

• 实验研究 Experimental research •

经尾动脉入路原发性肝癌大鼠 TACE 模型的构建

洪笑阳, 刘键鑫, 郭钊雄, 黄文蕊, 梁 伟, 郭永建, 王荣坤, 林立腾, 朱康顺

【摘要】 目的 建立经尾动脉途径肝癌大鼠经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)模型,并探讨其可行性、有效性和安全性。**方法** 0.01%二乙基亚硝胺(DEN)溶液连续诱导大鼠 12 周建立肝癌模型,12 周后通过 MRI 明确肿瘤大小。当最大肿瘤长径 >5 mm 时,在 DSA 引导下经尾动脉插管,并将微导管置于肝固有动脉进行 TACE,治疗后复查 CT 了解瘤内碘油沉积。观察大鼠术后 1 周生存率及相关并发症情况。检测术前及术后 3、7 d 大鼠 ALT、AST、TBil 及 CRE 水平。术后 7 d 行肝、肺、双肾及脾脏组织病理学检查。**结果** TACE 模型成功建立,尾动脉置管用时 (6.9 ± 1.4) min。造影显示大鼠肝内肿瘤染色明显,术后 CT 显示瘤内碘油沉积密实,组织病理学结果显示肿瘤大面积坏死,坏死区周围 Caspase3、HIF-1 α 表达水平明显升高。肺、肾、脾脏大体标本未发现明显异位栓塞。所有大鼠行为无异常。术后 3 d 大鼠 ALT、AST、TBil 较术前明显上升($P<0.05$),术后 7 d 明显下降,但仍高于术前($P<0.05$),手术前后 CRE 水平无明显差异($P>0.05$)。**结论** 经尾动脉入路可以安全、有效地完成对大鼠原发性肝癌的 TACE 治疗。

【关键词】 介入放射学; 肝细胞癌; 大鼠; 治疗性化疗栓塞; 尾动脉

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2023)-11-1096-05

The establishment of TACE model via transcatheter arterial access in experimental rats with hepatocellular carcinoma HONG Xiaoyang, LIU Jianxin, GUO Zhaoxiong, HUANG Wensou, LIANG Wei, GUO Yongjian, WANG Rongkun, LIN Liteng, ZHU Kangshun. Department of Interventional Radiology, Minimally-Invasive and Interventional Cancer Center, Affiliated Second Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510000, China

Corresponding author: ZHU Kangshun, E-mail: zhksh010@163.com

【Abstract】 Objective To establish a TACE model via transcatheter arterial access in experimental rats with diethylnitrosamine-induced(DEN-induced) hepatocellular carcinoma(HCC), and to evaluate its feasibility, effectiveness and safety. **Methods** The experimental rats were treated with 0.01% diethylnitrosamine(DEN) solution for 12 weeks to induce spontaneous HCC. After 12 weeks, the tumor size was determined by magnetic resonance imaging(MRI). When the maximum long diameter of the tumor was >5 mm, DSA-guided catheterization with a microcatheter via transcatheter arterial access into the proper hepatic artery was performed, which was followed by TACE. CT reexamination was adopted to check the lipiodol deposition within the tumor. The survival rate and associated complications at one week after surgery were recorded. The levels of aspartate aminotransferase(ALT), alanine aminotransferase(AST), total bilirubin(TBil), and creatinine(CRE) were determined before TACE as well as at 3 days and 7 days after TACE. The histopathological examinations of the liver, lung, both kidneys and spleen were performed 7 days after TACE. **Results** The TACE model was successfully established, and an average time of (6.9 ± 1.4) minutes was spent for transcatheter artery catheterization. Angiography showed that significant staining of the liver tumor in rats was observed. Postoperative CT scan revealed that dense lipiodol deposition was found within the tumor. The histopathological examination results showed that the tumor showed large areas of necrosis, and the expression levels of Caspase3 and HIF-1 α in the peripheral margin of the necrotic area were significantly increased.

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2023.11.008

基金项目: 吴阶平医学基金会(320.6750.2020-10-63), 广东省普通高校青年创新人才项目(2020KQNCX057), 广州医科大学附属第二医院临床科研项目(2021-LCYJ-01)

作者单位: 510000 广东广州 广州医科大学附属第二医院微创介入科

通信作者: 朱康顺 E-mail: zhksh010@163.com

No obvious ectopic embolism was found in the gross specimens of the lung, kidney, and spleen. No abnormal behaviors were observed in all of the rats. The postoperative 3-day levels of ALT, AST and TBil in rats were significantly increased when compared with their preoperative levels ($P < 0.05$), which decreased significantly at 7 days after TACE, but still higher than their preoperative levels ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in CRE levels before and after TACE ($P > 0.05$). **Conclusion** The transcatheter arterial approach can safely and effectively complete the TACE treatment in rat HCC model. (J Intervent Radiol, 2023, 32: 1096-1100)

【Key words】 interventional radiology; hepatocellular carcinoma; rat; therapeutic chemoembolization; caudal artery

经导管动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是中晚期肝癌患者的一线治疗策略,但肿瘤残存复发、术后肝损伤等问题使患者获益有限^[1-3]。解决上述临床难题有赖于构建可靠的动物模型,以指导开展临床研究^[4]。TACE治疗肝癌模型中以 VX2 移植瘤兔模型最常用,但 VX2 是间变表皮鳞癌,其肿瘤特征及发病机制与人 HCC 有本质上的差异^[5]。相较于兔,大鼠基因与人高度同源,且化学诱导大鼠肝癌模型具有与人 HCC 相似的肝脏背景和肿瘤特征^[6-10]。大鼠肝脏 TACE 传统上多以开腹经胃十二指肠动脉入路,因开腹后腹腔感染率高,且结扎胃十二指肠动脉对消化吸收功能影响大,限制了其模型的适用性^[11-12]。左侧颈总动脉或单侧股动脉入路避免了开腹和胃肠功能紊乱带来的弊端,但是脑缺血缺氧性损伤、后肢缺血等并发症干扰了动物的行为和生理功能^[13-16]。为探求一种创伤更小、并发症发生率更低的手术入路,本研究建立经尾动脉入路原发性肝癌大鼠 TACE 治疗模型并探讨其可行性、有效性和安全性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要实验设备

雄性 SD 大鼠 15 只,由斯贝福(北京)生物技术有限公司中心提供,4 月龄,体质量(400 ± 50) g,于广州医科大学附属第二医院动物中心恒温恒湿持续通风饲养。本实验获得广州医科大学附属第二医院动物实验伦理委员会的批准(2022-YJS-ks-25)。

数字减影血管造影机(飞利浦 UNIQ FD20,荷兰),高压注射器(LF Angiomat Illumena,美国),18 G 穿刺针(BD,美国),Headway17 1.7F/1.9F 微导管及 Traxcess14 微导丝(Microvention,美国),碘克沙醇及超液化碘油(江苏恒瑞医药有限公司,中国)。多柔比星及二乙基亚硝胺(diethylamine, DEN)溶液(默克生命科学上海有限公司,中国)。手术刀柄、眼科

剪、眼科无齿镊、止血弯钳、持针器、玻璃分针、4~0 缝线。天冬氨酸转氨酶(AST)测试盒、丙氨酸转氨酶(ALT)测试盒、肌酐(CRE)测试盒及总胆红素(TBil)测试盒(南京建成生物工程研究所)。HIF-1 α 及 Caspase 3 免疫组化染色相关一抗及二抗。

1.2 原发性肝癌大鼠模型建立

15 只 SD 大鼠予 0.01% DEN 溶液口服诱导 12 周,建立肝癌模型。12 周后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后进行 MRI 扫描,采用大鼠专用线圈于飞利浦 Ingenia 3.0T 磁共振机器下扫描,扫描范围为膈顶至肝下缘。扫描序列:T2W-TSE(T2 加权快速自旋回波序列),TR 3 000 ms,TE 80 ms,FOV 75 mm \times 75 mm,矩阵 312 \times 296,激励次数 2.6 次,层厚 2 mm。最大肿瘤长径 ≥ 5 mm 为肝癌模型诱导成功。分离大鼠尾动脉并插入微导管,在数字减影血管造影技术(DSA)引导下将微导管置于肝固有动脉进行 TACE 治疗。

1.3 TACE 模型的建立

所有大鼠于 TACE 术前 12 h 禁食,自由饮水。腹腔注射麻醉并固定。眼眶静脉丛采血收集术前血清样本进行生化检测。尾部消毒、铺巾,距尾根部 3~4 cm 处行尾腹侧正中直行切口,切口长 1~2 cm。切开皮肤及筋膜后使用眼科无齿镊分离皮下结缔组织并打开尾动脉鞘。玻璃分针钝性分离尾动脉约 2 cm,滴入 2%利多卡因扩张尾动脉并避免其痉挛。用 4~0 缝线结扎尾动脉远心端,用动脉夹夹闭近端尾动脉。将眼科无齿镊尾端垫于尾动脉下方,18 G 穿刺针自远心端向近心端沿血管走行呈 30°角穿刺尾动脉前壁,针尖进入血管后压平穿刺针并缓慢推进 1.5 mm,使穿刺针头端完全进入血管,随后退出穿刺针。Traxcess14 微导丝及 Headway17 1.7 F/1.9 F 微导管头端塑型为倒 J 型并插管。经微导管注入肝素盐水 2 mL(100 U/kg)进行肝素化,随后经微导丝指引将微导管选入肝固有动脉。将多柔比星溶于

1.2 mL 0.9% NaCl 溶液中,通过三通阀充分混悬超液化碘油及多柔比星溶液(2 mL:8.33 mg)^[17]。经微导管注入 0.2 mL 超液化碘油与多柔比星混悬液,以 0.2 mL/min 的速度推入 2 mL 肝素盐水冲管,使混悬液尽量进入肝固有动脉及其分支。TACE 术后结扎大鼠尾动脉,CT 观察大鼠肝脏碘油沉积情况,扫描模式 Helical Full 1.0 s,管电流 450 mA,管电压 100 KV,图像采用迭代算法重建。

1.4 血清及肝脏病理学检测

采用标准化试剂盒检测肝癌模型大鼠术前、术后 3、7 d 血清 ALT、AST、TBil 及 CRE 水平^[18-19]。观察肝脏大体标本,并将肝组织固定、石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色、MASSON 染色、天狼星红染色及 HIF-1 α 、Caspase3 免疫组化染色,于光镜下观察。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 26.0 软件分析数据。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示,比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TACE 手术

15 只雄性 SD 大鼠口服 0.01% DEN 溶液 12 周,其中 10 只大鼠肝内最大肿瘤长径 ≥ 5 mm,表明肝癌模型建立成功。10 只大鼠体质量为(605.4 \pm 19.1) g,最大肿瘤长径为(6.55 \pm 0.45) cm。HE(见图 1①)、MASSON(见图 1②)及天狼星红(见图 1③)染色示大鼠肝脏胶原蛋白沉积增加、纤维间隔形成。

TACE 手术成功定义为微导管选入肝固有动脉,栓塞治疗过程中微导管未脱出,治疗结束后 CT 扫描显示碘油沉积密实。10 只大鼠经尾动脉入路进行 TACE 治疗,均手术成功。自切开尾部皮肤至插入微导管用时(6.9 \pm 1.4) min。术中造影显示肿瘤染色明显,未发现血管痉挛。栓塞结束后肿瘤供血动脉部分闭塞,肿瘤内碘油沉积密实,周围肝实质见少量异位栓塞。术后 1 周 10 只大鼠均存活,未发现

异常行为。5 只大鼠为对照组,仅进行动脉造影,不注射碘油混悬液。

2.2 血清学检测

TACE 术后 3 d 大鼠 ALT、AST、TBil 水平明显升高,术后 7 d 指标下降,但仍明显高于术前($P < 0.05$),手术前后血清 CRE 水平差异无统计学意义($P = 0.534$)。见表 1。

表 1 TACE 前后大鼠血清学指标($n=10, \bar{x} \pm s$)

时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μ mol/L)	CRE(μ mol/L)
术前	15.91 \pm 1.01	13.55 \pm 0.66	20.60 \pm 1.44	97.09 \pm 3.54
术后 3 d	75.38 \pm 5.33	53.08 \pm 5.57	61.81 \pm 3.16	103.88 \pm 5.04
术后 7 d	42.81 \pm 4.06	17.87 \pm 1.10	46.91 \pm 2.40	100.17 \pm 3.99
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	0.534

2.3 术后组织病理学检查

肝脏大体标本显示肝脏可见多发结节型肝癌,TACE 术后肿瘤中心大面积坏死;肺、双肾及脾脏大体标本未发现由异位栓塞造成的损伤。

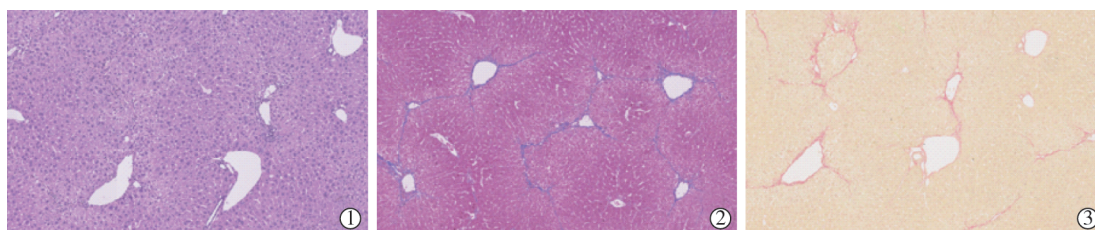
HE 染色显示大鼠 DEN 诱导形成的肿瘤部分浸润瘤周肝实质,瘤周肝细胞损伤和小叶结构破坏。TACE 术后肿瘤细胞中心明显坏死。坏死区边缘可见存活肿瘤细胞、大量炎性细胞浸润及纤维胶原形成。见图 2。

免疫组化结果显示对照组肿瘤内 Caspase3 及 HIF-1 α 低表达(见图 3①③),TACE 组术后残瘤分布区 Caspase3 及 HIF-1 α 表达明显升高(见图 3②④)。

3 讨论

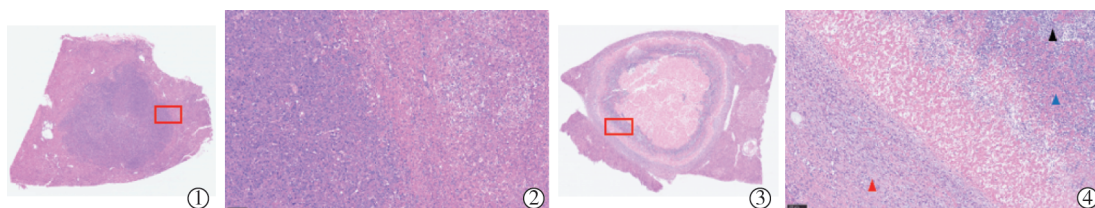
研究表明 TACE 术后肿瘤多呈不完全坏死,局部肿瘤复发率高,且术后多伴随肝脏及胆管损伤,进而降低患者手术耐受性并影响预后^[20-21]。目前针对 TACE 术后肝内微环境改变及其机制相关研究较少,而阐明其机制的关键有赖于可靠的动物模型。

本研究中大鼠 DEN 诱导形成的原发性肝癌均呈结节型,并伴有肝脏炎性细胞浸润及纤维化形成,模拟了肝细胞损伤-肝硬化-肝癌的经典模式,并体现



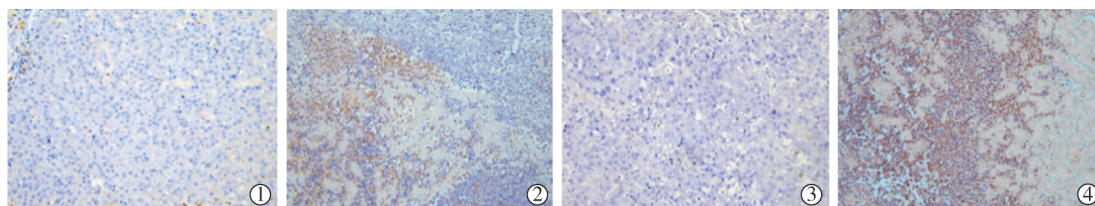
① HE 染色;②MASSON 染色;③天狼星红染色

图 1 术前大鼠肝脏病理学检查



①宏观扫描对照组大鼠肝脏 HE 染色($\times 1.5$);②对照组肿瘤边缘(HE, $\times 20$);③宏观扫描 TACE 组大鼠肝脏 HE 染色;④TACE 术后肿瘤坏死区边缘(HE, $\times 20$)

图 2 对照组及 TACE 组肝脏 HE 染色比较



①对照组大鼠肝脏 Caspase3 免疫组化染色($\times 20$);②TACE 组大鼠肝脏 Caspase3 免疫组化染色($\times 20$);③对照组大鼠肝脏 HIF-1alpha 免疫组化染色($\times 20$);④TACE 组大鼠肝脏 HIF-1alpha 免疫组化染色($\times 20$)

图 3 对照组及 TACE 组肝脏免疫组化染色比较

出与人 HCC 相似的肿瘤特征(如肿瘤促炎症环境)。

大鼠肝癌 TACE 治疗模型中最为经典的手术入路为开腹经胃十二指肠动脉入路,然而该法需开腹操作,操作时间较长、难度大,并且容易引起脉管系损伤、腹腔粘连、感染等并发症^[11-12, 22]。本研究通过尾动脉入路,置管时间短于既往实验中经股动脉(18.17 ± 3.43) min 或颈总动脉(24.5 ± 4.51) min 入路置管所花费的时间^[23],手术成功率较高。术后 CT 显示肿瘤内致密碘油沉积,肝脏病理学检查结果显示 TACE 术后肿瘤细胞凋亡、坏死。

外周血管解剖表浅,相对容易分离。与经左侧颈总动脉或单侧股动脉手术入路类似,经大鼠尾动脉进行 TACE 术可以避免开腹带来的巨大创伤,并且经微导丝和微导管进行血管超选,具有实现肿瘤供血血管精细栓塞的潜力^[6, 13]。并且大鼠尾部具有双重动脉血供及丰富的侧支血管,术后远端缺血的发生率较低^[15, 24]。在本研究中,大鼠术后 7 d 未出现严重并发症和死亡,尾部运动未发现异常。除此之外,大鼠尾部平直,便于操作,较长且易分离的尾动脉可供多次介入置管^[23, 25]。

值得注意的是,TACE 术后大鼠肝损伤明显,病灶边缘仍有部分肿瘤细胞存活。并且残瘤分布区域内 HIF-1alpha 表达升高,尤其在肿瘤坏死区边缘以及肿瘤纤维包膜内层的实质部分升高明显。HIF 家族是缺氧适应反应的关键调节因子,HIF-1alpha 决定 HIF-1 的活性,并在 TACE 术后缺血缺氧的环境中高表达,其表达的上调可能会通过促进新生血管

形成、肿瘤细胞增殖等方式促使肿瘤 TACE 抵抗或残存肿瘤复发。上述结果提示在患者可耐受的范围内,TACE 治疗或许难以达到病理学根治,研究肿瘤残存复发的分子机制对改善患者预后意义重大。同时提示临床患者 TACE 术后病程管理至关重要,如何无创、有效地监测 TACE 术后靶病灶活性是其中关键。

本模型构建关键点如下:①600 g 左右的大鼠体型较大,具有适宜的血管内径;②经 DEN 诱导后大鼠身体耐受性较差,由于 TACE 术中液体输入量大且手术室温度低,应注意术中、术后保温,避免大鼠发生低体温相关性死亡;③分离尾动脉后给予利多卡因浸润尾动脉使其扩张,减少痉挛,利于一次穿刺置管成功;④选用可塑型的微导管及微导丝,并在术前将其头端塑型成倒 J 型,可以增加选入腹腔干的成功率;⑤微导丝选入肝固有动脉后,推进微导管的同时顺时针旋转,有助于微导管进入肝固有动脉。

本研究也存在一定局限性:术后观察时间较短,且肿瘤影像评价不足,未来将延长术后观察时间,并在术后完善更全面的影像学检查(例如磁共振功能成像),以对病灶活性进行评估;由于微导管外径大,缺乏合适的鞘管及造影导管,仅进行全肝的非选择性栓塞,未来将同轴置入更细的微导管进行叶支、段支血管的超选。

综上所述,本研究建立了经尾动脉入路的大鼠肝癌 TACE 手术模型,安全并有效地完成对大鼠肝

脏肿瘤的栓塞治疗,为肝脏肿瘤 TACE 治疗的动物模型提供了新的选择。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8: 16-53.
- [2] Ebeling Barbier C, Heindryckx F, Lennernas H. Limitations and possibilities of transarterial chemotherapeutic treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 13051.
- [3] Rhee H, Nahm JH, Kim H, et al. Poor outcome of hepatocellular carcinoma with stemness marker under hypoxia; resistance to transarterial chemoembolization[J]. Mod Pathol, 2016, 29: 1038-1049.
- [4] 滕皋军. 重视基础实验研究, 推动介入放射学的可持续发展[J]. 介入放射学杂志, 2001, 10:129-130.
- [5] Pascale F, Pelage JP, Wassef M, et al. Rabbit VX2 liver tumor model: a review of clinical,biology,histology,and tumor micro-environment characteristics[J]. Front Oncol, 2022: 871829.
- [6] Gade TP, Hunt SJ, Harrison N, et al. Segmental transarterial embolization in a translational rat model of hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2015, 26: 1229-1237.
- [7] Greten TF, Mauda-Havakuk M, Heinrich B, et al. Combined locoregional-immunotherapy for liver cancer[J]. J Hepatol, 2019, 70: 999-1007.
- [8] Kurma K, Manches O, Chuffart F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2021,13: 4981.
- [9] Xu LX, He MH, Dai ZH, et al. Genomic and transcriptional heterogeneity of multifocal hepatocellular carcinoma[J]. Ann Oncol, 2019, 30: 990-997.
- [10] Chen Z, Li S, Shen M, et al. The mutational and transcriptional landscapes of hepatocarcinogenesis in a rat model[J]. iScience, 2020, 23: 101690.
- [11] 初金哲,王黎洲,张 帅,等. 改良的经大鼠胃十二指肠动脉逆行肝动脉插管实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25:798-802.
- [12] Sheu AY, Zhang Z, Omary RA, et al. Invasive catheterization of the hepatic artery for preclinical investigation of liver-directed therapies in rodent models of liver cancer[J]. Am J Transl Res, 2013, 5: 269-278.
- [13] Kiefer RM, Hunt SJ, Pulido S, et al. Relative initial weight is associated with improved survival without altering tumor latency in a translational rat model of diethylnitrosamine - induced hepatocellular carcinoma and transarterial embolization[J]. J Vasc Interv Radiol, 2017, 28: 1043-1050.
- [14] Li X, Wang YX, Zhou X, et al. Catheterization of the hepatic artery via the left common carotid artery in rats[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2006, 29: 1073-1076.
- [15] Wang Y, Cong Y, Li J, et al. Comparison of invasive blood pressure measurements from the caudal ventral artery and the femoral artery in male adult SD and Wistar rats[J]. PLoS One, 2013, 8: e60625.
- [16] Zaruk JG, Greenhalgh AD, David S. Microglia and macrophages differ in their inflammatory profile after permanent brain ischemia[J]. Exp Neurol, 2018, 301: 120-132.
- [17] Masada T, Tanaka T, Nishiofuku H, et al. Techniques to form a suitable lipiodol-epirubicin emulsion by using 3-way stopcock methods in transarterial chemoembolization for liver tumor[J]. J Vasc Interv Radiol, 2017, 28: 1461-1466.
- [18] Lin L, Li R, Cai M, et al. Andrographolide ameliorates liver fibrosis in mice: involvement of TLR4/NF- κ B and TGF- β 1/Smad2 signaling pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7808656.
- [19] Lin L, Gong H, Li R, et al. Nanodrug with ROS and pH dual-sensitivity ameliorates liver fibrosis via multicellular regulation [J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7: 1903138.
- [20] 张笑天, 陈欣菊. 原发性肝癌 TACE 术后复发进展的探究[J]. 中国医学创新, 2019, 16:159-164.
- [21] Buijs M, Vossen JA, Frangakis C, et al. Nonresectable hepatocellular carcinoma: long-term toxicity in patients treated with transarterial chemoembolization: single-center experience [J]. Radiology, 2008, 249: 346-354.
- [22] 张利捷,操焱焱,李 卿,等. 二乙基亚硝胺诱导大鼠原位肝癌模型及在 TACE 中应用研究[J]. 介入放射学杂志, 2022, 31: 686-692.
- [23] 高 群,胡 深,樊静雯,等. 经大鼠尾动脉置鞘法建立介入通路的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39: 135-138.
- [24] 王 蕾,叶明霞.大鼠尾部血管的解剖结构与鼠尾的生理功能探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28:51-55.
- [25] Kumagai K, Horikawa M, Yamada K, et al. Transtail artery access in rats: a new technique for repeatable selective angiography[J]. J Vasc Interv Radiol, 2020, 31: 678-681.

(收稿日期:2023-04-18)

(本文编辑:新 宇)