

## • 实验研究 Experimental research •

TACE 联合血管内皮抑素治疗兔 VX2 肝癌  
CT 灌注与肿瘤血管生成的分析

刘新献, 龙清云, 胡金香, 周 军, 方 瑜

**【摘要】 目的** 探讨经肝动脉化疗栓塞术(TACE)联合血管内皮抑素(Rh-endostatin)治疗兔 VX2 肝癌的疗效,并分析治疗前后肿瘤周围的 CT 灌注参数与微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)表达之间的相关性。**方法** 建立 30 只兔 VX2 肝癌模型,随机分为 3 组,每组 10 只。A 组:单纯 TACE 组;B 组:TACE + 内皮抑素组;C 组:对照组,灌注生理盐水。3 组于治疗前后均行 CT 灌注扫描,获取灌注参数肝血流量(HBF)、血容量(HBV)、肝动脉指数(HAF)、毛细血管表面通透性(PS)。各组于第 1 次灌注扫描后分别处死 1 只肿瘤兔,介入治疗后 10d 行第 2 次灌注扫描,并处死所有肿瘤兔。利用免疫组化检测 MVD、VEGF 的表达情况。**结果** 治疗前 3 组肿瘤周边 CT 灌注参数 HBF、HBV、HAF、PS 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),治疗后 A、B 两组均有明显降低,B 组较 A 组明显增高;B 组中 MVD、VEGF 较 A、C 组显示减低,A 组 MVD、VEGF 较 C 组稍显增高( $P < 0.05$ )。3 组中肿瘤 VEGF 与 MVD 均呈显著正相关( $P < 0.05$ ),B 组中 HBF、HBV、HAF、PS 分别与 MVD、VEGF 呈正相关 ( $P < 0.05$ ),而 A、C 组中 HBF、HBV、HAF、PS 与 MVD、VEGF 无相关性( $P > 0.05$ )。**结论** TACE 联合内皮抑素治疗兔 VX2 肝癌与单纯 TACE 比较,可明显降低 VEGF 的表达,显著地抑制治疗后肿瘤新生血管的形成,从而减慢肿瘤的生长速度。

**【关键词】** 肝肿瘤; VX2 肿瘤; TACE; 血管内皮抑素; CT 灌注; 肿瘤血管

中图分类号:R735.9 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-11-0893-05

**TACE combined with endostatin for the treatment of rabbit VX2 hepatic carcinoma: an analysis of the correlation between CT perfusion parameters and tumor angiogenesis** LIU Xin-xian, LONG Qing-yun, HU Jin-xiang, ZHOU Jun, FANG Yu. Department of Radiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: LONG Qing-yun, E-mail: longqy2005@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the efficacy of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) combined with endostatin (Rh-endostatin) in treating rabbit VX2 hepatic carcinoma, and to discuss the correlation between CT perfusion parameters and the expressions of microvascular density (MVD) as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) before and after the treatment. **Methods** The experimental model was established in 30 rabbits, which were randomly and equally divided into 3 groups. Group A, receiving TACE only. Group B, receiving both TACE and Rh-endostatin. Group C (control group), receiving saline only. CT perfusion scanning was performed in all three groups three days before and at different points of time after the treatment. The perfusion parameters, including HBF, HBV, HAF and PS, were determined. One rabbit from each group was sacrificed after the first CT perfusion scanning. Ten days after the interventional therapy the second CT perfusion scanning was carried out, then all the VX2 tumor-bearing rabbits were killed. The expression of MVD and VEGF were determined with immunohistochemistry method. **Results** Before therapy, the difference in perfusion parameters (HBV, HBF, HAF and PS) among three groups was of no statistical significance ( $P > 0.05$ ). After the treatment, the perfusion parameters were markedly decreased, although the perfusion parameters in group B were significantly higher than that in group A. MVD and VEGF in group B were obviously lower than these in group A and group C, while MVD and VEGF in group A were slightly higher than these in group C ( $P < 0.05$ ). A positive correlation existed between VEGF

and MVD in all three groups ( $P < 0.05$ ). In group B, HBV, HBF, HAF and PS showed a positive correlation with VEGF and MVD ( $P < 0.05$ ), while in group A and C no

基金项目:湖北省卫生厅资助项目(JX4C30)

作者单位:430071 武汉大学中南医院放射科

通信作者:龙清云 E-mail: longqy2005@yahoo.com.cn

definite relationship existed between the perfusion parameters (HBV, HBF, HAF and PS) and VEGF or MVD ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In treating rabbit VX2 hepatic carcinoma TACE combined with Rh-endostatin can significantly reduce the expression level of VEGF and effectively inhibit the formation of the tumor vessels, in this way the growth of tumor can be restrained. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 893-897)

【Key words】 hepatic tumor; VX2 tumor; TACE; endostatin; CT perfusion imaging; tumor vessels

经肝动脉化疗栓塞术(TACE)是目前临床上治疗肝细胞癌(HCC)的常用方法。研究表明 TACE 术后残留组织内 VEGF 的表达明显升高,促进肿瘤新生血管的形成,使肿瘤得以继续生长、复发和转移<sup>[1-2]</sup>。因此,本研究应用 CT 灌注成像(CT perfusion imaging, CTPI)观察兔 VX2 肝癌 TACE 联合内皮抑素(Rh-endostatin)治疗前后的 CT 灌注参数与微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)表达之间的相关性,以探讨 CTPI 在评价 TACE 联合内皮抑素治疗兔 VX2 肝癌疗效中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和模型制作

实验用新西兰大白兔 30 只,雌雄不限,由武汉大学动物实验中心提供,肿瘤兔由武汉大学生命科学院提供。实验兔采用 1%戊巴比妥钠溶液(3 ml/kg)经耳缘静脉注射麻醉。手术方法:常规消毒、铺巾,在兔剑突下稍左侧做一长约 2 cm 的切口,打开腹腔,暴露肝脏,用 50 ml 注射器针头在肝左叶实质较厚的部位做一穿刺点,然后用小镊子取 1~2 粒备好的 VX2 小瘤块经此穿刺点置入肝实质内,退出镊子,同时用 0.9%氯化钠溶液浸润的纱布压迫 15~20 s,逐层缝合切口,聚维酮碘消毒,术后连续 3 d 肌肉注射青霉素。

### 1.2 实验方法

1.2.1 TACE 治疗 27 只肝荷瘤兔于 2 周后麻醉固定,并用外科无菌方法暴露股动脉鞘,用桡动脉穿刺针穿刺股动脉,置入 5 F 自制导管鞘(取子宫动脉导管头长约 6~8 cm),插入 3 F 微导管超选择至肝固有动脉或左肝动脉,造影证实肿瘤染色后按分组要求注入药物,A 组(TACE 组):1 mg/kg 阿霉素与 0.2 mg/kg 超液态碘油;B 组(TACE + 内皮抑素组):1 mg/kg 阿霉素、0.2 ml/kg 超液态碘油和 0.5 mg/kg 内皮抑素;C 组(对照组):经肝动脉缓慢注入同等剂量生理盐水。术毕拔出导管,加压包扎切口,术后肌肉注射青霉素抗感染 3 d。

1.2.2 CTPI 扫描 分别在肿瘤接种 2 周后和介入治疗后 10 d 行 CTPI。检查当日禁食、禁水 8 h。首先

行肝脏平扫,参数设置:100 kV、120 mAs、层厚 5 mm、间距 5 mm。选择肿瘤显示较好的 2 个层面(层面应包括腹主动脉、门脉主干或分支)。对比剂总量 5 ml、流速 1.5 ml/s、延迟 2 s 开始扫描,扫描时间为 50 s。灌注扫描结束后 10 min 行肝脏 CT 增强扫描,参数设置:100 kV、120 mAs、层厚 5 mm、间距 5 mm、对比剂总量 4~5 ml、流速为 1 ml/s。获得灌注图像后输入 GEAW4.2 工作站,利用 Perfusion3 中的去卷积模型肝脏肿瘤灌注软件进行数据分析和处理。

1.2.3 病理及免疫组化检查 各组于第 1 次灌注扫描后处死 1 只 VX2 肝癌兔,第 2 次灌注扫描完毕后,处死所有 VX2 肝癌兔;摘取肝脏,先进行大体观察,然后切取癌灶及其周围肝组织,用 4%甲醛将解剖标本浸泡、固定,常规石蜡包埋。尽量取与灌注扫描层面相同切面切片,然后由病理科专业技术人员作 HE 染色及 MVD、VEGF 免疫组化染色。由专职从事免疫组化检查的病理学专家观察 MVD 及 VEGF 表达情况,免疫组化检查试剂由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2.4 MVD 及 VEGF 表达测定 在 400 倍光学显微镜下取 3 个“感兴趣区”(阳性细胞分布最密集的区域),取其平均数为该病例的 VEGF 阳性染色细胞数。MVD 计数参照 Weidner<sup>[3]</sup>的评判标准,选择 3 个高倍视野血管密度“感兴趣区”区域,任何黄染的细胞或细胞簇即使未显示管状结构只要和邻近的微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开均计为 1 个血管,计算 3 个“感兴趣区”计数均值。

### 1.3 统计学处理

所有计数资料数据用均数标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS15.0 统计软件进行数据分析,对于 VX2 肝癌灌注参数值与 MVD 和 VEGF 表达之间的关系采用 Spearman 相关分析法,均以  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TACE 治疗

27 只荷瘤兔经改良股动脉插管行 TACE 成功 23 只,成功率 85.2%(23/27),DSA 动脉期主要表现

为肿瘤血管增粗紊乱,肿瘤呈均匀或不均匀结节或团块状染色。瘤体较大时,粗大的供瘤动脉被肿瘤推压成抱球状;肝实质期大部分可见肿瘤染色,注入超液化碘油后再次造影显示碘油明显沉积。

## 2.2 病理观察

**2.2.1 大体形态** 治疗前肿瘤呈大小不等的结节状,突出于肝表面,表面较光滑,质硬,切面呈灰白色,部分瘤灶中心有坏死组织,瘤灶与周围正常肝组织分界尚清楚。治疗后肿瘤切面呈灰黑色,组织内有较多的坏死区。

**2.2.2 组织学检查** VX2 肿瘤细胞形态不规则,呈巢状分布,多为圆形、梭形,胞质较少,核大而深染,间质较少,瘤细胞异型明显,病理性核分裂象多见;治疗后 A、B 组观察肿瘤组织内正常肝结构消失,代之为结构混乱的肿瘤组织,巢状分布的瘤细胞团内可见较治疗前明显增多的大片状或多个小片状坏死区,大部分瘤细胞核固缩及核碎裂,A 组可见间质血管充血、扩张,局部有出血灶,坏死灶周围有较多炎症细胞浸润。

**2.2.3 免疫组化检查** VEGF 在肿瘤中呈弥漫性表达,在肿瘤边缘以及坏死区周围的瘤巢中表达较强,以细胞质呈棕黄色或棕褐色染色为 VEGF 阳性细胞。TACE 联合内皮抑素治疗后,肿瘤微血管稀少,VEGF 阳性细胞散在分布,而单纯 TACE 组及对照组见肿瘤组织及邻近间质内微血管多而密集,VEGF 阳性细胞弥漫分布于瘤巢中。TACE 联合内

皮抑素治疗组 MVD、VEGF 表达均较单纯 TACE 组、对照组明显减低,单纯 TACE 组较对照组稍显增高。治疗后各组间 MVD、VEGF 相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1),治疗后各组 VEGF 表达见图 1。

表 1 治疗后各组间 MVD 与 VEGF 的比较

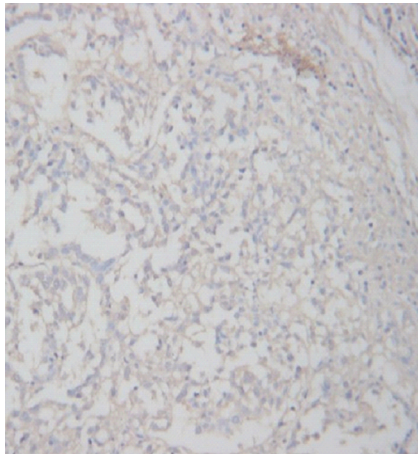
组别	MVD	VEGF
A	80.2 ± 18.5	159.4 ± 38.1
B	25.4 ± 9.8	65.3 ± 24.8
C	67.6 ± 13.7	144.7 ± 35.9

## 2.3 CTPI 参数

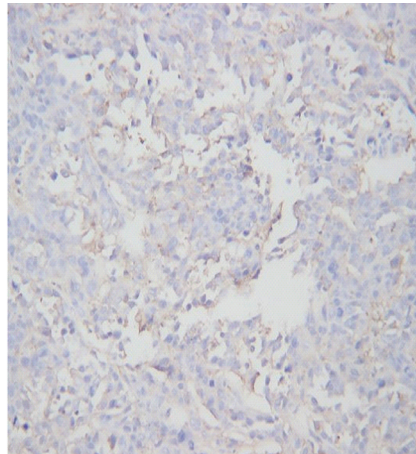
TACE 治疗前后肿瘤周边的 CT 灌注参数值见表 2。治疗前,3 组肿瘤周边的 CT 灌注参数肝血流量(HBF)、血容量(HBV)、肝动脉指数(HAF)、毛细血管表面通透性(PS)值差异无明显统计学意义( $P > 0.05$ ),治疗后,A、B 两组 HBF、HBV、HAF、PS 均有明显降低,B 组较 A 组明显增高( $P < 0.05$ )。TACE 联合内皮抑素组治疗后 CT 灌注参数图见图 2。

## 2.4 CT 灌注参数与 MVD、VEGF 相关性

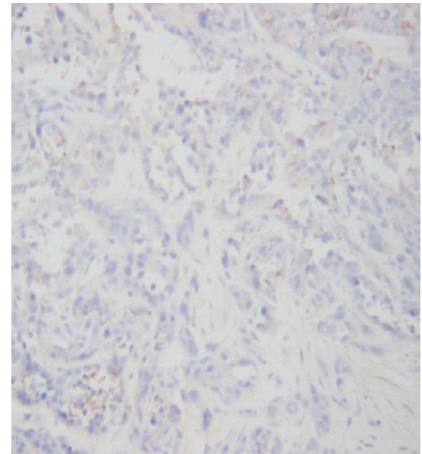
将介入治疗后 VX2 肝癌边缘各灌注参数值与 MVD、VEGF 表达强度做 Spearman 相关分析,结果显示 B 组中 HBF、HBV、HAF、PS 分别与 MVD、VEGF 呈正相关( $P < 0.05$ ),而 A、C 组中 HBF、HBV、HAF、PS 与 MVD、VEGF 无相关性( $P > 0.05$ )(表 3)。



a 单纯 TACE 组(× 200)



b TACE 联合内皮抑素组(× 200)



c 对照组(× 200)

图 1 治疗后各组 VEGF 表达

表 2 治疗前后肿瘤周边的灌注参数值

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	HBF		HBV		HAF		PS	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A 组	181.50 ± 12.63	135.34 ± 16.45	16.04 ± 1.18	8.43 ± 1.54	0.76 ± 0.04	0.51 ± 0.13	30.57 ± 1.12	18.83 ± 13.32
B 组	183.34 ± 15.56	152.65 ± 13.38	14.25 ± 3.81	10.51 ± 2.65	0.83 ± 0.09	0.62 ± 0.25	31.45 ± 1.34	25.35 ± 1.74
C 组	179.38 ± 13.15	177.50 ± 14.49	15.65 ± 2.42	16.86 ± 3.51	0.77 ± 0.05	0.85 ± 0.38	29.79 ± 1.67	29.62 ± 1.58

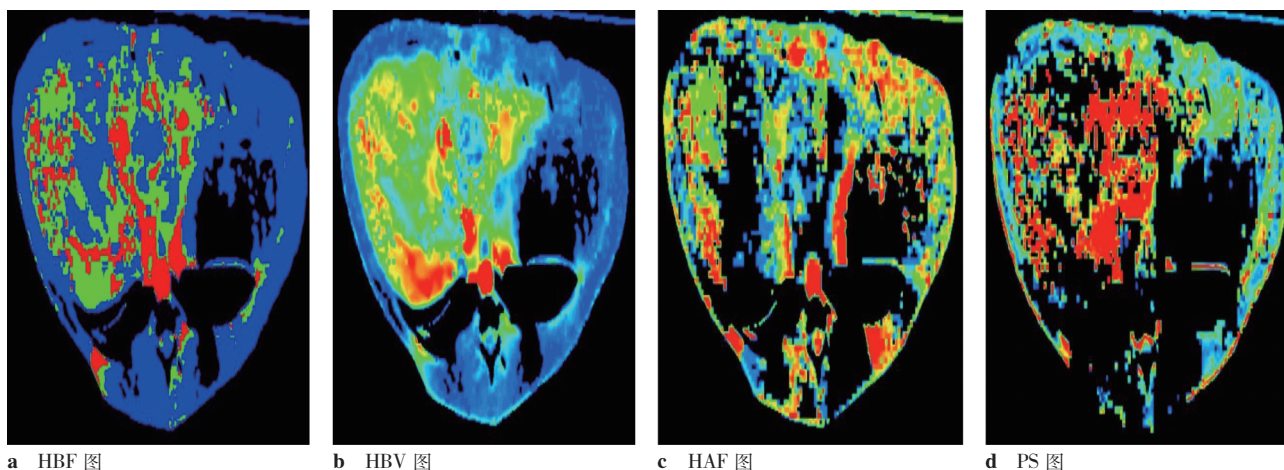


图 2 兔 VX2 肝癌治疗(TACE + 内皮抑素)后 CT 灌注图

表 3 介入治疗后 10 d 兔 VX2 肝癌肿瘤边缘 CT 灌注参数值与 MVD、VEGF 相关性

组别	MVD		VEGF	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
A				
HBF	0.103	0.247	0.127	0.218
HBV	0.152	0.521	0.165	0.533
HAF	0.191	0.142	0.113	0.180
PS	0.084	0.329	0.097	0.401
B				
HBF	0.627	0.032	0.735	0.027
HBV	0.706	0.024	0.693	0.031
HAF	0.843	0.029	0.763	0.022
PS	0.787	0.026	0.851	0.018
C				
HBF	0.142	0.212	0.249	0.239
HBV	0.068	0.583	0.105	0.574
HAF	0.126	0.201	0.192	0.197
PS	0.161	0.314	0.219	0.350

注:*r* 值为 HBF、HBV、HAF、PS 分别与 MVD、VEGF 的相关系数

### 3 讨论

CT 灌注可以通过测量微循环的血流量来评估组织器官的生理或病理状态,还具有无创、安全、准确、可靠的特点,从而为活体判断肿瘤血管情况提供一种新方法,有助于临床选择合适的治疗方案、判断疗效及预后<sup>[4]</sup>。目前 CTPI 在脑部的应用已基本成熟<sup>[5]</sup>。本实验通过应用 CTPI 可反映局部组织的血流动力学改变的优点,对 TACE 治疗前后肿瘤周边的 CTPI 参数值进行分析、对比。结果显示,TACE 治疗前肿瘤周边的 CTPI 参数值无明显变化;TACE 治疗后,A、B 两组 HBF、HBV、HAF、PS 均有明显降低,A 组较 B 组降低更为明显。说明 CTPI 参数可反映肿瘤血管化程度,进而可判断栓塞治疗的效果。Kan 等<sup>[6]</sup>对鼠移植型肝癌 TACE 术后的 CTPI 实验研究发现,TACE 术后病灶 HBF 与 HBV 较 TACE 术前

明显减少;张景峰等<sup>[7]</sup>探讨多层螺旋 CTPI 在兔 VX2 软组织肿瘤动脉栓塞术治疗前后疗效监测中的应用价值时也证实,所有兔大腿 VX2 肿瘤组织的 HBF、PS 值与动脉栓塞术前相比明显降低。

本实验中,TACE 联合内皮抑素治疗组 VEGF 表达均较单纯 TACE 组、对照组明显减低,单纯 TACE 组较对照组稍显增高。大量实验表明缺氧是上调 VEGF 表达的最主要的因素<sup>[8]</sup>。肝癌细胞随着 TACE 术后导致的肝动脉缺血、缺氧,使肿瘤内部形成缺氧区,从而刺激肝癌细胞分泌 VEGF,激发新生血管的生成。同时在对 MVD 值的检测中,发现单纯 TACE 术后残留组织中 MVD 也较密集,这主要是因为单纯 TACE 通过栓塞肿瘤的主要供血动脉以引起肿瘤细胞的缺血坏死,对肿瘤的新生血管作用不大;相反,由于栓塞后 VEGF 表达的增多,促进了残余肿瘤组织新生血管的形成,MVD 值也呈增高趋势,这与国内学者的研究结果一致<sup>[9]</sup>。同时,也表明内皮抑素可以通过直接减少 VEGF 的表达量以抑制肿瘤血管的新生<sup>[10]</sup>。

在 TACE 联合内皮抑素治疗组中,CTPI 参数 HBF、HBV、HAF、PS 与 MVD、VEGF 呈正相关,而单纯 TACE 组及对照组与 MVD、VEGF 无明显相关性。可能是 CTPI 能监测到的对象只是有功能的血管,而 MVD 是对所有各种血管化程度不同的新生血管的总的计数,包括无功能的单个内皮细胞、内皮细胞簇以及血管芽等。血管内皮抑素对新生血管的抑制,使肿瘤微血管主要以残存的有血流灌注的血管为主,CTPI 能监测的血管与 MVD 计数的血管基本一致,从而使 CTPI 参数值能反映这些血管的血流灌注状态。

任何方法联合治疗的原则都应提高肿瘤的治

疗疗效,尽可能的消灭肿瘤组织,减少不良反应及并发症,TACE 联合抗血管生成治疗也不例外。两者联合可以克服各自缺点,发挥各自优势,并且可以获得任何一种单一治疗方案都无法获得的治疗效果<sup>[11]</sup>。Maataoui 等<sup>[12]</sup>发现在肝癌的动物模型中,TACE 联合免疫治疗和抗血管生成治疗与单纯 TACE 治疗相比均可明显延缓肿瘤的生长,而联合抗血管生成治疗效果更为显著。联合治疗不但可以抑制肿瘤的生长,还可以提高患者的生存率,使治疗效果明显改善。另外,部分抗肿瘤血管生成的药物同时具有诱导肿瘤细胞坏死的作用,可以协同化疗药物杀死肿瘤细胞。

总之,TACE 联合血管内皮抑素治疗兔 VX2 肝癌与单纯的化疗栓塞比较,可以明显降低 VEGF 的表达,显著地抑制治疗后肿瘤新生血管的形成,从而减慢肿瘤的生长速度。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wang B, Gao ZQ, Xu H, et al. The effect of transcatheter arterial Chemoembolization on angiogenesis and the expression of VEGF in Hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2004, 91 (Suppl 1): S12 - S12.
- [2] Von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, et al. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2001, 48: 87 - 96.
- [3] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Berast Cancer Res Treat, 1995, 36: 169 - 180.
- [4] 潘克华, 殷薇薇, 刘再毅, 等. 原发性肝细胞癌多排螺旋 CT 灌注表现与 VEGF, MVD 相关性研究进展[J]. 肝胆胰外科杂志, 2006, 18: 391 - 393.
- [5] Abruzzo T, Tumialan L, Chaalala C, et al. Microscopic computed tomography imaging of the cerebral circulation in mice: feasibility and pitfalls[J]. Synapse, 2008, 62: 557 - 565.
- [6] Kan Z, Kobayashi S, Phongkitkarun S, et al. Functional CT quantification of tumor perfusion after transhepatic arterial embolization in a rat model[J]. Radiology, 2005, 237: 144 - 150.
- [7] 张景峰, 王仁法, 楼海燕, 等. 兔 VX2 肿瘤介入治疗前后肿瘤血管生成的多层螺旋 CT 灌注成像研究[J]. 中华放射学杂志, 2007, 41: 417 - 422.
- [8] Mugitani T, Taniguchi H, Takada A, et al. TNP-470 inhibits collateralization to complement the anti-tumor effect of hepatic artery ligation[J]. Br J Cancer, 1998, 77: 638 - 642.
- [9] 郑延波, 徐克. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  在兔 VX2 肝癌模型 TACE 术后的表达及其临床意义[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 334 - 338.
- [10] 蹇兆成, 孙业全, 王滨, 等. 内皮抑素在兔 VX2 肝移植瘤介入治疗中的应用价值[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 285 - 289.
- [11] Qian J, Feng GS, Vogl T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1885 - 1891.
- [12] Maataoui A, Qian J, Vossoughi D, et al. Transarterial chemoembolization alone and in combination with other therapies: a comparative study in an animal HCC model[J]. Eur Radiol, 2005, 15: 127 - 133.

(收稿日期: 2010-05-10)