

超声造影评估裸鼠胰腺癌微血管分布的实验研究

范 义

摘 要 **目的** 探讨超声造影评估裸鼠胰腺肿瘤内血流灌注状态的价值。**方法** 建立人胰腺癌裸鼠原位移植瘤模型 40 只,应用随机数字表法分为对照组和实验组各 20 只,实验组动物接受重组人血管内皮抑素治疗,对照组动物接受安慰剂治疗。所有实验动物在处死前均行超声造影检查,测定两组裸鼠胰腺肿瘤组织时间-强度曲线的峰值强度(PI)和曲线下面积(AUC)。应用免疫组化法测定血管内皮生长因子(VEGF)和 CD34 在胰腺肿瘤组织中的相对含量;明胶-氧化铅血管造影法检测胰腺肿瘤单位体积血管密度,分析 PI 和 AUC 与血管密度指标的相关性。**结果** 对照组裸鼠胰腺肿瘤组织的 PI 和 AUC 分别为(68.83±7.27)dB、859.93±114.27,均高于实验组(32.64±5.15)dB、523.68±57.06,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。对照组和实验组肿瘤组织中的微血管密度值分别为 32.10±6.43 和 11.70±3.49,提示实验组中 CD34 阳性表达较对照组增加,差异有统计学意义($t=34.84, P<0.001$);VEGF 在对照组和实验组肿瘤组织中的积分光密度值分别为 284.91±53.86 和 104.64±24.32,提示实验组中 VEGF 阳性含量较对照组明显降低,差异有统计学意义($t=27.13, P<0.001$)。对照组和实验组胰腺肿瘤单位体积血管密度分别为 6.257±1.084 和 1.686±0.421,差异有统计学意义($t=41.24, P<0.001$)。胰腺癌组织的 PI 与微血管密度、单位体积血管密度均呈正相关($r=0.857, 0.896$, 均 $P<0.05$);AUC 与微血管密度、单位体积血管密度均呈正相关($r=0.762, 0.675$, 均 $P<0.05$)。**结论** 超声造影血流参数 PI 和 AUC 可准确评估裸鼠胰腺癌组织的血流灌注量,PI 和 AUC 与胰腺癌血管密度密切相关。

关键词 超声检查;造影剂;胰腺癌;血流灌注;裸鼠

[中图分类号]R735.9;R445.1

[文献标志码]A

Correlation between contrast-enhanced ultrasound perfusion parameters and blood perfusion status in nude mice pancreatic cancer model

FAN Yi

Department of Ultrasound, the First People's Hospital of Yongkang, Zhejiang 321300, China

ABSTRACT **Objective** To explore the diagnostic value of contrast-enhanced ultrasonography in analyzing the blood perfusion status of pancreatic cancer model.**Methods** Forty cases of pancreatic cancer orthotopic xenograft tumor model were divided into control group ($n=20$) and experimental group ($n=20$) by random number table method. The experimental group was treated with recombinant human endostatin. The control group was treated with placebo. All animals underwent contrast-enhanced ultrasound before execution. The peak intensity (PI) and the area under the curve (AUC) were measured. Immunohistochemistry was employed to analyze the relative levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34 in pancreatic cancer specimens. Tumor vascular imaging was conducted using the lead oxide-gelatin injection technique to detect the vascular density per unit volume of pancreatic tumor. The relations between PI and microvascular density as well as the relationships between AUC and microvascular density were analyzed.**Results** A significant decrease of PI and AUC were found in experimental group specimens [(32.64±5.15)dB and 523.68±57.06] when compared with the control group [(68.83±7.27)dB and 859.93±114.27], there were significant difference (both $P<0.001$). The microvascular density of control group and experimental group were 32.1±6.43 and 11.7±3.49, the positive expression of CD34 in the experimental group was significantly increased compared with control group, and the difference was statistically significant ($t=34.84, P<0.001$). The integrated optical density values of VEGF in control group and experimental group were 284.91±53.86 and 104.64±24.32. The positive expression of VEGF in the experimental group was significantly reduced compared with control group ($t=27.13, P<0.001$). The vascular density per unit

volume of pancreatic tumor of control group and experimental group were 6.257 ± 1.084 and 1.686 ± 0.421 , the difference was statistically significant ($t=41.24, P<0.001$). The PI were positively correlated with micro vascular density and vascular density per unit volume in pancreatic cancer tissues ($r=0.857, 0.896$, both $P<0.05$). The AUC were positively correlated with micro vessel density and vascular density per unit volume in pancreatic cancer tissues ($r=0.762, 0.675$, both $P<0.05$). **Conclusion** Contrast-enhanced ultrasound parameters PI and AUC can accurately evaluate the blood perfusion of pancreatic cancer, and the values of PI and AUC are closely related to the vascular density of pancreatic cancer.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent; Pancreatic cancer; Blood perfusion; Nude mouse

胰腺癌在消化道肿瘤中恶性程度最高,是全球第六大癌症相关死亡原因,当前对于进展期胰腺癌仍缺乏有效的治疗措施^[1-3]。作为血供较为丰富的肿瘤,胰腺癌组织中的血管分布密度与其恶性生物学行为关系密切^[4-5]。通过计数肿瘤组织中CD34/CD31染色阳性细胞是目前临床评价肿瘤微血管密度最常用的方法,该方法从微观的角度来定量分析肿瘤组织内微血管密度,其检测在术后进行,对于其在镜下视野的选择上具有一定的主观性,可能会对结果产生一定的误差,故需要一种更加准确而敏感的影像学方法来评估肿瘤血管分布和血流灌注^[6-7]。本实验通过建立裸鼠胰腺癌原位移植瘤模型,应用超声造影检测肿瘤模型胰腺癌组织的血流灌注参数,并分析其与胰腺癌血管密度的相关性,旨在探讨超声造影在无创性评估胰腺癌微血管血流中的应用价值及可行性。

材料与方 法

一、实验材料和试剂

1. 实验动物: BALB/c 裸鼠 50 只,均为雌性,3~7 周龄,来源于中国科学院上海实验中心。

2. 细胞和主要试剂: 人胰腺癌细胞株 PANC-1 [美国模式培养物保存中心(ATCC)]; 重组人血管内皮抑素(山东先声麦得津生物制药有限公司); DMEM 高葡萄糖培养基、胎牛血清(杭州四季青有限公司); 超声造影剂 SonoVue(意大利 Bracco 公司); 血管内皮生长因子(VEGF)和 CD34 抗体(美国 Epitomics 公司); ABC 免疫组化检测试剂盒(北京中山生物工程有限公司)。

二、建立动物模型

参照文献[2]报道方法,将裸鼠放置在层流净化屏障系统内饲养。在 DMEM 高葡萄糖培养基中重悬人胰腺癌 PANC-1 细胞,并将细胞悬液的密度调节至 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 。将 0.2 ml 悬浮肿瘤细胞液经皮下注射到 3 只裸鼠的右下肢,接受注射 2 周后,处死裸鼠并取出皮下肿瘤组织。在显微镜下将 PANC-1 细胞形成的肿瘤块修剪成 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 大小,原位移植到裸鼠胰尾部,共建立 40 只裸鼠胰腺癌原位移植模型,胰腺

癌模型成功率为 100%。

三、实验仪器与方法

1. 分组及处理: 应用随机数字表法将 40 只裸鼠胰腺癌原位移植瘤模型分成对照组和实验组各 20 只。均继续饲养于 SPF 级饲养箱中,对照组裸鼠经腹腔注射生理盐水(每只 0.2 ml),实验组裸鼠经腹腔注射重组人血管内皮抑素(2 mg/kg),调整每次给药剂量为 0.2 ml,每天注射 1 次,共 2 周,于第 4 周终止体内实验。

2. 超声造影检查: 使用西门子 Acuson S 2000 彩色多普勒超声诊断仪,9L4 探头,频率 4~9 MHz; 配备反相脉冲谐波成像技术及时间-强度曲线分析软件。采用腹腔注射 10% 水合氯醛(35 mg/kg)麻醉裸鼠,取仰卧位后涂抹耦合剂,先行常规超声测量裸鼠胰腺肿瘤的长、宽、高径线,确定肿瘤最佳显示切面后固定探头; 使用灭菌生理盐水将 SonoVue 振荡稀释成 $4.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的混悬液,经尾静脉一次性注射造影剂混悬液 0.2 ml,注射完成 1 min 后开启超声造影模式。造影录像以 DICOM 的 Uncompress 格式导出,应用 SW-UCS-1 超声造影分析软件获得时间-强度曲线,记录并分析胰腺肿瘤组织的峰值强度(PI)和曲线下面积(AUC),所有实验动物均行超声造影检查。

3. 免疫组织化学检测: 每组取 10 只裸鼠,处死后取出胰腺肿瘤,5% 甲醛固定过夜,应用梯度乙醇脱水法将肿瘤组织进行脱水处理,包埋在石蜡中并切片。根据 SP 染色法进行免疫组织化学染色,测定 CD34 和 VEGF 在胰腺肿瘤组织中的阳性含量。随机选取 20 个视野并在低倍镜下拍照,应用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件分析 VEGF 在样本中的积分光密度值; 于 200 倍光学显微镜下选取 20 个视野,计数每个视野下 CD34 阳性细胞作为微血管密度值,取平均值。

4. 血管造影检查: 参照文献[2]对裸鼠胰腺癌原位移植瘤模型实施明胶-氧化铅造影。每组取 10 只裸鼠,经腹腔注射 10% 水合氯醛(35 mg/kg)麻醉,开胸后在裸鼠心尖处行长约 1 mm 切口,随即将 24 号留置针导管自切口插入,将明胶-氧化铅溶液自导管灌入裸鼠全身动脉,待明胶-氧化铅溶液凝固后取出胰腺肿

瘤于X线下摄像。应用Quantity One 4.6.2(BIO-RAD)软件扫描X胶片中肿瘤内血管组织的光密度值,用排水法测定胰腺肿瘤体积,计算肿瘤组织光密度值与肿瘤体积的比值,即肿瘤组织单位体积血管密度。

四、统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体及总体中两样本间比较采用ANOVA方差分析Dunnett-*t*法。相关性分析采用Pearson相关性分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、实验组与对照组超声造影检查结果比较

胰腺肿瘤组织呈不均匀低回声影,其内血流丰富,呈条索状或网格状。对照组裸鼠胰腺肿瘤组织的

PI和AUC分别为 (68.83 ± 7.27) dB、 859.93 ± 114.27 ,均明显高于实验组 $[(32.64 \pm 5.15)$ dB、 $523.68 \pm 57.06]$,差异均有统计学意义($t=24.78, 15.97$,均 $P < 0.001$)。见图1。

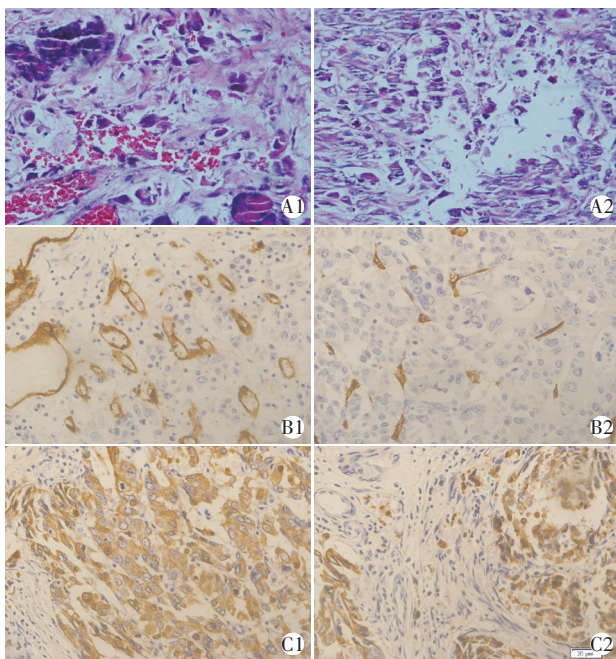
二、实验组与对照组裸鼠胰腺肿瘤中CD34和VEGF表达比较

对照组镜下见肿瘤细胞为低分化胰腺癌,增殖活跃,肿瘤血供丰富;实验组镜下见肿瘤细胞血供较为贫乏,可见大量组织坏死(图2)。对照组和实验组肿瘤组织中的微血管密度值分别为 32.10 ± 6.43 和 11.70 ± 3.49 ,提示实验组中CD34阳性表达较对照组明显增加,差异有统计学意义($t=34.84, P < 0.001$)。VEGF在对照组和实验组肿瘤组织中的积分光密度值分别为 284.91 ± 53.86 和 104.64 ± 24.32 ,提示实验组中VEGF阳性含量较对照组明显降低,差异有统计学意义($t=27.13, P < 0.001$)。



A、B:超声造影下分别观察对照组和实验组肿瘤组织中的血流情况,箭头示肿瘤组织呈不均匀低回声影;C:时间-强度曲线图,绿线示对照组,黄线示实验组

图1 实验组和对照组超声造影图



A:HE染色后观察肿瘤组织病理性改变(A1:对照组;A2:实验组);B:免疫组织化学法测定CD34阳性表达(B1:对照组;B2:实验组);C:免疫组织化学法测定VEGF蛋白阳性表达(C1:对照组;C2:实验组)

图2 实验组和对照组病理和免疫组织化学检测图($\times 200$)

三、实验组与对照组裸鼠胰腺肿瘤单位体积血管密度比较

采用明胶-氧化铅血管造影法对实验组和对照组共20只裸鼠实施血管造影,其中6只血管造影失败,成功率为70%。对照组胰腺肿瘤血管分布较为密集,实验组胰腺肿瘤血管数量明显减少(图3);对照组和实验组胰腺肿瘤组织单位体积血管密度分别为 6.257 ± 1.084 和 1.686 ± 0.421 ,差异有统计学意义($t=41.24, P < 0.001$)。

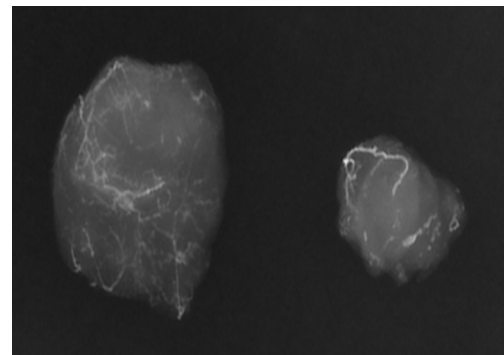


图3 对照组和实验组血管造影图(图左为对照组,图右为实验组)

四、相关性分析

对照组裸鼠胰腺肿瘤组织的PI、AUC与微血管密度均呈正相关($r=0.857、0.762$,均 $P<0.001$),与积分光密度均呈正相关($r=0.681、0.487$,均 $P<0.001$),与单位体积血管密度均呈正相关($r=0.896、0.675$,均 $P<0.001$)。见图4。

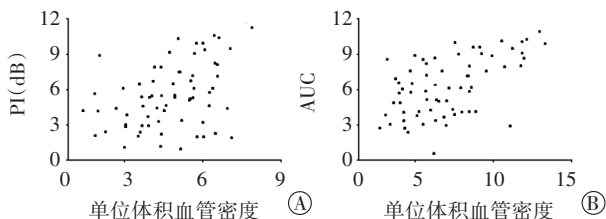


图4 对照组裸鼠胰腺肿瘤组织的PI(A)、AUC(B)与单位体积血管密度的相关性分析散点图

讨 论

超声造影可较为直观地显示目标部位的血流量和血流速度,同时在超声造影剂的协助下可分析目标组织的血流灌注增强特征,从而为研究肿瘤组织血管分布提供了一种非侵入性检测手段^[8-9]。超声造影剂SonoVue是一种血池显像剂,可停留在组织的微小血管中,从而对组织血管起示踪作用。注入造影剂后超声造影图像信号与造影剂浓度呈线性关系,其时间-强度曲线参数(PI、AUC)的变化定量反映了组织内血流灌注状态变化。

在本实验中,实验组通过使用血管生长抑制剂治疗后发现裸鼠胰腺肿瘤组织的PI和AUC均明显低于对照组(均 $P<0.05$),提示对照组胰腺癌组织内血流灌注较实验组更丰富,微血管大量生成,微血管密度增加。为验证超声造影检测本次实验动物血流灌注情况,同时鉴于微血管密度值是反映肿瘤组织中血管生成的定量指标,本实验分析比较了两组裸鼠胰腺肿瘤的微血管密度,结果表明实验组胰腺组织的微血管密度值显著低于对照组($P<0.05$),提示对照组胰腺肿瘤组织内微血管新生较实验组更为活跃。在肿瘤细胞转移过程中,肿瘤细胞通过旁分泌的方式释放大量VEGF从而促进新生血管形成,导致肿瘤内血流灌注增加^[10-11]。本实验结果表明实验组裸鼠胰腺肿瘤组织中的VEGF表达明显低于对照组($P<0.05$)。原因为实验组通过注射重组人血管内皮抑素,抑制了VEGF分泌,限制了肿瘤内新生血管的生成。同时胰腺肿瘤组织的PI和AUC与VEGF表达均呈正相关,提示PI和AUC可有效无创性评估胰腺癌组织的微血管密度,从

而反映其微血管生成状态。

本实验通过对裸鼠胰腺肿瘤实施明胶-氧化铅血管造影,X光下可见对照组胰腺肿瘤血供极为丰富,而实验组胰腺肿瘤血供较为稀疏,两组胰腺肿瘤的单位体积血管密度比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$),从而在宏观层面印证了血管生长抑制剂可有效抑制胰腺肿瘤血管生长,与CD34染色法及VEGF检测结果相似,进而对裸鼠胰腺癌模型的血流灌注情况有了相对准确的评价。但微血管密度值测定和明胶-氧化铅血管造影检查均无法用于术前评估,不利于术前治疗方案的确立,而超声造影可用于术前诊断。为此,本实验将对照组裸鼠胰腺肿瘤中超声造影参数与微血管密度、单位体积血管密度进行了相关性分析,结果表明PI、AUC与微血管密度、单位体积血管密度均呈正相关,表明超声造影血流灌注参数可有效、无创地反映裸鼠胰腺肿瘤内血流灌注情况,即胰腺肿瘤内的微血管密度越高,血流灌注量越大,肿瘤组织中的造影剂越多,病灶与周围正常胰腺组织的对比越强,PI和AUC值就越大。本实验通过微观和宏观两个层面印证通过超声造影参数评估胰腺肿瘤组织中的微血管血流的可行性,可为临床无创性评估胰腺癌微血管生成状态提供有价值的参考。

综上所述,超声造影血流参数PI和AUC可准确评估胰腺癌组织的血流灌注量;PI和AUC与胰腺癌血管密度密切相关。

参考文献

- [1] Liu A, Chen H, Wei W, et al. Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(1):81-89.
- [2] Eric AC, Peter JB, David KC, et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(4):207-220.
- [3] Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors [J]. *World J Oncol*, 2019, 10(1):10-27.
- [4] Liu A, Huang C, Cai X, et al. Twist promotes angiogenesis in pancreatic cancer by targeting miR-497/VEGF axis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18):25801-25814.
- [5] Stephanie KD. The pancreatic cancer microenvironment [J]. *Cancer J*, 2017, 23(6):321-325.
- [6] Wu Z, Cai X, Huang C, et al. miR-497 suppresses angiogenesis in breast carcinoma by targeting HIF-1 α [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3):1696-1702.
- [7] Andrea P, Mario P, Daniela B. Inflammation and pancreatic cancer: focus on metabolism, cytokines, and immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3):128-130.