

• 实验研究 •

大鼠 C6 胶质瘤放射治疗前后¹⁸F-FDG PET/CT 显像及病理学变化

李伟龙

【摘要】 目的:研究大鼠 C6 胶质瘤放射治疗后¹⁸F-脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)PET/CT 显像及组织病理学变化,观察放疗后肿瘤组织的演化过程,探讨 C6 胶质瘤放疗后不同时间点 FDG 摄取水平变化与病理学变化间的关系。**方法:**30 只雄性 SD 大鼠右腿皮下种植 C6 胶质瘤,2 周后全部成瘤,将大鼠按随机数字表分为 A、B、C 三组,每组 10 只,A 组为对照组,仅行¹⁸F-FDG PET/CT 显像,B、C 两组行放射治疗并分别在治疗后 48 h 及 1 周进行显像,观察肿瘤与对侧脊柱旁肌肉的最大标准摄取值(SUV_{max})比值(T/M)及肿瘤体积的变化。显像后取出肿瘤组织分别行病理切片观察肿瘤细胞的坏死及萎缩情况,并进行免疫组织化学切片计数微血管密度(MVD)。**结果:**A、B、C 三组 T/M 逐渐减低,分别为 10.86 ± 3.31 、 9.23 ± 4.56 和 5.16 ± 2.52 ,统计检验表明 A、B 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而 A、C 组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。病理结果表明随着放疗后时间的延长,肿瘤坏死成分逐渐增多,体积逐渐减小,A 组 $[(8.61 \pm 6.57) \text{cm}^3]$ 、B 组 $[(7.80 \pm 7.31) \text{cm}^3]$ 间差异无统计学意义($P > 0.05$),A、C 组 $[(5.21 \pm 5.48) \text{cm}^3]$ 间差异则具有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组化结果显示 B 组 MVD(19.5 ± 1.96)较 A 组(17.9 ± 2.02)轻度增高,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),C 组 MVD(8.4 ± 1.84)显著下降,与 A 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析表明 A、C 组间 T/M 变化与肿瘤体积及 MVD 变化呈正相关(r 分别为 0.83、0.68, P 值均 < 0.05),而 A、B 组间 T/M 变化仅与肿瘤体积变化相关($r = 0.76$, $P < 0.05$)。**结论:**大鼠 C6 胶质瘤放射治疗后,FDG 摄取水平变化在放疗后 48 h 仅与肿瘤体积变化相关,放疗后 1 周则能有效反映肿瘤的病理学改变。

【关键词】 神经胶质瘤;放射治疗;体层摄影术,发射型计算机;脱氧葡萄糖 F18;大鼠

【中图分类号】 R815.2; R814.42 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2011)05-0479-04

Correlative study of ¹⁸F-FDG PET/CT imaging and pathological changes of rat C6 glioma after radiotherapy LI Wei-long, Center of PET/CT, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study the correlation of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) PET/CT imaging with pathological changes of rat C6 glioma after radiotherapy. **Methods:** Thirty C6 glioma-bearing male SD rats were randomly divided into three groups (10 rats in each group), group A, B and C, and imaged with FDG PET/CT two weeks after inoculation of tumor cells, 48h and one week after radiotherapy respectively. The ratios of SUV_{max} of tumor to muscles (tumor-to-muscle, T/M) and tumor volume were calculated. All rats were sacrificed after FDG PET/CT imaging for pathology and immunohistochemistry studies. **Results:** T/M of group B (9.23 ± 4.56) was mildly reduced compared with group A (10.86 ± 3.31), while group C (5.16 ± 2.52) was significantly decreased compared with group A ($P < 0.05$). The amount of tumor necrosis increased with time after radiotherapy, tumor volume decreased gradually, the differences between group A and C were significant $[(8.61 \pm 6.57) \text{cm}^3 \text{ vs } (5.21 \pm 5.48) \text{cm}^3]$. Microvessel density (MVD) of group B (19.5 ± 1.96) increased slightly compared with group A (17.9 ± 2.02), MVD of group C (8.4 ± 1.84) was significantly decreased compared with that of group A ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that changes of T/M between group A and C were positively correlated with tumor volume and MVD ($r = 0.83, 0.68$, all $P < 0.05$); while changes of T/M between group A and B were only positively correlated with tumor volume ($r = 0.76, P < 0.05$). **Conclusion:** The changes of ¹⁸F-FDG uptake of rat C6 glioma in the early 48h after radiotherapy were only relevant to tumor volume, but were closely related to pathological changes one week later.

【Key words】 Glioma; Radiation therapy; Tomography, emission-computed; Fluoro-deoxyglucose F18; Rats

¹⁸F-脱氧葡萄糖(¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG) PET/CT 能反映解剖和代谢特征的变化,可用于脑胶质瘤放射治疗后疗效评估及复发与放射性损伤的鉴别诊断^[1,2],但有关放疗后肿瘤病理变化及其影响 FDG 摄取的机制报道较少。本研究通过建立大鼠

C6 胶质瘤模型,观察放疗前后肿瘤 FDG 摄取水平及组织病理学变化,旨在探讨胶质瘤放疗后 FDG PET/CT 显像变化与肿瘤病理学变化之间的关系,为¹⁸F-FDG PET/CT 评价胶质瘤放疗疗效提供实验依据。

材料与方法

1. 胶质瘤模型建立

作者单位:300052 天津,天津医科大学总医院 PET/CT 中心
作者简介:李伟龙(1986-),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事功能分子影像诊断工作。

选用 30 只 4~5 周雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 180~200 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。C6 胶质瘤细胞株由天津医科大学总医院神经外科实验室提供, 在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中, 采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基行常规培养。对数生长期经磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤 2 次, 0.125% 胰酶消化, 收集消化液离心后将细胞重新悬浮于 PBS 缓冲液中制成浓度为 1×10^8 /ml 单细胞悬液。在大鼠右腿腹股沟皮下注射细胞悬液 200 μ l。2 周后, 所有大鼠右腿腹股沟皮下均可见直径 ≥ 1 cm 结节, 表明模型建立成功。

2. 胶质瘤模型放射治疗及 PET/CT 显像

根据前期预实验结果, 接种 3 周的肿瘤与 2 周肿瘤大体形态及病理表现相似, 因此将 30 只荷瘤大鼠按随机数字表法分为以下 3 组, A 组为对照组, B 组、C 组为放疗组, 每组 10 只, A 组于接种肿瘤细胞后 2 周行 ¹⁸F-FDG PET 显像, B、C 两组在接种 2 周后行放射治疗并分别在治疗后 48 h 及 1 周行 PET 显像。放射治疗采用德国 Siemens Primus 直线加速器, 单次照射, 总剂量 12Gy。显像仪为美国 GE 公司 Discovery LS PET/CT 联合扫描仪。由鼠尾静脉注射 ¹⁸F-FDG

0.1 mCi, 60 min 后进行扫描, 先行 CT 透射扫描, 然后进行 PET 显像。获得的影像经迭代法处理和重建, 分别获得 CT、PET 及两者融合图像。

3. 肿瘤与对侧脊柱旁肌肉的最大标准摄取值 (SUV_{max}) 比值 (tumor-to-muscle, T/M) 及肿瘤体积的测量

PET 图像均经衰减校正处理。利用 Xeleris 图像融合工作站调用 PET/CT 断层图像, 获得横断面数据, 在肿瘤病变代谢最高横截面上选取活度最高位置为中心, 避开坏死区域, 勾画兴趣区 (region of interest, ROI), 得出病变最高的标准化摄取值 (standardized uptake value, SUV_{max}), 然后将 ROI 复制到对侧脊柱旁肌肉, 计算示踪剂的肿瘤与肌肉比值 (SUV_{T/M})。测量肿瘤最大直径和与其垂直径线长度及冠状面或矢状面最大高度, 三者乘积得出肿瘤体积。

4. 病理学检查

PET/CT 显像后处死大鼠, 取出肿瘤组织, 一部分经 5 μ m 切片、常规 HE 染色, 光镜下观察放疗前后肿瘤组织细胞形态的变化; 另一部分常规石蜡包埋, 5 μ m 切片, 采用兔抗鼠 γ 因子多克隆抗体 (德国 Dako 公司) 标记血管内皮。以细胞膜呈棕褐色为阳性染色, 测量微血管密度 (microvessel density, MVD); 先在低

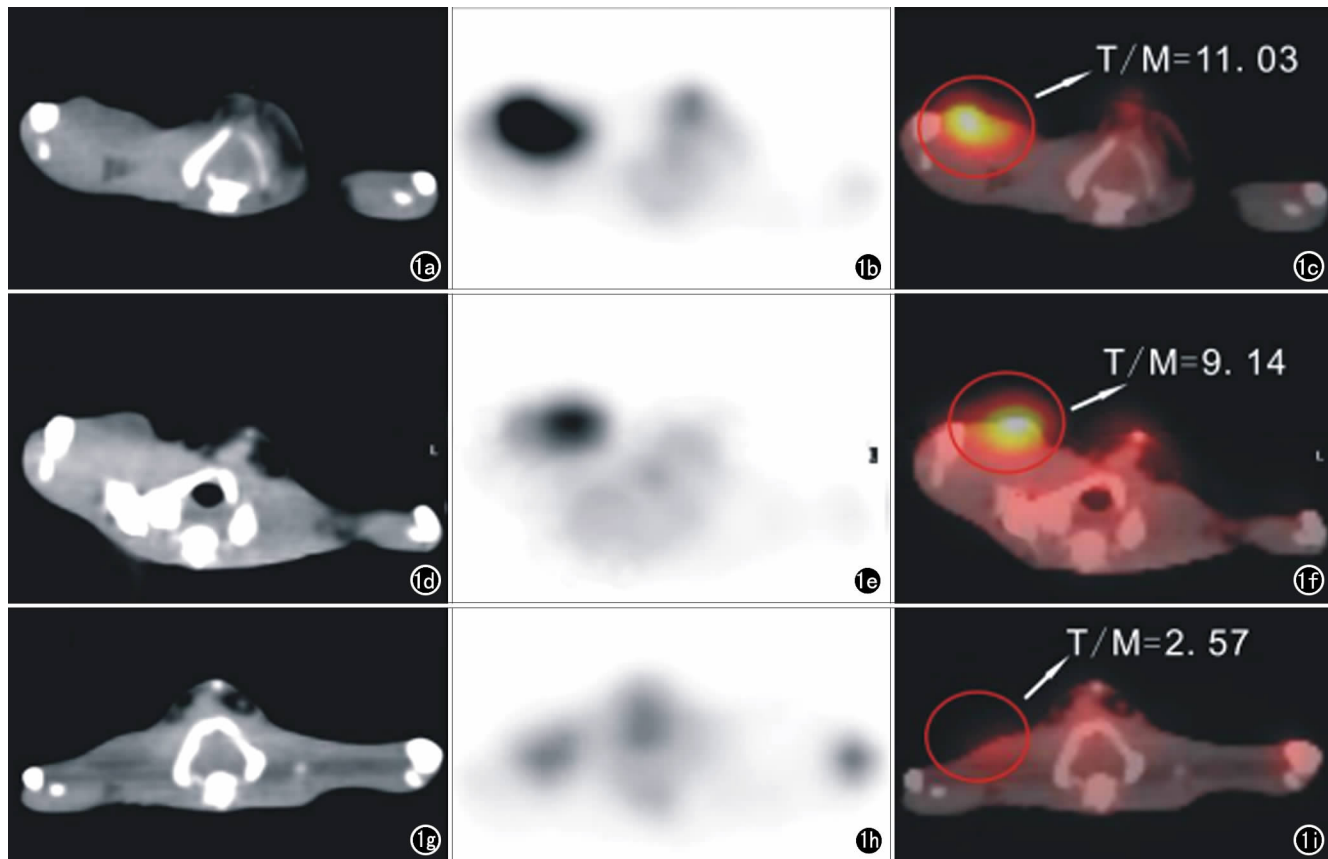


图 1 3 组大鼠 ¹⁸F-FDG PET/CT 图像, 自左向右依次为 CT、PET 及 PET/CT 融合图像。B 组 T/M 较 A 组略有下降, C 组 T/M 则最低。a) A 组大鼠 CT 图像; b) A 组大鼠 PET 图像; c) A 组大鼠 PET/CT 融合图像; d) B 组大鼠 CT 图像; e) B 组大鼠 PET 图像; f) B 组大鼠 PET/CT 融合图像; g) C 组大鼠 CT 图像; h) C 组大鼠 PET 图像; i) C 组大鼠 PET/CT 融合图像。

倍光学显微镜($\times 40$)下寻找肿瘤血管密集区,然后用高倍镜($\times 200$)计数 10 个视野,取平均值作为 MVD 值^[3]。

5. 统计学处理

计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;统计软件为 SPSS 13.0,多样本均数之间比较采用单因素方差分析。FDG SUV_{T/M} 与肿瘤体积及 MVD 间相关性采用 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

种植瘤存活情况。实验结果表明,大鼠 C6 胶质瘤皮下接种容易成活,30 只大鼠全部成瘤,成瘤速度快,于 2~3 周生长旺盛,少部分肿瘤呈浸润性生长;肿瘤直径达 0.8 cm 时肿瘤中心即可出现坏死,坏死程度随肿瘤体积增大逐渐增多。

从放疗前及放疗后 48 h 与 1 周的 PET/CT 融合图像(图 1)可见 A 组、B 组及 C 组的肿瘤均有不同程度的¹⁸F-FDG 摄取,随着放疗后时间的延长呈逐渐减低趋势,T/M 分别为 10.86 ± 3.31 、 9.23 ± 4.56 与 5.16 ± 2.52 ,总体比较组间差异有统计学意义($F=6.77$, $P=0.04$),两两比较,C 组与 A、B 两组间 T/M 差异均有统计学意义($P<0.05$),但 A、B 两组间 T/M 差异无统计学意义($P>0.05$)。

治疗前后病理学变化。目测大体肿瘤标本可见放

疗后肿瘤中心坏死组织较放疗前明显增多,并随放疗后观察时间的延长,坏死组织逐渐增多,肿瘤体积逐渐缩小。光镜下 A 组 C6 胶质瘤细胞束状密集排列,可见瘤巨细胞及明显病理性核分裂像,新生血管丰富,可见小灶状坏死。B 组尚见少量病理性核分裂像,出现灶状凝固性坏死,坏死成分较 A 组增多,血管生成明显。C 组肿瘤细胞呈大片坏死,细胞结构崩解,仅残存少量细胞及细胞核碎片(图 2)。A 组、B 组及 C 组肿瘤体积分别为 (8.61 ± 6.57) cm³、 (7.80 ± 7.31) cm³ 和 (5.21 ± 5.48) cm³,呈逐渐下降趋势。方差分析显示 A、C 组间差异具有统计学意义($P<0.05$),而 A、B 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫组织化学结果(图 3)表明放疗后 48 h MVD 较放疗前略增加,分别为 19.5 ± 1.96 和 17.9 ± 2.02 ,但差异无统计学意义($P>0.05$),放疗后 1 周 MVD 明显减低,为 8.4 ± 1.84 ,与放疗前相比差异具有统计学意义($P=0.00$)。相关性分析表明,放疗后 1 周肿瘤 T/M 变化与肿瘤体积及 MVD 变化均呈正相关(r 分别为 0.83、0.68, P 值均 <0.05),而放疗后 48 h T/M 变化仅与体积正相关($r=0.76$, $P<0.05$),与 MVD 无明显相关性。

讨 论

通过放疗前后肿瘤¹⁸F-FDG 摄取情况分析肿瘤治疗后生物学行为的改变,从而反应肿瘤细胞的增殖和生长状态,可评价放疗效果和鉴别复发或纤维化^[4,5]。

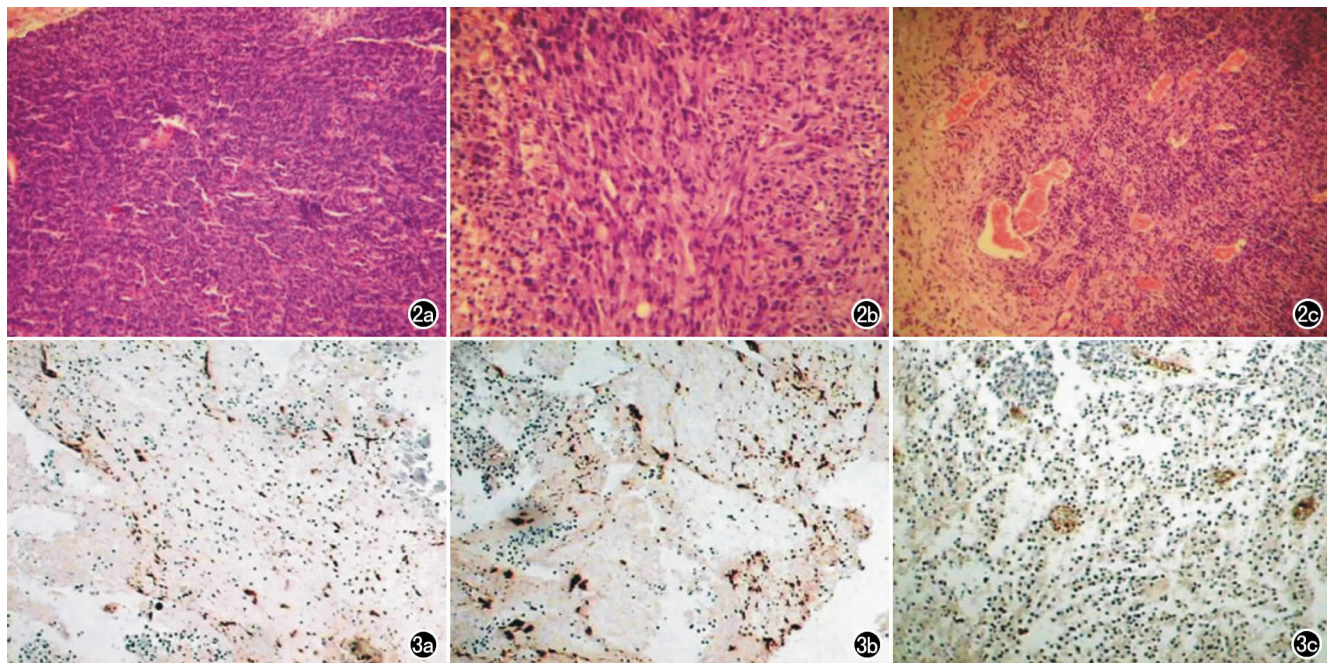


图 2 肿瘤标本病理图片($\times 40$,SP)。B 组肿瘤灶状坏死增多,C 组呈大片状坏死,细胞结构崩解。a) A 组肿瘤标本病理图片; b) B 组肿瘤标本病理图片; c) C 组肿瘤标本病理图片。图 3 肿瘤标本Ⅷ因子($\times 100$,SP)免疫组化染色图片。B 组染成棕色的肿瘤血管数较 A 组稍有增加,C 组明显下降。a) A 组肿瘤标本免疫组化图片; b) B 组肿瘤标本免疫组化图片; c) C 组肿瘤标本免疫组化图片。

治疗后病灶 FDG 摄取减低或接近正常组织表明治疗有效;相反,治疗后仍残存明显高代谢灶表明肿瘤病灶对治疗不敏感,往往提示预后不良。本研究将胶质瘤放疗前后 FDG PET/CT 显像变化与病理学变化进行比较,从病理水平探讨影响 FDG 摄取的机制,为 FDG PET 在胶质瘤放疗后疗效评估提供实验依据。

本研究结果显示在放疗后 48 h T/M 即开始下降,到 1 周显著下降;CT 观察肿瘤大小在放疗后 48 h 未见显著变化,1 周时肿瘤体积则显著减小。光镜下可见随着放疗后观察时间的延长,肿瘤细胞萎缩,碎裂及坏死逐渐增多,肿瘤细胞数目逐渐减低。C6 胶质瘤放疗后 FDG 摄取程度的变化,反映了肿瘤组织葡萄糖代谢的变化过程:放疗后 48 h,肿瘤核分裂减少并出现灶状坏死,坏死程度较放疗前增多,肿瘤细胞密度减低,从而导致组织细胞对葡萄糖的利用减少;放疗后 1 周,肿瘤坏死严重,仅残存少量细胞成分,葡萄糖的代谢功能严重受损。形态学变化是目前评价胶质瘤放疗疗效最常用的方法,对放疗后不同时间点肿瘤体积的统计分析发现,放疗后 48 h 及 1 周,肿瘤体积的变化均是影响 C6 胶质瘤 FDG 摄取的重要因素。

微血管密度是反映肿瘤恶性程度和增殖快慢较灵敏的指标^[6],对人脑胶质瘤的研究发现,肿瘤 FDG 摄取水平与 MVD 间具有显著的相关性^[7]。文献^[8]报道辐射引起的微血管损伤是影响肿瘤放疗反应的关键因素之一。本研究将微血管密度的变化与 T/M 进行相关性分析,结果显示,C6 胶质瘤微血管密度在放疗后 1 周迅速下降,且下降水平与肿瘤 FDG 摄取减低程度密切相关,因此可以通过 FDG PET 显像来反映放疗后 1 周微血管受辐射损伤的情况。在放疗后 48 h 微血管密度轻度升高,而 FDG 摄取则下降,两者表现不一致,导致这一显像的原因可能是:①辐射导致内皮细胞的破坏要在 48 h 以后才能观察到,且在放疗后早期,乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的激活使其调控的下游因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达增高,从而刺激微血管的生成^[9]。②MVD 虽然被广泛用于评价血管生成情况,但其无法区分肿瘤的固有血

管和新生血管,因而有可能高估肿瘤的血管生成情况^[10]。

综上,¹⁸F-FDG PET/CT 显像可以有效反映 C6 胶质瘤放疗后 1 周的病理学变化。除病理学变化以外,影响胶质瘤放疗后 FDG 摄取的因素还包括己糖激酶的活性、肿瘤细胞增殖活性以及肿瘤组织乏氧水平的变化等,这些指标如何影响 FDG 的摄取,尚需进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 李立伟,刘京璇,金泉. 16 例颅内胶质瘤术后并放射治疗后的¹⁸F-FDG PET 显像[J]. 中华核医学杂志,2001,21(1):14-16.
- [2] Hustinx R, Pourdehnad M, Kaschten B, et al. PET imaging for differentiating recurrent brain tumor from radiation necrosis[J]. Radiol Clin N Am, 2005, 43(1):35-47.
- [3] Foote RL, Weidner N, Harris J, et al. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61(3):745-753.
- [4] Van Baardwijk A, Baumert B, Bosmans G, et al. The current status of FDG-PET in tumour volume definition in radiotherapy treatment planning[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(4):245-260.
- [5] 贾志新,王全师,唐刚华,等. ¹⁸F-FDG PET 显像在肺癌治疗效果评价中的意义[J]. 中国临床医学影像杂志,2003,14(1):14-16.
- [6] 潘月龙,郑树,彭佳萍,等. 微囊化转 Maspin 基因细胞对乳腺癌微血管密度及肺转移影响的实验研究[J]. 中华医学杂志,2008,88(1):92-95.
- [7] Hannu J, Aronen, Francisco S, et al. High microvascular blood volume is associated with high glucose uptake and tumor angiogenesis in human gliomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1):2189-2200.
- [8] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis [J]. Science, 2003, 300(5622):1155-1159.
- [9] Benjamin J, Moeller, Yiting Cao, et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules[J]. Cancer Cell, 2004, 5(5):429-441.
- [10] Cher LM, Murone C, Lawrentschuk N, et al. Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using ¹⁸F-fluoromisonidazole, ¹⁸F-FDG PET, and immunohistochemical studies[J]. J Nucl Med, 2006, 47(3):410-418.

(收稿日期:2011-01-17 修回日期:2010-01-26)