

## ·实验研究 Experimental research·

## 液氮冻存瘤块构建 VX2 肝癌模型效果研究

余文仙, 郭小鹏, 何晓俊, 熊宇, 郑传胜

**【摘要】 目的** 观察液氮冻存的活性良好 VX2 兔肝癌瘤块复苏后构建兔肝癌模型的效果,并与常规方法构建兔肝癌模型作比较。**方法** 选取生长状态良好的 VX2 瘤块,剔除坏死组织并用锡箔纸包裹,液氮冻存 3 个月。20 只日本大耳白兔随机分为两组,A 组(对照组, $n=10$ )予新鲜瘤块肝脏原位种植法构建兔肝癌模型,B 组(实验组, $n=10$ )予新鲜瘤块液氮冻存 3 个月复苏后肝脏原位种植法构建兔肝癌模型。2 周后作增强 CT 扫描和 DSA 血管造影观察成瘤效果及瘤体血供情况。荷瘤兔处死后观察大体标本并作苏木精-伊红(HE)染色、血管内皮细胞生长因子(VEGF)和 CD31 免疫荧光染色,后者用于计算微血管密度(MVD)。**结果** A 组和 B 组建模成功率均为 100%。两组肿瘤生长、VEGF 和 MVD 表达均无明显差异。**结论** 液氮冻存瘤块构建的兔 VX2 肝癌模型 CT、DSA 影像学表现及组织学特征与常规方法无显著差异,瘤块整体冻存法可较好地保存瘤株活性,从而节省人力物力。

**【关键词】** 肝癌;动物模型;VX2 肿瘤

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-02-0151-05

**The establishment of rabbit VX2 HCC model with tumor lump frozen in liquid nitrogen: study on its modeling effect** YU Wenxian, GUO Xiaopeng, HE Xiaojun, XIONG Yu, ZHENG Chuansheng. Department of Gastroenterology and Interventional Radiology, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430022, China

Corresponding author: ZHENG Chuansheng, E-mail: hqzcsxh@sina.com

**【Abstract】 Objective** To discuss the establishment of rabbit VX2 hepatocellular carcinoma (HCC) model by using tumor lump which is frozen in liquid nitrogen and has good activity after resuscitation, and to compare the modeling effect with that by using conventional method. **Methods** The VX2 tumor blocks with good growth state were selected, the necrotic tissues were remove and the tissues in good condition were wrapped with tinfoil and frozen in liquid nitrogen for three months. Twenty Japanese white rabbits were randomly divided into two groups: group A(control group,  $n=10$ ) and group B (experiment group,  $n=10$ ). In group A, rabbit liver cancer model was established by liver transplantation of fresh tumor lump with in situ planting method. In group B, the fresh liver tumor lumps were frozen in liquid nitrogen for three months first, then, the resuscitated tumor tissues were implanted into the liver with in situ planting method. Two weeks later, enhanced CT scan and DSA angiography were performed to check the tumor-modeling effect and tumor blood supply. After tumor-loaded rabbits were sacrificed, the gross specimens were removed and sent for pathological examinations. HE staining was adopted, and immunofluorescence staining of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD31 was used to calculate the microvessel density (MVD). **Results** In both group A and group B, the success rate of modeling was 100%. No significant differences in tumor growth rate and the expression levels of VEGF and MVD existed between the two groups. **Conclusion** The imaging manifestations on CT and DSA and the histologic characteristics of rabbit VX2 HCC model, which is established with tumor lump frozen in liquid nitrogen, are no obviously different from those of rabbit VX2 HCC model, which is established with conventional modeling methods. The freezing method of whole tumor

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.02.011

基金项目:国家自然科学基金(81571782)

作者单位:430022 武汉 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科(余文仙、熊宇)、介入科(郭小鹏、何晓俊、郑传胜)

通信作者:郑传胜 E-mail: hqzcsxh@sina.com

lump can well preserve the tumor strain activity, thereby saving the manpower and material resources in the preparation of VX2 HCC model.(J Intervent Radiol, 2019, 28: 151-155)

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; animal model; VX2 tumor

我国肝癌年死亡数约占全球 45%<sup>[1-2]</sup>,其发病隐匿,约 80%肝癌患者发现时已是晚期,并失去肝移植或手术切除机会<sup>[3-4]</sup>。介入微创治疗逐渐成为不适合手术切除或不能耐受手术患者的重要干预手段<sup>[5]</sup>。VX2 肝癌模型已广泛应用于介入治疗实验研究<sup>[6-7]</sup>。VX2 移植性兔肝癌模型构建简单易行,可在短时间内复制大批模型,为目前国内最大动物实验性肝癌模型<sup>[8-9]</sup>。VX2 兔肝癌巨块型实体瘤浸润性生长,血供丰富,其模型构建简单易行,价格较低廉,试验周期短且可用于介入治疗<sup>[10]</sup>。目前常用瘤兔保存瘤株传代法进行瘤株保育,但荷瘤兔一般生存时间受限,且 3 周后易发生较大瘤内自发性坏死,影响建模效果。本实验拟采用液氮冻存法保存活性较好的实体瘤块复苏后构建兔肝癌模型,并与常规现取瘤块种植法进行比较,以期获取较为简单且廉价的瘤株保育方法,从而更好地应用此类模型进行更多生物医学研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用 20 只体重 2.0~2.5 kg 健康日本大耳白兔(购自武汉市万千佳兴生物科技公司,华中科技大学同济医学院实验动物中心饲养),雌雄不限,适应环境饲养 1~2 周。将兔子随机分为 A、B 两组,每组 10 只。A 组(对照组)予新鲜瘤块肝脏原位种植,B 组(实验组)行新鲜瘤块液氮冻存 3 个月复苏后肝脏原位种植。

### 1.2 瘤块冻存

取上一代 VX2 荷瘤兔(华中科技大学同济医学院附属协和医院介入科保种),原位种植约 18 d,肿瘤最大径 16~18 mm,耳缘静脉 10%水合氯醛过量麻醉法处死;以剑突为中心剃毛,3 遍消毒;沿剑突下腹中线剪开腹腔,充分暴露肝脏;剪下荷瘤肝叶,眼科剪去除肿瘤边缘肝脏组织,手术刀切开肿瘤,0.9%氯化钠溶液冲洗肿瘤组织去除血液及少量豆腐渣样自发坏死,留取鱼肉状新鲜肿瘤组织,无菌纱布小心吸干肿瘤表面水分;锡箔纸包裹好瘤块迅速浸入液氮内冻存,3 个月后备用。

### 1.3 构建肿瘤模型

A 组:取上一代 VX2 肝荷瘤兔,10%水合氯醛

(2 mL/mg)腹腔麻醉、聚维酮碘常规消毒后,取目测活性较好的鱼肉状半透明肿瘤组织,用 0.9%氯化钠溶液冲洗、再用高压消毒后眼科剪剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右瘤块备用。B 组:取液氮冻存瘤块备用,液氮取出后打开锡箔纸放入 0.9%氯化钠溶液内常温复苏,高压消毒后用眼科剪剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右瘤块备用。

实验兔 20 只术前禁食、水 12 h,按照 2 mL/kg 进行 10%水合氯醛腹腔注射;将麻醉状态实验兔置于手术台,消毒、铺巾,沿腹正中线作一约 3 cm 纵向切口,分离皮肤肌肉腹膜,轻轻牵拉出肝脏,用高压灭菌无齿眼科镊于肝左内叶(近肝镰状韧带)作一窦口;将修剪好的瘤块分别置入,并用事先剪好的止血明胶海绵颗粒填塞,待切口彻底止血后将肝脏回纳入腹腔,棉球清除出血;创口滴注硫酸庆大霉素(2 万~4 万 U),依次关腹缝合。术后连续 3 d 肌肉注射氨苄青霉素(1 万~2 万 U)。

### 1.4 CT 检查

种植 2 周后荷瘤兔接受 CT 检查(采用 MeoRaoSTELLANT 型高压注射器,以提前设定的 0.5 mL/s 速率注射纯碘克沙醇 3 mL 和 0.9%氯化钠溶液 10 mL,扫描参数为管电压 80 kV,管电流 60 mA),先平扫定位,后序贯动态动脉期(15 s)、静脉期(25 s)和延迟期(45 s)增强扫描;在 Vera 工作站采用多平面重建(MPR)三截面成像技术作图像后处理,分别测量肝脏内肿瘤横断位最大径(a)、矢状位最大径(b)、冠状位最大径(c),肿瘤体积(V)计算采用公式: $V=a \times b \times c \times \pi / 6$ 。CT 测量与实验兔处死后切开标本游标卡尺实际测量对比可知,增强 CT 扫描测量数据与实际测量值有较好的吻合性。

### 1.5 DSA 血管造影

荷瘤兔麻醉、备皮后充分暴露腹股沟区,消毒铺巾;0.3%利多卡因腹股沟区皮下浸润麻醉,逐层分离皮肤、肌肉、筋膜、股动脉鞘,无齿眼科镊钝性分离右股动脉,Seldinger 法穿刺股动脉并置入 4 F 股动脉鞘,肝素化 0.9%氯化钠溶液封闭冲管;置管成功后兔置于 DSA 手术台,4 F Cobra 导管在超滑泥鳅导丝导引下送至腹腔动脉主干,退出泥鳅导丝,注入肝素化 0.9%氯化钠溶液与碘克沙醇 1:1 稀释后对比剂混合液,“冒烟”证实置入位置准确

注入适量肝素化 0.9% 氯化钠溶液冲洗导管;连接高压注射枪,以 1 mL/s 流速、3 mL 总量、200 kPa 压力行腹腔干动脉造影;Terumo 微导管超选择置管,导管开口处位于肿瘤供血血管,以 0.5 mL/s 流速、2 mL 总量、200 kPa 压力造影证实肿瘤显影完全。

### 1.6 组织学染色和免疫荧光染色

造影后处死两组荷瘤兔,在肿瘤最大层面取样 2 cm×2 cm,厚度约 1 cm 并保留部分邻近肝组织。一半标本 4% 多聚甲醛固定 24 h 后石蜡包埋,制成 2~4  $\mu\text{m}$  切片用于组织学染色;一半标本液氮冻存,用于免疫荧光检测。苏木精-伊红(HE)染色:组织石蜡切片脱蜡后作 HE 染色,Olympus 光学显微镜下选取 3 个以上视野摄影,观察肿瘤病理变化。

免疫荧光染色:冰冻切片固定、10% 山羊血清封闭后,抗血管内皮细胞生长因子(VEGF)抗体(GeneTex,美国,稀释浓度 1:50)或抗 CD31 抗体(Dako,丹麦,稀释浓度 1:100)4℃ 过夜,磷酸缓冲液(PBS)漂洗后荧光二抗孵育,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核;封片后 Olympus 荧光显微镜下摄影,观察肿瘤血管生成,计算微血管密度(MVD);每组切片在同一电压和曝光时间条件下选取肝脏和肿瘤交界区摄影储存,采用 Image Pro Plus 软件计算各组 VEGF 荧光强度或对 CD31 阳性染色细胞计数,以作统计分析比较。

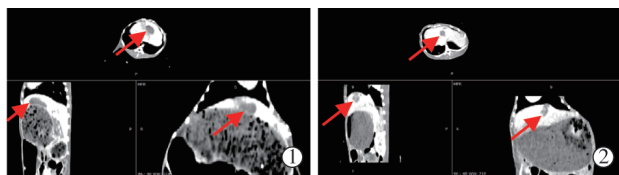
### 1.7 统计学分析

所有实验数据中计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,每个数据均来自至少 3 次独立重复试验。对数据结果均采用 IBM SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。统计学方法上符合正态分布和方差齐性两个条件的数据用 *t* 检验(两两比较),不符合则用 Mann-Whitney *U* 检验, $P<0.05$  时差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 6.0 专业软件绘制所需图表。

## 2 结果

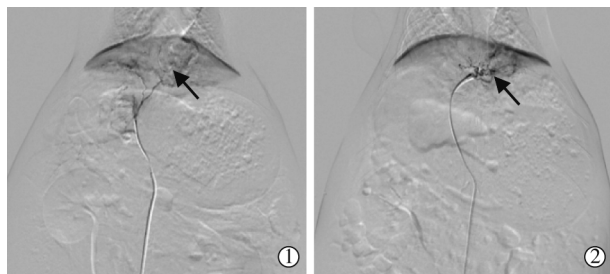
### 2.1 VX2 荷瘤兔肿瘤影像学观察和肿瘤测量

CT 成像显示两组所有肝内种植肿瘤生长于兔肝左叶内(图 1),DSA 造影显示两组肿瘤为肝左叶动脉供血,肿瘤呈球形且对比剂沉积良好(图 2),两组建模成功率 100%。建模 2 周后两组肿瘤体积分别为平均( $1\ 152.0\pm 346.1$ )  $\text{mm}^3$ 、( $1\ 134.0\pm 261.3$ )  $\text{mm}^3$ ,差异无统计学意义( $P=0.941\ 4$ )。



①A 组(对照组);②B 组(实验组)MPR 三维重建示肿瘤位于肝左叶近膈面,增强 CT 扫描可见类圆形肿瘤影(箭头)

图 1 建模 2 周后增强 CT 扫描影像



①A 组(对照组);②B 组(实验组)以 Terumo 微导管超选至肿瘤供血动脉,造影示肿瘤供血动脉迂曲,肿瘤呈球形近膈顶,对比剂沉积良好(箭头)

图 2 建模 2 周后 DSA 影像

### 2.2 VX2 荷瘤兔肿瘤大体和组织学特征

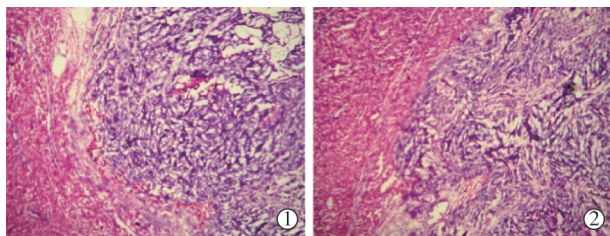
两组兔肝原位种植肿瘤呈单个结节状,切开后可见半透明鱼肉状肿瘤实质,肿瘤中心少量自发性液性坏死(见图 3)。HE 病理学结果显示肿瘤细胞和肝脏细胞对比明显,呈核大深染异型性细胞;中心处可见少量自发坏死及纤维化,肝脏交界区肿瘤向肝窦浸润性生长(图 4)。



①②A 组(对照组)示肿瘤位于肝左内叶,为单个实体瘤,切开后可见肿瘤实质为半透明鱼肉状,中心少量液化性坏死;③④B 组(实验组)大体病理与 A 组类似

图 3 大体病理学改变图像





①A 组(对照组);②B 组(实验组)HE 染色示肿瘤核大深染,实质区肿瘤分布致密,交界区肿瘤呈浸润性生长(100×)

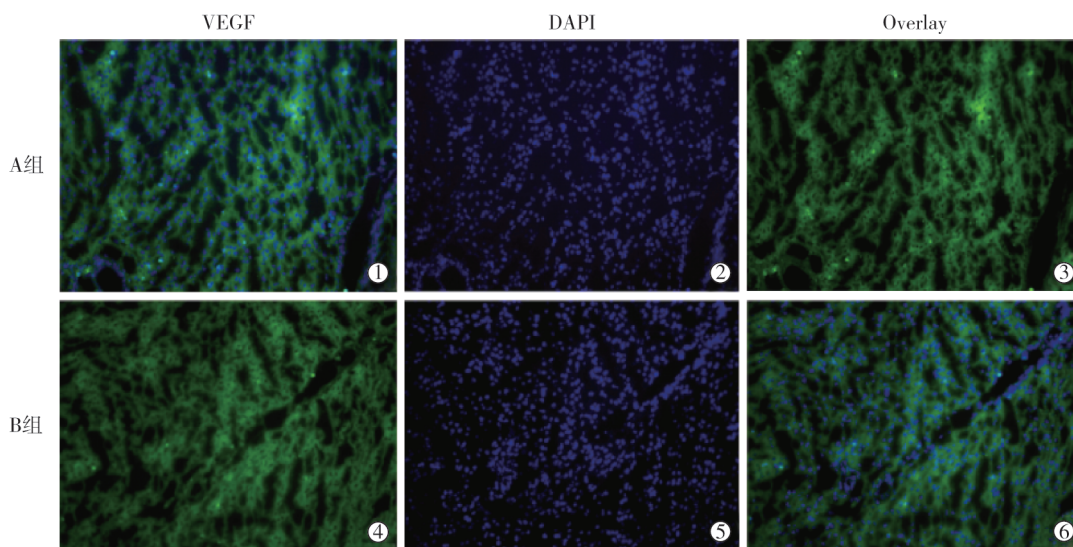
图 4 肿瘤 HE 染色图像

### 2.3 VX2 荷瘤兔肿瘤 VEGF 表达和肿瘤 MVD

两组肿瘤细胞 VEGF 广泛表达,免疫荧光染色结果显示 VEGF 表达量无明显差异(图 5)。两组肿瘤与肝脏交界区微血管数量增多,MVD 对比无明显差异(图 6)。

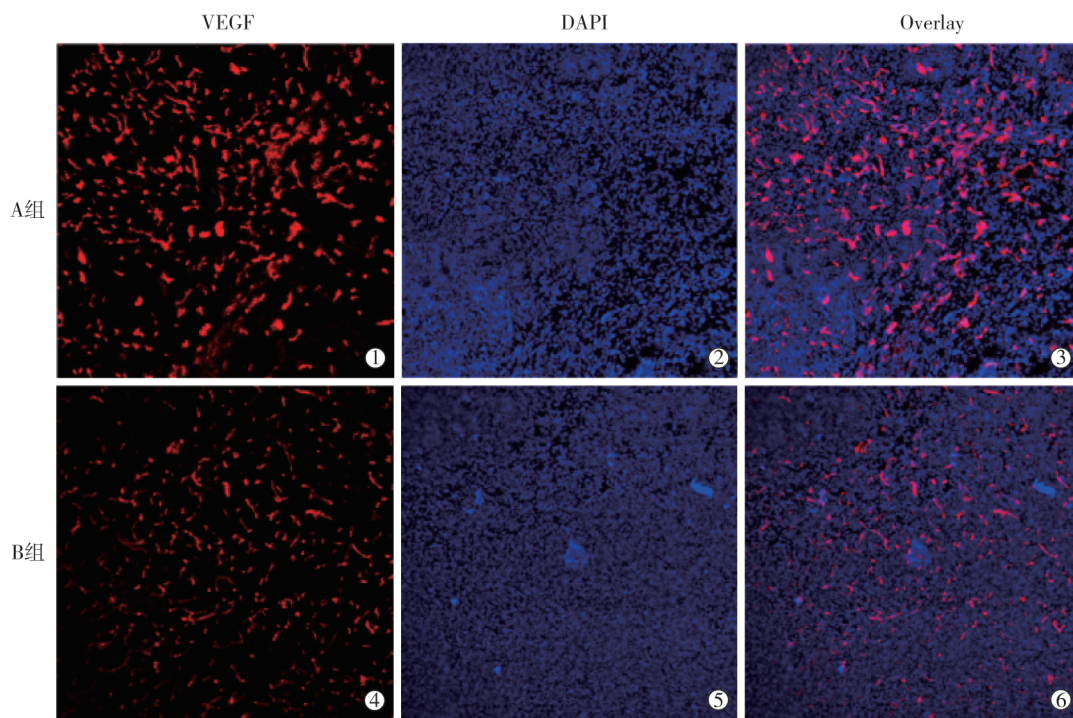
### 3 讨论

VX2 兔肝癌巨块型实体瘤浸润性生长,血供丰



①②③A 组(对照组)免疫荧光染色示肿瘤细胞质内及细胞间 VEGF 弥漫表达,通过自分泌与旁分泌作用于肿瘤细胞和肿瘤间质细胞;④⑤⑥B 组(实验组)VEGF 表达与对照组无明显差异

图 5 VEGF 免疫荧光染色图像



①②③A 组(对照组)CD31 免疫荧光染色示肝脏肿瘤交界区微血管分布致密,有助于肿瘤营养供应及脱落细胞远处转移;④⑤⑥B 组(实验组)微血管生成与对照组无明显差异

图 6 CD31 免疫荧光染色(MVD 对比)



富<sup>[10]</sup>,能较好地模拟人原发性肝癌且适合进行介入干预,对肿瘤治疗研究尤其是介入微创治疗具有重要作用<sup>[11]</sup>。稳定而持续的肿瘤模型是保证研究成功的重要前提<sup>[12]</sup>。由于不同课题组实验的间断性,长期瘤兔保存瘤株法浪费较多人力物力,且易诱发瘤株变异感染等不良事件,探索一种廉价而稳定的瘤株保育方法具有重要价值。本实验探索了液氮冻存瘤块用于构建兔肝癌模型的可行性,实践证明采用液氮冻存法保育瘤块可保持肿瘤稳定性,且肿瘤生长和生物学特性不受影响。液氮冻存瘤块法是一种行之有效且稳定的瘤株保育方法,易于储存和运输,减少人力物力投入,比较经济实用。

本实验尚存以下问题:①采用直接冻存法,未应用冻存液,液氮冻存具体实验方案需在后续实验中进一步探索;②采用冻存 3 个月肿瘤,未进行更长冻存时间复苏造模效果研究;③采用液氮罐储存,未进行液氮速冻后-80℃冰箱储存后复苏研究。

总之,本研究介绍一种兔 VX2 肿瘤瘤株储存方法,具有简单、稳定、可靠、节省人力物力的特点。该方法适用于间断进行实验,且可保存活性良好的瘤株,以防后续感染或瘤株变异影响实验进度。

#### [参考文献]

[1] Giannelli G, Villa E, Lahn M. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer

Res, 2014, 74: 1890-1894.

- [2] Xu JY, Yang Y, Xie R, et al. The NCX1/TRPC6 complex mediates TGF beta - driven migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2018, 78: 2564-2576.
- [3] Omyla-Staszewska J, Deptala A. Effective therapeutic management of hepatocellular carcinoma: on the basis of a clinical case[J]. Contemp Oncol(Pozn), 2012, 16: 60-63.
- [4] 赵倩,颜志平.载药微球经导管动脉化疗栓塞治疗肝癌研究进展[J].介入放射学杂志,2017,26:1052-1056.
- [5] Gnutzmann D, Kortes N, Sumkauskaitė M, et al. Transvascular therapy of hepatocellular carcinoma(HCC), status and developments [J]. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2018, 27: 69-80.
- [6] 管阳,刘凤永,付金鑫,等.肝癌动物模型与介入实验操作应用[J].介入放射学杂志,2017,26:1046-1051.
- [7] 江雄鹰,罗荣光,黄金华,等.兔 VX2 肝癌模型建立与经兔股动脉微导管超选择性肝左动脉插管技术的探讨[J].介入放射学杂志,2011,20:214-217.
- [8] 李智,倪才方,董凤林,等.兔 VX2 肝癌模型的建立及其生长转移特性的观察[J].介入放射学杂志,2009,18:691-694.
- [9] 陈胜利,全毅,黄子诚,等.Lp-THAE 诱导兔 VX2 肝癌细胞凋亡[J].介入放射学杂志,2007,16:406-410.
- [10] 秦建民,李琦,朱慧蓉.肝癌的药物靶向治疗[M].郑州:郑州大学出版社,2015:140-144.
- [11] 钱亭,陈茂振,高峰,等.两种方法建立兔 VX2 肝癌模型比较及影像学评估[J].介入放射学杂志,2014,23:58-61.
- [12] 金光鑫,王军,仇晓霞,等.MR 导引经皮穿刺瘤块种植法构建兔 VX2 肝癌模型[J].介入放射学杂志,2016,25:980-983.

(收稿日期:2018-06-03)

(本文编辑:边 估)