

· 论著 ·

超声造影在肿瘤化疗模型中诊断价值的初步探索

周世崇, 常 才, 乐 坚, 范亦武, 陈 敏

复旦大学附属肿瘤医院超声诊断科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

【摘要】 目的: 探索超声造影预测乳腺肿瘤新辅助化疗疗效的价值。方法: 建立裸鼠人乳腺肿瘤模型, 模拟临床给药方案, 在各次化疗后测量肿瘤生物学数据、超声造影数据及血管微循环指标。结果: 肿瘤血管内皮生长因子受体1在化疗早期显著下降, 微血管密度在第2次化疗后显著下降; 超声造影上肿瘤灌注峰值强度在化疗早期显著下降, 灌注达峰时间在第2次化疗后显著上升。结论: 超声造影部分指标的变化与肿瘤微循环指标一致, 具有深入研究价值。

【关键词】 超声造影; 肿瘤模型; 化疗

中图分类号: R730.41 文献标志码: A 文章编号: 1008-617X(2017)06-0385-06

Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound in tumor model with chemotherapy ZHOU Shichong, CHANG Cai, YUE Jian, FAN Yiwu, CHEN Min (Department of Ultrasound, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CHANG Cai E-mail: changcai@sina.com

【Abstract】 Objective: To explore the value of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in the diagnosis of breast cancer with neoadjuvant chemotherapy. **Methods:** A nude mouse model of human breast cancer was established, and the clinical drug administration program was simulated. After chemotherapy, the data of tumor biology, ultrasound imaging and blood vessel microcirculation index were measured. **Results:** Tumor vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) showed a significant decrease after the early stage of chemotherapy, and the microvascular density (MVD) decreased significantly after the second chemotherapy. The peak intensity (IMAX) of tumor perfusion significantly decreased after the early stage of chemotherapy, and the time to peak (TTP) significantly increased after the second chemotherapy. **Conclusion:** The changes in some indexes of CEUS are consistent with the changes in some tumor microcirculation indexes, although the correlation between them has not been confirmed and needs further research.

【Key words】 Contrast-enhanced ultrasound; Tumor model; Chemotherapy

目前, 国内女性恶性肿瘤中乳腺癌发病率居第1位^[1]。新辅助化疗在其治疗中应用日益广泛^[2], 但疗效评估仍依赖最终病理分级。现有影像学技术可监测肿瘤在化疗前后的大小变化, 但无法在化疗早期预测最终疗效^[3-4]。现有研究显示, 肿瘤可促进大量新生血管产生, 这是其生长、侵袭和转移的基础^[5]。超声造影剂具有纯血池灌注特性, 本研究拟通过超声造影观察化疗前后肿瘤血供改变, 以达到早期预测化疗疗效的目的。

1 资料和方法

1.1 研究对象

实验动物为无特定病原体(specific pathogen

free, SPF)级BALB/c裸鼠, 雌性, 4周龄。人乳腺癌细胞株MCF-7来自复旦大学附属肿瘤医院中心实验室。取对数生长期细胞, 制成密度约为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液。于每只裸鼠右侧胸壁乳垫下注射接种0.3 mL细胞悬液, 诱导裸鼠产生乳腺癌。接种后连续观察1周, 以接种部位皮下出现肿瘤结节、质地较硬等指标认为成瘤。4周后, 瘤体长至直径约2.0 cm时进一步实验。

将荷瘤裸鼠按完全随机法分成实验组和对照组, 每组30只。每组再按给药时间点分成3个亚组, 每个亚组10只。化疗前组: 不给药, 第1天给药前处死。化疗1次组: 第1天给药, 第7天第2次给药前处死。化疗2次组: 第1、7天贯序给药, 第14天处死。各亚组小鼠于处死前称量体质

基金项目: 国家自然科学基金(81371575, 81271591); 上海市2017年度“科技创新行动计划”(17411953400)。

通信作者: 常 才 E-mail: changcai@sina.com

量,测量肿瘤长径及短径,肿瘤体积换算公式=长径×短径²/2。

1.2 化疗方案

实验组给药方案CMF:环磷酰胺(cyclophosphamide, C)+甲氨蝶呤(methotrexate, M)+氟尿嘧啶(flourouracil, F)。给药剂量严格依据Lloyd等的实验设计^[6],单药剂量为2/3 LD₁₀。各药LD₁₀剂量具体如下^[7-9]:环磷酰胺100 mg/kg,甲氨蝶呤27 mg/kg,氟尿嘧啶140 mg/kg。模拟临床给药方案CMF。在实验组亚组给药的同时,相应对照组亚组给予生理盐水,均为腹腔注射。

1.3 仪器与方法

全部实验动物于处死前进行超声造影检查。使用意大利Esaote公司MyLab90多普勒彩色超声诊断仪,探头频率8~12 MHz。超声造影剂为意大利Bracco公司SonoVue,每只裸鼠通过尾静脉注射0.005 mL。注射后立即进行造影观察,记录数据。造影结束后于探头下置入定位针,确定观察区域。采用德国TomTec公司分析软件SonoLiver脱机分析造影数据,获取以下造影参数:肿瘤灌注峰值强度(maximum intensity, IMAX),即造影剂灌注达峰时对比对照区域的强度值;上升时间(rising time, RT),即灌注从峰值10%至90%强度所需时间;灌注达峰时间(time to peak, TTP),即从开始灌注至达峰所需时间;平均渡越时间(mean transit time, mTT),即病灶峰值强度下降一半所需时间。

全部裸鼠于置入定位针后脱颈处死,沿探头方向剖开瘤体,取定位针所在厚度约5 mm、长度包含全部造影瘤体的组织,固定后石蜡包埋切片。检测微血管密度(microvascular density, MVD),血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)-1/2/3。将实验组中化疗前亚组和2次化疗亚组的肿瘤标本切片,于光学高倍镜下进行肿

瘤细胞计数。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。将实验组与对照组同一时间点的亚组数据比较作为组间对照,实验组或对照组内各自3个亚组相互比较作为组内对照。将所有单因素做的析因设计进行方差分析(分组或时间点),如有统计学差异,进一步两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤物理指标

肿瘤生物指标包括荷瘤裸鼠体质量、肿瘤体积(表1)。第1次给药后:体质量组间对照($P=0.000$)和组内对照($P=0.000$)差异均有统计学意义;肿瘤体积组间对照($P=0.000$)差异有统计学意义,组内对照($P=0.539$)差异无统计学意义。第2次给药后:体质量组间对照($P=0.000$)和组内对照($P=0.000$)差异均有统计学意义;肿瘤体积组间对照($P=0.000$)差异有统计学意义,组内对照($P=0.46$)差异无统计学意义。

2.2 肿瘤微循环指标

微循环指标包括MVD、VEGFR-1/2/3(表2)。第1次给药后:MVD组间对照($P=0.138$)和VEGFR-3组间对照($P=0.069$)差异无统计学意义,组内对照($P=0.205$)差异无统计学意义;VEGFR-1组间对照($P=0.008$)显著下降,VEGFR-1组内对照($P=0.007$)显著下降。第2次给药后:MVD组间对照($P=0.000$)和VEGFR-3组间对照($P=0.003$)显著下降,MVD组内对照($P=0.004$)显著下降;VEGFR-1组间对照($P=0.000$)显著下降,VEGFR-1组内对照($P=0.000$)显著下降。镜下切片见图1~2。

2.3 超声造影指标

超声造影指标包括IMAX、RT、TTP和mTT(表3)。第1次给药后:IMAX组间对照($P=0.001$)和组内对照($P=0.000$)显著下降;TTP组间对照

表1 肿瘤生物指标

指标	化疗前			化疗1次			化疗2次		
	实验组	对照组	P值	实验组	对照组	P值	实验组	对照组	P值
体质量/g	20.70±0.35	20.65±0.47	0.837	19.15±0.24	21.85±0.34	0.000	15.55±0.72	23.40±0.84	0.000
肿瘤体积/cm ³	37.25±13.18	38.32±11.67	0.962	51.43±17.18	140.13±41.03	0.000	34.36±26.99	382.77±112.99	0.000

($P=0.427$)和组内对照($P=0.376$)差异无统计学意义。第2次给药后:IMAX组间对照($P=0.000$)和组内对照($P=0.000$)显著下降;TTP组间对照($P=0.001$)和组内对照($P=0.001$)显著上升。超声造影见图3~5。

2.4 病理结果

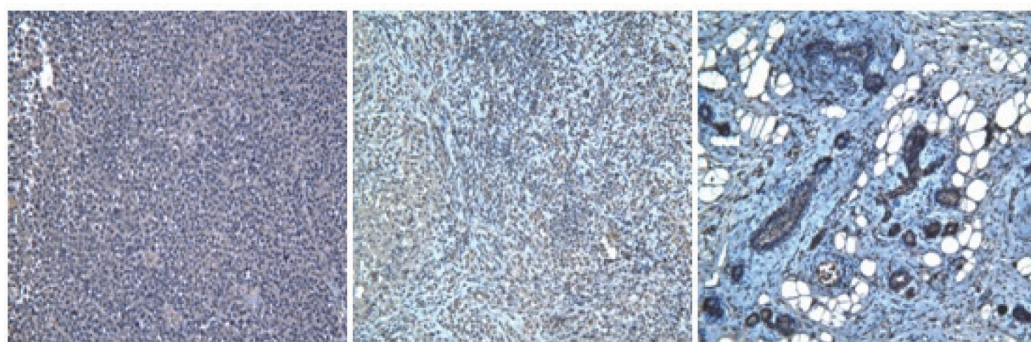
在光学显微镜40倍物镜下计数,化疗前实验组肿瘤细胞密度为 $464.92\pm 60.85/\text{HF}$,2次化疗后实验组肿瘤细胞密度为 $136.99\pm 17.3/\text{HF}$,化疗后肿瘤细胞显著减少($P=0.000$)。

表2 肿瘤微循环指标

指标	化疗前			化疗1次			化疗2次		
	实验组	对照组	<i>P</i> 值	实验组	对照组	<i>P</i> 值	实验组	对照组	<i>P</i> 值
MVD	17.80±2.77	17.81±2.21	0.893	16.46±1.37	18.03±2.76	0.138	13.30±1.51	17.96±2.34	0.000
VEGFR-1	264.01±5.22	263.77±5.18	0.956	205.66±38.82	264.29±52.87	0.008	34.01±6.34	268.47±54.94	0.000
VEGFR-2	211.46±94.78	207.6±92.15	0.837	188.3±84.4	209.76±43.33	0.558	165.17±44.6	212.2±98.66	0.202
VEGFR-3	159.54±59.65	155.11±59.99	0.911	116.28±41.37	158.64±56.08	0.069	89.06±12.58	159.58±59.64	0.003

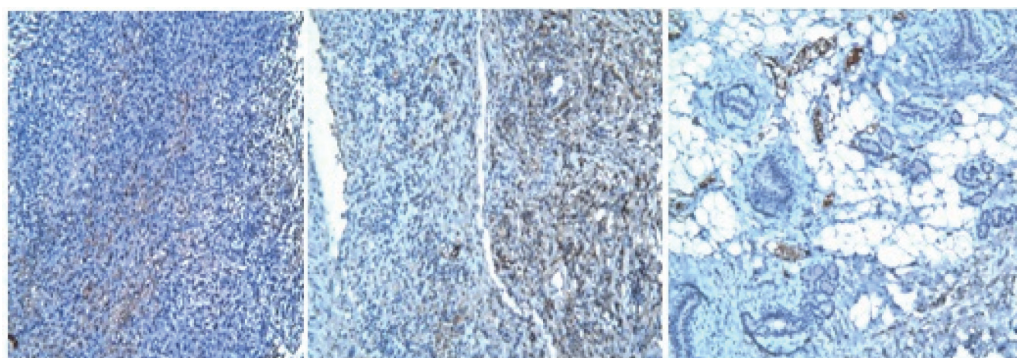
表3 超声造影参数

指标	化疗前			化疗1次			化疗2次		
	实验组	对照组	<i>P</i> 值	实验组	对照组	<i>P</i> 值	实验组	对照组	<i>P</i> 值
IMAX	366.19±68.57	366.24±69.48	0.999	256.92±53.10	366.54±71.29	0.001	76.96±23.49	364.55±92.49	0.000
RT	13.4±2.17	13.5±2.55	0.838	14.9±3.14	13.5±2.22	0.215	17±3.16	13.7±2.4	0.005
TTP	15.85±3.22	16.1±3.2	0.896	17.48±3.29	16.02±2.75	0.427	22.52±6.95	16.12±3.56	0.001
mTT	43.69±6.26	43.65±6.3	0.998	43.93±8.69	43.6±7.62	0.925	44.78±5.94	42.63±10.85	0.540



(×40, H-E staining)

图1 实验组化疗前、化疗1次、化疗2次的MVD镜下切片



(×40, H-E staining)

图2 实验组化疗前、化疗1次、化疗2次的VEGFR-1镜下切片

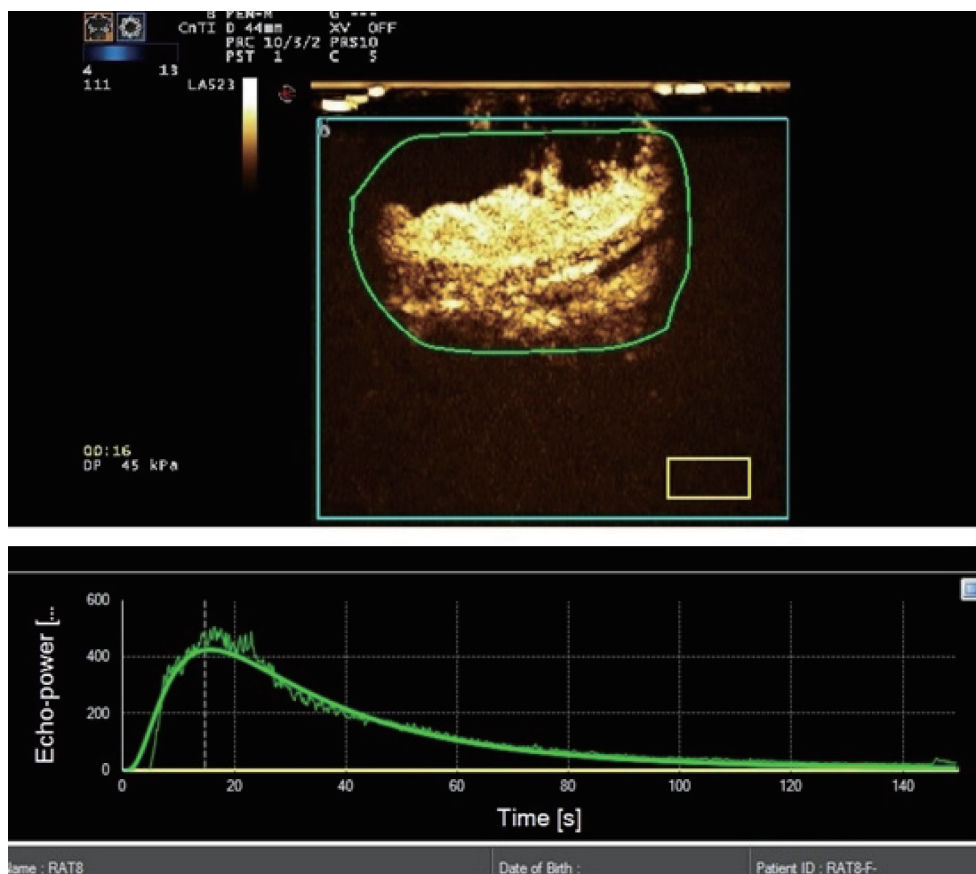


图3 化疗前肿瘤超声造影图

可见峰值强度较高，灌注面积较大

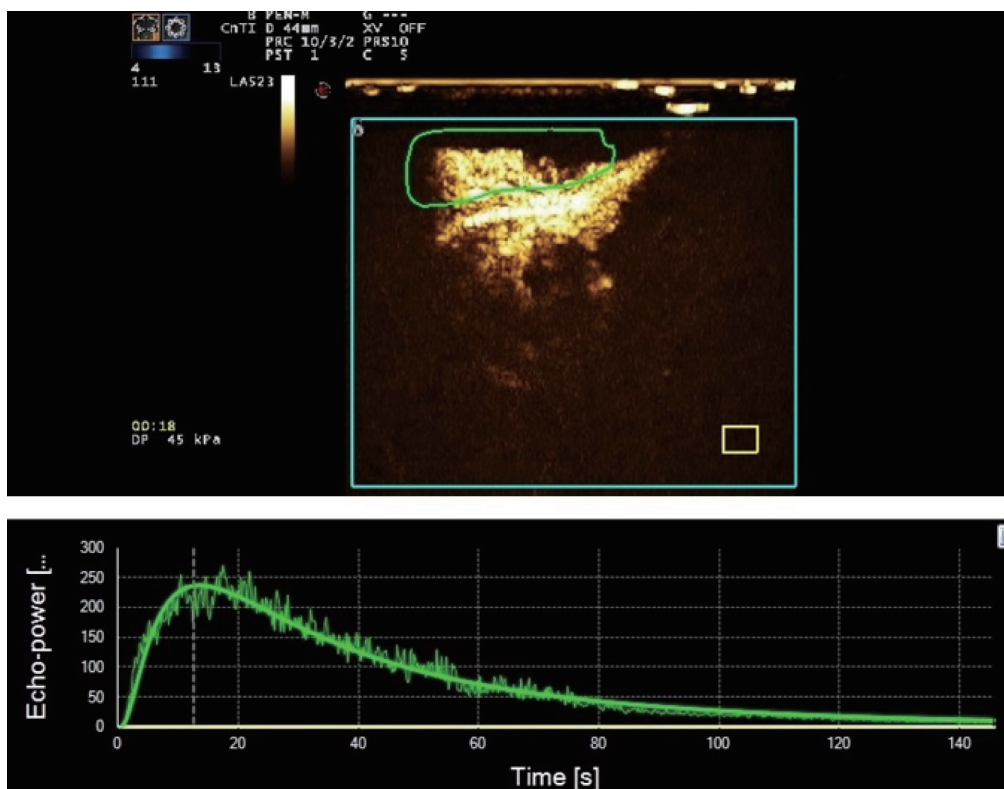


图4 化疗1次后的肿瘤超声造影图

峰值强度有所下降，灌注面积尚未变化

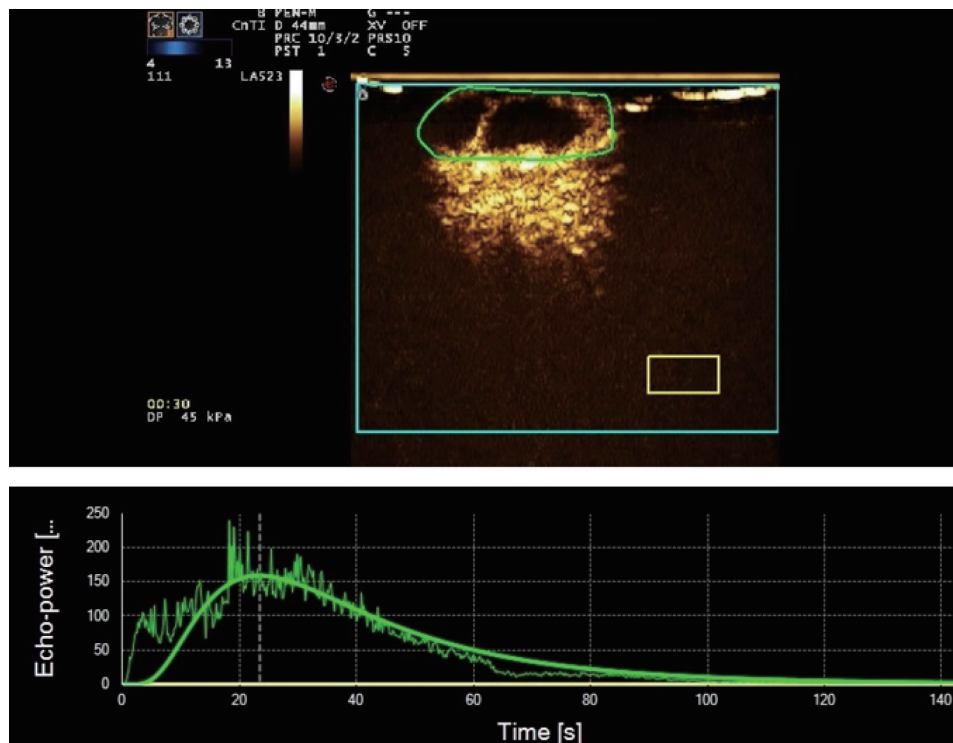


图5 化疗2次后的肿瘤超声造影图像

峰值强度持续下降, 灌注面积明显减少, 考虑可能是局部肿瘤坏死所致

3 讨 论

目前, 超声造影预测抗血管生成药物疗效的研究比较多。有研究报道^[10-14], 在动物肿瘤模型中使用抗血管生成药物, 伴随着肿瘤微循环指标降低, 超声造影参数出现不同程度的改变, 部分研究认为超声造影参数与抗血管疗效相关。然而, 临床使用的大部分化疗药物主要通过抑制肿瘤细胞DNA和RNA合成来抑制肿瘤生长, 作用机制不同于抗血管药物。有研究报道^[15-16], 超声造影在新辅助化疗前后曲线有显著变化, 但缺乏足够的量化参数。有研究报道^[17-19], 单独使用化疗药物如顺铂或阿霉素, 可观察到肿瘤的微循环指标改变, 且伴有超声造影参数变化, 但他们没有研究早期变化与肿瘤化疗疗效的关系。本研究模拟临床联合化疗方案, 探讨用药后肿瘤微循环指标的改变及超声造影指标的改变, 并分析两者的关系。

本研究中, MVD在第2次化疗后的组内和组间出现显著下降, 与既往报道^[17-19]吻合。进一步研究发现, VEGFR-1在首次化疗后组内和组间

即出现显著下降, 提示作为微循环指标, 其可能比MVD对化疗药物更敏感。2次化疗后, 肿瘤细胞下降70%以上, 按病理MP分级, 属不完全缓解中的3级。浸润癌细胞的降低达30%~90%, 属中度减少。由此可见, 肿瘤细胞被化疗灭活的同时, 出现了显著微循环改变。

第2次化疗后TTP在组间和组内均显著上升, 提示肿瘤灭活后灌注时间延长, 很可能是微循环受到破坏所致。对比病理结果, 肿瘤体积在2次化疗后较化疗前未出现显著变化, 而部分微循环指标和部分造影指标出现显著变化, 两者具有一致性, 均早于肿瘤物理体积的变化。

在乳腺癌新辅助化疗模型中, 超声造影部分指标变化与肿瘤微循环指标变化具有一致性, 均早于肿瘤物理体积变化。虽然尚未证实两者相关, 但值得进一步深入研究。

本研究存在以下不足: 样本量相对较小, 无法进行相关性分析; 仅模拟了一种新辅助化疗方案; MCF-7细胞也不能体现乳腺癌免疫组化和基因分型的多样性。

综上所述, 超声造影参数IMAX和TTP在化疗过程中, 与肿瘤微循环指标MVD和VEGFR-1

的变化具有一致性,提示超声造影具备了预测新辅助化疗疗效的潜力。

参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27: 2-12.
- [2] 宗瑜, 吴佳毅, 深坤炜. 乳腺癌新辅助治疗的国际共识与解读 [J]. *中华外科杂志*, 2013, 51: 10-13.
- [3] KEUNE J D, JEFFE D B, SCHOOTMAN M, et al. Accuracy of ultrasonography and mammography in predicting pathologic response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer [J]. *Am J Surg*, 2010, 199: 477-484.
- [4] MARINOVICH M L, SARDANELLI F, CIATTO S, et al. Early prediction of pathologic response to neoadjuvant therapy in breast cancer: systematic review of the accuracy of MRI [J]. *Breast*, 2012, 21: 669-677.
- [5] WEIDNER N. The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 122: 675-677.
- [6] LLOYD H H. Combination chemotherapy: considerations for design and analysis [J]. *Cancer Chemother Rep*, 1974, 4: 157-165.
- [7] LINDÉN C J. Toxicity of intraperitoneally administered antitumor drugs in athymic rats [J]. *In Vivo*, 1989, 3: 259-262.
- [8] INABA M, KOBAYASHI T, TASHIRO T, et al. Evaluation of antitumor activity in a human breast tumor/nude mouse model with a special emphasis on treatment dose [J]. *Cancer*, 1989, 64: 1577-82.
- [9] SEIGERS R, LOOS M, VAN TELLINGEN O, et al. Cognitive impact of cytotoxic agents in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2015, 232: c17-c37.
- [10] FORSBERG F, RO R J, FOX T B, et al. Contrast enhanced maximum intensity projection ultrasound imaging for assessing angiogenesis in murine glioma and breast tumor models: A comparative study [J]. *Ultrasonics*, 2011, 51: c382-c389.
- [11] ZHU X D, ZHANG J B, FAN P L, et al. Antiangiogenic effects of pazopanib in xenograft hepatocellular carcinoma models: evaluation by quantitative contrast-enhanced ultrasonography [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 28.
- [12] SESHADRI M, SACADURA N T, COULTHARD T. Monitoring antivascular therapy in head and neck cancer xenografts using contrast-enhanced MR and US imaging [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14: 491-501.
- [13] 王志会, 胡向东, 钱学林. 人肝癌裸鼠模型的超声造影峰值强度与血管生成关系的研究 [J]. *中国超声医学杂志*, 2012, 28: 1060-1062.
- [14] RIX A, LEDERLE W, SIEPMANN M, et al. Evaluation of high frequency ultrasound methods and contrast agents for characterising tumor response to anti-angiogenic treatment [J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81: 2710-2716.
- [15] PYSZ M A, GURACAR I, FOYGEL K, et al. Quantitative assessment of tumor angiogenesis using real-time motion-compensated contrast-enhanced ultrasound imaging [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15: 433-442.
- [16] 赵丽, 周晓东, 于铭, 等. 超声及超声造影技术对乳腺癌新辅助化疗的疗效评价 [J]. *中国超声医学杂志*, 2010, 26: 702-704.
- [17] CAO X, XUE J, ZHAO B. Potential application value of contrast-enhanced ultrasound in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38: 2065-2071.
- [18] WANG J W, CAO L H, HAN F, et al. Contrast-enhanced US quantitatively detects changes of tumor perfusion in a murine breast cancer model during adriamycin chemotherapy [J]. *Acta Radiol*, 2013, 54: 882-888.
- [19] WANG J W, ZHENG W, CHEN Y, et al. Quantitative assessment of tumor blood flow changes in a murine breast cancer model after adriamycin chemotherapy using contrast-enhanced destruction-replenishment sonography [J]. *J Ultrasound Med*, 2013, 32: 683-690.

(收稿日期: 2017-07-05 修回日期: 2017-09-02)