

一种建立骨肿瘤肺转移模型的方法研究

白磊鹏 吕家兴 李哲宏 孔令伟 曹海营 金 宇

摘 要 **目的** 探讨经胫骨种植 VX2 瘤组织建立兔肺转移瘤模型的肿瘤转移特点及在基础研究中的应用价值。**方法** 30 只日本大耳白兔,每只家兔均在左侧胫骨植入 VX2 肿瘤组织块,制成 VX2 骨肿瘤模型。模型制备后,每周处死 15 只家兔,行大体解剖,观察肿瘤在肺部转移情况,并将肺组织行固定、包埋后制成切片,经 HE 染色后观察其镜下表现。**结果** 30 只家兔均在肺部发生肿瘤转移,成模率 100%。大体解剖,第 1 周解剖见肺组织中多发肿瘤结节,主要分布在肺脏边缘,从肺边缘向肺门逐渐减少;第 2 周肿瘤结节布满全肺,结节明显多于第 1 周。HE 染色镜检,肿瘤细胞在肺脏中聚集成巢,结节中心为坏死细胞,周围为核大深染的肿瘤细胞和炎性细胞,肿瘤细胞与正常肺组织间边界不清晰。**结论** 经胫骨种植 VX2 瘤组织建立兔 VX2 恶性骨肿瘤肺转移模型,是一种操作简便、肿瘤生长迅速、可以在基础研究中推广使用的建模方法。

关键词 VX2 肿瘤 肺转移 动物模型 病理

中图分类号 R738.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.023

A Method of Establishing Lung Metastasis Model of Bone Tumor. Bai Leipeng, Lu Jiaxing, Li Zhehong, et al. Orthopedic Trauma Department, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei 067000, China

Abstract **Objective** To investigate the characteristics of tumor metastasis and its application value in basic research of rabbit lung metastatic tumor model established by implanting VX2 tumor tissue through tibia. **Methods** In 30 Japanese white rabbits, each rabbit was implanted with VX2 tumor tissue in the left tibia to make the model of VX2 bone tumor. After the preparation of the model, 15 rabbits were killed every week and gross dissection was performed to observe the metastasis of the tumor in the lung. The lung tissue was fixed and embedded into sections, and the microscopic manifestation was observed after HE staining. **Results** All 30 rabbits had tumor metastasis in the lung, and the modeling rate was 100%. Gross anatomy, multiple tumor nodules were found in the lung tissue in the first week, mainly distributed at the edge of the lung, gradually decreased from the lung edge to the hilum. In the second week, the tumor nodules covered the whole lung, and the nodules were significantly more than those in the first week. Microscopic examination of HE staining showed that tumor cells gathered to form nests in the lung, with necrotic cells in the center of the nodule, surrounded by large and deep stained tumor cells and inflammatory cells, and the boundary between tumor cells and normal lung tissue was not clear. **Conclusion** The establishment of rabbit lung metastasis model of VX2 malignant bone tumor by implanting VX2 tumor tissue through tibia is a modeling method with simple operation and rapid tumor growth, and can be widely used in basic research.

Key words VX2 tumor; Lung Metastasis; Animal model; Pathology

骨与软组织肉瘤均来源于间叶组织,其转移方式几乎都是血道扩散,肺因为双重血供的特殊解剖结构,是骨与软组织肉瘤早期转移的好发部位^[1,2]。恶性骨肿瘤肺转移率高达 1%~9%,高度恶性的骨原发性肉瘤患者在确诊时 15%~20% 肺部有微小转移病灶^[3,4]。临床中对于骨与软组织肉瘤的治疗,尤其是出现肺转移的患者,需要多学科联合治疗,延长生存时间,但此类患者的预后都较差^[5]。由于骨与软

组织肉瘤发生肺转移的患者病情十分复杂,涉及多个系统,在基础实验中缺乏理想的骨肿瘤肺转移动物模型,导致骨肿瘤肺转移的相关研究较少见。因此,建立一种稳定的恶性骨肿瘤的肺转移动物模型对于研究其发生机制、生物学特性、治疗方法等具有十分重要的意义。

目前,骨肿瘤常用的动物模型有小鼠模型、裸鼠模型等,而大型哺乳类动物模型常用兔 VX2 骨肿瘤模型^[6-8]。理想的恶性骨肿瘤的肺转移模型应与人类的肺转移发生的机制相同或接近,在局部浸润、转移方式等方面具有代表性,且对于肺部的观察简便易行。VX2 肿瘤细胞是由 Shope 病毒诱导的人乳头瘤来源的鳞状细胞癌,经过 72 代移植后形成^[9]。大量

基金项目:河北省重大医学科研基金资助项目(zd2013048);河北省科技厅指令性项目(14277790D)

作者单位:067000 承德医学院附属医院创伤骨科

通讯作者:金宇,电子信箱:603008749@qq.com

研究表明,兔 VX2 肝肿瘤生长迅速,可以接种到肺、肝、肌肉或骨骼^[10]。VX2 兔骨肿瘤模型具有人类恶性骨肿瘤类似生物学特性,可用于模拟人骨肿瘤的增殖和转移过程^[11]。因此,本研究选择在制作兔 VX2 骨肿瘤动物模型的基础上,探究一种建立骨肿瘤肺转移的动物模型的方法,以精准地体现骨肿瘤肺转移的发生、发展过程,可以更好地了解其生物学特性,为今后的相关研究提供参考。

材料与方法

1. 动物和瘤株:普通级日本大耳白兔 31 只,雌雄不限,月龄 2.5 个月,体质量 2.0 ~ 2.5 kg。购自北京市昌扬西山养殖场,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0007。所有实验兔喂养环境温度为 25℃,湿度为 50%。维持 12/12h 的光/暗周期,室内通风良好,食物和水的获取受到限制(每天 2 次)。VX2 肿瘤细胞株购自重庆蒙博生物科技有限公司,实验地点为承德医学院附属医院中心实验室。本研究遵循承德医学院实验动物保护和使用要求,遵循医学伦理学要求。

2. VX2 肿瘤组织块的制备:在常温常压环境中,由两名实验员将 VX2 肿瘤细胞组织植入 1 只日本大耳白兔左大腿肌肉处。3 周后,肿瘤生长至 3 cm × 3 cm × 3 cm 肿块。经耳缘静脉注射 1% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,以免角膜反射消失为麻醉成功标志。去除肿瘤区兔毛,俯卧位固定于动物实验操作台上,碘伏消毒术区,铺盖无菌孔巾,切开皮肤,分离皮下组织、肿瘤。将肿瘤完整取出后移至无菌工作台上,置于 37℃ 的 PBS 中清洗 3 遍,去除肿瘤中血迹、坏死组织和纤维组织,眼科剪将肿瘤剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块,置于含 10% 的胎牛血清中,常温常压下临时存放备用。

3. VX2 骨肿瘤模型的制作:30 只日本大耳白兔术前 4 h 禁食水,经耳缘静脉注射 1% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,后肢备皮仰卧位固定于操作台上,碘伏消毒 3 遍后铺无菌孔单。选取左侧膝关节内侧皮肤做一 1 cm 长切口,逐层切开皮下组织和筋膜,暴露髌韧带,纵行钝性分离髌韧带,显露胫骨平台,在胫骨平台面用 1 mm 克氏针钻孔,用顶棒将体积为 1 mm³ 的 VX2 肿瘤组织块沿套管推入胫骨髓腔内,拔出套管,骨蜡封堵骨孔,无水乙醇冲洗骨孔周围组织 3 遍,每次保留无水乙醇浸泡 1 min 以上,两侧髌韧带缝合重建后,逐层缝合切口,模型制作完成。缝合后连续 3 天大腿肌内注射青链霉素混悬液预防感染,模型制

作完成。以上操作于中心实验室动物实验间完成,实验间设备及环境由专业人员定时清理消毒。

4. 局部转移和肺转移的观察:在建模完成后,每周对左侧胫骨进行 1 次 X 线检查,连续 2 周。由高年资骨肿瘤临床医生做出评估,肿瘤生长速度,骨皮质破坏及局部转移显影情况与临床患者表现差异。第 1 周随机选取 15 只家兔 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后经耳缘静脉空气栓塞处死,解剖获取肺脏大体病理标本,由病理科医生进行固定、包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色。镜下观察 VX2 肿瘤在肺组织中表现与周围正常组织的关系。第 2 周同样方法处死剩余家兔后取材后经 HE 染色镜检。取材操作于中心实验室动物实验间完成,HE 染色及镜检由医院病理科医生于病理实验室完成。

结 果

30 只家兔肺中均出现肿瘤组织,建模成功率 100%。30 只家兔第 1 周胫骨 X 线显示肿瘤在髓内生长迅速,出现骨膜反应;第 2 周 3 只家兔肿瘤浸润至骨外。大体解剖可见,第 1 周,15 只家兔全部可在肺部见多发肿瘤结节,主要分布在肺部边缘处,从肺边缘向肺门逐渐减少;第 2 周,15 只家兔全部肺部布满肿瘤结节,明显多于第 1 周。HE 染色镜下,肿瘤细胞在肺脏中聚集成巢,结节中心为坏死细胞,周围为核大深染的肿瘤细胞和炎性细胞,肿瘤细胞与正常肺组织间边界不清晰(图 1)。

讨 论

骨与软组织肉瘤是来源于骨骼、肌肉、脂肪、血管及纤维结缔组织等间叶组织的恶性肿瘤,肺是骨与软组织肉瘤最常见的转移部位^[12, 13]。骨与软组织肉瘤早期几乎全部经血源性扩散转移到肺部。据相关报道,15% ~ 20% 的骨与软组织肉瘤患者会发生远处转移,其中肺转移者可达 90%^[14, 15]。发生肺转移的恶性骨肿瘤患者的预后极差,这种结果一方面是由于恶性肿瘤复杂的生物学特性引起的,另一方面显示了目前对于恶性骨肿瘤的远处转移的研究不足^[16]。

目前,临床中治疗骨与软组织肉瘤肺转移的方法主要有外科手术切除、局部消融、放疗、化疗、分子靶向治疗以及最新兴起的免疫治疗等^[17]。这些治疗大多具有良好的近期效果,但是远期疗效尚未有明显的改善。因此,建立符合人类骨与软组织肉瘤肺转移的动物模型可以精准地体现肿瘤在病患体内的发生、发展过程,可以更好地了解肿瘤肺转移的生物学特性,对于制定个体化治疗方案及肿瘤肺转移的基础和临

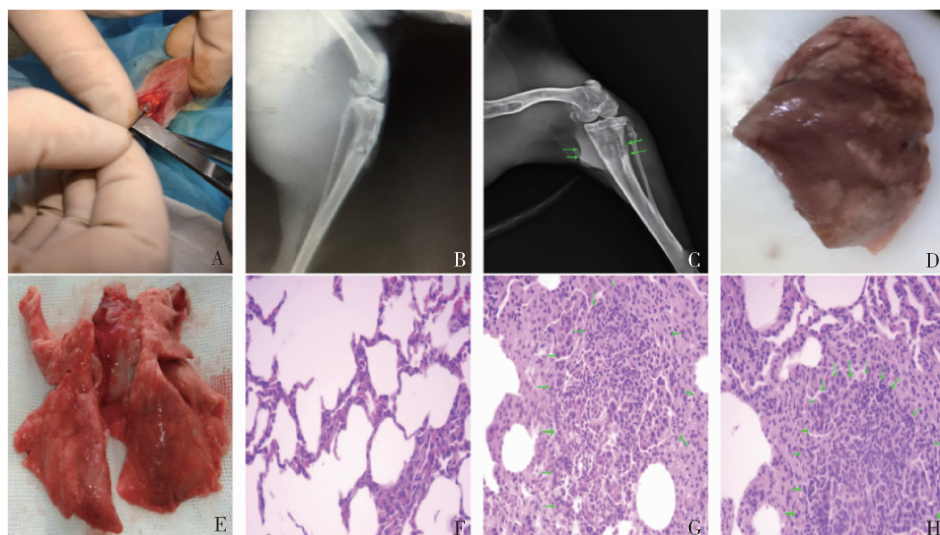


图1 骨肿瘤肺转移模型的制作和检测

A. 经胫骨种植 VX2 肿瘤; B. 第 1 周 X 线示肿瘤在髓腔内生长, 破坏骨皮质; C. 第 2 周 X 线示肿瘤浸润至骨外; D. 第 1 周, 肺转移结节分布从肺边缘至肺门逐渐减少; E. 第 2 周, P 肺转移结节布满全肺; F. 镜下正常肺组织 (HE, $\times 40$); G. 第 1 周肺组织肿瘤结节 (HE, $\times 40$); H. 第 2 周肺组织肿瘤结节 (HE, $\times 40$)

床研究具有重要意义。理想的骨与软组织肉瘤肺转移模型, 应与人类的肺转移过程具有相同或相近的生物学行为, 在局部扩散、远处转移、肺部浸润等方面提供临床研究价值。研究表明, 兔 VX2 肿瘤生长迅速, 可以接种至骨骼制成恶性骨肿瘤动物模型。同时, VX2 肿瘤细胞转移到肺部后可以早期产生淋巴结转移^[11, 18]。这表明 VX2 兔骨肿瘤模型具有相关生物学特性, 可用于模拟人转移性骨肿瘤。

兔胫骨 VX2 骨肿瘤肺转移动物模型的优点: ①操作简便, 时间短; ②创伤小; ③肺部无损伤; ④自发转移过程符合肿瘤特性; ⑤成模率高。以往的肺部植瘤模型, 需要根据肺部解剖对植瘤部位和方式进行严密操作, 植瘤术后并发症高, 易造成动物死亡。而兔胫骨 VX2 骨肿瘤肺转移模型不需要对肺部进行操作, 只需在胫骨植入肿瘤, 随着肿瘤的自发转移过程, 1 周即可获得肺转移瘤模型, 其操作步骤十分简单, 手术创伤也仅在胫骨植瘤部位留下 1cm 左右的切口, 手术不会对肺部造成损伤。肿瘤肺转移的过程是肿瘤生物学特性的表现, 避免了肺部植瘤的手术干扰因素。更小的创伤使得动物更易耐受手术操作, 降低了动物的死亡率, 因此成模率极高, 本实验中, 30 只家兔全部建模成功, 已证明了这一点。对植瘤的胫骨 X 线检查发现, 在第 1 周时, 肿瘤在髓腔内迅速生长, 并且出现骨膜反应; 第 2 周时, 部分家兔胫骨中肿瘤已浸润至骨外, 扩散到周围软组织中。通过大体解剖

发现, 在第 1 周时, 尽管肿瘤还在髓腔内生长, 但是肺部已经出现肺缘分布的肿瘤结节, 而第 2 周时, 肿瘤基本上布满全肺。病理切片镜下观察, 可见肺组织中成团落聚集的肿瘤结节, HE 染色中心区域为坏死细胞, 呈嗜碱性红染, 外周表现为浓染的肿瘤细胞、结缔组织和炎性细胞, 这与以往研究中的 VX2 肿瘤细胞的镜下表现相同^[19]。

总结本方法建模的经验: ①简化操作, 减小创伤, 可以极大提高动物植瘤后的成活率; ②通过向胫骨内植入较大的肿瘤组织块, 可以加速肿瘤生长, 更快获得肺转移模型; ③通过胫骨植瘤的肺转移模型, 可以避免种植瘤的局部浸润影响对远处转移的观察; ④肿瘤的远处转移是一个动态的过程, 该生物学行为在植瘤后第 1 周内即可发生。

综上所述, 本研究采用经胫骨移植 VX2 肿瘤组织块, 建立兔胫骨骨肿瘤模型, 肿瘤在胫骨髓腔内生长至一定程度后发生远处转移, 形成肺转移瘤模型, 该方法避免了肺部的损伤, 保留了肺部的完整结构, 且获得的病理标本均为多发的肺肿瘤结节, 这与临床中肺转移瘤的特性相同, 可以较为真实地研究恶性骨肿瘤肺转移的生物学行为^[20]。该模型制作方法简单, 成功率高, 在构建途径、生长方式和病理上均接近于人类恶性骨肿瘤肺转移过程, 能全面表现肿瘤浸润、转移全过程, 值得在基础研究中推广。

本研究的不足之处在于缺乏肺部完整的影像学

资料。VX2 肿瘤细胞虽然是基础研究较为成熟的造模瘤株,但恶性骨肿瘤多为间叶组织来源,而 VX2 肿瘤细胞是鳞状细胞癌,其生物学特性与恶性骨肿瘤比较,仍存在许多差异,因此本研究仅对制作骨肿瘤肺转移模型的方法具有一定的参考价值,而对于恶性骨肿瘤的肺转移参考价值有限。

参考文献

- 1 Global BC, Fitzmaurice C, Abate D, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability – adjusted life – years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(12): 1749 – 1768
- 2 Lin J, Wu Y, Shi Y, *et al.* Survival and prognosis in malignant giant cell tumor of bone: a population – based analysis from 1984 to 2013 [J]. J Bone Oncol, 2019, 19: 100260
- 3 Rosario M, Kim HS, Yun JY, *et al.* Surveillance for lung metastasis from giant cell tumor of bone [J]. J Surg Oncol, 2017, 116(7): 907 – 913
- 4 李浩江,陈茂强,王振勇,等. 利用生物信息学分析鉴定原位骨肉瘤以及肺转移的信号通路和核心基因[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(1): 4 – 13
- 5 Singla A, Geller DS. Musculoskeletal tumors[J]. Pediatr Clin North Am, 2020, 67(1): 227 – 245
- 6 Wang T, Li L, Qin W, *et al.* Early urine proteome changes in an implanted bone cancer rat model[J]. Bone Rep, 2020, 12: 100238
- 7 Sun Y, Xiong X, Pandya D, *et al.* Enhancing tissue permeability with MRI guided preclinical focused ultrasound system in rabbit muscle: from normal tissue to VX2 tumor [J]. J Controlled Release, 2017, 256: 1 – 8
- 8 赵景新,张猛. 建立兔胫骨 VX2 骨肿瘤模型的方法[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(23): 3702 – 3707
- 9 Georges E, Breitburd F, Jibard N, *et al.* Two Shope papillomavirus – associated VX2 carcinoma cell lines with different levels of keratinocyte differentiation and transplantability[J]. J Virol, 1985, 55(1):

246 – 250

- 10 Melancon MP, Appleton FT, Fuentes DT, *et al.* Development of an electroporation and nanoparticle – based therapeutic platform for bone metastases[J]. Radiology, 2018, 286(1): 149 – 157
- 11 Zhang W, Tao H, Zeng J, *et al.* Laparotomy cryoablation in rabbit VX2 pancreatic carcinoma[J]. Pancreas, 2017, 46(3): 288 – 295
- 12 Hamaji M, Chen F, Miyamoto E, *et al.* Surgical and non – surgical management of repeat pulmonary metastasis from sarcoma following first pulmonary metastasectomy [J]. Surg Today, 2016, 46(11): 1296 – 1300
- 13 Falk AT, Moureau – Zabotto L, Ouali M, *et al.* Effect on survival of local ablative treatment of metastases from sarcomas: a study of the French sarcoma group[J]. Clin Oncol Royal College Radiol: Great Britain, 2015, 27(1): 48 – 55
- 14 Yasuda N, Takenaka S, Nakai S, *et al.* TAS – 115 inhibits PDGFRalpha/AXL/FLT – 3 signaling and suppresses lung metastasis of osteosarcoma[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(5): 767 – 779
- 15 Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, *et al.* Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 3029 – 3035
- 16 杨孝清,鲍其远,朱良纲,等. 骨与软组织肉瘤肺转移手术治疗的疗效及其影响因素分析[J]. 中国骨与关节杂志, 2019, 8(9): 676 – 680
- 17 Wedekind MF, Wagner LM, Cripe TP. Immunotherapy for osteosarcoma: where do we go from here? [J]. Pediatr Blood Cancer, 2018, 65(9): e27227
- 18 Gregor A, Fujino K, Bernards N, *et al.* Rabbit VX2 lung tumor models can form early nodal metastases[J]. World J Surg Oncol, 2019, 17(1): 231
- 19 吴勇超,李智岗,史博,等. 经脾种植 VX2 瘤株悬液建立兔肝转移瘤模型[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28(9): 861 – 864
- 20 吴振刚. 肺部转移瘤的发生情况及多层螺旋 CT 诊断价值[J]. 系统医学, 2020, 5(2): 95 – 97

(收稿日期: 2020 – 05 – 26)

(修回日期: 2020 – 05 – 29)

(接第 160 页)

- 14 Lew JK, Pearson JT, Schwenke DO, *et al.* Exercise mediated protection of diabetic heart through modulation of microRNA mediated molecular pathways[J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1): 10
- 15 Sultana MR, Bagul PK, Katare PB, *et al.* Garlic activates SIRT – 3 to prevent cardiac oxidativestress and mitochondrial dysfunction in diabetes[J]. Life Sci, 2016, 164(1): 42 – 51
- 16 Wu Y, Xia ZY, Zhao B, *et al.* (–) – Epigallocatech – in – 3 – gallate attenuates myocardial injury induced by ischemia/reperfusion in diabetic rats and in H9c2 cells under hyperglycemic conditions[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(2): 389 – 399
- 17 苏丽清,喻嵘,吴勇军,等. 糖尿病心肌病从“久病入络”论治探讨[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(8): 838 – 841
- 18 朱宇溪,周慢,赵兴旺,等. 糖尿病心肌病的中医治疗进展[J]. 四川中医, 2017, 35(5): 218 – 220
- 19 吴伟,张玲莉,邹军. 中药多糖及运动抗氧化作用对糖尿病防

治的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2591 – 2599

- 20 张倩,梁晓春. 黄连抗氧化作用与糖尿病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2285 – 2288
- 21 范颖,李新. 黄芪部分有效部位对糖尿病模型大鼠氧化应激的影响及其交互关系[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(11): 3432 – 3436
- 22 Tao SL, Chen LY, Song JM, *et al.* Tanshinone IIA – ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting Grp78 and CHOP expression in STZ – induced diabetes rats [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 729 – 734
- 23 侯莉,毛冠群,瞿韦. 麦味地黄丸治疗老年糖尿病的临床疗效及分子机制研究[J]. 中药材, 2019, 42(2): 435 – 438
- 24 杜安业,张培影,左文标. 黄芪保心汤治疗糖尿病心肌病的临床观察及相关机制研究[J]. 中药材, 2018, 41(8): 2007 – 2010

(收稿日期: 2020 – 04 – 11)

(修回日期: 2020 – 05 – 17)