

· 论著 ·

人离体乳腺癌肿瘤新生血管的同步辐射成像实验研究

李瑞敏¹, 张 汐¹, 王升平¹, 彭卫军¹, 吴 昊²

1. 复旦大学附属肿瘤医院放射诊断科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院乳腺外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

【摘要】 目的: 探讨同步辐射类同轴相衬成像在人乳腺癌离体标本中的应用。**方法:** 12例乳腺癌标本经4%甲醛溶液固定后, 在上海同步辐射光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF)X线成像与生物医学应用光束线站(BL13W)上进行同步辐射类同轴相位衬度二维及三维成像, 最后行病理学及免疫组化检查, 将所得影像学资料与病理学资料进行对比研究。**结果:** 物像距为100 cm、能量为13 keV时, 图像具有较高的空间分辨率和衬度分辨率。类同轴相位衬度二维及三维成像均可在无对比剂条件下清晰显示肿瘤新生血管, 最小肿瘤血管直径约9 μm 。**结论:** 同步辐射类同轴相位衬度成像可检测人乳腺癌标本中的肿瘤新生血管, 清晰观察肿瘤血管的形态特征和空间分布, 为研究肿瘤新生血管的形成机制及各种干预或治疗措施对肿瘤血管的影响提供了检测和监测方法, 具有很高的医学应用价值。

【关键词】 乳腺癌; 血管生成; 同步辐射类同轴相位衬度成像

中图分类号: R445.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-617X(2016)02-0156-04

Visualization of angiogenesis by synchrotron radiation in human breast cancer LI Ruimin¹, ZHANG Xi¹, WANG Shengping¹, PENG Weijun¹, WU Jiong² (1.Department of Radiology, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Department of Breast Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: PENG Weijun E-mail: cjr.pengweijun@vip.163.com

【Abstract】 Objective: To evaluate the application of synchrotron radiation (SR) in-line X-ray phase-contrast imaging in human breast cancer. **Methods:** Twelve excised human breast specimens were studied. Monochromatic SR X-ray in-line phase-contrast images were obtained at the beamline BL13W of Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF) in China with the energy of 13 keV and the distances of 100 cm. Meanwhile, the three-dimensional images were processed. Finally, the pathology results were confirmed. **Results:** The images obtained with SR had higher contrast and better resolution. The angiogenesis of the breast cancer was obtained for the first time with no contrast agents, and the minimal tumor blood vessel was about 9 μm in diameter. **Conclusion:** SR in-line X-ray phase-contrast imaging can detect the angiogenesis of human breast cancer, and clearly display the morphological characteristics and spatial distribution of tumor blood vessels. It provides a method to study the mechanism of tumor angiogenesis and the effects of various interventions or treatments on tumor angiogenesis. It would be a great potential diagnostic tool in clinical application in the future.

【Key words】 Breast cancer; Angiogenesis; Synchrotron radiation in-line X ray phase-contrast imaging

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 而肿瘤新生血管的生成、生长是肿瘤发生、发展和转移的必要条件^[1]。早期检测并全程监测肿瘤新生血管的变化对乳腺癌的检出与治疗有重要意义。但目前传统影像学技术在显示肿瘤新生血

管方面还存在一定的局限性, 尚不能显示直径< 200 μm 的细小血管^[2], 而肿瘤新生血管的直径约为10 μm , 因此亟需一种新型成像技术, 用以观察和分析肿瘤新生血管的形态、结构和分布特征。

基金项目: 国家973计划项目(No: 2010CB834305); 国家自然科学基金(No: 11235007, No: 81371550, No: 81272446, No: 81172073)

通信作者: 彭卫军 E-mail: cjr.pengweijun@vip.163.com

同步辐射相衬成像是基于入射光在不同密度组织中的相位变化差异,其对软组织的分辨率较传统X线吸收成像提高1 000倍,可清晰显示软组织之间(如血管、韧带等)的细微差异。同步辐射相衬成像主要包括类同轴相衬成像、衍射增强成像、干涉法成像和光栅相位成像4种。其中,类同轴相衬成像具有成像原理简单、软组织分辨率高、图像与传统图像相似、易于理解和判读等优点。本研究旨在利用同步辐射类同轴相衬技术对人乳腺癌标本进行成像,观察乳腺癌肿瘤新生血管的形态和分布。

1 资料和方法

1.1 标本选取

选取2011年9月—2014年9月复旦大学附属肿瘤医院乳腺外科切除的标本12份,均经患者知情同意并满足临床病理诊断后取得,单个标本大小约10 mm×5 mm×3 mm,标本切取后即刻放入4%甲醛溶液进行固定并准备成像。本研究通过复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会批准。

1.2 同步辐射成像

标本在第3代上海同步辐射光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF) X线成像与生物医学应用光束线站(BL13W)上进行。其光子能量范围为8~72.5 keV,同步辐射光线照射单色晶体,被单色化后。与样品作用,在各组织面发生菲涅耳衍射,出射光线携带的样品相位信息被探测器接收后,通过调节探测器与样品台的距离及射线能量获得清晰的相位衬度图像。本研究选用高分辨率CCD探测器,像素9 μm×9 μm。物像距分别选取5 cm、20 cm、60 cm、100 cm、120 cm,单色光能量分别设置为8 keV、10 keV、13 keV、16 keV、19 keV,对比不同参数情况下获得的图像清晰度和分辨率,最后选择最佳成像参数。曝光时间根据样品厚度和密度而自动调节。CT扫描时,样本在转台上以0.25°/s的速度旋转180°,总投影数为1 200帧。

1.3 图像重建与图像后处理

摄片结束后对图像进行减影处理,先将投影图像减去相同成像条件的背景图像,然后

用IDL7.0 [ITT Visual Information Solutions (ITT VIS)]编写的平行束滤波反投影重建算法重建获得24位断层图像,最后用软件Amira 4.1 (Mercury Computer Systems, USA)进行三维重建。

1.4 影像学评价

血管直径的测量使用NIH Image J Program (version 1.37)。在图像的每一象限各选择两条较细的血管,由两名医师分别测量,每一组最细的血管被用来与另一组最细的血管进行比较。两名测量者公认的最细血管的平均值作为最细血管。

1.5 病理学分析

成像结束后,所有标本经4%甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μm连续切片,进行常规苏木素-伊红(Haematoxylin-Eosin, HE)染色及免疫组化染色[CD34及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)]。

2 结果

2.1 一般结果

12例标本中,11例可见肿瘤新生血管;1例仅见软组织密度影,未见肿瘤新生血管。

2.2 成像参数的确立

物像距:由于机器部件构造的因素,最小物像距为5 cm,相当于传统X线吸收成像,软组织及肿瘤中的钙化显示均较模糊。随着物像距增加,图像分辨率也逐渐增加,物像距为100 cm时所获得的图像显示肿瘤与正常组织边界、肿瘤内部的不均质结构及微钙化等细节非常清楚。但当物像距≥120 cm时,图像质量开始下降。成像能量:能量为8 keV时图像较暗,随着能量增加,图像本底明亮度增加,但衬度降低。对5种不同能量进行对比分析,认为能量为13 keV时图像亮度及衬度较为理想。曝光时间:根据样品厚度和密度不同,曝光时间也不同,系统在成像过程中根据探测器记录到的像素灰度值自动调整曝光时间,本研究中为5~25 ms。

2.3 肿瘤新生血管的检出

在物像距为100 cm、能量为13 keV的成像条件下,二维相衬成像可清晰显示乳腺癌标本内的肿瘤新生血管(图1~2)。肿瘤新生血管呈藤蔓状

分布于肿瘤的周边区，管径粗细不一，走行杂乱无章，最细的肿瘤新生血管直径约9 μm。类同轴相位衬度CT成像可三维立体显示肿瘤内部杂乱无章的肿瘤新生血管(图3)，可见肿瘤新生血管主要分布于肿瘤周边区域，而肿瘤中心区血管较少。

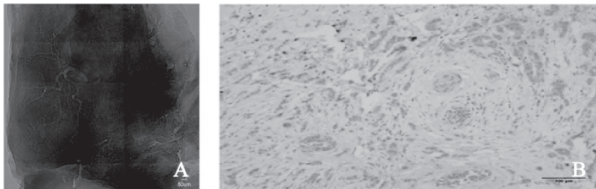


图1 乳腺癌标本内的肿瘤新生血管同步辐射类同轴相衬成像及VEGF免疫组化检查

A: 同步辐射类同轴相衬成像; B: VEGF免疫组化检查(×100)。无对比剂情况下，类同轴相位衬度成像可清晰显示微米级的乳腺肿瘤新生血管，呈树藤状分布于肿瘤周边区，管径粗细不一，走行杂乱无章；VEGF染色阳性，可见多发棕黄色颗粒散在分布，部分聚集成管腔样结构

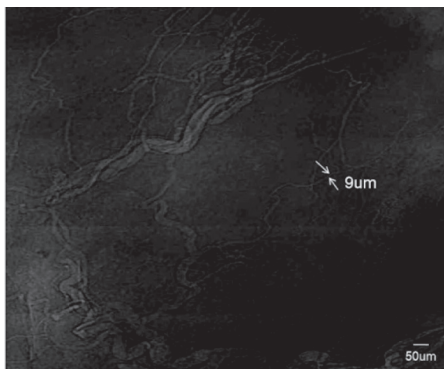


图2 乳腺癌标本内的肿瘤新生血管同步辐射类同轴相衬成像

为另一标本的同步辐射类同轴相衬成像，二维图形上测量的最细血管直径为9 μm

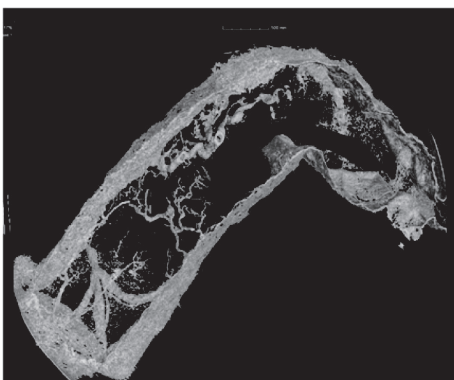


图3 类同轴相位衬度CT成像

无对比剂情况下，类同轴相位衬度三维成像可直观、立体显示肿瘤内部杂乱无章的肿瘤新生血管

2.4 病理学分析

HE染色可见正常组织与癌组织分界清楚，部分癌巢中可见囊变坏死，肿瘤间质中弥漫多发裂隙状的肿瘤新生血管。CD34及VEGF染色可见多发深染颗粒散在分布(图1)，形态和排列具有明显不均一性，形态失常，多为条索状，部分聚集成管腔样结构，管腔粗细不一。

3 讨论

12份标本中，11份可见肿瘤新生血管；1份未见肿瘤新生血管，分析该标本发现大部分为正常组织，仅边缘有少量肿瘤组织存在，可能原因是该病例肿块较小，取材时偏离肿块中心，导致取材主要为癌旁组织，癌巢呈点灶状散布于正常组织间，尚未见成熟的肿瘤新生血管形成。

类同轴相位衬度成像的成像条件确定非常重要。物像距是影响图像质量的一个非常重要的参数^[3]。根据小孔成像的原理，光源与样品的距离固定时，物像距越大，空间分辨率越低；另一方面，物像距越大，图像的衬度越高。本研究中物像距为5 cm或20 cm时，图像模糊，细节显示不够清楚，衬度分辨率不高。而物像距为60 cm、100 cm及120 cm时，图像质量明显提高，样品中的肿瘤组织、正常组织及两者边界显示非常清楚，三者图像衬度分辨率无明显差异。但当物像距≥120 cm时，有效空间分辨率受到一定限制，<10 μm的血管无法显示。因此，本研究选择了既能保证适当高衬度分辨率，又不损失空间分辨率的100 cm作为物像距。图像衬度与能量成反比，能量越低图像衬度越高^[4]。但能量太低时，对于部分较厚的标本，光线穿透不够，易造成图像本底较为黑暗，不利于病灶细微结构的显示。能量为13 keV时图像衬度最理想。

肿瘤新生血管生成对实体肿瘤的发生、发展起重要作用^[5-6]，实体肿瘤的生长和转移依赖新生血管的形成。但目前传统影像学技术只能分辨直径>200 μm的血管，且在应用对比剂的条件下才能使血管显影^[7]。本研究利用类同轴相位衬度成像技术，在不应用对比剂的情况下成功获得微米级的乳腺肿瘤新生血管，能清晰显示最小直径

约9 μm 的肿瘤血管。本研究检出的最细血管直径明显小于其他研究所能显示的最小直径,可能与X线相位漂移的特性有关^[8-9]。X线相位漂移与物体比重有一定的相关性,血液中红细胞内的血红蛋白含有大量铁原子,其比重与周围组织不同,可导致相位衬度发生很大的改变。而本研究选取的是临床上新鲜的乳腺癌标本,手术取出后立即放入甲醛溶液中固定,保证了肿瘤血管内的血液能及时固定下来而不会被其他物质影响,从而真实反映肿瘤新生血管的状态。

本研究的优势为在无对比剂情况下即可实现肿瘤新生血管的成像,避免使用碘造影剂带来的各种毒副作用,为以后临床不用对比剂即可进行血管成像提供了一定的思路。同时,类同轴相位衬度成像主要依赖X线的折射作用^[10],与X线的吸收无关,可明显减少人体吸收的辐射剂量。最后,同步辐射类同轴相位衬度成像对肿瘤新生血管的显示,可用来观察早期肿瘤微血管生成及抗肿瘤新生血管治疗的疗效,具有很高的医学应用价值。总之,同步辐射成像在乳腺疾病诊断和治疗中有着广阔的应用前景。

致谢: 上海光源BL13W线站的肖体乔、谢红兰、付亚楠等老师在本实验中的帮助和指导,在此一并感谢。

参考文献

- [1] OLIVO A, RIGON L, VINNICOMBE S J, et al. Phase contrast imaging of breast tumours with synchrotron radiation [J]. *Appl Radiat Isot*, 2009, 67(6): 1033-1041.
- [2] TAKEDA T, MOMOSE A, HIRANO K, et al. Human carcinoma: early experience with phase-contrast X-ray CT with synchrotron radiation-comparative specimen study with optical microscopy [J]. *Radiology*, 2012, 214(1): 298-301.
- [3] BECKMANN F, HEISE K, KOLSCH B, et al. Three-dimensional imaging of nerve tissue by X-ray phase-contrast microtomography [J]. *Biophys J*, 2012, 76: 98-102.
- [4] XI Y, ZHAO J. Inner-focusing reconstruction method for grating-based phase-contrast CT [J]. *Opt Express*, 2013, 21(5): 6224-6232.
- [5] ZHANG X I, YANG X R, CHEN Y, et al. Visualising liver fibrosis by phase-contrast X-ray imaging in common bile duct ligated mice [J]. *Eur Radiol*, 2013, 23(2): 417-423.
- [6] VEDANTHAM S, KARELLAS A. X-ray phase contrast imaging of the breast: Analysis of tissue simulating materials [J]. *Med Phys*, 2013, 40(4): 041906.
- [7] 张汐, 陈绍亮, 杨欣荣, 等. 同步辐射相位对比X线成像技术的初步研究 [J]. *中国放射医学与防护杂志*, 2009, 329(3): 317-320.
- [8] ANTONIASSI M, CONCEICAO A L, POLETTI M E. Study of electron densities of normal and neoplastic human breast tissues by Compton scattering using synchrotron radiation [J]. *Appl Radiat Isot*, 2012, 70(7): 1351-1354.
- [9] GRANDL S, WILLNER M, HERZEN J, et al. Evaluation of phase-contrast CT of breast tissue at conventional X-ray sources-presentation of selected findings [J]. *Z Med Phys*, 2013, 23(3): 212-221.
- [10] METTIVIER G, FEDON C, DI LILLO F, et al. Glandular dose in breast computed tomography with synchrotron radiation [J]. *Phys Med Biol*, 2016, 61(2): 569-587.

(收稿日期: 2016-05-10 修回日期: 2016-06-11)