

## • 实验研究 Experimental research •

## CT 灌注成像评价抗血管生成药物不同给药方式的疗效

刘 丽, 陈 波, 吴垠垠, 袁 磊, 曹建民, 卢光明, 许 健

**【摘要】 目的** 利用 CT 灌注成像技术评价兔 VX<sub>2</sub> 后腿肌肉间移植瘤经抗血管生成药物不同给药方式治疗后肿瘤解剖形态及血管功能的改变,探讨不同给药途径的肿瘤抗血管生成治疗的疗效差异。**方法** 新西兰大白兔 18 只,建立兔后腿移植瘤动物模型,按数字法随机分成 3 组,每组 6 只,分别经静脉给药途径(静脉组)、局部瘤内注射途径(局部组)给予重组人血管内皮抑制素注射液和局部生理盐水注射(对照组)处理。治疗 7 d 后测量各组 VX<sub>2</sub> 肿瘤体积,利用 CT 灌注成像参数血流量(BF)、血容量(BV)和表面渗透性(PS)进行血管功能评价;与病理结果和免疫组化检测的微血管密度(MVD)进行对照分析。**结果** 建模成功率 100%。静脉组及局部组肿瘤体积较对照组小( $P < 0.05$ ),静脉组及局部组抑瘤率分别为 50.52%和 56.21%。此外,局部组中有 1 只动物肿瘤出现明显坏死。CT 灌注检查显示静脉组及局部组治疗后 CT 灌注参数 BF、BV 及 PS 较治疗前减少( $P < 0.05$ ),而对照组治疗前后灌注参数差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。另外,治疗后各组间 CT 灌注参数比较,静脉组与局部组间的 BF、BV、PS 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。静脉组及局部组 BF、BV、PS 平均值均少于对照组( $P < 0.05$ )。病理组织学检查显示静脉组及局部组切片中组织内可见大片坏死结构,对照组肿瘤内少量坏死。免疫组化检查显示静脉组与局部组间 MVD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而静脉组与局部组 MVD 均低于对照组( $P < 0.05$ )。相关性分析提示 CT 灌注参数与 MVD 之间均具有相关性。**结论** CT 灌注成像技术是评估肿瘤血管生成及血管功能状态的有效、便捷方法。抗血管生成药物的局部瘤内注射术是有效的抗肿瘤治疗方案。

**【关键词】** 肿瘤; CT 灌注成像; 抗血管生成治疗; 重组人血管内皮抑制素

中图分类号:R31.36 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2014)-02-0136-06

**Application of CT perfusion imaging in evaluating the efficacy of antiangiogenic drugs via different administration routes** LIU Li, CHEN Bo, WU Yin-yin, YUAN Lei, CAO Jian-min, LU Guang-ming, XU Jian. Department of Medical Imaging, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command of PLA, Nanjing, Jiangsu Province 210002, China

Corresponding author: XU Jian, E-mail: 13851656307@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate CT perfusion imaging in evaluating the changes of the blood vessel function and anatomical morphology in rabbits with VX<sub>2</sub> hind leg muscle transplantation tumor after antiangiogenic drugs via different administration routes, and to discuss the difference in therapeutic efficacy via different administration routes. **Methods** A total of 18 hind leg transplantation tumor rabbit models were established. The animals were randomly and equally divided into 3 groups by using digital method. Recombinant human endostatin injection through intravenous therapy was carried out in the rabbits of intravenous group, and local intratumoral injection of recombinant human endostatin was employed in the rabbits of local groups, while local injection of saline was performed in the rabbits of control group. Seven days after the treatment, the VX<sub>2</sub> tumor volumes were measured. The vascular function was evaluated by CT perfusion imaging parameters, including blood flow (BF), blood volume (BV) and surface permeability (PS). The results were compared with pathological findings as well as with microvessel density (MVD) which was estimated by immunohistochemical study.

**Results** The success rate of modeling was 100%. After the treatment, the tumor volumes of intravenous group and local group became

smaller than that of control group ( $P < 0.05$ ). The inhibition rates of intravenous group and local group were 50.52% and 56.21% respectively. Significant tumor necrosis was seen in one rabbit of the local group. Postoperative CT perfusion scanning showed that the perfusion parameters, including BF, BV and PS, in the intravenous group and local group were decreased ( $P < 0.05$ ). No statistically significant differences in the perfusion parameters existed between the preoperative data and postoperative ones in the control group. The differences in CT perfusion parameters between the intravenous group and the local group were not significant ( $P > 0.05$ ). The mean values of BF, BV and PS of both the intravenous group and the local group were smaller than those of the control group ( $P < 0.05$ ). Histopathological examination with HE staining showed that large area of tissue necrosis could be seen in the intravenous group and the local group. In the control group, HE staining showed mild tumor necrosis. Immunohistochemical examination showed that no statistically significant difference in MVD existed between the intravenous group and the local group, although the MVD of the intravenous group and local group was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The CT perfusion parameters were closely correlated with MVD. **Conclusion** CT perfusion imaging is an effective and convenient means to assess tumor angiogenesis and vascular function. Local intratumoral injection of anti-angiogenesis drugs is an effective anti-tumor therapy. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 136-141)

**【Key words】** Tumor; CT perfusion imaging; antiangiogenic therapy; recombinant human endostatin

肿瘤血管生成是肿瘤生长的“血管性开关”。因此,抗血管生成治疗是肿瘤研究的又一重要领域。O'Reilly 等<sup>[1]</sup>的实验证明重组人血管内皮细胞抑制素在抗血管生成治疗中显示出明显的剂量依赖性。基于此,探索新的更有效的肿瘤抗血管治疗方案具有临床实际意义。本实验通过 CT 灌注成像评价抗血管生成药物重组人血管内皮抑制素注射液不同给药方式治疗兔后腿 VX<sub>2</sub> 移植瘤的效果,探索不同给药途径进行抗血管治疗在肿瘤治疗中的疗效差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

雄性新西兰大白兔 21 只,6~8 周龄,重 2~2.5 kg,购于南京军区南京总医院比较医学科,符合医学实验动物标准,无特异病原体级饲养。实验细胞株为抗兔型 VX<sub>2</sub> 细胞株,(由东南大学中大医院介入科实验中心惠赠)。重组人血管内皮抑制素注射液购自山东先声麦得津生物制药有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 建模方法及实验分组** 分别取 5 ml VX<sub>2</sub> 细胞株种植于 3 只兔左后腿肌肉间。饲养 14 d,经磁共振扫描监测肿瘤长到 2 cm 大小,则培育传代荷瘤兔成功,取出肿瘤组织制备成瘤组织悬浊液。另选取健康成年新西兰大白兔 18 只,分别在左后腿肌肉间注射肿瘤组织混悬液 5 ml。饲养 10 d,待其长至 1.5 cm 为建模成功。将模型动物按数字法随机分为静脉组、局部组和对照组,每组 6 只。其中静脉

组连续 7 d 于耳缘静脉按说明书给予重组人血管内皮细胞抑制素注射液;局部组经皮穿刺于肿瘤局部行瘤内注药术,将相当于 7 d 静脉给药剂量的注射液 1 次性注入瘤内,若瘤体过大则选择多点注射;对照组在瘤内注射相当剂量的生理盐水。治疗前后行 CT 灌注检查。治疗 7 d 后将实验动物处死、取瘤组织行病理检查。

**1.2.2 CT 灌注成像检测及图像处理分析** CT 灌注成像技术通过静脉团注对比剂碘帕醇注射液(300 mg/L)后对选定层面行同层动态扫描,获得该层面内每一像素的时间密度曲线(time-density curve, TDC),根据该曲线的数学模型计算出血流量(BF)、血容量(BV)和表面渗透性(PS)等参数值。首先行常规 CT 平扫,扫描参数:120 kV,160 mA,矩阵 512 × 512,扫描周期 0.5 s/周,重建层厚 2 mm。扫描范围从中下腹部至小腿,观察种植肿瘤的部位,然后进行 CT 灌注扫描。以肿瘤最大层面为中心监测层面,灌注扫描范围为 4 cm。使用高压注射器以 3 ml/s 的速率注入对比剂 8 ml,延迟 3 s 后开始灌注扫描,总灌注时间 40 s。扫描参数:120 kV,100 mA,矩阵 512 × 512,扫描周期 0.5 s/周,重建层厚 2 mm。

所有图片均传入西门子 Syngo 工作站进行后处理,应用 Body PCT 软件进行灌注后处理,以统一方式画取感兴趣区(region of interest, ROI),计算 BF、BV、PS 血流动力学参数。所有数据的测量取 8 个 ROI 区,最后取平均值。同时在 CT 增强图像上测量每个肿瘤的长径与短径(mm),计算相对瘤体积 =  $a^2b \times 0.52(\text{mm}^3)$ (a 为短径,b 为长径),参考文献[2]

计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组肿瘤体积 - 治疗组肿瘤体积) / 对照组肿瘤体积 × 100%。

1.2.3 病理组织学检查 分别进行常规苏木精-伊红染色(HE)及肿瘤标本的微血管密度(MVD)免疫组化检测。MVD 计数参照文献[3]报道的方法,记录 3 个视野内的微血管数,取平均数作为该肿瘤组织的 MVD 值。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据均为定量资料采用 Kolmogorov-Smirnov Test 进行正态性检验。各组间数据符合正态性以均数 ± 标准差表示,组内比较采用 2 Independent Samples Test 方法,各组间多重比较采用单向方差分析(One-Way ANOVA)。分析

两正态定量资料间的相关性采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤生长

实验建模成功率 100%。治疗 7 d 后静脉组肿瘤平均体积( $617.56 \pm 45.78$ ) mm<sup>3</sup>、局部组( $546.37 \pm 65.35$ ) mm<sup>3</sup>、对照组 ( $1247 \pm 67.58$ ) mm<sup>3</sup>,静脉组及局部组均较空白对照组小( $P < 0.05$ ),而静脉组与局部组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。静脉组及局部组抑瘤率分别为 50.52%和 56.21%( $P > 0.05$ )。此外,局部组中有 1 只动物肿瘤出现明显完全坏死(图 1)。

### 2.2 CT 灌注定量分析

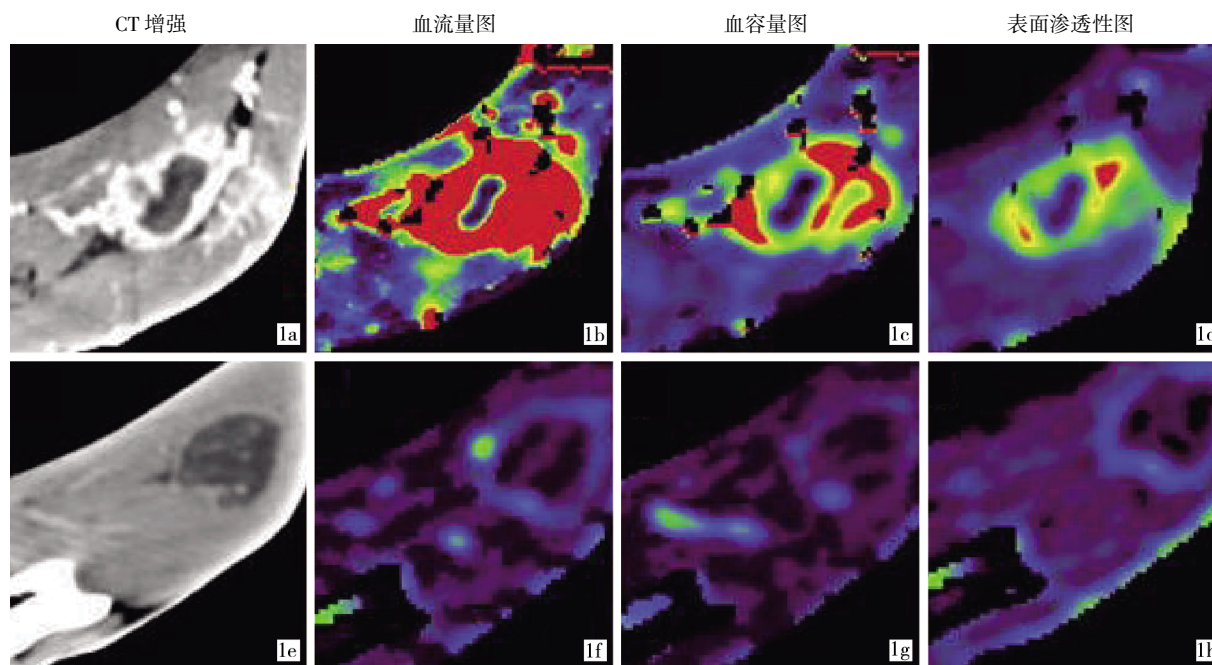


图 1 局部组治疗前(1a ~ 1d)、后(1e ~ 1h)CT 灌注图

治疗前后三组 CT 灌注结果见图 1 ~ 3, 各组 CT 灌注参数均符合正态分布, 与病理测量结果的比较见表 1。组内比较结果显示, 静脉组及局部组治疗后 BF、BV、PS 较治疗前减少( $P < 0.05$ )。而对照组治疗前后灌注参数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。治疗后组间比较显示, 静脉组与局部组 BF、BV、PS 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 均少于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 病理及免疫组化检查

HE 染色检查示各组瘤组织均有坏死区, 但静脉组及局部组切片中可见大片坏死结构, 中心区散在分布残留肿瘤细胞碎裂的核结构, 周围实质性成

分较少。对照组 HE 染色见少量坏死区(图 4)。免疫组化染色结果见表 1、图 4。Pearson 相关性分析得出 BF、BV、PS 与 MVD 值均有相关性(表 1)。

## 3 讨论

血管抑制性治疗是一种以阻止和(或)减少病变组织内血管生成作为策略的治疗方法。许多抗血管生成药物, 如重组人血管内皮抑制素注射液、贝伐珠单抗、伊马替尼等已经在临床或临床前实验阶段取得了不同程度的效果<sup>[4]</sup>。CT 灌注成像在肿瘤血管生成及抗肿瘤治疗疗效评价方面显示出良好的应用前景<sup>[5-8]</sup>。我们采用重组人血管内皮抑制素注射

表 1 三组 VX<sub>2</sub> 肿瘤治疗前后 CT 灌注参数及病理指标比较 (x̄ ± s)

组别	n	血流量(ml·100 ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )		血容量(ml/100 ml)		表面渗透性(ml·100 ml <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )		微血管密度
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
静脉组	6	119.10 ± 9.33	76.77 ± 21.43 <sup>a</sup>	104.65 ± 4.51	79.65 ± 25.51 <sup>a</sup>	41.63 ± 7.28	23.69 ± 13.43 <sup>a</sup>	9.01 ± 1.17 <sup>a</sup>
局部组	6	125.55 ± 14.70	60.95 ± 21.47 <sup>a</sup>	99.82 ± 5.83	75.53 ± 26.77 <sup>a</sup>	42.03 ± 14.32	24.33 ± 7.16 <sup>a</sup>	9.73 ± 1.01 <sup>a</sup>
对照组	6	142.84 ± 29.73	136.17 ± 27.95	110.06 ± 10.08	133.7 ± 20.36	50.17 ± 19.65	48.17 ± 10.99	17.31 ± 1.24
相关性		$r_{BF} = 0.746$		$r_{BV} = 0.863$		$r_{PS} = 0.785$		

与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

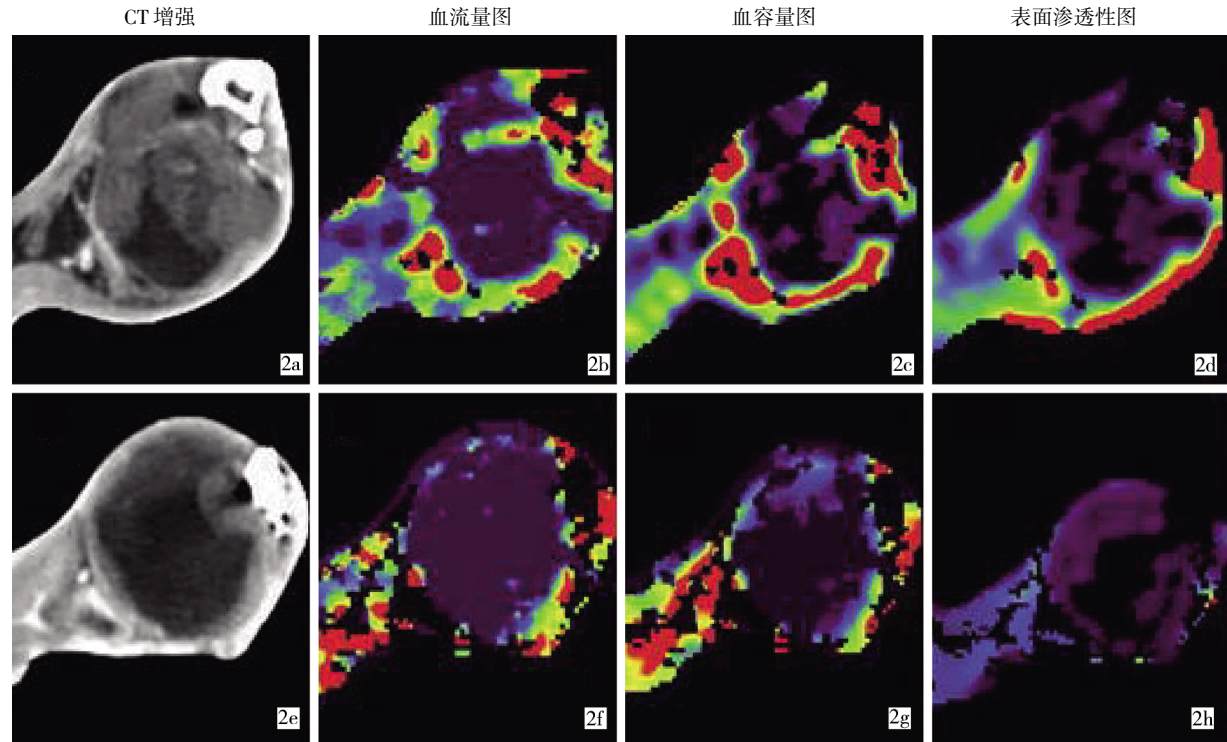


图 2 静脉组治疗前(2a ~ 2d)、后(2e ~ 2h)CT 灌注图

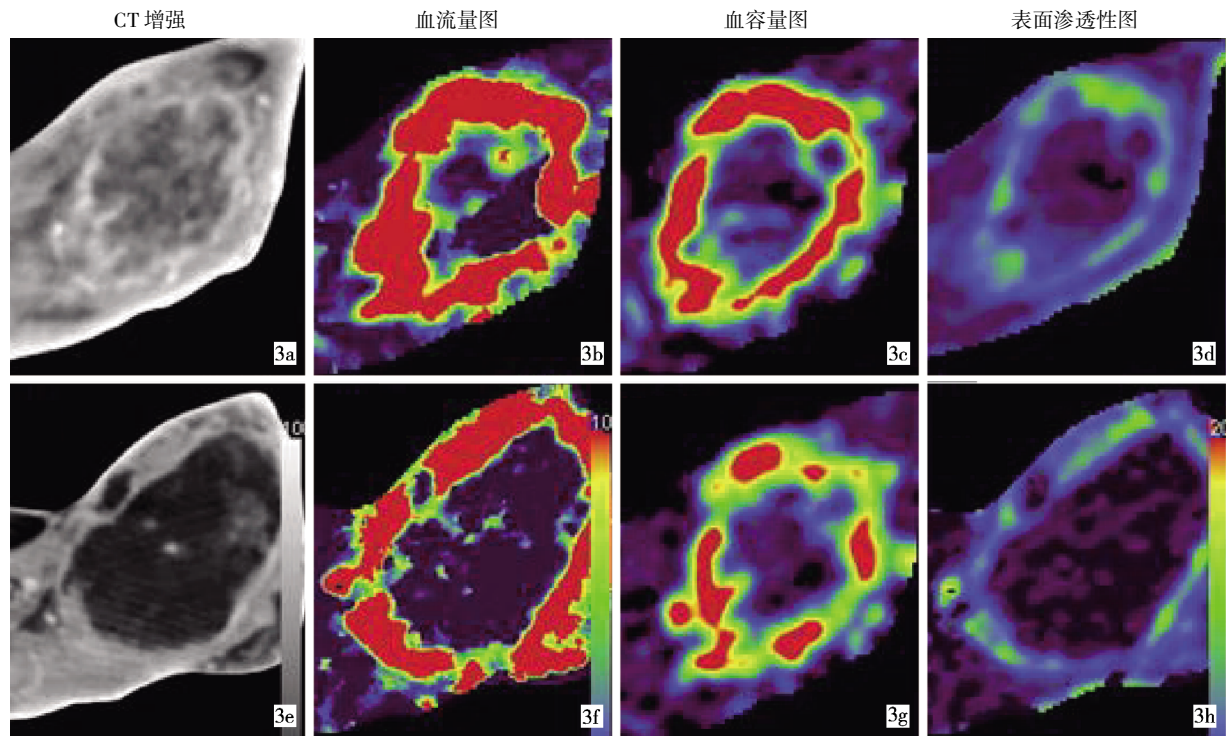


图 3 对照组治疗前(3a ~ 3d)、后(3e ~ 3h)CT 灌注图



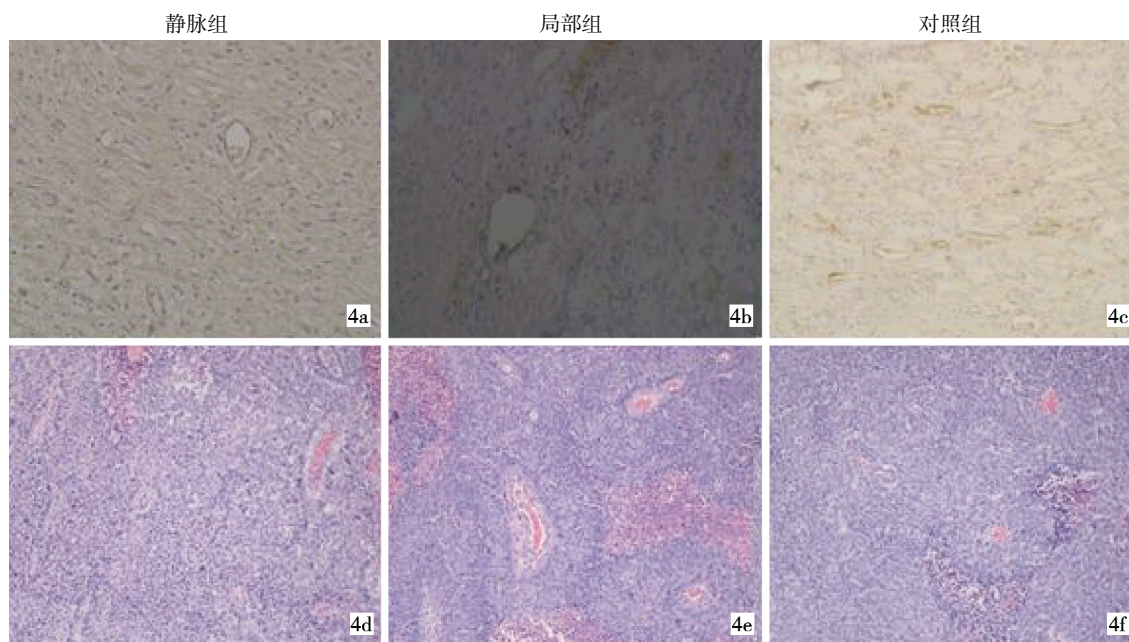


图 4 三组微血管密度(4a ~ 4c 免疫组化染色, 4d ~ 4f HE,  $\times 200$ )

液, 用 CT 灌注检查方法结合病理检查评价不同途径的肿瘤抗血管生成治疗疗效, 探索新的肿瘤抗血管治疗途径。

本研究中, 各组治疗后肿瘤体积的变化说明单纯抗血管治疗并不能完全抑制肿瘤进展, 但能在一定程度上控制肿瘤进展。本文结果表明, 各 CT 灌注参数与 MVD 均具相关性, 因此, 可以结合 CT 灌注与病理检查评价肿瘤微血管状态。对于治疗前后各组 CT 灌注检查结果的组内比较及治疗组与对照组的比较分析可见, 重组人血管内皮抑制素在抗血管治疗过程中, 可降低肿瘤 MVD, 降低肿瘤灌注量; 改善肿瘤血管微环境, 修剪不成熟的血管和强化残留的血管, 提高残留血管的完整性和功能, 使血管网的结构趋于正常, 降低肿瘤血管渗透性。而对照组中多种血管生成因子促进不成熟血管生成, 肿瘤细胞生长较为旺盛, 需更多血液供应, 刺激 MVD 增加, 而这种异常增生的血管“渗透性”明显增高。

另外, 静脉组与局部组间疗效无差异的原因可能是影响血管生成的因素多且复杂, 肿瘤内部非均匀性及血流灌注在空间和时间分布上不均衡所致。也可能由于局部给药次数的原因, 局部给药经皮穿刺一次性注入相当于 7 d 静脉给药剂量总和的重组人血管内皮抑制素注射液, 短时间瘤内高浓度药物可能使肿瘤短期急剧血管生成抑制, 导致肿瘤中心出现彻底坏死区, 但是由于重组血管内皮抑制素半衰期短暂, 造成局部高浓度药物持续时间较短, 可能出现短暂抑制后的各种促血管生成因子增加, 导

致残存周围肿瘤实质内血管生长, 致使灌注量增加。此外, 动物模型间存在较大的个体差异、样本数量较少也可能是形成误差的另一原因。但是, 在局部组中 1 只动物肿瘤出现彻底坏死, 而这种现象在静脉组及对照组中均未见到, 进一步肯定了局部高浓度的内皮抑制素能产生强烈的抑制肿瘤血管内皮细胞的生长、抑制肿瘤血供的效应。但是, 此动物肿瘤体积较其他稍小, 可能因为抗血管生成治疗针对肿瘤早期及新生血管更有效, 而对于进展期肿瘤及成熟血管效果较差。因此, 不同的给药途径对肿瘤血管生成具有不同的影响效果, 但其具体机制还有待进一步研究。

本研究的局部用药仍然存在以下问题: ① 局部药物浓度的确定, 其安全浓度和最佳抑制效应浓度的确定。② 局部应用内皮抑制素对肿瘤转移的抑制作用疗效的评定, 包括其作用持续时间、药物在肿瘤区和非肿瘤区的分布等。

总之, CT 灌注成像能无创、准确、动态地监测肿瘤抗血管治疗的疗效。局部瘤内注药术为肿瘤抗血管治疗提供了一种新的临床治疗途径。

#### [参考文献]

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88: 277 - 285.
- [2] 汪力慧, 李 凯. 血管内皮抑制素对小鼠体内 Lewis 肺癌血管生成及转移影响的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35: 587 -

- 590, 598.
- [3] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in Cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147: 9 - 19.
- [4] Hillman GG, Singh - Gupta V, Al-Bashir AK, et al. Dynamic contrast - enhanced magnetic resonance imaging of sunitinib - induced vascular changes to schedule chemotherapy in renal cell carcinoma xenograft tumors [J]. Transl Oncol, 2010, 3: 293 - 306.
- [5] 刘 丽. 肿瘤血管生成的影像学评价及新进展 [J]. 医学研究生学报, 2012, 25: 1102 - 1108.
- [6] Chen Y, Zhang J, Dai J, et al. Angiogenesis of renal cell carcinoma: perfusion CT findings[J]. Abdom Imaging, 2010, 35: 622 - 628.
- [7] Yao J, Yang ZG, Chen HJ, et al. Gastric adenocarcinoma: can perfusion CT help to noninvasively evaluate tumor angiogenesis? [J]. Abdom Imaging, 2011, 36: 15 - 21.
- [8] 陈 波, 许 健, 曹建民, 等. 氩氦刀冷冻治疗肺癌及疗效评估[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 510 - 514.
- (收稿日期: 2013-07-20)  
(本文编辑: 侯虹鲁)

· 消 息 ·

## 《神经血管疾病介入治疗与研究进展》一书出版

20 近日,由中国科学院汪忠镐院士、中国著名脑血管疾病介入专家马廉亭教授主审,韩新巍教授联合水少锋教授、滕军放教授、许予明教授、连亚军教授和卢红教授主编的《神经血管疾病介入治疗与研究进展》一书由郑州大学出版社出版发行,第一版印刷 5 000 册。该书出版填补了河南省脊髓及脑血管疾病介入治疗专著的空白。全书内容分为总论、各论两大篇章,21 个章节,共计 44 万余字。总论中对脑脊髓血管疾病介入放射学的产生与发展、血管应用解剖、常用介入诊疗技术、临床诊疗范围及病种等作了扼要的阐述;各论中按颅内、外动脉、静脉系统分别对有关疾病的病因学、临床表现、影像学检查、诊断和鉴别诊断、介入治疗基本策略(包括适应证、禁忌证、术前准备、技术操作要点、术后管理和并发症防治、随访等)作了较全面的论述。全书结构布局合理,内容充实,突出了临床实用性。

通览全书,具有以下特点:(1) 从介入治疗专业的视角较详尽的阐述了脑脊髓血管疾病介入治疗技术;又从临床医师的角度归纳了各有关疾病相关临床知识和临床处理对策,同时又能将两者有机结合并使之相互贯通、补充。(2) 把握了神经血管介入专业近年来国内外发展的基本动态,介绍了新技术和新理念。因此,此书适合于所有从事介入专业工作的医师和研究生阅读,更是一本良好的工具书,方便临床医师在实际工作中借鉴和参考,有利于开阔视野、拓宽思路和提高临床诊疗水平。

李 臻 马 骥