

◆ 实验研究

Ultrasound molecular radiomics for evaluation of prostate specific membrane antigen expression in prostate cancer: Experimental study

LI Rong, HUANG Zhaoxi, HUANG Fangyi, YUAN Han, GAO Yong*

(Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Guangxi

Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective** To observe the value of ultrasound molecular radiomics for evaluation of prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer (PCa). **Methods** 22RV1 cells (PSMA positive expression, $n=9$) and PC-3 cells (PSMA negative expression, $n=10$) were inoculated subcutaneously in nude mice to construct human prostate cancer cell transplantation tumor models with different PSMA expression level. PSMA targeted ultrasound nanobubbles (PSMA-NB) were prepared, and the characterizations of PSMA-NB were detected, while *in vivo* and *in vitro* ultrasound molecular imaging were acquired. The nude mice were randomly divided into training set or test set at a ratio of 7:3. The texture features were extracted in training set. Ultrasound molecular radiomics model was constructed after screening features using intra-class correlation coefficient, one-way analysis, least absolute shrinkage and selection operator, and its efficiency for diagnosing PSMA positive PCa was evaluated. **Results** The average particle size of PSMA-NB was (392.2 ± 31.56) nm, and the Zeta potential was (-29.3 ± 0.95) mV. The targeted nanobubbles showed good stability on *in vitro* ultrasound imaging. A total of 1 561 texture features were extracted in training set, and 3 features, *i. e.* exponential_glszm_ZoneVariance, wavelet_HHH_gldm_SmallDependenceLowGrayLevelEmphasis and logarithm_gldm_DependenceVariance were screened out. The area under the curve of this radiomics model was 0.950 and 0.875 in training set and test set, respectively. **Conclusion** Ultrasound molecular radiomics model based on targeted PSMA could be used to evaluate PSMA expression in nude mice PCa.

[Keywords] prostatic neoplasms; ultrasonography; animal experimentation; prostate specific membrane antigen

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2024.03.002

超声分子影像组学评估前列腺癌前列腺特异膜抗原表达: 实验研究

李蓉, 黄钊希, 黄方易, 袁晗, 高泳*

(广西医科大学第一附属医院超声科, 广西南宁 530021)

[摘要] **目的** 观察超声分子影像组学评估前列腺癌(PCa)前列腺特异膜抗原(PSMA)表达的价值。**方法** 分别于裸鼠皮下接种 22RV1 细胞(PSMA 阳性表达, $n=9$)或 PC-3 细胞(PSMA 阴性表达, $n=10$), 构建不同 PSMA 表达水平人前列腺癌细胞移植瘤裸鼠模型。制备靶向 PSMA 的超声纳米米泡(PSMA-NB), 进行表征检测及体内、外超声分子成像。以 7:3 比例将裸鼠随机分为训练集及测试集, 提取训练集纹理特征, 以组内相关系数、单因素分析、最小绝对收缩和选择算子等方法筛选特征, 构建超声分子影像组学模型, 并评估模型诊断 PSMA 阳性 PCa 的效能。**结果** 所制备 PSMA-NB 平均

[基金项目] 国家自然科学基金(82001827)。

[第一作者] 李蓉(1998—), 女, 广西北海人, 在读硕士。研究方向: 超声分子影像。E-mail: 1250856706@qq.com

[通信作者] 高泳, 广西医科大学第一附属医院超声科, 530021。E-mail: 21412066@qq.com

[收稿日期] 2023-11-01 **[修回日期]** 2024-01-04

粒径为(392.2±31.56)nm, Zeta 电位为(-29.3±0.95)mV, 体外显像效果理想, 稳定性好。共基于训练集数据提取 1 561 个纹理特征, 最终筛选出 3 个特征, 包括 exponential_glszm_ZoneVariance、wavelet_HHH_gldm_SmallDependenceLowGrayLevelEmphasis 及 logarithm_gldm_DependenceVariance, 以之构建的超声分子影像组学模型诊断训练集、测试集 PSMA 阳性表达 PCa 的曲线下面积分别为 0.950、0.875。结论 基于靶向 PSMA 超声分子影像组学模型可用于评估 PCa 裸鼠 PSMA 表达。

[关键词] 前列腺肿瘤; 超声检查; 动物实验; 前列腺特异膜抗原

[中图分类号] R737.25; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2024)03-0327-05

前列腺癌(prostate cancer, PCa)居男性癌症死因第 2 位^[1], 其前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)表达水平与疾病进展、复发显著相关^[2], PSMA 表达水平越高, 则患者生存期越短。靶向 PSMA 放射性药物具有广阔应用前景, 但筛选最佳收益患者至关重要^[3-4]。临床主要通过 PSMA-PET 诊断 PSMA 阳性 PCa^[3], 但因价格昂贵、有放射性、检查时间长等而应用受限。影像组学对于评价肿瘤基因表达具有重要价值。既往研究^[5-6]基于影像组学预测肿瘤 Ki-67、KRAS 等基因表达, 或利用⁶⁸镓标记 PSMA 配体进行 PET/MR 成像^[7]而发现 PCa MRI 纹理特征与其 PSMA 表达相关, 但鲜见基于超声分子成像构建超声组学模型评估 PCa PSMA 表达相关研究。本研究建立不同 PSMA 表达人前列腺肿瘤细胞移植瘤裸鼠模型, 观察超声分子影像组学评估其 PSMA 表达的价值。

1 材料与方 法

1.1 制备与检测靶向 PSMA 超声纳米泡(nanobubble, NB)

1.1.1 制备 NB 按比例称取 1,2-二棕榈酰-锡-甘油基-3-磷酸胆碱(1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸(1, 2-dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphate, DPPA)、1,2-二棕榈酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺(1, 2-distearoyl-snglycero-3-phosphorylethanolamin, DPPE)及二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-羧(1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy (polyethylene glycol)], DSPE-PEG-COOH), 与氯仿混合并充分溶解, 置于加热板上制成薄膜小瓶。加入 Pluronic 124 和甘油, 65℃水浴后混合均匀; 注入全氟丙烷气体后高速振荡 60 s, 4℃倒置分层 2 h, 抽取下层清液, 即 NB。按比例加入 1-乙基(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide, EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、

PSMA 多肽(序列为 CQKHHNYLC, 携 FITC 荧光基团, 由多个氨基酸合成), 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)离心清洗 3 次, 以去除未结合的 PSMA 多肽, 制得靶向 PSMA 超声 NB(PSMA-NB), 置于 4℃条件下避光保存。

1.1.2 检测 PSMA-NB 表征 取适量上述样品, 以预冷 PBS 稀释至 1:1 000 倍; 采用马尔文纳米粒度电位仪, 参数设置为 T = 25℃、laser wavelength = 660 nm、angle = 90°, 检测其平均粒径及 Zeta 电位。

1.1.3 体外 PSMA-NB 超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 取适量上述样品, 以预冷 PBS 稀释至 1:100 倍。采用 GE Logiq E9 超声仪、9L-D 探头行体外 CEUS, 频率 7 MHz, 机械指数 0.11, 动态范围 54 dB, 增益 3 dB, 观察 PSMA-NB 用于体外成像的效果。

1.2 动物实验

1.2.1 实验材料 19 只 4~5 周龄 BALB/C-nu 雄性裸鼠由广西医科大学实验动物中心提供; 人前列腺癌 22RV1 细胞株、PC-3 细胞株购自北京协和细胞资源中心。本研究通过广西医科大学动物伦理委员会批准(202203767)。

1.2.2 构建人前列腺肿瘤细胞移植瘤裸鼠模型 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养人前列腺癌细胞系 22RV1 细胞(PSMA 表达阳性), 以含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基培养人前列腺癌细胞系 PC-3 细胞(PSMA 表达阴性)^[8]。取对数生长期细胞, 按 1×10⁷ 个细胞/只将 22RV1 细胞接种于 9 只裸鼠背部右侧皮下(阳性组), 将 PC-3 细胞以 5×10⁶ 个细胞/只接种于 10 只裸鼠背部右侧皮下(阴性组)。

1.2.3 靶向 PSMA 超声分子成像 待移植瘤最大径达约 1.0 cm 时以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉荷瘤裸鼠, 以 GE Logiq E9 超声仪、9L-D 探头, 选取移植瘤最大切面, 先行常规成像, 再于经尾静脉注射 200 μl PSMA-NB 后行 CEUS, 参数同前。

1.2.4 肿瘤组织学分析 造影结束后取出肿瘤组织并制备切片标本, 采用 Hoechst 33342 荧光染料避光

染色 5 min, 以抗荧光衰减剂封片; 以正置荧光显微镜于 200 倍下观察 PSMA-NB 与 22RV1、PC-3 肿瘤组织结合情况。

1.3 影像组学分析

1.3.1 分割图像及提取特征 将超声分子成像动态视频分割为静态图片(每秒 1 帧), 由 2 名具有 10 年以上工作经验的超声科医师采用 ITK-SNAP 3.8.0 软件共同勾画肿瘤 ROI(图 1), 以 Python 软件 Pyradiomics 包提取影像组学特征, 包括形状、一阶特征、梯度特征、灰度共生矩阵(gray level co-occurrence matrix, GLCM)、灰度游程矩阵(gray level run length matrix, GLRLM)、灰度尺寸区域矩阵(gray level size zone matrix, GLSZM)、邻域灰度差分矩阵(neighbourhood gray tone difference matrix, NGTDM)、灰度相关矩阵(gray-level dependence matrix, GLDM)及小波变化等。

1.3.2 选择特征与构建模型 将提取特征行加权平均及 Z-score 标准化处理。随机选取 64 幅 CEUS 图, 计算其影像组学特征的组内相关系数(intra-class correlation coefficient, ICC), 针对 $ICC > 0.75$ 者行独立样本 *t* 检验, 保留差异有统计学意义($P < 0.05$)特征, 以 Pearson 相关性分析进行降维, 设阈值为 0.9。

按 7:3 比例将裸鼠随机分为训练集($n=13$, 包括阳性 5 只、阴性 8 只)与测试集($n=6$, 包括阳性 4 只、阴性 2 只)。采用最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)

筛选关键特征, 再通过多层感知机(multilayer perceptron, MLP)构建影像组学模型, 以 5 折交叉验证检验其稳定性。

1.4 统计学分析 采用 Python 3.7 统计分析软件, 绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线, 计算曲线下面积(area under the curve, AUC), 评价影像组学模型诊断 PSMA 阳性 PCa 的效能。

2 结果

2.1 PSMA-NB 表征检测 PSMA-NB 平均粒径为 $(392.2 \pm 31.56) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-29.3 \pm 0.95) \text{ mV}$, 见图 2。

2.2 体外 PSMA-NB CEUS PSMA-NB 呈点状均匀细腻强回声, PBS 显示为无回声的液性暗区。PSMA-NB 用于体外成像效果理想。见图 3。

2.3 组织学分析 荧光显微镜下 PSMA-NB 呈绿色荧光(FITC 荧光基团), 22RV1、PC-3 肿瘤组织细胞核呈蓝色荧光(Hoechst 33342 染色); 大量 PSMA-NB 分布于 PSMA 表达阳性的 22RV1 细胞周围(图 4A), 而 PSMA 表达阴性 PC-3 细胞周围未见明显 PSMA-NB 绿色荧光分布(图 4B)。

2.4 影像组学特征筛选及模型建立 共分割 694 幅声像图并提取 1 561 个超声纹理特征, 根据 $ICC > 0.75$ 初步选出 1 173 个纹理特征。基于训练集, 经过单因素分析、Pearson 相关性分析及 LASSO 回归特征降维, 最终筛选出 3 个与 PSMA 阳性表达相关的影像组学特征, 包

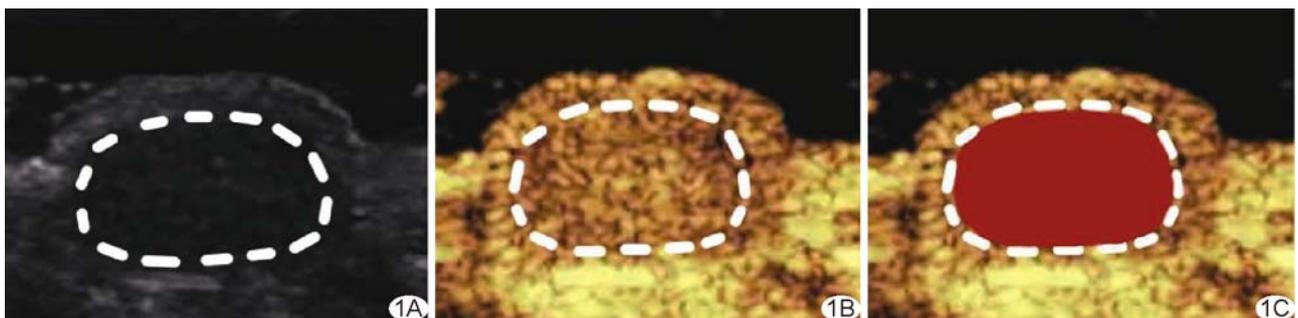


图 1 勾画人前列腺癌 22RV1 细胞裸鼠皮下移植瘤 ROI 示意图 A. 灰阶声像图; B. CEUS 图; C. 移植瘤 ROI(红色区域)

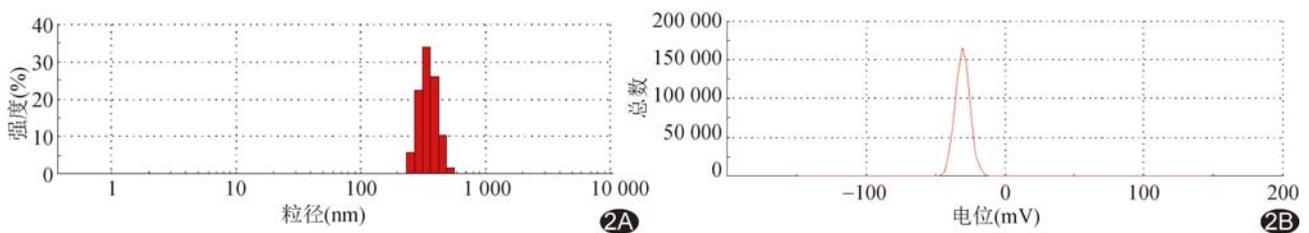


图 2 PSMA-NB 表征结果 A. 粒径; B. Zeta 电位

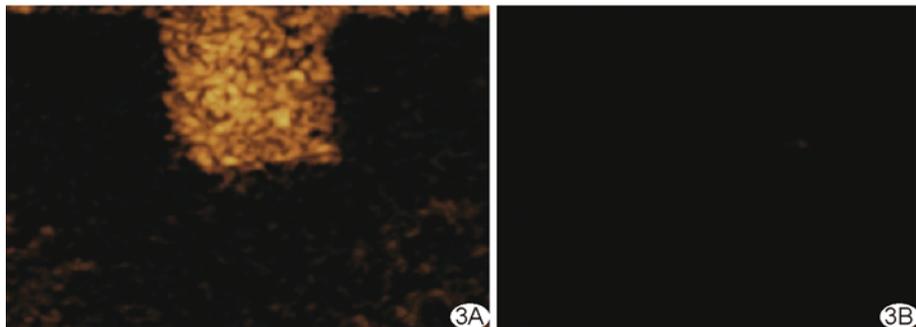


图 3 体外 PSMA-NB CEUS 图 A. 显示 PSMA-NB; B. 显示 PBS

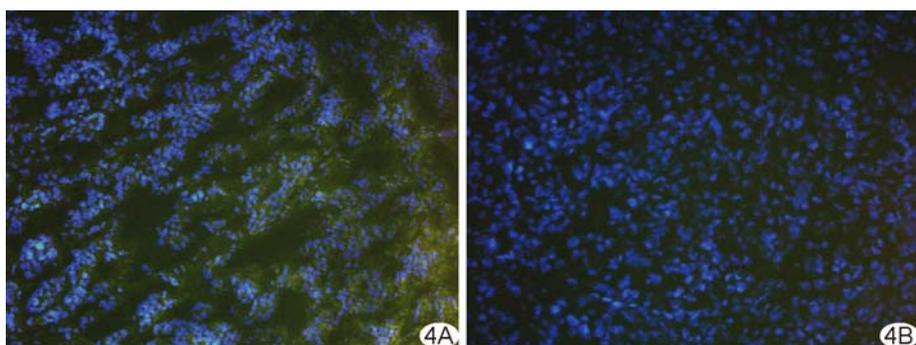


图 4 荷瘤裸鼠肿瘤组织 PSMA-NB 分布荧光合成图(×200) A. PSMA 表达阳性; B. PSMA 表达阴性

括 1 个 GLSZM 特征 exponential_glszm_ZoneVariance 及 2 个 GLDM 特征,即 wavelet_HHH_gldm_SmallDependenceLowGrayLevelEmphasis 与 logarithm_gldm_DependenceVariance;以之构建的超声分子影像组学模型诊断训练集、测试集 PSMA 表达阳性 PCa 的敏感度分别为 60.00%、50.00%,特异度均为 100%,准确率分别为 84.60%、66.70%,AUC 分别为 0.950、0.875,见图 5。

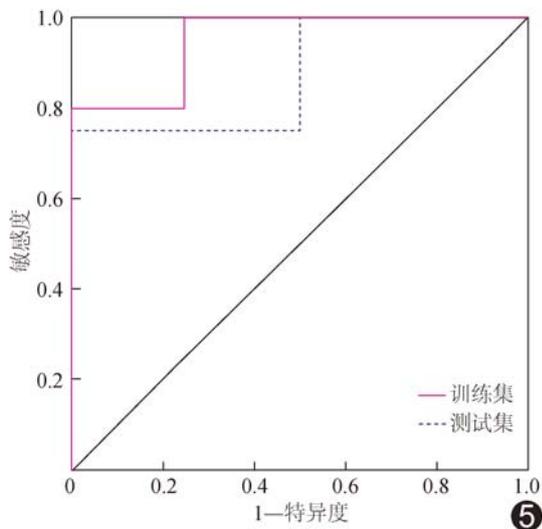


图 5 超声组学模型诊断 PSMA 阳性 PCa 的 ROC 曲线

3 讨论

超声分子成像通过将靶向配体(抗体、肽等)连接至超声造影剂表面、使之选择性地与靶位点受体结合并积累而实现靶位点特异性成像。纳米级造影剂可穿越肿瘤血管内皮间隙而进入肿瘤实质组织。本研究所制备的 PSMA-NB 可特异性识别并较长时间聚集于 PSMA 表达阳性 PCa 细胞周围,故支持 PSMA 靶点特异性成像。

分析超声分子图像时需要手动勾画 ROI,存在主观依赖性^[9]。影像组学可从医学图像中提取高通量特征并加以分析,以反映组织潜在的病理生理学特征,具有评价肿瘤基因表达潜力^[10]。本研究基于靶向 PSMA 超声分子成像提取其动态图像纹理特征,最终筛选出 3 个与 PSMA 阳性

表达相关的影像组学特征。其中的 exponential_glszm_ZoneVariance 是经图像强度指数预处理后提取的特征,可识别肿瘤内不同区域之间的信号强度差异以反映其异质性^[11],或可用于观察肿瘤内成分差异^[12],PSMA 表达水平不同使肿瘤及其微环境变得更加复杂,不断演化最终导致肿瘤呈现异质性;logarithm_gldm_DependenceVariance 是经图像强度值对数预处理后提取的特征,其值越高代表依赖性差异越大,图像纹理越不均匀^[13];wavelet_HHH_gldm_SmallDependenceLowGrayLevelEmphasis 则反映图像的灰度分布特征,参数值越高代表灰度不均匀度越高^[14]、纹理越粗糙。既往研究^[15]表明,PSMA 高表达可增强肿瘤内皮细胞血管生成活性,使肿瘤血管生成增加,导致图像纹理增粗、灰度更不均匀。基于超声分子影像提取组学特征不仅能反映肿瘤内异质性,还可显示微血管灌注特征,获得更多肿瘤信息。本研究基于以上特征构建的超声分子影像组学模型评估训练集和测试集 PCa PSMA 表达的 AUC 分别为 0.950、0.875,提示其具有较高效能。

综上所述,基于靶向 PSMA 的超声分子影像组学模型可用于评估 PCa 裸鼠 PSMA 表达。

利益冲突:全体作者声明无利益冲突。

作者贡献:李蓉研究设计和实施、撰写和修改文章;黄钊希图像分析、图像处理;黄方易数据分析、统计分析;袁晗查阅文献;高泳指导、审阅文章、经费支持。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1):17-48.
- [2] HUPE M C, PHILIPPI C, ROTH D, et al. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA) on biopsies is an independent risk stratifier of prostate cancer patients at time of initial diagnosis[J]. *Front Oncol*, 2018, 8:623.
- [3] 付书凡, 杜新雨, 廖翔鹤, 等. 前列腺特异性膜抗原原像用于前列腺癌研究进展[J]. *中国医学影像技术*, 2023, 39(3):453-457.
- [4] 罗田伟, 孙明月, 张文辉, 等. 与白蛋白结合的 PSMA 靶向分子 [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-CPN-PSMA 的制备及初步显像[J]. *核化学与放射化学*, 2023, 45(6):573-582.
- [5] DENG S, DING J, WANG H, et al. Deep learning-based radiomic nomograms for predicting Ki67 expression in prostate cancer[J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1):638.
- [6] 樊芮娜, 李杭, 林礼波, 等. MRI 影像组学预测结直肠癌患者 KRAS 基因突变[J]. *中国医学影像技术*, 2022, 38(3):392-397.
- [7] BATES A, MILES K. Prostate-specific membrane antigen PET/MRI validation of MR textural analysis for detection of transition zone prostate cancer[J]. *Eur Radiol*, 2017, 27(12):5290-5298.
- [8] HOLMBERG A R, MARQUEZ M, LENNARTSSON L, et al. Synthesis and binding of a novel PSMA-specific conjugate[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(3):1531-1537.
- [9] ZHU J Y, HE H L, LIN Z M, et al. Ultrasound-based radiomics analysis for differentiating benign and malignant breast lesions: From static images to CEUS video analysis[J]. *Front Oncol*, 2022, 12:951973.
- [10] CHETAN M R, GLEESON F V. Radiomics in predicting treatment response in non-small-cell lung cancer: Current status, challenges and future perspectives[J]. *Eur Radiol*, 2021, 31(2):1049-1058.
- [11] PARK C, JEONG D Y, CHOI Y, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte enrichment predicted by CT radiomics analysis is associated with clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors[J]. *Front Immunol*, 2023, 13:1038089.
- [12] 林礼波, 陈晓丽, 胥豪, 等. 基于 CT 影像组学预测结直肠癌 KRAS 基因突变[J]. *中国医学影像学杂志*, 2023, 31(6):617-621, 629.
- [13] WANG X, SONG G, JIANG H, et al. Can texture analysis based on single unenhanced CT accurately predict the WHO/ISUP grading of localized clear cell renal cell carcinoma?[J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2021, 46(9):4289-4300.
- [14] 周露, 王琳婧, 张国前, 等. 基于影像组学和剂量组学的放射性肺炎预测研究[J]. *中国医学物理学杂志*, 2023, 40(7):808-813.
- [15] WATANABE R, MAEKAWA M, KIYOI T, et al. PSMA-positive membranes secreted from prostate cancer cells have potency to transform vascular endothelial cells into an angiogenic state[J]. *Prostate*, 2021, 81(16):1390-1401.