

两种建立兔 VX2 肝癌模型方法的超声评价及病理对照

贡雪灏, 张家庭, 刘伟宗, 李征毅, 陈胜华, 程志坚, 李泉水

【摘要】 目的:比较两种超声引导下建立兔 VX2 肝肿瘤模型方法的效果差异。**方法:**超声引导下分别采用 VX2 瘤组织悬液(A 组)和瘤组织小块(B 组)对两组新西兰兔肝脏进行接种,接种后于第 7、14、21 和 28 天时采用超声观测两组成瘤过程并记录,处死动物后取病理标本进行对照。**结果:**超声观测下兔肝 VX2 肿瘤多呈等回声结节,边界清楚,可见声晕或丰富血供;当肿块直径 ≥ 1 cm 时,超声能准确地反映肿瘤生长情况,与病理检测结果一致。A 组与 B 组成瘤率分别为 26.7% 和 66.7%,其差异有统计学意义($P < 0.01$)。A 组多为多结节散在分布,异位种植多;B 组肿块多生长局限,呈孤立结节。**结论:**超声引导下经皮穿刺瘤块接种法是一种简单、省时、微创、成瘤率高,且能达到批量建模要求的动物模型制作方法。

【关键词】 超声引导; 肝肿瘤; 动物模型

【中图分类号】 R445.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2010)07-0815-04

Evaluation of two methods of establishing rabbit VX2 liver cancer model with pathologic correlation GONG Xue-hao, ZHANG Jia-ting, LIU Wei-zhong, et al. Department of Ultrasonography, the Second People's Hospital of Shenzhen, Guangdong 518035, P. R. China

【Abstract】 Objective: To evaluate the efficacy of two methods of ultrasound-guided establishing rabbit VX2 liver tumor model. **Methods:** Under ultrasound guidance, VX2 tumor tissue suspension (A group) and tumor tissue pieces (B group) were injected and implanted into the corresponding group of New Zealand rabbit's liver. 7, 14, 21 and 28 days after the procedures, ultrasound examination was performed to observe tumor growth in each group and then pathological specimens of the sacrificed animals were taken for control study with pathology. **Results:** Sonographically, most rabbit VX2 liver tumors presented as isoechoic nodules with clear border, some having surrounding echo halo or rich blood supply; when the masses diameter ≥ 1 cm, ultrasound could reflect the growth of tumor accurately with the pathologic findings. Success rates of group A versus group B were 26.7% and 66.7% respectively, with significant statistical difference ($P < 0.01$). Most masses appeared as disseminating multi-nodule with ectopic implantation in group A; and as localized growth, single nodule in group B. **Conclusion:** Ultrasound-guided percutaneous tumor tissue pieces implantation for modeling is simple, time-saving, micro-invasive and results in high successful tumor formation rate, with furthermore advantage of batch production for establishing animal models.

【Key words】 Ultrasound-guided; Liver neoplasms; Animal model

兔 VX2 肝癌模型是研究原发性肝癌的生物学特性及治疗效果等常用的动物模型,其制作目前多采用开腹瘤组织小块种植法,但肿瘤的生长易受多种因素影响,同时难以大量复制。本研究采用超声引导下经皮穿刺瘤组织悬液和瘤组织小块种植法制作兔肝肿瘤模型,超声观测两种方法的成瘤效果并与病理结果相对照,旨在探求一种简单、省时、成瘤率高、且能达到批量建模要求的动物模型制作方法。

材料与方 法

新西兰大白兔 30 只,雌雄不限,兔龄 ≥ 3 个月,体重 2.5~3.0 kg,由南方医科大学实验动物中心提供。荷瘤兔由中山大学附属孙逸仙纪念医院惠赠。

无菌剥离接种于兔后腿内侧肌肉内的 VX2 肿瘤,

切开肿块,于肿块边缘切取生长旺盛的肿瘤组织,剔除坏死组织及纤维组织,生理盐水冲洗后,置于无菌培养皿内。方法一(A 组):用眼科剪将肿瘤组织剪成细小的组织碎块(约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm),倒入生理盐水,制成混悬液;方法二(B 组):用眼科剪将肿瘤组织剪为约 5 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm 大小的瘤块(组织条),滴入少量生理盐水,将瘤块浸于其中备用。

超声仪采用百胜-DU8 型超声仪(配备穿刺系统),探头型号 6L3,频率 4.0~6.0 MHz。接种用针具采用 18G 引导针,钳断针尖及前端部分针杆,将针芯改制为平头针芯,长度以完全放入引导针后较引导针长 3~5 mm 为宜。另同法制备一较引导针短 8~10 mm 的平头针芯。

超声引导下肿瘤接种:将兔仰卧位固定,常规腹部脱毛,戊巴比妥钠(0.3 ml/kg)自耳缘静脉滴入。超声检查兔肝,选择具有一定厚度且避开血管处肝实质为接

种部位(每只兔于左、右肝叶各接种一处),标记体表穿刺点。标记处皮肤消毒、铺巾、局麻。超声引导下,A组采用 18G 穿刺套管针穿刺进入预定部位,拔出针芯,观察片刻,无血液及胆汁流出,用注射器抽取 0.5 ml 的瘤组织混悬液经穿刺针缓慢注入肝实质,超声监视下可见液体翻滚,注射局部肝实质内出现较弥散的强回声,拔针后棉棒压迫针道约 3 min。术后给予庆大霉素 20 万单位肌注,观察 15 min 后送回兔笼。B 组以小镊子夹取 3~5 个瘤块置于套管针前端,用平头针芯推入引导针内距前端 5 mm 左右,套入改制成的短针芯,超声引导下将引导针插入到预定部位后后退稍许,退出短平头针芯,使用长平头针芯将瘤块推入到预定部位,超声显示在接种部位出现一团状高回声。其后处理同 A 组。两组各 15 只兔共 30 处接种部位。

超声监测接种后肿瘤成瘤过程:分别于接种后第 7、14、21 和 28 天行超声检查,观察接种部位是否出现肿瘤、肿瘤大小及病灶局部的血供情况并做记录,将其与之后的病理解剖结果对照,评价超声在监测肿瘤成瘤过程中的价值。

判定模型建立成功与否:于研究后期处死动物,剖腹取出肝脏,观察肿瘤在肝内生长情况及在腹腔、腹壁异位种植情况。于最大切面剖开肿瘤,与采集的肿瘤最大超声切面图像比较,使用计算机图像分析软件计算肿瘤的超声与病理最大切面直径。常规 HE 染色观察肿瘤的组织学特征。镜下见到浸润性癌巢证明接种成功。

采用 SPSS 13.0 统计软件包。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间率的比较应用 χ^2 检验,超声与病理对肿瘤直径的测值采用双变量相关分析。

结 果

1. 超声监测接种后肿瘤成瘤过程

当肿瘤出现时,超声于接种部位可探及圆形或类圆形低至中等回声结节,多呈类圆形,无包膜,边界清

楚(图 1),可伴低回声晕,内部回声欠均匀,当肿瘤内出现坏死时,可见散在强回声。CDFI 及 CDE 显示部分兔肝 VX2 肿瘤血供较丰富,以周边血供为主,瘤周可见较粗的血流信号包绕并进入肿瘤内;但部分兔肝 VX2 肿块则表现为少血供,彩色血流信号稀少或探测不到。

超声检查 30 只兔的 60 个肝内接种部位:接种第 7 天,未发现肝内有肿瘤生长;第 14 天,A 组发现肝内肿瘤 3 个(其中 1 个与其后病理结果不符),B 组发现肝内肿瘤 9 个;第 21 天,A 组发现肝内肿瘤数为 7 个,B 组为 18 个;第 28 天及其后超声检查,两组兔肝内均未发现新的肿瘤。

21 天后超声检查显示两组兔肝肿瘤总数为 25 个,与之后的病理结果比较,相符者 24 个,诊断符合率为 85.7%。采用双变量相关分析计算超声观测与病理测量肿瘤大小的相关性(表 1),当肿块直径 ≥ 1 cm 时,超声检查结果与病理结果有较好的一致性($r = 0.937, P < 0.01$)。

表 1 两种种植方法肿瘤平均径线的测量结果 (cm)

组别	样本量	病理测值	超声测值
A 组	6 只	1.76 ± 0.42	1.81 ± 0.48
B 组	18 只	1.83 ± 0.22	1.91 ± 0.33

2. 肿瘤标本肉眼及病理观察

于研究后期处死动物,解剖兔肝,肉眼观:肿瘤与正常肝组织分界不清,外观呈圆形灰白色鱼肉样结节,表面光滑,质硬(图 2)。比较两组成瘤形态:A 组多为多个小结节散在分布,大小不等,部分兔肝可见小结节沿接种针道分布;B 组肿块多生长局限,呈孤立结节(而非弥漫性),类圆形,大小较均一,直径 1.5~2.5 cm,边界较清晰。

低倍镜下观察:浸润性癌巢与肝实质无明显边界,间质分界不清,结缔组织较少,癌巢边缘分布着初浸润的肝索结构,肿瘤细胞分散排列,可见纤维间隔,新生毛细血管丰富。高倍镜下可见瘤细胞体积大,形态不

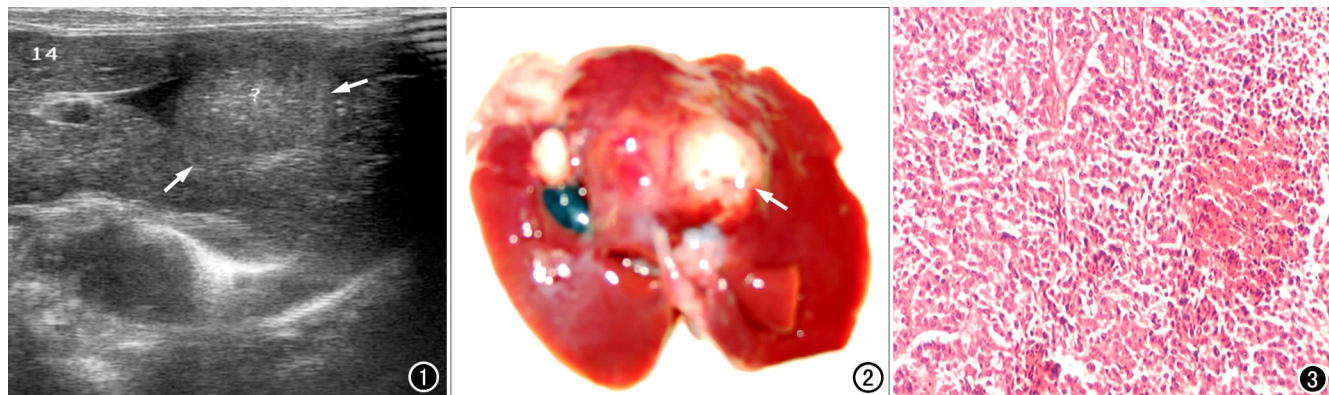


图 1 超声显示兔肝左叶内等回声肿块(箭),无包膜。图 2 超声引导经皮穿刺瘤组织小块法制作的兔肝肿瘤模型的大体标本,VX2 肿块呈灰白色圆形结节。图 3 镜下兔肝 VX2 肿瘤细胞胞浆丰富,淡红色,核肥大,其大小及形态各异,染色浓淡不均,核分裂像多见($\times 100$, HE)。

规则,细胞呈不规则排列,胞浆丰富,淡红色,核肥大,其大小及形态各异,染色浓淡不均,核分裂像多见,间质内可见淋巴细胞、浆细胞浸润(图 3)。

3. 两种方法肿瘤种植成功率及异位种植率的比较

肿瘤种植后,兔体内任何组织有肿瘤生长均视为肿瘤种植成活;肿瘤生长局限,于肝内呈孤立结节形,无邻近器官、腹膜腔及腹壁种植视为原位种植成功;而于肝外器官、腹膜腔或腹壁生长者,均视为肿瘤异位种植,两种方法肿瘤的生长情况见表 2。

表 2 两种种植方法肿瘤的生长情况

生长情况	A 组	B 组
肿瘤生长(个)		
肝左叶	4	11
肝右叶	4	9
无肿瘤生长(只)	9	3
异位种植(个)	7	3
原位成瘤率▲(%)	26.7	66.7
异位种植率▲(%)	23.3	10.0

注:▲两组比较,差异有显著性意义($P<0.05$)。

A 组 15 只兔共接种肿瘤 30 个,原位接种成功 8 个,原位成瘤率 26.7%(8/30)。其中肝左右两叶均接种成功者 2 只,仅一叶接种成功者 4 只,9 只接种失败者中,5 只于大网膜见新生肿瘤,2 只沿针道出现皮下种植。B 组 15 只兔共接种肿瘤 30 个,原位接种成功 20 个,原位成瘤率 66.7%(16/30)。其中两叶均接种成功者 8 只,其中 1 只伴腹腔淋巴结转移;仅一叶接种成功者 4 只;3 只接种失败,其中 2 只于大网膜见新生肿瘤,1 只出现皮下种植。

讨 论

兔 VX2 种植性肝癌模型是目前最常用、较理想的原发性肝癌动物模型,具有传代简单、易于移植、成功率高、生长迅速和侵袭性强等特点,且肿瘤供血以肝动脉为主,类似人的原发性肝癌^[1]。

采用兔 VX2 瘤株接种制作兔肝癌模型的方法和途径较多,目前多见者大致为开腹直视下的种植^[1,2]及影像学引导下的经皮穿刺种植两类。前者如开腹瘤块包埋法^[1,3],后者则主要有瘤细胞和瘤组织块悬液接种等^[4,5]。

开腹肝内瘤块包埋法的优点在于成瘤时间短,种植成功率高,肿瘤呈局限性生长,异位种植少等。其不足则为操作较复杂、费时,研究者需掌握一定的外科手术技能,单个模型制作完成平均需时 1.5~2.0 h 或以上,难以在短时间内完成批量模型制作;腹部较大的切口,对实验兔创伤大,实验条件要求相对高,术后易感染;瘤组织块分离下的活细胞数目不易控制,且手术创口易诱发炎症反应,肿瘤种植部易出现炎性包裹,这些均可影响肿瘤的生长,使其不易成活,导致种植失败;

手术形成瘢痕和腹腔粘连,影响其后肿瘤的超声观测及介入治疗研究。

而采用超声引导下经皮穿刺种植法,优点在于操作简单、省时,只需简单掌握超声介入操作方法即可,本研究中平均每 15~20min 即可完成 1 例接种,能达到小批量制作动物模型的要求;无需开腹,无手术瘢痕,因而对实验动物创伤小,感染概率低,并发症少,且利于其后超声介入治疗(如药物注射)的反复操作和疗效观察等。

对比超声引导下瘤组织悬液^[4]及瘤组织小块接种法^[6,7]建立兔 VX2 肝癌模型的结果,后组在成瘤时间、成瘤率、成瘤质量(成瘤形态)方面均优于前组,两组间的差异具有统计学意义。由此笔者认为,前者在接种时瘤组织更易经针道溢出,引起广泛种植,因而肝内成瘤弥散,不易形成局限性肿块,且异位种植多见;而后者既结合了开腹瘤组织小块包埋法和超声引导经皮穿刺法的优点,又避免了两者的不足,瘤组织块不易由针道脱出,成瘤时间短,成瘤率高,且成瘤形态多为孤立结节,有利于选择某个局限性肿块进行超声观测和介入治疗研究等,是一种效果较为理想的建立兔 VX2 肝肿瘤模型的方法。

本研究中观察发现,采用此法制作肝肿瘤模型,我们的体会是 VX2 肿瘤生长迅速,血供丰富,易发生坏死,瘤组织小块应取材于剖面上肿块边缘 2~3 mm 处生长最为旺盛的瘤组织(呈粉红色);兔肝左叶体积较大,形态及解剖位置变异小,且位置较表浅,宜于接种及其后的超声介入疗效观测;兔肝小、移动性大且分叶多,叶间隙较深,接种部位四周宜保留一定厚度的肝实质,避免瘤块接种于肝叶间隙(超声表现为一条高回声线);注意固定好兔,避免兔因挣扎或呼吸幅度较大等原因,使已插入肝实质内的引导针后退到肝叶之间,导致种植失败及异位种植;接种完毕后,用 1 ml 的琼脂糖凝胶封堵进针口,能有效防止瘤块组织脱离至腹腔或残留于皮下各层组织,从而提高成瘤率和降低异位种植率^[5]。

开腹瘤块包埋法成瘤率及成瘤时间在各家存在很大差异,近几年来文献报道成瘤率均在 90% 以上^[1,3]。与之相比,本组中成瘤率偏低(66.7%),成瘤时间较长,仍存在一定差距。分析原因,笔者认为这可能与接种肿瘤活力、数量及接种经验有关。

综上所述,超声引导下瘤组织小块接种法与常规开腹直视下接种法相比,接种后肿瘤生长原理相同,又具有简单、省时、创伤小、感染低等优点,能达到批量建立模型的要求,且利于模型制作成功后的超声介入治疗研究,随着经验的积累和技术的改进,将日趋完善,具有更好的应用前景。

需说明的是,尽管超声观测成瘤与病理结果有较好的一致性,但当接种肿瘤较小时(直径 <1 cm),超声观测仍有一定困难,其原因可能是肿瘤较小时,回声接近兔肝实质,呈中等回声,易漏诊;兔肝局部正常偏强回声结构(如筋膜、汇管区等)易误诊为小的肿瘤;兔呼吸、心跳较快,增加了超声检查的难度。通过熟悉 VX2 肿瘤声像图特征、兔肝正常解剖超声图像以及应用高分辨力超声和超声造影^[8],并在检查时适度用力按住兔胸廓以降低兔呼吸幅度,能有效提高小肿块的超声检出率。

参考文献:

- [1] 杨林,周翔平,官泳松,等. 兔 VX2 肝癌 MSCT 评价及病理特征[J]. 中国医学影像技术,2007,23(4):623-625.
- [2] 柳曦,李欣,赵俊功,等. 兔 VX2 肝癌模型制作及综合影像评价[J]. 实用放射学杂志,2002,18(2):132-134.

- [3] Hansler J, Neureiter D, Wasserburger M, et al. Percutaneous US-guided radiofrequency ablation with perfused needle applicators: improved survival with the VX2 tumor model in rabbits[J]. Radiology, 2004, 230(1):169-174.
- [4] 吴文娟,崔慧先,李海涛,等. 兔 VX2 肝癌模型的建立及超声观察[J]. 中华超声影像学杂志,2005,14(2):147-150.
- [5] Yoon CJ, Chung JW, Park JH, et al. Transcatheter arterial chemoembolization with paclitaxel lipiodol solution in rabbit VX2 liver tumor[J]. Radiology, 2003, 229(9):126-131.
- [6] 杨国华,陈孝平,黄志勇,等. 超声引导下瘤块注射建立兔 VX2 肝肿瘤模型[J]. 中国普外基础与临床杂志,2007,14(3):273-275.
- [7] 李远竞,刘颖,沈维红,等. 超声引导下组织块接种制作兔肝 VX2 瘤模型[J]. 中国医学影像技术,2008,24(12):1886-1888.
- [8] 刘政,张馨,高云华,等. 兔 VX2 微小肝癌超声造影的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志,2005,14(3):225-228.

(收稿日期:2010-03-05 修回日期:2010-04-12)

多脾综合征伴腹部脏器转位一例

· 病例报道 ·

张海彬, 胡道予

【中图分类号】R814.42 【文献标识码】D 【文章编号】1000-0313(2010)07-0818-01

病例资料 患者,女,8岁。B超检查怀疑肝肾间肿块而行 CT 检查。CT: 肝脏位于中上腹部,左叶体积明显增大,肝实质密度均匀,肝内血管显示清;胆囊位于上腹部中线区。胃大部位于右中腹部,胃窦及十二指肠球部、降部均位于左侧腹腔(图 1);胰腺较短,密度均匀,自左向右走行。脾区未见脾脏影,于右中下腹部肾脏周围、胃后方及胰尾前方可见 6 个大小不等结节影,最大者约 2.0 cm×5.5 cm(图 2),增强与肝脏同期强化,动脉期呈花斑样强化,静脉期及延迟期强化均匀。脾门可见供血动脉及引流静脉进出(图 3)。腹主动脉位于脊柱前方,下腔静脉位于椎体左前方,心尖仍位于左侧胸腔内,未见转位(图 4)。诊断:多脾综合征伴腹腔脏器转位。

讨论 多脾综合征指多脾伴有先天性心血管异常和内脏位置异位,是一种十分罕见的先天性多系统发育畸形组成的综合征。1788 年由 Baillie 首先报道,之后逐渐为人们所认识。脾脏起源于中胚层,是人体惟一见于左侧的器官。在胚胎发育第 5~6 自脐管回纳到腹腔内进行自身旋转,当这一阶段发生障碍,即可形成多脾综合征^[1]。多脾综合征的特征为脾的数目可为 2~6 个,合并有下腔静脉肝内段中断并奇静脉连续,房、室间隔缺损或其它心血管畸形,腹部内脏异位,胃肠道异常等,临床症状多与心血管畸形有关,肠道旋转不良可引起肠梗阻、腹部不适^[2]。总结本病例,虽然多脾综合征少见,但不应误认为肿瘤性病变,尤其是进行 B 超检查时,应建议进行 CT 或者 MRI 检查。其结节可多个和大小不一,但增强表现符合脾脏的强化规律,即动脉期呈花斑样强化,静脉期及延迟期强化均匀,多可明确诊断。同时还应检查心脏、肝脏、胰腺及胃肠等,除外是否有相伴随的病变。同时在发现心脏先天性畸形及胃肠



图 1 冠状面 CT 示胃大部位于右中腹部,胃窦及十二指肠球部及降部均位于左侧腹腔,脾区未见脾脏显示,胃左下方可见多个强化结节(脾脏,箭)。图 2 于右中下腹部肾脏周围、胃后方及胰尾前方可见 6 个大小不等脾脏结节影。图 3 CPR 图像示腹腔内多个大小不等脾脏结节,脾门可见脾脏的供血动脉(短箭)及引流静脉(长箭)。图 4 冠状面图像示下腔静脉(长箭)位于脊柱左侧,腹主动脉(短箭)位于脊柱右侧,心尖位于左侧胸腔内,肠系膜下静脉(CMV)、门静脉及肝静脉显示清楚。

道位置异常时,要进一步检查脾脏有无异常。

参考文献:

- [1] 金昌斌,曲昆,季克情. 多脾综合征 1 例报告[J]. 临床放射学杂志,2000,12(12):1042.
- [2] 白人驹等. 医学影像诊断学(第 2 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005. 497.

(收稿日期:2010-04-08)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科

作者简介:张海彬(1986—),男,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事腹部影像诊断和研究工作。