



MR 动态观察 C57BL/6 小鼠前列腺癌皮下移植瘤的实验研究

李文军¹, 刘峰¹, 朱红², 刘玉玺¹, 林明明¹, 孙业全¹, 王媛媛¹

(1 潍坊医学院医学影像学系, 山东 潍坊 261053; 2 寿光市人民医院 CT 室, 山东 寿光 262700)

摘要:目的 采用 3.0T MR 动态观察 C57BL/6 小鼠前列腺癌皮下移植瘤的生物学特征。方法 采用前列腺癌 RM-1 细胞悬液接种于 50 只 C57BL/6 小鼠的背部皮下,待触及皮下移植瘤时,每 5 d 采用游标卡尺测量移植瘤的长径和短径,计算移植瘤体积;MR 在第 15、20、25 及 35 d 对移植瘤进行测量和观察。移植术后第 35 天处死小鼠,并绘制移植瘤生长曲线。处死小鼠后观察移植瘤大小、形态,有无局部侵袭及淋巴、脏器转移,并行病理学检查。采用游标卡尺体外测量移植瘤体积并与 MR 测量结果进行对照,比较其差异。结果 移植瘤多呈圆形或椭圆形,平均成瘤潜伏期为(13.41±1.37) d,移植瘤成功率为 90%,瘤体倍增时间为 10 d 左右。MR 检查移植瘤直径≤1.5 cm 时形态规则,信号尚均匀;当移植瘤直径约 2.0 cm 时其内部见不均匀混杂信号,符合坏死表现。游标卡尺体外测量、MR 测量 2 种方法所得移植瘤体积结果的比较无统计学差异($P>0.05$)。第 35 天 MR 测量移植瘤体积与病理测量结果的相关性($r=0.971, P<0.01$)较游标卡尺体外测量与病理测量结果的相关性更高($r=0.906, P<0.05$)。结论 3.0T MR 能无创、清晰地显示小鼠前列腺癌移植瘤的生长变化情况,能够提供更多的信息来评价其生物学特征。

关键词:前列腺癌;皮下移植瘤;磁共振成像;动物模型

DOI:10.3969/j.issn.1002-1671.2019.01.032

中图分类号:R737.25;R445.2;R-332 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1671(2019)01-0126-04

MR dynamic observation of subcutaneous xenografts of prostate cancer in C57BL/6 mice

LI Wenjun¹, LIU Feng¹, ZHU Hong², LIU Yuxi¹, LIN Mingming¹, SUN Yequan¹, WANG Yuanyuan¹

(1 Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

2 CT Room, the People's Hospital of Shouguang, Shouguang, Shandong Province 262700, China)

Abstract: Objective To observe the biological characteristics of prostate cancer subcutaneous xenograft in C57BL/6 mice by 3.0T MR. **Methods** The prostate cancer cell line RM-1 cells were inoculated into the back of 50 C57BL/6 mice, when the subcutaneous xenograft were to be touched, the long diameter and the short diameter of the xenograft were measured with a vernier caliper every 5 d, and the volume of the xenograft was calculated. The xenografts were measured and observed on days 15, 20, 25 and 35. The mice were sacrificed on the 35th day after transplantation and the growth curve of the xenograft was drawn. After the mice were sacrificed, the size and shape of the xenografts, with or without local invasion and lymph node metastasis were observed, and pathological examination was performed. The volume of xenografts were measured by vernier caliper and compared with the results of MR. **Results** The xenografts were mostly round or oval, with an average tumor-forming latency of (13.41±1.37) d, the success rate of the xenograft was 90% and the tumor doubling time was about 10 d. MR examination showed that the morphology of the xenografts were regular and the signal were uniform when the diameter was ≤1.5 cm. When the xenografts were about 2.0 cm in diameter, they showed heterogeneous mixed signals, which was consistent with necrotic performance. There was no statistical difference in the volume of the xenografts obtained by the two methods of vernier caliper measurement and MR measurement ($P>0.05$). On day 35, the correlation between MR measurement and pathological measurement of xenograft volume was higher ($r=0.971, P<0.01$) than that of vernier calipers in vitro and pathological measurements ($r=0.906, P<0.05$). **Conclusion** 3.0T MR can noninvasively and clearly show the growth and change of prostate cancer xenograft in mice, it can provide more information to evaluate its biological characteristics.

Key words: prostate cancer; subcutaneous xenograft; magnetic resonance imaging; animal models

作者简介:李文军(1989-),男,山东省潍坊市人,在读硕士,住院医师。研究方向:介入诊断与治疗。

通信作者:孙业全, E-mail: sunyequan007@163.com

前列腺癌是常见的男性泌尿生殖系统肿瘤,也是发达国家男性被诊断最多的癌症^[1]。近年来,我国前列腺癌发病率也呈明显上升趋势,严重影响我国男性

的生命健康及生活质量^[2]。异位皮下移植模型的建立为实验研究前列腺癌发病机制及药物治疗提供了重要平台和手段。本实验采用前列腺癌细胞株 RM-1 细胞接种 C57BL/6 小鼠,建立前列腺癌皮下移植瘤模型,并用 MR 对前列腺癌皮下移植瘤的生物学特征进行动态观察。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设备 C57BL/6 雄性近交系小鼠 50 只[济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号:SCXK(鲁)20140007]。鼠龄 6~8 周,体质量 18~20 g,恒温、恒湿、清洁环境饲养,定期更换垫料、清洁饮用水及饲料供小鼠自由摄入。RM-1 小鼠前列腺癌细胞株由中国科学院细胞库提供。生长于 RPMI 1640 完全培养液中,37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱内培养 3~4 d,细胞呈梭形贴壁生长。10%的水合氯醛。OLYMPUS(奥林巴斯)研究级显微镜,型号 BX43。

1.2 荷瘤鼠的建立 将处于对数期的 RM-1 细胞,采用 0.25%的胰酶消化,以 1 000 r/min 速度离心 5 min 后将其浓度调整为 1×10^7 个/mL,碘伏消毒小鼠背部,将细胞悬液注入小鼠背部皮下,每只 0.1 mL。在皮下形成圆形或椭圆形皮丘,缓慢退针,观察无细胞悬液外漏为接种成功,接种过程中无需麻醉小鼠^[3]。

1.3 MR 检查

1.3.1 MR 检查前准备 采用 10%的水合氯醛按照 0.4 mL/100 g 的剂量对实验鼠进行腹腔麻醉,待实验鼠完成麻醉后取俯卧位,身体平行于扫描床,行 MR 常规序列检查。

1.3.2 MR 扫描参数 美国 GE 公司 High signal 3.0T MR 扫描仪,MR 检查采用腕部线圈,扫描序列包括:横轴位 T₁WI(TR 533.34 ms,TE 9.43 ms,层厚 2.5 mm,层距 1.0 mm)像,横轴位 T₂WI(TR 2 000 ms,TE 91.17 ms,层厚 2.5 mm,层距 1.0 mm)像,NEX 2,FOV 120 mm×120 mm,矩阵 288×192。T₁、T₂ 均采用快速自旋回波(fast spin echo,FSE)序列。

1.4 移植瘤生长曲线 每日观察小鼠背部有无瘤组织形成。待触及皮下移植瘤时每 5 d 用游标卡尺体外测量移植瘤的最大长径(a),最小短径(b)。采用 MR 观察移植瘤的位置、大小、形态、轮廓是否规则,信号是否均匀及其与周围组织结构的关系,并在 T₂WI 上测量移植瘤的最大长径(a)和最小短径(b)。以上 2 种方法以公式 $V=1/2(ab^2)$ 计算移植瘤体积。观察至第 35 天,绘制移植瘤生长曲线。从接种日至用手可触及皮下移植瘤的时间来计算平均成瘤潜伏期。肿瘤体积倍增时间(DT)= $0.1 \times t / (\log Dt - \log Do)$ (Do 为第 1 次

测得的肿瘤直径,Dt 为经过 t 时间后测得的肿瘤直径)来计算肿瘤体积倍增时间。

1.5 病理学检查 移植术后第 35 天 MR 检查完毕后处死小鼠,手术剥离肿瘤,对肿瘤行大体观察,用游标卡尺准确测量移植瘤的大小,计算肿瘤体积(公式同前)。对移植瘤行病理学检查,10%甲醛溶液固定,酒精梯度脱水、包埋和 HE 染色。解剖小鼠观察淋巴结及各脏器有无转移发生。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本计量资料比较采用配对样本 t 检验,3 种测量方法的相关关系用 Pearson 相关系数进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植瘤成功率 50 只小鼠建模,45 只成功长出皮下移植瘤,移植瘤成功率为 90%。

2.2 移植瘤生长特性 移植术后小鼠生长情况良好。术后第 10 天,部分小鼠后背皮下可以触摸到大米粒样大小的肿瘤硬块,但肉眼不易看到。第 15 天时肉眼可见 45 只小鼠背后皮下移植瘤部位皮肤隆起,可触摸到质硬肿块,由此推算平均成瘤潜伏期为(13.41±1.37) d。术后第 1~10 天移植瘤生长速度较慢,第 11~35 天移植瘤生长速度加快,移植瘤体积倍增时间在 10 d 左右(图 1)。

2.3 MR 表现 由于经济因素,MR 在第 15、20、25 及 35 天对移植瘤进行观察。移植术后 15 d,MR 检查移植瘤在 T₁WI 呈等信号,在 T₂WI 呈高信号,形态规整,呈圆形或类圆形,与周围组织分界清楚,内部信号均匀(图 2)。术后第 20 天移植瘤形态规整,T₂WI 显示内部短条状高信号(图 3)。术后第 25 天,移植瘤形态规整,内亦可见短条状高信号影,与周围组织分界尚清(图 4)。术后第 35 天,移植瘤与周围组织分界欠清,内部信号不均匀,见条状短 T₂ 信号影,即移植瘤 T₂WI 由原来的高信号变为低信号,此为坏死的特殊征象(图 5)。

移植瘤体积采用游标卡尺体外测量、MR 测量 2 种方法所得结果无统计学差异($P > 0.05$)。第 35 天处死小鼠后,对移植瘤病理标本进行测量,发现体外测量与病理测量的结果、MR 与病理测量的结果均存在相关关系,且前者的相关性低于后者相关性(表 1)。

2.4 病理学特征 移植瘤外观呈圆形或椭圆形,质地较韧,能皮下移动。手术摘除后观察,绝大多数肿瘤形态较为规则,包膜完整(图 6),部分瘤灶表面可见糜烂面。剖面观移植瘤组织呈灰白色,较大肿瘤内部发现坏死灶(图 7)。高倍镜下可见肿瘤细胞大小不一,形态

不规则,细胞排列紊乱,细胞核体积增大,核深染(图8)。解剖小鼠仅见到肿瘤局部的生长与浸润(2只小鼠皮

下移植瘤侵及骨),未见转移发生。

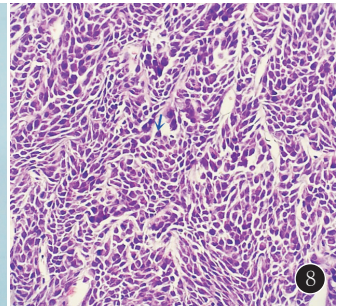
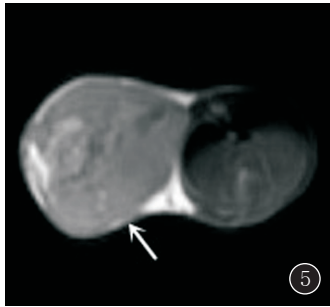
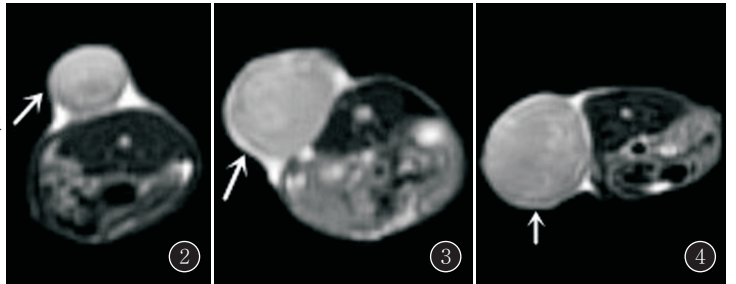
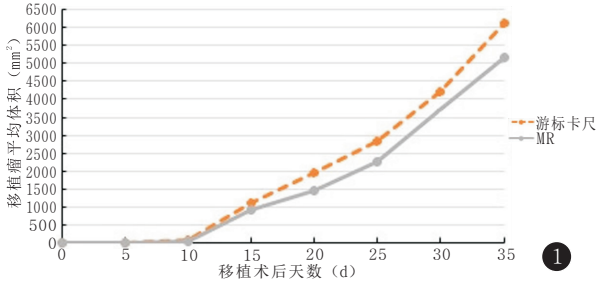


图1 不同方式测量前列腺癌皮下移植瘤生长曲线 图2~5 移植瘤 T₂WI 横断面图像。图2~5 分别为移植术后第15、20、25、35天大体表现,其直径分别约为1 cm、1.3 cm、1.6 cm、2.1 cm 图6 前列腺癌皮下移植瘤 图7 皮下移植瘤剖面解剖图,中央可见坏死灶 图8 第35天皮下移植瘤 HE 染色图片,箭头示癌细胞(HE ×400)

表1 不同测量方法所得移植瘤体积的比较(̄x±s)

测量方法	完成例数 (n)	移植瘤体积 (mm ³)	与病理测量结果 相关系数(r)
游标体外测量	45	6 102±1 078	0.906
MR 测量	45	5 146±819	0.971
病理测量	45	6 214±1 141	*

注:*,表示空格

3 讨论

前列腺癌动物模型的建立,是进行前列腺癌研究的重要内容之一,按照建立方法的特点可分为4类:化学诱导模型,移植瘤模型,PDX模型及遗传工程模型^[4]。移植瘤模型又分为原位移植和异位移植2种模型,由于原位移植对技术要求较高,侵袭周围组织及转移发生较早,生存期较短,目前多用于前列腺癌转移的研究^[5];而异位皮下移植模型在前列腺癌的药物、物理及基因等多种治疗方法的研究中得到了广泛应用^[6-7]。

MR已被公认为前列腺癌最佳影像检查手段,但采用MR对C57BL/6小鼠皮下移植瘤进行动态监测的报道甚少。以往大多采用游标卡尺对皮下移植瘤进行体外测量,这种方法虽然简单,但不能准确评估移植瘤浸润的情况和测量其深度而存在一定的误差。MR具有较高的空间、组织分辨率和对比度,能够清晰地显

示正常组织及病变部位的解剖结构及形态学特征,也可以提供一定的组织成分信息,如出血、坏死等^[8]。T₁WI的优势在于反映组织器官的解剖结构,而T₂WI较T₁WI更能清晰地显示肿瘤边界^[9],因此本实验采用T₂WI对肿瘤进行测量。

据相关文献报道^[3],不同的移植方法,成瘤潜伏期是不同的。皮下组织块移植成瘤速度虽然快,但是瘤体大小不一、形态各异,并且较易发生坏死,因此不适用于判别药物疗效;而用RM-1细胞悬液建立的移植瘤模型形成的瘤体形态、大小较为一致,多呈圆形或类圆形,瘤体容易测量,且坏死发生较晚,适用于判别药物的治疗效果。国内外许多学者^[10-11]将RM-1细胞种植到C57BL/6小鼠背部皮下,成功建立皮下移植瘤模型。本实验小鼠移植瘤成功率为90%,平均成瘤潜伏期为(13.41±1.37)d。移植术后第14~20天4只小鼠死于淋巴结及多脏器转移,考虑注射瘤细胞时因穿刺过深或肿瘤细胞沿血管、淋巴发生转移。第35天处死小鼠解剖仅见到肿瘤局部的生长与浸润,未见肿瘤转移发生,因此用RM-1细胞建立的动物模型生存期较长,为观察药物疗效提供较宽的时间窗,适用于前列腺癌肿瘤治疗实验研究的需要。

从移植瘤生长曲线可以看出,移植瘤在移植术后1~10d生长速度较慢,11~35d肿瘤生长速度加快,分析认为肿瘤的生长分为血管前期和血管期。在血管

前期,肿瘤细胞主要通过既有血管的扩散作用从组织间液获取营养,生长较慢;而在移植瘤建立血供后,肿瘤细胞从新生的血管网获得充足的营养而迅速增大,因此移植瘤的生长呈慢-快的生长模式^[12]。当移植瘤直径约 2 cm 时,MR T₂ WI 显示肿瘤内不均匀混杂信号,病理检查证实为坏死灶,分析认为低分化肿瘤生长较快,导致内部血供不足,因此会发生中心性坏死。MR 在移植术后第 20 天测量移植瘤平均直径约为 1.5 cm,因此认为研究小鼠移植瘤治疗实验的最佳时间为移植术后 11~20 d、瘤体直径在 1~1.5 cm 之间最佳。

总之,笔者所建立的小鼠前列腺癌移植瘤模型具有接种方便、易于观察、移植成功率高、瘤体较为规则等优点;MR 能无创、可重复、清晰地显示小鼠前列腺癌移植瘤的生长变化情况,因此能提供更多的信息来评估前列腺癌皮下移植瘤的生物学特征。

参考文献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] 南淑良, 申 铎, 林艳端, 等. 细胞及瘤块种植人前列腺癌裸鼠皮下移植瘤模型比较[J]. 海南医学, 2014, 25(2): 157-160. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2014.02.0061.
- [4] 梁前俊, 樊 松, 梁朝朝. 常用鼠前列腺癌动物模型的研究进展[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2017, 9(1): 55-57. DOI: 10.3870/j.

issn.1674-4624.2017.01.017.

- [5] JUÁREZ P, FOURNIER P G J, MOHAMMAD K S, et al. Halofuginone inhibits TGF- β /BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 86447-86462. DOI: 10.18632/oncotarget.21200.
- [6] HOU R, XU Y, LU Q, et al. Effect of low-frequency low-intensity ultrasound with microbubbles on prostate cancer hypoxia[J]. Tumour Biol, 2017, 39(10): 1010428317719275. DOI: 10.1177/1010428317719275.
- [7] KAWANAMI T, TANAKA T, HAMAGUCHI Y, et al. Selective androgen receptor modulator S42 suppresses prostate cancer cell proliferation[J]. Endocrinology, 2018, 159(4): 1774-1792. DOI: 10.1210/en.2018-00099.
- [8] 陈 阳, 阳青松, 王馨蕊, 等. 多参数磁共振成像对前列腺癌的诊断价值[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(2): 212-219. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2017.02.0212.
- [9] 宋震宇, 刘 勇. 前列腺疾病的影像检查现状与进展[J]. 西部医学, 2015, 27(2): 315-317. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2015.02.053.
- [10] 曹荣月, 俞敏霞, 张昕黎, 等. VEGF II /GRP 融合蛋白的构建、表达、纯化及其抗小鼠 RM-1 前列腺癌的作用研究[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(8): 9-15. DOI: 10.13523/j.cb.20160802.
- [11] WEI S M, FEI J X, TAO F, et al. Anti-CD27 antibody potentiates antitumor effect of dendritic cell-based vaccine in prostate cancer-bearing mice[J]. Int Surg, 2015, 100(1): 155-163. DOI: 10.9738/INTSURG-D-14-00147.1.
- [12] 耿 良, 花宝金. 肿瘤血管生成机制研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(7): 492-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2012.07.004.

(收稿日期: 2018-04-27; 修回日期: 2018-04-29)

(上接第 117 页)

- [7] 王俊鹏, 颜林枫, 孙 琳, 等. 小剂量靶血管阈值同步跟踪扫描技术在头颈部 CT 血管成像方法中的应用[J]. 实用放射学杂志, 2014, 30(2): 352-354.
- [8] 黄 刚, 马娅琼, 李生虎. 利用 Test-Bolus 技术分析影响颈动脉 CT 增强效果的个体因素[J]. 中国医学影像技术, 2013, 29(6): 1015-1018. DOI: 10.13929/j.1003-3289.2013.06.011.
- [9] DAS K, BISWAS S, ROUGHLEY S, et al. 3DCT cerebral angiography technique using a 320-detector machine with a time-density curve and low contrast medium volume: comparison with fixed time delay technique[J]. Clin Radiol, 2014, 69(3): 129-135. DOI: 10.1016/j.crad.2013.10.021.
- [10] 李月卿. 医学影像成像理论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 29-32.
- [11] 李 瑞, 林 洁, 唐 坤, 等. 低管电压扫描对颈动脉 CT 血管成

像图像质量及辐射剂量的影响[J]. 实用放射学杂志, 2013, 29(5): 819-823. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1671.2013.05.034.

- [12] HUDA W, SCALZETTI E M, LEVIN G. Technique factors and image quality as functions of patient weight at abdominal CT[J]. Radiology, 2000, 217(2): 430-435. DOI: 10.1148/radiology.217.2.r00nv35430.
- [13] 梁永超. 低辐射剂量和低浓度对比剂头颈部 CTA 的初步研究[D]. 广西: 广西中医药大学第一临床医学院, 2016.
- [14] 吕 蓉, 韩宇欣, 孙俊杰, 等. 图像 CT 值与管电流、管电压及碘浓度的关系及降低管电压时对比剂的合理用量[J]. 中华放射学杂志, 2017, 51(6): 456-459. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2017.06.012.

(收稿日期: 2018-06-04; 修回日期: 2018-06-30)