

## Correlation between contrast-enhanced ultrasonographic appearances and the expression of vascular endothelial growth factor of primary hepatocellular carcinoma

HUANG Li-ping\*, YIN Shuai, DENG Li-jun, SONG Xiao-yan, REN Wei-dong

(Department of Ultrasound, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between the parameters of CEUS time-intensity curve and vascular endothelial growth factor (VEGF) of primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Twenty-seven patients with pathologically confirmed primary HCC were enrolled, including 16 with poorly to moderately differentiated HCC and 11 with well differentiated HCC. The hepatic tissues around HCC in 13 patients were selected as control. CEUS images before operation were analyzed. Time-intensity curve was drawn and the parameters such as intensity time, rising slope, relative peak intensity, peak enhancement rate, descending slope were calculated. VEGF was located with immunohistochemistry method and quantitatively analyzed with Western-blot method. The correlation between the parameters of enhancement time-intensity curve and VEGF expression was analyzed. **Results** VEGF was mainly distributed in cytoplasm. The quantitative analysis showed that the relative value of VEGF was  $(46.63 \pm 9.70)\%$  in moderately to poorly differentiated HCC,  $(32.36 \pm 8.56)\%$  in well differentiated HCC, and  $(8.85 \pm 5.05)\%$  in control group, statistical differences were found between each two groups (all  $P < 0.05$ ). The relative peak intensity of HCC was positively correlated to VEGF expression ( $r = 0.56$ ,  $P < 0.05$ ), while no correlation was found with intensity time, rising slope, peak enhancement rate nor descending slope (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** The relative peak intensity of HCC may indicate VEGF expression, and the relative value of VEGF in different differentiated HCC is obviously different.

**[Key words]** Carcinoma, hepatocellular; Ultrasonography; Contrast media; Vascular endothelial growth factor

## 原发性肝细胞癌的超声造影表现与血管内皮生长因子表达的相关性

黄丽萍\*, 尹 率, 邓力军, 宋晓雁, 任卫东

(中国医科大学附属盛京医院超声科, 辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** **目的** 探讨原发性肝细胞癌(HCC)的 CEUS 增强时间-强度曲线各参数与血管内皮生长因子(VEGF)表达的相关性。**方法** 选择经手术病理证实的 27 例原发性 HCC 作为研究对象,其中中低分化癌 16 例,高分化癌 11 例,取其中 13 例患者的癌周组织作为对照。分析术前 CEUS 图像,绘制时间-强度曲线,计算增强时间、上升斜率、相对峰值强度、峰值增强率、下降斜率。应用 S-P 免疫组化法对 VEGF 进行定位,应用蛋白印迹法对 VEGF 进行定量,分析 CEUS 曲线参数与 VEGF 表达的相关性。**结果** VEGF 蛋白主要分布于胞浆中,蛋白定量分析显示中低分化 HCC、高分化 HCC、对照组织的 VEGF 蛋白相对含量分别为  $(46.63 \pm 9.70)\%$ 、 $(32.36 \pm 8.56)\%$ 、 $(8.85 \pm 5.05)\%$ ,两两比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。HCC 曲线的相对峰值强度与 VEGF 蛋白相对含量呈正相关( $r = 0.56$ ,  $P < 0.05$ ),而增强时间、上升斜率、峰

**[基金项目]** 辽宁省教育厅基金(2008T210)。

**[作者简介]** 黄丽萍(1971—),女(壮族),广西南宁人,博士,副教授。研究方向:腹部超声诊断及超声造影。

**[通讯作者]** 黄丽萍,中国医科大学附属盛京医院超声科,110004。E-mail: lipinghuang08@yahoo.com.cn

**[收稿日期]** 2011-10-15 **[修回日期]** 2011-11-16

值增强率及下降斜率与 VEGF 蛋白相对含量均无相关性 ( $P$  均  $> 0.05$ )。结论 HCC 造影增强时间-强度曲线的相对峰值强度可反映 VEGF 蛋白表达, 不同分化程度 HCC 的 VEGF 蛋白相对含量差异显著。

[关键词] 癌, 肝细胞; 超声检查; 造影剂; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R735.7; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2012)05-0953-04

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是典型的富血供肿瘤, 其生长、侵袭及转移均与血管生成密切相关。在诸多促血管生成因子中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是针对血管内皮细胞特异性最高、促血管生成作用最强的因子之一。本研究探讨 HCC CEUS 时间-强度曲线参数与 VEGF 表达的相关性。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2007 年 1 月—2010 年 6 月在我院手术病理证实为原发性 HCC 的患者中, 选择病灶最大径  $\leq 5.0$  cm 的 27 例作为研究对象, 男 18 例, 女 9 例, 年龄 31~71 岁, 中位年龄 54 岁; 病灶直径 1.5~5.0 cm, 平均  $(3.72 \pm 1.03)$  cm; 中低分化癌 16 例 (中低分化 HCC 组), 高分化癌 11 例 (高分化 HCC 组)。术前行 CEUS 检查, 术后留取新鲜肿瘤, 以癌周组织作为对照组 ( $n=13$ ), 癌组织取肿瘤靠近周边部位 (避开坏死区), 癌周组织距离肿瘤 1 cm,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2 仪器与方法 采用 Toshiba Aplio 彩色超声显像仪, 配有脉冲减影成像技术, 机械指数  $< 0.1$ 。造影剂为 Bracco SonoVue。经肘前正中静脉快速团注 SonoVue 2.4 ml, 开启计时器录像。应用 ImageLab 软件绘制时间-强度曲线 (图 1), ROI 置于病变区及同等深度的非癌肝组织 (避开坏死区及大血管), 计算增强时间 (峰值时间-始增时间)、上升斜率 (dB/s)、相对

峰值强度 (病灶峰值强度-同等深度非癌肝组织强度), 峰值增强率 [(病灶峰值强度-同等深度非癌肝组织强度)/同等深度非癌肝组织强度]  $\times 100\%$ , 下降斜率 (dB/s)<sup>[1-2]</sup>。

1.3 免疫组化染色 采用链菌素亲生物素-过氧化物酶法 (S-P 法) 对 VEGF 进行定位, 一抗为兔抗大鼠 VEGF 抗体 (1:75, SantaCruz 公司), SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司, 以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 代替一抗作为阴性对照。对石蜡包埋的标本切片, 行 VEGF 染色和 DAB 显色。

1.4 蛋白印迹实验 取 50 mg 组织, 用全蛋白提取试剂盒 (KGP250, 凯基生物) 提取全分离蛋白, BCA 法定量, 按每孔 40  $\mu\text{g}$  总蛋白的浓度上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 200 mA 60 min 转印至 NC 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 NC 膜 1 h, 洗膜后在 VEGF 兔抗大鼠 IgG 溶液 (1:200, Santacruz 公司) 中  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。洗膜后转到碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 溶液 (1:2000, Sigma 公司) 中室温孵育 2 h, NBT/BCIP 试剂盒 (上海生工生物公司) 显色, GIS-700D 凝胶图像系统扫描分析结果。以同法检测  $\beta$ -actin (1:1000, Santacruz 公司) 的蛋白表达 (内参照), 分析 VEGF 相对含量。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件, 计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析及 SNK 检验比较不同分化程度 HCC 及对照组 VEGF 蛋白相对含量, 采用 Pearson 相关分析观察 CEUS 增强参数与 VEGF

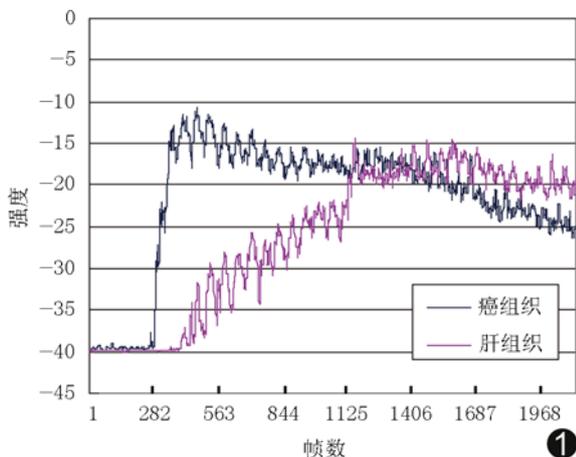


图 1 中低分化 HCC 的 CEUS 增强时间-强度曲线 横轴表示时间 (1124 帧/分)

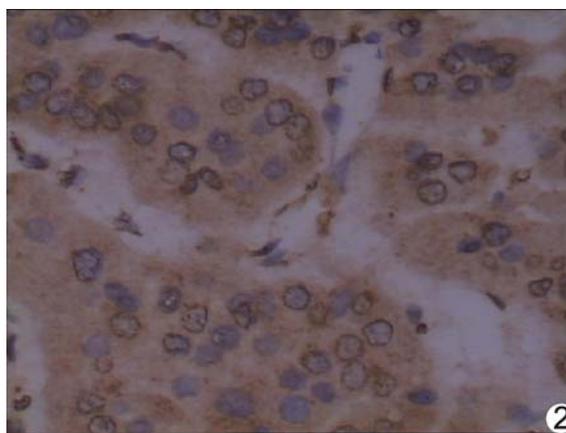


图 2 HCC 免疫组化染色阳性, 呈棕黄色 (HE,  $\times 400$ )



图3 不同分化程度 HCC 组与对照组 VEGF 蛋白印迹图 中低分化 HCC 组相对含量最高, 高分化 HCC 组次之 (1, 2: 对照组; 3, 4: 高分化 HCC 组; 5, 6: 中低分化 HCC 组)

蛋白相对含量的相关性,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 VEGF 免疫组化定位 VEGF 蛋白分布于胞浆中, 阳性细胞显示棕黄色或棕褐色颗粒(图 2)。

2.2 VEGF 表达与 HCC 分化程度的关系 VEGF 蛋白在各组中的相对含量中, 中低分化 HCC 组  $[(46.63 \pm 9.70)\%]$  > 高分化 HCC 组  $[(32.36 \pm 8.56)\%]$  > 对照组  $[(8.85 \pm 5.05)\%]$ , 两两比较差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ , 图 3)。

2.3 CEUS 增强参数与 VEGF 蛋白相对含量的相关性 HCC 相对峰值强度与 VEGF 蛋白相对含量呈正相关 ( $r = 0.56, P < 0.05$ ), 而增强时间、上升斜率、下降斜率及峰值增强率与 VEGF 蛋白相对含量均无相关性 ( $r = -0.15, 0.21, 0.24, 0.39, P$  均  $> 0.05$ )。

## 3 讨论

HCC 为富血供肿瘤, 其生长和转移与血管生成有着密切联系。在非诱导血管形成期 (瘤体直径  $< 1$  mm), 肿瘤通过弥散作用获取营养物质, 当肿瘤直径  $\geq 2$  mm 时即进入诱导血管形成期, 肿瘤内新生毛细血管生长速度明显加快, 肿瘤血管形成取决于促血管生成因子与抑制因子之间的动态平衡, 这种平衡一旦打破, 则肿瘤获得生长和侵袭能力<sup>[3]</sup>。在促进血管生成的诸多因子中, VEGF 是目前已知针对血管内皮细胞特异性最高、作用最强的因子之一, 能够刺激血管内皮细胞增殖, 降解血管外基质, 导致内皮细胞分裂和迁移而形成新生血管。VEGF 在肿瘤生长、侵袭及转移的各阶段都起着重要作用, 并且与预后密切相关<sup>[4-7]</sup>。

研究显示 VEGF 蛋白分布于胞浆中, 阳性细胞显示棕黄色或棕褐色颗粒, 蛋白印迹实验结果示中低分化组及高分化 HCC 组的 VEGF 蛋白相对含量与对照组比较差异均有统计学意义, 表明癌组织 VEGF 蛋白含量高于癌周组织, 并且随着 HCC 恶性程度增加, VEGF 蛋白含量也逐渐增加。Park 等<sup>[8]</sup>研究发现, 正

常肝细胞及肝癌细胞中均可见 VEGF 表达, 且在 HCC 发展过程中 VEGF 表达逐步增加, 高度异型增生结节及早期 HCC 的 VEGF 表达高于低度异型增生结节。其他研究<sup>[9]</sup>也表明 HCC 的 VEGF 表达与组织学分级相关。

本研究表明, HCC 的 CEUS 相对峰值强度与 VEGF 蛋白相

对含量呈正相关, 表明 HCC 的 VEGF 表达越强, 病灶内新生血管越丰富, 表现为造影增强的相对峰值强度越大。HCC 新生滋养血管基膜不完整、通透性大, 因缺乏平滑肌和神经末梢无舒缩功能, 导致血液灌注量增加; VEGF 在促进血管生成的同时增加毛细血管的通透性, 导致肿瘤的血流动力学发生改变。既往研究发现, MRI FSE T2WI 肿瘤-肝对比度噪声比与 HCC 的 VEGF 表达呈正相关<sup>[10-11]</sup>。肿瘤的增强 CT 动脉相强化程度、血管造影染色程度均与 VEGF 表达呈正相关<sup>[12-13]</sup>。还有研究<sup>[14]</sup>表明 HCC 血流等级、相对灌注率与 VEGF 表达相关。本研究中 HCC 的 CEUS 增强时间、上升斜率、下降斜率与 VEGF 表达无相关性, 可能由于样本量较小, 另外上述与时间有关的参数是否受高血压、心律失常等疾病的影响还有待进一步探讨。

本研究的局限性: 肿瘤的血管生成是一个极其复杂的过程, 本研究仅探讨了 HCC 的 CEUS 时间-强度曲线参数与 VEGF 表达的相关性, 由于样本量有限, 相关结果有待进一步研究加以验证。

## [参考文献]

- [1] 黄丽萍, 唐少珊, 解丽梅, 等. 原发性肝细胞癌的超声造影表现与微血管密度的相关性研究. 中国医学影像技术, 2009, 25(9): 1645-1647.
- [2] Quaia E, Palumbo A, Rossi S, et al. Comparison of visual and quantitative analysis for characterization of insonated liver tumors after microbubble contrast injection. AJR Am J Roentgenol, 2006, 186(6): 1560-1570.
- [3] Park YN, Kim YB, Yang KM, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7): 1061-1065.
- [4] 文卫, 杨连粤, 黄耿文, 等. TSP-1 和 VEGF 在肝细胞癌新生血管生成中的作用. 中华肝胆外科杂志, 2005, 11(1): 17-19.
- [5] von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, et al. Dual mechanism

- of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2001, 48(1):87-96.
- [6] Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, et al. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*, 2008, 17(4):411-417.
- [7] Xiang Z, Zeng Z, Tang Z, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor-C and nuclear CXCR4 in hepatocellular carcinoma is correlated with lymph node metastasis and poor outcome. *Cancer J*, 2009, 15(6):519-525.
- [8] Park YN, Kim YB, Yang KM, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(7):1061-1065.
- [9] An FQ, Matsuda M, Fujii H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancers Res Clin Oncol*, 2000, 126(3):153-160.
- [10] Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver and correlation with MRI findings. *AJR Am J Roentgenol*, 2005, 184(3):832-841.
- [11] Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver: Correlation with MR imaging and angiographically assisted CT. *Abdom Imaging*, 2006, 31(1):78-89.
- [12] Kwak BK, Shim HJ, Park ES, et al. Hepatocellular carcinoma: Correlation between vascular endothelial growth factor level and degree of enhancement by multiphase contrast-enhanced computed tomography. *Invest Radiol*, 2001, 36(8):487-492.
- [13] Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver: Correlation with angiographically assisted CT. *AJR Am J Roentgenol*, 2004, 183(6):1585-1593.
- [14] 肖际东, 沈守荣, 朱文晖, 等. 彩色多普勒超声检测肝癌血流及其与 MVD、VEGF 表达的关系. *中国医学影像技术*, 2007, 23(6):884-887.

## 《中国介入影像与治疗学》杂志 2012 年广告代理启事

《中国介入影像与治疗学》杂志是经国家新闻出版总署批准,由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办,中国工程院医药卫生工程学部协办的国家级学术期刊。主编为邹英华教授。本刊创刊于 2004 年 9 月,为月刊,64 页,彩色印刷,每月 10 日出刊,国内外公开发行(ISSN 1672-8475, CN 11-5213/R, 邮发代号:80-220)。广告经营许可证号:京海工商广字第 0074 号。

《中国介入影像与治疗学》杂志授权北京博朗迪科技有限公司为广告销售独家代理,全面负责杂志的广告销售业务。

北京博朗迪科技有限公司,隶属于中国公共医疗(控股)有限公司(港股代码 08116),公司致力于医学影像数据领域的开发、应用,与中国健康促进基金会携手组建中国医学数字影像专项基金,开展医学影像研究、合作。同时,通过与《中国介入影像与治疗学》、《中国医学影像技术》等业内领军杂志的强强联合,加强医学影像媒体平台合作。

北京博朗迪科技有限公司诚邀业内同仁,借助本刊广告,推进中国医学影像事业发展,共同搭建医学影像宽广平台,共赢美好未来。

联系人:张女士 联系电话:010-67810853-610 传真:010-82038927

E-mail: zhangxin@legendmt.com

地址:北京经济技术开发区康定街 1 号国盛科技园 7 号 邮编:100176