

# 兔 VX2 乳腺癌淋巴转移模型的建立及超声对其诊断的价值

李文军<sup>1</sup> 朱红<sup>2</sup> 孙业全<sup>1</sup> 朱晴<sup>1</sup> 延春雨<sup>1</sup> 刘峰<sup>1</sup>

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

**[摘要]** **目的** 本研究用 VX2 乳腺癌组织块种植法建立新型乳腺癌腋窝淋巴结转移模型, 探讨超声在实验兔 VX2 乳腺癌腋窝转移性淋巴结对定性诊断中的应用价值。**方法** 采用组织块种植法将 VX2 传代瘤株接种于 22 只雌性新西兰种大白兔右侧第 3 乳头的乳垫内, 原位肿瘤生成后触诊检查腋窝淋巴结有无肿大, 待触及肿大的淋巴结时切除原位乳腺癌组织并行病理组织学检查。第 5 周对实验兔淋巴结行超声检查, 依据其诊断标准评价淋巴结的性质, 所得结果与病理组织学检查结果进行比较。**结果** 第 2 周时, 20 只实验兔可触及乳腺内的质韧结节, 超声显示类圆形、边界尚清, 内部回声尚均匀的低回声实性结节, 肿瘤内部及周边血流丰富。3 周后, 触诊发现 18 只实验兔有肿大淋巴结发生。第 5 周超声检查示转移性淋巴结 35 枚, 非转移性淋巴结 7 枚。以病理组织学结果作为金标准, 基于淋巴结个数, 超声诊断转移性淋巴结的准确性为 85.7% (36/42), 灵敏度为 89.2% (33/37), 特异度为 60.0% (3/5), 建模成功率为 81.8% (18/22)。超声与病理组织学两种方法对转移性淋巴结的诊断差异有统计学意义 ( $\chi^2=4.541, P<0.05$ )。**结论** 组织块种植法建立的新型大白兔乳腺癌淋巴转移模型创伤小, 成功率高, 易发生淋巴转移。常规超声对诊断兔乳腺癌转移性淋巴结有一定的应用价值。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 淋巴转移; 超声检查; 病理学; 乳房肿瘤, 实验性; 模型, 动物; 兔

**[中图分类号]** R737.9; R73-37 **[文献标志码]** A

THE ESTABLISHMENT OF A RABBIT LYMPH NODE METASTASIS MODEL OF VX2 BREAST CANCER AND THE VALUE OF ULTRASOUND IN ITS DIAGNOSIS LI Wenjun, ZHU Hong, SUN Yequan, ZHU Qing, YAN Chunyu, LIU Feng (Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a new model of breast cancer axillary lymph node metastasis by VX2 breast cancer tissue implantation, and to investigate the value of ultrasound in the qualitative diagnosis of axillary metastatic lymph nodes in rabbits with VX2 breast cancer. **Methods** The VX2 subcultured tumor strain was inoculated into the breast pad of the right third nipple of 22 female New Zealand white rabbits by tissue implanation. After in situ tumor formation, palpation was performed to check whether the axillary lymph nodes were enlarged. When the enlarged lymph nodes were touched, the orthotopic breast cancer tissues were resected for histopathological examination. At the 5th week, the experimental rabbits' lymph nodes were examined by ultrasonography, and the nature of the lymph nodes was evaluated according to the diagnostic criteria; the results obtained were compared with those of histopathological examination. **Results** At the 2nd week, tough nodules in the mammary gland were touched in 20 experimental rabbits, ultrasound showed a quasi-circular, clear boundary, low-echo solid nodules with uniform internal echo, and abundant blood flow inside and around the tumor. Three weeks later, palpation revealed that 18 rabbits had enlarged lymph nodes. At the 5th week, ultrasound examination revealed 35 metastatic lymph nodes and 7 non-metastatic lymph nodes. Using the histopathological results as the gold standard, based on the number of lymph nodes, the accuracy of ultrasound diagnosis of metastatic lymph nodes was 85.7% (36/42), the sensitivity was 89.2% (33/37), the specificity was 60.0% (3/5), and the modeling success rate was 81.8% (18/22). There were significant differences in the diagnosis of metastatic lymph nodes between ultrasound and histopathological ( $\chi^2=4.541, P<0.05$ ). **Conclusion** The new white rabbit model of breast cancer lymph node metastasis established by tissue implantation has small trauma and high success rate and is prone to lymph node metastasis. Conventional ultrasonography has certain value in the diagnosis of metastatic lymph nodes in rabbits with breast cancer.

**[KEY WORDS]** Breast neoplasms; Lymphatic metastasis; Ultrasonography; Pathology; Mammary neoplasms, experimental; Models, animal; Rabbits

世界卫生组织(WHO)指出乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,也是女性死亡的主要原因之一,占有癌症死亡人数的 23%,无论是在发达国家还是发

展中国家,发病率和死亡率在过去的 50 年内不断增加<sup>[1-2]</sup>。最新研究表明,在我国乳腺癌是 45 岁以下女性最常见的死亡原因,30~59 岁女性为乳腺癌高发人群<sup>[3]</sup>。尽管乳腺癌的治疗水平在不断提高,但仍有部分患者会发展为乳腺癌晚期,主要原因为肿瘤早期就已经转移至腋窝淋巴结,这常常是导致患

[收稿日期] 2019-02-12; [修订日期] 2019-05-27  
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373322)  
[通讯作者] 刘峰, Email: liufengwfm@163.com

者死亡或治疗失败的原因<sup>[4]</sup>。因此为了更好地治疗转移性乳腺癌,非常有必要建立合适的动物乳腺癌转移模型。本研究采用组织块种植法建立新型大白兔乳腺癌淋巴转移模型,并评估超声对乳腺癌转移性淋巴结的诊断价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 8 月龄普通级纯种雌性新西兰种大白兔 22 只,购买于济南金丰实验动物有限公司(许可证号 SCXK(鲁)20140006),体质量为 $(3.51 \pm 0.24)$  kg。雄性兔 1 只,体质量 2.2 kg,建荷瘤兔用于取肿瘤组织。

**1.1.2 实验设备** 德国西门子乳腺容积成像系统,型号 ACUSONS2000,探头 9L4,频率 5~8 MHz。徕卡 DM2000 研究级显微镜(德国徕卡公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 荷瘤兔的建立** 用固定器将雄性新西兰种大白兔固定后,将 20 g/L 的利多卡因剂量(0.5 mL)以 0.1 mL/s 的流量缓慢局部注射至左下肢内侧(已备皮)肌肉丰富区。将液氮保存的 VX2 瘤组织(购于协和医科大学)37℃解冻复苏后,置于 RPMI 培养液的玻璃皿中,在 10 倍显微镜下用眼科剪剪成微小瘤粒,将瘤粒放于 18G 穿刺针的针头处,位于针头头端为最佳。穿刺进入兔后腿外侧肌肉内,用内芯将瘤粒顶出,缓慢拔出穿刺针。3 周后,在接种部位可触及质韧的实性包块,即荷瘤兔制作成功。

**1.2.2 接种组织块制备** 荷瘤兔行肿瘤包块剥离术前禁食 12 h、不禁水。取俯卧位固定四肢于兔手术台上,常规消毒、铺无菌洞巾,肿瘤周边行利多卡因多点分层浸润麻醉,无菌条件下切取荷瘤兔后腿实体瘤,瘤体用生理盐水清洗 3 次后,切除边缘纤维结缔组织,取靠近外周、无坏死的肿瘤组织,放置于滴加有庆大霉素生理盐水的玻璃皿中(50 mL 生理盐水含庆大霉素 20 000 U)<sup>[5]</sup>。10 倍显微镜下将瘤组织剪成微小瘤粒。将瘤粒存于 18G 穿刺针针头头端(每次取 1 粒)备用。

**1.2.3 兔乳腺癌模型制作及观察** 将 22 只雌性兔清醒状态下仰卧位固定,用穿刺针将瘤粒注射于兔胸壁右侧第 3 乳头的乳垫下,缓慢拔针。拔针后局部压迫片刻,确认无出血后碘附消毒。接种后每日观察肿瘤是否形成,皮肤有无溃破,兔的活动状态及生长情况有无异常。移植术后第 3 周起每日触诊检查腋窝淋巴结有无肿大。接种前所有实验兔腋窝均

未扪及肿大淋巴结。

**1.2.4 超声及病理组织学检查** 待触诊能触及质韧的肿大淋巴结后,行外科手术将原位乳腺癌组织切除,并保留乳头,切除的原位乳腺癌组织行病理组织学检查。每周采用超声检查肿大淋巴结的大小、形态、回声及瘤体血供。待兔出现恶病质时,通过静脉注射过量戊巴比妥将兔处死,解剖后观察淋巴结及各脏器的肿瘤转移情况,并做病理组织学检查,用 40 g/L 甲醛溶液固定原位乳腺癌及转移性淋巴结,乙醇梯度脱水、包埋和苏木精-伊红(HE)染色。淋巴结内见巢状排列、与正常细胞分界明显、大小形态不一、胞质相对丰富、有核分裂象的肿瘤细胞,提示淋巴结内有转移。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 建模成功率

用于造模 22 只兔,2 周后超声检查,20 只兔接种部位有病灶,乳腺移植瘤成功,另外 1 只于接种 2 d 后死亡,另 1 只未长出原位移植瘤,接种成功率为 90.9%(20/22)。3 周后,18 只实验兔腋窝处可触及质地较硬的转移性淋巴结。经过病理组织学检查证实 18 只实验兔淋巴结为转移性,淋巴结转移率为 90.0%(18/20),建模成功率为 81.8%(18/22)。其中,8 只实验兔各发现 3 枚淋巴结,8 只各发现 2 枚淋巴结,其余 2 只各发现 1 枚淋巴结。

### 2.2 肿瘤生长情况

移植术后 1~2 周触诊法可触及种植于乳腺的瘤组织肿块,质韧,活动度差,类圆形。第 1~2 周增长速度较慢,从第 3 周开始增长速度明显加快。

### 2.3 常规超声表现

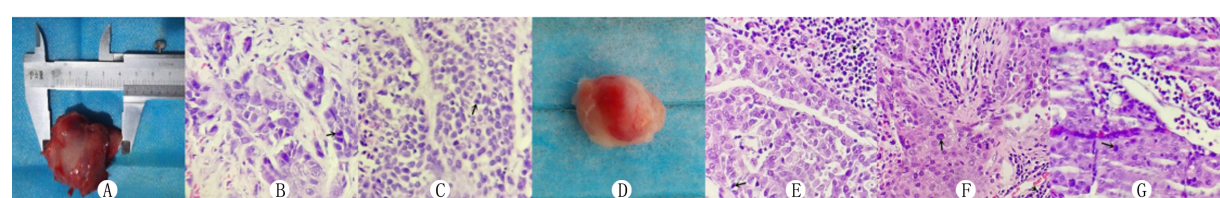
第 3 周时行超声检查示乳头下类圆形的低回声实性暗区,边界尚清;彩色多普勒血流显像(CDFI)示肿瘤内部及周边均可见星点状和(或)短棒状混合型血流信号,流速较低。转移性淋巴结呈圆形或类圆形,淋巴门结构消失或移位,内部回声欠均匀;CDFI 示淋巴结内部和(或)周边均可见星点状和(或)短棒状混合型血流信号,血流信号多集中在淋巴结周边。

### 2.4 病理组织学检查结果

移植瘤呈类圆形,血供丰富,切开后见液化坏死

形成(图 1A);病理组织学切片检查,高倍镜下见癌细胞大小、形态不一,胞质丰富,淡红染色,核异型性明显(图 1B、C)。第 5 周超声检出转移性淋巴结 35 枚,经病理组织学证实 33 枚为转移性淋巴结,2 枚为非转移性淋巴结;非转移性淋巴结 7 枚,经病理组织学证实 4 枚为转移性淋巴结(直径均 $<5\text{ mm}$ ),3 枚为非转移性淋巴结。基于淋巴结个数,超声诊断转移性淋巴结的准确性为 85.7%,诊断的特异度为

60.0%,诊断的灵敏度为 89.2%(33/37)。腋窝转移性淋巴结肉眼可见表面凹凸不平并有大量毛细血管生成,形态不规则,淋巴结门消失(图 1D)。高倍镜下转移性淋巴结见大量癌细胞巢,癌细胞体积大,核大深染,淋巴结的正常结构被完全破坏(图 1E、F)。正常肺组织内查见肿瘤细胞(图 1G)。超声与病理组织学两种方法对转移性淋巴结的诊断存在差异,并具有统计学意义( $\chi^2=4.541, P<0.05$ )。



A:乳腺癌原位移植瘤大体表现;B、C 乳腺癌原位移植瘤高倍镜下所见;D 腋窝转移性淋巴结大体表现;E、F 转移性淋巴结高倍镜下所见;G 乳腺癌肺转移高倍镜下所见,HE 染色,400 倍。

图 1 病理组织学检查结果

## 2.5 尸检情况

将 18 只实验兔处死后进行解剖,发现全部出现了腋淋巴结转移,2 只实验兔双肺见多发大小不等结节状转移灶。

## 3 讨论

乳腺癌淋巴结转移动物模型建立的探索,是进行乳腺癌研究的重要内容之一。该模型不仅有利于寻找肿瘤转移的抑制或促进因素,同时在研究人类乳腺癌的发病机制、治疗、转移及预防等方面起着非常重要的作用,是联系基础研究与临床研究的桥梁<sup>[6-7]</sup>。乳腺癌是否转移对于临床具有重要意义,对于腋窝淋巴结阴性的患者,可避免行腋窝淋巴结清扫,减少患肢并发症的发生<sup>[8-10]</sup>。

VX2 肿瘤细胞株起源于 Shope 病毒诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞癌,是一种可以移植的肿瘤细胞株<sup>[11]</sup>。移植性乳腺癌动物模型是目前应用最广、研究最多的乳腺癌模型<sup>[12]</sup>。移植方法包括细胞悬液注射法、组织块悬液接种法以及肿瘤组织块接种法等<sup>[7]</sup>。近年来,国内外多位学者研究发现以上三种方法均可建立乳腺癌原位移植瘤动物模型<sup>[13-16]</sup>,其中肿瘤组织块接种和组织块悬液接种肿瘤生长快,易发生淋巴结及多脏器的转移。细胞悬液注射法虽能建立乳腺癌模型,但淋巴结转移率不高。据报道将细胞悬液注射到裸鼠皮下,建模成功率为 100%,但无淋巴结转移,并且细胞悬液在接种时一旦进入动物皮下、血管或胸壁肌肉组织内,常引起扩散转移,影响实验结果<sup>[13,17]</sup>。

人类乳腺癌移植性模型常常使用的动物是裸鼠,因其无胸腺,缺乏成熟的 T 淋巴细胞,同时能保持肿瘤细胞的原有形态及病理组织学特性,成为肿瘤研究中较为理想和常用的动物实验工具<sup>[18]</sup>。但裸鼠饲养条件要求高,缺少对肿瘤细胞的免疫反应,对化疗等治疗的耐受性差<sup>[19]</sup>,同时裸鼠淋巴结较小,转移性淋巴结不易发生,肉眼很难观测,需要解剖或采用辅助技术来观察裸鼠的淋巴结<sup>[13]</sup>。新西兰种大白兔作为一种较大型实验动物,其生长特征及转移过程与人类乳腺癌相似,且肿瘤生长快,成瘤率高,转移淋巴结大而浅,又适于被肉眼、彩超等检测,具有很高的科研应用价值。

传统的移植性肿瘤转移模型一般对原位移植瘤未进行处理,因此不适用于复发转移性乳腺癌治疗方法的研究。本研究建立的兔乳腺癌模型是先将 VX2 瘤块接种于实验兔右侧第 3 乳垫内,淋巴结发生转移后再将 VX2 原位移植瘤进行外科切除。此法的优势为:①更接近于人类乳腺癌术后的情况,模拟淋巴结及后期远处脏器的转移,排除了原位肿瘤的干扰,能更准确地评估治疗效果。徐加菊<sup>[11]</sup>研究发现,兔 VX2 乳腺移植瘤在 4 周时会出现液化坏死,如果动物伴发感染后死亡则不易确定死亡原因。②此法建立的动物模型生存期较长,适用于观察药物疗效,为判别药物疗效提供较宽的时间窗。③易发生淋巴结转移且转移途径接近人类乳腺癌淋巴结转移。本实验淋巴结转移率为 90%,接近于凌瑞等<sup>[14]</sup>报道的 91.3%的结果。病理组织学证实肿瘤已转移到腋窝淋巴结,提供了进行与淋巴结转移有



关的实验的机会。④实验安全性高,术后感染发生率低。但本实验也存在如下问题:①没有进行预实验。②难以确保种植组织块大小的完全一致,加之实验兔间个体差异,故每只实验兔原位移植瘤和转移性淋巴结的大小及出现时间不同。③影像检查单一,可以联合 MRI 或 PET-CT 对转移性淋巴结进行诊断。

超声是常用的乳腺疾病诊断方法,也是检测腋窝淋巴结的常用方法之一。超声检查无辐射、操作简单、实时动态,在临床被广泛应用于辅助诊断。本实验中超声诊断特异度较低,分析认为:①癌细胞沿淋巴管转移到淋巴结并在淋巴结内增殖是一个动态变化的过程,早期并不引起淋巴结的大小、结构的显著改变。部分研究表明乳腺癌转移性淋巴结中大约 15%~48% 为微小转移<sup>[20]</sup>,因此超声检查很难检出。②非转移性淋巴结早期主要引起炎性反应性增生,即便这样,假阴性仍然存在。本实验假阴性淋巴结边缘光整,形态规则,内部回声均匀、未见血流分布而误诊为非转移性淋巴结,经病理组织学证实为转移性淋巴结。可以通过乳腺癌前哨淋巴结活检术(SLNB)降低以上两种情况的假阴性率。③人为因素。加强扫查精准度,调节好超声仪器,都将可以提高超声筛查的准确性。

实验心得:①瘤块制备时,要仔细剔除肌肉、血管及内部坏死结缔组织,选择外周生长旺盛富有弹性的组织。肿瘤从剥离至接种最好控制在 2 h 之内。②注射瘤组织和退针时速度要慢,保证瘤组织留在乳腺内,拔针后局部压迫片刻,确认无出血后碘附消毒。③注意无菌操作。避免感染所致接种失败,手术后及时使用抗生素预防感染。

总之,组织块种植法制备的新型乳腺癌动物模型易操作、创伤小、肿瘤生长快,较好地模拟了人类乳腺癌术后的情况,为探索乳腺癌淋巴转移或复发转移性乳腺癌患者新的治疗方法提供实验动物模型。常规超声对于兔乳腺癌转移性淋巴结的诊断有一定的应用价值,但由于微小转移的存在,还达不到病理组织学诊断的准确率。

### [参考文献]

[1] DUBEY A K, GUPTA U, JAIN S. Breast cancer statistics and prediction methodology: A systematic review and analysis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015,16(10):4237-4245.  
[2] DONEPUDI M S, KONDAPALLI K, AMOS S J, et al. Breast cancer statistics and markers[J]. J Cancer Res Ther, 2014,10(3):506-511.

[3] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: Cancer J Clin, 2016,66(2):115-132.  
[4] KERJASCHKI D, BAGO-HORVATH Z, RUDAS M, et al. Lipoxigenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse[J]. J Clin Invest, 2011, 121(5):2000-2012.  
[5] 刘玉玺,孙业全,王苗苗,等. 改良型乳腺癌淋巴结转移模型的制备及超声表现[J]. 中国医学影像学杂志, 2016,24(6):410-413.  
[6] 仲雷,张建国. 乳腺癌实验动物模型的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2008,17(5):484-487.  
[7] 潘秀华,冯玉梅. 乳腺癌移植转移模型的建立与应用[J]. 中国肿瘤临床, 2008,35(4):234-237,239.  
[8] GOLDBERG B B, MERTON D A, LIU J B, et al. Contrast-enhanced sonographic imaging of lymphatic channels and sentinel lymph nodes[J]. J Ultrasound Med, 2005,24(7):953-965.  
[9] JANNI W, KÜHN T, SCHWENTNER L, et al. Sentinel node biopsy and axillary dissection in breast cancer: The evidence and its limits[J]. Dtsch Arztebl Int, 2014,111(14):244-249.  
[10] GIULIANO A E, BALLMAN K V, MCCALL L, et al. Effect of axillary dissection vs no axillary dissection on 10-year overall survival among women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: The ACOSOG Z0011(alliance) randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017,318(10):918-926.  
[11] 徐加菊. 兔多器官 VX2 动物模型建立的实验研究[D]. 泰安:泰山医学院, 2010.  
[12] 赵亚婷,张景华,张显岚. 乳腺癌动物模型的现状及进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013,16(8):1417-1421.  
[13] 王乐,米成峰,王文. 裸鼠 MDA-MB-231 乳腺癌淋巴转移模型建立[J]. 中华医学杂志, 2015,95(23):1862-1865.  
[14] 凌瑞,陈江浩,姚青,等. 兔转移性乳腺癌模型:肿瘤生长及转移[J]. 中国癌症杂志, 2005,15(1):9-11.  
[15] 魏强,方亮,杨继金,等. 兔肝脏、肌肉、皮下 VX2 肿瘤模型的建立和对比研究[J]. 介入放射学杂志, 2013,22(11):931-935.  
[16] CHOI B H, YOUNG H S, QUAN Y H, et al. Real-time computed tomography fluoroscopy-guided solitary lung tumor model in a rabbit[J]. PLoS One, 2017,12(6):e0179220.  
[17] 高薇. 乳腺癌淋巴转移动物模型的建立与评价[D]. 银川:宁夏医科大学, 2014.  
[18] LEWIS K M, HARFORD-WRIGHT E, VINK R, et al. NK1 receptor antagonists and dexamethasone as anticancer agents in vitro and in a model of brain tumours secondary to breast cancer[J]. Anticancer Drugs, 2013,24(4):344-354.  
[19] BECKHOVE P, SCHÜTZ F, DIEL I J, et al. Efficient engraftment of human primary breast cancer transplants in non-conditioned NOD/Scid mice[J]. Int J Cancer, 2003,105(4):444-453.  
[20] 张迪,吕青. 乳腺癌前哨淋巴结微小转移灶的预后意义及临床处理[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2016,10(2):109-112.