

18^F-FDG PET-CT 显像评估大鼠 C6 胶质瘤放疗 早期疗效实验研究

张雨,徐慧琴,汪会,余文静,薛杨央,岳峤

摘要 目的 了解大鼠 C6 胶质瘤放疗前后¹⁸F-脱氧葡萄糖正电子发射体层显像-X 线计算机断层成像(¹⁸F-FDG PET-CT)显像特点,探讨¹⁸F-FDG PET-CT 评估大鼠 C6 胶质瘤早期放疗疗效价值。方法 建立荷 C6 胶质瘤 SD 大鼠模型,按随机数字表法分成对照组及放疗组,两组分别于放疗前及放疗后 24 h、7 d 行¹⁸F-FDG PET-CT 显像,采集不同时期大鼠肿瘤最大标准摄取值(SUV_{max}-T)、对侧脊柱旁肌肉最大标准摄取值(SUV_{max}-M),计算两者比值(T/M)并观察肿瘤体积变化。放疗结束,取两组肿瘤,常规 HE 染色,免疫组织化学法测定肿瘤细胞增殖指数 Ki-67 及微血管密度(MVD)表达情况。结果 ① 放疗 24 h T/M 值较放疗前降低($t = 5.991, P < 0.01$)。对照组 24 h T/M 值较首次显像增高($t = 5.196, P < 0.01$)。② 放疗 7 d T/M 值较放疗后 24 h ($t = 3.082, P < 0.05$)

$P < 0.05$)、放疗前($t = 4.822, P < 0.01$)显著降低($F = 5.902, P < 0.01$)。对照组 7 d T/M 值较 24 h 明显增高($t = 3.621, P < 0.05$)。③ HE 染色示放疗组较对照组坏死明显,放疗组 Ki-67 与 MVD 表达水平较对照组明显减低($t = 7.201, 2.986, P < 0.01$)。④ T/M 值与 Ki-67 表达呈明显正相关($r = 0.824, r^2 = 0.679, P < 0.05$)；T/M 值与 MVD 表达呈正相关($r = 0.779, r^2 = 0.606, P < 0.05$)。结论 ¹⁸F-FDG PET-CT 可评估大鼠 C6 胶质瘤放疗早期疗效,并可反映胶质瘤的增殖活性和血管生成情况。

关键词 脱氧葡萄糖;发射型计算机体层显像;Ki-67;微血管密度;C6 胶质瘤;放射线疗法

中图分类号 R 445.6;R 825.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1586-06

2014-06-30 接收

基金项目:2013 年卫生部核医学重点实验室江苏省分子核医学重点实验室开放课题(编号:KF201301)

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:张雨,男,硕士研究生;

徐慧琴,女,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:hfx-huqin@163.com

放射治疗是脑胶质瘤主要治疗方法之一^[1],早期有效的疗效评估与胶质瘤预后密切相关。近年来新型分子影像学显像方法正电子发射计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET-CT)已广泛应用于肿瘤的早期诊断、分期、疗效评估及监测复发等^[2]。¹⁸F-脱氧葡萄糖(¹⁸fluorine-18 fluorodeox-

flagellar cap protein FliD and to investigate its role in *C. difficile* infection and its potentiality to be a candidate vaccine component. **Methods** The full-length *fliD* was amplified by PCR from *C. difficile* strain VPI 10463. The product was cloned into pET-22b, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strains, positive clones were induced by isopropyl-1-thio-β-galactopyranoside (IPTG) to express. Recombinant protein with His-tag was purified using Ni²⁺ NTA Sepharose and confirmed by N-terminal sequencing. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect specific IgG against FliD in serum of a rabbit which was immunized by three subcutaneous injections. Vero incubated with FliD were detected in a Flow Cytometer (FCM) after indirect immunofluorescence stain to check out adhesion of FliD. **Results** The complete *fliD* gene was amplified from strain VPI10463 with sequence of 89% ~ 100% identity between nine other *C. difficile* strains published in GenBank. The pET-22b-*fliD* recombinant plasmid expressed successfully a protein of 56 ku with the N-terminal sequence MSSIS which exhibited up to 100% identity as predicted. FliD with purity of 99% was obtained by one-step expression. The rabbit developed a titer of 10⁵ prominent anti-FliD immunoglobulin G in serum after three immunization. FCM provided the proof for FliD's function as a cell surface-adherence factor. **Conclusion** The recombinant protein FliD of VPI10463 has been expressed by pET-22b-*fliD* plasmid in *E. coli*. The phenomenon that FliD can adhere to Vero *in vitro* confirms its role as an adherence factor in *C. difficile* infection. FliD is high antigenic, in addition, which makes it one of the possible candidate antigen in preventing *C. difficile* infection.

Key words *Clostridium difficile*; flagellar cap protein FliD; recombinant expression; flow cytometry; adherence factor

glucose, ^{18}F -FDG) 为葡萄糖的拟合物, 相关研究^[3]表明肿瘤组织对其摄取程度与肿瘤细胞增殖、新生血管能力密切相关。该研究拟通过 ^{18}F -FDG PET-CT 显像观察大鼠 C6 胶质瘤模型放射治疗前后变化, 及免疫组织化学增殖指数 Ki-67 及微血管密度 (microvesseldensity, MVD) 的研究, 探讨 ^{18}F -FDG PET-CT 评估肿瘤放疗早期疗效的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 16 只, SPF 级, 雄性, 180~250 g, 3~5 周龄, 购于安徽医科大学实验动物中心。

1.2 细胞株及处理 大鼠 C6 胶质瘤细胞由安徽医科大学基础医学院核医学教研室提供, 于 CO_2 恒温培养箱 (温度 37 °C, CO_2 体积分数为 5%) 中培养, 培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司)。接种前半小时, 使用 PBS 缓冲液冲洗两次后, 胰酶消化 20 s, 细胞计数, 然后离心 (1 000 r/min, 5 min) 收集细胞, 加入不含血清的培养基, 轻柔吹打均匀, 制成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 单细胞悬液。

1.3 实验器材及相关试剂 Biograph Truepoint PET-CT 仪 (52 环 64 层) 购于德国 Siemens 公司; ^{18}F -FDG 购于江苏南京江原安迪科正电子研究发展有限公司, 放射纯度 >95%; CO_2 恒温培养箱购于日本三洋公司; 低温离心机购于德国 heraeus 公司; 倒置显微镜购于日本奥林巴斯公司; 超净工作台购于苏州净化设备有限公司; 原装石蜡切片机购于德国 LEICA 公司; Nikon 80i 型免疫荧光显微镜购于日本尼康公司; 兔抗鼠 Ki-67 多克隆抗体 (sc-15402, 工作效价 1:500) 及兔抗鼠 VIII 因子多克隆抗体 (sc-376975, 工作效价 1:400) 购于美国 Santa Cruz 公司; PV 两步法染色试剂盒购于北京中杉金桥生物工程有限公司。

1.4 方法

1.4.1 大鼠 C6 胶质瘤模型制备及分组 采用细胞悬浊液接种于大鼠右侧大腿皮下构建肿瘤模型, 每只大鼠接种约 0.2 ml 细胞悬浊液^[4] (细胞浓度 $1 \times 10^7/\text{ml}$)。接种后约 2 周, 大鼠右侧大腿外侧可见直径约 1 cm 肿瘤结节, 按照随机数字表法将 16 只大鼠均分成对照组及放疗组。放疗组于 ^{18}F -FDG PET-CT 第 1 次显像后进行放射治疗, 对照组不予以任何处理。

1.4.2 放射治疗 放疗组大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后俯卧位固定于自制的大鼠固定板上。

放疗采用美国 VARIAN 23-EX 医用直线加速器, 分次照射剂量 4 Gy, 隔日 1 次, 共 3 次, 累计照射剂量 12 Gy, 照射采用 6 Mev 电子线, 照射野 25 cm × 25 cm, 缘皮距 100 cm 照射, 剂量率 2 Gy/min。

1.4.3 ^{18}F -FDG PET-CT 显像 分别于放疗前及放疗后 24 h、7 d 对大鼠进行显像。大鼠显像前禁食 6 h 以上, 每只大鼠经尾静脉注入约 37 MBq ^{18}F -FDG, 注射完毕后置于大鼠饲养笼中静候, 40~60 min 腹腔注射质量分数 10% 水合氯醛, 麻醉后俯卧位固定于自制大鼠固定板上, 先行低剂量 CT 螺旋扫描, 再行 PET 发射扫描。CT 扫描参数为: 电压 120 kV, 电流 80 mA, 层厚 1.5 mm。PET 图像采集方式为 3D 模式, 采集床位 1 个, 5 min/床位。用 CT 做衰减校正、迭代重建得到 PET 图像, 得到大鼠 C6 胶质瘤模型 CT、PET 及 PET-CT 融合图像。由两位资深核医学科医师对图像进行分析, 选取肿瘤最大切面并避开肿瘤边缘和坏死区, 采集不同时期荷瘤鼠腿部肿瘤最大标准化摄取值 (maximum standardized uptake value of tumor, SUV_{max-T})、对侧脊柱旁肌肉最大标准化摄取值 (maximum standardized uptake value of muscle, SUV_{max-M}) 及两者比值 (T/M)。大鼠肿瘤体积由 PET-CT 自带 TrueD 软件计算得出。

1.4.4 病理学检查 于显像完成后采用颈椎脱臼法处死荷瘤鼠, 取出肿瘤组织, 迅速加入 10% 中性饱和甲醛液固定 4 μm 连续切片, 常规 HE 染色, 免疫组化采用 PV 两步法。Ki-67 阳性表达定位于肿瘤细胞核, 以棕黄色及棕黑色染色者为阳性, 选取有代表性的区域 (不少于 5 个高倍镜视野), 计数 200 个细胞中的阳性细胞数, 以阳性细胞数占所计数肿瘤细胞总数的百分比进行评估, <5% 为 1 分, 5%~25% 为 2 分, 26%~50% 为 3 分, >50% 为 4 分, 其中 1 分为阴性, 2~4 分为阳性。MVD 阳性表达定位于血管内皮细胞细胞质或细胞膜, 以出现棕黄色颗粒为阳性表达, 采用 Weidner 计数法^[5] 计数血管, 凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞群, 并与周围组织有明显界限者作为一个血管计数, 先在低倍镜下 ($\times 40$) 选择 5 个 MVD 最高区, 然后在 400 倍镜下计数, 取 5 个视野的微血管数平均值作为 MVD。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组治疗前后比较采用配对 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 采用 Spearman 相关分析评价 T/M 值与 Ki-67、MVD 表达的相关性。

表1 各组肿瘤组织T/M值与组织体积变化($n=8$ $\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤组织T/M值			肿瘤组织体积(cm^3)		
	首次显像	24 h 显像	7 d 显像	首次显像	24 h 显像	7 d 显像
放疗	9.388 \pm 2.097	8.276 \pm 2.247 [*]	5.898 \pm 2.204 ^{*△}	3.481 \pm 0.878	3.495 \pm 0.874	3.156 \pm 0.881 ^{*△}
对照	10.086 \pm 1.983	10.408 \pm 1.958 [*]	11.463 \pm 2.102 ^{*△}	3.685 \pm 0.833	3.707 \pm 0.301	4.432 \pm 0.565 ^{*△}

与首次显像比较:^{*} $P < 0.05$;与24 h显像比较:^{*△} $P < 0.05$

2 结果

2.1 大鼠C6胶质瘤¹⁸F-FDG PET-CT显像 16只大鼠右侧腿部均可见结节状或灶状放射性摄取浓聚区,部分肿瘤内放射性分布欠均匀,可见放射性分布稀疏缺损坏死区,肿瘤边界与周围正常组织分界较清,部分肌肉及肠道可见生理性摄取,其他部位未见明显转移灶,见图1。放疗前,放疗组及对照组T/M值差异无统计学意义($t = 0.683$, $P > 0.05$)。放疗24 h放疗组T/M值较放疗前降低,差异有统计学意义($t = 5.991$, $P < 0.01$)。对照组24 h T/M值较首次显像增高($t = 5.196$, $P < 0.01$)。放疗7 d T/M值较放疗24 h($t = 3.082$, $P < 0.05$)、放疗前($t = 4.822$, $P < 0.01$)显著降低($F = 5.902$, $P < 0.01$)。对照组7 d T/M值较24 h明显增高($t = 3.621$, $P < 0.05$),见表1。

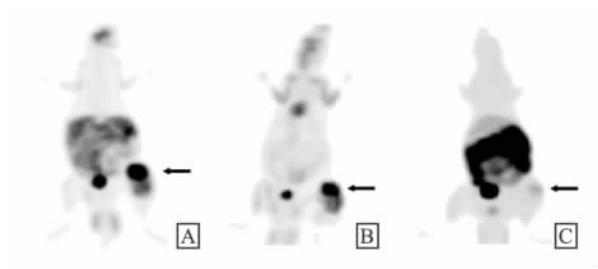


图1 放疗组荷C6胶质瘤大鼠¹⁸F-FDG PET-CT显像图
A:放疗前显像图;B:放疗24 h显像图;C:放疗7 d显像图

放疗前,放疗组及对照组肿瘤体积差异无统计学意义($t = 0.476$, $P > 0.05$)。放疗组放疗24 h肿瘤体积与放疗前比较未见明显差异($t = 2.076$, $P > 0.05$),放疗7 d与放疗24 h比较肿瘤体积明显减小,差异有统计学意义($t = 10.900$, $P < 0.01$),与放疗前比较肿瘤体积明显减小,差异有统计学意义($t = 10.920$, $P < 0.01$)。对照组24 h与首次显像肿瘤体积没有明显差异($t = 1.964$, $P > 0.05$),7 d与24 h、首次显像比较肿瘤体积明显增大,差异有统计学意义($t = 6.299$ 、 6.852 , $P < 0.01$),见表1。

2.2 组织病理学结果

2.2.1 HE染色结果 荷瘤鼠无痛处死取出肿瘤,肉眼观察瘤体与周围正常组织边界清晰,有较为明显包膜分隔,选取肿瘤最大切面切开,放疗组瘤体中心不同程度白色坏死样组织。HE染色观察对照组肿瘤细胞排列密集紊乱,细胞核呈明显异形性,细胞核大深染,核质比增大,部分可见血管形成,坏死不明显;放疗组肿瘤细胞仍可见明显异形性,核分裂象比例明显减少,周边可见大片状坏死区,坏死区细胞核呈核固缩、核碎裂改变,见图2。

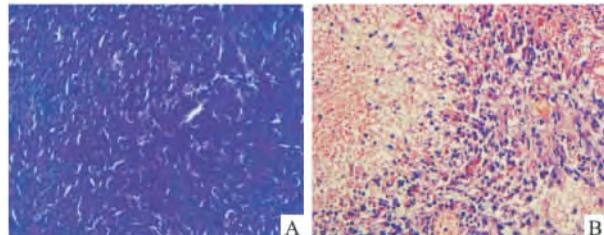


图2 两组荷C6胶质瘤大鼠病理图 HE $\times 400$
A:对照组;B:放疗组

2.2.2 Ki-67、MVD免疫组织化学检测结果 免疫组化镜下观察Ki-67广泛表达,主要存在于肿瘤细胞核,部分表达于胞质,阳性结果呈点状及长条状分布,阳性细胞率为24%~72%。计数200个细胞中阳性细胞数,结果对照、放疗组分别为(41.625 ± 4.138)、(24.125 ± 5.488),两组比较差异有统计学意义($t = 7.201$, $P < 0.01$);百分比评分结果对照组4分5例(62.5%)、3分3例(37.5%),放疗组4分1例(12.5%)、3分3例(37.5%)、2分3例(37.5%)、1分1例(12.5%)。MVD主要表达于血管内皮细胞细胞质或细胞膜,阳性表达为棕黄色颗粒,对照、放疗两组均值分别为(18.250 ± 4.026)、(13.250 ± 2.492),两组比较差异有统计学意义($t = 2.986$, $P < 0.01$)。

2.3 T/M值与Ki-67、MVD表达相关性分析

Ki-67表达与T/M值呈明显正相关($r = 0.824$, $r^2 = 0.679$, $P < 0.05$);MVD表达与T/M值呈正相关($r = 0.779$, $r^2 = 0.606$, $P < 0.05$)。见图3。

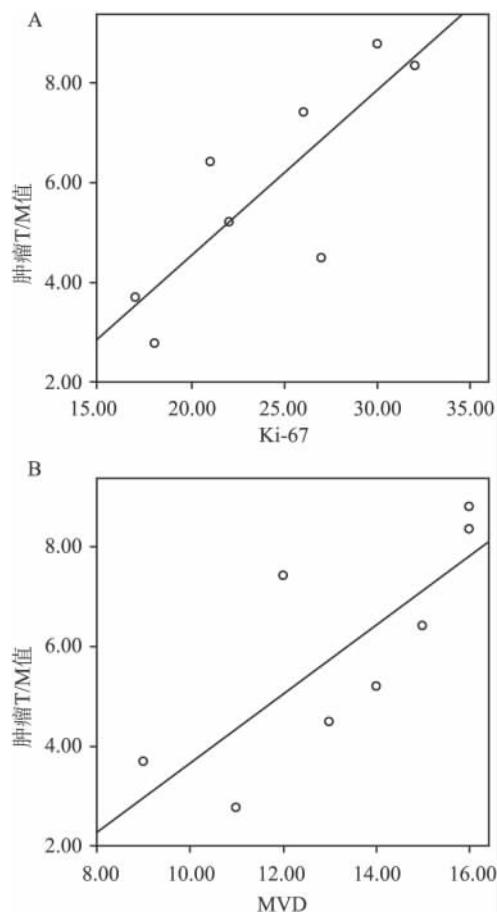


图3 T/M值与Ki-67、MVD表达相关性分析

A:肿瘤T/M值与Ki-67相关分析直线相关图;B:肿瘤T/M值与MVD相关分析直线相关图

3 讨论

PET-CT作为一种全新的影像学检查手段,能够从分子水平判断活体生理及代谢等变化,因而在肿瘤放疗疗效评估中有着不可替代的优势。¹⁸F-FDG为葡萄糖的拟合物,与体内正常葡萄糖竞争葡萄糖转运酶转运。由于肿瘤细胞需要转运大量的葡萄糖进入细胞内以满足其高代谢及快速生长的特点,因此肿瘤组织相对于正常组织会更多的摄取¹⁸F-FDG,这是¹⁸F-FDG PET-CT能够反映出肿瘤活性的原因之一。宋少莉等^[6]研究发现VX₂兔肿瘤在给予低剂量顺铂1~2 h,敏感组肿瘤FDG摄取明显减低,体积未见明显改变。本实验中放疗24 h肿瘤体积未见明显减小,而此时已出现T/M值减低,提示放疗后肿瘤形态改变之前其细胞活性已受到一定水平的抑制,这种分子水平的改变明显早于肿瘤形态学改变,表明PET-CT可早期监测肿瘤放疗疗效;放

疗7 d肿瘤T/M值较放疗24 h明显减低,肿瘤体积明显缩小,表明肿瘤放疗后,细胞出现大量坏死、崩解等改变,细胞活性受到明显抑制。

Ki-67为目前应用较为广泛的一种细胞增殖标志物,能够准确反映出细胞的增殖活性,在肿瘤分级及判断预后有十分重要的作用^[7],主要存在于细胞生长周期除了G₀期以外的G₁、S、G₂、M期。吴永廉等^[8]发现Ki-67的表达与星形细胞起源肿瘤的分级、增殖和侵袭有关,可作为判断肿瘤恶性度的重要指标。李迎辞等^[9]研究发现Ki-67可反映结直肠癌细胞的增殖状态。本实验中,相关性分析结果表明肿瘤组织对¹⁸F-FDG摄取与Ki-67表达呈明显正相关,进一步显示¹⁸F-FDG PET-CT可以准确反映肿瘤代谢及增殖活性变化,根据肿瘤组织¹⁸F-FDG摄取改变了解放疗早期肿瘤增殖活性变化。

血管生成是肿瘤组织的重要特征之一,为肿瘤生长、侵袭与转移必须条件。MVD通过血管标记因子检测肿瘤组织中新生血管数量、形态及分布,反映肿瘤组织接受氧供和营养支持程度。MVD为目前免疫组化公认比较准确测定微血管生成程度的一个量化指标。相关研究^[8]显示MVD可作为判断肿瘤恶性度分级、增殖的指标之一。蔡莉等^[10]发现脑胶质瘤¹⁸F-FDG摄取与缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)及MVD的表达之间存在良好相关性,本研究显示,MVD表达与¹⁸F-FDG摄取存在相关性,提示¹⁸F-FDG PET-CT可评估放疗后肿瘤血管生成情况。

综上所述,¹⁸F-FDG PET-CT能早期监测C6胶质瘤放疗效果改变,即在放疗早期形态学未改变时已发现肿瘤代谢活性改变,且与Ki-67及MVD的表达存在相关性,提示¹⁸F-FDG PET-CT可评估大鼠C6胶质瘤放疗早期疗效,且¹⁸F-FDG PET-CT显像在一定程度上能够反映胶质瘤增殖活性和血管生成情况。

参考文献

- [1] Omuro A, DeAngelis L M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. [J]. *JAMA*, 2013, 310(17):1842-50.
- [2] Zygogianni A, Kyrgias G, Kouvaris J, et al. A new role of PET-CT for target delineation for radiotherapy treatment planning for head and neck carcinomas. [J]. *Hell J Nucl Med*, 2012, 15(2):139-43.
- [3] 李伟龙, 邢喜玲, 蔡莉, 等. 大鼠C6胶质瘤放射治疗前后¹⁸F-FDG摄取水平变化与多种生物学指标的相关性研究[J].

- 中华核医学杂志 2011, 31(6):368-72.
- [4] Hanato T, Zhao S, Zhao Y, et al. Biological characteristics of intratumoral [^{18}F -18]-fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma [J]. *Int J Oncol* 2013, 42(3):823-30.
- [5] 张丽娜, 张淑敏. Vimentin、Ki-67 在透明细胞性肾细胞癌组织中的表达及其与 MVD 的相关性研究 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3):457-9.
- [6] 宋少莉, 刘建军, 王兆海, 等. ^{18}F -FDG PET-CT 早期检测小剂量顺铂在体化疗敏感性的实验研究 [J]. 核技术, 2009, 32(8):614-9.
- [7] 吴婧婧, 顾康生. 小肠腺癌患者 MMP-9、Ki-67、EGFR 与 VEGF 的表达与临床特征及预后的相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报 2013, 48(6):647-50.
- [8] 吴永廉, 王国荣, 张声, 等. 星形细胞起源肿瘤 Claudin-1、Ki-67、CD34 表达水平与细胞增殖和侵袭的关系 [J]. 中华神经医学杂志 2008, 7(10):1023-6.
- [9] 李迎辞, 于丽娟, 田墨涵, 等. Glut1 与 Ki-67 在结直肠癌中的表达及其与 ^{18}F -FDG PET-CT SUV_{max} 的相关性 [J]. 中国医学影像技术 2011, 27(9):1855-8.
- [10] 蔡莉, 张川, 李彦生, 等. 人脑胶质瘤 ^{18}F -FDG 摄取与乏氧诱导因子-1 α 表达及微血管密度的相关性 [J]. 中华核医学杂志 2010, 30(1):10-4.

The role of ^{18}F -FDG PET-CT in evaluation of early radiotherapeutic efficacy in C6 rat glioma

Zhang Yu, Xu Huiqin, Wang Hui, et al

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

Abstract **Objective** To study the characteristics of ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography with computed tomography (^{18}F -FDG PET-CT) imaging in C6 rat glioma models before and after radiotherapy, and to investigate the therapeutic effect of radiotherapy in C6 rat glioma model using ^{18}F -FDG PET-CT. **Methods** Sixteen C6 rat glioma models were randomly divided into two groups (8 rats in each group), one radiotherapy group, and the other control group. ^{18}F -FDG PET-CT imaging was performed before radiotherapy and 24 h, one week after radiotherapy. Tumor's SUV_{max}, the lateral spinal muscles' SUV_{max}, the ratio of SUV_{max} of tumor to muscles and the volume of the tumor were calculated. All of the rats were sacrificed after radiotherapy, pathological changes were observed by HE staining, and the expression of proliferation index Ki-67 and microvessel density MVD were measured by immunohistochemical staining. **Results** ① At 24 h post-radiotherapy, the ratio of tumor to muscles (T/M) value of radiotherapy group was significantly lower than that before radiotherapy ($t = 5.991, P < 0.01$). While the T/M value of the control group of first and 24 h imaging were $10.408 \pm 1.958, 10.086 \pm 1.983$, respectively ($t = 5.196, P < 0.01$). ② One week after radiotherapy, the T/M value of radiotherapy group was significantly lower than that of 24 h imaging ($t = 3.082, P < 0.05$) and before radiotherapy ($t = 4.822, P < 0.01$) ($F = 5.902, P < 0.01$). While the T/M value of the control group was higher than that of 24 h imaging ($t = 3.621, P < 0.05$). ③ More obvious necrosis was observed in the radiotherapy group than the control group by HE staining. The expressions of Ki-67 and MVD staining in the radiotherapy group were significantly decreased compared with the control group. All of the results above were statistically significant ($t = 7.201, 2.986, P < 0.01$). ④ T/M value was positively correlated with Ki-67 expression ($r = 0.824, r^2 = 0.679, P < 0.05$), and had positive correlation with MVD expression ($r = 0.779, r^2 = 0.606, P < 0.05$). **Conclusion** ^{18}F -FDG PET-CT not only can be used to assess the early radiotherapeutic effect of C6 rat glioma, but also can measure the proliferation activity and angiogenesis of gliomas.

Key words deoxyglucose; emission computed tomography; Ki-67; MVD; C6 glioma; radiotherapy