

• 实验研究 Experimental research •

兔 VX2 门静脉癌栓模型构建

武 贝, 高 杨, 席 玮, 张秀明, 郭 震, 张静渊, 余 辉,
陈世晞, 陈 骏

【摘要】 目的 经肠系膜上静脉插管注入 VX2 肝癌瘤粒或瘤条, 构建不同类型兔门静脉癌栓 (PVTT) 模型。方法 剖腹后直视下穿刺肠系膜上静脉, 在兔门静脉主干近端置入经皮肝穿刺胆道造影 (PTC) 套管。20 只健康大白兔随机分成两组, A 组 (n=10) 注入 0.1~0.2 cm 瘤粒, B 组 (n=10) 注入 0.1 cm×1.5~2.0 cm 瘤条。术后 1 周, DSA 造影观察癌栓生长情况, 处死后作病理学观察。结果 两组实验兔均成功完成门静脉插管, 瘤株接种成功率均为 100%。术后 1 周造影显示, A 组 8 只兔见门静脉一级分支癌栓, 2 只兔见门静脉主干癌栓, 10 只兔均见肝内弥漫散在的多发转移灶; B 组 10 只兔均见门静脉主干癌栓, 肝实质内未见弥漫性转移灶。结论 采用介入技术将不同大小的 VX2 肿瘤瘤粒或瘤条种植于兔门静脉内, 能形成伴有或不伴有肝内弥漫性转移灶的门静脉主干或一级以上分支癌栓模型。

【关键词】 兔; 门静脉; 癌栓; 放射学; 介入性; 动物模型

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-03-0239-04

The establishment of VX2 portal vein tumor thrombus model in experimental rabbits WU Bei, GAO Yang, XI Wei, ZHANG Xiu-ming, GUO Zhen, ZHANG Jing-yuan, YU Hui, CHEN Shi-xi, CHEN Jun. Department of Radiology, Jiangsu Provincial Cancer Hospital, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

Corresponding author: CHEN Jun, E-mail: 13813939190@139.com

【Abstract】 Objective To establish different types of portal vein tumor thrombus (PVTT) models in rabbits by injecting VX2 tumor particles or strips through superior mesenteric vein catheterization. Methods After exploratory laparotomy, superior mesenteric vein was punctured under direct vision, then, a percutaneous transhepatic cholangiography (PTC) cannula was placed in the proximal side of main portal vein. Twenty healthy rabbits were randomly divided into group A (n=10) and group B (n=10). Particles of 0.1-0.2 cm sized VX2 tumor tissue were injected into portal vein in the rabbits of group A, while 0.1×(1.5-2.0) cm sized tumor tissue strips were injected into portal vein in the rabbits of group B. One week after the implantation, digital subtraction angiography (DSA) was performed to observe the growth of PVTT. Results Technical success of portal vein catheterization was achieved in all rabbits of both groups, the success rate of tumor strain vaccination was 100%. DSA performed one week after the implantation showed that in group A PVTT was formed in the primary branch of portal vein (n=8) or in the main portal vein (n=2), and multiple disseminated hepatic metastases were demonstrated in all 10 rabbits; while in group B the formation of PVTT in the main portal vein was observed in all the 10 rabbits, and no disseminated liver metastases were seen. Conclusion By using interventional technology, the implantation of different sized VX2 tumor particles or strips into the portal vein can establish rabbit models of PVTT, locating in the main portal vein or in the primary branch of portal vein accompanying with or without multiple disseminated hepatic metastases. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 239-242)

【Key words】 rabbit; portal vein; tumor thrombus; radiology, interventional; animal model

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.03.013

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81271677)、江苏省“333 工程”科研项目(BRA2015492)

作者单位: 210009 南京 江苏省肿瘤医院(南京大学附属肿瘤医院)放射科

通信作者: 陈 骏 E-mail: 13813939190@139.com

影像诊断和介入诊疗实验研究中,常选择兔构建各种疾病动物模型^[1-4]。以往的兔门静脉癌栓(PVTT)模型制作采用切开门静脉主干并在腔内固定移植瘤粒原位成瘤方法^[5,6],操作相对复杂,可行性不佳。也有学者通过注射器直接穿刺门静脉主干,或自制微导管经肠系膜上静脉至门静脉注入瘤粒,然而注射器针头或微导管只能通过较小瘤粒,瘤粒在门静脉小分支内生长,易向肝内转移形成弥漫性肝癌,因此模型均一性较差^[4,7]。本研究探索采用经皮肝穿刺胆道造影(PTC)套管插入门静脉主干,分别尝试用小瘤粒和长瘤条注入门静脉构建门静脉主干、一级分支及以上分支癌栓、伴或不伴有散在转移性肝癌的动物模型,以满足不同 PVTT 实验研究的需要。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只普通清洁级健康大白兔,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg,由东南大学动物实验中心(许可证号:SYXK 苏 2010-0004)提供。VX2 肝癌瘤株由东南大学滕皋军教授惠赠。

1.2 器材和试剂

实验器材包括 Allura Xper FD20 型大平板数字减影血管造影机(荷兰 Philips 公司)、眼科剪、直剪、直镊、止血钳、有齿镊、无齿镊、持针器、缝合圆针、三角针、缝合丝线、玻璃分针、18 G 穿刺套管针、0.014 英寸经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)导丝(日本 ASAHI 公司)、PTC 穿刺套装(NPAS-100-RH-NT,美国 Cook 公司)等;试剂包括碘佛醇注射液(320 mgI/ml,江苏恒瑞医药股份有限公司)、苯巴比妥钠(100 mg/支,上海新亚药业有限公司)、肝素(1.25 万 U/支,江苏万邦生化医药股份有限公司)、青霉素(80 万 U/支,山东鲁抗医药有限公司)、庆大霉素(8 万 U/支,烟台只楚药业公司)、2%利多卡因注射液(10 ml/支,上海朝晖药业有限公司)、地塞米松注射液(5 mg/支,天津金耀药业有限公司)、金霉素眼膏(2 g/支,上海通用药业股份有限公司)、5%葡萄糖氯化钠注射液(250 ml/袋,浙江康吉尔药业有限公司)等。

1.3 瘤株接种与传代

苯巴比妥钠 100 mg/kg 经耳缘静脉推注麻醉种兔后,将其固定于自制手术台上,常规无菌操作切开一侧后腿部肿瘤边缘皮肤,逐层分离至肿瘤区,取出瘤体边缘类鱼肉样肿块,置于盛有生理盐水稀

释的庆大霉素容器中;眼科剪剪取包膜下乳白色瘤块,逐步剪碎成直径约 0.05 cm 瘤粒备用;1 ml 注射器吸取瘤粒 3~5 粒并以 9 号针头直接注入另一只健康兔后腿皮下内,每 2~3 周完成一次瘤株接种与传代。

1.4 兔 PVTT 模型构建

将从种兔取出的 VX2 肿瘤组织制备成粒径 0.1~0.2 cm 瘤粒和 0.1 cm×1.5~2.0 cm 瘤条若干。实验兔随机分为两组,A 组(n=10)经门静脉注入粒径 0.1~0.2 cm 瘤粒,B 组(n=10)经门静脉注入 0.1 cm×1.5~2.0 cm 瘤条。所有实验兔术前禁食 36 h,禁水 12 h^[8],术前 0.5 h 肌内注射青霉素 20 万 U、地塞米松 2 mg;分别于术中和术后经耳缘静脉缓慢输注 5%葡萄糖氯化钠 20 ml;术后连续 3 d 肌内注射青霉素 20 万 U,且手术切口涂抹金霉素眼膏。

手术操作步骤:苯巴比妥钠 100 mg/kg 经耳缘静脉推注麻醉,实验兔取仰卧位,腹部剃毛、消毒、铺巾,腹正中剑突下约 5 cm 长度局部皮下注射 2%利多卡因注射液 5 ml,沿腹白线切开上腹部,显露肠系膜上静脉及其分支;以玻璃分针分离肠系膜上静脉较粗大的某一支,2 根 2-0 丝线分别置于游离的静脉近端和远端下方备用;18 G 穿刺针直视下穿刺肠系膜上静脉分支,待穿刺针外鞘管进入血管腔后退出针芯,引入微导丝,退出外鞘管;沿导丝引入 PTC 穿刺套管入门静脉主干,至门静脉尾叶分支开口水平作门静脉 DSA 造影。A 组注入瘤粒若干颗,至门静脉某一支一级分支血流阻断为止;B 组注入瘤条若干条,至门静脉主干远端血流阻断或充盈缺损为止。拔出套管,5 号丝线缝合肠系膜上静脉破口,小心回纳肠管;庆大霉素生理盐水冲洗腹腔,依次逐层缝合皮下肌肉组织和皮肤,切口局部消毒、涂抹金霉素眼膏。

1.5 DSA 造影和病理学观察

所有实验兔种植 VX2 肿瘤前即刻、种植 VX2 肿瘤后即刻,均经 PTC 套管作门静脉 DSA 造影;种植 VX2 瘤后 1 周再次剖腹,以 18 G 穿刺针穿刺肠系膜上静脉分支,经穿刺针外套管作门静脉 DSA 造影,造影后立即经肠系膜上静脉灌注 4%甲醛溶液处死动物,获取肝脏标本作大体解剖学观察,PVTT 组织常规切片后作苏木精-伊红(HE)染色镜下观察。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件作统计学分析,两组间率的比较用 Fisher 精确卡方检验。

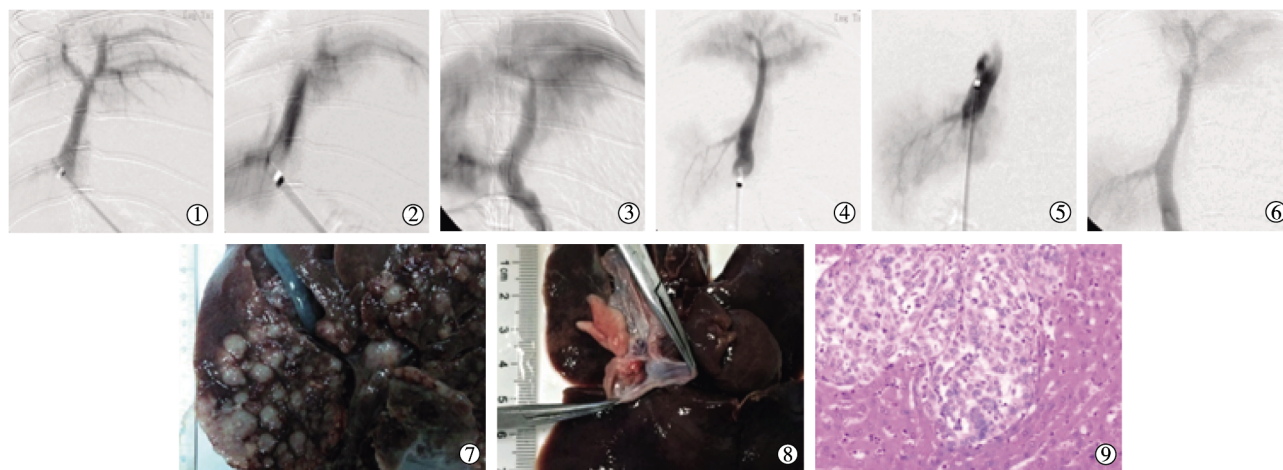
2 结果

A、B 两组实验兔均成功完成门静脉插管术,在门静脉分别植入瘤粒和瘤条,瘤株接种成功率均为 100%。

种植 VX2 肿瘤前 DSA 造影显示,实验兔门静脉及其分支走行正常,管腔完整;A 组接种瘤粒后门静脉一级分支至少有 1 支血流完全阻断,B 组接种瘤条后门静脉主干远端血流阻断或呈充盈缺损状。

术后 1 周 DSA 造影显示,A 组至少有 1 支门静脉一级分支不显影,8 只兔门静脉主干未见明显充盈缺损,2 只兔门静脉远端见充盈缺损;B 组所有兔门静脉主干或血流阻断,或见明显充盈缺损;形成的癌栓,A 组主要局限于门静脉一级分支,B 组则累及门静脉主干,两组间癌栓类型有显著的统计学差异(检验值 20.587, $P < 0.0001$)(图 1)。

病理形态学特征观察显示,A 组 8/10(80%)只



兔门静脉一级分支癌栓:①注入瘤粒前,门静脉及其分支形态正常;②注入瘤粒若干颗后,肝右叶和中叶门静脉分支血流阻断;③种植瘤粒后 1 周,肝右叶门静脉分支未见明显显影,肝中叶门静脉分支见充盈缺损。兔门静脉主干癌栓:④注入瘤条前,门静脉及其分支形态正常;⑤注入瘤条若干条后,门静脉主干血流阻断;⑥种植瘤条后 1 周,门静脉主干见不规则充盈缺损。病理形态学特征:⑦注入瘤粒组兔肝脏,门静脉主干未见癌栓,肝脏弥漫性转移灶;⑧注入瘤条组兔肝脏,门静脉主干见癌栓,肝实质未见转移灶;⑨显微镜下见癌细胞排列成巢状,癌细胞边界不清,核质比增大,并可见病理性核分裂像

图 1 兔 VX2 肝癌 PVTT 模型构建影像

兔肝脏标本未见明显门静脉主干癌栓,所有兔门静脉一级分支见癌栓生长,肝内见广泛弥漫性大小不等的转移灶,部分病灶相互融合,肝门见多发转移淋巴结融合成团(图 1⑦);B 组 10 只兔肝脏标本均见门静脉主干癌栓并延续入一级分支,肝内未见弥漫性转移灶,肝门未见转移淋巴结(图 1⑧)。显微镜下见癌细胞排列成巢状,细胞黏附性强,细胞间出现腺管或不规则腔隙;癌细胞边界不清,核浆比增大,胞质淡嗜伊红或嗜双色,细胞核增大,核膜和核仁明显,并可见病理性核分裂像(图 1⑨)。

3 讨论

肝癌伴 PVTT 预后差,有报道患者自然生存时间仅为 2.6 个月^[9],也是肝癌治疗后复发和转移的原因之一。建立 PVTT 动物模型对相关基础实验研究十分重要。与其它小动物比较,兔门静脉相对粗大,适合于影像诊断和介入诊疗实验研究^[4-8]。

通过剖腹直接穿刺肠系膜上静脉,经微导管

注入小的瘤粒构建 PVTT 模型^[7,10]。我们在预实验中发现,微导管仅能通过极小瘤粒,癌栓多分布在小的门静脉分支内生长,短期主干内形成癌栓少。这可能是瘤粒较小,门静脉注射时小瘤粒在主干几乎不停留,而是随血流停留在一级以下门静脉分支内的缘故。主干癌栓则经过逆行生长才能形成,形成主干 PVTT 时间晚,模型均一性不佳。小瘤粒随血流播散,容易进展成肝实质内弥漫性转移灶,动物生存时间短。这种模型或许可用作临床药物治疗后疗效观察,病理学、病理生理学等研究。如果需作癌栓 CT、MRI 等影像学研究,这种小分支癌栓伴肝脏弥漫性种植灶模型并非最佳选择。

范伟等^[5]、周明强等^[6]采用切开门静脉主干、腔内固定移植瘤块原位成瘤方法构建 PVTT 模型,可在门静脉主干形成癌栓,但操作复杂,需要操作者有良好的显微外科技术,可行性欠佳。该方法构建的癌栓病灶局限于肝外门静脉主干,门静脉肝内部分及门静脉分支难以形成癌栓,不太符合临床上癌

栓生长方式。

我们的方法是在介入放射学方法引导下,将 PTC 穿刺套装外套管经肠系膜上静脉置入兔门静脉,选择肠系膜上静脉一级大分支作为置管进针点,直视下穿刺成功率为 100%。若对手术有更精细要求,可在显微放大镜下操作。PTC 套管直径较大,可注入较大瘤条,我们在预实验中确认可顺利通过 0.1 cm×1.5~2.0 cm,甚至更大瘤条。本实验注入小瘤粒或长瘤条,以期将 VX2 肿瘤选择性地种植在门静脉不同分支水平,构建不同类型兔 PVTT 模型。这两种方法均容易操作,可重复性强,模型均一性较好。植入 VX2 小瘤粒形成小分支 PVTT 伴弥漫性肝癌模型,适合于临床药物治疗肝癌伴 PVTT 相关实验研究,尤其是经门静脉途径的药物研究;植入相对较大的 VX2 瘤条形成门静脉主干癌栓,肝实质相对正常,适合于对癌栓的 CT、MRI、DSA 等影像学实验研究。本实验瘤粒种植 1 周 DSA 造影显示 A 组有 2 只兔门静脉主干远端充盈缺损,可能是术中种植小瘤粒数目偏多,填满了门静脉一级分支后快速生长进入门静脉主干,以致在主干远端形成癌栓。这提示即使是注入小瘤粒,如果注入数量过多,也有可能在兔门静脉主干短时期内形成癌栓,同时伴有肝实质内广泛转移。但种植癌栓与自然生长癌栓在病理等生物学特点上有很多不同,这是兔 VX2 种植肿瘤模型的普遍缺点,也是本实验采用直接种植法构建的 PVTT 模型不足之处。

总之,本实验经兔肠系膜上静脉途径,用 PTC 穿刺套装套管成功构建了门静脉主干、一级以下分支伴有或不伴弥漫性转移灶的兔 VX2 肿瘤 PVTT 模型。研究者可经套管注入不同粒径瘤粒或瘤条,

以构建不同类型 PVTT 模型,满足不同实验研究目的需要。

[参 考 文 献]

- [1] Park HS, Han JK, Lee JM, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI using a macromolecular MR contrast agent (P792): evaluation of antivascular drug effect in a rabbit VX2 liver tumor model[J]. Korean J Radiol, 2015, 16: 1029-1037.
- [2] 黄 昊, 何仕诚, 冯国栋, 等. 骨水泥对兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型的作用研究[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 520-523.
- [3] 武 贝, 高 杨, 席 玮, 等. 经兔耳动脉与经股动脉插管行肝动脉造影的比较研究[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 329-332.
- [4] Feng G, Lei Z, Wang D, et al. The evaluation of anti-angiogenic effects of Endostar on rabbit VX2 portal vein tumor thrombus using perfusion MSCT[J]. Cancer Imaging, 2014, 14: 17.
- [5] 范 伟, 罗世樵, 李崇燕, 等. 兔移植性门静脉癌栓模型的建立及生物学特性[J]. 现代医药卫生, 2005, 21: 1626-1628.
- [6] 周明强, 刘长珠, 刘斯润, 等. 门脉癌栓兔模型的超声及 CT 影像表现[J]. 中国医药指南, 2013, 16: 110-112.
- [7] 万智勇, 冯敢生, 余宏建. 兔移植性肝癌伴门静脉癌栓模型的制作[J]. 临床放射学杂志, 2003, 22: 517-520.
- [8] 刘 煌, 李冉冉, 陈文有, 等. VX2 肝癌兔肝动脉联合门静脉插管模型的建立及其手术方法的比较[J]. 肝胆外科杂志, 2012, 20: 225-228.
- [9] Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials[J]. Hepatology, 1999, 29: 62-67.
- [10] 张 峰, 李康安, 张贵祥, 等. 新西兰兔门静脉癌栓模型的建立及 MCT 和 DSA 评价[J]. 复旦学报·医学版, 2005, 32: 738-741.

(收稿日期:2015-08-30)

(本文编辑:边 佶)