

兔 VX2 移植性骨肿瘤模型超声影像学表现

陈莉, 姜立新, 郭倩, 胡兵

(上海交通大学附属第六人民医院超声科, 上海 200223)

摘要: 建立兔 VX2 移植性骨肿瘤模型, 为高强度聚焦超声(HIFU)治疗骨肿瘤提供理想的实验动物模型。将 VX2 瘤块植入到 20 只兔的右侧胫骨髓腔内建立骨肿瘤模型, 连续进行超声和磁共振影像学检查并观察其生长特性, 确定 HIFU 治疗骨肿瘤的最佳时间。结果表明成瘤率达 100%, 1~2 周肿瘤在髓内生长, 超声可观察肿瘤引起的骨膜反应, 2~3 周肿瘤开始破坏骨皮质, 超声可观察到髓内肿瘤及向髓外软组织侵犯情况, 3~4 周肿瘤中心有坏死及液化, 并开始出现远处转移。可见超声可监测 VX2 骨肿瘤生长情况, HIFU 治疗 VX2 骨肿瘤模型最佳时间为植瘤后 3 周左右。

关键词: 骨肿瘤动物模型; 超声造影剂; 磁共振

中图分类号: R730.59

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2011)-02-0153-05

DOI 编码: 10.3969/j.issn1000-3630.2011.02.009

Sonographic features of transplantable VX2 bone tumor model in rabbit

CHEN Li, JIANG Li-xin, GUO Qian, HU Bing

(Department of Ultrasound, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200223, China)

Abstract: Objective: To establish experimental rabbit model with VX2 malignant bone tumor as an ideal experimental animal model for high intensity focused ultrasound (HIFU) treatment in bone tumor. Methods: Twenty New Zealand white rabbits were inoculated with VX2 tumor in cavitas medullaris of right tibia and taken sequential ultrasound and magnetic resonance imaging (MRI) examination to observe growth characteristics and make sure of the best time for bone tumor treatment with HIFU. Results: 20 rabbits were all successfully inoculated. Tumor grew in the local cavitas medullaris of tibia and periosteal reaction could be observed on sonography in 1-2nd week, cortical bone of tibia were destroyed, soft tissues outside of bone were invaded on sonography image in 2-3th week. Necrosis and liquification in the center of the tumor could be seen on sonography, and metastasis also could be found in other part of the body in 3-4th week. Conclusion: Combined with sonography characteristics of the VX2 tumor in cavitas medullaris of right tibia, it is clear that 3 weeks after tumor transplantation is the best time for VX2 bone tumor model treatment of HIFU.

Key words: bone tumor animal model; microbubble contrast agents; magnetic resonance imaging

0 引言

恶性骨肿瘤发病率逐年增高, 其中以骨肉瘤所占比例最高, 且恶性程度高, 预后不佳。骨肉瘤好发于青少年, 好发部位为胫骨近端及股骨远端, 外科手术常需截肢治疗^[1,2]。为提高骨肉瘤患者的生活质量, 以保肢为目的的综合治疗, 成为除手术以外的重要治疗方法。HIFU 作为一种新型局部微创治疗手段, 经临床证实对前列腺癌、子宫肌瘤等实体瘤均有较好的治疗效果^[3]。将 HIFU 用于骨肿瘤的保肢治疗中, 并对其进行评估成为研究热点。本研

究通过建立兔移植性骨肿瘤模型, 观察其影像学变化并结合病理学结果, 以期为临床治疗的随访及评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

纯种新西兰大白兔 20 只, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄不限(由上海市第六人民医院实验动物中心提供)。

1.2 兔 VX2 骨肿瘤的接种

无菌条件下手术剥离荷瘤兔肌肉间肿瘤, 从肿瘤的边缘区取新鲜鱼肉样的肿瘤组织块置于生理盐水中, 剔除坏死组织及纤维组织, 将瘤组织剪碎至 1 mm³ 大小的组织块备用。用 2.5%戊巴比妥钠 1.0

收稿日期: 2010-12-12; 修回日期: 2011-03-12

作者简介: 陈莉(1985-), 女, 江西萍乡人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤的超声介入治疗及超声分子诊断。

通讯作者: 胡兵, E-mail: hubingshanghai@163.com

ml/kg 经耳缘静脉注射麻醉模型兔后, 仰卧位固定, 局部去毛消毒后, 于右侧胫骨干骺端内侧较平坦处作 1 cm 长皮肤切口, 分离皮下组织暴露胫骨后, 用 2 mm 克氏针骨表面钻孔, 从皮质直至髓腔, 深约 4 mm 左右, 将 1 mm³ 大小的肿瘤组织块送入腔内, 骨蜡封口, 缝合皮肤, 制成动物模型。

1.3 实验仪器及实验方法

20 只新西兰大白兔随机分为 4 组, 每组 5 只, 连续进行超声及磁共振检查, 共观察 5 周, 将第一、第二、第三、第四组依次分别于第 2、第 3、第 4、第 5 周处死, 观察肿瘤的生长及全身转移情况。

超声仪器为意大利 Esaote MyLab90 超声诊断仪, 探头频率为 12.5 MHz。每次超声检查时均在同等设置条件进行。所有实验动物均连续进行超声观察, 先行二维超声、彩色多普勒和频谱多普勒超声检查, 观察病灶大小、肿瘤内部和周边血供以及浸润情况。使用 CDFI 技术评估肿瘤内部血流及周边血供, 使用频谱多普勒技术测量每只兔肿瘤内动脉阻力指数测量并计算其平均值。视肿瘤生长情况, 适时进行超声造影检查, 所用造影剂为 SonoVue (Bracco, Italy), 先以 5 ml 生理盐水稀释, 振摇至冻干粉完全分散入溶液。按 0.2 ml/kg 剂量经兔耳缘静脉团注给药, 随后快速注射 2 ml 生理盐水冲管。造影剂注入后即时存储连续、实时、动态图像, 观察病灶造影剂灌注情况及变化过程。

MRI 扫描仪为 PHILIPS Achieva SM2-1 型, 磁场强度为 3.0T。使用头颅 8 通道线圈, 对接种部位进行 T1 加权、T2 加权和 TI 增强的横断面、冠状面和矢状面扫描, 所有兔平扫后均行增强扫描, 增强造影剂使用马根维显, 按 0.1 mmol/kg 从耳缘静脉注射。扫描序列: T2W:TR=1600ms, TE=100ms, NSA=6, 层厚=2 mm, FOV=100 mm×100 mm, 矩阵=200×192; T1W: TR=500 ms, TE=20 ms, NSA=6, 层厚=2 mm, FOV=100×100 mm, 矩阵=224×270, 总扫描时间约 12 min, 所有检查均在仪器设置相同的情况下进行。

1.4 病理学检查

20 只实验兔于不同时期影像学检查后处死, 肉眼观察病侧胫骨髓腔内肿瘤大小、形态、周围骨皮质、软组织浸润及远处转移情况, 随即行病理组织学观察, 切取靶区肿瘤组织及其它脏器转移瘤组织置于 10% 中性甲醛中固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色。

2 结果

2.1 移植成瘤率和肿瘤组织生长特征

20 只实验动物, 肿瘤原位移植均成功, 未发现肿瘤自发消退现象。肿瘤移植后第 1~2 周肿瘤局限在髓腔内, 第 2 周观察到髓腔内肿瘤开始浸润转移, 骨皮质被破坏(图 1), 第 3 周周围软组织明显受侵犯, 有肿块形成, 第 4 周以后软组织肿块生长速度快, 形态变化很大, 且无一定规律, 于小腿内侧后肌群内广泛浸润, 形成边界不清的大肿块。第 3~4 周出现肺转移。4~5 周可有肝、肾、盆腹腔淋巴结转移。经统计, 第二组的 5 只兔均在胫骨髓腔内发现肿瘤, 5 只出现髓腔外软组织肿块, 4 只发生肺转移, 未发现有其他组织器官转移(见表 1)。



图 1 胫骨内 VX2 移植性肿瘤
Fig.1 Transplantable VX2 tumor in tibia

表 1 兔 VX2 移植性骨肿瘤模型肿瘤生长数目统计

Table 1 Tumor statistics of VX2 transplantable VX2 bone tumor model in rabbit

部位	分组			
	第一组/只	第二组/只	第三组/只	第四组/只
髓腔内	5	5	5	5
髓腔外	3	5	5	5
肺	1	4	5	5
肝、肾	0	0	4	5

2.2 影像学观察

2.2.1 超声影像表现

第一周, 病灶区骨表面粗糙不光滑, 回声增强。

第二周, 病灶区可见骨表面毛糙, 不连续, 回声增强, 周围骨皮质呈楔形增厚, 髓腔内可见回声不均匀的肿块。CDFI 技术显示病灶内肿瘤组织及病灶骨表面均有较丰富的血流信号, 后者提示肿瘤已引起骨膜反应。骨膜反应最早于第 10 天被观察到(见图 2)。

第三周, 病灶区骨皮质缺损区增大, 不规则,

可见短而毛糙的骨膜新生骨,其外层骨膜抬起并有楔形增厚,与周围软组织内低回声肿块形成类似 X 线上的 Codman 三角表现(见图 3)。CDFI 显示骨膜反应较丰富的血流信号。显示肿瘤内有异常增生的血管,血管内径增粗、迂曲、分布密集互相交通。

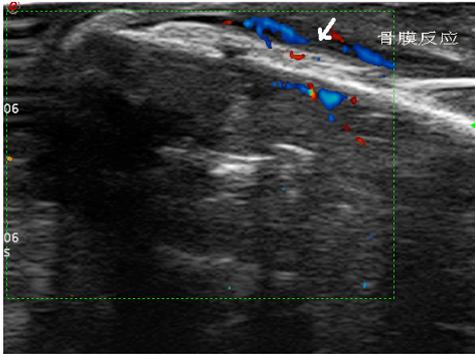


图 2 超声显示早期骨膜反应

Fig.2 Ultrasound displayed periosteal reaction in early phase

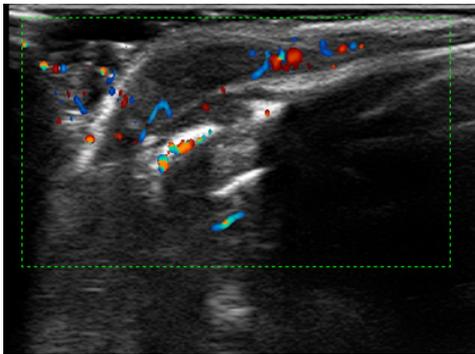


图 3 超声显示第 3 周的骨膜反应

Fig.3 Ultrasound displayed periosteal reaction in the third week

病灶区同时测得动、静脉血流,通过脉冲多普勒测得肿瘤周边动脉血流呈高速低阻,RI: 0.359±0.073,而内部动脉血流呈高速高阻,RI: 0.694±0.184。

第四周,周围软组织肿块体积增长迅速,超过髓腔内肿块体积。

超声造影表现为:注射造影剂后,肿块快速增强,髓腔内肿块开始显影的平均时间为 4.5s,肿块增强达高峰的平均时间为 12s(见图 4),于平均时间 19s 开始减退,平均时间 80s 廓清。肿块的血流灌注方式:从周边向中央向心性均匀性增强,减退时为从中央向周边离心性均匀性减退,呈快进快退方式。造影后测得肿瘤上下径: 17.614±0.955 mm,肿瘤的前后径: 10.414±1.142 mm。

2.2.2 磁共振影像表现

肿瘤在 T1WI 上呈等信号, T2WI 稍高于骨髓信号, T1 增强扫描显示骨肿瘤强化不均匀,实性部分强化,中心坏死部分不强化(见图 5)。肿瘤后第 7 天可观察到病侧胫骨髓腔内正常骨髓信号缺失,代

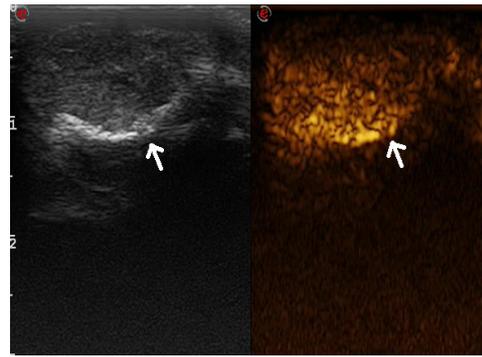


图 4 胫骨 VX2 肿瘤行超声造影

Fig.4 Sonography in VX2 tibial tumor

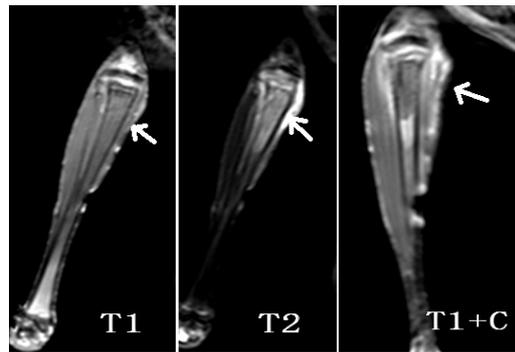


图 5 兔胫骨 VX2 骨肿瘤磁共振表现

Fig.5 MRI features of VX2 bone tumor in rabbit's tibia

之 T1WI 为等信号, T2WI 上为低信号的类圆形肿块,增强扫描肿块有较均匀强化,而周围骨皮质连续完整,无明显受累征象。第 21、28 天骨皮质低信号不均匀,骨皮质外软组织内可见与髓腔肿块同样信号的肿块, T1 增强上髓腔内肿块边缘及周围软组织肿块强化,髓腔肿块中心坏死区域无明显强化。

2.3 病理学检查

HE 染色切片,低倍镜(40×)下,肿瘤组织内骨髓组织正常结构破坏,代之以大量肿瘤细胞,生长旺盛,核大而深染,异型性明显,瘤体中可见少量自发性坏死,多为极小的岛屿状,未见大片状坏死(见图 6)。镜下见转移灶内肿瘤细胞形态与胫骨原灶肿瘤细胞形态特征相同(见图 7)。

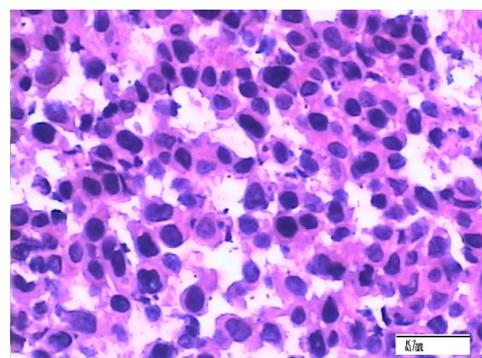


图 6 胫骨 VX2 肿瘤病理切片(HE X 40)

Fig.6 Pathological section of VX2 tibial tumor

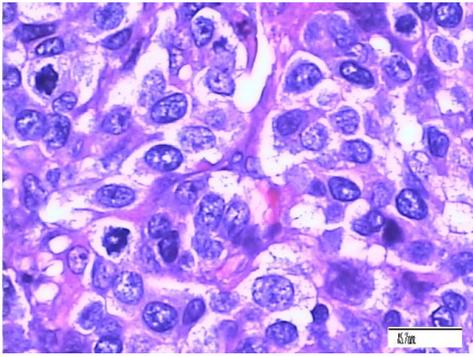


图 7 肺 VX2 转移瘤病理切片(HE X 40)

Fig.7 Pathological section of VX2 pulmonary tumor

3 讨论

3.1 骨肿瘤模型的建立及其生物学特性

自 1976 年 Galasko 和 Bennett 用 VX2 来制作兔骨肿瘤模型以来, 该模型就被认为是比较成功且适用于影像学观察的动物模型。它实际上是一种非骨源性的同种异体移植模型, 兔 VX2 肿瘤株建于第一次世界大战前, 此肿瘤为 SHOPE 病毒诱发的乳头状瘤经数十代传代培养后建立起来的可移植皮肤鳞癌。VX2 属高度恶性肿瘤细胞系, 具有易于移植、生长迅速和侵袭性强的特点^[4,5], 其形态学和生物学特性与人类癌瘤相似。

本实验制作的动物模型具有以下特点: (1) 体型较大, 比鼠类骨肿瘤模型更利于影像学观察及 HIFU 治疗; (2) 制作方法简单, 周期短; (3) 移植成功率高, 肿瘤生物学特性稳定, 较早发生肺转移, 虽为移植性肿瘤, 但与人体原发恶性骨肿瘤的生物学行为非常接近^[6]。研究其影像学特点, 对于骨恶性肿瘤的早期诊断有着重要的意义, 为其后的 HIFU 治疗及其疗效的影像学随访提供理想的动物模型。

3.2 骨肿瘤模型的超声影像学特点

3.2.1 VX2 骨肿瘤模型的超声影像学特点

VX2 瘤细胞对胫骨的破坏, 可由髓腔内逐渐向周围浸润, 远处转移。在超声影像上, 骨肿瘤的形态特征可概括为: (1) 骨髓内肿瘤, 病灶为不均匀实质性回声; 肿瘤内部有瘤骨强回声团块与未成骨的肿瘤组织低回声相间存在, 以低回声为主; (2) 骨质破坏, 表现为病变骨表面粗糙不光滑, 回声增强, 连续性中断, 不同程度的骨缺损, 导致骨表面凹凸不平呈虫蚀状; (3) 骨膜反应, 肿瘤区骨膜抬起并有楔形增厚, 形成三角形结构, 与放射影像学描述

的 Codman 三角一致; (4) 骨质破坏区周围的软组织肿块, 肿瘤破坏骨质侵犯软组织时, 多表现为软组织内出现低回声肿块。

3.2.2 超声监测能够确定 HIFU 治疗骨肿瘤的适宜时间

本实验主要通过超声监测肿瘤生物学特性以确定 HIFU 治疗骨肿瘤的最佳时间。实验发现, 肿块植入髓腔早期, 病灶局限于髓腔内且体积不断增大, 而骨皮质及骨膜未被侵犯浸润, 最早于第 10 天发现病灶处骨膜反应, 第 2 周开始发现骨膜反应异常明显且骨皮质有不规则破坏及缺损区, 第 3 周骨皮质破坏区域增大, 周围软组织肿块形成, 第 4 周周围软组织肿块体积增大迅速, 超过髓腔内原病灶体积。

根据以上特征, 认为 HIFU 治疗肿瘤理想时间为骨肿瘤种植后 3 周左右, 原因如下: (1) 骨皮质有一定程度的破坏, 超声能量能够透过破损的骨皮质进入髓腔内, 使髓腔内的肿瘤组织受到 HIFU 的能量辐射; (2) 超声造影后所测得的髓内肿瘤大小亦适合进行 HIFU 治疗; (3) 除肺组织外其余脏器未发现有远处转移。

3.2.3 超声监测的优势

影像学检查观察骨肿瘤的常用方法有 MRI、核素显像、CT 及超声等检查方法, 其中磁共振被认为是显示骨肿瘤结构改变最佳的影像学检查^[7], 在显示髓腔内肿瘤及软组织内肿瘤范围大小方面具有很好的优势^[8]。本实验中的增强 T1 加权像可以显示病灶内部的缺血坏死等变化。相比磁共振检查, 超声在检查骨肿瘤方面亦有其优势, 可做实时多切面扫查, 当肿瘤区骨皮质破坏后可观察肿瘤内部结构改变(包括出血、液化、肿瘤新生骨等), 而且超声检查方便, 费用成本低廉, 其中的 CDFI 和超声造影技术在显示肿瘤血管方面发挥了重要的作用。

肿瘤组织的生长需要丰富的血供, 血管再生是肿瘤生长、转移的重要条件^[9,10]。肿瘤移植胫骨后 10 天, 在磁共振尚不能发现骨皮质的形态学变化时, 运用 CDFI 技术对肿瘤内及其周围血流情况进行观察, CDFI 已经可以显示肿瘤区骨膜处血流较正常骨膜处血流丰富, 呈细条状分布, 表明肿瘤开始侵犯骨膜, 刺激周边的新生血管的形成。以上证实 CDFI 对肿瘤引起的早期骨膜反应的敏感性高, 优于 MRI。植瘤二周后 CDFI 还可以显示髓内肿瘤及软组织内肿瘤内部的丰富血流, 呈树枝状分布, 即使中心有溶骨性改变亦可显示肿瘤血管。

4 小结

超声可监测 VX2 骨肿瘤生长情况,通过 CDFI 技术及超声造影可显示肿瘤血供,对兔 VX2 骨肿瘤模型进行连续超声观察后,认为 HIFU 治疗肿瘤最佳时间为植瘤后 3 周左右。

参 考 文 献

- [1] Rafiq A, Robert G. Surgical modalities in the treatment of bone sarcoma in children[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2010, **36**(4): 342-347.
- [2] Steven A L, Michael J J. Bone sarcomas: Overview of management, with a focus on surgical treatment considerations[J]. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2010, **77**(1): 8-12.
- [3] Hwang J H, Crum L A. Current status of clinical high-intensity focused ultrasound[C]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009: 130-133.
- [4] Kelly A K, Naglaa E A, Alia S, et al. Development of a Rabbit Pleural Cancer Model by Using VX2 Tumors[J]. *Comparative Medicine*, 2008, **58**(3): 287-293.
- [5] 孙诚, 柳霞, 黄鹤, 等. 兔 VX2 肿瘤模型的建立及其在影像研究中的应用[J]. *中国医学影像学杂志*, 2003, **11**(3): 212-214.
- [6] SUN Cheng, LIU Xia, HUANG He, et al. Establishment of transplantable malignant bone tumor model and application of its image study in rabbit[J]. *Chinese Journal of Medical Imaging*, 2003, **11**(3): 212-214.
- [6] 吴蓉, 胡兵, 姜立新, 等. VX2 骨肿瘤模型的超声造影和磁共振初步观察[J]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2008, **15**(3): 392-398.
- [6] WU Rong, HU Bing, JIANG Li-xin, et al. Observation of contrast enhanced sonography MRI in experimental rabbit model with VX2 bone tumor[J]. *Chinese Journal of Medical Ultrasound (Electronic Edition)*, 2008, **15**(3): 392-398.
- [7] Jung A C, Eun Y K, Han K K, et al. Evolution of VX2 carcinoma in rabbit tibia:magnetic resonance imaging with pathologic correlation. [J]. *Clinical Imaging*, 2008, **32**(2): 128-135.
- [8] Hakan I, Jean S, William N, et al. Clinical presentation and imaging of bone and soft-tissue sarcomas[J]. *Cleveland Clinic Journal Of Medicine*, 2010, **77**(1): 2-7.
- [9] Abdelrahim M, Konduri S, Basha R, et al. Angiogenesis: an update and potential drug approaches (review)[J]. *Int J Oncol*, 2010, **36**(1): 5-18.
- [10] 关利铭, 王智彪, 伍烽. 高强度超声对肿瘤营养血管的作用[J]. *中国超声医学杂志*, 2000, **16**(5): 388-389.
- [10] GUAN Liming, WANG Zhibiao, WU Feng. A review of the function of high intensity focused ultrasound for tumor vessels[J]. *Chinese Journal of Ultrasound in Medicine*, 2000, **16**(5): 388-389.