

9.4 T 磁共振弥散张量纤维束成像对 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型肿瘤生长特点随时间变化的影像学分析

马璐, 余永强

摘要 目的 探讨 9.4 T 磁共振弥散张量纤维束成像 (DTT) 对 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型皮质纤维束 (CST) 随着肿瘤发展所致的一系列影像学变化, 并通过相关病理检验验证影像诊断中的意义。方法 ① 使用立体定向法对 20 只成年雄性的 SD 大鼠的右脑尾状核注入体积为 10 μ l 含 10^6 个的 C6 胶质瘤细胞悬浮液。② 运用 9.4 T 行常规磁共振 (MRI)、弥散张量成像 (DTI) 和 DTT 检查后, 运用 Function tool 软件处理, 得到各向异性分数图 [纤维束重组成像 (FA)] 图和方向编码彩色图及双侧 CST 3D 纤维束重建图。对肿瘤病灶区域及肿瘤周边水肿区及正常白质区进行 FA 值及平均弥散系数 (MD) 值测量, 进行 FA 图像信号强度及对比度的分析, 并且观察分析不同时期的 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤对皮质脊髓束解剖关系的影响, 然后行 HE 染色进行病理证实。结果 所有 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型均完成 3D 纤维束 FA 图像重建。测量的 FA 值在 3 个区域比较差异 (肿瘤实质区、周围水肿带、正常脑白质区) 均有统计学意义

($P < 0.05$)。水肿带和肿瘤实质区测量的 FA 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 3 个部位的测量的 MD 值差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。DTT 显示随着时间的推移, 脊髓纤维束容易受到脑肿瘤占位、浸润、瘤周水肿带等的影响, 纤维束可出现破坏和移位。结论 9.4 T 磁共振 DTT 能对不同时期 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型做出直观观察, 能较好显示皮质纤维束解剖关系的改变, 病理上的改变也证实影像上的分析。

关键词 9.4 T 磁共振; DTT; DTI; MRI; C6 胶质瘤模型; SD 大鼠; FA 值

中图分类号 R 338; R 739.41; R 445

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1233-05

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 致死率高, 术后容易复发, 平均存活期仅为 9~12 个月。由于脑胶质瘤生长的显著特点是浸润性和侵袭性, 其与周围正常组织分界不清, 即使在手术显微镜下, 也难以完全切除, 根治困难, 目前随着磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 技术的发展, 人们对肿瘤及其周围变化的认识尤其是肿瘤对脑白质纤维完整性影响及对瘤周浸润程度的影响更加深入, 利用 MRI 弥散张量纤维束成像序列 (diffusion tensor tractograph, DTT) 技术重建立体脑白质纤维束在影像学上的研究逐渐成为热点^[1]。随着影像

2014-04-24 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 99044530); 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: 001kj137)

作者单位: 安徽医科大学第四附属医院放射科, 合肥 230022

作者简介: 马璐, 女, 硕士研究生;

余永强, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shenyuxi@mail.hf.ah.cn

To further compare the binding activity of NEIBMs with the four mouse IgG subclasses, ELISA was conducted with HRP-labeled NEIBMs. **Results** After five, four, five and five rounds molecular evolution of the phage library directed by mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3, the control phages and one inserted the library was all two inserted domains phages, suggesting that the evolution of the library was finished. Sequence analysed by the software showed that DD, DD, AC and DC were obtained by the mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 respectively. The phage binding assays confirmed that the three molecules possessed binding advantages with the four mouse IgG subclasses. The results of ELISA with HRP-labeled NEIBMs were not completely consistent with the *in vitro* molecular evolution of the library by four mouse IgG subclasses, but the binding strength was consistent, all were: IgG3 > IgG2a > IgG2b > IgG1. **Conclusion** In this work, three novel evolved immunoglobulin binding molecules D-D, A-C and D-C are obtained from the *in vitro* molecular evolution of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various binding domains, and they have special binding advantages with the four mouse IgG subclasses that don't exist neither in SpA nor SpG. The three molecules provide the new molecules for the purification and detection of the four mouse IgG subclasses.

Key words phage library; directed molecular evolution; subclass; NEIBM

新技术的出现,虽然可以重建不同时期患者的立体脑白质纤维束图,使临床精确手术切除肿瘤成为可能,但是由于临床患者的身体状况、病情变化及伦理学限制等原因,影像新技术检测后不能进一步行病理确认,造成研究的局限性,因此重建 C6 胶质瘤大鼠脑纤维立体图为更进一步研究胶质瘤提供依据^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞株 雄性 SD 大鼠 24 只, SPF 级,约 250 g,购于安徽医科大学实验动物中心。分组:实验组 20 只,对照组(假手术组)4 只。C6 胶质瘤细胞株来自安徽医科大学临床药理研究所(购买自中国科学院上海细胞库);其他物品均由安徽医科大学临床药理研究所提供。

1.1.2 细胞培养与处置 C6 胶质瘤细胞放在的 1640 培养基 + 10% 胎牛血清的培养液中培养。接种前,细胞处于状态良好的对数期,加入含质量分数为 1% 琼脂糖的无血清双倍 1640 为细胞悬浮介质,终浓度为每 10 μl 含 10⁶ 个 C6 细胞。

1.1.3 立体方向接种法 立体定向架固定头部,以右脑尾状核为细胞种植点(即外耳道连线前 7 mm、中线向右 3 mm 处为钻孔位置),利用立体定向架定位并使用微量注射器注入接种体积为 10 μl,细胞为 10⁶ 个的 C6 胶质瘤细胞悬浮液^[3]。垂直缓慢进针 4 ~ 5 mm,注射时间为 10 s,注毕停针 45 s,然后缓慢拔针。定期(1、2、3、4 周)行 MRI 检查。

1.2 方法

1.2.1 MRI 检查方式 采用最大梯度场为 50 mT/m,切换率为 150 T/m/s 的 9.4 T 超导型 MRI 成像系统(位于中国科学院合肥物质科学研究所)。并按如下顺序以视交叉为中心扫描:轴位 SE-T1WI、FSE-T2WI、T2-FLAIR、弥散张量成像序列(diffusion tensor imaging,DTI)、DTT,最后行轴位、矢状位、冠状位 T1WI 增强扫描。常规 MRI 检查扫描参数:TIWI 序列:TR = 350 ms,TE 最小值,带宽 50,层厚 3.0 mm,层间距 0,矩阵 192 × 192,激励次数 4,FOV 8 cm。T2WI 序列:TR = 3 000 ms,TE = 120 ms,层厚、层间距、矩阵、激励次数、视野均与 T1WI 相同。FLAIR T2WI 序列:TR = 9 000 ms,TE = 155 ms,回波链长为 36,带宽为 31.25,层厚 3.0 mm,激励次数

1,FOV 15 cm。DTI 序列:采用单次或多次自旋回波序列,层厚 3.0 mm,层间距 0,层数 8,激励次数 16,视野 8 cm,每层运用 15 个非共线方向的数据,梯度扩散因子(b)值为 0 和 800 s/mm²,TR:2 500 ms,TE 最小值。DTT 技术利用计算机后处理重建。增强扫描序列:平扫后行冠状、冠状 T1WI 增强扫描,增强方式采用腹腔注射扎喷替酸葡甲胺(gadopentetate dimeglumine magnevist,Gd-DTPA)2.5 ~ 3.0 ml/kg,约 20 min 后扫描,参数同常规 T1WI,行 SAG 3D-bravo 扫描参数:层厚 0.8 mm,视野 8 cm,预扫描时间 380 ms,翻转角 15°,带宽 31.25,Locs per Slab 为 38。

1.2.2 相关病理验证方法 所有大鼠第 4 次 MRI 检查后均解剖取脑组织,用 4% 甲醛溶液固定 24 h,首先观察大体形态学表现:以视交叉为参照^[4],选取冠状位连续切取三块 4 mm 厚度标本,脱水,石蜡包埋,取与 DTI 肿瘤最大层面脑组织标本做连续冠状切片,切片数约 10 张,厚度约 0.4 mm。每个标本取 4 张行 HE 染色观察确定 C6 胶质瘤分化程度(WHO 分级)^[5]和肿瘤浸润情况,并观察肿瘤中心区、瘤周水肿区肿瘤细胞密度改变^[6]。

1.3 图像剖析及测量 按照常规 T1WI、T2WI、FLAIR、T1WI 增强图像的不同信号改变确定肿瘤的实质部分、瘤周水肿带、正常脑组织^[7]。① 肿瘤的实质部分:T1WI 增强区域,若强化不明显结合 T2WI、FLAIR 表现。② 瘤周水肿:T1WI 增强不明显,FLAIR 信号被抑制。③ 正常组织:位于肿瘤对侧的脑组织,T1WI、T2WI、FLAIR 信号正常。通过西门子工作站 Function tool 软件进行表观弥散系数(apparent diffusion coefficient,ADC)值测量,结合常规 MRI、DTI 和 ADC 彩图分别在肿瘤对侧正常脑白质及灰质、肿瘤周围水肿区(肿瘤周边 1 cm 以内的区域)、肿瘤实质选取感兴趣区(region of interesting,ROI)^[8]。分别测得平均弥散系数(mean diffusivity,MD)以及各向异性(fractional anisotropy,FA)值^[9]。对不同时期 FA 图、彩色张量图及脑白质纤维图进行测量以及分析,根据纤维束位置、方向的改变,肿瘤将对邻近的白质纤维束的影响表现为以下 4 种情况:无明显改变、推移、浸润和破坏^[10]。

1.4 统计学处理 运用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间差异检验采用配对 t 检验或方差分析,多组均数间的两两比较采用 q 检验,用单因素方差分析检验 3 个区域的 MD 值和 FA 值。

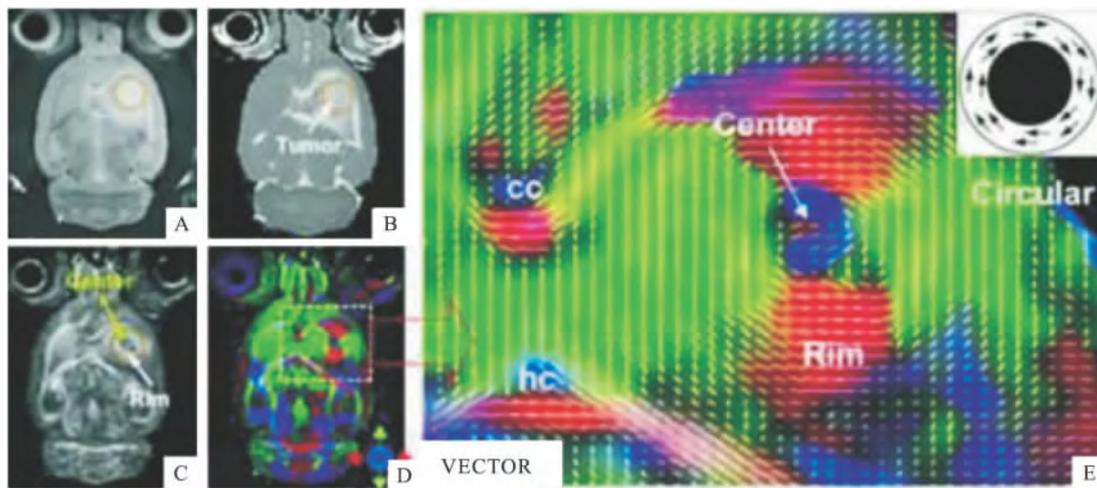


图1 SD大鼠 C6 接种 12 d 后 MRI 表现

A:T2WI 图;B:DWI 图;C:FA 图;D:原始向量图;E:D图重建后 VECTOR 图;cc:胼胝体;hc:海马连合

2 结果

2.1 肿瘤 MRI 表现 全部大鼠完成了 DTI 和 T1WI 等序列的 MRI 扫描、FA 图像和 DTT 的重建。扫描图片结果显示:脑灰质为等信号,脑室或者脑池内的脑脊液为低信号,脑白质纤维束为显著的高信号,形态结构清晰,即使在病灶的周围间质水肿区内白质纤维束仍能显像。脑胶质瘤多为类圆形信号,在 T2WI 图及 DWI 图上肿瘤区呈高信号;FA 图上肿瘤区各向异性值不同,中心低,外周高;向量图上肿瘤周边呈环状,见图 1。

2.2 病灶不同区域的 MD、FA 值 MD 图清晰显示胶质瘤肿瘤实质区、周围水肿区级正常白质区 3 个区域 MD 值分别为 $(1.250 \pm 0.261) \times 10^{-9} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、 $(1.131 \pm 0.146) \times 10^{-9} \text{ mm}^2/\text{s}$ 以及 $(0.826 \pm 0.090) \times 10^{-9} \text{ mm}^2/\text{s}$ 。肿瘤实质区、瘤周水肿带、正常白质区的 MD 值比较有统计学意义 ($P < 0.05$),而肿瘤实质区、周围水肿区比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);FA 图显示肿瘤邻近白质纤维受压移位,部分浸润、破坏,肿瘤的实质区、周围水肿带、正常白质区域的 FA 值分别为 (0.173 ± 0.024) 、 (0.216 ± 0.035) 、 (0.395 ± 0.048) 、3 个区域 FA 值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 肿瘤与全脑纤维束的关系 分别于 1、2、3、4 周进行 DTI 检查,经后处理软件生成 DTT,主要重建胼胝体、运动区和扣带回的纤维束,观察 1~4 周不同时期肿瘤生长的特点,见图 2;第 1 周,肿瘤侧各纤维束形态及连续性完整,与对侧相近;第 2 周

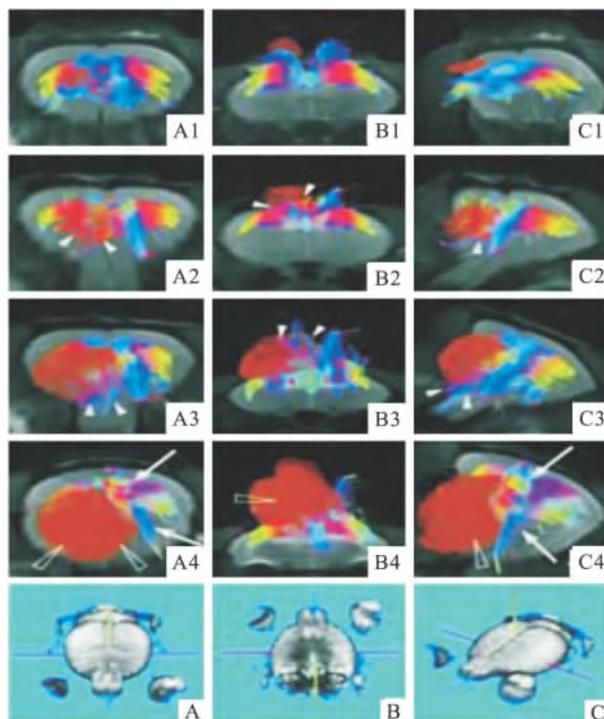


图2 肿瘤种植后 1~4 周肿瘤对白质纤维束的影响

A:前后位(正面观);B:上下位(底面观);C:右侧位(侧面观);1:1 周;2:2 周;3:3 周;4:4 周;棕色:肿瘤;红色:左右走行的纤维束;绿色:上下走形的纤维束;蓝色:前后走形的纤维束;实心箭头:肿瘤侧胼胝体向对侧轻度移位;空心箭头:肿瘤侧胼胝体消失;白色箭头:对侧胼胝体向对侧移位

时出现轻度移位,连续性完整;第 3 周后则明显的向腹侧或对侧移位,见图 3;到第 4 周肿瘤占据整个半球,肿瘤周围纤维束消失破坏,对侧纤维束也出现相应的移位,但连续性仍完整,见图 4。

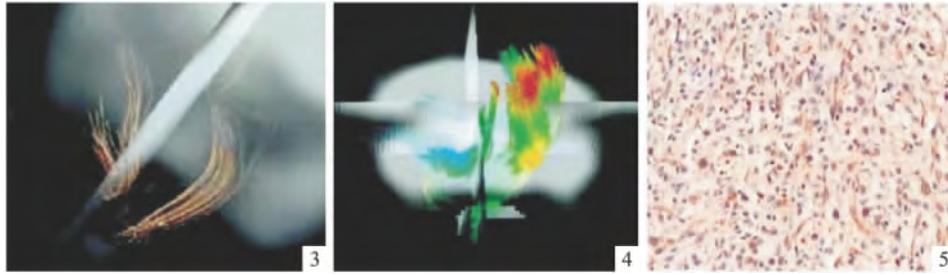


图3 右侧纤维束移位图 图4 右侧纤维束破坏及左侧纤维束移位图 图5 GFAP 阳性 SP×200

2.4 相关组织病理结果分析 肉眼大体可见肿瘤呈圆形或椭圆形,比周围正常组织颜色较深,边界较清楚,肿瘤质地为鱼肉状,周边脑组织较对侧肿胀,中线偏移,部分肿瘤内可见少许出血。HE 染色:肿瘤弥漫生长,细胞呈椭圆形、星形,细胞密集,核深染,细胞状态旺盛,每个视野均可见核分裂像。从肿瘤中心区至瘤周水肿区肿瘤细胞密度逐渐下降,瘤周瘤体交界处细胞密度下降明显,瘤内及瘤周可见水肿。20 例肿瘤浸润程度在 35% ~ 65%,中度浸润 4 例,重度浸润 16 例。[根据肿瘤细胞所占比例鉴定肿瘤浸润程度:① 无浸润(-):无肿瘤细胞;② 轻度浸润(+):肿瘤细胞 < 20%;③ 中度浸润(++) :肿瘤细胞 20% ~ 40%;④ 重度浸润(+++) :肿瘤细胞 > 40%]。GFAP 见核深染呈棕褐色,呈强阳性表达,表明给 SD 大鼠立体定向接种的肿瘤为胶质源性肿瘤,有人类脑胶质瘤的特性,见图 5。

3 讨论

DTT 是目前唯一能活体显示白质纤维束的无创成像方法^[11],通过依据脑白质纤维束内水分子活动的各项异性将平行于白质纤维束长轴方向的水分子弥散运动表现为高信号,从而实现白质纤维束的显像。在不同的参数图及后处理图上可以直观的显示脑白质纤维束的走形和分布、胶质瘤与白质纤维束的关系^[12]。肿瘤对周围的白质纤维束产生水肿、压迫和浸润,通常描述为以下 4 种类型:① 移位指白质纤维束保持正常的各向异性位置和走行已发生改变;② 水肿在 T2WI 图像上显示为高信号,白质纤维束的各向异性及其位置尚正常;③ 浸润在移位或水肿的基础上白质纤维束变得稀疏但尚能辨认;④ 破坏是指白质纤维束出现断裂,消失,不能辨认。低级别胶质瘤一般仅表现为移位和(或)水肿,高级别胶质瘤除表现为水肿、移位外,多有浸润和破坏的征

象^[13]。并且瘤周水肿区的 FA 值可用于评估胶质瘤对周围脑白质的侵袭浸润程度,因为肿瘤细胞常破坏神经纤维髓鞘结构,常致使 FA 值减低,所以 FA 值可作为评价肿瘤浸润的指标用于区分脑肿瘤与肿瘤周边正常组织^[14]。胶质瘤病灶内及周围水肿区与正常脑组织比 MD 值显著升高,而 FA 值显著降低,这种改变表明肿瘤浸润破坏了周围的组织结构、血管源性水肿所致细胞外自由水的增多,DTT 不但可重建胶质瘤病灶对周围重要脑白质纤维束的影响外,而且还可看到脑白质纤维束的结构完整性与肿瘤的确切位置的关系,但是 DTT 对于模型胶质瘤诊断还存在一些局限,首先:生化特性如黏度、温度、微观结构、分子、细胞膜和细胞器等会影响 FA 值的测量,在胶质瘤的病理生理状态下是否能准确测量还需进一步研究证实;其次:弥散运动所设计的成像序列对微观的弥散运动很敏感,影响 DTI 定量分析尤其是在活体成像中,容易产生伪影,导致 DTT 所重建的纤维轨迹与真实存在的传导通路存在一定偏差,这些问题在动物模型中同样存在。因此 DTT 无法取代 T1WI、T2WI 和 FLAIR,必须相互结合才能完成诊断^[15]。

总之,DTT 技术可以清楚地显示 SD 大鼠脑胶质瘤模型不同时期脑白质纤维与周围解剖结构的空

参考文献

[1] Liu X, Tian W, Kolar B, et al. MR diffusion tensor and perfusion-weighted imaging in preoperative grading of supratentorial nonenhancing[J]. *Neuro Oncol* 2011, 13(4):447-55.
 [2] Prabhu S P, Ng S, Vajapeyam S, et al. DTI assessment of the brainstem white matter tracts in pediatric BSG before and after therapy: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium [J]. *Childs Nerv Syst* 2011, 27(1):11-8.

- [3] 陈晓兵, 罗天有. Gd-DTPA 对脑肿瘤扩散张量成像观测指标的影响[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(6): 651-5.
- [4] Asanuma T, Doblbas S, Tesiram Y A, et al. Diffusion tensor imaging and fiber tractography of C6 rat glioma[J]. *J Magn Reson Imaging* 2008, 28(3): 566-73.
- [5] 郝金锁, 徐成, 荷业新, 等. 核磁共振弥散张量成像在脑胶质瘤诊断中的应用研究[J]. 中国基层医药, 2011, 18(14): 1919-21.
- [6] Sang hvi D A. Recent advances in imaging of brain tumors[J]. *Indian J Cancer* 2009, 46(2): 82-7.
- [7] Jain R, Narang J, Sundgren P M, et al. Treatment induced necrosis versus recurrent progressing brain tumor: going beyond the boundaries of conventional morphologic imaging[J]. *J Neurooncol*, 2010, 100(1): 17-29.
- [8] Chan K C, Khong P L, Cheng M M, et al. MRI of late microstructural and metabolic alterations in radiation-induced brain injuries[J]. *J Magn Reson Imaging* 2009, 29(5): 1013-20.
- [9] Rogers L R, Gutierrez J, Scarpace L, et al. Morphologic magnetic resonance imaging features of therapy-induced cerebral necrosis [J]. *J Neurooncol*, 2011, 101(1): 25-32.
- [10] Wang S, Wu E X, Qiu D, et al. Longitudinal diffusion tensor magnetic resonance imaging study of radiation-induced white matter damage in a rat model[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 1190-8.
- [11] Asanuma T, Doblbas S, Tesiram Y A, et al. Diffusion tensor imaging and fiber tractography of C6 rat glioma[J]. *J Magn Reson Imaging* 2008, 28(3): 566-73.
- [12] Jiang S, Liu M X, Han T, et al. Diffusion tensor imaging with multiple diffusion-weighted gradient directions[J]. *Neural Regen Res* 2011, 6(1): 66-71.
- [13] 魏大年, 赛克, 牟永告, 等. 弥散张量成像对胶质瘤手术风险的评估[J]. 中华神经外科杂志, 2009, 25(6): 455-9.
- [14] Bae M, Jahng G H, Ryu C W, et al. Effect of intravenous gadolinium-DTPA on diffusion tensor MR imaging for the evaluation of brain tumors[J]. *Neuroradiology* 2009, 51(5): 793-802.
- [15] 晏怡, 唐文渊, 邓朝霞, 等. 弥散张量成像量化分析脑胶质瘤侵袭性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(17): 3289-95.

Application of 9.4 T of DTT in the diagnosis of cerebral gliomas of SD rat

Ma Lu, Yu Yongqiang

(Dept of Radiology, The Four Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the 9.4 T of DTT in the diagnosis of SD rat C6 cerebral gliomas model about the change of CST on tumor progression and pathology confirmed. **Methods** ① 10 μ l C6 cell suspension of 10^6 cells number were implanted into the right caudate nucleus of brain hemisphere of 20 adult male SD rat with stereotactic technique. ② Application of 9.4 T of DTT and DTI, meanwhile the routine T1-weighted imaging (T1WI), T2-weighted imaging (T2WI), contrast-enhanced T1WI, FLAIR imaging and diffusion tensor of the brain were acquired. Anatomic relationship between cerebral glioma and surrounding white matter fiber tracts was analyzed and measured the values of FA and MD in different areas on fractional anisotropic (FA) map, color-coded directional map, three-dimensional (3D) white matter fiber tracts map, then stained with routine HE. **Results** All of SD rat C6 cerebral gliomas models 3D white matter fiber tracts map by means of FA maps of DTI were successfully completed. Apparently significant differences of FA values were found in solid tumor, surrounding edema, compared with normal white matter regions ($P < 0.05$); but there was no significant difference among solid tumor and surrounding edema region ($P > 0.05$); there were significant differences of MD values between solid tumor, surrounding edema and normal white matter region ($P < 0.05$). **Conclusion** The 9.4 T of DTT offers the optimal visualization of Anatomic relationship between cerebral glioma and surrounding white matter fiber tracts in the different periods of the tumor moder.

Key words 9.4 T; DTT; DTI; MRI; C6 model of Glioma; SD rat; FA values