

¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像评价熊果酸对 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型放疗增敏的早期疗效

陈梅诺 陶伟涛 许阿磊 王思淇 徐慧琴

安徽医科大学第一附属医院核医学科, 合肥 230022

通信作者: 徐慧琴, Email: hfxuhuiqin@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (81971643)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20220811-00258

Early efficacy of ursolic acid on radiotherapy sensitization in MCF-7 breast cancer bearing nude mice evaluated by ¹⁸F-FDG total-body PET/CT dynamic imaging

Chen Meينو, Tao Weitao, Xu Alei, Wang Siqi, Xu Huiqin

Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Xu Huiqin, Email: hfxuhuiqin@163.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971643)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20220811-00258

近半数的 IV 期乳腺癌患者在治疗上涉及放化疗^[1], 然而放疗抵抗性的存在, 导致该部分患者预后不良, 生存率低。研究表明, 五环三萜类化合物熊果酸 (ursolic acid, UA) 可以通过阻滞 G2/M 细胞周期, 增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 从而提高人结直肠癌 HCT 116、人前列腺癌 DU145 等细胞的放射敏感性^[2-3], 而其对乳腺癌 MCF-7 细胞的放疗增敏价值鲜有报道。

准确的早期疗效评价方法至关重要, 目前临床上广泛应用的常规 PET/CT 为静态扫描^[4], 其常用指标 SUV 受到患者体质量、血糖水平等多种因素的影响, 被认为可能并不是早期治疗反应监测的最理想选择^[5-6]。¹⁸F-FDG PET/CT 动态显像可以通过动力学建模获得常规静态显像无法获得的示踪剂动力学参数, 如最大示踪剂净流入速率常数 (maximum tracer uptake net inflow constants, Ki_{max}), 以实现¹⁸F-FDG 摄取的绝对定量分析^[7]。本研究拟通过建立 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型, 采用 UA 对其进行放射增敏治疗, 探讨¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像评价 UA 对裸鼠乳腺癌放疗增敏早期疗效的价值。

一、材料与方法

1. 实验材料与仪器。DMEM 高糖培养基及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; UA 购自合肥博美生物科技有限责任公司; 葡萄糖转运蛋白 (glucose transport protein, Glut)-1、细胞增殖核抗原 Ki-67 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司。4~5 周龄 BALB/c 雌性裸鼠 24 只 (体质量 20~25g) 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: [SCXK(浙)2019-0001], 于无特定病原体级动物房中饲养。¹⁸F-FDG 由南京江原安迪科正电子研究发展有限公司提供, 放化纯大于 95%。显像采用德国 Siemens Biograph Vision 450 PET/CT 仪; 放疗采用美国 Varian 公司 Vital Beam 直线加速器。本实验经安徽医科大学动物实验伦理审查委员会批准 (批号: LLSC20211059)。

2. 移植瘤模型的制备与分组。将对数生长期的 MCF-7 细胞 (2×10^7 个/ml; 0.2 ml) 采用皮下注射法接种于裸鼠右上肢腋下, 每天用游标卡尺测量肿瘤长短径, 计算肿瘤体积 (长径 \times 短径² \times 0.5), 待肿瘤长径达到 1 cm 时开始治疗。将造模成功的 24 只裸鼠按随机数字表法分为对照组、UA 组、放疗组、UA+放疗组, 每组 6 只。UA 组每日给予 UA 蒸馏水悬液灌服, 持续 7 d, 剂量为每只每天 40 mg; 对照组给予蒸馏水灌服; 放疗组分次照射剂量 2 Gy, 隔天 1 次, 共 3 次, 累计照射剂量 6 Gy (照射采用 6 Mev 电子线, 剂量率 2 Gy/min, 照射野 10 cm \times 10 cm, 限光桶固定缘皮距照射); UA+放疗组参照 UA 组方法进行给药, 同时参照放疗组进行放疗。

3. ¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像。放疗前和放疗后 24 h, 分别对 4 组的所有荷瘤裸鼠进行显像。首先进行低剂量全身 CT 采集, 用于衰减校正; 然后通过尾静脉注射 5.55 MBq ¹⁸F-FDG, 同时开始以心脏为中心的 6 min 动态单床 PET 扫描, 以获得 PET 图像输入函数。随后在 58 min 中内进行 18 次连续进床全身 PET 扫描 (速度 0.8 mm/s)。图像重建采用有序子集最大期望值迭代法, 4 次迭代, 5 个子集, 矩阵为 220 \times 220。图像由 2 位核医学医师进行分析, 在每只小鼠的左心室区域绘制感兴趣体积 (volume of interest, VOI), 并投射到每张 PET 图像上以获得图像输入函数。在轴向 PET 图像中手动划定肿瘤组织, 得到单个肿瘤的时间-活度曲线。然后利用 Patlak 图形分析方法获得示踪剂净流入常数 Ki , 从而生成 Ki 参数图像。动态 PET 图像最后一帧的扫描时间对应常规静态扫描的标准时间, 以此帧所得图像为 SUV 图像用于静态测量, 计算肿瘤/肌肉 (tumor/muscle, T/M) 值, 其中 T 为肿瘤 SUV_{max} , M 为同一断层对侧脊柱旁肌肉 SUV_{max} 。

4. 免疫组织化学分析。取肿瘤组织, 经体积分数 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4 μ m 连续切片, 行 Glut-1, Ki-67 及 VEGF 免疫组织化学检查。在高倍视野下每张切片随机选择 5 个视野分析 Glut-1, Ki-67 及 VEGF 的表达情况, 以积分光密度 (integrated-optical density, IOD) 值反映免疫反应物

的表达强度。

5. 统计学处理。采用 IBM SPSS 26.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组治疗前后比较采用配对样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析及最小显著差异 *t* 检验;不同指标之间的相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异或相关性有统计学意义。

二、结果

1. ¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像结果。结果显示 24 只荷瘤裸鼠右侧腋下均可见结节状摄取增高灶,肿瘤周边与周围正常组织分解清晰,全身未见明显肿瘤转移病灶(图 1)。治疗前,4 组的 T/M 值与 K_i 值差异均无统计学意义(F 值:0.11、0.90, P 值:0.955、0.459);治疗后,4 组的 T/M 值与 K_i 值差异均有统计学意义(F 值:62.34、64.68,均 $P < 0.001$),但放疗组与 UA+放疗组的 T/M 值差异无统计学意义($t = 0.31, P = 0.762$),而 UA+放疗组的 K_i 值较放疗组下降明显($t = 2.71, P = 0.013$;表 1)。与治疗前相比,对照组和 UA 组治疗后的 T/M 值、 K_i 值均升高(t 值:-11.14~-5.51,均 $P < 0.05$);放疗组与 UA+放疗组的治疗后 T/M 值、 K_i 值均较治疗前下降(t 值:5.10~9.78,均 $P < 0.05$)。治疗前,4 组肿瘤体积差异无统计学意义($F = 0.20, P = 0.894$);治疗后,4 组肿瘤体积差异有统计学意义($F = 84.63, P < 0.001$),对照组、UA 组明显大于放疗组和 UA+放疗组(t 值:10.39~12.07,均 $P < 0.001$),而放疗组和 UA+放疗组的肿瘤体积差异无统计学意义($t = 1.12, P = 0.276$;表 1)。

2. 免疫组织化学检查结果。Glut-1 在肿瘤组织中高表达(图 2),对照组、UA 组、放疗组和 UA+放疗组的 IOD 值分别为 65.79 ± 8.80 、 66.32 ± 6.53 、 49.69 ± 4.47 和 36.07 ± 6.02 ,UA+放疗组明显低于其他组($F = 28.60, t$ 值:7.75、7.89、3.55,均 $P < 0.001$);Ki-67 在肿瘤组织中高表达(图 3),4 组的 IOD 值分别为 56.44 ± 6.47 、 55.40 ± 6.13 、 40.41 ± 2.92 和 33.51 ± 2.89 ,UA+放疗组明显低于其他组($F = 31.90, t$ 值:8.10、7.73、2.44,均 $P < 0.001$);VEGF 在肿瘤组织中高表达(图 4),4 组的 IOD 值分别为 68.26 ± 5.25 、 68.62 ± 6.19 、 76.40 ± 7.08 和 36.20 ± 6.14 ,UA+放疗组明显低于其他组($F = 49.74, t$ 值:8.96、9.06、11.23,均

$P < 0.001$)。

3. T/M、 K_i 与 Glut-1、Ki-67、VEGF 表达间的关系。Glut-1、Ki-67 和 VEGF 的 IOD 值与 T/M 值呈正相关(r 值:0.81、0.70 和 0.43,均 $P < 0.05$);与 K_i 值也呈正相关(r 值:0.88、0.78 和 0.46,均 $P < 0.05$)。

三、讨论

恶性肿瘤的早期疗效评价对促进个体化治疗至关重要。目前,临床上广泛使用的常规静态 PET/CT 是在注药后的晚期时间点进行扫描,将采集的数据在采集时间范围内取平均值以生成传统的静态 PET 图像,并以 SUV 为指标进行量化。¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像通过连续、动态的扫描获取示踪剂的动力学参数。有研究表明,与传统的 SUV 相比,动态扫描得到的 K_i 值可以对肿瘤微小代谢变化做出更灵敏的早期评估,这与 K_i 值具有评价磷酸化 FDG 摄取的能力有关^[8]。但 K_i 值仅反映了组织中参与代谢的葡萄糖的水平,相比之下,SUV 还包括存在于血管和细胞间隙中游离的葡萄糖,这是与肿瘤代谢无关的部分;此外,SUV 显著依赖于显像剂注入和扫描的时间间隔,而 K_i 值是 1 种基于更宽的时间窗的动态度量,受摄取时间抖动的影响比 SUV 小得多,这也增加了 K_i 值反映示踪剂摄取的准确性^[9]。获取动态 PET/CT 定量分析输入函数的“金标准”是动脉采血,然而该方法为侵入性的,实际应用中需要克服多重问题。小鼠总血量较小,连续采血在技术上具有挑战性且可能影响小鼠生理功能。本研究采用以心脏为 VOI 的图像衍生输入方法,该方法已被证明可有效取代标准动脉采血输入函数,且在动力学建模方面,比将 VOI 放置在腔静脉/主动脉区域的方法更加准确、可靠^[10]。

目前,只有少数学者对动态¹⁸F-FDG PET/CT 的疗效评价价值进行了研究,其研究重点主要集中在参数显像预测患者生存时间等方面^[11],而¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像评估放射增敏早期疗效的研究鲜有报道。本研究通过 UA 作为增敏剂以克服肿瘤细胞放疗抵抗,从而提高治疗效果,并通过¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像评价此方法的放疗增敏效应,为临床的肿瘤早期疗效评价提供新的方法。

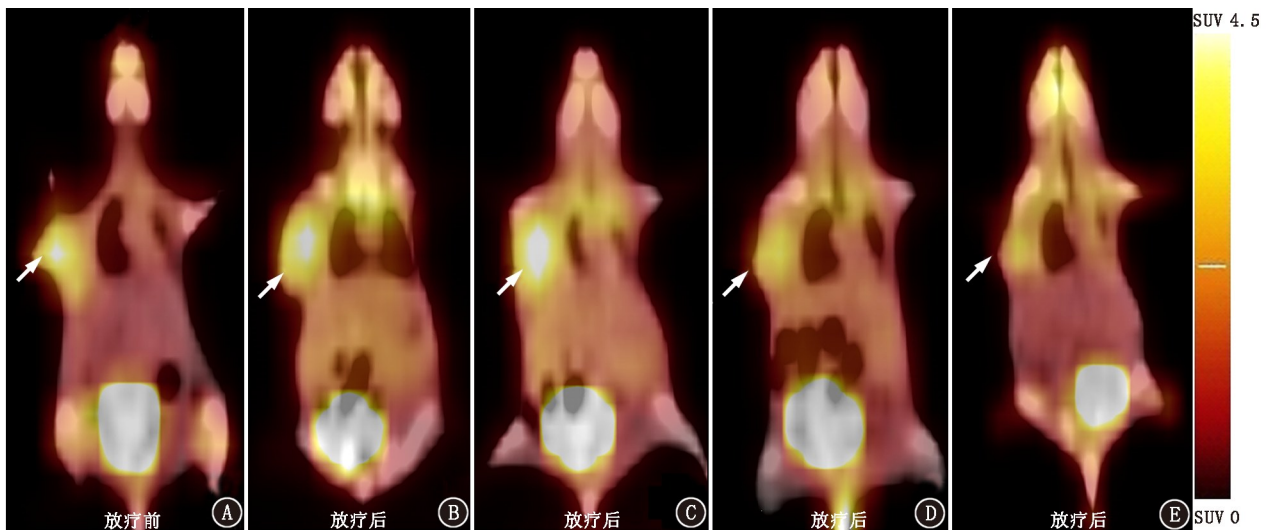


图 1 各组 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像图(箭头示肿瘤)。放疗前,对照组裸鼠右上肢腋下见结节状摄取增高的肿瘤病灶(A);放疗后,对照组(B)和熊果酸(UA)组(C)肿瘤显像剂摄取增高,放疗组(D)和 UA+放疗组(E)肿瘤显像剂摄取降低

表 1 各组 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型治疗前后肿瘤 T/M 值、 Ki_{max} 值及肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T/M 值		Ki_{max} 值		肿瘤体积 (cm ³)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	2.615±0.301	3.490±0.339	0.205±0.024	0.283±0.031	0.503±0.034	1.404±0.117
UA 组	2.665±0.352	3.525±0.433	0.198±0.034	0.295±0.026	0.503±0.043	1.376±0.073
放疗组	2.713±0.428	1.595±0.305	0.218±0.029	0.152±0.017	0.520±0.050	0.847±0.048
UA+放疗组	2.605±0.397	1.533±0.300	0.222±0.025	0.107±0.037	0.508±0.046	0.790±0.099

注:各组小鼠数为 6 只; Ki_{max} 为最大示踪剂净流入速率常数,T/M 为肿瘤/肌肉,UA 为熊果酸

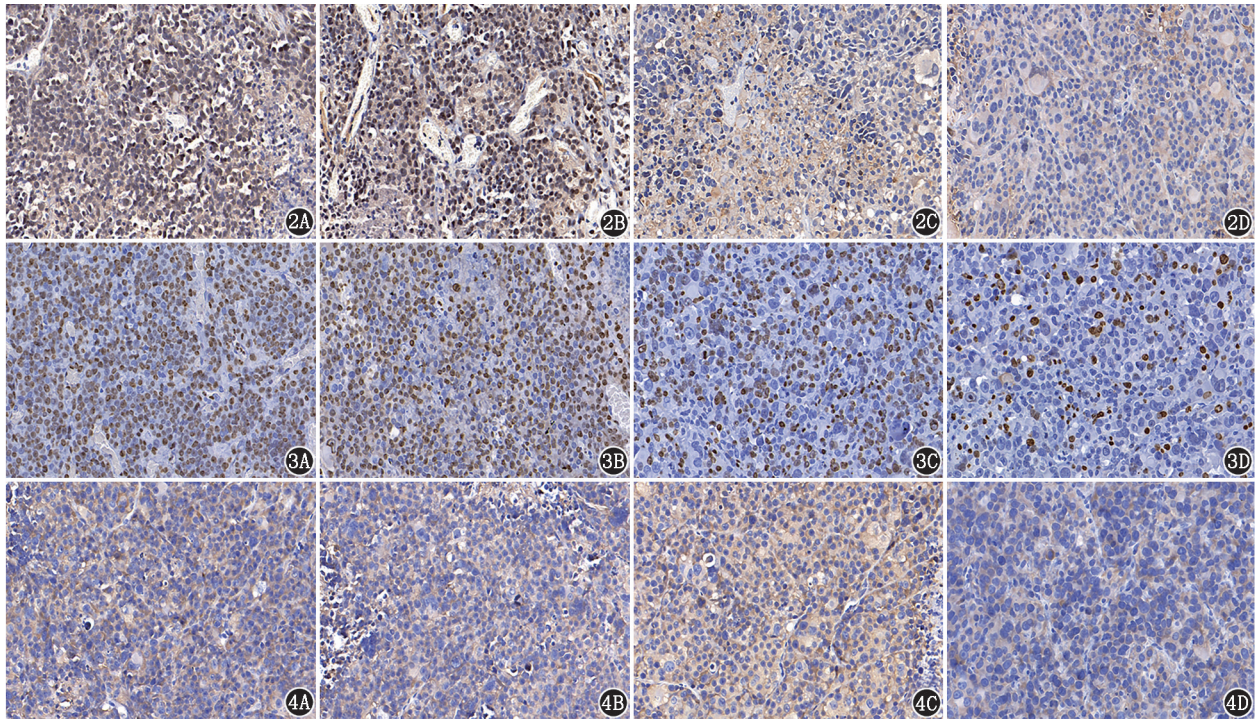


图 2 各组 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型肿瘤组织葡萄糖转运蛋白 (Glut)-1 免疫组织化学检查图 (Envision 法 ×400)。对照组 (2A) 和熊果酸 (UA) 组 (2B) Glut-1 阳性表达广泛,放疗组 (2C) 和 UA+放疗组 (2D) Glut-1 阳性表达明显减少 图 3 各组 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型肿瘤组织细胞增殖核抗原 Ki-67 免疫组织化学检查图 (Envision 法 ×400)。对照组 (3A) 和 UA 组 (3B) Ki-67 阳性表达广泛,放疗组 (3C) 和 UA+放疗组 (3D) Ki-67 阳性表达明显减少 图 4 各组 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型肿瘤组织血管内皮生长因子 (VEGF) 免疫组织化学检查图 (Envision 法 ×400)。对照组 (4A)、UA 组 (4B) 和放疗组 (4C) VEGF 阳性表达广泛,UA+放疗组 (4D) VEGF 阳性表达明显减少

本研究结果显示放疗后对照组和 UA 组的肿瘤体积明显大于放疗组和 UA+放疗组,然而 UA+放疗组的肿瘤体积与放疗组相比差异无统计学意义,这可能是受到放疗后肿瘤周围组织水肿和坏死组织的影响。本研究采用 T/M 值作为静态分析指标,放疗后,放疗组和 UA+放疗组的 T/M 值和 Ki_{max} 值均较放疗前明显下降;放疗组与 UA+放疗组的 T/M 值差异无统计学意义,而 2 组间的 Ki_{max} 值差异具有统计学意义,这表明在接受了总剂量 6 Gy 的放射治疗后, Ki_{max} 值先于肿瘤体积和静态指标反映出组间的微小代谢差异,对肿瘤活性早期变化监测更灵敏。

恶性肿瘤细胞常有 Glut-1、Ki-67 及 VEGF 异常表达,提示肿瘤更具侵袭性,预后较差,且在评价预后、指导治疗等方面具有重要意义^[12-14]。本实验中,UA+放疗组的 Glut-1、Ki-67 及 VEGF 表达均明显低于其他组,提示使用 UA 作为增敏剂的联合治疗组对放疗更敏感。同时,在 PET/CT 参数和免疫组织化学结果的相关性分析中,发现 T/M 值和 Ki_{max} 值与上述 3 种生物标志物表达均呈正相关,以 Ki_{max} 的相关性更为显著,表

明¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像对肿瘤生物学变化的无创捕获具有重要意义,进一步验证了其对于早期治疗反应的监测作用。

放疗后肿瘤微环境的改变会导致非肿瘤特异性的 FDG 摄取^[15-16]。此时 SUV 很难显示出残余活性的肿瘤细胞摄取 FDG 的真实水平,而仅反映肿瘤细胞内参与代谢的 FDG 水平的 Ki 值则更有优势。治疗后组织中的高背景摄取可能使 SUV 图像难以分辨存活肿瘤,而通过全身动态显像得到的 Ki 图像因为抑制了血池信号及背景摄取,可提供肿瘤与正常组织间更好的对比度,从而实现更准确的病灶分割^[17]。此外,对于在实际临床中进行定期疗效随访的患者,治疗过程中患者的体质量变化及治疗导致的肾脏清除率的改变都会影响 SUV^[18],而这些因素对动态指标 Ki 值不会产生影响,这也显示了 Ki 值在疗效评价上的优越性。

综上,UA 对 MCF-7 乳腺癌裸鼠模型具有放射增敏作用,¹⁸F-FDG 全身 PET/CT 动态显像可以对肿瘤微小代谢变化进行早期评估,可比传统 PET/CT 静态显像更灵敏地评价

乳腺癌放疗增敏的早期疗效。另外,本实验是在免疫缺陷的裸鼠模型上完成的,不能完全代表人类肿瘤代谢的复杂变化,未来需要在广泛的临床研究中验证本研究结果。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈梅诺、陶伟涛:研究实施、论文撰写;许阿磊、王思淇:数据整理、统计学分析;徐慧琴:研究指导,论文修改

参 考 文 献

- [1] DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(6): 438-451. DOI:10.3322/caac.21583.
- [2] Hasan Abdali M, Afshar S, Sedighi Pashaki A, et al. Investigating the effect of radiosensitizer for ursolic acid and kamololonol acetate on HCT-116 cell line[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(1): 115152. DOI:10.1016/j.bmc.2019.115152.
- [3] Koh SJ, Tak JK, Kim ST, et al. Sensitization of ionizing radiation-induced apoptosis by ursolic acid[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(3): 339-345. DOI:10.3109/10715762.2012.656101.
- [4] 顾丙新, 谢一兆, 王碧芸, 等. 治疗前¹⁸F-FDG PET/CT 摄取异质性在 HER2 阳性转移性乳腺癌疗效预测中的价值[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2021, 41(2): 76-81. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20191112-00256.
Gu BX, Xie YZ, Wang BY, et al. Value of pre-treatment ¹⁸F-FDG PET/CT uptake heterogeneity for early prediction of response to targeted therapy in patients with HER2 positive metastatic breast cancer [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 41(2): 76-81. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191112-00256.
- [5] Huang J, Chunta JL, Amin M, et al. Early treatment response monitoring using 2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucose positron emission tomography imaging during fractionated radiotherapy of head neck cancer xenografts[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 598052. DOI: 10.1155/2014/598052.
- [6] Guo J, Guo N, Lang L, et al. ¹⁸F-alfatide II and ¹⁸F-FDG dual-tracer dynamic PET for parametric, early prediction of tumor response to therapy[J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(1): 154-160. DOI: 10.2967/jnumed.113.122069.
- [7] Dimitrakopoulou-Strauss A, Pan L, Sachpekidis C. Kinetic modeling and parametric imaging with dynamic PET for oncological applications: general considerations, current clinical applications, and future perspectives[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48(1): 21-39. DOI:10.1007/s00259-020-04843-6.
- [8] Wangerin KA, Muzi M, Peterson LM, et al. A virtual clinical trial comparing static versus dynamic PET imaging in measuring response to breast cancer therapy[J]. *Phys Med Biol*, 2017, 62(9): 3639-3655. DOI:10.1088/1361-6560/aa6023.
- [9] Tong X, Srivatsan A, Jacobson O, et al. Monitoring tumor hypoxia using ¹⁸F-FMISO PET and pharmacokinetics modeling after photodynamic therapy[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31551. DOI:10.1038/srep31551.
- [10] He X, Wedekind F, Kroll T, et al. Image-derived input functions for quantification of $\alpha 1$ adenosine receptors availability in mice brains using PET and [¹⁸F]CPFPX[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1617. DOI:10.3389/fphys.2019.01617.
- [11] Chitalia R, Viswanath V, Pantel AR, et al. Functional 4-D clustering for characterizing intratumor heterogeneity in dynamic imaging: evaluation in FDG PET as a prognostic biomarker for breast cancer [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 48(12): 3990-4001. DOI:10.1007/s00259-021-05265-8.
- [12] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy [J]. *Nat Med*, 2001, 7(9): 987-989. DOI:10.1038/nm0901-987.
- [13] Deng Y, Zou J, Deng T, et al. Clinicopathological and prognostic significance of GLUT1 in breast cancer: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(48): e12961. DOI:10.1097/MD.0000000000012961.
- [14] Pezzilli R, Partelli S, Cannizzaro R, et al. Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEs): a systematic review [J]. *Adv Med Sci*, 2016, 61(1): 147-153. DOI:10.1016/j.advms.2015.10.001.
- [15] Gandhi S, Chandna S. Radiation-induced inflammatory cascade and its reverberating crosstalks as potential cause of post-radiotherapy second malignancies [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 375-393. DOI:10.1007/s10555-017-9669-x.
- [16] Guo N, Lang L, Gao H, et al. Quantitative analysis and parametric imaging of ¹⁸F-labeled monomeric and dimeric RGD peptides using compartment model [J]. *Mol Imaging Biol*, 2012, 14(6): 743-752. DOI:10.1007/s11307-012-0541-7.
- [17] Visser EP, Philippens ME, Kienhorst L, et al. Comparison of tumor volumes derived from glucose metabolic rate maps and SUV maps in dynamic ¹⁸F-FDG PET [J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(6): 892-898. DOI: 10.2967/jnumed.107.049585.
- [18] Kajáry K, Lengyel Z, Tökés AM, et al. Dynamic FDG-PET/CT in the initial staging of primary breast cancer: clinicopathological correlations [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 997-1006. DOI: 10.1007/s12253-019-00641-0.

(收稿日期:2022-08-11)