

高 CO₂ 分压下大鼠神经胶质瘤肿瘤血管的 MR 灌注成像特点

张清波 冯晓源 梁宗辉 陈爽

【摘要】 目的 了解 MR 灌注成像显示肿瘤血管成熟度和变异度的可行性。方法 20 只雄性 SD 大鼠, 采用数字表法随机平分为肿瘤组和正常对照组。肿瘤组大鼠于右侧尾状核区种植 C6 胶质瘤细胞, 复制大鼠脑胶质瘤模型。种植肿瘤细胞后 4 周, 两组大鼠吸入高浓度 CO₂ 混合气体, 吸入气体前后, 分别行全脑灌注成像扫描, 检测局部相对脑血容量(rCBV)、局部相对脑血流量(rCBF)。扫描前测定大鼠血 CO₂ 分压、pH 值等血气指标。检查后处死肿瘤组大鼠并取脑固定, 全脑切片, 分别行苏木精-伊红及鼠特异性平滑肌抗体反应素(SMA) 抗体免疫组织化学染色。光学显微镜下观察肿瘤组织特征并进行 SMA 阳性血管计数。采用配对 t 检验比较两组大鼠脑组织 MR 灌注值、肿瘤组织微血管计数及血气指标的差异, 并将免疫组织化学检查结果与 MR 检查结果进行 Pearson 相关性分析。结果 胶质瘤的 rCBV 和 rCBF 呈明显的高灌注。所有大鼠在吸入含高浓度 CO₂ 的混合气体 15 min 后, 血液 CO₂ 分压肿瘤组从(4.69 ± 0.62) kPa 升高至(7.62 ± 0.81) kPa, 对照组从(4.67 ± 0.51) kPa 升高至(7.63 ± 0.78) kPa, 差异具有统计学意义(t 值分别为 6.09, 7.012, P 值均 < 0.05); pH 值肿瘤组从(7.42 ± 0.03) 降至(7.10 ± 0.05), 对照组从(7.40 ± 0.04) 降至(7.08 ± 0.02), 差异具有统计学意义(t 值分别为 2.745, 2.693, P 值均 < 0.05)。肿瘤实质部分的 rCBV 和 rCBF 的增加率分别为(26 ± 17)% 和(26 ± 18)%, 低于肿瘤组健侧正常脑组织[分别为(90 ± 32)% 和(45 ± 14)%], 二者差异具有统计学意义(t 值分别为 5.05, 2.355, P 值均 < 0.05)。SMA 染色部位在血管的平滑肌细胞, 形态规则, 肿瘤内 SMA 阳性血管较正常脑组织的阳性血管管壁薄, 管腔直径宽; 肿瘤内 SMA 阳性血管[(6.7 ± 2.8) 个/高倍视野] 明显少于肿瘤组健侧脑组织[(12.7 ± 2.8) 个/高倍视野](t = 1.86, P < 0.05)。吸入高浓度 CO₂ 混合气体后, 肿瘤实质区的 rCBV 和 rCBF 的变化率与免疫组织化学的 SMA 阳性血管计数之间均无显著的相关性(r 值分别为 0.504 和 0.607, P 值均 > 0.05)。但正常脑组织的 rCBV 和 rCBF 变化率与其 SMA 阳性血管计数之间呈正相关(r 值分别为 0.721 和 0.525, P 值均 < 0.05)。结论 MR 灌注技术在改变血液 CO₂ 分压的条件下可以反映正常脑组织和肿瘤组织血流变化, 进而间接判断肿瘤血管的成熟度。

【关键词】 神经胶质瘤; 磁共振成像; 灌注; 血管

Functional response of tumor vasculature in rats glioma to hypercarbia evaluated by MR perfusion weighted imaging ZHANG Qing-bo*, FENG Xiao-yuan, LIANG Zong-hui, CHEN Shuang. Department of Radiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China* (Present address: the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of MR PWI in judging maturity and variability of tumor vasculature in gliomas in rats. Methods Twenty male SD rats were randomly assigned to tumor group and control group. Four weeks after implantation of C6 glioma cells in the brains of tumor group and injection of saline in the brains of control group, all rats were examined using MR PWI before and after inhalation of a mixture of 10% CO₂ and 90% air. PaCO₂ and blood pH values of rats were monitored. Relative cerebral blood volume(rCBV) and relative cerebral blood flow(rCBF) values of tumors and normal brain tissue were measured. Brain sample were examined histologically using HE and immunohistochemical staining for smooth muscle actin(SMA). The histological features of gliomas were observed and SMA positively stained vessels of each tumor were counted manually using a light microscope. Perfusion data and pathological findings were analyzed statistically with SPSS for Windows. Results PaCO₂ increased significantly [from (4.69 ±

0.62) kPa to (7.62 ± 0.81) kPa in tumor group and from (4.67 ± 0.51) kPa to (7.63 ± 0.78) kPa in control group, $P < 0.05$) after inhalation of the mixed gas. The rCBV and rCBF values of tumor core were remarkably greater than those of normal contralateral brain tissue. The increasing rate of rCBV and rCBF values in gliomas [(26 ± 17)% and (26 ± 18)% respectively] were significantly less than those in normal brain tissue [(90 ± 32)% and (45 ± 14)% respectively] ($t = 5.05$ and 2.355 , $P < 0.05$). Immunohistochemical staining of 10 tumors as well as contralateral brain tissue all demonstrated positive SMA expression in the smooth muscles of the vessels. The vascular walls of positive SMA labeled vessels within tumors were thinner and their vascular lumen wider than those within normal brain tissues. The number of SMA(+) vessels in tumors [(6.7 ± 2.8)/HP] was statistically less than that in contralateral brain tissue [(12.7 ± 2.8)/HP] ($t = 1.86$, $P < 0.01$). Changing rate of rCBV, rCBF of the tumor cores and number of the positive SMA labeled vessels showed no correlation ($r = 0.504$ and 0.607 , $P > 0.05$), while changing rate of rCBV, rCBF in normal brain tissue correlated well with number of positive SMA labeled vessels ($r = 0.721$ and 0.525 , $P < 0.05$). Conclusion PWI can detect the hemodynamic change induced by PaCO₂ increase in the normal brain and in the tumor. It may be a useful technique to measure maturity of tumor vessels.

【Key words】 Glioma; Magnetic resonance imaging; Perfusion; Blood vessels

实质肿瘤尤其是恶性肿瘤是血管生成依赖性病变^[1-2]。肿瘤新生血管多不成熟,这些血管是临床肿瘤抗血管生成治疗的靶目标;肿瘤组织内的成熟血管对抗血管生成治疗的敏感性很低。所以肿瘤新生血管的成熟度和稳定性可以作为临床制定特异性抗血管生成治疗方案的参考指征之一^[3-4]。笔者采用升高 C6 胶质瘤模型大鼠血 CO₂ 分压而造成大鼠高碳酸血症状态的方法,在此前后行 MR 灌注加权成像(PWI),并将结果与相应的免疫组织化学检查结果对照,探讨 MR 灌注能否反映胶质瘤新生血管的特征,以便为临床抗血管生成治疗提供依据。

资料与方法

1. 大鼠胶质瘤模型的建立: C6 胶质瘤细胞购自上海中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。纯种 SD (Sprague-Dawley) 雄性大鼠 20 只,体重 250 ~ 300 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,清洁级。20 只大鼠随机(数字表法)平分为正常对照组和肿瘤组,每组 10 只。肿瘤组大鼠于右侧尾状核区接种 C6 胶质瘤细胞制备大鼠胶质瘤模型,细胞培养和接种按余永强等^[4]的方法进行。

2. 常规 MR 成像: 大鼠接种胶质瘤细胞后第 4 周进行 MR 扫描。采用 GE 3.0 T MR 扫描仪和专用鸟笼线圈,成像参数为: 层厚 3 mm,无间隔,视野(FOV) 6 mm × 6 mm,矩阵 256 × 160,激励次数(NEX) 2。首先扫描 3 个方位的定位像,然后行全脑冠状面扫描(与大鼠身体长轴垂直方向),SE T₁WI: TR 400 ms, TE 13 ms; T₂WI: TR 4000 ms, TE 120 ms, PWI 后行 T₁WI 增强扫描。在增强图像上测量肿瘤最大直径。

3. 常规 MR PWI: 接种肿瘤细胞 4 周后进行 MR PWI 检查。大鼠一侧股动脉和对侧股静脉分别穿刺

放置直径 0.7 mm 静脉导管后固定。平扫后,将自制气体面罩固定于大鼠面部,包裹口鼻,小动物呼吸机进气端连接 10% CO₂ 与 90% 空气混合气体的钢瓶,出气端连接大鼠面罩,连续给气。给气前和给气后 15 min 后分别用肝素化的密闭注射器从大鼠股动脉采血 0.3 ml 测定 CO₂ 分压和血 pH 值。PWI 扫描于吸入高浓度 CO₂ 气体前、后各进行 1 次,2 次扫描间隔不少于 60 min。采用单次激发回波平面成像(EPI), TR 1000 ms, TE 50 ms, 反转角 60°, 层厚 3 mm, 间隔 0.1 mm, FOV 8 mm × 8 mm, 矩阵 64 × 64, NEX 1。使用压力注射器经留置管从股静脉以 1 ml/s 的流率团注 0.3 mmol/kg 钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)注射液, 1 s 内完成注射,每层面共获得 50 幅图像,成像时间 90 s。原始图像传送至工作站(Advantage Workstation AW 4.0, GE 公司),采用 Functiontool 灌注软件处理(GE 公司)。根据像素-像素分析法绘制出各选定层面的局部相对脑血容量(relative cerebral volume, rCBV)、局部相对脑血流量(relative regional cerebral flow, rCBF)伪彩图,选取肿瘤灌注值最大区域和健侧正常脑组织区(避开明显的血管),绘制出各感兴趣区(ROI)的时间-信号衰减曲线。

4. 组织学检查: 肿瘤组大鼠 MR 检查后处死取脑,以 5 μm 层厚连续横断面常规切片,分别行苏木精-伊红(HE)和鼠特异性微血管平滑肌抗体反应素(smooth muscle actin, SMA)抗体(基因有限公司提供)免疫组织化学(简称免疫组化)染色以观察组织内含有平滑肌结构的微血管数。

5. 数据处理和统计方法: 根据扫描的 rCBV 和 rCBF 值计算每组大鼠吸入高浓度 CO₂ 混合气体前后两者的变化率(%)。变化率(%) = (吸入后灌注

值 - 吸入前灌注值) / 吸入前灌注值 $\times 100\%$ 。并对 2 组的变化率进行比较, 结果行单因素配对 t 检验。肿瘤组织和健侧正常脑组织内 SMA 阳性血管数间的比较采用单因素配对 t 检验。在吸入高浓度 CO_2 混合气体前后肿瘤实质和健侧脑组织 rCBV 和 rCBF 的变化率与肿瘤 SMA 阳性血管计数的相关性采用 Pearson 相关回归分析。差异均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 大鼠 C6 胶质瘤的常规 MRI 及镜下表现: 接种肿瘤细胞 4 周后 MRI 示, 大鼠脑内肿瘤最大径 3.5 ~ 12.0 mm, 平均 (6.8 ± 3.1) mm, T_1 WI 呈等或低信号、 T_2 WI 呈等或高信号, 周围有片状水肿。增强后肿瘤实质明显强化(图 1), 中央多出现坏死区。

镜下见肿瘤细胞密集, 核质比例高, 血管增生显著, 常见坏死灶。

2. 大鼠吸入高浓度 CO_2 混合气体后部分血气指标和 rCBV、rCBF 的变化: 大鼠在吸入高浓度 CO_2 15 min 后, 血液 CO_2 分压升高, pH 值降低, 而氧分压和红细胞压积无明显变化。两组大鼠血气指标差异无统计学意义 (P 值均 > 0.05 , 表 1)。对照组大鼠吸入高浓度 CO_2 后, rCBV 和 rCBF 值明显升高, 右侧尾状核区变化率与肿瘤组左侧(无瘤侧正常组织)尾状核区变化率差异无统计学意义 (P 值均 > 0.05 , 表 2)。肿瘤组瘤组织区的 rCBV 和 rCBF 变化率与对侧无瘤脑组织比较差异有统计学意义, 表现为对比剂首过时段信号强度下降幅度加大, 回复基线的时间延长, 部分首过曲线不规则或出现双峰。肿瘤实质的 rCBV 和 rCBF 增加, 但平均变化率明显

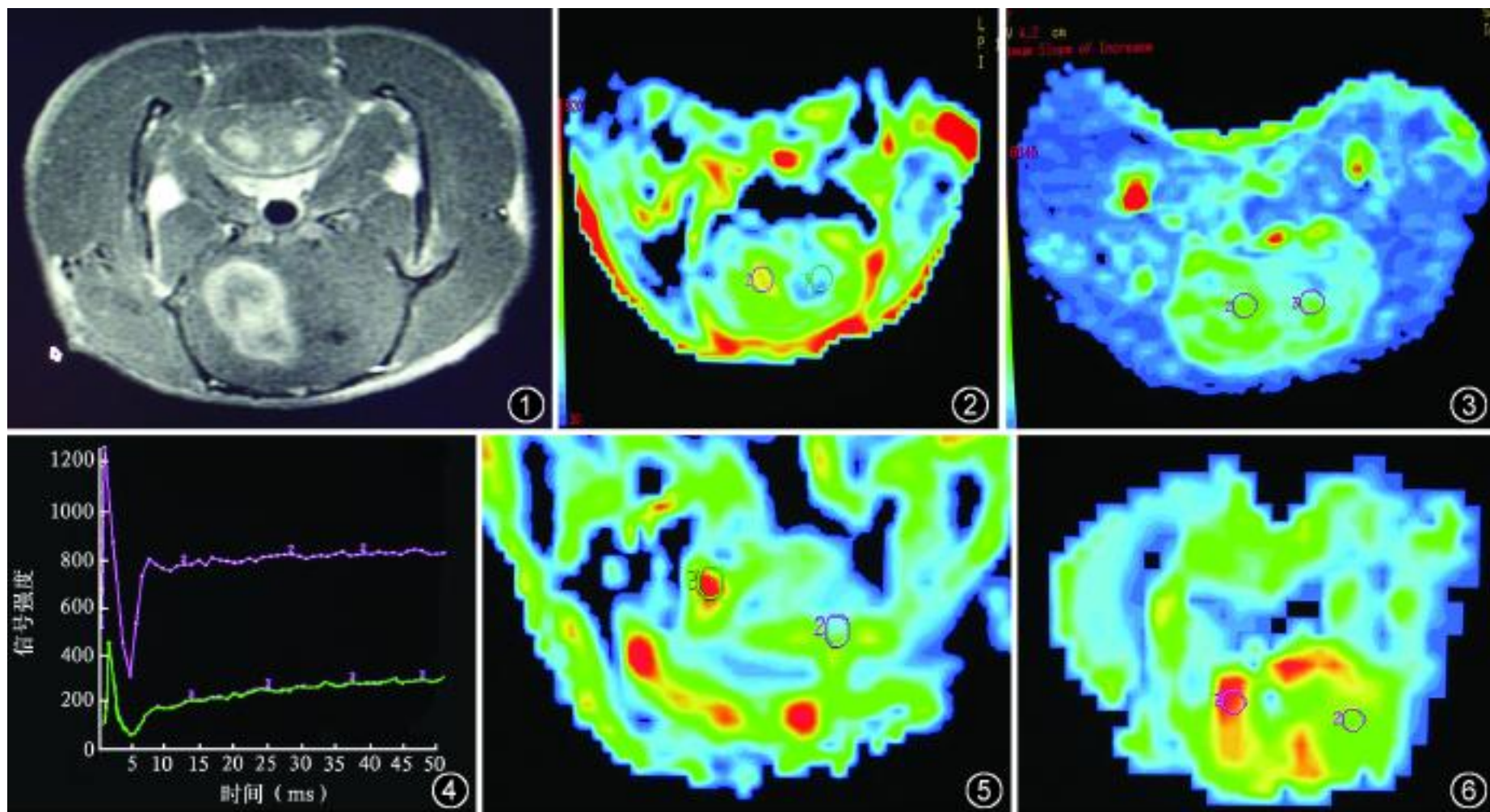


图 1 肿瘤 T_1 WI 增强表现为肿瘤实质明显强化 图 2, 3 肿瘤中心层面灌注 rCBV(图 2)、rCBF(图 3)伪彩图, 显示肿瘤区高血流灌注 图 4 为肿瘤(下)和对侧脑组织(上)的灌注(时间-信号下降)曲线 图 5, 6 肿瘤组大鼠吸入高浓度 CO_2 混合气体前的 rCBV 伪彩图(图 5), 肿瘤实质区呈红黄色, 对侧脑组织为蓝绿色, 对比明显。同一大鼠吸入高浓度 CO_2 混合气体后的 rCBV 伪彩图(图 6), 肿瘤实质区仍呈红黄色, 变化不大; 但对侧脑组织为黄绿色, 提示灌注量增加

表 1 2 组各 10 只大鼠吸入高浓度 CO_2 混合气体前后部分血气指标检测结果及比较($\bar{x} \pm s$)

组别	pH 值		PaCO_2 (kPa)		PaO_2 (kPa)		红细胞压积	
	吸入空气	10% CO_2	吸入空气	10% CO_2	吸入空气	10% CO_2	吸入空气	10% CO_2
肿瘤组	7.42 \pm 0.03	7.10 \pm 0.05	4.69 \pm 0.62	7.62 \pm 0.81	13.56 \pm 2.63	13.30 \pm 1.35	0.38 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03
对照组	7.40 \pm 0.04	7.08 \pm 0.02	4.67 \pm 0.51	7.63 \pm 0.78	13.64 \pm 4.25	13.27 \pm 3.27	0.38 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03
t 值	1.265	1.174	0.079	0.028	0.051	0.027	0.21	1.05
P 值	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

注: 吸入高浓度 CO_2 混合气体后, 肿瘤组和对照组 pH 值均明显降低 (t 值分别为 2.745, 2.693, P 值均 < 0.05); CO_2 分压 (PaCO_2) 明显升高 (t 值分别为 6.09, 7.012, P 值均 < 0.05); 其他指标变化无统计学意义 (P 值均 > 0.05)

低于正常脑组织(表 2, 图 2 ~7)。

3. C6 胶质瘤免疫组化染色结果: 大鼠 SMA 抗体免疫组化染色部位在血管的平滑肌细胞质, 呈棕褐色散在分布, 形态较规则(图 8, 9)。SMA 阳性血管计数肿瘤组健侧脑组织为(12.7 ± 2.8) 个/高倍视野, 肿瘤组织为(6.7 ± 2.8) 个/高倍视野, 两者差异有统计学意义($t = 1.86, P < 0.05$)。与正常组织的 SMA 阳性血管比较, 肿瘤内的阳性血管管腔内径显著增宽, 约为正常组织同级血管的 2 ~ 4 倍, 管壁相对较薄, 约为正常组织同类血管的 1/3 ~ 1/2 (图 8 ~ 11)。

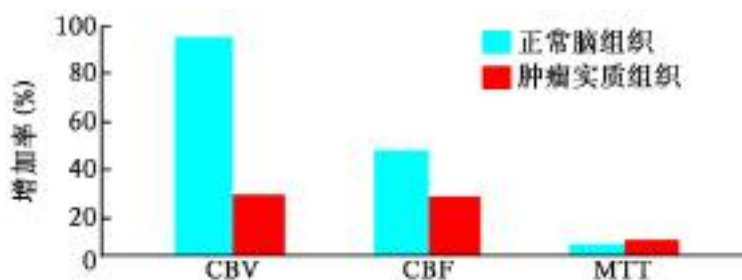


图 7 示正常脑组织及肿瘤实质组织相对脑血容量 (rCBV)、相对脑血流量 (rCBF) 和平均通过时间 (MTT) 变化率

表 2 对照组和肿瘤组大鼠血液 CO₂ 分压升高前后 rCBV 和 rCBF 的变化率比较 (% , 珔±s)

组别	动物数(只)	rCBV 变化率	rCBF 变化率
对照组右侧	10	88 ± 28	47 ± 14
肿瘤组	10		
健侧(左侧)	10	90 ± 32	45 ± 14
肿瘤实质	10	26 ± 17	26 ± 18

注: rCBV 为相对脑血容量, rCBF 为相对脑血流量。对照组右侧与肿瘤组健侧比较 rCBV 的 t 值为 0.122, rCBF 的 t 值为 0.203, P 值均 > 0.05 ; 与肿瘤实质比较, rCBV 和 rCBF 的 t 值分别为 5.05, 2.355, P 值均 < 0.05

Pearson 相关回归分析显示, 肿瘤实质区的 rCBV 和 rCBF 吸入高浓度 CO₂ 混合气体后的变化率与 SMA 阳性血管计数之间无明显相关性(r 值分别为 0.504, 0.607, P 值均 > 0.05)。而健侧正常脑组织的 rCBV 和 rCBF 的变化率与其 SMA 阳性血管

计数呈正相关(r 值分别为 0.721, 0.525, P 值均 < 0.05)。

讨 论

肿瘤血管生成虽然活跃, 但形成的新生血管多不成熟, 即血管周围结构发育不完整, 缺乏平滑肌等结构。SMA 可以反映血管成熟度, 该抗体对血管平滑肌细胞质特异染色。根据染色阳性细胞数目, 可以确定血管中平滑肌的数目, 从而确定“血管成熟指数”^[5-6]。

动物吸入含高浓度 CO₂ 的气体可以造成呼吸性高碳酸血症, 血 pH 值降低。CO₂ 和 H⁺ 透过血脑屏障, 引起脑脊液中的 pH 值也同步降低。这种变化会使有功能的外周血管收缩, 而心、脑等重要器官的功能血管舒张, 以保证重要器官营养和 O₂ 的供应量^[7-8], 在脑组织会出现血流量和血容量的增加^[9]。本实验中 2 组大鼠吸入高浓度 CO₂ 气体后, 脑组织的 rCBV 和 rCBF 均增加, 血 CO₂ 分压升高前后, 对照组大鼠脑组织和肿瘤组大鼠健侧脑组织各 rCBV、rCBF 变化率以及两组大鼠的主要血气指标差异均无统计学意义, 说明种植肿瘤细胞不会明显影响非瘤脑组织的血流状态以及机体的血气指标, 因此对脑肿瘤各项指标的评估具有可比性。

本研究发现, 吸入高浓度 CO₂ 前后大鼠 C6 胶质瘤实质部分的 rCBV 和 rCBF 的变化率明显低于正常脑组织(图 7), 考虑原因可能为恶性肿瘤的“不成熟”血管缺乏舒缩功能, 对高碳酸血症的反应能力差^[7, 10-11]。但本实验中肿瘤组织的 rCBV 和 rCBF 的变化率与免疫组织化学 SMA 阳性血管计数无显著相关, 其原因有待探讨。Packard 等^[12] 对雌性裸鼠脑内 U87MGdEFFR 胶质瘤血管功能的 MRI 研究发现, 虽然肿瘤的 CBV 对高浓度 CO₂ 的反应迟钝, 但是在降低 CO₂ 分压时肿瘤 CBV 的下降率却明显大于正常脑组织。笔者认为, 胶质瘤中大量结构欠

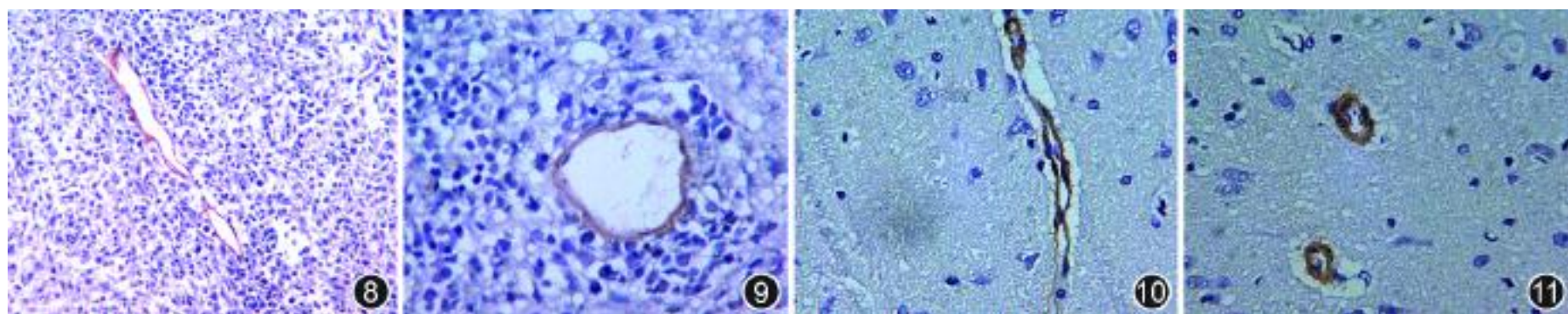


图 8, 9 胶质瘤组织免疫组织化学平滑肌抗体反应素(SMA)染色, 血管横断面可见染成棕褐色, 血管结构较规则(图 8, × 200); 血管呈扩张状态, 管壁较薄(图 9, × 400) 图 10, 11 大鼠正常脑组织内的 SMA 染色情况(× 200), 可见染成棕褐色的 SMA 阳性血管(图 10), 与肿瘤组织内的同类血管比较(图 8, 9), 管壁较厚, 管腔直径较小(图 11)

完整不成熟血管并非造成 MR 灌注 rCBV 和 rCBF 在 CO₂ 分压升高前后变化率低于正常脑组织的惟一原因。首先, 脑肿瘤中无论成熟血管还是新生肿瘤血管, 为了满足肿瘤对 O₂ 和营养的需求, 在各种因素的作用下都会变形、扩张或形成动静脉瘘, 其变化可能不同于正常组织的血管。即在正常 CO₂ 分压下, 肿瘤的血管可能已经明显扩张, 达到或接近其扩张极限。因此, 升高 CO₂ 分压, 其进一步扩张的能力十分有限, 其 CBV 和 CBF 也相应达到或接近最大值, 进一步升高的能力降低, 即所谓储备能力降低。这是 MR 灌注 rCBV 和 rCBF 对 CO₂ 分压升高反应迟钝的重要原因之一。而 CO₂ 分压下降时, 这些肿瘤血管却可将扩张储存的势能转化为动能而回缩, 从而解释了 Packard 等^[12] 实验中低碳酸血症情况下胶质瘤 CBV 的下降率明显大于正常脑组织的原因。

本研究中肿瘤组织内血管 SMA 阳性细胞数较少、血管管壁较薄、管腔较宽, 说明瘤内血管处于相对扩张状态。另外由于肿瘤组织结构相对致密, 比正常脑组织对血管产生更大的压迫作用, 亦限制了血管的扩张。尽管本实验中正常脑组织的 rCBV 和 rCBF 的变化率与组织 SMA 阳性血管数目正相关, 但肿瘤组织却没有这种相关性, 从另一角度说明了肿瘤血管结构不同于正常组织血管的复杂性, 肿瘤新生血管缺乏平滑肌结构只是其一个方面。随着肿瘤恶性度的增加, 肿瘤血管变异和迂曲扩张明显, 导致 CBV 和 CBF 增加, 但变化范围缩小。因此, 对高碳酸血症的变化敏感度下降。所以, 尽管 rCBV 和 rCBF 的变化率与 SMA 阳性血管数量无显著相关, 但仍然能够通过高碳酸血含量前后 MR 灌注 rCBV 和 rCBF 的变化率的大小判断肿瘤血管的变异程度进而推断肿瘤的恶性度。

参 考 文 献

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285: 1182-1186.
- [2] 杨本强, 田建明, 周丽娟, 等. 神经胶质瘤相对性脑血流容积与血管内皮生长因子蛋白表达及微血管密度的相关性研究. *中华放射学杂志*, 2003, 37: 327-331.
- [3] Benjamining LE, Golijanin D, Itlin A, et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*, 1998, 103: 159-165.
- [4] 余永强, 钱银锋, 陈骏, 等. 大鼠 C6 胶质瘤抗血管生成治疗的 MR 灌注研究. *中华放射学杂志*, 2004, 38: 762-766.
- [5] Benjamining LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor(VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 5: 8761-8766.
- [6] Kassner A, Annesley DJ, Zhu XP, et al. Abnormalities of contrast re-circulation phase in cerebral tumors demonstrated using dynamic susceptibility contrast enhanced imaging: a possible marker of vascular tortuosity. *J Magn Reson Imaging*, 2000, 11: 103-113.
- [7] Neeman M, Dafni H, Bukhari O, et al. In vivo BOLD contrast MRI mapping of subcutaneous vascular function and maturation: validation by intravital microscopy. *Mag Res Med*, 2001, 45: 887-898.
- [8] Mazurchuk R, Zhou R, Straubinger RM, et al. Functional magnetic resonance(fMR) imaging of a rat brain tumor model: implications for evaluation of tumor microvasculature and therapeutic response. *Magn Reson Imaging*, 1999, 17: 537-548.
- [9] 雷静, 高培毅, 刘明勇. 症状性大脑中动脉缺血患者脑血管储备能力的 CT 灌注成像研究. *临床放射学杂志*, 2007, 26: 235-239.
- [10] Julien C, Payen JF, Tropres I, et al. Assessment of vascular reactivity in rat brain glioma by measuring regional blood volume during graded hypoxic hypoxia. *Cancer*, 2004, 91: 374-380.
- [11] Cenic A, Nabavi DG, Rosemary A, et al. ACT method to measure hemodynamics in brain tumors: validation and application of cerebral blood flow maps. *AJNR*, 2000, 21: 462-470.
- [12] Packard SD, Mandeville JB, Ichikawa T, et al. Functional response of tumor vasculature to PaCO₂: determination of total and microvascular blood volume by MRI. *Neoplasia*, 2003, 5: 330-338.

(收稿日期: 2007-09-12)

(本文编辑: 高宏)