

• 能谱 CT 影像学专题 •

CT 能谱成像评价胰腺癌抗血管生成治疗效果的价值

王明亮, 缪飞, 林晓珠, 胡胜平, 赵雪松, 吴志远, 唐永华, 严福华

【摘要】 目的:探讨 CT 能谱成像评价胰腺癌抗血管生成治疗效果的可行性。**方法:**取 20 只荷瘤鼠制作胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型, 实验组(10 只鼠)分别在肿瘤种植后第 15 天和 22 天向腹腔内给予阿瓦斯汀(10 mg/kg) 治疗, 对照组(10 只鼠)给予生理盐水。在肿瘤种植后第 28 天行平扫和三期增强(延迟时间分别为 10 s、20 s 和 1 min) CT 能谱扫描。基于碘-水对, 测定肿瘤边缘和中心以及肝脏的碘含量, CT 检查后取瘤体标本分析肿瘤组织微血管密度(MVD)-肿瘤增殖指数和 Bcl-2 凋亡蛋白表达水平。**结果:**腹腔注药后实验组肿瘤生长速度较对照组明显减慢; CT 能谱检查三期增强扫描时实验组和对照组肿瘤边缘的碘含量均高于肿瘤中心, 实验组肿瘤边缘和肿瘤中心各期扫描增强时的碘含量均低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组 MVD、肿瘤增殖指数和 Bcl-2 凋亡蛋白表达水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CT 增强各期肿瘤边缘碘含量的标准化值与 MVD 均存在相关性(r 分别为 0.955、0.837 和 0.961, P 均 < 0.05)。**结论:**CT 能谱成像能够在活体内进行肿瘤碘含量的测定, 能敏感地检测肿瘤内碘含量的变化, 反映肿瘤的微循环灌注情况, 可以作为评价活体内肿瘤抗血管生成治疗疗效的参考指标。

【关键词】 胰腺肿瘤; 新生血管; 微血管密度; 体层摄影术, X 线计算机; 能谱成像; 碘

【中图分类号】 R814.42; R735.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2012)03-0246-04

CT spectral imaging in the evaluation of antiangiogenic treatment response in pancreatic cancer WANG Ming-liang, MIAO Fei, LIN Xiao-zhu, et al. Department of Radiology, Ruijin Hospital, School of Medical, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the feasibility of CT spectral imaging in the evaluation of antiangiogenic treatment response in pancreatic cancer. **Methods:** Human pancreatic cancer xenograft model in nude mice was produced, 2 weeks later, 20 tumor-bearing mice were divided into experimental group and control group (10 mice in each group). The experimental group was given Avastin (10mg/kg) by intraperitoneal administration on the Day 15 and Day 22 after tumor inoculation, while the control group was given saline. On the Day 28, nonenhanced and multi-phase (10s, 20s and 1min) contrast-enhanced CT scans with GSI mode on a Discovery CT750 HD scanner were performed to all mice. The values of iodine concentrations in the tumor margin, tumor center and liver were measured. Tumor specimens were obtained to analyze the tumor microvessel density (MVD) after CT examination. **Results:** The tumor growth in the experimental group was significantly slower than in the control group; in the first phase (10s), the second phase (20s) and the third phase (1min) of contrast-enhanced CT scans, iodine concentrations in the tumor margin were higher than those in the tumor center both in the experimental group and in the control group; iodine concentrations of the tumor margin and tumor center in the experimental group were less than those in the control group in every phase of contrast-enhanced CT scan and standardized differences were found ($P < 0.05$). The MVD, proliferation index and Bcl-2 expression of tumors in the experimental group were also lower than those in the control group ($P < 0.05$). Positive correlations were found between standardization of iodine concentrations of the tumor margin in each phase of contrast-enhanced CT scan and MVD (r were 0.955, 0.837, 0.961 respectively, $P < 0.05$ in every pair group). **Conclusion:** Since CT spectral imaging can analyze the iodine concentrations in tumors in vivo and has the sensitivity to detect the changes of iodine concentrations, it is promising to be a method for the evaluation of the efficacy of antiangiogenic therapy for tumors in vivo.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Angiogenesis; Microvessel density; Tomography, X-ray computed; Spectral imaging; Iodine

CT 能谱成像能准确地反映不同浓度溶液的碘含量, 可以用于定量诊断, 对物质成分的评估优于常规的

单纯 CT 值测量。而通过测定局部组织的碘聚集量, 从而获得局部组织的血流灌注量, 可以反映在微循环水平组织器官的血流灌注情况。本研究通过制作胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型, 借助于宝石 CT 能谱成像技术, 对人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的碘聚集量进行分析, 并与肿瘤组织的病理和免疫组织化学方法测量的

作者单位: 200025 上海, 上海交通大学医学院附属瑞金医院放射科

作者简介: 王明亮(1982-), 男, 山东潍坊人, 博士, 住院医师, 主要从事 CT 和 MRI 新技术的临床应用工作。

通讯作者: 缪飞, E-mail: mfl1066@rjh.com.cn

基金资助: 上海市重点学科建设项目(S30203); 上海市科学技术委员会基础重点项目(09JC1410200)

肿瘤微血管密度等结果进行对照,探讨 CT 能谱成像中碘含量测定方法对胰腺癌抗血管生成治疗效果的评估价值。

材料与方法

1. 实验动物

BALB/c 裸鼠 24 只,4~6 周龄,雄性,体重 18~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号 SCXK(沪)20070005,饲养于 SPF 级屏障系统环境(复旦大学上海医学院动物科学部):恒温(23℃~25℃)、恒湿(45%~50%),整个环境严格消毒,并人工控制 12 h 昼夜变换光照,饲料和饮水消毒饲养,操作器材及其它用品均灭菌处理后使用,实验时按无菌原则操作。

2. 细胞培养

人胰腺癌细胞株 BxPC-3 购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,单层培养于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的恒温孵箱内,以 0.25% 的胰蛋白酶传代消化。

3. 细胞接种

待上述胰腺癌细胞株处于对数生长期时以浓度为 0.25%胰蛋白酶溶液消化,洗涤离心并计数,将含有 1.0×10^7 个单细胞的悬液(0.1 ml)接种于裸鼠腋窝皮下,密切观察肿瘤生长情况,每周用游标卡尺测量肿瘤大小。

4. 实验动物分组

肿瘤种植 2 周后,随机抽取荷瘤鼠 20 只,随机分为实验组和对照组,每组 10 只,进行干预,实验组分别在肿瘤种植后第 15 天、22 天向腹腔内注射含阿瓦斯汀生理盐水溶液 0.1 ml,阿瓦斯汀用量为 10 mg/kg,对照组给予生理盐水,在肿瘤种植后第 28 天行 CT 检查。

5. CT 检查

CT 设备:采用 GE Discovery CT750 HD 宝石 CT 机。

检查前准备:裸鼠消毒后腹腔内注射 6%的水合氯醛溶液,剂量为 100 mg/kg 进行麻醉,待裸鼠麻醉后,将裸鼠俯卧于自制动物固定架上,其躯干和四肢用胶带固定在架上,并注意裸鼠保暖。

GSI 模式 CT 平扫:扫描野包括全部肿瘤和肝脏,视野 250 mm×250 mm,层厚 0.625 mm,600 mA,螺距 0.984,探测器覆盖范围 20 mm。GSI 模式增强扫描:经裸鼠尾静脉注射含碘海醇(300 mg I/ml)的生理盐水溶液 0.08 ml(对比剂:生理盐水=1:1),注射时间 4 s(注射流率 0.02 ml/s),分别于对比剂注入后 10 和 20 s 及 1 min 进行 CT 扫描,扫描野包括肿瘤和

肝脏,视野 250 mm×250 mm,层厚 0.625 mm,600 mA,螺距 0.984,探测器覆盖范围 20 mm,矩阵 512×512。

6. CT 图像后处理

平扫和增强扫描获得的各期图像均传至 GE AW4.4 工作站进行后处理。在肿瘤显示最佳 KeV 图像上,在肿瘤的最大径层面,将圆形 ROI 分别放置在肿瘤边缘区和中心区以及肝内非血管区域,注意避开肿瘤内的坏死、钙化和出血区,ROI 大小相同。连续选取两个层面的 ROI,取其平均值,记录所得 ROI 内的碘含量(以碘为基础物质图像计算所得到的数值)。将测得的肿瘤的碘含量除以同期相肝脏的碘含量,得到标准化后的碘含量值。

7. 肿瘤组织固定

肿瘤种植第 28 天于 CT 检查后采用颈椎脱臼法处死裸鼠,取肿瘤组织,做 HE 染色和肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)染色。

8. 肿瘤微血管密度计数

先在低倍镜(×100)下全面观察切片以确定肿瘤内血管密度最高处。再在高倍镜(×200)下计数 5 个视野的微血管,取其平均值。镜下呈棕黄色或棕褐色的内皮细胞或内皮细胞丛为一个微血管,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管计数,而厚壁血管或管径大于 50 μm 的血管则排除在外。

9. 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计分析软件,应用配对 *t* 检验和 Spearman 相关分析法,分析各期 CT 增强扫描对照组和实验组肿瘤内碘含量的差异,分析各期 CT 增强扫描肿瘤内碘含量与微血管密度的关系,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

裸鼠胰腺癌皮下移植瘤成功率 100%。阿瓦斯汀干预后,实验组肿瘤生长较对照组减慢。

在最佳 KeV 图像上肿瘤最大径层面,将圆形 ROI 分别放置在肿瘤边缘区、肿瘤中心区,基于碘水对分析,可以测得肿瘤边缘区、肿瘤中心区和同期肝脏内非血管区的碘水含量分布图,同时可以得到水基图像和碘基图像(图 1)。

各期 CT 扫描实验组和对照组的肿瘤边缘区、肿瘤中心区和同期肝脏内非血管区的碘含量测量结果见图 2。

CT 增强扫描各期时实验组和对照组肿瘤中心和边缘区的碘含量标准化值测量结果见表 1。结果显示,不论实验组还是对照组,肿瘤中心区与肿瘤边缘区的各期增强扫描的碘含量标准化值差异均有统计学意

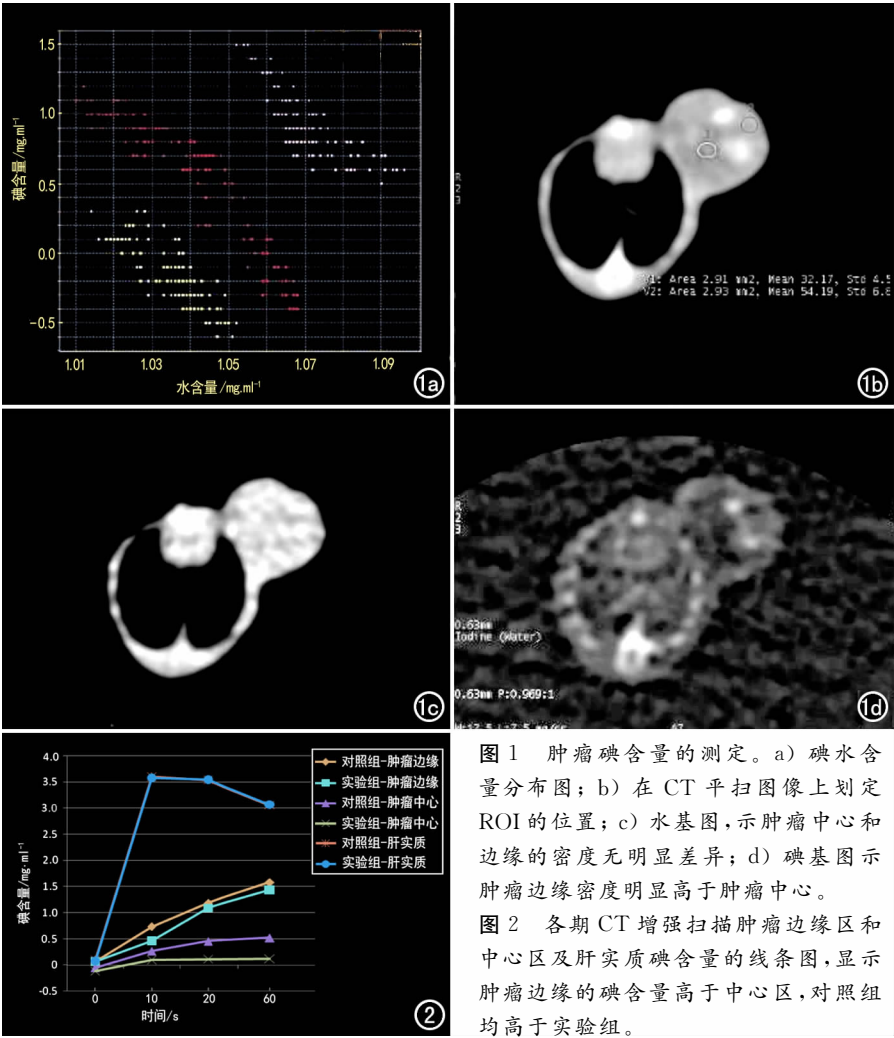


图 1 肿瘤碘含量的测定。a) 碘水含量分布图; b) 在 CT 平扫图像上划定 ROI 的位置; c) 水基图, 示肿瘤中心和边缘的密度无明显差异; d) 碘基图, 示肿瘤边缘密度明显高于肿瘤中心。
图 2 各期 CT 增强扫描肿瘤边缘区和中心区及肝实质碘含量的线条图, 显示肿瘤边缘的碘含量高于中心区, 对照组均高于实验组。

讨论

胰腺癌是恶性程度极高的胰腺外分泌肿瘤, 手术切除率低, 病死率较高。对于胰腺癌患者, 特别是不能手术切除的胰腺癌患者, 采取合适的治疗方案, 减轻患者的症状, 提高生存质量, 改善预后, 已经成为当前胰腺癌治疗研究的热点之一。

肿瘤的生长、侵袭和转移受诸多因素影响和制约, 血管形成是其中的重要因素之一。目前所知血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是作用最强的促血管形成因子^[1-2]。具有分子靶向的抗血管生成药物在胰腺癌的治疗方面有着广阔的临床应用前景。阿瓦斯汀 (Avastin) 是第一个人源化的抗 VEGF 单抗, 能够结合并阻断 VEGF 的作用, 抑制新生血管形成, 从而发挥抗肿瘤活性。

常用的研究肿瘤微血管生成的方法中, 病理组织微血管密度 (microvessel density, MVD) 计数被认为是现阶段的金标准, 但无法用于活体组织, 不能反映活体血管功能,

并且受取材部位及精确度的影响; 同时此方法不能用于手术难以切除、难以取得病理标本的肿瘤, 评价其血管生成就受到一定的限制。

近年来, 大量研究证实 CT 灌注成像参数可以在微循环水平反映肿瘤组织的血流灌注情况, 与肿瘤的微血管密度具有明显相关性^[3-10], 也已经应用到肿瘤的抗血管药物治疗的疗效评价^[11-13]。但是灌注扫描要求对比剂注射流率足够快, 用量不能多, 防止增强峰值延迟导致动态扫描期间对比剂再循环, 引起血流灌注测量的偏差; CT 灌注成像中实际测量的是感兴趣组织中对对比剂浓度 (即单位体积组织中碘的含量) 及其随时间的变化规律。但是对比剂浓度及其变化情况和特点受患者的体表面积、心搏出量甚至呼吸控制水平等多因素影响; 同时 CT 灌注扫描带来的较大的辐射剂量也成为了限制其广泛应用的因素。

宝石能谱 CT 能够生成单能谱图像; 能够进行物质分离, 生成新的基础物质密度图像, 如水、钙和碘等; 能够显示不同物质衰减曲线图, 为临床应用中肿瘤的早期诊断及鉴别诊断、临床分期和治疗随访等提供了广阔的应用前景^[14-16]。

义 (P 均 < 0.05)。

表 1 三期增强扫描实验组和对照组肿瘤中心和边缘碘含量标准化值

部位	延迟 10s	延迟 20s	延迟 60s
对照组			
肿瘤边缘	0.204±0.019	0.335±0.013	0.518±0.020
肿瘤中心	0.074±0.009	0.129±0.012	0.171±0.015
实验组			
肿瘤边缘	0.129±0.014	0.308±0.024	0.470±0.023
肿瘤中心	0.027±0.006	0.032±0.018	0.039±0.014

义 ($P < 0.05$), 实验组肿瘤边缘、肿瘤中心区与对照组肿瘤边缘和肿瘤中心区比较, 其各期增强扫描的碘含量标准化值差异也均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

CD34 染色发现, 实验组微血管密度较低 (17.200 ± 1.687), 对照组微血管密度较高 (46.100 ± 3.784), 实验组微血管密度显著低于对照组 (图 3、4), 差异有极显著性意义 ($P < 0.001$)。

通过病理和免疫组化染色发现, 肿瘤的微血管密集区主要集中在癌灶边缘和肿瘤细胞间质内, 同时 CT 增强扫描发现肿瘤边缘的碘含量值高于中心, CT 三期增强扫描时肿瘤边缘的碘含量标准化值与 MVD 均存在相关性 (r 分别为 0.955、0.837、0.961 和 $P < 0.05$, 图 5)。

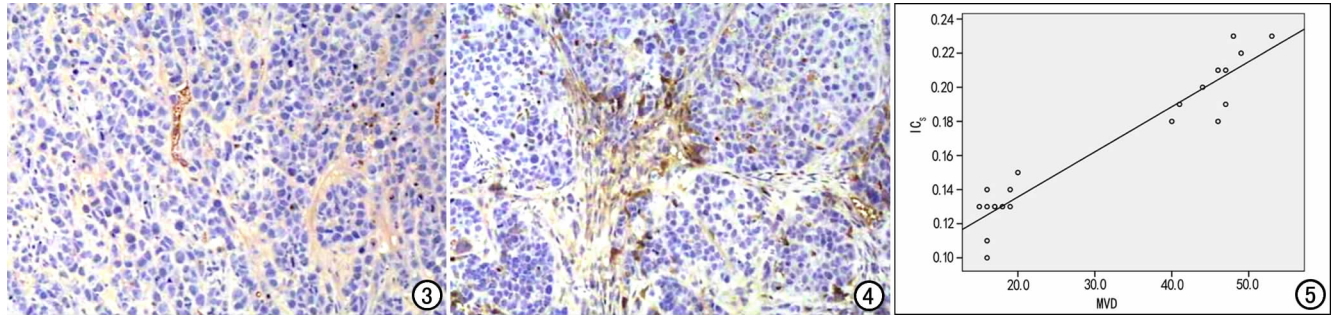


图 3 实验组肿瘤组织 CD34 染色,镜下示肿瘤内有微血管密度生成($\times 200$)。图 4 对照组肿瘤组织 CD34 染色,镜下示肿瘤内微血管密度高于实验组。图 5 CT 增强扫描第一期时肿瘤边缘碘含量标准化值与 MVD 关系的散点图,示两者呈明显正线性相关。

本研究发现在实验组和对照组中,人胰腺癌裸鼠移植瘤模型能谱 CT 扫描时,肿瘤中心和边缘在增强扫描各期的碘含量差异均有统计学意义;对照组和实验组肿瘤边缘和肿瘤中心在增强后各期的碘含量差异均有统计学意义,且测量结果与肿瘤微血管密度的测量结果相一致。因此,CT 能谱成像的碘含量测定可以作为在活体判断肿瘤新生血管状况和抗血管生成治疗疗效的参考指标。

本研究存在的不足及局限性:①本研究采用的人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型,不能完全反映人类胰腺癌对抗血管生成药物的反应;②对比剂经裸鼠尾静脉注射,对比剂的注射流率难以完全相同;③病理切片和 CT 观察的层面难以一一对应,结果可能受影响;④CT 能谱扫描时管电流固定,而裸鼠体积小,导致辐射剂量较高。

虽然本研究存在很多不足和缺陷,但研究结果提示 CT 能谱成像的碘含量分析可以作为在活体判断肿瘤新生血管状况和抗血管生成治疗疗效的参考指标,有望在今后的临床和科研工作中得到进一步研究和应用。

致谢:感谢 GE 公司 CTRC 工程师李剑颖博士、沈云博士和高娜女士等在实验实施中给予的帮助。

参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis[J]. Semin Cancer Biol, 2003,13(2):159-167.
- [2] Etoh T, Inoue H, Tanaka S, et al. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases[J]. Cancer Res, 2001,61(5):2145-2153.
- [3] Eastwood JD, Lev MH, Provenzale JM, et al. Perfusion CT with iodinated contrast material[J]. AJR, 2003,180(1):3-12.
- [4] Gigli F, Zattoni F, Zamboni G. Correlation between pathologic features and perfusion CT of renal cancer: a feasibility study[J]. Urologia, 2010,77(4):223-231.
- [5] Jiang HJ, Lu HB, Zhang ZR, et al. Experimental study on angiogenesis in a rabbit VX2 early liver tumour by perfusion computed tomography[J]. J Int Med Res, 2010,38(3):929-939.
- [6] Fournier LS, Oudard S, Thiam R, et al. Metastatic renal carcinoma: evaluation of antiangiogenic therapy with dynamic contrast-enhanced CT[J]. Radiology, 2010,256(2):511-518.
- [7] Yao J, Yang ZG, Chen HJ, et al. Gastric adenocarcinoma: can perfusion CT help to noninvasively evaluate tumor angiogenesis? [J]. Abdom Imaging, 2011,36(1):15-21.
- [8] Jiang HJ, Zhang ZR, Shen BZ, et al. Quantification of angiogenesis by CT perfusion imaging in liver tumor of rabbit[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009,8(2):168-173.
- [9] Feng ST, Sun CH, Li ZP, et al. Evaluation of angiogenesis in colorectal carcinoma with multidetector-row CT multislice perfusion imaging[J]. Eur J Radiol, 2010,75(2):191-196.
- [10] Yang HF, Du Y, Ni JX, et al. Perfusion computed tomography evaluation of angiogenesis in liver cancer[J]. Eur Radiol, 2010,20(6):1424-1430.
- [11] Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, et al. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases[J]. JAMA, 2009,302(21):2338-2344.
- [12] Thiam R, Fournier LS, Trinquart L, et al. Optimizing the size variation threshold for the CT evaluation of response in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib[J]. Ann Oncol, 2010,21(5):936-941.
- [13] Tai JH, Tessier J, Ryan AJ, et al. Assessment of acute antivascular effects of vandetanib with high-resolution dynamic contrast-enhanced computed tomographic imaging in a human colon tumor xenograft model in the nude rat[J]. Neoplasia, 2010,12(9):697-707.
- [14] Brown CL, Hartman RP, Dzyubak OP, et al. Dual-energy CT iodine overlay technique for characterization of renal masses as cyst or solid: a phantom feasibility study[J]. Eur Radiol, 2009,19(5):1289-1295.
- [15] Lv P, Lin XZ, Li J, et al. Differentiation of small hepatic hemangioma from small hepatocellular carcinoma: recently introduced spectral CT method[J]. Radiology, 2011,259(3):720-729.
- [16] Silva AC, Morse BG, Hara AK, et al. Dual-energy (spectral) CT: applications in abdominal imaging[J]. RadioGraphics, 2011,31(4):1031-1046.