文章编号:1000-5404(2011)11-1187-04

论著

超声光散射断层成像与乳腺癌 HIF-1α 表达的相关性

王红磊,武 力,阙 燕,马大昌,吴多明,纪彩玉 (730000 兰州,兰州大学第一医院乳腺科)

【摘要】 **目的** 通过研究术前乳腺癌超声光散射断层成像(diffused optical tomography with ultrasonography)的综合诊断指数(synthesis diagnostic index, SDI)以及术后缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)、CD105 在乳腺癌中的表达,探讨乳腺癌超声光散射断层成像综合诊断指数与缺氧诱导因子-1α 表达、微血管密度(microvessel density, MVD)的关系。**方法** 采用超声光散射断层成像系统,研究 2008 年 11 月至 2010 年 9 月我科 131 例乳腺良性肿块及 142 例乳腺癌患者,测量超声光散射断层成像综合诊断指数(synthesis diagnostic index, SDI),通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)确定乳腺癌的最佳诊断阈值。使用免疫组化法检测 HIF-1α 表达与定位,检测乳腺癌 MVD。分析超声光散射 SDI 值与 HIF-1α 表达、MVD 值的关系。分析超声光散射的 SDI 值以及 HIF-1α 表达与乳腺癌临床病理特征的关系。**结果** 乳腺良性疾病与乳腺癌的 SDI 值分别:(109.35 ± 48.03)、(190.87 ± 60.33)。两者之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。经 ROC 曲线分析确定,以 SDI 值 > 141.2 作为乳腺癌的最佳诊断阈值。HIF-1α 表达阳性的乳腺癌 SDI 值高于 HIF-1α 表达阴性的乳腺癌($P<0.05$)。SDI 值与 MVD 值呈正相关($r=0.673$, $P<0.01$)。HIF-1α 表达阳性的 MVD 值大于 HIF-1α 表达阴性的 MVD 值($P<0.05$)。SDI 值、HIF-1α 表达与乳腺癌临床病理联系显示:两者与肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期、CerbB-2 表达有关($P<0.05$)与 ER、PR 表达无关($P>0.05$)。**结论** 超声光散射断层成像系统作为一种新的功能性检测技术对乳腺癌的诊断、病情判断方面有重要的指导意义。

【关键词】 超声光散射断层成像;乳腺癌;缺氧诱导因子-1α;微血管密度
【中图法分类号】 R737.9;R445.1;R730.4 **【文献标志码】** A

Correlation between ultrasound-guided diffused optical tomography and expression of hypoxia inducible factor-1α in breast cancer

Wang Honglei, Wu Li, Que Yan, Ma Dachang, Wu Duoming, Ji Caiyu (Department of Breast Diseases, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

【Abstract】 **Objective** To study the correlation between synthesis diagnostic indications (SDI) of ultrasound-guided diffused optical tomography (DOT), expression of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α), and microvessel density (MVD) in breast cancer. **Methods** SDI were demonstrated by ultrasound-guided DOT for 131 patients with benign mass and 142 patients with breast cancer admitted to our department from November 2008 to September 2010. Optimal diagnostic threshold of breast cancer was established by receiver operating characteristic (ROC) curve. Expressions of HIF-1α and MVD in breast cancer were detected with the immunohistochemical method. Correlation of SDI with expression of HIF-1α and MVD in breast cancer, and pathological features of breast cancer was analyzed. **Results** The SDI value was significantly lower in patients with benign breast mass than in those with breast cancer (109.35 ± 48.03 *vs* 190.87 ± 60.33, $P<0.05$). ROC curve analysis showed that the SDI value greater than 141.2 was used as the optimal diagnostic threshold of breast cancer. The SDI and MVD values were significantly higher in breast cancer with positive HIF-1α expression than in that with negative HIF-1α expression ($P<0.05$). The SDI value was positively correlated with the MVD value ($r=0.673$, $P<0.01$). The SDI value and the expression of HIF-1α were significantly correlated with the tumor size, lymphatic metastasis, TNM stage, and CerbB-2 expression ($P<0.05$), but not with the ER and PR expression. **Conclusion** As a new function testing technique, ultrasound-guided DOT plays an important role in diagnosis of breast cancer.

【Key words】 ultrasound-guided diffused optical tomography; breast cancer; hypoxia inducible factor-1α; microvessel density

Corresponding author: Wu Li, E-mail: wuli8625679@126.com

【通信作者】 武 力,E-mail:wuli8625679@126.com

乳腺超声光散射断层成像系统(diffused optical tomography with ultrasonography)是近年来发展的一种新的乳腺功能成像技术,是集超声和光学成像为一体的诊断系统。通过超声检查定位乳腺肿物、光散射成像技术(diffuse optical tomography, DOT)发射光子测量肿物内部血红蛋白总量(hemoglobin total concentration, HBT)、血氧饱和度等参数反映肿瘤的代谢状态,达到对病变的定位和定性诊断,有效鉴别乳腺良恶性病变。恶性肿瘤在其发生、发展过程中需要新生血管来提供营养及排除代谢产物,并可诱导新生血管生成。微血管密度(microvessel density MVD)能够直接反映血管的生成状态。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)在乳腺癌血管生成中起重要作用。本研究旨在通过研究乳腺癌的超声光散射断层成像综合诊断指数(synthesis diagnostic index,SDI)与乳腺癌MVD、缺氧诱导因子-1α表达的关系以及SDI值和HIF-1α表达与乳腺癌临床病理特征的关系,探讨超声光散射断层成像诊断乳腺癌的病理基础及其对乳腺癌临床病情判断的价值。

1 对象与方法

1.1 临床资料

2008年11月到2010年9月间在兰州大学第一医院乳腺科住院的273例患者,所有乳腺肿块均经病理证实其中乳腺良性肿块131例,乳腺癌142例,年龄为17~73岁。肿瘤≤2 cm的54例,>2 cm且≤5 cm的66例,>5 cm的22例。有淋巴结转移的62例,无淋巴结转移的80例,TNM分期:Ⅰ~Ⅱ期103例,Ⅲ~Ⅳ期39例。ER阴性64例,ER阳性78例,PR阴性62例,PR阳性80例,CerBb-2阴性76例,CerBb-2阳性66例。

1.2 仪器、材料与方法

仪器:使用新奥博为技术有限公司生产的OPTIMUS-Ⅱ型超声光散射乳腺成像系统。首先通过超声图像引导,定位肿瘤位置,进行患侧乳房的光学数据采集。然后在肿瘤所对应的健康乳房区域,采集健侧乳房的数据。利用组织对不同波长的光不同的吸收能力,进行载体组织光谱分析。通过对测量结果重建计算,生成组织血液功能三维断层图像并对组织内生物化学信息进行定量,准确评价乳腺肿块内部的血红蛋白总量。二维超声检测到的肿物空间信息经过系统自动数字化处理,定量显示肿物空间信息数值。系统将肿物光学信息与超声信息相结合,智能化处理,得出综合诊断指数SDI。

1.3 免疫组化及评判标准

免疫组化:S-P法常规实验步骤,微波热抗原修复,一抗(CD105、HIF-1α)置37 ℃孵育30 min,4 ℃过夜。抗体均为兔抗人单抗(即用液)。超敏S-P试剂盒、DAB显色试剂盒均购自福州迈新公司。

所有乳腺肿块的超声光散射断层成像综合诊断指数做受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线。选择Youden指数(敏感度+特异度)最大时的SDI值作为最佳诊断阈值。

免疫组化结果判定:HIF-1α以细胞核和/或细胞质出现明显的棕黄色颗粒为阳性染色。先按染色强度打分:无色0分,浅黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分;再按阳性细胞所占百分比打分:阳性细胞数<5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分;染色强度与阳性细胞百分比的乘积9~12分为强阳性(++),5~8分为弱阳性(+),0~4分为阴性(-)。CD105阳性判断及MVD:计数采用Weidner[1]法来判断阳性结果:以与肿瘤细胞和结缔组织成分明显有别的任何一个染成棕色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管相,先在低倍镜下(10×10)寻找肿瘤内血管高密度区(hotspot),然后在高倍镜下(10×40)计数5个血管高密度区的微血管数,取其平均值代表MVD。

1.4 统计学分析

使用SPSS 16.0统计软件分析计量资料的单因素方差、计量资料两独立样本t检验、计数资料的统计用卡方检验。直线相关、回归分析SDI值和MVD值之间的关系。ROC曲线分析SDI值的最佳诊断阈值。

2 结果

2.1 超声光散射检查在乳腺良、恶性疾病中的表现

在光散射图像中,用彩色编码不同的吸收强度,颜色越偏向红色表示光子吸收越多,组织血红蛋白浓度越高;颜色越偏向蓝色表示血光子吸收越少,组织总血红蛋白越低。从图1可见乳腺癌的颜色偏红、乳腺良性疾病的颜色偏蓝。131例乳腺良性肿块的SDI值为:(109.35±48.03),142例乳腺癌的SDI值为:(190.87±60.33),两者之间的差别有统计学意义($t=-12.753$,$P<0.05$)。

2.2 超声光散射SDI值的ROC分析

通过受试者工作特征曲线(ROC曲线),确定SDI值>141.2作为乳腺癌的最佳诊断阈值。其灵敏度:83.8%、特异度:87%、阳性预测值:87.5%、阴性预测值:78.1%、准确率85.35%。

2.3 乳腺癌组织HIF-1α表达与SDI值的关系

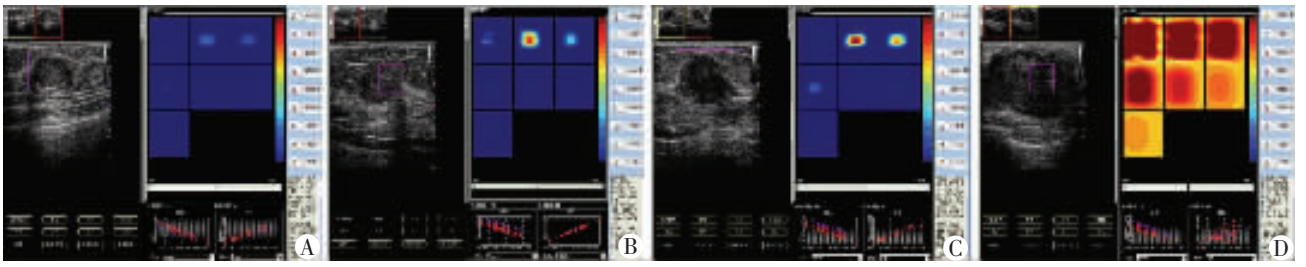
HIF-1α主要表达于乳腺癌细胞核和/或细胞质中。HIF-1α的阳性表达率为53.52%。HIF-1α表达阴性的SDI值(161.37±53.36)和HIF-1α表达阳性的SDI值(216.47±54.28)之间的差别有统计学意义($P<0.01$)。见图2。

2.4 乳腺癌MVD值与SDI值的关系

CD105主要表达于肿瘤新生血管的血管内皮细胞上,而在正常组织血管内皮细胞上中很少表达。乳腺癌的MVD均值为(39.28±11.72)。经相关分析可得SDI值与MVD值呈直线相关($r=0.673$,$P<0.001$),直线回归分析,$R^2=0.453$,直线回归方程为:$y=14.345+0.131x$。见图2。

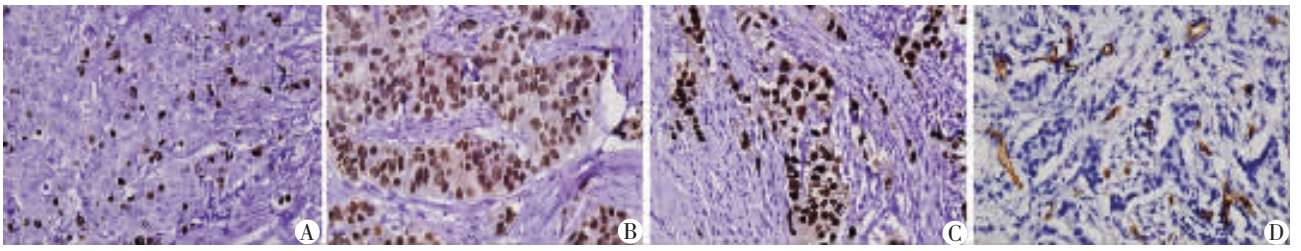
2.5 乳腺癌HIF-1α表达与MVD的关系

HIF-1α表达阴性和阳性乳腺癌的MVD值分别为:(35.59±10.99)、(42.49±11.44),两者之间的差别有统计学意义($P<0.01$)。



A：乳腺纤维腺瘤 SDI 值：57.78；B：Ⅰ期乳腺癌 SDI 值：132.65；C：Ⅱ期乳腺癌 SDI 值：169.62；D：Ⅲ期乳腺癌 SDI 值：208.69

图 1　乳腺肿块超声光散射断层成像的表现



A：HIF-1α 在Ⅰ期乳腺癌中的弱阳性表达；B：HIF-1α 在Ⅱ期乳腺癌中的强阳性表达；C：HIF-1α 在Ⅲ期乳腺癌中的强阳性表达；D：CD105 在乳腺癌血管内皮细胞上的表达

图 2　HIF-1α 和 CD105 标记的 MVD 在乳腺癌中的表达　（S-P ×400）

2.6　乳腺癌 SDI 值、HIF-1α 表达与临床病理关系

乳腺癌超声光散射 SDI 值、HIF-1α 表达与乳腺癌大小、淋巴结转移、TNM 分期、CerbB-2 表达有关（$P<0.05$）与 ER、PR 表达无关（$P>0.05$）。见表 1。

表 1　超声光散射 SDI 值及 HIF-1α 表达与乳腺癌的临床病理关系

临床病理参数	例数	SDI	F/t	P	HIF-1α		χ^2	P
					−	+		
肿瘤大小								
≤2 cm	54	155.85±54.86	24.722	0.000	33	21	8.733	0.013
>2 cm～≤5 cm	66	202.08±52.86	0.000[a]	0.000[a]	27	39		
>5 cm	22	243.16±42.27	0.005[b]		6	16		
淋巴结转移								
有	62	216.48±60.09	4.788	0.000	20	40	7.218	0.007
无	80	171.01±52.87			46	36		
TNM 分期								
Ⅰ～Ⅱ	103	176.68±56.168	−4.909	0.000	57	46	11.837	0.001
Ⅲ～Ⅳ	39	228.31±55.29			9	30		
ER								
−	64	187.88±61.42	−0.532	0.596	27	37	0.863	0.212
+	78	193.31±59.72			39	39		
PR								
−	62	195.80±57.44	0.857	0.393	25	37	1.677	0.195
+	80	187.04±62.584			41	39		
CerbB-2								
−	76	163.24±45.06	−7.433	0.000	47	29	15.515	0.000
+	66	226.31±55.99			19	47		

a：$P<0.01$，与≤2 cm 肿瘤 SDI 值之间的比较；b：$P<0.01$，与 >2 cm～≤5 cm 肿瘤 SDI 值之间的比较

3　讨论

超声光散射断层成像系统是由超声成像子系统和光散射成像子系统构成的双模式融合系统。该系统充分利用激光对血液的高敏感性以及超声波的高空间分辨率，量化肿瘤的功能特征与形态特征，并将肿物光学信息与超声信息相结合，得出综合诊断指数，达到对乳腺肿块的鉴别诊断。与传统的钼靶、超声、近红外线检查等检查手段相比较，能更全面地获得乳腺肿瘤的性质状态。尤其对于早期乳腺癌，形态学变化不典型时，可通过对乳腺肿块血液含量异常的发现达到对乳腺癌的早期诊断。

本研究通过对 131 例乳腺良性肿块和 142 例乳腺癌的研究发现，SDI 值在两者之间存在着较大差别（$P<0.05$）。说明乳腺良、恶性肿块间的超声光散射表现有较明显的差异。进一步对所研究对象的 SDI 值行 ROC 曲线，其灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值以及准确率均较高。美国学者 Zhu 等[2] 在美国进行的临床研究显示该技术诊断乳腺癌的灵敏度高达 100%，特异度 96%。说明该技术对于乳腺癌的鉴别诊断具有良好的价值。

肿瘤的血管生成在肿瘤的发生、发展中具有重要作用，与肿瘤的生长、浸润、转移和复发密切相关。肿瘤的微血管总面积增大，肿瘤内血流速度变慢，癌细胞代谢旺盛，耗氧量大，造成了肿瘤内部呈现“血含量高、氧含量低”的特殊现象。超声光散射成像系统对于肿瘤内部的血液含量及缺氧有较高的敏感性。相关文献研究显示乳腺癌肿块以近红外线高血、低氧检测参数作为判断恶性肿瘤的标准是可靠的[3-5]。肿瘤微

血管密度是衡量肿瘤血管形成程度的标志。但无法在术前对血管生成状态作出评估。超声光散射断层成像系统可反映乳腺肿块的血液含量及代谢状态。本研究结果显示：乳腺癌SDI值与MVD值之间呈正相关($r=0.673$，$P<0.05$)。说明SDI值与肿瘤血管生成密切相关，通过SDI值的测定可术前评估乳腺癌的血管生成活性。这与黄烨等[3]的研究结果相类似。

肿瘤细胞的快速生长导致肿瘤组织缺氧从而促进了缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1，HIF-1)的产生。缺氧诱导因子-1是一种核转录因子，其功能亚基HIF-1α通过结合缺氧反应原件(HREs)增强下游靶基因VEGF、葡萄糖转运因子、糖酵解酶等基因的合成，从而在肿瘤血管生成、能量代谢肿瘤发展中起重要作用[6-7]。HIF-1α是VEGF基因上游的重要表达调控因子，它不仅促进VEGF转录，而且增加VEGF mRNA的稳定性从而促进血管的生成。本研究显示：HIF-1α表达阳性乳腺癌MVD值大于HIF-1α表达阴性乳腺癌的MVD值($P<0.05$)，说明乳腺癌HIF-1α表达与肿瘤血管生成密切相关。超声光散射系统可以对乳腺病变组织内部氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白浓度、及血氧饱和度(SO_2)度的测定反映术前病变组织内氧含量状态。本研究结果显示：HIF-1α表达阳性乳腺癌SDI值大于HIF-1α表达阴性乳腺癌的SDI值($P<0.05$)。推测可能与乳腺癌组织缺氧以及HIF-1α促进VEGF的产生、导致肿瘤组织血管生成增多有关。

本实验进一步研究了乳腺癌超声光散射SDI值和HIF-1α表达与临床病理特征之间的联系。结果显示：SDI值以及HIF-1α表达与乳腺癌的大小有关，肿瘤越大，SDI值越高，HIF-1α阳性表达率越高($P<0.05$)。SDI值、HIF-1α表达与乳腺癌的淋巴结转移、TNM分期有关有关，有淋巴结转移的病变、Ⅲ～Ⅳ期乳腺癌其SDI值，HIF-1α阳性率高于无淋巴结转移的病变以及Ⅰ～Ⅱ期的乳腺癌($P<0.05$)。说明肿瘤组织快速生长引起肿瘤组织缺氧并促使HIF-1α表达增多，进而促进了肿瘤血管的生成，为肿瘤生长提供更多的营养，进一步促进肿瘤的继续增长。肿瘤血管生成促进淋巴结转移可能的机制是：新生血管的生成使肿瘤间质内液体量和压力增高，加快淋巴回流，促进了肿瘤的淋巴结转移；并且肿瘤血管生成利于肿瘤细胞侵入邻近与毛细血管伴行的淋巴管，或通过淋巴静脉直接进入淋巴管，从而导致淋巴转移的增加[8]。乳腺癌的SDI值、HIF-1α阳性率与ER、PR表达无关($P>0.05$)。而与CerbB-2表达有关，CerbB-2阳性的乳腺癌SDI值、HIF-1α阳性率高于CerbB-2阴性的乳腺癌($P<0.05$)。Li等[9]认为CerbB-2的过度表达可激活PI3K/Akt，增强HIF-1α和HIF-1β亚单位间的亲和力，进一步促进Akt与HIF-1β相互作用，调节HIF-1的活性。Semenza等[10]在CerbB-2过表达的肿瘤组织中，也发现HIF-1的表达上调。说明CerbB-2的过度表达可能与肿瘤的血管生成、肿瘤组织的缺氧有关。

综上所述，超声光散射诊断系统是基于肿瘤的发生、发展与肿瘤血管生成密切相关并结合了光散射和超声检查的优点而设计的一种功能成像技术。本研究通过对乳腺癌超声光散射综合诊断指数与乳腺癌微血管密度密以及HIF-1α表达的研究，进一步说明了该技术和血管生成的关系，并可能对乳腺癌病情发展状态做出一定判断，对乳腺疾病的诊断及治疗做出一定的指导。超声光散射作为一项功能成像技术具有广阔的前景。

参考文献：

[1] 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.

[2] Zhu Q, Cronin E B, Currier A A, *et al*. Benign versus malignant breast masses: optical differentiation with US-guided optical imaging reconstruction[J]. Radiology, 2005, 237(1): 57-66.

[3] 黄烨，陈登峰，袁璐，等. 乳腺肿块微血管密度与血氧近红外光参数的实验研究[J]. 肿瘤防治研究，2007，34(1)：51-53.

[4] Shah N, Cerussi A E, Jakubowski D, *et al*. The role of diffuse optical spectroscopy in the clinical management of breast cancer[J]. Dis Markers, 2003-2004, 19(2/3): 95-105.

[5] Zhu Q, Huang M, Chen N, *et al*. Ultrasound-guided optical tomographic imaging of malignant and benign breast lesions: initial clinical results of 19 cases[J]. Neoplasia, 2003, 5(5): 379-388.

[6] Ruan H, Wang J, Hu L, *et al*. Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX[J]. Neoplasia, 1999, 1(5): 431-437.

[7] Turner K J, Moore J W, Jones A, *et al*. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2957-2961.

[8] 孙乐刚，刘玲，冯红超，等. 血管细胞粘附分子-1在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与血管生成的关系[J]. 现代口腔医学杂志，2007，21(3)：267-270.

[9] Li Y M, Zhou B P, Deng J, *et al*. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3257-3263.

[10] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

(收稿：2010-11-26 修回：2011-01-14)

(编辑 吴培红)