

## CT perfusion monitoring early response to gene therapy in C6 glioma model of rats

SHEN Hui-cong, WEI Xin-hua, WANG Jian-jiao, CHAI Qi,

MA Jun, LI Shao-wu, AI Lin, DAI Jian-ping\*

(Imaging Center of Neuroscience, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University,  
Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect CT perfusion (CTP) for early monitoring tumor response to gene therapy in a rat C6 glioma model. **Methods** Fifty male Wistar rats with C6 tumor cells implanted intracranially into the right caudate nucleus were examined with 3.0T MR scanner, then the rats were divided into treated group and control group (each  $n = 25$ ). Rats in treated group received recombinant herpes simplex viral (R-HSV) mediated Angiostatin-Endostatin (Statin-AE) fusion gene therapy. Conventional MR and CTP were performed on 2, 3 weeks after implantation. **Results** In the second week, there was no significance in tumor volumes between the two groups ( $P > 0.05$ ), but the relative cerebral blood flow (rCBF) and cerebral blood volume (rCBV) values of both tumor center and peripheral of the treated group were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). In the third week, the tumor volumes, rCBF and rCBV of the treated group were less than those of control group, a significant difference was observed ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CT perfusion has a potential use for the detection of early response to antiangiogenic gene therapy.

**[Key words]** Rats; Glioma; Tomography, X-ray computed; Perfusion; Gene therapy

## CT 灌注成像观测早期基因治疗大鼠 C6 胶质瘤疗效

沈慧聪, 魏新华, 王建交, 柴奇, 马军, 李少武, 艾林, 戴建平\*

(首都医科大学附属北京天坛医院神经影像中心, 北京市神经外科研究所, 北京 100050)

**[摘要]** **目的** 探讨常规 MR 检查结合 CT 灌注成像早期观察胶质瘤基因治疗效果的作用。 **方法** 雄性 Wistar 大鼠 50 只于右侧尾状核接种 C6 胶质瘤细胞后随机分为两组, 治疗组大鼠于相同位置注入携带融合基因的重组单纯疱疹病毒。接种后第 2、3 周行 MR 常规及 CT 灌注检查及病理检查。 **结果** 第 2 周对照组与治疗组大鼠 C6 胶质瘤肿瘤体积差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而治疗组大鼠的 rCBF 及 rCBV 小于对照组 ( $P < 0.05$ )。第 3 周时治疗组大鼠肿瘤体积、rCBF 及 rCBV 均小于对照组 ( $P < 0.05$ )。 **结论** CT 灌注成像可早期发现抗血管生成基因治疗对大鼠 C6 脑胶质瘤局部微循环的影响。

**[关键词]** 大鼠; 神经胶质瘤; 体层摄影术, X 线计算机; 灌注; 基因治疗

**[中图分类号]** R739.41; R-332; R814.42 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)11-1937-04

近年来以癌基因为靶目标的药物开发取得显著效果, 需要找到一种能尽早反映治疗后肿瘤变化的评判指标, 以确定新药的预期效应及其理想剂量。抗血管生成基因治疗对于胶质瘤具有重要意义, 目前该方法对肿瘤血流动力学研究多采用 MR 动态磁敏感对比技术<sup>[1-2]</sup>, 而与 MR 相比, CT 灌注

(CT perfusion, CTP) 由于对比剂浓度与组织信号呈线性相关, 在体内血流动力学的准确定量方面更具优势<sup>[3-5]</sup>。本文通过 CTP 研究大鼠 C6 胶质瘤在重组单纯疱疹病毒介导的血管抑素与内皮抑素 (angiostatin-endostatin, Statin-AE) 融合基因治疗后的血流动力学变化, 并与组织病理学相对比, 探索 CTP 在判定大鼠 C6 胶质瘤治疗后早期疗效中的作用。

### 1 材料与方 法

1.1 动物与分组 雄性 Wistar 大鼠 50 只, 平均体重 (300 ± 20)g, 颅内接种 C6 胶质瘤细胞, 在第 1 周 MR 检查确认有肿瘤生长后随机分为对照组和治疗组。实验方案严格遵守动物实验的各项伦理条例。

1.2 实验方法

**[基金项目]** 北京市自然科学基金(7092027)。

**[作者简介]** 沈慧聪(1974-), 女, 河北玉田人, 博士, 副主任医师。研究方向: 神经影像诊断。E-mail: shenhuicong@126.com

**[通讯作者]** 戴建平, 首都医科大学附属北京天坛医院神经影像中心, 北京市神经外科研究所, 100050。E-mail: daijianpingyan\_2008@sina.com

**[收稿日期]** 2009-04-15 **[修回日期]** 2009-06-16

1.2.1 模型制作 10% 水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉实验鼠,采取常用的右侧尾状核区为肿瘤接种靶点,C6 细胞注射量为 10  $\mu$ l( $5 \times 10^5$  细胞)。

1.2.2 融合基因治疗 治疗组大鼠在第 1 周 MR 检查确认肿瘤生长后,以接种 C6 细胞同样方法及步骤于颅内相同位置直接单点注射剂量为  $10^7$  空斑形成单位(plaque forming unit, pfu)的携带 Statin-AE 融合基因的重组单纯疱疹病毒(加拿大温哥华哥伦比亚大学脑研究中心提供)。对照组大鼠同样方法及部位注入等量生理盐水。

1.2.3 MR 检查及分析

(1) 常规 MR 扫描:10% 水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后俯卧位保定。采用 GE Signa 3.0T MR 成像仪,5 英寸表面线圈。MR 成像包括增强前的液体衰减反转恢复序列(fluid-attenuated inversion recovery sequence, FLAIR)冠状面及横断面 T1WI,冠状面 T2WI;增强后冠状面及横断面 FLAIR T1WI。第 2、3 周增强检查经鼠尾静脉注射 0.4 mmol/kg Gd-DTPA。扫描条件:FLAIR T1WI;TR

表 1 对照组与治疗组大鼠 C6 脑胶质瘤不同时间和区域的 rCBF 值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 2 周			第 3 周		
	肿瘤中心实质	肿瘤边缘	P 值	肿瘤中心实质	肿瘤边缘	P 值
对照组	2.06 $\pm$ 0.27	2.05 $\pm$ 0.17	>0.05	1.84 $\pm$ 0.23	2.16 $\pm$ 0.35	<0.05
治疗组	1.65 $\pm$ 0.36	1.59 $\pm$ 0.31	>0.05	1.43 $\pm$ 0.37	1.34 $\pm$ 0.28	>0.05
P 值	<0.05	<0.05	—	<0.05	<0.05	—

注:脑血液动力学参数均为病侧/健侧的参数比值

表 2 对照组与治疗组大鼠 C6 脑胶质瘤不同时间和区域的 rCBV 值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 2 周			第 3 周		
	肿瘤中心实质	肿瘤边缘	P 值	肿瘤中心实质	肿瘤边缘	P 值
对照组	2.02 $\pm$ 0.16	2.05 $\pm$ 0.15	>0.05	1.72 $\pm$ 0.18	2.20 $\pm$ 0.15	<0.05
治疗组	1.65 $\pm$ 0.31	1.73 $\pm$ 0.22	>0.05	1.39 $\pm$ 0.32	1.46 $\pm$ 0.43	>0.05
P 值	<0.05	<0.05	—	<0.05	<0.05	—

注:脑血流动力学参数均为病侧/健侧的参数比值

别在肿瘤中心区、边缘区、对侧正常脑组织各选取 3 个感兴趣区(约 2.5 ~ 3.5 mm<sup>2</sup>)并取其平均值来计算接种后第 2、3 周的血流动力学参数值。由于影响 CT 灌注图像的因素较多以及不同实验动物个体差异,本研究采用患侧/健侧比值的半定量计量方式,结果前加 r(relative)代表相对值。

1.3 组织病理学检查及分析 常规苏木精-伊红(HE)及反映血管内皮细胞的 CD31 免疫组织化

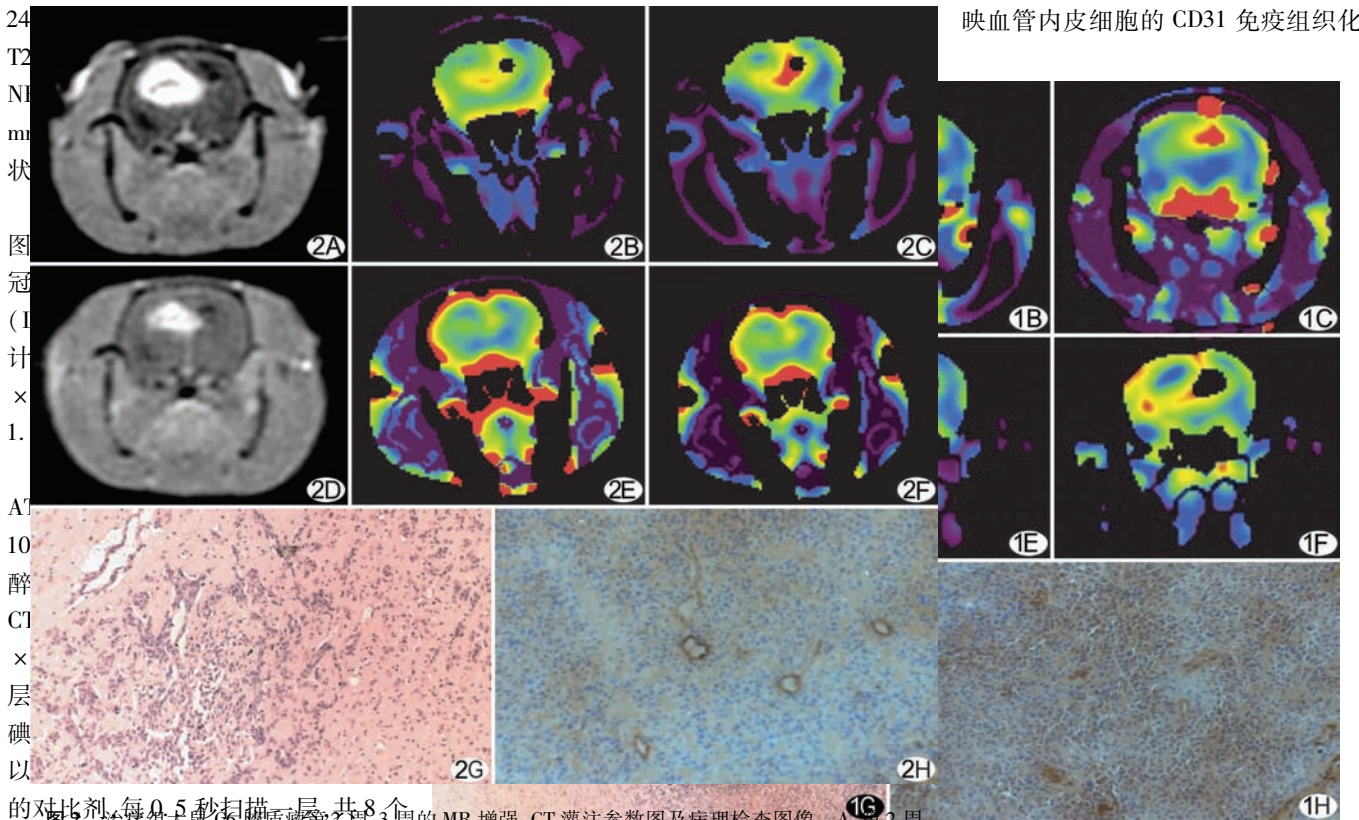


图 2 治疗组大鼠 C6 胶质瘤第 2 周、3 周的 MR 增强、CT 灌注参数图及病理检查图像 A. 第 2 周 T1WI 增强图像可见肿瘤不均匀强化,中央坏死;B. 第 2 周肿瘤区 rCBF(B)及 rCBV 增加(C);D. 第 2 周肿瘤边缘 rCBF(E)及 rCBV(F)增加;E、F. 肿瘤边缘 rCBF(E)及 rCBV(F)增加,中央下降;G. 肿瘤边缘血管明显增多(HE,  $\times 100$ );H. 免疫组织化学染色显示 CD31 计数阳性血管内皮细胞较密集( $\times 200$ )

学染色。请神经病理专家评价肿瘤细胞生长情况及微血管密度(micro-vessel density, MVD)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计学软件,体积采用中位数表示,CT 灌注参数值用  $\bar{x} \pm s$  表示。对照组与治疗组治疗前后肿瘤体积的组间与组内差异两两比较采用独立样本的秩和检验;两组间、组内不同区域间 CT 灌注参数值差异的两两比较采用独立样本  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠的接种及分组情况 本组 50 只大鼠脑内接种 C6 细胞后 1 周进行 MR 检查,有 43 只大鼠尾状核见到肿瘤生长,模型成功率为 86.00%,按随机分组原则分为对照组 21 只,治疗组 22 只。随后每组各处死 2 只大鼠进行第 1 周的病理学检查。治疗组于接受基因治疗后因为麻醉意外死亡 1 只。故对照组及治疗组各 19 只大鼠于第 2 周接受 MR 及 CT 检查,检查结束后各组分别处死 8 只大鼠行病理学检查。之后对照组大鼠死亡 2 只,故对照组 9 只,治疗组 11 只大鼠于第 3 周接受检查。

2.2 MRI 增强体积测量结果 第 2 周治疗组和对照组大鼠胶质瘤的体积分别为  $91.64 \text{ mm}^3$  和  $90.60 \text{ mm}^3$ ,二者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。第 3 周治疗组大鼠肿瘤体积( $29.64 \text{ mm}^3$ )小于对照组( $156.64 \text{ mm}^3$ )( $P < 0.05$ )。

2.3 CT 灌注表现 治疗组和对照组大鼠 C6 胶质瘤的不同时间及不同区域的 CT 灌注参数值见表 1、2。两组大鼠体积及 CT 灌注参数变化见图 1、2。

2.4 组织病理学观察 第 1 周时,HE 染色可见瘤细胞团边缘宿主血管扩张。第 2 周治疗组可见肿瘤微血管形态不整,肿瘤细胞肿胀碎裂,间质水肿,肿瘤内见坏死、出血;对照组见生长活跃的胶质瘤细胞密集成群,呈树枝样浸润生长,有肿瘤新生血管生成,且以肿瘤边缘区多于中心区。第 3 周治疗组可见肿瘤体积缩小、细胞碎裂、细胞数量明显减少,肿瘤微血管明显减少,管腔闭塞,肿瘤内见坏死囊变;对照组肿瘤细胞在边缘区围绕小血管密集生长,中心区可见出血、坏死灶。

## 3 讨论

3.1 胶质瘤的抗血管生成基因治疗 传统的肿瘤细胞毒性治疗对于延长胶质瘤患者生存期无明显帮助,血管生成的分子生物学机制研究则为此带来新的希望。Endostatin 和 Angiostatin 是目前所发现的两种活性最强的抗血管生成因子,但均属于蛋白类物质,在体内降解快,价格高,有毒性,使其临床应用受限<sup>[6]</sup>。基因治疗作为一种新型的疾病治疗手段,能将目的基因转染至靶细胞,目的基因在体内肿瘤局部持续发挥作用,克服了上述缺点。Ohlfest 等<sup>[7]</sup>通过酶联免疫吸附试验证实 Statin-AE 融合基因可通过抑制肿瘤的微血管生成来抑制肿瘤的生长。本研究的预实验显示 7 天时尚处于肿瘤血管生成前、早期,此时进行抗肿瘤血管生成治疗效果佳,故在第 7 天检查结束后作为基因治疗的时间窗。

3.2 C6 大鼠胶质瘤生长规律及抗血管生成联合基因治疗的 CTP 影像学检查观察评价抗肿瘤治疗效果是临床筛选和

评价药物疗效的重要手段。与其他抗肿瘤治疗如细胞毒性药物和放疗不同,抗血管治疗的早期反应可能仅通过改变肿瘤的血管特性、生长微环境等来抑制肿瘤的生长,而肿瘤体积无明显变化,使得在治疗后的相当长时间内无法判断疗效,因此了解肿瘤治疗后的内部血流动力学变化对观察疗效十分重要。

目前常用来评价活体血流动力学状态的影像学方法包括 MR 动态磁敏感对比成像(也称 MR 灌注成像)和 CTP。MR 灌注成像无辐射、所需对比剂剂量小,其缺点是对比剂浓度与信号变化呈非线性相关,空间分辨率相对低,易受磁敏感伪影的影响。CTP 的对比剂与密度变化呈线性相关,具有定量更加准确、空间分辨率高、不易受伪影干扰等优点,其作用在肿瘤抗血管治疗的实验性研究中得到初步证实<sup>[8,9]</sup>。本研究中对实验大鼠同时进行了两种方法的成像,发现尽管 MR 灌注成像的信号改变具有统计学意义,但由于是在 3.0T 高场强的临床扫描仪器下进行,非小动物专用机,故灌注参数图的磁敏感伪影较为明显,在此方面 CTP 更具优势。本研究中采用 Siemens 螺旋 CT 脑肿瘤灌注后处理软件,采用 Patlak 方法计算肿瘤的 CBV,此法考虑到对比剂血管内外间存在物质交换,消除了 BBB 受损的影响,使之更适于颅脑肿瘤测量。

由于注药速度及剂量均可能对测量结果有一定影响,本实验中综合以往研究<sup>[10]</sup>及预实验结果,采取大鼠尾静脉穿刺,通过高压注射器以  $0.4 \text{ ml/s}$  的速度注入总量  $1.2 \text{ ml}$  的对比剂,操作简单,损伤少,且易于固定和重复检查使用。

本组治疗组接种后第 2 周即接受治疗 1 周后,其肿瘤体积与对照组间差异无统计学意义,与体积变化不同,两组间的 rCBF、rCBV 在第 2 周即有统计学差异。分析原因与基因在体内的转染、表达及发挥作用尚需一定时间,且开始发挥抗血管作用后,肿瘤间质发生血管性水肿及细胞肿胀,也是体积不会立即缩小的原因之一。实验表明单纯疱疹病毒介导的 Statin-AE 融合基因改变了治疗组大鼠的肿瘤微血管状态,对于监测肿瘤治疗的早期变化优于常规 MR 检查的体积测量。同时治疗组与对照组大鼠的 rCBV 与 rCBF 在邻近区域间的两两比较差异无统计学意义,提示抗血管生成治疗影响了肿瘤血流动力学规律,在病理检查中也见到肿瘤边缘的血管数目明显减少,形态不规则。第 2 周时对照组大鼠肿瘤中心实质及边缘的 rCBF 及 rCBV 相近,这与病理观察到的肿瘤边缘新生血管较多不完全相一致,可能是血管直径和通透性对局部血流灌注的影响平衡了血管数目的作用,血瘤屏障的通透程度决定了对比剂外漏的量,影响了局部血液灌注;第 3 周对照组大鼠肿瘤边缘的 rCBF 和 rCBV 大于肿瘤中心,与此时病理上所观察到的肿瘤边缘血管数目进一步增多而中央出现不同程度的出血、坏死的结果相一致。

本实验初步显示单纯疱疹病毒介导的重组 Statin-AE 融合基因可通过抑制肿瘤血管生成来抑制大鼠脑内胶质瘤的生长。CTP 可以早于肿瘤体积发生变化而发现抗血管生成基因治疗对肿瘤局部微循环状态的影响,在肿瘤的疗效观察和

预测方面将有更大的发展空间和应用价值。

[参考文献]

[1] Badruddoja MA, Krouwer HG, Rand SD, et al. Antiangiogenic effects of dexamethasone in 9L gliosarcoma assessed by MRI cerebral blood volume maps. *Neuro-Oncology*, 2003, 5(4): 235-243.

[2] Marzola P, Degrassi A, Calderan L, et al. Early antiangiogenic activity of SU11248 evaluated in vivo by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in an experimental model of colon carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5827-5832.

[3] Hoeffner EG, Case I, Jain R, et al. Cerebral perfusion CT: technique and clinical applications. *Radiology*, 2004, 231(3): 632-644.

[4] Sabir A, Schor-Bardach R, Wilcox CJ, et al. Perfusion MDCT enables early detection of therapeutic response to antiangiogenic therapy. *AJR Am J Roentgenol*, 2008, 191(1): 133-139.

[5] Koukourakis MI, Mavanis I, Kouklakis G, et al. Early antivasular effects of bevacizumab anti-VEGF monoclonal antibody on colorectal carcinomas assessed with functional CT imaging. *Am J Clin Oncol*, 2007, 30(3): 315-318.

[6] Yamanaka R, Tanaka R. Gene therapy of brain tumor with endostatin. *Drugs Today (Barc)*, 2004, 40(11): 931-934.

[7] Ohlfest JR, Demorest ZL, Motooka Y, et al. Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 778-788.

[8] Marzola P, Degrassi A, Calderan L, et al. Early antiangiogenic activity of SU11248 evaluated in vivo by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in an experimental model of colon carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5827-5832.

[9] Kan Z, Phongkitkarun S, Kobayashi S, et al. Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model. *Radiology*, 2005, 237(1): 151-158.

[10] Guan LM, Guo M, Xu K, et al. Preliminary study of CT perfusion imaging in rat C6 brain gliomas. *Chin J Med Imaging Technol*, 2006, 22(3): 333-336.

关丽明, 郭敏, 徐克, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤 CT 灌注成像的初步研究. *中国医学影像技术*, 2006, 22(3): 333-336.