

◆ 实验研究

Feasibility of apparent diffusion coefficient values in reflecting expression of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 gene

LI Hui, WANG Deling, YIN Shaohan, GENG Zhijun, XIE Chuanmiao*

(Department of Medical Imaging and Interventional Radiology, Cancer Center of Sun Yat-sen University, State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of ADC in reflecting the expression of Epstein-Barr virus (EBV)-latent membrane protein 1 gene (EBV-LMP1). **Methods** A total 30 nude mice model were divided into two groups, namely LMP1(+) group (included CNE2-LMP1 [+] subgroup, HONE1-LMP1 [+] subgroup) and LMP1(-) group (included CNE2-LMP1 [-] subgroup and HONE1-LMP1 [-] subgroup; each $n=15$). The MRI and DWI were performed when the tumor volumes were 90—110 mm³. The ADC values of each group were obtained and statistical analysis. Histological specimens of each group were obtained after the completion of image acquisition. **Results** The tumors volume of LMP1(+) group [98.23 ± 11.42]mm³ were significant larger than that of LMP1(-) group [87.42 ± 15.14]mm³; $t=6.31$, $P=0.03$. LMP1(+) group had more necrosis in the lesions than LMP1(-) group in MRI scan. The ADC values of LMP1(+) ($[0.68 \pm 0.12] \times 10^{-3}$ mm/s²) were significant lower than that of LMP1(-) group ($[0.87 \pm 0.23] \times 10^{-3}$ mm/s²; $t=9.34$, $P<0.01$). Histopathological examination showed the cells of the LMP1(+) group were more dense and necrosis were more easily to be detected, compared to LMP1(-) group. **Conclusion** ADC value can effectively reflect the expression of EVB-LMP1.

[Key words] Models, animal; Latent membrane protein 1 gene; Diffusion magnetic resonance imaging; Apparent diffusion coefficient

DOI:10.13929/j.1003-3289.201607065

ADC 值反映 EB 病毒 LMP1 基因表达的可行性

李卉, 王德玲, 尹韶晗, 耿志君, 谢传淼*

(中山大学肿瘤防治中心影像介入中心 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

[摘要] **目的** 探讨 ADC 值反映 EB 病毒潜伏膜蛋白 1(LMP1)基因表达的可行性。**方法** 建立 LMP1(+)组[包括 CNE2-LMP1(+)亚组、HONE1-LMP1(+)亚组]和 LMP1(-)组[包括 CNE2-LMP1(-)亚组、HONE1-LMP1(-)亚组]的皮下种植瘤裸鼠模型(每组 15 只)。待移植瘤体积达 90~110 mm³后,对实验动物进行常规 MR 及 DWI 检查,分别获得两组肿瘤的 ADC 值,并进行统计学分析。实验结束后,观察两组实验裸鼠种植瘤病理组织学改变。**结果** LMP1(+)组肿瘤体积 [98.23 ± 11.42]mm³ 明显大于 LMP1(-)组 [87.42 ± 15.14]mm³; $t=6.31$, $P=0.03$]。常规 MR 扫描示 LMP1(+)组肿瘤内坏死较 LMP1(-)组更明显。LMP1(+)组肿瘤 ADC 值为 $(0.68 \pm 0.12) \times 10^{-3}$ mm/s², LMP1(-)组肿瘤 ADC 值为 $(0.87 \pm 0.23) \times 10^{-3}$ mm/s², 差异有统计学意义 ($t=9.34$, $P<0.01$)。肿瘤病理组织学检查显示与

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2015377)。

[第一作者] 李卉(1980—),女,广东广州人,硕士,主治医师。研究方向:分子影像学。E-mail: lihui@sysucc.org.cn

[通信作者] 谢传淼,中山大学肿瘤防治中心影像介入中心 华南肿瘤学国家重点实验室,510060。E-mail: xchuanm@mail.sysu.edu.cn

[收稿日期] 2016-07-28 **[修回日期]** 2016-11-24

LMP1(-)组相比,LMP1(+)组肿瘤细胞更密集,坏死更多见。**结论** ADC值可有效反映裸鼠移植瘤中EB病毒LMP1基因的表达。

[关键词] 模型,动物;潜伏膜蛋白基因1;扩散磁共振成像;表观扩散系数

[中图分类号] R-332; R445.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2017)02-0167-04

鼻咽癌是头颈部常见的恶性肿瘤,发病有明显地区性,是一种高度异质性的疾病。研究^[1]表明相同TNM分期、WHO分型的鼻咽癌患者其分子遗传学不尽相同,从而导致肿瘤治疗反应和患者的预后差异。EB病毒潜伏膜蛋白1(latent membrane protein 1, LMP1)基因已被证明是与鼻咽癌患者生存预后最密切的基因之一,并被应用于基于分子标记物的鼻咽癌预后评估系统^[1]。本研究主要在动物实验水平探讨DWI中ADC值反映EB病毒LMP1基因表达的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取4~6周龄BALB/C雌性裸鼠共30只,每只体质量约20g。购于中山大学动物实验中心。在恒温(25~27℃)、恒湿(45%~50%)、新鲜空气、高度除尘除菌、无特殊支原体环境下饲养。将实验动物置于专用培养箱,安放于层流式超净架内。本研究通过动物实验伦理审查。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠皮下种植瘤的建立 分别以CNE2和HONE1作为载体细胞。取对数生长期的CNE2和CNE2-LMP1以及HONE1和HONE1-LMP1细胞株,经胰酶消化后,采用pH值为7.4的PBS液洗涤,调整浓度为 5×10^7 个/ml。将细胞株以0.2ml细胞混悬液分别接种于裸鼠的右侧臀部皮下。为比较两种载体(CNE2和HONE1)成瘤的有效性,将CNE2[包括CNE2-LMP1(+)和CNE2-LMP1(-)]和HONE1[包括HONE1-LMP1(+)和HONE1-LMP1(-)]作为载体细胞的细胞株,分别接种于15只实验鼠。携带LMP1细胞株[CNE2-LMP1(+)或HONE1-LMP1(+)]接种于裸鼠右侧臀部皮下,LMP1(-)细胞株[CNE2-LMP1(-)或HONE1-LMP1(-)]接种于裸鼠左侧臀部皮下。建立分别以CNE2和HONE1作为载体细胞的裸鼠皮下移植瘤对照模型,LMP1(+)组包括CNE2-LMP1(+)亚组、HONE1-LMP1(+)亚组,LMP1(-)组包括CNE2-LMP1(-)亚组、HONE1-LMP1(-)亚组。记录两组皮下种植瘤的大小、形态、局部毛发情况,并绘制生长曲线。用游标卡尺测量裸鼠移植瘤的长(L)、宽(W)和高(H),计算肿瘤近似体积(V):

$V=1/2 \cdot L \cdot W \cdot H$ 。待移植瘤体积达90~110mm³后,对实验动物行常规MR及DWI检查。

1.2.2 MR检查 MR检查:采用GE Discovery MR 750 3.0T磁共振扫描仪,小动物专用线圈。对实验鼠采用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,注射剂量0.5~0.6ml/100g体质量。

将实验鼠俯卧位保定,裸鼠皮下移植瘤位于射频线圈的中心位置。常规进行轴位T1WI和轴位、冠状位及矢状位T2WI扫描;采用SE-EPI序列的多b值DWI行轴位扫描。扫描参数:TR 3 300 ms,TE 97 ms,层厚2 mm,层间距0,层数10层,FOV 62 mm × 62 mm;b值分别为0、600、800 s/mm²。

1.2.3 图像后处理与数据测量 采用GE ADW 4.6后处理工作站。测量冠状位病灶ADC值,ROI为病灶最大层面的80%,尽量避开肿瘤内坏死区,对所有病灶均重复测量3次取平均值。

1.2.4 病理学检查 实验结束后,对裸鼠断颈,并剥离肿瘤,测得肿瘤质量。生理盐水洗净离体肿瘤表面血迹,经固定、脱水、石蜡包埋后切片。

1.3 统计学分析 采用SPSS 17.0统计分析软件。CNE2和HONE1两种载体细胞成瘤率的比较采用 χ^2 检验。计量资料数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,LMP1(+)组和LMP1(-)组肿瘤体积及ADC值的比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

裸鼠皮下接种不同细胞悬液后,7~10天移植瘤体积达90~110mm³。30只裸鼠中,成功建立双侧对照皮下种植瘤模型25只,并完成常规MR以及DWI检查;其中CNE2作为载体细胞株裸鼠13只,HONE1作为载体细胞株裸鼠12只,两者差异无统计学意义($\chi^2 < 0.01, P = 1.000$)。LMP1(+)组肿瘤大小为(98.23 ± 11.42)mm³,LMP1(-)组肿瘤大小为(87.42 ± 15.14)mm³,LMP1(+)组明显高于LMP1(-)组($t = 6.31, P = 0.03$),见表1。

常规MR扫描示LMP1(+)组肿瘤体积较LMP1(-)组大,肿瘤内坏死更明显。LMP1(+)组肿瘤ADC值为(0.68 ± 0.12) × 10⁻³ mm²/s,LMP1(-)组



图 1 裸鼠皮下移植瘤 T2WI(A)、DWI(B)以及 ADC(C)图像 箭示右侧 LMP1(+)肿瘤,左侧为 LMP1(-)肿瘤,右侧肿瘤体积明显大于左侧,肿瘤内见坏死区,右侧肿瘤坏死区范围大于左侧,DWI 图示肿瘤弥散受限呈高信号,ADC 图上肿瘤呈低信号

表 1 各组裸鼠皮下移植瘤成瘤情况、肿瘤体积及 ADC 值

组别	成瘤情况(侧)	肿瘤体积(mm ²)	ADC 值($\times 10^{-3}$ mm/s ²)
LMP1(+)组			
CNE2-LMP1(+)亚组	14	95.44 ± 9.38	0.62 ± 0.24
HONE1-LMP1(+)亚组	15	99.98 ± 12.76	0.69 ± 0.13
LMP1(-)组			
CNE2-LMP1(-)亚组	13	88.59 ± 17.33	0.83 ± 0.14
HONE1-LMP1(-)亚组	12	84.87 ± 8.59	0.89 ± 0.19

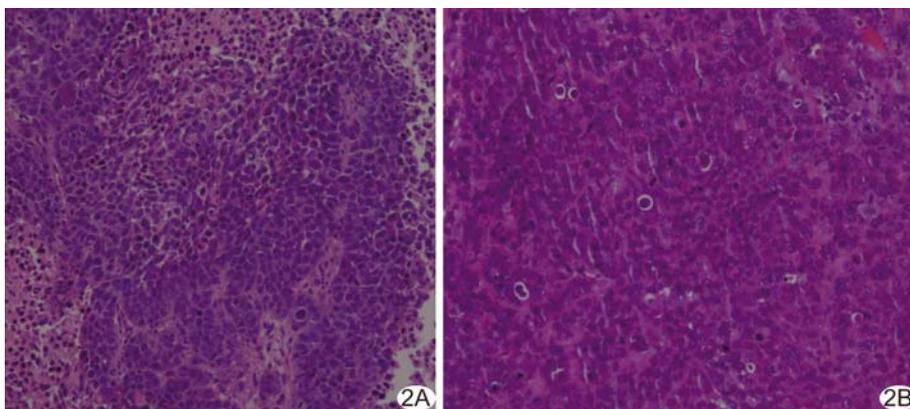


图 2 裸鼠皮下移植瘤病理组织切片(HE, $\times 100$) A. LMP1(+)组织切片; B. LMP1(-)组织切片, LMP1(+)较 LMP1(-)肿瘤细胞密度更高,更易见散在凝固性坏死区

肿瘤 ADC 值为 $(0.87 \pm 0.23) \times 10^{-3} \text{ mm/s}^2$, 差异有统计学意义 ($t=9.34, P<0.01$), 见表 1 和图 1。

光镜下 LMP(+)组与 LMP(-)组相比, 肿瘤体积较大, 肿瘤内坏死较多, 肿瘤细胞体积较大, 核分裂象易见, 肿瘤细胞更密集, 凝固性坏死区更多见(图 2)。

3 讨论

鼻咽癌是头颈部常见的恶性肿瘤, 该病的发生主

要与 EB 病毒的感染、遗传易感性、饮食习惯等多种因素有关, 同时其也是一个多基因参与、多步骤的复杂过程^[1]。由 LMP 基因编码的 LMP1 是重要的致癌蛋白, 在鼻咽癌的发生发展中具有重要作用, 且与放化疗抗性及其复发转移密切相关, 是一个潜在的分子靶向治疗靶点^[2-3]。本实验通过建立 LMP1(+)组[包括 CNE2-LMP1(+)亚组、HONE1-LMP1(+)亚组]和 LMP1(-)组[包括 CNE2-LMP1(-)亚组、HONE1-LMP1(-)亚组]裸鼠模型, 并对其进行常规 MR 及 DWI 扫描, 计算 ADC 值, 评估 ADC 值是否能有效反映该基因的表达。

CNE2 和 HONE1 细胞株为鼻咽癌常用的载体细胞株, 在前期实验中, 笔者已获得可稳定表达 LMP1 以及 LMP1 空载体细胞株。本研究分别以 CNE2 和 HONE1 为载体细胞建立皮下移植瘤模型, 发现两种载体细胞的成瘤率无明显差异, 均可用于裸鼠皮下移植瘤模型的建立。

研究^[4]表明对于 III ~ IV a 期鼻咽癌患者, LMP1 阳性表达患者生存时间明显低于该基因阴性患者。研究^[5-7]认为 LMP 阳性表达患者肿瘤更具有侵袭性, 更易出现放化疗抗性, 并出现复发转移。本实验中

LMP1(+)组肿瘤的体积明显大于 LMP1(-)组,提示携带 LMP1 基因细胞株细胞活性、增殖力均明显高于 LMP1(-)组,提示 LMP1(+)组显著的细胞增殖活力可能与 LMP1 阳性表达者预后较差以及肿瘤的侵袭性、放疗抗性有关。

DWI 是一种可反映水分子微观运动的 MR 成像方法,研究^[8-9]表明 DWI 可为肿瘤或淋巴结性质的鉴别、治疗前敏感性评价以及治疗中肿瘤疗效的早期评价提供重要信息。有研究^[10]分析 DWI 与肝癌增殖细胞核抗原基因(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的相关性,发现对兔 VX2 肝脏肿瘤模型进行化学栓塞治疗后,肿瘤组织 ADC 值与 PCNA 基因表达水平呈线性相关,表明肿瘤组织基因表型的差异可能通过 ADC 值反映。研究^[11]表明 ADC 值与浸润性乳腺癌的肿瘤分级具有相关性,可用于评估其恶性程度。也有研究^[12]证实儿童高级别胶质瘤的 ADC 值明显低于低级别胶质瘤,ADC 值可用于术前儿童脑胶质瘤的病理分级评估。本研究对 25 只成功建瘤裸鼠均成功完成常规磁共振以及 DWI 扫描,发现 LMP1(+)组肿瘤 ADC 值明显低于 LMP1(-)组,结合病理结果,与 LMP1(-)组相比,LMP1(+)组肿瘤内坏死较多,光镜下 LMP1(+)组肿瘤细胞体积较大,肿瘤细胞更密集,凝固性坏死更多见,表明 LMP1(+)组肿瘤水分子弥散运动受限程度明显高于 LMP1(-)组,提示 ADC 值可反映 LMP1 基因的表达。

总之,在本研究的裸鼠皮下移植瘤模型中,ADC 值可有效反映 EB 病毒 LMP1 基因的表达,可为肿瘤治疗前在形态学基础上进一步了解与肿瘤预后相关的基因表型、预测患者的预后以及疗效提供依据。

[参考文献]

- [1] Wang HY, Sun BY, Zhu ZH, et al. Eight-signature classifier for prediction of nasopharyngeal [corrected] carcinoma survival. *J Clin Oncol*, 2011, 29(34):4516-4525.
- [2] Yang CF, Peng LX, Huang TJ, et al. Cancer stem-like cell characteristics induced by EB virus-encoded LMP1 contribute to radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by suppressing the p53-mediated apoptosis pathway. *Cancer Lett*, 2014, 344 (2): 260-271.
- [3] Xiao L, Hu ZY, Dong X, et al. Targeting Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1-mediated glycolysis sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy. *Oncogene*, 2014, 33 (37): 4568-4578.
- [4] Guo Q, Tham IW, Lin S, et al. Prognostic significance of pre-treatment latent membrane protein 1 from nasopharyngeal swabs for stage III-IV A nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Oncol*, 2012, 4:81.
- [5] Yang GD, Huang TJ, Peng LX, et al. Epstein-Barr Virus-Encoded LMP1 upregulates microRNA-21 to promote the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin-induced Apoptosis by suppressing PDCD4 and Fas-L. *PLoS One*, 2013, 8(10):e78355.
- [6] Lu J, Tang M, Li H, et al. EBV-LMP1 suppresses the DNA damage response through DNA-PK/AMPK signaling to promote radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*, 2016, 380(1):191-200.
- [7] Wang Y, Sun LE. Knockdown of LMP1-induced miR-155 sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to radiotherapy in vitro. *Oncol Lett*, 2016, 11(5):3451-3456.
- [8] Li H, Liu XW, Geng ZJ, et al. Diffusion-weighted imaging to differentiate metastatic from non-metastatic retropharyngeal lymph nodes in nasopharyngeal carcinoma. *Dentomaxillofac Radiol*, 2015, 44(3):20140126.
- [9] 牛庆亮,杜汉旺,李芹,等. ADC 值对宫颈癌的诊断价值及其与临床病理因素的关系. *中国中西医结合影像学杂志*, 2016, 14(5): 520-523.
- [10] Yuan YH, Xiao EH, Liu JB, et al. Gene expression and MR diffusion-weighted imaging after chemoembolization in rabbit liver VX-2 tumor model. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(36): 5557-5563, 5562.
- [11] 蔡自强,尤克增,柴仕红,等. 3.0T 磁共振扩散加权成像 ADC 值在浸润性乳腺癌分级中的应用. *中国医学影像技术*, 2015, 31(7):1041-1044.
- [12] 王俊丽,范森,初建平,等. 动态对比增强 MRI 灌注参数和 ADC 值在儿童脑胶质瘤病理分级中的应用. *中国医学影像技术*, 2015, 31(5):678-682.