

·实验研究 Experimental research·

兔 VX2 膀胱癌移植瘤模型实验研究

李 彬, 张 强, 王志伟, 周 慷, 高钦宗, 李晓光

【摘要】 目的 通过模拟原位膀胱癌发生机制构建兔 VX2 膀胱癌移植瘤动物模型, 研究其生物学特性及影像学表现。**方法** 采用同轴法穿刺接种 VX2 细胞株于 25 只新西兰大白兔膀胱, 接种术后 14、21、28 d 分别作 CT 平扫及增强扫描, 评估肿瘤种植及生长情况。取兔膀胱组织标本作大体解剖学及组织病理学检查, 同时观察腹腔淋巴结及肝肺转移情况。**结果** 22 只实验兔建模成功, 植瘤成瘤率为 88.0% (22/25)。植瘤后 14、21、28 d 瘤体平均长径分别为 (1.38 ± 0.20) mm、 (2.30 ± 0.08) mm、 (3.22 ± 0.24) mm, 且瘤体变化差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。VX2 移植瘤 CT 表现为膀胱壁局部不规则增厚或肿块突起, 呈均匀强化 (14 d) 或环型强化 (21、28 d), 肿瘤腔内呈不同程度充盈缺损。种植瘤大体形态及其影像学特征基本相符, 组织病理学表现为血管丰富的低分化鳞状细胞癌, 呈浸润性生长, 21 d 后瘤体中心出现坏死, 21、28 d 出现肝、肺及腹腔淋巴结转移。**结论** 本研究成功构建兔 VX2 膀胱移植瘤模型, 基本反映了膀胱癌发生与发展过程, 适合 CT 动态观察及实验研究。

【关键词】 膀胱肿瘤; 动物模型; VX2 细胞株; CT

中图分类号: R737.14 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-11-0991-05

Transplanted VX2 bladder carcinoma model in rabbits: an experimental study LI Bin, ZHANG Qiang, WANG Zhi-wei, ZHOU Kang, GAO Qin-zong, LI Xiao-guang. Department of Radiology, Peking Union Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Xiao-guang, E-mail: xglee88@126.com

【Abstract】 Objective To establish the transplanted VX2 bladder carcinoma model in experimental rabbits by simulating the occurrence mechanism of bladder cancer in situ, and to study its biological features and imaging manifestations. **Methods** VX2 tumor tissue was implanted into the bladders of 25 healthy New Zealand white rabbits by coaxial puncture inoculation method. Both plain and enhanced CT scans were performed at 14, 21 and 28 days after inoculation to evaluate the conditions of tumor seeding and growth. The specimens of rabbit bladder tissue were macroscopically and histopathologically examined. The metastases of abdominal lymph nodes, liver and lung were determined. **Results** Successful tumor-modelling was obtained in 22 experimental rabbits, the tumor formation rate was 88.0% (22/25). The average length of tumor at 14, 21 and 28 days after inoculation were (1.38 ± 0.20) mm, (2.30 ± 0.08) mm and (3.22 ± 0.24) mm respectively, the differences in the changes of tumor size along with time were statistically significant ($P < 0.01$). On CT scan, the transplanted VX2 tumors were characterized by irregular thickening or tumor-like protrusion of local bladder wall, showing homogeneous enhancement (at 14 days) or ring enhancement (at 21 days and 28 days); different degree of filling defect was seen in the tumor cavity. The imaging features were basically consistent with the gross morphology of the tumors. Histopathologically, the tumors were manifested as poorly differentiated squamous cell carcinoma containing abundant blood vessels, taking the form of invasive growth. At 21 days after inoculation, necrosis appeared in the tumor center, and at 21 and 28 days after inoculation, metastases of liver, lung and abdominal lymph nodes were observed. **Conclusion** This study indicates that transplanted VX2 bladder carcinoma model can be successfully established in experimental rabbits. The

pathological observation shows that the formation course of transplanted VX2 tumor basically reflects the occurrence and development of bladder cancer. Therefore, this tumor model is suitable for dynamic CT observation as well as for experimental study. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 991-995)

【Key words】 bladder neoplasm; animal model; VX2 cell line; CT

膀胱癌是发生于尿路上皮细胞的恶性肿瘤,目前临床有效治疗方法局限,术后复发率高、需多次反复治疗、生存获益较低。构建合理的动物膀胱癌模型进行深入的基础及临床研究,对于提高诊断与治疗效果具有重要意义。兔 VX2 移植瘤形态学及生物学特性与人类肿瘤相似,具有易于种植、增殖迅速、侵袭性强等特点,适用于制成原位肿瘤模型及实验研究^[1-2]。本实验旨在通过构建稳定的兔 VX2 膀胱癌移植瘤模型,探讨并研究其生物学特性及影像学表现。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要器材

新西兰大白兔 25 只(北京协和医院实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK 京 2015-0025),雌雄不限,体重 2.5~3.5 kg。VX2 瘤株由中国医学科学院基础所细胞中心提供。

实验主要器材包括 SOMATOM Perspective 型 64 层螺旋 CT 扫描仪(德国 Siemens 公司)、高压注射器(美国 Medrad 公司)、18 G 穿刺针(美国 Argon 公司)、普通手术器械包(含直剪、直镊、止血钳、有齿镊、持针器、手术刀柄)、无菌刀片(上海浦东金环医疗用品公司)、3-0 缝线缝合针(台湾佳合医材公司)、碘海醇注射液(350 mg I/ml,美国通用公司)、2%利多卡因注射液(中国大冢制药公司)、戊巴比妥钠(100 mg/支,上海新亚药业公司)、青霉素(80 万 U/支,山东鲁抗医药公司)、苏木精-伊红(HE)、4%多聚甲醛溶液(武汉谷歌生物科技有限公司)、明胶海绵颗粒(1 000~1 400 μm ,杭州艾丽康医药科技公司)。

1.2 VX2 瘤株制备和种植方法

将冻存的 VX2 瘤株组织进行复苏后离心 5 min (800 r/min),弃去上清液,加入适量磷酸缓冲液(PBS)液摇匀取悬液,锥虫蓝染色,细胞计数池计数并调制成浓度 1×10^6 的细胞混悬液待种植。用 1 ml 注射针取 VX2 细胞悬液 0.5 ml 接种于兔后腿外侧肌肉内传代。2~3 周后全身麻醉无菌条件下剥离兔肿瘤,选取瘤体边缘生长旺盛的鱼肉样组织,切成约 1.0 mm \times 1.0 mm \times 2.0 mm 组织条,置于生理盐水备用。

术前以 3%戊巴比妥钠(3 mg/kg)经实验兔耳缘静脉注射麻醉,麻醉起效后仰卧位固定于手术台。手术区备皮消毒铺巾,严格无菌操作,取兔耻骨以上腹部中线纵行切口约 2 cm,2%利多卡因 3 ml 局部麻醉,切开皮肤,钝性分离皮下组织及肌肉层,将膀胱待种植部位暴露于视野内。经 1 ml 注射针向膀胱壁种植部位注入 0.5 ml 生理盐水,将预先装有 VX2 组织条及明胶海绵颗粒(浸有对比剂)的 18 G 穿刺针针尖完全刺入所隆起的膀胱黏膜内,并经同轴管腔快速推送瘤块,完整进入后拔针并逐层缝合肌肉及皮肤,切口再次消毒、包扎,记录所用时间。术后青霉素 5 万 U/kg 肌肉注射,连续 3 d,预防感染。

1.3 影像学评估和病理学检查

种植后 14、21、28 d 分别作 CT 平扫及增强扫描(扫描参数:管电压 80 kV,管电流 120 mA,有效层厚 5 mm,重建间隔 1 mm),经兔耳缘静脉用高压注射器(1.0 ml/s 速率、1.5 ml/kg 剂量)注入对比剂作动脉期(10 s)、静脉期(20 s)及延迟期(60 s)扫描。通过 CT 影像监测及评估移植瘤种植及生长情况,并根据公式 $a \times b^2/2$ (a 、 b 分别代表瘤体长径、短径,单位为 mm^3) 计算肿瘤体积(V)^[3], $(a_2b_2 - a_1b_1)/a_1b_1$ 计算肿瘤生长率(tumor growth rate, TGR)。CT 扫描后即可处死荷瘤兔,获取膀胱标本作大体解剖学观察,检查肝、肺、腹腔淋巴结等转移情况。将荷瘤膀胱标本固定于 4%多聚甲醛溶液 24 h,石蜡包埋,切片厚度 4~5 μm ,作 HE 染色,光镜下观察肿瘤组织学特征及坏死情况。观察剩余实验兔生存期。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学处理。样本数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态及成瘤情况

25 只实验兔均完成 VX2 膀胱移植瘤种植,过程顺利,平均(12.0 \pm 2.5) min,术后 40 min 苏醒,活动、进食水。2 只实验兔于接种后 4 d 出现缝合口感染并皮下积气,局部切开清创,再次缝合,给予抗生

素 3 d 肌内注射;1 只兔于术后 10~14 d 出现切口皮下种植转移灶,可触及呈结节状;3 只兔至 21 d 时 CT 扫描未见肿瘤,解剖检查证实无肿瘤生长。实验兔平均生存期为 5~6 周,尸检发现广泛肺及腹腔转移伴胸、腹腔积液。

共 22 只实验兔接种成功,成瘤率为 88.0% (22/25)。病理证实肿瘤形成,实验期内均未见自发缩小或消失,肿瘤生长变化情况见表 1。

表 1 种植后 14、21、28 d 兔 VX2 膀胱肿瘤生长变化

$n=25, \bar{x} \pm s$

术后时间/d	瘤体长径/cm	瘤体短径/cm	肿瘤体积/cm ³	TGR/%
14	1.38±0.20	1.08±0.15	0.84±0.31	—
21	2.30±0.08	1.89±0.10	4.57±0.50	192.7 ^a
28	3.22±0.24	2.49±0.20	10.00±1.34	84.4 ^b

注:^a与术后 14 d 相比, $P<0.01$;^b与术后 21 d 相比, $P>0.05$

2.2 影像学表现

瘤株接种后 14 d,CT 扫描显示膀胱壁局部不规则增厚,呈等密度或稍低密度,增强后呈均匀强化(14 d)(图 1①②),瘤体平均长径(1.38±0.20) mm。接种后 21、28 d,瘤体平均长径分别为(2.30±0.08) mm、(3.22±0.24) mm,肿瘤体积增长迅速,TGR 在 21 d 时为 192.7%,较前显著变化($P<0.01$),28 d 时为 84.4%,

较前无显著变化($P>0.05$);CT 表现为向膀胱腔内外突起的肿块影,中心出现低密度坏死区,动脉期及静脉期呈环形强化,延迟期膀胱腔内高密度对比剂填充,肿瘤腔内呈不同程度充盈缺损(图 1③);腹膜后淋巴结肿大、肝脏及肺部结节状转移灶。

2.3 大体标本及病理学表现

兔 VX2 膀胱种植瘤大体形态呈类圆形,向腔内外突起,周围新生血管包绕(图 2①),质硬,瘤体切面中心见糜粥样坏死组织,周缘呈灰白色鱼肉样,侵及膀胱壁全层,与正常组织交界不清。病理组织学表现:瘤体为血管丰富的低分化鳞状细胞癌,呈浸润性生长,肿瘤细胞形态不规则,排列紊乱,体积较大,核大而深染,异型性明显,核异常分裂像多见;肿瘤组织局灶性坏死,坏死区细胞核消失,胞质蛋白部分降解,胞质淡染;坏死区炎性细胞(淋巴细胞、粒细胞)浸润(图 2②③)。

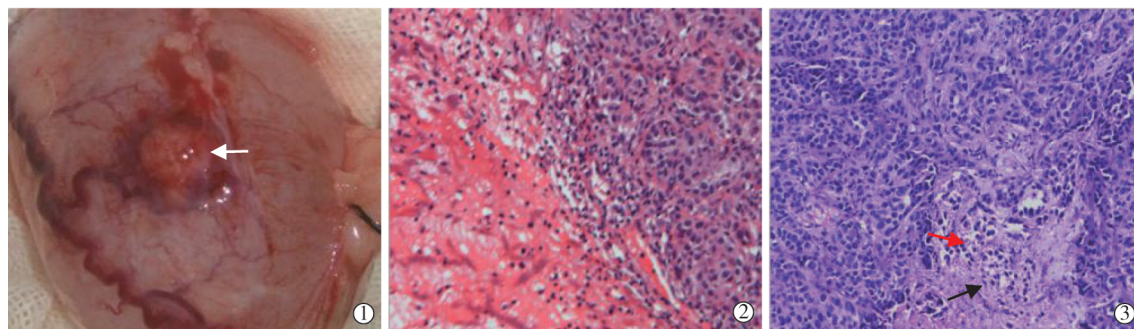
3 讨论

构建良好的膀胱癌动物模型是研究膀胱癌发生发展机制的关键,为模拟人类膀胱癌影像学评估及临床治疗研究提供了稳定的基础实验模型。实验室常用小鼠作为肿瘤模型载体,通过化学致癌剂诱



①CT 增强扫描示肿瘤(箭头)均明显强化,呈类圆形,形态规则,边界清楚,自膀胱壁向腔内外突起;②矢状位重建成像示肿瘤(箭头);③俯卧位延迟期扫描示膀胱腔内高密度对比剂填充,肿瘤腔内呈不规则充盈缺损表现

图 1 兔 VX2 膀胱移植瘤种植 14 d 后 CT 影像



①兔 VX2 膀胱移植瘤大体形态呈类圆形(箭头),突起于膀胱壁,周围新生毛细血管包绕;②HE 染色(100×)示 VX2 瘤体呈浸润性生长,肿瘤细胞形态不规则,核大深染,异型性明显;③HE 染色(100×)示肿瘤组织局灶性坏死,胞质淡染(黑箭头),坏死区细胞核消失,炎性细胞浸润(红箭头)

图 2 兔 VX2 膀胱移植瘤种植 14 d 后大体解剖及病理学图像

发膀胱癌^[4],如以 N-丁基-N(4-羟丁基)-亚硝基胺(BBN)、N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)为代表的亚硝基类化合物和以 N[4-(5-硝基-2-呋喃基)-2-噻唑基]甲酰胺(FANFT)为代表的硝基呋喃化合物,可分别通过饲喂或经尿道膀胱灌注方式诱发动动物模型成瘤。尽管该方式接近人体自然条件下诱发肿瘤,但诱癌周期较长,成瘤率不匀一,个体差异大,且鼠类体积较小,使影像学及治疗学研究受限。

实验兔是目前具有自身瘤株的最大动物品系,其膀胱与人体膀胱基本解剖学结构及血供系统相近。从动物易得、经济、安全可行等方面衡量,新西兰大白兔是构建膀胱癌模型最为适合的实验动物。VX2 细胞株是由 Shope 病毒在兔皮肤上诱发乳头状瘤衍生的鳞状细胞癌^[5],经 72 次移植传代培养后构建的肿瘤细胞株,在兔体内应用已得到广泛认可。由于新西兰种属兔缺乏对该肿瘤的免疫抗体^[6],故可直接接种至兔肝、肺、肾脏及肌肉等器官,制成原位肿瘤动物模型。VX2 肿瘤细胞株具有生物学性质稳定、易于传代和种植、增殖迅速、侵袭性强等特点,适用于肿瘤模型构建及实验研究。

VX2 瘤株可直视下通过瘤细胞悬液或瘤组织块包埋种植于膀胱,瘤细胞悬液注射可准确定量移植肿瘤细胞数目,但穿刺深度与注射压力不易掌握,细胞悬液可向外渗出,造成腹腔内种植转移^[7];瘤块包埋可保证瘤细胞正常生长的浓度,且组织块对机体免疫有抵抗力,对种植环境适应性较好。既往文献报道的瘤块包埋法,是将 VX2 瘤株置于局部切开的膀胱壁内再缝合包埋,对膀胱壁损伤较大且易导致穿孔^[8-9]。我们在上述瘤株移植方法基础上进行创新改进,采用同轴法穿刺植入瘤株,即在手术直视下经切口暴露膀胱,用 1 ml 注射针向种植部位注入 0.5 ml 生理盐水,经 18 G 穿刺针将预先填充在同轴管腔内瘤组织块及浸有对比剂的明胶海绵颗粒推送至隆起的膀胱黏膜内。该方法创伤小,接种部位明确、局限,易于观察肿瘤生长情况;明胶海绵颗粒可固定瘤块并封堵穿刺针眼,防止瘤块溢出,同时浸有对比剂起到 CT 影像上显示肿瘤种植位置的作用。本实验选择 18 G 穿刺针(外径 1.2 mm,内径 1.0 mm)用于瘤组织植入,该穿刺针可预先置入瘤块,保证组织完整性,又在减少膀胱壁损伤的同时提高手术可操作性,缩短种植时间,降低术中感染风险。因此,该方式对于构建移植瘤模型具有较好的应用价值。

本实验中未出现麻醉及操作相关原因导致的

动物死亡,平均手术时间为(12.0±2.5) min,成瘤率达 88.0%,成功完成膀胱癌移植瘤模型构建。针对种植术后切口感染(8%)、皮下种植转移(4%)及肿瘤种植失败(12%)等问题,我们考虑应注意:①瘤块制备需选切瘤体周缘鱼肉样组织,接种时预置有瘤株的穿刺针尖应整体刺入后再完全推送针芯,有助于提高成瘤率及防止腹腔种植转移;②手术严格无菌操作,减少开腹后腹腔暴露时间,术后肌肉注射抗生素可有效降低感染及死亡率;③随访观察动物一般状况并及时处理切口感染等并发症。

本实验采用 CT 平扫及增强扫描作影像学评估,动态观察瘤株于膀胱壁成活后的生长发展特征。术后 2 周,膀胱壁局部出现不规则增厚,呈等密度或稍低密度,增强后呈均匀强化,肿瘤呈实性,大量毛细血管形成,供养丰富,此阶段为供瘤血管形成期;术后 3~4 周,肿瘤生长迅速,瘤体中心出现缺血坏死,为供瘤血管稳定期,CT 表现为向膀胱腔内突起的等低密度肿块影,中心见低密度坏死区,增强后动脉期及静脉期实性部分呈环形强化,延迟期对比剂经尿液代谢入膀胱,腔内呈不同程度充盈缺损,出现腹膜后淋巴结肿大,双肺及肝脏多发结节状转移灶。肿瘤组织解剖标本形态与 CT 图像变化相符,瘤体切面灰白、质硬,向周边膨胀呈浸润性生长,分界不清;镜下瘤细胞呈团块状分布,异型性明显,可见角化不良细胞,提示为低分化鳞状细胞癌。我们建议,为避免肿瘤坏死和转移对实验结果的影响,最好选择在术后 2~3 周进行 VX2 瘤株传代、模型制作及实验研究,这与既往报道的观点相近。本研究不足之处在于 VX2 瘤株非源于膀胱移行上皮,无法完全取代其它方法构建的膀胱癌模型,且其恶性程度极高,呈侵袭性生长,不利于长期研究与生存率评价。

总之,本研究成功构建兔 VX2 膀胱移植瘤模型,基本反映了膀胱癌发生与发展过程。该建模方法成瘤率高,操作安全、简捷,重复性强,并发症较少,为在膀胱移植瘤模型上进行基础研究及临床研究创造了较好条件,尤其适合于 CT 动态观察肿瘤种植及生长变化,对影像评估有重要价值。

[参考文献]

- [1] 武 贝,高 杨,席 玮,等.兔 VX2 门静脉癌栓模型构建[J].介入放射学杂志,2016,25:239-242.
- [2] 张 强,郭子义,李 彬,等.隐动脉置管在兔肝肾动脉介入治疗中的应用[J].介入放射学杂志,2015,24:1090-1094.

- [3] Naito S, Von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. Cancer Res, 1986, 46: 4109-4115.
- [4] Prabhu B, Sivakumar A, Sundaresan S. Diindolylmethane and lupeol modulates apoptosis and cell proliferation in n-butyl-n-(4-hydroxybutyl) nitrosamine initiated and dimethylarsinic acid promoted rat bladder carcinogenesis[J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22: 747-754.
- [5] Guan L. Angiogenesis dependent characteristics of tumor observed on rabbit VX2 hepatic carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 12014-12027.
- [6] Bize PE, Jordan O, Fuchs K, et al. Evaluation of the antitumoral effect sunitinib eluting beads in VX2 liver tumour in a rabbit model[J]. J Clin Oncol, 2013, 31: 91-97.
- [7] Lin WY, Chen J, Lin Y, et al. Implantation of VX2 carcinoma into the liver of rabbits: a comparison of three direct-injection methods[J]. J Vet Med Sci, 2002, 64: 649-652.
- [8] 吴刚, 靳风烁, 李黔生, 等. 可移植兔原位高转移性膀胱癌模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18: 466-467.
- [9] 陈军, 徐祗顺, 董德鑫, 等. 兔膀胱 VX2 肿瘤移植模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 117.
- (收稿日期: 2016-03-31)
(本文编辑: 边 皓)

• 病例报告 Case report •

腔内治疗复杂巨大腹主动脉瘤 1 例

周静文, 陈德基, 何明基, 练 辉

【关键词】 腔内修复; 腹主动脉瘤; 动脉硬化

中图分类号: R543.5 文献标志码: D 文章编号: 1008-794X(2016)-11-0995-02

Endovascular repair of complex and huge abdominal aortic aneurysm: report of one case ZHOU Jing-wen, CHEN De-ji, HE Ming-ji, LIAN-Hui. Department of Radiology, Affiliated Second Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510260, China

Corresponding author: CHEN De-ji, E-mail: chendeji2003@163.com (J Intervent Radiol, 2016, 25: 995-996)

【Key words】 endovascular repair; abdominal aortic aneurysm; arteriosclerosis

病例资料

患者男, 74 岁, 既往高血压、冠心病、不稳定型心绞痛 10 余年, 口服药物病情控制良好。5 年前在当地医院发现腹部搏动性包块, 超声确诊为腹主动脉瘤, 大小约 12 cm×8.8 cm, 当时无特殊不适, 未进一步治疗。2014 年 6 月患者因“左腰背部疼痛, 呈酸胀感, 站立活动时明显, 伴有腹胀、深呼吸受限、纳差等症状”来我院就诊, 收治入院并完善相关检查。CTA 示: 肾动脉开口以下巨大腹主动脉瘤并附壁血栓形成, 大小约 16.6 cm×13.2 cm, 较前增大, 瘤颈角约 70°; 双侧髂总动脉受累并扩张; 双侧髂内动脉狭窄并附壁血栓形成; 左侧髂外动脉严重迂曲、折叠; 主动脉全程、双侧髂内外动脉管壁粥样硬化。

手术过程

Seldinger 技术穿刺左肱动脉, 置入 5 F 导管鞘, 将 5 F 猪尾导管送至肾动脉开口以下瘤颈附近行腹主动脉造影(造影后留置导管), 并测量动脉瘤相关数据进行术中评估, 确定使用支架类型和直径。

因左侧髂动脉严重迂曲, 故选取右侧股动脉为入路血管。采用 Seldinger 技术和导丝交换技术, 右股动脉置入超硬导丝通过瘤体至胸主动脉, 沿超硬导丝置入覆膜支架主体及其推送系统至近端锚定区。造影观察主体支架位置, 控制收缩压 90 mmHg 左右, 透视监视下调整主体支架定位于肾动脉下方释放。为控制主体支架的稳定性, 先将主体支架释放一半, 露出主体支架残端即可。

从左侧肱动脉路径在椎管、交换导丝引导下通过主体支架残端开口至左侧髂、股动脉, 切开左侧股动脉, 引出交换导丝构成肱-股动脉导轨, 然后将分体支架经左股动脉内交换

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.11.016

作者单位: 510260 广州医科大学附属第二医院放射科

通信作者: 陈德基 E-mail: chendeji2003@163.com