

肝脏泡球蚴病 CT 灌注成像与微血管密度及血管内皮生长因子的相关性分析

王静 任波 刘文亚 温浩 卿松 谢卫东 孙亚菁 王海涛

【摘要】 目的 分析肝脏泡球蚴病 CT 灌注成像与微血管密度(MVD)和血管内皮生长因子(VEGF)的相关性,评价 CT 灌注技术在显示肝泡球蚴血管生成方面的价值。方法 回顾性分析 27 例肝脏泡球蚴病患者的螺旋 CT 灌注检查资料,绘制病灶边缘 ROI 的时间密度曲线(TDC),并测定灌注参数包括血流量(BF)、血容量(BV)、平均通过时间(MTT)和表面通透性(PS)。通过病理免疫组织化学方法测定病灶边缘区域 MVD 计数和 VEGF 的表达,对不同类型 TDC 的灌注参数、MVD 和 VEGF 比较采用 *t* 检验,采用 Spearman 法分析不同类型 TDC 各 CT 灌注参数与 MVD 和 VEGF 表达的相关性。结果 21 例为 I 型 TDC,6 例为 II 型 TDC,两型 TDC 的 BF 分别为 (111.7 ± 27.6) 和 (158.9 ± 39.5) $\text{ml} \cdot 100 \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,BV 分别为 (15.1 ± 6.2) 和 (26.8 ± 8.4) $\text{ml}/100 \text{g}$,MTT 分别为 (7.0 ± 4.4) 和 (7.7 ± 3.1) s,PS 分别为 (51.7 ± 17.3) 和 (51.0 ± 20.5) $\text{ml} \cdot 100 \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,两型 TDC 之间 BF、BV 差异有统计学意义(*t* 值分别为 -7.897 和 -18.783 ,*P* 值均 <0.05),MTT 及 PS 差异无统计学意义(*t* 值分别为 1.311 和 0.182 ,*P* 值均 >0.05);两型之间 MVD 计数分别为 (20.5 ± 5.4) 和 (37.2 ± 7.5) 个/高倍视野,差异有统计学意义($t = -5.223$,*P* <0.05),而 VEGF 计分分别为 (2.1 ± 1.0) 和 (3.2 ± 1.0) 分,差异无统计学意义($t = -1.707$,*P* >0.05)。MVD 与 II 型 TDC 的 BF、BV 有相关性(*r* 值分别为 0.789 和 0.878 ,*P* 值均 <0.05),与 MTT、PS 间无相关性(*P* 值均 >0.05);MVD 与 I 型 TDC 各参数之间,以及 VEGF 与两型 TDC 各灌注参数之间均无相关性(*P* 值均 >0.05)。结论 CT 灌注成像不同 TDC 在一定程度上反映了病灶边缘不同的血管生成状态,有望为泡球蚴病灶边缘的血管化研究提供一种新的方法。

【关键词】 棘球蚴病,肝; 体层摄影术,X 线计算机; 对比研究

The correlation of CT perfusion imaging with microvessel density and vascular endothelial growth factor in hepatic alveolar echinococcosis WANG Jing*, REN Bo, LIU Wen-ya, WEN Hao, QING Song, XIE Wei-dong, SUN Ya-jing, WANG Hai-tao. *Imaging Center, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: LIU Wen-ya, Email:wenyalu2002@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the correlation of CT perfusion imaging with microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatic alveolar echinococcosis (HAE). **Methods** Multi-slice spiral CT perfusion imaging was performed in 27 patients with HAE. Time-density curves(TDC) of the HAE peripheral area was drawn from the region of interest (ROI) with perfusion functional software. CT perfusion parameters including blood flow (BF), blood volume (BV), mean transit time(MTT) and permeability surface area product (PS) were calculated. MVD and VEGF expression of pathological specimens were examined by immunohistochemical staining with anti-CD34, anti-VEGF monoclonal antibody. The CT perfusion parameters, MVD and VEGF were compared in different types of TDC with *t* test. The correlation of CT perfusion parameters with MVD and VEGF were analyzed with Spearman test. **Results** In this group, 21 cases which TDC lower than that of the liver were classified as type I, the others 6 cases TDC higher than the liver were of type II TDC. TDC perfusion parameters of the two types were as follows, BF: (111.7 ± 27.6) , (158.9 ± 39.5) $\text{ml} \cdot 100 \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, BV: (15.1 ± 6.2) , (26.8 ± 8.4) $\text{ml}/100 \text{g}$, MTT: (7.0 ± 4.4) , (7.7 ± 3.1) s, PS: (51.7 ± 17.3) , (51.0 ± 20.5) $\text{ml} \cdot$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2011.11.010

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960100)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院影像中心(王静、任波、刘文亚、谢卫东、孙亚菁、王海涛),病理科(卿松);新疆包虫病研究所(温浩)

通信作者:刘文亚,Email:wenyalu2002@yahoo.com.cn

$100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. The significant differences of BF, BV and MVD [(20.5 ± 5.4)/HP, (37.2 ± 7.5)/HP, respectively] were found between two types ($t = -7.897, -18.783, -5.223, P < 0.05$, respectively). There were no significant differences in MTT, PS and VEGF expression (2.1 ± 1.0, 3.2 ± 1.0, respectively) between two types of TDC ($P > 0.05$). The correlation was found between the MVD and BF and BV in the type II TDC group ($r = 0.789$ and 0.878 , respectively) and no correlation was found between MVD and each CT perfusion parameters in the type I TDC group ($P > 0.05$). There was no correlation between the VEGF expression and CT perfusion parameters in two types of TDC ($P > 0.05$). **Conclusion** CT perfusion imaging with different type of TDC reflected different situation of angiogenesis in HAE peripheral area, which could be a potential technique to illustrate the microcirculation of this disease.

【Key words】 Echinococcosis, hepatic; Tomography, X-ray computed; Comparative study

肝泡球蚴病 (hepatic alveolar echinococcosis, HAE) 系多房棘球绦虫幼虫感染人体引起的少见寄生虫病, 呈类似恶性肿瘤样浸润生长并可经血液和淋巴组织向远处转移。常规影像方法包括超声、CT 及 MRI, 对于疾病诊断有重要价值, 但均不能较好地评价病灶的生物学活性状态^[1]。研究发现¹⁸F-脱氧葡萄糖 PET 能够直接显示泡球蚴病灶的活性区域, 其血供丰富的区域生物学活性增强, 在 PET 图像上表现为相应的高代谢区域^[2-3]。但 PET 设备昂贵, 不易普及。笔者拟通过 CT 灌注成像与微血管密度 (microvessel density, MVD) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的相关性分析, 来评价该技术在显示肝泡球蚴血管生成方面的价值。

资料与方法

一、病例资料

回顾性分析新疆医科大学第一附属医院 2006 年 12 月至 2010 年 10 月就诊的肝脏泡球蚴患者 27 例, 其中男 15 例、女 12 例, 年龄 18 ~ 73 岁, 平均 43 岁。CT 扫描及手术前未行任何针对肝脏泡球蚴病的治疗。CT 检查结果显示, 23 例为单发病灶, 4 例肝内可见 2 个病灶, 共检出病灶 31 个; 病灶直径 2.5 ~ 18.3 cm。CT 灌注扫描后 1.0 ~ 5.0 d (平均 2.8 d) 行手术切除, 其中 2 例行肝移植, 15 例行病灶切除根治术或肝叶切除术, 10 例行部分病灶姑息切除术, 病理均证实为肝脏泡球蚴病。

二、CT 灌注扫描与观察指标

1. CT 灌注扫描: 采用美国 GE Lightspeed Ultra 型 64 层螺旋 CT 机。首先训练患者胸式浅呼吸, 尽量降低膈肌及腹部呼吸幅度, 在常规全肝平扫后, 选择病变近肝门的 8 个层面作为靶层面, 用 Ulrich 型高压注射器经前臂静脉一次性快速团注对比剂碘海醇 (300 mg I/ml) 40 ~ 50 ml, 流率为 4.0 ~ 4.5 ml/s, 预留时间 8 s, 以电影模式连续无间断扫描 55 s, 层厚 5 mm, 管电压 120 kV, 管电流 200 mA,

产生 872 幅图像, 将图像传输到 AW 4.2 工作站。

2. 图像及数据处理: 应用 GE CT Perfusion 4 肝肿瘤灌注 (liver tumor perfusion) 协议处理软件包, 选择 1 组病灶层面大、门静脉及其分支显影清晰、无呼吸运动影响的图像进行分析。首先确定阈值, 然后以手动模式定义腹主动脉和门静脉或其分支内的 ROI。接着设定肝脏泡球蚴病灶边缘区域及正常肝组织的 ROI, 要避免肉眼可辨的血管影、坏死囊变区及钙化区。经过计算同时可获得靶动脉、静脉、病灶及周围正常肝组织的时间-密度曲线 (TDC) 及以下灌注参数数值及灌注图: 血流量 (blood flow, BF)、血容量 (blood volume, BV)、平均通过时间 (mean transit time, MTT)、表面通透性 (permeability surface area product, PS)。记录各灌注参数时, 在肝脏泡球蚴病灶边缘及周围肝脏实质内各选取 3 个 ROI, 取其均值。按泡球蚴病灶边缘 TDC 走行形态分为 I 型和 II 型 TDC, I 型 TDC 位于肝实质曲线之下, II 型 TDC 位于肝实质曲线之上。

三、病理标本制备及免疫组织化学 (简称免疫组化) 测定

手术切除标本时, 作记号标明标本的前后, 标本进行病理取材时, 按 CT 扫描时的位置摆放, 病理取材病灶边缘区域尽量与 CT 图像后处理所测 ROI 一致, 每例均取材 3 处, 包括 2 处边缘区域及一个正常肝组织区域, 制成蜡块备用。资料收集完成后由病理科专职人员切片行 HE 染色及免疫组化染色。试剂包括: 超敏试剂盒 (SP)、广谱试剂盒及鼠抗人 CD34、VEGF 单克隆抗体。所有试剂均购自北京中山生物技术有限公司。

MVD 按照 Weidner^[4] 的判断标准: 任何被染成棕黄色的内皮细胞团, 只要与邻近微血管或其他结缔组织分开, 就当成 1 个微血管, 血管内径 > 容纳 8 个红细胞及有肌层的血管不包括在内。先在低倍镜 (×40) 下寻找 3 个高血管密度区, 即“热点”, 换为高倍镜 (×200), 再观察 3 个视野并进行计数, 取其平均值作为 MVD。VEGF 按照 Volm 等^[5] 的判断标准:

以细胞质或细胞膜呈棕黄色者为 VEGF 阳性细胞,进行以下评分:(1)染色百分比评分,0 分为无 VEGF 阳性细胞;1 分:VEGF 阳性细胞 $\leq 25\%$;2 分:VEGF 阳性细胞为 $26\% \sim 50\%$;3 分:VEGF 阳性细胞 $> 50\%$;(2)染色强弱评分:0 分:阴性;1 分:弱阳性;2 分:中阳性;3 分:强阳性。取染色百分比评分和染色强弱评分之和的均值作为 VEGF 的得分。0 ~ 2 分为阴性,3 ~ 4 分为弱阳性,5 ~ 6 分为强阳性。

四、统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包处理数据。I 型和 II 型 TDC 间各灌注参数及免疫组化指标的比较采用 *t* 检验,各灌注参数与免疫组化指标之间的相关性分析采用 Spearman 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、泡球蚴病灶边缘 TDC 走行特点

泡球蚴病灶边缘 TDC 走行为缓升型, I 型 TDC 为 21 例(图 1,2), II 型 TDC 为 6 例(图 3,4)。

二、MVD 和 VEGF 检测结果

HE 染色显示泡球蚴病灶区域大片凝固性坏死,边缘见纤维组织增生,周围大量炎细胞浸润,周围肝组织细胞内可见多少不等脂肪空泡(图 5)。MVD 免疫组化染色显示,泡球蚴病灶边缘区域内可

见数目不等的微血管染色,呈棕褐色不规则扁圆形、索条状或圆形,多数微血管具有一定的管腔形态(图 6,7)。周围肝组织仅汇管区可见微血管染色,其余肝细胞区域未见微血管显示。VEGF 染色显示,肝脏泡球蚴病灶边缘区域 VEGF 不表达或表达很少。病变周围肝组织细胞胞质被染成棕黄色,呈现出 VEGF 阳性表达征象,分布稍欠均匀(图 8)。

I 型 TDC 灌注参数中的 BF、BV 值低于 II 型, MVD 计数也少于 II 型,差异均有统计学意义, I 型和 II 型 TDC 之间 MTT、PS 及 VEGF 计分差异无统计学意义(表 1)。Spearman 相关性分析显示, II 型 TDC 的 MVD 计数与 BF、BV 的 *r* 值分别为 0.789 和 0.878, P 值均 < 0.05 , 与 MTT、PS 的 *r* 值分别为 0.151 和 -0.561 , P 值均 > 0.05 ; I 型 TDC 的 MVD 与 TDC 各参数之间的 *r* 值分别为 0.412、0.397、0.313 和 0.075, P 值均 > 0.05 ; VEGF 计分与两型各灌注参数之间均无相关性, P 值均 > 0.05 。

讨 论

CT 灌注成像是反映器官及组织血液灌注的功能成像技术,目前已被初步应用于全身多个组织器官的多种病变研究中,该技术能在一定程度上反映病变血管形成和相关因子表达的情况^[6-7]。

姚冰等^[8]应用 CT 灌注成像与病理对照研究发

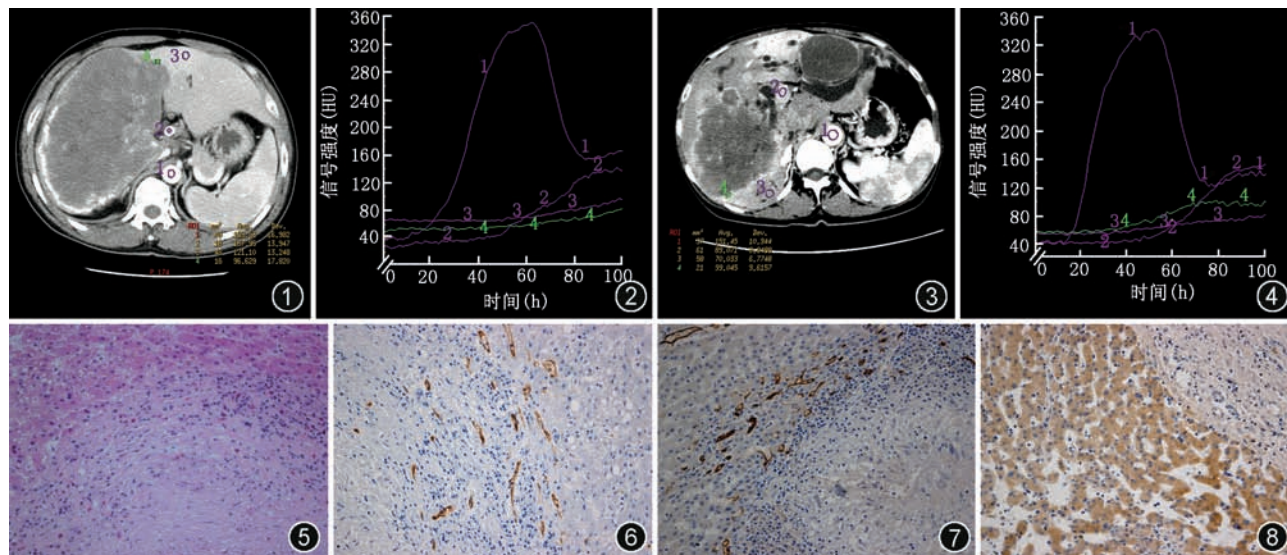


图 1,2 肝脏泡球蚴病。图 1 为 CT 灌注扫描原始图像显示肝右叶巨大低密度肿块,无明显强化,边缘可见钙化。图 2 为 CT 灌注的时间-密度曲线(TDC)图;4 条曲线分别为:1 主动脉,2 门静脉,3 周围肝组织,4 病灶边缘(绿色曲线),可见曲线 4 位于 3 的下方,为 CT 灌注 I 型 TDC 图 3,4 肝脏泡球蚴病。图 3 为 CT 灌注扫描原始图像显示肝右叶低密度病灶边缘环形强化,肝左叶合并囊性包虫病,肝内胆管扩张。图 4 为 CT 灌注 TDC 图,显示绿色曲线 4 位于 3 的上方,为 CT 灌注 II 型 TDC 图 5 肝泡球蚴病灶边缘组织可见大量纤维结缔组织并炎症细胞浸润,周围肝细胞脂肪变性(HE $\times 200$) 图 6,7 肝泡球蚴病灶边缘组织 CD34 标记微血管密度(MVD)染色($\times 200$),可见血管被染成棕黄色,管腔有一定形态。图 6 可见少量微血管染色为 I 型 TDC 组织,图 7 可见大量微血管染色为 II 型 TDC 组织 图 8 免疫组织化学血管内皮生长因子(VEGF)染色($\times 200$),周围肝组织细胞胞质被染成棕黄色,呈广泛阳性表达;泡球蚴病灶边缘未见明显阳性表达

表 1 肝脏泡球蚴病边缘两型 TDC 之间灌注参数、MVD 计数及 VEGF 计分结果比较($\bar{x} \pm s$)

TDC 分型	例数	BF (ml · 100 g ⁻¹ · min ⁻¹)	BV (ml/100 g)	MTT (s)	PS (ml · 100 g ⁻¹ · min ⁻¹)	MVD (个/高倍视野)	VEGF (分)
I 型	21	111.7 ± 27.6	15.1 ± 6.2	7.0 ± 4.4	51.7 ± 17.3	20.5 ± 5.4	2.1 ± 1.0
II 型	6	158.9 ± 39.5	26.8 ± 8.4	7.7 ± 3.1	51.0 ± 20.5	37.2 ± 7.5	3.2 ± 1.0
t 值		-7.897	-18.783	1.311	0.182	-5.223	-1.707
P 值		<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

注: MVD: 微血管密度; VEGF: 血管内皮生长因子; BF: 血流量; BV: 血容量; MTT: 平均通过时间; PS: 表面通透性

现, 泡球蚴病灶边缘区存在着与病灶中心及周围肝实质不同的血流灌注区域。笔者在此基础上根据病灶边缘 TDC 形态将其分为低于肝实质的 I 型和高于肝实质的 II 型 2 种曲线。TDC 代表了对比剂在靶器官中浓度的变化, 间接反映了组织器官灌注量的变化, 曲线每一个点的强化值为 ROI 所代表组织 (包括其内微血管床和血管外组织细胞) 的平均 CT 值。本组结果显示, I 型 TDC 的灌注参数 BV、BF 及免疫组化指标 MVD 计数均低于 II 型, 差异有统计学意义, 这表明两型 TDC 的病灶边缘确实存在不同程度的血流灌注。而两型间 MTT 及 PS 差异无统计学意义, 观察其病理学表现, 均为慢性肉芽肿形成, 两型 TDC 间无论是染色的血管形态, 或是血管外的细胞及组织结构等均相似, 这与肿瘤常出现组织结构的异型性不同, 考虑为两型间 MTT 及 PS 均无明显差异的病理学基础。由此推测两型 TDC 所反映的只是病灶边缘不同的血管生成数量, 即 I 型 TDC 病变组织中有效血管较少, 属于陈旧的活性较低的病变, II 型 TDC 病变组织中有效血管较多, 考虑为相对新鲜的活性较高的病变。

本研究结果显示, MVD 计数与 II 型 TDC 的 BF、BV 有相关性; 与 I 型 TDC 各参数之间均无相关性, 此结果与大部分肝脏肿瘤的 CT 灌注与 MVD 和 VEGF 之间有相关性的研究结果不同^[6]。推测由于 I 型 TDC 病变组织中血管相对少, 其中管腔大、可容纳 8 个红细胞及有肌层的血管对 CT 灌注的影响不容忽视, 但 MVD 计数并未计算在内, 这可能是造成其 MVD 与灌注参数不相关的原因之一, 而 II 型 TDC 中血管计数多, 其 MVD 及 CT 灌注受到此类血管计数的影响均相对较小, 因此二者之间的相关性得以表现出来。

本组 VEGF 在病灶边缘表达很少, 而在周围肝组织中广泛表达, 这是否表明在肝脏泡球蚴病灶边缘的血管生成中无或少有 VEGF 的作用, 而是受到其他生长因子的调控? 或如 Vuitton 和 Gottstein^[9]提到的“多房泡球蚴幼虫自身所分泌的类细胞因子物质可能促进其周围肉芽肿内血管生成”。而肝

细胞中 VEGF 广泛阳性表达可能与泡球蚴病灶所致的肝脏纤维化有一定关系^[10], 但由于其机制非常复杂, 相关结果尚需要进一步研究证实。

总之, 相对于 MVD 离体、静态、局部的观察病灶的血管生成, CT 灌注技术能够无创、动态、全面的对肝脏泡球蚴病灶边缘的血流状态进行评价, 解剖与功能信息同时显示, 不同的 TDC 代表了病灶边缘区域不同的血管生成, 为活体泡球蚴病灶边缘的血管化研究及其生物学活性评价提供了一种新的方法, 具有较好的临床应用前景。本研究的不足之处在于样本量不大, 且未能与 PET 做对照分析, 今后将继续收集样本在条件具备时进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Reuter S, Nussle K, Kolokythas O, et al. Alveolar liver echinococcosis: a comparative study of three imaging techniques. *Infection*, 2001, 29:119-125.
- [2] Stumpe KD, Renner-Schneider EC, Kuenzle AK, et al. F-18-fluoro deoxyglucose (FDG) positron-emission tomography of Echinococcus multilocularis liver lesions: prospective evaluation of its value for diagnosis and follow up during benzimidazole therapy. *Infection*, 2007, 35:11-18.
- [3] Reuter S, Buck A, Manfras B, et al. Structured treatment interruption in patients with alveolar echinococcosis. *Hepatology*, 2004, 39:509-517.
- [4] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 1995, 147:9-19.
- [5] Volm M, Koomagi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer*, 1997, 74:64-68.
- [6] 文利, 丁仕义, 牟伟, 等. 肝细胞癌 CT 灌注参数与微血管密度的相关性研究. *中华放射学杂志*, 2005, 39:280-284.
- [7] 陈雁, 张瑾, 朱正戴, 等. 肾细胞癌灌注 CT 表现与微血管密度及血管内皮生长因子表达的相关性. *中华泌尿外科杂志*, 2009, 30:306-308.
- [8] 姚冰, 王海涛, 刘文亚, 等. 肝泡球蚴病边缘区域 CT 灌注成像与组织病理对照研究. *中国医学计算机成像杂志*, 2010, 16:215-220.
- [9] Vuitton DA, Gottstein B. Echinococcus multilocularis and its intermediate host: a model of parasite-host interplay. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 23:134-147.
- [10] Guerret S, Vuitton DA, Liance M, et al. Echinococcus multilocularis: relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice. *Parasitol Res*, 1998, 84:657-667.

(收稿日期: 2011-01-30)

(本文编辑: 张晓冬)