

Contrast ultrasound for evaluating tumor angiogenic activity and its prognostic significance in axillary-node-negative breast carcinoma

LI Ying-jia^{1*}, ZHANG Xue-lin², WEN Ge², GONG Wei-bing¹, SUN Gui-ping³

(1. Department of Ultrasound Diagnosis, 2. Department of Medical Imaging, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Ultrasound China National Heavy Duty Truck Group Corporation Hospital, Jinan 250031, China)

[Abstract] **Objective** To determine the value of contrast ultrasound for evaluating tumor angiogenic activity and its prognostic significance in axillary-node-negative breast carcinoma. **Methods** Intratumoral vascularization was observed preoperatively by power Doppler imaging (PDI) before and after the injection of contrast agents and analyzed with computer-assisted quantitative assessment, and the microvessel density (MVD) were also assessed immunohistochemically by using the specific endothelial cell markers FVIII-RA. Correlations between blood vessels positive area within masses, the expression of MVD and several clinic pathologic factors were studied further. **Results** Before using contrast agents, there was no correlation between the blood vessels positive area and the expression of MVD. After contrast enhanced PDI was performed, it showed positive correlation between them. Both of them were not correlated with the general clinic pathologic factors. Blood vessels positive area and MVD were significantly higher in tumors relapsed or metastasis group than in disease free survival group. Moreover, patients with higher blood vessels positive area or higher MVD had lower disease free survival rate (DFS) or overall survival rate (OS) than those with lower blood vessels positive area or lower MVD. **Conclusion** Blood vessels positive area or MVD may be good prognostic indicators for patients with ANNBC which are useful in selection of high-risk ANNBC patients for adjuvant therapy or antiangiogenic therapy.

[Key words] Angiogenesis; Axillary-node-negative breast carcinoma; Contrast agent

声学造影对腋淋巴结阴性乳腺癌血管生成的定量检测及生物学行为相关性研究

李颖嘉^{1*}, 张雪林², 文戈², 龚渭冰¹, 孙桂萍³

(1. 南方医科大学南方医院超声诊断科, 2. 影像中心, 广东 广州 510515;
3. 中国重汽集团公司医院超声科, 山东 济南 250031)

[摘要] **目的** 探讨超声造影对腋淋巴结阴性乳腺癌(ANNBC)血管生成的定量检测及与其生物学行为的关系。 **方法** 采用超声造影结合能量多普勒技术术前检测 60 例 ANNBC 患者肿瘤内血流信号并通过图像分析技术定量测定肿瘤内血管阳性反应总面积, 采用免疫组织化学技术检测肿瘤内微血管密度(MVD)的表达, 分析造影前后肿瘤内血管阳性反应总面积与 MVD 的相关性, 单因素和多因素方法研究造影后肿瘤内血管阳性反应总面积、MVD 与 ANNBC 相关临床病理因素及预后的关系。 **结果** 全部病例造影增强前 PDI 检测血管阳性反应总面积与 MVD 无相关性($r=0.25$, $P>0.05$), 造影增强后血管阳性反应总面积与 MVD 呈正相关($r=0.65$, $P<0.05$)。造影增强后血管阳性反应总面积、MVD 均与一般临床病理因素无关, 与组织学分级和复发转移密切相关, 术后复发转移组造影增强后血管阳性反应总面积、肿瘤内 MVD 均显著高于无瘤生存组。高血管阳性反应总面积组和高 MVD 组总生存率(OS)和无瘤生存率(DFS)低于低血管阳性反应总面积组 and 低 MVD 组($P<0.005$)。 **结论** 超声造影结合能量多普勒技术对 ANNBC 血管生成活性的定量检测可作为有价值的预后预测指标及治疗指导指标。

[关键词] 血管生成; 腋淋巴结阴性乳腺癌; 造影剂

[基金项目] 国家自然科学基金资助面上项目(30670580)。

[作者简介] 李颖嘉(1968—), 女, 重庆人, 博士, 副教授。研究方向: 肿瘤血管生成。

[通讯作者] 李颖嘉, 南方医科大学南方医院超声诊断科, 510515。E-mail: lyjia@fimmu.com

[收稿日期] 2006-11-22 **[修回日期]** 2007-04-09

随着乳腺癌发病率的增加及临床诊治水平的提高,腋淋巴结阴性乳腺癌(axillary-node-negative breast carcinoma, ANNBC)所占比例已占初诊总数的 1/2 以上,寻找判断 ANNBC 预后的准确指标,合理选择术式,使高危亚群不要错过最佳治疗时机,同时让复发可能性极小的患者免受过强的辅助治疗,对提高患者生存质量具有重要意义^[1,2]。长期以来,ANNBC 一直缺乏良好的预测指标。目前的证据表明,血管生成是肿瘤生长和转移的基础。我们采用造影增强能量多普勒成像结合免疫组织化学方法检测 ANNBC 的血管生成活性,探讨它们与 ANNBC 相关临床病理因素及其预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集手术后随访 5 年以上 60 例女性乳腺癌患者,年龄 25~75 岁,中位年龄 48 岁,原发灶<2 cm 24 例,2~5 cm 32 例,>5 cm 4 例,所有病例均经术后病理学确诊。一般临床病理资料详情见表 1。所有患者的原始病理切片均经病理科医师复阅再找出相应原发灶蜡块作为试验标本。病例筛选条件如下:①行乳腺癌根治或改良根治术,②肿瘤原发灶蜡块保存良好,③术前乳腺包块行造影增强能量多普勒成像并进行血流定量分析,④术中术后分离腋窝淋巴结 6 枚以上,⑤病理诊断腋淋巴结阴性,⑥术前均未经任何抗癌治疗,术后无任何辅助治疗,⑦随访资料完整。

表 1 60 例 ANNBC 患者的临床病理资料

临床病理因素		例数
年龄(岁)	≤48	33
	>48	27
肿瘤大小(cm)	<2	24
	2~5	32
	≥5	4
组织学分级	I	18
	II	25
	III	17
病理类型	浸润性导管癌	39
	浸润性小叶癌	14
	其他	7
内分泌状况	绝经前	32
	绝经后	28
雌激素受体	ER 阳性	34
	ER 阴性	26

1.2 PDI 检测造影前后乳腺癌肿块内血流及定量分析 应用 ATL HDI 5000 型彩色多普勒诊断仪,探头频率 12 MHz。选用乳腺常规检测程序,二维切面观察肿块大小、形态、边缘及内部回声,CDFI 多切面观察肿块周边及内部血流情况,之后选用 PDI 程序,选取 3 个血流信号最丰富区域冻结并存储图像,比较相同区域造影前后肿瘤周边及内部 PDI 显示血流情况,结果取均值。采用德国 Leica 公司 MD20 型真彩色图像分析仪测定测试区内血管阳性反应总面积。方法:待测图像由扫描器扫描后经模数转换存储于缓冲寄存器内,通过计算机定点点击测试区内呈暗红色着色的血管区,每一测阌(测

定面积)视为一个像素,测试区内边界灰度值以上的总像素和即为所测定的血管阳性反应总面积。

声学造影剂采用南方医院药理基地研制的白蛋白包裹全氟丙烷微气泡声学造影剂,微泡直径 2.0~5 μm,浓度 1.0×10⁹~2.0×10⁹/ml,分布 98% 小于 10 μm,pH 值 6.4~7.4。造影剂经左前臂静脉弹丸式注射,剂量 0.01 ml/kg,重复注射,间隔时间大于 15 min。

1.3 免疫组织化学染色 全部标本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋切片。VIII 因子相关抗原(FVIII-RA)为 Dako 公司产品,工作浓度 1:50,采用 LSABC 法,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)替代一抗作阴性对照。应用 CMIAS 真彩色图像分析系统测定 MVD,首先选取具有代表性的组织切片,排除肿瘤出血区及边缘反应区,低倍镜(40×)观察每例切片中 3 个血管密度最高区域即所谓血管热点区(HOT spot),高倍镜(200×)下计数每个区域的微血管密度(microvessel density, MVD),其平均值即作为该例肿瘤的 MVD 值。

1.4 统计学处理 本研究全部数据采用 SPSS 10.0 统计软件处理, $P<0.05$ 为有显著性差异,统计学方法有 t 检验、 χ^2 检验等。预后单因素分析采用 Kaplan-Meier 分析法和 Log-rank 检验,多因素分析采用 COX 风险比例模型。

2 结果

2.1 超声造影 PDI 技术及免疫组织化学技术对 ANNBC 肿块血流的定量检测 60 例 ANNBC 肿块造影增强前 PDI 血流检出率 56.67%(34/60),造影增强后 PDI 血流检出率 96.7%(58/60),肿块血流分布存在差异,多以肿瘤组织周边为著,增强前内部已检出血流信号者造影增强后周边和内部的血流形态和分布更为清晰,60 例 ANNBC 造影增强前平均血管阳性反应总面积 2510±258,造影增强后平均血管阳性反应总面积 3990±342(图 1、2)。

免疫组织化学染色可见病灶内微血管形成(图 3)。FVIII-RA 阳性产物定位于血管内皮细胞胞浆或胞膜。肿瘤组织中微血管分布呈明显异质性,微血管丰富区多位于肿瘤组织边缘。60 例 ANNBC 的 MVD 平均值是 29.99±19.26,造影增强前 PDI 检测血管阳性反应总面积均值为 2510±258,造影增强后 PDI 检测血管阳性反应总面积均值为 3990±342,增强前平均血管阳性反应总面积与 MVD 无相关性($r=0.25, P>0.05$),增强后平均血管阳性反应总面积与 MVD 呈正相关($r=0.65, P<0.05$)。

2.2 ANNBC 血管生成与临床病理因素及预后的关系 造影增强后肿瘤血管阳性反应总面积、MVD 与肿瘤大小、病理类型、内分泌状况、雌激素受体水平(ER)、年龄无关,但与组织学分级和复发转移密切相关。在组织学分级方面,III 级(低分化)血管阳性反应总面积 4208±180 明显高于 I、II 级 2010±201 及 3930±239($P<0.01$),MVD 值也明显增高,分别是 53.9±30.10、23.90±9.90、35.80±18.71($P<0.01$)。III 级组肿瘤体积大于 I、II 级组,但无统计学差

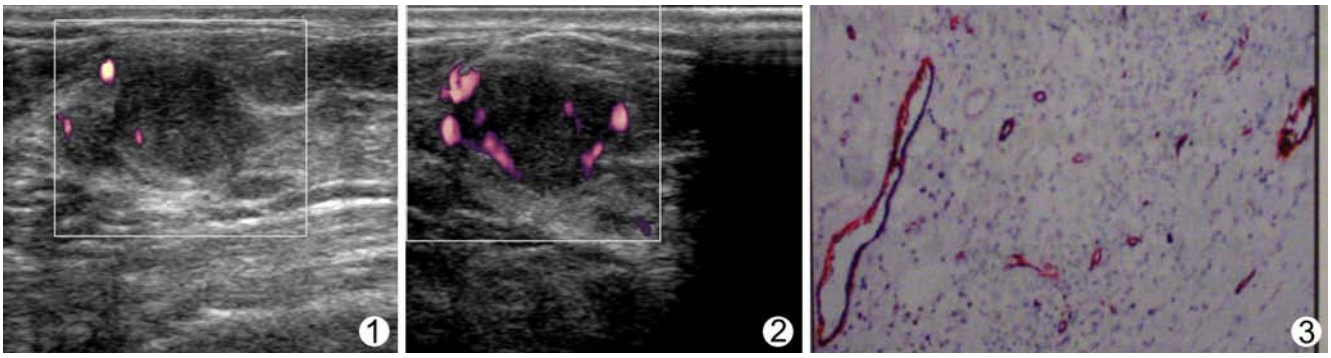


图1 造影增强前PDI显示ANNBC内血流信号 图2 造影增强后PDI显示ANNBC内血流信号明显增多 图3 FVRIII-RA免疫组织化学染色显示ANNBC内微血管形成

异。60例ANNBC中复发转移者20例(20/60,33.3%),无瘤生存者40例(40/60,66.7%),前者造影增强后血管阳性反应总面积是后者的3倍,免疫组织化学测得的MVD均值亦是后者的3倍,说明术后复发转移者造影增强后血管阳性反应总面积、肿瘤内微血管密度均显著高于无瘤生存者,造影增强后血管阳性反应总面积与肿瘤内微血管密度具有近似直线关系(表2)。同时复发转移组肿瘤体积大于无瘤生存组($P<0.01$)。

表2 造影增强后血管阳性反应总面积、MVD与复发转移的关系

术后状况	例数	造影增强后血管阳性反应总面积	MVD
复发转移	20	7560±468*	68.67±28.03*
无瘤生存	40	25400±236	21.310±11.01

注: * $P<0.01$

将造影增强后血管阳性反应总面积按 >4000 和 ≤ 4000 分为高低两组,比较各自的总体生存率(overall survival rate, OSR)和无瘤生存率(disease free survival rate, DFSR)。结果表明高血管阳性反应总面积组的OSR为63.63%(14/22),低于低血管阳性反应总面积组的OSR 94.74%(36/38), $\chi^2=15.1$, $P<0.005$ 。高血管阳性反应总面积组DFSR为54.54%(12/22),低于低血管阳性反应总面积组的DFSR 89.47%(34/38), $\chi^2=13.2$, $P<0.005$ 。将免疫组织化学测得的MVD值按 >30 和 ≤ 30 分为高低两组,比较各自的总体生存率OSR和无瘤生存率DFSR。高MVD的OSR为54.17%(13/24),低于低MVD组的OSR 94.11%(34/36), $\chi^2=16.8$, $P<0.005$ 。高MVD组DFSR为50.00%(12/24),低于低MVD组的DFSR 91.67%(34/36), $\chi^2=14.1$, $P<0.005$ 。

COX模型多因素分析:对组织学分级、病理类型、内分泌状况、雌激素受体水平ER、年龄、MVD、造影增强后血管阳性反应总面积、肿瘤大小等8种因素量化后导入COX风险比例模型分析,结果只有后三者是影响ANNBC预后的独立因素,其风险比例(RR)分别是2.203、2.009、1.801, P 值分别是0.0054、0.0030、0.010。

3 讨论

腋淋巴结有否转移通常被认为是决定乳腺癌预后的最重要因素,我们继往的研究表明PDI对乳腺癌肿瘤组织内血流的定量检测与术后肿瘤标本内MVD测定具有一致性,二者均与其腋淋巴结转移密切相关,提示PDI检测乳腺癌血管生成活性可能为临床判断乳腺癌预后提供一较为简便的形态学指标^[3]。近年来随着乳腺癌早期诊治水平的提高,腋淋巴结阴性乳腺癌(ANNBC)所占比例逐年增加,ANNBC患者相对预后较好,但仍有20%~30%在5~10年内出现复发、转移或死亡。对所有ANNBC患者行术后辅助治疗,可提高总体生存率,但可能造成70%左右的低危人群接受不必要的药物或放射损伤。因此,如何较精确地评估ANNBC患者的预后,以便采取相应的治疗措施,已成为临床面临的重要课题。已经证实肿瘤内MVD与临床转归具有高度相关性,血管生成是包括乳腺癌在内的多种实体瘤发生、发展的必需条件^[4]。我们采用造影增强PDI检测ANNBC血管生成活性并与免疫组织化学测定的肿瘤内MVD值对照,探讨造影增强PDI在评价ANNBC血管生成及其预后判断中的价值,结果显示造影增强前PDI检测血管阳性反应总面积与MVD无相关性,造影增强后血管阳性反应总面积与MVD呈正相关,本组ANNBC中复发转移者(20例),造影增强后血管阳性反应总面积是无瘤生存者(40例)的3倍,免疫组织化学测得的MVD均值亦是后者的3倍,说明造影增强能量多普勒对血管阳性反应总面积的测定与免疫组织化学测定的MVD值具有一致性,术后复发转移者血管生成明显活跃于预后好者,造影增强能量多普勒超声术前检测ANNBC血管生成活性可能为临床选择治疗方案,评估预后提供客观简便的量化指标。采用免疫组织化学技术以von Willebrand因子、CD31或CD34等内皮细胞特异性标记物标记微血管检测活检或术后病理标本中MVD一直是评估实体肿瘤内血管生成状态的金标准,但只适用于对术后石蜡标本的检测,对肿瘤患者的术前评估没有帮助,且操作复杂,价格昂贵,我们的结果表明造影增强能量多普勒检测结果与MVD具有一致性,通过造影增强能量多普勒对瘤内血流的定量检测可以间接评估活体内ANNBC血管生成活性,这对于选择术式,确定治疗方案,判断预后有一定参考意义。有关乳腺肿瘤血流超声定量测量与

病理测量 MVD 两者之间相关性的研究结果目前各家报道不一^[5-7],原因可能与应用的超声技术、探头频率、标记血管内皮细胞的抗体及样本量选择的不同有关。CDFI、PDI 及声学造影技术对肿瘤血管显示的敏感性存在差异,PDI 具有较大的动态范围,尤其对低速低流量肿瘤血管的敏感性比 CDFI 高,可显示直径为 1 mm 及流速为 1 cm/s 的小血管^[8],但尚不能显示肿瘤内微血管,对少血供的乳腺癌无法显示肿瘤新生血管网全貌。声学造影剂的应用提高了血管与周围组织的信噪比,弥补了常规超声对肿瘤内细小血管显示的不足,使用高频超声探头,造影增强超声可显示直径约 40 μ m 以下的微血管^[9]。本组 60 例 ANNBC 造影增强前后 PDI 检测血管阳性反应总面积与 MVD 相关性存在差异,原因可能在于 ANNBC 肿块偏小,肿块内血管更为细小,血供情况常规超声手段难以显示,提示经静脉超声造影与 PDI 技术相结合在提高肿瘤复杂新生血管的显示能力方面具有较大优势,能更程度地显示肿瘤内微血管特征。

本研究发现,组织学分级为 I ~ II 级的 ANNBC 造影增强后血管阳性反应总面积、MVD 明显低于 III 级的患者,说明 ANNBC 的血管生成活性与其组织学分级密切相关。造影增强后 ANNBC 血管阳性反应总面积、MVD 与其他一般临床病理因素无关,随肿瘤直径的增大,血管阳性反应总面积、MVD 值增高,并且随组织学分级增高,III 级组肿瘤体积大于 I、II 级组,但均无统计学差异,可能与本组样本量偏少有关。复发转移组肿瘤体积明显大于无瘤生存组($P < 0.01$),而 COX 模型多因素分析中除 MVD、血管阳性反应总面积外,只有肿瘤大小是 ANNBC 预后独立因素。因此,如果将造影增强能量多普勒超声检测血管阳性反应总面积、免疫组织化学测定的 MVD 值与肿瘤大小结合分析预后,可能更全面。

筛选腋淋巴结阴性乳腺癌复发转移高危和低危组籍以指导治疗是国内外近年来研究的热点^[10],本研究结果如在进一步的前瞻性、大样本研究中得以证实,则对造影增强能量多普勒超声提示高血管生成活性的 ANNBC 患者,应考虑辅以后补充治疗的同时加以抗血管生成治疗;而对低血管阳性反应总面积、低 MVD 者可不予补充治疗,但应定期随访。这样合理运用术后辅助治疗,可以减少盲目性,降低患者经济负担,提高生存率和生存质量。

[参考文献]

[1] Linderholm B, Tavelin B, Crankvist K, et al. Does vascular endothelial growth factor(VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer[J]? BR J Cancer, 1999,81(4):727-732.

[2] Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, et al. Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis in node-negative breast carcinoma, results of a multiparametric study[J]. Breast Cancer Res Treat,1995,36(2):205-217.

[3] LI JY, GONG WB, WU FL. The correlation between tumor angiogenetic activity and lymph node metastasis in primary breast carcinoma[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2001, 10(4): 228-230.
李颖嘉,龚渭冰,吴凤林.能量多普勒超声检测乳腺癌血管生成活性及其与腋窝淋巴结转移的关系[J].中华超声影像学杂志,2001, 10(4):228-230.

[4] Guidi AJ, Fiascher I, Harris JR, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast[J]. J Natl Cancer Inst,1994,86(3):614-619.

[5] Sehgal CM, Arger PH, Rowling SE, et al. Quantitative vascularity of breast masses by Doppler imaging: Regional variations and diagnostic implications[J]. J Ultrasound Med,2000,19(7):427-440.

[6] Masaki T, Ohkawav S, Amano A, et al. Noninvasive assement of tumor vascularity by contrast-enhanced ultrasonography and the prognosis of patients with nonresectable pancreatic carcinoma[J]. Cancer, 2005,103(5):1026-1035.

[7] Echo contrast-enhanced power Doppler ultrasonography for assement of angiogenesis in renal cell carcinoma[J]. J Ultrasound Med,2005,24(6):747-753.

[8] Rizzatto G, Chersevani R. Breast ultrasound and new technologies [J]. Eur J Radiol, 1998, 27(Suppl 2):S242-S249.

[9] Chaudhari MH, Forsberg F, Voodarla A. Breast tumor vascularity identified by contrast enhanced ultrasound and pathology:Initial results[J]. Ultrasonics, 2000,38(18):105-109.

[10] Arora A, Joshi K, Nijhawan R, et al. Angiogenesis is an independent prognostic indicator in node-negative breast cancer [J]. Anal Quant Cytol Histol,2002,24(4):228-233.