

## 超声组学定量评估 miR-122 抑制裸鼠肝细胞癌的疗效

郭焕玲<sup>1</sup>, 李薇<sup>1</sup>, 李昕<sup>2</sup>, 谢晓燕<sup>1</sup>, 吕明德<sup>1,3</sup>, 匡铭<sup>3</sup>, 陈立达<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>  
(中山大学附属第一医院 1. 超声医学科, 2. GE 医疗中国, 3. 肝胆外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探究超声组学评估 microRNA-122 (miR-122) 抑制裸鼠皮下肝细胞癌(HCC)移植瘤疗效的可行性。【方法】建立裸鼠皮下 HCC 移植瘤模型, 治疗组 ( $n=6$ ) 和对照组 ( $n=6$ ) 分别接受瘤内注射 miR-122 mimics 和 miR-negative control, 每隔 2 天注射 1 次, 共 5 次。每次给药前采集肿瘤二维灰阶超声图像; 末次给药 24 h 后, 分别采集瘤块的二维灰阶超声图像和超声造影动态图, 并采用实时荧光定量 PCR 法检测两组瘤组织 miR-122 含量。超声造影动态图像分析获取瘤块灌注指标: 峰值强度、上升时间、达峰时间、平均渡越时间及拟合质量; 同时, 截取超声造影不同时间点 (10、30、60、90 s) 的单幅图像超声组学特征; 提取图像特征、筛选组间显著差异参数、建立组学评估模型, 并以超声组学定量值对疗效进行评估分析。【结果】治疗组 miR-122 的表达水平为对照组的  $(763\pm 60)$  倍 ( $P<0.05$ )。第 3 次给药后治疗组与对照组的肿瘤体积均有统计学差异 ( $P<0.05$ )。超声造影肿瘤灌注评估中, 两组间各灌注量化参数均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。超声组学分析中, 超声造影 10 s 静态图无组间显著差异参数, 无法构建评估模型; 而其余三个增强期均可构建评估模型, 且超声组学定量值在两组间均有统计学差异 ( $P<0.05$ )。不同增强期的定量值间两两比较, 30 s 分别与 60、90 s 比较均有统计学差异, 而 60 s 与 90 s 对比无统计学差异。【结论】基于超声造影静态图像的超声组学分析可用于评估 miR-122 抑制 HCC 的疗效, 且优于常规灌注定量评估。

**关键词:** 肝细胞癌; 超声组学; 疗效评估; microRNA-122

中图分类号: R37 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2018)02-0274-08

## Ultrasonomics for Early Evaluation of Tumor Response to microRNA-122 in a Nude Mouse Hepatocellular Carcinoma Model

GUO Huan-ling<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, XIE Xiao-yan<sup>1</sup>, LÜ Ming-de<sup>1</sup>, KUANG Ming<sup>2</sup>,  
CHEN Li-da<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. GE healthcare, Shanghai, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: WANG Wei, E-mail: wangw73@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To explore the evaluation value of ultrasonomics based on contrast-enhanced ultrasound (CEUS) imaging in the therapy response of microRNA-122 (miR-122) in hepatocellular carcinoma (HCC). 【Method】 Mice bearing subcutaneous HCC xenografts were injected intratumorally with microRNA-122 mimics (miR-122 mimics) and negative control mimics (NC mimics) in treatment group ( $n=6$ ) and control group ( $n=6$ ), respectively. The injections were performed every 3 days for five times. Before each injection, two-dimension ultrasound (2D-US) imaging was performed. At 24 h after the last injection, 2D-US and CEUS images of tumors were acquired, and then mice scarified for tumor miR-122 expression analysis by qRT-PCR. To evaluate the therapy response by RECIST, tumor volumes were mea-

收稿日期: 2018-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(81601500; 81701719); 广东省自然科学基金(2017A030313661); 中山大学青年教师培育项目(16YK-PY37)

作者简介: 郭焕玲, 硕士研究生, E-mail: guohuanl@mail2.sysu.edu.cn; 王伟, 通信作者, 博士, 副教授, E-mail: wangw73@mail.sysu.edu.cn

sured based on each 2D-US image. To analyze the tumor perfusion by mRECIST, perfusion parameters (maximum of intensity, rise time, time to peak, mean transit time, quality of fit) were analyzed off-line based on dynamic CEUS videos using SonoLiver<sup>®</sup> software. For ultrasomics, CEUS images at 10, 30, 60, 90 second were used for features extraction, respectively. The corresponding ultrasomics formulas were built to evaluate the therapy response for miR-122. 【Result】 The tumors treated with miR-122 mimics resulted in a (763±60) folds increase in miR-122 levels compared to the tumors in control group ( $P<0.05$ ). Effectively therapeutic response evaluated by tumor sizes change was detected after the third injection ( $P<0.05$ ). For assessment using mRECIST, all the parameters of treatment group did not show significant difference from the ones of control group ( $P>0.05$ ). Analysis using ultrasomics fail to detect different features of the static images of CEUS at 10 s, and models can be successfully built based on the rest of the three phases of CEUS images. The ultrasomics Scores between control group and treatment group were statistically different ( $P<0.05$ ). The ultrasomics score at 30s were significantly lower than those at 60 s and 90 s, while there was no statistical difference between scores at 60 s and 90 s. 【Conclusion】 Ultrasomics analysis based on CEUS imaging is a useful method in evaluating the therapy response of miR-122 in HCC, and showed greater value than dynamic perfusion parameter.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; ultrasomics; therapy response; microRNA-122

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2):274-281]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是临床上常见的恶性肿瘤之一, 全球发病率第五, 死亡率高居第三<sup>[1]</sup>。尽管手术切除、射频消融和肝移植是 HCC 的有效治疗手段, 但是患者术后 2 年复发率可高达 70%<sup>[2]</sup>。对于进展期的 HCC, 仍有待探索有效的治疗方法。已有实验证明过表达 microRNA-122 (miR-122) 可以显著抑制 HCC 的生长, 因此基于 miR-122 的基因治疗有望成为抑制进展期 HCC 的有效手段<sup>[3-5]</sup>。然而, miR-122 的治疗反应可因患者的个体差异而大相径庭, 因此, 建立 miR-122 疗效的有效评估手段可以避免过度治疗。临床上 mRECIST (modified response evaluation criteria in solid tumors) 是评估实体瘤治疗疗效的标准方法, 即通过增强影像学判断肿瘤血供变化来评估疗效<sup>[7]</sup>。其中, 超声造影 (contrast enhanced ultrasound, CEUS) 是常用的评估方法之一<sup>[8]</sup>。文献报道 miR-122 主要抑制肝癌细胞的增殖、侵袭、转移能力和促进细胞凋亡<sup>[9-11]</sup>, 尚未被证实具有抗肿瘤血管生成的作用。因此, 这种基于灌注量变化的分析方法是否能评估 miR-122 疗效尚待研究。近年来, 影像组学<sup>[12]</sup>可以在肿瘤基因表达<sup>[14]</sup>、诊断及鉴别诊断<sup>[15]</sup>、疗效监测<sup>[16]</sup>、预后分析<sup>[17]</sup>等临床诊治多个环节发挥重要作用。其方法在超声中的初步探索也提示了其可行性<sup>[18]</sup>, 这意味着超声组学有望成为一种全新的实体瘤疗效评估手段。因此, 本研究拟采用超声组学建立评估模型,

评估 miR-122 抑制裸鼠皮下 HCC 移植瘤的疗效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

DEME 细胞培养基、胎牛血清、青霉素 (细胞级)、链霉素 (细胞级) 购自美国 GIBCO 公司, 胰蛋白酶和 PBS 缓冲液购自美国 Invitrogen 公司。高浓度基底膜基质 (BD Matrigel<sup>®</sup>) 购自上海康宁生命科学有限公司; 体内阳离子转染试剂 In vivo-jet-PEI<sup>™</sup> 购自法国 PolyPlus-transfection 公司。微小 RNA 提取试剂 (RNAiso for Small RNA) 购自 TaKaRa 公司。MiRNA 逆转录-聚合链酶反应试剂盒 Bulge-Loop<sup>™</sup> miRNA qRT-PCR Starter Kit 购自广州市锐博生物科技有限公司。MiR-122 mimics 及其阴性对照序列 negative control mimics (NC mimics) 及内参照 U6 的 PCR 引物均由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成。超声造影剂 SonoVue 购自意大利 Bracco 公司。人肝细胞性肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中山大学东校区实验动物中心。SPF 级 BALB/C 品系裸小鼠由中山大学动物实验中心提供 (实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2016-0029), 均为雌性, 4~5 周龄, 体质量 16~18 g, 共 12 只, 并在中山大学动物实验中心进行无菌饲养, 动物实验均经过中山大学动物实验伦理委员会批准同意。

## 1.2 主要仪器与分析软件

荧光定量PCR实验由ABI7500实时荧光定量PCR仪进行。二维灰阶超声成像采用全数字手持式超声诊断仪mSonic MU1, L10-5线阵探头,成像频率为8.0 MHz,增益大小为75,深度维持在50 mm;超声造影成像使用Philips iU22彩色超声诊断仪, L9-3线阵宽频探头,频率为15Hz,机械指数MI 0.06,聚焦点位于肿瘤底部,其他仪器条件造影前后均设置为统一标准,包括深度、增益、彩色血流标尺等。超声造影DICOM图像导入SonoLiver<sup>®</sup> 1.0软件(德国的TomTec公司),完成灌注参数的自动量化分析。A.K. 软件(Artificial Intelligence Kit, Version 2.1, GE Healthcare)用于提取造影静态图像的特征参数。

## 1.3 裸鼠皮下HCC移植瘤模型的建立

取处于对数增殖期的人肝细胞性肝癌细胞SMC-7721细胞,用PBS制备成细胞悬液(浓度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ ),以1:1体积与浓度基底膜基质于冰上混合,以100  $\mu\text{L}$ /只注射量迅速接种于裸鼠的右侧背部皮下(腹腔注射戊巴比妥钠,75 mg/kg,150  $\mu\text{L}$ /只)。成瘤标准为:负荷瘤体积 $\geq 50 \text{ mm}^3$ 。

## 1.4 miR-122转染和miRNA-122表达水平qRT-PCR检测

当肿瘤增长至50~100  $\text{mm}^3$ 时开始进行基因治疗。将荷瘤裸鼠随机两组( $n=6/\text{组}$ ):①基因治疗组,治疗基因为miR-122 mimics;②阴性对照组,治疗基因为miR-122 NC。体内基因转染采用瘤体内直接注射法,每隔2 d注射一次,连续注射5次(图1)。基因复合物jetPEI/miR-122按照in-vivo jetPEI试剂盒说明书进行制备( $N/P=6$ )。第13天,处死实验裸鼠,取肿瘤用于后续miR-122表达水平检测。逆转录和荧光定量PCR实验均按照Bulge-Loop<sup>™</sup> miRNA qRT-PCR Starter Kit进行,定量分析方法采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法。

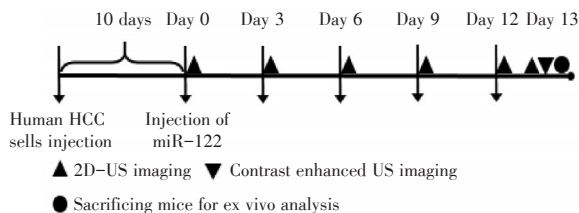


图1 实验流程示意图

Fig.1 Figure of experiment procedure

## 1.5 二维超声和对比增强超声成像方法

二维灰阶超声成像由一位具有10年超声检查经验的医师完成,分别于每次给药前及末次给药24 h后(图1)进行。成像截面为每个瘤块的最大切面和与之垂直的切面,切面选取由两位分别具有2、10年超声检查经验的医师共同决定,并记录切面位置,以保持多次成像的切面一致性。荷瘤鼠成功麻醉后,在瘤块及探头表面涂无菌耦合剂,并在瘤块和探头间放一块厚5 mm的琼脂凝胶垫,成像过程中所有成像参数始终一致。超声造影成像由一位具有7年超声造影检查经验的医师完成,于末次给药24 h后进行。成像截面为每个瘤块的最大切面。按照上述二维灰阶超声成像方法固定探头后,经裸鼠尾静脉团注0.1 mL SonoVue标准溶液,随后立即追加团注0.1 mL生理盐水,每次团注在1 s内完成,实时观察肿瘤的动态灌注过程。从造影剂团注结束时开始计时,录取2 min动态视频图像,将存图以DICOM格式存盘以备后续脱机分析。为研究超声造影成像的可重复性,本研究中12个瘤块均以上述方法进行两次造影剂注射及成像,两次造影剂注射间保证30 min以上的时间间隔,以排除上一次瘤块中的造影剂对下一次成像的影响。

## 1.6 基于二维超声图像的RECIST评估

依据RECIST,基于二维灰阶超声图像测量肿瘤体积大小,用于评估miR-122对HCC增长的影响。肿瘤体积按以下公式计算: $V=1/6\pi \times L \times W \times H$ ,其中 $V$ 为肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ), $L$ 为肿瘤长径( $\text{mm}^3$ ), $W$ 为肿瘤短径( $\text{mm}^3$ ), $H$ 为肿瘤的高( $\text{mm}^3$ )。瘤块的长、短、高均由MicroDicom Viewer软件在二维图像中测量获得。为研究肿瘤体积测量的可重复性,本研究中分别由一位有10年超声检查工作经验的医生和一位具有2年超声检查工作经验的医师独立测量肿瘤大小。

## 1.7 基于对比增强超声图像的mRECIST评估

将造影动态图像导入SonoLiver<sup>®</sup>软件中进行分析,分别勾画瘤块和同水平的瘤周肌肉组织感兴趣区(regions-of-interest, ROI),其中瘤块ROI沿着皮下瘤周进行勾画,包括整个肿瘤组织。运动补偿后进行时间-强度曲线分析,得到动态血管模式(DVP)曲线,拟合度均大于70%;导出各图像的峰值强度(maximum of intensity, IMAX)、上升时间(rise time, RT)、达峰时间(time to peak, TTP)、

平均渡越时间(mean transit time, mTT)及拟合质量(quality of fit, QOF)数值。

### 1.8 超声组学分析

分别截取超声造影图像 10、30、60 和 90 s 的静态图,用于超声组学分析。将静态图像导入 AK 软件(Artificial Intelligence Kit, Version 1.1, GE Healthcare),画出瘤块感兴趣区 ROI, ROI 范围为整个瘤块,与上述超声造影参数分析保持一致。为研究其可重复性,由两位分别具有 2、10 年超声检查工作经验的医师独立勾画感兴趣区。每个图像均可提出 1 044 个图像特征参数,主要反映图像的四类特征:灰度分布(gray-level histogram)、转换矩阵特征(transformed matrix texture)、纹理转换特征(wavelet transformed texture)和滤过转换特征(filter transformed texture)。为避免数据维度过高而导致大量的冗余信息产生、算法精度降低,我们采用适用于高维小样本数据的 LASSO(least absolute shrinkage and selection operator)来进行参数降维。LASSO 基本思想是在满足回归系数的绝对值之和小于或等于一个阈值的约束条件下,最小化残差平方和,从而能够产生某些严格等于 0 的回归系数,得到的模型具有较好的可解释性。用 LASSO 方法进行的收缩估算同时删除非信息性变量,并估计信息特性的优势比(OR)。该方法使用 Lambda ( $\lambda$ ) 惩罚收缩系数。惩罚参数  $\lambda$  控制的收缩值  $\lambda$  越大,特征选择的数量越少。10 倍交叉验证(CV)过程是重复 100 次生成套索惩罚参数的最优值  $\lambda$ 。LASSO 回归复杂度调整的程度由参数  $\lambda$  来控制,  $\lambda$  越大对变量较多的线性模型的惩罚力度就越大,从而最终获得一个变量较少的模型。基于上述筛选出的有效参数及对应系数建立疗效评估模型方程式:  $\text{Score} = \sum_{i=1}^n X_i$ , 其中, Score 为基于本研究超声组学疗效评估模型的疗效评估值,  $X$  为参与建模的特征参数,  $n$  为参数个数。分别求出两组不同增强时间图像的疗效评估模型公式,求得 Score 值,用于疗效评估分析。

### 1.9 统计学方法

采用 R 语言 3.3.3 (<http://www.r-project.org/>) 完成初步差异参数筛选、LASSO 回归和 Logistic 回归,建立超声组学疗效评估模型。采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据统计分析。分别用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 进行正态分布和方差齐性检

验,正态分布资料采用均数 $\pm$ 标准差进行描述,非正态分布资料用中位数和四分位数(median,  $Q_{25}$ - $Q_{75}$ )描述。符合正态分布且方差齐者进行  $t$  检验,否则采用 Wilcoxon 秩和检验。不同评估方法的可重复性由组内相关系数(intraclass correlation efficient, ICC)评价,评定标准为:  $\text{ICC} \geq 0.80$ , 可重复性好;  $\text{ICC} = 0.50$ - $0.79$ , 可重复性一般;  $\text{ICC} < 0.50$ , 可重复性差。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

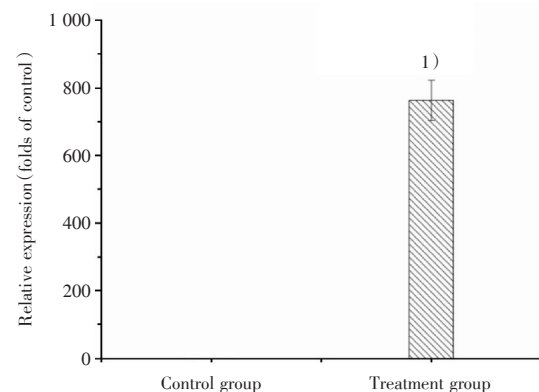
## 2 结果

### 2.1 RECIST, mRECIST 和超声组学的可重复性

基于二维灰阶超声图像的 RECIST 评估中,肿瘤体积测量在观察者间的可重复性高( $\text{ICC} = 0.92$ )。基于超声造影的灌注参数分析(mRESICT)的总体可重复性好( $\text{ICC} = 0.62$ - $0.91$ )。超声组学评估中,30、60、90 s 超声造影静态图像中分别有 90%、83% 和 84% 的评估模型参数  $\text{ICC} \geq 0.80$ , 其余参数中,  $\text{ICC} = 0.50$ - $0.79$  的参数分别占 6%、9% 和 11%,  $\text{ICC} < 0.50$  者分别占 4%、8% 和 5%。

### 2.2 MiR-122 的表达水平以及其体内肿瘤治疗效果

所有裸鼠均成功建立皮下 HCC 移植瘤模型。末次 miR-122 转染给药后 24 h, 采用 qRT-PCR 法检测各组肿瘤中 miR-122 的表达水平。以对照组的表达水平设为标准对照进行比较,治疗组 miR-122 的表达水平为 ( $763 \pm 60$ ) 倍,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ , 图 2)。



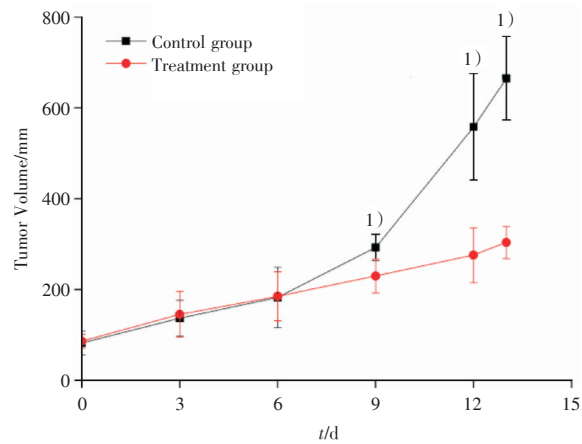
$n=3, 1) P < 0.05$  vs control

图2 两组间瘤块 microRNA-122 表达水平的比较  
Fig.2 Comparison of microRNA-122 expression levels of tumors in treatment group relative to control group

两组间的肿瘤生长情况有明显区别:根据肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。在第9天后,对照组的肿瘤体积明显大于治疗组,且生长速度明显快于治疗组( $P<0.05$ ,图3)。

### 2.3 MiR-122对HCC在超声造影定量灌注参数大小的影响

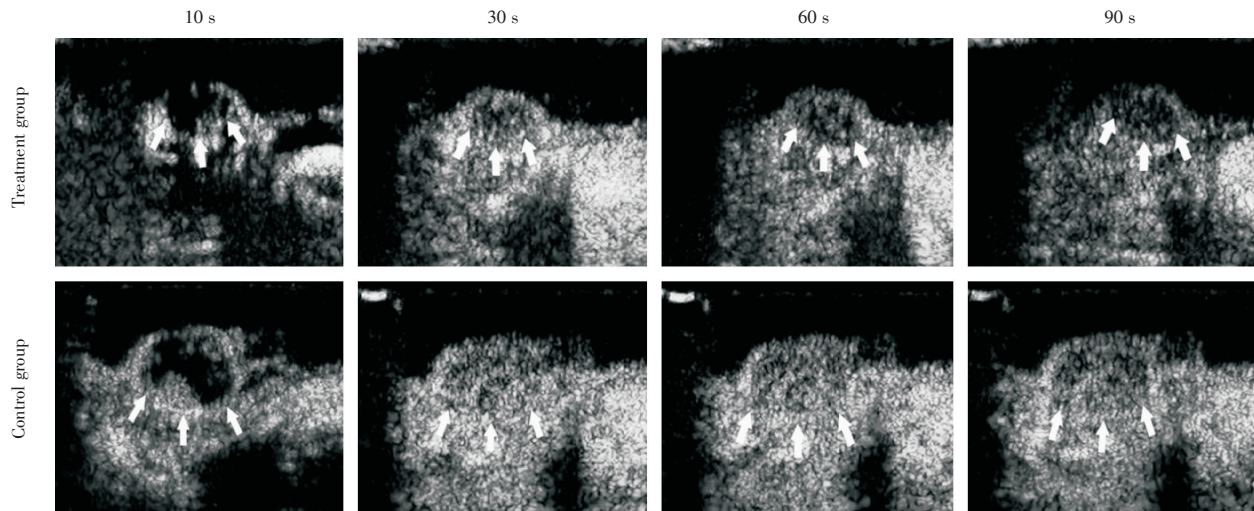
超声造影成像发现:瘤周肌肉组织呈快速达最大增强且观察期内无明显消退;肿瘤造影表现为,10 s时,造影剂开始从瘤周逐渐向中央充满整个瘤块,造影增强峰值出现在30 s左右,随后增强强度在60 s和90 s缓慢降低,两组间瘤块的增强表现无明显差异(图4)。SonoLiver定量分析软件对裸鼠HCC皮下移植瘤的超声造影动态过程拟合过程良好,治疗组和对照组的QOF分别为 $(81\pm 12)\%$ 和 $(90\pm 10)\%$ ,两组间无统计学差异( $P=0.619$ )。超声造影灌注参数定量分析结果见表1,两组间IMAX、RT、TTP及mTT均无统计学差异( $P>0.05$ )。



On day 9, 12 and 13, the tumor volume in microRNA-122 mimics-treated mice were significantly smaller than microRNA-122 negative control-treated mice ( $P<0.001$ ); no significant difference was observed neither at day 3 ( $P=0.650$ ) nor 6 ( $P=0.872$ ).  $n=6, 1) P<0.05$

图3 对照组和治疗组的肿瘤生长曲线

Fig.3 The tumor growth curve of mice in control group and treatment group



During CEUS imaging, the muscle tissue beside the tumor enhanced rapidly and showed no obvious regression during the observation period. Tumor enhancement started at nearly 10 s, from periphery to the central, contrast enhancement peak appeared nearly at 30 s, then gradual regression was observed at the 60 s and 90 s. It showed no obvious different enhancement styles between two groups.

图4 两组不同增强时期的超声造影静态图

Fig.4 The static CEUS images in different enhancement phases of treatment group and control group

### 2.4 基于不同增强时期的超声造影图像的超声组学分析结果

由于超声造影10 s静态图像的参数中无两组间显著差异参数,因此无法成功建立疗效评估公式。30、60和90 s静态图像中均可成功筛选出有效参数,并建立疗效评估公式:

$$\textcircled{1} \text{Score } 30 \text{ s: Score} = -5.03 + 1.32 \times 10^3 X_1 + 5.64 \times 10^1 X_2 + 5.50 \times 10^{-3} X_3;$$

$$\textcircled{2} \text{Score } 60 \text{ s: Score} = -5.02 \times 10^{-1} - 7.32 \times 10^{-3} Y_1 - 3.03 \times 10^{-5} Y_2 + 6.50 \times 10^{-4} Y_3;$$

$$\textcircled{3} \text{Score } 90 \text{ s: Score} = -8.25 \times 10^{-1} - 2.03 \times 10^{-8} Z_1 + 5.33 \times 10^{-3} Z_2。$$

表1 两组间瘤块超声造影灌注定量参数比较

Table 1 Comparison of CEUS tumor perfusion parameters in control group ( $n=6$ ) and treatment Group ( $n=6$ )

	Control group	Treatment group	$t$ or $T$	$P$ value
IMAX/%	51±8	48±11	0.587	0.634
RT/s	23.60(-13.29, 117.85) <sup>1)</sup>	45.30(7.64, 108.31) <sup>1)</sup>	31	0.690 <sup>2)</sup>
TTP/s	24.00(-19.29, 142.25) <sup>1)</sup>	47.60(8.53, 114.17) <sup>1)</sup>	32	0.690 <sup>2)</sup>
mTT/s	450±271	412±209	0.397	0.812

IMAX: maximum of intensity; RT: rise time; TTP: time to peak; mTT: mean transit time. 1) Data are expressed in terms of Median (25% Percentile, 75% Percentile); 2) The comparisons were performed by Wilcoxon Mann Whitney U test

其中,  $X_1$ : Inverse Difference Moment\_All Direction\_offset5\_SD;  $X_2$ : GLCM Energy\_angle0\_offset7;  $X_3$ : Long Run High Grey Level Emphasis\_All Direction\_offset7\_SD;

$Y_1$ : High Grey Level Run Emphasis\_All Direction\_offset1\_SD;  $Y_2$ : Long Run High Grey Level Emphasis\_All Direction\_offset1\_SD;  $Y_3$ : Long Run High Grey Level Emphasis\_All Direction\_offset8\_SD;

$Z_1$ : Cluster Prominence\_All Direction\_offset3\_SD;  $Z_2$ : Long Run High Grey Level Emphasis\_All Direction\_offset3\_SD。

对照组和治疗组间比较发现, 30、60和90 s的Score值组间均有统计学差异( $P \leq 0.001$ , 表2)进一步不同增强时间图像Score值对比分析结果见表2, 30 s分别与60 s和90 s均有统计学差异而60 s和90 s之间无统计学差异。

表2 两组间不同增强时期造影图像的超声组学评分比较

Table 2 Comparison of ultrasonics Scores of different CEUS enhanced phase images between control group ( $n=6$ ) and treatment group ( $n=6$ )

Contrast-enhanced Time	Control group	Treatment group	$t$	$P$ value
30 s	-1.80±0.60	1.20±0.40	6.021	0.000 <sup>1)</sup>
60 s	-0.49±0.05 <sup>2)</sup>	-0.28±0.07 <sup>2)</sup>	4.587	0.001 <sup>1)</sup>
90 s	-0.00±0.17 <sup>2)</sup>	-0.08±0.14 <sup>2)</sup>	4.144	0.002 <sup>1)</sup>

Comparison between control group and treatment group,  $P < 0.05$ ; 2) Comparing with contrast-enhanced ultrasound images of 30 s,  $P < 0.05$ ;

### 3 讨论

肝细胞性肝癌是死亡率最高的三大肿瘤之一, 尽管目前手术治疗、放化疗、消融等治疗手段长足进步, 患者的总体生存仍不理想。近年来, 随着肿瘤学、人类基因组学研究的不断进步, 分子靶向治疗已成为颇具潜力的抑瘤治疗手段。其中, microRNA是分子靶向治疗研究中的热点, 其主要作用机制是通过与靶蛋白的mRNA非编码区配对结合, 调控相关基因及下游蛋白的表达<sup>[19]</sup>。在肝细胞性肝癌中, miR-122即为其中一个重要的治

疗靶点。体内外实验证实miR-122可有效抑制肝癌细胞生长、侵袭及转移<sup>[9-11]</sup>, 且能提高化疗敏感性<sup>[20]</sup>。本研究采用miR-122模拟物mimics成功实现了对HCC瘤组织的过表达, 进而依据RECIST, 通过瘤块体积对其疗效进行评估, 结果与既往研究相一致, 治疗组的瘤块体积明显小于对照组, 说明miR-122能明显抑制HCC瘤块的增长。

临床上常用的实体瘤疗效评估方法主要是RECIST和mRECIST。其中, 基于肿瘤灌注评估的mRECIST可有效评估化疗治疗对HCC的治疗疗效, 且CEUS的定量灌注参数在其中起到重要作用<sup>[21-23]</sup>。周建华等的研究发现在荷肝癌小鼠模型

中,顺铂治疗组瘤块的最大增强强度(IMAX)和血流灌注指数PI明显低于对照组<sup>[21]</sup>,类似地,抗肿瘤血管生成药物沙利度胺也使小鼠的瘤块灌注参数,曲线下面积AUC、IMAX和PI显著低于阴性对照组<sup>[23]</sup>,说明了超声造影的灌注定量参数能有效评估出抗血管生成治疗的治疗反应。本研究在miR-122治疗结束后进行CEUS成像,利用SonoLiver分析常规的灌注参数,发现常规的灌注量化参数在两组间没有显著差异。不同于具有明确抗肿瘤血管生成作用的药物,尚未有研究证实miR-122对HCC血流灌注改变的影响。因此,本研究中miR-122治疗未引起明显的总体灌注特征的变化(组间IMAX、RT、TTP、mTT均无统计学差异),提示HCC对miR-122的早期反应可能不表现为明确的抗血管生成效应。

常规的CEUS定量建立一个灌注模型来分析量化参数,这种基于动态图像的定量参数只能反映病灶内造影剂循环时间和增强峰值,无法解析图像纹理等大量有价值信息。影像组学高通量地从影像中提取图像特征,可筛选到有效的与疾病相关的内涵特征。而超声具有放射影像检查不具备的实时、造价低、操作简便、便于多次重复检查等优点,因此,如果能将放射影像组学的思想和方法应用于超声中,即超声组学,将在临床上具有重要的价值。但目前尚未见基于造影图像的超声组学的研究,其分析方法尚无规范制定。参考影像组学方法,并结合CEUS时间分辨率的优势,我们截取超声增强造影的动脉期早期(10 s)、动脉期晚期(30 s)、静脉期早期(60 s)和静脉期晚期(90 s)的图像分别进行超声组学分析。其中,10 s为本研究中造影剂开始进入瘤块的时间点,30 s为接近瘤块增强最高强度时间点,60 s及90 s反

应造影剂在瘤块内的滞留和消退情况。我们成功从30、60、90 s的图像中筛选出两组间的显著差异参数,并建立相应的预测模型,发现两组间的超声组学预测值在上述时间点中均具有显著差异,且治疗组明显高于对照组。进一步总体分析发现,60 s和90 s的造影图像组学信息无显著差异,而30 s分别与60、90 s均有显著差异,提示本研究中增强峰值时间为超声组学最佳的分析时间点。我们推论可能是因为该时间点接近肿瘤增强峰值,造影剂在瘤体内密集分布,因此基于30 s的图像分析可以充分反映基因治疗效果;而60 s和90 s时造影剂已经开始出现消退,虽然也能够分析出差异,但是评估效能不如峰值时图像。而10 s时造影剂尚未完全充填肿瘤,因此无法建立基因疗效评估的指标。与常规灌注分析方法不同,超声组学可实现高通量地提取图像信息,这就有潜力克服常规mRECIST分析中无法检测病灶纹理、微小灌注改变及分子水平变化的缺陷,而这些方面正是疾病的早期评估和早期治疗监测的关键。

本研究尚存在以下不足之处:首先,本研究的样本量较小,是常规超声造影定量灌注参数无法实现对肝癌的基因治疗疗效评估的可能原因之一,因此,尚需进行大样本的进一步研究。其次,本研究的超声成像截面均选取瘤块的最大截面,不可避免出现取样误差,进一步研究中,需纳入三维超声成像及动态图参数提取方法,以将上述误差降至最低。最后,本研究中常规CEUS灌注分析无显著差异,需进一步获取病理学依据,证实miR-122早期无法影响HCC的新生血管。

综上所述,基于超声造影静态图像的超声组学可定量评估miR-122抑制HCC的疗效,在动脉增强晚期效果最佳,且优于常规灌注定量评估。

#### 参考文献

- [1] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9822): 1245-1255.
- [2] Mullick Chowdhury S, Wang TY, Bachawal S, et al. Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular carcinoma using complementary microRNAs [J]. *J Control Release*, 2016, 238 (9): 272-280.
- [3] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 648-656.
- [4] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49 (5): 1571-1582.
- [5] Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, et al. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (2): 448-457.

- [6] Patrick T, Susan GA, Elizabeth A, et al. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(3): 205-216.
- [7] Lencioni R and Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(1): 52-60.
- [8] Liu M, Lin M, Lu M, et al. Comparison of contrast-enhanced ultrasound and contrast-enhanced computed tomography in evaluating the treatment response to transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma using modified RECIST [J]. *Eur Radiol*, 2015, 25(8): 2502-2511.
- [9] Wang SC, Lin XL, Li J, et al. MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101330.
- [10] Liu N, Jiang F, He T, et al. The Roles of MicroRNA-122 Overexpression in Inhibiting Proliferation and Invasion and Stimulating Apoptosis of Human Cholangiocarcinoma Cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-12.
- [11] Xu Q, Zhang M, Tu J, et al. MicroRNA-122 affects cell aggressiveness and apoptosis by targeting PKM2 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 2054-2064.
- [12] Lambin P, Rios-Velaquez E, Leijenaar R, et al. Radiomics: extracting more information from medical images using advanced feature analysis [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(4): 441-446.
- [13] Kumar V, Gu Y, Basu S, et al. Radiomics: the process and the challenges [J]. *Magn Reson Imaging*, 2012, 30(9): 1234-1248.
- [14] Segal E, Sirlin C, Ooi C, et al. Decoding global-gene expression programs in liver cancer by non-invasive imaging [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(6): 675-680.
- [15] Wang J, Liu X, Dong D, et al. Prediction of malignant and benign of lung tumor using a quantitative-radiomic method [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2016, 10(1): 1272-1275.
- [16] Teruel R, Heldahl G, Goa E, et al. Dynamic-contrast-enhanced MRI texture analysis for pretreatment-prediction of clinical and pathological response to adjuvant chemotherapy in patients with locally-advanced breast cancer [J]. *NMR Biomed*, 2014, 27(8): 887-896.
- [17] Aerts J, Velazquez R, Leijenaar T, et al. Decoding tumour phenotype by noninvasive imaging using a quantitative radiomics approach [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(2): 4006-4023.
- [18] Qiao M, Hu Y, Guo Y, et al. Breast Tumor Classification Based on a Computerized Breast Imaging Reporting and Data System Feature System [J]. *J Ultrasound Med*, 2017, [Epub ahead of print].
- [19] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-282.
- [20] Bai S, Nasser MW, Wang B, et al. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(46): 32015-32027.
- [21] Zhou JH, Cao LH, Zheng W, et al. Contrast-enhanced gray-scale ultrasound for quantitative evaluation of tumor response to chemotherapy: preliminary results with a mouse hepatoma model [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2011, 196(1): W13-17.
- [22] Zhou JH, Zheng W, Cao LH, et al. Quantitative evaluation of viable tissue perfusion changes with contrast-enhanced greyscale ultrasound in a mouse hepatoma model following treatment with different doses of thalidomide [J]. *Br J Radiol*, 2011, 84(84): 826-832.
- [23] Zhou JH, Zheng W, Cao LH, et al. Contrast-enhanced ultrasonic parametric perfusion imaging in the evaluation of antiangiogenic tumor treatment [J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81(6): 1360-1365.

(编辑 王晓鹰)