Correlation study between MVD, expression of VEGF and CT perfusion parameters in small metastases of rat liver

SHI Gao-feng*, WANG Shi-jie, ZHANG Jun-jie, WANG Qi, XU Qian, LI Ru-xun, DU Yu, WANG Ya-ning, LI Yue-kao, YANG Li, LIU Hui

(Department of Radiology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] Objective Using CT perfusion imaging to evaluate the correlation between hemodynamic changes caused by hepatic micrometastases in rats and extent of tumor angiogenesis in pathologic specimens. Methods Liver micrometastases were produced in 22 SD rats by transspleenic injection of 2×10^7 Walker-256 cells. Ten experimental control rats were injected with saline solution. CT perfusion was performed to calculate liver perfusion by gradient method. Perfusion parameters included hepatic artery perfusion, portal venous perfusion, total hepatic blood flow and hepatic perfusion index. MVD and expressions of VEGF were examined by immunohistochemical techniques. Results The micrometastases (diameter, between 0.5 mm and 6.6 mm) were seen in 19 rats. Hepatic arterial perfusion was 2.25 times in the rats with micrometastases than that in the control rats. Portal hepatic perfusion was 76.6% lower in the rats with micrometastases than that in the control rats. The MVD and expressions of VEGF of tumor were positive linear correlation with hepatic artery perfusion. Conclusion Small liver metastases in rats can lower the portal perfusion and increase the arterial perfusion. There were positive linear correlation between MVD and expressions of VEGF with hepatic artery perfusion.

[Key words] Liver metastases; Perfusion imaging; Tomography, X-ray computed; Animals, laboratory

大鼠 Walker-256 微小转移性肝癌 CT 灌注参数 与微血管密度及血管内皮生长因子表达关系的研究

时高峰*,王士杰,彰俊杰,王 琦,许 茜,李如迅,杜 煜,王亚宁,李月考,杨 丽,刘 辉 (河北医科大学第四医院 CT 室,河北 石家庄 050011)

[摘 要] 目的 应用 CT 灌注成像观察大鼠微小转移性肝癌所引起的血流动力学变化与肿瘤血管化程度的相关性。方法 22 只经脾脏注入 Walker-256(细胞含量 2×10⁷)制备成肝脏微小转移癌的大鼠为实验组;10 只大鼠经脾脏注入等量生理盐水为对照组。实验组中随机选取 10 只作为空白对照组。CT 灌注扫描后使用斜率法得到参数包括:肝动脉灌注量、门静脉灌注量、肝灌注指数、总肝灌注量。采用免疫组织化学方法测定病理标本的微血管密度和血管内皮生长因子。结果实验组中有 19 只大鼠发现转移灶,直径在 0.5~6.6 mm 之间。各项参数值组间比较:实验组大鼠肝动脉灌注量、肝灌注指数明显高于对照组和空白组;对照组和空白组之间无显著差别。实验组门静脉灌注量明显低于对照组和空白组,对照组和空白组无显著差别。总肝灌注量组间比较,三组之间没有差别。VEGF表达程度随着实验组大鼠肝动脉灌注量增高而增高。而且 VEGF不同表达程度的转移癌之间 MVD 的差异均有统计学差异。结论 大鼠微小肝转移癌表现为肝动脉灌注量的增加和门静脉灌注量的降低。肝动脉灌注量的大小与 VEGF 的表达程度和 MVD 呈正相关。

[关键词] 转移性肝癌;灌注成像;体层摄影术,X线计算机;动物实验

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2006)05-0639-04

「基金项目]河北省科技厅资助项目(05276101D-67)。

L作者简介] 时局歐(1962-),男,石家庄人,博士,教授,王仕医师。世究方向:肿瘤影像学。

[通讯作者] 时高峰,河北医科大学第四医院 CT 室,050011。

E-mail: Gaofengs62@sina.com

「收稿日期] 2005-12-10 「修回日期] 2006-02-20

恶性肿瘤的生长需要形成满足生长需要的血管网。这一过程是由于肿瘤病灶释放大量血管生成活性因子(例如血管内皮生长因子,vascular endothelial growth factor, VEGF)所引起的。在此基础上病灶微血管密度(microvessel density, MVD)增加^[1],导致局部灌注量和毛细血管通透性的增加。过去人们已经注意到肝脏转移癌在其形态学变化之前可以引起肝动脉和门静脉血流量的改变^[2],Leen等^[3]使用超声多普

勒对于肝转移癌病灶血流灌注进行了研究,但多普勒只能研究大血管内的血流状态,对小血管及微循环无能为力,且重复性差,难以推广;近年来由于 CT 技术的快速发展,具有高时间、空间分辨率的 CT 灌注成像方法已成为研究组织器官血流动力学最方便、有效和实用的工具之一。本项研究应用 CT 灌注成像观察微小的转移性肝癌所引起的血流动力学变化与肿瘤血管化程度的相关性。

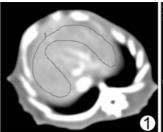
1 材料与方法

1.1 动物模型的制备 40 只正常雄性 SD 大鼠(体重 280~330 g)用于实验研究。30 只为实验组(2 只因实验时间过长死亡),10 只为实验对照组。动物模型的制备方法详见参考文献^[4],我们将"微小转移癌"界定为 0.5~5 mm 大小的转移灶。CT 常规检查对这样小的肝转移癌诊断敏感性很低。预实验:分别在经脾注入 Walker-256 瘤细胞后的第 3、5、7、9、11及 13 天进行常规 CT 或 MR 扫描并立即解剖大鼠,发现在第 9 天大部分瘤灶直径在 0.5~5 mm 之间,此时 CT 和 MR 很难发现病灶,符合本研究需要。

1.2 CT 检查 在实验组中随机选取 10 只大鼠作为空白组,空白组的大鼠在接种瘤细胞之前麻醉状态下行肝脏 CT 灌注扫描(以获得实验组大鼠在制备成肝转移癌之前正常肝血流的灌注参数)。接种瘤细胞后第 9 天在麻醉的状态下,对实验组及对照组大鼠进行 CT 灌注扫描。CT 机使用德国西门子公司 Somatom Volume Zoom 型多层螺旋 CT 机,首先以 2 mm 层厚行全肝扫描,以确定灌注扫描的中心位置。一般选择肝门层面作为灌注扫描的中心层面,但要求至少有一个层面包括肾脏。然后选取 CT 机内带有体部灌注扫描模式,适当改变扫描参数(80 kV,150 mAs,Rotation time 1 s,层厚 5 mm),对比剂为碘海醇(300 mgI/ml)与生理盐水稀释成 1:4 的比例。经大鼠颈静脉用高压注射器注入稀释后的对比剂 2 ml,注射速度 1 ml/s。注射对比剂的同时开始扫描,扫描持续时间为 30 s;每秒钟扫描一次;每次获取 4 幅图像。扫描后获得包括强化前图像在内的 120 幅图像。

1.3 图像分析 将获得图像资料调入工作站 Dynamic Evaluation 软件中画出扫描层面内的兴趣区,肝脏使用不规则画法,要避开肝脏内大的分支血管(图 1);肾皮质、腹主动脉和门静脉采用圆形或椭圆形的画法(图 2)。获得所画各兴趣区的时间-密度曲线(time-density curve, TDC)以及增量曲线图(图 3、4)。将获得的每个时间点上的增量 CT 值导入个人电脑 Microsoft Excel 2003 软件中,作为计算灌注参数的数据。本项研究采用的是 Blomley 等^[5]使用的斜率法计算灌注参数。得到肝动脉灌注量(hepatic arterial perfusion, HAP)、肝门静脉灌注量(portal vein perfusion, PVP)、肝总灌注量(total hepatic perfusion, THP),单位均为 ml/(min·100 ml)。肝灌注指数(hepatic perfusion index, HPI)为肝动脉灌注量占肝总灌注量的百分比(对各组每一只大鼠 CT 扫描获得的不同层面灌注参数进行比较无显著性差异,采用以两个层面灌注参数的平均数作为比较的数据)。

1.4 病理学免疫组化检查 在 CT 扫描结束,随机处死 22 只 实验组大鼠取出肝脏作病理学检查。剩余6只继续饲养,2



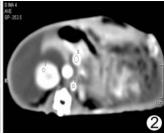
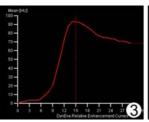


图 1 肝脏的兴趣区采用不规则画法,同时避开肝脏内大的血管分支 图 2 图内 1、2、3 兴趣区分别为腹主动脉、门静脉和肾皮质



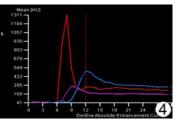


图 3 肝脏时间-密度曲线 图 4 腹主动脉(红色)、肾皮质(蓝色)和门静脉(紫红色)时间-密度曲线

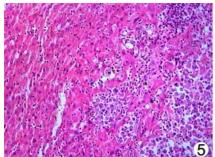
只分别于接种后 26、29 天死于衰竭,4 只于第 35 天再做 CT 检查后立即将其处死。

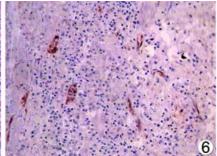
将取出的肝脏按常规程序进行 HE 染色和 MVD 及 VEGF 免疫组化染色。2 名病理学教授观察 HE 和免疫组化染色的组织切片,重点观察各组织标本转移灶的有无、分布及病灶和周围的血管化程度。MVD 的计算参考 Weidner^[6]的方法:选取 3 个高倍视野(200 倍)微血管密度表达最强处,计算肿瘤内毛细血管和微血管,用血管数目的总和来表示MVD。VEGF 蛋白的表达参考刘佩芳等^[7]的方法,表达阳性染色细胞<5%:阴性(-);5%~25%:弱阳性(+);26%~50%:阳性(++);>50%:强阳性(+++)。

1.5 统计学分析 使用 SAS 6.12 作为统计软件,对于实验组、对照组和空白组的大鼠的灌注参数差别的比较使用完全随机设计的单因素方差分析后,SNK-q 检验行多重比较。P < 0.05 为差异有显著意义。MVD、VEGF 与灌注参数之间的关系,使用完全随机设计的单因素方差分析后,SNK-q 检验行多重比较。VEGF 与 MVD 相关性使用 Spearman 等级相关分析法。

2 结果

2.1 病理检查所见 本实验组 22 只大鼠,病理检查有 19 例在肝内形成转移灶,成功率为 86.4%。肉眼观察肝脏表面及剖面,可见局灶性、灰白色的微小转移灶,病灶直径在 0.5~6.6 mm 之间。8 只大鼠腹腔内有一定量血性腹水。光镜下见肿瘤病理差异较明显,肿瘤细胞多呈圆形或椭圆形,呈团状生长。瘤细胞排列紊乱,异型性明显,核分裂像多见。肉瘤成分形态多样,结构复杂。较大的病灶中心区域有坏死。呈膨胀-浸润性生长,与脾脏的肿瘤结节的病理形态结构相似(图5)。另外生长 35 天的 4 只大鼠,病理学检查发现大鼠肝脏明显肿大,肝内见大小约2~3 cm的转移癌灶,数目有个体差





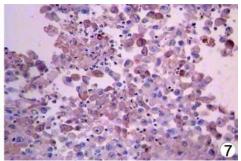


图 5 镜下可见肿瘤细胞异型性明显,排列杂乱,瘤灶呈浸润性生长(HE ×200)

图 6 染色呈棕褐色的肿瘤血管散在分布(MVD×200)

图 7 显示胞质成棕褐色的肿瘤细胞表达程度为阳性(VEGF × 400)

表 1	二组	灌注	参数	值的	比较
10 1		11年1上	20 XX	田田り	1111

肝脏灌注参数值	HPI(%)	HAP	PVP	THP
		ml/(min • 100 ml)	ml/(min • 100 ml)	ml/(min • 100 ml)
实验组 (n=19)	24.75 ± 5.28	97.67 \pm 31.42	295.49 ± 61.85	393.16 ± 86.94
实验对照组 $(n=10)$	9.91 ± 3.07	43.35 \pm 17.39	385.7 ± 71.25	430.55 ± 82.47
空自对照组(n=10)	10.32 \pm 3.61	40.77 \pm 18.91	362.73 ± 78.56	404.48 ± 91.25
SNK-q 检验	F = 110.04	F = 47.84	F = 14.10	F = 1.39
	P = 0.0001	P = 0.0001	P = 0.0001	P = 0.255

异,3~12个,部分转移结节融合成块,难以计数。脾脏的接种部位均可见灰白色瘤灶。

- 2.2 TDC 和肝脏灌注参数 通过 TDC 可以看到:腹主动脉 在开始强化后 2 s 左右首先达到峰值。随后是肾脏皮质强化 达到峰值,紧随其后的是门静脉强化的峰值。其中肾脏皮质 和门静脉的上升和下降变化比腹主动脉要缓慢。肝脏的 TDC 从图形上没有看到三组显著的差异。
- 2.3 肝脏灌注参数三组数值比较 实验组大鼠 HAP, HPI 明显高于对照组和空白组;对照组和空白组之间无显著差别。实验组 PVP 明显低于对照组和空白组,对照组和空白组无显著差别。总肝灌注量组间比较,三组之间没有差别(表1)。其中实验组 HAP增高,是对照组的 2.25 倍;而 PVP 明显较少,是对照组的 76.6%。
- 2.4 VEGF 表达、MVD 与灌注参数之间的关系 转移癌 19 例,VEGF 染色有 2 例表达为(-),5 例表达为(+),10 例表达为(++),2 例表达为(+++)。 VEGF 表达程度与 HAP 呈显著正相关,r=0.277(P<0.05)。 所有数据经 q 检验,各组之间的差异均有统计学意义(P<0.05)。 随着 VEGF 表达程度的增高 HAP逐渐增高。

MVD 从 8. $3\sim29.0$ 不等 $(-:8.79\pm1.82;+:10.35\pm2.67;++:18.03\pm3.41;+++:25.0\pm4.39)$,而且 VEGF 不同表达程度的转移癌之间 MVD 的差异均有统计学差异,转移癌的 MVD 随着 VEGF 表达增高而增高(F=5.87,P<0.05)。 Pearson 法相关分析表明 HAP 与 MVD 呈正相关,相关系数为 0.401(P<0.05)。(图 6.7)

3 讨论

3.1 微小转移性肝癌的血流动力学变化 本研究结果显示实验组微小转移性肝癌种植前后大鼠的 HAP、HPI 及 PVP的数值有显著的变化,表现为大鼠的 HAP 远远大于对照组

(是对照组的 2.25 倍);而 PVP 明显少于对照组(是对照组的 76.6%)。这种血流动力学变化与人类肝脏转移癌灌注扫描 结果是相似的^[5]。

PVP下降其原因可能是转移癌细胞经门静脉转移至肝脏,停留在微小血管床上,门静脉出现大量的小血栓,导致微小血管床阻力增加,瘤灶周围的小门静脉和毛细血管阻塞、消失[8];也有学者认为瘤细胞和病灶周围的组织细胞能够分泌一些因子使门静脉血流量减少[9]。以上的原因导致门静脉血流量的下降和平均通过时间延长,这在多普勒超声中得到了证实[10]。

HAP 明显增加是转移灶内新生血管形成^[3],这也证实肝脏转移癌主要由肝动脉供血。Cuenod 等认为^[11]500 μm 左右的大鼠肝转移癌,HAP 没有显著的变化,而 PVP 是降低的。他认为 PVP 的降低是首先发生的,HAP 的增加主要是对PVP减少的补偿作用。本组结果与 Cuenod 的研究不同,可能是所研究的瘤灶大小差别所致。500 μm 左右的肿瘤血管网还没有建立起来。肝脏转移癌生长到 500 μm 以上的时候就要依赖肿瘤新生成血管的供血^[4]。而本组转移灶均大于500 μm,此时肿瘤的新生血管已经形成,HAP 明显增加,以维持肿瘤的生长和总肝血流量的相对稳定。

3.2 灌注参数值的变化与 MVD、VEGF 的相关性分析 本研究结果表明肿瘤细胞内 VEGF 的表达和瘤灶内 MVD 的数量均与 HAP 呈显著的正相关。转移癌的 MVD 随着 VEGF 表达增高而增高。VEGF 是一种很强血管生成因子¹¹¹,与内皮细胞上两种特异受体结合而刺激血管内皮细胞增殖;并可提高微血管特别是毛细血管后静脉和小静脉的通透性;同时改变细胞外基质,诱导血管形成。MVD 的增加是由于VEGF 高度表达引起的,而 MVD 的增加使单位时间内单位组织内肝血流量的增加,是 HAP 升高的病理基础;并提示肝

动脉是肿瘤血管生成的来源,门静脉不参与转移灶的供血。 VEGF和 MVD被认为是恶性肿瘤重要的预后指标。

传统影像观察到的组织结构上的变化,病灶至少要达到 3~5 mm。微小的转移癌在没有达到肉眼可分辨形态学变化之前称之为"隐匿性转移癌"。虽然 CT 检查不能直接显示肿瘤内的新生血管,但是由于新生血管的增加导致的血液灌流量的增加可以被 CT 灌注成像的技术反映出来,肿瘤组织的灌注参数可以反映 MVD和 VEGF。

总之,大鼠微小肝转移癌表现为 HAP 增加和 PVP 降低。VEGF 和 MVD 的增加是 HAP 升高的病理基础。CT 灌注成像技术可以用来评价肝脏的血流动力学变化,不但为早期诊断转移癌提供可能,而且也可用于评价肿瘤血管生成以及估计预后。

「参考文献]

- [1] Shibusa T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(6):1483-1487.
- [2] Kuszyk BS, Bluemke DA, Urban BA, et al. Portal-phase contrast-enhanced helical CT for the detection of malignant hepatic tumors: sensitivity based on intraoperative and pathologic findings
 [J]. AJR, 1996, 166(1):91-95.
- [3] Leen E, Goldberg JA, Angerson MJ, et al. Potential role of Doppler perfusion index in selection of patients with colorectal cancer for adjuvant chemotherapy [J]. Lancet, 2000, 355 (9197): 34-37.
- [4] Shi GF, Wang Q, Xu Q, et al. CT perfusion imaging of Walker-

256 small metastases in rat liver $\[J \]$. Chin J Med Imaging Technol, 2006, 22(1):35-38.

时高峰,王琦,许茜,等.大鼠 Walker-256 肝微小转移癌模型的 CT 灌注成像研究[].中国医学影像技术,2006,22(1):35-38.

- [5] Blomley MJ, Coulden R, Dawson P, et al. Liver perfusion studied with ultrafast CT[J]. J Comput Assist Tomogr, 1995, 19(3):424-433.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.
- [7] Liu PF, Bao RX, Niu J, et al. Angiogenesis and dynamic contrast enhanced MRI of benign and malignant breast lesions preliminary results[J]. Chin J Radiol, 2002, 36(11):967-972.
 刘佩芳,鲍润贤,牛均,等. 乳腺良恶性病变动态增强 MRI 表现特

刘佩芳,鲍润贤,牛均,等. 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[J]. 中华放射学杂志,2002,36 (11):967-972.

- [8] Jonathan BK, Thomas P, Robert AK, et al. Hepatic perfusion changes in mice livers with developing colorectal cancer metastases [J]. Radiology, 2004, 231(2):482-490.
- [9] Warren HW, Angerson WJ, Leen E, et al. Haemodynamic changes associated with colorectal liver metastases: evidence of a humoral mediator[J]. Br J Surg, 1993, 80(4):1461-1464.
- [10] Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, et al. In vivo microscopy of hepatic tumors in animal model: a dynamic investigation of blood supply to hepatic metastases [J]. Radiology, 1993, 187(3):621-626.
- [11] Cuenod C, Leconte I, Siauve N, et al. Early changes in liver perfusion caused by occult metastases in rats: detection with quantitative CT[J]. Radiology, 2001, 218(2):556-561.

本刊投稿须知

本刊已全面实行电子邮件投稿和修改稿件,不再受理纸稿投稿。具体说明如下:

- **1 投稿** 邮件主题栏注明"投稿+第一作者姓名+论文题目",将稿件、论文图片和单位介绍信扫描件放于附件内发送至邮箱 cjmit@cjmit.com。如果邮件过大,可分成数个邮件发送,但每个邮件主题后应标出"1"、"2"、"3"……,以示邮件内容不同。
- **2** 稿件处理 稿件收到后,我刊会于 3 日内邮件回复,请注意查收邮箱。如欲查询稿件审理情况,请登陆本刊网址:www.cjmit.com。
- 3 退稿和修改 需"修改后再审"或"修改后发表"的论文,本刊将通过电子邮件将修改意见发送至作者投稿时邮箱,请及时查收个人信箱,以保证论文发表周期。修改稿件请用电子邮件发回,并注明"稿号+第一作者姓名+修改稿"。退稿者,可电子邮件询问退稿意见,一般编辑部不主动发送。

《中国医学影像技术》编辑部