

• 实验研究 •

DCE-MRI 评价肿瘤血管生成的实验研究

宋媛, 丁爽, 贾文霄

【摘要】 目的:通过建立裸鼠结肠癌皮下移植瘤模型,分析动态增强核磁(DCE-MRI)结合药代动力学获得的各项定量参数与免疫组化指标的相关性,以探讨 DCE-MRI 评价肿瘤血管生成的应用价值。**方法:**对 22 只裸鼠结肠癌模型连续 3d 行常规 MRI 及动态增强 MRI 扫描,动态观察反映血管功能的各项定量参数,对比剂容积转移常量 K^{trans} ,反流速率常数 K_{ep} ,血管空间容积分数 V_p ,血管外细胞外间隙容积 V_e ,分别在第二天、第三天核磁扫描结束后各处处死 11 只,将其行免疫组化染色检测,微血管密度(MVD)计数和增殖细胞核抗原(PCNA)计分,将 MRI 各参数与免疫组化结果做相关性分析。**结果:** K^{trans} 、 K_{ep} 各时间段间的比较存在统计学差异($P < 0.05$), V_e 、 V_p 各时间段间比较无统计学差异($P > 0.05$)。 K^{trans} 和 K_{ep} 两个参数分别与 MVD 计数表达间有正相关($r = 0.809, P < 0.001$; $r = 0.598, P = 0.014$), K^{trans} 与 PCNA 计分有正相关($r = 0.712, P = 0.006$)。MVD 计数、PCNA 计分两者之间也有正相关($r = 0.687, P = 0.021$)。**结论:**DCE-MRI 技术中的定量参数 K^{trans} 、 K_{ep} 可作为影像生物标记物无创性的评价肿瘤血管生成情况。

【关键词】 磁共振成像; 生物学标记物; 肿瘤移植; 动物实验

【中图分类号】 R445.2; R735.35 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2014)06-0640-04

DOI:10.13609/j.cnki.1000-0313.2014.06.015

Experimental study on DCE-MRI evaluation of tumor angiogenesis SONG Yuan, DING Shuang, JIA Wen-xiao. The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 830063, P. R. China

【Abstract】 Objective: By established subcutaneous colon cancer xenograft model in nude mice, we analyzed the correlation between immunohistochemical indicators and quantitative parameters from dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) combining pharmacokinetic, to explore the application value of DCE-MRI in evaluating tumor angiogenesis. **Methods:** DCE-MRI and conventional MRI were performed for three consecutive days in 22 subcutaneous colon cancer xenograft model. The following parameters were dynamically observed, including microvascular permeability transfer constant (K^{trans}), volume fraction of the plasma space (V_p), extravascular extracellular volume fraction (V_e) and microvascular permeability reflux constant (K_{ep}). Each 11 mice were sacrificed after magnetic resonance scanning in the second day and the third day. Immunohistochemical staining, including microvessel density (MVD) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), was done. Correlation analysis was performed between MRI parameters and immunohistochemistry results. **Results:** There was statistical difference between K^{trans} and K_{ep} in each time period ($P < 0.05$), but there was no statistical difference between V_e and V_p in each time period ($P > 0.05$). K^{trans} and K_{ep} were correlated with the MVD where $r = 0.809$, $P < 0.001$ and $r = 0.598$, $P = 0.014$, respectively. K^{trans} was correlated to PCNA where $r = 0.712$, $P = 0.006$ and MVD was correlated to PCNA where $r = 0.687$, $P = 0.021$. **Conclusion:** The quantitative parameters of K^{trans} and K_{ep} from DCE-MRI can be used as imaging biomarkers to evaluate tumor angiogenesis noninvasively.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Biological markers; Neoplasms transplantable; Animal experimentation

1971 年, Folkman^[1] 提出肿瘤依赖血管生成(angiogenesis)理论,指出丰富的肿瘤血管和肿瘤微血管的高通透性,为肿瘤的生长和远处转移提供营养。因此,如何有效地评价肿瘤血管生成情况成为目前研究的热点。

微血管密度(microvessel density, MVD)是目前反映肿瘤血管生成的“金标准”^[2]。就临床应用来说 MVD 测定方法创伤大,对组织标本无法长期动态、重

复观察等局限性,导致临床应用受到较多限制。因此,寻找一种无创、快捷、可在活体上重复实施并能显示肿瘤全貌的检查方法用于评价肿瘤血管生成和预测预后,具有临床实用意义。MRI 动态增强扫描作为一种非创伤性的评价肿瘤微血管生成的技术,可以从细胞分子水平获取多个反映肿瘤血流动力学、细胞代谢障碍等的影像生物标记物^[3],所以 MRI 技术在评价肿瘤血管生成状态方面具有极大优势。本文就 22 例结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型,探讨 MRI 动态增强扫描(dynamic contrast-enhanced MRI, DCE-MRI)结合药代动力学获得反映血管通透性的各项定量参数在评价肿瘤血管生成方面的应用价值。

作者单位: 830063 乌鲁木齐,新疆医科大学第二附属医院(宋媛); 830002 新疆医科大学第六附属医院(宋媛); 830054 新疆医科大学第一附属医院影像中心(丁爽); 830063 新疆医科大学第二附属医院(贾文霄)

作者简介: 宋媛(1981—),女,新疆乌苏人,硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤影像诊断工作。

通讯作者: 贾文霄, E-mail: jwxxj@sina.com

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划项目(201333104)

材料与方法

细胞系及实验动物:使用人结肠癌 HT-29 细胞株(由中科院上海生命科学研究院细胞库提供)。健康 BALB/c-nu 裸鼠 22 只,鼠龄 4~5 周,雌性,体重 14~16 g。所有动物实验有关的操作程序均得到新疆医科大学实验动物使用与伦理管理委员会批准。

主要试剂及设备:鼠抗人原始造血细胞 CD34 单克隆抗体,鼠抗人 PCNA 抗体,二步免疫组化检测试剂盒(PV-6002),西门子 1.5T Tim Avanto 磁共振扫描仪,25 mm 实验动物专用 4 通道 MR 显微线圈。

建立裸鼠结肠癌皮下移植瘤模型:严格实验室操作,使用人结肠癌 HT-29 细胞株,配置成瘤细胞浓度为 1×10^6 个/mL 的悬液 0.1~0.2 mL,接种于裸鼠右后肢皮下。成瘤后由同一测量者用游标卡尺测量肿瘤的最大直径 a 和最小直径 b,根据公式 $V = ab^2\pi/6$ 计算肿瘤体积大小,建立模型成功的标准为皮下移植瘤体积达到 200 mm³。

对建模成功的 22 只结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型,连续 3d 行常规 MRI 检查及动态增强 MRI 扫描检查,随机选择其中 11 只在第二天 MRI 检查结束后处死,剩余的在第 3 天行 MRI 检查结束后均处死。裸小鼠处死后取出局部肿瘤组织(尽可能与 MR 扫描层面一致),在 10%中性福尔马林液固定后,常规石蜡包埋、切片,并进行免疫组化染色检测。

MRI 扫描及 DCE-MRI 扫描:实验使用 1.5T Tim Avanto 磁共振扫描仪,对裸鼠行轴面扫描。TSE-T₁WI 序列(TR 280 ms,TE 18 ms),TSE T₂WI 序列(TR 3000 ms,TE 82 ms),层数 10 层,层厚 2 mm,层间距 0.0 mm,视野 60~70 mm。DCE-MRI 扫描采用 3D-T₁WI-GRE 序列,扫描参数为:TE 1.28 ms,TR 9.0 ms,层数 16 层,层厚 2 mm,层间距 0.4 mm,视野 62 mm,采集次数(NSA)1 次,矩阵 128×94,100 个动脉时相,即连续无中断扫描 100 个动态图像,扫描范围从移植瘤至双肾水平,扫描时间 7 分 26 秒。使用钆喷酸葡胺注射液(Gd-DTPA),把 Gd-DTPA 稀释在 0.9%的生理盐水配制成浓度为 0.06 mmol/L 的对比剂应用于 DCE-MRI 扫描,注射剂量是 0.30 mmol/kg;在 DCE-MRI 基础扫描 15 个动态时相之后注射对比剂,选择裸鼠尾静脉做为注射部位,由同一人按照相同的速度人工推注。

DCE-MRI 图像处理及分析:将 DCE-MRI 图像输入 Biomap 软件进行后处理,在腹主动脉划取感兴趣区(ROIR2)(图 1),通过 Biomap 软件获得裸鼠的动脉输入功能函数(arterial input function, AIF),在载瘤裸鼠移植瘤划取感兴趣区 R1(图 2),在 AIF 基础上

Biomap 软件自动计算出移植瘤中反映有关微血管通透性的各定量参数,即血管空间容积分数(V_p)、单位容积组织血管外细胞外间隙容积(V_e)、对比剂从血浆空间渗漏到血管外细胞外间隙(EES)的体积转运常数(K^{trans}),并根据公式计算出对比剂从 EES 返回到血浆空间的速率常数,即反流速率常数(K_{ep}),计算公式为

$$K_{ep} = \frac{K^{trans}}{V_e}$$

病理标本观察方法:微血管(MVD)的定量判定标准采用目前国际上常用的 Weidner^[4]改进式方法。以染成棕色的单个血管内皮细胞或内皮细胞束作为 1 条血管数,具有厚的平滑肌层或管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管排除在外。以此标准随机记录 5 个视野内的微血管数,最后取其平均数作为该切片的 MVD 计数。

PCNA 计分:在 5 个观察视野内各计数 200 个细胞,根据阳性细胞所占的百分比分为 4 个等级。阳性细胞<25%为 0 分,阳性细胞数 26%~50%之间为 1 分,阳性细胞数 51%~75%之间为 2 分,阳性细胞数>76%为 3 分。再根据染色强度分为 4 个等级。0 分无染色,1 分细胞淡黄色,2 分细胞棕黄色,3 分细胞呈现棕褐色;最后将阳性细胞的百分比与细胞染色强度的两个分数相乘得到的乘积称为 PCNA 计分,作为最终免疫学染色评分标准。

3. 统计学分析

统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件对所有原始数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较不同时间段 DCE-MRI 各项定量参数的变化,若不满足方差齐性条件则用非参数秩和检验。免疫组化 MVD 计数及 PCNA 计分两者之间进行相关性分析,将 MRI 获得的参数(K^{trans} 、 K_{ep} 、 V_e 、 V_p)与免疫组化指标进行相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 常规 MRI 扫描结果

结肠癌裸鼠皮下移植瘤 T₁WI 上呈稍低信号(图 3),T₂WI 上呈稍高信号(图 4),肿瘤形态较规则,边界清楚。

2. 病理学检查结果

免疫组化染色结果:采用 CD34 抗体对结肠癌裸鼠皮下移植瘤染色,低倍镜下可见大量核大、染色深的肿瘤细胞巢;肿瘤细胞巢内部及周围可见散在新生血管分布,高倍镜下新生血管呈棕褐色不规则形,管壁厚薄不均(图 5)。11 只载瘤裸鼠在观察第二天处死后,所测 MVD 计数为 10.6 ± 1.8 ,其余在观察第三天处死后,所测 MVD 计数为 12.2 ± 1.6 。两天的 MVD

计数之间比较,无统计学差异($P=0.429$)。

采用 PCNA 抗体染色,阳性表达在细胞核,所有切片均可见阳性细胞的染色,呈棕褐色或棕黄色颗粒(图 6)。观察第 2 天及第 3 天的 PCNA 阳性细胞百分比分别为 76.5% 和 87.5%,随着观察时间的延长,PCNA 阳性细胞百分比有所增加,但两天之间结果无统计学差异($P=0.352$)。

免疫组化 MVD 计数与 PCNA 计数的相关性分析:将免疫组化 MVD 计数及 PCNA 计分两者之间进行相关性分析,两者存在正相关($r=0.687, P=0.021$)。

3. DCE-MRI 各参数的测定结果

22 只结肠癌裸鼠皮下移植瘤均获得较为满意的 DCE-MRI 原始图像及 CTC 曲线。DCE-MRI 各参数的测量结果具体数据见表 1。

表 1 结肠癌裸鼠皮下移植瘤 DCE-MRI 扫描中各参数的测量结果

时间	第 1 天	第 2 天	第 3 天	F 值	P 值
例数	22	22	11		
$K^{trans}(s^{-1})$	0.023 ± 0.007	0.032 ± 0.009	0.035 ± 0.005	9.404	<0.001
V_e	0.299 ± 0.082	0.369 ± 0.114	0.250 ± 0.109	6.129*	0.105
V_p	0.360 ± 0.050	0.413 ± 0.164	0.469 ± 0.229	5.676*	0.129
$K_{ep}(s^{-1})$	0.078 ± 0.023	0.087 ± 0.022	0.182 ± 0.052	25.255*	<0.001

注: * 代表 H 值。

随着观察时间的延长, K^{trans} 值及 K_{ep} 值逐渐增大,不同时间段之间存在统计学差异($F=9.404, P=0.000; H=25.255, P=0.000$)。 K_{ep} 值在第三天增长幅度较大,不同时间段之间(除了第一天与第二天之间, $P=0.378$)均存在统计学差异。 V_e 、 V_p 在不同时间段间比较均无统计学差异。

4. 病理学检查结果与 DCE-MRI 各参数间的相关

性分析

将 DCE-MRI 扫描中获得的 4 个定量参数与病理学检查结果进行相关性分析(表 2)。结果显示 DCE-MRI 定量参数 K^{trans} 值与 MVD 计数及 PCNA 计分均具有正相关性,相关系数分别为 0.809、0.712,存在统计学差异;定量参数 K_{ep} 仅与 MVD 计数之间有正相关性,相关系数为 0.598。 V_p 、 V_e 与病理学检查结果之间不存在相关性。

表 2 DCE-MRI 各参数与免疫组化染色的相关性分析

免疫组化	DCE-MRI 参数			
	$K^{trans}(s^{-1})$	V_e	V_p	$K_{ep}(s^{-1})$
MVD 计数				
r 值	0.809	-0.252	0.379	0.598
P 值	<0.001	0.320	0.231	0.014
PCNA 计分				
r 值	0.712	-0.323	0.062	0.426
P 值	0.006	0.221	0.640	0.377

讨 论

1971 年,Folkman^[1]指出肿瘤一旦发生,任何肿瘤细胞数量的增加都必须以聚集于肿瘤的新生血管生成为先导,肿瘤在无血管生成条件下呈缓慢的线性生长,直径一般 $<2\text{ mm}$,而当有血管生成时肿瘤呈指数生长。血管生成在肿瘤的生长和转移中起着非常重要的作用。因此,研究肿瘤血管生成的过程和机制,对肿瘤防治都有重要的临床意义。

近年来,探讨肿瘤分子生物学因素与影像之间关系的研究逐渐成为影像学研究的重要方向^[5]。目前,DCE-MRI 结果分析的模型广泛采用 Tofts^[6]提出的

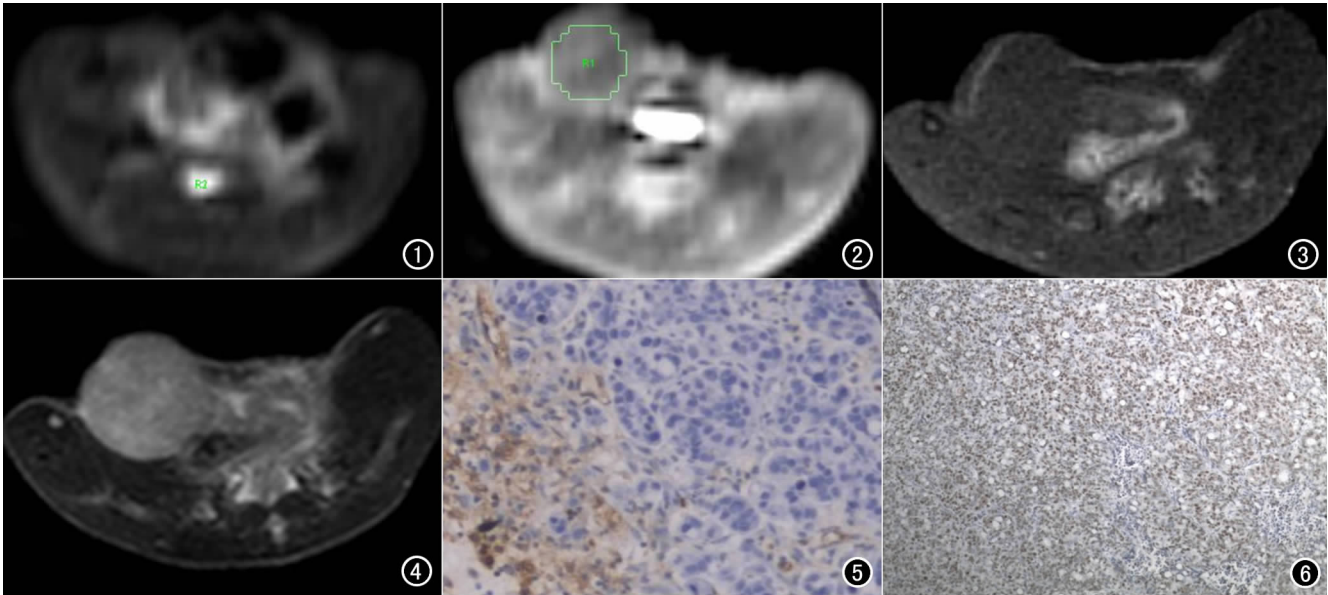


图 1 载瘤裸鼠腹主动脉感兴趣区 R2。 图 2 载瘤裸鼠移植瘤感兴趣区 R1。 图 3 结肠癌裸鼠皮下移植瘤 T₁WI 图像 (TR 280ms,TE 18ms)。 图 4 结肠癌裸鼠皮下移植瘤 T₂WI 图像 (TR 3000ms,TE 82ms)。 图 5 移植瘤 CD34 染色,血管内皮细胞成棕黄色,肿瘤细胞边缘见新生血管分布($\times 200, SP$)。 图 6 移植瘤 PCNA 染色,阳性表达在细胞核,呈棕褐色或棕黄色($\times 200, SP$)。

两室腔药代动力学模型,描述了对比剂在血管空间和血管外细胞外间隙之间转运的动力学过程。采用 DCE-MRI 及药代动力学交换常数 K^{trans} 值可获得肿瘤局部血流速度、血容量、微血管通透性等多参数评估抗肿瘤血管生成情况,同时观察肿瘤体积大小,为研究肿瘤血管生成提供重要信息^[7]。因此,应用动态增强的影像学方法评价肿瘤血管生成状态是可行的,且具有一定的优势。

K^{trans} 、 K_{ep} 反映了血管渗透性和组织灌注,同时可以反映肿瘤内新生血管形成的程度^[8]。其中,最重要最常用的定量参数是 K^{trans} ,它取决于组织血流量、内皮细胞表面积大小和血管内皮细胞通透性。 K^{trans} 值高时,预示着血流高灌注量和高渗透性, K^{trans} 值低时,预示着血流低灌注量和低渗透性。因此当 K^{trans} 值增大,肿瘤血流灌注增加,微血管通透性增高,为肿瘤细胞生长提供了更充足的营养物质,肿瘤新生血管数目增多,即 MVD 计数增高;同时也为肿瘤细胞的恶性增殖提供丰富的血供及营养物质,从而加速了肿瘤细胞的恶性增殖,使得 PCNA 计分和阳性细胞百分比增高。也就是说,PCNA 参与了肿瘤细胞增殖及血管新生的调控,PCNA 计分可以间接反映肿瘤血管的生成状态,PCNA 计分越大,细胞增殖活性越高,间接表示肿瘤微血管密度越大。这也解释了移植瘤的影像参数 K^{trans} 与 MVD 计数、PCNA 计分表达之间存在正相关。因此,PCNA 可以作为细胞增殖的一个客观生物学指标^[9]。

当前,国外学者越来越重视对 K_{ep} 的研究,应用 K_{ep} 值的改变监测抗肿瘤血管药物的临床应用疗效。学者^[10]认为肿瘤细胞对血管的过度刺激,会导致血管结构的异常,血管呈“渗漏性”,通透性明显增高,表达为对比剂的高交换。因此当基础 K_{ep} 值越高,在血浆与血管外细胞外间隙之间对比剂或药物的交换率越高,药物疗效会更好,说明它在药物输送中具有重要作用^[11]。至于 K_{ep} 值与 PCNA 计分之间无相关性,考虑可能与样本含量较少、血流灌注在时间和空间上分布不平衡有关,需要扩大样本量及药物干预实验进一步验证并寻求原因。

Tofts^[12] 及国内一些学者^[13] 的研究结果均显示 K^{trans} 与 K_{ep} 值一般都较稳定,后期我们将继续进行抗肿瘤血管药物治疗裸鼠结肠癌的实验研究,对其 K^{trans} 与 K_{ep} 值的稳定性等内容进一步验证。

定量参数 V_p 值、 V_e 值的均数在 3 天间的比较均无统计学差异,且均与 MVD 计数、PCNA 计分之间不存在相关性,考虑可能与小鼠个体差异、对比剂残留于组织间隙不能及时排出有关,是否能监测药物疗效有待后期药物干预实验的进一步研究。

本研究载瘤裸鼠在观察的第 2 天、第 3 天处死后

所得到的 MVD 计数及 PCNA 计分均随着观察时间的延长有所增加,但是两天之间数据的比较并无统计学差异。考虑这可能是由于观察的间隔时间太短,观察的天数也相对较短,肿瘤内新生血管生成还没有来得及产生较多的变化反映在病理指标上,但在动态增强的磁共振成像中,反映血管功能的参数 K^{trans} 、 K_{ep} 已经有了一定的改变,且第 2 天与第 3 天两天之间参数值比较有统计学意义,说明影像学指标对肿瘤血管生成的改变反映更灵敏,影像学方法评价肿瘤血管生成更实用。

综上所述,DCE-MRI 反映血管功能的参数 K^{trans} 与 K_{ep} 可以用来评价肿瘤血管生成情况,还能间接反映肿瘤细胞增殖活性,是很有前途的影像学生物标记物。DCE-MRI 为抗肿瘤血管生成药物疗效的监测提供有效的评价手段。

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumorangiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] 丁洪基. 肿瘤微血管密度检测及其临床病理意义[J]. 诊断病理学杂志, 2008, 15(3): 241-243.
- [3] Perini R, Choe R, Yodh AG, et al. Non-invasive assessment of tumor neovasculature: techniques and clinical applications[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4): 615-630.
- [4] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
- [5] 刘莉, 吴宁. MRI 在肿瘤血管生成研究中的初步应用[J]. 中国肿瘤影像学, 2009, 2(2): 108-111.
- [6] Tofts PS, Brix G, Buckley DL, et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast enhanced T₁-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols[J]. J Magn Reson Imaging, 1999, 10(3): 223-232.
- [7] Yankeelov TE, Gore JC. Dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging in oncology: theory, data acquisition, analysis, and examples[J]. Curr Med Imaging Rev, 2009, 3(2): 91-107.
- [8] Padhani AR, Miles KA. Multiparametric imaging of tumor response to therapy[J]. Radiology, 2010, 256(2): 348-364.
- [9] 高平, 李巍, 鲍雷. 大肠癌组织中增殖细胞核抗原(PCNA)和微血管密度(MVD)的表达及临床意义[J]. 中国医药指南, 2008, (16): 545-546.
- [10] 史红媛, 田迎, 罗松, 等. 动态增强 MRI、扩散加权成像及光学成像联合监测抗血管生成治疗后肿瘤反应的动物实验研究[J]. 中华放射学杂志, 2012, 46(3): 269-274.
- [11] 李春媚, 陈敏, 李飒英, 等. 3.0T MR 动态增强扫描定量分析诊断前列腺癌的初步研究[J]. 中华放射学杂志, 2011, 45(1): 50-54.
- [12] Tofts PS. Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging[J]. J Magn Reson Imaging, 1997, 7(1): 91-101.
- [13] 史红媛, 田迎, 胡秋菊, 等. 动态增强磁共振评价重组人血管内皮抑素抑制人肺癌裸鼠皮下移植瘤的血管生成[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(1): 19-23.

(收稿日期: 2013-08-23 修回日期: 2014-01-20)