

论 著

氢质子磁共振频谱活体检测结肠癌耐药性的初步探讨*

1. 广州医科大学附属广州市第一人民医院南沙医院医学影像科

2. 广州医科大学附属广州市第一人民医院南沙医院总院病理科

3. 广州医科大学附属广州市第一人民医院南沙医院总院分子实验室 (广东 广州 511457)

4. 中山大学肿瘤防治中心病理科 (广东 广州 510060)

谢 琦¹ 杨逸铭¹ 吴敏仪¹张鼎旋¹ 雷正贤¹ 张 静⁴许 进² 钟维德³

【摘要】目的 探索¹H-MRS活体检测结肠癌耐药性的可能性。**方法** 5只耐药(耐5-FU)与5只不耐药人类结肠癌SW480荷瘤裸鼠于肿瘤直径大于1.5cm时行¹H-MRS检查,随后处死荷瘤鼠,切下肿瘤检测其PKC、P-gp、MRP1蛋白表达(Western Blot),观察肿瘤凋亡(TUNNEL法)。分析结肠癌耐药性与¹H-MRS检测代谢物、肿瘤耐药基因表达、肿瘤凋亡的相关性。**结果** 不耐药组人类结肠癌SW480裸鼠肿瘤的cho、lac、Lip及mI峰/cr面积比较耐药组人类结肠癌SW480/5-FU裸鼠增加,差别有统计学差异($P < 0.05$)。耐药组PKC、P-gp、MRP1蛋白表达明显高于不耐药组,差别有统计学差异($P < 0.05$)。在TUNNEL检测切片上,两组肿瘤组织均可见肿瘤细胞凋亡,两者差别无统计意义($P > 0.05$)。肿瘤代谢物cho、Lac、Lip、mI/cr与肿瘤耐药性呈正相关性;cho面积与肿瘤PKC表达光密度呈正相关,与肿瘤P-gp表达光密度呈正相关。**结论** 肿瘤代谢物cho、lac、Lip的改变有可能有助于利用¹H-MRS活体检测结肠癌耐药性改变。

【关键词】 氢质子磁共振频谱分析; 结肠癌; 多药耐药; 荷瘤鼠模型

【中图分类号】 R445.2; R735.3+5

【文献标识码】 A

【基金项目】 广东省自然科学基金, 2015A03013732

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5131.2017.02.030

通讯作者: 谢 琦

In Vivo Detection of the Drug resistance of Human Colon Cancer in Mice with Magnetic Resonance Spectrum*

XIE Qi, YANG Yi-ming, WU Min-yi, et al. Department of Medical Imaging, Nan Sha Center Hospital, Guangzhou Municipal First People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 511457, Guangdong Province, China

[Abstract] **Objective** To exploration the feasibility to detect the drug resistance of human colon cancer in mice with magnetic resonance spectrum in vivo. **Methods** Nude mice with human colon cancer SW480(drug response) and 5 nude mice with SW480/5-Fu(5-Fu resistance) were given ¹H-MRS examinations when the diameters of tumor were over 1.5 centimeters. Then these mouse models were sacrificed. Their tumors were removed and detected the protein expression of PKC, P-gp and MRP1 (Western blot), apoptosis (TUNNEL). The correlation between metabolites detected with ¹H-MRS and tumor drug resistance and the protein expression of PKC, P-gp and MRP1 (Western blot), tumor apoptosis were analyzed. **Results** The the area of cho, lac and Lip of tumors in SW480 group were significantly higher than that in SW480/5-Fu group ($P < 0.05$). The protein expression of PKC, P-gp and MRP1 in SW480/5-Fu group were significantly higher than that of SW480 group ($P < 0.05$). In the TUNNEL section, apoptotic cell were observed in two groups, and there is no significant difference between two groups ($P > 0.05$). The area of cho, lac and Lip of tumors was positively correlated with drug resistance (r , $P: 0.870, 0.001$). The the area of cho has a positive correlation with the protein expression of PKC (r , $P: 0.745, 0.013$), P-gp (r , $P: 0.782, 0.008$). **Conclusion** The change of metabolites cho, lac and Lip detected with ¹H-MRS has the potential to help detection of colon cancer drug resistance with MR in vivo.

[Key words] ¹H-Magnetic Resonance Spectrum; Human Colon Cancer; Multiple Drug Resistance; Xenograft Model

不同耐药状态的肿瘤细胞的增值状态有差别,导致其代谢物的含量不同。本研究对耐药、不耐药的结肠癌荷瘤鼠进行¹H-MRS检测,初步探讨磁共振功能影像活体检测结肠癌耐药性的可能。

1 材料与方法

1.1 耐药与不耐药结肠癌荷瘤鼠模型制作

1.1.1 人类结肠癌SW480对5-FU耐药细胞细胞系SW480/5-FU的制作: 人类结肠癌SW480细胞系购自中山大学细胞库,用RPMI-1640培养液(含10%胎牛血清/杭州四季青公司、100U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的培养基)置37℃, 5%CO₂孵箱中培养。采用5-FU持续接触、浓度递增诱导肿瘤细胞耐药,连续培养5个月,至结肠癌细胞能在6 μg/ml的5-FU培养液中稳定生长,制成耐药肿瘤细胞株,即SW480/5-FU。

1.1.2 荷瘤鼠模型制作: 参照前期研究的结肠癌荷瘤鼠模型组织块移植方法^[1-3]。

先行种瘤鼠制作,在麻醉状态下取出种瘤鼠上的肿瘤块,在含庆大霉素的无菌生理盐水中分离出肿瘤非坏死部分,切成1~2mm³左右碎块,再分别移植到外表健康裸鼠双侧大腿根部皮下(5只,右侧SW450,左侧SW480/5-Fu),模型鼠养殖于SPF级实验室。

1.2 荷瘤鼠的MR成像 荷瘤鼠肿瘤长至1.5cm以上时,在SIEMENS

Verio-3.0T超导型磁共振成像系统上用配套腕关节专用正交线圈进行以下序列及¹H-MRS数据采集。

(1) T2WI快速自旋回波(TSE)脂肪抑制(SPIR)序列: TR/TE=4500ms/82ms, 层厚=2mm, 间隔=0, FOV=128mm, NAS=4, SENSE加速因子=2, 采集矩阵=128×128, 重建矩阵=512×512, 行轴位成像。

(2) ¹H-MRS: 采用以下三种模式采集, 均采用PRESS序列, 谱线带宽=1000Hz, 翻转角=90°, 采集MRS数据前均手动匀场、抑水。多体素三维容积采集(3-demensional multi voxel, 3DMV): TR/TE=1700ms/135ms, 层厚=2mm(根据肿瘤大小调整), 间隔=0, FOV=60mm, VOI=30mm, 采集体素边长=10mm, NAS=8, 采集矩阵=128×128, 重建矩阵=512×512。

采集的¹H-MRS数据使用相同工作站的专用软件处理, 生成肿瘤的MRS谱线图, 自动计算出所测代谢物的峰高、波峰下面积及其与肌酸(Cr)的峰高比值及峰下面积比值。被检测的代谢物有胆碱、肌酸、谷氨酸、脂质、乳酸、肌醇。

1.3 肿瘤标本的实验研究

荷瘤鼠完成上述MR成像后腹腔注射过量水合氯醛处死, 完整取出肿瘤, 测量大小, 一分为二, 一半放入缓冲甲醛液固定、石蜡包埋并且片(TUNNEL研究), 另一半低温(-300C以下)保存(耐药蛋白检测)。

1.3.1 肿瘤细胞凋亡检测: TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)检测肿瘤组织切片的肿瘤细胞凋亡。

TUNNEL结果分析: 病理切片由两位病理科医师分别按同一标

准在显微镜下阅片分析, 取两位医师所采集的均值为病理的检测最终结果数值。TUNNEL检测阳性细胞为细胞核呈棕黄色, 在×100视野下观察并估算切片内TUNNEL染色阳性细胞与形态为死亡细胞的肿瘤细胞面积的百分比为肿瘤凋亡范围。

1.3.2 耐药蛋白表达: 用Western blot检测。Phototope®-HRP Western blot检测试剂盒购自Cell Signaling technology公司, 鼠抗β-actin: BM0627购自Baster公司, 鼠抗SC-6243购自Santa Crag Bictech 公司, 鼠抗PKC、MDR1、MRP1抗体购自Bioss 公司。

最终胶体的显影结果经扫描仪扫入电脑以JPGF格式保存, 用Imagepro-plus 6.0版自动图像分析系统处理自动计算每组样本每个条带光密度(IOD)。

1.4 统计学分析 所采集的数据采用SPSS13.0版统计学软件进行统计处理, 数据用 数据用表示, 数据符合正态分布两组之间比较用t检验, 数据符合正态分布

相关性分析采用Pearson相关检验, (P<0.05)示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ¹H-MRS对耐药及不耐药肿瘤的评价 不耐药组cho、lac、Lip峰面积及mI峰/cr面积比明显小于耐药组, 两者差别有统计学意义(P<0.05, 表1)。

2.2 耐药组与不耐药组肿瘤凋亡TUNNEL评价 耐药组与不耐药组裸鼠肿瘤组织均见凋亡细胞(图1-2), 两组肿瘤组织细胞凋亡范围的差别无统计学意义(表2, P>0.05)。

2.3 Western Blot检测耐药组与不耐药组中P-gp、MRP1、PKC蛋白表达 免疫印迹检测耐药组与不耐药组PKC、P-gp、MRP1表达量均较不耐药组增加(图3), 两者差别有统计学意义(P<0.05, 表3)。

2.4 不同评价方法的相关性分析(Pearson相关分析)

2.4.1 耐药蛋白表达与

表1 耐药组与不耐药组肿瘤¹H-MRS检测面积定量结果($\bar{x} \pm s$)

组别(n=5)	cho	lac	Lip	mI/cr
耐药组	3.39 ± 1.75	1.31 ± 0.96	1.41 ± 0.82	2.77 ± 0.19
不耐药组	1.12 ± 0.47	0.37 ± 0.28	0.41 ± 0.25	1.26 ± 0.18
t	3.537	4.090	5.053	-2.323
P	0.002	0.001	0.002	0.032

表2 不同组肿瘤凋亡情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡范围
SW480组	0.285 ± 0.026
SW480/5-FU组	0.295 ± 0.015
t	1.091
P	0.325

表3 耐药组与不耐药组耐药蛋白表达RIOD值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	P-gp	MRP1	PKC
SW480	0.513 ± 0.077	0.835 ± 0.058	0.807 ± 0.088
SW480/5-FU	1.211 ± 0.158	1.155 ± 0.150	1.078 ± 0.102
t	-7.078	-3.814	-7.331
P	0.002	0.019	0.002

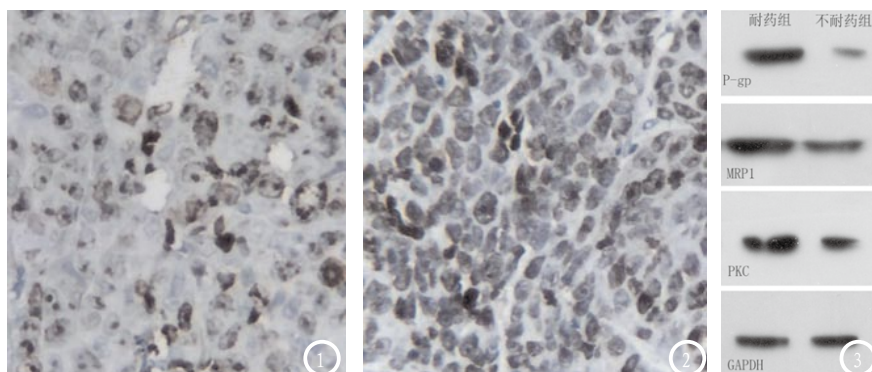


图1-2 SW480/5-FU组肿瘤细胞凋亡(图1)与SW480组肿瘤细胞凋亡(图2)。图3 耐药组与不耐药组PKC、P-gp、MRP1表达(Western Blot)。

肿瘤耐药性相关性: 肿瘤耐药性与肿瘤PKC、P-gp、MRP1蛋白表达光密度正相关性(r 、 P : 0.870, 0.001)、(r 、 P : 0.801, 0.005)、(r 、 P : 0.870, 0.001)。

2.4.2 ^1H -MRS检测代谢物与肿瘤耐药性及相关蛋白表达相关性分析: 代谢物cho、Lac、Lip、mI/cr与肿瘤耐药性呈正相关性(r 、 P : 0.870, 0.001); cho面积与肿瘤PKC表达量呈正相关(r 、 P : 0.745, 0.013), 与肿瘤P-gp表达量呈正相关(r 、 P : 0.782, 0.008)。

3 讨论

目前能确定参与肿瘤耐药机制调节的蛋白有p糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein, MRP1)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)。肿瘤组织产生耐药前后, 组织内代谢物的变化对耐药检测可能起到一定的作用。但生物学方法的检测需要肿瘤组织离体标本, 肿瘤组织断血及相应的生物学处理过程, 已使肿瘤本身的代谢产生巨大变化, 代谢物的成份已不能真实反应肿瘤耐药状态。因此, 在活体状态下检测肿瘤耐药前后代

谢物变化尚可合理反应肿瘤的生物学改变, 也可能为耐药性判断提供有价值的生物学信息。

磁共振频谱(MRS)具有选择性, 非创伤性, 且无破坏地确定一些化合物是否存在及相对、绝对含量, 因此MRS对于检查组织和器官的细胞代谢物是一种非常重要的方法^[4]。组织功能紊乱或疾病可引起代谢物变化, 利用MRS可检测到这种变化, 可探索耐药肿瘤、不耐药肿瘤组织的代谢物差别。课题组前期研究成功使用临床医用磁共振对结肠癌荷瘤鼠肿瘤进行活体 ^1H -MRS检测^[1-2]。

本研究采用5-FU持续接触、浓度递增诱导肿瘤细胞耐药, 所获得的能在5-FU浓度为 $6\mu\text{g/ml}$ 的培养液中稳定生长的人类结肠癌耐药细胞株SW480/5-FU, 同时将SW480/5-FU、亲本SW480分别种植于同一只裸鼠大腿根部左右两侧, 建立相应的耐药、不耐药同体结肠癌荷瘤鼠模型, 两种肿瘤组织对比, 两者肿瘤细胞凋亡范围无差别, 耐药肿瘤组织P-gp、MRP1、PKC的表达明显增高, 说明这三种耐药蛋白是SW480对5-Fu耐药形成的参与者。

^1H -MRS检测显示, SW480/5-FU荷瘤鼠组肿瘤组织cho、lac、Lip峰面积及mI峰/cr面积比明显高于SW480组($P<0.05$)。

Cho峰位于3.21ppm, 活体 ^1H -

MRS的胆碱(Choline, Cho)峰由磷酸胆碱、葡萄糖胆碱、葡萄糖磷酸乙醇胺、磷酸乙醇胺和自由胆碱组成, 反映的是细胞膜合成有关的磷酸化的信息, 其参数改变是细胞增殖状态的一指标。磷酸胆碱的含量可反映肿瘤抑制中起重要作用的信号通路的改变^[5]。本研究结果显示cho面积与肿瘤PKC表达及肿瘤膜转运蛋白P-gp表达呈正相关。推测耐药肿瘤细胞代谢可能进一步加快, 细胞膜合成与分解加速, 两者均可造成Cho含量增加。

乳酸(Lac)峰位于1.33ppm处, 在低氧、炎症、酵解增加等可产生大量的乳酸产物的情况下出现。肿瘤的Warburg效应使肿瘤细胞即使在供氧充足的条件下, 糖酵解代谢也明显活跃^[6], 而糖酵解的最终代谢产物是乳酸。肿瘤细胞酸性代谢产物增加, 细胞外的Ph(PHe)和细胞内酸性囊泡内的PH值(PHv)明显低于正常细胞^[7], 肿瘤细胞外的酸性有效阻断药物进入细胞或中和药物, 以及将药物隔绝在酸性的细胞囊泡中以阻止到达它们的细胞作用靶点, 改变药物在细胞内外的分布^[8], 从而降低其对肿瘤细胞的杀伤作用。本研究结果显示SW480/5-FU组织中的Lac含量明显高于不耐药的SW480, 因此, 活体 ^1H -MRS检测的Lac变化可从活体组织酸碱度的层面作为肿瘤耐药性监测的分子标记物。

Lip峰位于1.3和0.9ppm处, 磁共振频谱检测出的Lip是游离的脂质分子, 主要是由细胞膜破坏引起细胞内脂质分子流出所致。许多细胞过程如增殖、炎症、恶变、坏死、生长抑制、凋亡与MRS所见的脂肪水平改变有关, 细胞内的脂质体是引起上述改变最重要的因素; 饱和脂质共振峰与环

死有关^[9]，而胶质瘤中多聚不饱和脂肪酸(PUFA)共振峰在凋亡期间增高^[10]，提示细胞死亡机制对MRS探测细胞脂质有不同的影响。本研究发现SW480/5-FU组织中的Lip含量明显高于不耐药的SW480，但两者肿瘤凋亡范围差别不明显。其原因需进一步探讨。

Cr峰分别存在于3.02ppm和3.94ppm处，由肌酸、磷酸肌酸以及较低水平的 γ -氨基丁酸、赖氨酸、谷胱甘肽组成，总肌酸可以作为细胞完整性的可靠标志，所有与贮存能量有关的各种代谢物中均可存在，反映细胞代谢与能量平衡。因其含量在各种病理状态下均较稳定，波峰比较稳定，因此Cr常常作为内标准比较各种代谢产物的增高或降低^[11]。肌醇(mI)由磷脂酰肌醇和二磷酸磷脂酰肌醇的前体物组成，波峰位于3.56ppm处。磷脂酰肌醇是G蛋白偶联受体的信号转导通路中的一种途径，参与对激素敏感的神经传导和PKC的调节。肌醇与胆碱一样对脂肪有亲和性，肌醇和胆碱结合形成卵磷脂，有助于细胞膜转运功能^[12]。本研究提示SW480/5-FU组织中mI/Cr较不耐药的SW480高，也可能为活体检测肿瘤耐药性的分子标记物。

本研究主要探讨¹H-MRS活体检测肿瘤耐药性的可能，仅选取三个经典的耐药基因表达蛋白作为SW480/5-Fu为耐药细胞的佐证，P-gp、PKC与MRP1与Cho、Lac、LIP、mI/Cr的升高之间的调节机制尚需进一步研究。

总之，本研究诱导的对5-Fu

耐药的结肠癌的PKC、P-gp、MRP1等耐药基因蛋白较亲本不耐药结肠癌明显高表达，¹H-MRS活体观察到cho、lac、Lip及mI峰/cr面积比耐药较不耐药肿瘤组织明显升高，因此，¹H-MRS检测的代谢物变化有可能有助于利用¹H-MRS活体检测结肠癌耐药性改变。

参考文献

- [1] 谢琦, 江新青, 陈明旺, 等. 人类结肠癌裸鼠移植瘤模型制作及临床1.5TMR成像仪的¹H-MRS研究[J]. 中国CT和MRI杂志, 2008, 16(1): 1-5.
- [2] 谢琦, 张鼎旋, 梁碧玲, 等. ¹H-MRS活体检测rAd/P53治疗人类结肠癌荷瘤裸鼠肿瘤代谢物变化[J]. 临床医学工程, 2012, 19(9): 1460-1462.
- [3] Xie Q, Bi-Ling Liang, Yan-Heng Wu, et al. Synergistic anticancer effect of rAd/P53 combined with 5-fluorouracil or iodized oil in the early therapeutic response of human colon cancer in vivo[J]. GENE, 2012, 499(2): 303-308.
- [4] 吴国昌, 李伟, 胡茂清, 等. ¹H-MRS在乳腺肿瘤中的应用研究[J]. 中国CT和MRI杂志, 2012, 10(4): 47-49.
- [5] Belouche-Babari M, Arunan V, Troy H, et al. Histone deacetylase inhibition increases levels of choline kinase α and phosphocholine facilitating noninvasive imaging in human cancers[J]. Cancer Res, 2012, 72(4): 990-1000.
- [6] Vaitheesvaran B, Xu J, Yee J, et al. The Warburg effect: a balance of flux analysis[J]. Metabolomics, 2015, 11(4): 787-796.
- [7] Riemann A, Ihling A, Schneider B, et al. Impact of extracellular acidosis on intracellular pH control and cell signaling in

tumor cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 789: 221-8.

- [8] Elf S E, Chen J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer[J]. Cancer, 2014, 120(6): 774-780.
- [9] Zoula S, Herigault G, Ziegler A, et al. Correlation between the occurrence of ¹H-MAS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat gliomas development[J]. NMR Biomed, 2003, 15(4): 199-212.
- [10] Griffin JL, Lehtimäki KK, Valonen PK, et al. Assignment of ¹H NMR visible polyunsaturated fatty acids in BT4C gliomas undergoing cancrivir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death[J]. Cancer Res, 2003, 63(12): 3195-3201.
- [11] Kousi E, Tsougos I, Tsohaki E, et al. Spectroscopic evaluation of glioma grading at 3T: the combined role of short and long TE[J]. Scientific World Journal. 2012, 2012(4): 5461-5471.
- [12] Goldman SM, Nunes TF, Melo HJ, et al. Glutamine/glutamate metabolism studied with magnetic resonance spectroscopic imaging for the characterization of adrenal nodules and masses[J]. Biomed Res Int, 2013(3): 2013: 835385-835385.

(本文编辑: 张嘉瑜)

【收稿日期】2016-12-27