

^{18}F -氟赤式硝基咪唑 microPET/CT 显像评估 马蔺子素对乳腺癌的放疗增敏作用

谯凤 徐慧琴 张丹 苏晓雨 汪会 余文静

230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院核医学科

通信作者:徐慧琴, Email: hfxuhuiqin@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.04.008

【摘要】 目的 探讨 ^{18}F -氟赤式硝基咪唑(FETNIM) microPET/CT 显像评估马蔺子素(IR)对乳腺癌放疗的增敏作用。方法 将 32 只荷 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠按随机数字表法分为单纯放疗组、IR+放疗组、IR 组和对照组(每组 8 只),分别在放疗前和放疗后 24 h 行 ^{18}F -FETNIM microPET/CT 显像,观察 4 组荷瘤裸鼠肿瘤部位最大标准摄取值(SUV_{max})变化。观察肿瘤组织病理改变,用免疫组织化学法分析乏氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达情况。采用配对 t 检验、单因素方差分析、最小显著差异 t 检验和 Pearson 相关分析处理数据。结果 放疗前,单纯放疗组、IR+放疗组、IR 组和对照组 SUV_{max} 差异无统计学意义(1.429 ± 0.090 、 1.430 ± 0.076 、 1.445 ± 0.071 和 1.432 ± 0.074 ; $F = 0.072$, $P > 0.05$)。放疗后 24 h,单纯放疗组和 IR+放疗组的 SUV_{max} 下降(1.075 ± 0.098 和 0.890 ± 0.076 ; t 值: 12.888 和 33.217, 均 $P < 0.05$), IR+放疗组下降更明显($t = 4.197$, $P < 0.05$); IR 组及对照组的 SUV_{max} 上升(1.617 ± 0.090 和 1.644 ± 0.063 ; t 值: -11.009 和 -16.061, 均 $P < 0.05$)。病理结果示,单纯放疗组及 IR+放疗组肿瘤细胞数量减少且坏死区明显,且后者更甚。免疫组织化学结果显示, HIF-1 α 在 IR+放疗组中表达最低[(26.75 ± 7.19)%]; $F = 46.745$, t 值: 2.898~9.743, 均 $P < 0.05$]。HIF-1 α 表达与 SUV_{max} 呈正相关($r = 0.89$, $P < 0.05$)。结论 ^{18}F -FETNIM microPET/CT 可以评估 IR 对荷 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠肿瘤放疗的增敏作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; 辐射增敏药; 放射疗法; 正电子发射断层显像术; 体层摄影术, X 线计算机; 硝基咪唑类

基金项目: 国家自然科学基金(81371587)

Evaluation of radiosensitivity enhancement by irisquinone with ^{18}F -FETNIM microPET/CT imaging in breast cancer bearing nude mice Qiao Feng, Xu Huiqin, Zhang Dan, Su Xiaoyu, Wang Hui, Yu Wenjing

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

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

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of irisquinone (IR) on the radiosensitization of MDA-MB-231 breast cancer in nude mice using ^{18}F -fluoroerythroimidazole (^{18}F -FETNIM) microPET/CT. **Methods** Thirty-two nude mice bearing MDA-MB-231 breast cancer were divided into 4 groups by random number table method ($n = 8$ for each group): group A was treated with radiotherapy alone, group B was treated with radiotherapy and IR, group C was treated with IR alone, and group D was fed with distilled water. ^{18}F -FETNIM microPET/CT images were obtained to monitor the maximum standardized uptake value (SUV_{max}) of tumor before radiotherapy and 24 h after radiotherapy. The mice were sacrificed and tumor tissues were removed for HE staining. The expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) was detected by immunohistochemical (IHC) method. Data were analyzed by paired t test, one-way analysis of variance, the least significant different t test and Pearson correlation analysis. **Results** There was no significant difference in SUV_{max} among the 4 groups before radiotherapy (1.429 ± 0.090 , 1.430 ± 0.076 , 1.445 ± 0.071 , 1.432 ± 0.074 ; $F = 0.072$, $P > 0.05$). At 24 h after radiotherapy, the SUV_{max} of group A and B decreased significantly (1.075 ± 0.098 , 0.890 ± 0.076 ; t values: 12.888, 33.217, both $P < 0.05$), and there was significant difference between group B and group A ($t = 4.197$, $P < 0.05$). However, the SUV_{max} of group C and D increased significantly (1.617 ± 0.090 , 1.644 ± 0.063 ; t values: -11.009, -16.061, both $P < 0.05$). Pathological results showed that tumor cells in group A and B were reduced. IHC results showed that the expression of HIF-1 α was lower in group B than others ((26.75 ± 7.19)%); $F = 46.745$, t values: 2.898-9.743, all $P < 0.05$). The expression of HIF-1 α was positively correlated with SUV_{max} ($r = 0.89$, $P < 0.05$). **Conclusion** ^{18}F -

FETNIM microPET/CT could evaluate the radiosensitization effect of IR on MDA-MB-231 breast cancer in nude mice.

【Key words】 Breast neoplasms; Radiation-sensitizing agents; Radiotherapy; Positron-emission tomography; Tomography, X-ray computed; Nitroimidazoles

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81371587)

乏氧普遍存在于恶性实体肿瘤中,是肿瘤对放疗抗拒及患者预后不良的重要因素^[1],放射增敏剂是解决乏氧抗拒性的有效途径之一。马蔺子素(irisquinone, IR)作为有效的乏氧细胞增敏剂之一,可降低肿瘤细胞内谷胱甘肽含量,且在缺氧的条件下,可增加 DNA 单链或双链断裂的数量,抑制辐射引起的 DNA 损伤的修复^[2],对肺癌、脑胶质瘤、食管癌、鼻咽癌有明显的放疗增敏作用^[2-4]。MicroPET/CT 能从分子水平动态观察动物体内药物的吸收、分布、代谢、排泄等过程。¹⁸F-氟赤式硝基咪唑(fluoroerythronitroimidazole, FETNIM)是硝基咪唑类化合物,是常用的乏氧显像剂之一^[5],可动态观察肿瘤组织乏氧状态的变化。本研究拟通过建立裸鼠 MDA-MB-231 乳腺癌模型,并采用 IR 对其进行放疗增敏治疗,探讨¹⁸F-FETNIM microPET/CT 显像评估 IR 放射增敏疗效的价值。

材料与方法

1. 实验材料及试剂。BALB/c 裸鼠 32 只,雌性,4~6 周龄,体质量(20±2) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号:SCXK(沪)2012-0002]; IR 购自山东新华制药股份有限公司;乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司。人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自中科院上海细胞库。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、质量分数 0.25% 的胰酶购自美国 Gibco 公司。

2. 细胞培养及肿瘤接种。MDA-MB-231 乳腺癌细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液于含体积分数 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱(MCO-15AC 型,日本 SANYO 公司)中培养,待细胞贴满瓶底约 80% 时用含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化制成单细胞悬液(2×10⁷ 个/ml),取 0.2 ml 皮下接种于裸鼠右上肢腋下,待瘤体最大直径≥1 cm 时进行动物实验。

3. 实验分组及各组处理。将 32 只荷瘤裸鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 8 只。单纯放疗组:每只裸鼠用质量分数 0.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,放疗采用美国 Varian23EX 医用直线加速器,使用 6 MeV 电子线,照射野 10 cm×10 cm,单次放疗 10 Gy; IR+放疗

组:每只裸鼠自放疗前 7 d 每日给予 IR 蒸馏水悬液灌服,0.5 mg/只,放疗方法及剂量同单纯放疗组; IR 组:每日给予 IR 灌服,0.5 mg/只,连续灌服 7 d; 对照组:给予蒸馏水灌服,未经照射。

4. ¹⁸F-FETNIM microPET/CT 显像与图像分析。采用德国 Siemens 公司 Inveon microPET/CT 显像。FETNIM 前体购自常熟华益化工有限公司,¹⁸F-FETNIM 由上海交通大学医学院附属新华医院 PET 中心生产,放化纯>95%。4 组荷瘤裸鼠均于放疗前及放疗结束后 24 h 行 microPET/CT 显像。显像前夜禁食,但可自由饮水。固定后于裸鼠尾静脉注射约 5.55 MBq ¹⁸F-FETNIM,1 h 后用异氟烷麻醉并俯卧位固定于扫描床上,行 microPET/CT 显像。先行 CT 扫描 10 min,再行 PET 扫描 5 min,进行图像融合。

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 microPET/CT 图像进行分析。目测病灶¹⁸F-FETNIM 的摄取程度,并于病灶放射性浓聚最高的层面测量最大标准摄取值(maximum standardized uptake value, SUV_{max})。

5. 病理学及免疫组织化学检查。显像完成后,采取颈椎脱臼法处死裸鼠。取肿瘤组织,用体积分数 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 切片行 HE 染色及 HIF-1 α 免疫组织化学检查。在高倍视野下每张切片随机选择 5 个视野拍照分析,得出每张照片阳性细胞百分比。

6. 统计学处理。采用 SPSS 17.0 软件,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组放疗前后比较采用配对 *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,HIF-1 α 表达与 SUV_{max} 的相关性采用 Pearson 相关分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

接种 2 周左右,32 只裸鼠右侧腋下均可见类圆形瘤体,接种成功率 100%。MicroPET/CT 显像右侧腋下均可见结节状不同程度放射性摄取增高灶,部分肿瘤内部可见片状坏死区,放射性分布稀疏缺损。放疗前,4 组 microPET/CT 显像 SUV_{max} 分别为 1.429±0.090、1.430±0.076、1.445±0.071 和 1.432±0.074,差异无统计学意义(*F*=0.072, *P*>0.05); 放疗后,单纯

放疗组、IR+放疗组的 SUV_{max} 较放疗前均明显降低(t 值:12.888 和 33.217,均 $P<0.05$),IR 组及对照组 SUV_{max} 较放疗前均明显升高(t 值:-11.009 和 -16.061,均 $P<0.05$)。放疗后 4 组 SUV_{max} 间差异有统计学意义($F=168.796, P<0.05$),IR+放疗组 SUV_{max} 较单纯放疗组下降更为明显($t=4.197, P<0.05$;表 1;图 1)。

表 1 不同治疗组荷 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠放疗前后肿瘤 SUV_{max} ($\bar{x}\pm s$)

组 别	肿瘤 SUV_{max}	
	放疗前	放疗后 24 h
单纯放疗组	1.429±0.090	1.075±0.098
IR+放疗组	1.430±0.076	0.890±0.076
IR 组	1.445±0.071	1.617±0.090
对照组	1.432±0.074	1.644±0.063

注:每组 8 只荷瘤裸鼠;IR 为马薊子素, SUV_{max} 为最大标准摄取值

肉眼观察肿瘤与正常组织分界清楚,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(图 2)示 IR 组及对照组肿瘤细胞核大且深染,排列密集紊乱,呈现明显的细胞异

型性,坏死不明显;单纯放疗组及 IR+放疗组仍可见肿瘤异型细胞,但与 IR 组及对照组相比肿瘤细胞数量减少,并见大片坏死,而 IR+放疗组较单纯放疗组肿瘤细胞减少更显著,坏死区更明显。

免疫组织化学结果(图 3)示,HIF-1 α 阳性表达于细胞核及胞质中,IR 组及对照组广泛表达,而单纯放疗组及 IR+放疗组阳性百分比明显低于 IR 组及对照组,IR+放疗组较单纯放疗组阳性百分比更低。单纯放疗组、IR+放疗组、IR 组及对照组阳性细胞百分比分别为(36.75±6.61)%、(26.75±7.19)%、(64.75±9.91)%和(69.0±8.72)%,IR+放疗组阳性细胞百分比明显低于其他 3 组($F=46.745, t$ 值:2.898、8.138、9.743,均 $P<0.05$)。相关分析结果显示,HIF-1 α 表达与 SUV_{max} 呈正相关($r=0.89, P<0.05$)。

讨 论

恶性肿瘤严重威胁人类健康,放射治疗是直接或辅助治疗恶性肿瘤的重要方式之一。放射治疗主

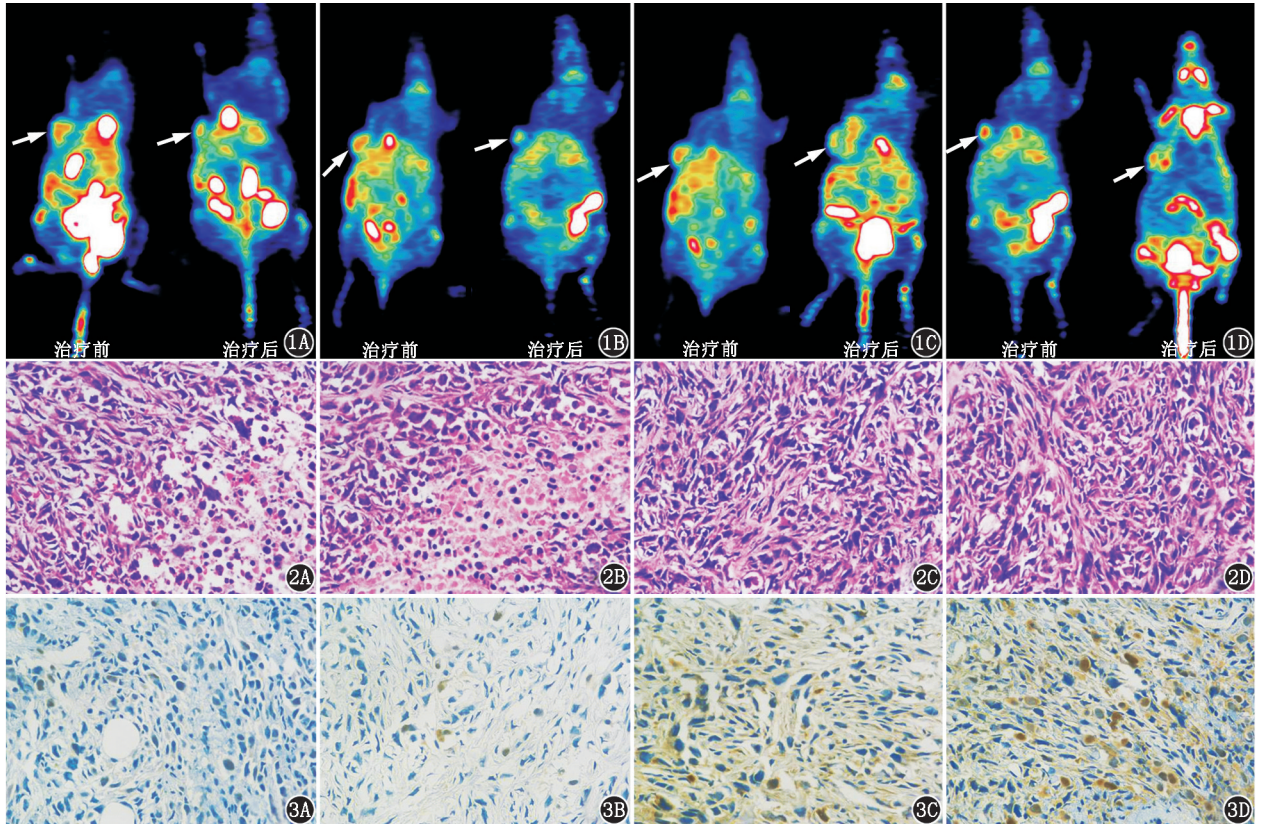


图 1 荷 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠放疗前后¹⁸F-氟赤式硝基咪唑(FETNIM) microPET/CT 显像图(箭头示肿瘤)。治疗前荷瘤裸鼠右上肢腋下结节状放射性摄取增高;治疗后单纯放疗组(1A)与马薊子素(IR)+放疗组(1B)放射性摄取降低,IR 组(1C)与对照组(1D)放射性摄取增高 **图 2** 荷瘤裸鼠肿瘤组织病理检查图(HE 染色 ×400)。单纯放疗组(2A)与 IR+放疗组(2B) 肿瘤细胞数量减少,并见大片坏死;IR 组(2C)与对照组(2D)肿瘤细胞核大且深染,排列密集紊乱 **图 3** 荷瘤裸鼠肿瘤乏氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)免疫组织化学检查结果(PV 两步法 ×400)。单纯放疗组(3A)与 IR+放疗组(3B) HIF-1 α 阳性表达明显减少,IR 组(3C)与对照组(3D) HIF-1 α 阳性表达广泛

要是通过电离辐射的直接或间接作用促使细胞死亡。肿瘤内存在的乏氧细胞对放射治疗具有抵抗作用,是肿瘤复发的主要原因之一^[1]。而增敏剂可提高乏氧细胞对射线的敏感性,提高放疗效果。本研究选用我国自主研发的乏氧细胞增敏剂 IR,其是从中药马蔺子种皮中分离提取的一种不饱和醌类化合物^[2]。

随着分子影像学技术的快速发展,PET/CT 可通过不同显像剂无创监测肿瘤内微环境变化,更加全面准确地评估肿瘤治疗疗效。MicroPET/CT 通过对小动物进行活体状态下的功能及解剖成像,可获得显像剂在体内分布情况;SUV_{max} 是衡量组织放射性摄取的半定量指标,一定程度上可反映肿瘤活性。¹⁸F-氟硝基咪唑 (fluoromisonidazole, FMISO) 是硝基咪唑类乏氧显像剂,能选择性滞留于乏氧组织或细胞中,通过 PET 显像探测肿瘤的乏氧程度。对¹⁸F-FMISO 的结构略加改造,可得到比其亲水性强、正常组织摄取及毒性均较低的¹⁸F-FETNIM^[6-7]。¹⁸F-FETNIM 外周代谢与脂溶性均较低,能被肿瘤乏氧组织摄取,可用于肿瘤乏氧显像^[7-8],评估放疗疗效及预后,高 FETNIM 摄取提示更差的无进展生存期和总生存率^[9]。

HIF-1 α 表达水平是衡量肿瘤乏氧的常用指标。HIF-1 α 高表达,表示肿瘤乏氧程度高,肿瘤放射抗拒性强,复发率高^[10]。本研究中,放疗后 24 h 对照组及 IR 组 SUV_{max} 均较前显著上升,考虑为肿瘤生长使内部乏氧程度增加所致。由此可见,单独的 IR 处理无明显的肿瘤治疗效果。单纯放疗组及 IR+放疗组 SUV_{max} 均较放疗前显著下降,2 组的 HIF-1 α 阳性表达率也显著低于 IR 组及对照组,说明放疗后肿瘤乏氧细胞减少,乏氧程度降低;结合相关分析结果,肿瘤组织摄取¹⁸F-FETNIM 的 SUV_{max} 与 HIF-1 α 呈正相关($r=0.89, P<0.05$),表明¹⁸F-FETNIM microPET/CT 显像能观察裸鼠肿瘤组织乏氧状态的变化。放射治疗后,肿瘤乏氧细胞减少,HIF-1 α 表达水平下降;在 IR+放疗组中,IR 的增敏作用与放疗联合,治疗效果更为明显,HIF-1 α 表达更低。本研究结果表明,IR 能增加肿瘤乏氧细胞对射线的敏感性,增强放疗效果,与徐慧琴等^[3]的研究结论一致。

综上,IR 可增加裸鼠 MDA-MB-231 乳腺癌对放疗的敏感性,提高放疗疗效;¹⁸F-FETNIM microPET/CT 显像可监测肿瘤内部乏氧情况,评估 IR 对裸鼠

MDA-MB-231 乳腺癌的放射增敏作用。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Fleming IN, Manavaki R, Blower PJ, et al. Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography[J]. Br J Cancer, 2015, 112(2): 238-250. DOI:10.1038/bjc.2014.610.
- [2] Xu H, Sun G, Wang H, et al. Dynamic observation of the radiosensitive effect of irisinone on rabbit VX2 lung transplant tumors by using fluorine-18-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography[J]. Nucl Med Commun, 2013, 34(3): 220-228. DOI:10.1097/MNM.0b013e32835d3730.
- [3] 徐慧琴,汪会,薛杨央,等. ¹⁸F-FDG PET/CT 显像评估马蔺子素放射增敏作用[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(2): 150-153. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.02.013. Xu HQ, Wang H, Xue YY, et al. The role of ¹⁸F-FDG PET/CT in evaluation of radiosensitivity enhancement by irisinone [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 33(2): 150-153. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.02.013.
- [4] Wang H, Zhang Y, Yu W, et al. Radiosensitizing effect of irisinone on glioma through the downregulation of HIF-1 α evaluated by ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-FMISO PET/CT[J]. Nucl Med Commun, 2016, 37(7): 705-714. DOI:10.1097/MNM.0000000000000498.
- [5] Hoigebazar L, Jeong JM. Hypoxia imaging agents labeled with positron emitters[J]. Recent Results Cancer Res, 2013, 194: 285-299. DOI:10.1007/978-3-642-27994-2_15.
- [6] Kurihara H, Honda N, Kono Y, et al. Radiolabelled agents for PET imaging of tumor hypoxia[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(20): 3282-3289. DOI:10.2174/092986712801215964.
- [7] 汪会,徐慧琴.肿瘤乏氧显像剂的研究进展[J].国际放射医学核医学杂志, 2012, 36(6): 366-370. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.06.011. Wang H, Xu HQ. Advances in study of tumor hypoxia imaging agents [J]. Int J Radiat Med Nucl Med, 2012, 36(6): 366-370. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.06.011.
- [8] 胡漫,孔莉,赵书强,等. ¹⁸F-氟硝基咪唑 PET-CT 检测非小细胞肺癌乏氧的应用价值[J].中华肿瘤杂志, 2010, 32(6): 463-466. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2010.06.016. Hu M, Kong L, Zhao SQ, et al. Value of ¹⁸F-FETNIM PET-CT for detection of tumor hypoxia in non-small-cell lung cancer [J]. China J Oncol, 2010, 32(6): 463-466. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2010.06.016.
- [9] 蒋力扬,孟雪,于金明.用分子影像指导肿瘤精准治疗[J].中华核医学与分子影像杂志, 2016, 36(1): 3-6. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.01.002. Jiang LY, Meng X, Yu JM. Precision therapy of oncology by molecular imaging[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2016, 36(1): 3-6. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2016.01.002.
- [10] Kim BR, Yoon K, Byun HJ, et al. The anti-tumor activator sMEK1 and paclitaxel additively decrease expression of HIF-1 α and VEGF via mTORC1-S6K/4E-BP-dependent signaling pathways[J]. Oncotarget, 2014, 5(15): 6540-6551. DOI:10.18632/oncotarget.2119.

(收稿日期:2017-11-03)