

Advances of correlations between tumor angiogenesis and contrast-enhanced ultrasound

JIANG Hong-hong, LI An-hua*

(Department of Medical Ultrasound Cancer Center, Sun Yat-Sen University,
State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China)

[Abstract] Angiogenesis is the character of malignant tumors, microvascular density is not only the gold standard to evaluate tumor angiogenesis, but also correlative with tumorous grade. Contrast-enhanced ultrasound is one of the latest methods to evaluate tumor angiogenesis at present, which can evaluate in vivo angiogenesis by mensuring perfusion parameters. It can offer preoperative pathology and pathophysiology information to clinic. Furthermore, the index-evaluated angiogenesis has a significant correlation with microvascular density. So contrast-enhanced ultrasound can help predict prognosis and select treatment plan of anti-angiogenic therapy and exairesis et al.

[Key words] Contrast-enhanced ultrasound; Angiogenesis; Microvascular density; Vascular endothelial growth factor

肿瘤血管生成与超声造影成像相关性研究进展

江虹虹 综述, 李安华* 审校

(华南肿瘤学国家重点实验室暨中山大学附属肿瘤医院超声科, 广东 广州 510060)

[摘要] 血管生成是恶性肿瘤的重要特征, 微血管密度是评价肿瘤血管生成的金标准, 且与肿瘤的分级有很好的相关性。超声造影成为目前评价肿瘤血管的最新检查方法, 可通过测定各种灌注参数对活体肿瘤组织的微血管生成情况进行判断。不仅可以为临床提供术前更加丰富的病理学及病理生理学信息。同时其反映肿瘤血管的指标与肿瘤微血管密度具有较高的相关性, 从而为预测预后及抗肿瘤血管生成的疗法、手术切除等治疗方案的选择提供重要的依据。

[关键词] 超声造影; 血管生成; 微血管密; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R730.2; R730.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2007)03-0466-03

20 世纪 70 年代初, Folkman 首先提出“肿瘤生长和转移都依赖于新生血管的形成”的概念^[1], 并得到大量实验结果的证实, 目前这一概念已经形成共识。血管生成(angiogenesis)是指在原有微血管网的基础上通过内皮细胞的“芽生”方式形成新生血管的过程^[2]。在肿瘤内及周围的血管生成被认为是恶性肿瘤细胞增殖的前提^[3]。这些新生血管不但能够提供肿瘤细胞增殖所需的营养, 也为肿瘤细胞在体内的远处转移提供了通道^[3,4]。所以血管生成是恶性肿瘤的重要特征, 它的检出对于肿瘤的诊断、治疗与预后相当重要。微血管密度(microvascular density, MVD)即平均每平方毫米肿瘤面积内的血管数, 这一病理学指标被认为是评价肿瘤血管生成的金标准^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的最重要的血管生长因子, MVD 主要受 VEGF 表达水平的影响。就临床应用而言, MVD、VEGF 多在术后已切除的肿瘤组织标本中进行免疫组化测定

得出, 因此寻找一种无创、快捷、在活体上可重复实施、既能显示肿瘤解剖结构, 又能用于评价瘤血管生成、抗肿瘤血管生成疗效和预测预后的检查方法, 具有很高临床实用价值。近年来超声微泡造影剂的出现不仅开辟了检测微血管灌注的新路。造影增强超声检查是目前除了增强螺旋 CT、增强 MR 灌注成像外, 评价肿瘤血管的新型检查方法, 它不但简单、便宜、机动性和可重复性强, 并且特别有助于进行动物实验研究, 可通过测定各种灌注参数对活体肿瘤组织的微血管生成情况进行判断, 为临床提供术前更加丰富的病理学及病理生理学信息。

1 肿瘤血管的生成

肿瘤血管生成主要受血管生成因子和血管生成抑制因子的调节, 肿瘤细胞、内皮细胞和巨噬细胞受缺氧系统刺激等使局部微环境发生变化的因素作用而合成释放上述因子, 当血管生成因子和血管生成抑制因子的调节平衡被打破, 即发生血管生成过程^[6]。VEGF 是目前所知特异地作用于血管内皮细胞的一种生长因子, 是促进血管生成最直接最主要的正调节因子, 它强烈诱导血管形成^[7]。Park 等^[8]研究证实: VEGF 在肝细胞及 HCC 细胞中均见表达, VEGF 的表达强度与血管生成和细胞增殖能力相关。

[作者简介] 江虹虹(1979-), 女, 青岛人, 在读硕士。

E-mail: honghongjiang79@yahoo.com

[通讯作者] 李安华, 华南肿瘤学国家重点实验室暨中山大学附属肿瘤医院超声科, 510060。Email: lianhua58@126.com

[收稿日期] 2006-10-09 **[修回日期]** 2006-11-05

肿瘤生长存在两个阶段,即血管前期和血管期。肿瘤聚集体生成后即进入无血管生长期,通过弥散作用使肿瘤细胞获得足够的营养和氧,并运走代谢产物。当肿瘤体积增至 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 以上时,如无新生血管长入,肿瘤组织将保持休眠状态或发生退化^[9,10]。一旦新生血管长入肿瘤,血液供应变为灌注,肿瘤组织将快速生长并达到难以控制的体积。肿瘤新生血管不成熟,结构缺乏完整性和细胞间连接,管壁薄弱,仅排列一层内皮细胞,缺乏平滑肌,基膜不完整,因此通透性较高。新生血管为肿瘤细胞提供了转移通道。 1 cm^3 原发肿瘤每天约释放出 2×10^6 个肿瘤细胞进入血液循环,这些肿瘤细胞仅有极少数生成转移灶,转移灶的数目与进入血循环的肿瘤细胞数呈正比。此外,肿瘤血管化过快使间质内液体量和压力增高,加快淋巴回流,而后者亦为转移的基本途径。血管丰富的肿瘤有更高的转移率,其 MVD 已成为预测肿瘤转移、复发和判断预后的一项重要指标^[11]。另外有关肿瘤分级和诊断与其 MVD 的关系的研究也早已开始。1999 年 SUN 等报道肝癌内 MVD 与 5 年生存率成高度负相关,而与肿瘤大小、有无包膜、血清 AFP 水平、肝硬化程度等参数无关^[12]。

2 造影剂增强超声检查

超声造影剂(ultrasound contrast agents, UCA)是利用声波对气体反射比液体大近 1 000 倍的原理,使用含气微泡后超声回波信号增强,得到更高的对比分辨率,从而有利于疾病的诊断。至今,有关超声造影剂的研究已有近 30 年的历史^[13]。最常见的是经静脉注射直径与红细胞类似的微小气泡,它能增加来自血管的多普勒信号,有助于提高小血管的显示率,新型的特殊微气泡可以显示毛细血管水平。微泡增强彩色多普勒可以显示直径小到 $70 \mu\text{m}$ 的血管,这大大增强了非增强多普勒对微血管的检出能力。目前超声造影检查显示与测定肿瘤微血管及血流动力学定量的方法有:

2.1 能量多普勒检测肿瘤内彩色血管平均密度(MCVD) 即病人在注入造影剂后进行能量多普勒超声检查,获得肿瘤内彩色多普勒信号占肿瘤内总像素数量的比率(color pixel ratios),再与术后标本 MVD 比较,得出两者具有线性相关。Kabaki 等^[14]研究肾癌病人在注入造影剂后所得的 MCVD 与术后 MVD 两者具有统计学相关性,所以应用增强能量多普勒检查获得肿瘤内彩色多普勒信号比率能够术前定量肾癌的肿瘤血管。Shigeno 等^[15,16]经过直肠彩色多普勒测量前列腺癌灶内彩色像素强度(color pixel intensity)与术后组织切片所获 MVD 和免疫组化所获 VEGF 有统计学相关性,不难推断增强多普勒对肿瘤血管的高敏感性会得到更好的结果。

2.2 时间-强度曲线 多在术前行超声造影检查,利用计算机软件在感兴趣区获得时间-强度曲线,并与组织病理学比较。分析判断感兴趣区内血流灌注增强峰值、造影剂到达时间、效应持续时间、时间-强度曲线下面积、绝对和相对(比率)上升强度等等来鉴别肿瘤的良好性、区别弥漫性肝脏疾病与肝硬化、预报微转移等。Detlef Klein 等^[17]对 39 个病人的肝脏肿瘤应用定量动力学增强超声,并与组织病理学比较。利用专门的软件在造影剂注入肘静脉后进行血管增强的定量,这种软件可以允许在肿瘤内、肿瘤周边的肝实质和具有代表性的肝脏血管(肝动脉、静脉及门静脉)设置感兴趣区。分析判断肝动脉内、门静脉或肝脏晚期的血流灌注增强峰值。利

用 ROC 曲线分析,鉴别肿瘤的价值较造影前明显提高。Orden 等^[18]及 Giorgio Rizzatto 等^[19]分别对卵巢肿瘤、乳腺肿瘤的病人术前超声造影检查,并用特定的软件来获得定量数据和造影剂在肿瘤内通过的时间强度曲线,用来鉴别肿瘤的良好性。功能图像的另一项有用研究方法是分析微气泡首次通过肝循环的动力学特征。利用频谱多普勒信号强度的改变与微气泡的浓度成比例,可以测定时间与浓度的关系。肝硬化及恶性病变因为血管短路及肝血供的动脉血化,增强会提前出现^[20,21]。这项简洁的技术在区别弥漫性肝脏疾病与肝硬化时,当普通超声图像不能提供有助信息,否则需要采取肝穿刺时就显得特别实用。Lee 等^[22]通过超声造影计算了多普勒灌注指数。从当前对 90 例病人研究的数据来看,提示出现在普通超声正常的肝脏中的“正常”的晚增强的表现是非常安全的表现(所有的 90 例患者接下来都没有患病)。相反,所有出现异常“提前”增强表现的患者,接下来都出现了转移灶。

2.3 肿瘤分级和诊断与其微血管的关系 肝脏肿瘤由于其病理基础不同其超声造影的表现也有所不同。超声造影的特异性增强模式有很高的敏感性,且对于运动伪像不敏感,即使当微气泡静止不动时也能够检出造影剂的分布。因此,微泡的特异性分布模式能够显示毛细血管水平的微循环。肿瘤的增强模式与其血管构成、数目和分布有密切关系。如肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)由肝动脉和门静脉双重供血,以肝动脉供血为主。当肝癌以肝动脉供血为主时造影表现为肿瘤血管在动脉相从外周到内部的快速强化并迅速达到峰值,门脉相及晚期相回声降低^[23]。Nicolau C 等^[24,25]研究发现:典型 HCC 动脉相出现增强,也有一些肿瘤细胞分化好的 HCC 无早期增强而呈等回声改变;门脉相表现为低回声的病灶比等回声病灶的肿瘤细胞分化更差;实质相表现为等回声的病灶较低回声病灶的肿瘤细胞分化好。我们推测不同病理分级的 HCC 增强模式与其细胞分型、血管构成和 MVD 存在相关性。

3 肿瘤血管生成和超声造影检查的相关研究

随着影像学技术的发展及肿瘤治疗手段的进步,对肿瘤的诊断已经不能满足于单纯形态学的定位定性,因为在肿瘤发生病理解剖结构改变之前,首先发生的是功能性的改变,而肿瘤的生长和转移依赖持续性的血管生成,这些新生血管引起血容积、灌注量及毛细血管通透性的改变,这些均构成了影像学异常成像的基础^[26]。肿瘤的血管有以下特征^[27]:①血管数量明显增加;②血管形态发生变化,扭曲增粗,有异常的血管网状结构;③血管基底膜不完整,外周间隙大,通透性高。由于以上原因,单位时间内通过单位体积的造影剂数量必然增多,肿瘤的灌注容量明显增加。肿瘤的血管增生导致肿瘤组织外间隙的容量灌注和毛细血管通透性都增加,对比剂通过肿瘤血管的数量也之增加,这是增强 CT 或 MRI 异常成像的基础。与 CT 或 MR 造影剂不同,超声造影剂不会弥散到细胞间隙,是真正的血池显像剂,因此,超声造影应能更准确地反映肝局灶性占位的血供情况。目前世界上近 10 万例肝脏肿瘤声学造影结果表明超声造影与 CT/MR 的相关性高达 92%^[28]。超声造影灌注成像由于可以反映组织血流灌注情况,所以在检测肿瘤血管生成方面具有很大潜力,其通过测定各种灌注参数对活体内肿瘤组织的微血管生成情况进行判

断,临床上最初多用于判断肿瘤的良恶性。大量的临床研究结果表明,恶性肿瘤较良性肿瘤具有更早期、更高水平的强化,并且与 MVD 具有相关性。近年来,国内外学者对某些肿瘤的超声造影所得的各种灌注参数与免疫组化所得 VEGF 和 MVD 值之间进行了许多相关性研究,取得了一定进展^[14,29-31]。

由于超声检查无射线、方便、和价廉的特点,加上与 CT/MRI 相近似的诊断符合率,使得超声造影术快速在世界医学界受到关注。它利用超声微泡造影剂介导来发现疾病早期在细胞和分子水平变化,在检测肿瘤血管生成方面具有很大潜力,其通过测定各种灌注参数对活体内肿瘤组织的微血管生成情况进行判断,为肿瘤的诊断提供了新的途径和方法,同时其反映肿瘤血管的指标与肿瘤 MVD 具有较高的相关性,从而可初步评估肿瘤组织微血管的丰富程度,为预测预后及抗肿瘤血管生成的基因疗法、手术切除等治疗方案的选择提供重要的依据。

[参考文献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21):1182-1186.

[2] Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects[J]. J Mol Med, 1995, 73(7):333-346.

[3] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors[J]. Science, 1987, 235(4787):442-447.

[4] Folkman J, Long DM Jr, Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture[J]. Cancer, 1963, 16:453-467.

[5] Laforga JB, Aranda FI. Angiogenic index: a new method for assessing microvasculature in breast carcinoma with possible prognostic implications[J]. Breast J, 2000, 6(2):103-107.

[6] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3):353-364.

[7] Suzuki K, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(13):3004-3009.

[8] Park YN, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7):1061-1065.

[9] Kong HL, Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(4):273-286.

[10] Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy[J]. Cancer Metastasis Rev, 2000, 19(1-2):45-49.

[11] Cavallaro U, Christofori G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2):63-70.

[12] Sun HC, Christofori G. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(7):419-426.

[13] Gramiak R, Shah PM, Kramer DH. Ultrasound cardiography: contrast studies in anatomy and function[J]. Radiology, 1969, 92(5):939-948.

[14] Kabacki N, Igei E, Secil M, et al. Echo contrast-enhanced power Doppler ultrasonography for assessment of angiogenesis in renal

cell carcinoma[J]. J Ultrasound Med, 2005, 24(6):747-753.

[15] Shigeno K, Igawa M, Shiina H, et al. Transrectal colour Doppler ultrasonography for quantifying angiogenesis in prostate cancer[J]. BJU Int, 2003, 91(3):223-226.

[16] Strohmeyer D, Frauscher F, Klauser A, et al. Contrast-enhanced transrectal color doppler ultrasonography (TRCDUS) for assessment of angiogenesis in prostate cancer[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4B):2907-2913.

[17] Klein D, Jenett M, Gassel HJ, et al. Quantitative dynamic contrast-enhanced sonography of hepatic tumors[J]. Eur Radiol, 2004, 14(6):1082-1091.

[18] Orden MR, Jurvelin JS, Kirkinen PP. Kinetics of a US contrast agent in benign and malignant adnexal tumors[J]. Radiology, 2003, 226(2):405-410.

[19] Rizzatto G, Martegani A, Chersevani R, et al. Importance of staging of breast cancer and role of contrast ultrasound[J]. Eur Radiol, 2001, 11(Suppl 3):E47-51.

[20] Albrecht T, Blomley MJ, Cosgrove DO, et al. Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent[J]. Lancet, 1999, 353(9164):1579-183.

[21] Blomley MJ, Albrecht T, Cosgrove DO, et al. Liver vascular transit time analyzed with dynamic hepatic venography with bolus injections of an US contrast agent: early experience in seven patients with metastases[J]. Radiology, 1998, 209(3):862-866.

[22] Harvey CJ, Cosgrove DO, Eckersley RJ, et al. Can liver vascular transit time with bolus injections of the ultrasound contrast agent levovist predict the presence of occult metastases in colorectal cancer? [J]. Radiology, 2000, 217(P):396- .

[23] Jang HJ, Lim HK, Lee WJ, et al. Focal hepatic lesions: evaluation with contrast-enhanced gray-scale harmonic US[J]. Korean J Radiol, 2003, 4(2):91-100.

[24] Nicolau C, Bru C. Focal liver lesions: evaluation with contrast-enhanced ultrasonography[J]. Abdom Imaging, 2004, 29(3):348-359.

[25] Nicolau C, Catala V, Vilana R, et al. Evaluation of hepatocellular carcinoma using SonoVue, a second generation ultrasound contrast agent: correlation with cellular differentiation[J]. Eur Radiol, 2004, 14(6):1092-1099.

[26] Miles KA. Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review[J]. Eur J Radiol, 1999, 30(3):198-205.

[27] Less JR, Skalak TC, Sevic EM, et al. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions[J]. Cancer Res, 1991, 51(1):265-273.

[28] Harvey CJ, Albrecht T. Ultrasound of focal liver lesions[J]. Eur Radiol, 2001, 11(9):1578-1593.

[29] Forsberg F, Dicker AP, Thakur ML, et al. Comparing contrast-enhanced ultrasound to immunohistochemical markers of angiogenesis in a human melanoma xenograft model: preliminary results[J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(4):445-451.

[30] Forsberg F, Ro RJ, Potoczek M, et al. Assessment of angiogenesis: implications for ultrasound imaging[J]. Ultrasonics, 2004, 42(1-9):325-330.

[31] Iordanescu I, Becker C, Zetter B, et al. Tumor vascularity: evaluation in a murine model with contrast-enhanced color Doppler US effect of angiogenesis inhibitors[J]. Radiology, 2002, 222(2):460-467.