

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130910

建立兔舌癌颈淋巴结转移模型的多普勒超声动态监测

欧阳紫兰, 邱丽华, 王 婷, 庞 凉, 李 勇, 曾 峥

(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 重庆市口腔疾病与生物医学研究中心, 重庆 401147)

【摘要】目的:应用多普勒超声动态监测不同时期兔舌 VX2 癌瘤颈部淋巴结的超声图像表现, 分析舌体肿瘤及颈部淋巴结转移的发生规律, 评估多普勒超声对于转移淋巴结的诊断价值。**方法:**将 VX2 瘤块接种于 30 只实验兔舌缘, 根据超声检查的时间随机分为 1 周组、3 周组及 5 周组 (每组 10 只), 动态观察舌癌不同时期颈部淋巴结的超声图像并诊断, 然后行舌体肿瘤及颈深区肿大淋巴结的病理学检查, 完成超声诊断实验评价。**结果:**瘤块接种 1 周后舌体成瘤, 超声未见颈部淋巴结影像; 3 周时出现反应性淋巴结, 超声图像多形态均匀, 皮、髓质结构正常; 5 周时出现淋巴结转移, 超声图像多形态不均, 结构紊乱, 其最大横径与反应性淋巴结间有统计学差异 ($P=0.000$)。3 组实验兔处死时的体质量间有统计学差异 ($P=0.005$)。超声诊断的灵敏度及特异度分别为 85% 及 83%, 受试者工作特征曲线下面积达 0.84 ($P=0.001$)。**结论:**兔舌 VX2 癌与人舌鳞癌表现相似。不同性质的淋巴结具有特异的多普勒超声图像特征, 用于舌癌颈部淋巴结诊断的灵敏度、特异性及准确度均可。

【关键词】VX2 瘤块; 动物模型; 舌癌; 颈淋巴结转移; 多普勒超声

【中国图书分类法分类号】R739.86; R445.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-07

Doppler ultrasound in the detection of neck lymph node metastasis of tongue carcinoma in rabbits

OUYANG Zilan, QIU Lihua, WANG Ting, PANG Liang, LI Yong, ZENG Zheng

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science)

【Abstract】Objective: To dynamically detect the occurrence regularity of the rabbits' VX2 tongue carcinoma and cervical lymph node metastases in different periods according to Doppler ultrasound and to evaluate its diagnostic value. **Methods:** Intact VX2 rabbits' hepatic tumor tissues were transplanted to the lateral border of tongues of 30 rabbits and the rabbits were divided into 3 groups ($n=10$) based on the time of receiving ultrasound detection. Ultrasound images of cervical lymph nodes of tongue carcinoma in different periods were observed. Specimens of transplanted carcinomas and cervical lymph nodes in the rabbits were examined pathologically. Then evaluation on the ultrasound diagnostic test was made. **Results:** Tongue carcinoma was formed at one week after transplantation, but no ultrasonic image for cervical lymph node was observed. Lymph nodes reacted after 3 weeks and ultrasonic image showed that the nodes had high uniformity and normal structure of cortex and medulla. After 5 weeks, lymph nodes with uneven form and disordered structure were metastatic, maximum diameter of which was statistically different from that of reacting lymph nodes ($P=0.000$). There were statistical differences among 3 groups in terms of death weight ($P=0.005$). Diagnostic sensitivity of Doppler ultrasound was 85% and specificity was 94% while the area under receiver operating characteristic curve was 0.84 ($P=0.001$). **Conclusions:** VX2 tongue carcinoma is similar to squamous cell carcinoma of human tongue. Reacting and metastasizing lymph nodes showed their characteristic images by Doppler ultrasound, which is accurate, specific and sensitive in the diagnosis of lymph nodes metastases.

【Key words】 VX2 intact tumor tissue; animal model; tongue cancer; neck lymph node metastases; Doppler ultrasound

众所周知, 舌癌是人类口腔颌面部发病率最高的恶性肿瘤, 多为鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC), 易发生颈部淋巴结转移, 而转移与否直接影响疾病预后、临床分期以及治疗方案^[1]。因此, 及早诊治舌癌患者颈部转移淋巴结对于提高患者的生存率及生存质量至关重要。多年来, 颈部淋巴结的无创定性检查一直备受关注。多普勒超声作为临床常用方法之一, 具有无创、无辐射, 操作简

作者介绍: 欧阳紫兰, Email: 792084916@qq.com,

研究方向: 口腔颌面外科学。

通信作者: 邱丽华, Email: gqyidi2001@163.com。

基金项目: 重庆市科学技术研究资助项目 (编号: KJ100322)。

便等众多优点,现已广泛用于人体健康与疾病的诊断^[2-6]。

兔 VX2 瘤于 1940 年建株,属 SCC,现已广泛用于相关动物模型的建立与研究^[7-11],具有成本低、易复制,成瘤率及转移率高等优点。研究表明^[12],VX2 瘤块接种建立的舌癌模型首先转移至颈部淋巴结且多发于颈深区,与人舌鳞癌的转移途径基本相同。因此,本实验采用 VX2 瘤块接种建立舌癌颈部转移淋巴结的大型动物模型,应用多普勒超声检查术后不同时间点的颈深区淋巴结,结合病理学诊断动态监测舌体肿瘤及颈部转移淋巴结的发生规律,评估多普勒超声对于舌癌颈部转移淋巴结的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机选取成年新西兰大白兔 30 只,雌雄不限,独笼喂养,由重庆医科大学动物实验中心提供及代养。本实验经重庆医科大学生物医学研究伦理委员会批准同意。

1.2 瘤块、试剂及仪器

兔肝 VX2 瘤块由重庆医科大学生物医学工程学院惠赠,于离体 2 h 内接种。戊巴比妥钠(粉剂)购自上海启晟实验器材经营部。脱毛剂硫化钾购自重庆医科大学设备科。“飞利浦 IU22 型超声诊断仪”由重庆医科大学附属第二医院超声科提供。

1.3 实验方法

1.3.1 麻醉及处死方法 3%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 肌注给药,在全麻下进行实验操作。实验结束后,耳缘静脉注入空气处死实验兔。

1.3.2 实验操作 将 VX2 瘤块剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,于兔左侧舌缘前 1/3 做小切口,分离达肌层,接种瘤块一块,严密缝合,术后 3 d 肌注抗生素预防感染。按术后超声检查的时间分为 1 周组、3 周组及 5 周组,每组 10 只。双侧颈部脱毛后进行每组实验兔双侧颈深区淋巴结的多普勒超声检查,观察其超声图像并诊断,完成后处死并进行舌部肿瘤及双侧颈深区肿大淋巴结的病理学检查,评价多普勒超声

的诊断价值。

1.3.3 观察指标 ①一般情况;②颈深区肿大淋巴结多普勒超声图像;③病理学诊断;④诊断试验评价指标:灵敏度(sensitivity, Se),特异度(specificity, Sp),诊断一致率,Youden 指数,似然比(likelihood ratio, LR)及受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线。

1.3.4 统计学分析 利用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析。体质量比较采用单因素方差分析(LSD-*t* 法两两比较),淋巴结最大横径的比较采用独立样本 *t* 检验。计算公式:Se=真阳性/(真阳性+假阴性),Sp=真阴性/(真阴性+假阳性),一致率=(真阳性+真阴性)/样本量,Youden 指数=Se+Sp-1,LR(+)=Se/(1-Sp),LR(-)=(1-Se)/Sp。Youden 指数越大,LR(+)越大,LR(-)越小,ROC 曲线下面积(area under curve, AUC)越接近 1,诊断准确率越高。

2 结果

2.1 一般情况

实验兔术后 1~3 周情况良好,精神状态可;3~4 周开始出现食量稍减、偶精神欠佳等情况;5 周时,实验兔食量减少、进食时偶致口周毛发杂乱、污秽,但并未出现停止进食、精神萎靡以及极度消瘦等恶病质表现。3 组实验兔处死时的体质量(表 1)间有统计学差异($P=0.005$)(1 周组与 3 周组、3 周组与 5 周组间 P 值分别为 0.017、0.002)。

表 1 实验兔体质量情况

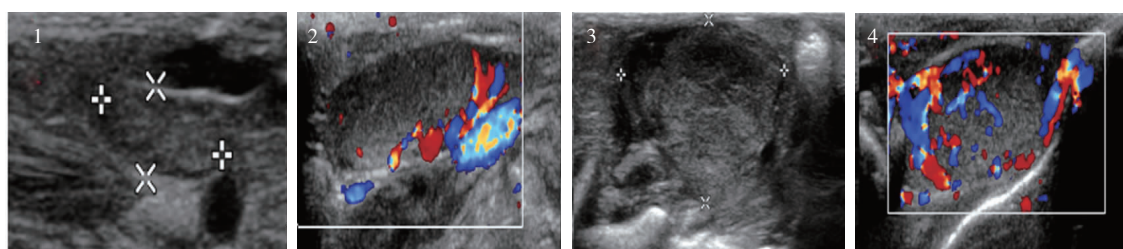
Tab.1 Weight of the rabbits

分组	体质量(g, $\bar{x} \pm s$)	变异系数(%)
1 周	2.01 ± 0.15	7.46
2 周	2.16 ± 0.13	6.02
3 周	1.96 ± 0.09	4.59

2.2 多普勒超声检查

2.2.1 观察指标 于淋巴结多个切面上观察其大小、形态、结构、内部回声(皮、髓质及淋巴门)、纵横比及彩色多普勒血流分布。淋巴结超声图像见图 1(图中所示符号及区域为淋巴结)。

2.2.2 诊断结果 按照上述指标进行颈深区淋巴结动态监测及诊断。结果:1 周组超声检查未见淋巴结影像。3 周组共



1、2. 反应性淋巴结 (7.9 mm × 3.2 mm); 3、4. 疑转移性淋巴结 (18.2 mm × 13.8 mm)

图 1 颈部淋巴结超声图像

Fig.1 Ultrasonic imaging of neck lymph nodes

见 6 枚肿大淋巴结,诊断为反应性淋巴结。5 周组共见 25 枚肿大淋巴结,11 枚诊断为反应性淋巴结,14 枚为转移性淋巴结。

2.3 病理学检查及诊断

1 周组、3 周组及 5 周组的舌体肿瘤成瘤率分别为 80%、90%及 90%。各组肿瘤间表现相似,呈浸润性生长,癌细胞多呈实体巢状紧密排列,多形性明显,核分裂常见且不典型核分裂象多见,血供丰富,未见明显角化珠,细胞间桥极少。1 周组颈深区无肿大淋巴结。3 周组共 6 枚反应性淋巴结。5 周组共 25 枚肿大淋巴结,12 枚为反应性,13 枚为转移性,二者最大横径分别为 (8.83 ± 3.21) mm 及 (19.62 ± 3.95) mm,差异有统计学意义($t=7.448, P=0.000$)。镜下可见转移淋巴结内有散在坏死灶,癌细胞大小不一,呈弥漫性排列,细胞核固缩或溶解,细胞内结构消失,异常核分裂及多核细胞多见,淋巴窦内见组织细胞增多,但肿瘤未突破胞膜。部分区域可见残存淋巴细胞。

2.4 多普勒超声诊断试验评价

本实验共解剖出颈深区肿大淋巴结 31 枚,病理诊断 18 枚为反应性淋巴结,13 枚为转移性淋巴结。多普勒超声将 3 枚反应性淋巴结及 2 枚转移性淋巴结误诊。诊断的 Se 为 85%(11/13),Sp 为 83%(15/18),诊断一致率为 81%(25/31),Youden 指数为 68%,LR(+)为 5,LR(-)为 0.18,AUC 为 0.84($P=0.001$)。见图 2。

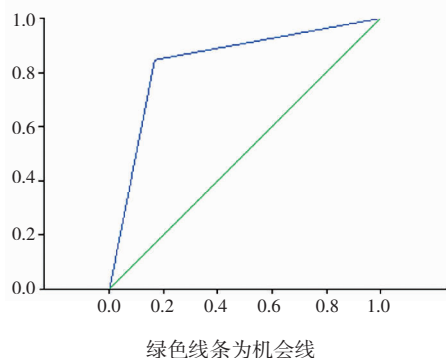


图 2 舌癌颈淋巴结超声诊断的 ROC 曲线

Fig.2 ROC curve of ultrasonic diagnosis for neck lymph nodes

3 讨论

随着超声技术的不断发展,淋巴结内部的细微结构得到了更加精确的显示,尤其是彩色多普勒的使用更有利于淋巴结诊断。周辉红等^[13]通过临床实验比较了多普勒超声、CT 及 MRI 对舌鳞癌患者颈部转移淋巴结的诊断价值,结果超声可通过灰阶值的差异增加小病灶的检出率,其诊断的准确度和 Se 均优于 CT、MRI。本实验结合多普勒超声及病理学检查,于接种后不同时间点(1、3、5 周)动态监测舌 VX2 癌颈部淋巴结的超声影像及镜下形态学表现,

发现在舌癌发展的不同时期,淋巴结具有特异的超声图像特征:舌癌早期正常颈部淋巴结因体积小、组织无病理性改变而无明显显影;随着疾病发展,颈深区淋巴结开始出现病理变化,超声图像可见淋巴结多呈椭圆形,最大横径 ≤ 1 cm,多表现为形态均匀,皮、髓质分界清,皮质为周边较薄的低回声,髓质为中央强回声,纵横比 ≥ 2 者比例较高,彩色多普勒血流显像显示仅见少量短线状血流信号;疾病进一步发展后,肿瘤细胞侵入淋巴结内,转移淋巴结多呈圆形或不规则形,最大横径 >1 cm(占 77%,10/13),多表现为形态不均,边界不明,皮、髓质分界不清(占 85%,11/13),皮质厚度不均匀增加(占 38%,5/13),髓底消失(占 69%,9/13),中央可出现液化坏死导致髓质强回声呈现不均匀的变小或消失(占 77%,10/13),淋巴门结构破坏,此外由于肿瘤细胞浸润,淋巴结呈膨隆状,短径明显增长,纵横比 <2 者比例较高,占 85%(11/13),血流显像显示血流信号增多,可见周边异常粗大的血流信号(占 62%,8/13)。因此淋巴结的形态、大小、结构、内部回声、纵横比的改变等均可作为多普勒超声诊断舌癌颈部转移淋巴结的影像学指标,而彩色多普勒血流显像显示血流信号的改变也可作为重要参考。本实验中,虽然单一超声图像指标在反应性及转移性淋巴结间存在交叉,但多指标,尤其是淋巴结大小、皮髓质分界、髓质回声及纵横比值的联合应用可减少错误判断,而彩色多普勒也可进一步提高淋巴结诊断的准确率。

本实验直接采用新鲜兔肝 VX2 小瘤块接种于实验兔舌缘成功建立了颈淋巴结转移模型,操作简便,且移植瘤与兔肝 VX2 癌瘤镜下表现相似,癌细胞多呈巢状排列,未见明显角化珠,细胞间桥极少,提示为低分化鳞状细胞癌(poorly differentiated squamous cell carcinoma,PDSCC),但二者在癌细胞的大小、形态、排列等方面稍有差异,可能与肿瘤生长的环境改变有关^[14]。动态观察的结果表明,VX2 癌瘤接种 1 周后舌体已成瘤,肿瘤细胞呈浸润性生长,逐渐压迫、侵犯周围组织,恶性程度高,易通过局部淋巴引流发生颈淋巴结转移且转移首先出现在颈深区,接种 5 周后颈淋巴结转移率高,且此时宿主的生存状态可,舌体肿瘤尚未明显影响其呼吸及进食,是利用该模型进行舌癌生物学、治疗学研究的黄金阶段。目前,多数学者都认同颈部淋巴转移是人舌癌的主要转移途径之一,受生长因子、趋化因子等

多因素调控,如转移淋巴结中高表达 CXCR4 趋化因子受体 4^[15]。研究表明^[16],肿瘤淋巴管在人类恶性肿瘤的扩散和转移中起到积极作用,淋巴管生成及其开放面积增加与肿瘤淋巴转移密切相关。因此,兔舌 VX2 癌在生长方式、转移特点及镜下形态学表现等方面均与人舌 PDSCC 表现出高度相似性,适用于模拟人舌鳞癌及颈部转移淋巴结的实验研究,但其转移机制仍有待于进一步探讨。

ROC 曲线综合了 Se 及 Sp 2 个指标,且不受患病率及诊断界值的影响,相较于其它诊断试验评价指标而言是目前公认的准确性最佳的综合指标,AUC 越接近 1,说明实验的诊断准确度越高。本实验应用 ROC 曲线联合多个诊断实验评价指标评估多普勒超声对转移淋巴结的诊断价值,结果表明超声多普勒诊断的 Se、Sp 及准确度均较好,是一种简单且具有较高诊断价值的无创定性检查方法。

参 考 文 献

- [1] Ow T J, Myers J N. Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2011, 4(1): 1-10.
- [2] Henkes D N, Patel S N, Rosenkranz L A, et al. The utility of UroVy-sion fluorescence in situ hybridization in pancreatic fine-needle aspiration samples directed and obtained by endoscopic ultrasonography[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(1): 64-71.
- [3] 周立冰. 超声对鼻咽癌颈部转移淋巴结的诊断价值[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(5): 480-481.
- Zhou L B. Diagnostic value of ultrasound in the neck lymph node metastases of nasopharyngeal carcinoma[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2011, 18(5): 480-481.
- [4] Coates L C, Hodqson R, Conaghan P G, et al. MRI and ultrasonography for diagnosis and monitoring of psoriatic arthritis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012, 26(6): 805-822.
- [5] 刘 峰, 张炳英, 马小平, 等. 彩色多普勒超声对乳腺癌腋下淋巴结转移的诊断价值[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(4): 267-268.
- Liu F, Zhang B Y, Ma X P, et al. Diagnostic value of color Doppler imaging in the axillary node metastases of breast cancer[J]. Ningxia Med J, 2005, 27(4): 267-268.
- [6] 吴 娟, 栗河舟, 丛 娟, 等. 断层超声显像技术联合时间空间相关成像技术和四腔心平面头侧偏斜法在胎儿心脏畸形筛查中的初步研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(22): 6554-6557.
- Wu J, Su H Z, Cong J, et al. Study of tomographic ultrasound imaging-spatiotemporal image correlation and four-chamber view with probe tilting cranially slightly technique in fetal heart screening[J]. Chin J Clinicians (Electronic Edition), 2011, 5(22): 6554-6557.
- [7] 郭 兴, 丁 伟, 李雪鹏, 等. 细胞悬液法与组织块埋植法制作兔 VX2 肝癌影像模型的对照研究[J]. 长治医学院学报, 2008, 22(2): 88-90.
- Guo X, Ding W, Li X P, et al. The comparison research of rabbit VX2 liver cancer model which was made by embedding tissue lump and injecting cell suspension[J]. Journal of Changzhi Medical College, 2008, 22(2): 88-90.
- [8] Xu Y P, Yang M, Pan D H, et al. Bioevaluation study of 32P-CP-PLLA particle brachytherapy in a rabbit VX2 lung tumor model[J]. Appl Radiat Isot, 2012, 70(4): 583-588.
- [9] Song J, Li C, Wu L, et al. MRI-guided brain tumor cryoablation in a rabbit model[J]. J Magn Reson Imaging, 2009, 29(3): 545-551.
- [10] 杨 文, 王 建, 丁运萍, 等. 兔 VX2 肿瘤淋巴转移动物模型建立和病理学观察[J]. 四川动物, 2010, 29(4): 633-635.
- Yang W, Wang J, Ding Y P, et al. Establishment and pathological observation of VX2 tumor lymph node metastasis models in rabbits[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2010, 29(4): 633-635.
- [11] Lin L M, Chen Y K, Chen C H, et al. VX2-induced rabbit buccal carcinoma: a potential cancer model for human buccal mucosa squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2009, 45(11): 196-203.
- [12] 应海岳, 吴海涛, 周 梁. 兔 VX2 舌癌颈深淋巴结转移模型的建立及其转移特性的观察[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 43(10): 778-781.
- Ying H Y, Wu H T, Zhou L. Establishment of the deep cervical lymph node metastasis model of tongue VX2 carcinoma and observation of its metastatic features[J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2008, 43(10): 778-781.
- [13] 周辉红, 张蔚蓓, 詹维伟, 等. 超声、CT/MR 在舌鳞状细胞癌诊断中的价值[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(12): 1930-1932.
- Zhou H H, Zhang W Q, Zhan W W, et al. Ultrasound, CT/MR in diagnosis of squamous cell carcinoma of tongue[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2008, 24(12): 1930-1932.
- [14] 张 娟, 李远竞, 刘 颖. 兔 VX2 肝癌超声检查及病理学特征[J]. 中国基层医药, 2010, 17(18): 2460-2461.
- Zhang J, Li Y J, Liu Y. Ultrasound evaluation and pathological characteristics of VX2 hepatic tumors in rabbit[J]. Chin J Prim Med Pharm, 2010, 17(18): 2460-2461.
- [15] 尹 东, 高 志. 趋化因子受体 CXCR4 在口腔鳞癌中的表达和临床意义[J]. 华西口腔医学杂志(电子版), 2007, 25(4): 392-395.
- Yin D, Gao Z. Expression and clinical significance of chemokine receptor 4 in oral squamous cell carcinoma[J]. West China Journal of Stomatology (Electronic Edition), 2010, 17(18): 2460-2461.
- [16] 沈 军, 张洪杰, 孙保存, 等. 舌癌的淋巴管生成与颈部淋巴结转移[J]. 天津医药, 2007, 35(6): 413-415.
- Shen J, Zhang H J, Sun B C, et al. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma[J]. Tianjin Medical Journal, 2007, 35(6): 413-415.

(责任编辑: 关蕴良)