论著

文章编号:1000-5404(2008)20-1944-04

大鼠C6脑胶质瘤血管生成的多层螺旋CT灌注成像研究

王舒楠,王 毅,李 雪,冉启胜,陈金华,张伟国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科,重庆 400042)

摘 要:目的 采用64层MSCT灌注成像(CTP)观测大鼠C6脑胶质瘤灌注参数的动态变化规律,探讨大鼠C6脑胶质瘤的血管生成特征。**方法** 采用立体定向仪进行C6细胞脑内接种,建立大鼠C6脑胶质瘤模型。每次随机抽取10只接种鼠分别对应于5~9 d、10~14 d、15~19 d 3个时间段行CTP及病理学检查,观测大鼠C6脑胶质瘤血流灌注参数的变化规律。**结果** 大鼠脑内C6细胞接种后5~9 d,瘤内CBF和CBV值即有增高,并随时间而继续上升,于10~14 d达到高峰,并稳定在一较高水平,15~19 d肿瘤CBF和CBV值有所下降。肿瘤PS值在5~9 d内即有明显增高,10 d以后继续增高,15 d以后增高显著,并在20 d内无下降趋势。而肿瘤组织的MTT不随时间的延长而发生变化。**结论** 大鼠C6脑胶质瘤血管生成的上升时期在15 d以内,采用该模型进行治疗研究时,干预时间点和观察时段应考虑其本身血管生成的特点。

关键词: 多层螺旋CT;灌注成像;胶质瘤;动物模型
中图法分类号: R730.23;R730.264;R814.42 **文献标识码:** A

Study on angiogenesis of C6 brain gliomas in rats by MSCT perfusion imaging

WANG Shu-nan, WANG Yi, LI Xue, RAN Qi-sheng, CHEN Jin-hua, ZHANG Wei-guo (Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the feature of angiogenesis in C6 brain gliomas by 64-slice MSCT perfusion imaging. **Methods** C6 cells were planted into 40 Wistar rats brain *via* stereotaxic apparatus. Ten rats were randomly selected at the time periods of 5 – 9 days, 10 – 14 days, 15 – 19 days after cell transplantation to do CT perfusion for the changes of functional cerebral parameters. The data were transferred to the workstation to establish the time-signal curve and the perfusion maps. **Results** The values of cerebral blood flow (CBF) and cerebral blood volume (CBV) increased at 5 – 9 days, peaked at 10 – 14 days and maintained stably in a high level. The value of permeability surface (PS) in glioma rats increased at all time periods. No significant difference was found in mean transit time (MTT) of glioma at each time period. **Conclusion** Angiogenesis in the glioma transplanted rats increases in 15 days. The changes of angiogenesis with time must be considered as the factor for therapeutic effect.

Key words: multi-slice spiral CT; perfusion imaging; glioma; animal model

CT灌注(CT perfusion, CTP)成像能够活体检查,并具有无创、安全、快速的特点,药效动力学模型允许评价组织血流量、血容量、平均通过时间和毛细血管表面通透性等微血管参数,可用于评价肿瘤的血管生成及功能情况,并进一步监测抗血管生成的疗效[1-3]。本研究通过建立Wistar大鼠C6脑胶质瘤模型,采用多层螺旋CT(multi-slice spiral CT, MSCT)灌注成像观测肿瘤的血管生成特征,为CTP在肿瘤血管生成评价和抗血管生成疗效监测中的临床应用提供实验依据。

基金项目: 重庆市攻关课题(2007AC5014)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (2007AC5014)
作者简介: 王舒楠,男,福建省漳平市人,硕士研究生,医师,主要从事神经放射学方面的研究。电话:(023)68757621, E-mail:wangshunan2001@hotmail.com
通信作者: 张伟国,电话:(023)68757621
收稿日期: 2008-07-21;**修回日期:** 2008-08-15

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

成年Wistar大鼠40只,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,雌雄各半,体质量200~250 g。细胞培养:C6细胞于10%胎牛血清RPMI1640完全培养液中,单

层培养法传代培养生长至所需的细胞数,在接种前再传代 1 次,24 h 后更换 1 次培养液。在细胞于对数生长期大约 80% 满时,以 0.25% 胰酶消化,收集消化液离心后去除上清液,D-Hanks 液吹打冲洗 2 次后以 D-Hanks 液制成细胞悬液,调节细胞数为 $1\times10^5\cdot\mu l^{-1}$,置于 37 ℃水浴中待接种。台盼蓝排斥实验检测细胞活力 >95%。接种的细胞量:1×10^6/只。

模型制作:3.5% 水合氯醛于大鼠腹腔内注射(1 ml/100 g)麻醉后,采用立体定向架固定,头顶双侧眼裂连线后大约 1.5 cm 处纵向切开头皮,暴露前囟颅骨标志,前囟中点后 1 mm,矢状缝右侧旁开 3 mm 处用牙科钻钻一骨孔。利用 50 μl 微量注射器抽取细胞悬液 10 μl,垂直固定于立体定向架上,经骨孔处进针硬脑膜下 6 mm,后退 1 mm,于 10 min 内将细胞悬液注完(1 μl/min),注射完毕后留针 5 min,缓慢退针,骨蜡封闭骨孔,1 号丝线缝合头皮切口,对接种的大鼠在动物中心进行单笼常规饲养。

每次抽取 10 只接种鼠分别对应于 5 ~ 9 d、10 ~ 14 d、15 ~ 19 d 3 个时间段行 CTP 及病理学检查,每一时间段取 2 个时间点各检查 5 只,对应的时间点分别是 7、9、12、14、17 d 和 19 d。

1.2　CT 灌注成像

腹腔注射 3.5% 的水合氯醛 1 ml/100 g 麻醉大鼠平稳后,于尾静脉安置 24G × 19 mm 静脉留置针。将大鼠俯卧位固定于木板上,置于 CT 机扫描孔,首先扫描正位和侧位两个定位像,管电压 80 kV,管电流 100 mA。常规横断面平扫,矩阵 512 ×512,FOV 9.6 cm、层厚 2.5 mm,连续扫描。CT 灌注成像采用 GE LightSpeed 64 层螺旋 CT 机,以平扫肿瘤最大层面为中心行 CT 灌注检查,用 CT 自动高压注射器经大鼠尾静脉注射对比剂:欧乃派克(Omnipaque, 350 mg/ml),注射速度 0.2 ml/s,总剂量 2 ml。CT 灌注扫描参数:电影(cine)采集、管电压 80 kV、管电流 100 mA、矩阵 512 × 512, FOV 9.6 cm × 9.6 cm,层厚 2.5 mm、1 层/s、扫描时间 40 s,共得到 640 帧影像。

图像分析采用 AW 4.2P 后处理工作站,利用 Perfusion 3 软件中的脑部肿瘤分析软件,选定扫描图像的 CT 值范围:0 ~ 120 Hu,然后手工选取流入动脉,一般选择颈总动脉,流出静脉选择上矢状窦。最后计算得到反映肿瘤灌注功能状态的伪彩功能图:脑血流量(cerebral blood flow, CBF)、脑血容量(cerebral blood volume, CBV)、平均通过时间(mean transit time, MTT)和表面通透性(permeability surface, PS)图(图 1)。用 1 ~ 2 mm^2 的小感兴越区(ROI)测量肿瘤最大灌注区、瘤周区、对侧正常脑组织的相关灌注参数,每个部位测量 3 次,取其平均值。

1.3　病理学检查

将要处死的大鼠立即于腹腔追加注射 3.5% 水合氯醛 2 ~ 3 ml,过量麻醉后以生理盐水和 4% 多聚甲醛先后经左心室灌注,并断头取脑,置于 10% 中性福尔马林溶液中固定 24 h 以上,切去肿瘤两端正常脑组织,对包含肿瘤部分的组织进行石蜡包埋,以 5 μm 厚由前向后连续切片,直至达到肿瘤最大层面,制成常规光学显微镜切片,做 HE 染色用于观察肿瘤组织特征(图 2)。

1.4　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用统计软件 SPSS 13.0,先行方差齐性检验,组间比较采用配对 t 检验,方差不齐时采用 t' 检验或秩和检验。

2　结果

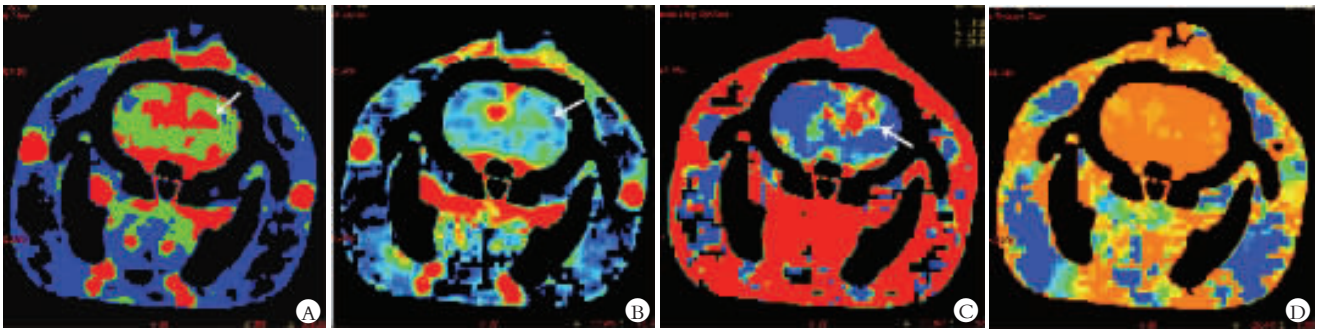
2.1　肿瘤、瘤周与对侧正常脑组织间的 CTP 参数比较

5 ~ 9 d、10 ~ 14 d、15 ~ 19 d 3 个时间段肿瘤最大灌注区、瘤周及对侧正常脑组织 CBF、CBV、MTT、PS 值的各组平均值见表 1。采用配对 t 检验进行分析,结果表明各时间段肿瘤组织的 CBF、CBV 及 PS 值均显著高于瘤周及对侧正常脑组织($P<0.01$,图 1A ~ 1C)。瘤周组织与对侧正常脑组织的 CBF、CBV 及 PS 值比较,除 5 ~ 9 d 时间段两者差异无统计学意义外($P>0.05$),其他 2 个时间段瘤周组织均显著高于对侧正常脑组织($P<0.01$)。而 MTT 值在不同时间段的不同组织间差异均无统计学意义($P>0.05$,图 1D)。病理学切片 HE 染色证实右侧纹状体区有肿瘤形成(图 2)。

表 1　不同时间段与不同部位 CTP 参数的观测结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

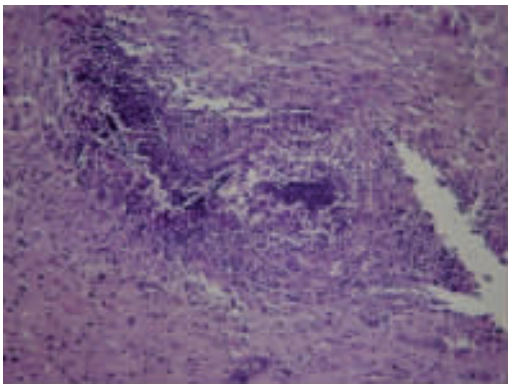
时间	部位	CBF(ml · min^{-1} · 100 g^{-1})	CBV(ml · 100 g^{-1})	PS(ml · min^{-1} · 100 g^{-1})	MTT(s)
5 ~ 9 d					
	肿瘤	411.669 ± 32.217[a]	13.367 ± 1.095[a]	7.936 ± 1.015[a]	2.292 ± 0.256
	瘤周	298.465 ± 22.738[b]	8.455 ± 1.019[b]	0.381 ± 0.189[b]	2.327 ± 0.283
	对侧	266.990 ± 37.532	7.584 ± 1.134	0.289 ± 0.116	2.301 ± 0.278
10 ~ 14 d					
	肿瘤	467.489 ± 30.357[d]	16.874 ± 1.129[d]	9.873 ± 1.089[d]	2.288 ± 0.292
	瘤周	369.730 ± 31.606[d]	12.137 ± 1.294[d]	4.203 ± 1.081[d]	2.297 ± 0.272
	对侧	267.679 ± 40.603	7.722 ± 1.537	0.324 ± 0.140	2.303 ± 0.245
15 ~ 19 d					
	肿瘤	452.610 ± 32.401[c]	14.246 ± 1.131[e]	16.470 ± 1.419[de]	2.305 ± 0.253
	瘤周	347.916 ± 40.688[d]	11.002 ± 1.165[d]	7.383 ± 1.150[de]	2.287 ± 0.279
	对侧	270.968 ± 34.184	7.766 ± 1.270	0.356 ± 0.112	2.357 ± 0.294

a: $P<0.01$, 与瘤周及对侧脑组织比较; b: $P<0.01$,与对侧脑组织比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与 5 ~ 9 d 比较; e: $P<0.01$,与 10 – 14 d 比较



A:CBF 图,见右侧尾壳核可见一片状红色高灌注区(↑);B:CBV 图,见右侧尾壳核可见一片状绿蓝混杂色彩高灌注区(↑);C:PS 图,见可见病变区 PS 值明显增高,表现为红黄绿混杂色彩(↑),范围大于 CBF 和 CBV 图;D:MTT 图,见显示色彩比较均匀,提示病变区 MTT 无明显改变

图 1 大鼠 C6 脑胶质瘤 CT 灌注成像表现



见瘤细胞向周围浸润明显,形成瘤巢、菊形团或假菊形团样结构

图 2 大鼠 C6 脑胶质瘤病理学变化 (HE×100)

2.2 不同时间段肿瘤组织的 CTP 参数变化

5~9 d 时间段的 CBF、CBV 及 PS 值均低于 10~14 d 和 15~19 d 2 个时间段,其 CBF 及 PS 值差异均具有显著性意义($P<0.01$, $P<0.05$),而 CBV 值与 15~19 d 比较无统计学意义($P>0.05$)。10~14 d 的 CBF 和 CBV 值高于 15~19 d,2 组间 CBV 值比较差异有统计学意义($P<0.01$),而 CBF 值比较无显著性差异($P>0.05$)。PS 值随时间而进行性增高,3 个时间段比较均有显著性差异($P<0.01$)。MTT 值在各时间段比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

2.3 不同时间段瘤周组织的 CTP 参数变化

5~9 d 时间段 CBF、CBV 及 PS 值均低于 10~14 d 和 15~19 d 2 个时间段,其差异均有显著性意义($P<0.01$)。10~14 d 的 CBF 和 CBV 值高于 15~19 d,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。PS 值随时间而逐渐增高,3 个时间段 PS 值两两比较均有显著性差异($P<0.01$)。MTT 值在各时间段比较均无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

3 讨论

血管生成是肿瘤生长、蔓延和转移的前提,并对其产生重要的作用,因此成为当今肿瘤学研究领域中占主导地位的课题。新生的肿瘤血管具有高度的异质性,幼稚而不成熟,不同于正常毛细血管,常常是扭曲而不规则,不能产生有效的血流灌注,并具高通透性,尤其是大分子,且不受毛细血管正常血流调节机制的控制[4]。肿瘤新生血管的这些特征为肿瘤的生长、侵袭和转移提供了条件,其性质也间接反映肿瘤的恶性程度。因此,对血管生成数量和功能的评价可用于判断肿瘤的侵袭性,是一个很有价值的预测指征,其随访监测也是反映血管生成动态变化及抗血管生成治疗效果的预示指针。

病理学上通过观测微血管密度(MVD)指数来评价肿瘤的血管生成,尽管被公认为是量化肿瘤微血管的金标准[5],但这一技术仍存在较大限制。MVD 计数不仅标本的获取属于侵袭性操作,不能活体随访评价血管生成的动态变化,而且标本的处理过程极其繁琐,并导致 MVD 在不同观察者间具有较大的可变性,且目前缺乏统一的操作和评价标准,因此给不同研究的比较带来困难[6]。CTP 是近 10 年发展起来的技术,允许活体非侵袭性评价肿瘤的血管生成,不仅能够预测肿瘤的恶性程度,而且给肿瘤抗血管生成治疗的随访监测带来新的希望,并已用于动物或临床试验中,初期的结果表明具有较高的应用价值[2,3,7-10]。

本研究 CT 灌注成像采用 64 层螺旋 CT,扫描层厚 2.5 mm,16 层共 40 mm 的灌注扫描范围,涵盖了 Wistar 大鼠整体脑组织,不存在遗漏病变的问题。扫描参数选择 80 kV、120 mA,FOV 9.6 cm×9.6 cm,矩阵 512×512,成像时间 40 s,共获得 640 帧图像,既有效降低了辐射剂量,又能达到满意的分辨率。就大鼠脑组织而言,时间分辨率已足够要求,而空间分辨率也能满足对大鼠脑组织的研究需要。本实验所采集的图像比较清晰,能够将肿瘤组织、正常脑组织以及周围其他组织区分开来,虽然部分图像存在着一定的几何变

形,但并不影响对图像的观察和灌注数据的采集。

本研究采用 CTP 动态观测了 C6 细胞大鼠脑内接种后灌注参数的变化过程,在 5 ~ 9 d、10 ~ 14 d 和 15 ~ 19 3 个时间段各取 2 个时间点对肿瘤最大灌注区、周围区及对侧正常脑组织的 CBF、CBV、PS 及 MTT 值进行了观测,发现 Wistar 大鼠脑内 C6 细胞接种后其血管生成有一定规律,5 ~ 9 d 瘤内即有新生微血管,表现为 CBF 和 CBV 值较对侧正常脑组织明显增高,并随时间而继续上升,于 10 ~ 14 d 达到高峰,并稳定在一较高水平,而 15 ~ 19 d 则出现下降。而肿瘤组织毛细血管通透性(PS 值)的变化与 CBF、CBV 的变化有所不同,PS 值在 5 ~ 9 d 内也有明显增高,10 d 以后继续增高,而 15 d 以后呈显著增高,并在 20 d 内无下降趋势。由此可以看出,PS 与 CBF 和 CBV 随时间变化的差异在晚期,可以推测肿瘤晚期 PS 值进一步增高可能是大鼠病情继续恶化的重要原因之一,加上呈指数规律增长的肿瘤体积显著增大,以及各种并发症的出现,最终导致大鼠临床症状进行性加重,大多数大鼠相继死亡,仅少数自身能够产生强烈免疫排斥反应的大鼠可出现肿瘤自行消退,并长期存活[11,12]。

对于瘤周组织血管生成的变化,在 5 ~ 9 d 血管增生不明显或仅表现为缓慢增生,可能是此阶段血管生成主要发生在瘤内以维持肿瘤细胞的持续增殖。当瘤内血管生成达到一定数量,即 10 ~ 14 d 呈快速增生并达到高峰这一阶段,其血管生成才开始向周围组织发展,并伴随肿瘤细胞向周围浸润,此后(15 ~ 19 d)随着瘤内血管生成的下降而缓慢下降。对于瘤周组织毛细血管通透性,由于早期瘤周无明显新生血管形成,因此在 5 ~ 9 d 内 PS 值无明显增高,10 d 以后伴随新生血管的形成而显著增高,并与肿瘤内 PS 值变化一致,晚期仍继续进行性增高,共同导致大鼠病情的恶化。同时,瘤周组织 PS 值在中晚期进行性增高也许可以解释在 PS 图上异常染色的范围大于 CBF 和 CBV 图上肿瘤染色的范围。

基于上述 C6 细胞大鼠脑内接种后 CTP 参数的变化规律,本研究认为,肿瘤血管生成并不是一直处于进行性地增殖,即肿瘤微血管数量会出现一个高峰限制,随后肿瘤血管生成可能会逐渐下降。而肿瘤增生血管的性质(表面通透性、异质性、成熟度)可能一直处于动态变化过程中,是决定肿瘤恶性程度的主要因素之一。在 CTP 各种参数中,PS 值是反映肿瘤血管性质的较好指标之一,而 CBF、CBV 是反映肿瘤微血管数量的敏感性指标,这些参数值的高低是主要由肿瘤的类型、恶性程度而决定,不同类型及恶性程度不同的肿瘤会可能产生不同的 CBF、CBV 及 PS 值。因此,CTP 是研究肿瘤血管生成敏感而准确的技术,根据 CTP 参数的高低也可以区分不同类型及恶性程度不同的肿瘤。

对于大鼠 C6 脑胶质瘤模型而言,由于血管增生的上升时期是 5 ~ 15 d,随后可能出现缓慢下降,因此采用该模型进行抗血管生成试验性治疗时,干预时间点和观察时段应考虑其本身血管生成的特点。

参考文献:

[1] Goh V, Padhani A R. Imaging tumor angiogenesis: functional assessment using MDCT or MRI? [J]. Abdom Imaging, 2006, 31(2): 194 - 199.

[2] Lee TY, Purdie TG, Stewart E. CT imaging of angiogenesis. Q J Nucl Med, 2003, 47(3): 171 - 187.

[3] Provenzale J M. Imaging of angiogenesis: clinical techniques and novel imaging methods[J]. AJR Am J Roentgenol, 2007, 188(1): 11 - 23.

[4] Goldbrunner R H, Wagner S, Roosen K, *et al*. Models for assessment of angiogenesis in gliomas[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1 - 2): 53 - 62.

[5] Fox S B, Harris A L. Histological quantitation of tumour angiogenesis [J]. APMIS, 2004, 112(7 - 8): 413 - 430.

[6] Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, *et al*. Histopathologic assessment of hot-spot microvessel density and vascular patterns in glioblastoma: Poor observer agreement limits clinical utility as prognostic factors: a translational research project of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group[J]. Cancer, 2006, 107(1): 162 - 170.

[7] 余永强, 钱银锋, 陈　骏, 等. 大鼠 C6 胶质瘤抗血管生成治疗的 MR 灌注研究[J]. 中华放射学杂志, 2004, 38(7): 762 - 766.

[8] Dennie J, Mandeville J B, Boxerman J L, *et al*. NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis[J]. Magn Reson Med, 1998, 40(6): 793 - 799.

[9] Ozdemir O. The role of mast cell and mast cell subtypes (MC(T) and MC(CT)) in tumor angiogenesis[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 29(4): 638 - 639.

[10] Fan G, Zang P, Jing F, *et al*. Usefulness of diffusion/perfusion-weighted MRI in rat gliomas: correlation with histopathology[J]. Acad Radiol, 2005, 12(5): 640 - 451.

[11] 李　明, 冯　华, 李　飞, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤模型的病理特征与 MRI 的观察[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(5): 279 - 282.

[12] Vince G H, Bendszus M, Schweitzer T, *et al*. Spontaneous regression of experimental gliomas——an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model[J]. Exp Neurol, 2004, 190(2): 478 - 485.

(编辑　王　红)