

• 实验研究 •

DCE-MRI 评价恩度联合阿瓦斯汀抗肿瘤血管生成疗效

田迎, 史红媛, 袁彩云, 罗松, 王建东, 卢光明

【摘要】 目的:利用动态增强磁共振成像技术(DCE-MRI)评价恩度单独及恩度联合阿瓦斯汀抑制肿瘤血管生成的疗效。**方法:**将 18 只人肺腺癌细胞系 A549 皮下接种裸鼠,随机分成对照组($n=6$)、恩度单独给药组($n=6$)和恩度联合阿瓦斯汀给药组($n=6$)三组,DCE-MRI 结合病理学方法评价肿瘤血管生成及其渗透性。**结果:**给药 7 天后,对照组肿瘤体积为(0.85 ± 0.25) cm^3 ,恩度单独给药组为(0.37 ± 0.17) cm^3 ,联合给药组为(0.16 ± 0.03) cm^3 ($F=24.455, P=0.000$);对照组血管功能参数 K^{trans} 、 K_{ep} 、 V_e 及 iAUC 分别为(0.11 ± 0.03) min^{-1} 、(0.67 ± 0.54) min^{-1} 、(0.35 ± 0.12)、(13.28 ± 4.25),恩度单独给药组分别为(0.06 ± 0.01) min^{-1} 、(0.40 ± 0.25) min^{-1} 、(0.31 ± 0.09)、(7.33 ± 3.93),联合给药组分别为(0.04 ± 0.02) min^{-1} 、(0.27 ± 0.12) min^{-1} 、(0.36 ± 0.19)、(4.29 ± 3.53),给药组 K^{trans} 及 iAUC 值较对照组明显减小,差异均具有统计学意义($F=15.257, P=0.000$; $F=8.197, P=0.004$);对照组微血管密度(MVD)为(14.24 ± 3.38)条/高倍视野,恩度给药组为(8.88 ± 1.86)条/高倍视野,联合给药组为(6.47 ± 1.78)条/高倍视野,差异具有统计学意义($F=41.305, P=0.000$);免疫组化结果显示给药组 VEGF 呈低表达,对照组呈高表达。**结论:**DCE-MRI 定量参数对评价肿瘤血管生成与病理学结果具有一致性,DCE-MRI 具有实时动态、无创等优点,能早期监测肿瘤生长、评价抗肿瘤血管生成药物的疗效。

【关键词】 磁共振成像;恩度;阿瓦斯汀;抗肿瘤血管生成

【中图分类号】 R445.2; R73-36 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2012)08-0820-05

Antiangiogenic effect of Endostar combined with Avastin: a dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging study

TIAN Ying, SHI Hong-yuan, YUAN Cai-yun, et al. Department of Medical Imaging, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Jiangsu 210002, P. R. China

【Abstract】 Objective: To evaluate antiangiogenic effect of endostar or endostar combined with avastin in a xenograft model of human lung cancer using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI). **Methods:** 18 nude mice, which were inoculated subcutaneously with human lung adenocarcinoma cells A549, were divided into three groups, control group ($n=6$), endostar group ($n=6$) and combination of endostar and avastin ($n=6$). Tumor angiogenesis and vascular permeability were assessed with DCE-MRI and pathology methods. **Results:** 7 days after antiangiogenic treatment, tumor volume among the control group, the endostar group and the combination treatment group were (0.85 ± 0.25) cm^3 , (0.37 ± 0.17) cm^3 and (0.16 ± 0.03) cm^3 , respectively. K^{trans} , K_{ep} , V_e and iAUC among three groups were (0.11 ± 0.03) min^{-1} , (0.67 ± 0.54) min^{-1} , (0.35 ± 0.12) and (13.28 ± 4.25), (0.06 ± 0.01) min^{-1} , (0.40 ± 0.25) min^{-1} , (0.31 ± 0.09) and (7.33 ± 3.93), (0.04 ± 0.02) min^{-1} , (0.27 ± 0.12) min^{-1} , (0.36 ± 0.19) and (4.29 ± 3.53). Significant decreases were reached in K^{trans} , K_{ep} and iAUC after antiangiogenic treatment, ($F=15.257, P=0.000$ and $F=8.197, P=0.004$ respectively). Microvessel density (MVD) among the control group, the endostar group and the combination treatment group were (14.24 ± 3.38) item/hpf, (8.88 ± 1.86) item/hpf and (6.47 ± 1.78) item/hpf, respectively. A significant decrease in MVD was noted after antiangiogenic treatment ($F=41.305, P=0.000$). There were statistically significant differences in VEGF expression among three groups. A significant decrease in VEGF was reached after antiangiogenic treatment. **Conclusion:** DCE-MRI is a non-invasive functional imaging technique that permits indirect measurement of tumor angiogenesis. It may therefore be suitable for monitoring the antiangiogenic effects of endostar combined with avastin.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Endostar; Avastin; Antiangiogenesis

近年来,分子靶向治疗成为抗肿瘤药物研发的主要方向,如广泛应用于临床的恩度(Endostar)和阿瓦斯汀(Bevacizumab, Avastin)是靶向抑制恶性肿瘤血管生成的有效药物^[1]。动态增强磁共振成像技术(dy-

namic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)能够早期监测肿瘤血管生成、评价抗肿瘤血管生成药物疗效,具有无创、实时动态的特点^[2-3]。本文结合 HE 染色和免疫组化方法分析,旨在探讨 DCE-MRI 在评价抗肿瘤血管生成药物疗效方面的准确性和优越性。

作者单位: 210002 南京,南京军区南京总医院医学影像科(田迎、史红媛、袁彩云、罗松、卢光明),病理科(王建东)

作者简介: 田迎(1983-),女,山东淄博人,硕士,技师,主要从事分子影像与分子病理学研究。

通讯作者: 卢光明, E-mail: cjr. luguangming@vip.163.com

材料与方法

1. 材料

细胞系及实验动物:人肺腺癌细胞 A549 为本实验室保存。18 只 BAIB/c-nu/nu 雄性裸鼠购自南京军区南京总医院比较医学科,鼠龄 6~8 周,体重 18~20 g。在恒温(18℃~19℃)、恒湿(40%~70%)、空气洁净度达 10000 级无特定病原体(specific-pathogen free,SPF)饲养间饲养。所有动物实验有关的操作程序均得到南京军区南京总医院实验动物使用与伦理管理委员会批准。

主要试剂及设备:恩度(由山东先声麦得津生物制药有限公司馈赠),阿瓦斯汀(Roche),抗小鼠单克隆抗体 CD34、VEGF(Abcam),钨贝葡胺(上海博莱科信谊药业有限公司),RPMI 1640 培养基(HyClone),双抗溶液(HyClone),胎牛血清(GIBCO),0.25%胰酶(GIBCO),3.0 T 磁共振成像系统(Siemens),荧光相差显微与成像系统(OLYMPUS)。

2. 方法

细胞培养及接种:将 A549 置于含 10%胎牛血清、100 IU/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养,细胞每 48 h 传代 1 次。接种前细胞达到 90%汇合度,收集细胞,3×10⁶ 个/只接种于裸鼠下肢上方皮下。

实验分组及给药:待肿瘤长至 5 mm 左右,随机分成三组:①对照组 6 只,生理盐水 0.2 ml/只/天腹腔注射;②恩度单独给药组 6 只,3 mg/kg,生理盐水稀释,0.2 ml/只/天腹腔注射;③恩度与阿瓦斯汀联合给药组 6 只,每天给予恩度治疗,剂量同②,每两天给予一次阿瓦斯汀治疗,3mg/kg,生理盐水稀释,0.2 ml/只/两天腹腔注射。连续给药 7 天。

DCE-MRI 扫描及图像采集:采用 3.0T MRI 扫描,小动物专用线圈。平扫采用快速自旋回波序列(TSE),层厚 2 mm,T₂ WI:TR 3000 ms,TE 61 ms,视野 70 mm×70 mm;T₁ WI:TR 650 ms,TE 24 ms,视野 70 mm×70 mm;动态增强采用 3D 快速小角度激发序列(FLASH):TR 5.0 ms,TE 2.0 ms,视野 55 mm×70 mm,层厚 5 mm,平扫 6 个序列后经小鼠尾静脉注入 0.1 ml 对比剂钨贝葡胺,进行连续 70 个序列的动

态增强扫描。扫描结束后,原始数据利用专业软件(Tissue4D,Siemens)处理,在每个横轴面肿瘤强化最明显的区域选取 4 个 ROI,输出参数分别为对比剂容积转移常量 K^{trans}、渗漏空间 V_e、速度常量 K_{ep} 和增强曲线下初始面积 iAUC,图像用伪彩图表示。

免疫组化:成像结束后,选取肿瘤组织,浸泡在 4%的多聚甲醛中,次日进行石蜡包埋,4~5 μm 切片,血清封闭 30 min,敷一抗(CD34、VEGF)4℃过夜。PBS 冲洗,敷二抗室温 30 min,DAB 显色,荧光相差显微与成像系统观察、微血管密度(microvessel density,MVD)计数并采集图像。

3. 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。定量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。正态性检验用 Kolmogorov-Smirnov 法,方差齐性检验用 Levene 法。三组肿瘤体积、MVD 值及血管功能参数 K^{trans}、K_{ep}、V_e 及 iAUC 值比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),除 K_{ep}不符合方差齐性采用 Dunnett's T3 检验外,其余均满足正态性和方差齐性,两两比较采用 LSD 法。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

1. DCE-MRI 扫描结果

所有裸鼠肿瘤经 DCE-MRI 扫描及后处理得到定量动态伪彩图及动态增强曲线(图 1)。在磁共振 T₁ WI 冠状面上测量肿瘤短径 a 与长径 b(cm),通过公式 a²b×0.52(cm³)计算肿瘤相对体积,三组差异具有统计学意义(F=24.455,P=0.000),单独给药组和联合给药组体积较之对照组,差异具有统计学意义(P 值均为 0.000),给药组之间比较差异无统计学意义(P=0.062)。通过专业软件分析三组扫描参数 K^{trans}、K_{ep}、V_e 及 iAUC,给药组 K^{trans} 及 iAUC 明显减小(F=15.257,P=0.000;F=8.197,P=0.004),单独给药组和联合给药组较之对照组 K^{trans} 值差异有高度统计学意义(P 值分别为 0.001 和 0.000),iAUC 差异具有统计学意义(P 值分别为 0.021 和 0.048),给药组之间差异无统计学意义(P 值分别为 0.195 和 0.554);给药组和对照组间 K_{ep} 和 V_e 差异无统计学意义(F=1.953,P=0.176;F=0.244,P=0.787,表 1)。

表 1 三组体积、输出参数 K^{trans}、K_{ep}、V_e 及 iAUC 值的比较

参数	对照组(n=6)	单独给药组(n=6)	联合给药组(n=6)	F 值	P 值
体积(cm ³)	0.85±0.25	0.37±0.17	0.16±0.03	24.455	0.000
K ^{trans} (min ⁻¹)	0.11±0.03	0.06±0.01	0.04±0.02	15.257	0.000
K _{ep} (min ⁻¹)	0.67±0.54	0.40±0.25	0.27±0.12	1.953	0.176
V _e	0.35±0.12	0.31±0.09	0.36±0.19	0.244	0.787
iAUC	13.28±4.25	7.33±3.93	4.29±3.53	8.197	0.004

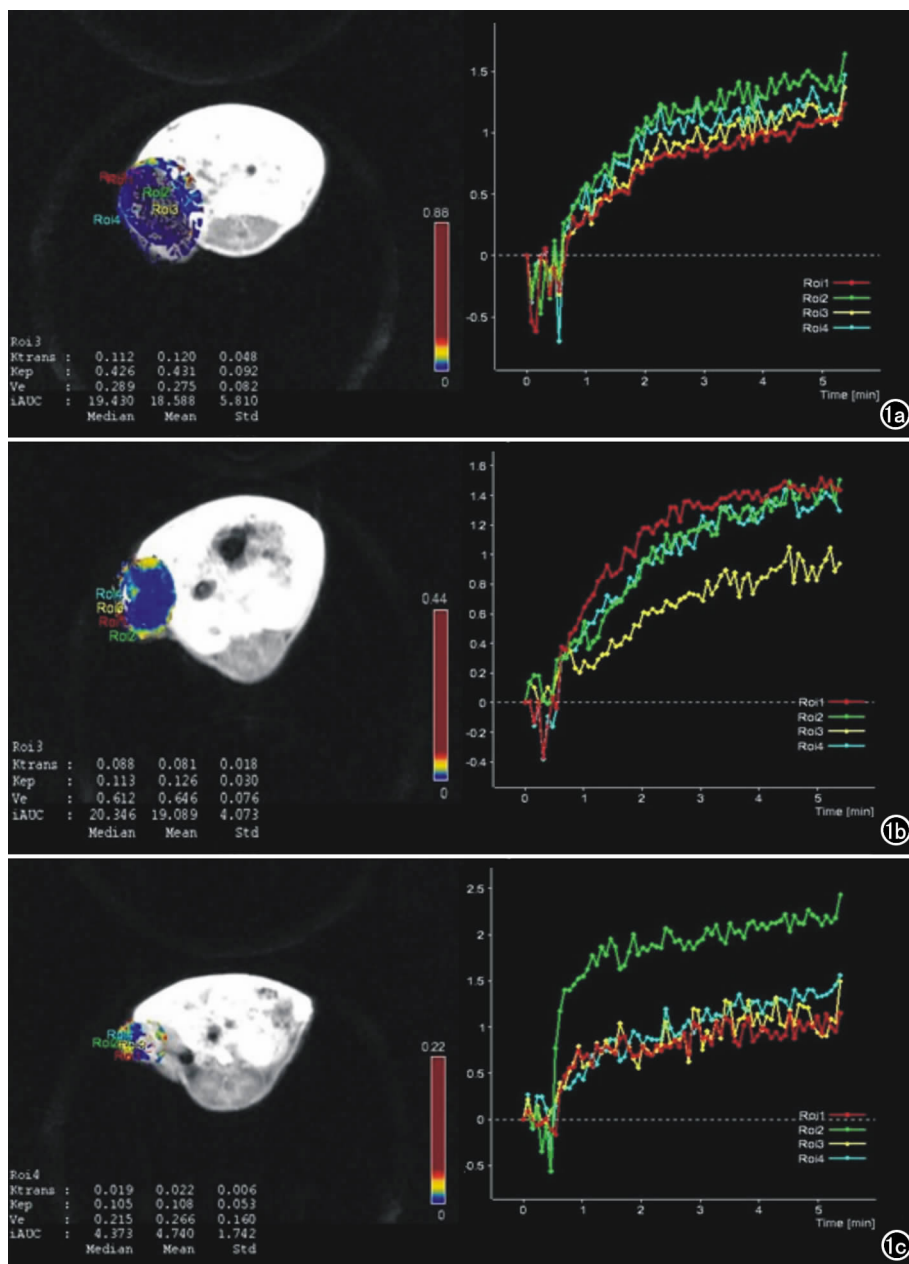


图 1 a) 对照组裸鼠肿瘤的 DCE-MRI 后处理所得定量动态伪彩图及动态增强曲线; b) 恩度单独给药组裸鼠肿瘤的 DCE-MRI 后处理所得定量动态伪彩图及动态增强曲线; c) 联合给药组裸鼠肿瘤的 DCE-MRI 后处理所得定量动态伪彩图及动态增强曲线。

2. 病理结果

HE 染色显示对照组血管较为丰富, 肿瘤细胞密集, 联合给药组肿瘤组织有大面积坏死区域(图 2a~c)。VEGF 免疫组化结果显示, 对照组肿瘤细胞 VEGF 高表达, 恩度单独给药组 VEGF 表达降低, 联合给药组 VEGF 呈低表达(图 2d~f)。采用微血管计数方法分析 CD34 免疫组化染色结果(图 2g~i), 200 倍视野下单独给药组和联合给药组血管数目较对照组明显减少($F=41.305, P=0.000$)。对照组 MVD 值为(14.24 ± 3.38)条/高倍视野, 单独给药组为(8.88 ± 1.86)条/高倍视野, 联合给药组为(6.47 ± 1.78)条/高倍视野, 且给药组与对照组相比值差异有高度统计学

意义(P 值均为 0.000), 单独给药组与联合给药组之间比较差异具有统计学意义($P=0.014$)。

讨论

血管生成是肿瘤生长过程中必不可少的环节, 为其生长提供营养, 为肿瘤细胞进入血液循环和远处转移提供可能。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)在肿瘤血管生成中发挥重要作用, 主要参与调节肿瘤内皮细胞分泌, 诱导内皮细胞增殖和迁移, 增加微血管的渗透性等^[4]。研究证实, VEGF 过表达可导致肺癌等肿瘤疾病的发生^[5]。目前, 以肿瘤新生血管为靶点的抗肿瘤药物已成为研究热点^[6]。

恩度是国内首例重组人血管内皮抑制素, 通过抑制血管内皮细胞迁移来抑制肿瘤新生血管形成, 还通过调节肿瘤细胞表面 VEGF 的表达及蛋白水解酶的活性, 多靶点发挥抗血管生成作用; 阿瓦斯汀为一种重组人源化 IgG1 型单克隆抗体, 可以与血管内皮细胞生长因子 VEGF 高亲和力结合, 阻断 VEGF 介导的血管生成, 降低血管通透性, 2004 年获得 FDA 的批准, 是美国第一个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的药物。目前国内多开展恩度联合化疗药物如多西紫杉醇、顺铂及吉西他滨的研究^[7-8], 恩度联合阿瓦斯汀的治疗

尚未见报道。本实验采用恩度单独治疗及恩度结合阿瓦斯汀联合治疗, 评价人肺腺癌 A549 皮下移植瘤动物模型血管表达情况。笔者分别应用标记血管的 CD34 和 VEGF 单克隆抗体染色, 免疫组化方法评价治疗前后肿瘤组织中 MVD 及 VEGF 的表达情况。MVD 和 VEGF 是反映肿瘤血管生成的重要指标, VEGF 表达和 MVD 值呈正相关, VEGF 能够促进内皮细胞的生长和迁移, 增加血管渗透性, 诱发血管密度增加, MVD 值升高^[9-10]。免疫组化结果显示, 与对照组比较, 给药组血管数目显著减少, VEGF 表达呈弱阳性, 恩度及阿瓦斯汀的抑瘤作用明显, 其中联合治疗组

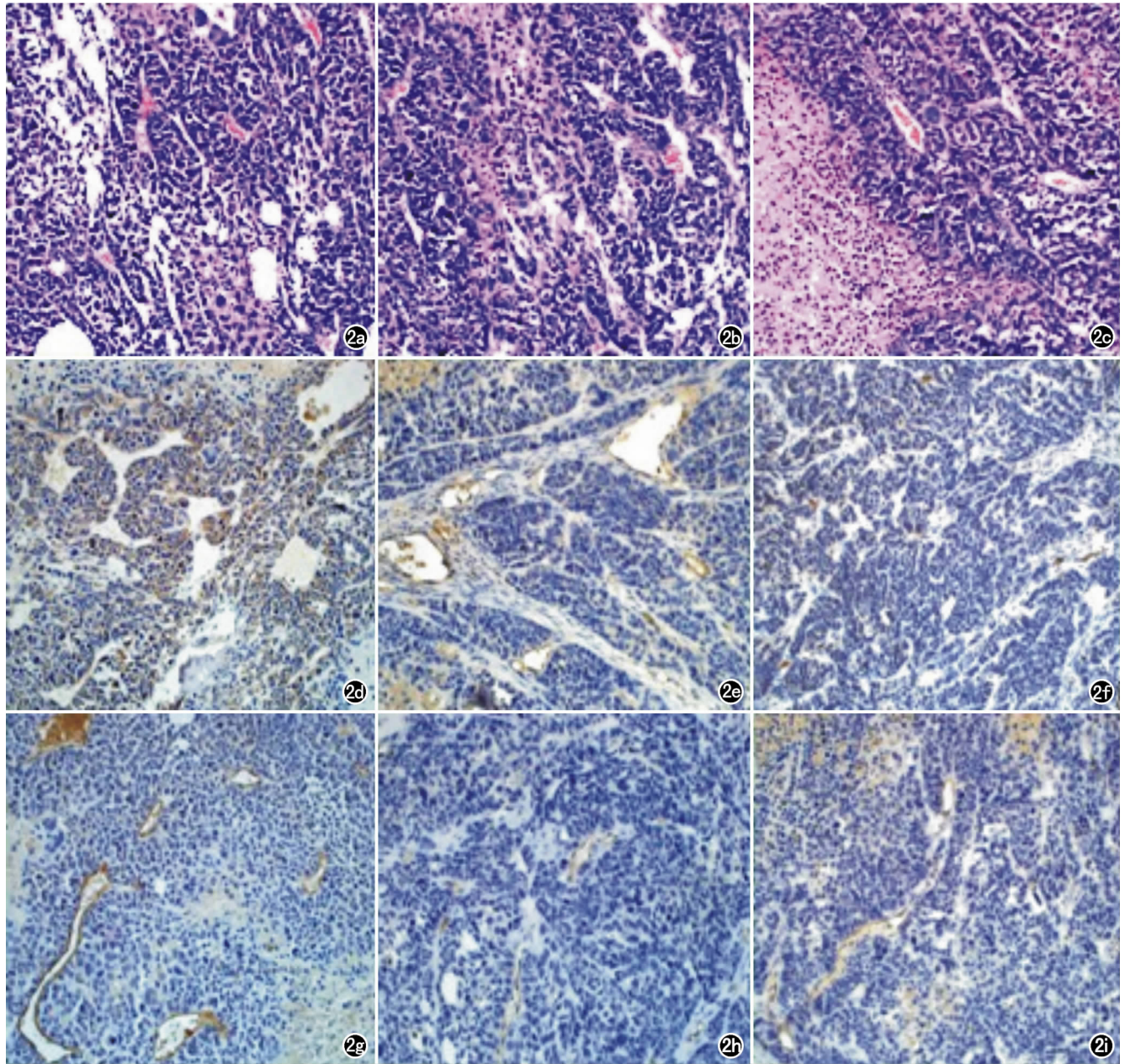


图 2 a) 对照组 HE 染色($\times 200$); b) 恩度单独给药组 HE 染色($\times 200$); c) 联合给药组 HE 染色($\times 200$); d) 对照组 VEGF 免疫组化染色($\times 200$); e) 恩度单独给药组 VEGF 免疫组化染色($\times 200$); f) 联合组 VEGF 免疫组化染色($\times 200$); g) 对照组 CD34 免疫组化染色($\times 200$); h) 恩度单独给药组 CD34 免疫组化染色($\times 200$); i) 恩度及阿瓦斯汀联合给药组 CD34 免疫组化染色($\times 200$)。

较单独治疗组效果更为显著,差异具有统计学意义。由于药物作用,影响 VEGF 的增殖,抑制和破坏肿瘤血管生成,导致肿瘤组织缺氧及营养供应不足,肿瘤组织呈现大面积坏死,这与本实验 HE 染色结果一致。

免疫组化方法具有定位准确、定性灵敏度高等优势,但取材不便,不能动态追踪病变的发展。无创性影像技术 DCE-MRI 能够对肿瘤血管功能进行定量、半定量分析,成为评价肿瘤性能以及恶性肿瘤疗效的有力手段^[11-12]。与传统的 MRI 相比,DCE-MRI 能动态示踪对比剂通过血管的药代动力学变化,连续获得注射前中后一系列磁共振图像。目前 DCE-MRI 结果分

析的模型广泛采用 Tofts 等提出的血流双室动力学模型,输出参数分别是对比剂容积转移常量 K^{trans} 、渗漏空间 V_e 、速度常量 K_{ep} 和增强曲线下初始面积 $iAUC$,其中反映血管渗透性最常用的参数是 K^{trans} ,它代表组织的血流量和渗透性能, $iAUC$ 可以综合反应 K^{trans} , K_{ep} 和 V_e 的变化^[13]。肿瘤血管结构扭曲、不规则,管壁扩张交联,结构异常的新生血管由于内皮细胞自身凹陷及大量膜通道增加,基底膜不连续,与内皮细胞供给营养的外周细胞连接疏松,小分子及蛋白质成分外渗,导致血管渗透性和脆性增加, K^{trans} 、 K_{ep} 等相关参数降低^[14]。Tobias 等^[15]用 DCE-MR 评价唑来膦酸和

舒尼替尼单独治疗和联合治疗的 MDA-MB-231 乳腺癌动物模型,反映血管容积和渗透性的参数如 K_{ep} ,与对照组相比均明显改变。本实验采用 DCE-MRI 评价恩度和阿瓦斯汀的治疗效果,经过靶向治疗后,内皮细胞增殖及 VEGF 介导的血管生长受到抑制,血管通透性降低,对比剂外渗速度减慢, K^{trans} 、 V_e 、 K_{ep} 和 iAUC 数值明显降低,给药组与对照组相比, K^{trans} 及 iAUC 差异均具有统计学意义。可能由于小鼠个体差异及肿瘤细胞坏死等原因,对比剂残留于组织间隙,血管外、细胞外渗透容积及速度造成误差,导致 K_{ep} 和 V_e 差异没有统计学意义。MVD、VEGF 的表达与 MRI 动态参数存在相关性,经恩度及阿瓦斯汀治疗后,VEGF 表达及 MVD 值受影响,血管渗透性降低,动态参数数值也会改变。Foote 等^[16]也证明,在鼻咽癌中高 MVD 病例由于肿瘤血管数目多和管腔大,微血管相对面积和通透性增高,使得对比剂通过血管壁漏出速度加快。Keunen 等^[17]采用阿瓦斯汀对胶质瘤大鼠模型进行抗 VEGF 治疗,治疗后肿瘤血流量和血管体积分别减少了 17% 和 46%,血管渗透参数 K^{trans} 和 K_{ep} 显著降低,其中 K^{trans} 降低了 33%,且 $P < 0.01$ 。

免疫组化结果进一步证实 DCE-MRI 在监测肿瘤血管生成、评价抗肿瘤血管生成药物疗效方面的准确性,DCE-MRI 是非侵袭性影像学监测技术,能实时动态追踪肿瘤的发展变化,及时为临床提供可靠的诊断依据。随着该技术的优化,它将在临床上得到更为广泛的开发和应用。

参考文献:

- [1] Wedam SB, Low JA, Yang SX, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(5): 769-777.
- [2] Choyke PL, Dwyer AJ, Knopp MV. Functional tumor imaging with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2003, 17(5): 509-520.
- [3] Thukral A, Thomasson DM, Chow CK, et al. Inflammatory breast cancer: dynamic contrast-enhanced MR in patients receiving bevacizumab—initial experience[J]. *Radiology*, 2007, 244(3): 727-735.
- [4] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 464-478.
- [5] Jobim FC, Schwartzmann G, Xavier NL, et al. Expression of

- MMP29 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators[J]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2008, 30(6): 287-293.
- [6] Jain RK, Duda DG, Willett CG, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2009, 6(6): 327-338.
- [7] 张特, 刘大海, 王斌, 等. 恩度联合吉西他滨和顺铂二线方案治疗晚期非小细胞肺癌的近期疗效及安全性[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(6): 969-971.
- [8] 刘莺, 刘文静, 王居峰, 等. 恩度联合多西紫杉醇和顺铂一线治疗晚期食管鳞癌的疗效[J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(12): 1426-1429.
- [9] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 174-183.
- [10] LI Y, GUO Z, HAN YP, et al. Expressions of MVD, VEGF, Ki67 in residual prostate cancer after cryoablation[J]. *Clin Oncol Cancer Res*, 2011, 8(1): 27-32.
- [11] Tuncbilek N, Karakas HM, Okten OO. Dynamic contrast enhanced MRI in the differential diagnosis of soft tissue tumors[J]. *Eur J Radiol*, 2005, 53(3): 500-505.
- [12] Marzola P, Degraiss A, Calderan L, et al. Early antiangiogenic activity of U11248 evaluated in vivo by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in an experimental model of colon carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5827-5832.
- [13] Preda A, Novikov V, Moglich M, et al. MRI monitoring of Avastin antiangiogenesis therapy using B22956/1 a new blood pool contrast agent in an experimental model of human cancer[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2004, 20(5): 865-873.
- [14] Turkbey B, Thomasson D, Pang Y, et al. The role of dynamic contrast-enhanced MRI in cancer diagnosis and treatment[J]. *Diagn Interv Radiol*, 2010, 16(3): 186-192.
- [15] Tobias B, Maximilian M, Dorde K, et al. Drug-induced vessel remodeling in bone metastases as assessed by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging and vessel size imaging: a longitudinal In vivo study[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3215-3225.
- [16] Foote RL, Weidner N, Harris J, et al. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 61(3): 745-753.
- [17] Keunen O, Johansson M, Oudin A, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9): 3749-3754.

(收稿日期: 2011-08-18 修回日期: 2011-11-24)