基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0413-04

卵巢上皮性肿瘤中三维能量超声血流成像与 MVD、CD146 表达的研究

张龙云,孙 彤
(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:为了研究三维能量超声测定卵巢肿瘤的血流成像与微血管密度、CD146 表达的关系。方法:应用三维彩色血管能量成像(3D color power angiography,3D-CPA)检测 46 例卵巢肿瘤血流,采用免疫组织化学技术检测卵巢肿瘤组织中 CD146 的表达及微血管密度(Microvessel density,MVD)的情况。结果:卵巢恶性肿瘤组血流分级明显高于良性组血流分级。卵巢恶性肿瘤 MVD(42.71 ± 8.40)/400 倍视野,明显高于良性组(19.48 ± 5.09)/400 倍视野($P<0.01$)。恶性组 CD146 表达高于良性组($P<0.01$)。相关分析显示血流分级与 MVD、CD146 呈正相关($P<0.05$)。结论:3D-CPA 为临床鉴别良恶性卵巢肿瘤提供了敏感的血流信息,且 3D-CPA 血流特性与 CD146 表达存在正相关,CD146 过度表达与卵巢癌的进展、转移有关。

【关键词】卵巢肿瘤;三维能量多普勒超声;微血管密度;免疫组织化学
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-14

3D color power angiography in ovarian tumors and its relationship to MVD, CD146 expression

ZHANG Long-yun, et al
(*Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the relationship between the blood flow, microvessel density (MVD) and expression of CD146 in ovarian tumor. *Methods*: Blood flow signals of ovarian carcinoma were preoperatively detected by three diamensions color power angiography (3D-CPA) in 46 patients. MVD, and expression of CD146 in tumor were assessed immunohistochemically. *Results*: Blood flow grade in ovarian cancer group was significantly higher than that in benign group. The expression of MVD in ovarian cancer group (42.71 ± 8.40) was significantly higher than that in benign group (19.48 ± 5.09) ($P<0.01$). And the expression of CD146 in ovarian cancer group was higher than that in benign group. Correlation analysis showed that there was a positive correlations between blood flow grade and MVD, CD146. *Conclusion*: 3D-CPA provides sensitive flow information for differentiating epithelial ovarian tumors. CPA flow features corresponds to CD146 protein expression of ovarian epithelial arcinoma. High CD146 expression are related to metastatic vascular invasion and poor differentiation.

【Key words】Ovarian tumor; Three dimensional color power angio; Microvessel density; Immunohistochemisty

卵巢癌死亡率居妇科恶性肿瘤之首,在卵巢恶性肿瘤中上皮性卵巢癌发病率最高。恶性肿瘤的一系列特征均与其间质血管生成密切相关。本研究术前应用三维彩色血管能量成像(3D color Doppler angio imaging,3D-CPA)检测卵巢肿瘤组织中的血流,术后应用免疫组化法检测卵巢肿瘤组织中 CD146 的表达及微血管密度(Microvessel density,MVD)的情况,旨在探讨 CPA 血流与 CD146 的表达及 MVD 的关系,评价其临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 对象

选取 2007 年 1 月至 2007 年 12 月重庆医科大学附属第一医院妇产科卵巢上皮性肿瘤患者,恶性卵巢上皮性肿瘤 30 例,其中卵巢浆液性囊腺癌 22 例,粘液性囊腺癌 8 例,患者平均年龄 51.0 岁(15 ~ 80 岁);交界性上皮性肿瘤组织 6 例,平均年龄 42.5 岁(30 ~ 65 岁);良性卵巢上皮性肿瘤 10 例,平均年龄 39.0 岁(16 ~ 58 岁)。患者术前均未行介入治疗或化疗,手术切除后立即切取 1.0 cm × 1.0 cm 肿瘤组织,

作者介绍:张龙云(1980-),男,医师,硕士,
研究方向:超声医学。
通讯作者:孙 彤,女,教授,E-mail:suntg98@163.com。

固定、石蜡包埋。全部标本均经手术及病理证实。按照国际妇产科联盟 1988 年分期标准，Ⅰ期 3 例，Ⅱ期 7 例，Ⅲ期 10 例，Ⅳ期 10 例。

1.2 仪器与方法

仪器采用 GE 公司 Voluson Expert 730 彩超仪，三维容积探头。全部病人在术前 1 周内行超声检查。先行二维超声多切面扫查盆腔，二维切面观察肿块大小、形态、内部回声及附壁乳头大小，有无腹水及周围脏器浸润情况，彩色多普勒血流显像多切面观察肿块周边及内部血流情况。然后用彩色多普勒能量图观察病灶周边及其内部血流，保持容积探头在腹壁位置不变，嘱患者屏住呼吸，启用 3D/4D 功能键，使用三维显像方式，自动扫描和计算机三维重建。取样容积的大小根据观察范围而改变，一次成像时间为 8～12 s。扫描结束后，通过对 A、B、C 3 个切面进行角度、中轴点、方向的调整，获取最佳立体视觉效果的 3D—CPA 图像。三维能量多普勒图像定量分析使用 VOCAL（Virtual organ computer-aid analysis）软件中的三维能量多普勒进行分析，计数肿瘤区域血管总条数（包括肿瘤周边及内部血管）。如血管走行无分支，则计为一支；如有多个分支，则以末梢血管分支数为计测标准。然后计算肿瘤血管指数（Vasculary index，VI），即单位体积内血管的条数（条/cm^3），作为反映肿瘤血管丰富程度的指标与 3D-CPA 定量分析的标准。

3D-CPA 血管分型标准：根据肿瘤血管的分布、走行、分支情况等特点，参考文献[1]将肿瘤的血管分为 4 级：0 级，肿瘤周边及年内部均未见血流信号；Ⅰ级，肿瘤周边可见点、线样血流，内部未见血流信号；Ⅱ级，除周边血管外，肿瘤内部可见稀疏的血管，血管分支简单，走行较平直；Ⅲ级，肿瘤内部可见丰富的血管树或血管网，血管分支复杂，血管走行迂曲不规则，肿瘤周边可见血管包绕。

1.3 免疫组化检测 MVD、CD146 表达。

1.3.1 所用试剂鼠抗人 CD146 单克隆抗体（英国 Novocastra 公司）或兔抗人 CD34 多克隆抗体（武汉博士德生物公司）DAB 试剂盒、免疫组化 SP 试剂盒（北京中杉生物公司）。

1.3.2 免疫组化染色步骤 参照试剂盒说明进行。用已知的卵巢癌组织切片作为阳性对照，用磷酸盐缓冲液代替一抗，作为阴性对照。

1.3.3 结果判断 (1) MVD 计数方法及结果判定：先在 100 倍显微镜下扫描整个切片，选择 4 个血管密度最高区，然后在 400 倍视野下计数每个区中 1 个视野的微血管数目，结果以 4 个视野微血管数目的平均数来表示。任何被染成棕褐色的内皮细胞或内皮细胞丛均作为 1 个微血管计数，血管腔大于 8 个红细胞者不进行计数。(2) CD146 阳性判定：CD146 以胞质和胞膜呈棕黄色染色为阳性。阳性和阴性表达根据细胞染色强度和染色细胞占面积百分比，两者积分之和来判断。染色强度分为：0 分为无着色，1 分为浅黄色，2 分为黄色，3 分为棕黄色。染色面积分为：无细胞染色为 0 分，细胞染色 <25% 为 1 分，细胞染色 25%～50% 为 2 分，>50% 为 3 分。两种积分相加：阴性（-）为 0 分，弱阳性（+）为 1～2 分，阳性（++）为 3～4 分，强阳性（+++）为 5～6 分。若两者之和 >2 分为阳性表达，≤2 分为阴性表达。

1.4 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用方差分析进行检验；计数资料、等级资料采用 χ^2 检验；应用方差分析与 χ^2 检验分析血流等级、VI 与 MVD、CD146 表达等多项指标间的相关关系，使用 SPSS13.0 统计软件进行。

2 结 果

2.1 卵巢肿瘤的 3D-CPA 血流特点

本组 30 例上皮性卵巢癌中，3D-CPA 以Ⅲ级血流为主，占 80%（24/30），Ⅱ级占 13.33%（4/30），Ⅰ级占 6.67%（2/30）。交界性卵巢肿瘤以Ⅱ级血流为主，占 50%（3/6），Ⅲ级占 33.33%（2/6），Ⅰ级占 16.67%（1/6）。良性卵巢肿瘤以Ⅰ级血流为主，占 70%（7/10），Ⅱ级占 30%（3/10）。良、恶性卵巢肿瘤的血流分级比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。30 例卵巢癌患者 VI 平均为 0.072±0.019 条/cm^3，10 例良性肿瘤患者 VI 平均为 0.024±0.011 条/cm^3，两组差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 免疫组化染色结果

卵巢上皮性肿瘤中的 MVD 值：30 例恶性卵巢上皮性肿瘤的 MVD 值为 42.71±8.40。10 例良性卵巢上皮性肿瘤的 MVD 值为 19.48±5.09。恶性卵巢上皮性肿瘤的 MVD 值明显高于良性卵巢上皮性肿瘤（$P<0.05$）。卵巢上皮性肿瘤中 CD146 表达：CD146 阳性颗粒主要定位肿瘤细胞胞质和胞膜，恶性卵巢肿瘤 CD146 的阳性表达率 63%，明显高于良性组（20%），差异亦有统计学意义（$P<0.05$），而恶性组和交界组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。在不同组织学类型（浆液性囊腺癌和粘液性囊腺癌）间 CD146 表达水平差异无统计学意义。卵巢肿瘤组织中 CD146 阳性表达组的 MVD 显著高于 CD146 阴性表达组。

2.3 卵巢上皮性肿瘤 3D-CPA 与 MVD、CD146 表达的关系

经统计学检验，不同血流分级 MVD 值差异具有显著性（$P<0.05$），随着血流分级的增高，MVD 值随之增高；3D-CPA 定量分析 VI 与 MVD 之间存在相关性（$r=0.80$，$P<0.01$）。Ⅲ级血管分型的 CD146 染色强度高于Ⅰ、Ⅱ级，血流分级与 CD146 表达呈正相关（表 2）。

表 1 卵巢肿瘤多普勒血流参数与 MVD、CD146 表达

类型	3D-CPA(例)			血管指数 VI	MVD	CD146 表达数(例)	
	Ⅰ级	Ⅱ型	Ⅲ型	（条/cm³）	（$\bar{x}\pm s$）	阴性	阳性
浆液性囊腺癌	1	3	18	0.073 ± 0.015	43.43 ± 7.23	7	15
粘液性囊腺癌	1	1	6	0.069 ± 0.028	41.20 ± 8.32	3	5
交界性	1	3	2	0.059 ± 0.023	31.45 ± 7.30	3	3
良性	6	3	1	0.024 ± 0.011	19.48 ± 5.09	8	2

表 2 上皮性卵巢肿瘤中 3D-CPA 血流分级与 MVD、CD146 的表达

血流分级	MVD	CD146	
		阴性	阳性
Ⅰ	21.4 ± 5.17	7	2
Ⅱ	36.2 ± 7.52	6	4
Ⅲ	45.9 ± 5.83	8	19

3 讨 论

90%的卵巢恶性肿瘤是卵巢上皮性癌，而卵巢癌早期诊断困难。但是，随着各种医学影像技术的发展，不仅可宏观显示病变的图像改变，还可定量分析肿瘤的血管生成情况。3D-CPA 是近年来发展起来的以能量方式显示血管内血流的彩色多普勒技术，能提高信噪比，不受流速、探测角度的影响，能敏感探测恶性肿瘤血管的异常结构，还可以对超声重建后的肿瘤血管进行定量测量。本实验中恶性肿瘤 24 例（80%）表现为Ⅲ型血流分布，显示出粗大、弯曲的肿瘤供血动脉环绕瘤体，并从周边进入肿瘤中心，肿瘤内血管丰富，有不规则增粗的肿瘤血管和动静脉瘘；而良性肿瘤多为周边型血流，10 例良性肿瘤中仅 1 例表现为Ⅲ型，肿瘤内血流呈点状、短线状血管走行规则。

3D-CPA 通过多切面观察和旋转可更细致地评价卵巢肿瘤内新生血管的结构特征，显示出良恶性肿瘤血管空间结构的差异，为肿瘤的定性诊断增加了一个新的参考指标。有研究[1]表明 3D-CPA 对卵巢肿瘤血管结构的定性分析结合形态学参数在临床上诊断敏感性、特异性分别能达到 100%、99.8%。

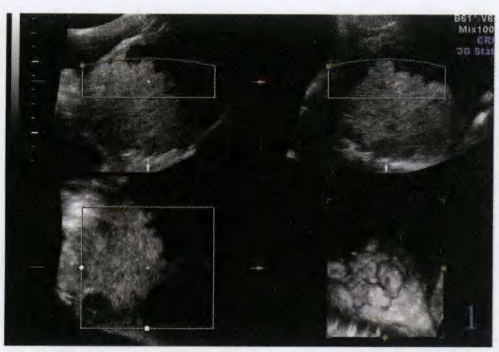


图 1 为浆液性囊腺癌的三维超声图像，可直观的看到内壁有一较大的实性乳头状突起

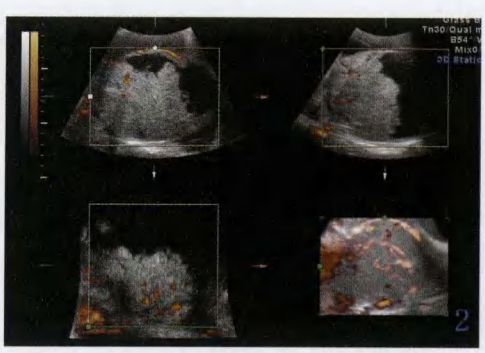


图 2 为同一患者的三维能量血流图像

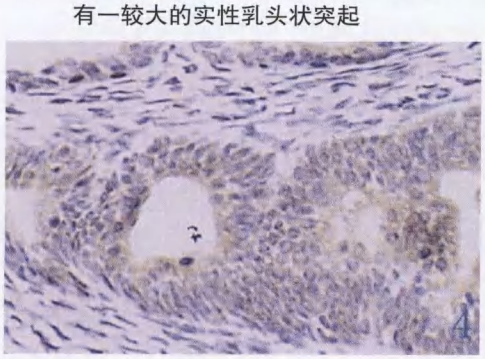


图 3 为浆液性囊腺癌 CD34 阳性表达（SP×400）

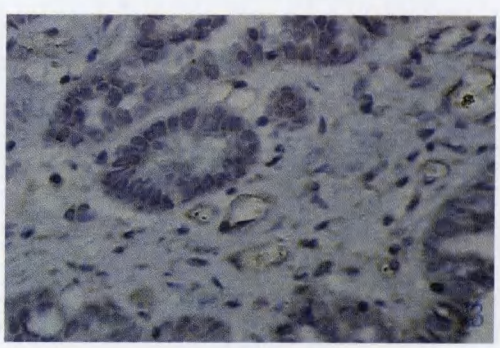


图 4 为粘液性囊腺癌 CD146 阳性表达（SP×400）

Kupesic S [2]应用三维超声结合 3D-CPA 对 43 例Ⅰ期卵巢癌病人检查，达到 97%的检出率，高于仅用三维超声的检出率 74%。

MVD 是目前衡量肿瘤新生血管程度的常用指标，也是反映恶性肿瘤生物学行为的重要参考指标。本研究显示卵巢恶性肿瘤中 MVD 高于交界性肿瘤、交界性肿瘤 MVD 显著高于良性肿瘤，表明卵巢肿瘤生长依赖于新生血管的生成。MVD 与血流分级和病理分化有关，随着肿瘤分化程度降低，组织内微血管生成增多，血供丰富程度增大，与 Czekierdowski A [3]报道的一致。Raspollini 等[4]研究表明浆液性卵巢癌组织的 MVD 与患者的总生存期和无病生存期相关，对于生存和疾病复发是独立的预后因素。MVD 表达可反映卵巢肿瘤组织内微血管生成情况，而 3D-CPA 血流检测可直接观察活体卵巢肿瘤组织中微血管生成情况。

CD146 是最近确定的 Ig 基因超家族成员，为一单拷贝基因，位于人 11 号染色体长臂上，由 16 个外显子组成，跨越大约 14 kb 的染色体区。Aldovini [5]用免疫组化和 Western blot 检测发现 CD146 的表达从正常卵巢组织到卵巢上皮性肿瘤组织逐渐增高，本研究表明，CD146 在恶性卵巢肿瘤组织中的阳性率高于良性卵巢肿瘤组织中的阳性表达率，而且恶性卵巢肿瘤组织中 CD146 表达强度与血流分级呈正相关，CD146 阳性表达组的 MVD 高于阴性组的 MVD($P<0.05$)，说明 CD146 的阳性表达率与肿瘤的血管生成、肿瘤的恶性变有关。目前认为 CD146 参与肿瘤进展的机制首先是 CD146 促进肿瘤细胞间的同型粘附，使得瘤细胞成簇群集，有利于肿瘤的生长和转移[6]；其次是肿瘤细胞上共表达 CD146 及其配体，使内皮细胞活化，从而上调内皮细胞上其他粘附分子的表达，产生粘附分子介导的级联反应，随后肿瘤细胞通过损伤的血管内皮细胞外渗[7]。阎锡蕴等[8]把 CD146 单抗经腹腔注入小鼠平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌模型中，观察 4 周，发现 3 种肿瘤在小鼠体内都有明显缩小，并伴有肿瘤组织中微血管密度的降低，提示 CD146 能促进肿瘤生长和血管新生。CD146 调节肿瘤血管形成的可能机制是激活了基质金属蛋白酶 2，后者能够降解基膜和细胞外基质[8,9]。

本研究结果显示，在 MVD 高表达组中，3D-CPA 血流分级、Ⅵ均高于 MVD 低表达组，MVD 与 3D-CPA 血流分级、Ⅵ具有相关性；3D-CPA 血流分级与 CD146 表达相关。3D-CPA 血流分级、Ⅵ均是反映超声检测血流丰富程度的指标，可宏观显示，这些参数与 MVD 及 CD146 微观指标有密切联系，提示 CD146 在促进肿瘤血管生成方面可能有重要作用。

本研究中不足之处：(1)对上皮性卵巢肿瘤进行评估的样本量相对较少。(2)研究中获得的结果受仪器设备的影响。(3)3D-CPA 的血流评分系统受主观影响较大。将来，新的超声技术和新的肿瘤标记物将会改进卵巢肿瘤的诊断特异型，但是，要证明它们的有效性将需要大样本量病人的研究，还需进一步探索。

参 考 文 献

[1] Kurjak A, Kupesic S, Anic T, et al. Three-dimensional ultrasound and power Doppler improve the diagnosis of ovarian lesions[J]. Gynecologic Oncology, 2000, 76(1): 28-32.

[2] Kupesic S, Plavsic B M. Early ovarian cancer: 3-D power Doppler [J]. Abdom Imaging, 2006, 31(5): 613-619.

[3] Czekierdowski A, Szymanski M, Szumilo J, et al. Color Doppler blood flow measurements and microvessel density assessment in ovarian tumors [J]. Ginekol Pol, 2003, 74(9): 695-700.

[4] Raspollini M R, Amunni G, Villan ucci A, et al. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(5): 815-823.

[5] Aldovini D, Demichelis F, Doglioni C, et al. M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. Int Cancer, 2006, 119(8): 1920-1926.

[6] Lehmann J M, Riethmuller G, Johnson J. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 9891-9895.

[7] Shih I M, Speicher D, Hsu M Y, et al. Melanoma cell-cellinteractions are mediated through heterophilic Mel-CAM/Ligand adhesion [J]. Cancer Res, 1997, 57: 3835-3840.

[8] Yan X, Lin Y, Yang D, et al. A novel anti-CD146 monoclonalantibody, AA98, inhibit angiogenesis and tumor growth[J]. Blood, 2003, 102 (1): 184-191.

[9] Xie S, Luca M, Huang S, et al. Expression of MCAM/ MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2295-2303.

(责任编辑：冉明会)