文章编号:1000-5404(2010)04-0331-03

论著

兔 VX2 肿瘤超声造影灌注定量参数与肿瘤组织周细胞变化

黄泽君,李 锐,张 莹,陈朝晖,袁曼丽,杨正春 (400038 重庆,第三军医大学西南医院超声科)

[摘要] **目的** 探讨兔 VX2 肿瘤超声造影定量新生血管血流灌注参数与肿瘤组织周细胞变化的关系。**方法** 选用 VX2 肿瘤肌肉模型兔 10 只,应用超声造影连续脉冲对比(comparative pulse serial, CPS)技术及 ACQ 定量分析软件测定肿瘤血管血流灌注各参数值和峰值强度比率(rate of peak index, RPI),并与肿瘤组织标记周细胞的免疫组化染色检测的微血管密度(micro vascular density, MVD)和周细胞数(pericytes number, PN)对照,进行相关性分析。**结果** 肿瘤组织造影血流灌注参数峰值强度(peak intensity,PI)为(15.29±4.14)dB,RPI 为(2.95±1.26)dB/s;肿瘤组织标记周细胞的 MVD 为(17.75±7.60),PN 为(26.10±10.59);肿瘤组织造影血流灌注参数 PI 与 MVD 和 PN 显著正相关(r 值分别为 0.866、0.857,$P<0.01$),RPI 与 MVD 和 PN 显著正相关(r 值分别为 0.647、0.648,$P<0.01$),而到达时间(arrival time, AT)、达峰时间(time-to-peak,TTP)与 MVD、PN 无相关性。**结论** 超声造影血流灌注参数 PI 和 RPI 可以间接反映肿瘤血管生成中周细胞的数量、分布、密度以及微血管密度等变化。

[关键词] 肝肿瘤;超声检查;周细胞;新生血管化,病理性,兔
[中图法分类号] R445.1;R73-354;R730.41 [文献标志码] A

Quantitative perfusion parameters of VX2 tumor at ultrasonography and change of pericytes in tumor tissue of rabbits

Huang Zejun, Li Rui, Zhang Ying, Chen Zhaohui, Yuan Manli, Yang Zhengchun (Department of Ultrasonography, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between perfusion parameters of new blood vessels in VX2 tumor at ultrasonography and change of pericytes in tumor tissue of rabbits. **Methods** Ten rabbits with implanted VX2 tumor cells were enrolled in this study. Comparative pulse serial (CPS) technique and ACQ software were used to detect the ratio between perfusion parameters of tumor vessels and rate of peak index (RPI). Micro vascular density (MVD) was detected in tumor tissues stained with immunohistochemistry and compared with that in pericytes, and their correlation was analyzed. **Results** The mean PI and RPI in perfused tumor tissue were 15.29±4.14 dB/s and 2.95±1.26 dB/s, respectively. The mean MVD and the number of pericytes in tumor tissue were 17.75±7.60 and 26.10±10.59, respectively. The PI and RPI were positively correlated with MVD and pericytes. **Conclusion** Ultrasonic PI and RPI can indirectly reflect the changes of pericytes during the angiogenesis in tumors.

[**Key words**] VX2 tumor; ultrasonography; pericytes; neovascularization, pathologic; rabbits

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770563). Corresponding author: Li Rui, Tel: 86-23-68754000, E-mail: raylee-7991@yahoo.com.cn

肿瘤血管生成是肿瘤生长、侵袭和转移的重要条件[1]。血管生成主要涉及内皮细胞和周细胞的分化、增殖、迁移和共同作用等重要过程[2]。近年来,国内外学者对某些肿瘤的超声造影所得的血流灌注参数与免疫组化染色标记内皮细胞所获得微血管密度(micro vascular density, MVD)值之间进行了大量相关性研究[3-7],但与周细胞病理的相关性研究甚少。本研究通过对兔肌肉 VX2 肿瘤超声造影定量肿瘤新生血管血流灌注参数与肿瘤血管周细胞染色标记的微血管密度及阳性细胞数相对照进行研究,旨在探讨超声造影血流灌注参数对评价肿瘤血管生成中周细胞的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用新西兰大白兔 10 只作为模型兔,雌雄不限,体质量 1.6~3.0(2.6±0.5) kg(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。VX2 肿瘤组织(第三军医大学新桥医院赠送)。以速眠新(0.2 ml/kg)经肌肉注射麻醉。先从种

[基金项目] 国家自然科学基金(30770563)
[通信作者] 李 锐,电话:(023)68754000,E-mail:raylee-7991@yahoo.com.cn

兔体内取出瘤块生长旺盛组织(靠近边缘的灰白色鱼肉样瘤组织),采用隧道组织块包埋法[8],将兔VX2肿瘤组织块接种于兔大腿股外侧肌内建立兔VX2肌肉肿瘤模型,种植后7~22 d用于实验。

1.2 仪器

使用美国Acuson Sequoia 512超声诊断仪,配有对比脉冲序列CPS(contrast pulse sequence)成像技术和ACQ(Axius™ auto tracking contrast quantification)定量分析软件。造影剂采用SonoVue(Bracco公司,意大利),用5 ml生理盐水稀释、摇匀,微泡平均直径为2.5 μm,浓度为2×10^8个/ml,按0.1 ml/kg经兔耳缘静脉团注,尾随快速注射3 ml生理盐水冲洗。

1.3 实验方法

1.3.1 超声造影检查 首先用二维灰阶超声监测肿瘤生长情况,肿瘤两径线大于10 mm时进行实验。选取肿瘤最大的切面进行造影检查,启动CPS技术,实时连续观测肿瘤区域的灌注过程和回声强度变化,并保存于硬盘。造影结束后,动态回放观察造影的全过程,利用配有造影定量分析功能的ACQ软件,选取肉眼下病灶组织中增强最明显区域和相近面积的周围肌肉组织作为感兴趣区(region of interest,ROI),绘制造影剂时间-强度曲线,得到造影剂灌注的相关参数:到达时间(arrival time, AT)、达峰时间(time-to-peak,TTP)、峰值强度(peak intensity,PI)、峰值强度比率RPI=PI/TTP。

1.3.2 免疫组化染色MVD和PN测定 鼠抗兔α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)单克隆抗体和SABC免疫组化染色试剂分别购自武汉博士德公司和北京中杉金桥公司。取材与超声检测部位一致,用已知阳性切片作阳性对照,以PBS替代一抗作阴性对照。

MVD计数方法采用Weidner等[9]方法,采用双盲法分别由2名病理医师进行结果统计,每个样本先在低倍镜(×100)下观察阳性染色的微血管,选择染色最多的区域(即"热点"),然后选择3个不重复高倍镜视野,最后计算单位视野(×200)的平均微血管数和染色表达阳性的周细胞数,即MVD和PN。

1.4 统计学处理

采用SAS 8.0统计软件,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,两组资料的比较采用t检验,两变量资料相关分析用Pearson积差相关分析方法。

2 结果

2.1 肿瘤种植结果

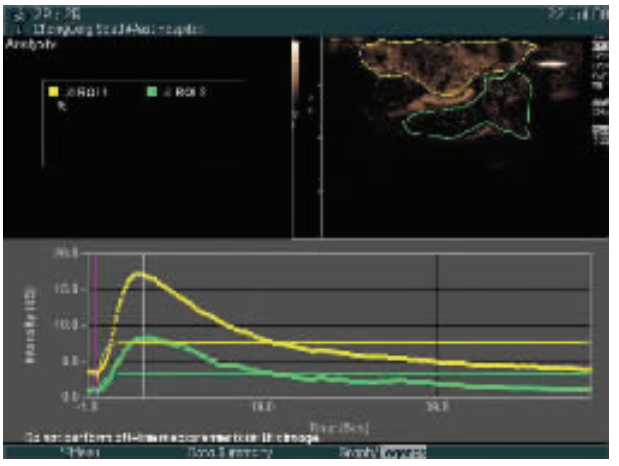
10只接种肌肉VX2肿瘤实验兔均种植成功,共有24个肿瘤结节,其中直径>10 mm的肿瘤结节20个,<10 mm的4个;肿瘤结节呈分叶状或类圆形,边缘多清晰,部分有包膜形成。

2.2 肿瘤组织与周围肌肉组织超声造影血流灌注参数定量分析

肿瘤组织与周围肌肉组织超声造影血流灌注参数定量分析结果(图1):肿瘤组织的PI、RPI明显高于周围肌肉组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);但肿瘤组织与周围肌肉组织的AT、TTP差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

2.3 免疫组化染色结果

肿瘤组织抗α-SMA抗体免疫组化染色后,在肿瘤组织新生血管周细胞细胞质内出现棕黄色颗粒,周细胞在肿瘤微血管内可确切的标记。周细胞大多在肿瘤组织边缘呈簇状、管状、和条索状结构(图2),而在肿瘤组织内可见散在点状和管状结构(图3)。肿瘤组织的MVD为(17.75±7.60),PN为(26.10±10.59)。



黄色:肿瘤组织;绿色:周边肌肉组织

图1 肿瘤组织和周边肌肉组织的时间-强度曲线图

表1 肿瘤组织与周边肌肉组织超声造影血流灌注参数值变化

($n=20,\bar{x}\pm s$)

组织类型	AT(s)	TTP(s)	PI(dB)	RPI(dB/s)
肿瘤组织	1.11±0.85	6.04±3.20	15.29±4.14	2.95±1.26
周边肌肉组织	1.35±1.45	6.71±3.98	11.19±3.52	2.16±1.26
t值	-0.66	-0.58	3.37	1.99
P值	0.51	0.56	0.0017	0.05

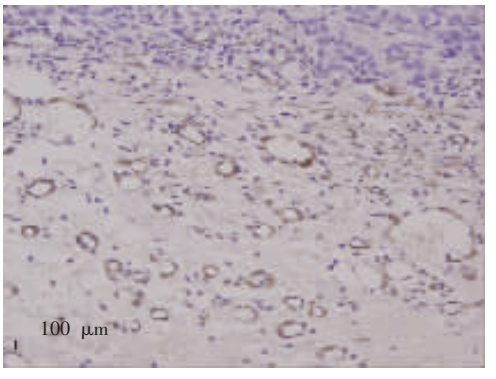


图2 免疫组化观察肿瘤组织边缘部位周细胞的变化 (SABC ×200)

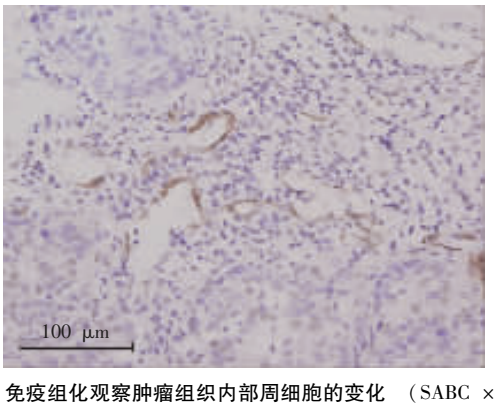


图3 免疫组化观察肿瘤组织内部周细胞的变化 (SABC ×200)

2.4 肿瘤组织造影血流灌注参数与MVD、PN的相关性分析

肿瘤组织造影血流灌注参数PI与MVD和PN显著正相关(r值分别为0.866、0.857,$P<0.01$),RPI与MVD和PN显著正相关(r值分别为0.647、0.648,$P<0.01$),而AT、TTP与MVD、PN无相关性。

3 讨论

实体恶性肿瘤的生长、侵袭及转移必须依赖肿瘤新生血管的参与,新生血管主要由内衬的内皮细胞和外围的周细胞组成,血管生成涉及这2种细胞的分化、增殖、迁移和共同作用等重要过程。近年来,随着更多周细胞标记物的发现与应用,周细胞在血管发生、血管生成、血管成熟和塑型等方面的研究得以深入,其作用和意义也逐步引起关注,特别在血管生成中的作用越来越受到重视,从而被视为抗血管生成治疗具有潜力的新靶点[2,10,11]。

目前常用的周细胞标记物有胞内蛋白如α-平滑肌肌动蛋白抗原(alpha-smooth-muscle actin, α-SMA)、结蛋白(Desmin)和G蛋白信号调节子-5(G protein signaling 5 ,RGS-5)等[2]。王医术等[12]实验中也发现α-SMA标记显示肿瘤间质微血管及肉芽组织的周细胞均被确切标记,证明其可作为周细胞的有用指标。本实验也采用α-SMA作为周细胞的标记,周细胞在肿瘤微血管内可确切的标记,与其相符。本实验中肿瘤组织边缘微血管多而密集,α-SMA阳性细胞大多呈簇状、管状和条索状结构,而在肿瘤组织内可见微血管较稀散,α-SMA阳性细胞呈散在点状、管状结构。肿瘤组织微血管密度以及平均周细胞数的分布计数测定表明:随着微血管密度的增多,周细胞数目也呈上升的趋势,与内皮细胞免疫组化的特征相似。从而进一步表明了周细胞与内皮细胞共同参与了肿瘤微血管生成,在肿瘤血管生成中有不可忽视的作用。

本研究应用的新型灰阶超声造影成像技术CPS与以往的造影技术相比具有更好的微泡敏感性、特异性及空间分辨率,同时具有数字减影的动态成像功能。探讨其成为一种在体无创、快捷评价肿瘤血管生成情况的技术,对抗肿瘤血管生成治疗的疗效观察和预后估测,具有非常重要的临床实用意义。本实验采用实时超声造影成像技术CPS和造影定量分析软件(ACQ)对肿瘤及周围肌肉组织的血流灌注情况进行实时观察,获得了较为全面的参数:AT、TTP、PI,以及较新的参数峰值强度比率(RPI = PI/TTP)。在肿瘤组织和周围肌肉组织的这些参数比较发现:肿瘤组织的PI、RPI明显高于周围肌肉组织,肿瘤组织内微血管明显比周围肌肉组织增多,进入肿瘤组织内的造影剂的量较多,肿瘤的峰值强度较高,加上肿瘤组织微血管的不成熟性,到达峰值时间相对较短,所以PI及RPI差异有统计学意义。而肿瘤组织与周围肌肉组织的AT、TTP差异无统计学意义,与付文生等[7]实验中肝细胞癌超声造影增强达峰时间(T_{max})与MVD之间具有负相关的结果不一致,其原因可能为:①肿瘤组织来源不同;②ROI取样时包括了中央坏死的组织的影响;③样本量少等。本实验中造影参数与病理周细胞标记的微血管密度和周细胞数相关性分析显示:PI和RPI与周细胞标记的MVD和PN有显著的相关性,PI和RPI可以间接的反映提示周细胞标记的微血管密度和周细胞数,为抗肿瘤血管生成治疗的疗效观察和预后估测提供了实验依据。

参考文献:

[1] Carmeliet P, Jain P K. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.

[2] Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(4): 452-464.

[3] 方华, 李凤华, 杜晶, 等. 乳腺肿瘤实时灰阶超声造影与微血管密度相关性研究[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 25(6): 555-558.

[4] McCarville M B, Streck C J, Dickson P V, *et al*. Angiogenesis inhibitors in a murine neuroblastoma model: quantitative assessment of intratumoral blood flow with contrast-enhanced gray-scale US[J]. Radiology, 2006, 240(1): 73-81.

[5] 丁红, 范培丽, 林希元, 等. 超声造影定量分析技术评价肝癌肿瘤血管生成的临床研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2008, 17(5): 405-408.

[6] 江虹虹, 李安华. 肿瘤血管生成与超声造影成像相关性研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(3): 466-468.

[7] 付文生, 杨一林, 段云友, 等. 肝细胞癌超声造影增强达峰时间与微血管密度相关性研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2007, 16(4): 318-320.

[8] 王琦, 马宽生, 李廷军, 等. 射频消融治疗兔肝VX2肿瘤后消融病灶鬼影细胞的形态变化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1173-1175.

[9] Weidner N, Semple J P, Welch W R, *et al*. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1-8.

[10] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions[J]. Circ Res, 2005, 97(6): 512-523.

[11] Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2003, 314(1): 15-23.

[12] 王医术, 李玉林, 朱桂彬, 等. 乳腺癌间质新生血管周细胞的形态学特点及其意义[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(3): 176-179.

(**收稿**:2009-11-06;**修回**:2009-12-03)

(编辑 王小宴)