实验研究

# DCE-MRI评价中药康 莱特抑制人结肠癌 裸鼠皮下移植瘤血 管生成的研究\*

### 新疆医科大学第二附属医院影像中 心(新疆 乌鲁木齐 830063)

陈星	赵丽萍	王 红
王云玲	邓佳敏	贾文霄

【摘要】目的 探讨动态增强磁共振评价 中药康莱特抑制人结肠癌裸鼠皮下移植瘤 血管生成的应用价值。方法 建立人型结 肠癌HT-29裸鼠皮下移植瘤模型48只,随 机分为实验组(n=24)和对照组(n=24), 实验组每日给予康莱特0.5mg/(20g.d) 腹腔注射,对照组每日腹腔注射等量生 理盐水,分别于治疗前、治疗后7天、14 天、21天进行DCE-MRI扫描,并且在治疗 后的3个时间节点扫描结束后分别处死8 只取肿瘤组织进行病理免疫组化检查, 动态观察并分析反映肿瘤血管功能的参 数值9对比剂容积转运常数K<sup>trans</sup>、速率常 数Kep、血管外细胞外容积分数Ve、血浆空 间容积分数Vp,并与同期肿瘤组织MVD表 达结果进行相关性分析。结果 随时间延 长,实验组Ktrans及Kep值逐渐下降,对照 组Ktrans及Kep值逐渐上升,均存在统计学 差异(P<0.05)。治疗前实验组与对照组 K<sup>trans</sup>及K<sub>ep</sub>值比较差异无统计学意义,治 疗后的3个时间节点实验组Ktrans及Kep值分 别明显低于对照组,均存在统计学差异(P <0.05)。实验组及对照组给药后三个时 间节点的Ktrans及Kep值均与MVD呈正相关(P 均<0.05)。结论康莱特对人结肠癌异体 移植瘤具有良好的抑制作用, DCE-MRI技 术所得到的动态变化的Ktrans及Kep值可被 看做是评价结肠癌早期化疗效果的定量指 标。

【关键词】动态增强磁共振;移植瘤;康 菜特;结肠癌;裸鼠 【中图分类号】R246.5 【文献标识码】A 【基金项目】国家自然科学基金项目 (编号: 81360214) DOI:10.3969/j.issn.1672-5131.2016.09.001

通讯作者: 贾文霄

# The Value of Dynamic Contrast-enhanced MRI in Assessing Anti-angiogenic Effect of KLT in Human Colon Cancer Transplanted Subcutaneously in Nude Mice\*

CHEN Xing, ZHAO Li-ping, WANG Hong, et al., Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Autonomous Region, China

[Abstract] Objective To investigate the applicated value of dynamic contrast-enhanced MRI(DCE-MRI) in evaluating anti-angiogenic effect of Chinese medicine KLT in human colon cancer transplanted subcutaneously in nude mice. *Methods* 48 human colon cancer models of HT-29 which made by nude mice were established, and divided into experimental group and control group randomly, peritoneal cavities of the experimental group were injected KLT with dose 0.5mg/20g per day, and the control group were injected with the same volumes of saline in the same locations, DCE-MRI were performed before therapy and 7 days, 14 days, 21 days after treatment. 8 mouses were sacrificed respectively after MRI scanning in three time points, and pathological immunohistochemical examination were done. The following parameters(Ktrans, Kep, Veand  $V_{P}$  which reflecting the tumor blood vessel functions were observed dynamically. The correlations between the changes of tumor tissue MVD and parameter values at each time point were analyzed. **Results** K<sup>trans</sup> and K<sub>ep</sub> of the experimental group decline and the control group rise gradually with the extended of time, the statistical differences in the two groups were existed(P<0.05). There were no statistically difference between K<sup>trans</sup> and Kep of the two groups before treatments, however, Ktrans and Kep of the experimental group were obviously lower than the control group at each time point after treatments which were statistically significances(P<0.05). K<sup>trans</sup> and K<sub>ep</sub> of the two groups after treatments were positively correlated with corresponded MVD at each time point(P <0.05). Conclusion KLT could inhibit the development of human colon cancer xenograft significantly, the dynamic changes of K<sup>trans</sup> and K<sub>ep</sub> values of DCE-MRI technology can be considered as a quantitative indexes for evaluating early colon cancer chemotherapy.

**[Key words]** Dynamic Contrast–enhanced MRI; Transplanted Tumor; Kang Laite; Colon Cancer; Nude Mice

肿瘤的生长与血管生成关系密切,通过检测肿瘤血管生成,有助 于判断抗肿瘤药物疗效。相关文献<sup>[1]</sup>证实,动态增强磁共振(DCE-MRI) 技术获得的定量参数可以作为影像生物学标记物无创性的评价肿瘤血 管生长。中药康莱特(kang laite,KLT)是从中药薏苡仁中提取的一种 脂肪乳剂,有效成分是薏苡仁油,康莱特对多种移植性肿瘤及人体癌 细胞移植于裸鼠的癌体均有较明显的抑癌作用,目前应用分子影像学 的方法评价康莱特治疗肿瘤的报道比较少,本实验通过动态增强磁共 振定量分析康莱特对裸鼠结肠癌皮下移植瘤血管生成的抑制作用,探 讨DCE-MRI对评价抗肿瘤血管生成药物疗效的价值。

# 1 材料与方法

**1.1 实验动物及细胞株** SPF级BALB/C-nu裸鼠48只,雌雄各半, 6~8周,18~20g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,符合医 学动物实验标准。人型结肠癌HT-29细胞株,购于中科院上海细胞库, 经传代扩增后配制成细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>个/m1的悬液。本实验经新 疆医科大学实验动物使用与伦理 管理委员会批准。

1.2 结肠癌裸鼠移植模型建 立及分组 取细胞悬液0.2mL接 种于每只裸鼠左后肢背部皮下, 将48只裸鼠随机分为2组,每组 24只,肿瘤接种后第15天开始给 药,实验组腹腔注射康莱特注射 液0.5mg/(20g.d)(浙江康莱特药 业有限公司生产),连续给药21 天,对照组腹腔注射等量生理盐 水,连续注射21天。

1.3 DCE-MRI扫描设备及方法 采用飞利浦1.5T常规临床超导MRI 扫描仪,线圈采用实验动物专用 的25mm专用显微线圈,常规进行 SE-T1WI、SE-T2WI扫描,冠状位 扫描, 层厚2.5mm, 层间距1mm, 层数10层。MR动态增强扫描采用 T1WI-DCE-MRI快速梯度回波序 列,选择冠状面进行扫描,80个 动态时相,基线扫描8~10个动态 时相, 层厚0.7mm, 无间隔扫描, 通过尾静脉注射钆喷酸葡胺注射 液(Gd-DTPA)。参考相关文献<sup>[2]</sup>, 将Gd-DTPA与0.9% 的生理盐水配 制成浓度为0.06mmo1/L的溶液, 注射剂量为0.30mmo1/Kg,由同一 个人经尾静脉匀速推注。

1.4 DCE-MRI图像处理与数 据分析 将DCE-MRI图像转化格 式后输入Biomap后处理软件内, 在腹主动脉强化最明显处取感兴 趣区R1和R2, 合并之后由Biomap 软件获得裸鼠的动脉输入功能函 数(arterial input function, AIF),在移植瘤强化最明显处划 取感兴趣区R3(图1),在AIF的基 础上自动生成反映肿瘤微血管通 透性的各项参数,即对比剂容积 转运常数K<sup>trans</sup>,血管外细胞外容 积分数V。,血浆空间容积分数V。, 并根据公式(Ken=K<sup>trans</sup>/Ve)计算出速 度常数Ken(图2)。

1.5 病理组织学检查及分 48只裸鼠肿瘤组织进行常规 析 石蜡包埋及切片,用CD31单克隆 抗体(购自中杉金桥)进行标记, 实验步骤参照SP试剂盒说明书。 判定标准采用目前国际上常用的 Weidner改进式方法: 即先在低倍 镜(×100)下扫视整个玻片,找出 微血管密度最大的"热点"后, 变换高倍镜(×200)观察并计数。 任何被抗体染成棕色的单个细胞 或细胞团(图3),只要它与周围的 微血管、肿瘤组织及其他结缔组 织成分有清楚的分离,都作为1条 可计数的血管,排除肿瘤内硬化 区以及与肿瘤交界处软组织内的 微血管及具有厚的平滑肌或管腔 面积 > 8个红细胞直径的血管。以 此为标准记录5个视野内的微血管 数,取其平均数作为该肿瘤组织 的MVD计数。

1.6 统计学分析 影像学 检查所有的计量数据均以表格 形式录入数据库,采用(x ± s) 的形式来处理,组间分析根据方 差齐性情况采用方差分析或非参 数检验。在病变不同阶段的影像 学指标与相应阶段的病理结果之 间做相关分析。所有数据均采用 SPSS18.0软件分析,检验水准 α=0.05。

### 2 结 果

2.1 DCE-MRI各参数的测定 结果 随观察时间延长,对照组 K<sup>trans</sup>及K<sub>ep</sub>值逐渐增加,存在统 计学差异(F=16.749 P=0.000; F=25.907 P=0.000)(表1),实验 组K<sup>trans</sup>及K<sub>ep</sub>值逐渐降低,存在统 计学差异(F=21.096 P=0.000; F=19.024 P=0.000)(表2),治疗 后各时间节点实验组K<sup>trans</sup>及K<sub>ep</sub>较 对照组明显减小,差异有统计学 意义(P<0.05),两组Ve及Vp组间 及组内差异均无统计学意义(P> 0.05)。

表1	对照组裸鼠皮	下移植瘤DCE-MRI不同	同时间段各参	、数测量结果 [Ktrans、	$K_{en}$ ( × 10 <sup>-3</sup> )]
----	--------	---------------	--------	-----------------	----------------------------------

参数	0	7	14	21	F	Р
例数	24	24	16	8	-	-
Ktrans(/s)*	1. $553 \pm 0.420$	3. $284 \pm 0.404$	5.734 $\pm$ 0.583	7.694 $\pm$ 0.858	16.749	0.000
Kep(/s)*	5.509 $\pm$ 1.005	9.924 $\pm$ 1.959	16.412 ± 2.641	24. $309 \pm 4.843$	25.907	0.000
Ve	0.281 ± 0.056	0. $337 \pm 0.042$	0.356 $\pm$ 0.058	0. $323 \pm 0.054$	7.812	0.372
Vp	0.405 ± 0.055	$0.408 \pm 0.036$	0.411 ± 0.064	$0.400 \pm 0.050$	0.093	0.964

注: \*代表SNK法两两比较各时间节点间P<0.05。

表2 实验组裸鼠皮下移植瘤DCE-MRI不同时间段各参数测量结果[K<sup>itans</sup>、K<sub>op</sub>(×10<sup>-3</sup>)]

参数	0	7	14	21	F	Р
例数	24	24	16	8	-	-
Ktrans(/s)*	1. $527 \pm 0.421$	$1.228 \pm 0.358$	0.867 ± 0.256	0. 570 $\pm$ 0. 081	21.069	0.000
Kep(/s)*	5.711 ± 1.147	4.544 ± 1.859	2.747 $\pm$ 1.287	2. $3884 \pm 0.809$	19.024	0.000
Ve	$0.278 \pm 0.082$	0. $307 \pm 0.076$	0. $349 \pm 0.091$	0. $385 \pm 0.287$	2.078	0.111
Vp	0. 404 $\pm$ 0. 047	0. 407 $\pm$ 0. 052	$0.390 \pm 0.048$	0. $432 \pm 0.035$	1.330	0.272

注: \*代表SNK法两两比较各时间节点间P<0.05。

表3 裸鼠皮下移植瘤治疗后DCE-MRI各参数与免疫组化MVD的相关性分析

分组	参数	73	7天		14天		21天	
		r	Р	r	Р	r	Р	
对照组	Ktrans	0.874	0.005	0.739	0.036	0.813	0.014	
	Kep	0.738	0.036	0.734	0.038	0.789	0.020	
	Ve	0.929	0.092	-0.542	0.165	-0.619	0.102	
	Vp	0.667	0.071	-0.594	0.121	-0.098	0.817	
实验组	Ktrans	0.727	0.041	0.730	0.040	0.847	0.008	
	Kep	0.802	0.017	0.744	0.034	0.745	0.034	
	Ve	-0.158	0.709	-0.736	0.067	-0.714	0.086	
	Vp	-0.044	0.918	0.264	0.527	-0.654	0.079	



图1 裸鼠结肠癌皮下移植瘤DCE-MRI图像及ROI的选取位置。图2 Biomap软件获得的肿瘤Ktrans等参数。图3 免疫组化CD31抗体染色,高倍镜(10×20)下显示肿瘤内部被染成棕黄色的血管内皮或内皮细胞束(箭头所指)。

2.2 MVD计数 通过微血 管计数发现,对照组三个时间 节点的MVD为(16.4±0.7)条/ 每个视野、(20.4±0.9)条/每 个视野、(24.4±1.0)条/每个 视野,实验组三个时间节点的 MVD为(8.3±0.6)条/每个视 野、(6.0±0.4)条/每个视野、 (5.0±0.7)条/每个视野。

2.3 DCE-MRI各参数与MVD结 果的相关性分析 将DCE-MRI获得 的4个定量参数与病理免疫组化 结果进行Pearson相关性分析(表 3),结果显示,实验组和对照组 各时间节点的K<sup>trans</sup>和K<sub>ep</sub>与MVD之间 均有良好相关性,两组各时间节 点的V<sub>e</sub>及V<sub>p</sub>与MVD之间不存在相关 性。

#### 3 讨 论

在肿瘤的生长、浸润和转移

过程中,血管新生是非常重要的 环节。本世纪70年代,Folkman<sup>[3]</sup> 首先研究发现了新生血管的生成 在肿瘤生长中的重要作用,认为 肿瘤的生长和转移很大程度上依 赖肿瘤血管形成,实体肿瘤长到 2~3mm时,如果没有新生血管形 成,肿瘤细胞即进入休眠状态。 肿瘤的血管结构具有特异性,包 括血管形态不规则、结构扭曲和 管壁扩张,内皮细胞自身凹陷不 牢靠,基底膜不连续、出现裂 隙,导致血管结构脆性大和高的 渗透性。

近年来,抗肿瘤血管治疗以 及对其新生过程进行干预已成为 肿瘤治疗的一个新的方向。康莱 特是临床上常用的抗肿瘤药物, 具有确切的抗肿瘤作用,曾有文 献报道<sup>[4-5]</sup>,康莱特在体外具有抑 制血管生成的作用,细胞周期研 究发现康莱特注射液具有使细胞 周期阻滞于G/M期,阻止肿瘤细胞 有丝分裂抑制肿瘤细胞的增殖导 致细胞凋亡,并能逆转多药耐药 的肿瘤细胞,明显抑制新生血管 的生成,加快血管进入衰退期。

现阶段,评价肿瘤血管新生 大多采用肿瘤组织MVD计数,但是 临床上不能对MVD进行实时、动 态、重复的观察,而且MVD对肿瘤 代谢和血管早期变化不敏感,限 制了其在临床上的应用<sup>[6]</sup>。DCE-MRI是最常见的无创性评价肿瘤组 织血流灌注状态的MR技术<sup>[7]</sup>,通 过跟踪MRI造影剂药代动力学可以 对微血管结构及功能进行非侵袭 性定量分析,达到无创、实时、 定量评价抗肿瘤药物的早期疗效 的目的,能够为临床提供可靠的 影像学依据。

DCE-MRI结果分析模型采用 Tofts提出的两室腔药代动力学 模型, 描述了对比剂在血管空间 和血管外细胞外间隙之间的转运 的动力学过程, K<sup>trans</sup>是造影剂从 血管空间渗漏到血管外细胞外间 隙的容积转运常数、Ken是速率常 数、Ve是血管外细胞外容积分数、 V<sub>p</sub>是血浆空间容积分数,K<sup>trans</sup>和K<sub>ep</sub> 反映了血管渗透性和组织灌注, 可同时反映肿瘤内新生血管的程 度<sup>[8]</sup>, K<sup>trans</sup>值高时说明血流高灌 注量和高渗透性, K<sup>trans</sup>值低时说 明血流低灌注量和低渗透性<sup>[9]</sup>。 参数测量时选取肿瘤组织ROI非常 关键<sup>[10]</sup>,鉴于肿瘤组织是非均质 的,应用抗肿瘤血管药物治疗后 会加重肿瘤的非均质性,因此本 实验肿瘤组织ROI选取时避开坏死 区,选取肿瘤强化最明显处,也 是血管最密集区域,尽量与计数 时取肿瘤内微血管密度最高处做 到一致。

本组资料显示随观察时间延 长,对照组裸鼠肿瘤的K<sup>trans</sup>、K<sub>ep</sub> 值逐渐升高,推测对照组肿瘤血

管数量逐渐增多,血管通透性增 高,表现为对比剂高交换,与同 期病理结果MVD具有良好的正相关 性,这与文献报道一致<sup>[11-12]</sup>。治 疗组K<sup>trans</sup>、Kep值逐渐减低,推测 康莱特能抑制肿瘤血管新生,促 进血管正常化,因此治疗后肿瘤 血管渗透性降低,对比剂交换减 慢,与同期病理结果MVD具有良 好的正相关性。实验组治疗后各 个节点K<sup>trans</sup>、Kep较对照组明显减 低,反映了化疗药物抑制肿瘤血 管的程度,这与Hirashima<sup>[13]</sup>等 的研究结果是一致的。本组资料 显示V<sub>e</sub>、V<sub>e</sub>值的变化没有规律性, 在两组组间及组内差异均没有统 计学意义,并且与病理MVD无相关 性,这与Franiel等<sup>[14]</sup>报道的V。与 K<sup>trans</sup>有相关性及史红媛等<sup>[15]</sup>报道 的抗肿瘤血管药物可能导致V。值减 低不符,分析原因可能与裸鼠个 体差异较大、肿瘤坏死、肿瘤内 部非均一性有关,此外还可能与 图像分析及参数测量存在一定误 差有关,因此,研究V。和V。是否能 反映化疗药物抑制肿瘤血管的程 度还需进一步深入。

综上所述,DCE-MRI参数中的 K<sup>trans</sup>和K<sub>ep</sub>可以作为有效的生物学 标记物评估肿瘤血管生长及受抑 制的情况,有利于评价肿瘤的早 期疗效,为临床治疗提供依据, 同时DCE-MRI检查技术具有无创性 的、无电离辐射、重复性好的特 点,在临床上具有广阔的应用前 景。

# 参考文献

- [1] 丁爽, 贾文霄, 徐永华, 等. DCE-MRI 联合DWI评价肿瘤血管生成的实验 研究[J]. 中国医学计算机成像杂 志, 2012, 18(6): 542-547.
- [2] 丁爽, 许永华, 贾文霄, 等. 对比剂剂 量对裸鼠DCE-MRI成像及定量参数 测定影响的研究[J]. 实用放射学杂 志, 2013, 29 (2): 119-123.
- [3] Folkman J. Tumorangiogensis: the rapeuticimplications [J]. N Engl Med, 1971, 285 (21): 1182-1186.
- [4] 杜萌,丁安伟,陈彦.薏苡仁化学成分 及其防治肿瘤作用机制研究[J].吉 林中医药,2012,2(32):195-201.
- [5] 李瑛, 石廷章.康莱特诱导肿瘤细胞 凋亡的实验研究[J].中国肿瘤临 床, 2002, 29 (12): 869-873.
- [6] 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, 3: 241-243.
- [7] 彭艳霞, 蔡宏民, 崔春艳, 等. DWI 及动态增强MRI鉴别乳腺病变的 对比研究[J]. 中国CT和MRI杂 志, 2014, 11 (1): 1-4.
- [8] Padhani AR, Miles KA. Mulfiparametric imaging of tumor response to therapy[J]. Radiology, 2010, 256 (2): 348-364.
- [9] 宋媛, 丁爽, 贾文霄, 等. DCE-MRI评价 肿瘤血管生成的实验研究[J]. 放射 学实践, 2014, 06(15): 640-643.
- [10] 吴继雄,李海云,石安斌,等. MR动态 增强及减影成像鉴别乳腺良恶性病 变的相关研究[J].中国CT和MRI杂 志,2015,13(5):71-73.
- [11]Ferrier MC, Sarin H, Fung SH, et al. Validation of dynamic contrast-enhanced

magnetic resonance imagingderived vascular permeability measurements using quantitative autoradiography in the RG2 rat brain tumor model[J]. Neoplasia, 2007, 9(7): 546-555.

- [12] Niermann KJ, Fleischer AC, Huamani J, et al. Measuring tumor perfusion in control and treated murine tumors: correlation of microbubble contrast enhanced sonography to dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging andfluorodeoxyglucose positron emission tomography [J]. J Ultrasound Med, 2007, 26 (6): 749-756.
- [13] Hirashima Y, Yamada Y, Tateishi U, et al. Pharmacokinetic parameters from 3-Tesla DCE-MRI as surrogate biomarkers of antitumor effects of bevacizumab plus FOLFIRI in colorectal cancer with liver metastasis [J]. Int J Cancer, 2012, 130 (10): 2359-2365.
- [14] Franiel T, Hamm B, Hricak H. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and pharmacokinetic models in prostate cancer [J]. Eur Radiol, 2011, 21 (3): 616-626.
- [15] 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.

(本文编辑:黎永滨)

【收稿日期】2016-08-04