

❖ 实验研究

Intravoxel incoherent motion DWI in assessment of hypoxic status of tumor microenvironment of C6 glioma model in SD rats

XU Man, YU Yongqiang*, HOU Weishu, PAN Hongli

(Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of intravoxel incoherent motion DWI (IVIM-DWI) in assessment of hypoxic status of tumor microenvironment of C6 glioma in SD rat models. **Methods** C6 glioma models were established in 48 SD rats. IVIM-DWI scanning were performed on 16 rats on the 14th day, 21st day and 28th day after modeling, respectively, and parameters of ADC, slow diffusion coefficient (D), fast diffusion coefficient (D^*) and fractional perfusion-related volume (f) were obtained. The rats were scarified after each scanning, and the tumors were removed for hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) immunohistochemical staining and scoring. Differences of IVIM-DWI parameters and HIF-1 α score at different time points were compared, and correlation between parameters of IVIM-DWI and HIF-1 α score were analyzed. **Results** There were statistical differences of IVIM-DWI parameters and HIF-1 α score on the 14th day, 21st day and 28th day after modeling (all $P < 0.01$). On the 21st day after modeling, HIF-1 α score was negatively correlated with D , D^* and f ($r = -0.73, -0.58, -0.67$, all $P < 0.05$), while on the 28th day after modeling, HIF-1 α score were negatively correlated with D and f ($r = -0.60, -0.65$, both $P < 0.05$). **Conclusion** IVIM-DWI can be used to assess hypoxic status of tumor microenvironment of C6 glioma SD rat models.

[Keywords] glioma; magnetic resonance imaging; intravoxel incoherent motion imaging; hypoxia-inducible factor 1
DOI:10.13929/j.1003-3289.201806071

体素内不相干运动 DWI 评估 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境缺氧状态

徐 曼, 余永强*, 侯唯姝, 潘红利

(安徽医科大学第一附属医院放射科, 安徽 合肥 230022)

[摘要] **目的** 观察体素内不相干运动 DWI (IVIM-DWI) 评估 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境缺氧状态的可行性。**方法** 建立 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型 ($n=48$), 于造模第 14、21 及 28 天分别取 16 只大鼠行 IVIM-DWI, 获得 ADC、纯扩散系数 (D)、伪灌注扩散系数 (D^*) 及灌注分数 (f)。每次扫描后处死大鼠, 取肿瘤组织行缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 免疫组织化学染色并评分, 比较造模后各时间点 IVIM-DWI 参数及 HIF-1 α 评分差异, 分析 IVIM-DWI 参数与 HIF-1 α 评分的相关性。**结果** 造模第 14、21 及 28 天, IVIM-DWI 各参数及 HIF-1 α 评分比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。造模第 21 天, D 、 D^* 、 f 均与 HIF-1 α 评分呈负相关 ($r = -0.73, -0.58, -0.67$, P 均 < 0.05); 造模第 28 天, D 、 f 均与 HIF-1 α 评分呈负相关 ($r = -0.60, -0.65$, P 均 < 0.05)。**结论** IVIM-DWI 能够评价 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境缺氧状态。

[基金项目] 合肥市借转补项目 (YW201608080003)。

[第一作者] 徐曼 (1992—) 女, 安徽肥西人, 硕士, 医师。研究方向: 神经影像学。E-mail: 1245381859@qq.com

[通信作者] 余永强, 安徽医科大学第一附属医院放射科, 230022。E-mail: cjr.yuyongqiang@vip.163.com

[收稿日期] 2018-06-13 **[修回日期]** 2018-11-04

[关键词] 神经胶质瘤;磁共振成像;体素内不相干运动;缺氧诱导因子 1

[中图分类号] R739.41; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2019)02-0170-05

胶质瘤是一种瘤内微血管高度增生的原发性脑肿瘤,呈浸润性生长,高表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[1]。目前对于胶质瘤的标准治疗方案为手术联合放化疗^[2-3],但患者预后较差^[4],胶质瘤微环境呈乏氧状态是影响疗效的主要因素^[5-6]。既往主要采用检测氧分压、PET 等评估胶质瘤微环境的乏氧程度,但氧分压检测为有创性检查, PET 具有辐射,且二者均不能动态评估乏氧状态。体素内不相干运动 DWI(intravoxel incoherent motion-DWI, IVIM-DWI)采用多个 b 值获取系列 DWI,可区分水分子扩散与血液灌注信息,反映活体内的微观运动。本研究探讨 IVIM-DWI 评估 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境乏氧状态的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择清洁级 SD 大鼠 48 只,雄性,体重 250~300 g,由安徽医科大学实验动物中心提供[许可证号:scxk(皖)2017-001]。本研究经我院动物伦理委员会论证并通过。

1.2 胶质瘤模型建立 对体外培养处于 80% 对数生长期的大鼠胶质瘤 C6 细胞进行消化,制备浓度为 $10^8/\text{ml} \sim 10^{10}/\text{ml}$ 的细胞悬液备用。将 SD 大鼠麻醉后保定于定位仪,暴露术区颅骨,以冠状缝前 1 mm、矢状缝右 3 mm 为钻孔点钻开颅骨。采用微量注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μl ,自钻孔点进针至硬脑膜下 6 mm 时后退 1 mm,将细胞悬液缓慢注入大鼠脑实

质,注射速度约 1 $\mu\text{l}/\text{min}$,注射完毕停留 5 min,拔针。封闭颅骨钻孔,缝合切口,待大鼠苏醒后送回动物房饲养。

1.3 仪器与方法 采用 GE Discovery MR750W 3.0T MR 扫描仪,4 通道实验动物专用线圈。在造模第 14、21 及 28 天分别取大鼠 16 只,对其行头部扫描,采集常规 MRI 及 IVIM-DWI。FSE T1WI: FOV 6 cm $\times$ 6 cm,矩阵 256 $\times$ 256,层厚 2 mm,间距 0.5 mm,TR 2 532.1 ms,TE 24 ms; FSE T2WI: FOV 6 cm $\times$ 6 cm,矩阵 256 $\times$ 256,层厚 2 mm,间距 0.5 mm,TR 4 746 ms,TE 120 ms。IVIM-DWI: FOV 6 cm $\times$ 6 cm,矩阵 128 $\times$ 128,层厚 2.4 mm, NEX 4,TR 3 000 ms,TE 102.4 ms,FA 90°,扩散敏感系数 b 值分别取 0、10、20、50、100、200、400、600、800 s/mm^2 。

1.4 图像分析 由 2 名影像科主治医师阅片,意见不同时经协商达成一致。采用 GE ADW 4.6 工作站提供的 MADC 软件对 IVIM-DWI(图 1)进行后处理,在肿瘤实性成分最明显的连续 3 个层面上勾画 ROI,避开出血及坏死区域,获得参数 ADC、纯扩散系数(D)、伪灌注扩散系数(D*)及灌注分数(f)。

1.5 病理分析 每次 MR 扫描后处死大鼠,以 4% 甲醛溶液灌注心脏后取胶质瘤组织,石蜡包埋后切片,行 HE 染色及缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)免疫组织化学染色(图 2)。

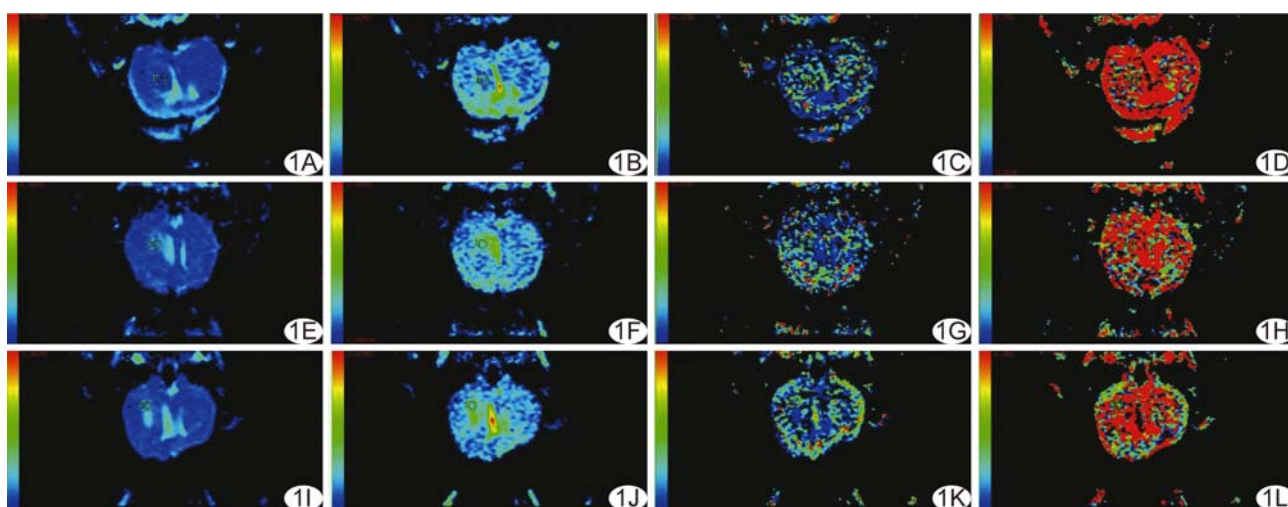


图 1 造模不同时间 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型头部 IVIM-DWI 伪彩图 A~D. 分别为造模第 14 天时 ADC(A)、D(B)、D* (C)、f(D)伪彩图; E~H. 分别为造模第 21 天时 ADC(E)、D(F)、D* (G)、f(H)伪彩图; I~L. 分别为造模第 28 天时 ADC(I)、D(J)、D* (K)、f(L)伪彩图

以细胞质内出现棕色颗粒状物判定为 HIF-1 α 染色阳性。低倍镜($\times 100$)下观察切片,随机选择 5 个 HIF-1 α 阳性细胞密集区,高倍镜($\times 200$)下对密集区内阳性细胞进行计数,每个视野计数 100 个细胞(排除非特异性染色细胞)。根据视野内 HIF-1 α 阳性细胞占有细胞的百分比及阳性细胞染色程度对免疫组化结果进行评分:无 HIF-1 α 阳性细胞为 0 分, HIF-1 α 阳性细胞占有细胞的百分比 $< 10\%$ 为 1 分、 $10\% \sim 50\%$ 为 2 分、 $> 50\% \sim 75\%$ 为 3 分、 $> 75\%$ 为 4 分;细胞质无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。以 2 项评分的乘积作为 HIF-1 α 评分结果。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计分析软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较各时间点 IVIM-DWI 参数及 HIF-1 α 评分的差异,2 时间点间比较采用 SNK- q 检验。以 Pearson 相关分析观察各时间点 IVIM-DWI 参数与 HIF-1 α 评分的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

常规 MRI:造模第 14 天肿瘤组织呈 T1WI 低信号、T2WI 稍高信号;造模第 21 天肿瘤组织较造模第 14 天稍增大,呈 T1WI 低信号、T2WI 稍高信号;造模第 28 天肿瘤内见坏死区,坏死区呈 T1WI 低信号、T2WI 高信号。HE 染色:造模第 14 天肿瘤细胞分布密集;第 21、28 天见部分肿瘤细胞坏死,坏死区细胞数减少、细胞核裂解,且第 28 天坏死区面积较第 21 天增大。

2.1 各时间点 IVIM-DWI 参数及 HIF-1 α 评分比较 造模第 14、21 及 28 天,IVIM-DWI 各参数及 HIF-1 α 评分比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。与造模第 14 天比较,造模第 21 天 ADC、D、f 及 HIF-1 α 评分均升高, D^* 降低;造模第 28 天 ADC 值、D 及 HIF-1 α 评分均升高, f 降低;差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。与造模第 21 天比较,造模第 28 天 D^* 升高、 f 及 HIF-1 α 评分均降低(P 均 < 0.05)。见表 1。

2.2 IVIM-DWI 参数与 HIF-1 α 评分的相关性 造

表 1 造模后各时间点 IVIM-DWI 参数及 HIF-1 α 评分比较($\bar{x} \pm s$)

时间	ADC ($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	D ($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	D^* ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	f	HIF-1 α 评分
第 14 天	3.07 $\pm$ 1.35	4.41 $\pm$ 1.09	4.90 $\pm$ 1.31	0.38 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 2.09
第 21 天	4.28 $\pm$ 1.13 [*]	8.08 $\pm$ 0.87 [*]	3.07 $\pm$ 1.00 [*]	0.49 $\pm$ 0.07 [*]	5.94 $\pm$ 3.73 [*]
第 28 天	4.60 $\pm$ 1.11 [*]	8.27 $\pm$ 1.10 [*]	4.80 $\pm$ 1.52 [#]	0.26 $\pm$ 0.09 ^{*#}	4.00 $\pm$ 2.00 ^{*#}
F 值	6.72	71.59	10.08	35.62	11.28
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:*,与第 14 天比较, $P < 0.05$;#,与第 21 天比较, $P < 0.05$

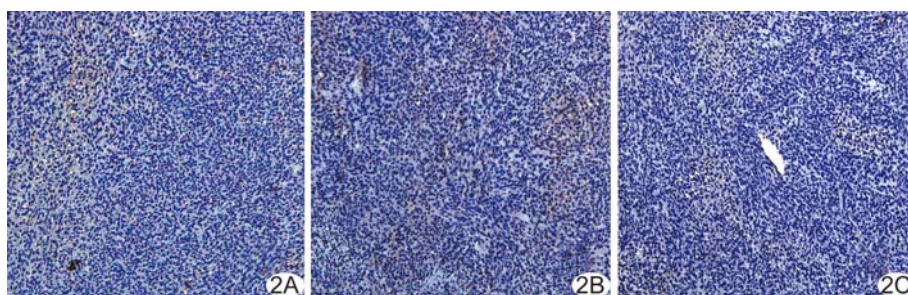


图 2 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤组织 HIF-1 α 免疫组织化学染色图($\times 100$) 细胞质内出现棕色颗粒为 HIF-1 α 阳性细胞,造模第 14 天(A)阳性细胞较第 21 天(B)及 28 天(C)减少,第 28 天(C)阳性细胞较第 21 天减少

模第 14 天 IVIM-DWI 各参数与 HIF-1 α 评分均无明显相关性(P 均 > 0.05);造模第 21 天 D、 D^* 、f 与 HIF-1 α 评分均呈负相关($r = -0.73$ 、 -0.58 、 -0.67 , P 均 < 0.05);造模第 28 天 D、f 与 HIF-1 α 评分均呈负相关($r = -0.60$ 、 -0.65 , P 均 < 0.05);造模第 21 及 28 天 HIF-1 α 评分与 ADC 均无明显相关性(P 均 > 0.05)。

3 讨论

胶质瘤通过刺激新生血管生成以保证氧气及其他营养成分的供应,但新生血管内皮细胞功能不全,当肿瘤细胞氧消耗大于氧供应,且营养成分如糖类等供给不能满足细胞增殖所需时,造成肿瘤微环境缺氧,肿瘤组织内出现乏氧区;乏氧严重导致细胞坏死、细胞核裂解,并逐渐发展为坏死区^[7-8]。胶质瘤组织出现乏氧坏死区是导致其耐药、预后不良的原因之一。目前临床主要通过检测氧分压评估胶质瘤微环境的乏氧状态及程度,但该检查有创,患者接受度低;PET 等影像学方法亦可用于评估胶质瘤微环境的乏氧状态及程度,但具有辐射。

IVIM-DWI 以多 b 值获取系列 DWI 图像,根据双指数模型拟合,获得组织扩散系数和微毛细血管灌注信息^[9]。低 b 值扫描获得的 DWI 反映组织内血流灌注及水分子扩散,且以对前者的反映为著;高 b 值扫描图像仅反映组织水分子扩散;故采用多 b 值扫描的 IVIM-DWI 可将肿瘤组织血流灌注和水分子扩散分

开,且无创、无需使用对比剂^[10]。有研究^[11-12]发现,IVIM-DWI 可用于指导胶质瘤术前病理分期、鉴别高级别胶质瘤和转移瘤等。本研究拟采用 IVIM-DWI 评估 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境缺氧状态。

既往研究^[13]报道,氧敏感转录因子 HIF-1 α 可感知肿瘤细胞氧及葡萄糖缺乏,表现为 HIF-1 α 在肿瘤组织邻近坏死区周围的缺氧区高表达。本研究免疫组织化学染色结果显示,造模第 14、21 及 28 天 HIF-1 α 评分比较差异均有统计学意义(P 均 <0.01),且造模第 21 及 28 天 HIF-1 α 评分均高于第 14 天,提示随着胶质瘤的进展,肿瘤微环境出现缺氧;但造模第 28 天 HIF-1 α 评分较第 21 天降低,可能原因为造模第 21、28 天肿瘤内出现坏死区,且第 28 天坏死区面积大于第 21 天,使缺氧区相对减小,HIF-1 α 表达降低。

IVIM-DWI 结果显示,造模第 14、21 及 28 天 IVIM-DWI 各参数比较差异均有统计学意义(P 均 <0.01),且造模第 21 天 D^* 、 f 与 HIF-1 α 评分均呈负相关,造模第 28 天 D 、 f 与 HIF-1 α 评分均呈负相关,提示 IVIM-DWI 可能反映肿瘤微环境的缺氧状态。造模第 28 天 ADC、 D 与第 21 天比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05),可能原因为选取 ROI 时人为避开坏死区,使 2 个时间点 ROI 内肿瘤细胞密度相似,水分子扩散受限程度亦相似;造模第 14 天与第 28 天 D^* 比较差异无统计学意义($P>0.05$),可能是造模第 28 天时肿瘤内缺氧区发展为坏死区,肿瘤组织内血流发生变化,导致检测到的 D^* 可能存在误差。造模第 21、28 天时 HIF-1 α 评分与 D 均呈负相关,可能原因为这 2 个时间点肿瘤缺氧区 HIF-1 α 表达水平较高,且缺氧区肿瘤细胞数量多、排列密集,导致水分子扩散受限。造模第 21、28 天 HIF-1 α 评分与 f 呈负相关, f 与血流量及血容量有关,反映肿瘤组织的灌注情况,造模第 21、28 天肿瘤细胞增殖快,能量及营养缺乏,HIF-1 α 表达增加,但坏死区的出现使血液灌注相对下降,故 HIF-1 α 评分与 f 呈负相关。造模第 21 天 HIF-1 α 评分与 D^* 呈负相关,而造模第 28 天二者无明显相关性,可能原因为中枢神经系统的血流量相较于其他系统少,且 D^* 易受肿瘤内细胞异质性及缺氧区血供等因素干扰,影响 D^* 准确性^[14]。造模第 14 天时 IVIM 各参数与 HIF-1 α 评分均无明显相关性,原因可能为造模第 14 天肿瘤体积较小,血液及糖类等营养供给尚可,尚未形成明显缺氧及坏死区。造模第 14、21 及 28 天时 HIF-1 α 评分与 ADC 均无明显相关性,可能原因为胶质瘤细胞异质性和水分子扩散运动的复杂性,使

ADC 不能准确反映肿瘤细胞密度等特征。

综上所述,IVIM-DWI 能够用于评价 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型肿瘤微环境缺氧状态。但随着缺氧程度增加,坏死区逐渐增大,导致肿瘤组织血流发生变化、肿瘤细胞侵袭性增加等,影响 IVIM-DWI 参数的准确性;此外,本研究样本量相对较少,且选取 ROI 时人为避开坏死区,动物模型受饲养环境等影响,HIF-1 α 免疫组织化学结果受染色环境、大鼠灌注效果等影响;故本研究尚需进一步完善。

[参考文献]

- [1] Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2009, 27(5): 740-745.
- [2] Sun C, Yu Y, Wang L, et al. Additive antiangiogenesis effect of ginsenoside Rg3 with low-dose metronomic temozolomide on rat glioma cells both in vivo and in vitro. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35:32.
- [3] Zhou Q, Mu K, Jiang L, et al. Glioma-targeting micelles for optical/magnetic resonance dual-mode imaging. *Int J Nanomed*, 2015, 10:1805-1818.
- [4] Wang JY, Bettegowda C. Genetics and immunotherapy: Using the genetic landscape of gliomas to inform management strategies. *Neurooncol*, 2015, 123(3):373-383.
- [5] Hatipoglu G, Hock SW, Weiss R, et al. Sunitinib impedes brain tumor progression and reduces tumor-induced neurodegeneration in the microenvironment. *Cancer Sci*, 2015, 106(2):160-170.
- [6] Lo Dico A, Martelli C, Valtorta S, et al. Identification of imaging biomarkers for the assessment of tumour response to different treatments in a preclinical glioma model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 42(7):1093-1105.
- [7] Marampon F, Gravina GL, Zani BM, et al. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1 α functional interplay. *Int J Oncol*, 2014, 44(6):2121-2131.
- [8] Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, 2009, 15(6):501-513.
- [9] Lima M, Le Bihan D. Clinical intravoxel incoherent motion and diffusion MR imaging: Past, present, and future. *Radiology*, 2016, 278(1):13-32.
- [10] Lee HJ, Rha SY, Chung YE, et al. Tumor perfusion-related parameter of diffusion-weighted magnetic resonance imaging: Correlation with histological microvessel density. *Magn Reson Med*, 2014, 71(4):1554-1558.
- [11] 宋双双,赵继平,马敏阁,等. 体素内不相干运动 DWI 鉴别诊断高级别胶质瘤与脑转移瘤. *中国医学影像技术*, 2018, 34(6): 826-830.

- [12] 徐蒙来,陈宏伟,汤群峰,等. IVIM-DWI 在胶质瘤分级中的诊断价值. 临床放射学杂志, 2018, 37(2):182-189.
- [13] Jensen RL, Mumert ML, Gillespie DL, et al. Preoperative dynamic contrast-enhanced MRI correlates with molecular markers of hypoxia and vascularity in specific areas of intratumoral microenvironment and is predictive of patient outcome. Neuro Oncol, 2014, 16(2):280-291.
- [14] Lemke A, Laun FB, Klauss M, et al. An evaluation of the sensitivity of the intravoxel incoherent motion (IVIM) method of blood flow measurement to changes in cerebral blood flow. Invest Radiol, 2009, 44(12):769-775.

Ultrasonic manifestations of facial neurinoma located in parotid gland region: Case report

腮腺区面神经鞘瘤超声表现 1 例

张卓恒, 韩雪莉, 闫媛媛, 史海宏

(郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007)

[Keywords] facial nerve; neuroma; ultrasonography

[关键词] 面神经; 神经瘤; 超声检查

DOI:10.13929/j.1003-3289.201804051

[中图分类号] R739.81; R445.1

[文献标识码] B

[文章编号] 1003-3289(2019)02-0174-01



图 1 右侧腮腺区面神经鞘瘤 A. 声像图示右侧耳下区腮腺与咬肌之间的低回声; B. 声像图示右侧面部咬肌浅方不规则条索状低回声; C. CDFI 示条索状低回声内少许细点状血流信号; D. 病理图(HE, ×100)

患者男, 21 岁, 因“发现右侧腮腺区肿物 2 个月”就诊。查体: 右侧腮腺区触及多发肿物, 呈串珠状排列, 较大者直径约 15 mm, 质硬, 无压痛, 活动度一般, 局部皮肤无红肿, 无压痛。超声检查: 右侧面部咬肌浅侧见条索状低回声, 长约 59.2 mm, 最宽处内径约 6.4 mm, 形态不规则, 呈串珠样改变, 边界清楚, 内部回声不均匀, 近端位于右侧腮腺与咬肌间隙, 呈细管状延伸至腮腺腺体内, 远端膨大, 终止于咬肌前缘水平(图 1A、1B); 右侧腮腺大小形态正常, 腺体回声均匀; CDFI 可见细点状血流信号(图 1C)。超声考虑右侧腮腺导管占位。行腮腺肿物切除+面神经嵌压松懈术。术中见肿物位于右侧面神经颊支处, 约 40.4 mm×10.3 mm, 质韧, 边界清楚。术后病理(图 1D): 右侧面神经颊支肿物, 符合神经鞘瘤。

讨论 面神经鞘瘤为生长缓慢的良性肿瘤。面神经由脑池、内听道、颞骨和腮腺 4 段组成, 面神经鞘瘤可发生于面神经

通路的任何部位, 以颞骨段多见, 发生于腮腺段者较罕见。本病男女均可发病, 以男性常见, 好发年龄为 20~30 岁。因发生部位不同, 临床表现多样, 发生于腮腺区的面神经鞘瘤表现为不同程度的面神经麻痹和局部肿块形成, 与腮腺肿瘤难以鉴别。腮腺段面神经鞘瘤超声可表现为均匀低回声、不均质高回声或混合回声, 边界清楚, 其中以均匀低回声较为常见。超声检查时, 在长轴切面肿瘤的一端或两端可探及与之相连的神经干细尾状低回声, 有助于本病的诊断。本例患者声像图表现为不规则条索状低回声, 边界清晰, 近端可见明显神经干尾状低回声, 右侧腮腺未见明显异常。手术切除是治疗面神经鞘瘤的主要方法。超声声像图可显示腮腺区肿块的位置、大小、形状、与周边组织的关系和血供情况, 有助于术前全面评估, 减少术中损伤面神经的概率。腮腺区面神经鞘瘤超声表现虽有一定特异性, 但确诊仍依赖于病理学检查。

[第一作者] 张卓恒(1982—), 男, 河南郑州人, 本科, 主治医师。E-mail: 478369059@qq.com

[收稿日期] 2018-04-09 [修回日期] 2018-09-06