

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.13.008
文章编号: 1005-8982 (2022) 13-0044-05

实验研究·论著

超声造影定量评估兔肝 VX2 肿瘤新生血管与 CD34、血管内皮生长因子的相关性研究*

程颖¹, 阮骊韬², 杨艳秋³

(1. 西安交通大学附属陕西省肿瘤医院, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第一附属医院, 陕西 西安 710061; 3. 青海省第五人民医院, 青海 西宁 810001)

摘要: 目的 分析兔肝 VX2 肿瘤超声造影(CEUS)定量参数与 CD34 和血管内皮生长因子(VEGF)的相关性, 深入探讨肿瘤血管生成基础与超声造影定量参数的关系。**方法** 应用超声引导下经皮穿刺种植法成功复制 24 只兔肝 VX2 肿瘤模型, 并通过 CEUS 动态观察肝肿瘤的进展过程, 测定肝肿瘤超声定量参数, 制作肝肿瘤标本并进行免疫组织化学染色, 判定 CD34 和 VEGF 的阳性表达水平, Pearson 法分析超声造影定量参数与 CD34、VEGF 的相关性。**结果** 兔肝 VX2 肿瘤 CEUS 对比剂强度、肿瘤组织与周围正常肝组织曲线增强上升斜率(AS)、达峰时间(TTP)、曲线下面积(AUC)与周围正常肝组织比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 对比剂强度、AS 及 AUC 均明显大于周围正常肝组织, VX2 肿瘤 TTP 明显短于周围正常肝组织; TTP 与 CD34、VEGF 呈负相关($P < 0.05$); 对比剂强度与 CD34、VEGF 呈正相关($P < 0.05$); AS 与 CD34、VEGF 呈正相关($P < 0.05$); AUC 与 CD34、VEGF 呈正相关($P < 0.05$)。**结论** CEUS 测定的各种灌注参数, 能够客观地反映肝肿瘤新生血管的生成情况及瘤内灌注特征, 为影像学评估肝肿瘤血管生成、预后及复发的相关研究提供参考。

关键词: 超声造影; 兔肝 VX2 肿瘤; CD34; 血管内皮生长因子

中图分类号: R445.1

文献标识码: A

Correlation evaluation of angiogenesis with CD34 and vascular endothelial growth factor in rabbit liver VX2 tumor evaluated by contrast-enhanced ultrasound*

Hao Cheng¹, Li-tao Ruan², Yan-qiu Yang³

(1. Shaanxi Cancer Hospital Affiliated of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061 China; 2. The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061 China; 3. The Fifth Hospital of Qinghai Province, Xining, Qinghai 810001 China)

Abstract: Objective To analyze the correlation between quantitative parameters of contrast-enhanced ultrasound(CEUS) and expression levels of CD34 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in rabbit liver VX2 tumors, and to explore the relationship between the basis of tumor angiogenesis and quantitative parameters of CEUS. **Methods** Twenty-four rabbits with VX2 liver tumors were successfully established by ultrasound-guided percutaneous puncture and implantation. The progression of liver tumors was dynamically observed by CEUS technique. The quantitative parameters of liver tumors were measured. Tumor specimens were prepared and analyzed by immunohistochemistry. The positive expression levels of CD34 and VEGF were determined. The quantitative indexes of contrast-enhanced ultrasound, microvessel density and vascular endotheliogenesis were

收稿日期: 2022-01-22

* 基金项目: 陕西省科技厅一般面上项目资助(No: 2020SF-163)

[通信作者] 杨艳秋, E-mail: yanqiyang86@126.com; Tel: 15319422128

determined. Long factor correlation analysis. **Results** Comparison of contrast agent intensity ($P < 0.05$), ascending branch slope(AS) between tumor tissue and surrounding normal liver tissue ($P < 0.05$), peak time (TTP) ($P < 0.05$), area under curve (AUC) ($P < 0.05$) showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The intensity of contrast agent strength, AS, and AUC were significantly higher than those of surrounding normal liver tissue. Peak reaching time TTP was negatively correlated with CD34 ($P < 0.05$) and VEGF ($P < 0.05$). Contrast agent strength was positively correlated with CD34 and VEGF ($P < 0.05$). The AS was positively correlated with CD34 and VEGF ($P < 0.05$). AUC under the curve was positively correlated with CD34 and VEGF ($P < 0.05$). **Conclusion** Quantitative analysis of perfusion parameters by contrast-enhanced ultrasound can objectively reflect the angiogenesis and intratumoral perfusion characteristics of hepatic tumors, and provide a reference for imaging evaluation of angiogenesis, prognosis and recurrence of hepatic tumors.

Keywords: contrast-enhanced ultrasound; rabbit liver VX2 tumor; CD34; vascular endothelial growth factor

肿瘤新生血管在肿瘤生长、转移及预后过程中具有关键作用^[1]。肿瘤新生血管的生成与血管内皮生成因子的释放密切相关,如 CD34、血管内皮生长因子(VEGF)等的表达促进新生血管形成,加快肿瘤的生长、浸润及转移^[2]。在肿瘤患者的长期随访与远期疗效评估过程中,组织学方法观察肿瘤新生血管是有创性的,多次重复测定不切实际。近年来影像学技术对肿瘤血管形态和功能的评估进展显著,通过影像手段反映肿瘤新生血管及瘤内微血管灌注情况已成为肿瘤诊断治疗的研究热点。其中超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)技术发展迅速。研究表明 CEUS 能够显示肿瘤血管灌注变化情况,是一种敏感且可靠的影像学手段^[3]。本实验通过观察兔肝 VX2 肿瘤的进展过程,分析 CEUS 定量参数与 CD34 和 VEGF 的相关性,进一步深入探讨肿瘤血管生成基础与 CEUS 定量参数的关系,为影像学准确地评估肝肿瘤血管生成、预后及复发的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LOGIQ E9 超声诊断仪和 ML6-15 高频探头购自美国 GE 公司,仪器配置低机械指数反向编码造影成像技术(coded phased inversion, CPI)。兔抗兔 CD34 多克隆抗体(一抗稀释浓度为 1:100)、兔抗兔 VEGF 多克隆抗体(一抗稀释浓度为 1:100)、即用型链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物模型复制

选择健康新西兰白兔 24 只,体重(2.5 ± 0.5)kg,

雌雄不限。手术剥离出荷瘤兔肝 VX2 肿瘤,选取肿瘤边缘生长旺盛的鱼肉样组织,制备成大小约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的肿瘤块。用 3% 戊巴比妥钠(剂量 30 mg/kg)经耳缘静脉麻醉接种兔后,在超声引导下,用穿刺针经皮经肝将肿瘤块接种于兔肝左叶深部位置,完成兔肝 VX2 肿瘤模型复制。术后正常饲养,预防感染。共复制 24 只兔肝 VX2 肿瘤模型,肿瘤种植成功后正常饲养 14 d,选取 24 个肿瘤灶进行观察。

1.3 CEUS 与定量分析

VX2 肿瘤植入 14 d 后 1 进行 CEUS 检查。启用 CPI 技术,Small Parts 造影模式。常规扫查选定兔肝肿瘤的最大中心切面行 CEUS 检查,将观察目标放置于屏幕中央,局部放大图像。使用 5 号头皮针建立耳缘静脉通道,制备 SonoVue 微泡混悬液,经耳缘静脉团注射 1 mL 混悬液后,随即快速注射 2 mL 生理盐水冲洗静脉通路。团注对比剂同时启动系统内存储计时器,实时、动态观察选定的肝肿瘤显影情况 2 min,所有影像资料存盘。对存盘图像进行 CEUS 定量参数分析。

利用 CEUS 定量分析软件,选取感兴趣区域(ROI)进行动态量化分析,选取肿瘤实质内或坏死周边显著增强的病灶区域,避开肿瘤内坏死液化的无增强区。选取周围肝组织时避开肝内大血管走行。仪器自动拟合出时间-强度曲线,软件自动计算并显示肿瘤组织与周围正常肝组织曲线增强上升斜率(AS)、对比剂强度、达峰时间(TTP)及曲线下面积(AUC)等 CEUS 定量参数。同一肿瘤及周围组织选择不同感兴趣区域重复测取 3 次,取其平均值。

1.4 免疫组织化学染色

24 只兔肝 VX2 肿瘤模型进行 CEUS 检查后立即处死荷瘤兔, 制作肿瘤标本并进行免疫组织化学染色。所有标本用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片、染色, 并采用 SABC 法进行免疫组织化学染色, 判定 CD34 和 VEGF 的表达水平。

1.4.1 CD34 的检测 肿瘤细胞染色呈棕黄色为 CD34 阳性细胞, 在低倍光镜下随机选取热点, 然后转换到 400 倍镜下随机选取 5 个热点视野计数阳性细胞, 计算每个视野中阳性细胞占总细胞数的百分率, 将其平均值作为 CD34 阳性细胞的表达率。CD34 阳性细胞表达分为: 0% ~ 30% 为弱阳性, > 30% ~ 70% 为阳性, > 70% ~ 100% 为强阳性。

1.4.2 VEGF 的检测 肿瘤细胞胞质中出现黄色、棕黄色、棕褐色颗粒为阳性细胞。随机选取 5 个热点视野, 高倍镜下计算每个视野中阳性细胞占总细胞数的百分率, 将其平均值作为 VEGF 阳性细胞的表达率。VEGF 阳性细胞表达率分级: 0% ~ 25% 为

I 级, > 25% ~ 50% 为 II 级, > 50% ~ 75% 为 III 级, > 75% ~ 100% 为 IV 级。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验; 相关性分析采用 Pearson 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

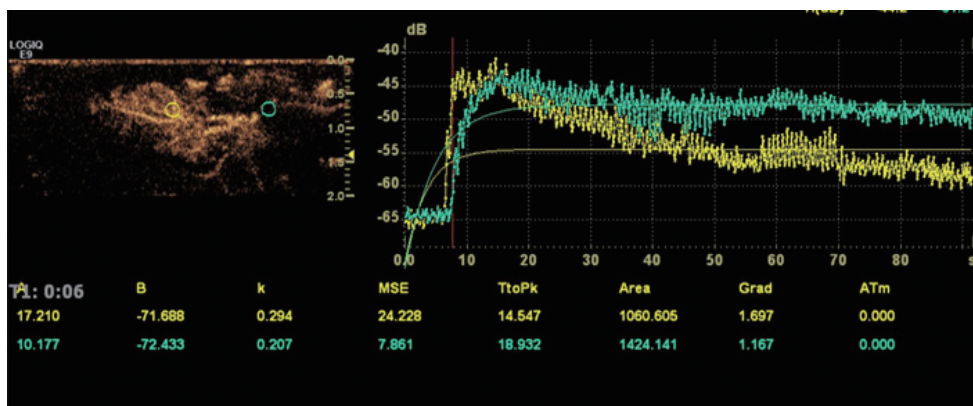
2 结果

2.1 肝肿瘤与周围正常肝组织 CEUS 参数比较

兔肝 VX2 肿瘤的对剂强度、AS、TTP、AUC 与周围正常肝组织比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 对比剂强度、AS 及 AUC 均明显大于周围正常肝组织, TTP 明显短于周围正常肝组织。本实验兔肝 VX2 肿瘤 CEUS 直观表现均呈“速升速降”特点, 肿瘤在动脉相呈整体显著增强, 瘤内出现液化坏死者表现为不均匀增强或环状增强, 坏死灶无增强。造影时间-强度曲线表现为动脉相上升支陡直, 快速达峰, 静脉相迅速下降。见表 1 和图 1。

表 1 兔肝 VX2 肿瘤与周围正常肝组织 CEUS 参数的比较 (n=24, $\bar{x} \pm s$)

组别	对比剂强度	AS	TTP	AUC
兔肝 VX2 肿瘤	15.30 ± 4.36	0.68 ± 0.43	12.86 ± 4.93	757.70 ± 242.73
周围正常肝组织	10.28 ± 5.12	0.36 ± 0.21	19.82 ± 4.42	953 ± 265.16
<i>t</i> 值	-5.912	-2.321	6.285	7.441
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000



黄色曲线为肿瘤组织时间-强度曲线, 绿色曲线为正常肝组织时间-强度曲线, 图上所示参数为个体定量分析参数。

图 1 兔肝 VX2 肿瘤与正常肝组织 CEUS 时间-强度曲线

2.2 免疫组织化学检查结果

兔 VX2 肿瘤 CD34 与 VEGF 表达均为阳性 (见图 2A、B), 其中弱阳性 5 个, 阳性 16 个, 强阳性 3 个。CD34 阳性表达的平均值为 (56.12 ± 6.72), VEGF 阳

性表达率的平均值为 (61 ± 24)%。VEGF 阳性细胞表达率 I 级: 0% ~ 25% 阳性细胞的肿瘤 5 个; II 级: > 25% ~ 50% 阳性细胞的肿瘤 6 个; III 级: > 50% ~ 75% 阳性细胞的肿瘤 10 个; IV 级: > 75% ~ 100% 阳

性细胞的肿瘤 3 个。见表 2。

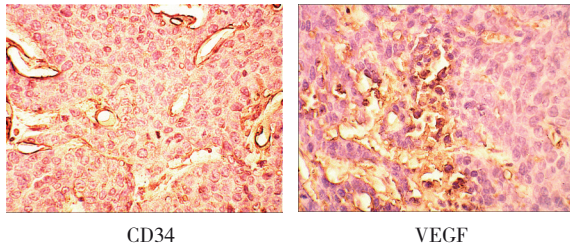


图 2 兔肝 VX2 肿瘤 CD34 和 VEGF 的表达
(SABC 染色 $\times 400$)

表 2 兔 VX2 肿瘤 CD34 与 VEGF 阳性表达结果

肿瘤灶	CD34 ($\bar{x} \pm s$)	VEGF
弱阳性 5 个	31.80 \pm 7.63	I 级 (0% ~ 25%)
阳性 6 个	53.67 \pm 5.92	II 级 (> 25% ~ 50%)
阳性 10 个	64.90 \pm 5.02	III 级 (> 50% ~ 75%)
强阳性 3 个	72.33 \pm 4.51	IV 级 (> 75% ~ 100%)

2.3 CEUS 定量指标与 CD34、VEGF 的相关性

CEUS 各定量指标中, TTP 与 CD34、VEGF 呈负相关 ($r = -0.843$ 和 -0.692 , 均 $P = 0.000$); 对比剂强度与 CD34、VEGF 呈正相关 ($r = 0.386$ 和 0.365 , 均 $P = 0.042$); AS 与 CD34、VEGF 呈正相关 ($r = 0.497$ 和 0.631 , 均 $P = 0.005$); AUC 与 CD34、VEGF 呈正相关 ($r = 0.425$ 和 0.485 , 均 $P = 0.016$)。

3 讨论

兔肝 VX2 肿瘤的生长特性类似于人类肝细胞癌, 其生长演变过程迅速, 肿瘤血供丰富, 被广泛用于肝肿瘤影像诊断、介入治疗等基础研究^[4-6]。近年来, 肿瘤精准治疗技术不断发展, 对肿瘤疗效和预后的判断需要更加准确的评估方法。

肿瘤的生长转移依赖于新生血管生成^[7], 因此对肿瘤新生血管的评估成为肿瘤研究的热点。肿瘤血管具有特殊的形态, 血管走形扭曲, 粗细不均并会生成较多异常分支, 结构特点也不同于正常组织血管, 其内皮细胞基底膜不完整, 没有平滑肌成分, 仅由有孔的内皮细胞和片状基膜结构组成, 导致肿瘤血管渗透性增加等, 这种异常的形态结构特点更加促进恶性肿瘤的生长、转移。因此有研究认为, 肿瘤新生血管的定量是一个重要的独立预后因素^[8]。

恶性肿瘤细胞还会分泌多种血管内皮生成因子, 如 CD34、VEGF、vWF、CD105 等, 血管内皮生成因子的释放促进了肿瘤血管的生成。肿瘤新生血管旺盛形成与多种血管内皮生成因子的高表达密切相关。因此在进行肿瘤新生血管计数时, 可采用 CD34、VEGF 等内皮细胞标志物定量法, 但此法具有损伤性且易受取材范围的影响。一直以来, 各种临床和基础实验都致力于找到一种安全有效、操作简便的技术用来精确评估肿瘤的生长和新生血管的生成。目前应用于临床和研究的主要有 CT 灌注^[9]、CEUS^[10]等影像学技术手段。

由于肿瘤血管特殊的形态结构特点, 造成肿瘤的血流灌注量和血容量明显高于正常组织, 超声对比剂是一种血池显影剂, CEUS 过程中对比剂能快速进入肿瘤, 并且快速廓清^[11]。CEUS 通过测定对比剂强度、AS、TTP、AUC 等参数, 反映肿瘤内对比剂灌注随时间变化的特点, 能够比较客观地评价肿瘤新生血管的生成和功能情况^[12]。

本实验兔肝肿瘤 CEUS 时间-强度曲线参数中, TTP 与 CD34 和 VEGF 表达具有较好的负相关性, AS 与 CD34 和 VEGF 呈正相关, 肿瘤血供越丰富, 对比剂的灌注速度越快, 对比剂所表示的肿瘤血流信号也更丰富^[13]。肿瘤动脉血液供应的多寡与新生肿瘤血管形成关系密切, 肿瘤新生血管是以血管生成因子为中介诱导产生, CD34 和 VEGF 等血管内皮生成因子的高表达与新生血管的旺盛程度密切相关, 因此 CEUS 参数在一定程度上能够客观地反映肿瘤血管内皮生成因子的表达水平。同时 AUC 与 CD34 和 VEGF 呈正相关, AUC 是流速、流量及时间三者的全面评估, 可较好地反映一定时间内局部组织造影增强的累积效应, 同时受血流速度的影响, 与局部血流量呈线性正相关^[14], 因此 AUC 能够综合反映肿瘤血管床的血流动力学情况^[15], 也表明 AUC 与肿瘤血管内皮生成因子的表达密切相关。

综上所述, 肿瘤的 CEUS 表现与肿瘤新生血管及血管内皮生成因子密切相关, CEUS 时间-强度曲线能够量化肿瘤血管内对比剂流速和流量的变化情况^[16], 从而更加客观地反映出肿瘤新生血管的生成情况及瘤内灌注特点, CEUS 定量参数也能够客观反映出肿瘤血管内皮生成因子 CD34 和 VEGF 表达水平。因此, CEUS 定量分析技术的应用实现了由

主观判断肿瘤强化程度到客观定量评价肿瘤血流灌注情况的转变。这种无创而实用的影像学技术在评价肿瘤微血管密度及抗肿瘤血管治疗疗效等方面具有重要的临床应用价值。

参 考 文 献 :

- [1] ZHANG L J, WU S, WANG M, et al. Quantitative dual energy CT measurements in rabbit VX2 liver tumors: comparison to perfusion CT measurements and histopathological findings[J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81(8): 1766-1775.
- [2] HICKLIN D J, ELLIS L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 10(5): 1011-1027.
- [3] PARK Y S, LEE C H, PARK P J, et al. Intraoperative contrast-enhanced sonographic portography combined with indigo carmine dye injection for anatomic liver resection in hepatocellular carcinoma: a new technique[J]. *J Ultrasound Med*, 2014, 33(7): 1287-1291.
- [4] GUAN L. Angiogenesis dependent characteristics of tumor observed on rabbit VX2 hepatic carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015, 8(10): 12014-12027.
- [5] YANG Y Q, RUAN L T, et al. CEUS in observation of rabbit liver VX2 tumor necrosis process[J]. *Chinese Journal of Interventional Imaging and Therap*, 2015, 12(4): 238-241.
- [6] LIU X L, LIU J, ZHANG Y J, et al. The application value of contrast-enhanced ultrasonography in early detection of hepatic VX2 tumor of rabbit[J]. *Technical Acoustics*, 2014, 33(2): 137-140.
- [7] ASABELLA A N, PALO A D, ALTINI C, et al. Multimodality imaging in tumor angiogenesis: presents tatus and prespectives[J]. *Int J Molecular Sci*, 2017, 18(9): e1864.
- [8] FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29: 15-18.
- [9] LIU Z J, LONG X Y, LIU H. Total liver CT perfusion imaging for evaluation on rabbit liver VX2 tumor perfusion and comparative analysis through immunohistochemistry[J]. *Journal of Central South University(Medical Scienc)*, 2016, 41(12): 1270-1277.
- [10] CHEN L, WEI X H, XU H G, et al. Comparison of perfusion imaging and microvessel density in rabbit models of hepatic VX2 tumors after high intensity focused ultrasound[J]. *Chin Magn Reson Imaging*, 2013, 4(4): 280-285.
- [11] DUAN Y Y, WANG J, YUAN L J, et al. Contrast-enhanced intraoperative ultrasound and microvessel density in patients with different pathological grades of cerebral gliomas[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2013, 39(5): S82.
- [12] LÉONARD L J, SÉBASTIEN R, VILLAVERDE E L, et al. Plane wave imaging for ultrasonic non-destructive testing: generalization to multimodal imaging[J]. *Ultrasonics*, 2016(64): 128-138.
- [13] HE Y, LI X J, ZHANG L. Role of ultrasound contrast time-intensity curves in hepatic tumor characterization and the evaluation of radiofrequency ablation effect[J]. *Chinese Journal of Medical Imaging*, 2013, 21(11): 844-848.
- [14] ZHANG X R, OUYANG J, et al. Quantitative evaluation of blood perfusion in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization by contrast-enhanced ultrasound[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2019, 27(4): 276-281.
- [15] MEI L L, NIE L, ZENG S. Application value of ultrasonic contrast and time-intensity curve in the radiofrequency ablation for the treatment of liver tumors[J]. *Chin J Diagnostics (Electronic Edition)*, 2018, 6(4): 226-231.
- [16] ZHU Y, ZHANG D, LI Y D, et al. Investigation of contrast-enhanced ultrasonography in uterine VX2 tumor of rabbits[J]. *Chinese Journal of Medical Ultrasound(Electronic Edition)*, 2014, 11(12): 1015-1020.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 程颢, 阮骊韬, 杨艳秋. 超声造影定量评估兔肝 VX2 肿瘤新生血管与 CD34、血管内皮生长因子的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(13): 44-48.

Cite this article as: CHENG H, RUAN L T, YANG Y Q. Correlation evaluation of angiogenesis with CD34 and vascular endothelial growth factor in rabbit liver VX2 tumor evaluated by contrast-enhanced ultrasound[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(13): 44-48.