

## 磁共振扩散加权成像监测不同剂量单次照射兔 VX2 肝癌的疗效

吴红珍, 江新青, 吴梅, 陈亮, 魏新华, 郭媛

**【摘要】** 目的:通过 DWI 监测单次不同剂量照射下兔 VX2 肝癌的改变,并与病理比较。方法:40 只兔 VX2 肝癌待肿瘤直径 $\geq 1$  cm 时,随机分为 2 组行立体定向放疗,放疗剂量分别为 10 Gy、20 Gy,单次放疗,放疗后不同时间点 1d、5d、10d、15d 分别行 MR 扫描,测量 VX2 肿瘤、肝脏感兴趣区(ROI)的 ADC 值,并计算两者比值。标本采用 DNA 缺口末端标记(TUNEL)法检测计算凋亡指数,并进行统计学分析。结果:40 只肝癌模型共发现 48 个病灶。放疗后 1d、15d 10Gy 组与 20Gy 组 ADC 比值、凋亡指数的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),放疗后 5d、10d 10Gy 组与 20Gy 组 ADC 比值、凋亡指数有显著性差异( $P<0.05$ ),认为 20Gy 组 ADC 比值显著高于 10Gy 组。结论:DWI 可以从分子水平监测不同剂量放疗后 VX2 肝癌的动态变化,适当提高放疗剂量可以使细胞凋亡增加,细胞坏死、崩解更彻底,但有可能增加了放疗毒性。

**【关键词】** 磁共振成像; 肝肿瘤; 扩散磁共振成像; 模型, 动物; 放射疗法, 辅助

**【中图分类号】** R445. 2; R735. 7; R815 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2014)06-0631-04

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2014.06.013

**Diffusion weighted imaging for monitoring the therapeutic effect of single irradiation with different doses in hepatic VX2 tumors rabbit model** WU Hong-zhen, JIANG Xin-qing, CHEN Liang, et al. Department of Radiology, First Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, P. R. China

**【Abstract】 Objective:** To evaluate the changes of hepatic VX2 tumors in comparison of the results of DWI and pathology after different doses of single stereotactic radiotherapy. **Methods:** When the tumor  $\geq 1$ cm in diameter, 40 hepatic VX2 tumor models were randomly divided into 2 groups for single radiation dose of 10Gy and 20 Gy respectively. MR-DWI scanning was performed and calculated at different time points, one day, 5 days, 10 days, 15 days respectively after radiation therapy. ADC values were measured by choosing the ROI of the VX2 tumor tissue and normal liver tissue respectively, and then the ADC ratio of tumor tissue and normal liver tissue was calculated. The apoptotic index of specimen was calculated by DNA Nick end labeling (TUNEL) method, and statistical analysis was performed. **Results:** Fourty rabbit models of hepatic VX2 tumors were implanted successfully and 48 lesions were detected. One day and 15 days after radiotherapy, there was no significant difference of ADC ratio and apoptotic index between 10Gy and 20Gy group ( $P>0.05$ ), while 5 days and 15 days after radiotherapy, there was significant difference of ADC ratio and apoptotic index between 10Gy and 20Gy group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** MR-DWI may help to reflect the dynamic changes of the molecular level at different time points for hepatic VX2 tumors after radiotherapy. The appropriate increased radiation dose could increase apoptosis, cell necrosis and disintegration could be more thorough, but it may increase radiation injury.

**【Key words】** Magnetic resonance imaging; Liver neoplasms; Diffusion magnetic resonance imaging; Models, animal; Radiotherapy, adjuvant

原发性肝癌治疗效果差,大多数患者就诊时处于晚期,无法手术,随着影像学的发展,三维适形放射治疗(three-dimensional conformal radiation therapy, 3DCRT)俗称光子刀,具有治疗精确性高、疗效高、放疗不良反应少的特点,已被证实是局部照射治疗原发性肝癌安全而有效的<sup>[9]</sup>,然而,在每次放疗剂量的大小上,尚未形成定论。磁共振扩散加权成像(diffusion-weighted imaging, DWI)能反映肿瘤的水分子运动,在检出和监测肿瘤进展方面具有潜在的重要价值。本

研究通过 DWI 来监测单次不同剂量照射下的兔 VX2 肝癌的改变,并与病理、凋亡指数比较分析。

### 材料与方 法

#### 1. 建立动物模型

新西兰大白兔 40 只(由广东省医学动物中心提供),雌雄各半,体重 1.4~2.0 kg,平均体重 1.6 kg。建立 40 只兔 VX2 肝癌模型,使用 Philips 1.5T 磁共振扫描仪行常规 MR 扫描监测肿瘤生长情况,观察肿瘤大小,待肿瘤直径 $\geq 1$  cm 时,送入肿瘤放疗中心,行三维立体定向放疗。

#### 2. 三维立体适形放疗方法

40 只瘤兔随机分为 2 组,放疗剂量分别为 10 Gy、20 Gy,单次放疗,均在 Philip ACQ Sim CT 模拟机定

作者单位:510180 广州,广州市第一人民医院放射科  
 作者简介:吴红珍(1980-),女,广东梅州人,硕士,主治医师,主要从事腹部影像诊断工作。  
 通讯作者:江新青, E-mail:jiangxqw@163.com  
 基金项目:广东省科技厅基金项目(2004B36001043);广州市医药卫生科技项目(20131A011003);广州市医药卫生科技项目(201102A213105);广东省科技计划项目(病毒性肝炎、肝硬化、肝癌 MR 弥散成像的实验与临床研究)

位下连续扫描,靶区层厚 3 mm,将定位 CT 图像通过局域网输送到三维治疗计划设计系统(Pinnacle 3 7.0 版本),勾画出靶区(图 1a,2a)。靶体积的定义:放疗计划 CT 上的可见肿瘤为大体肿瘤体积(gross tumor volume,GTV),勾画 GTV 前参考 MR 图像,确定计划靶体积(planning target volume,PTV),由物理师筛选射线入射方向,调整剂量分布,使 90%等剂量曲线包绕 100% PTV 剂量体积,用 Eleketa Precise 医用直线加速器实现放疗计划,采用 6MV X 线。放疗后送回动物中心饲养。

### 3. MR 扫描方法及图像处理

成功行放疗后,将 10 Gy、20 Gy 剂量组的瘤兔分别于放疗后 1、5、10 和 15d(n=5)行 MR 扫描,检查完毕后统一处死,取病理标本迅速固定于中性甲醛溶液中,石蜡包埋后行 HE 染色、TUNEL 法凋亡检测。

速眠新 0.2 mL/kg 深度麻醉兔后,采用 Philips 1.5T 磁共振扫描仪,使用自制腹带加压固定、膝关节线圈及呼吸门控,行常规 T<sub>2</sub>W 扫描后,行 DWI 扫描,DWI 序列采用 SE-EPI 序列,采用 SENSE 技术,SENSE 成像参数的缩减因子(reductio factor)取值为 2。扫描参数:层厚 2 mm,各向同性,NSA 4 次平均,视野(FOV)150 mm,矩阵 256×256,梯度因子 b 值分别取 100、200、300、400、500、600 s/mm<sup>2</sup>,共扫描时间约为 4 min。

ROI 选取:在不同 b 值的 ADC 图上,取肿瘤横切最大层面瘤体面积作为 ROI,分别测量 5±1 次左右,取平均值。分别测量正常肝脏、VX2 肿瘤感兴趣区(region of interest,ROI)的表面扩散系数(apparent diffusion coefficient,ADC)值。计算不同放疗组的 ADC 比值(VX2 肿瘤/肝脏)。

### 4. 凋亡检测

采用 DNA 缺口末端标记(TUNEL)法检测。高倍镜下在肿瘤组织随机选择 5±1 个视野计数 100 个肿瘤细胞,其中阳性细胞所占百分比即凋亡指数(apoptosis index,AI)。凋亡细胞的判断标准为:胞核或胞核、胞质同时呈棕黄色,有典型凋亡形态特征,包括与周围细胞分离、胞体变小、染色体浓缩、核碎裂或染色质沿核膜呈规则半月形边集或凋亡小体形成,即为凋亡细胞。

### 5. 统计学方法

使用 SPSS 软件 13.0 版进行统计学分析,所有均数采取均数±标准差表示,P<0.05 认为差异有统计学意义,P<0.01 为有显著性差异。

## 结 果

40 只兔均成功建立 VX2 模型,10 Gy 组在放疗后

24 h、3 d、13 d 自然死亡各 1 只,20 Gy 组于放疗后 24 h 死亡 2 只,2 d、8 d、14 d 各死亡 1 只。其余 32 只均生存至 MR 检查结束。各组剩余瘤兔情况如下:放疗后 1 d 10 Gy 组 4 只,20 Gy 组 3 只;放疗后 5 d 两组均为 4 只;放疗后 10 d 10 Gy 组 5 只,20 Gy 组 4 只;放疗后 15 d 两组均为 4 只。

### 1. 放疗前兔 VX2 肝癌 MR 表现

40 只种植成功的瘤兔在扫描过程中呼吸平稳,麻醉深浅适度,基本得到满意的肝脏图像质量。术后 14 d 扫描,发现肿瘤共 48 个,其中 32 只 1 个病灶,8 只 2 个病灶。瘤体最大径分别为(1.27±1.05) cm,平扫 T<sub>2</sub>W 为稍高信号,信号较均匀,部分边界欠清楚,肿瘤均局限于肝组织内,未见明显腹腔积液、胸腔积液及双肺转移灶。

DWI 图像中呼吸伪影轻微,图像显示良好,能清晰勾画出 VX2 瘤体轮廓。取不同 b 值的 DWI 图像上 VX2 瘤均呈明显高信号,与周围正常肝组织形成鲜明的对比,部分病灶呈“灯泡样”改变,在 ADC 图上则相反,病灶 ADC 值低于周围肝实质。

### 2. 放疗后兔 VX2 肝癌 MR 表现

32 只瘤兔肿瘤体积均较前明显增大,且随着时间延长而体积增大更明显。T<sub>2</sub>W 信号不均匀,可见低、高信号影(图 1b、2b),未发现等 T<sub>2</sub> 信号,DWI 图上信号减低,大部分稍高于肝实质(图 1c、2c),部分低于肝实质,ADC 图上则相反(图 1d、2d)。后期病灶转移明显,可见腹腔种植、腹水、胸水及双肺转移。放疗后 1 d、15 d 10 Gy 组与 20 Gy 组 ADC 比值的差异无统计学意义(P=0.139),放疗后 5 d、10 d 10 Gy 组与 20 Gy 组有显著性差异(P<0.01),认为 20 Gy 组 ADC 比值显著高于 10 Gy 组。

表 1 放疗后 2 组的 ADC 比值(VX2 瘤组织/正常肝组织)情况

组别 (d)	ADC 比值		P <sup>▲</sup>
	10Gy 组	20Gy 组	
1	1.184±0.532	1.067±0.653	0.115
5	1.294±0.682	1.555±0.603	0.006
10	1.308±0.510	1.621±0.885	0.023
15	1.010±0.450	0.943±0.390	0.324

注:▲配对 t 检验,放疗后 1、15d 10Gy 组与 20Gy 组 ADC 比值的差异无统计学意义(P>0.05),放疗后 5d、10d 10Gy 组与 20Gy 组 ADC 比值有显著性差异(P<0.01),认为 20Gy 组 ADC 比值显著高于 10Gy 组。

### 3. 病理表现

放疗后 1 d 两组病理表现大致相仿,肉眼观瘤体呈灰白色鱼肉样,质硬,切面呈灰白色,坏死不明显,镜下肿瘤细胞密集,部分细胞呈水肿样改变。放疗后 5~10 d,肉眼观察放疗 20 Gy 组肿瘤血管减少,质较前变软,切开瘤体可见类似脓样的黄白色液体流出,囊变、液化明显(图 2e),随着时间延长囊变范围增大,囊内液体增多。镜下见毛细血管内皮细胞退化,细胞坏死

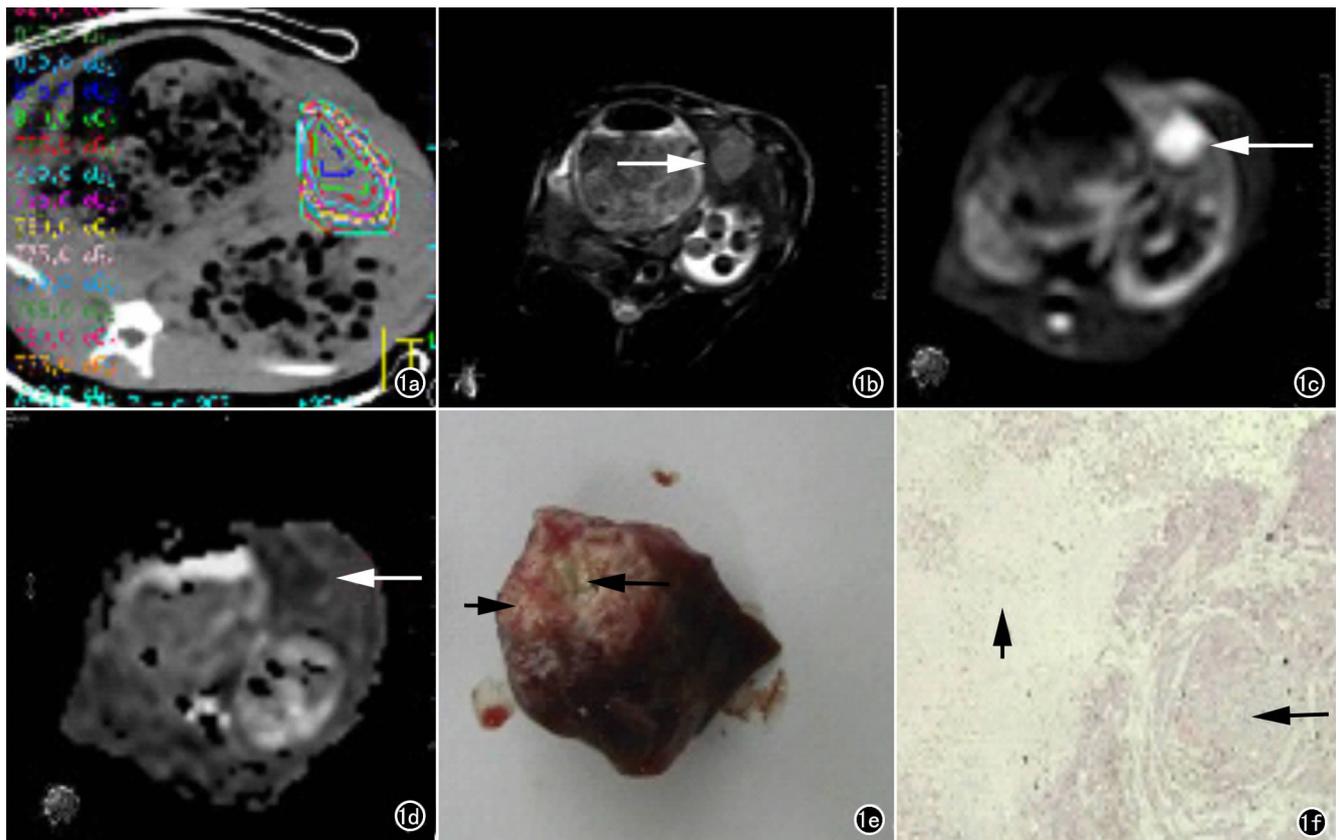


图1 a) 放疗后 5d 10Gy 组; b) T<sub>2</sub>W 肿瘤相对于肝实质呈稍高信号(箭); c) b 值取 500s/mm<sup>2</sup> 时, DWI 上呈较高信号(箭); d) ADC 图呈稍低信号(箭); e) 剖开大体标本见肿瘤中央坏死(箭)、囊变, 周围新鲜瘤组织(短箭); f) HE 染色(×100), 见较明显的肿瘤细胞坏死区(短箭), 间质较多, 肿瘤周边区较多瘤细胞(箭)。

明显, 呈溶解性坏死, 可见空泡征(图 2f), 瘤周可见水肿和炎症反应; 10 Gy 组表面血管增多增粗, 切开瘤体囊变面积小(图 1e)或未见囊变征。镜下肿瘤可见坏死, 肿瘤间质较多(图 1f), 周围瘤细胞较丰富。放疗后 15 d, 两组肿瘤均呈多发结节状, 剖开见瘤体坏死不明显。镜下肿瘤呈浸润性生长, 边界不清, 核大、分裂像多见, 间质少, 瘤周区血管丰富。细胞凋亡检测显示放疗后 1 d、15 d 10 Gy 组与 20 Gy 组凋亡指数的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 放疗后 5 d、10 d 10 Gy 组与 20 Gy 组凋亡指数有显著性差异( $P < 0.01$ ), 认为 20 Gy 组凋亡指数显著高于 10 Gy 组(表 2)。

表 2 放疗后 2 组的凋亡指数(AD)情况

组别 (天)	凋亡指数		P <sup>▼</sup>
	10Gy 组	20Gy 组	
1	0.162±0.272	0.152±0.190	0.924
5	0.328±0.220	0.475±0.294	0.014
10	0.452±0.340	0.701±0.207	0.001
15	0.259±0.206	0.385±0.263	0.104

注: ▼ 两样本 t 检验, 放疗后 1、15d 10Gy 组与 20Gy 组凋亡指数的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 放疗后 5、10d 10Gy 组与 20Gy 组凋亡指数有显著性差异( $P < 0.01$ ), 认为 20Gy 组凋亡指数显著高于 10Gy 组。

## 讨论

VX2 瘤体的血液供应丰富且主要由肝动脉供血, 类似人体肝细胞癌<sup>[2-4]</sup>, 是目前肝癌影像医学基础研究

最常用的模型<sup>[5,6]</sup>。近年来发现 DWI 也可以为肿瘤学研究提供重要信息, 由于肿瘤组织内细胞膜、核膜、胞质内细胞器均为水分子自由弥散的主要障碍<sup>[2,6]</sup>, 因此肿瘤组织内水分子的弥散程度与肿瘤组织的细胞密度、细胞膜通透性、细胞外间隙以及弥散介质的粘滞性均具有显著相关性<sup>[7]</sup>。细胞密度、细胞膜通透性或细胞外间隙等因素的变化均会引起组织内分子弥散的改变, 表现为信号的强度变化, 因此通过研究肿瘤细胞密度、细胞外间隙等微观结构变化, 为 MR 在肿瘤学研究领域开辟了新途径。肿瘤细胞密度是肿瘤的重要特征, 它反映肿瘤细胞的增生、坏死及凋亡情况, 肿瘤增殖越旺盛, 恶性程度越高, 其细胞密度越高, 同时肿瘤细胞的密度还与肿瘤的侵袭及转移特性有关, 肿瘤细胞的密度越高, 其侵袭及转移性越强<sup>[8,9]</sup>。DWI 的扩散敏感度用 b 值来表示, 它代表扩散强度。本实验采用多 b 值扫描, 测量不同 b 值时瘤体的 ADC 值, 并与相应的肝组织 ADC 值之比作为统计学指标, 避免了因采用不同 b 值时导致的 ADC 值的差异。

三维适形放疗是近些年来迅速发展的治疗肝癌的一种新的放疗方法, 可诱导细胞凋亡加速, 它具有定位精确、不良反应少、疗效确切的优势。3D CRT 中晚期肝癌疗效较好, 但如何根据肿瘤体积大小、肝硬化程度和肝癌分期等因素决定个体化的分割剂量和最高剂量

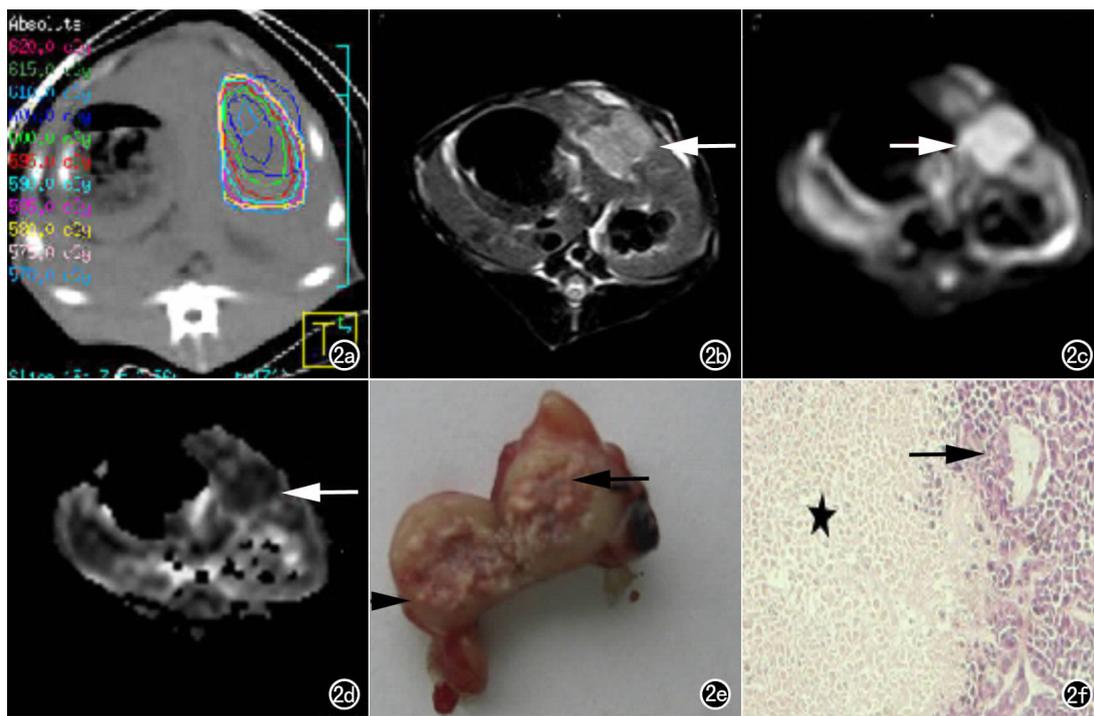


图2 a) 放疗后5d 20Gy组; b)  $T_2W$ 相对于肝实质肿瘤呈稍高信号(箭); c) b值取500s/mm<sup>2</sup>时DWI呈较高信号(箭); d) ADC图呈低信号(箭); e) 剖开大体标本见瘤体坏死明显(箭),囊变面积大,周围新鲜肿瘤组织较少(箭头); f) 光镜下(HE染色,×400)见肿瘤细胞坏死明显,呈空泡状改变,间质少(★),肿瘤周边区瘤细胞(箭)。

尚不确定<sup>[10]</sup>。本实验结果表明放疗后24h,10Gy组与20Gy组ADC比值、凋亡指数差异无统计学意义( $P>0.05$ ),可能是由于放疗并未使细胞立刻诱导细胞凋亡,细胞膜尚保持完整性,尚未引起水分子扩散的变化,镜下肿瘤细胞密度高,部分细胞呈水肿样改变。放疗后5d,10d,10Gy组与20Gy组ADC比值、凋亡指数有显著性差异( $P<0.05$ ),且20Gy组ADC值、凋亡指数高于10Gy组,是由于放疗后瘤细胞和血管内皮细胞受照射后通透性增高,20Gy剂量较高,瘤组织崩解、坏死、液化较完全,加上瘤区血管变窄、闭塞,造成供血障碍等,成为加速瘤组织崩解的因素,细胞膜破裂,瘤体细胞密度减低,瘤体组织水分子扩散能力增加,导致了ADC值升高、凋亡指数升高。放疗后15d,10Gy组与20Gy组ADC比值、凋亡指数差异无统计学意义( $P>0.05$ ),可能由于肿瘤边缘残存细胞生长,细胞密度再度增加,瘤体水分子扩散能力下降,导致两者ADC值、凋亡指数差异无统计学意义。镜下肿瘤呈浸润性生长,边界不清,核大、分裂像多见,间质少,瘤周区血管丰富。因此,放疗后1~15d内,不同剂量单次放疗后瘤体ADC值及凋亡指数升高出现在5~10d时间段,说明此时间段为细胞崩解高峰期,且高剂量使细胞坏死崩解更完全,15d左右由于残存细胞增殖,细胞密度再度增加,剂量高低反而不能引起ADC值及凋亡指数有统计学差异。

本实验认为适当提高放疗剂量可以使细胞崩解更彻底,ADC比值及凋亡指数增加,肿瘤局部控制较佳,但是由于剂量高的同时使VX2瘤兔耐受能力下降,其中20Gy组共死亡5只,10Gy组共死亡3只,可能由于放疗毒性增加,且兔VX2肝癌为移植性肿瘤,并非

真正的肝细胞癌,与人类原发性肝癌有一定的差异,因此能否利用本实验结果来指导临床研究及对肝癌患者的剂量控制,尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈龙华,官键.单纯性适形放疗中晚期原发性肝癌的疗效评价[J].第一军医大学学报,2003,23(1):55-57.
- [2] Blanchard RJ, Grotenhuis I, Lafave JW, et al. Blood supply to hepatic VX2 carcinoma implants as measured by radioactive microspheres[J]. Pro Soc Exp Biol Med, 1965, 118(3):465.
- [3] Chamberlain MN, Gray BN, Heggie JCP, et al. Hepatic metastases—a physiological approach to treatment[J]. Br J Surg, 1983, 70(10):596.
- [4] Blanchard JW, Grotenhuis I, LaFave JW, et al. Blood supply to hepatic VX-2 carcinoma implants as measured by radioactive microspheres[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1965, 118(2):465-468.
- [5] 曾象苏,张宏伟,周康荣,等.供影像诊断实验的大鼠移植性肝癌模型的可行性研究[J].临床放射学杂志,1996,15(1):56.
- [6] Minami Y, Kudo M, Kawasaki T, et al. Transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: usefulness of coded phase-inversion harmonic sonography[J]. Am J Roentgenol, 2003, 180(3):703-708.
- [7] Norris DG. The effects of microscopic tissue parameters on the diffusion weighted magnetic resonance imaging experiment (Review)[J]. NMR Biomed, 2001, 14(2):77-93.
- [8] Vallat-Decouvelaere AV, Dry SM, Fletcher CD. Atypical and malignant solitary fibrous tumors in extrathoracic locations: evidence of their comparability to intra-thoracic tumors[J]. Am J Surg Pathol, 1998, 22(12):1501-1511.
- [9] Tworek JA, Appelman HD, Singleton TP, et al. Stromal tumors of the jejunum and ileum[J]. Mod Pathol, 1997, 10(3):200-209.
- [10] 芦东徽,钱立庭,费振乐,等.三维适形放疗71例中晚期原发性肝癌的疗效观察[J].中华放射肿瘤学杂志,2012,21(2):147-148. (收稿日期:2013-07-31 修回日期:2013-10-28)