

Correlation of targeting CEUS and matrix metalloproteinase-2 in transplanted ovarian tumor of nude mice

LI Qian, ZENG Qianqian, LIU Hui, XIANG Hong*

(Department of Obstetrics and Gynecology Ultrasound, the First Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation between targeting CEUS parameters and the intensity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in xenografts of nude mice. **Methods** Fifty nude mice transplanted tumor models were established, and were equally divided into group I—V according to the time points of 7th day, 14th day, 21st day, 28th day and 35th day after transplantation, respectively (each $n=10$). Then the mice were examined with routine and targeting CEUS. The parameters of time intensity curve, including peak intensity (PI) and time to peak (TTP) were analyzed. The expression of MMP-2 in ovarian cancer xenografts of nude mice was immunohistochemically detected, and the correlation of the targeting CEUS parameters and the intensity MMP-2 in ovarian cancer xenografts of nude mice were analyzed. **Results** Compared with routine CEUS, PI increased, TTP decreased in targeting CEUS (all $P<0.05$). In targeting CEUS, there was no correlation between PI, TTP and the intensity of MMP-2 in group I, IV and V (PI: $r=0.38, -0.47, 0.17$, all $P>0.05$; TTP: $r=-0.74, 0.07, -0.44$, all $P>0.05$), while PI, TTP of group II and III were correlated with the intensity of MMP-2 (PI: $r=0.86, 0.76$, $P<0.01$, $P=0.02$; TTP: $r=-0.84, -0.87$, $P=0.01$, $P<0.01$). **Conclusion** At different stages, targeting CEUS of ovarian cancer and the intensity of MMP-2 have certain correlation in xenografts of nude mice.

[Key words] Ovarian neoplasms; Ultrasonography; Contrast media; Matrix metalloproteinase-2

DOI:10.13929/j.1672-8475.201711061

卵巢癌移植瘤裸鼠靶向 CEUS 参数与基质金属蛋白酶 2 的相关性

李 茜, 曾倩倩, 刘 慧, 向 红*

(新疆医科大学第一附属医院妇产科超声科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 观察卵巢癌移植瘤裸鼠靶向 CEUS 参数与基质金属蛋白酶 2(MMP-2)的相关性。**方法** 建立 50 只裸鼠卵巢癌移植瘤模型,并分为 5 组, I 组为移植后第 7 天, II 组为移植后第 14 天, III 组为移植后第 21 天, IV 组为移植后第 28 天, V 组为移植后第 35 天。对每组移植瘤进行普通及靶向 CEUS 检查,分析各时间强度曲线(TIC)的峰值强度(PI)和达峰时间(TTP)。采用免疫组化方法检测卵巢癌中 MMP-2 表达水平,分析 5 组卵巢癌移植瘤靶向 CEUS 参数 PI 和 TTP 与同期 MMP-2 表达的相关性。**结果** 与普通 CEUS 比较,相同组别靶向 CEUS 的 PI 升高、TTP 减低(P 均 <0.05)。I 组、IV 组及 V 组肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI、TTP 与 MMP-2 均无明显相关(PI: $r=0.38, -0.47, 0.17$, P 均 >0.05 ; TTP: $r=-0.74, 0.07, -0.44$, P 均 >0.05); II 组及 III 组肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI 与 MMP-2 呈正相关($r=0.86, 0.76$, $P<0.01, P=0.02$), TTP 与 MMP-2 呈负相关($r=-0.84, -0.87$, $P=0.01, P<0.01$)。**结论** 不同时期卵巢癌移植瘤

[基金项目] 国家自然科学基金(81560289)。

[第一作者] 李茜(1992—),女,河南长葛人,在读硕士。研究方向:卵巢肿瘤超声诊断。E-mail: 741926452@qq.com

[通信作者] 向红,新疆医科大学第一附属医院妇产科超声科,830054。E-mail: xianghong65@126.com

[收稿日期] 2017-11-29 **[修回日期]** 2018-02-02

裸鼠靶向 CEUS 的 TIC 参数与 MMP-2 表达高度相关。

【关键词】 卵巢肿瘤;超声检查;造影剂;基质金属蛋白酶-2

【中图分类号】 R-332; R445.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1672-8475(2018)08-0491-05

卵巢肿瘤早期诊断困难,患者预后差。基质金属蛋白酶-2 (metalloproteinase-2, MMP-2) 在人卵巢癌血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 结构中有特异性表达^[1-2], 且其过表达与卵巢肿瘤的发生、发展有关^[3]。目前关于靶向 CEUS 与 MMP-2 相关性的研究较少。本研究通过靶向 CEUS 检测不同时期卵巢癌时间强度曲线 (time intensity curve, TIC) 参数, 以免疫组化方法检测 MMP-2 强度, 探讨靶向 CEUS 参数与 MMP-2 的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 BALB/cNude 雌性裸鼠 50 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g (北京维通利华生物科技有限公司)。人卵巢 SKOV3 癌细胞株 SKOV3 (北京北纳创联生物技术研究院), 超声造影剂 SonoVue (Bracco 公司), 生物素化大鼠抗小鼠 MMP-2 单克隆抗体 MMP-2 [艾博抗 (上海) 贸易有限公司], 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记山羊抗大鼠 IgG 抗体 (Ebioscience 公司), 链霉亲和素、生物素化脂质 (Sigma 公司), 鼠抗人 CD31 单克隆抗体一抗, 鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体 (Invitrogen 公司), 山羊抗鼠生物素标记二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 山羊抗兔 IgG 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色液 (北京中杉金桥生物技术有限公司), PAS 染色液 (南京建成科技有限公司)。

1.2 建立模型 参考文献[4]的方法建立裸鼠卵巢癌移植瘤模型。将人卵巢 SKOV3 细胞经胰蛋白酶消化后以无血清 1640 培养液洗涤, 并于 37℃、5%CO₂、完全饱和湿度的培养箱中进行常规培养, 调整活细胞浓度为 5×10⁷ 个/ml, 待卵巢癌 SKOV3 细胞株处于对数生长期且传代培养至 7~8 代时提取细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶消化后, 用含胎牛血清的高糖培养基漂浮洗涤, 调整活细胞浓度至 5×10⁷ 个/ml, 充分混匀, 于裸鼠背部皮下接种细胞混悬液 0.2 ml (含 1×10⁷ 个细胞)。根据接种后细胞移植时间分为 5 组, 每组 10 只: I 组为移植后第 7 天, II 组为移植后第 14 天, III 组为移植后第 21 天, IV 组为移植后第 28 天, V 组为移植后第 35 天。

1.3 制备靶向超声造影剂 向 SonoVue 中注入磷酸盐缓冲液 3 ml, 加入 450 μg 生物素化脂质。经恒温轻摇、离心后, 保留乳白色微泡聚集层; 将链霉亲和素加

入生物素化的 SonoVue 中, 收集上层微泡, 再次加入生物素化的 MMP-2 鼠抗人单克隆抗体, 静置、洗涤, 收集上层乳白色微泡。

1.4 CEUS 检查 采用百胜 MyLab 90 超声诊断仪, LA522 探头, 频率 3~9 MHz。先行二维超声检查, 选择移植瘤最大切面后转入对比脉冲序列 (contrast pulse sequence, CPS) 造影模式^[5], 机械指数 0.16, 帧频 8 Hz。经模型鼠尾静脉注射 SonoVue 造影剂 0.2 ml, 行普通 CEUS 检查, 直至造影剂消退完全; 1 h 后注入相同剂量靶向造影剂, 存储从注入造影剂开始至造影剂完全消退的动态影像, 用于脱机分析。采用 Qontrast 软件获得 CEUS 相关参数, 包括峰值强度 (peak intensity, PI) 和达峰时间 (time to peak, TTP)。

1.5 免疫组化 石蜡标本组织经微波抗原修复后, 采用一抗为 10% 的羊血清封闭 1:100 鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体, 于室温下孵育 2 h, 以生物素标识羊抗鼠抗体, 室温放置 30 min, DAB 反应显色, 苏木素复染, 光镜下观察。对所有动物均完成 CEUS 检查后, 以 CD31/PAS 免疫组化双染法检测 VM, 行 MMP-2 免疫组化检测瘤体内 MMP-2 抗原。VM 为相邻肿瘤细胞围成的紫红色的梭形或管状结构, MMP-2 抗原阳性结果为细胞膜或细胞质内有明确棕褐色沉着。由 2 名病理科主治医师采用盲法阅片, 随机选取 5 个高倍镜视野观察, 根据 Formwitz 半定量积分法计算 MMP-2 染色区域所占百分比: ≤5%, 0 分; 5%~25%, 1 分; <25%~50%, 2 分; <50%~75%, 3 分; >75%, 4 分。细胞着色程度: 无色, 0 分; 浅黄色, 1 分; 黄色, 2 分; 棕色, 3 分; MMP-2 染色区域所占百分比与细胞着色程度的乘积评价 MMP-2 强度的表达结果: 0 分 (-); 1~4 分 (+); 5~8 分 (++) ; 9~12 分 (+++)。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件。计量资料满足正态分布及方差齐性, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 *t* 检验比较普通与靶向 CEUS 的 PI 和 TTP, 采用 Spearman 相关分析靶向 CEUS 参数与 MMP-2 强度的相关性。|*r*| 值 ≤0.3 表示相关性较差, 0.3<|*r*|≤0.6 表示中度相关, 0.6<|*r*|≤0.8 表示有较高度相关性, |*r*|>0.8 表示相关性很高。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

50 只裸鼠移植瘤均建模成功。I 组裸鼠背部皮下可见小的点状凸起, II、III 组裸鼠背部实性小肿块约 5~10 mm, IV 组实性肿块最大径均 >10 mm; V 组部分裸鼠背部皮下的实性肿块周围略见少量出血点, 解剖后可见糜烂及出血。

2.1 CEUS 参数比较 二维超声观察, 实质性肿块周边及其内可见少许星点状血流信号; 注射普通及靶向造影剂后, 靶向 CEUS 充盈更迅速, 且在瘤体内停留时间更长, 瘤体内部及周边的强化更明显, 造影剂逐渐充满整个瘤体, 7~8 min 后造影剂逐渐消退至消失。同组裸鼠中, 与普通 CEUS 参数比较, 靶向 CEUS 的 PI 升高、TTP 减低 (P 均 < 0.05), 见表 1、图 1。

2.2 免疫组化结果 经常规免疫组化 SP 法染色后, 50 个移植瘤标本中均可发现不同程度黄染的 MMP-2, 在 I、II、III 组中 MMP-2 呈大小不等的颗粒样棕黄色, 且多集中于 VM, IV、V 组中 MMP-2 呈棕黄染的小团块状, 且多集中于新生血管及细胞外基质中, 见图 2。

2.3 相关性分析 I 组、IV 组及 V 组肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI、TTP 与 MMP-2 均无明显相关 ($PI: r = 0.38, -0.47, 0.17, P$ 均 > 0.05; $TTP: r = -0.74, 0.07, -0.44, P$ 均 > 0.05); II 组及 III 组肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI 与 MMP-2 呈高度正相关 ($r = 0.86, 0.76, P < 0.01, P = 0.02$), TTP 与 MMP-2 呈高度负相关 ($r = -0.84, -0.87, P = 0.01, P < 0.01$)。

表 1 5 组裸鼠普通和靶向 CEUS 的 PI 和 TTP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI(dB)	TTP(s)
I 组		
普通 CEUS	49.21±12.38	87.31±46.20
靶向 CEUS	71.08±13.78	46.41±22.64
t 值	-3.73	2.51
P 值	0.002	0.022
II 组		
普通 CEUS	39.71±12.86	46.40±14.59
靶向 CEUS	63.03±17.56	26.82±11.71
t 值	-3.38	3.30
P 值	0.003	0.004
III 组		
普通 CEUS	58.50±12.88	87.31±46.20
靶向 CEUS	71.36±7.93	46.40±22.63
t 值	-2.68	2.51
P 值	0.015	0.022
IV 组		
普通 CEUS	41.91±13.96	54.45±21.60
靶向 CEUS	58.30±13.10	36.37±10.80
t 值	-2.71	2.36
P 值	0.014	0.029
V 组		
普通 CEUS	57.86±9.74	60.39±16.73
靶向 CEUS	72.96±8.07	44.84±15.66
t 值	-3.77	2.14
P 值	0.001	0.046

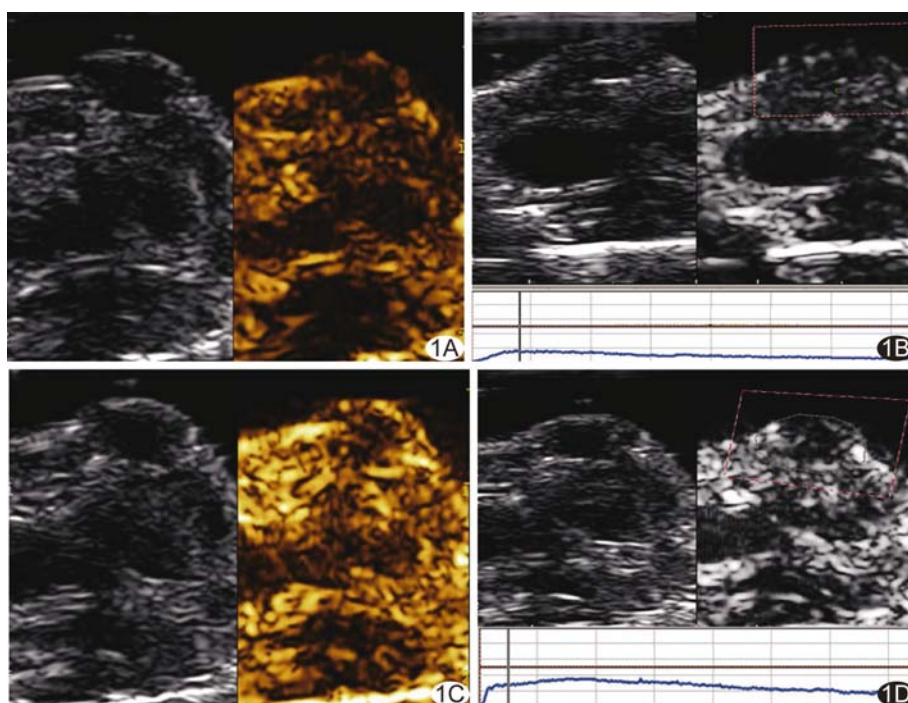


图 1 II 组裸鼠普通与靶向 CEUS 表现 A、B. 普通 CEUS 15 s 时瘤体呈低强化状态(A), TIC 显示 TTP 为 53.14 s, PI 为 19.10 dB(B); C、D. 靶向 CEUS 15 s 时瘤体呈高强化状态(C), TIC 显示 TTP 为 36.76 s, PI 为 32.40 dB(D)

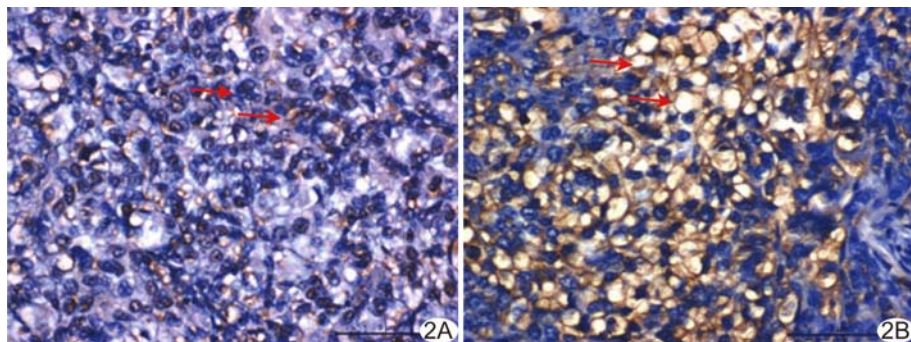


图 2 免疫组化染色病理图(SP, ×400) A. II 组, MMP-2 呈棕色分布于 VM(箭); B. V 组, MMP-2 呈大片棕色(箭)分布于细胞间质和胞浆

3 讨论

CEUS 是通过向外周静脉注入超声造影剂,使大量微泡造影剂悬浮于血液,由此实现实时动态地观察组织微血管灌注信息^[6]。本研究采用“生物素—亲和素”桥连接法,并以 SonoVue 为基础制备靶向超声造影剂,发现该造影剂可更特异性地显示病灶微血管灌注全过程,提高 CEUS 检查裸鼠移植瘤病灶的能力^[7-8]。本研究中,与普通 CEUS 比较,靶向 CEUS 的 PI 更高、TTP 更短。由于靶向造影剂靶点的抗原可与抗体一对一结合,使其停留在靶点的时间更长,故造影效果优于普通造影剂;另外,恶性肿瘤血管多走行迂曲,且通透性好,故注入造影剂后微泡在血管内流动加速,从而导致 PI 提前。

卵巢癌是妇科疾病中常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌,严重威胁妇女生命及健康^[9-10]。卵巢肿瘤的生长依赖于氧及其他营养物质,需通过新生血管来增加血液供应;且新生血管能表达大量特异性抗原,可进一步促进肿瘤组织生长。MMP-2 主要通过分解细胞外基质中的各种影响因子来阻止癌细胞进一步扩散,在肿瘤侵袭转移中起关键作用^[11-12]。赵小琪等^[13]发现,在卵巢癌早期微循环系统 VM 中,围绕 VM 管壁的肿瘤细胞分泌大量 MMP-2,以溶解 VM 结构中的细胞外基质成分,是卵巢癌早期 VM 产生及调控的关键因素,故 MMP-2 表达水平可作为判断卵巢癌病情及预后的重要参考指标。本研究以裸鼠卵巢癌移植瘤 MMP-2 为靶点,可使造影剂集聚于肿瘤组织内,有利于靶向 CEUS 显像;造影剂注入荷瘤鼠体内后,靶向造影剂可与卵巢癌 VM 中特异性表达的 MMP-2 靶点相互结合,真实显示肿瘤的灌注特点,故靶向 CEUS 技术可为早期、无创诊断卵巢癌提供可能^[14]。

既往研究^[15]表明,在接种 3~6 周后,移植瘤小鼠逐渐出现胸腹腔积液及恶病质,从而导致荷瘤鼠死亡。由于荷瘤鼠卵巢癌成瘤时间较长,为准确显示靶向 CEUS 参数与卵巢癌 MMP-2 的相关性,本研究根据移植时间建立 5 组 SKOV3 移植瘤模型,通过免疫组化检查发现 5 组移植瘤标本中均有 MMP-2 表达, I、II、III 组中 MMP-2 多集中于 VM 中表达, IV、V 组中 MMP-2

多集中于肿瘤的细胞外基质中而较少集中于 VM 内,提示 VM 在卵巢癌较早期产生特异性抗原,使卵巢癌致病力及侵袭力增高;而卵巢癌晚期由细胞外基质的新生血管产生抗原为卵巢癌提供营养,加速肿瘤生长。上述发现为治疗卵巢癌提供了新思路,即针对卵巢癌肿瘤不同生长时期可采用不同治疗方法。

本研究 I、IV、V 组中肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI、TTP 均与 MMP-2 无明显相关(PI: $r=0.38$ 、 -0.47 、 0.17 , P 均 >0.05 ; TTP: $r=-0.74$ 、 0.07 、 -0.44 , P 均 >0.05), 而 II 组及 III 组肿瘤组织靶向 CEUS 的 PI 均与 MMP-2 呈高度正相关($r=0.86$ 、 0.76 , $P<0.01$ 、 $P=0.02$), TTP 均与 MMP-2 呈高度负相关($r=-0.84$ 、 -0.87 , $P=0.01$ 、 $P<0.01$), 提示 VM 是卵巢癌早期血液灌注的重要影响因子,而卵巢癌晚期由肿瘤新生血管代替 VM 的供血循环,与上述病理结果一致。

本研究的主要局限性:仅按照移植时间进行分组,发现 II、III 组裸鼠卵巢癌靶向 CEUS 与 MMP-2 存在高度相关,这些结果是否可代表早期裸鼠卵巢癌靶向 CEUS 与 MMP-2 相关尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Anil KS, Mavis S, Fletcher MD, et al. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(4):899-909.
- [2] 苏敏, 黄华, 施公胜, 等. 卵巢癌血管生成拟态的临床意义及 HIF-1 α 、MMP-2 表达. *中国妇幼保健*, 2010, 25(33):4901-4905.
- [3] Brun JL, Cortez A, Lesieur B, et al. Expression of MMP-2, -7, -9, MT1-MMP and TIMP-1 and -2 has no prognostic relevance in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep*, 2012, 27(4):1049-1057.

- [4] 张颖,刘莹,符爱珍,等.CO₂气腹对人卵巢癌 SKOV3 细胞裸鼠移植瘤 CXCL12/CXCR4 表达的影响.中国肿瘤临床,2013,40(20):1217-1220.
- [5] 杨钦涵,刘慧,向红.靶向超声造影剂对卵巢癌新生血管的评价.中国超声医学杂志,2014,30(4):368-371.
- [6] 宋梅,徐栋.超声造影在卵巢恶性肿瘤诊断中的应用进展.中华医学超声杂志(电子版),2015,12(12):920-922.
- [7] 梁博,谢阳桂.超声造影在妇科疾病中的应用及进展.南通大学学报,2012,32(2):138-142.
- [8] 郑磊,田新桥.超声造影剂在心脏疾病诊治中的应用进展.中华临床医师杂志(电子版),2013,7(18):8408-8411.
- [9] Si J, Su Y, Wang Y, et al. Expressions of lysophosphatidic acid receptors in the development of human ovarian carcinoma. Int J Clin Exp Med, 2015,8(10):17880-17890.
- [10] 马丹宇,张维维,刘国炳,等.卵巢癌患者肿瘤浸润淋巴细胞的抗肿瘤活性观察.山东医药,2015,55(30):11-13.
- [11] Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, et al. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 2013,430(4):1319-1321.
- [12] Gao J, Ding F, Liu Q, et al. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9. Mol Cell Biochem, 2013,376(1/2):21-32.
- [13] 赵小琪,刘慧,向红.卵巢癌超声造影与血管生成拟态及 MVD 的相关性.中国医学影像技术,2014,30(12):1792-1796.
- [14] 陈智毅,谢明星.超声靶向破坏微泡技术的应用进展.中国医学影像技术,2010,26(9):1790-1792.
- [15] Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: Inhibition of ascites formation by immunoneutralization. Am J Pathol, 1998, 153 (4): 1249-1256.

《中国介入影像与治疗学》杂志 2018 年征订启事

《中国介入影像与治疗学》杂志创刊于 2004 年,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,主编为邹英华教授。刊号:ISSN 1672-8475, CN 11-5213/R。曾获中国精品科技期刊,现为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、WHO《西太平洋区医学索引》(WPRIM)来源期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊。

《中国介入影像与治疗学》杂志以报道介入影像与治疗学、介入超声学、介入材料学、药物学与护理学等方面的临床研究、基础研究以及医、理、工结合的成果与新进展为主,是介入影像、介入治疗专业人员学习、交流的平台。

《中国介入影像与治疗学》为月刊,64 页,大 16 开本,彩色印刷。单价:16 元,全年定价 192 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号:80-220;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话:010-82547903 传真:010-82547903

E-mail:cjiit@mail.ioa.ac.cn 网址:www.cjiit.com

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室 邮编:100190

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社 账号:110907929010201

开户行:招商银行北京分行清华园支行 联系人:田苗

