

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.002

循环游离 Shope 病毒 DNA 含量与兔 VX2 肿瘤 18F-FDG PET/CT 影像表现的相关性分析 *

车莉萍¹ 程 超² 张桢瑜² 冯 菲² 崔 斌² 孙高峰² 张 建² 左长京^{2△}

(1 上海交通大学附属新华医院肿瘤科 上海 200025; 2 第二军医大学附属上海长海医院核医学科 上海 200020)

摘要 目的:探讨循环血中 Shope 病毒 DNA 含量与兔 VX2 肿瘤 18F-FDG PET/CT 影像学特征间的关系及其临床意义。**方法:**采用组织块接种法建立兔 VX2 肿瘤模型,并行 ¹⁸F-FDG PET-CT 观测肿瘤大小及糖代谢相关值,实时定量荧光探针 PCR 法检测肿瘤组织及血浆中 Shope 病毒特征性 DNA 片段含量。**结果:**移植前外周血中未检测出 Shope 病毒特异性 DNA 片段;移植后 2 周, VX2 肿瘤组织和循环血中均可以检测到特征性 Shope 病毒 DNA 片段。瘤体内 DNA 含量明显高于循环血中含量。循环血 Shope 病毒 DNA 含量与 FDG-PET 的最大标准摄取值(SUVmax)明显呈正相关($r=0.943, p=0.005$),但与肿瘤体积相关性尚不明确($r=0.657, p=0.156$)。**结论:**循环血 Shope 病毒 DNA 有望作为一种潜在的 VX2 肿瘤标志物,其廉价、无创的特性,有望在肿瘤的早期诊断和预后随访中发挥优势。

关键词: VX2 肿瘤; 循环游离 DNA; 氟[18F]-脱氧葡萄糖; 正电子发射计算机断层; 标准摄取值

中图分类号: Q95-3; R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)15-2808-04

The Correlation between Cell-Free Shope Virus DNA Circulating in Plasma and ¹⁸F-FDG PET/CT Imaging in VX2 Tumor-Bearing Rabbits*

CHE Li-ping¹, CHENG Chao², ZHANG An-yu², FENG Fei², CUI Bin², SUN Gao-feng², ZHANG Jian², ZUO Chang-jing^{2△}

(1 Oncology Department, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Nuclear Medicine Department, Chang hai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai, 200020, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between 18F-FDG PET/CT imaging characteristics and circulating cell-free Shope virus DNA copies, and to explore its clinical values. **Methods:** The VX2 tumor models in rabbit were established by transplanting VX2 tumor mass into leg muscles, and the Shope virus DNA in tumor tissues and plasma was quantified by a quantitative real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method. **Results:** Before tumor transplantation, no viral DNA was detected in peripheral blood; 14 days after transplantation circulating Shope virus specific DNA fragments could be detected. Concentration of Shope virus DNA in tumor tissue (mean $(4.9 \pm 1.9) \times 10^6$ copies/L) was significantly higher than that in the plasma (mean $(1.3 \pm 0.9) \times 10^3$ copies/L). There is a positive association between circulating Shope DNA level and ¹⁸F-FDG-PET/CT maximum standard uptake value, but no significant association was observed between plasma Shope virus DNA level and VX2 tumor size. **Conclusion:** Cell-free Shope viral DNA in circulating plasma may be a tumor-marker of VX2 tumor animal model for cancer research, and circulating cell free tumor specific DNA may be proposed as a novel and early detectable bio-marker as well as an inexpensive and noninvasive assay for cancer management.

Key words: VX2 tumor; ccfDNA (circulating cell free DNA); 18F-FDG; PET (Positron Emission Tomography); SUV (Standard Uptake Value)

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R73-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)15-2808-04

前言

肿瘤的诊断和疗效评价,除影像手段之外,尚有多种特异性血清肿瘤标志物。目前有关肿瘤外周血循环游离核酸标志物的研究已经成为肿瘤学研究的一个热点^[12]。研究报道,鼻咽癌等与 EB 病毒、HPV 病毒相关的头颈部肿瘤,血液中 EB 病毒和 HPV 病毒的特征性 DNA 水平变化可用于疗效判断^[3,4]。兔

VX2 肿瘤是 Shope 病毒在兔皮肤上诱发而产生的鳞癌细胞株,可接种在兔的肝脏、肺、骨骼、肌肉等处,是使用最为广泛的大型哺乳动物肿瘤模型,目前研究 VX2 肿瘤多使用影像方法^[5-8],尚无一种肿瘤标志物可以用于观察 VX2 肿瘤^[9-11]。因此,我们根据已知的 Shope 病毒基因库设计 Shope 病毒特征性 DNA 探针,测定 VX2 肿瘤组织块及循环血中 Shope 病毒 DNA 含量,并比较其与兔 VX2 肿瘤 ¹⁸F-FDG PET/CT 影像表现的关系,探

* 基金项目:上海市卫计委“新百人计划”基金(XBR2011040);上海市博士后科学基金(11R21410600);上海市人才发展资金(2010020);

长海医院“1255”学科建设基金(CH125521103)

作者简介:车莉萍,(1978-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:肿瘤放疗,电话:021-31162238

△通讯作者:左长京,主任,教授,研究方向:PET/CT 诊断、CT 引导下的介入治疗

(收稿日期:2014-01-05 接受日期:2014-01-30)

讨论循环游离 DNA 对 VX2 肿瘤的诊断及生物学评价的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物与麻醉方法

纯种新西兰大白兔 6 只,雌雄不限,体质量 2-3 kg,4-5 月龄,由第二军医大学实验动物中心提供。3%戊巴比妥(1 ml/kg)耳缘静脉注射麻醉,麻醉满意后仰卧固定,剃除右侧后腿近端外侧体毛。

1.2 肿瘤细胞来源及模型兔的制作

VX2 瘤细胞株荷瘤兔由本院放射科介入中心提供。麻醉满意后,仰卧位固定,肿瘤部位皮肤常规剃毛、消毒,铺无菌洞巾,切开皮肤,剥离肿瘤,生理盐水清洗并剔除坏死组织及纤维结缔组织,将鱼肉状肿瘤组织剪为 $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ 大小组织块,加入适量生理盐水备用。取 6 只健康新西兰大白兔麻醉满意后,采用切口瘤块包埋种植法建模。取兔右侧大腿股外侧肌处作一长约 1 cm 切口,依次切开皮肤、皮下组织、筋膜,暴露股外侧肌,用眼科镊在股外侧肌穿一小洞,将一瘤块植入其中,逐层缝合关闭切口。模型兔制作完成。

1.3 ^{18}F -FDG PET/CT 显像

VX2 肿瘤移植后 14 天,采用西门子 Biograph 64 型 PET-CT 仪行 ^{18}F -FDG PET/CT 成像。 ^{18}F -FDG 由上海原子科兴药业有限公司提供,放化纯度 $>95\%$ 。3%戊巴比妥静脉给药(1 ml/Kg)麻醉满意后,耳缘静脉注射 ^{18}F -FDG(28MBq/kg),注射后 60 分钟后,3D 模式采集,每个床位 3 分钟,采集部位由双下肢至盆腔,TureX 重建图像。

1.4 PET-CT 图像后期处理

将所有数据以 DICOM 的形式传入 MEDEX 报告系统,选定已知肿瘤病灶,利用感兴趣区(region of interest, ROI)技术,得到最大标准化摄取值(SUVmax)。肿瘤体积(GTV)按如下公式计算: $\text{GTV} = d1 \times d2 \times d3 \times \pi/6$,d1 为在肿瘤最大层面的 CT 图像上测量最大截面的长径,d2 为肿瘤垂直于 d1 的最长径,d3 为肿瘤高度^[9](图 1)。

1.5 肿瘤组织及血液标本处理



图 1 VX2 荷瘤种兔 ^{18}F FDG PET-CT 显像图

Fig.1 ^{18}F FDG PET-CT imaging in VX2 tumor-bearing rabbit

PET 扫描结束后,心脏采血,低温离心($2000 \times g$, 5 分钟)后留取血浆^[9], -80°C 冻存用于 DNA 精制;手术方式收集肿瘤组织块,分为两份,一份 10%福尔马林保存用于病理分析,另一份液氮冻存用于 DNA 精制。

1.6 病理标本处理

采用 HE 染色和免疫组化 EnVision 法检测 Ki67 在肿瘤组织中的表达情况,一抗购自上海长岛公司,用 Lecai Bond X 机器染色。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 肿瘤及血浆中 shope 病毒定量检测

血浆及肿瘤组织 DNA 按照 Pure Link Genomic DNA Mini Kit 操作手册进行,采用 ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 仪进行定量分析。绝对定量 PCR 法,将扩增的目的片段做 TA 克隆,载体为 pMD18-T 载体,感受态细胞株为 DH5 α 。Shope 病毒特征性 DNA 片段上游引物: 5'-TCAGCTTCGCTCTGCGTCTGT-3'; 下游引物: 3'-GCGGATAGCAGTCGATTCAAG-5'; 荧光探针: 5'-FAM-CTCCAGAAGCCATAAGA-MGB-3'^[12-14],标准品 PCR 增幅曲线如图 2。

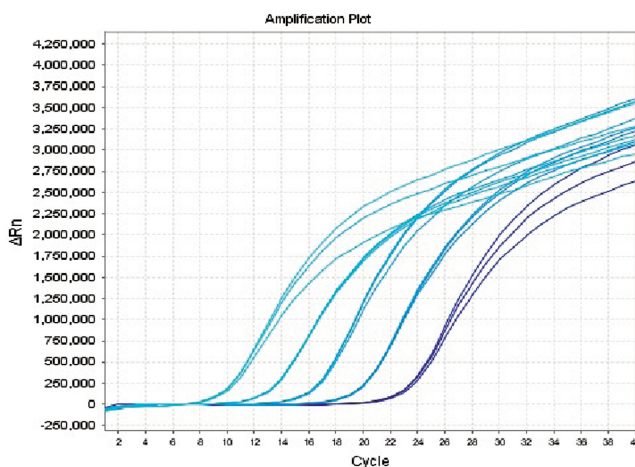


图 2 标准质粒 PCR 绝对定量曲线

Fig.2 Plasmid PCR absolute quantification standard curve

1.8 统计学方法

所有资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,肿瘤组织及循环 DNA 含量差别采用 t 检验;DNA 含量与 PET-CT 特征指标间关系采用 spearman 相关分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VX2 种植瘤特点

组织块种植易于成活,6 只实验动物,种植成瘤率达 100%。成瘤速度快,7d 可触及肿块存在,14 d 时生长最旺盛,测量最大直径平均为 $(1.5 \pm 0.4) \text{ cm}$ 。肉眼观瘤体呈实质性、鱼肉状,剖面未见坏死组织。病理 HE 染色(400 倍)可见肿瘤体积较大,形态欠规则,排列紧密,核大且浓染,核仁明显;免疫组化 Ki67(400 倍)可见肿瘤细胞染色明显,增值活跃(图 3)。

2.2 成瘤后外周血及瘤体中病毒 DNA 表达情况

移植前,血液中未见肿瘤病毒基因检出;移植后 14 天肿瘤组织内 shope DNA 含量为 $(4.9 \pm 1.9) \times 10^6 \text{ Copies/L}$,血液游离 shope DNA 含量为 $(1.3 \pm 0.9) \times 10^3 \text{ Copies/L}$,移植前后血液中病毒 DNA 浓度存在明显差异,有统计学价值,详见表 1。血液内病毒基因含量与肿瘤组织病毒表达量正相关,差异有统计学价值($r=0.943$, $p=0.005$)(图 4)。

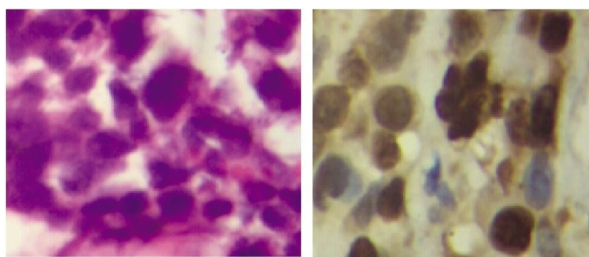


图3 左侧为 HE 染色($\times 400$ 倍),右侧为免疫组化 Ki67($\times 400$ 倍)

Fig.3 Left: HE staining ($\times 400$); Right: IHC for Ki67 ($\times 400$)

表 1 肿瘤组织移植前后循环血和肿瘤组织内 Shope 病毒表达情况

Table 1 Shope DNA expression level in blood and tumor tissue before and after transplantation

	DNA level before tumor transplantation (copies/L)	DNA 14 days after tumor transplantation (copies/L)
Blood	(-)	$(1.3 \pm 0.9) \times 10^3$
Tumor	(-)	$(4.9 \pm 1.9) \times 10^6$
T-TEST		6.60
P		0.001

Note:T-TEST, $P < 0.05$

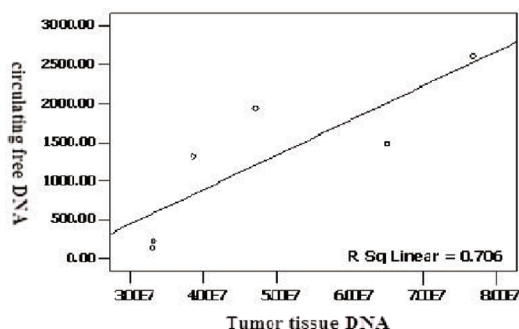


图4 肿瘤组织 shope 病毒 DNA 与循环血 DNA 相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between tumor shope DNA and circulating DNA

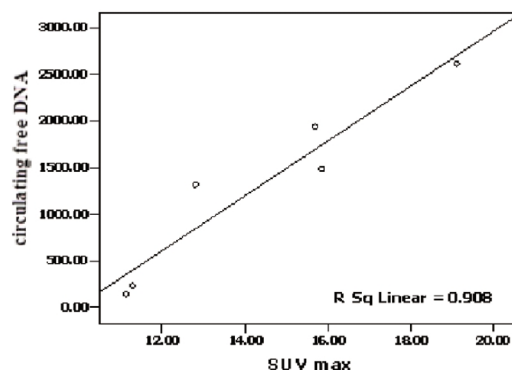


图5 ^{18}F -FDG-PET 的 SUVmax 值与循环血 shope 病毒 DNA 相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between SUVmax value and circulating shope DNA

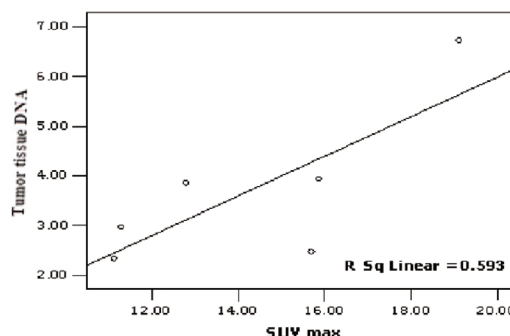


图6 ^{18}F -FDG-PET 的 SUVmax 值与肿瘤体积的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between ^{18}F -FDG-PET SUVmax value and tumor size

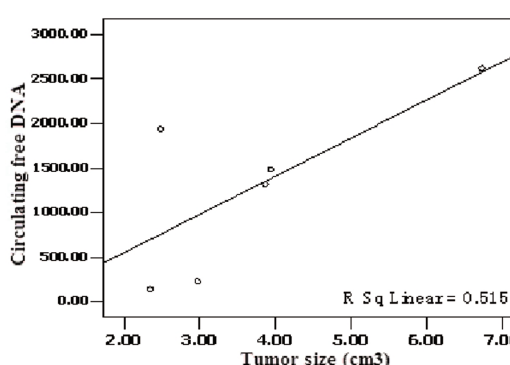


图7 肿瘤体积 GTV 与循环血 shope 病毒 DNA 相关性分析

Fig.7 Correlation analysis between circulating shope DNA and tumor size (GTV)

3 讨论

Mandel 和 Metais 于 1947 年首次发现血浆中存在游离形式的循环核酸,即 cell-free DNA^[4,15,16]。循环 DNA 是一种无细胞状态的胞外 DNA,存在于血液(血清或血浆)、滑膜液和脑脊液等体液中,其主要由单链或双链 DNA 以及单链与双链 DNA

2.3 兔 VX2 肿瘤 ^{18}F -FDG PET/CT 参数与 shope 病毒 DNA 含量的相关性

循环血 cell-free shope 病毒 DNA 含量与 FDG-PET 的 SUVmax 值呈明显正相关关系 ($r=0.943$, $p=0.005$)(图 5);PET 显像肿瘤体积大小与 FDG-PET 的 SUVmax 值呈明显正相关关系($r=0.829$, $p=0.042$)(图 6);但 shope 病毒特异性 ccfDNA 与肿瘤体积相关性尚不明确($r=0.657$, $p=0.156$)(图 7)。

的混合物组成,以 DNA- 蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在。1977 年,人们开始将血浆中游离形式的 DNA 用于肿瘤及癌症的诊断研究。Leon 等用放免法发现肿瘤患者血清 DNA 水平达(180 ± 38) ng/ml 远高于正常人(13 ± 3) ng/ml^[9]。Xue Hou 等发现在鼻咽癌患者血浆中发现肿瘤来源的 EB 病毒相关性 mRNA^[6]。本研究也发现移植前,血液中未见肿瘤病毒基因检

出;移植后 14 天肿瘤组织内 shope DNA 含量为 $(4.9 \pm 1.9) \times 10^6$ copies/L,血液游离 shope DNA 含量为 $(1.3 \pm 0.9) \times 10^3$ copies/L,移植前后血液中病毒 DNA 浓度存在明显差异。血液浓度与肿瘤内的病毒含量呈正相关。这提示我们循环血游离形式 DNA 确实可能与肿瘤的发生发展有一定的关系。

正电子发射计算机断层(简称 PET)是目前最有前途的显像诊断技术之一,尤其是目前的 PET/CT 不仅能从形态学评价肿瘤的准确位置、大小及形态,而且能够监测肿瘤组织的代谢活性^[17]。通过无创性探测正电子放射性药物在机体内分布状况,从而反映肿瘤组织细胞的活性。Seok JW 等用 FDG-PET/CT 监测乳腺癌化疗后的反应,观察可疑小病灶的反应,发现,FDG-PET/CT 可以预测乳腺癌化疗后长期疗效及腋淋巴结转移情况^[8]。然而,PET/CT 价格昂贵,从一定程度上,限制了临床的广泛应用。本课题通过对兔 VX2 移植瘤 ¹⁸F-FDG PET/CT 显像研究,并将循环血 DNA 含量与 PET/CT 融合图像同步对比发现:循环血 shope 病毒 DNA 含量与肿瘤体积无明显相关关系($r=0.657, p=0.156$),但其与 FDG-PET 的 SUVmax 值呈明显正相关关系($r=0.943, p=0.005$);肿瘤体积大小与 FDG-PET 的 SUVmax 值呈明显正相关关系($r=0.829, p=0.042$)。肿瘤代谢越活跃,SUV 值越高,其释放到循环血的 cell-free DNA 就越多^[18]。可见循环血中肿瘤特征性 DNA 量可以作为肿瘤标志物对肿瘤性疾病进行诊断和疗效判断。相对 PET-CT 是一种价廉物美的检查方法。

此外,本研究采用组织块包埋法建立兔 VX2 肿瘤移植模型,我们发现该方法不但操作简单,而且成瘤率高,肿瘤局限,转移发生较晚。避免了细胞悬液注射法时,因注射局部压力较高,促使肿瘤细胞沿组织间隙扩散,同时注射的针道也利于肿瘤细胞的扩散,肿瘤呈播散性生长,形状不规则,容易发生多器官的转移。这与苏静等的报道一致^[3]。VX2 鳞癌在瘤体的中央较早出现坏死为了避免移植瘤坏死对结果产生影响,我根据文献资料,选取肿瘤移植后 2 周,进行观察。病理证实 2 周时所有肿瘤组织均未出现坏死病灶^[19]。

诚然,循环血中 DNA 做为肿瘤标志物尚存其他技术问题,比如溶血的影响;缺乏通用型的肿瘤分子探针,无法直接测定血浆中的 DNA 含量等技术问题尚待改进。但是我们研究证实循环血 DNA 从某种程度上讲检查对肿瘤的发生有一定的预测价值,可以作为高危人群防癌初筛检测指标之一。这样避免了不必要的价格昂贵的 PET-CT 检查,更好地节约了医疗资源。

鸣谢:长海医院杨继金教授和魏强医生在 VX2 肿瘤动物模型建立方面的指导,以及英潍捷基公司路峰先生在 PCR 实验方面的协助。

参考文献(References)

- [1] V.V. Vlassov, P.P. Laktionov, E.Y. Rykova. Circulating Nucleic Acids as a Potential Source for Cancer Biomarkers [J]. Current Molecular Medicine, 2010, 10(2): 142-165
- [2] Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey[J]. Biochim Biophys Acta, 2007,1775(1): 181-232
- [3] Handal JA, Schulz JF, Florez GB. Creation of rabbit bone and soft tissue tumor using cultured VX2 cells [J]. J Surg Res, 2013, 179(1): e127-132
- [4] Wright KC, Ravoori MK, Dixon KA, et al. Perfusion CT assessment of tissue hemodynamics following hepatic arterial infusion of increasing doses of angiotensin II in a rabbit liver tumor model [J]. Radiology, 2011, 260(3): 718-26
- [5] Marco Agostini, Salvatore Pucciarelli, Maria Vittoria Enzo, et al. Circulating Cell-Free DNA: A Promising Marker of Pathologic Tumor Response in Rectal Cancer Patients Receiving Preoperative Chemoradiotherapy[J]. Ann Surg Oncol, 2011,18: 2461-2468
- [6] Xue Hou, Chong Zhaoy, Ying Guoz, et al. Different Clinical Significance of Pre- and Post-treatment Plasma Epstein Barr Virus DNA Load in Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Radiotherapy [J]. Clinical Oncology, 2011, 23(2): 128-133
- [7] Lv Y, Zheng H, Wang Q, et al. Value of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis of laryngeal carcinoma [J]. Journal of Southern Medical University, 2012, 32(10): 1486-1490
- [8] Seok JW, Kim Y, An YS, et al. The clinical value of tumor FDG uptake for predicting axillary lymph node metastasis in breast cancer with clinically negative axillary lymph nodes [J]. Ann Nucl Med, 2013, 27(6): 546-553
- [9] Giri I, Danos O, Yaniv M. Genomic structure of the cottontail rabbit (Shope) papillomavirus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(6): 1580-1584
- [10] Murat D, Quinlan A, Valli H, et al. Comprehensive genetic dissection of the shope gene island reveals the step wise assembly of a prokaryotic organelle [J]. Proc Acad Sci USA, 2010, 107 (12): 5593-5598
- [11] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650
- [12] Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 1,60(9):2351-2355
- [13] To EW, Chan KC, Leung SF, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 15,9(9): 3254-3259
- [14] Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(8): 472-484
- [15] Tang LQ, Chen QY, Fan W, et al. Prospective study of tailoring whole-body dual-modality[18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography with plasma Epstein-Barr virus DNA for detecting distant metastasis in endemic nasopharyngeal carcinoma at initial staging[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(23): 2861-2869
- [16] Kwee S, Song MA, Cheng I, et al. Measurement of circulating cell-free DNA in relation to 18F-fluorocholine PET/CT imaging in chemotherapy-treated advanced prostate cancer [J]. Clin Transl Sci, 2012, 5(1): 65-70
- [17] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. Cell, 2008, 134(5): 703-707
- [18] Sai S, Ichikawa D, Tomita H, et al. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27: 2747-2751
- [19] Lilleberg SL, Durocher J, Sanders C. High sensitivity scanning of colorectal tumors and matched plasma DNA for mutations in APC, TP53, K-RAS, and BRAF genes with a novel DHPLC fluorescence detection platform[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1022: 250-256