

## • 实验研究 Experimental research •

# CT 导引下“体外预装示踪一步植入技术” 制作兔肝/肾肿瘤模型

张 强, 李 彬, 李晓光, 游国超, 高 毅

**【摘要】 目的** 采用 CT 导引下经皮穿刺“体外预装示踪一步植入技术”制作兔 VX2 肝/肾肿瘤模型, 评价该方法的有效性及其便捷性。**方法** 采用一次性 16 G 胸穿刺针(8.5 cm)和自制 18 G 穿刺探针进行接种。胸穿刺针头腔内逆行装填 1.5 mm×1.5 mm×3.0 mm 明胶海绵条并用 0.3 mL 对比剂浸润, 再逆行装入 1.0 mm×1.0 mm×3.0 mm VX2 组织块 1 条完成体外预装。CT 导引下预装穿刺针经皮穿刺实验兔靶器官, 确认针尖到达理想靶点(种植肝肿瘤于肝左叶外侧段, 肾肿瘤于肾下极), 将针尾端插入探针并推出内装的肿瘤组织块和明胶海绵, 30 s 后缓慢地整体拔出穿刺针和探针并按压穿刺点 60 s, CT 扫描明确高密度明胶海绵位置。记录植瘤时间。2、3、4 周后增强 CT 确认建模结果。**结果** 术后即刻 CT 显示植瘤部位表现为肝内/肾内结节状高密度影。肝肿瘤造模 10 只兔, 均获成瘤(10/10), 平均植瘤时间 4.3 min; 肾肿瘤造模 10 只兔, 成瘤 9 只(9/10), 平均植瘤时间 4.9 min。所有成瘤均为单发, 成瘤部位与高密度明胶海绵部位基本一致。随访观察显示肝种植瘤 CT 增强为周边强化, DSA 为环状强化, 肾种植瘤 CT 增强及 DSA 均表现为肾实质染色缺损。所有接种肿瘤 3~4 周后快速增长明显。**结论** CT 导引下“体外预装示踪一步植入技术”制作兔 VX2 肝/肾肿瘤模型, 具有便捷省时、术后即刻确认接种部位、成瘤率高且孤立成瘤等优点。

**【关键词】** 兔; VX2 肿瘤; 肾; 肝; 动物实验

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2018)-03-0252-05

**The establishment of liver and kidney tumor model in rabbits with CT-guided “external pre-loaded and traced one-step implantation technique”** ZHANG Qiang, LI Bin, LI Xiaoguang, YOU Guochao, GAO Yi. Department of Interventional Radiology, Anyang District Hospital, Anyang, Henan Province 455000, China

Corresponding author: LI Xiaoguang, E-mail: xglee88@126.com

**【Abstract】 Objective** By using CT-guided percutaneous inoculation with “external pre-loaded and traced one-step implantation technique” to establish VX2 liver and kidney tumor model in experimental rabbits, and to evaluate the effectiveness and convenience of this technique. **Methods** By using a disposal 16G thoracic puncture needle (length of 8.5 cm) and a self-made 18 G puncture probe, inoculation of tumor cells was performed in experimental rabbits. Retrograde filling of gelatin sponge strip, which was infiltrated with 0.3 mL contrast medium, into the thoracic puncture needle lumen was performed, which was followed by retrograde loading of 1×1×3 mm<sup>3</sup> VX2 tissue block, and the pre-assembly in vitro was completed. Under CT guidance, percutaneous puncturing of the target organ of experimental rabbit with pre-assembly probe was conducted, then, the end of the needle was inserted into the probe to push out the tumor tissue and gelatin sponge when it was verified that the needle tip reached the desired target point. After 30 seconds, the needle and probe were pulled out slowly and integrally, and the puncture point was manually pressed for 60 seconds. CT scan was performed to check the location of high-density gelatin sponge. The tumor inoculation time was recorded. Contrast-enhanced CT scan was employed at 2, 3 and 4 weeks after inoculation to validate the

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.03.014

作者单位: 455000 河南 安阳地区医院介入科(张 强、游国超、高 毅);北京医院肿瘤微创治疗中心(李 彬、李晓光)

通信作者: 李晓光 E-mail: xglee88@126.com

modeling results. **Results** Immediate postoperative CT scan showed that the inoculation site was manifested as nodular high density shadow in the liver or kidney parenchyma. Liver tumor modeling was used in 10 rabbits, and tumor formation was obtained in all 10 rabbits (100%, 10/10), and the mean time used for inoculation was 4.3 minutes. Kidney tumor modeling was adopted in 10 rabbits, and tumor formation was obtained in 9 rabbits (90%, 9/10), and the mean time used for inoculation was 4.9 minutes. The inoculated tumor was characterized by a single lesion in all experimental rabbits, the location of the tumor was basically the same as that of the high density gelatin sponge. Check-up contrast-enhanced CT scan showed that the liver implanted tumor had peripheral enhancement, which presented as ring-shaped enhancement on DSA. The kidney implanted tumor was manifested as renal parenchyma staining defect on both contrast-enhanced CT scan and DSA. After 3–4 weeks of inoculation, the implanted tumors grew rapidly. **Conclusion** For the establishment of rabbit VX2 liver and kidney tumor models, CT-guided percutaneous inoculation with “external pre-loaded and traced one-step implantation technique” is very effective. This technique has several advantages, such as convenient and time-saving, postoperative immediate confirmation of the inoculation site, higher tumor formation rate, solitary tumor formation, etc. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 252-256)

**【Key words】** rabbit; VX2 tumor; kidney; liver; animal experiment

兔 VX2 肿瘤模型制作方法多种多样,种植方式有开腹法及 CT 或超声引导下经皮穿刺种植法,瘤源包括细胞悬液或组织块。开腹种植法创伤较大,细胞悬液种植法靶器官外种植转移发生率较高,CT 或超声引导下组织块种植法是目前常用的兔 VX2 肿瘤模型制作方法<sup>[1-2]</sup>。文献报道中多采用空芯穿刺针穿刺兔肝脏/肾脏,再经针尾将 VX2 组织块用针芯推入,存在植入组织块碎裂、大小不一、拔针时组织块移位、成瘤大小和位置均质性差等问题。为此,本研究对传统组织瘤块种植法进行改良,体外将浸润少量对比剂的明胶海绵条、肿瘤组织块逆向预装入穿刺针内,然后在 CT 引导下经皮穿刺靶器官,穿刺针到位后将组织块和明胶海绵条“一步”推送植入,较传统方法便捷省时、孤立成瘤率高。具体实验结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新西兰大白兔 26 只,雌雄不限,体重 2~3 kg,由北京协和医院实验动物中心提供;VX2 瘤株由中国医学科学院北京协和医学院基础研究所细胞中心提供。设备及器材包括前瞻性扫描 2013 型 CT 机(德国 Siemens 公司)、Infinix-i INFX-8000 V 型 DSA 机(日本 Toshiba 公司)、16 G 8.5 cm 种植穿刺针、一次性胸穿刺包(佛山特种医用导管公司)、18 G 穿刺套管针针芯(头端磨平,作为种植穿刺针针芯)(美国 Angiotech 公司)、明胶海绵(广州市快康医疗器械公司)、2%利多卡因(5 mL:1 g,中国大冢制药公司)、3%戊巴比妥(美国 Sigma 公司)、肝素

钠(2 mL:12 500 U,江苏万邦生化医药公司)、碘海醇注射液(350 mg I/mL,通用电气药业上海公司)。

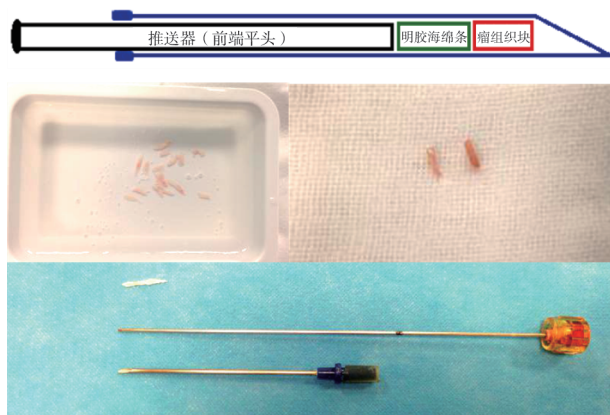
### 1.2 种兔制作和组织块体外预装

将已冻存 VX2 瘤株组织迅速置于 37℃ 水浴内融化、快速复苏,低温以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量磷酸缓冲液(PBS)摇匀,制成细胞悬液备用。取 VX2 细胞悬液 1 mL 接种于肿瘤传代兔后腿外侧最厚肌肉群内,2 周后观察接种部位是否可触及肿块,并作增强 CT 扫描,进一步确认荷瘤兔制备是否成功。

3%戊巴比妥(1 mL/kg)经耳缘静脉麻醉荷瘤兔,肿块处备皮消毒,无菌条件下取出肿块,切开、去除中心坏死组织,取边缘生长旺盛的鱼肉样组织,用手术刀片切割成约 1.0 mm×1.0 mm×3.0 mm 组织块,置于无菌 0.9%NaCl 溶液中备用。将明胶海绵块修剪为 1.5 mm×1.5 mm×3.0 mm 长条状数条备用;取无菌 16 G 8.5 cm 胸穿刺针,剪除尾端连接管;将 18 G 穿刺针针芯头端磨平,消毒备用,于距离针芯头端 9.5 cm 处作一标记。将明胶海绵条沿长轴捻动压缩,经穿刺针头端逆向填入针腔内约 3 cm,用 1 mL 注射器抽取对比剂 0.3 mL,注入穿刺针针腔内将明胶海绵条浸润;用注射器针头挑取肿瘤组织块 1 条,经穿刺针头端逆向填入针腔内,将组织块完全填入(组织块头端距离针尖斜面 0.5~1 cm);用无菌 0.9%NaCl 溶液纱布将穿刺针头端擦拭 5~10 次,去除针尖表面可能残留的肿瘤细胞,完成组织块预装,备用(图 1)。

### 1.3 兔 VX2 肝/肾肿瘤模型制作

兔 VX2 肝肿瘤模型——实验兔耳缘静脉用 3%



自上至下:预装穿刺针示意图、组织块实物、穿刺针实物

图1 “体外预装示踪一步植入技术”

戊巴比妥(1 mL/kg)麻醉后,仰卧位固定于操作台上,腹部备皮,消毒铺巾;CT扫描定位穿刺点,设计进针路线,取肝左叶外侧段为预接种部位;1%利多卡因 2 mL 作穿刺点局部麻醉,切开穿刺点皮肤约 5 mm,用预装穿刺针沿预先设计进针路线穿刺入 1.5~2 cm,CT扫描确定针尖部位,使之位于肝左叶实质中部;位置合适后经穿刺针尾端缓慢推送针芯至标记处并保留 30 s,随后缓慢旋转并整体拔出穿刺针,穿刺点按压 1 min,再次消毒。术后即刻 CT 扫描确定高密度明胶海绵位置,预判种植部位。兔 VX2 肾肿瘤模型——实验兔麻醉后,俯卧位固定于操作台上,背部备皮,消毒铺巾,CT扫描定位穿刺点,设计进针路线,取肾下极为种植部位;1%利多卡因 2 mL 作穿刺点及穿刺针道局部麻醉,切开穿刺点皮肤约 5 mm,用预装穿刺针沿预先设计进针路线穿刺入 2~2.5 cm,CT扫描确定针尖部位,使之位于肾下极内;位置合适后经穿刺针尾端缓慢推送针芯至标记处并保留 30 s,随后缓慢旋转并整体拔出穿刺针,穿刺点按压 1 min,再次消毒。术后即刻 CT 扫描确定高密度明胶海绵位置,预判种植部位。

术毕记录植瘤时间(局部麻醉开始至拔针完成所用时间)。实验兔自然清醒,送动物房饲养。2 周后作增强 CT 扫描检查,明确有无肿瘤生长,并与预判种植部位对比,明确肿瘤生长部位与预接种部位是否一致。3 周后再次 CT 增强扫描检查,明确肿瘤生长特点。取两模型实验兔各 1 只作肝、肾肿瘤组织学检查,常规苏木精-伊红(HE)染色。后续经兔隐动脉入路分别行肝、肾肿瘤栓塞<sup>[3]</sup>,观察肝、肾 VX2 肿瘤造影表现。

#### 1.4 随访观察

接种后 2 周对种兔模型作 CT 平扫和增强扫描(管电压 80 kVp,管电流 120 mAs,层厚 2 mm,矩阵

512×512,照射野 150 mm)——肝脏 3 期扫描,动脉期延迟 6 s,门静脉期 31 s,延迟期 37 s;肾脏 2 期扫描,动脉期延迟 8 s,延迟期 31 s——对比剂经 22 G 静脉留置针经耳缘静脉注入(剂量 1 mL/kg,速率 1.5 mL/s,压力 100 psi)。将 CT 成像传送至 Syngo 工作站,分别检测肿瘤矢状面、横断面及冠状面最大径,采用“Oncology”及“Volume”软件测定不同层面径线,记录肿瘤体积。

#### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件作统计学处理,所得数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

2 只实验种兔制作均成功,2 周后种植部位可触及肿块,质硬。CT 见种植部位肌肉内类圆形强化肿块,直径约 1.5 cm,周边强化明显。肝肿瘤接种 10 只兔,接种均获成功,无感染及死亡发生;植瘤时间 3.5~5.5 min,平均 4.3 min。肾肿瘤接种 10 只兔,接种成功 9 只(9/10),无感染及死亡发生。植瘤时间 4.3~6.5 min,平均 4.9 min。

肝肿瘤生长区与对比剂标记的高密度明胶海绵区基本一致。2 周 CT 平扫表现为肝内单发类圆形低密度病灶,动脉期周边环状强化,门静脉期肿瘤周边强化环密度逐渐减低,呈向心性强化趋势,但不能完全使病灶强化,平衡期瘤周强化环密度进一步减低,中心可见未强化低密度区;3 周病变明显增大,强化特点与 2 周时相同,但中心未强化区明显增大(图 2①~③);4 周出现肝肺转移播散。随访期间无穿刺针道及肝外种植转移发生,DSA 检查表现为肝内单发病变,类圆形,病变周边染色明显(图 2④)。组织学检查显示肿瘤细胞核大深染,侵犯邻近正常肝组织(图 2⑤)。VX2 肝肿瘤径线及体积变化见表 1。

肾肿瘤生长区与对比剂标记的高密度明胶海绵区基本一致。2 周时 CT 平扫肿瘤轮廓显示不清,动脉期表现为肾下极单发占位性病变,强化不明显,表现为肾皮质连续性中断或皮质缺损;延迟扫描肿瘤边界清楚、密度较肾实质低、类圆形,周边轻度强化,中心强化不明显,占位效应明显,邻近肾盏受压变形,重建图像显示病变位于肾实质内,未突破肾包膜;3 周病变明显增大,占位效应明显,中心未强化区扩大,肿瘤突破肾皮质外生(图 3①~③);4~5 周肿瘤突破肾包膜,侵犯邻近筋膜并出现肺转移。DSA 检查表现为肾下极实质内染色缺损区,占





①穿刺针位于肝左叶,针尖位置良好;②高密度明胶海绵条示肿瘤种植部位;③3 周后增强 CT 示肝肿瘤周边强化明显,中间可见无强化区;④ DSA 示肿瘤类圆形染色,血供丰富;⑤组织学检查(HE,×100)示肿瘤组织聚集成团,核大深染,侵犯周围正常肝脏组织

图 2 VX2 肝肿瘤种植影像及组织学随访结果

表 1 VX2 肝肿瘤径线及体积随时间变化  $\bar{x} \pm s$

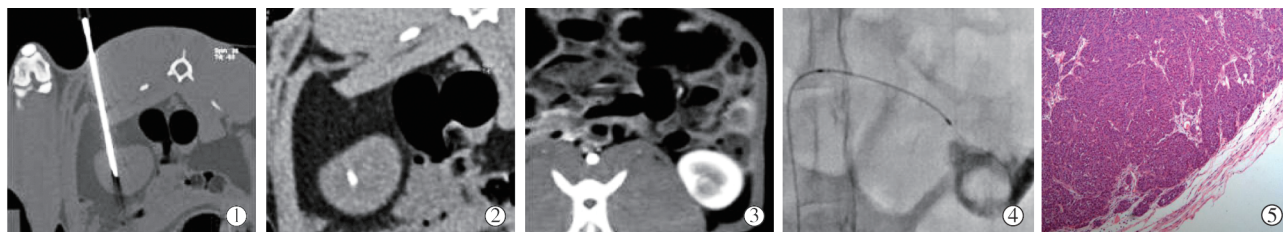
时间	横断面/cm	矢状面/cm	冠状面/cm	体积/cm <sup>3</sup>
2 周	1.03±0.32	1.03±0.29	1.16±0.31	0.74±0.54
3 周	2.14±1.21	1.75±0.38	1.78±0.52	3.47±2.77
4 周	3.44±1.28	3.11±1.09	3.16±1.02	15.26±9.94

位效应明显(图 3④);组织学检查显示 2 周时肿瘤

细胞核大深染,瘤组织未突破肾包膜(图 3⑤)。VX2 肾肿瘤径线及体积变化见表 2。

### 3 讨论

VX2 肿瘤模型种植方法多种多样<sup>[4-13]</sup>。既往多采用细胞悬液法制备,但操作过程繁琐,最主要是



①俯卧位穿刺,穿刺针位于左肾下极,针尖位置良好;②种植后高密度明胶海绵条提示肿瘤种植部位;③3 周后增强 CT 示动脉期肾皮质强化明显,肿瘤组织呈类圆形无强化区;④ DSA 示肿瘤类圆形染色缺损区;⑤组织学检查(HE,×40)示肿瘤组织核深染,聚集成团,未突破肾包膜

图 3 VX2 肾肿瘤种植影像及组织学随访结果

表 2 VX2 肾肿瘤径线及体积随时间变化  $\bar{x} \pm s$

时间	横断面/cm	矢状面/cm	冠状面/cm	体积/cm <sup>3</sup>
2 周	1.06±0.31	1.19±0.40	1.13±0.31	0.68±0.46
3 周	1.53±0.26	1.70±0.23	1.43±0.25	1.97±0.82
4 周	2.08±0.38	2.22±0.37	2.16±0.47	5.09±1.78

易发生转移和针道种植,使造模失败,故不适合介入放射学动物实验研究。目前多采用组织块种植法,其简便,易于成瘤,孤立成瘤率较高。开腹种植法创伤较大,而腹腔镜种植法需要专门器械及操作技能。因此,影像设备引导下经皮穿刺组织块种植法是目前常用造模方法<sup>[7-8,10,12]</sup>。

既往报道影像引导下经皮穿刺组织块种植法多采用“后装技术”,即穿刺针到位后再将组织块及明胶海绵块经穿刺针尾部缓慢推入。但该方法有以下缺点:组织块在针腔内移行距离长,与针腔内壁摩擦,可能损伤部分组织;“后装技术”耗时且不便,装填组织块时需要固定穿刺针,穿刺针随实验兔呼吸可能在体内移位,从而使种植部位发生移位,特别是对体积相对小的脏器如肾脏,更易发生穿刺针移位,导致植瘤失败。为此,本实验改进该方

法,采用“体外预装示踪一步植入技术”——先体外逆向将明胶海绵条填入穿刺针内,并用对比剂浸润明胶海绵,起示踪作用,后再逆行填入修剪好的组织块 1 条于针腔内,预装完成后反复擦拭穿刺针尖部,去除表面可能残留的组织块碎屑或细胞。采用预装好的穿刺针直接穿刺,穿刺针到位后可快速将组织块推送入靶器官,耗时明显减少,且组织块在针腔内移行距离明显缩短,降低了组织块损伤及组织碎屑脱落概率,进而降低移位种植风险。

与 VX2 肝肿瘤模型近似,超声及 CT 引导下组织块种植法也是较为理想的 VX2 肾肿瘤模型制作方法<sup>[13-16]</sup>,成瘤率为 40%~100%<sup>[17-18]</sup>。由于肾脏较肝脏小,影像引导下种植较肝脏困难,准确判定针尖位置至关重要;CT 较超声有较高的组织分辨率和空间分辨率,采用 CT 引导下组织块种植,即刻 CT 扫描即可显示肿瘤种植部位是否理想。本实验肾肿瘤种植成瘤率 90%(9/10),均为单发成瘤,无肾外种植发生,2 周肿瘤主要位于肾实质内。因此,该方法是理想的兔 VX2 肿瘤模型制作方法。

本实验采用“体外预装示踪一步植入技术”制

作兔 VX2 肝/肾肿瘤模型, 优点在于肿瘤组织块已预装好, 穿刺针位置理想后即可用针芯推送, 可减少穿刺针在体内滞留时间及移位概率, 缩短手术时间, 术后可即刻了解肿瘤种植部位, 便捷有效; 结果显示肿瘤生长区与对比剂标记的高密度明胶海绵区基本一致。浸润对比剂的明胶海绵条既起到示踪作用, 又可封堵穿刺针道, 防止出血和组织块在拔针时移位于靶器官外, 发生种植转移。本实验采用大小长度基本一致的单一组织块种植, 与既往报道相比增加了组织块长度, 未增加组织块数量, 结果均可成瘤, 且为孤立种植瘤, 2~3 周随访无靶器官外种植转移。种植瘤大小和位置均一性好, 更加适合进行肝/肾肿瘤经导管动脉栓塞或经皮消融实验研究。

#### [参考文献]

- [1] 钱 亨, 陈茂振, 高 峰, 等. 两种方法建立兔 VX2 肝癌模型的比较及影像学评估[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 58-61.
- [2] 李远竞, 刘 颖, 沈维红, 等. 超声引导下组织块接种制作兔 VX2 瘤模型[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24: 1886-1888.
- [3] 张 强, 郭子义, 李 彬, 等. 隐动脉置管在兔肝肾动脉介入治疗中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 1090-1094.
- [4] 杨 林, 李祖茂, 周翔平. 兔 VX2 肝癌动物模型的建立[J]. 川北医学院学报, 2010, 25: 156-159.
- [5] 朱光宇, 滕皋军, 牛焕章, 等. 兔 VX2 肝癌模型建立方法的比较及股动脉插管方法的应用[J]. 中国医学影像技术, 2006, 22: 1785-1788.
- [6] 鲁 东, 吕维富, 高 斌, 等. 兔 VX2 肝癌模型的改良制作及肝血管造影技术探讨[J]. 医学影像学杂志, 2009, 19: 1333-1337.
- [7] 王 凯, 蒋国民, 赵进委, 等. CT 引导下兔 VX2 肝癌模型制作及血管造影技术[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7: 664-667.
- [8] 邵海波, 徐 克, 苏洪英, 等. CT 引导下套管针种植法制作兔双灶肝癌模型的评价[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20: 292-295.
- [9] Chen Z, Kang Z, Xiao EH, et al. Comparison of two different laparotomy methods for modeling rabbit VX2 hepatocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 4875-4882.
- [10] Sun JH, Zhang YL, Nie CH, et al. Considerations for two inoculation methods of rabbit hepatic tumors: pathology and image features[J]. Exp Ther Med, 2012, 3: 386-390.
- [11] Parvinian A, Casadaban LC, Gaba RC. Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and "how to" guide[J]. Diagn Interv Radiol, 2014, 20: 335-340.
- [12] White SB, Chen J, Gordon AC, et al. Percutaneous ultrasound guided implantation of VX2 for creation of a rabbit hepatic tumor model[J]. PLoS One, 2015, 10: e0123888.
- [13] 涂 刚, 乔天愚, 杨光永. VX2 兔肾癌模型的制作及传代保存[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20: 167.
- [14] Lee JM, Kim SW, Chung GH, et al. Open radio-frequency thermal ablation of renal VX2 tumors in a rabbit model using a cooled-tip electrode: feasibility, safety, and effectiveness[J]. Eur Radiol, 2003, 13: 1324-1332.
- [15] Ho Y, Huang Y, Lin C, et al. Application of radiofrequency ablation of renal VX2 tumors by cooled-tip electrode in a rabbit model[J]. J Endourol, 2009, 23: 677-684.
- [16] 王玉忠, 郭宏筹, 刘光香. 兔 VX2 肾癌模型的构建及其外周血细胞因子的变化[J]. 江苏大学学报·医学版, 2011, 21: 23-25.
- [17] 王子明, 余军军, 程 伟, 等. 兔肾 VX2 移植瘤模型的建立及其超声显像检测[J]. 西安交通大学学报·医学版, 2006, 27: 55-58.
- [18] Bruners P, Braunschweig T, Hodenius M, et al. Thermoablation of malignant kidney tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study in a rabbit model[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2010, 33: 127-134.

(收稿日期: 2017-10-18)

(本文编辑: 边 皓)