



· 论 著 ·

小鼠HCCLM3肝癌模型中超声分子成像对抗血管生成治疗的早期评价

汤 阳¹, 孔文韬², 张小龙¹, 李翠仙¹, 张炜彬³, 王文平¹

1. 复旦大学附属中山医院超声科, 上海 200032 ;
2. 南京大学医学院附属鼓楼医院超声科, 江苏 南京 210008 ;
3. 上海市影像医学研究所, 上海 200032

[摘要] 目的: 探讨靶向血管内皮生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 的超声造影在裸小鼠HCCLM3肝癌移植瘤模型中早期评价贝伐单抗抑制肿瘤血管生成的可行性。方法: 采用“生物素-亲和素”桥接法制备携VEGFR2单克隆抗体的靶向超声微泡, 建立裸小鼠HCCLM3肝癌皮下移植瘤模型。将荷瘤鼠随机分为治疗组 ($n=6$, 贝伐单抗10 mg/kg每周2次, 治疗1周) 和对照组 ($n=6$, 等体积0.9% NaCl溶液给药)。治疗前 (第0天)、治疗第2天、治疗第7天行超声造影检查, 绘制时间-强度曲线 (time-intensity curve, TIC), 比较相关定量参数的组间差异及组内各参数的变化, 同时采用CD31免疫组织化学染色比较2组间微血管密度 (microvessel density, MVD)。结果: 治疗第7天, 治疗组达峰时间 (time to peak, TTP)、平均渡越时间 (mean transit time, MTT) 较治疗前缩短, 曲线下面积 (area under curve, AUC) 较治疗前减小, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 组间比较发现, 治疗第7天治疗组流入相曲线下面积 (area under wash-in curve, WiAUC) 低于对照组 [(36.4 ± 11.6) dB·s vs (61.9 ± 12.4) dB·s, $P=0.010$]; 免疫组织化学结果显示, 治疗组MVD值低于对照组 (8.3 ± 2.1 vs 18.4 ± 7.6 , $P=0.039$)。结论: 靶向VEGFR2的超声造影可用于早期无创监测裸小鼠HCCLM3肝癌皮下移植瘤模型中抗血管生成治疗反应, TTP、MTT、AUC及WiAUC等定量参数是有效的参考指标。

[关键词] 超声分子成像; 血管内皮生长因子受体2; HCCLM3; 贝伐单抗; 定量分析

DOI: 10.19732/j.cnki.2096-6210.2019.02.002

中图分类号: R735.7; R445.1 文献标志码: A 文章编号: 2096-6210(2019)02-0072-06

Molecular ultrasound imaging with VEGFR2-targeted microbubbles in early assessment of antiangiogenic therapy in a mouse liver cancer model TANG Yang¹, KONG Wentao², ZHANG Xiaolong¹, LI Cuixian¹, ZHANG Weibin³, WANG Wenping¹ (1. Department of Ultrasound, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Ultrasound, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; 3. Shanghai Institute of Medical Imaging, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: WANG Wenping E-mail: puguang61@126.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-targeted contrast-enhanced ultrasound in monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy in a subcutaneous xenograft tumor model of HCCLM3. **Methods:** Anti-VEGFR2 monoclonal antibody was conjugated onto the surface of lipid microbubbles by the biotin-avidin interaction. The vascular effects of therapy were examined in mice carrying HCCLM3 xenografts. *In vivo* molecular contrast-enhanced ultrasound imaging with VEGFR2-targeted microbubbles was performed before and 2, 7 d after bevacizumab or saline treatment. Intratumoral perfusion areas were quantified by binarizing ultrasound images and the microvessel density was observed by CD31 immunohistochemistry. Perfusion parameters derived from time-intensity curve (TIC) were compared between the bevacizumab group and the control group, and longitudinal comparison of the parameters within the two groups was performed. **Results:** Although tumor volume was not significantly different between the two groups throughout the therapy period, longitudinal analysis of perfusion parameters showed a significant decrease in time to peak (TTP), mean transit time (MTT) and area under curve

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81571676); 上海市医学领军人才项目。

通信作者: 王文平 E-mail: puguang61@126.com

(AUC) 7 d after bevacizumab treatment, but no significant changes appeared in the control group. There was a significant difference in area under the wash-in curve (WiAUC) between the two groups on day 7. Immunohistochemistry confirmed the lower microvessel density in the bevacizumab group. **Conclusion:** The efficacy of antiangiogenic therapy could be noninvasively monitored with VEGFR2-targeted ultrasound in a murine model of human liver cancer with a significant decline of multiple perfusion parameters.

[**Key words**] Molecular ultrasound imaging; Vascular endothelial growth factor receptor 2; HCCLM3; Bevacizumab; Quantitative analysis

抗血管生成药物是肿瘤治疗中除手术、放化疗以外的极具潜力的辅助治疗手段^[1], 应用越来越广。其中, 贝伐单抗 (Bevacizumab) 通过直接阻断血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 引起肿瘤血管减少而切断肿瘤营养和氧气的来源, 血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 在肿瘤新生血管内皮细胞表面高度表达, 而在正常组织表达保守^[2]。本研究用磷脂质包覆的USphere™造影剂, 内含全氟化碳气体, 通过“生物素-亲和素”桥接法与VEGFR2单克隆抗体相接, 构成靶向肿瘤新生血管的分子探针, 探讨其监测贝伐单抗抑制肿瘤血管生成过程中肿瘤血流灌注变化的潜力及应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞与动物

人肝癌细胞系HCCLM3购自复旦大学附属中山医院肝癌研究所。

无特定病原体级BALB/c-nu/nu雄性裸小鼠12只, 6周龄, 购自复旦大学实验动物中心。

1.1.2 主要实验试剂与仪器

DMEM培养液、胎牛血清购自美国Gibco公司, 磷酸盐缓冲生理盐水购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 青-链霉素溶液购自吉诺生物医药技术有限公司, USphere™ Labeler全氟化碳微泡购自中国台湾博信生物科技股份有限公司, 生物素化大鼠抗小鼠CD309单克隆抗体购自美国BioLegend公司, 兔抗鼠CD31单克隆抗体购自英国Abcam公司, a.max AM-1高速振荡器购自中国台湾茂杰产业股份公司, PHILIPS iU22彩色多普

勒超声成像系统。

1.2 方法

1.2.1 HCCLM3皮下移植瘤模型的建立

人肝癌HCCLM3细胞于含10%胎牛血清的DMEM培养液 (含青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL) 中生长, 培养条件为37 ℃、CO₂体积分数为5%、完全饱和湿度, 用0.25%胰蛋白酶溶液和0.02%乙二胺四乙酸溶液消化传代。收集对数生长期的HCCLM3细胞, 用0.9% NaCl溶液清洗3次, 制成单细胞悬液, 每只裸小鼠右肩背部皮下接种 5×10^6 个HCCLM3细胞 (0.2 mL), 待肿瘤长径增至7 mm左右 (接种后约3周) 开始实验。

1.2.2 靶向VEGFR2超声微泡的制备

将USphere™ Labeler微泡于室温下置入专用高速振荡器内, 设置振荡时间为30 s, 活化后产生微气泡。从瓶内抽取适量微泡与生物素化VEGFR2单克隆抗体于室温下混合, 放置15 min, 不时轻轻混匀。将修饰成功的微泡用0.9% NaCl溶液稀释至0.5 mL, 1 000 r/min离心洗涤3 min, 弃去下清液以去除未修饰成功的靶标分子, 重复洗涤3次, 完成制备。

1.2.3 超声造影检查

将12只荷瘤鼠随机分成对照组和治疗组, 每组6只。治疗组每只裸小鼠给予贝伐单抗0.2 mg (25 mg/mL), 用0.9% NaCl溶液稀释至0.1 mL行瘤内注射, 对照组瘤内注射等体积的0.9% NaCl溶液, 每3 d给药1次, 共给药2次。治疗前 (第0天)、治疗第2和7天分别行超声造影检查。采用PHILIPS iU22彩色多普勒超声诊断系统L12-5线阵探头, 机械指数谐波造影技术, 设定动态范围83 dB, 机械指数0.07, 帧频12 Hz, 深度25 mm, 焦点位于肿瘤下方, 尽量避开肿

瘤, 减少超声波照射对微泡的破坏, 以获得最佳超声造影效果。裸小鼠麻醉后取俯卧位固定, 用二维超声测量肿瘤大小, 根据公式长 \times 宽 \times 厚/2计算肿瘤体积, 清晰显示肿瘤最大切面图像后探头保持不动, 切换到造影模式, 尾静脉一次性团注靶向微泡 1.0×10^8 bubbles/只 (50 μ L), 录像3 min后立即采用高声压爆破技术破坏肿瘤内残余微泡, 再次录像30 s。计算微泡破坏前后稳定的平均灰阶强度值, 两者之差用于估计血管内皮细胞结合的微泡量。

1.2.4 病理学检查

末次造影结束后, 过度麻醉处死荷瘤鼠, 沿肿瘤包膜完整剥离肿瘤, 用10%中性甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片, 行H-E染色及CD31免疫组织化学染色。

1.2.5 造影结果及图像分析

应用Interface Design定量分析软件绘制时间-强度曲线 (time-intensity curve, TIC), 选取有增强的肿瘤实质为感兴趣区, 排除始终未见增强的坏死区域及周围高增强的包膜, 得到以下灌注参数: 达峰时间 (time to peak, TTP)、峰值强度 (peak intensity, PI)、平均渡越时间 (mean transit time, MTT)、曲线下面积 (area under curve, AUC) 及流入相曲线下面积 (area under wash-in curve, WiAUC)、曲线上升及下降斜率等, 对比分析2组间定量参数的差异并纵向比较组内各参数的变化。

1.2.6 微血管密度 (microvessel density, MVD) 的计算

通过计算MVD判断肿瘤血管生成。首先在低倍镜 ($\times 40$ 和 $\times 100$) 下观察, 每张切片确定4个血管最密集区, 然后在每个密集区选取1个高倍视野 ($\times 200$) 计数微血管数, 4个区域的微血管平均值即为测定的MVD (个/HP)。

1.3 统计学处理

应用SPSS 24.0软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析, 组内比较采用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物模型

12只BALB/c裸小鼠均成瘤, 3周后肩背部隆起皮下种植瘤长径约7 mm, 皮肤表面光滑无破溃。至观察终点, 对照组2只裸小鼠因麻醉反应死亡, 余10只荷瘤鼠均存活。

2.2 肿瘤生长曲线

对照组与治疗组第0天体积分别为 $(0.119 \pm 0.057) \text{ cm}^3$ ($0.038 \sim 0.143 \text{ cm}^3$) 与 $(0.157 \pm 0.076) \text{ cm}^3$ ($0.063 \sim 0.245 \text{ cm}^3$), 两者差异无统计学意义 ($P = 0.383$), 治疗第2天和第7天两组间肿瘤体积及体积增长率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。纵向观察两组内肿瘤体积及体积增长率, 均显著增长 ($P < 0.05$, 图1)。

2.3 造影图像分析及TIC定量结果

经荷瘤鼠尾静脉一次性团注入造影剂后, 肿瘤包膜和周围肌肉组织快速增强并持续高增强, 肿瘤实质随后明显增强, 迅速达到峰值后缓慢下降, 表现为整体均匀及不均匀增强, 少见未增强的无灌注区域 (图2)。

与治疗前相比, 治疗第2天两组各参数的组内差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗第7天, 治疗组TTP、MTT明显缩短, AUC减低, 下降斜率明显增加, PI反而少许增强, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组除PI显著增强外 [$(20.4 \pm 3.5) \text{ dB}$ 和 $(26.0 \pm 3.3) \text{ dB}$, $P = 0.002$], 其余参数差异无统计学意义 (表1)。

比较两组间相关定量参数, 治疗第7天治疗组WiAUC明显低于对照组 [$(36.4 \pm 11.6) \text{ dB}\cdot\text{s}$ 和 $(61.9 \pm 12.4) \text{ dB}\cdot\text{s}$, $P = 0.010$], 肿瘤内微泡爆破后灰阶强度下降值也明显低于对照组 [$(3.7 \pm 1.7) \text{ dB}$ 和 $(6.2 \pm 1.4) \text{ dB}$, $P = 0.029$]。

2.4 病理学检查结果

镜下观察, 对照组及治疗组内均可见小片坏死灶散在分布, 为小灶性无结构、嗜酸性物质, 其中可见少量略呈嗜碱性的细胞核碎屑, 活

性肿瘤细胞可沿血管丰富的间质分布或位于包膜下。至观察终点时，对照组与治疗组MVD值

分别为 18.4 ± 7.6 和 8.3 ± 2.1 ，差异有统计学意义 ($P=0.039$ ，图3)。

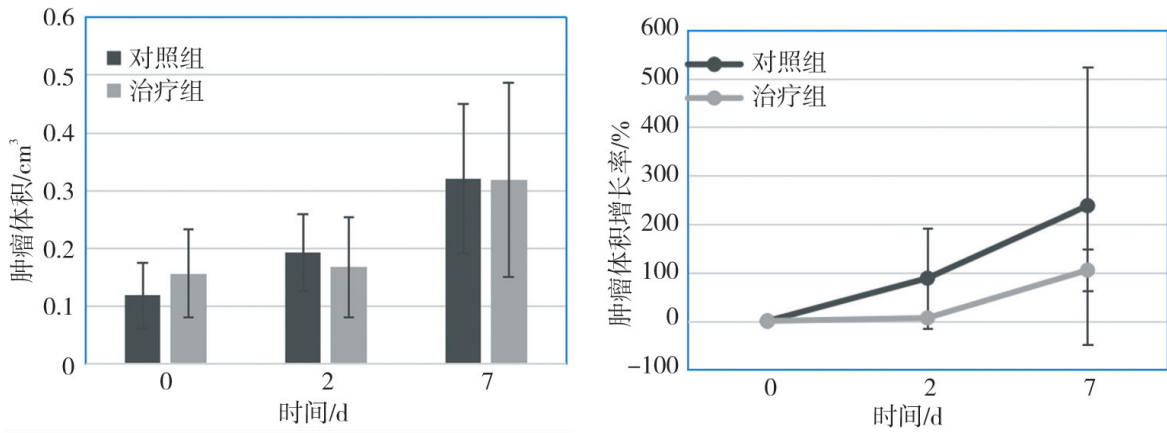


图1 肿瘤生长曲线

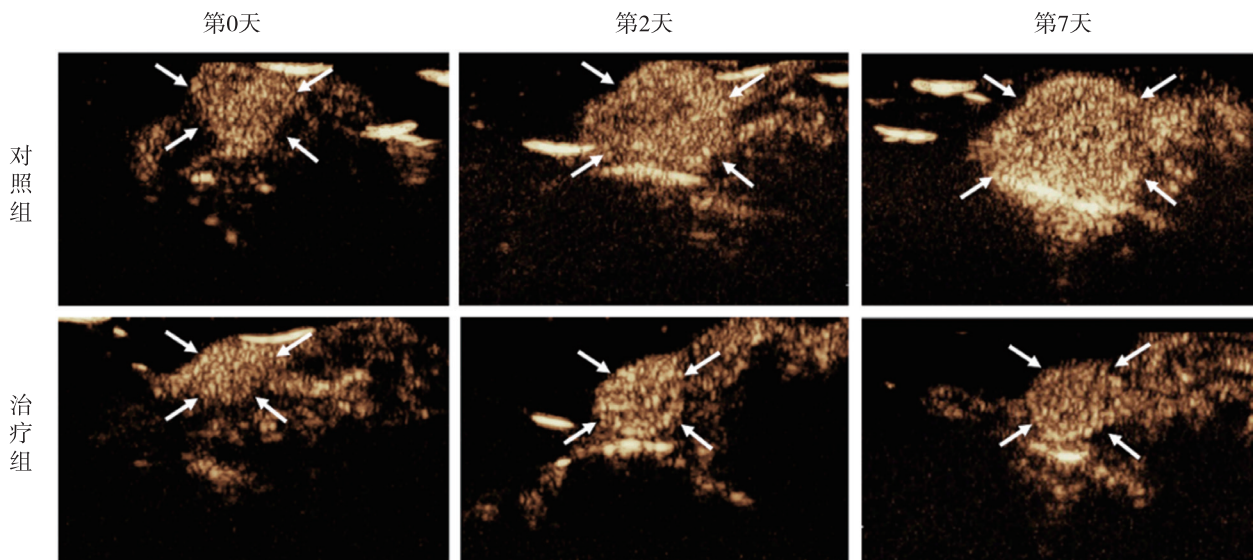


图2 对照组与治疗组各时间点造影图像

表1 TIC相关定量参数的比较

组别	例数	TTP/s	PI/dB	MTT/s	AUC/dB·s	WiAUC/dB·s	上升斜率	下降斜率
对照组								
第0天	6	3.4 ± 1.3	20.4 ± 3.5	73.9 ± 14.7	2 962.2 ± 622.8	31.3 ± 19.1	3.11 ± 4.91	0.055 ± 0.046
第7天	4	4.6 ± 1.7	26.0 ± 3.3	55.9 ± 3.3	2 515.2 ± 795.8	61.9 ± 12.4	2.51 ± 2.01	0.320 ± 0.158
P值	-	0.425	0.002	0.079	0.350	0.146	0.701	0.067
治疗组								
第0天	6	4.2 ± 2.2	21.1 ± 1.6	111.1 ± 38.8	3 306.2 ± 225.9	53.7 ± 32.8	3.87 ± 3.83	0.018 ± 0.020
第7天	6	2.7 ± 1.1	23.4 ± 1.6	54.7 ± 1.3	1 996.6 ± 694.2	36.4 ± 11.6	7.75 ± 4.28	0.215 ± 0.073
P值	-	0.028	0.015	0.016	0.004	0.148	0.174	0.001

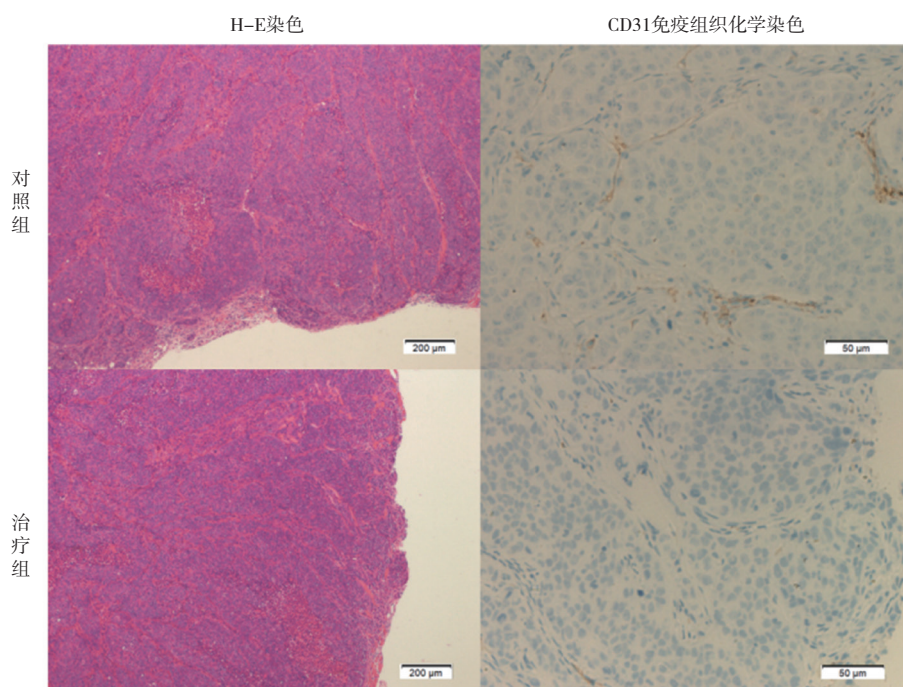


图3 对照组与治疗组H-E染色 ($\times 40$) 及CD31免疫组织化学染色 ($\times 200$) 结果

3 讨 论

VEGF在调节肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 血管生成中起关键作用, 与HCC侵袭性和预后密切相关。贝伐单抗是重组人源VEGF单克隆抗体, 通过阻断VEGF促血管生成的生物学作用而抑制肿瘤内血管新生。有临床研究发现, 低实体肿瘤疗效评价标准 (response evaluation criteria in solid tumors, RECIST) 反应的部分患者总生存率却显著提高, 提示预后与肿瘤内血管生成及坏死密切相关^[3]。

本研究利用“生物素-亲和素”桥接法制备VEGFR2为靶点的超声微泡, 用于肿瘤血管的特异性显像。使用的USphere™ Labeler微泡直径约1 μm , 与其他较大粒径的微泡相比, 其能通过高通透性和滞留效应在肿瘤组织中形成选择性分布^[4]以提高显像效果, 旨在早期敏感地显示抗血管生成治疗后肿瘤微循环灌注的变化。HCCLM3起源于MHCC97细胞株, 具有高侵袭性及转移潜能, 35 d的裸小鼠皮下移植瘤模型100%发生肺部转移, 其中HCCLM3细胞本身高表达VEGF参与新生血管生成^[5-6]。

Lassau等^[7-8]发现, HCC患者采用贝伐单抗

治疗3 d后, AUC、TTP的变化与2个月后的治疗反应及生存率明显相关; 对接受抗血管生成药物治疗的不同类型实体肿瘤患者行超声造影检查, 发现贝伐单抗治疗7 d后的MTT与无进展生存期显著相关, 尤其在乳腺癌及结肠癌患者中相关性较显著, 以此作为血管正常化的生物学指标用于转移性肿瘤患者的结局预测。本研究发现, 治疗第7天治疗组TTP、MTT较治疗前明显缩短, AUC明显减低, 与上述临床研究结果一致。

Klotz等^[9]对小鼠LLC-1皮下移植瘤模型予以抗血管生成药物治疗14 d后, PI和AUC出现明显下降。另外1项针对肠癌肝转移患者的研究显示, 接受贝伐单抗治疗的一部分患者肿瘤缩小与超声造影灌注参数PI的早期变化之间存在相关性^[10]。然而, 本研究发现治疗第7天治疗组PI反而稍有增强, 肿瘤体积及体积增长率也有明显增长, 与以往研究结果不完全一致, 可能与HCCLM3细胞株的生物学特性及其对贝伐单抗的敏感性有关, 肿瘤血管分布的空间异质性及样本量偏小也是重要影响因素。

Sugimoto等^[11]对肝癌患者中索拉非尼的疗效进行研究, 发现治疗14 d时WiAUC与治疗反应显著相关, 治疗7 d时WiAUC与无进展生存期及总生存期最相关。另1项研究通过构建大鼠人

结直肠腺癌皮下移植瘤模型行靶向VEGFR2超声造影,发现给药第7天治疗组WiAUC显著下降,对照组则无明显变化,且治疗组造影晚期微泡结合量明显低于对照组,还伴有治疗组VEGFR2、CD31和Ki-67阳性细胞明显减少^[12]。本研究发现,贝伐单抗治疗7 d后,治疗组WiAUC明显低于对照组,肿瘤内微泡爆破后平均灰阶强度下降值和MVD值也明显低于对照组,提示治疗引起肿瘤血管生成减少,肿瘤血管内皮捕获的靶向微泡数量相应减少,与既往文献一致。

本研究的局限性在于二维超声造影无法显示肿瘤灌注的空间异质性,单独分析中心切面评价抗血管生成治疗效果易造成对疗效的高估^[13],而近年来三维超声造影的发展弥补了这一缺陷。Zhou等^[14]对人结肠癌皮下移植瘤模型采用贝伐单抗治疗24 h,利用三维超声造影即观察到PI和AUC显著降低,这种灌注参数的早期改变与治疗10 d的抗血管生成治疗反应明显相关。另1项类似研究利用靶向VEGFR2的超声微泡行三维超声分子成像,与对照组相比,单次抗血管生成治疗后PI和相对血容量显著降低,与VEGFR2表达和微血管比例降低相一致,而与其他灌注参数无明显相关^[15]。此外,各时间点造影图像少见未增强的无灌注区域,镜下观察对照组和治疗组均可见活性肿瘤组织间小片坏死灶散在分布,未形成大片的中央性及偏心性坏死区域,可能与观察周期较短、肿瘤体积较小相关,因此较难对坏死情况进行准确的定量评价。而对转移部位的观察与评价还需借助其他影像学手段及病理学检查,尤其是发现肺部病灶。

综上所述,贝伐单抗阻断VEGF/VEGFR2信号转导通路干扰肝癌组织新生血管形成,靶向VEGFR2的超声造影能早期敏感地显示该过程中肿瘤微循环灌注的变化,包括TTP、MTT及AUC在内的多项与灌注相关的定量参数,对抗血管生成药物疗效的早期评价具有重要价值。

参考文献

- [1] TURKBEY B, KOBAYASHI H, OGAWA M, et al. Imaging of tumor angiogenesis: functional or targeted? [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 193(2): 304–313.
- [2] WILLMANN J K, LUTZ A M, PAULMURUGAN R. Dual-targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis *in vivo* [J]. *Radiology*, 2008, 248(3): 936–944.
- [3] BEX A, FOURNIER L, LASSAU N. Assessing the response to targeted therapies in renal cell carcinoma: technical insights and practical considerations [J]. *Eur Urol*, 2014, 65(4): 766–777.
- [4] KOBAYASHI H, WATANABE R, CHOYKE P L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? [J]. *Theranostics*, 2013, 4(1): 81–89.
- [5] 马喜波, 田捷, 杨鑫, 等. 多模态分子影像对肝癌进展和血管生成的研究 [J]. *生物物理学报*, 2011, 27(4): 355–364.
- [6] TIAN J, TANG Z Y, YE S L, et al. New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis [J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(5): 814–821.
- [7] LASSAU N, KOSCIELNY S, CHAMI L, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification—preliminary results [J]. *Radiology*, 2011, 258(1): 291–300.
- [8] LASSAU N, COIFFIER B, KIND M, et al. Selection of an early biomarker for vascular normalization using dynamic contrast-enhanced ultrasonography to predict outcomes of metastatic patients treated with bevacizumab [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(10): 1922–1928.
- [9] KLOTZ L V, CLEVERT D A, SCHECKINGER S, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of antiangiogenic tumor therapy [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(5): 2571–2576.
- [10] MOGENSEN M B, HANSEN M L, HENRIKSEN B M, et al. Dynamic contrast-enhanced ultrasound of colorectal liver metastases as an imaging modality for early response prediction to chemotherapy [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2017, 7(2): E35.
- [11] SUGIMOTO K, MORIYASU F, SAITO K, et al. Hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: early detection of treatment response and major adverse events by contrast-enhanced US [J]. *Liver Int*, 2013, 33(4): 605–615.
- [12] ESCHBACH R S, CLEVERT D A, HIRNER-EPPENEDER H, et al. Contrast-enhanced ultrasound with VEGFR2-targeted microbubbles for monitoring regorafenib therapy effects in experimental colorectal adenocarcinomas in rats with DCE-MRI and immunohistochemical validation [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169323.
- [13] WANG H, KANEKO O F, TIAN L, et al. Three-dimensional ultrasound molecular imaging of angiogenesis in colon cancer using a clinical matrix array ultrasound transducer [J]. *Invest Radiol*, 2015, 50(5): 322–329.
- [14] ZHOU J, ZHANG H, WANG H, et al. Early prediction of tumor response to bevacizumab treatment in murine colon cancer models using three-dimensional dynamic contrast-enhanced ultrasound imaging [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(4): 547–555.
- [15] WANG H, LUTZ A M, HRISTOV D, et al. Intra-animal comparison between three-dimensional molecularly targeted US and three-dimensional dynamic contrast-enhanced US for early antiangiogenic treatment assessment in colon cancer [J]. *Radiology*, 2017, 282(2): 443–452.

(收稿日期: 2018-10-29 修回日期: 2018-12-07)