



· 论著 ·

乳腺癌淋巴微转移模型的建立及皮内与静脉注射¹⁸F-脱氧葡萄糖的诊断效果

李永霞^{1,2,3}, 郑莹莹^{1,2,3}, 孙玉云^{1,2,3}, 何思敏^{1,2,3,4}, 罗建民^{1,2,3}, 张建平^{1,2,3,4},曹天野^{1,2,3,4}, 王明伟^{1,2,3,4}, 章英剑^{1,2,3,4}

1. 复旦大学附属肿瘤医院核医学科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032 ;
2. 复旦大学生物医学影像研究中心, 上海 200032 ;
3. 上海市质子重离子医院核医学科, 上海 201315 ;
4. 上海分子影像探针工程技术研究中心, 上海 200032

[摘要] 目的: 探讨乳腺癌小鼠区域性局部皮内和静脉注射¹⁸F-脱氧葡萄糖 (¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG) 后瘤周淋巴结PET/CT成像的差异, 评估¹⁸F-FDG在肿瘤淋巴结微转移中的成像效果。方法: 构建4T1原位乳腺癌淋巴结微转移模型, 区域性局部皮内和次日静脉注射¹⁸F-FDG, 进行小动物PET/CT显像, 对淋巴结摄取¹⁸F-FDG较高者隔日再行瘤周局部皮内注射锝硫胶体 (technetium sulfur colloid, ^{99m}Tc-SC) 后行小动物SPECT/CT成像。显像完成后, 取淋巴结组织进行H-E染色, 以及上皮细胞角蛋白5/6 (cytokeratin 5/6, CK5/6) 和葡萄糖转运蛋白1 (glucose transporter-1, Glut-1) 免疫组织化学染色。结果: 局部皮内注射时, 有微转移的小鼠瘤周淋巴结摄取¹⁸F-FDG异常增高, ID%/g值为 19.2 ± 2.0 ($n=2$), 显著高于对照 (自身对照时对侧淋巴结; ID%/g值为 6.8 ± 0.4) 和无转移小鼠 (ID%/g值为 7.2 ± 0.4) 相同位置淋巴结 ($P<0.001$)。静脉注射时, 未发现任何小鼠淋巴结摄取异常增高 (ID%/g值为 2.5 ± 0.5 ; $P=0.870$)。局部皮内注射^{99m}Tc-SC时, 可观测到多个腋淋巴结, 其中1个瘤周淋巴结与¹⁸F-FDG高摄取淋巴结位置相吻合。H-E染色和CK5/6免疫组织化学染色证实, ¹⁸F-FDG高摄取的淋巴结为发生微转移的淋巴结。结论: 区域性局部皮内注射¹⁸F-FDG能定性前哨淋巴结, 比静脉注射法早期发现肿瘤微转移淋巴结。

[关键字] 乳腺癌; 淋巴结微转移; 皮内注射; 静脉注射; ¹⁸F-脱氧葡萄糖PET/CT成像

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.03.007

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639 (2018) 03-0164-05

Establishing and diagnosis of lymph node micrometastasis with subcutaneous or intravenous injection of ¹⁸F-FDG by PET/CT imaging in mouse breast cancer LI Yongxia^{1,2,3}, ZHENG Yingying^{1,2,3}, SUN Yuyun^{1,2,3}, HE Simin^{1,2,3,4}, LUO Jianmin^{1,2,3}, ZHANG Jianping^{1,2,3,4}, CAO Tianye^{1,2,3,4}, WANG Mingwei^{1,2,3,4}, ZHANG Yingjian^{1,2,3,4} (1. Department of Nuclear Medicine, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Center of Biomedical imaging, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Proton Heavy Ion Center, Shanghai 201315, China; 4. Shanghai Engineering Research Center of Molecular Imaging Probe, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CAO Tianye E-mail: ctyfudan@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the difference in the identification of lymph node micrometastasis between regional subcutaneous injection and intravascular injection of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) by PET/CT imaging in mouse breast cancer. **Methods:** The mouse 4T1 breast cancer lymph node micrometastasis model was established. The regional subcutaneous and intravascular injection of ¹⁸F-FDG was performed for PET/CT imaging

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81401514)。

通信作者: 曹天野 E-mail: ctyfudan@163.com

in two day, respectively. For the higher ^{18}F -FDG uptake in lymph node of mice, SPECT/CT imaging was also performed by subcutaneous injection of technetium sulfur colloid ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SC). H-E staining and immunohistochemistry of epithelial cytokeratin 5/6 (CK5/6) and glucose transporter 1 (Glut-1) were measured. **Results:** The uptake value (ID%/g) of ^{18}F -FDG in lymph nodes was 19.2 ± 2.0 ($n=2$) by subcutaneous injection in micrometastasis group, which was significantly higher than the contralateral ones (ID%/g of 6.8 ± 0.4) and those without micrometastasis (ID%/g of 7.2 ± 0.4) ($P<0.0001$). No increased uptake of ^{18}F -FDG was observed in any mouse lymph node (ID%/g of 2.5 ± 0.5) ($P=0.870$) by intravascular injection. Moreover, SPECT/CT imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SC revealed multiple axillary lymph nodes, one of which had a well-matched lymph node with high ^{18}F -FDG uptake. H-E staining and immunohistochemistry of CK5/6 confirmed that high ^{18}F -FDG uptake in lymph nodes revealed micrometastatic. **Conclusion:** Regional subcutaneous injection of ^{18}F -FDG can qualitatively identify micrometastatic sentinel lymph nodes earlier than intravenous injection, which is worthy of clinical application.

[**Key words**] Breast cancer; Lymph node micrometastasis; Subcutaneous injection; Intravascular injection; ^{18}F -fluorodeoxyglucose PET/CT imaging

静脉注射 ^{18}F -脱氧葡萄糖(^{18}F -fluoro-deoxyglucose, ^{18}F -FDG)后的代谢显像已广泛用于恶性肿瘤分期和疗效评价^[1],包括用于乳腺癌腋窝淋巴结和内乳淋巴结转移的诊断^[2-4]。近年来有研究者采用手持型高能 γ 探测器,用于 ^{18}F -FDG静脉注射后术中指导乳腺癌病灶清除^[5],还有研究者采用局部皮内注射 ^{18}F -FDG进行小鼠前哨淋巴结显像^[6],提出“正电子淋巴结显像”(positron lymphography)的概念。本研究构建乳腺癌淋巴微转移小鼠模型,比较区域性皮内与静脉注射 ^{18}F -FDG后小鼠PET/CT成像,以评估不同注射方式下 ^{18}F -FDG PET/CT对乳腺癌淋巴结微转移成像的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和动物

4T1乳腺癌肿瘤细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。SPF级8周龄BALB/c雌性裸鼠6只,体质量20~25 g,购于复旦大学上海医学院实验动物部,显像前2周于实验中心饲养。

1.1.2 试剂和仪器

^{18}F -FDG和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SC由本科室自制。DMEM培养基购自Gibco公司。小动物PET/CT(型

号Inveon,购自德国Siemens公司)、小动物SPECT/CT(型号Bioscan,匈牙利Mediso公司)均为本科室拥有。

1.1.3 细胞培养及肿瘤淋巴微转移动物模型的建立

细胞培养主要参考美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)提供的方法。4T1细胞用DMEM培养基,于37℃、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中常规培养,每3~4 d在细胞对数生长期时按1:3传代培养。以无血清DMEM培养基洗涤,调整活细胞密度为 1×10^6 个/mL,制成细胞悬浊液,分别在6只雌性裸鼠右侧第二乳房脂肪垫内注射0.1 mL。成瘤3 d后,手术取出部分瘤,术后第11天成像。有创伤操作均在洁净麻醉下进行。小鼠饲养于标准动物房。

1.2 研究方法

1.2.1 荷瘤小鼠淋巴结PET/CT和SPECT/CT显像

严格遵守《实验动物科学与管理》,所有操作过程均于麻醉(1%~2%异氟烷与空气混合物)状态下进行。每次 ^{18}F -FDG成像前禁食4 h,先在左、右前爪皮内分别等量注射3.7 MBq ^{18}F -FDG,总剂量为7.4 MBq,1 h后小动物PET/CT显像;24 h后尾静脉注射7.4 MBq ^{18}F -FDG,再次显像。PET/CT显像按三维模式采集10 min静态图像,并采用OSEM3D/MAP法重建,获得衰减校正后的PET/CT融合

图像。然后在疑似有淋巴结微转移的荷瘤鼠左、右两侧前爪皮内分别注射3.7 MBq锝硫胶体 (technetium sulfur colloid, ^{99m}Tc-SC), 1 h后进行SPECT/CT静态显像, 并测量瘤周淋巴结和对侧淋巴结放射性占注入量的百分比 (%ID/g)。

显像后处死裸鼠, 摘取肿瘤组织、瘤周淋巴结和对侧淋巴结标本, 用10%中性甲醛溶液固定。

1.2.2 病理学分析

荷瘤裸鼠肿瘤组织经10%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 切片厚5 μm, 行H-E染色。用SAB法分别检测肿瘤组织、瘤周转移淋巴结、对侧阴性淋巴结中上皮细胞角蛋白5/6 (cytokeratin 5/6, CK5/6) 和葡萄糖转运蛋白1 (Glut-1) 的水平。

1.2.3 统计学处理

采用Image-Pro Plus 6.0分析阳性细胞率, SPSS 19.0软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ¹⁸F-FDG不同注射方式下荷瘤小鼠PET/CT成像差异

前爪皮内注射¹⁸F-FDG后, 有2只小鼠瘤周腋下淋巴结摄取值异常增高, ID%/g值为 19.2 ± 2.0 , 明显高于对侧淋巴结 (ID%/g为 6.8 ± 0.4) 及其他4只小鼠相同位置淋巴结 (ID%/g为 7.2 ± 0.4) ($P < 0.001$; 图1A)。静脉注射时, 所有小鼠瘤周腋下淋巴结几乎与背景相当 (图1B), ID%/g值为 2.5 ± 0.5 。

此外, 瘤周淋巴结摄取较高的荷瘤小鼠前爪皮内注射传统淋巴结显像剂^{99m}Tc-SC后1 h, 可观测到细长淋巴引流区域, 两侧出现4个放射性摄取增高淋巴结, ID%/g值约为 0.32 ± 0.3 , 差异无统计学意义 ($P = 0.415$)。瘤周侧的一个淋巴结与¹⁸F-FDG高摄取淋巴结位置相吻合。

2.2 4T1乳腺癌淋巴结微转移的免疫组织化学结果

解剖后发现, 皮内注射¹⁸F-FDG摄取较高的小鼠 (2/6) 瘤周淋巴结为红色稍大淋

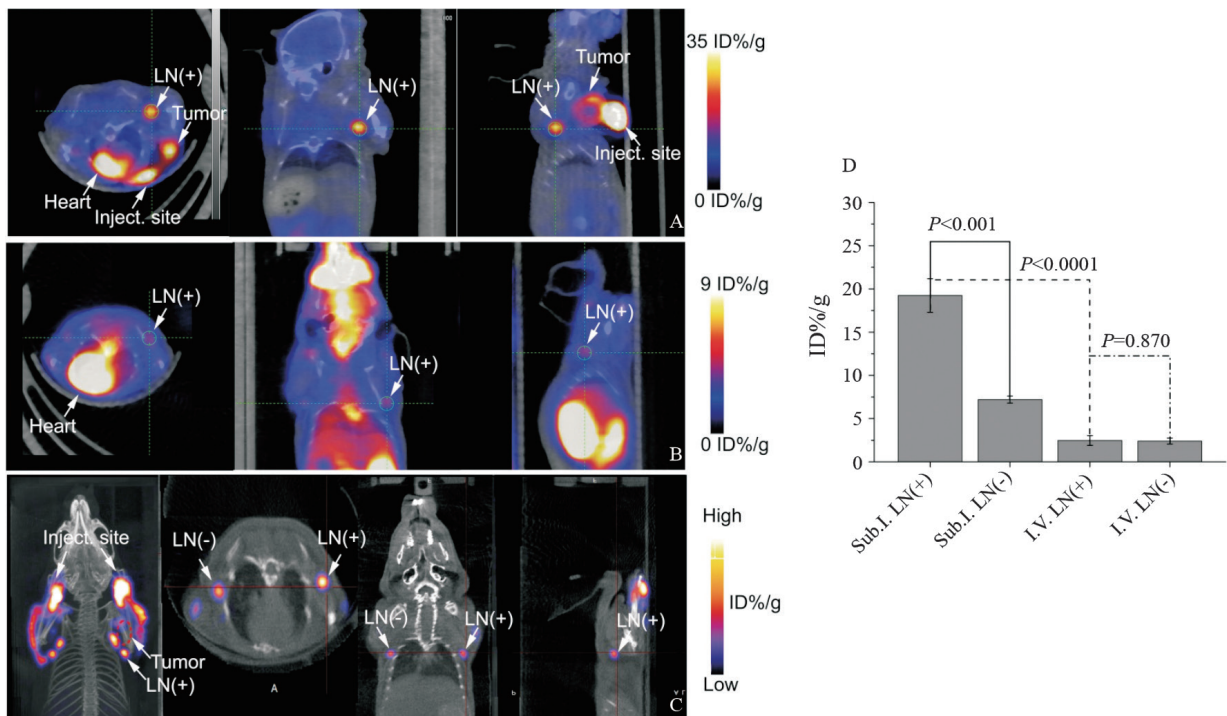


图1 不同注射方式下的PET和SPECT成像图及摄取值

A: 同一只荷瘤小鼠, 前爪皮内注射; B: 尾部静脉注射¹⁸F-FDG后1 h的肿瘤PET/CT成像剖面图 ($n=3$); C: 前爪皮内注射淋巴显像剂^{99m}Tc-SC后1 h SPECT/CT成像的肿瘤最大密度投影图和剖面图 ($n=3$)

巴结（图2），CK5/6呈强阳性，阳性率为（73.9 ± 7.1）%。HE染色显示淋巴结结构未发生破坏，证明其为微转移淋巴结^[7]。定量分析¹⁸F-FDG摄取较低小鼠（4/6）的瘤周淋巴

结，CK5/6阳性率为（10.1 ± 4.7）%（ $P < 0.0002$ ）。此外，阳性转移淋巴结中Glut-1阳性率为（51.9 ± 11.5）%，明显高于阴性淋巴结的（15.2 ± 1.3）%（ $P < 0.01$ ）。

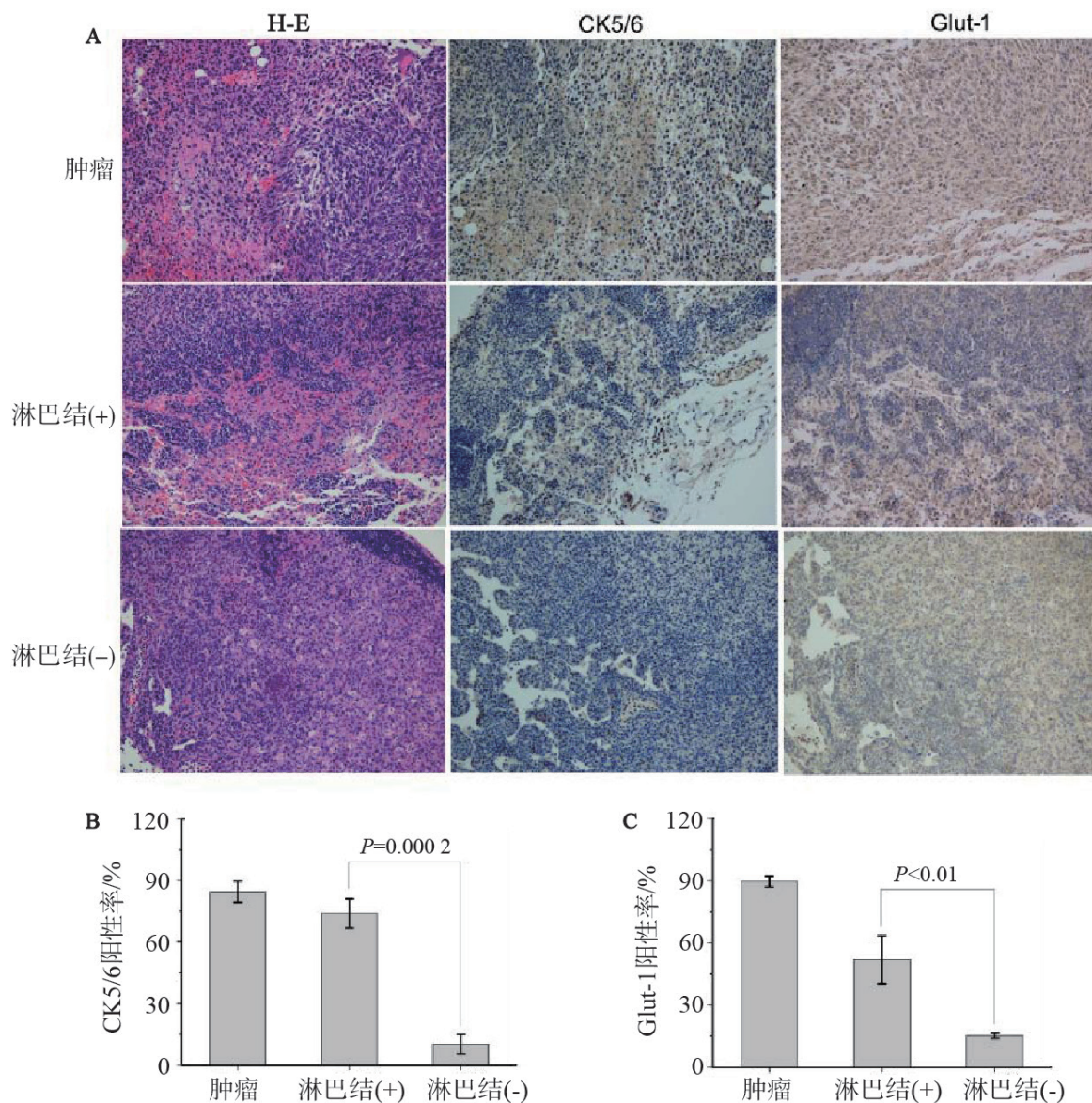


图2 组织病例特性鉴定

A: 肿瘤组织、阳性转移淋巴结和阴性淋巴结的H-E染色及免疫组织化学染色（×200）；B-C: 不同组织中CK5/6（B）和Glut-1（C）的阳性表达率

3 讨论

前哨淋巴结活检较多用于乳腺癌、黑色素瘤及子宫颈癌等的淋巴结分期、预后分析和决定是否进行淋巴结清扫^[8]。该方法通常使用染料和（或）放射性药物^{99m}Tc-SC在瘤周皮内局部注射以定位前哨淋巴结，然后通过病理分析

观察其是否有转移，如有转移则进一步开展淋巴结清扫^[9-11]。因此，这类“淋巴结显像术”仅适用于前哨淋巴结定位，不能定性。虽然其定位准确率达94%^[12]，但识别淋巴结是否转移或微转移有赖于病理学检查结果。此外，注射过量或注射压力不当会使区域淋巴结过量显示，难以决定前哨淋巴结数量^[13]。静脉注射

¹⁸F-FDG后全身PET/CT显像, 可发现较大的转移性淋巴结, 这些宏转移淋巴结中通常葡萄糖代谢增高; 而静脉注射¹⁸F-FDG使放射性呈全身分布, 微转移淋巴结常因放射性摄入不足而难以显示。

Thorek等^[6]首次提出“正电子淋巴显像”, 证实可通过皮内注射¹⁸F-FDG定位正常小鼠淋巴结位置, 1 h后淋巴结ID%/g值为2~8, 与本研究阴性淋巴结的ID%/g值(7.2 ± 0.4)相当。转移淋巴结高摄取的原因, 可能主要是局部注射后经淋巴管进入淋巴结的放射性浓度远高于静脉注射法, 从而容易显示肿瘤细胞数量不多但葡萄糖代谢增高的微转移, 这一点与转移淋巴结和阴性淋巴结的Glut-1阳性率相吻合。

本研究建立的乳腺癌淋巴结微转移模型证实, 局部注射¹⁸F-FDG比静脉注射能更好地显示淋巴结转移, 原位接种再手术去除部分瘤体的方法可促使淋巴结微转移。淋巴结CK5/6结果证实转移率约为33% (2/6), 与局部皮内注射¹⁸F-FDG成像判断的淋巴结转移率一致。值得一提的是, 只有阳性淋巴结有较高的¹⁸F-FDG摄取, 其余瘤周阴性淋巴结则不然。目前, 国外正在进行多项临床试验, 以验证不同注射方式(瘤内、间质注射等)下的“正电子淋巴显像”效果(临床试验编号: NCT02285192), 其结果将于近几年公布。此外, “正电子淋巴显像”可结合“切伦科夫成像”帮助术中清扫淋巴结^[6], 但临床上可能会遇到一些问题, 如人体成像相对于动物实验需更长采集时间, 人体组织也可能对切伦科夫信号有干扰。因此, “正电子淋巴显像”的临床应用尚需时日。

综上所述, 本研究构建了小鼠乳腺癌淋巴结微转移模型, 对比不同注射方式(局部皮内与静脉注射)及不同显像剂(¹⁸F-FDG与^{99m}Tc-SC)时瘤周淋巴结成像, 发现皮内注射¹⁸F-FDG能更好地实现术前诊断乳腺癌淋巴结微转移。

[参考文献]

- [1] SINGNURKAR A, POON R, METSER U. Comparison of ¹⁸F-FDG-PET/CT and ¹⁸F-FDG-PET/MR imaging in oncology: a systematic review [J]. *Ann Nucl Med*, 2017, 31(5): 366-378.
- [2] GROHEUX D, MANKOFF D, ESPIÉ M, et al. ¹⁸F-FDG PET/CT in the early prediction of pathological response in aggressive subtypes of breast cancer: review of the literature and recommendations for use in clinical trials [J]. *Eur J Nucl Med Mol I*, 2016, 43(5): 983-993.
- [3] KITAJIMA K, FUKUSHIMA K, MIYOSHI Y, et al. Diagnostic and prognostic value of ¹⁸F-FDG PET/CT for axillary lymph node staging in patients with breast cancer [J]. *Jpn J Radiol*, 2016, 34(3): 220-228.
- [4] COOPER K I, HARMAN S, MENG Y, et al. Positron emission tomography (PET) for assessment of axillary lymph node status in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(3): 187-198.
- [5] ORSARIA P, CHIARAVALLOTI A, FIORENTINI A, et al. PET probe-guided surgery in patients with breast cancer: proposal for a methodological approach [J]. *In Vivo*, 2017, 31(1): 101-110.
- [6] THOREK D L, ABOU D S, BCATTIC B J, et al. Positron lymphography: multimodal, high-resolution, dynamic mapping and resection of lymph nodes after intradermal injection of ¹⁸F-FDG [J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(9): 1438-1445.
- [7] BAO L, HAQUE A, JACKSON K, et al. Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(2): 838-851.
- [8] GRADISHAR W J, ANDERSON B O, BALASSANIAN R, et al. Invasive breast cancer version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016, 14(3): 324-354.
- [9] 章英剑, 潘张弛, 周敏, 等. 乳腺癌前哨淋巴结显像研究 [J]. *中华核医学杂志*, 2003, 23(4): 197-200.
- [10] 刘哲斌, 吴昊, 黄晓燕, 等. 乳腺癌前哨淋巴结活检中亚甲蓝与亚甲蓝、同位素联合示踪的比较研究 [J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(11): 840-843.
- [11] 孙晓, 王永胜, 宋现让, 等. 乳腺癌前哨淋巴结术中分子诊断的价值 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(2): 138-141.
- [12] AHMED M, PURUSHOTHAM A D, DOUEK M. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(8): 351-362.
- [13] 陆晓聆, 袁慧瑜, 曹天野, 等. ^{99m}Tc-硫胶体不同注射体积在乳腺癌前哨淋巴结定位中的对比分析 [J]. *肿瘤影像学杂志*, 2017, 26(3): 193-198.

(收稿日期: 2018-01-05 修回日期: 2018-05-30)