

· 临床研究 ·

前列腺癌超声造影参数与其Ki-67蛋白表达的相关性研究

刘 慧 红 华

摘 要 **目的** 探讨前列腺癌超声造影参数与其Ki-67蛋白表达的相关性。**方法** 收集经直肠前列腺穿刺活检确诊的前列腺癌患者95例,术前均行超声造影检查,观察超声造影模式,确定异常增强区域。免疫组化法检测异常增强区域组织Ki-67蛋白的表达情况,并根据其检测结果分为:阴性组40例、低表达组40例和高表达组15例。应用QLAB软件分析异常增强区域的时间-强度曲线,记录并比较各组超声造影定量参数。分析各超声造影参数与Ki-67蛋白表达的相关性。绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价超声造影参数对Ki-67蛋白表达的诊断价值。**结果** 超声造影模式以不均质增强为主,异常增强区域的时间-强度曲线形态以速升速降及速升缓降为主。各组超声造影时间-强度曲线的曲线下面积(AUC)、峰值强度(PI)、强度降半时间(HT)、平均通过时间(MTT)、上升支斜率比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),其中AUC、PI、HT、MTT与Ki-67蛋白表达均呈正相关($r=0.657, 0.537, 0.503, 0.407$,均 $P<0.05$)。ROC曲线显示AUC、PI、HT对Ki-67蛋白表达有较高的诊断价值,当截断值分别为479.44 dBs、7.71 dB、49.48 s,其ROC曲线下面积分别为0.848、0.793、0.752,以AUC的诊断特异性和敏感性最高(83.64%、73.24%)。**结论** 超声造影时间-强度曲线定量参数AUC、PI、HT与Ki-67蛋白表达均有相关性,可为无创评估前列腺癌的肿瘤细胞增殖程度及肿瘤血管生成提供一定依据,可为预测肿瘤恶性程度及预后提供影像学参考。

关键词 超声检查;造影剂;定量参数;前列腺肿瘤,恶性;Ki-67蛋白表达

[中图法分类号]R445.1;R737.25

[文献标识码]A

Correlation between contrast-enhanced ultrasound parameters and Ki-67 protein expression in prostate cancer

LIU Hui, HONG Hua

Department of Ultrasound Medicine, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010017, China

ABSTRACT **Objective** To explore the correlation between contrast-enhanced ultrasound (CEUS) parameters and Ki-67 protein expression in prostate cancer. **Methods** Ninety-five prostate cancer patients diagnosed by rectal prostate biopsy were collected. Before operation, ultrasound contrast examination was performed to observe the ultrasound contrast mode and to determine the abnormal enhancement area, and the expression of Ki-67 protein in the abnormal enhancement area was detected by immunohistochemical. According to the results, they were divided into the negative group (40 cases), low expression group (40 cases) and high expression group (15 cases). The time-intensity curve of the abnormal enhancement region was analyzed by QLAB software, and the parameters of CEUS in each group were recorded and compared. The correlation between CEUS parameters and Ki-67 protein expression was analyzed. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to evaluate the diagnostic value of CEUS parameters for expression of Ki-67. **Results** The mode of contrast-enhanced ultrasound was dominated by heterogeneous enhancement, and the time-intensity curve of the abnormal enhancement area was dominated by rapid rise, rapid fall and slow rise. The area under curve (AUC), peak intensity (PI), the intensity halving time (HT), mean transit time (MTT) and wash in slope of the ultrasound contrast time-intensity curve of each group were compared, and the differences were statistical significance (all $P<0.05$). Among them, AUC, PI, HT and MTT were positively correlated with Ki-67 protein expression ($r=0.657, 0.537, 0.503, 0.407$, all $P<0.05$). ROC curve showed that AUC, PI and HT had high diagnostic value for

Ki-67 expression levels. When the cutoff values were 479.44 dBs, 7.71 dB and 49.48 s, the AUC were 0.848, 0.793 and 0.752, respectively. The diagnostic specificity and sensitivity of AUC were the highest (83.64% and 73.24%). **Conclusion** AUC, PI, HT of ultrasound contrast time-intensity curve and Ki-67 protein expression are correlated, which can provide a certain basis for noninvasive evaluation of the degree of tumor cell proliferation and tumor angiogenesis in prostate cancer, and can provide imaging reference for the prediction of tumor malignancy and prognosis.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agents; Quantitative parameters; Prostate tumor, malignant; Expression of Ki-67 protein

前列腺癌是常见的男性泌尿生殖系恶性肿瘤之一,在美国男性肿瘤中发病率第一,死亡率第二^[1]。与欧美国家相比,我国目前虽是前列腺癌发生的低危国家,但其发病率及死亡率亦逐年上升,且患者确诊时多为较晚期病变,致其预后显著低于欧美国家^[2],故早期诊断前列腺癌尤为重要。超声造影能客观反映肿瘤组织的血流灌注情况。Ki-67 蛋白是肿瘤细胞增殖的标记物,也可以作为前列腺癌独立的预后参数^[3]。目前关于超声造影参数与 Ki-67 蛋白表达间关系的研究较少。本研究旨在分析前列腺癌超声造影参数与 Ki-67 蛋白表达的相关性,以期为临床评估前列腺癌肿瘤细胞增殖度、预测患者预后提供影像学参考。

资料与方法

一、研究对象

选取 2015 年 7 月至 2019 年 6 月于我院经直肠前列腺穿刺活检并确诊为前列腺癌的男性患者 95 例,年龄 45~87 岁,平均(71.8±7.6)岁;前列腺特异性抗原(PSA)水平 0.02~778.20 ng/ml,平均(17.59±100.00)ng/ml。入选标准:①前列腺 MRI 或超声造影异常;②超声引导靶向穿刺及系统穿刺结果均提示为前列腺癌。排除标准:①其他恶性肿瘤患者;②严重心肺疾病患者及其他造影及穿刺禁忌症;③近期内均未对前列腺进行刺激性检查。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. 超声造影检查及其引导下穿刺:使用 Philips iU 22 彩色多普勒超声诊断仪,变频经直肠端扫式探头,频率 5~10 MHz;配以专用穿刺架、18 G 活检针及美国 Bard 公司生产自动活检枪;机械指数 0.11~0.13。应用经直肠二维超声观察前列腺整体情况,结合 MRI 结果确定超声造影平面,然后进行超声造影检查。将 SonoVue 造影剂(意大利 Barcco 公司)用 5.0 ml 生理盐水稀释并轻微摇晃使其充分混合后,经肘静脉团注 2.4 ml,注射速度约为 1~2 ml/s,随后静脉推注 5.0 ml 生理盐水冲管,速度 2 ml/s,同时储存至少 3 min 的动态

图像。观察图像增强模式,并确定出异常增强区域,应用 QLAB 软件分析储存的造影图像异常增强区域的超声造影时间-强度曲线形态,记录定量参数,包括:上升时间(RT)、峰值强度(PI)、平均通过时间(MTT)、曲线下面积(AUC)、强度降半时间(HT)、上升支斜率(WIS)、达峰时间(TTP)。以上操作均由两名经验丰富的超声医师协商进行。最后行超声造影引导下经直肠前列腺穿刺活检术,用 18 G 穿刺针分别在前列腺左右叶内外腺的底、中、尖进行 12 针系统穿刺,随后对造影异常增强区域加穿 1~2 针,并标记位置后送病理。所选标本行病理穿刺的部位应与超声造影异常增强区域 QLAB 分析取点尽可能一致。

2. 超声造影增强模式判断标准:①弥漫性增强,前列腺内外腺分界不清,呈弥漫均匀性增强,造影剂流入为快速进入,快速消退;②结节性增强,即前列腺局部区域呈高增强,造影剂流入为快速进入,快速消退;③不均匀性增强,前列腺内外腺分界不清,呈弥漫不均匀性增强,内可见不规则低增强或无增强的区域;④无异常增强,即前列腺内外腺均匀性增强,分界清晰。超声造影异常区域判断标准:①注射造影剂后相对其他区域快速对比增强;②增强病灶与邻近组织相比对比增强且快速消退;③边界不清的病变无增强或低增强。

3. Ki-67 蛋白表达检测及分组:对取样组织标本进行 Ki-67 免疫组织化学染色。Ki-67 蛋白经免疫组化染色后出现黄色、棕黄色、棕褐色颗粒为 Ki-67 表达阳性,反之为阴性或未表达。Ki-67 蛋白分级标准:①阴性(-):阳性细胞数<5%;②弱阳性(+):阳性细胞数 5%~25%;③阳性(++):阳性细胞数 26%~50%;④强阳性(+++):阳性细胞数>50%。根据 Ki-67 蛋白表达检测结果分组:阴性组 40 例(阴性表达)、低表达组 40 例(弱阳性表达)和高表达组 15 例(阳性和强阳性表达)。阴性组、低表达组及高表达组患者的年龄、PSA 水平比较,差异均无统计学意义。

三、统计学处理

应用 SPSS 21.0 统计软件,不服从正态分布的计量资料以 $M(Q1-Q3)$ 表示,组间比较行 Kruskal-Wallis H

检验,两两比较采用 Bonferroni 校正法。Ki-67 蛋白表达与造影定量参数的相关性采用 Spearman 秩相关分析。绘制超声造影参数诊断 Ki-67 蛋白表达的受试者工作特征(ROC)曲线,确定其截断值并计算其诊断效能。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、超声造影表现和异常增强区域的时间-强度曲线分析

95 例前列腺癌超声造影患者中,55 例造影模式为不均质增强,表现为前列腺内外腺分界不清,呈弥漫不均匀性增强,内可见不规则低增强或无增强的区域;20 例为结节性增强,表现为前列腺局部区域呈高增强,呈快进快退模式;20 例为弥漫性增强,表现为前列腺内外腺分界不清,呈弥漫均匀性增强,呈快进快退模式。异常增强区域的时间-强度曲线形态:48 例表现为快速上升,快速下降;43 例表现为快速上升,缓慢下降;4 例表现为低增强缓慢上升,缓慢下降。

二、各组超声造影异常增强区域的时间-强度曲线参数比较

各组间超声造影参数 AUC、PI、HT、MTT、WIS 比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);RT、TTP 比较差异无统计学意义。组间两两比较,低表达组 PI、AUC、HT 高于阴性组,高表达组 PI、MTT、AUC、HT、WIS 高于阴性组,高表达组 MTT、AUC、HT、WIS 高于低表达组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见图 1~3 和表 1。

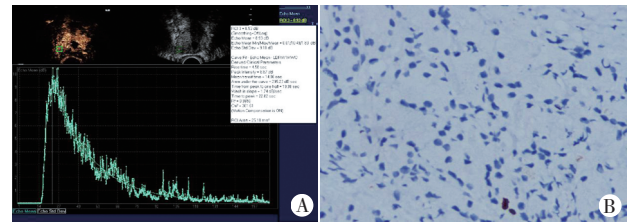
三、超声造影参数与 Ki-67 蛋白表达相关性分析

相关性分析结果显示,超声造影参数 AUC、PI、HT、MTT 与 Ki-67 蛋白表达均呈正相关($r=0.657$ 、 0.537 、 0.503 、 0.407 , 均 $P<0.05$),其中 AUC 相关性最高,随 Ki-67 蛋白表达增加呈上升趋势;WIS、RT、TTP 与 Ki-67 蛋白表达均无相关性。见表 2。

表 1 超声造影异常增强区域的时间-强度曲线参数比较 [$M(Q1\sim Q3)$]

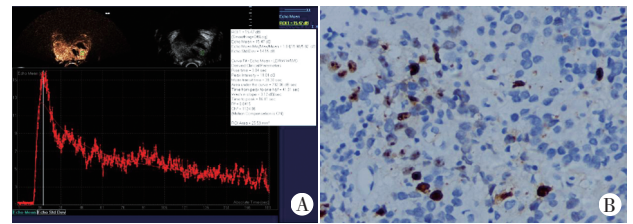
组别	RT(s)	PI(dB)	MTT(s)	AUC(dBs)	HT(s)	WIS(dB/s)	TTP(s)
阴性组	6.23 (4.93~8.55)	7.39 (5.59~9.44)	26.20 (20.34~32.77)	391.34 (270.78~504.33)	38.00 (29.05~46.08)	1.48 (0.86~1.70)	24.13 (20.99~29.23)
低表达组	6.01 (5.25~8.22)	10.06 (7.98~11.29) [#]	28.86 (21.74~38.97)	564.10 (484.27~802.41) [#]	45.35 (36.20~56.60) [#]	1.34 (1.03~1.73)	24.35 (21.11~27.56)
高表达组	9.11 (6.04~14.14)	14.38 (11.24~15.71) [#]	43.06 (39.66~53.02) ^{**}	1186.65 (952.35~1294.73) ^{**}	65.91 (60.94~81.11) ^{**}	1.56 (0.76~2.03) ^{**}	26.28 (20.77~35.10)
H 值	1.434	40.008	10.197	47.113	22.320	4.942	5.444
P 值	0.838	<0.001	0.037	<0.001	<0.001	<0.001	0.245

与阴性组比较,[#] $P<0.05$;与低表达组比较,^{*} $P<0.05$ 。RT:上升时间;PI:峰值强度;MTT:平均通过时间;AUC:曲线下面积;HT:强度降半时间;WIS:上升支斜率;TTP:达峰时间



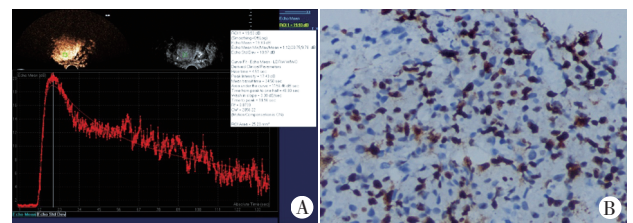
A:时间-强度曲线呈速升速降模式,其中 AUC:295.23 dBs, PI:8.87 dB;
B:免疫组化染色后显示 Ki-67 蛋白:3%~5%($\times 200$)

图 1 阴性表达组异常增强区域超声造影时间-强度曲线图和免疫组化图



A:时间-强度曲线呈速升速降模式,其中 AUC:792.06 dBs, PI:11.01 dB;
B:免疫组化染色后显示 Ki-67 蛋白:5%~10%($\times 200$)

图 2 低表达组异常增强区域超声造影时间-强度曲线图和免疫组化图



A:时间-强度曲线呈速升速降模式,其中 AUC:1156.46 dBs, PI:17.43 dB;
B:免疫组化染色后显示 Ki-67 蛋白:40%~50%($\times 200$)

图 3 高表达组异常增强区域超声造影时间-强度曲线图和免疫组化图

四、ROC 曲线分析

超声造影参数 AUC、PI、HT 诊断 Ki-67 蛋白阳性表达的截断值分别为 479.44 dBs、7.71 dB、49.48 s,其 ROC 曲线下面积分别为 0.848、0.793、0.752,其中 AUC 和 PI 的诊断敏感性较高,分别为 83.64%、85.45%,特异性分别为 73.24%、60.56%,见图 4 和表 3。

表2 超声造影参数与Ki-67蛋白表达的相关性分析

超声造影参数	Ki-67蛋白表达	
	r值	P值
RT	0.159	0.075
PI	0.537	<0.001
MTT	0.407	<0.001
AUC	0.657	<0.001
HT	0.503	<0.001
WIS	0.023	0.795
TTP	0.028	0.752

RT:上升时间;PI:峰值强度;MTT:平均通过时间;AUC:曲线下面积;HT:强度降半时间;WIS:上升支斜率;TTP:达峰时间

表3 超声造影参数鉴别Ki-67蛋白阴阳性表达的效能

造影参数	截断值	曲线下面积	95%可信区间	敏感性(%)	特异性(%)	阳性似然比	阴性似然比	约登指数
AUC	479.44 dBs	0.848	0.773~0.906	83.64	73.24	3.13	0.22	0.569
PI	7.71 dB	0.793	0.712~0.860	85.45	60.56	2.17	0.24	0.460
HT	49.48 s	0.752	0.667~0.825	61.82	83.10	3.66	0.46	0.449
MTT	36.57 s	0.690	0.602~0.769	47.27	90.14	4.79	0.58	0.374

AUC:曲线下面积;PI:峰值强度;HT:强度降半时间;MTT:平均通过时间

讨 论

肿瘤的发生、发展与转移是一个复杂、多步骤、多因素相互作用的动态过程,肿瘤血管的形成是前列腺癌生长与转移的基础,与患者预后密切相关^[4]。超声造影能客观反映组织灌注情况,敏感地显示与前列腺癌发生发展相关的新生血管^[5]。前列腺癌疾病的局部控制取决于肿瘤的增殖活性和血管生成的程度^[6],既往实验和临床数据^[7-8]表明,肿瘤细胞的增殖与血管生成有关。Ki-67蛋白可作为判定肿瘤增殖活性的主要标记,指数越高则其肿瘤分化程度、浸润、转移及预后越差^[9]。本研究通过分析超声造影参数与Ki-67蛋白表达的相关性,旨在初步判断肿瘤的增殖活性和肿瘤血管生成情况。

本研究结果发现,阴性组、低表达组和高表达组PI、MTT、AUC、HT比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且均与Ki-67蛋白表达呈正相关,尤以PI和AUC相关性最高($r=0.537、0.657$,均 $P<0.05$)。分析原因可能是由于Ki-67与血管内皮生长因子(VEGF)在肿瘤的发生及发展中的协同作用,肿瘤的增殖能力越强,VEGF分泌越多,则形成更多的新生血管,随之促进了肿瘤的增殖;随着肿瘤恶性程度的增加,肿瘤新生血管增多,局部形成动静脉瘘、滋养血管^[10],注入造影剂后微泡迅速到达肿瘤部位血管内,使造影剂在短时间内大量聚集于病灶,速度快且单位时间造影剂流入量明显

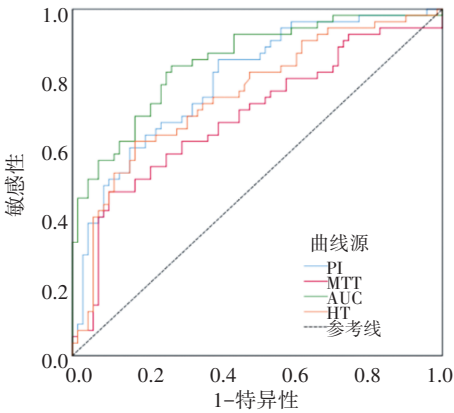


图4 超声造影参数诊断Ki-67蛋白阳性表达的ROC曲线图

增多,故时间-强度曲线形态表现为快速上升,快速下降。另外,不同部位肿瘤增殖程度不同,导致超声造影模式表现不同,前列腺癌是显著的异质性肿瘤,主要以不均质增强为主,由于肿瘤细胞增生引起的前列腺内血管压力增高、细胞形态和排列不规则引起的结构异常、器官高度压缩及肿瘤新生血管与正常血管不同,新生血管中无平滑肌,降低了管壁的弹性,呈不规则的分支,迂曲扩张、粗细不均,易形成癌栓,增加回流的阻力^[10-11],可能导致造影剂在这些部位中的停留时间延长,时间-强度曲线形态则表现为快速上升,缓慢下降。超声造影参数WIS、RT、TTP与Ki-67蛋白表达均无相关性,这可能与本研究样本量少,且前列腺癌是显著异质性肿瘤有关。综合以上分析,本研究结果提示超声造影可以作为预测前列腺癌恶性程度的一项潜在性指标,与既往研究^[12-14]结果基本一致。

本研究筛选出各组具有相关性的造影参数,并绘制其鉴别Ki-67蛋白阳性表达的ROC曲线,结果提示AUC、PI、HT的ROC曲线下面积分别为0.848、0.793、0.752,截断值分别为479.44 dBs、7.71 dB、49.48 s,说明超声造影参数AUC、PI、HT在截断值范围内,可以反映其对应的时间-强度曲线形态特征,对于鉴别前列腺癌Ki-67蛋白阳性表达有较高的准确率,提示超声造影参数可为无创评估前列腺癌肿瘤细胞增殖程度及肿瘤血管生成提供一定的影像学依据。

综上所述,超声造影时间-强度曲线定量参数

AUC、PI、HT与Ki-67蛋白表达均有相关性,为无创评估前列腺癌的肿瘤细胞增殖程度及肿瘤血管生成提供一定的依据,可为预测肿瘤恶性程度及预后提供影像学补充,具有一定的临床应用价值。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 韩苏军. 中国前列腺癌发病及死亡现状和流行趋势分析[D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2015.
- [3] Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Urol Oncol, 2017, 35(8): 499-506.
- [4] Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Urol Oncol, 2017, 35(8): 499-506.
- [5] Postema AW, Frinking PJ, Smeenge M, et al. Dynamic contrast-enhanced ultrasound parametric imaging for the detection of prostate cancer[J]. BJU Int, 2016, 117(4): 598-603.
- [6] Mukherji D, Temraz S, Wehbe D, et al. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 87(2): 122-131.
- [7] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [8] Matic SD, Rakocevic MS, Jovic TT, et al. Clinical significance of microvessel density and proliferation in prostate cancer core biopsy[J]. J BUON, 2017, 22(3): 757-765.
- [9] Miller I, Min M, Yang C, et al. Ki-67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence[J]. Cell Rep, 2018, 24(5): 1105-1112.
- [10] Russo G, Mischi M, Scheepens W, et al. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging[J]. BJU Int, 2013, 110(11): 794-780.
- [11] Zelli R, Orlandi R, Troisi A, et al. Power and pulsed Doppler evaluation of prostatic artery blood flow in normal and benign prostatic hyperplasia-affected dogs[J]. Reprod Domest Anim, 2013, 48(5): 768-773.
- [12] Maxeiner A, Fischer T, Schwabe J, et al. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and quantitative perfusion analysis in patients with suspicion for prostate cancer[J]. Ultraschall Med, 2019, 40(3): 340-348.
- [13] 吴成爱, 刘聪雅, 杨永生, 等. 前列腺癌经直肠超声造影定量参数及分化程度与微血管密度相关性的初步研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2015, 24(10): 865-868.
- [14] Jiang J, Chen Y, Zhu Y, et al. Contrast-enhanced ultrasonography for the detection and characterization of prostate cancer: correlation with microvessel density and Gleason score[J]. Clin Radiol, 2011, 66(8): 732-737.

(收稿日期: 2019-08-30)

• 病例报道 •

Ultrasonic manifestations of primary yolk sac tumor of seminal vesicle: a case report

原发性精囊卵黄囊瘤超声表现 1 例

韩小玮 张文君

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] B

患者男, 34岁, 因“发现盆腔肿块10年, 尿道口分泌物2个月余”入院。自诉10年前因肛周肿痛于外院检查发现盆腔包块, 行穿刺抽液, 病变性质不详, 未进一步处理。7年前盆腔肿块复发于外院切除, 术后病理考虑精囊囊肿。7年来间断出现肛周肿胀、伴尿线细, 有血精1次, 无明显尿频、尿急、血尿, 口服抗感染等对症治疗稍改善。既往间断高血压病史多年, 未行诊治, 入院测量血压163/113 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)。直肠指检: 肛门括约肌张力可, 直肠前方可触及囊性包块, 表面光滑, 质软, 边界无法触及, 触痛明显, 指套退出无血染。尿道外口无狭窄, 见混浊黏性分泌物, 无明显异味。超声检查: 前列腺增

大, 形态、轮廓失常, 后部可见一大大小约6.9 cm×4.8 cm×4.4 cm团块状混合回声, 边界清晰, 形态规则, 内可见低弱回声及不规则实性回声; CDFI于上述混合回声包块实性部分可探及血流信号(图1)。超声提示: 前列腺后部混合回声团块。MRI检查: 右侧精囊腺区示结节状异常信号, T2WI压脂呈稍高信号, 边缘示低回声环绕, T1WI呈等信号, 直径约1.5 cm; DWI: 右侧精囊腺区结节呈高信号; 增强MRI示右侧精囊腺区结节明显强化(图2)。行精囊镜探查术+经尿道射精管切开术+膀胱镜检查+尿道镜检查+留置导尿管置入术, 术中见精囊后方明显隆起, 行

(下转第343页)

作者单位: 442000 湖北省十堰市, 锦州医科大学十堰市太和医院研究生培养基地 湖北医药学院附属医院超声医学科

通讯作者: 张文君, Email: pulushi38@126.com