

## ·实验研究 Experimental research·

## 离体低温储存瘤块构建 VX2 肝癌模型效果研究

郭安然, 陈 宁, 刘安娜, 李 玲

**【摘要】 目的** 比较观察新鲜瘤块及不同时间低温冻存 VX2 肝癌瘤块经复苏后构建兔肝癌模型的效果。**方法** 选取鱼肉状新鲜 VX2 瘤块,剔除周边坏死组织和肌肉后,  $-80^{\circ}\text{C}$  下冰冻 3、5 和 7 个月。20 只新西兰大白兔随机分为 4 组, A 组予新鲜瘤块肝脏原位种植法构建 VX2 兔肝癌模型; B、C、D 组分别给予  $-80^{\circ}\text{C}$  冰冻 3、5 和 7 个月的瘤块, 复苏后采用肝脏原位种植法构建兔肝癌模型。14 d 后观察各组瘤兔肝脏的成瘤效果。通过免疫荧光观察肿瘤的增殖、凋亡及新生血管。**结果** A、B、C、D 4 组的成瘤率为 100%, 但随着冻存时间的延长, 5 个月以后的瘤块活性差异性变大, 肝脏肿瘤中心坏死面积增加。组织学检查发现, A、B 两组模型 TUNEL、Ki67、HIF1- $\alpha$ 、VEGF、CD31 表达无明显差异, 而 A、B 组与 C、D 组相比, TUNEL、Ki67、HIF1- $\alpha$ 、VEGF、CD31 表达差异显著。**结论**  $-80^{\circ}\text{C}$  下离体低温储存瘤块构建的兔 VX2 肝癌模型 7 个月内均可成瘤, 5 个月后瘤块间活性差异性变大, 但整体来看可较好地保存瘤株活性, 节省人力物力。

**【关键词】** VX2 肿瘤; 肝癌; 动物模型

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2024)-03-0269-06

**The application of low temperature-storing tumor lumps in vitro in establishing VX2 liver cancer models: study of its modeling effect** GUO Anran, CHEN Ning, LIU Anna, LI Ling School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei Province 437100, China

Corresponding author: LI Ling, E-mail: lilong02@hbust.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To compare the effect of using the fresh tumor lump and the recovered low temperature-storing VX2 tumor lump that have been frozen for different time to construct the rabbit HCC model. **Methods** Fish-like fresh VX2 tumor lumps were selected. After the peripheral necrotic tissue and muscle were removed, the tumor lumps were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 3, 5 and 7 months. Twenty New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups. The rabbits in group A (control group) received fresh liver tumor lump implantation to construct in-situ VX2 rabbit HCC models. The rabbits in groups B, C and D (experimental groups) received implantation of the recovered low temperature-storing VX2 tumor lump which had been frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 3, 5 and 7 months, respectively, to construct in-situ VX2 rabbit HCC models. Fourteen days after implantation, the modeling effect of tumor formation in each group was assessed. The proliferation, apoptosis of tumor cells and the angiogenesis were evaluated by immunofluorescence assay. **Results** The tumor formation rate of all group A, B, C and D was 100%. However, with the extension of cryopreservation time, the difference in tumor mass activity became larger after 5 months, and the necrotic area of liver tumor center became enlarged. Histological examination showed that there were no significant differences in the expressions of TUNEL, Ki67, HIF- $\alpha$ , VEGF and CD31 between group A and group B, while there were significant differences in the expressions of TUNEL, Ki67, HIF1- $\alpha$ , VEGF and CD31 between group A, B and group C, D. **Conclusion** The rabbit VX2 HCC model, which is constructed by implantation of recovered low temperature-storing VX2 tumor lump being frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  in vitro for a certain time, can be successfully

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2024.03.008

基金项目: 湖北省自然科学基金(2023AFB1077), 湖北科技学院博士启动基金(BK202118)

作者单位: 437100 湖北咸宁 湖北科技学院医学部药学院(郭安然、陈 宁、刘安娜), 生物医学工程与医学影像学院(李 玲)

通信作者: 李 玲 E-mail: lilong02@hbust.edu.cn

established within 7 months. The difference in tumor mass activity between tumor lumps became larger after 5 months. But on the whole, the constructed rabbit VX2 HCC model can better preserve the tumor strain activity. This modeling technique can save manpower and material resources. (J Intervent Radiol, 2024, 33: 269-274)

【Key words】 VX2 tumor; hepatocellular carcinoma; animal model

随着介入治疗的发展,以经导管动脉化疗栓塞(TACE)及导管动脉栓塞(TAE)为主的治疗手段被认为是化疗与栓塞相结合更有效的治疗方法<sup>[1-2]</sup>。介入治疗是在数字减影血管造影机、CT等影像设备的引导和监视下,利用导管、穿刺针等介入器材,通过微小的创口将特定的药物导入病变部位的治疗方法,因创伤小精准性高的特性,已广泛用于中晚期肝癌治疗<sup>[3-6]</sup>。目前,虽然建立兔VX2肿瘤模型的手法已经很成熟<sup>[7]</sup>,但是对于VX2瘤株的保育方法还很局限,主要以饲养瘤兔保存传代法为主,这种方法耗费人力物力,需要在规定的时间范围内及时将瘤块取出,以防长时间生长导致的瘤内大面积液化坏死。为了解决这一问题,本研究尝试将-80℃冻存的不同时间段活性较好的瘤块进行复苏,构建兔VX2肿瘤模型,并与新鲜瘤块构建的兔VX2肿瘤模型进行比较,探索一种既能保持肿瘤良好活性又简便廉价的瘤株保育方法,从而可更加便利地应用VX2瘤兔模型进行临床前动物实验研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

20只成年新西兰大白兔购自湖北科技学院实验动物中心,体质量2.5~3.0 kg,雌雄不限,所有动物程序均按照湖北省科技厅实验动物护理与使用指南执行,并经湖北科技学院动物伦理委员会批准。适应性饲养1~2周后,将20只实验兔随机分为A、B、C、D 4组,每组5只。A组予新鲜瘤块肝脏原位种植,B、C和D组分别予-80℃冰冻3、5和7个月的瘤块进行肝脏原位种植。

### 1.2 VX2肿瘤的传代及冻存

VX2瘤兔麻醉后,剔除肿瘤部位兔毛,将肿瘤部位的皮肤及皮下组织分离后暴露肿瘤,抽吸肿瘤内部因坏死产生的血性液体,沿肿瘤轮廓将肿瘤结节整体切除,刮去坏死核心,留取新鲜鱼肉状肿瘤组织,一部分置于有生理盐水的弯盘中,将肿瘤组织反复剪碎制成混悬液,抽吸排气后将混悬液注射到兔后腿肌肉发达处,2周后肿瘤生成,再次取新鲜肿瘤组织并进行传代<sup>[8-9]</sup>。余新鲜肿瘤组织-80℃保

存3、5和7个月备用。

### 1.3 术前取瘤、保存及肿瘤模型的构建

A组:将腿部肿瘤结节生成良好的VX2荷瘤兔静脉注射戊巴比妥钠处死,肿瘤部位备皮消毒后整体切除,取活性较好的粉红色鱼肉状肿瘤组织,剪成1~2 mm的瘤块备用。B、C、D组:取-80℃冻存3、5和7个月瘤块,复苏后剪成1~2 mm的瘤块备用。

20只实验兔术前禁食禁水,10%三氯乙醛水合物腹腔注射麻醉,剑突下腹部备皮消毒,沿腹白线注射0.02 g/mL利多卡因局部麻醉,切开腹壁4~5 cm进入腹膜腔,即可看见暴露的肝脏。将肝左内叶表面划开4~5 mm,将肿瘤组织包埋于肝脏,明胶海绵压迫止血同时防止瘤块溢出。伤口内滴注硫酸庆大霉素后逐层缝合。连续3 d肌内注射青霉素预防感染。

### 1.4 CT检查

种植2周后行CT扫描,观察各组肿瘤的大小。10%三氯乙醛水合物麻醉VX2瘤兔,在耳缘静脉处备皮,平扫定位后以0.5 mL/s速率注射碘克沙醇3 mL。扫描参数:管电压80 kV,管电流60 mA,动脉期15 s,静脉期25 s,延迟期45 s。观察不同时间段冻存瘤块在肝脏的成瘤情况。

### 1.5 组织病理学及免疫荧光评价

CT扫描结束后,处死VX2瘤兔,肉眼观察各组肝脏大体标本的颜色、大小和坏死情况,将肝脏肿瘤沿纵轴一分为二,分段选择肝脏肿瘤组织。将组织块洗净后放于含有10%多聚甲醛固定液中,对离体肝脏及肿瘤组织进行常规包埋与切片,组织样本脱蜡、水化、染色、风干后封片,光学显微镜观察肿瘤的病理变化。

采用免疫组化染色法观察肿瘤细胞的凋亡、增殖和新生血管情况,TUNEL法对组织样本切片中的凋亡细胞进行染色和定量,将切片用蛋白酶K(20 µg/mL)37℃孵育20 min,然后用TUNEL 37℃的黑暗中放置1 h,4,6-二氨基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)染色5 min。免疫组化分析前,将切片分别置于小鼠抗Ki67抗原(武汉塞维科技有限公司)、小鼠

抗 VEGF(武汉塞维尔科技有限公司)、小鼠抗人 CD31(武汉塞维尔科技有限公司)单克隆抗体中 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用稀释 150 倍的山羊抗兔二级抗体液 37℃ 孵育 50 min, DAPI 染色标记肿瘤细胞核, 显微镜下观察 VEGF 和 CD31 的表达水平。DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 蓝光; FITC 激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 绿光; CY3 激发波长 510~560 nm, 发射波长 590 nm, 红光。利用图像分析软件 Image J 对组织图像 3 个区域的平均色强度进行定量分析。凋亡和增殖的评估: 检测到特定标记物的荧光信号时, 单个细胞被标记为阳性, 其值表示为阳性细胞相对于平均细胞核总数的百分数。计算公式: 阳性染色面积%=TUNEL 或者 Ki67 面积/样本平均 ROI。

## 1.6 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析。所有数据均以至少 3 个独立实验的均值±标准差表示, 符合正态分布和方差齐性两个条件的数据比较采用 *t* 检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义, 采用 Image J 进行定量分析。

## 2 结果

### 2.1 VX2 种植瘤块

A、B、C、D 组的瘤块均呈粉红色鱼肉状, 质地

韧, 各组相比无明显差异, 见图 1。

### 2.2 VX2 瘤兔肿瘤 CT 检查和大体组织特征

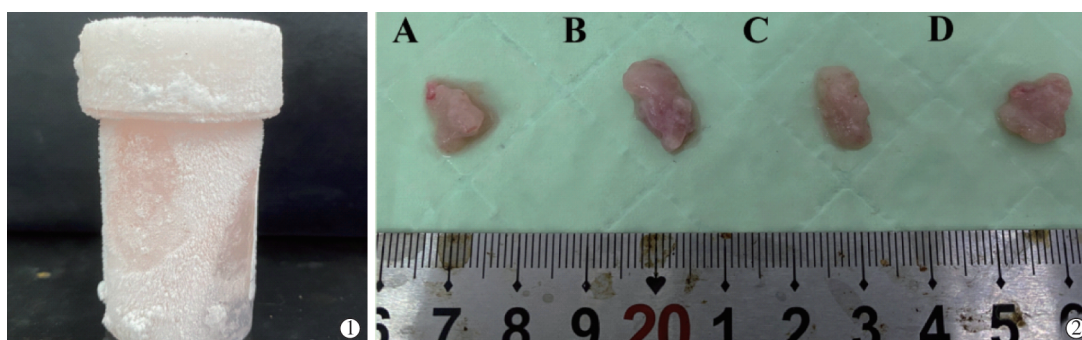
接种肿瘤 14 d 后行 CT 平扫结果显示, 肝脏均已成瘤, 增强扫描后呈球形阴影, 见图 2。各组成瘤率均为 100%, A、B、C、D 组肿瘤体积分别为  $(1\,328.64\pm397.05)\text{ mm}^3$ 、 $(969.21\pm94.62)\text{ mm}^3$ 、 $(401.25\pm166.31)\text{ mm}^3$ 、 $(437.72\pm184.53)\text{ mm}^3$ 。

对 VX2 肝肿瘤进行离体取材, 每组均可看到凸起的肿瘤结节, 将肿瘤一分为二, A 组和 B 组可以看到明显的鱼肉状活肿瘤并且中心白色豆渣样坏死较少, 两组无明显差异; C 组和 D 组肝脏原位种植肿瘤切开后中心出现明显的豆渣样坏死, 鱼肉状活肿瘤主要分布在坏死周围。C 组肿瘤中心坏死程度略大于 D 组, 肿瘤活性不稳定, 可能原因为种植前在 -80℃ 环境下冻存 5.5 个月及以上的瘤块间活性差异开始变大, 见图 3。

### 2.3 VX2 瘤兔组织病理学

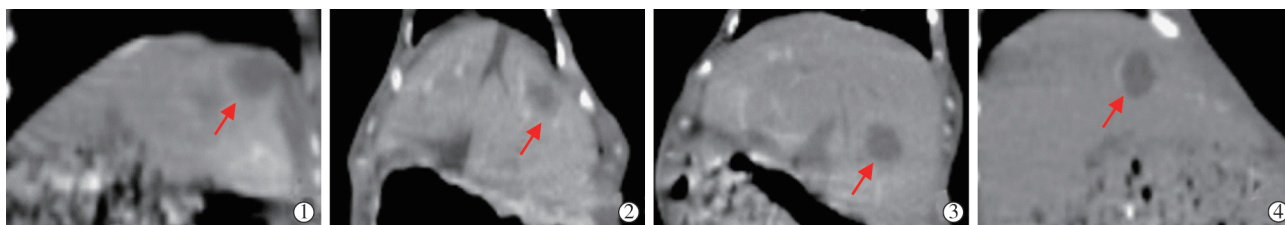
HE 染色见 A 组和 B 组肿瘤中心坏死少, 切片洗脱后白色坏死区域面积较小, 而 C 组和 D 组瘤块中心出现大面积坏死, 切片洗脱后白色坏死区域明显大于 A、B 两组。放大倍数观察, 肿瘤细胞与正常肝细胞对比明显, 4 组均呈现出明显的核深染、核变形, 肿瘤细胞排列紊乱并向周边呈浸润性生长, 见图 4。

免疫荧光定量分析结果见表 1。对肿瘤组织切片进行 TUNEL 染色, 图 5 示 A、B 两组绿色荧光水平



①-80℃冻存瘤块;②37℃水浴复苏后瘤块, 肉眼观察 B、C、D 组与 A 组无明显差异

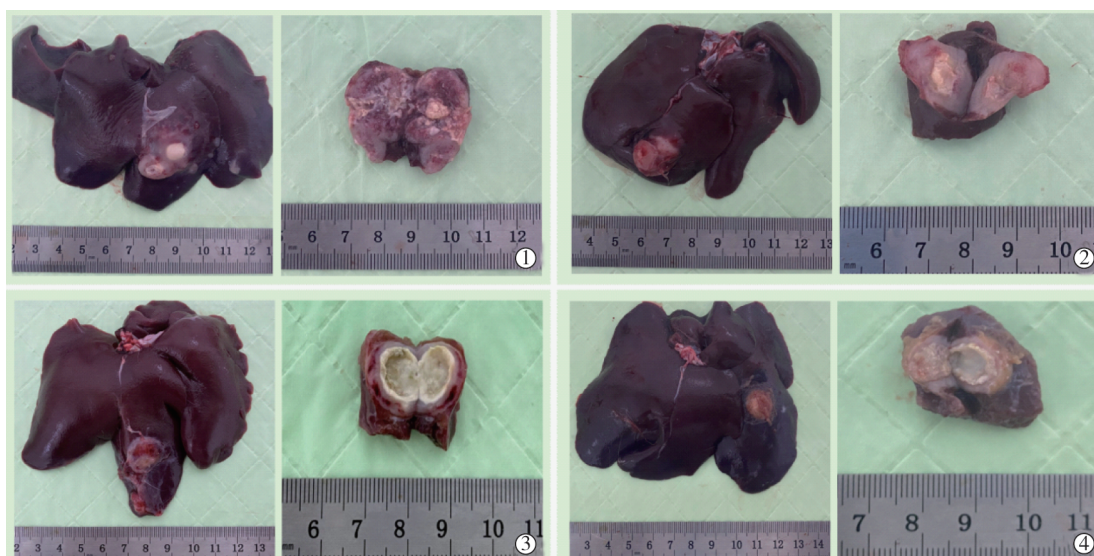
图 1 VX2 种植瘤块



①A 组 VX2 瘤兔肝脏 CT 冠状面增强扫描示, 肿瘤呈球形深灰色阴影(红色箭头处);②③④ B、C、D 组 VX2 瘤兔肝脏 CT 冠状面增强扫描示, 肿瘤呈球形深灰色阴影(红色箭头处)

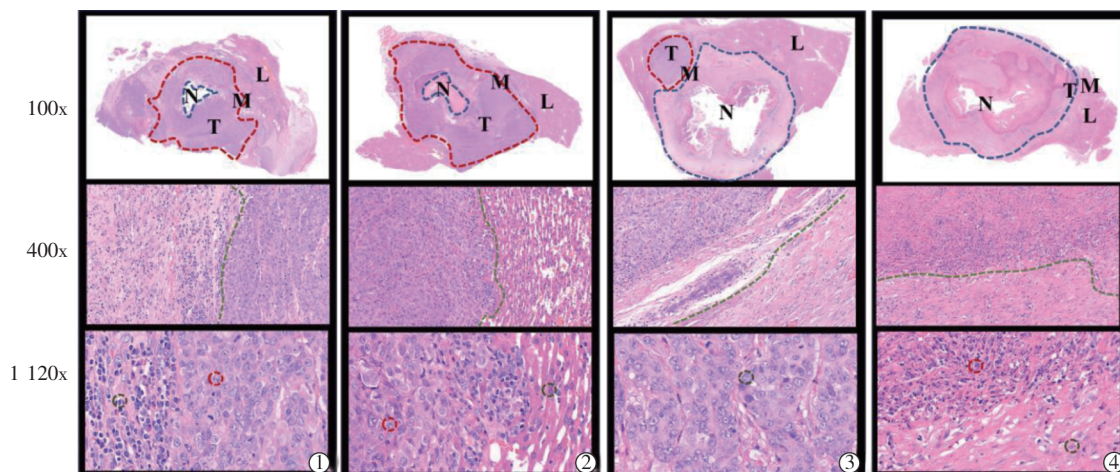
图 2 14 d 后 VX2 瘤兔肝脏 CT 增强扫描表现





①A 组左图示 VX2 肝脏肿瘤接种 14 d 后,右图为肿瘤纵向切开可见大量鱼肉状组织,肿瘤中心少量液化坏死;②B 组大体图和肿瘤纵向剖开;③C 组肿瘤剖开可以看到瘤块中心豆渣样坏死,鱼肉状新鲜组织分布在坏死周围;④D 组瘤块中心坏死程度与 C 组类似,周围鱼肉状新鲜组织略多于 C 组

图 3 VX2 肿瘤肝脏大体标本



①A 组;②③④B、C、D 组;T:肿瘤区域,L:肝组织,N:坏死区域,M:肿瘤边缘。肿瘤核大深染(红色圆圈处),交界区呈浸润生长(绿色直线处)

图 4 VX2 瘤兔组织病理表现

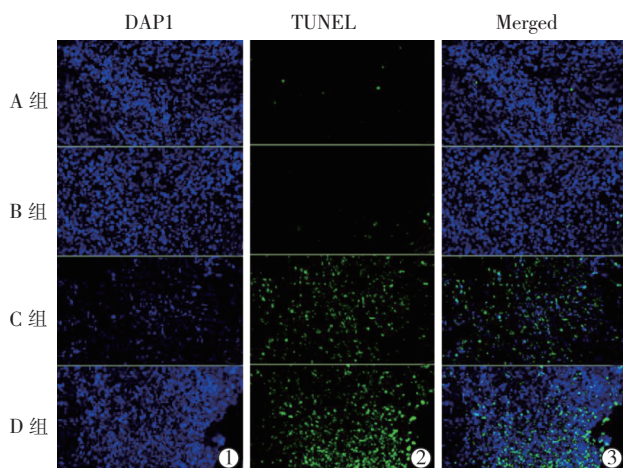
表 1 免疫荧光定量分析结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TUNEL	Ki67	HIF- $\alpha$	VEGF	CD31
A 组	0.47 $\pm$ 3.92	60.66 $\pm$ 55.63	0.47 $\pm$ 3.99	3.30 $\pm$ 6.79	61.15 $\pm$ 79.67
B 组	1.08 $\pm$ 18.85	35.2 $\pm$ 17.41	2.15 $\pm$ 13.59	3.33 $\pm$ 28.99	55.94 $\pm$ 74.88
C 组	22.94 $\pm$ 31.62	9.33 $\pm$ 18.12	86.62 $\pm$ 72.33	86.66 $\pm$ 86.76	67.88 $\pm$ 62.35
D 组	42.15 $\pm$ 27.55	9.85 $\pm$ 16.45	32.36 $\pm$ 63.0	67.88 $\pm$ 62.35	46.42 $\pm$ 18.85

明显弱于 C 组和 D 组,表明随着在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下冻存瘤块时间延长,瘤块活性开始下降且变得不稳定,种植后的肿瘤坏死率逐渐升高。Ki67 反映肿瘤细胞的增殖情况,从图 6 可以看出 4 组 Ki67 表达均呈阳性,A、B 两组肿瘤细胞增殖率明显高于 C、D 两组,表明在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下储存 5 个月以内瘤块活性优于更长

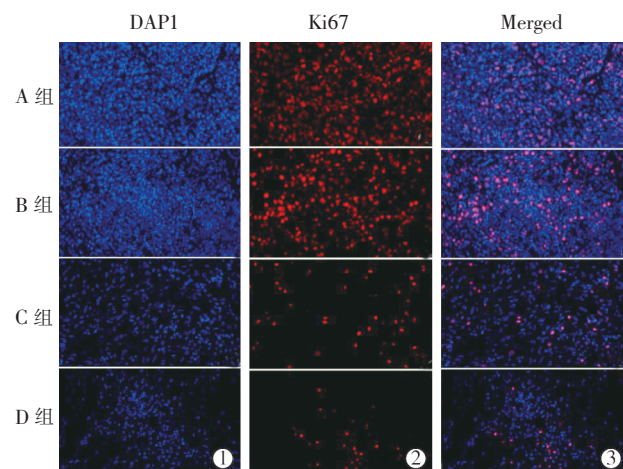
时间储存的瘤块。HIF- $\alpha$  阳性肿瘤细胞通常位于坏死肿瘤周围,从图 7 可以看出 A、B 两组 HIF- $\alpha$  阳性细胞明显低于 C、D 两组,说明 A、B 两组肿瘤周边坏死明显少于 C、D 两组。HIF- $1\alpha$  的表达与 VEGF 阳性细胞呈正相关,通常情况下 VEGF 的表达主要分布在坏死肿瘤周围的活细胞中。从图 8 中





A 组肿瘤细胞 TUNEL 染色阳性;B 组与 A 组无明显差异 ( $P>0.99$ );C 组与 D 组相比无明显差异( $P=0.18$ );A、B 两组与 C、D 两组 TUNEL 表达差异明显( $P<0.05$ )

图 5 TUNEL 免疫荧光图



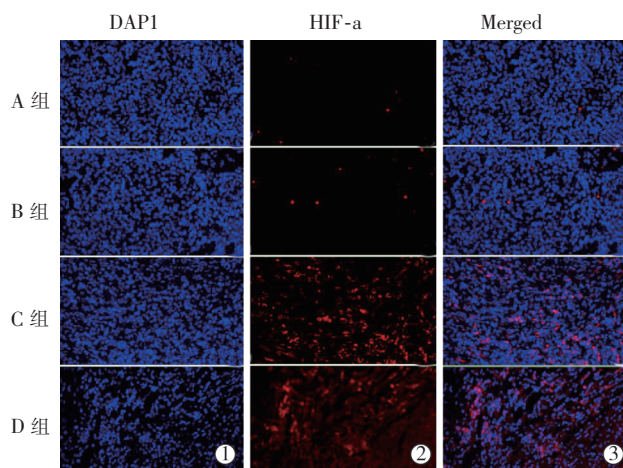
A 组与 B 组 Ki67 染色阳性,肿瘤细胞增殖明显,两组有明显差异( $P=0.01$ );C 组与 D 组 Ki67 染色阳性细胞表达较少,两组差异不明显( $P=0.99$ );A、B 两组与 C、D 两组 Ki67 表达差异明显( $P<0.05$ )

图 6 Ki67 免疫荧光图

可以看出,C、D 两组肿瘤坏死面积较大,所以坏死周围 VEGF 阳性细胞明显多于 A、B 两组。CD31 常用来评估肿瘤血管的生成,反映肿瘤的生长状况,图 9 显示 A、B 两组肿瘤活性好、肿瘤血管丰富为其提供丰富的营养物质加速了肿瘤向周边转移;C、D 两组由于肿瘤坏死不完全,其内部新生血管较多所以也呈现出阳性增高趋势。

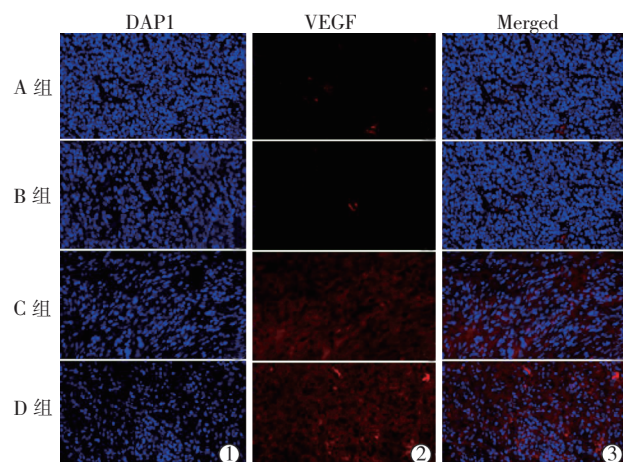
### 3 讨论

VX2 肿瘤具有在骨骼肌内快速繁殖生长的特性,已被用于多种恶性肿瘤的建模。相比于大鼠、小鼠,兔血管管腔相对较粗,所以 VX2 瘤兔模型已被用于多种肝细胞癌的成像和局部药物释放治疗研



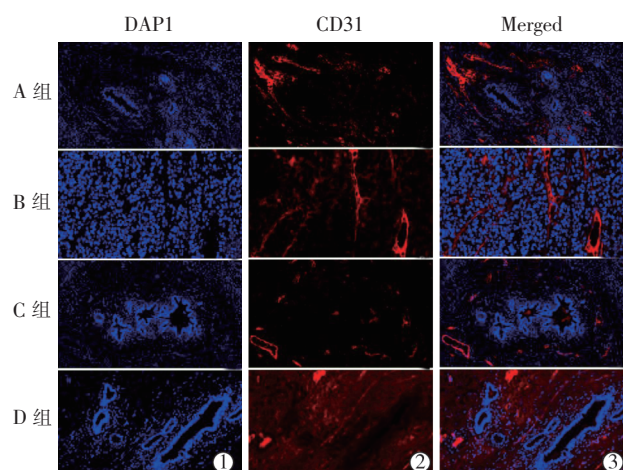
A 组与 B 组 HIF- $\alpha$  染色阳性无明显差异( $P>0.99$ );C 组与 D 组 HIF- $\alpha$  染色阳性细胞表达较多,C 组表达高于 D 组( $P=0.0002$ );A、B 两组与 C、D 两组 Ki67 表达差异明显( $P<0.01$ )

图 7 HIF- $\alpha$  免疫荧光图



A 组与 B 组 VEGF 表达均不明显,无明显差异( $P>0.99$ );C 组与 D 组肿瘤细胞内 VEGF 表达明显,无明显差异( $P=0.14$ );A、B 两组与 C、D 两组 VEGF 表达差异明显( $P<0.01$ )

图 8 VEGF 免疫荧光图



A 组 CD31 表达与 B、C、D 组无明显差异( $P>0.05$ )

图 9 CD31 免疫荧光图

究<sup>[7]</sup>。当前对于建立 VX2 瘤兔模型面临的主要困难是瘤块保种传代方法单一,传统的保种传代以不间断的瘤兔保存瘤株法为主,此方法耗时耗力且有瘤株变异的风险。有研究报道了液氮冻存瘤块用于构建兔肝癌模型的可行性<sup>[10]</sup>。本研究发现在半年内-80℃恒温保存的瘤块可以保持良好的生长特性和成瘤率,冻存 5 个月之内的瘤块同时具备稳定的细胞活性。虽然不同时间段冻存的瘤块具有较高的成瘤率,但此冻存方法还存在部分缺点,如随着冻存时间的延长,不同瘤块间细胞活性差异性变大,不同时间段种植的肿瘤中心坏死面积差异较大等。所以对于在更长时间内维持肿瘤的高活性、高成瘤率和低坏死率方面还有待进一步深入研究。

本研究探讨了不同时间段冻存瘤块的活性,与以往冻存方法相比更为简单便利,仅需要-80℃冰箱冻存,大大节约了实验成本。瘤块直接冻存法不仅缩短了对动物饲养的时间,还减少了实验动物的使用数量,实现了对 VX2 肝癌模型的长期间断性研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 史 博,杨东强,郝晓光,等. 海藻酸钠微球与碘化油栓塞治疗兔 VX2 肝转移瘤对比研究[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25:

896-899.

- [2] Tang H, Cao C, Zhang G, et al. Impact of particle size of multivesicular liposomes on the embolic and therapeutic effects in rabbit VX2 liver tumor[J]. Drug Deliv, 2023, 30: 1-16.
- [3] 马婧璇,颜志平. 肝癌介入治疗进一步思考[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28:507-510.
- [4] 陈 丽,应希慧,涂建飞,等. 射频消融联合其他介入综合技术治疗原发性肝癌研究进展[J]. 中华介入放射学电子杂志, 2019, 7:75-80.
- [5] 王建华. 肝癌综合介入治疗的进展[J]. 中华介入放射学电子杂志, 2013, 1:61-64.
- [6] 冯 旭,冯桂玲,刘 彦,等. MR 与 CT 引导下经皮兔 VX2 肝脏血管旁肿瘤模型制作有效性与安全性的对比研究[J]. 磁共振成像, 2022, 13:84-88.
- [7] 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.
- [8] 罗 荣,王凌霄,刘 航,等. 臭氧化 0.9%氯化钠溶液治疗兔 VX2 肿瘤模型有效性和安全性研究[J]. 介入放射学杂志, 2021, 30:1261-1264.
- [9] 余 量,含笑,周丽芬.兔 VX2 肝癌模型改良制作及 TAE 前后 CT 与 DSA 影像学评估[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2017, 15: 85-87.
- [10] 余文仙,郭小朋,何晓俊,等. 液氮冻存瘤块构建 VX2 肝癌模型效果研究[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28:151-155.

(收稿日期:2023-08-02)

(本文编辑:新 宇)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告