

肝细胞癌患者超声造影特征与其肿瘤标志物表达的临床研究

刘轼初 赖植发 张裕珍 王庆丹

摘要 **目的** 分析肝细胞癌(HCC)患者超声造影特征与其肿瘤标志物表达情况,探讨其临床应用价值。**方法** 选取术前超声造影检查,并经手术病理证实的 214 例 HCC 患者,使用免疫组化染色观察白细胞介素 8(IL-8)和甲胎蛋白(AFP)的表达情况,分析超声造影参数(始增时间、达峰时间、峰值加速时间、始增速度及增强速率)与肿瘤标志物之间的关系,以及 IL-8、AFP 表达情况与 HCC 的关系。**结果** HCC 病灶的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均小于病灶周围背景肝组织,病灶始增速度和增强速率均大于病灶周围背景肝组织,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。IL-8 表达阳性率 74.77% (160/214), AFP 表达阳性率 69.62% (149/214), 两者表达呈正相关($r=0.252, P=0.003$)。IL-8、AFP 阴性 HCC 患者的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均大于 IL-8、AFP 阳性患者,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); IL-8、AFP 阳性 HCC 患者的始增速度、增强速率均大于 IL-8、AFP 阴性患者,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** HCC 超声造影特征可为 HCC 肝切除患者的生物学行为评估、临床预处理及预后评估提供依据,具有较好的临床应用价值。

关键词 超声检查;造影剂;肝细胞癌;炎症相关标志物

[中图分类号] RR445.1; R735.7

[文献标识码] A

Clinical study of contrast-enhanced ultrasound characteristics and tumor markers expression in patients with hepatocellular carcinoma

LIU Shichu, LAI Zhifa, ZHANG Yuzhen, WANG Qingdan

Department of Ultrasound, Pingshan People's Hospital, Shenzhen 518118, China

ABSTRACT Objective To investigate the contrast-enhanced ultrasound characteristics and tumor markers expression in patients with hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore its clinical application value. **Methods** A total of 214 patients with HCC confirmed by surgery or puncture pathology who had received contrast-enhanced ultrasonography before surgery were collected. The expression of interleukin-8 (IL-8) and alpha fetoprotein (AFP) was observed by immunohistochemical staining. The relationship between the parameters of contrast-enhanced ultrasound (onset time, peaking time, peak acceleration time, initiation rate and enhancement rate) and tumor markers was analyzed, as well as the relationship between the expression of IL-8/AFP and HCC. **Results** The onset time, peaking time and peak acceleration time of the HCC lesions were less than those of background liver tissue around the lesions, and the initiation rate and enhancement rate of HCC were higher than those of background liver tissue around the lesions (all $P < 0.05$). The positive rate of IL-8 expression was 74.77% (160/214), and the positive rate of AFP expression was 69.62% (149/214). There was a significant positive correlation between the two expressions ($r=0.252, P=0.003$). The onset time, peaking time and peak acceleration time of IL-8/AFP negative HCC were greater than those of IL-8/AFP positive HCC (all $P < 0.05$). Initiation rate and enhancement rate of IL-8/AFP positive HCC were greater than those of IL-8/AFP negative HCC (all $P < 0.05$). **Conclusion** The contrast-enhanced ultrasound characteristics of HCC can provide the basis for biological behavior evaluation, clinical pretreatment and prognosis in patients with HCC hepatectomy, which has better clinical application value.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent; Hepatocellular carcinoma; Inflammation related markers

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)术后早期复发主要来源于切除前或切除过程中未发现的隐匿性肿瘤病变,其复发风险与肿瘤因素有关^[1-2]。白细胞介素8(IL-8)是一种趋化因子,在肿瘤发生特别是肿瘤生长、血管生成和侵袭中均有重要作用。HCC患者中,甲胎蛋白(AFP)水平与肿瘤负荷有关,其在诊断和预后中亦均有重要作用^[3-4]。超声造影可完整反映肿瘤局部解剖结构^[5],如何通过无创的影像学技术反映HCC的预后因子,探寻二者间的相关性是当前研究的热点。本研究通过分析HCC患者超声造影特征与其肿瘤标志物表达情况,旨在为HCC的预后评估提供依据。

资料与方法

一、研究对象

选取2015年6月至2018年7月在我院行术前超声造影检查,并经手术病理证实的214例HCC患者,男120例,女94例,年龄30~79岁,平均(59.86±5.24)岁。所有研究对象均行体格检查、实验室筛查和肝脏超声检查,获得完整病史。HCC的诊断参照国际原发性肝癌TNM(2011年)标准。排除标准:①神经系统疾病及行为失常患者;②伴有肝脏囊肿等其他类型肝脏疾病患者;③自身患有其他恶性肿瘤或合并肿瘤远处转移患者。本研究经我院医学伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

二、仪器与方法

1. 超声检查:使用GE Logiq 9、E 9彩色多普勒超声诊断仪,4C1探头,频率6~8 MHz,机械指数<0.2;配备对比脉冲序列成像技术。造影剂使用意大利博莱科公司生产的SonoVue。患者取仰卧位,常规扫查肝脏,观察病灶部位、范围、边界、内部回声、数目及血流情况,然后应用CDFI观察血流情况及其与周围组织结构的关系。SonoVue溶液用生理盐水溶解稀释,振荡混匀后经肘部浅静脉团注2.4 ml,然后用5.0 ml生理盐水冲管,启动计时器,分析超声造影时病灶内部增强及消退特征,连续观察4 min。导出超声造影图像进行时间-强度曲线分析,记录始增时间、达峰时间、峰值加速时间、始增速度及增流速度等参数。当患者有多个病灶时,分析最大病灶的超声造影图像。

2. 免疫组化:对HCC患者术后标本切片,采用免疫组织化学技术检测IL-8和AFP的表达,严格按照试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司生产,产品型号分别为IM-03397B小鼠IL-8和IM-03404B小鼠AFP)的操作说明进行检测。制作4 μm厚度的石蜡切片,二甲苯脱蜡3次、酒精梯度水化每浓度2次,ddH₂O冲洗2次,微波抗原修复后行封闭缓冲液处理20 min,加入一抗后4℃孵育,TBS-T液冲洗3次,每次3 min,封闭缓冲液37℃处理10 min,ELPS染色。

3. IL-8、AFP免疫染色阳性判定:应用蔡司显微镜(型号Scope A1)200倍视野观察组织切片,IL-8阳性着色定位于细胞质或细胞膜,以出现棕褐色或棕黄色为阳性;AFP阳性着色定位于内皮细胞,以出现粗细不等的棕黄色细颗粒为阳性细胞。每张切片随机选取10个视野,计数100个细胞,记录阳性细胞表达百分数。阳性细胞百分数<10%记作(-);阳性细胞百分数10%~49%记作(+);阳性细胞百分数50%~89%记作(++);阳性细胞百分数≥90%记作(+++)。

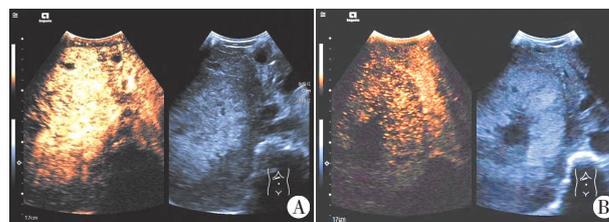
三、统计学处理

应用SPSS 20.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验;计数资料以率表示;IL-8与AFP表达之间的相关性采用Pearson相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、超声造影特征

HCC病灶的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均小于HCC病灶周围背景肝组织,HCC病灶始增速度和增强速率均大于HCC病灶周围背景肝组织,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图1和表1。



A: 动脉相(注射造影剂后18 s),病灶呈不均匀高增强;B: 门脉相(注射造影剂后98 s),病灶内造影剂明显廓清,呈低增强

图1 同一HCC患者超声造影图

表1 HCC病灶与病灶周围背景肝组织超声造影参数比较($\bar{x} \pm s$)

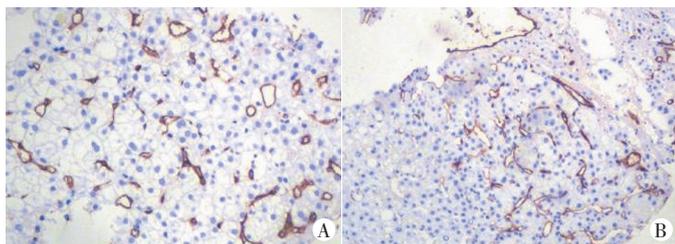
部位	始增时间(s)	达峰时间(s)	峰值加速时间(s)	始增速度(dB)	增强速率(dB/s)
HCC病灶	10.31±1.09	23.25±4.22	12.18±2.02	9.25±2.01	2.32±0.39
病灶周围背景肝组织	20.30±0.09	36.19±6.53	23.15±6.65	6.20±0.72	1.24±0.17
t 值	4.726	6.685	7.870	7.486	8.325
P 值	0.020	0.025	0.018	0.001	0.002

二、IL-8、AFP在HCC中的表达

IL-8表达阳性患者160例,阳性率74.77%(160/214), AFP表达阳性患者149例,阳性率69.62%(149/214)。Pearson 相关分析显示,IL-8与AFP在HCC中的表达呈正相关($r=0.252, P=0.003$)。见图2,3。

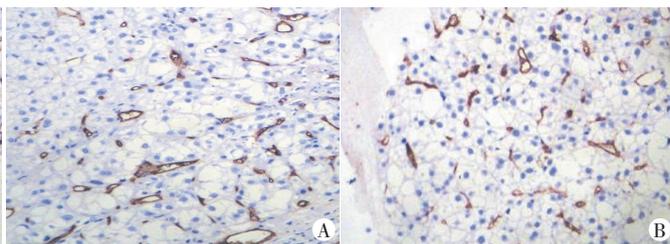
三、不同IL-8、AFP表达HCC患者的超声造影特征
IL-8阳性表达HCC患者的始增时间、达峰时间、

峰值加速时间均小于IL-8阴性表达HCC患者,IL-8阳性表达HCC患者始增速度、增强速率均大于IL-8阴性表达HCC患者,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。AFP阳性表达HCC患者的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均小于AFP阴性表达HCC患者,AFP阳性表达HCC患者始增速度、增强速率均大于AFP阴性表达HCC患者,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。见表2。



A: IL-8阳性表达,可见多个棕色的内皮细胞或内皮细胞簇;B: IL-8阴性表达,棕色的内皮细胞或内皮细胞簇数量较少

图2 IL-8不同表达免疫组化光镜图(ELPS染色,×200)



A: AFP阳性表达,细胞质呈棕黄色,细胞呈木梭形或长条形,形状不规则,染色数目多;B: AFP阴性表达,细胞质呈浅黄色,细胞呈圆形或卵圆形,形状较规则,染色数目少

图3 AFP不同表达免疫组化光镜图(ELPS染色,×200)

表2 IL-8、AFP表达情况与HCC超声造影特征($\bar{x}\pm s$)

肿瘤标志物	始增时间(s)	达峰时间(s)	峰值加速时间(s)	始增速度(dB)	增强速率(dB/s)
IL-8					
阳性(60)	9.28±1.17*	22.23±4.15*	12.69±2.32*	9.07±2.12*	3.33±0.42*
阴性(54)	12.29±2.12	35.15±5.50	23.05±4.12	6.05±0.55	1.66±0.28
AFP					
阳性(49)	9.10±1.29*	22.53±5.32*	12.16±2.01*	9.72±1.28*	3.05±0.47*
阴性(65)	12.08±2.51	34.17±4.24	23.05±6.10	6.26±0.56	1.48±0.22

与同一肿瘤标志物阴性比较,* $P<0.05$

讨 论

研究^[6-7]表明血管生成集中在HCC病变的边缘,监测HCC病变边缘的血液动力学变化可以为临床提供有用的信息,更好地评估治疗反应^[8]。超声造影可以监测HCC新生血管形成和其他生物学行为^[9-10]。本研究对HCC患者超声造影参数进行了分析,结果显示,病灶的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均小于病灶周围背景肝组织,病灶始增速度和增强速率均大于病灶周围背景肝组织,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。说明肝癌组织内新生血管的数目较多,且血管管径较粗、阻力较低,造影剂进入血管的速度更快,与相关研究^[11-12]结果一致,即肝癌组织内部弥漫性增强,呈“漫天星”状,血供丰富;治疗后表现为肿块呈弥漫性增强,但肿瘤血管造影强度低于治疗前,造影剂充盈缺损区范围扩大,内可见裂隙样无回声区,近腹壁侧可见片状充盈缺损区。

IL-8是人类疾病中炎症和免疫反应的重要媒介。

部分肝脏疾病患者血清样品中的IL-8水平通过高度特异性和敏感性酶联免疫吸附测定,结果显示IL-8增加,因此其可能在宿主防御和疾病中发挥重要作用。本研究发现肝癌组织中IL-8阳性率较高,且IL-8阳性表达HCC患者的始增时间、达峰时间、峰值加速时间均小于IL-8阴性表达HCC患者,IL-8阳性表达HCC患者的始增速度和增强速率均大于IL-8阴性表达HCC患者,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。说明肝癌组织的超声造影参数可以评估IL-8的表达情况,与范莎莎等^[13]研究结果一致。

临床认为当患者AFP水平>400 ng/ml时,需通过组织病理诊断来证实HCC^[14]。因此,AFP被认为对追踪HCC患者的临床过程有重要作用。AFP标记细胞具有较高的转移能力,同时对血管的生成具有促进作用,而肿瘤血管的生成是形成肿瘤的必要因素。本研究结果显示,AFP标记的细胞在肝癌组织中具有较高的阳性表达率,与研究^[15]结果一致。

综上所述,通过分析HCC的超声造影特征,可对

HCC肝切除患者的生物学行为、临床预处理及预后评估提供依据,有助于临床医师更好地诊断肿瘤类型,并做出最佳治疗决策,具有较好的临床应用价值。

参考文献

- [1] Kim EA, Yoon KH, Lee YH, et al. Focal hepatic lesions; contrast-enhancement patterns at pulse-inversion harmonic US using a microbubble contrast agent[J]. Korean J Radiol, 2013, 4(4): 224-233.
- [2] Caproni N, Marchisio F, Pecchi A, et al. Contrast-enhanced ultrasound in the characterisation of breast masses: utility of quantitative analysis in comparison with MRI[J]. Eur Radiol, 2010, 20(6): 1384-1395.
- [3] Vallone P, D' Angelo R, Filice S, et al. Color-Doppler using contrast medium in evaluating the response to neoadjuvant treatment in patients with locally advanced breast carcinoma[J]. Anticancer Res, 2015, 25(1B): 595-599.
- [4] Lamuraglia M, Lassau N, Garbay JR, et al. Doppler US with perfusion software and contrast medium injection in the early evaluation of radio frequency in breast cancer recurrences: a prospective phase II study[J]. Eur J Radiol, 2015, 56(3): 376-381.
- [5] Szabó BK, Aspelin P, Kristoffersen Wiberg M, et al. Invasive breast cancer: correlation of dynamic MR features with prognostic factors[J]. Eur Radiol, 2013, 13(11): 2425-2435.
- [6] Bergh J. Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients[J]. Endocr Relat Cancer, 2017, 6(1): 51-59.
- [7] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 36(2): 169-180.
- [8] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors [J]. Science, 2015, 235(4787): 442-447.
- [9] Tuncbilek N, Unlu E, Karakas HM, et al. Evaluation of tumor angiogenesis with contrast-enhanced dynamic magnetic resonance mammography[J]. Breast J, 2003, 9(5): 403-408.
- [10] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up [J]. Histopathology, 2014, 19(5): 403-410.
- [11] Böcker W. WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2012, 86(1): 116-119.
- [12] 龙圣根, 张凤春, 张战民. 低功率超声空化治疗肝癌前后超声血管造影检查结果变化及意义[J]. 山东医药, 2013, 53(34): 74-75.
- [13] 范莎莎, 李爱民, 李荣. IL-17在肝癌患者血清中表达增高对肝癌诊断的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2014, 37(3): 19-23.
- [14] 张菊蓉. LC-HCC患者血清AFP、ChE、血NH3水平与肝功能分级的关系[J]. 西南国防医药, 2018, 28(4): 348-351.
- [15] 周宇辰, 袁国盛, 胡承光. 降低AFP诊断阈值并联合检测DCP显著提高肝细胞癌的诊断率[J]. 肝脏, 2019, 24(5): 507-518.

(收稿日期: 2019-05-16)

· 病例报道 ·

Prenatal ultrasound diagnosis of fetal bladder extrophy: a case report 产前超声诊断胎儿膀胱外翻 1 例

王丽娟 项莉亚 黄萍 罗红

[中图分类号] R445.1; R714.5

[文献标识码] B

孕妇, 31岁, 孕1产0, 孕30周, 孕30周前未行任何超声检查。现产前系统超声检查: 胎儿臀位, 于胎儿正中矢状切面、腹盆腔横切面及冠状面见胎儿下腹壁正常弧形连续性消失, 脐带腹壁插入位置较低, 其下方见一大小为1.82 cm×1.58 cm的等回声突起, 双侧脐动脉之间无膀胱显示(图1, 2), 胎儿外生殖器声像图特征不典型, 余胎儿脏器及附属物均正常, 胎儿生长参数与孕周符合。超声提示: 胎儿膀胱外翻。后引产一女死婴, 大体标本示胎儿下腹壁缺损, 脐带低置, 膀胱外翻, 耻骨联合分离, 阴蒂分离, 大阴唇增厚, 小阴唇缺失(图3)。

讨论: 胎儿膀胱外翻是一种罕见且严重的先天性畸形, 属

下腹部露脏畸形的范畴, 其可以是泄殖腔外翻综合征的一部分, 亦或与肢体-体壁综合征相关。该畸形发病原因尚不清楚, 可能与环境和遗传变异等因素相关^[1]。膀胱外翻的胚胎发病机制: 在妊娠第4周, 腹部外胚层和泄殖腔间的间充质细胞异常迁移, 导致前腹壁及膀胱前壁缺损所致^[2]。膀胱外翻的产前超声表现: ①从妊娠第15周开始, 持续性膀胱未显示, 当双肾和羊水量正常时, 应高度怀疑膀胱外翻; ②脐带腹壁插入较低, 且脐下腹壁缺损, 其下方常伴有肿块膨出; ③膀胱外翻常伴骨盆肌肉和骨骼发育异常, 常以髂骨翼增宽, 耻骨分离为主; ④男性常合并小阴茎、尿道上裂等畸形, 女性常合并大阴

(下转第48页)