

研究论文

MSCT评价兔VX₂乳腺种植瘤抗血管生成治疗的研究

卞婷婷 徐娜 冯国全 邹天宇 雷振*

(辽宁医学院附属第一医院放射科, 锦州 121001)

摘要 探讨多层螺旋CT(multi-slice spiral computed tomography, MSCT)灌注成像与肿瘤血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的相关性以评估兔VX₂乳腺种植瘤抗血管生成治疗的疗效。将69只乳腺VX₂瘤兔于肿瘤生长2周后随机分为对照组(生理盐水)、恩度组(Endostar)、CEF组[环磷酰胺(Cyclophosphamide C)、表阿霉素(Epirubicin E)和5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil F)]、联合治疗组(Endostar和CEF)。治疗2周后对瘤兔进行MSCT灌注扫描, 获得血流量(blood flow, BF)、血容量(blood volume, BV)、平均通过时间(mean transit time, MTT)及表面通透性(permeability surface, PS)等灌注参数均值; 随后取瘤组织进行免疫组化及Western blot检测VEGF蛋白表达情况。结果显示, 对照组、CEF组、恩度组、联合治疗组BF、BV和PS均与VEGF表达结果呈正相关($R_{\text{对照组}}=0.896、0.680、0.765, R_{\text{CEF组}}=0.877、0.876、0.852, R_{\text{恩度组}}=0.804、0.924、0.888, R_{\text{联合治疗组}}=0.780、0.735、0.744; P<0.05$), MTT均与VEGF表达结果呈负相关($R_{\text{对照组}}=-0.591, R_{\text{CEF组}}=-0.678, R_{\text{恩度组}}=-0.793, R_{\text{联合治疗组}}=-0.687; P<0.05$)。MSCT灌注参数与VEGF蛋白表达具有相关性, MSCT灌注参数可以反映肿瘤治疗后免疫组化与分子水平VEGF表达的变化, MSCT可以在体无创评价兔VX₂乳腺种植瘤抗血管生成治疗的疗效。

关键词 多层螺旋CT; 乳腺种植瘤; 血管内皮生长因子

The Evaluation of Anti-angiogenic Treatment for Implanted Rabbit VX₂ Breast Tumor Using Multi-slice Spiral Computed Tomography

Bian Tingting, Xu Na, Feng Guoquan, Zou Tianyu, Lei Zhen*

(Department of Radiology, the First Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

Abstract The objective of this work was to investigate the correlation between multi-slice spiral computed tomography (MSCT) perfusion imaging and VEGF for assessing targeted anti-angiogenesis therapy on an implanted rabbit VX₂ breast tumor model. 69 female rabbits were randomly assigned to one of the 4 groups and received treatment accordingly: control (saline), Endostar, neoadjuvant chemotherapy (CEF) and combination therapy (Endostar and CEF). After 2 weeks of treatment, MSCT perfusion scanings were performed for all rabbits and information about blood flow (BF), blood volume (BV), mean transit time (MTT) and surface permeability (PS) was collected. Then tumor tissue was dissected for immunohistochemistry and Western blot for VEGF expression.

收稿日期: 2013-08-08 接受日期: 2013-11-06

*通讯作者。Tel: 0416-4197557, E-mail: leizhen2004@163.com

Received: August 8, 2013 Accepted: November 6, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-416-4197557, E-mail: leizhen2004@163.com

网络出版时间: 2013-12-23 14:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0243.html>

There was a positive correlation between VEGF expression and BE, BV, or PS level ($P < 0.05$) and a negative correlation between VEGF expression and MTT level for all 4 groups ($P < 0.05$). Therefore, MSCT can be used as a non-invasive approach to evaluate the effect of anti-angiogenic therapy for implanted rabbit VX₂ breast tumors.

Key words multi-slice spiral computed tomography (MSCT); implanted breast tumor; vascular endothelial growth factor

乳腺癌的靶向治疗已经成为乳腺癌治疗领域的研究热点,是继手术、放疗和化疗三大传统治疗模式之后的一种全新的治疗模式^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是介导肿瘤血管生成的一个关键调节剂,有利于肿瘤生长、浸润及转移^[2],是靶向抗血管生成治疗的主要靶点之一^[3]。多层螺旋CT(multi-slice spiral computed tomography, MSCT)灌注成像是一种功能影像学显像方式,能够量化早于病理学改变的肿瘤组织灌注状态^[4-5],这些优势使MSCT在评估和预测肿瘤抗血管生成疗效方面逐渐受到重视^[6]。但MSCT灌注成像对靶向抗血管生成治疗疗效的评价在乳腺肿瘤研究方面尚未完全明确。本实验建立兔VX₂乳腺种植瘤模型并对其行靶向抗血管生成治疗,初步探讨MSCT灌注参数与VEGF表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 兔VX₂乳腺种植瘤动物模型制作

纯种雌性新西兰大白兔69只,月龄3~4个月,体重2.0~2.8 kg,辽宁医学院实验动物中心提供。实验动物操作遵循实验动物福利要求并获辽宁医学院伦理委员会批准。于传种兔后肢注射VX₂细胞株悬液,2周后于传种兔后肢取VX₂肿瘤制成组织块悬液,抽取悬液1 mL以与皮肤呈约45°进针至乳头下将其注射于兔乳晕边缘^[7];2周后肿瘤生长达研究所需大小。

1.2 瘤兔分组及治疗

1.2.1 实验分组 将瘤兔随机分四组:对照组(生理盐水, $n=16$)、CEF组(环磷酰胺C、表阿霉素E和5-氟尿嘧啶F, $n=16$)、恩度组(Endostar, $n=18$)和联合治疗组(Endostar+CEF, $n=18$)。各组均治疗2周后对瘤兔乳腺肿瘤行灌注扫描。

1.2.2 瘤兔治疗药物、给药剂量及方法 所有药物均耳缘静脉滴注。(1)恩度(重组人血管内皮抑制素注射液,山东先声麦得津生物制药有限公司,国药准字号S20050088)每日给药一次,给药2周,给药剂

量0.256 mg/kg; (2)环磷酰胺C(江苏恒瑞医药股份有限公司)、表阿霉素E(浙江海正药业股份有限公司)、5-氟尿嘧啶F(上海旭东海普药业有限公司), CEF首日一次给药,以后继续给0.9%生理盐水每日50 mL,持续2周,给药剂量环磷酰胺61.8 mg/kg、表阿霉素6.2 mg/kg、5-氟尿嘧啶45 mg/kg; (3)联合治疗组CEF首日一次给药后再给恩度,恩度每日给药,给药2周,剂量同上; (4)对照组每日给0.9%生理盐水50 mL,持续2周。

1.3 瘤兔治疗后CT灌注成像

1.3.1 CT灌注设备与试剂 Lightspeed16螺旋CT机、ADW4.2工作站、Perfusion 3体部肿瘤灌注软件(美国GE公司)、高压注射器、22 G×25 mm留置针(深圳安特高科实业有限公司)、欧乃派克(Omnipaque, 300 mgI/mL,上海通用电气药业有限公司)。

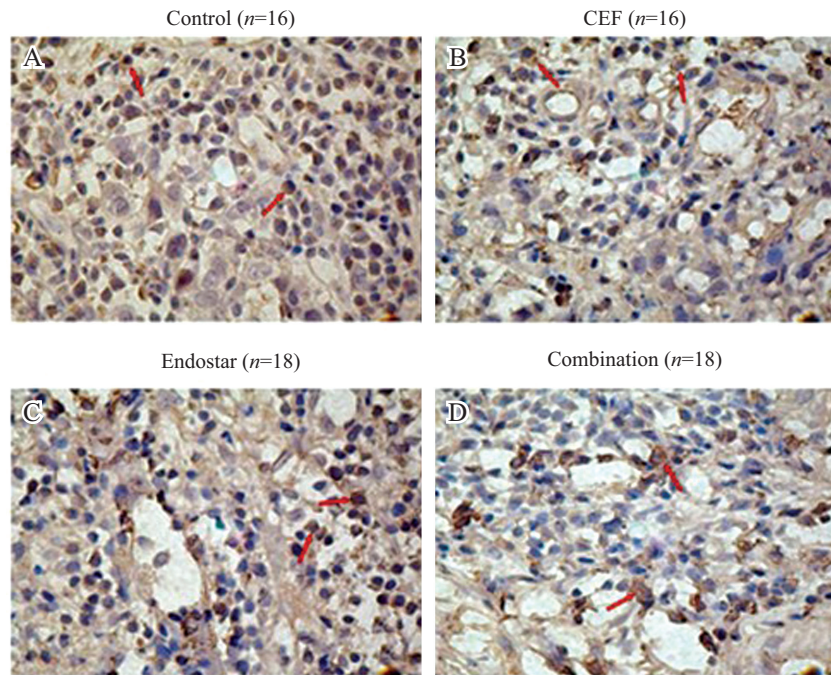
1.3.2 CT灌注方法及图像后处理 先常规CT轴位平扫进行肿瘤定位,扫描参数:管电压80 kV,管电流120 mAs,矩阵512×512,FOV 12 cm×12 cm~16 cm×16 cm,层厚2.5 mm。应用多层同层动态CT灌注扫描技术,取肿瘤最大层面相邻4层为灌注层面,灌注参数:层厚5 mm,管电压80 kV,管电流130 mAs,矩阵512×512,0.5 mL/s流率注入对比剂3 mL,延迟5 s开始灌注扫描,共扫描50 s。确定肿瘤所在层面主动脉为输入动脉,取主动脉、肿瘤组织为感兴趣区(ROI)。CT灌注参数包括血流量(BF)、血容量(BV)、平均通过时间(MTT)及表面通透性(PS)。

1.4 免疫组化检测乳腺种植瘤VEGF表达

CT灌注成像后处死瘤兔取瘤组织, SABC(streptavidin-biotin complex)法进行VEGF(VEGF单克隆抗体,浓度1:100,武汉博士德生物工程公司)免疫组化染色,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。采用刘佩芳等^[8]半定量方法对VEGF免疫组化染色结果进行分析并评分。

1.5 Western blot检测乳腺种植瘤VEGF表达

CT灌注成像后处死瘤兔并取瘤组织进行VEGF



A: 对照组, 箭头示棕褐色颗粒为VEGF于肿瘤细胞胞浆内表达(400×); B: CEF组, 箭头示浅褐色颗粒为VEGF于肿瘤细胞胞浆内表达(400×); C: 恩度组, VEGF在胞浆内表达消失或箭头示浅褐色颗粒(400×); D: 联合治疗组, VEGF在胞浆内表达消失或颗粒染色变浅(400×)。

A: control group, red arrow indicates brown particles with VEGF expression in cytoplasm of tumor cell (400×); B: CEF group, red arrow indicates light brown particles with VEGF expression in cytoplasm of tumor cell (400×); C: endostar group, VEGF expression in the cytoplasm disappeared or red arrow indicates light brown granules (400×); D: combined treatment group, VEGF expression in the cytoplasm disappeared or shallow granular staining (400×).

图1 兔VX₂乳腺种植瘤治疗后免疫组化检测VEGF蛋白表达结果

Fig.1 Expression of VEGF in implanted rabbit VX₂ breast cancer tumor after anti-angiogenic treatment by immunohistochemistry

Western blot检测, 凝胶成像系统下观测相对光密度 D 值, 对 D 值进行统计学分析。使用超声波破碎仪击打粉碎肿瘤组织块后离心取上清液, 完成灌胶和电泳, 转膜, 将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 先后加入一抗及二抗(武汉博士德生物工程公司), 反复洗膜, 显色。

1.6 统计学分析与处理

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析。治疗后组间VEGF蛋白表达结果及灌注参数分别进行单因素方差分析, 灌注参数与VEGF表达结果进行Pearson相关分析并计算 R 值, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺种植瘤治疗后VEGF蛋白表达的检测

2.1.1 免疫组化检测VEGF蛋白表达 对照组、CEF组、恩度组、联合治疗组VEGF表达均值分别为: 10.99 ± 0.24 、 6.58 ± 0.42 、 4.68 ± 0.68 、 1.37 ± 0.37 , 差异有统计学意义($P < 0.05$), 各治疗组VEGF蛋白表达依次递减(图1)。

2.1.2 Western blot检测VEGF蛋白的表达 经3次

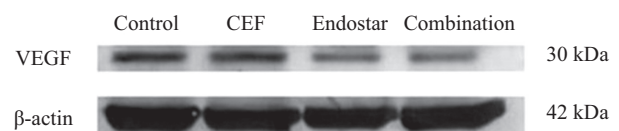


图2 兔VX₂乳腺种植瘤治疗后Western blot检测VEGF蛋白表达结果

Fig.2 Expression of VEGF in implanted rabbit VX₂ breast cancer tumor after anti-angiogenic treatment by Western blot

Western blot检测VEGF蛋白表达, 可见对照组、CEF组、恩度组、联合治疗组VEGF蛋白表达相对 D 值分别为 0.34 ± 0.01 、 0.22 ± 0.02 、 0.12 ± 0.02 、 0.04 ± 0.02 , 差异有统计学意义($P < 0.05$), 各治疗组VEGF蛋白表达依次递减(图2)。

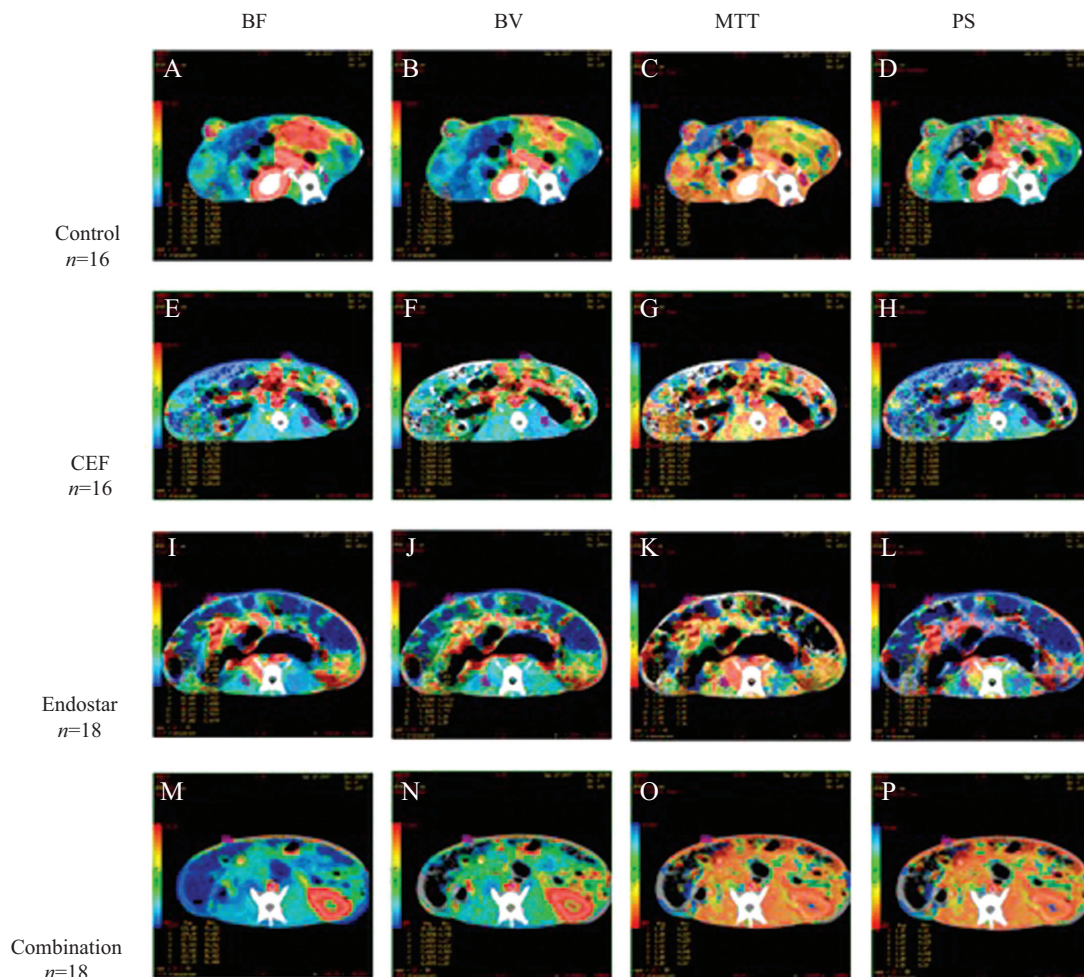
2.2 乳腺种植瘤治疗后CT灌注参数

对照组、CEF组、恩度组、联合治疗组各组BF、BV、MTT及PS均值两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 各治疗组BF、BV和PS均值依次递减, 而MTT均值依次增高(表1和图3)。

表1 乳腺种植瘤治疗后CT灌注参数结果

Table 1 CT perfusion measures of implanted rabbit VX₂ breast cancer tumor after anti-angiogenic treatment

	血流量[mL/(100 mL·min)] BF [mL/(100 mL·min)]	血容量(mL/100 mL) BV (mL/100 mL)	平均通过时间(s) MTT (s)	表面通透性[mL/(100 mL·min)] PS [mL/(100 mL·min)]
Control group	355.29±28.86	40.91±3.36	2.52±0.93	26.70±3.15
CEF group	156.46±15.93	5.61±2.51	6.07±2.69	5.53±2.18
Endostar group	91.43±13.21	2.89±0.33	9.95±2.64	1.82±0.20
Combined treatment group	31.65±5.04	1.31±1.06	12.47±0.22	1.17±1.04
<i>F</i>	1 547.36	601.84	41.89	500.03
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000



对照组灌注图A~D: 图A(BF)、图B(BV)、图D(PS)瘤区见红色灌注区域, 图C(MTT)瘤区见蓝色灌注区域; CEF组灌注图E~H: 图E(BF)红色灌注区轻度减小, 图F(BV)、图H(PS)瘤区热区减小, 图G示MTT延长; 恩度组灌注图I~L: 图I(BF)、图J(BV)、图K(MTT)、图L(PS)均见瘤区蓝色区域范围增加; 联合治疗组灌注图M~P: 图M(BF)、图N(BV)、图P(PS)见瘤区热区减小, 图O示MTT延长, 瘤区蓝色范围增加。

Control group perfusion maps A~D: (A) BF, (B) BV, (D) PS, see the red tumor perfusion area, (C) MTT see the blue tumor perfusion area; CEF group perfusion maps E~H: (E) BF mild reduction of red perfusion area, (F) BV, (H) PS reduced tumor perfusion area, (G) MTT the longer MTT; Endostar group perfusion maps I~L: (I) BF, (J) BV, (K) MTT, (L) PS all with expanded blue perfusion area; Combined treatment group perfusion maps M~P: (M) BF, (N) BV, (P) PS shown the reduced tumor perfusion area and (O) MTT longer MTT and expanded blue tumor area.

图3 兔VX₂乳腺种植瘤治疗后CT灌注结果

Fig.3 CT perfusion results of implanted rabbit VX₂ breast cancer tumor after anti-angiogenic treatment

表2 乳腺种植瘤治疗后CT灌注参数与VEGF免疫组化表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of CT perfusion measures and immunohistochemical expression of VEGF in implanted rabbit VX₂ breast cancer tumor after anti-angiogenic treatment

灌注参数 Perfusion measures	对照组 Control group	CEF组 CEF group	恩度组 Endostar group	联合治疗组 Combined treatment group
BF	0.896	0.877	0.804	0.780
BV	0.680	0.876	0.924	0.735
MTT	-0.591	-0.678	-0.793	-0.687
PS	0.765	0.852	0.888	0.744

2.3 乳腺种植瘤治疗后CT灌注参数与VEGF免疫组化表达结果相关性分析

对照组、CEF组、恩度组、联合治疗组BF、BV、PS均与VEGF表达呈正相关($R_{\text{对照组}}=0.896$ 、 0.680 、 0.765 , $R_{\text{CEF组}}=0.877$ 、 0.876 、 0.852 , $R_{\text{恩度组}}=0.804$ 、 0.924 、 0.888 , $R_{\text{联合治疗组}}=0.780$ 、 0.735 、 0.744 ; $P<0.05$), MTT均与VEGF表达呈负相关($R_{\text{对照组}}=-0.591$, $R_{\text{CEF组}}=-0.678$, $R_{\text{恩度组}}=-0.793$, $R_{\text{联合治疗组}}=-0.687$; $P<0.05$)(表2)。

3 讨论

大量肿瘤新生微血管生成是肿瘤发生发展的基础, 肿瘤细胞分泌多种血管内皮细胞增殖因子来刺激肿瘤血管形成, VEGF是最关键的促血管生成因子。大量研究表明, VEGF在肿瘤血管形成中发挥中心作用, 被认为是最有效和最重要的血管生成信号^[9]。本研究各组VEGF蛋白表达依次减低, 尤以恩度和联合治疗组减低明显, 提示不同治疗组肿瘤血管生成均发生了改变, 即产生了不同的抗血管生成作用, 从分子水平提示了兔VX₂乳腺种植瘤靶向抗血管生成治疗的有效性, 即靶向抗血管生成药物可以有效抑制肿瘤细胞VEGF蛋白高表达, 进而抑制血管内皮细胞增殖、迁移及基底膜降解, 降低微血管通透性, 阻断肿瘤新生血管形成并最终限制肿瘤生长。因此, VEGF可成为抗血管生成疗效的评判标准, 为MSCT评价兔VX₂乳腺种植瘤抗血管生成疗效奠定分子基础。

本研究各组BF、BV、PS依次递减而MTT依次递增, 提示MSCT灌注参数与各组治疗后肿瘤血管生成的不同生物学表现相吻合, CT灌注成像能够揭示肿瘤局部组织微循环分布及灌注状态的改变。灌注参数的变化尤以恩度和联合治疗组变化明显, 提示靶向抗血管生成治疗能够有效阻断VEGF表达, 减

少其对血管内皮细胞的刺激, 直接抑制肿瘤血管生长并发生减低肿瘤血管密度的生物学效应, 导致肿瘤新生血管生成减少并降低肿瘤血管通透性。对照组因生理盐水不能有效控制VEGF表达, 与上述两组结果产生了鲜明对比。CEF组各灌注参数也发生了一定变化, 这可能与其对肿瘤细胞的直接杀伤及微量的抗血管生成作用有关, 但其未能直接抑制VEGF而使抑制肿瘤血管生成的效应并不明显。因此, MSCT灌注成像提供了一种非侵袭的监测抗血管生成疗效的方法, 可以在抗血管生成治疗后验证肿瘤灌注和肿瘤血管生成情况, 为MSCT在临床乳腺肿瘤靶向抗血管生成治疗疗效进行量化评价提供了实验依据。

MSCT灌注成像是指在静脉注射对比剂的同时对选定层面进行连续多次同层扫描, 以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线, 根据该曲线利用不同的数学模型计算出BF、BV、MTT、PS等参数, 对以上参数进行图像重组和伪彩染色处理得到血流灌注图、血容积图、对比剂平均通过时间图、表面通透性图等, 以此来评价组织器官的灌注状态, 反映组织器官的血流动力学及功能改变。目前开展的主要有脑部、颌面颈部肿瘤、乳腺肿瘤、软组织肿瘤、肺、肝、胃、胰腺、肾脏等的灌注成像。本研究显示, VEGF免疫组化表达与灌注参数BF、BV、PS均呈正相关而与MTT呈负相关, 提示MSCT灌注参数所反映出的抗血管生成治疗疗效与病理学检测相符, 即灌注参数的变化可以反映肿瘤组织VEGF表达的变化情况。BF、BV可以反映组织局部血液的动力灌注状态和血容量, MTT指血液流经动脉并通过组织毛细血管到达静脉并流出的平均时间, PS能够揭示局部血管内皮细胞屏障作用破坏的程度, 这是CT灌注成像监测肿瘤新生血管数量和功能改变的基础。靶向抗血管生成治疗不仅阻断了肿瘤细胞诱导

毛细血管形成建立血液循环的过程,也削弱了VEGF增加肿瘤血管通透性的功能,上述灌注参数不仅正确反映出了这些变化并与VEGF表达结果相一致,说明它们能够将微观检测信息进行宏观转化。VEGF表达结果与灌注参数的一致性提示我们应用灌注成像可以获得反映肿瘤血管生成功能特性的量化值,因此在乳腺肿瘤灌注参数与抗血管生成治疗疗效间建立某种线性关系成为可能,这也为临床进一步应用MSCT评价乳腺癌不同治疗方案抗血管生成治疗疗效提供了实验基础。

常规CT主要反映组织器官大体形态学的变化,而MSCT灌注成像在显示形态学变化的同时反映生理功能的改变^[10]。因此,MSCT灌注成像作为一种无创的功能成像方式能获得并定量分析乳腺肿瘤灌注参数,可以间接了解乳腺肿瘤血管生成情况进行抗血管生成治疗疗效评估。但是肿瘤血管生成也是一个极其复杂的病理过程,毛细血管内皮细胞增生可能生成也可能不生成功能性的管腔化血管,而MSCT灌注成像参数可能只对功能性即可灌注的毛细血管敏感,只能近似地反映肿瘤的血管生成。因此,对乳腺肿瘤MSCT灌注成像结果的解释仍需结合多种影像学检查手段及形态学特征进行综合分析。

参考文献 (References)

- 1 陈其田,程晶. 乳腺癌的分子靶向治疗新进展. 药品评价 (Chen Qitian, Cheng Jing. Advances of molecular targeted therapy in the treatment of breast cancer. Drug Evaluation) 2012; 9(21): 23-7.
- 2 Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: Progress with anti-VEGF treatment with large molecules. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6(9): 507-18.
- 3 谢伟敏,黄银梅. 血管内皮抑素治疗恶性肿瘤的研究进展. 中国癌症防治杂志(Xie Weimin, Huang Yinmei. Research development of endostatin in the treatment of malignant tumors. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment) 2009; 1(3): 279-81.
- 4 Bisdas S, Konstantinou GN, Lee PS, Thng CH, Wagenblast J, Baghi M, *et al.* Dynamic contrast-enhanced CT of head and neck tumors: Perfusion measurements using a distributed-parameter tracer kinetic model. Initial results and comparison with deconvolution-based analysis. Phys Med Biol 2007; 52(20): 6181-96.
- 5 Goetti R, Reiner CS, Knuth A, Klotz E, Stenner F, Samaras P, *et al.* Quantitative perfusion analysis of malignant liver tumors: Dynamic computed tomography and contrast-enhanced ultrasound. Invest Radiol 2012; 47(1): 18-24.
- 6 Schegerin M, Tosteson AN, Kaufman PA, Paulsen KD, Pogue BW. Prognostic imaging in neoadjuvant chemotherapy of locally-advanced breast cancer should be cost-effective. Breast Cancer Res Treat 2009; 114(3): 537-47.
- 7 姚青,陈江浩,凌瑞,王岭,杨华,张聚良. 组织块悬液注射法制作兔VX₂乳腺癌模型. 中国癌症杂志(Yao Qing, Chen Jianghao, Ling Rui, Wang Ling, Yang Hua, Zhang Juliang. Establishment of VX₂ breast carcinoma model in rabbit by injection of tissue mass suspension. China Oncology) 2004; 14(1): 22-7.
- 8 刘佩芳,鲍润贤,牛哟,于咏. 乳腺良恶性病变动态增强MRI表现特征与血管生成相关性的初步研究. 中华放射学杂志(Liu Peifang, Bao Runxian, Niu Yun, Yu Yong. Angiogenesis and dynamic contrast enhanced MRI of benign and malignant breast lesions: Preliminary results. Chinese Journal of Radiology) 2002; 38: 967-72.
- 9 Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 2003; 3(6): 401-10.
- 10 Jiang HJ, Zhang ZR, Shen BZ, Wan Y, Guo H, Li JP. Quantification of angiogenesis by CT perfusion imaging in liver tumor of rabbit. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2009; 8(2): 168-73.