺野见5~15 mm圆形、类圆形、不规则片状及条形密度增高影,边界不清(图1)。4例沿穿刺道见条状密度增高影。出现少量皮下气肿1例、少量气胸3例,肺内出血2例,未予特别处理。接种犬均无气急、气促、呼吸困难等不适症状,亦无大量血、气胸等致死性并发症发生。



图1 CT扫描示左下肺圆形毛玻璃密度影(箭头所示)

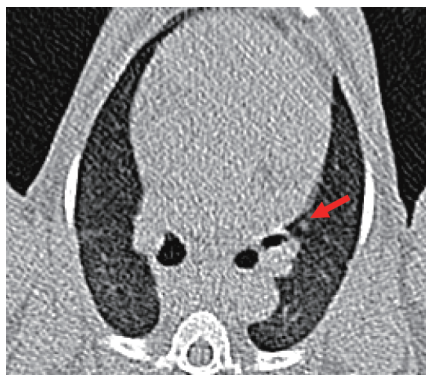
### 2.2 接种犬的成瘤率、胸壁种植情况

12只犬中9只犬最终肺内成瘤,犬成瘤率为75.0%。15个接种点至第10周观察最终10个成瘤,接种点成瘤率为66.7%。肿瘤至第10周最大直径可达3.5 cm。6只犬可见胸壁及皮下种植,其中5只发生于肺内成瘤犬;1只犬仅见胸壁种植,肺内未成瘤,但该犬有大量胸腔积液。肺内成瘤大小差异较大,多呈类圆形,边界清楚,其周边可伴有子灶形成

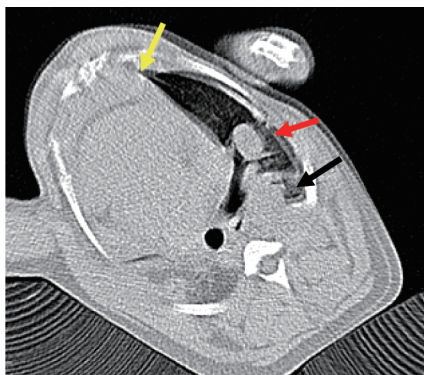
(5/9), 均位于同一肺叶内; 各成瘤犬后期(9 周以后)均发现少至大量的胸腔积液; 前纵隔淋巴结肿

大 9 例(图 2)。所有动物未发现其他脏器转移。

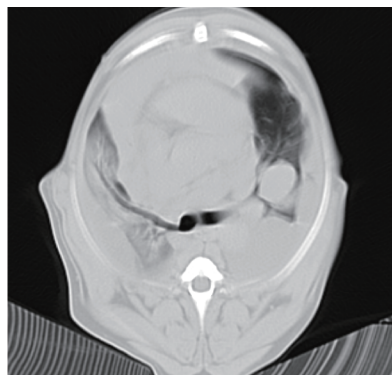
### 2.3 肿瘤的生长及转移情况



a 图示第 6 周示左下肺点状密度增高影(红箭头)



b 图示第 8 周见左下肺约 1.8 cm 肿瘤(红箭头), 伴胸膜转移(黑箭头), 心包积液(黄箭头)



c 图示左下肺肿瘤继续增大, 胸腔积液及心包积液量增多

图 2 犬 CTVT 细胞悬液接种后 CT 随访

**2.3.1 不同时间段肿瘤的 CT 表现** 接种后第 2 ~ 4 周内各犬均未见肿瘤生长, 第 5 周时仅 2 只犬可见肺内成瘤(2/12), 直径约 3 mm, 圆形, 边缘光滑, 清楚。第 6 周时 9 只犬肺内成瘤, 肿瘤呈圆形, 边缘光滑, 清楚, 密度均匀, 肿瘤直径 3 ~ 14 mm, 肿瘤最大层面均径约  $(1.059 \pm 0.113)$  cm, 纵隔淋巴结无肿大, 未见胸腔积液。第 7 周时肿瘤呈圆形, 边缘光滑, 但部分相邻病灶可见融合, 形状变得不规则, 肿瘤大小不等, 主病灶直径 6 ~ 29 mm; 且部分接种犬可见少量胸腔积液及纵隔淋巴结肿大(2/12), 凡出现胸腔积液的患犬, 胸膜已可见小转移结节。第 7 周开始肿瘤迅速生长, 同时胸腔积液量增多, 部分病犬可伴有心包积液, 前纵隔淋巴结明显增大; 第 8 周: 肿瘤最大层面均径约  $(1.827 \pm 0.084)$  cm。至第 10 周, 肺内接种肿瘤平均直径约为  $(2.389 \pm 0.153)$  cm, 最大达 3.5 cm, 所有接种犬均出现中 ~ 大量胸腔积液, 心包积液, 前纵隔淋巴结明显肿大, 部分病犬胸膜呈“飘絮”样增厚(图 3)。



a 纵隔淋巴结明显肿大(箭头)



b 肺内未成瘤, 但胸膜广泛转移伴双侧大量胸膜积液(红箭头)

图 3 接种 10 周后肺及胸腹改变

**2.3.2 肿瘤生长转移与时间的关系** 实验动物自接种到 CT 扫描发现肿瘤生长的时间最早为第 5 周

初(计 29 d), 共 2 只(2/12); 在第 6 周扫描时发现 9 只犬肺内结节存在(9/12)。同时在接种穿刺点的皮下及胸壁可见肿瘤种植; 后期扫描其他犬未能成瘤; 胸膜结节早于胸腔积液出现; 所有成瘤犬均发现纵隔淋巴结不同程度肿大(图 3)。

**2.3.3 动物的存活情况** 自接种以后, 2 只犬分别于第 9 周及第 11 周因肿瘤恶液质状态而死亡; 7 只犬在 10 至 11 周后续实验后处死; 另 3 只犬状态良好, CT 随访 12 周, 无肿瘤生长表现。

**2.3.4 一般情况观察** 实验动物自接种时起至 CT 扫描发现胸腔积液前精神状态、饮食、呼吸情况均无明显变化, 自第 8 周以后, 随着胸腔积液的快速增长, 实验动物开始出现精神差、食欲下降、呼吸急促, 至第 9、10 周以后, 上述症状明显加重, 皮肤菲薄, 皮毛干枯, 消瘦明显, 呈恶病质状态, 并有 2 只犬因呼吸衰竭而死亡。

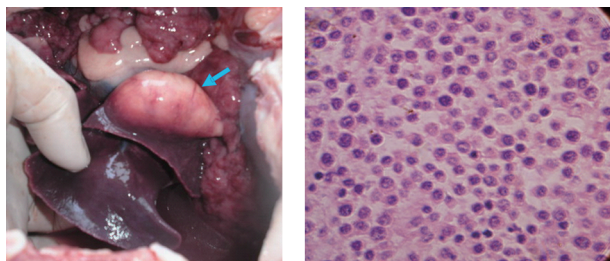
**2.3.5 接种部位与肿瘤生长的关系** 10 个肺内肿瘤中 9 个与原穿刺部位一致, 1 例原右肺中叶种植, 成瘤位于右肺后叶。5 只犬可见穿刺道及胸壁可见种植(5/15)。

**2.3.6 病理检查** 自然死亡的动物病理检查发现双侧大量淡红色胸腔积液, 且局部呈包裹性积液, 壁、脏层胸膜见数量不等之小结节, 且胸膜腔内见大饼状网膜结构, 表面密布大小不等之红色颗粒, 切面呈白色鱼肉状, 与肺内肿瘤切面相同; 纵隔淋巴结广泛转移, 且相互融合, 以前纵隔明显, 并伴有心包积液。肺内见最大直径约 3.5 cm × 3.0 cm × 2.8 cm 肿瘤, 肿瘤周围见 1 至 3 个 5 mm 左右结节。而机体其他器官未见明显转移灶。

CTVT 肿瘤边界清楚, 边缘光滑, 质韧均匀, 呈



膨胀性生长,肿瘤切面呈鱼肉状,外缘为质韧、厚度均匀的白色包膜,肿瘤中心无明显坏死,临近支气管及血管呈受压改变,但无明显侵犯征象。组织学上,CTVT 瘤巢由大片多形性的肿瘤细胞构成,该肿瘤细胞核浓染,内有粗大成群的染色质和明显增大的核仁。并可观察到大量的有丝分裂现象(图 4)。瘤巢被纤薄的纤维血管样间隔分开,与大气道相邻的肿瘤,组织学上亦未见气道壁的浸润。



a CTVT 肺肿瘤大体标本:肿瘤呈卵圆形,表面光滑,位于肺叶表面呈膨胀性生长(绿箭示肿瘤) b 高倍镜下病理示 CTVT 肿瘤细胞呈圆形,细胞核浓染,核仁粗大,可见大量核分裂相,肿瘤间质成分很少(HE × 40)

图 4 实验犬成瘤病理观察

### 3 讨论

随着临床实验医学的发展,特别是微创介入医学的飞速进步,迫切要求建立一适合临床研究的肺癌大动物模型,但目前国内尚无经济、实用、可靠且重复性高的模型供临床实验研究。

目前国内外建立的比较成熟的移植性肺癌模型多为兔 VX2 瘤<sup>[5-7]</sup>,虽然成功率较高,重复较好,但瘤灶多较小,容易出现胸水,转移等恶病质情况,且兔体积较小,介入治疗中血管难于找到,限制了其实验研究。近年来,国内外学者在移植性肺癌模型的制作方面做了很大努力,但适合临床研究的大动物模型始终难于建立,其主要原因之一在于适合在大动物体内生长的瘤株难于找到。

CTVT 是一种自然发生的、能够自愈的,以性接触传播为主的犬类动物生殖系统肿瘤,该肿瘤细胞具有特殊的生物活性:在宿主体内能够通过主要组织相容性复合体的屏障,逃避机体的免疫监视,而增殖成瘤<sup>[8]</sup>,因此将具有生物活性的 CTVT 细胞以接种的方式注入同种动物体内,建立相应的肿瘤动物模型成为一种可能。通常自然发生的 CTVT 生存期一般为 2 ~ 6 个月,并具有自限性,在自然条件下经历快速生长期,稳定期和消退期后可自行消退。近年来,由于肿瘤本身具有可靠的稳定性、原位移植的多样性、异种移植性,而成为动物实验模型研究的热点。Ahrar 等<sup>[4]</sup>曾报道以经皮穿刺植入和经肺动脉植

入 CTVT 组织浆液的方法建立犬移植性肺癌模型,经皮穿刺法于 8 至 10 周时肿瘤最大可达 35 mm,获得较满意结果。但国内对于大动物的移植性肺癌尚无稳定的模型,采用经皮注射 CTVT 细胞悬液的方式建立移植性肺癌模型,为一尝试。本实验采用选择性向目标肺叶内植入 CTVT 细胞的方法,肺内成瘤部位与期望相符,成瘤期 1 ~ 2 个月,满足临床实验成瘤期较短的要求,且成瘤较大,平均直径大于 2 cm。尽管文献报道犬 CTVT 肿瘤在免疫状态下可出现自然消退现象<sup>[9-10]</sup>,但本实验犬在环孢素免疫抑制状态下,10 周内观察犬肺内肿瘤未见明显消退迹象,而 10 周以后肿瘤的变化尚待进一步研究。

研究表明采用 CT 引导下经皮向免疫抑制犬肺内注入细胞悬液的方式同样可以获得犬移植性肺癌模型,成功率较高,且具有微创,重复率高,成瘤较大,适合临床实验应用的特点。

本实验的不足之处在于该动物模型肿瘤胸壁种植率,胸腔积液出现率及纵隔淋巴结转移率较高,后期有明显的恶液质表现,给后续实验造成一定困难。其主要原因考虑与穿刺推注细胞悬液过程中沿针道反流及细胞液易向周围弥散有关,尝试组织块接种有望避免。但胸腔积液及纵隔淋巴结转移的高出现率可适用于某些特定实验的研究。另本实验模型所成肺内肿瘤边缘光滑,肿瘤表面有一层包膜,对周边肺组织呈一种压迫状态,缺乏对于肺实质及周围气道的浸润,更类似于肺转移瘤模型,不同于原发性肺癌。

总之,经皮 CTVT 细胞悬液注射法建立犬同种移植性肺癌模型,具有成功率较高,实验周期短,模拟性好,操作相对简单,且创伤小的特点,适合于微创介入治疗(射频消融,粒子植入,经血管化疗栓塞等)、影像医学及外科手术等临床研究,但如何进一步提高成功率、弥补其不足之处,有待于在将来研究中进一步改进。

### 〔参考文献〕

- [1] Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia[J]. J Clin Pathol, 2001, 54: 257 - 271.
- [2] Hook RR Jr, Berkelhammer J, Oxenhandler RW. Melanoma: Sinclair swine melanoma[J]. Am J Pathol, 1982, 108: 130 - 133.
- [3] Rivera B, Ahrar K, Kangasniem MM, et al. Canine transmissible venereal tumor: a large-animal transplantable tumor model [J]. Comp Med, 2005, 55: 335 - 343.

- [4] Ahrar K, Madoff DC, Gupta S, et al. Development of a large animal model for lung tumors[J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13: 923 - 928.
- [5] 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和生物学特性研究[J]. 中华放射学杂志, 2003, 37: 166 - 170.
- [6] 马连君, 张向华, 祁彦君. 兔 VX2 肺癌模型的建立及评价[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32: 916 - 918.
- [7] 刘德森, 倪才方, 秦涌, 等. 兔 VX2 肺癌模型的建立和螺旋 CT 评价[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 266 - 268.
- [8] Higgins DA. Observations on the canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas[J]. Vet Rec, 1966, 79: 67 - 71.
- [9] Hill DL, Yang TJ, Wachtel A. Canine transmissible venereal sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages[J]. Vet Pathol, 1984, 21: 39 - 45.
- [10] Yang TJ. Regression of canine transmissible venereal sarcoma[J]. J Am Vet Med Assoc, 1987, 191: 196.
- [11] Goldberg SN, Gazelle GS, Compton CC, et al. Radiofrequency tissue ablation of VX2 tumor nodules in the rabbit lung[J]. Acad Radiol, 1996, 3: 929 - 935.
- (收稿日期: 2010-07-26)

## ·消 息·

# 第十四届全国介入心脏病学论坛(CCIF)征文及征集病例

## 一、征文

征文内容:

- 1、临床研究;
- 2、基础研究;
- 3、流行病学研究与人群防治;
- 4、个案报道;
- 5、综述、述评。

征文要求:

- 1、摘要投稿,字数在 1000 字以内。如选为优秀论文再寄全文(选后另行通知),并发表在《中国介入心脏病学杂志》上;
- 2、摘要请按《中国介入心脏病学杂志》统一格式撰写,摘要分为目的、方法、结果、结论四部分,具体要求参见《中国介入心脏病学杂志》每年第 1 期稿约;
- 3、请自留底稿,未经采用者,不退稿。

## 二、病例征集

病例征集范围:

1. “PCI 并发症”专场病例:通过对 PCI 术中、术后各种并发症,如血管夹层、撕裂、急性血管闭塞、无复流、穿孔、血栓形成、支架脱载等的早期识别与妥善处理,成功避免病人发生各种意外情况;
2. “我最糟糕的病例”专场病例:由于适应证掌握、治疗策略选择、技术操作等原因,造成病人出现严重后果、甚至死亡;
3. “与专家面对面”专场病例:日常工作中遇到的疑难病例,需要请示专家,共同讨论。

病例要求:

1. 无论成功的经验,还是失败的教训,每个病例都要有提高自己、帮助他人的教育意义;
2. 病例做成 PPT 格式,PPT 控制在 10 张以内,“PCI 并发症”专场病例、“我最糟糕的病例”专场,病例要求有一张 PPT 专门介绍教育点;“与专家面对面”专场,病例要求有一张 PPT 专门提出需要请示和讨论的问题。

投稿方式:

1. 登录论坛网站 <http://www.ccif.net.cn/login.aspx> 在线提交病例
2. 将刻有 PPT 文件的光盘邮寄到第十四届全国介入心脏病学论坛组委会(详细地址如下)

地址:北京市西城区大红罗厂街 1 号(北大医院第二住院部新内科楼 B1 层)

邮编:100034 电话:010-66511764 传真:010-66137748

注:来信请在信封上注明“介入论坛”或“CCIF”字样。

截稿日期:2011 年 1 月 15 日