

Establishing subcutaneous tumor bearing nude mice model: Comparison of three different methods and MR imaging

HONG Guo-bin^{1,2}, LIANG Bi-ling^{1*}, SHEN Jun¹, HUANG Wen-ge³

(1. Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Radiology, the Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China;

3. Experimental Animal Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective** To compare the success rate, time of tumor formation and number of tumors in three methods of tumor transplantation, in order to seek an ideal animal model for molecular imaging study. **Methods** Forty-eight BALB/C-nu/nu nude mice were randomly divided into three groups (each $n = 16$). Tumor tissue mass of 2 mm^3 was injected into subcutaneous of nude mice in experiment group. Tumor tissue mass of 1 mm^3 was applied in control group 1. Tumor cells suspension liquid was injected into subcutaneous of nude mice in control group 2. The tumor formation rate, the time of tumor formation and the number of tumors were observed. MRI scanning were performed 3—6 weeks after implantation. **Results** The rate of tumor formation of three groups was 93.75%, 75.00% and 43.75%, respectively. The time of tumor formation was (21.7 ± 2.4) , (29.8 ± 2.9) and (34.6 ± 3.9) days, respectively. The rate of solitary nodule implanted tumor was 93.33% in experiment group, higher than that in control group 1 (75.00%) and control group 2 (14.29%). The tumors were hypointense on T1WI and hyperintense on T2WI. **Conclusion** Transplantation 2 mm^3 tumor tissue mass is effective to set up the subcutaneous implanted tumor models with a high success rate of tumor formation, a short time of tumor formation and high rate of solitary tumors, being suitable for the study of molecular imaging. The models can undertake conventional T1WI, T2WI and T2-mapping imaging, and the imaging qualities are good.

[Key words] Liver neoplasms; Models, animal; Magnetic resonance imaging

制备裸鼠皮下移植瘤动物模型：3种 建模方法及 MR 成像比较

洪国斌^{1,2}, 梁碧玲^{1*}, 沈君¹, 黄文革³

(1. 中山大学附属第二医院放射科, 广东 广州 510120; 2. 中山大学附属第五医院放射科,

广东 珠海 519000; 3. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080)

[摘要] **目的** 通过比较 3 种人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型建模方法, 探索适于分子影像学研究的裸鼠移植瘤建模方法。 **方法** 48 只 BALB/C-nu/nu 裸小鼠随机分成 3 组, 每组 16 只。对实验组采用 2 mm^3 大小的瘤组织块建模, 对照组 1 采用 1 mm^3 大小的瘤组织块建模, 对照组 2 采用瘤细胞悬液法进行建模, 分别观察成瘤率、成瘤时间和成瘤数目。接种后 3~6 周进行常规 MR 扫描及 T2-mapping 成像。 **结果** 实验组、对照组 1、对照组 2 的成瘤率分别为 93.75%、75.00%、43.75%, 实验组与对照组 2 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组、对照组 1、对照组 2 的肿瘤体积达 1 cm^3 的时间分别为 (21.7 ± 2.4) 天、 (29.8 ± 2.9) 天、 (34.6 ± 3.9) 天, 组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 组形成单发肿瘤的比例分别为 93.33%、75.00%、14.29%, 实验组与对照组 2 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。常规 T1WI 和 T2WI 均能清晰显示肿瘤、肝脏、脾脏和脑组织等主要脏器, 肿瘤在 T1WI 上呈等、稍低信号, 在 T2WI 上呈高信号。利用多回波自旋回波序列 (MSE) 可测量肿瘤组织的 T2 弛豫时间, 将 T2-mapping 成像数据输入工作站可获得 T2-mapping 伪彩图。 **结论** 采用体积约 2 mm^3 的改良瘤组织块法制作人肝癌移植瘤动物模型成瘤率高, 成瘤时间短且较易形成单发肿瘤, 可进行常规 MR 成像和 T2-map-

[基金项目] 国家自然科学基金 (30900357)、广东省医学科研基金 (B2009092)、中山大学医科青年教师科研启动基金 (2008010)、广东省珠海市卫生局医学科研基金 (2009055)。

[作者简介] 洪国斌 (1975—), 男, 湖北黄冈人, 博士, 主治医师。研究方向: 骨关节影像诊断学和分子影像学。E-mail: honggb2003@163.com

[通讯作者] 梁碧玲, 中山大学附属第二医院放射科, 510120。E-mail: liangbl@163.net

[收稿日期] 2009-07-20 **[修回日期]** 2009-10-21

ping 成像,是一种适用于分子影像学成像研究的建模方法。

[关键词] 肝肿瘤;模型,动物;磁共振成像

[中图分类号] R-332; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2010)02-0205-04

目前裸鼠移植瘤模型已广泛应用于体外培养细胞株的鉴定、在体肿瘤生物学行为的研究等方面^[1]。肿瘤分子影像学的迅猛发展迫切需要简便快速、成瘤时间短和稳定性好的动物模型制作方法,并以此作为研究平台进行后续研究^[2-3]。本研究通过比较 3 种人肝癌裸鼠皮下移植瘤建模方法的成瘤率、成瘤时间和成瘤数目,并进行常规 MR 成像和 T2-mapping 成像,探索适用于分子影像学研究的裸鼠移植瘤建模方法。

1 材料与与方法

1.1 实验材料 常规手术器械,磷酸盐缓冲液(PBS),4.3% 水合氯醛,人肝癌 Bel 7402 细胞株, BALB/C-nu/nu 裸小鼠,裸小鼠动物专用线圈(上海辰光医疗科技有限公司)。

1.2 细胞培养 人肝癌 Bel 7402 细胞株购自中山大学实验动物中心细胞库,培养条件采用含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 小牛血清(四季青公司)、100 U/ml 青霉素钠、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司),在 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的条件下连续培养及传代。所用细胞悬液经台盼蓝染色鉴定,活力均大于 95%。

1.3 种鼠的建立 将人肝癌 Bel 7402 细胞株制成 5×10^7 个/ml 细胞悬液,用带 7 号针头的注射器抽取 0.2 ml 约含 1×10^7 个活细胞的悬液,接种于裸小鼠(种鼠, BALB/C-nu/nu 裸小鼠)背部皮下,待皮下肿瘤长至约 1 cm^3 时用于模型制作的瘤源。

1.4 方法与分组 雄性 BALB/C-nu/nu 裸小鼠共 48 只(购自中山大学实验动物中心,许可证号:粤 SYXK2007-081;动物合格证号:0025614),鼠龄 4~6 周,体质量 18~24 g。随机分成 3 组:实验组、对照组 1、对照组 2,每组 16 只。实验组:先处死种鼠,在无菌条件下完整取出肿瘤,及时放入含无血清培养液的青霉素瓶,再在超净工作台内修剪肿瘤组织,去除脂肪、结缔组织及坏死肿瘤组织,并用无血清培养液洗涤 2 次,将其剪成 2 mm^3 大小的瘤组织块,加适量的 PBS 备用。以 4.3% 水合氯醛(430 mg/kg)经腹腔注射麻醉裸小鼠,常规消毒背部肩胛区,切开局部皮肤,用无菌套管针抽吸准备好的 2 mm^3 大小瘤块,将其接种于背部肩胛区皮下,建立裸鼠皮下移植瘤的人肝癌模型。对照组 1:将瘤组织块控制在 1 mm^3 大小,其余同实验组。对照组 2:将人肝癌 Bel 7402 细胞株制成 5×10^7 个/ml 细胞悬液,用带 7 号针头的注射器抽取 0.2 ml 约含 1×10^7 个活细胞的悬液,接种于裸小鼠背部肩胛区皮下。

1.5 观察指标 接种结束后,将裸小鼠送回 SPF 环境(无特定病原体饲养室)饲养,每日观察小鼠精神、饮食及排便情况,用游标卡尺分别测量肿瘤的长度(a)、宽度(b)和高度(c),按公式^[1] $V = \pi/6(a \times b \times c)$ 计算肿瘤体积(V)。分别观察三组的成瘤率、肿瘤体积长至 1 cm^3 的时间及成瘤数目等指标。

1.6 MR 成像 接种后 3~6 周、待肿瘤长至约 1 cm^3 时进行

MR 成像。采用 Philips Intera 1.5T 超导 MR 成像仪,裸鼠专用动物线圈(上海辰光医疗科技有限公司生产),成像序列包括常规 T1WI、T2WI 和 T2-mapping 成像。T2WI 采用快速自旋回波(turbo spin echo, TSE)序列,TR 2600 ms,TE 100 ms,层厚 2.0 mm,矩阵 256×256 ,FOV 120~150 mm,NEX 4。SE T1WI 扫描参数为 TR 500 ms,TE 15 ms,层厚 2.0 mm,矩阵 256×256 ,FOV 120~150 mm,NEX 2。

采用多回波自旋回波序列(multi-echo spin echo, MSE)测量肿瘤组织 T2 弛豫时间,TR 2000 ms,TE 20~160 ms,8 个均匀回波,层厚 2 mm,矩阵 256×256 ,NEX 1,利用感兴趣区技术测量获得 T2 时间^[4-6]。同时将 T2-mapping 成像数据输入工作站,获得 T2-mapping 伪彩图。

1.7 病理学检查 裸瘤模型完成 MR 成像及其他相关实验后,处死动物,完整切除肿瘤,观察其外形、色泽、数目等;将肿瘤组织固定于 10% 甲醛溶液中,常规脱水,石蜡包埋,5 μm 切片,行常规 HE 染色,光镜观察。

1.8 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件包,采用 χ^2 检验(Fisher 确切概率法)比较 3 组间的成瘤率和形成单发肿瘤百分比;采用多组独立样本的方差分析比较 3 组肿瘤体积达 1 cm^3 的时间,各组间的两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种建模方法成瘤率、成瘤时间及成瘤数目比较 实验组、对照组 1、对照组 2 成瘤率分别为 93.75%、75.00%、43.75%,实验组的成瘤率最高,与对照组 2 比较差异有统计学意义($P = 0.006$)。

实验组、对照组 1、对照组 2 肿瘤体积达 1 cm^3 的时间分别为(21.7 \pm 2.4)天、(29.8 \pm 2.9)天、(34.6 \pm 3.9)天,组间差异有统计学意义($F = 54.3, P < 0.001$)。

实验组、对照组 1、对照组 2 中形成单发瘤灶的裸小鼠分别为 14 只、9 只、1 只,形成单发瘤灶的比例分别为 93.33%、75.00% 和 14.29%;其中实验组形成单发肿瘤的比例最高,与对照组 2 比较差异有统计学意义($P = 0.001$)。

2.2 MR 成像 常规 T1WI 和 T2WI 图像均能清晰显示肿瘤、肝脏、脾脏和脑组织等主要脏器,肿瘤在 T1WI 上呈等、稍低信号, T2WI 上呈高信号(图 1)。T2-mapping 成像数据输入工作站获得的 T2-mapping 伪彩图像见图 2。

2.3 病理学检查 常规 HE 染色示肿瘤细胞核大而浓染,多数见核分裂象,间质成分少,梁索间有血窦,表明所建立的裸小鼠荷人肝癌皮下移植瘤符合人肝细胞癌特征(图 3)。

3 讨论

3.1 裸鼠移植瘤建模方法 裸小鼠是 1966 年以来发现和培育的一种小鼠突变系,先天无毛、无胸腺, T 淋巴细胞功能完

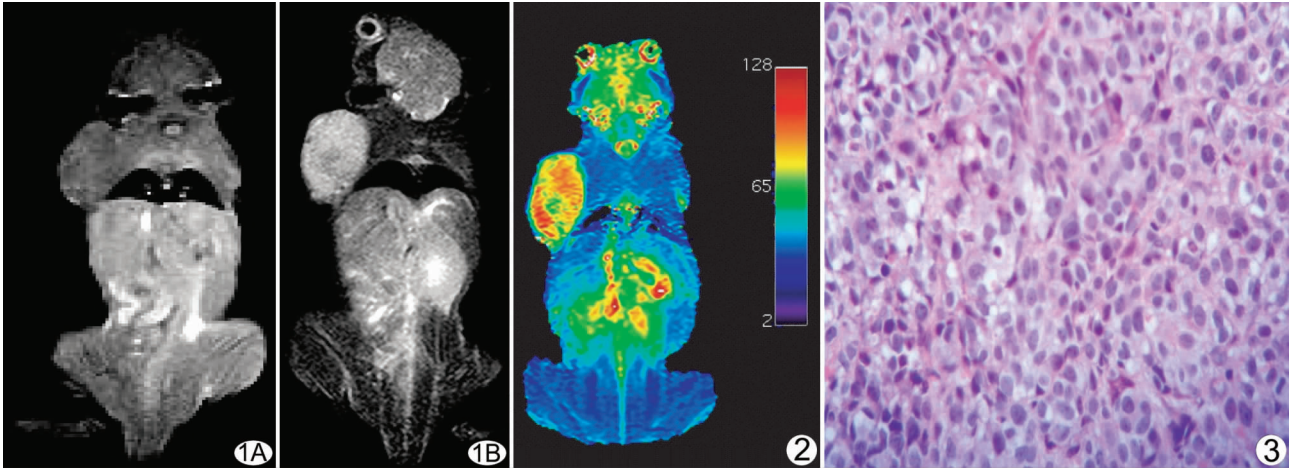


图 1 MR 成像 A. T1WI 图像, 肿瘤组织在常规 T1WI 呈等、稍低信号; B. T2WI 图像, 肿瘤组织在常规 T2WI 呈高信号 图 2 T2-mapping 伪彩图像 图 3 裸鼠荷瘤病理图, 肿瘤细胞核大而浓染, 间质成分少, 梁索间有血窦 (HE, ×400)

全缺乏, 对异种移植不产生排斥反应, 特别适用于人类肿瘤异种移植^[1]。

目前常用的裸鼠移植瘤建模方法有瘤细胞悬液法和瘤组织块法, 二者各具特点^[1]。利用细胞悬液法建模比较昂贵、费时, 成瘤率较低, 且不易形成单发孤立的肿瘤^[7]。传统瘤组织块法采用大小约 1 mm³ 的瘤组织块进行接种, 与细胞悬液法相比成本较低, 且较易形成单发肿瘤, 但成瘤时间仍然较长, 且成瘤率难以令人满意^[8]。

针对瘤细胞悬液法成瘤率较低且不易形成单发肿瘤和传统瘤组织块法成瘤时间较长的缺陷, 本研究采用改良的瘤组织块法建立裸鼠移植瘤模型, 并与瘤细胞悬液法和传统瘤组织块法进行比较, 以探索一种新的、适用于分子影像学研究的裸鼠移植瘤建模方法, 发现采用约 2 mm³ 瘤组织块法成瘤率更高, 成瘤时间更短, 且更易形成单发肿瘤, 是一种比较理想的适于分子影像学研究的裸鼠移植瘤建模方法, 值得进一步推广应用。

3.2 裸鼠移植瘤的 MRI 表现 国外进行裸鼠 MRI 研究多采用高场强 (3.0 ~ 9.4T 不等, 甚至更高) 动物 MR 专用扫描仪和裸鼠专用动物线圈, 所获图像信噪比和对比度优良^[9]; 常规 T1WI 和 T2WI 均能清晰显示肿瘤、肝脏、脾脏和脑组织等主要脏器, 肿瘤在 T1WI 上一般呈等、稍低信号, 在 T2WI 上呈高信号^[9-11]。目前国内多利用临床型 MR 设备进行 MR 分子成像研究, 应用超高场强 MR 扫描仪和动物专用线圈的研究较少^[7-8]。本组利用临床型 1.5T 的 MR 设备和国产裸鼠专用动物线圈进行肿瘤 MR 成像研究, 肿瘤在 T1WI 上一般呈等、稍低信号, 在 T2WI 上呈高信号, 所获图像信噪比和对比度较高场强动物专用 MRI 稍差, 但基本可满足目前 MR 分子成像的要求^[9]。

3.3 裸鼠移植瘤 MR 成像

3.3.1 运动伪影及其对策 运动伪影主要出现在相位编码方向上, 其强度取决于运动结构的信号强度, 且伪影的位置和数目受 TR、FOV、NEX、动物麻醉方式和剂量以及实验动物的

体重、生存状态、天气等诸多因素影响; 另外, 切换相位编码方向、施加预饱和带、增加 NEX 和采用快速成像序列等措施均可能改善运动伪影^[6]。

3.3.2 线圈 进行裸小鼠 MR 分子成像研究应尽可能采用高场强的 MR 专用机和动物专用线圈, 动物专用 MR 设备与动物专用线圈相匹配可获得高信噪比和对比度优良的图像, 常规 T1WI 和 T2WI 均能清晰显示肿瘤和肝脏、脾脏、脑组织等主要脏器, 同时还可获得高质量的小体型动物的磁共振波谱 (magnetic resonance spectroscopy, MRS)、扩散加权成像 (diffusion weighted imaging, DWI)^[9]。应用临床型 1.5T 或 3.0T MR 设备、采用裸鼠动物专用线圈进行裸鼠 MR 成像研究时, 所获图像信噪比和对比度虽较动物专用线圈差, 但常规 T1WI 和 T2WI 亦可清晰显示裸小鼠肿瘤和主要脏器, 而欲获得较高质量的 MRS、DWI 图像则存在较大困难^[11]。

3.3.3 T2-mapping 成像 MRI 的信号强度值受很多因素的影响, 直接测量图像上组织的信号强度值无任何意义, 而弛豫是组织的固有特性, 在主磁场强度固定的情况下, 组织的弛豫特性保持不变^[6]。T2-mapping 是定量测量 T2 时间的成像技术, 最早应用于骨骼肌肉的 MRI 诊断中, 对关节软骨的早期诊断和观察肌肉组织的病理生理改变具有特别重要的参考意义, 也广泛应用于肿瘤分子成像研究。目前应用最广泛的 T2-mapping 成像技术是采用 MSE 进行单层面测量, 并采用单指数衰减模型获得组织的 T2 值, 也有文献报道^[4,6] 利用 TSE 序列进行 T2 值的测量。将 T2-mapping 成像数据输入工作站可获得 T2-mapping 伪彩图像。

总之, 本实验通过比较 3 种人肝癌裸鼠皮下移植瘤动物模型建模方法和 MR 成像, 初步认为采用体积较大的、约 2 mm³ 的改良瘤组织块法所制作的人肝癌移植瘤动物模型成瘤率高、成瘤时间短且较易形成单发肿瘤, 可进行常规 MR 成像和 T2-mapping 成像, 是一种适用于分子影像学成像研究的理想建模方法。

[参考文献]

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 205-208.
- [2] Weidleder R. Molecular imaging in cancer. *Science*, 2006, 312(5777): 1168-1171.
- [3] Choi H, Choi SR, Zhou R, et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Acad Radio*, 2004, 11(9): 996-1004.
- [4] de Bazelaire CM, Duhamel GD, Rofsky NM, et al. MR imaging relaxation times of abdominal and pelvic tissues measured in vivo at 3.0T: preliminary results. *Radiology*, 2004, 230(3): 652-659.
- [5] 尚瑶, 郑卓峰, 李选. 利用快速自旋回波序列测量骨骼肌肉系统的 T2 时间. *中华放射学杂志*, 2007, 41(12): 1349-1352.
- [6] 杨正汉, 冯逢, 王霄英. 磁共振成像技术指南. 北京: 人民军医出版社, 2007: 223-226.
- [7] 李宁, 刘海生, 孙楚东, 等. 肿瘤细胞悬液注射法制作兔食管癌移植瘤模型. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(12): 707-710.
- [8] 凌瑞, 陈江浩, 姚青, 等. 免转移性乳腺癌模型: 肿瘤生长及转移. *中国癌症杂志*, 2005, 15(1): 9-11.
- [9] Khemtong C, Kessinger CW, Ren J, et al. In vivo off resonance saturation magnetic resonance imaging of alpha v beta 3-targeted superparamagnetic nanoparticles. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1651-1658.
- [10] Brockmann MA, Ulmer S, Leppert J, et al. Analysis of mouse brain using a clinical 1.5T scanner and a standard small loop surface coil. *Brain Res*, 2006, 1068(1): 138-142.
- [11] Chen F, Sun XH, De Keyser F, et al. Liver tumor model with rhabdomyosarcoma in rats: MR imaging, microangiography, and histopathologic analysis. *Radiology*, 2006, 239(2): 554-562.

本刊启用《科技期刊学术不端文献检测系统》

近年来恶劣学术不端事件时有发生,给整个学术界的声誉造成了极坏的影响。为遏制学术不正之风,有效防止、杜绝涉及本刊科研论文发表方面的学术不端行为,切实提高期刊学术质量,本刊已启用《科技期刊学术不端文献检测系统》。该系统由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社与同方知网共同研制,经新闻出版总署、科技部、全国科研诚信管理委员会等有关方面指导,具有全面性和权威性,将成为我刊把好科技期刊内容质量关的重要辅助工具和重要手段。

中国科协第六届全国委员会第四次会议学术不端行为归纳为七大类:

——抄袭剽窃他人成果。在论文、研究报告、著作等科研成果中抄袭剽窃他人的实验数据、图表分析甚至大段的文字描述。

——伪造篡改实验数据。在实验数据、图表分析中,随意编造数据或有选择性地采用数据证明自己的论点。

——随意侵占他人科研成果。利用职权在自己并无贡献的论文或成果上署名,把他人科研成果据为己有;将通过会议、评审等过程获得的特殊信息和思想随意传播;在论文被录用或成果获奖后任意修改作者排序和著作权单位;为论文顺利发表或成果获奖私自署上知名科学家名字;为完成科研任务或求得职称晋升,无关的同事、同学、亲友间相互挂名。

——重复发表论文。论文一稿两投甚至一稿多投;将某一刊物已发表的文章原封不动或改头换面后重新投到另一刊物;将国外刊物以外文形式发表的论文以中文作为原创性论文在国内发表而不注明。

学术论文质量降低和育人不负责任。部分学者为提高论文数量,将可用一篇完整论文发表的科研成果分为多篇投稿,降低了论文质量并破坏了研究工作的系统性、完整性;论文发表中引用文献注释不明确;部分教授为完成科研任务招收几十名甚至上百名研究生为自己工作、挂名发表大量论文,而无法全面有效教育培养研究生,使研究生素质大面积滑坡。这些情况造成科研资源包括生产资料资源、智力资源的极大浪费。

——学术评审和项目申报中突出个人利益。

——过分追求名利,助长浮躁之风。

《科技期刊学术不端文献检测系统》检测文献后自动生成检测结果报告,包括:①重合文字来源文献信息:系统详细列出重合文字来源文献信息,这些文献都是真实存在、公开发表或得到发表确认的;②比对信息:检测文献和来源文献的详细比对信息;③检测指标:该指标体系从多个角度对检测文献中的文字复制情况进行描述;④诊断类型:系统根据指标参数及其他元数据相关信息,自动给出一个预判断的诊断类型;⑤检测报告:检测系统自动生成一个检测报告单,详细列出检测文献的学术不端行为检测情况,最后生成终审报告。

大规模数据测试结果显示该系统针对中文学术期刊中出现的学术不端文献具有较好的检测能力,在文献对比查准率和查全率方面均 >99%,达到了大规模使用的成熟程度。我刊试用 2 个月,获得了很好的效果,故决定正式启用该系统对所有来稿进行科技期刊学术文献重合度检测。若所投文章文字重合度过高,明显涉嫌抄袭或重复发表,将不予接受。

感谢各位作者对我刊的关注与厚爱,真诚希望继续得到您的支持与合作!