

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.008.html

¹⁸F-氟赤硝基咪唑 micro PET/CT 评价裸鼠乳腺癌 早期放疗疗效实验研究

苏晓雨, 徐慧琴, 汪会, 余文静, 张丹, 谯凤

摘要 目的 探讨¹⁸F-氟赤硝基咪唑 micro PET/CT 评价裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌早期放疗疗效的价值。方法 建立 16 只裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌模型, 将其按照随机对照原则分为两组: 对照组(A组)、放疗组(B组), 每组 8 只。每组裸鼠行 micro PET/CT 显像, 测定每只裸鼠肿瘤 SUV_{max} 值。完成显像后, 常规 HE 染色观察每组肿瘤组织形态学特征, 免疫组化方法测定每组肿瘤细胞乏氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达情况。结果 放疗前, 对照组与放疗组 SUV_{max} 值差异无统计学意义 ($t = 0.375, P > 0.05$)。放疗组放疗后 48 h 裸鼠肿瘤组织 SUV_{max} 值较放疗前 ($t = 9.958, P < 0.05$)、放疗后 24 h ($t = 16.506, P < 0.05$) 明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 58.860, P < 0.05$)。放疗后 24 h SUV_{max} 值也低于放疗前 24 h ($t = 5.405, P < 0.05$), 差异有统计学意义。HE 染色结果显示放疗组肿瘤细胞坏死较对照组更加明显。免疫组化结果显示放疗组放疗后 HIF-1 α 表达阳性率明显低于放疗前 ($t = 14.802, P < 0.05$), 差异具有统计学意义。相关性分析结果显示肿瘤 SUV_{max} 与 HIF-1 α 的表达呈明显正相关性 ($r = 0.865, P < 0.05$)。结论 ¹⁸F-氟赤硝基咪唑 micro PET/CT 可以监测肿瘤内部的乏氧状态, 并且可以评价裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌的早期放疗疗效。

关键词 ¹⁸F-氟赤硝基咪唑; micro PET/CT; 放疗疗效; 乏氧诱导因子-1 α

中图分类号 R 730.55

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0203-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.008

目前, 放射治疗已经成为治疗中晚恶性肿瘤的主要有效手段之一, 但是仍有部分恶性肿瘤对放射治疗的效果不佳, 这与恶性肿瘤组织内大量乏氧细胞的存在密切相关。肿瘤组织乏氧现象在实体恶性肿瘤中是普遍存在的^[1]。有研究^[2-3]表明在恶性肿瘤组织坏死区域和其周边间存在大量的乏氧细胞, 乏氧细胞的存在能明显影响恶性肿瘤细胞的放射治

疗效果, 而利用放射性核素标记的乏氧显像剂进行乏氧组织的小动物正电子发射型计算机断层显像 (micro position emission tomography, micro PET/CT) 能无创、较为真实地反映肿瘤组织内部的乏氧情况。¹⁸F-氟赤硝基咪唑 (¹⁸F-FETNIM) 在外周组织代谢水平相对较低, 脱氟率也较其他乏氧显像剂低, 且容易被肿瘤内部的乏氧组织摄取, 能够真实反映肿瘤内部的乏氧状态, 可以作为恶性肿瘤的乏氧显像剂^[4]。该研究拟通过¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像联合免疫组化乏氧指标乏氧诱导因子 (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 探讨¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 评估裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌早期放疗疗效的价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 人乳腺癌 MDA-MB231 细胞株购自中科院上海细胞库; DMEM 高糖培养基、FBS (胎牛血清)、0.25% 胰酶、PBS (磷酸盐缓冲液) 均购自美国 Gibco 公司; HIF-1 α 免疫组化试剂购自武汉三鹰生物科技有限公司; BALB/C 裸鼠, 雌性, 6~8 周龄, 20~22 g, 16 只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司; VARIAN 23EX 型直线加速器购自美国瓦里安公司; Inveon micro PET/CT 购自德国 Siemens 公司; FETNIM 前体购自常熟华益有限公司; ¹⁸F-FETNIM 由上海交通大学医学院附属新华医院 PET 中心合成, 放化纯度 > 95%。

1.2 细胞培养及乳腺癌模型的建立 人乳腺癌 MDA-MB231 细胞培养采用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液, 在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱 (MCO-15AC 型, 日本 SANYO 公司) 中培养, 待细胞贴满培养皿底约 80% 时用含 EDTA 的胰酶消化制成单细胞悬液 (2×10^7 个/ml), 取 0.2 ml 皮下接种于裸鼠右上肢腋下。接种 1 周后即开始试验, 瘤体直径 ≥ 1 cm。

1.3 实验分组 采用随机对照原则将 16 只荷瘤裸鼠分为 A、B 两组, 每组 8 只; A 组为对照组, 未进行任何处理; B 组为放疗组, 将裸鼠麻醉固定, 用美国

2018-08-31 接收

基金项目: 安徽省科技厅科技攻关项目 (编号: 1704a0802164)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院核医学科, 合肥 230022

作者简介: 苏晓雨, 男, 硕士研究生;

徐慧琴, 女, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hfxuhuiqin@163.com

VARIAN 23EX 医用直线加速器对裸鼠肿瘤进行照射,使用 6 MeV 电子线,照射野 10 cm × 10 cm,行单次照射,剂量为 10 Gy,然后分别于放疗后 24 h 及 48 h 行 micro PET/CT 显像。

1.4 ¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像 裸鼠于显像前禁食 8 h,不禁水。显像前将裸鼠麻醉固定,于尾静脉注射约 150 μCi 剂量的¹⁸F-FETNIM,1 h 后用异氟烷麻醉并俯卧位固定于扫描床上,行 micro PET/CT 显像,CT 扫描参数 10 min,PET 扫描 5 min。然后由 2 位高年资的核医学科医师采用视觉和半定量结合的方法对 micro PET/CT 图像进行分析。目测图像中肿瘤病灶¹⁸F-FETNIM 的摄取程度,并于放射性浓聚最高的层面,测量最大标准化摄取值(SUV_{max})。

1.5 组织病理学检查 显像完成后,采取颈椎脱臼法处死裸鼠。尽快取出肿瘤组织,用体积分数 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μm 切片并行 HE 染色以及 HIF-1α 免疫组化检查。HIF-1α 阳性表达于细胞核及胞质中。每张切片随机观察 5 个高倍视野(10 × 40)拍照分析,计数每个视野 100 个细胞中阳性细胞百分率。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。同组内放疗前后数据之间比较采用配对 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析,两组数据之间比较采用两样本 *t* 检验,SUV_{max} 与的 HIF-1α 表达相关性采用 Pearson 相关性分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像情况

micro PET/CT 显像图像后,在 16 只裸鼠右上肢腋下均可见放射性摄取浓聚病灶,少数肿瘤内可见放射性摄取分布稀疏或缺损区,肿瘤周边与周围正常组织分界清晰,部分裸鼠肌肉及肠道可见生理性放射性摄取,余全身未见明显肿瘤转移病灶,具体见图 1。放疗前,对照组与放疗组 SUV_{max} 值差异无统计学意义(*t* = 0.375, *P* > 0.05)。放疗组放疗后 48 h 裸鼠肿瘤组织 SUV_{max} 值较放疗前(*t* = 9.958, *P* < 0.05)、放疗后 24 h(*t* = 16.506, *P* < 0.05)明显降低(*F* = 58.860, *P* < 0.05),差异有统计学意义。放疗后 24 h SUV_{max} 值也低于放疗前(*t* = 5.405, *P* < 0.05),差异有统计学意义,见表 1。

2.2 组织病理学结果

2.2.1 HE 染色结果

显像完成后,颈椎脱臼法处

死所有裸鼠后取出完整的肿瘤组织,肉眼观察见肿瘤与周围正常组织分界清晰,有明显包膜。选择肿瘤最大截面切开,部分肿瘤中心见灰白色坏死组织。HE 染色镜下观察对照组 MDA-MB231 细胞排列密集紊乱,细胞核呈明显异型,细胞核大、深染,核质比例增大,坏死较少;放疗组 MDA-MB231 细胞仍可见明显异型,分裂象比例明显减少,周边可见大片状肿瘤坏死区,见图 2。

表 1 放疗组裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌肿瘤 SUV_{max}(*n* = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	SUV _{max}		
	放疗前	放疗后 24 h	放疗后 48 h
对照	1.544 ± 0.113	1.676 ± 0.103	1.768 ± 0.083
放疗	1.567 ± 0.127	1.245 ± 0.106*	0.974 ± 0.092*#

与放疗前比较:* *P* < 0.05;与放疗后 24 h 比较:# *P* < 0.05

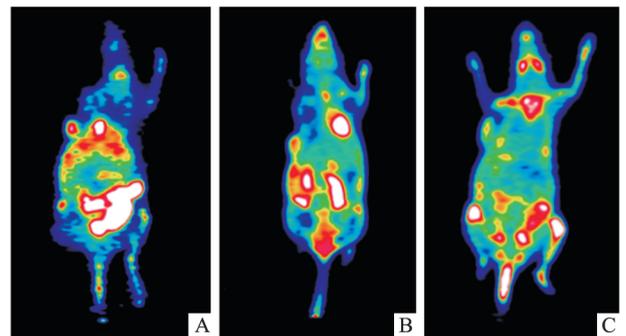


图 1 放疗组裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像结果
A:放疗前;B:放疗后 24 h;C:放疗后 48 h

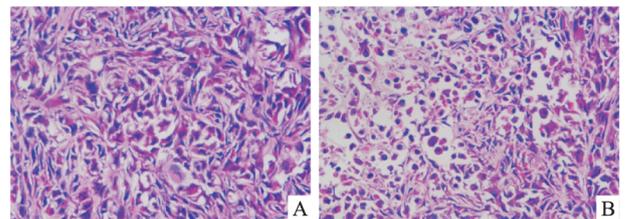


图 2 对照组及放疗组裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌 HE 染色 ×400
A:对照组;B:放疗组

2.2.2 HIF-1α 免疫组化检查结果

镜下观察,HIF-1α 阳性表达于细胞核及胞质中,阳性结果为点状或簇状分布,阳性细胞率为 26% ~ 89%。放疗组在放疗前、放疗后 HIF-1α 表达阳性率分别为(76.198 ± 9.046)%、(41.905 ± 10.262)%。放疗组放疗后 HIF-1α 表达阳性率明显低于放疗前(*t* = 14.802, *P* < 0.05),差异具有统计学意义。见图 3。

2.3 SUV_{max} 与 HIF-1α 表达相关性分析

Pearson 相关分析结果显示,SUV_{max} 与 HIF-1α 表达呈明

显正相关性($r=0.865$, $P<0.05$),见图4。

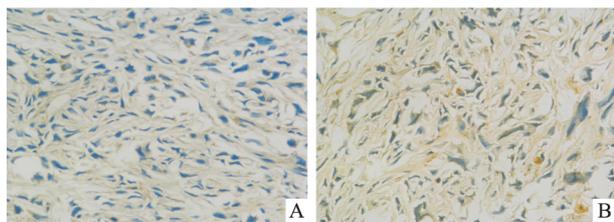


图3 放疗组裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌 HIF-1 α 免疫组化 $\times 400$
A: 放疗前; B: 放疗后

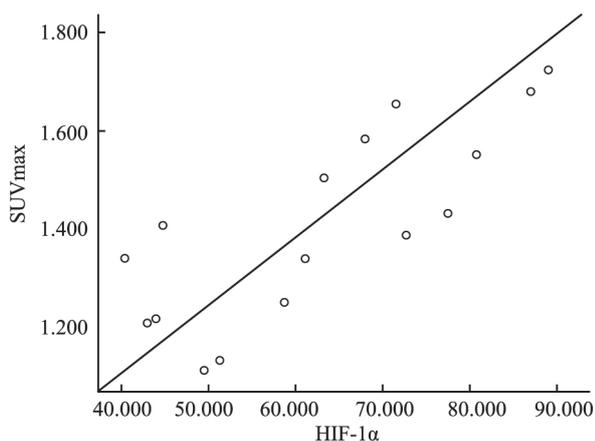


图4 肿瘤 SUVmax 值与 HIF-1 α 表达相关性分析

3 讨论

恶性肿瘤的早期放疗疗效评价与其预后密切相关,传统影像学检查方法(如 CT、MRI 及 B 超等)可以在解剖结构的变化方面对肿瘤的放射治疗效果做出判断评价,但是难以同时针对恶性肿瘤组织解剖及功能代谢改变做出具体有效的评价^[5]。PET/CT 是目前临床上应用最广泛的分子影像学检查方法,将功能成像 PET 和解剖成像 CT 同机融合,能同时拥有较高的灵敏度和分辨率,同时 PET/CT 也可应用多种显像剂,可特异性地反映肿瘤组织的代谢、增殖、乏氧及凋亡等情况,进而对恶性肿瘤的放疗效果进行有效的评价^[6]。micro PET/CT 能够无创、活体、动态、定量地从分子生物水平观察放射性药物在小动物体内的吸收、分布、代谢、排泄等过程。¹⁸F-硝基咪唑丙醇(¹⁸F-FMISO)是一种乏氧显像剂,可与肿瘤内的乏氧细胞特异性结合,选择性滞留在乏氧细胞内,但因为其具有一定的神经毒性,且水溶性较差,评价肿瘤组织乏氧状态具有一定的缺陷,所以很难广泛应用于临床^[7-8]。有研究者对其化学结构进行了稍加改进,1995 年, Yang et al^[9] 合成了¹⁸F-FETNIM,发现其比¹⁸F-FMISO 亲水性更强,并且周围

正常组织的摄取较肿瘤组织低。而 Lehtiö et al^[10] 的相关研究中,对 10 例头颈部肿瘤患者行¹⁸F-FETNIM 动态显像,同时测定肿瘤部位的血流供应,将两个结果结合后发现¹⁸F-FETNIM 可以较好地真实反映肿瘤组织内部的乏氧情况。

本研究中,裸鼠行¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像后,每只裸鼠于右侧腋下皮下均可见肿瘤病灶。放疗组放疗后 48 h 裸鼠肿瘤组织 SUVmax 值较放疗前及放疗后 24 h 均明显降低,且放疗后 24 h 也较放疗前明显降低,说明¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 可以通过肿瘤组织 SUVmax 来反映肿瘤组织内部的乏氧状态,并且可进一步反映放疗产生的疗效。

HIF-1 α 是 HIF-1 的活性亚单位,是低氧诱导产生的关键转录因子,其在低氧的恶性肿瘤组织中呈现高表达状态,可以同转录起始复合物反应参与多种基因的转录,协助肿瘤细胞适应周围环境^[11-13]。同时有研究^[14]证实 HIF-1 α 具有促进乏氧状态下恶性肿瘤细胞新生血管的生成,改变乏氧状态下的代谢方式和状态,增强肿瘤侵袭性,促进肿瘤细胞的远处转移等作用,并且参与乏氧状态下肿瘤细胞增殖和凋亡的调控。徐慧琴等^[15]关于¹⁸F-FDG PET/CT 评估齐墩果酸放射增敏作用实验研究中 SUVmax 与 HIF-1 α 的相关性分析结果提示 SUVmax 大小与 HIF-1 α 表达呈明显正相关性。本研究通过肿瘤乏氧指标 HIF-1 α 来反映裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌肿瘤组织的乏氧状态,并从病理学上验证¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 的显像结果。

HE 染色结果显示放疗组出现大片状坏死,且坏死现象较对照组更明显,说明放射治疗可以促进细胞溶解、坏死,加速肿瘤细胞凋亡。免疫组化结果显示,放疗组放疗后 HIF-1 α 表达阳性率明显低于放疗前,此结果与 micro PET/CT 显像中各组肿瘤 SUVmax 值相一致。结合相关性分析结果肿瘤组织 SUVmax 与 HIF-1 α 呈明显正相关性,从病理学方面进一步验证了¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像结果。

综上所述,¹⁸F-FETNIM micro PET/CT 显像可以监测恶性肿瘤内部的乏氧状态,并且可以评价裸鼠 MDA-MB231 乳腺癌的早期放疗疗效。

参考文献

- [1] Price P, McMillan T J. The use of non-clonogenic assays in measuring the response of cells *in vitro* to ionising radiation [J]. Eur J Cancer, 1994, 30A (6): 838-41.
- [2] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome [J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(2): 225-

- 39.
- [3] Hu M ,Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development[J]. *Curr Opin Genet Dev* 2008 ,18(1) :27 -34.
- [4] 何晓坤,王荣福. ^{18}F -FETNIM 的 药代动力学: 一个适于 PET 显像的有潜力的乏氧标志物[J]. *国外医学(放射医学核医学分册)* 2002 26(3) :120 -1.
- [5] Zeng Y C ,Wu R ,Xu Z G ,et al. Safety and radiation-enhancing effect of sodium glycididazole in locoregionally advanced laryngeal cancers previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens: a preliminary report [J]. *Cancer Radiother* ,2010 ,14(1) :59-64.
- [6] 张娜莎,朱慧,朱健等. 医学影像学对肿瘤放疗应答的早期评价研究[J]. *中华放射肿瘤学杂志* 2017 26(2) :243-6.
- [7] 薛杨央,徐慧琴,张雨,等. ^{18}F -硝基咪唑 PET/CT 评价大鼠 C6 胶质瘤放疗增敏研究[J]. *肿瘤影像学* 2015 24(3) :185 -9.
- [8] Rasey J S ,Casciari J J ,Hofstrand P D ,et al. Determining hypoxic fraction in a rat glioma by uptake of radiolabeled fluoromisonidazole [J]. *Radiat Res* 2000 ,153:84 -92.
- [9] Yang D J ,Wallace S ,Cherif A ,et al. Development of F-18-labeled fluoroerythro-nitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia [J]. *Radiology* ,1995 ,194(3) :795 -800.
- [10] Lehtiö K ,Oikonen V ,Grönroos T ,et al. Imaging of blood flow and hypoxia in head and neck cancer: initial evaluation with $[(15)\text{O}]\text{H}(2)\text{O}$ and ^{18}F fluoroerythro-nitroimidazole PET [J]. *J Nucl Med* 2001 42(11) :1643 -52.
- [11] Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. *Cell* 2012 ,148(3) :399 -408.
- [12] Iriando O ,Rábano M ,Domenici G ,et al. Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 α or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions [J]. *Oncotarget* 2015 ,6:31721 -39.
- [13] Ioannou M ,Paraskeva E ,Baxeivanidou K ,et al. HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature [J]. *J BUON* 2015 20(3) :680 -9.
- [14] Greijer A E ,van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis [J]. *J Clin Pathol* 2004 ,57(10) :1009 -14.
- [15] 徐慧琴,张雨,汪会,等. ^{18}F -FDG PET/CT 评估齐墩果酸放射增敏作用的实验研究[J]. *中华核医学与分子影像杂志* ,2015 35(3) :217 -21.

Experimental study on the efficacy of early radiotherapy for breast cancer in nude mice by ^{18}F -FETNIM micro PET/CT

Su Xiaoyu ,Xu Huiqin ,Wang Hui ,et al

(Dept of Nuclear Medicine ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the value of ^{18}F -FETNIM micro PET/CT in assessing the radiotherapeutic efficacy in MDA-MB231 breast cancer model. **Methods** Sixteen MDA-MB231 breast cancer models were randomly divided into two groups (8 rats in each group) : control group (group A) and radiotherapy group (group B). ^{18}F -FETNIM micro PET/CT imaging was performed in two groups to measure the SUVmax of tumor in all nude mice. The morphological features of tumor tissue in each group were observed by HE staining. The expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) in two groups were determined by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference in the SUVmax value between control group and radiotherapy group before radiotherapy ($t = 0.375$, $P > 0.05$). The SUVmax value of tumor tissue when 48 h after radiotherapy was significantly lower than that before radiotherapy ($t = 9.958$, $P < 0.05$) and 24 h after radiotherapy ($t = 16.506$, $P < 0.05$) , the difference was statistically significant ($F = 58.860$, $P < 0.05$). The SUVmax value of tumor tissue when 48 h after radiotherapy was also lower than before radiotherapy ($t = 5.405$, $P < 0.05$). More obvious necrosis was observed in the radiotherapy group than the control group by HE staining. The expressions of HIF-1 α in the radiotherapy group were significantly decreased compared with the control group ($t = 14.802$, $P < 0.05$). The tumor SUVmax value was positively correlated with HIF-1 α expression ($r = 0.865$, $P < 0.05$). **Conclusion** ^{18}F -FETNIM micro PET/CT not only can be used to detect the hypoxic state within the tumor , but also can evaluate the early radiotherapeutic efficacy in MDA-MB231 breast cancer in nude mice.

Key words ^{18}F -FETNIM; micro PET/CT; radiotherapeutic efficacy; HIF-1 α