

❖腹部影像学

Relationship between parameters of intravoxel incoherent motion imaging with Ki-67 expression level in rectal adenocarcinoma

ZHU Haibin, LI Xiaoting, LIU Yuliang, SUN Yingshi*

(Department of Radiology, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research [Ministry of Education], Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between parameters of intravoxel incoherent motion imaging and the molecular markers Ki-67 in rectal cancer patients. **Methods** Totally 86 patients with rectal cancer confirmed by surgery and without receiving chemoradiotherapy were included in this retrospective study. All patients underwent multiple b-values ($b=0, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1\ 000, 1\ 200, 1\ 400, 1\ 600\text{ s/mm}^2$) DWI before any anticancer treatment. The patients were divided into low Ki-67 group ($\text{Ki-67} < 50\%$) and high Ki-67 group ($\text{Ki-67} \geq 50\%$) according to Ki-67 level. Relationship between the quantitative parameters from IVIM model and Ki-67 level were assessed. The relationship among Ki-67 level, clinicopathological outcomes and MR parameters was analyzed using linear regression analysis. **Results** In high Ki-67 group, the mean D, f value had significantly differences compared with those of the low-Ki-67 group [$(0.61 \pm 0.14) \times 10^{-3}\text{ mm}^2/\text{s}$ vs $(0.44 \pm 0.15) \times 10^{-3}\text{ mm}^2/\text{s}$, $P < 0.01$; (0.25 ± 0.07) vs (0.32 ± 0.10) , $P = 0.01$]. However, the mean D^* values had no difference between two groups [$(24.2 \pm 8.9) \times 10^{-3}\text{ mm}^2/\text{s}$ vs $(23.5 \pm 12.1) \times 10^{-3}\text{ mm}^2/\text{s}$, $P = 0.41$]. There was a negative correlation between Ki-67 level and D values ($r = -0.40$, $P < 0.01$). In addition, of all these variables, a higher D values independently predicted a high Ki-67 status. **Conclusion** Significant correlations are observed between pre-treatment D values and Ki-67 level of rectal cancer. It suggests that D value from IVIM model may be used as a noninvasive biomarker for evaluation the biological features of rectal cancer before treatment.

[Key words] Rectal neoplasms; Intravoxel incoherent motion imaging; Diffusion-weighted imaging; Ki-67

DOI:10.13929/j.1003-3089.201610017

直肠癌磁共振体素内不相干运动成像定量参数与 Ki-67 表达水平的相关性分析

朱海滨, 李晓婷, 刘玉良, 孙应实*

(北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所医学影像科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142)

[摘要] **目的** 探讨直肠癌体素内不相干运动成像(IVIM)定量参数值与 Ki-67 表达水平的相关性。**方法** 86 例未接受新辅助治疗而直接经手术证实的直肠腺癌患者接受直肠多 b 值 DWI 检查($b=0, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1\ 000, 1\ 200, 1\ 400, 1\ 600\text{ s/mm}^2$), 测量病灶相应的 D、 D^* 、f 值。按 Ki-67 水平将其分为低表达组($\text{Ki-67} < 50\%$)和高表达组

[基金项目] 国家自然科学基金(81471640、81371715)。

[第一作者] 朱海滨(1985—), 男, 山东泰安人, 博士, 主治医师。研究方向: 腹部肿瘤影像。E-mail: zuirenchiyu@163.com

[通信作者] 孙应实, 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所医学影像科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 100142。

E-mail: sys27@163.com

[收稿日期] 2016-10-08 **[修回日期]** 2016-11-09

($Ki-67 \geq 50\%$), 比较两组多 b 值定量参数有无差异并分析其与 Ki-67 表达水平的相关性, 并采用多因素回归分析 Ki-67 指数增殖程度与临床病理结果和 MR 参数的关系。结果 直肠癌低表达组与高表达组的平均 D、f 值分别为 $[(0.61 \pm 0.14) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}]$ vs $[(0.44 \pm 0.15) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}]$; (0.25 ± 0.07) vs (0.32 ± 0.10) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$; $P = 0.01$), 两组间 D^* 值差异无统计学意义 $[(24.2 \pm 8.9) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}]$ vs $[(23.5 \pm 12.1) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}]$, $P = 0.41$ 。D 值与 Ki-67 表达水平呈负相关 ($r = -0.40$, $P < 0.01$)。多因素回归分析提示仅 D 值是高 Ki-67 表达的独立危险因素。结论 直肠癌 D 值与 Ki-67 表达相关, 可间接评估直肠肿瘤细胞增殖情况及预后, 反映直肠癌的侵袭性和生物学特性。

[关键词] 直肠肿瘤; 体素内不相干运动; 扩散加权成像; Ki-67

[中图分类号] R735.3; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2017)02-0237-05

直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率逐年上升, 发病年龄也趋向年轻化^[1]。细胞增殖核抗原 Ki-67 是一种反映细胞分裂和增殖活性的标志物, 其在肿瘤组织中表达的高低不仅与肿瘤的增殖密切相关, 还与新辅助放化疗对肿瘤的疗效及患者的预后密切相关^[2]。然而, Ki-67 表达水平须在直肠癌手术后经免疫组化染色获得, 因此术前无创性评价 Ki-67 表达水平对预测患者疗效及判断预后具有重要临床价值。体素内不相干运动 (intravoxel incoherent motion imaging, IVIM) 序列 MRI 不仅可提供反映组织中水分子运动的定量参数, 还可反映组织灌注情况, 目前已作为一种无创性检查方法广泛用于临床^[3]。本研究采用 3.0T MR 术前评价 IVIM 定量参数与 Ki-67 表达程度的相关性, 以期临床诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 9 月—2016 年 7 月我院接诊的直肠癌患者 86 例, 其中男 56 例, 女 30 例, 年龄 18~82 岁, 中位年龄 59 岁。纳入标准: ①术前未接受放、化疗且有完整 MRI 资料; ②MR 检查后 1 周内接受根治性手术治疗; ③术后病理确诊为直肠癌。排除标准: ①既往有盆腔手术史; ②伴有或患过其他肿瘤并接受过盆腔放疗和/或化疗; ③MR 图像缺失或无法测量; ④病理结果为直肠黏液腺癌和印戒细胞癌。

1.2 仪器与方法 检查前无需行肠道准备, 在无禁忌证 (青光眼、前列腺过度肥大或严重心脏病) 的情况下, 予盐酸山莨菪碱 20 mg 肌肉注射, 以使肠道处于低张状态。采用 GE Signa Horizon HDXT 3.0T MR 扫描仪和 8 通道相控阵腹部线圈, 线圈中心定位于耻骨上缘。多 b 值 DWI 采用单激发自旋回波平面成像 (SE-EPI) 序列, b 值取 12 个 (0、20、50、100、200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 s/mm^2), 相应的激励次数分别为 1、1、1、1、1、2、2、2、4、4、6、8。其他参数如下: TR 2 800 ms, TE 70 ms, 反转恢复时间 240 s, 矩

阵 256×256 , FOV $340 \text{ mm} \times 272 \text{ mm}$, 层厚 4 mm, 间距 1 mm。图像为轴位采集, 覆盖全部肿瘤区域, 总扫描时间为 4.5 min。多 b 值 DWI 扫描完成后, 行轴位及矢状位、冠状位 T2WI 序列扫描。增强扫描对比剂采用 Gd-DTPA, 经高压注射器以 3.0 ml/s 的流率注射对比剂 0.1 mmol/kg 体质量, 后用 20 ml 生理盐水冲管。

1.3 图像处理 由 2 名经验丰富的放射科医师在未知患者手术病理结果的情况下对图像进行分析并最终取得一致意见。采用 GE AW 4.6 工作站分析 DWI 图像并计算生成相应的扩散系数。在 $b = 1\,000 \text{ s}/\text{mm}^2$ 的图像选取肿瘤最大层面勾画 ROI, 重复测量 3 次扩散系数并取平均值; 勾画 ROI 时参考 T2WI、DCE-MRI 图像以确定肿瘤边界, 并避开黏液、坏死、囊变及出血区, ROI 不应包括肠腔、伪影和血管。通过双指数模型的 IVIM 对数据进行分析, 得到以下 3 个参数: D^* (假性扩散系数或 fastADC, 单位: $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)、D (真性扩散系数, 也称为 slowADC 或与灌注不相关的扩散, 单位: $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) 和 f (灌注相关的扩散分数) 值。双指数模型的计算公式如下: $S(b)/S(0) = f \times \exp(-b \times D^*) + (1-f) \times \exp(-b \times D)$ 。其中 $S(b)$ 是特定的 b 值的信号强度, $S(0)$ 是 $b = 0$ 的信号强度。

1.4 病理学分析 所有患者均按照全系膜直肠切除手术 (total mesorectal excision, TME) 行根治性切除手术, 手术标本经甲醛溶液固定 48 h 后, 石蜡包埋切片、HE 染色。直肠癌 TNM 分期以国际抗癌联盟 (International Union Against Cancer, UICC) 和美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 合作制定的第 7 版肿瘤 TNM 分期为标准^[4]。行免疫组化染色观察 Ki-67 阳性细胞, 每张切片观察 5 个高倍镜视野, 以细胞内有棕黄色染色颗粒沉积者为 Ki-67 阳性细胞, 计算阳性细胞所占细胞总数的百分比即为 Ki-67 指数。以 50% 为界, 将患者分为: 低表达组 ($Ki-67$ 指数 $< 50\%$) 和高表达组 ($Ki-67$ 指数 $\geq 50\%$)。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件。连

续变量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两独立样本 t 检验或 Mann-Whitney 检验比较不同 Ki-67 表达水平组间的差异;采用 Spearman 双侧检验法,分析各参数间的相关性;采用线性回归分析 Ki-67 水平与临床病理结果及 MR 参数的线性关系,选择单因素分析 $P < 0.1$ 的参数纳入多因素回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

86 例直肠癌患者中高分化腺癌 4 例、中分化腺癌 67 例、低分化腺癌 15 例。术后分期:T1 期 5 例、T2 期 19 例、T3 期 56 例、T4 期 6 例;N0 期 50 例、N1 期 24 例、N2 期 12 例。脉管癌栓阳性组 31 例、阴性组 55 例。

2.1 IVIM 定量参数与直肠癌 Ki-67 表达的关系

86 例患者中,Ki-67 抗原低表达组 15 例(15/86,17.44%)、高表达组 71 例(71/86,82.56%)。低表达组肿瘤的平均 D 值为 $[(0.61 \pm 0.14) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}]$;f 值为 0.25 ± 0.07 ;高表达组 D 值为 $(0.44 \pm 0.15) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$;f 值为 0.32 ± 0.10 ,差异均有统计学意义($P < 0.01, P = 0.01$)。低表达组与高表达组间 D* 值差异无统计学意义 $[(24.20 \pm 8.90) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs $(23.50 \pm 12.10) \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}, P = 0.41]$,见图 1、2。肿瘤平均 D 值与 Ki-67 的表达呈负相关($r = -0.40, P < 0.01$),见表 1、图 3。

表 1 Ki-67 表达水平与 D、D* 及 f 值的相关性

参数	D	D*	f
r 值	-0.40	-0.09	0.27
P 值	<0.01	0.41	0.01

2.2 Ki-67 表达水平回归分析 对直肠癌患者的 Ki-67 表达水平与临床病理及 MR 各参数行单元及多元回归分析,发现仅 D 值与 Ki-67 间存在回归关系($\beta = -0.29, P = 0.01$,表 2)。

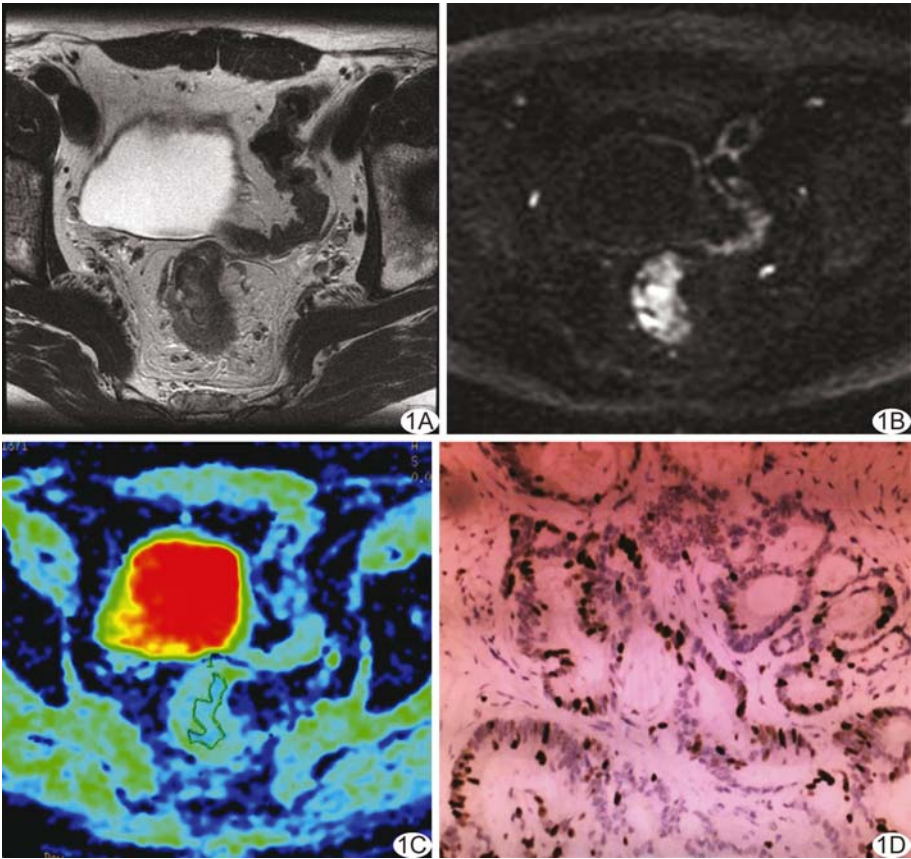


图 1 患者男 65 岁,直肠中段中分化腺癌 A.轴位 T2WI 示肿瘤位于左侧壁及后壁,肿块向腔内突出,呈稍高信号;B. DWI($b = 1\,000 \text{ s}/\text{mm}^2$)示病灶呈明显高信号;C. D 值伪彩图示病灶呈稍低信号(ROI 内),平均 D 值为 $0.72 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$;D. Ki-67 染色在高倍镜下($\times 200$)呈均一棕黄色颗粒(Ki-67 指数为 30%)

表 2 Ki-67 指数与各参数回归分析结果

变量	单元线性回归		多元线性回归	
	β	P 值	β	P 值
D	-0.35	0.01	-0.29	0.01
D*	-0.01	0.91	—	—
f	0.27	0.01	0.18	0.10
脉管癌栓	0.13	0.24	—	—
T 分期	0.25	0.02	—	—
N 分期	-0.09	0.39	—	—

3 讨论

DWI 通过检测活体组织中水分子布朗运动受限的程度和方向,可定量计算表观扩散系数值来间接反映水分子的微观运动,目前这种方法已广泛用于临床^[5-6]。但这一传统模型是基于水分子位移呈高斯分布和影像信号随着 b 值的增加呈单指数函数衰减为前提的。实际生物体内,水分子的位移呈偏离高斯分布,DWI 信号衰减也并不符合单指数函数:即 DWI 信号

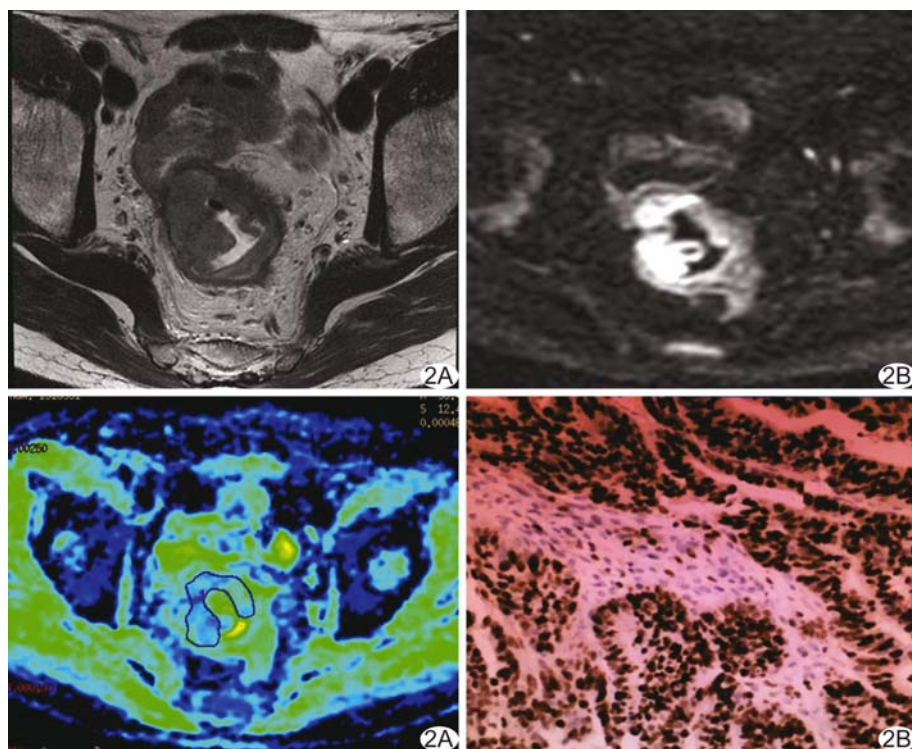


图2 患者男,65岁,直肠上段中分化腺癌 A. 轴位 T2WI 示肿瘤侵犯肠壁约 3/4 周,呈稍高信号; B. DWI($b=1\,000\text{ s/mm}^2$) 示病灶呈明显高信号; C. D 值伪彩图示病变呈低信号(ROI),平均 D 值为 $0.57 \times 10^{-3}\text{ mm}^2/\text{s}$; D. Ki-67 染色在高倍镜($\times 200$)下呈均一棕黄色颗粒(Ki-67 指数为 90%)

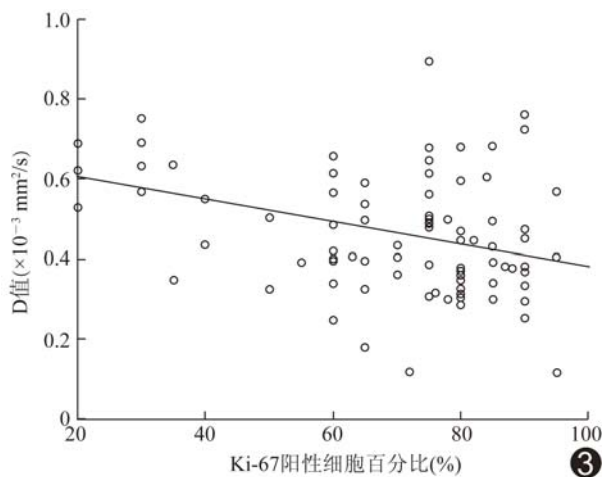


图3 肿瘤 D 值与 Ki-67 指数的相关性散点图

除受组织内水分子扩散影响外,还与毛细血管网的微循环灌注相关,特别在低 b 值($b < 200\text{ s/mm}^2$)时,微循环灌注起主要作用^[7]。Li 等^[3]于 1986 年提出 IVIM 理论,采用多 b 值扫描、进行双指数扩散衰减模式计算,可将分子的扩散和灌注效应相分离,使体素内水分子的扩散更接近生物组织的实际特征。IVIM 模型得到 3 个参数包括:真性扩散系数(D)值、灌注分数

(f) 值、灌注相关假扩散系数(D^*)。

Ki-67 是一种增殖期细胞特异性表达的核抗原,其表达的高低反映了细胞的增殖状态,功能与细胞的有丝分裂密切相关,在有丝分裂的 G2/M 期呈高表达。Ki-67 广泛应用于肿瘤恶性程度及预后的评估方面,高表达提示肿瘤细胞增殖活跃、侵袭性较强,预后较差^[8]。本研究结果显示 D、 f 值在不同 Ki-67 表达水平组间差异有统计学意义,但 Logistic 回归分析显示仅 D 值与 Ki-67 间存在回归关系,同时 Ki-67 的表达水平和 D 值呈负相关,即 Ki-67 表达越多,D 值也越低,恶性程度增加。分析原因可能为:肿瘤 Ki-67 高表达提示肿瘤细胞增殖活跃,细胞体积增大、数目增多,细胞外体积分数减低;与此同时,细胞内的蛋白质等大分子合成增多,细胞核增大、染色质增

多,核/浆比增高。这些因素最终导致细胞内、外水分子扩散障碍,D 值降低。本研究结果与既往关于表观扩散系数的研究较一致,如 Meng 等^[9]对 91 例直肠癌研究提示,表观扩散系数值与 Ki-67 呈负相关,相关系数为 -0.475 。同时,肿瘤表观扩散系数值与 Ki-67 表达之间的关系在膀胱和乳腺的研究中也得到了相似的结论^[2,10]。本研究回归分析显示,仅 D 值是高 Ki-67 的独立回归因子,其他因素(包括病理学分级、T/N 分期及脉管癌栓状态)均不是独立回归因子。既往对乳腺癌的研究^[11]多认为 Ki-67 水平与病理学分级密切相关,与本研究结果不一致,可能与本研究高分化直肠癌入组病例较少造成的偏倚有关,故未来还需大样本、多中心研究进一步证实。本研究结果提示 Ki-67 表达水平与肿瘤 T/N 分期及脉管癌栓状态无关,可能的原因是肿瘤 T/N 分期增加及脉管癌栓形成时,肿瘤细胞异型性、数目及细胞内外间隙可能未发生明显变化,即肿瘤组织内部的微观结构未发生显著变化,而仅是侵犯程度增加,因此肿瘤 T/N 分期及脉管癌栓状态与 Ki-67 表达水平间不具有相关性,但这一推测还有待结合病理学研究进一步证实。

目前关于灌注参数与 Ki-67 的相关性研究主要集中在动态增强 MR 的定量参数方面,其结果仍存争议。Molinari 等^[12]研究提示,高 K^{trans} 、高 K_{ep} 和低 V_e 均与 Ki-67 之间存在相关性,而 Kim 等^[13-14]对乳腺癌的研究则提示仅 K^{trans} 与 Ki-67 存在相关性。导致这种结果的原因是一方面可能与 Ki-67 分组标准不同有关;另一方面与动态增强定量参数有关(如 K^{trans} 、 K_{ep} 和 V_e)。Ki-67 与 IVIM 各参数的相关性仍待进一步研究。

本研究的局限性:①ROI 的选择可能对结果有较大影响。本研究中采用手动勾勒最大层面 ROI,而非全肿瘤 ROI 和实性肿瘤取样 ROI。因为 ROI 的大小、位置均会对扩散系数观察者间的一致性产生较大影响,关于不同 ROI 选择对于结果的影响仍需进一步研究。②仅收集了直肠腺癌而排除了黏液腺癌和印戒细胞癌,可能对结果造成选择偏倚。③T4 期患者样本量较小,主要由于多数 T4 患者因接受新辅助治疗而无法入组。

综上所述,IVIM 是目前临床应用广泛的一种无创性检测水分子扩散受限的影像学检查方法,其定量参数 D 值与 Ki-67 的表达水平呈负相关,可术前评估直肠癌肿瘤细胞增殖程度,为指导临床治疗提供了客观评价指标。

[参考文献]

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [2] Kobayashi S, Koga F, Kajino K, et al. Apparent diffusion coefficient value reflects invasive and proliferative potential of bladder cancer. *J Magn Reson Imaging*, 2014, 39(1):172-178.
- [3] Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*, 1988, 168(2):497-505.
- [4] Kim MS, Hur H, Min BS, et al. Clinical outcomes for rectal carcinoid tumors according to a new (AJCC 7th edition) TNM staging system: A single institutional analysis of 122 patients. *J Surg Oncol*, 2013, 107(8):835-841.
- [5] Schnapauff D, Zeile M, Niederhagen MB, et al. Diffusion-weighted echo-planar magnetic resonance imaging for the assessment of tumor cellularity in patients with soft-tissue sarcomas. *J Magn Reson Imaging*, 2009, 29(6):1355-1359.
- [6] Heijmen L, Verstappen MC, Ter Voert EE, et al. Tumour response prediction by diffusion-weighted MR imaging: Ready for clinical use? *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, 83(2):194-207.
- [7] Zhou XH, Gao Q, Abdullah O, et al. Studies of anomalous diffusion in the human brain using fractional order calculus. *Magn Reson Med*, 2010, 63(3):562-569.
- [8] Sole V, Calvo FA. Research opportunities for vascular endothelial growth factor receptor and Ki67 relative percentage co-reduction in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2014, 26(2):122-123.
- [9] Meng X, Li H, Kong L, et al. MRI in rectal cancer: Correlations between MRI features and molecular markers Ki-67, HIF-1 α , and VEGF. *J Magn Reson Imaging*, 2016, 44(3):594-600.
- [10] Choi SY, Chang YW, Park HJ, et al. Correlation of the apparent diffusion coefficient values on diffusion-weighted imaging with prognostic factors for breast cancer. *Br J Radiol*, 2012, 85(1016):e474-e479.
- [11] Kim EJ, Kim SH, Park GE, et al. Histogram analysis of apparent diffusion coefficient at 3.0t: Correlation with prognostic factors and subtypes of invasive ductal carcinoma. *J Magn Reson Imaging*, 2015, 42(6):1666-1678.
- [12] Molinari C, Clauser P, Girometti R, et al. MR mammography using diffusion-weighted imaging in evaluating breast cancer: A correlation with proliferation index. *Radiol Med*, 2015, 120(10):911-918.
- [13] Kim JY, Kim SH, Kim YJ, et al. Enhancement parameters on dynamic contrast enhanced breast MRI: Do they correlate with prognostic factors and subtypes of breast cancers? *Magn Reson Imaging*, 2015, 33(1):72-80.
- [14] Shin JK, Kim JY. Dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MRI of estrogen receptor-positive invasive breast cancers: Associations between quantitative MR parameters and Ki-67 proliferation status. *J Magn Reson Imaging*, 2017, 45(1):94-102.