

❖ 实验研究

In vivo intravoxel incoherent motion imaging in evaluation on drug resistance of human colon cancer SW480 in nude mice

XIE Qi^{1,2*}, CHEN Hui.xian¹, DU Lei¹, LIAO Yanhui¹, TAN Zhilin², YANG Yiming³,
WU Minyi⁴, HUANG Weiling^{1,2}, ZHANG Dingxuan^{1,2}

(1. Department of Medical Imaging, Nansha Hospital, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511457, China; 2. Department of Medical Imaging, Nansha Hospital, the Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou 511457, China; 3. Department of Medical Imaging, Guangdong Province Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou 510030, China; 4. Department of Medical Imaging, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China)

[Abstract] **Objective** To explore drug resistance of human colon cancer SW480 tumor in nude mice with intravoxel incoherent motion (IVIM) imaging in vivo and its feasibility. **Methods** Nude mice with human colon cancer SW480 tumor in the resistant group ($n=5$) and non-drug resistant group ($n=5$) underwent IVIM imaging when the longest tumor diameter was greater than 1.50 cm, and true-diffusion coefficient (D), pseudo-diffusion coefficient (D^*) and perfusion fraction (f) of the tumor were measured. Then the mice were sacrificed, and the protein expression (Western Blot) of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), protein kinase C (PKC), necrosis (HE stain), apoptosis (TUNEL) of tumors were detected. Correlation analysis on IVIM parameters and tumor protein expression was performed. **Results** The D value of non-resistance group was higher than that of drug-resistant group ($P<0.05$). There was no statistical difference of D^* nor f between the two groups (all $P>0.05$). Tumor necrosis areas of the two groups were similar, the nucleus of drug-resistant group was larger than that of non-resistant group, while cells were arranged more closely and cell density was larger. There was no statistical difference in the apoptotic index between the two groups ($P>0.05$). Protein expression of PKC, P-gp and MRP1 in the drug-resistant group was higher than those in non-resistant group (all $P<0.05$). The D value was negatively correlated with the expression of P-gp, MRP1 and PKC (all $P<0.05$). **Conclusion** The D value of tumor in nude mice model may become a significant marker to in vivo evaluate drug resistance of nude mice with human colon cancer SW480 tumor.

[Keywords] drug resistance; colonic neoplasms; intravoxel incoherent motion; diffusion magnetic resonance imaging; mice, nude

DOI:10.13929/j.1003-3289.201810147

[基金项目] 广东省自然科学基金(2015A030313732)。

[第一作者] 谢琦(1966—),女,四川木里人,博士,主任医师、教授。研究方向:分子影像学。

[通信作者] 谢琦,广州医科大学附属广州市第一人民医院南沙医院影像科,511457;华南理工大学附属第二医院南沙医院影像科,511457。

E-mail: xieqi8@21cn.com

[收稿日期] 2018-10-26 **[修回日期]** 2019-01-23

体素内不相干运动成像在体检测人类结肠癌 SW480 裸鼠耐药性

谢琦^{1,2*}, 陈惠娴¹, 杜磊¹, 廖炎辉¹, 谭智霖²,

杨逸铭³, 吴敏仪⁴, 黄伟玲^{1,2}, 张鼎旋^{1,2}

(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, 广东 广州 511457; 2. 华南理工大学

附属第二医院南沙医院医学影像科, 广东 广州 511457; 3. 广东省中医院医学影像科,

广东 广州 510030; 4. 番禺中心医院医学影像科, 广东 广州 511400)

[摘要] 目的 探讨体素内不相干运动 (IVIM) 成像活体评价人类结肠癌 SW480 裸鼠耐药性及其可行性。方法 对耐药组 ($n=5$) 和不耐药组 ($n=5$) 人类结肠癌 SW480 荷瘤裸鼠于肿瘤最长径大于 1.50 cm 后分别行 IVIM DWI 检查, 测量肿瘤真扩散系数 (D)、假扩散系数 (D^*) 及灌注分数 (f)。处死荷瘤鼠, 检测肿瘤坏死 (HE 染色)、凋亡 (TUNEL 法) 及 P-糖蛋白 (P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1)、蛋白激酶 C (PKC) 蛋白表达 (Western Blot), 对 IVIM 参数和肿瘤蛋白表达情况进行相关分析。结果 不耐药组 D 较耐药组增高 ($P<0.05$), 2 组 D^* 和 f 差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。2 组肿瘤组织坏死区域范围相似; 耐药组细胞核较不耐药组增大, 且细胞间排列更紧密, 细胞密度较大。2 组肿瘤细胞凋亡指数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。耐药组 PKC、P-gp、MRP1 蛋白表达均较不耐药组增加 (P 均 <0.05)。肿瘤 D 值与 P-gp、MRP1、PKC 表达均呈负相关 (P 均 <0.05)。结论 IVIM 成像参数 D 值可能成为评估小鼠人类结肠癌 SW480 耐药性的指标。

[关键词] 抗药性; 结肠肿瘤; 体素内不相干运动; 扩散磁共振成像; 小鼠, 裸

[中图分类号] R-332; R445.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2019)05-0641-05

多数结肠癌患者诊断时已是中晚期, 一般以 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 化疗为主, 化疗过程中肿瘤细胞易出现对化疗药物的耐受^[1], 患者无进展生存期仅 8.7~12.3 个月。目前主要通过体外检测肿瘤标记物监测肿瘤细胞耐药性, 亟待寻找影像学方法活体监测肿瘤细胞耐药性。体素内不相干运动 (intravoxel incoherent motion, IVIM) 成像可提供与组织生理特性、细胞和细胞膜结构的相关信息, 如细胞组织结构、微结构和微循环^[2]。本研究探讨 IVIM 活体检测结肠癌小鼠对 5-FU 耐药性的可能。

1 材料与方法

1.1 人类结肠癌耐药细胞株的建立 将人类结肠癌 SW480 亲代细胞株 (购自中山大学动物中心细胞库) 培养于 37℃ 完全新鲜培养液、5% CO₂ 孵箱中, 细胞处于对数生长期时, 换为含 6 μg/ml 5-FU 的培养液培养 24 h, 再换为无 5-FU 的完全培养液培养, 1~2 天换液 1 次, 待细胞重新恢复正常增殖、生长至对数生长期时传代, 再以含此浓度 5-FU 的培养液冲击培养诱导耐药细胞株, 交替培养 6 个月, 获得可在 6 μg/ml 5-FU 浓度中稳定生长的人类结肠癌 SW480 耐药细胞株, 即

SW480/5-FU。

MTT 比色法检测人类结肠癌亲本 SW480、耐药 SW480/5-FU 细胞半抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀), 计算耐药指数 (resistance index, RI): $RI = SW480/5-FU \text{ IC}_{50} / SW480 \text{ IC}_{50}$ 。

1.2 荷瘤鼠模型制备 选取 10 只健康 BALB/c 裸小鼠 (购自中山大学实验动物中心), 雌性, 5~6 周龄, 体质量约 16~18 g。将其分为耐药组 ($n=5$) 和不耐药组 ($n=5$), 分别于其双侧大腿根部皮下注入 SW480/5-FU 和 SW480 细胞悬液 (0.2 ml/侧, 细胞浓度 4×10^7 /ml), 定期观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至最长径 1.50 cm 以上行 MR 检查。

1.3 MR 检查 采用 Siemens Magnetom Skyra 3.0T MR 系统, 上海辰光 8 通道相控阵鼠标式鼠线圈。腹腔麻醉荷瘤鼠后以俯卧位保定进行 MR 扫描: T2W 快速自旋回波 (turbo spin echo, TSE) 序列, TR 4 500 ms, TE 110 ms, 层厚 2 mm, 层间隔 0, FOV 128 mm×128 mm, NAS 4, 采集矩阵 128×128, 重建矩阵 512×512, 行轴位 (图 1A)、冠状位 (图 1B)、矢状位成像, 扫描时间 2 min 2 s; T1W TSE 序列, TR 2 780 ms,

TE 15 ms, 层厚 2 mm, 间隔 0, FOV 200 mm × 200 mm, NAS 2, 采集矩阵 200 × 200, 重建矩阵 768 × 768, 行冠状位成像 (图 1C), 扫描时间 1 min 46 s; DWI 采用 EPI 序列, 轴位, TR 3 400 ms, TE 60 ms, 按各向同性施加扩散敏感梯度场, 取 8 个 b 值 (0、50、100、150、200、400、800、1 200 s/mm²)。FOV

220 mm × 220 mm, NAS 3, 层厚 2 mm, 采集矩阵 220 × 220, 重建矩阵 308 × 308, 扫描时间 13 min 39 s。

由 2 名放射科医师以盲法对多 b 值 DWI 图像进行分析, 意见不同则经协商达成一致。将多 b 值 DWI 数据导入 MITK Diffusion Version 2013.03.00 软件, 在肿瘤最大切面实性区域选择 3 个 ROI, 避开出血、囊变及坏死区域, 记录真扩散系数 (true-diffusion coefficient, D)、假扩散系数 (pseudo-diffusion coefficient, D^{*})、灌注分数 (perfusion fraction, f), 并取均值。

1.4 细胞学检测 MR 检查结束后经腹腔注射 10% 水合氯醛处死荷瘤鼠, 完整取出肿瘤放入冰生理盐水。将肿瘤分为 2 份。1 份放入 4% 多聚甲醛溶液固定, 用于 HE 染色并采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 法检测细胞凋亡; 由 2 名病理科医师分别按相同标准在偏光显微镜下分析病理切片, 凋亡细胞为细胞核呈棕黄色, 随机选取 5 个高倍 (×400) 视野观察, 计算 TUNEL 凋亡细胞与细胞总数的百分比, 即细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI), 取 2 名医师的均值。另 1 份放入液氮, 行 Western Blot 检测 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 表达。采用凝胶图象处理系统 Image J 分析条带的净光密度值, 计算蛋白表达光密度比 (relative integrated optical density, RIOD)。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 以 Spearman 分析观察 IVIM 参数与肿瘤细胞蛋白表达的相关性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

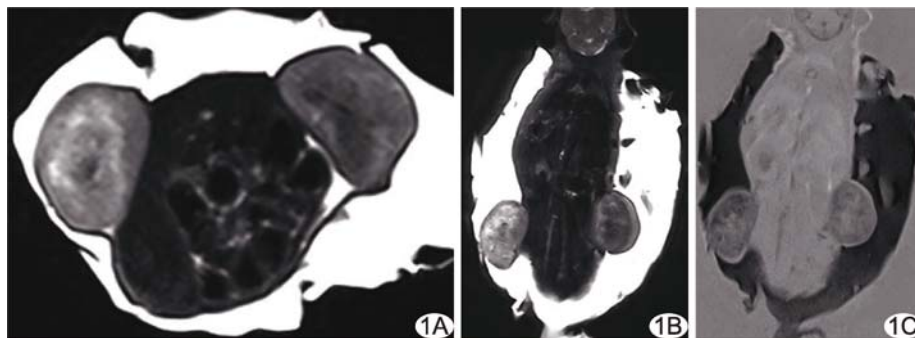


图 1 荷瘤鼠 MR 成像 A. 轴位 T2WI; B. 冠状位 T2WI; C. 冠状位 T1WI

2 结果

耐药组 SW480/5-FU 细胞 IC₅₀ 为 20.59 μg/ml, 不耐药组 SW480 细胞 IC₅₀ 为 4.64 μg/ml, RI = 4.44。

不耐药组肿瘤 D 值较耐药组增加 (P = 0.008), 2 组肿瘤 D^{*} 值、f 值差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表 1。

表 1 耐药组与不耐药组肿瘤 D 值、D^{*} 值、f 值比较 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

组别	D (× 10 ⁻³ mm ² /s)	D [*] (× 10 ⁻³ mm ² /s)	f (%)
耐药组	0.63 ± 0.05	2.81 ± 0.92	5.58 ± 1.55
不耐药组	0.95 ± 0.18	5.20 ± 2.36	7.59 ± 3.47
Z 值	2.611	1.776	0.940
P 值	0.008	0.095	0.421

HE 染色示 2 组肿瘤坏死区域范围相似; 耐药组细胞核较不耐药组增大, 且细胞间排列更紧密, 细胞密度较大 (图 2)。TUNEL 法发现 2 组均可见散在的细胞核呈棕黄染色的凋亡细胞 (图 3), 耐药组和不耐药组 AI 分别为 (38.24 ± 5.58)%、(31.42 ± 10.31)%, 差异无统计学意义 (Z = -1.091, P = 0.275)。耐药组 P-gp、MRP1、PKC 表达量均较不耐药组增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 2。

表 2 耐药组与不耐药组蛋白表达 RIOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

组别	P-gp	MRP1	PKC
不耐药组	0.20 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02
耐药组	0.31 ± 0.08	0.69 ± 0.10	0.86 ± 0.06
Z 值	2.611	2.785	2.668
P 值	0.003	0.005	0.008

肿瘤 D 值与 P-gp ($r_s = -0.697$, P = 0.025)、MRP1 ($r_s = -0.925$, P < 0.001)、PKC ($r_s = -0.693$, P = 0.026) 表达均呈负相关。

3 讨论

目前肿瘤耐药性监测多采用体外实验^[3]。但肿瘤

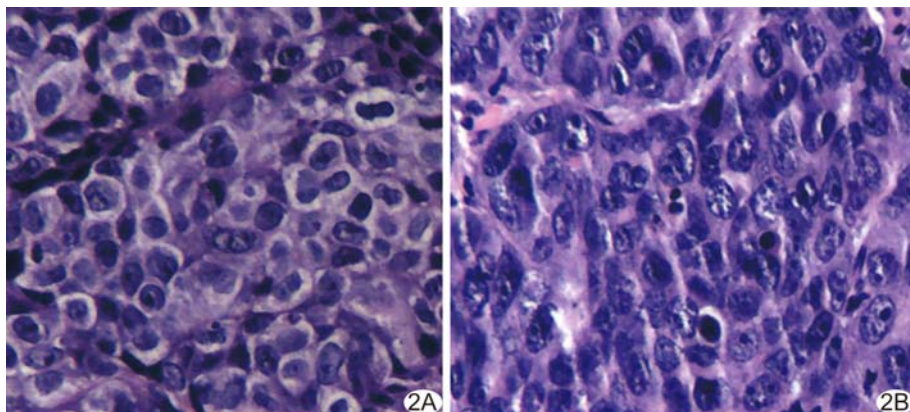


图2 病理图(HE, ×400) A. 不耐药组; B. 耐药组 耐药组 W480/5-FU 细胞核较 SW480 增大, 且细胞间排列更紧密

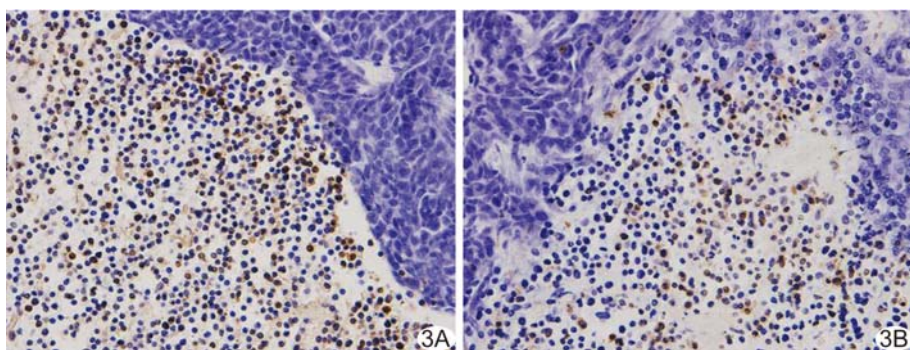


图3 肿瘤组织细胞凋亡检测(TUNEL 法, ×400) A. 不耐药组; B. 耐药组 2 组均发现散在细胞核呈棕黄染色的凋亡细胞

组织是分化不均匀的异质性和多形性细胞群体, 体外实验仅能检测活检区域肿瘤组织的耐药情况, 不能准确反映其整体耐药性; 且体外检测只有取得肿瘤标本才可进行, 为有创检查, 所需时间较长, 肿瘤组织离体后某些代谢物含量会产生改变, 最终可能影响实验结果。因此, 探索一种便捷、可靠的方法以活体评价整个肿瘤的耐药性有重要价值。

DWI 可无创进行微观水平活体成像, 准确、快速显示空间结构和组织成分。组织中水分子扩散能力与组织细胞密度和细胞膜完整性呈负相关, 细胞膜不完整或细胞间隙增大时, 水分子运动受限程度减低, DWI 信号增高^[2]。ADC 能量化分析可反映活体组织中水分子扩散运动受限程度, 及组织构成、功能状态与微观结构等变化^[4]。本课题组前期研究^[5]结果显示, 与不耐药组移植瘤对比, 耐药组移植瘤 ADC 值降低 ($P > 0.05$), 提示当肿瘤产生耐药时, 其生物学性状的差异可能导致以上表征改变, 并通过水分子交换功能的改变而体现。另外, 组织内水分子扩散还受微循环血液灌注等因素影响, 而传统 DWI 忽略了局部毛细血

管网的微循环灌注对 ADC 值的影响^[4-6]。

IVIM 模型通过分析多 b 值 DWI 图像而对水分子扩散运动与微循环血液灌注^[2]单独量化, 获得扩散相关参数 D 值和灌注相关参数 D^* 、f 值。D 值反映水分子在组织中的流动性, 取决于细胞与细胞外空间的曲折度、细胞膜的完整性和流体的黏度^[7-10]; D^* 值反映体素内微循环灌注相关的扩散效应, 取决于血流速度和微血管段的长度^[11-13]。f 为体素内微循环相关的灌注效应占总体扩散效应容积的比值, 是微血管血流对 DWI 信号的相对变化^[2,4]。因此, IVIM 评价肿瘤耐药性更具有潜在价值。

IVIM 可不受微循环灌注等因素影响而反映相对客观可信的水分子扩散状态。扩散系数主要取决于细胞内和细胞外的空间组织比, D 值一般被认为与细胞密度呈负相关^[2,4,6]。有研究^[14]显示

化疗后鼻咽癌病灶 D 值增加, 可能是由于化疗药物杀伤肿瘤细胞, 导致细胞密度减少所致。本研究不耐药组移植瘤 D 值较耐药组增高 ($P < 0.05$), 且与肿瘤耐药相关蛋白表达呈负相关; 肿瘤组学研究显示 2 组肿瘤细胞的坏死、凋亡无显著差别, 但耐药组细胞形态不规则、组织间隙较不耐药组小, 核浆比较不耐药组增大。推测这是由于亲本 SW480 结肠癌在 5-FU 反复刺激下肿瘤细胞生物学性状发生改变, 增殖能力增强, 细胞核增大, 成瘤后细胞密度增加、胞外间隙变窄, 导致肿瘤水分子扩散能力减弱, D 值降低。细胞密度增大可导致肿瘤血管形成受阻, 最终导致肿瘤缺血坏死和酸中毒, 致使对化疗药物不敏感; 且由于肿瘤血管缺乏化疗药物到达瘤体的“通道”, 使瘤内药物浓度较低。以上机制均可能与肿瘤多药耐药相关^[15]。

D^* 值与平均血流速度和平均毛细血管段长度呈正比, 而 f 值较高则提示肿瘤血供较为丰富。血管量也可对肿瘤耐药性产生影响, 理论上血供较多的肿瘤出现缺氧坏死和酸中毒的概率较低, 且化疗药物浓度也与肿瘤血供呈正相关。但 Koh 等^[16]发现鼻咽癌放

化疗有效组及无效组间 f 值和 D^* 值差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。Hauser 等^[14]则发现鼻咽癌 f 值越高, 对化疗药物越不敏感, 预后反而较差。Che 等^[17]观察乳腺癌辅助化疗患者, 敏感组 f 值低于非敏感组 ($P < 0.05$), 2 组 D^* 值差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。本研究耐药组和不耐药组 f 值和 D^* 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可能由于 IVIM 成像尚不能反映肿瘤组织毛细血管特性和血流动力学的变化。此外, 本研究显示移植瘤表面可见一层纤维包膜覆盖, 可能对肿瘤血管生长与侵入起阻碍作用, 不能完全模拟原位肿瘤的血供特点, 这也可能降低了通过 f 值和 D^* 检测肿瘤耐药的敏感度。

总之, 与不耐药组裸鼠人类结肠移植瘤相比, 耐药组 D 值降低, 并与肿瘤耐药蛋白表达呈负相关, 提示 D 值可能成为活体检测肿瘤耐药性的分子标记物。

[参考文献]

- [1] Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, et al. Global burden of cancer in 2008: A systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet*, 2012, 380(9856): 1840-1850.
- [2] Mannelli L, Nougaret S, Vargas HA, et al. Advances in diffusion-weighted imaging. *Radiol Clin North Am*, 2015, 53(3): 569-581.
- [3] 李婷, 贾钰铭, 雷开健. 体外肿瘤细胞药敏试验方法概述. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(5): 828-830.
- [4] Murtz P, Sprinkart AM, Reick M, et al. Accurate IVIM model-based liver lesion characterisation can be achieved with only three b-value DWI. *Eur Radiol*, 2018, 28(10): 4418-4428.
- [5] 谢琦, 杨逸铭, 吴敏仪, 等. 磁共振弥散成像对耐药与不耐药结肠癌荷瘤鼠检测的观察. *中国临床医学影像杂志*, 2016, 27(5): 355-358, 366.
- [6] De Robertis R, Tinazzi MP, Demozzi E, et al. Diffusion-weighted imaging of pancreatic cancer. *World J Radiol*, 2015, 7(10): 319-328.
- [7] Taouli B, Koh DM. Diffusion-weighted MR imaging of the liver. *Radiology*, 2010, 254(1): 47-66.
- [8] Takahara T, Kwee TC. Low b-value diffusion-weighted imaging: Emerging applications in the body. *J Magn Reson Imaging*, 2012, 35(6): 1266-1273.
- [9] Padhani AR, Liu G, Koh DM, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: Consensus and recommendations. *Neoplasia*, 2009, 11(2): 102-125.
- [10] Aoyagi T, Shuto K, Okazumi S, et al. Apparent diffusion coefficient correlation with oesophageal tumour stroma and angiogenesis. *Eur Radiol*, 2012, 22(6): 1172-1177.
- [11] Xiao-ping Y, Jing H, Fei-ping L, et al. Intravoxel incoherent motion MRI for predicting early response to induction chemotherapy and chemoradiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Magn Reson Imaging*, 2016, 43(5): 1179-1190.
- [12] Cho GY, Kim S, Jensen JH, et al. A versatile flow phantom for intravoxel incoherent motion MRI. *Magn Reson Med*, 2012, 67(6): 1710-1720.
- [13] 张晨, 郑卓肇, 赵本琦. 体素内不相干运动扩散加权成像鉴别诊断肝脏实性局灶性病变. *中国介入影像与治疗学*, 2018, 15(7): 419-423.
- [14] Hauser T, Essig M, Jensen A, et al. Characterization and therapy monitoring of head and neck carcinomas using diffusion-imaging-based intravoxel incoherent motion parameters—preliminary results. *Neuroradiology*, 2013, 55(5): 527-536.
- [15] Harguindevy S, Arranz JL, Polo Orozco JD, et al. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs—an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 282.
- [16] Koh DM, Collins DJ, Orton MR. Intravoxel incoherent motion in body diffusion-weighted MRI: Reality and challenges. *AJR Am J Roentgenol*, 2011, 196(6): 1351-1361.
- [17] Che S, Zhao X, Ou Y, et al. Role of the intravoxel incoherent motion diffusion weighted imaging in the pre-treatment prediction and early response monitoring to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(4): e2420.