

·实验研究 Experimental research·

经脾种植 VX2 瘤株悬液建立兔肝转移瘤模型

吴勇超, 李智岗, 史 博, 荣小翠, 李亚洲, 夏青青, 武中林

【摘要】 目的 探讨经脾种植 VX2 瘤株构建肝转移瘤(LM)模型的可行性及能否成为 LM 临床和基础研究的理想动物模型。**方法** 选取 40 只新西兰大白兔。制备 VX2 瘤株悬液。经左上腹切口将脾脏牵拉出腹腔,用 1 mL 注射器将瘤株悬液注入脾脏,注射后将脾脏纳入腹腔,逐层缝合。2 周后行上腹部增强 CT 扫描,观察 LM 模型肝内影像学表现。将兔处死行大体解剖,观察 LM 在肝内分布。对 LM 脱水、固定后行苏木精-伊红(HE)染色,观察其镜下表现。**结果** 40 只兔 VX2 肝转移瘤模型成功种植 37 只,种植成功率为 92.5%。1 只兔种植中麻醉死亡,1 只未种植成功,1 只 CT 增强扫描时死亡。37 只兔上腹部增强 CT 扫描显示肝内转移瘤强化,周边呈环形强化,中心区未见强化,与临床上常见消化道 LM 增强 CT 表现一致;大体解剖显示肝内各叶有大小不等多发 LM,分布无明显特点,与临床上肿瘤经门静脉途径转移至肝脏的特点一致;镜下见 LM 中心区为坏死细胞,外周区表现为浓染的肿瘤细胞、炎性细胞等。**结论** 经脾种植 VX2 瘤株悬液可成功建立兔 LM 模型,脾脏转移至肝脏的转移瘤更符合临床上消化道肿瘤经门静脉途径转移至肝脏模式。该模型值得在临床和基础研究中推广。

【关键词】 脾脏; 种植; 兔 VX2; 肝转移瘤模型; 门静脉

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-09-0861-04

Establishment of rabbit liver metastasis model by splenic implantation of VX2 tumor strain suspension

WU Yongchao, LI Zhigang, SHI Bo, RONG Xiaocui, LI Yazhou, XIA Qingqing, WU Zhonglin. Department of Interventional Radiology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province 050011, China

Corresponding author: WU Zhonglin, E-mail: 191610485@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of establishing a liver metastasis (LM) model by splenic implantation of VX2 tumor strain, and to discuss whether it can be used as an ideal animal model for clinical and basic research of LM. **Methods** A total of 40 New Zealand white rabbits were selected for this study. The VX2 tumor strain suspension was prepared. Through left upper abdominal incision the spleen was pulled out of the abdominal cavity, with a 1 mL syringe the tumor strain suspension was injected into the spleen, then, the spleen was pushed back into the abdominal cavity and the abdominal wall was sutured layer by layer. Contrast-enhanced CT scan of the upper abdomen was performed two weeks after the procedure to observe the imaging manifestations of LM lesions. The experimental rabbits were sacrificed for gross anatomy, and the distribution of LM lesions was determined. After dehydration and fixation of LM lesions, hematoxylin-eosin(HE)staining of tissue slices was made for microscopic examination. **Results** Successful implantation of VX2 tumor strain suspension was achieved in 37 experimental rabbits, the planting success rate was 92.5%. One rabbit died due to intraoperative anesthesia, implantation of VX2 tumor failed in one rabbit, and one rabbit died during contrast-enhanced CT scan. Contrast-enhanced CT scan of the upper abdomen in 37 rabbits demonstrated that intrahepatic metastatic lesions showed enhancement area with periphery ring-shaped enhancement and no central enhancement was observed, which were consistent with the enhanced CT presentation of LM lesions from commonly-seen digestive tract tumors. Gross anatomy revealed that multiple

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.09.012

基金项目: 河北省科技支撑计划自筹经费项目(162777216)、河北省科技厅重点研发计划项目(18277744D)

作者单位: 050011 石家庄 河北医科大学第四医院放射介入科

通信作者: 武中林 E-mail: 191610485@qq.com

liver metastases with varying sizes were found in each lobe of liver, and their distribution pattern had no obvious characteristics, which was consistent with the pathological features of hepatic metastases via portal vein approach. Microscopically, there were necrotic cells at the central area of LM lesion and densely-stained tumor cells together with inflammatory cells at the peripheral zone. **Conclusion** The rabbit LM model can be successfully established by transplanting VX2 tumor strain suspension in spleen, and the LM lesions metastasized from the spleen is quite consistent with the lesions metastasized from upper digestive tract tumor through portal vein. Therefore, this model is worth popularizing in clinical and basic researches. (J Intervent Radiol, 2019, 28: 861-864)

[Key words] spleen; implantation; rabbit VX2 model; liver metastasis model; portal vein

肝脏特殊的解剖结构和双重血供,成为恶性肿瘤常见的转移脏器之一,尤其是消化道肿瘤。消化道肿瘤最常见转移部位为肝脏^[1-2]。临床上正尝试应用多种治疗策略控制其发展或根治肝转移瘤(liver metastases, LM), 提高患者生存质量和延长生存期。LM 涉及多种恶性肿瘤, 患者病情复杂, 因此建立 LM 动物模型、分析其生物学特性、为患者研制出个性化疗法具有重要的临床指导意义。LM 转移途径包括血行转移、淋巴转移和直接转移, 消化道恶性肿瘤中最常见转移方式为血行转移, 尤其是经门静脉途径转移^[3]。目前常用 LM 动物模型主要为小鼠模型、裸鼠模型等^[4-5], 大型哺乳动物 LM 模型构建多采用兔 VX2 肿瘤, 但其归属肝癌模型^[6-7]。理想的 LM 动物模型应与人类 LM 生物学行为相同或相近, 能全面表现肿瘤浸润、转移全过程。因此建立一种符合消化道肿瘤转移至肝脏的模型, 精确模拟肿瘤在患者体内表现, 不仅可更好地理解 LM 生物学特性, 最终研制出个性化疗法, 还能减少对实验动物的需求, 对 LM 基础和临床研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 兔 VX2 瘤株及其细胞悬液制备

在新西兰大白兔后腿处种植 VX2 肿瘤细胞, 约 2 周后形成类圆形肿块。兔麻醉后于无菌条件下将瘤块取出, 去除瘤组织内豆腐渣样坏死区, 留取鱼肉样生长活跃瘤组织, 以备制取 VX2 细胞悬液。超净台上将新鲜鱼肉样瘤组织反复剪切, 并于比目网中反复冲洗, 重复进行直至瘤组织不再透过比目网为止; VX2 悬液离心(100 r/min)约 5 min, 去除上清液, 再次吹吸、离心, 反复进行至少 3 次以上; 对最后的细胞悬液作锥虫蓝染色, 制成约 1×10^6 个细胞/mL 悬液, 吸取至 1 mL 注射器内。

1.2 建立兔 VX2 LM 模型

选取 40 只新西兰大白兔, 种植前至少禁食

12 h。实验兔以 1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)麻醉成功后, 固定于动物手术台上, 腹部剃毛、消毒, 铺手术巾, 沿左侧肋缘下斜行切口 5~8 cm, 逐层分离, 直至暴露腹腔脏器, 找到左侧肠系膜后轻轻拉拽, 脾脏沿肠系膜暴露后游离出腹腔外; 将装有 VX2 瘤株悬液 1 mL 注射器沿脾脏最厚处斜行插入, 注入约 0.3 mL 悬液, 拔出注射器迅速用适量明胶海绵块压迫穿刺点 1~2 min, 确认无出血和悬液溢出后将脾脏回纳入腹腔, 约 5 mL 0.9%氯化钠溶液进行腹腔冲洗, 然后逐层缝合。缝合后连续 3 d 对兔进行抗炎治疗, 预防术后感染。

1.3 CT 检查和解剖观察

种植术后 2 周行上腹部 CT 增强扫描, 观察 LM 模型肝内影像学表现, 由放射科高年资医师作出诊断, 判断是否与临床上人 LM 增强表现一致。CT 增强扫描确认转移成功后处死模型兔, 解剖分离肝脏, 观察 LM 在肝内分布及其大小等情况。

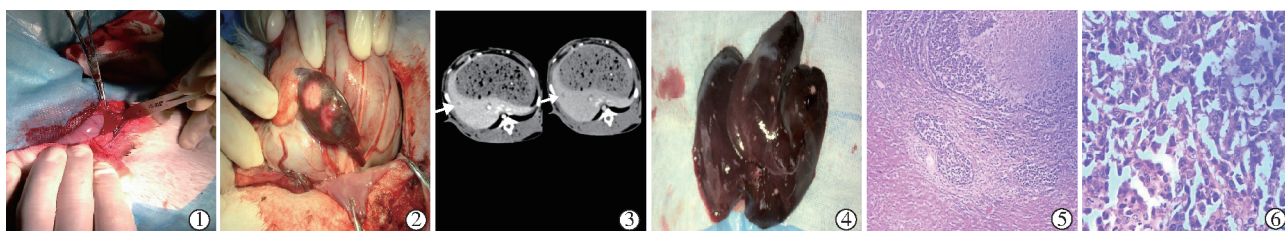
1.4 组织学分析

对兔 VX2 LM 进行分离、脱水、固定和苏木精-伊红(HE)染色, 镜下观察兔 VX2 LM 组织学表现及与周围正常肝组织的关系。

2 结果

VX2 细胞悬液种植新西兰大白兔 40 只, 种植成功率为 92.5%(37/40)(图 1①②)。1 只兔种植中麻醉死亡, 1 只未种植成功, 1 只 CT 增强扫描时死亡, 考虑可能是麻醉药物过敏和对比剂过敏所致。种植成功兔模型上腹部 CT 增强扫描显示, 肝脏内可见多发大小不等 LM, 动脉期特点为转移瘤周边呈环形强化, 中心区未见强化, 静脉期特点为转移瘤环形强化程度衰减(图 1③), 与临床上常见消化道肿瘤所致 LM 强化方式一致。

兔 VX2 LM 肝脏解剖可见肝脏呈多叶, 与人肝脏肝叶分型不一样, 肝内可见多发 LM, 大小不一,



①正常兔脾脏形状呈狭长、弯月牙状;②脾脏种植VX2瘤株悬液2周后形成的脾脏肿瘤;③腹部增强CT显示动脉期LM为环形强化,中心无强化(箭头),静脉期LM强化衰减,中心无强化(箭头);④解剖游离出肝脏后观察LM为多发、散在分布,肝脏各叶均有转移瘤存在;⑤⑥镜下观察LM外周为浓染的具有活性肿瘤细胞,中心区域为嗜碱性红染的坏死细胞

图1 经脾种植VX2瘤株构建兔LM模型过程图像

肝脏各叶均有转移发生(图1④),分布无明显特点;脾脏明显增大,脾内可见原发性肿瘤生成,脾周未见有新生肿瘤或与周围组织粘连,表明针尖穿刺脾脏种植瘤株未穿破脾脏,未导致悬液种植于脾外。

HE染色镜下观察发现,LM中心区域为坏死细胞和少量肿瘤细胞,坏死细胞排列松散,呈嗜碱性红染,外周为浓染的具有活性的肿瘤细胞、结缔组织和炎性细胞,LM压迫周围正常肝组织(图1⑤⑥)。

3 讨论

肝脏是恶性肿瘤常见转移脏器之一,仅次于淋巴转移而居第2位。消化道恶性肿瘤,尤其是结直肠癌最常见转移脏器为肝脏。研究证实,10%~25%结直肠癌患者确诊时已存在肝脏转移,且40%~60%结直肠癌患者接受相关治疗时发生肝脏转移^[1-2]。目前LM治疗方法有手术、消融、放疗、化疗、分子靶向治疗及经导管动脉化疗栓塞术(TACE)等,近期效果均令人欣慰,但远期疗效并不理想。因此,建立符合人类LM生物学行为的动物模型,不仅可更好地理解LM生物学特性,最终为患者研制出个性化疗法,延缓肿瘤进展,提高生存质量,延长生存期,还能减少对实验动物需求,对LM基础和临床研究具有重要意义。

理想的LM动物模型应与人类LM生物学行为相同或相近,能全面表现肿瘤浸润、转移全过程。研究证实,脱落的肿瘤细胞通过肠系膜静脉和脾静脉回流至门静脉并进入肝脏恶性增殖、形成LM,是消化道恶性肿瘤血液转移的主要机制^[3]。目前LM动物模型研究多采用小鼠或裸鼠模型,然而由于体积小无法进行消融、TACE等临床研究。兔VX2模型体积大、耐受性高、肝脏血运系统丰富,是临床或基础研究常用的可进行多种实验的理想动物模型^[8-10]。目前兔VX2模型构建多直接种植于肝脏,形成LM用于研究原发性肝癌各种治疗方法^[6-7],也有

学者将VX2瘤块种植于膀胱形成膀胱肿瘤模型^[8]等。本研究经脾构建兔VX2 LM模型,40只兔成功构建37只模型,成功率为92.5%;对种植成功的LM模型作肝脏CT增强扫描发现,动脉期强化方式为环形染色,中心坏死区域未见强化,周边肿瘤活跃区域强化明显;HE染色中心区域为坏死细胞,呈嗜碱性红染,外周表现为浓染的肿瘤细胞、结缔组织和炎性细胞,这种表现与增强CT环形强化相关。上述影像学表现和病理表现与人消化道肿瘤所致LM影像学表现和病理表现相似^[11]。肝脏大体解剖发现LM在兔肝脏各叶均有分布且大小不一,这种表现与临床上结直肠癌肝转移表现也一致。综上所述,兔VX2 LM模型在转移形态、影像学表现和大体病理上与结直肠癌肝转移表现一致,可成为理想的用于临床和基础研究的动物模型。

总结本研究构建兔VX2 LM模型的经验 and 注意点:①兔VX2 LM模型构建多以瘤块作VX2瘤株种植,不易造成瘤块外溢,形成腹腔种植,而兔脾脏太小且薄、呈狭长状,瘤块种植易造成脾脏破裂或穿透脾脏,故采用VX2瘤株悬液吸入1 mL注射器后进行种植,结果表明种植成功率高。②瘤株悬液注射时1 mL注射器针头斜行插入脾脏,深度为0.2~0.3 cm,既可避免穿透脾脏风险,又能将瘤株悬液注入脾脏内不易造成悬液溢出,导致腹腔内种植;注入完毕针头拔出后应采用明胶海绵块压迫穿刺点1~2 min,以利于瘤细胞种植在脾脏深处,防止悬液回流入腹腔内。③有报道采用VX2瘤株种植结肠形成原位癌和LM^[12],本课题组应用此方法发现易造成结肠穿透和坏死,因而若只是单纯研究LM,可行经脾种植VX2瘤株形成LM模型,既符合临床上经门静脉转移至肝脏模式,种植成功率又高,不易造成其它脏器坏死。

综上所述,本研究采用VX2瘤细胞种植新西兰大白兔脾脏,脾形成肿瘤后再转移至肝脏,使模型

兔具有完整的免疫系统,虽然肿瘤在脾脏形成,但保留了其免疫功能,即保存了宿主固有的抗肿瘤免疫。经脾种植兔 VX2 瘤株形成 LM 模型符合临床上消化道恶性肿瘤经门静脉系统转移至肝脏的形态,影像学表现、大体解剖和镜下表现也符合临床 LM 影像学表现和病理表现,种植成功率高。该模型从构建途径、生长方式和病理上均接近于人类 LM,能全面表现肿瘤浸润、转移全过程,值得在临床和基础研究中推广。

本研究不足之处在于全部种植成功的兔 VX2 LM 模型中肝脏内均为多发 LM,即使 CT 增强扫描上发现 1 个或 2 个,大体解剖观察也为多发。这对临床上要求单个或少发 LM 模型具有局限性,本课题组将进一步进行实验,明确如何控制 LM 数量,满足基础和临床研究对 LM 模型的多种不同要求。

[参 考 文 献]

- [1] 国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,消化道肿瘤 MDT. 国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院结直肠癌肝转移 MDT 治疗共识[J].肝癌电子杂志, 2016, 3: 1-8.
- [2] 中国医疗保健国际交流促进会,结直肠癌肝转移分会. 中国医促会结直肠癌肝转移分会结直肠癌肝转移 MDT 诊治共识(讨论版)[J]. 肝癌电子杂志, 2017, 4: 1-12.
- [3] 戴灵波,史逸华,肖德双,等. 结直肠癌肝转移灶肝内分布宏观机制的研究进展[J]. 中华普通外科杂志, 2018, 33: 445-446.
- [4] 孙 钰,严卿莹,阮善明,等. 转移性结直肠癌动物模型的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21: 335-339.
- [5] 李敏江,陈 栋,陈文斌. β -肾上腺素能受体阻滞剂和 COX-2 抑制剂在结直肠癌肝转移中的作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23: 893-899.
- [6] Tong H, Duan LG, Zhou HY, et al. Modification of the method to establish a hepatic VX2 carcinoma model in rabbits[J]. Oncol Lett, 2018, 15: 5333-5338.
- [7] 潘江洋,时高峰,王 琦,等. DCE-MRI 评估索拉非尼抑制兔 VX2 肝种植瘤血管生成的实验研究[J]. 放射学实践, 2018, 33: 13-19.
- [8] 李 彬,张 强,王志伟,等. 兔 VX2 膀胱癌移植瘤模型实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25: 991-995.
- [9] 史 博,李智岗,李亚洲,等. 兔 VX2 肝转移瘤影像学表现与病理结构对照研究[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25: 610-613.
- [10] 牟晓庆,陈孝均,唐光才,等. 兔肝 VX2 瘤不同生长时期 DWI 与病理对照研究[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2015, 13: 636-639.
- [11] 李雪芹,赵大伟,刘 晖,等. 肝内病变环状强化的影像表现及病理组织学对照[J]. 实用放射学杂志, 2015, 31: 1108-1111.
- [12] 孙国洋,陆风旗,张追阳,等. 兔 VX2 结直肠癌模型 CT 与大体病理的对比研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2016, 19: 798-803.

(收稿日期:2018-12-20)

(本文编辑:边 伟)