

兔VX2肺肿瘤 PET-CT 与血管生成的相关性研究

李亚军 白人驹 高硕 李彦生 刘磊 贾薇 蔡莉 邢喜玲

【摘要】 目的 探讨 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT 反映兔 VX2 肺肿瘤血管生成的效能。方法 新西兰大白兔 54 只, 右肺接种 VX2 肿瘤 10~11 d 后, 行 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT, 测量肿瘤 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG 最大标准化摄取值(SUV_{max})。同时, 测量肿瘤标本大小, 用免疫组化方法评价肿瘤微血管密度(MVD)。然后对肿瘤胆碱 SUV_{max} 、 ^{18}F -FDG SUV_{max} 与肿瘤大小、MVD 进行相关性分析。结果 33 只实验兔成功完成所有检查, 得到 VX2 肺肿瘤的 ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 平均值为 4.02 ± 3.07 (1.4~12.2), 对 ^{18}F -FDG 的 SUV_{max} 平均值为 5.70 ± 3.45 (1.0~13.0), 肿瘤大小平均值为 $(1.68 \pm 1.61) \text{cm}^3$ (0.13~8.00 cm^3)。高倍镜(200 倍, 0.739mm^2)视野下, 肿瘤 MVD 平均值为 (35.8 ± 13.6) 个(13~64 个)。经统计学分析, ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 与肿瘤大小及 MVD 之间均不具有相关性; ^{18}F -FDG SUV_{max} 与 MVD ($r=0.525, P=0.002$) 之间存在正相关关系, 与肿瘤大小($r=0.335, P=0.057$) 之间呈临界正相关关系。结论 ^{18}F -FDG PET-CT 可反映兔 VX2 肺肿瘤血管生成, ^{11}C -胆碱 PET-CT 不能反映肿瘤血管生成。

【关键词】 肺肿瘤; 正电子发射断层显像; 氟脱氧葡萄糖 F18; ^{11}C -胆碱; 模型, 动物; 兔; 微血管密度

The correlation between PET-CT imaging and microvessel density in rabbit lung VX2 tumor model

LI Ya-jun*, BAI Ren-ju, GAO Shuo, LI Yan-sheng, LIU Lei, JIA Wei, CAI Li, XING Xi-ling.

(*Department of Radiology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

【Abstract】 Objective To evaluate and compare the suitability of ^{11}C -choline and ^{18}F -FDG PET-CT for reflecting tumors angiogenesis. **Methods** Fifty-four New Zealand white rabbits which weighted 2.5~3.0 kg were used in the experiment. Under general anesthesia, a needle was transthoracically inserted into the right lung, 0.5 ml viable VX2 tumor cell suspension was slowly injected through the needle to establish the model. ^{11}C -choline and ^{18}F -FDG PET-CT were performed after 10~11 d. The tumors SUV_{max} were calculated. The sections were stained with hematoxylin and eosin, and immunostained for CD34. Assessment of microvessel density(MVD) was performed by computer-assisted image analysis. The relationship ^{11}C -choline SUV_{max} and ^{18}F -FDG SUV_{max} with tumor size and MVD were statistically analyzed. **Results** Thirty-three rabbits successfully completed all imaging examinations. ^{11}C -choline and ^{18}F -FDG differently accumulated in all lung VX2 tumors. The mean of ^{11}C -choline SUV_{max} was 4.02 ± 3.07 (1.4~12.2), and the mean of ^{18}F -FDG SUV_{max} was 5.70 ± 3.45 (1.0~13.0). The mean size of tumor was $(1.68 \pm 1.61) \text{cm}^3$ (0.13~8.00 cm^3). Under high power microscope field of vision (200 \times , 0.739mm^2), the mean of MVD was 35.8 ± 13.6 (13~64). ^{11}C -choline SUV_{max} did not correlate with tumor size and MVD. ^{18}F -FDG SUV_{max} significantly and positively related to MVD ($r=0.525, P=0.002$). There was a critical positive correlation between ^{18}F -FDG SUV_{max} and tumor size ($r=0.335, P=0.057$). **Conclusions** In the rabbit VX2 lung tumor model, ^{18}F -FDG SUV_{max} correlated with MVD, so ^{18}F -FDG PET-CT could reflect tumor angiogenesis. ^{11}C -choline SUV_{max} did not statistically correlate with MVD, and ^{11}C -choline PET-CT could not reflect tumor angiogenesis.

【Key words】 Lung neoplasms; Positron-emission tomography; Fluorodeoxyglucose F18; ^{11}C -choline; Model, animal; Rabbits; Microvessel density

恶性肿瘤新陈代谢速度加快, 就需要新生血管

提供充足的氧和营养物质来满足肿瘤生存及进展的需要。目前, 抗血管疗法已成为一种常用的临床治疗恶性肿瘤的方法^[1]。本研究用新西兰大白兔制作的 VX2 肺肿瘤模型作为实验对象, 对其进行 ^{11}C -胆

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.03.003

作者单位: 300052, 天津医科大学总医院放射科(李亚军, 白人驹), PETCT 中心(高硕, 李彦生, 刘磊, 贾薇, 蔡莉, 邢喜玲)

通信作者: 高硕 (E-mail: dr_shuogao@hotmail.com)

碱、 ^{18}F -FDG PET-CT 对比研究, 并与病理及免疫组化结果对照, 以检验 ^{14}C -胆碱、 ^{18}F -FDG PET-CT 反映肿瘤血管生成的效能。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

新西兰大白兔 54 只 (中国药品生物制品检定所实验动物中心), 月龄 5~6 月, 体质量 2.5~3.0 kg, 健康状况良好, 雌雄不限。VX2 肿瘤细胞由活体种兔后肢肌肉注射传代获得。

1.1.1 麻醉

氯胺酮(上海第一生化药业有限公司) 20 mg, 咪唑安定(江苏恩华药业集团有限公司) 5 mg, 采用肌肉注射麻醉。

1.1.2 瘤细胞获取

无菌手术切下种兔后肢肿瘤, 去除坏死组织后剪切成泥, 放入 200~400 目细胞筛内, 加少许生理盐水挤压过滤, 收集细胞悬液, 以离心半径为 10 cm, 1500 转/min, 离心 3 min, 去上清, 将沉淀再次悬浮于生理盐水中。进行细胞计数, 并用台盼蓝排除法计算活细胞百分率, 制成 10^7 个/ml 的活细胞悬液。

1.1.3 瘤细胞接种

实验兔麻醉后取左侧卧位, 在胸骨剑突上约 2 cm 水平、右侧腋中线处肋间隙穿刺进针, 进针距离 1~1.5 cm, 并用止血钳固定。用 2 ml 注射器吸取 0.5 ml 细胞悬液 (约含 5×10^6 个活细胞), 缓慢注入。

1.1.4 成瘤标志

实验兔接种 VX2 肿瘤 7 d 后用 CT 监测是否成瘤。以肺内单发结节为肿瘤种植成功的标志, 如果发现单发结节则为成瘤, 否则为未成瘤。

1.2 PET

荷瘤兔在接种 VX2 肿瘤 10~11 d 后行 PET, 所用仪器为 GE Discovery LS PET-CT 扫描仪 (美国 GE 公司)。先行 ^{14}C -胆碱 (由加速器自制) PET-CT, 在静脉注射 ^{14}C -胆碱 37 MBq 后 5 min 进行检查; 注射 ^{14}C -胆碱后 60 min 静脉注射 18.5 MBq ^{18}F -FDG (由加速器自制), 再等待 60 min 后行 ^{18}F -FDG PET-CT。荷瘤兔俯卧位固定, 先行低剂量螺旋 CT, 再行 PET。用低剂量 CT 作衰减校正、迭代重建得到 PET 断层图像, 层厚 5 mm。在肿瘤最大层面测定其标准化摄取值 (standardized uptake value, SUV),

感兴趣区包括肿瘤截面积 2/3 以上的区域, 并避开肿瘤边缘和坏死区, 获得 SUV 最大值 (SUV_{max})。

1.3 病理学检查

常规固定、包埋和切片后, 用免疫组化单克隆抗 CD34 抗体 (浓度 1:50, Zymed 公司, 购于天津津脉试剂公司) 标记血管。使用二步法免疫组化染色 (免疫球蛋白-过氧化物酶联合多聚法), CD34 染色后微血管特异性标记为棕黄色。用高倍镜 (200 倍, 0.739 mm^2) 视野进行计数, 计数 3 个“热点”区的微血管密度 (microvessel density, MVD) 平均值。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 11.5 统计软件包, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 ^{14}C -胆碱 SUV_{max} 、 ^{18}F -FDG SUV_{max} 与肿瘤大小和 MVD 的相关性分析采用 Pearson 直线相关分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

54 只实验兔中, 36 只实验兔成功种植单发 VX2 肺肿瘤, 成功率为 66.7%, 其中 33 只实验兔成功完成所有检查。

2.1 兔 VX2 肺肿瘤病理学表现

大体观察: 肿瘤呈球形, 切面呈白色鱼肉样, 浸润性生长, 边界不清; 大部分肿瘤无明显坏死, 少部分可见坏死、液化。测量肿瘤直径并计算肿瘤体积, 平均为 $(1.68 \pm 1.61) \text{ cm}^3$ ($0.13 \sim 8.00 \text{ cm}^3$)。镜下观察: 肿瘤细胞排列密集, 核大、深染, 瘤巨细胞多见; 间质较少, 血管丰富 (图 1), 经高倍镜下计数, 每个视野内的 MVD 平均为 (35.8 ± 13.6) 个 ($13 \sim 64$ 个)。



图 1 兔 VX2 肿瘤抗 CD34 抗体标记血管染色图 (二步法免疫组化染色, 放大 200 倍)

2.2 兔 VX2 肺肿瘤 ^{14}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT 表现

实验兔双肺可见轻度的 ^{14}C -胆碱浓集, 但不影响肿瘤显示。部分实验兔 (5/33, 15.15%) 心肌可见 ^{18}F -FDG 浓集, 而通过 PET-CT 融合图像可对肿瘤

进行准确定位。兔 VX2 肺肿瘤模型右肺肿块的 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT 结果见图 2。

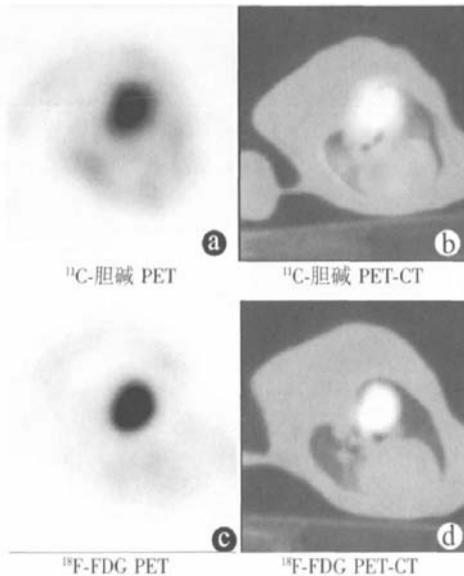


图 2 兔 VX2 肺肿瘤 ^{11}C -胆碱及 ^{18}F -FDG PET-CT 结果图中, a, b: ^{11}C -胆碱 PET 及 PET-CT 融合图像, 显示右肺肿块可见胆碱明显浓集; c, d: ^{18}F -FDG PET 及 PET-CT 融合图像, 显示右肺肿块可见 ^{18}F -FDG 明显浓集, 肿瘤显示清晰。

2.3 兔 VX2 肺肿瘤 ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 、 ^{18}F -FDG SUV_{max} 与肿瘤大小、MVD 之间的相关性

33 只兔 VX2 肺肿瘤 ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 平均为 4.02 ± 3.07 (1.4~12.2), ^{18}F -FDG SUV_{max} 平均为 5.70 ± 3.45 (1.0~13.0)。经统计分析, ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 与肿瘤大小 ($r=0.237$, $P=0.184$) 及 MVD ($r=0.238$, $P=0.181$) 之间均不具有相关性。 ^{18}F -FDG SUV_{max} 与 MVD ($r=0.525$, $P=0.002$) 之间存在正相关关系, 与肿瘤大小 ($r=0.335$, $P=0.057$) 之间呈临界正相关关系。肿瘤大小与肿瘤 MVD 之间存在正相关关系 ($r=0.362$, $P=0.038$)。结果显示, ^{18}F -FDG PET-CT 可反映兔 VX2 肺肿瘤血管生成, 而 ^{11}C -胆碱 PET-CT 则不能反映肿瘤血管生成。

3 讨论

肺肿瘤 MVD 与肿瘤恶性程度及预后密切相关。然而, 这通常需经组织病理学来进行评价, 而光镜下对微血管进行计数比较困难, 且由于肿瘤的不均一性易导致采样的误差, 因此迫切需要一种新的手段对 MVD 进行评价。本课题应用新西兰大白

兔 VX2 肺肿瘤模型对 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT 进行了比较, 并对其与肿瘤 MVD 进行了相关性研究。

3.1 兔 VX2 肺肿瘤模型及其血管生成

VX2 肿瘤是由家兔皮肤乳头状瘤经 Shope 病毒诱导形成的一种间变性鳞癌, 该瘤株具有诱导时间短、种植成功率高、植入后组织学性质稳定等优点, 而且具有较高的可重复性^[2]。因此, 本研究选择新西兰大白兔为研究对象制作肺肿瘤模型。目前, 大多数学者在制作兔肺肿瘤模型时, 所采用的方法为在 CT 引导下经皮下穿刺入肺, 缓慢注入含 $10^6 \sim 10^8$ 个 VX2 细胞的悬液, 10~14 d 后, 肿瘤即可长至直径 10 mm, 成瘤率为 46%~77.8%。本研究即采用穿刺法, 54 只实验兔中的 36 只在 7 d 后形成单发肺肿瘤, 成功率达 66.7%。

肿瘤若无血管生成, 血供缺乏, 将发生坏死或凋亡^[3]。本研究结果显示, VX2 肺肿瘤具有较高的 MVD, 并与肿瘤大小呈正相关, 与 Zagzag 等^[4]的结果一致, 支持有关肿瘤血管生成的理论。

3.2 兔 VX2 肺肿瘤的 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG PET-CT

本研究中的 33 只兔 VX2 肺肿瘤均可见不同程度的 ^{11}C -胆碱和 ^{18}F -FDG 摄取, 平均 SUV_{max} 分别为 4.02 和 5.70, 与国外学者研究结果相似。

本研究中, 实验兔双肺可见程度不一的 ^{11}C -胆碱摄取, 虽然国外学者的早期研究显示正常兔肺有 ^{11}C -胆碱明显摄取, 但其数量较少, 而且本研究的实验兔右肺种植肿瘤也可能导致其生理代谢的改变。此外, 兔心肌有时可摄取 ^{18}F -FDG 而影响肿瘤在 PET 上的观察, 而通过 PET-CT 融合图像可对肿瘤进行准确定位, 消除肺及心肌摄取示踪剂对肿瘤显像观察的影响。

3.3 兔 VX2 肺肿瘤 ^{11}C -胆碱、 ^{18}F -FDG 摄取与 MVD 的相关性

3.3.1 ^{18}F -FDG 摄取与 MVD

研究表明, 无论在生理还是病理状态下, 葡萄糖代谢率与血供都是相关的。此外, 恶性肿瘤由于局部血供相对或绝对缺乏而导致葡萄糖有氧代谢降低, 无氧糖酵解增加, 使得葡萄糖利用率降低而葡萄糖及其放射性类似物 ^{18}F -FDG 的摄取率增加, 放射自显影动物实验研究即显示肿瘤坏死周边缺氧区 ^{18}F -FDG 摄取更高^[5], 因此肿瘤血供可能是决定肿瘤葡萄糖代谢率的重要因素。Mankoff 等^[6]认为,

^{18}F -FDG 摄取与血流比率的增加提示葡萄糖摄取增加,也提示肿瘤可能缺氧。本研究发现,兔 VX2 肺肿瘤 ^{18}F -FDG SUV_{max} 与 MVD 之间具有正相关关系 ($r=0.525, P<0.01$), ^{18}F -FDG PET-CT 可反映肿瘤血管生成。国外学者的研究也显示,乳腺癌、肺癌、泌尿生殖系统肿瘤等的 ^{18}F -FDG 摄取与 MVD 存在明显正相关关系^[7-12],支持 ^{18}F -FDG PET-CT 可反映恶性肿瘤血管生成。Guo 等^[13] 进一步发现,肺腺肿瘤 ^{18}F -FDG 摄取可反映肿瘤血管生成状态,特别是可反映活动性血管的生成。

3.3.2 ^{11}C -胆碱摄取与 MVD

有关 ^{11}C -胆碱摄取与 MVD 之间相关性的研究还很少,结果也不尽相同。Shinoura 等^[14] 的研究发现,虽然脑瘤/正常脑组织摄取 ^{11}C -胆碱的比值与 ^{15}O - H_2O 测定的局部脑血流并不相关,但在血管丰富的肿瘤中,局部脑血流比率与 ^{11}C -胆碱摄取均较高。此外,Spaeth 等^[15] 的研究结果显示,在鼠 F98 脑胶质瘤模型中,肿瘤与对侧脑皮质 ^{11}C -胆碱摄取比值和 MVD 之间存在正相关关系。但本研究结果显示,兔 VX2 肺瘤 ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 与 MVD 之间不具有相关性 ($r=0.238, P=0.181$),即 ^{11}C -胆碱 PET-CT 不能反映肿瘤血管生成。这可能与胆碱在细胞的代谢途径多、影响因素多有关,如胆碱进入细胞后还可作为第二信使调节细胞代谢;在肝、肾内转化为甲基供体用作生物合成的原料;在神经系统内可生成神经递质等。恶性肿瘤的生长、进展需要充足的氧和各种营养物质,肿瘤的血供多,可被肿瘤摄取的胆碱也多;肿瘤的血供少,可被肿瘤摄取的胆碱就少,二者变化趋势相同,但不一定具有线性相关关系。

总之, ^{18}F -FDG SUV_{max} 与肿瘤 MVD 之间存在相关性, ^{18}F -FDG PET-CT 可反映肿瘤血管生成; ^{11}C -胆碱 SUV_{max} 与肿瘤 MVD 之间不存在相关性, ^{11}C -胆碱 PET-CT 不能反映肿瘤血管生成。

参 考 文 献

- [1] Charnley N, Donaldson S, Price P. Imaging angiogenesis. *Methods Mol Biol*, 2009, 467(1): 25-51.
- [2] Kuszyk BS, Corl FM, Franano FN, et al. Tumor transport physiology: Implications for imaging and imaging-guided therapy. *AJR Am J Roentgenol*, 2001, 177(4): 747-753.
- [3] Holmgren L, O' Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1995, 1(2): 149-153.
- [4] Zagzag D, Brem S, Robert F. Neovascularization and tumor growth in the rabbit brain. A model for experimental studies of angiogenesis and the blood-brain barrier. *Am J Pathol*, 1988, 131(2): 361-372.
- [5] Brown RS, Fisher SJ, Wahl RL. Autoradiographic evaluation of the intra-tumoral distribution of 2-deoxy-D-glucose and monoclonal antibodies in xenografts of human ovarian adenocarcinoma. *J Nucl Med*, 1993, 34(1): 75-82.
- [6] Mankoff DA, Dunnwald LK, Gralow JR, et al. Blood flow and metabolism in locally advanced breast cancer: relationship to response to therapy. *J Nucl Med*, 2002, 43(4): 500-509.
- [7] Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, et al. Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol*, 2002, 20(2): 379-387.
- [8] Zee YK, O'Connor JP, Parker GJ, et al. Imaging angiogenesis of genitourinary tumors. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(2): 69-82.
- [9] Bajpai J, Gamanagatti S, Sharma MC, et al. Noninvasive imaging surrogate of angiogenesis in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 54(4): 526-531.
- [10] Niu G, Chen X. PET Imaging of Angiogenesis. *PET Clin*, 2009, 4(1): 17-38.
- [11] Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, et al. Correlation of angiogenesis with ^{18}F -FMT and ^{18}F -FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 2009, 100(4): 753-758.
- [12] Tateishi U, Nishihara H, Tsukamoto E, et al. Lung tumors evaluated with FDG-PET and dynamic CT: the relationship between vascular density and glucose metabolism. *J Comput Assist Tomogr*, 2002, 26(2): 185-190.
- [13] Guo J, Higashi K, Ueda Y, et al. Microvessel density: correlation with ^{18}F -FDG uptake and prognostic impact in lung adenocarcinomas. *J Nucl Med*, 2006, 47(3): 419-425.
- [14] Shinoura N, Nishijima M, Hara T, et al. Brain tumors: detection with C-11 choline PET. *Radiology*, 1997, 202(2): 497-503.
- [15] Spaeth N, Wyss MT, Pahnke J, et al. Uptake of ^{18}F -fluorocholine, ^{18}F -fluoro-ethyl-L-tyrosine and ^{18}F -fluoro-2-deoxyglucose in F98 gliomas in the rat. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(6): 673-682.

(收稿日期: 2010-01-15)