

Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation on blood supply of rabbit liver VX2 tumor in early stage

ZHOU Peng, ZHOU Ping*, HE Wei, WANG Li-hua, LI Xing-hua,
TIAN Shuang-ming, QIAN Ying, CHEN Li-rong

(Department of Ultrasound, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To observe the value of contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) in quantitatively evaluating the evolution of the blood supply of rabbit liver VX2 tumor models in early stage. **Methods** Eighteen liver VX2 tumor models of rabbits were divided into 3 groups randomly (each $n=6$). CEUS was performed on the 10th, 15th and 20th day group after establishment, respectively. Time intensity curve (TIC) was plotted, the rabbits' liver tumor and surrounding normal liver tissue were resected for immuno-histochemistry and microvessel density (MVD) count. **Results** CEUS showed that the rabbit liver VX2 tumor present a typical malignant tumor imaging "fast-in and fast-out" in early stage. TIC showed that the time to peak (TTP) of hepatic tumor is shorter than that of surrounding normal liver tissue in all three groups ($P<0.01$), no statistical difference of tumor's TTP was detected among three groups ($P>0.05$). Absolute enhanced intensity (AEI) and MVD reduced in turn of 10th, 15th and 20th day group. MVD of tumor was higher in 10th day group than surrounding normal liver tissue ($P<0.01$), while was equal in 15th day group ($P>0.05$) and lower in 20th day group ($P<0.01$). AEI of liver tumor had positive correlation with MVD ($r=0.83$, $P<0.05$). **Conclusion** AEI of TIC can be used to quantitatively assess the evolution of the blood supply in rabbit liver VX2 tumor models. The blood supply in early stage of rabbit liver VX2 tumor models shows a gradual descent process from abundant blood supply to medium blood supply and then low blood supply.

[Key words] Rabbits; Liver neoplasms; Ultrasonography, interventional

超声造影定量评估实质期兔肝 VX2 瘤血供程度的演变过程

周 鹏, 周 平*, 何 炜, 王利华, 李兴华, 田双明, 钱 滢, 陈丽蓉

(中南大学湘雅三医院超声科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨超声造影(CEUS)在定量评估实质期兔肝 VX2 瘤血供及血供演变过程中的价值。 **方法** 将 18 只兔肝 VX2 肿瘤模型随机分为 3 组(每组 6 只), 分别于术后 10、15、20 天接受 CEUS, 绘制时间-强度曲线(TIC), 计算各组肿瘤及周边正常肝组织的 TIC 参数。CEUS 后取兔肝肿瘤及周边正常肝组织行病理免疫组化染色, 计数微血管密度(MVD)。 **结果** CEUS 及 TIC 显示实质期兔肝 VX2 瘤呈典型“快进快出”。3 组肿瘤达峰时间(TTP)均短于相应的正常组织($P<0.01$), 但肿瘤 TTP 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。肿瘤绝对峰值强度(AEI)及肿瘤 MVD: 10 天组、15 天组、20 天组依次减低($P<0.05$)。肿瘤 MVD 与正常肝组织比较: 10 天组肿瘤 MVD 高于正常肝组织($P<0.01$)、15 天组等于正常肝组织($P>0.05$), 20 天低于正常肝组织($P<0.01$)。肿瘤 AEI 与 MVD 呈正相关($r=0.83$, $P<0.05$)。 **结论** 超声造影 TIC 指标 AEI 能实时定量评估实质期兔肝 VX2 肿瘤血供状况。实质期兔肝 VX2 肿瘤血供呈“富血供—等血供—乏血供”逐渐递减的演变过程。

[关键词] 兔; 肝肿瘤; 超声检查, 介入性

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)04-0616-04

[作者简介] 周鹏(1980—), 男, 湖南岳阳人, 硕士, 医师。研究方向: 腹部疾病的超声诊断与介入治疗。E-mail: zpdahai@hotmail.com

[通讯作者] 周平, 中南大学湘雅三医院超声科, 410013。E-mail: zhouping1000@hotmail.com

[收稿日期] 2009-08-03 **[修回日期]** 2009-09-06

兔 VX2 瘤株是一种可移植的肿瘤细胞株,其肝癌模型接种成功率高、成模时间短,作为理想的肿瘤模型,已被广泛应用于肿瘤影像、治疗等方面的研究^[1-2]。目前虽有不少关于兔肝 VX2 肿瘤血供特点的研究^[3-4]报道,但针对兔肝 VX2 肿瘤不同时期血供变化情况的研究尚少。本研究利用超声造影(contrast-enhanced ultrasonography, CEUS)及其时间-强度曲线(time intensity curve, TIC)指标,定量评估实质期的兔肝 VX2 肿瘤模型在不同时间点血供演变情况,并结合病理组织微血管密度(microvessel density, MVD)加以验证,旨在探讨 CEUS 及 TIC 在定量评估肝脏肿瘤新生血管及血供演变过程中的应用价值以及兔肝 VX2 瘤模型实质期血供状态变化的病理基础,为进一步研究提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 VX2 瘤荷瘤种兔由华中科技大学同济医学院提供。新西兰大白兔雌雄不限,体质量 1.5~2.0 kg,参考

文献方法^[5]制作兔肝 VX2 肿瘤模型 18 只,随机分成 3 组(每组 6 只)。在 VX2 瘤种植后 10 天、15 天和 20 天时进行 CEUS 检查,随后处死荷瘤兔,取 VX2 肿瘤及周边正常肝组织制成石蜡标本。

1.2 超声造影方法 将荷瘤兔麻醉,仰卧位保定,保留耳缘静脉通道。用 Aloka α10 超声仪浅表探头(探头频率 7~10 MHz)对实验兔左肝进行常规扫查。所有调节参数(深度、聚焦、总增益等)保持不变,设定机械指数<0.11。采用 Bracco SonoVue 干粉,5 ml 生理盐水稀释,振荡充分溶解混匀,经兔耳缘静脉按 0.1 ml/kg 团注,尾随快速注射 1 ml 生理盐水冲管,团注同时启动计时器,所有影像存盘。由两名高年资医师分析其动态影像资料,利用软件绘制肿瘤及同深度正常肝实质的 TIC。记录达峰时间(time to peak, TTP)及绝对峰值强度(absolute enhanced intensity, AEI),其中 AEI=肿瘤峰值强度-相同深度周边正常肝组织峰值强度。

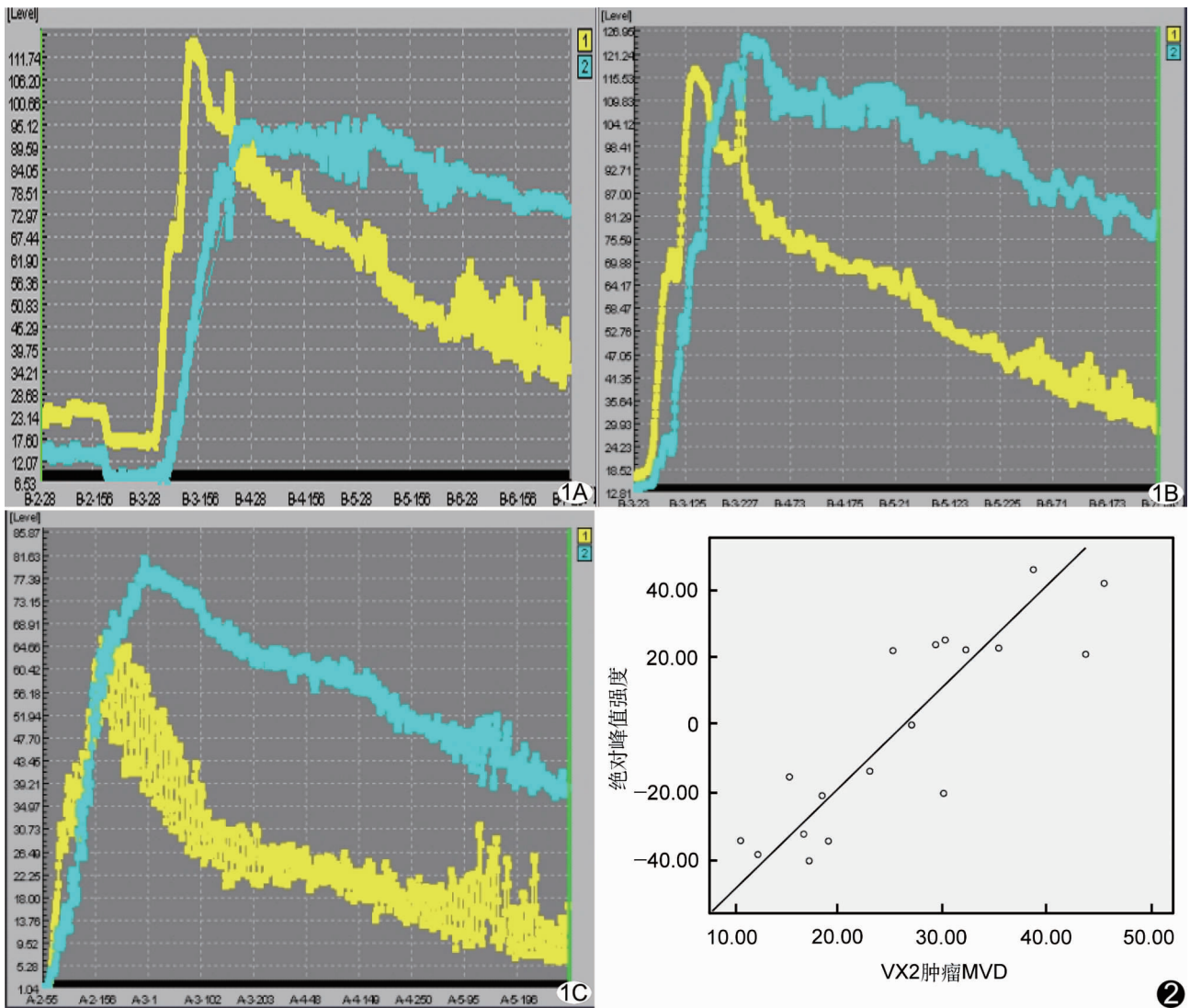


图 1 各组兔肝 VX2 瘤时间强度曲线 A. 10 天组:肿瘤曲线达峰迅速,峰值强度高于周边正常肝组织; B. 15 天组:肿瘤曲线达峰迅速,峰值强度与周边正常肝组织相差不大; C. 20 天组:肿瘤曲线达峰迅速,峰值强度低于周边正常肝组织 (黄色曲线:VX2 肿瘤 TIC;绿色曲线:周边正常肝组织 TIC) 图 2 绝对峰值强度与 VX2 肿瘤 MVD 散点图

表 1 3 组兔肝 VX2 肿瘤及正常肝组织 TIC 指标及 MVD 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TTP(s)		AEI	MVD	
		肿瘤	正常肝组织		肿瘤	正常肝组织
10 天组	6	7.06±1.03*	12.32±2.20	30.04±11.11	37.71±6.13*	18.55±3.33
15 天组	6	7.59±1.26*	12.52±2.10	0.60±20.38#	25.63±4.33#	19.63±2.62
20 天组	6	8.06±1.45*	12.88±1.75	-32.36±8.88#△	15.31±3.17*#▲	18.21±2.07

注:与正常肝组织比较,*: $P < 0.01$;与术后 10 天组比较,#: $P < 0.01$;与术后 15 天组比较,△: $P < 0.01$,▲: $P < 0.05$

1.3 免疫组织化学染色及结果判定 MVD 检测采用免疫组化 PicTure™ 二步法, DAB 显色。所用一抗为抗 CD34。MVD 计数方法^[6]:先在低倍镜($\times 40$)下全面观察切片,选出血管密度聚集区,后于高倍镜($\times 400$)下取 3 个视野计数微血管,以染成棕色的血管内皮或内皮细胞束作为一条血管数,以 3 个高倍镜视野的微血管平均数作为该切片的 MVD 值。MVD 计数检测均由 2 名病理科医师采用双盲法独立进行。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。三组间 TTP、AEI、MVD 的比较采用单因素方差分析, TIC 指标 AEI 与 MVD 的相关性分析采用 Pearson 直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔肝 VX2 肿瘤模型的 CEUS 和 TIC 表现 各组兔肝 VX2 肿瘤 CEUS 表现:团注微泡后第 5~9 s 可见肿瘤周围先呈“抱球状”高增强,后迅速整体高增强,共持续约 3~6 s,随之迅速廓清而呈低增强,呈“快进快出”;瘤周正常肝实质约在 12~27 s 达到最大强化,之后逐渐缓慢消退,8~10 min 完全消退,呈“慢进慢出”。

兔肝 VX2 肿瘤 TIC 表现为上升陡直、达峰迅速、下降快速;周边正常肝组织 TIC 表现为达峰缓慢、下降平缓(图 1)。

2.2 各组 TIC 参数(TTP、AEI)比较 各组兔肝 VX2 肿瘤模型 TIC 参数测量结果见表 1。3 组肿瘤 TTP 较正常组织达峰迅速($P < 0.01$);但肿瘤及正常肝组织的 TTP 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。组间 AEI 差异有统计学意义($P < 0.01$),随种植时间的不同,肿瘤的 AEI 呈逐渐递减趋势。

2.3 兔肝 VX2 肿瘤模型的 CD34 染色结果 兔肝 VX2 肿瘤模型各组中肿瘤及正常肝组织的 MVD 值见表 1。10 天组、15 天组、20 天组肿瘤 MVD 呈逐渐递减趋势($P < 0.05$);肿瘤的 MVD 与正常肝组织 MVD 比较:10 天组、20 天组差异有统计学意义($P < 0.01$),而 15 天组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 兔肝 VX2 肿瘤 AEI 与 MVD 相关性 各组 AEI 值与 MVD 表达强度呈正相关($r = 0.83, P < 0.05$, 图 2)。

3 讨论

兔肝 VX2 肿瘤与人类肝细胞癌具有相似的血供特征,因此成为肝癌基础研究中最重要、最常用的模型之一,为肝癌的各类治疗研究提供了可靠、复制周期短且性质均一的基础平

台。兔肝 VX2 肿瘤模型一般可分为 3 个生长时期^[7]:实质期(种植后 2~3 周)、坏死期(4~5 周)、囊变期(6~7 周)。通过预先实验观察到兔肝 VX2 瘤具有生长迅速的特点,10 天肿瘤直径即可达 1 cm 左右,此时可被超声良好监测,但 3 周后就有一部分肿瘤可出现中央坏死和种植转移,此时其研究价值必将大大降低,甚至丧失。本研究选在 VX2 瘤种植成功后 10~21 天内不同时间点,对处于实质期的兔肝 VX2 肿瘤进行 CEUS 及 TIC 检测,以了解其血供特征。

研究^[8]发现实质期兔肝 VX2 肿瘤 CEUS 表现为动脉相迅速整体高增强,门脉相迅速廓清而呈低增强, TIC 上升支陡直,达峰迅速,下降则快于正常肝组织,呈“快进快出”造影声像特点,与人肝癌 CEUS 类似,表明兔肝 VX2 肿瘤与人肝癌一样亦为动脉血供性肿瘤。动脉血供性肿瘤的这种声像特点可以有如下解释:超声造影剂在动脉内流动要远快于门静脉,且造影剂通过肝动脉要比通过门静脉少经过一次微循环而先期达到肝组织,形成动脉血供性肿瘤在动脉期快速增强影像;在门静脉灌注后肝实质开始增强,但此时肿瘤内微泡逐渐廓清,又因动脉血供性肿瘤内动脉新生血管常大量形成且发育不成熟^[9],经过动脉来的造影剂可以通过“短路”途径快速廓清而显示阴性低增强区,与正常肝实质相比肿瘤形成明显回声“缺失”的影像反差。

超声造影剂微泡属血池造影剂,不能自由透过血管壁,是评价组织微血管灌注良好的示踪剂,肿瘤内血管数越多,血供越丰富,单位时间进入单位体积肿瘤病灶的造影剂就越多,肿瘤增强越明显,故 CEUS 及 TIC 能较好地反映肝局灶性占位的血供情况^[10-11]。本研究 10 天组兔肝 VX2 肿瘤 CEUS 的 AEI 显著高于正常肝组织,15 天组的 AEI 与正常肝组织大致相同,20 天组的 AEI 显著低于正常肝组织,随着肿瘤的生长,AEI 呈“高一等一低”于正常肝组织的动态变化过程,这提示实质期兔肝 VX2 肿瘤血供存在一个由“富血供一等血供一乏血供”的动态变化过程。

MVD 计数能显示肿瘤极微小的新生血管内皮细胞及新生血管,是定量分析肿瘤血管生成的金标准,对于判断肿瘤血管生成及血供状态有重要作用^[12]。本研究对不同时间段的兔肝 VX2 瘤组织进行了免疫组化染色及 MVD 定量分析,发现肿瘤内 MVD 随着肿瘤生长呈逐渐减低趋势, MVD 与肿瘤 TIC 参数 AEI 呈正相关,进一步证实了实质期兔肝 VX2 肿瘤的血供变化特点,同时也说明 AEI 与 MVD 具有高度的一致性,可较好用于评估实质期兔肝 VX2 肿瘤血供。

实质期兔肝 VX2 肿瘤之所以出现这种由“富血供一等血供一乏血供”的动态变化过程,可以解释为早期兔肝 VX2 肿瘤生长活跃,新生血管发生多, MVD 高,肿瘤血供丰富,单位时间进入单位体积肿瘤病灶的造影剂增多,与瘤旁正常肝组织比较 AEI 较高;随着时间的推移,新生血管发生逐渐减低,但新生血管数具有稍滞后的特点,故 MVD 仍处于较高水平;之后肿瘤组织呈加速生长,新生毛细血管逐渐落后于组织体

积的生长,血供相对减少,MVD 开始呈相对递减趋势,此时单位时间进入单位体积肿瘤病灶的造影剂相对减少,AEI 亦逐渐从等同于瘤旁正常肝实质发展到低于瘤旁正常肝组织;最后到实质期晚期肿瘤新生血管不能满足肿瘤生长需要,肿瘤血供不足,最终逐渐过渡到囊性坏死期。

综上所述,CEUS 及 AEI 能实时定量评估实质期兔肝 VX2 肿瘤的微血管滋养情况及血供状态;兔肝 VX2 瘤模型实质期内血供状态呈现“富血供—等血供—乏血供”逐渐递减的动态变化过程。

[参考文献]

- [1] Gandhi D, Hoeffner EG, Carlos RC, et al. Computed tomography perfusion of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Initial Results. J Comput Assist Tomogr, 2003, 27(5):687-693.
- [2] 韩志刚,程红岩,段纪成,等.少血供兔 VX2 肝移植瘤模型动脉栓塞后影像与病理分析.中国介入影像与治疗学,2007,4(2):148-154.
- [3] 杨林,周翔平,官泳松,等.兔 VX2 肝癌 MSCT 评价及病理特征.中国医学影像技术,2007,23(4):623-625.
- [4] 柳曦,李欣,赵俊功,等.兔肝 VX2 瘤模型制作及综合影像评价.实用放射学杂志,2002,18(2):132-134.
- [5] 李远竞,刘颖,沈维红,等.超声引导下组织块接种制作兔肝 VX2 瘤模型.中国医学影像技术,2008,24(12):1886-1888.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.
- [7] 梁斌,肖恩华,向军,等.兔肝 VX2 瘤模型 MR 灌注成像与 MVD 及 VEGF 的相关性研究.临床放射学杂志,2007,26(1):73-77.
- [8] 林旻,张雪林,黄君超.超声造影在肝硬化背景-F 鉴别增生性结节与肝细胞性肝癌的应用价值.中国病理生理杂志,2008,24(11):2265-2267.
- [9] Park KS, Choi BI, Won HJ, et al. Intratumoral vascularity of experimentally induced VX2 carcinoma: comparison of color Doppler sonography, power Doppler sonography, and microangiography. Invest Radiol, 1998, 33(1):39-44.
- [10] 刘红磊,赵玉珍,孟洁,等.肝恶性肿瘤超声造影时间-强度曲线定量分析研究.中国超声医学杂志,2007,23(6):445-447.
- [11] 荣雪余,冀鸿涛,朱强,等.超声造影在肝局灶性病变更鉴别诊断中的应用.中国医学影像技术,2008,24(3):402-405.
- [12] Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. Tumour Biol, 2005, 26(1):1-8.

《中国医学影像技术》引证报告

据中国科学技术信息研究所 2009 年版中国科技期刊引证报告(核心版)对 1868 种期刊的统计,2008 年《中国医学影像技术》的主要指标和在军事医学与特种医学、医学影像学类期刊中的排名如下:

- 1 总被引频次 2371,排名第二。
- 2 影响因子 0.550,排名第四。
- 3 总分 59.8,排名第二。
- 4 学科扩散指标 0.80。
- 5 学科影响指标 0.84。