

¹⁸F-FLT Micro PET/CT 显像评价奥拉帕尼对裸鼠乳腺癌模型的放疗增敏作用

王思淇 陶伟涛 许阿磊 薛杨央 汪会

摘要 目的 探讨¹⁸F-脱氧胸腺嘧啶核苷(¹⁸F-FLT)正电子发射计算机断层显像(PET/CT)评价奥拉帕尼(Olaparib)对裸鼠乳腺癌模型的放疗增敏作用。方法 建立24只BALB/C裸鼠MCF-7乳腺癌模型,按随机数字表法分为4组,每组6只,分别为对照组、单纯放疗组、Olaparib组、Olaparib+放疗组,分别于治疗前和治疗后48 h对裸鼠行¹⁸F-FLT Micro PET/CT显像。比较4组治疗前后肿瘤最大标准化摄取值(SUV_{max})、总增殖体积(TPV)及肿瘤体积的变化。显像完成后,取出肿瘤进行称重观察肿瘤质量变化。通过免疫组化法分析肿瘤增殖指数Ki-67及增殖细胞核抗原PCNA的表达情况,并分析肿瘤SUV_{max}与免疫组化指标Ki-67及PCNA的相关性。结果 治疗前A组肿瘤的SUV_{max}、TPV及肿瘤体积差异无统计学意义($F=0.041, 0.061, 0.045, P>0.05$);治疗结束后48 h,对照组和Olaparib组的肿瘤SUV_{max}较治疗前升高($t=-12.111, P<0.001; t=-3.001, P=0.03$);单纯放疗组和Olaparib+放疗组肿瘤的SUV_{max}较治疗前减低($t=5.829, P<0.01; t=4.448, P<0.01$),Olaparib+放疗组肿瘤的SUV_{max}、TPV和肿瘤体积均低于单纯放疗组($t=3.388, 5.884, 5.990, P<0.01$)。Olaparib+放疗组瘤体质量明显低于其他3组($F=44.405, P<0.001$)。免疫组化检测显示Ki-67及PCNA在Olaparib+放疗组中表达均少于其他3组($F=16.289, 39.645, P<0.001$)。相关性分析显示SUV_{max}与Ki-67及PCNA表达均呈正相关($r=0.920, 0.918, P<0.01$)。结论 ¹⁸F-FLT Micro PET/CT显像可以评价Olaparib对裸鼠乳腺癌模型的放疗增敏作用。

关键词 乳腺肿瘤;聚腺苷二磷酸核糖聚合酶;¹⁸F-氟脱氧胸苷;放射疗法;Micro PET/CT; Ki-67; PCNA

中图分类号 R 730.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0930-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.009

乳腺癌是女性常见的癌症之一,也是导致女性死亡的主要原因^[1]。放疗主要依靠高能电离辐射和活性氧的作用,来诱发细胞内DNA链的损伤,进

而灭杀肿瘤细胞。然而,乳腺癌的放疗低敏感性仍然是治疗效果不佳的重要原因之一^[2-3]。随着人类对乳腺癌认识的不断加深,出现了许多分子水平的靶向治疗手段,为乳腺癌的治疗提供了新方法。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂(PARP inhibitor, PARPi)可以阻断肿瘤细胞DNA的损伤修复通路并有放疗增敏作用^[4]。奥拉帕尼(Olaparib)是市场上第一个PARP抑制剂,它可以抑制PARP的活性。PARP是修复单链DNA断裂的一个主要因素。抑制PARP可以导致更多有害的双链DNA断裂,并增加基因组的不稳定性,导致细胞死亡^[5-6]。正电子发射计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET/CT)是临床常用的诊断方法,对肿瘤的临床诊断和疗效评价具有重要意义。该实验通过建立MCF-7乳腺癌裸鼠模型,探讨¹⁸F-FLT Micro PET/CT显像在评价Olaparib的放射增敏作用中的价值。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂 人乳腺癌MCF-7细胞购自中科院上海细胞库;胎牛血清和0.25%胰酶均购自美国Gibco公司;Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)和磷酸盐缓冲液均购自美国Hyclone公司;Olaparib购自美国Sigma公司;Ki-67及PCNA免疫组化试剂均购自武汉赛维尔生物技术有限公司。

1.2 实验动物 24只雌性BALB/C裸鼠,SPF级,4~5周龄,体质量20~25 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001]。该研究动物实验方案经安徽医科大学动物实验伦理审查委员会批准(批号:LLSC20190249)。

1.3 主要仪器 Inveon Micro PET/CT购自德国西门子公司;放疗采用VARIAN 23 EX医用直线加速器购自美国VARIAN公司;FLT前体购自北京派特生物技术有限公司;¹⁸F-FLT由上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科生产,放化纯度>95%。

1.4 肿瘤模型的建立和分组 24只BALB/C裸鼠

2023-03-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971643)

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:王思淇,男,硕士研究生;

汪会,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: wanghuiyx@163.com

采用随机数字表法随机分为4组:对照组、单纯放疗组、Olaparib组和Olaparib+放疗组,每组6只。收集处于对数生长期的乳腺癌MCF-7细胞,细胞密度均调整至 5×10^6 个/ml,根据分组然后分别于裸鼠右上肢腋下注射0.2 ml细胞,待肿瘤最大直径 ≥ 0.8 cm时进行动物实验。单纯放疗组:使用6 Mev电子线进行局部照射,照射野 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$;单次照射剂量4 Gy,隔日照射1次,共4次,7 d完成,累计照射剂量16 Gy;Olaparib组:按照每只每天50 mg/kg的剂量行Olaparib生理盐水悬浊液灌胃处理,共7 d。Olaparib+放疗组:灌胃方法及剂量同Olaparib组,放疗方法及剂量同单纯放疗组。对照组:给予每天生理盐水灌胃,未经照射。各组裸鼠治疗前一天和治疗结束后48 h,分别用游标卡尺测量每只裸鼠肿瘤长短径,根据公式计算肿瘤体积:体积=长径 \times 短径 $^2 \times 0.5$ 。

1.5 ^{18}F -FLT Micro PET/CT 显像与图像分析 4组乳腺癌裸鼠模型均于放疗前及第4次放疗结束后48 h,行Micro PET/CT显像。裸鼠于显像前夜禁食,可自由饮水。在扫描开始前60 min,将裸鼠固定,每只裸鼠通过尾静脉注射 ^{18}F -FLT约5.55 MBq (150 μCi)。扫描前给予1%异氟烷麻醉并俯卧位固定于扫描床上进行显像。显像完成后,由2位高年资的核医学科医师对PET/CT图像进行分析,选择病灶 ^{18}F -FLT放射性浓聚最高的层面测量 SUV_{max} 和平均标准化摄取值(SUV_{mean})作为统计指标。通过公式计算各肿瘤组织TPV: $\text{TPV} = \text{SUV}_{\text{mean}} \times \text{肿瘤体积}$ 。各组裸鼠显像全部完成后,采取颈椎脱臼法处死裸鼠。

1.6 免疫组化分析 取出肿瘤组织,将各组裸鼠移植瘤称重,然后计算抑瘤率,其公式为:抑瘤率(%) = (对照组肿瘤平均质量 - 治疗组肿瘤平均质量) / 对照组肿瘤平均质量 $\times 100\%$ 。称量完毕后立即用质量分数4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋 $4 \mu\text{m}$ 切片行Ki-67及PCNA免疫组化检测。在高倍视野下每张切片随机选择5个视野拍照分析,并使用Image-Pro Plus 6.0软件进行定量分析。

1.7 统计学处理 使用SPSS 26.0软件进行统计学分析。对符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组内放疗前后比较采用配对 t 检验,多个样本均数比较用单因素方差分析并采用LSD- t 检验进行事后比较,两组间比较采用两独立样本 t 检验;采用Pearson相关法分析 SUV_{max} 与Ki-67及PCNA表达的相关性, $P < 0.05$ 为差异或相关性有统计学意义。

2 结果

2.1 ^{18}F -FLT Micro PET/CT 显像结果 24只裸鼠Micro PET/CT显像右上肢腋下均可见结节状放射性摄取不同程度增高灶,肿瘤与周围组织分界清晰,部分肿瘤内见片状放射性摄取缺损区。见图1。治疗前4组肿瘤 SUV_{max} 、TPV及肿瘤体积差异无统计学意义($F = 0.041, 0.061, 0.045, P > 0.05$)。治疗结束后48 h 4组肿瘤 SUV_{max} 、TPV及肿瘤体积差异有统计学意义($F = 43.119, 13.861, 44.313, P < 0.001$);对照组和Olaparib组肿瘤 SUV_{max} 较治疗前升高;单纯放疗组和Olaparib+放疗组肿瘤 SUV_{max} 较治疗前减低,Olaparib+放疗组肿瘤的 SUV_{max} 、TPV和肿瘤体积均低于单纯放疗组。见表1。经称量4组瘤体质量分别为(1.448 ± 0.115)、(1.103 ± 0.127)、(1.393 ± 0.140)和(0.653 ± 0.150),Olaparib+放疗组瘤体质量明显低于其他3组($F = 44.405, P < 0.001$),Olaparib+放疗组较单纯放疗组相比瘤体质量更小($t = 5.598, P < 0.05$)。通过计算单纯放疗组、Olaparib组和Olaparib+放疗组抑瘤率分别为23.82%、3.80%和54.89%。

表1 各组乳腺癌裸鼠治疗前后肿瘤 SUV_{max} 变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)

项目	治疗前	治疗后48 h	t 值	P 值
对照组				
SUV_{max}	1.103 ± 0.119	1.457 ± 0.135	-12.111	<0.001
TPV	0.271 ± 0.076	1.072 ± 0.271	-8.377	<0.001
肿瘤体积 (cm^3)	0.491 ± 0.092	1.594 ± 0.200	-12.554	<0.001
单纯放疗组				
SUV_{max}	1.119 ± 0.186	0.842 ± 0.148	5.829	0.002
TPV	0.261 ± 0.047	0.729 ± 0.090	-11.225	<0.001
肿瘤体积 (cm^3)	0.473 ± 0.089	1.088 ± 0.114	-14.591	<0.001
Olaparib组				
SUV_{max}	1.126 ± 0.067	1.313 ± 0.157	-3.001	0.030
TPV	0.260 ± 0.045	0.931 ± 0.179	-8.973	<0.001
肿瘤体积 (cm^3)	0.482 ± 0.098	1.512 ± 0.166	-10.558	<0.001
Olaparib+放疗组				
SUV_{max}	1.099 ± 0.209	$0.578 \pm 0.119^{**}$	4.448	0.007
TPV	0.273 ± 0.093	$0.475 \pm 0.056^{***}$	-4.371	0.007
肿瘤体积 (cm^3)	0.497 ± 0.169	$0.702 \pm 0.101^{***}$	-5.331	0.003

与单纯放疗组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 免疫组化结果 Ki-67和PCNA均在肿瘤组织中高表达。4组肿瘤组织中Ki-67表达的平均吸光度值分别为(64.932 ± 7.288)、(49.382 ± 9.482)、(63.748 ± 6.920)、(35.060 ± 7.183),差异有统计学意义($F = 16.289, P < 0.001$),其中Olaparib+放疗组平均吸光度值明显低于单纯放疗组($t = 2.692$,

$P < 0.05$)。4 组肿瘤组织中 PCNA 表达的平均吸光度值分别为 (80.460 ± 6.702) 、 (63.280 ± 6.800) 、 (79.826 ± 3.700) 、 (48.102 ± 3.885) ，差异有统计学意义 ($F = 39.645, P < 0.001$)，Olaparib + 放疗组平均吸光度值明显低于单纯放疗组 ($t = 4.333, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 SUV_{max} 与 Ki-67 及 PCNA 表达的相关性分析

肿瘤 SUV_{max} 与 Ki-67、PCNA 表达均呈明显正相关 ($r_{\text{Ki-67}} = 0.920, P < 0.01; r_{\text{PCNA}} = 0.918, P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

乳腺癌是妇女癌症死亡的第二大原因^[7]。在

临床上由于乳腺癌对放疗的敏感性较低，所以放疗经常与其他治疗方法联合使用^[8]。PARPi 是第一个临床批准的旨在利用合成致死性的药物，在 BRCA1 或 BRCA2 中携带种系突变的患者中产生的肿瘤对 PARPi 敏感。然而，与其他靶向治疗一样，对 PARPi 的耐药性出现在晚期疾病中，所以寻求组合治疗方法是解决问题的方法之一。如将化疗方案与 PARPi 组合、PARPi 与抗 CTLA4 和抗 PD1 / PDL-1 等免疫疗法的组合、PARPi 与癌症特异性特征起作用的药物有益地结合等。该文将放疗与 PARPi 结合，通过放疗来对 DNA 链造成损伤，PARPi 来抑制 DNA 链的修复，增加 DNA 修复的复杂性，从而造成更大的 DNA 损伤。Olaparib 是 PARPi 的代表之一，具有抑

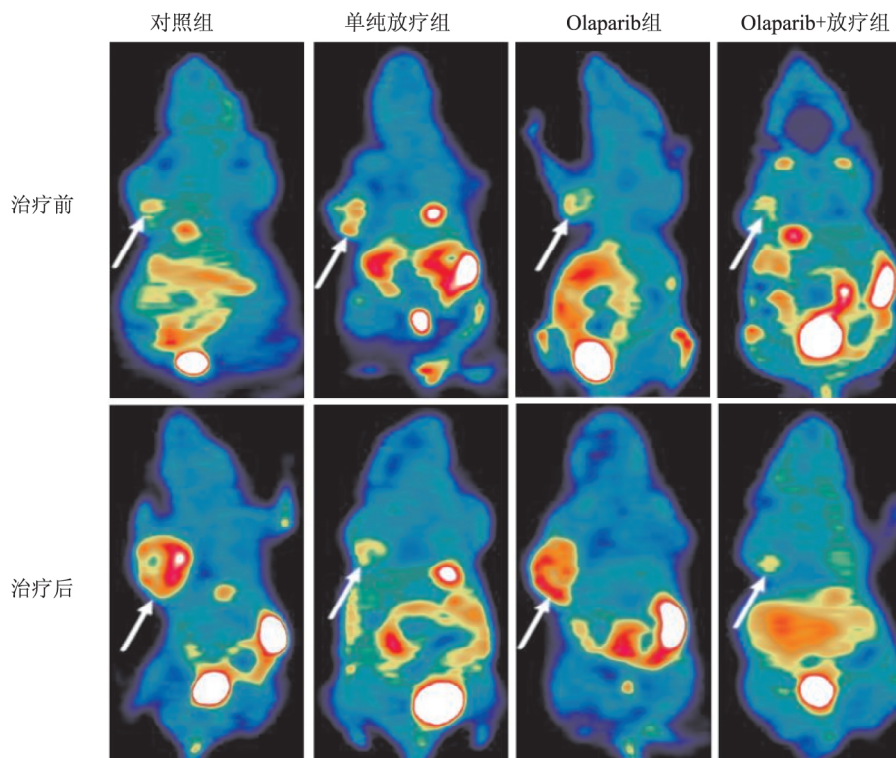


图1 各组乳腺癌裸鼠治疗前后¹⁸F-FLT Micro PET/CT 显像图
白色箭头: 肿瘤

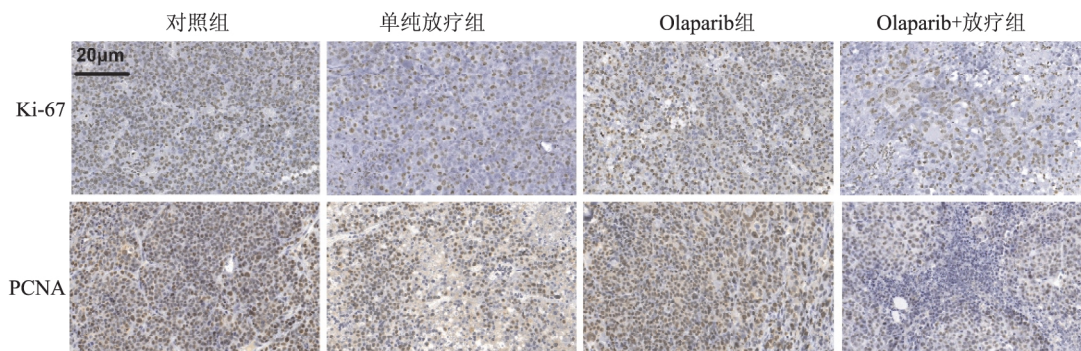
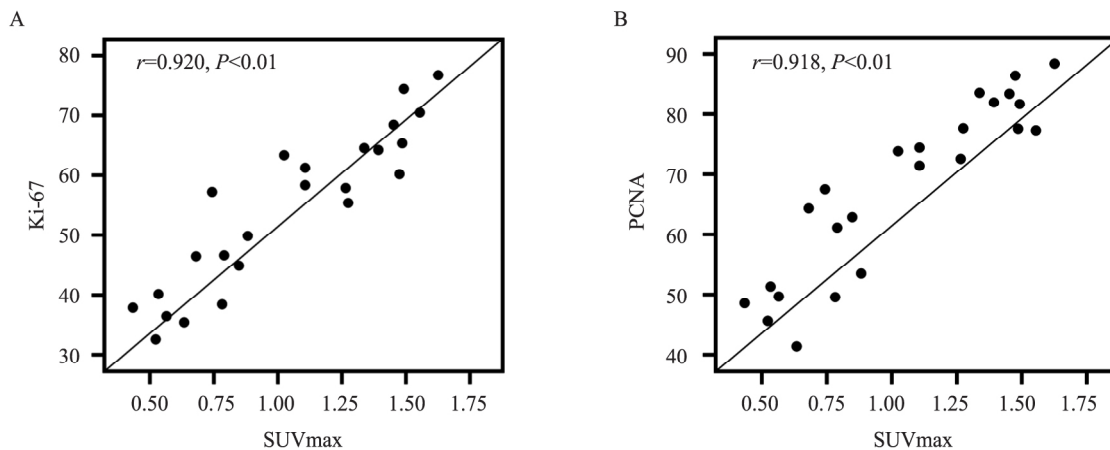


图2 各组荷乳腺癌裸鼠肿瘤组织 Ki-67 及 PCNA 免疫组织化结果 ×400

图3 SUV_{max}与Ki-67及PCNA表达相关性分析A: SUV_{max}与Ki-67表达相关分析; B: SUV_{max}与PCNA表达相关分析

制单链DNA断裂修复的作用,以加速癌细胞的死亡。在其他研究中,奥拉帕尼还具有放射增敏的效果^[9]。该实验通过体内实验构建裸鼠MCF-7乳腺癌模型,并将放疗与Olaparib两种治疗手段联合,由实验结果得出联合治疗比单一治疗更能抑制肿瘤的生长,也进一步表明了Olaparib确实具有放射增敏的效果。

PET/CT不仅可以用于乳腺癌的诊断与分析,还可以用于乳腺癌的疗效判断。近年来,¹⁸F-FLT作为一种胸苷嘧啶类似物,已被开发为增殖追踪剂,它可以被胸腺嘧啶脱氧核苷激酶1(thymidine kinase 1,TK1)磷酸化后滞留在细胞内,用PET成像和测量增殖可以为该研究提供一种无创的分期工具和监测并评价放疗对肿瘤的早期疗效,已被证实可用于乳腺癌^[10],且肿瘤组织摄取¹⁸F-FLT的数量分别与Ki-67及PCNA有显著相关性^[11-12]。最大标准化摄取值(SUV_{max})是PET/CT在肿瘤诊断中常用的半定量指标,经常被用于多种肿瘤的早期诊断、治疗监测及预后评价中,在该实验中通过监测SUV_{max}的变化来反映肿瘤组织对¹⁸F-FLT的摄取程度从而表现出肿瘤的增殖活性;治疗后48h,单纯放疗组和Olaparib+放疗组的肿瘤SUV_{max}均较放疗前降低,降低了对¹⁸F-FLT的摄取,体现出肿瘤组织的增殖受到了抑制;通过比较显示Olaparib+放疗组的肿瘤SUV_{max}、TPV和肿瘤体积明显低于单纯放疗组,Olaparib+放疗组的瘤体质量明显低于其他3组,并且抑瘤率最高。Olaparib联合放疗比单纯放疗可以更明显降低肿瘤组织对¹⁸F-FLT的摄取,说明联合治疗可以更大程度上抑制肿瘤组织的增殖能力。

不受控制的增殖是癌症的标志。在乳腺癌中,

免疫组化评估细胞染色中Ki-67的比例已成为比较肿瘤样品之间增殖的最广泛使用的方法。Ki-67越来越多地在这些情况下用于临床研究,包括作为临床试验的主要疗效终点,有时用于临床管理^[13]。PCNA是DNA复制和修复的重要因素,因其在复制中的作用而被称作增殖的分子标志物^[14]。免疫组化结果显示接受放疗的两组荷瘤裸鼠Ki-67及PCNA表达均低于未接受放疗组,同时,Olaparib+放疗组相比单纯放疗组有着更低的Ki-67及PCNA表达。此外SUV_{max}与Ki-67及PCNA表达分别均呈正相关,进一步验证了¹⁸F-FLT Micro PET/CT显像能反映肿瘤细胞增殖能力。为乳腺癌的治疗监测及制定个性化治疗策略作出贡献。

参考文献

- [1] Lei S, Zheng R, Zhang S, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: a population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020 [J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(11): 1183-94.
- [2] Liu T I, Lu T Y, Yang Y C, et al. New combination treatment from ROS-induced sensitized radiotherapy with nanophototherapeutics to fully eradicate orthotopic breast cancer and inhibit metastasis [J]. Biomaterials, 2020, 257: 120229.
- [3] Thakur V, Zhang K, Savadelis A, et al. The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP triggers an outside-in DNA damage response that impacts chemo- and radiotherapy responses of breast cancer [J]. Cancer Lett, 2019, 443: 115-24.
- [4] Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(10): 610-21.
- [5] Pascal J M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage [J]. DNA Repair (Amst), 2018, 71: 177-82.
- [6] O'Connor M J. Targeting the DNA damage response in cancer

- [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 547–60.
- [7] Sun Y S, Zhao Z, Yang Z N, et al. Risk factors and preventions of breast cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(11): 1387–97.
- [8] Gong L, Zhang Y, Liu C, et al. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 1083–102.
- [9] Wang L, Cao J, Wang X, et al. Proton and photon radiosensitization effects of niraparib, a PARP-1/-2 inhibitor, on human head and neck cancer cells [J]. *Head Neck*, 2020, 42(9): 2244–56.
- [10] Ma G, Liu C, Lian W, et al. F-FLT PET/CT imaging for early monitoring response to CDK4/6 inhibitor therapy in triple negative breast cancer [J]. *Ann Nucl Med* 2021, 35(5): 600–7.
- [11] 谯凤, 徐慧琴, 汪会, 等. ^{18}F -FLT micro PET/CT 显像评价马简子素对裸鼠乳腺癌的放射增敏作用 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(10): 1430–3.
- [12] Yu W, Su X, Zhang D, et al. Dual-Tracer assessment of dynamic changes in reoxygenation and proliferation decrease during fractionated radiotherapy in murine tumors [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1046.
- [13] Dowsett M, Nielsen T O, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(22): 1656–64.
- [14] Wang S C. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(4): 178–86.

Evaluation of Olaparib radiosensitization for breast cancer in nude mice by ^{18}F -FLT Micro PET/CT imaging

Wang Siqi, Tao Weitao, Xu Alei, Xue Yangyang, Wang Hui

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

Abstract Objective To investigate the effect of ^{18}F -deoxythymidine nucleoside (^{18}F -FLT) positron emission computed tomography (PET/CT) imaging to evaluate the radiosensitization effect of Olaparib on breast cancer model in nude mice. **Methods** According to the random number table method, twenty-four BALB/C nude mice MCF-7 breast cancer models were established and divided into four groups with 6 mice in each group, namely the control group, radiotherapy group, Olaparib group and Olaparib + radiotherapy group. ^{18}F -FLT micro PET/CT imaging was performed on nude mice before and 48 h after treatment, respectively. The changes of maximum standardized uptake value (SUV_{max}), total proliferation volume (TPV) and tumor volume before and after tumor treatment in four groups were compared. The tumors were extracted and weighed to observe the changes of tumor weight, and the expression of Ki-67 and PCNA was analyzed by immunohistochemistry staining. The correlation of tumor SUV_{max} with Ki-67 and PCNA was analyzed. **Results** Before treatment, there were no significant differences in SUV_{max} , TPV and tumor volume among the 4 groups ($F=0.041, 0.061, 0.045, P>0.05$). 48 h after treatment, SUV_{max} in the control and Olaparib groups increased significantly ($t=-12.111, P<0.001$; $t=-3.001, P=0.03$), SUV_{max} was reduced in the radiotherapy and Olaparib + radiotherapy groups ($t=5.829, P<0.01$; $t=4.448, P<0.01$), while SUV_{max} , TPV and tumor volume of tumors in the Olaparib + radiotherapy group were lower than those in the radiotherapy group ($t=3.388, 5.884, 5.990, P<0.01$). Tumor weight was significantly lower in the Olaparib + radiotherapy group than in the other three groups ($F=44.405, P<0.001$). Immunohistochemical staining showed that Ki-67 and PCNA were the least expressed in the Olaparib + radiotherapy group than in the other three groups ($F=16.289, 39.645, P<0.001$). SUV_{max} was positively correlated with Ki-67 and PCNA expression ($r=0.920, 0.918, P<0.01$). **Conclusion** ^{18}F -FLT Micro PET/CT imaging can evaluate the radiosensitizing effect of Olaparib on nude mouse breast cancer model.

Key words breast neoplasms; poly (ADP-ribose) polymerase; ^{18}F -fluorodeoxythymidine; radiotherapy; Micro PET/CT; Ki-67; PCNA