

王明霜, 唐禹, 陈跃, 等. ^{111}In 标记的博来霉素复合物用于鉴别裸鼠高级和低级别胶质瘤的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 102 - 106.

Wang MS, Tang Y, Chen Y, et al. ^{111}In -labeled bleomycin complex for SPECT in differentiation of high- and low-grade gliomas in nude mice[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 102 - 106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 04. 018

^{111}In 标记的博来霉素复合物用于鉴别裸鼠高级和低级别胶质瘤的实验研究

王明霜¹, 唐禹², 陈跃¹, 冯悦¹, 赵岩¹, 陈琳¹

(1.西南医科大学附属医院核医学科,核医学与分子影像四川省重点实验室,泸州 646000;

2.四川大学原子核科学技术研究所,成都 610000)

【摘要】 目的 本研究以 ^{111}In 标记的博来霉素复合物(^{111}In -BLMC)标记为单光子发射计算机断层成像术(single-photon emission computed tomography, SPECT)追踪剂,观察裸鼠高级别和低级别胶质瘤的差异。**方法** 建立裸鼠胶质瘤模型,在注射 ^{111}In -BLMC后10 min进行SPECT检查,研究了34只裸鼠胶质瘤,包括22只高级别和12只低级别肿瘤裸鼠,对早期相和延迟相显像分别作半定量分析,以得出 ^{111}In -BLMC早期、延迟相摄取指数和滞留指数。**结果** ^{111}In -BLMC标记所有的SPECT均为阳性,在高级别胶质瘤组中,早期和延迟相 ^{111}In -BLMC摄取指数和滞留指数分别(3.47 ± 1.66)和(5.193 ± 1.49);在低级别胶质瘤组中,早期和延迟相 ^{111}In -BLMC摄取指数和滞留指数分别(1.59 ± 1.68)和(2.99 ± 1.36),且均具有统计学差异($P < 0.01$)。当摄取指数 < 1.898 时,诊断低级别胶质瘤的敏感性为66.67%,特异性为85.71%($P < 0.01$);当滞留指数 < 3.155 时,诊断低级别胶质瘤的敏感性为58.33%,特异性为63.66%($P < 0.01$)。**结论** ^{111}In -BLMC标记的脑胶质瘤SPECT可对术前肿瘤分级提供一定帮助,摄取指数和滞留指数可对肿瘤细胞的恶性程度作出比较准确的判断。

【关键词】 脑胶质瘤; ^{111}In ; 博来霉素; SPECT; 动物试验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 04-0102-05

^{111}In -labeled bleomycin complex for SPECT in differentiation of high- and low-grade gliomas in nude mice

WANG Mingshuang¹, TANG Yu², CHEN Yue¹, FENG Yue¹, ZHAO Yan¹, CHEN Lin¹

(1.Department of Nuclear Medicine, The Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Nuclear Medicine and Molecular Imaging Key Laboratory of Sichuan Province, No. 25, Taiping St., Luzhou 646000, China.

2. Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610000)

【Abstract】 Objective In this study, the ^{111}In -labeled bleomycin complex (^{111}In -BLMC) was used as a Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT)-tracking agent to differentiate the high-grade and low-grade gliomas in nude mice. **Methods** Thirty-four nude mice with gliomas, including 22 high-grade and 12 low-grade gliomas, were used in this study. SPECT was performed 10 min after the injection of ^{111}In -BLMC to the mice. Semi-quantitative analysis by imaging was performed at the early and delayed phases. The ^{111}In -BLMC early- and delayed-phase uptake indexes and retention indexes were obtained. **Results** All SPECTs were positive for ^{111}In -BLMC markers. In the high-grade glioma group, the early- and delayed-phase ^{111}In -BLMC uptake indexes and retention indexes were (3.47 ± 1.66) and (5.193 ± 1.49),

respectively. In the low-grade glioma group, the mid-, early-, and delayed-phase ^{111}In -BLMC uptake indexes and retention indexes were (1.59 ± 1.68) and (2.99 ± 1.36) , respectively, both differences were statistically significant ($P < 0.01$). When the intake index was < 1.898 , the sensitivity of diagnosis of low-grade glioma was 66.67% and the specificity was 85.71% ($P < 0.01$); when the retention index was < 3.155 , the sensitivity of diagnosis of low-grade glioma was 58.33%, and the specificity was 63.66% ($P < 0.01$). **Conclusions** ^{111}In -BLMC-labeled glioma SPECT can provide some help for preoperative tumor grading. The uptake index and the retention index enable a relatively accurate judgment of the degree of malignancy of gliomas.

【Keywords】 glioma; ^{111}In ; bleomycin; SPECT; animal experiment

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,占脑中所有恶性肿瘤的 80%。在美国,神经胶质瘤的平均发病率为每 10 万人 6.61 (6.57%~6.6%) 和 2003 年至 2011 年^[1]。胶质瘤起源于脑胶质细胞,根据其细胞类型根据组织学表现和生物分子状态进行分类,最常见于星形细胞瘤或少突神经胶质瘤,并根据其等级,低级(I-II 级)或高级(III-IV 级)^[2]。成人低级别胶质瘤的 10 年生存率约为 43%^[3]。据报道,少突胶质细胞瘤与星形细胞瘤相比具有相对更有利的结果。与 I 级和 II 级胶质瘤相比,III 级胶质瘤预后明显更差^[4]。最常见的颅内肿瘤,即 IV 级胶质瘤,也称为胶质母细胞瘤,中位生存期为 15 个月^[5]。准确评估肿瘤分级和类型对于最佳治疗计划至关重要。肿瘤的诊断,分类和分级是建立在活检或切除,与相当大的风险相关,包括死亡,特别是在大脑的中央区域^[6]。此外,活组织检查或亚全切除术的诊断可能受到样本不具代表性的限制,导致肿瘤分级的下降^[7],甚至可能会误导治疗计划,采取更保守的策略。此外,不能手术或不愿接受手术或肿瘤位于雄辩区域的患者可能不适合进行外科手术,即使他们有资格接受包括化疗和/或放疗在内的辅助治疗。

因此,即使目前没有理想的成像技术,也非常需要术前对脑肿瘤进行分级的替代方法,其中 PET 显像作为合理的替代方案。本研究合成 ^{111}In -博来霉素复合物(^{111}In -labeled bleomycin complex, ^{111}In -BLMC),并用作 SPECT 扫描的追踪剂,观察高级别和低级别胶质瘤的差异,现将方法和结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 实验材料

SPF 级 3 月龄雄性 SD 大鼠 34 只,,由西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2013-17],饲养于西南医科大学实验动物中心实验室[SYXK(川)2013-181]。实验前在实验室饲养 1 周适应新环

境。对大鼠进行分组:实验组 22 只,对照组 12 只。

SHG44 细胞和 U251 细胞胶质瘤细胞株购自于中国科学院上海细胞库;其他物品均由西南医科大学实验动物中心提供。 ^{111}In -BLMC 是由 13 个色谱不同的亚基组成,并由西南医科大学附属医院提供。用于放射标记前, ^{111}In -BLMC 溶于生理盐水,配制成 2 mg/mL,并通过缓冲液调成 pH 值为 7.35~7.45。该研究得到了西南医科大学附属医院伦理委员会同意并执行,并有签订知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

SHG44 细胞和 U251 细胞胶质瘤细胞于 1640 培养基(添加 10% 胎牛血清)培养。依据培养瓶细胞代谢产物及细胞密度给予换液及传代。接种细胞前,用 0.25% 胰酶消化并吹散细胞,吸出消化液,并加入含 1% 琼脂糖的无血清 1640 培养基为细胞悬浮,细胞悬液终浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.2.2 裸鼠成瘤实验

选择裸鼠腋下接种,接种前用 0.5% 碘伏对进针部位进行消毒。实验组裸鼠接种的细胞悬液为 SHG44 胶质瘤细胞,对照组接种的细胞悬液为 U251 细胞。穿刺注射器排除空气,吸入 0.2 mL 细胞悬液,从进针部位向前穿刺大约 1 cm,进行皮下注射。并每日测量一次裸鼠的肿瘤的体积,每次每只小鼠测量两次取平均值,并做详细记录,实验周期为首次治疗剂量给药后的第 16 天,实验结束后处死所有的肿瘤小鼠,取出肿瘤组织进行称重,按组记录,取平均值。实验结束后,每组随机抽取小鼠 3 只(包括实验组、对照组),进行病理切片显微镜观察。

1.2.3 显像方法

在进行扫描前,要求裸鼠禁食至少 6 h 以上。注射 ^{111}In -BLMC 前嘱咐所有服用加入过氯酸钾 100 mg 的饮用水。通过尾静脉注射 ^{111}In -BLMC 后,进行 22 帧动态序列($6 \times 10 \text{ s}$, $4 \times 15 \text{ s}$, $2 \times 30 \text{ s}$, $2 \times 60 \text{ s}$, $2 \times 150 \text{ s}$ 和 $6 \times 300 \text{ s}$),然后重建 2 个静态

FET PET 帧整个脑在 10~30 min (FET10-30) 和 20~40 min (FET20-40)。对于所有图像,应用默认随机,散射和死区时间校正以及基于低剂量 CT 的衰减校正。

1.2.4 图像结果处理

脑实质出现放射性物质可定义为异常放射性浓聚,除脑室内脉络膜外。选择肿瘤部位放射性浓聚最明显的横断面断层图像,确定 ROI。并采用镜影技术,在对侧相同部位勾画相同形状和大小的区域。分别对早期相和延迟相显像进行半定量分析。在 OM 线横断面上取 1 帧肿瘤放射性浓聚最明显的图像,确定肿瘤 ROI 并将对侧镜面部位定为本底,以 L/N 分别计算¹¹¹In-BLMC 早期和延迟相摄取指数,并计算滞留指数(RI)。RI=延迟摄取指数/早期摄取指数。

1.3 统计学方法

本次临床研究采用 SPSS17.0 软件包处理数据。计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,病灶的 T/N 比值采用 *t* 检验。ROC 曲线用于分析摄取指数和滞留指数在诊断胶质瘤的价值,并采用 *Z* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 基本资料

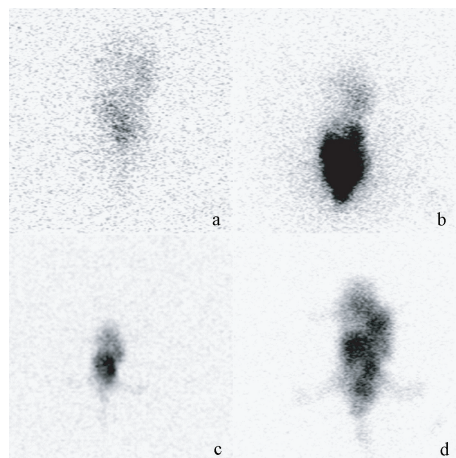
34 只脑胶质瘤裸鼠均接种成功,术后组织学提示实验组 22 只裸鼠为高级别胶质瘤,2 周后裸鼠的肿瘤体积为 $(567 \pm 124) \text{ mm}^3$,对照组 12 只为低级别胶质瘤,2 周后裸鼠的肿瘤体积为 $(531 \pm 108) \text{ mm}^3$ 。U251 细胞接种的裸鼠为对照组,SHG44 细胞接种的裸鼠为实验组,两组的鼠龄、性别、体重指数、肿瘤体积均无统计学差异。

2.2 摄取、滞留指数与脑胶质瘤组织学关联

¹¹¹In-BLMC 标记所有的 SPECT 均为阳性,见图 1 所示。在低级别胶质瘤组中(a 和 c 组),早期和延迟相¹¹¹In-BLMC 摄取指数和滞留指数分别 (1.59 ± 1.68) 和 (2.99 ± 1.36) ,在高级别胶质瘤组中(b 和 d 组),早期和延迟相¹¹¹In-BLMC 摄取指数和滞留指数分别 (3.47 ± 1.66) 和 (5.193 ± 1.49) ;如图 2 所示,有统计学差异(均 $P < 0.01$)。

2.3 摄取、滞留指数诊断高级别脑胶质瘤的 ROC 曲线

为进一步探讨¹¹¹In-BLMC 标记所有裸鼠的 SPECT 诊断胶质瘤的敏感性和特异性,研究人员将



注:a 和 c 为对照组裸鼠(低级别胶质瘤),其中 a 为 24 h 后¹¹¹In-BLMC 标记的 SPECT 结果,c 为 72 h 后¹¹¹In-BLMC 标记的 SPECT 结果;b 和 d 为实验组裸鼠(高级别胶质瘤),其中 b 为 24 h 后¹¹¹In-BLMC 标记的 SPECT 结果,d 为 72 h 后¹¹¹In-BLMC 标记的 SPECT 结果。

图 1 ¹¹¹In-BLMC 标记的 SPECT 在实验组和对照组脑胶质瘤裸鼠的结果

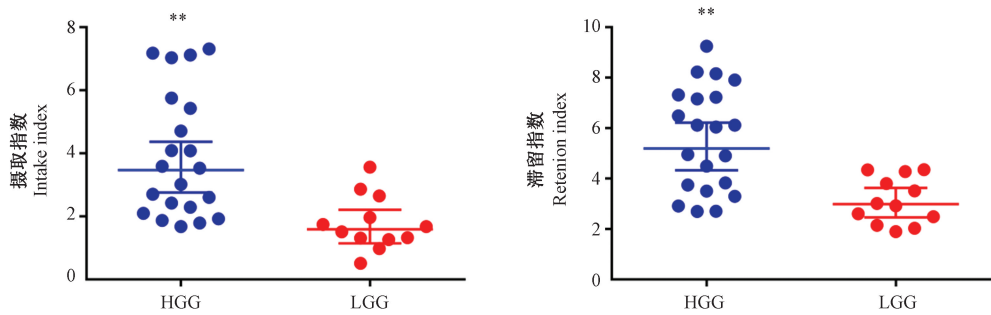
Note. a and c are control nude mice (low grade glioma). a is the SPECT result of ¹¹¹In-BLMC labeling after 24 h. c is the SPECT result of ¹¹¹In-BLMC labeling after 72 h. b and d are the experimental group of nude mice (high-grade glioma). b is the SPECT result of ¹¹¹In-BLMC labeling after 24 h. d is the SPECT result of ¹¹¹In-BLMC labeling after 72 h.

Figure 1 Results of ¹¹¹In-BLMC-labeled SPECT in nude mice with glioma in the experimental group and the control group

进行 ROC 曲线分析,当摄取指数 < 1.898 时,诊断低级别胶质瘤的敏感性为 66.67%,特异性为 85.71% ($P < 0.01$);当滞留指数 < 3.155 时,诊断低级别胶质瘤的敏感性为 58.33%,特异性为 63.66% ($P < 0.01$),ROC 曲线如图 3 所示。

3 讨论

SPECT 显像是现代诊断肿瘤的重要手段之一,肿瘤显像分子探针可以分为两大类,非特异性阳性显像与特异性肿瘤显像^[8]。18F-FDG 是现阶段用于 PET 肿瘤诊断的重要的非特异性正电子显像剂,但是由于其选择性低,特异性不强,不具有靶向性,在现代肿瘤诊断中已经不能满足临床需要。特异性肿瘤正电子显像剂,由于可以与肿瘤受体特异性结合,在肿瘤诊断中更具有特异性与准确性。癌症病人早诊断早治疗是降低患者危害的最佳办法,因此靶向的显像剂与靶向抗肿瘤药物正是最佳选择^[9]。肿瘤细胞中过度表达的受体是诊断和治疗



注:HGG:高级别胶质瘤,LGG:低级别胶质瘤,与 LGG 比较,** $P<0.01$ 。

图 2 不同级别胶质瘤的摄取和延迟指数

Note. HGG, High-grade glioma. LGG, Low-grade glioma. Compared with the LGG group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Uptake and delay index of the gliomas of different grades

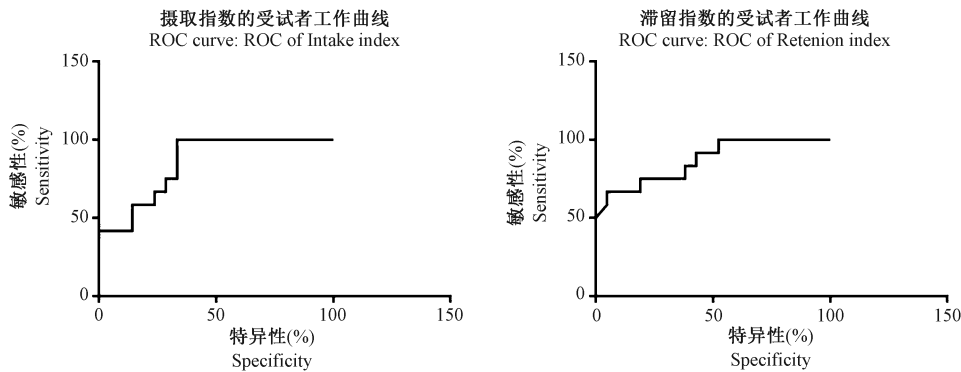


图 3 摄取指数和滞留指数诊断胶质瘤的 ROC 曲线

Figure 3 ROC curve of uptake index and retention index in the diagnosis of glioma

肿瘤的一个潜在靶点。通过检测肿瘤细胞中受体的表达程度可以准确对肿瘤进行诊断、分期、监测治疗效果等。所以新型靶向显像剂的研发已经成为了当今最热门的话题之一。

^{111}In 是通常用于闪烁显像的放射性核素($t_{1/2}$: 2.81 d, 172 和 247keV 光子发射),平均每个衰变发射 14.7 个俄歇电子(平均能量:0.46 keV),也可能适合放疗。具有 $<2\text{ keV}$ 的平均能量的俄歇电子是在组织中具有亚细胞路径长度(2~500 nm)的高 LET 辐射。俄歇电子发射放射性药物当细胞内化到细胞质中时对细胞具有高度毒性,特别是如果掺入到 DNA 中可能导致染色体损伤,并且已经被认为是肿瘤的放射治疗剂。 ^{111}In 与多种纳米粒子如 DTPA-A5-CCPM、DTPA-CCPM、DOTA/Cy5.5/Herceptin 等形成的复合物在体内有着良好的分布,通过 SPECT/NIRF 成像可以观察到高肿瘤积聚和强的肿瘤与正常组织的对比,用于小鼠肿瘤的多模态成像^[10-12]。

BLMC 在生理和病理生理条件下启动内在的凋亡途径。发现 BLM 表达的降低与肿瘤促进和自身

免疫相关,而过度表达抑制肿瘤生长和耐药性,因为癌细胞抑制 BLMC 表达和稳定性。除了其在正常的动态平衡的作用,BLMC 已经成为肿瘤发生的调节中的球员,因此获得关注,作为一个合理的目标化疗。BLMC 表达和稳定性的调节在多个层面复杂和调节,转录,转录后,翻译后(优选通过磷酸化和泛素化),表观遗传(通过启动子乙酰化或甲基化),包括 miRNA。此外,可以利用对 BLMC 表达和稳定性的控制来增强化学疗效,克服耐药性并选择抗癌药物方案,因为各种化疗剂利用 BLMC 作为细胞死亡的执行者^[13]。由于其有效的抗肿瘤活性,许多 BH3 模拟物例如 ABT-737, ABT-263, obatoclax, AT-101 和 A-1210477 已被开发并进入临床试验。更有可能的是,在不久的将来,控制 BLMC 表达和稳定性的策略最终导致基于 BLMC 的用于癌症治疗的治疗方案。

^{111}In 与 BLMC 通过一定条件形成稳定的复合物后,由于其二者本身对肿瘤具有的杀伤性,同时对某些肿瘤的特异性结合,使其能够在肿瘤的瘤体内停滞一定的时间,达到肿瘤显影以及一定的治疗

作用, SPECT 的图像清晰, 病灶定位准确, 所以这种复合显像剂在临床诊断方面具有其自身的优势。癌症的死亡率偏高, 究其主要原因是靶向性显像剂品种少和早期 F18-FDG 诊断不灵敏, 同时靶向抗癌药物少。所以研发诊断肿瘤的特异性显像剂尤为重要, 着手以 BLMC 进行¹¹¹In 标记, 从而得到新的肿瘤靶分子影像探针, 确定他们的结构表征与药代动力学参数。通过在不同肿瘤动物模型上进行 SPECT 显像, 确定其在不同肿瘤中的构效关系, 筛选出最优靶向性最高的特异性肿瘤^[14-15]。并为将来将其进行转化医学研究做好基础工作, 丰富肿瘤的显像诊疗一体化。并将其应用于临床, 提高肿瘤患者的生存率。

本实验结果也证实使用¹¹¹In-BLMC 对于在低级别和高级别脑胶质瘤患者中出现了很好的追踪差异。低级别脑胶质瘤显示出少量或基本不吸收, 而在高级别脑胶质瘤显示出显著的吸收。这可能意味着¹¹¹In-BLMC 能够优先与高级别胶质瘤表达的相关蛋白结合, 从而出现较大的差异。

综上, 研究人员认为¹¹¹In-BLMC 能够作为 SPECT 的追踪剂, 从而区别高级别和低级别脑胶质瘤, 进而为临床诊断和术前提供参考价值。

参考文献:

[1] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011 [J]. *Neuro Oncol.* 2014, 4:iv1–63.

[2] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. *Acta Neuropathol.* 2016, 131 (6): 803–820.

[3] Smoll NR, Gautschi OP, Schatlo B, et al. Relative survival of patients with supratentorial low-grade gliomas [J]. *Neuro Oncol.* 2012, 14 (8): 1062–1069.

[4] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas [J]. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005, 64 (6): 479–489.

[5] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med.* 2005, 352 (10): 987–996.

[6] Tobin WO, Meyer FB2, Keegan BM. Diagnostic yield and safety of cerebellar and brainstem parenchymal biopsy [J]. *World Neurosurg.* 2015, 84 (6): 1973–1976.

[7] Jackson RJ, Fuller GN, Abi-Said D, et al. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas [J]. *Neuro Oncol.* 2001, 3 (3): 193–200.

[8] Slasnikova TA, Rosenkranz AA, Morozova NB, et al. Preparation, cytotoxicity, and in vivo antitumor efficacy of ¹¹¹In-labeled modular nanotransporters [J]. *Int J Nanomedicine.* 2017, 12: 395–410.

[9] Li HK, Morokoshi Y, Daino K, et al. Transcriptomic signatures of auger electron radioimmunotherapy using nuclear targeting ¹¹¹In-trastuzumab for potential combination therapies [J]. *Cancer Biother Radiopharm.* 2015, 30 (8): 349–358.

[10] Shih YH, Peng CL, Lee SY, et al. ¹¹¹In-cetuximab as a diagnostic agent by accessible epidermal growth factor (EGF) receptor targeting in human metastatic colorectal carcinoma [J]. *Oncotarget.* 2015, 6 (18): 16601–16610.

[11] Patel N, Able S, Allen D, et al. Monitoring response to anti-angiogenic mTOR inhibitor therapy in vivo using ¹¹¹In-bevacizumab [J]. *EJNMMI Res.* 2017; 7 (1): 49.

[12] Chakraborty S, Shi J, Kim YS, et al. Evaluation of ¹¹¹In-labeled cyclic RGD peptides: tetrameric not tetravalent [J]. *Bioconjug Chem.* 2010, 21 (5): 969–978.

[13] Burow GB, Franks CD, Acosta-Martinez V, et al. Molecular mapping and characterization of BLMC, a locus for profuse wax (bloom) and enhanced cuticular features of Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench.) [J]. *Theor Appl Genet.* 2009, 118 (3): 423–431.

[14] Jääskelä-Saari HA, Grénman R, Ramsay HA, et al. Indium-111-bleomycin complex in squamous cell cancer xenograft tumors of nude mice [J]. *Cancer Biother Radiopharm.* 2005, 20 (4): 426–435.

[15] Korppi-Tommola TI, Huhmar H, Aronen HJ, et al. ¹¹¹In-labelled bleomycin complex for the differentiation of high- and low-grade gliomas [J]. *Nucl Med Commun.* 1999, 20 (2): 145–152.

[收稿日期] 2018–09–17