

乳腺肿块的能量多普勒血流定量与病理微血管定量相关性研究

荣雪余¹, 杨 堤², 姜玉新¹

(1. 北京协和医院超声诊断科, 2. 病理科, 北京 100730)

[摘要] **目的** 研究超声造影及能量多普勒技术测定乳腺肿瘤的彩色像素密度与病理微血管密度的相关性。**方法** 应用超声造影和能量多普勒技术观察 51 例乳腺肿块血流信号(28 例良性, 23 例恶性), 计算机辅助测量肿瘤血流的彩色像素密度, 对手术标本进行抗 CD34 因子免疫组化染色测量肿瘤微血管密度。**结果** 彩色像素密度及微血管密度值均表现为同样梯度, 即恶性组>良性组>对照组(10 例远离肿块的周围乳腺组织)。恶性组中腋下淋巴结转移组的彩色像素密度及微血管面密度均高于无腋下淋巴结转移组($P<0.05$)。能量多普勒测定的彩色像素密度与病理微血管面密度有较好的相关性($r=0.84, P<0.001$)。**结论** 能量多普勒血流定量测值与肿瘤微血管密度测值相关性较好, 能量多普勒超声造影对乳腺肿瘤的鉴别诊断及乳癌预后的评估有帮助。

[关键词] 造影剂; 乳腺病变; 能量多普勒; 彩色像素密度

[中图分类号] R981.1; R655.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2002)07-0660-04

Correlation between Contrast-Enhanced Power Doppler and Pathology in Quantitative Vascularity of Breast Masses

RONG Xue-yu, YANG Di, JIANG Yu-xin

(Department of Ultrasonography, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

[Abstract] **Purpose** To determine the relationship between color pixel density of breast masses in contrast-enhanced power Doppler and in pathology. **Methods** Contrast-enhanced power Doppler was performed on 51 patients with breast masses (28 benign, 23 malignant). Computer-assisted analyzed color pixel density of breast mass. Microvessel density was measured in surgical specimens after immunohistochemical staining using anti-factor CD34. **Results** Both color pixel density and microvessel density had the same gradient, malignant group>benign group>control group (10 parenchyma distal to breast masses). Axillary node-positive tumors demonstrated significantly higher color pixel density and area density of microvessel than did axillary node-negative tumors ($P<0.05$). These studies showed a good correlation between color pixel density by power Doppler imaging and area density of microvessel by histologic examination ($r=0.84, P<0.001$). **Conclusion** Breast mass vascularity of quantified contrast-enhanced power Doppler shows a good correlation with the corresponding histologic microvessel density measurement. Contrast-enhanced power Doppler has a potential ability for differentiating breast mass and for predicting breast tumor prognosis.

[Key words] Contrast agent; Breast lesion; Power Doppler image; Color pixel density

肿瘤血管生成(tumor angiogenesis, TA)在肿瘤生长和转移中起重要作用^[1]。肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)被证实为评估肿瘤预后的指标。随着多普勒超声技术(尤其是超声造影)的发展,超声显示肿瘤细小血管已成为可能。目前超声对乳腺肿瘤血管定量测量与肿瘤微血管密度相关性方面的文献报道较少,多普勒超声对判定肿瘤预后的作用尚无定论。本文应用超声造影与能量多普勒(CDE)相结合的技术,观察乳腺肿块血流情况,采用计算机辅助定量测量乳腺肿块血流的彩色像素密度(color pixel density, CPD),并应用免疫组化方法测定 MVD,目的在于探讨 CPD 与 MVD 的相关性,评价超声血流定量研究在鉴别乳腺良恶性肿瘤以及评估恶性肿瘤预后方面的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2000 年 4 月至 6 月,51 例乳腺疾病女性患者,年龄 34~78 岁,中位年龄 48 岁。研究对象分为三组:恶性组 23 例,其中浸润性导管癌 18 例,髓样癌 2 例,导管内癌 1 例,叶状囊肉瘤 1 例,胶样癌 1 例,腋下淋巴结转移 12 例;良性组 28 例,其中纤维腺瘤 6 例,腺病 8 例,纤维腺瘤合并腺病 11 例,慢性乳腺炎 1 例,脂肪坏死 1 例,毛细血管脂肪瘤 1 例;对照组 10 例(以远离肿瘤的乳腺组织为对照)。肿块直径范围 0.5~6cm,平均 1.8cm。其中乳癌 1.2~4.3cm,良性乳腺疾病 0.5~6cm。

1.2 超声检测乳腺肿块内血流及定量方法 应用美国 ATL 公司 HDI 5000 彩色多普勒超声显像仪,探头频率 12MHz。先常规观察乳腺肿瘤的二维图像,然后转换至能量多普勒功能观察肿瘤内部及周围组织血流情况。从肘静脉注射 Levovist 5~8ml,浓度为 400mg/ml,注射速度 1~2ml/s,观察超声造影后

[作者简介] 荣雪余(1970—),女,北京人,硕士,主治医师。

[收稿日期] 2002-01-26

乳腺肿瘤血流信号的变化(图 1)。整个检查过程用录像带记录,磁盘存储图像。选择超声造影后血流信号最丰富的图像作为研究对象,应用 Photoshop 软件的选取工具分别选取肿瘤范围、肿瘤内彩色信号范围,计算机统计出肿瘤像素值、肿瘤内彩色像素值,求出肿瘤 CPD 值即(肿瘤内彩色像素值/肿瘤像素值) $\times 100\%$ 。以 10 例肿块周围乳腺组织的 CPD 值为对照。超声造影均在手术前两天内进行。

图 1 浸润性导管癌的能量多普勒超声造影显示肿块周边及内部血流紊乱

1.3 免疫组化染色操作过程 将术后乳腺肿瘤标本、肿瘤周围正常乳腺组织标本石蜡包埋,切成 3 μm 标本切片。抗 CD34 免疫组化染色采用二步法。蒸馏水漂洗,复染、脱水及封片。棕色为阳性反应(图 2)。

图 2 浸润性导管癌的抗 CD34 染色可见密集的微血管(棕色区域)

1.4 微血管计数方法 应用 CMIAS 系列多功能真彩色病理图像分析软件,以内皮细胞被抗 CD34 棕染的小动脉、小静脉及内皮细胞群为观察目标。每张切片在低倍镜(40 $\times$)下观察 3 个血管相对最密集区域(hot spot)^[1],在 100 倍镜下计数微血管面密度(血管总面积/统计场面积),以平均值表示。比较良性组、恶性组及对照组之间,有腋淋巴结转移组[LN(+)]及无腋淋巴结转移组[LN(-)]之间微血管面密度的差异。

1.5 统计方法 应用 SPSS 统计分析软件,三组之间彩色像素密度、微血管面密度比较应用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验, LN(+)组与 LN(-)组比较采用两组样本 t 检验。彩色像素密度与微血管面密度相关性检验采用一元线性回归分析。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 能量多普勒超声造影检查乳腺肿块,应用计算机测定乳腺肿块的彩色像素密度,结果见表 1;恶性组的平均彩色像素密度最高,其次为良性组、对照组,三组之间的平均彩色像素密度差异显著($P<0.05$)。LN(+)组的平均彩色像素密度高于 LN(-)组($P<0.05$)。

表 1 乳腺肿瘤的彩色像素密度($\bar{x}\pm s$)		
	例数	CPD(%)
良性组	28	11.4 $\pm$ 11.0 [#]
恶性组	23	24.7 $\pm$ 16.6 [*]
LN(+)组	12	31.1 $\pm$ 14.6 ^{Δ}
LN(-)组	11	17.6 $\pm$ 16.3
对照组	10	1.9 $\pm$ 0.1

注:与对照组比较(经 F 检验及 q 检验),[#] $P<0.05$;与良性组、对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 LN(-)组比较(经 t 检验), ^{Δ} $P<0.05$

2.2 病理微血管面密度的测量结果见表 2 恶性组的微血管面密度高于良性组,两组的微血管面密度均明显高于对照组($P<0.05$);LN(+)组的微血管面密度高于 LN(-)组($P<0.05$)。

表 2 乳腺肿瘤的微血管面密度($\bar{x}\pm s$)		
	例数	微血管面密度(%)
良性组	28	1.3 $\pm$ 0.9 [#]
恶性组	23	3.3 $\pm$ 1.3 [*]
LN(+)组	12	3.9 $\pm$ 1.2 ^{Δ}
LN(-)组	11	2.8 $\pm$ 1.3
对照组	10	0.5 $\pm$ 0.1

注:与对照组比较(经 F 检验及 q 检验),[#] $P<0.05$;与良性组、对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 LN(-)组比较(经 t 检验), ^{Δ} $P<0.05$

2.3 彩色像素密度与微血管面密度有较好相关性($r=0.84$, $P<0.001$)(见图 3)。

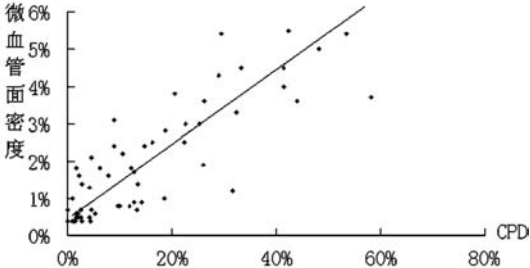


图 3 造影后肿瘤血流彩色像素密度与微血管面密度的相关性

3 讨论

血管生成因子(angiogenesis)是形成新生血管的先决条件^[2]。在胚胎发育、组织分化、伤口修复等生理性过程中血管生成因子激活的血管增殖受机体严格调节。病理性疾病(如肿

瘤、糖尿病视网膜病变、子宫内膜异位、银屑病、消化性溃疡等)血管则呈无控制性生长^[3,4]。Folkman 实验结果表明,体内肿瘤组织直径长到 2~3mm 时,靠弥散作用所提供氧和营养物质已不能满足其生长需要,肿瘤细胞分泌一些因子(VEGF、FGF 等)激活肿瘤血管由血管前期进入血管期,诱导肿瘤新生血管形成,使肿瘤组织迅速生长。肿瘤新生血管结构不完善,癌细胞极易通过新生血管基底膜进入血循环导致肿瘤转移。肿瘤血管生成因子在肿瘤生长和转移中起重要作用。

研究肿瘤血管生成最直接的方法是对肿瘤石蜡标本进行血管测量。这种测量最早是通过基于内皮细胞形态和血管密度的组织学指数(histologic index)来反映肿瘤血管活性(tumor angiogenic activity)^[3]。目前最常用的方法是 1991 年 Weidner 提出的微血管密度测量方法,即对标本切片做血管内皮细胞免疫组化染色,先在低倍镜下寻找微血管密度最高区域,再在高倍镜下计数微血管数^[2]。Weidner 率先应用此法研究乳腺浸润性导管癌。后来这种微血管密度测量法广泛应用于宫颈、脑、肺、膀胱、前列腺、直肠等脏器肿瘤研究。微血管密度象肿瘤大小、组织学分级、激素受体状态、淋巴结转移等因素一样可作为独立的评估肿瘤预后指标之一。

1993 年 Bigler 研究前列腺癌和良性组织之间 MVD 的差别,结果显示 14 例前列腺癌的 MVD 明显高于良性组织($P<0.001$)^[4]。1991 年 Weidner 对 49 例乳腺浸润性导管癌标本切片进行内皮细胞Ⅷ因子免疫组化染色,发现有转移组(30 例、远处或淋巴结转移)MVD 为每视野 101 ± 49.3 ($200\times$ 镜下),无转移组(10 例)MVD 为每视野 45 ± 21.1 ($200\times$ 镜下),有转移组与无转移组之间差异显著($P=0.003$)^[2]。本研究应用 Weidner 提出的方法来选择微血管相对最丰富的区域,应用病理图像专用软件的体视分析功能测量微血管面积,以微血管面积与统计场面积之比(微血管面密度)来反映微血管密度。本组结果表明乳腺良性及恶性肿瘤的微血管面密度均高于对照组,不仅恶性组与良性组之间微血管面密度存在差异,且在无腋下淋巴结转移乳腺癌和有腋下淋巴结转移乳腺癌组之间差异显著($P<0.05$),与以往文献结果相同。

MVD 是肿瘤血管形态学上的测量方法,需要对术后病理组织标本进行免疫组化染色后方能测量。因此有必要研究一种与 MVD 相关性好、低创伤的影像学检查方法,能够在术前为临床提供可靠信息。目前应用于肿瘤血管生成活性方面研究的影像学技术包括 MRI、螺旋 CT、多普勒超声等。多普勒超声相对其他影像学技术来说,其操作较简便,价格较低。

本研究应用造影剂与能量多普勒相结合技术显示乳腺肿瘤血管,计算机辅助定量分析肿瘤彩色像素密度,结果表明:对照组、良性组及恶性组的彩色像素密度值依次升高,差异显著。肿块的彩色像素密度高者,恶性可能性大。LN(+)组的彩色像素密度值高于 LN(-)组,提示肿块的彩色像素密度与其发生淋巴结转移的机率有关。能量多普勒超声造影技术定量测量血管,可用于监测肿瘤血管生成活性,为鉴别诊断乳腺肿瘤和了解乳腺癌有无腋下淋巴结转移提供一种可行方法。

多普勒超声在评估乳腺癌预后及研究肿瘤微血管的作用尚有争论。一些学者应用彩色多普勒血流参数评估乳腺癌预后,但结论未达一致。Peters-Engl C 一组资料表明乳腺癌肿块

内的峰值流速(Vmax)是反映乳腺癌预后的独立指标,Vmax $>25\text{cm/s}$ 的乳腺癌患者死于乳腺癌的机率较高^[5]。Mehta 认为 PDI 显示乳腺癌有血流与乳腺癌发生淋巴结、淋巴血管侵犯有关,其敏感性较高(93%、90%),但特异性较低(32%、35%)。值得注意的是,PDI 未显示血管的乳腺癌发生淋巴结、淋巴血管侵犯的机率较低,其阴性预测值分别为 90%、87%^[6]。

多普勒超声血流显像与病理组织切片 MVD 的相关性研究结论尚未统一。部分文献认为两者有相关性。Sekgal CM 观察 74 例乳腺肿块中心、周边及周围组织三个区域的血流,用计算机对 CDFI(探头频率 5~10MHz)及 PDI 显示的彩色血流信号定量分析(彩色像素密度等),结果为三个区域彩色血流信号的超声测量值(彩色像素密度等)与组织学 MVD 测量值有较强的相关性($R^2>0.9$)^[7]。Meyerowitz 研究 9 例鼠肺腺癌模型,发现 PDI 显示肿瘤的彩色像素密度与微血管计数相关性较好($r=0.8$)^[8]。本研究应用造影剂与能量多普勒相结合技术对彩色血流定量测量与免疫组化技术测量微血管面密度两者密切相关($r=0.84, P<0.001$)。

另有学者观点认为两者无相关性。Buadu 应用彩色多普勒(探头频率 7.5MHz)对 78 例乳腺肿块标本切片进行抗 CD34 染色测量 MVD,与彩色多普勒测定的平均血流面积进行比较,乳腺肿块的平均彩色血流面积与微血管密度的相关性较微弱($r=0.3, P<0.02$)^[9]。Peters-Engl C 应用 5MHz 探头研究 53 例乳腺癌的彩色多普勒血流参数(Vmax)与 MVD 之间关系,结果表明两者之间无明显相关性,他认为目前的彩色多普勒提供的血流信息是有关大血管,MVD 则反映组织学上微血管水平^[10]。

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出现分歧,笔者分析可能有以下影响因素:①各研究所用的超声技术不同。CDFI、PDI 及造影剂技术对肿瘤血管的敏感性存在差异,PDI 具有较大的动态范围,对肿瘤血管的敏感性比 CDFI 高。造影剂的应用提高血管与周围组织的信噪比,易于获得更多肿瘤血管信息。文献报道现代超声仪器在显示大血管的同时,可发现 1mm 甚至 40 μm 大小血管及流速为 1cm/s 的血流^[7],这表明现代多普勒超声能够显示小静脉、小动脉水平,当然尚不能显示微血管水平。②探头频率不同是影响血流显示率的一个因素。③免疫组化方法不同。应用于免疫组化法评估肿瘤血管内皮细胞的特异性抗体较多,包括抗Ⅷ因子、抗 CD34、抗 CD31、抗 CD105 等。各种抗体染色效果存在差异,可能会影响微血管密度测值。④人工计数与计算机测量存在差异。无论是彩色像素密度还是 MVD,计算机辅助分析相对于人工计数来说更客观、更准确,可重复性强。⑤研究样本不同。

本研究结果为恶性组血流的彩色像素密度比良性组高,血流丰富的乳癌其发生转移可能性大,超声测定的彩色像素密度与病理测定的微血管密度相关性较好。由此可见,应用造影剂和能量多普勒技术及计算机辅助测量肿瘤血流,可间接评估肿瘤血管活性,有助于鉴别乳腺肿瘤的良好性,为乳腺癌预后评估提供有用信息;还可应用此技术观察乳癌治疗前后血流多少的变化,间接判断乳癌放疗、化疗及激素治疗疗效,指导临床更有效地判定、调整治疗方案。

[1] Folkman J. Angiogenesis and breast cancer[J]. Journal of Clinical Oncology,1994,12(3): 441-443.

[2] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med,1991,324(1):1-8.

[3] Passe TJ, Bluemke DA, Siegelman SS. Tumor angiogenesis: Tutorial on implications for imaging[J]. Radiology, 1997, 203(6): 593-600.

[4] Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue[J]. Hum Pathol,1993,24(2): 220-226.

[5] Peters-Engl C, Frank W, Leodolter S, et al. Tumor flow in malignant tumors measured by Doppler ultrasound: an independent predictor of survival[J]. Breast Cancer Res Treatment,1999,54(1): 65-71.

[6] Mehta TS, Raza S. Power Doppler sonography of breast cancer: Does vascularity correlate with node status or lymphatic with node status or lymphatic vascular invasion[J]? AJR,1999,173(2):303-307.

[7] 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.

[8] Meyerowitz CB, Fleischer AC, Pickens DR, et al. Quantification of tumor vascularity and flow with amplitude color Doppler sonography in an experimental model: Preliminary results[J]. J Ultrasound Med, 1996,15(12):827-833.

[9] Buadu LD, Murakami J, Murayama S, et al. Colour Doppler sonography of breast masses: a multiparameter analysis[J]. Clin Radiology,1997,52(12):917-923.

[10] Peters-Engl C, Medl M, Mirau M, et al. Color-coded and spectral Doppler flow in breast carcinomas-relationship with the tumor microvasculature[J]. Breast Cancer Res Treatment, 1998,47(1): 83-89.

左室心肌不紧合的二维超声心动图诊断

汪 洁,陈树宝,孙 锐,倪金红,高玲玲,陈 笋
(上海第二医科大学附属新华医院心超室,上海 200092)

[中图分类号] R445.1; R542.2 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2002)07-0663-02

左室心肌不紧合是一种罕见的发育不良性心肌病,心衰、严重的心律失常或血栓栓塞,可以出现在任何年龄^[1]。我们通过对 1994 年至 2001 年间 9 例患者的超声图像的分析,探讨左室心肌不紧合的超声图像特点。

1 资料与方法

本组 9 例患者中男 4 例,女 5 例,年龄 3 天~54 岁,其中 4 例患者出现心衰的临床表现,3 例有先天性心脏病的临床表现和体征,2 例无明确的病史(其中 1 例偶有活动后气急的表现)。心电图:8 例表现为左心室的增大或左房、左室的增大(其中 2 例伴有 ST-T 的变化,1 例伴右心室的增大,1 例伴右房的增大,1 例伴房颤);1 例为正常心电图。胸片显示 2 例患者双室增大(其中 1 例肺血增多);1 例全心扩大伴肺部感染

的表现;4 例仅有左心室扩大;2 例胸片无特殊。仪器使用 HP SONOS 1000 型或 5500 型超声诊断仪,探头频率 2.5~5MHz。患者取平卧或左侧卧位,常规行剑突下四腔切面、五腔切面、短轴切面的扫查及心尖部四腔、五腔、胸骨旁短轴、长轴检查,重点观察左室壁结构的变化。

2 结果

本组 9 例患者于剑突下或胸骨旁四腔、短轴切面发现左心室腔内二尖瓣水平、腱索水平或乳头肌水平以下的心肌被网格状或蜂窝状的海绵样心肌组织所充填(图 1~4),9 例患者中 1 例病变起自二尖瓣水平,1 例局限于心尖部,其余均起自腱索或乳头肌水平。对伴发的其他超声表现及心功能情况归纳如下(表 1)。

表 1 9 例患者超声表现

	性别	年龄	左室增大	左房增大	MR	AI	伴发先心	EF	FS
1	女	6 个月	+	—	++	—	—	0.24	0.11
2	女	11 岁	+(呈球型)	+	+++	+	—	0.48	0.10
3	女	5 岁	—	—	—	—	—	0.69	0.38
2	男	1 岁	—	—	+	—	—	0.57	0.29
5	男	6 岁	+	+	+++	++	PDA、单支左冠状动脉	0.52	0.27
6	男	3 天	+	—	—	—	TOF、ASD、PDA、LSVC	0.69	0.37
7	女	4 个月	+(呈球型)	+	+++	—	—	0.48	0.24
8	女	12 岁	+	+	+	++	PDA、VSD、LVOTO、PH	0.61	0.29
9	男	54 岁	+	+	++	+	—	0.36	0.18

注:MR:二尖瓣返流;AI:主动脉瓣返流(+:轻微,++:轻度,+++ :中度);ASD:房间隔缺损;TOF:法洛四联症;PDA:动脉导管未闭;LVOTO:左室流出道梗阻;VSD:室间隔缺损;LSVC:左上腔静脉残存;PH:肺动脉高压;EF:左室射血分数;FS:短轴缩短分数

[作者简介] 汪洁(1968—),女,上海人,大学本科,主管技师。
[收稿日期] 2002-03-27