

乳腺肿瘤生长抑素受体表达与生长抑素受体显像

王佳琼 王自正 姚薇萱 王峰

【摘要】 目的 探讨生长抑素受体(SSTR)显像对乳腺癌的诊断价值。方法 15例乳腺癌患者术前进行^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像,勾画感兴趣区,计算瘤体与对侧正常组织的放射性比值(T/N),术后采用逆转录-聚合酶链反应检测肿瘤组织 SSTR1~SSTR5 mRNA 的表达,SP 免疫组化法比较该15例乳腺癌和18例乳腺良性病变组织 SSTR2 和 SSTR5 的表达水平。结果 ① 15例乳腺癌患者^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像均为阳性, T/N 为 1.873 ± 0.341 ; ② 15例乳腺癌组织的 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5 mRNA 表达阳性率分别为 100%(15/15)、93.30%(14/15)、100%(15/15)、46.70%(7/15)、86.70%(13/15),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参基因计算的 mRNA 表达量,从高到低分别为 SSTR3、SSTR1、SSTR2、SSTR5、SSTR4, SSTR2 mRNA 表达水平与乳腺癌显像 T/N 呈正相关,有显著的统计学意义($r=0.728, P<0.01$); ③ SP 免疫组化结果显示,乳腺癌组织的 SSTR2 和 SSTR5 的表达明显高于乳腺良性病变组织。结论 乳腺癌组织有丰富的 SSTR 表达,明显高于乳腺良性病变组织,^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像对乳腺癌有较好的靶向诊断价值。

【关键词】 乳腺肿瘤; 受体,生长抑素; 锝; 奥曲肽

【中图分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)01-0017-05

Somatostatin receptor scintigraphy and somatostatin receptors expression in breast neoplasm

WANG Jia-qiong, WANG Zi-zheng, YAO Wei-xuan, WANG Feng

(Department of Nuclear Medicine, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the value of ^{99m}Tc-octreotide somatostatin receptor (SSTR) scintigraphy in breast cancer. **Methods** 15 breast cancer patients underwent ^{99m}Tc-octreotide SSTR scintigraphy before surgery, and tumor to normal tissue ratio (T/N) was calculated. mRNA expression of SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5 was detected by RT-PCR after surgery. And SSTR2 and SSTR5 expressions were detected by immunohistochemical staining in these 15 breast carcinoma as well as other 18 benign breast tissue. **Results** All of the 15 breast cancer patients showed intense uptake of ^{99m}Tc-octreotide, and T/N values were 1.873 ± 0.341 . All five SSTR sub-types were variably expressed at the mRNA level in breast cancer with 100%(15/15) amples showing SSTR1, 93.30%(14/15) SSTR2, 100%(15/15) SSTR3, 46.70%(7/15) SSTR4 and 86.70%(13/15) SSTR5. Levels of SSTR mRNA, when corrected for glyeraldehyde 3-phosphaate dehydrogenase gene levels, were highest for SSTR3 followed by SSTR1, SSTR2, SSTR5, and SSTR4. Good correlation was obtained between the ratio of T/N and the expression of SSTR2 mRNA ($r=0.728, P<0.01$). Both the expression of SSTR2 and SSTR5 are higher in malignant ones than in benign breast tissues. **Conclusion** The results indicate that there was high expression of SSTR in breast cancer. SSTR scintigraphy is of great value in targeted detection of breast cancer.

【Key words】 Breast cancer; Receptor, somatostatin; Technetium; Octreotide

近年来,生长抑素受体(somatostatin receptors, SSTR)显像应用于诊断肿瘤以及利用生长抑素类似物治疗肿瘤在国外已有报道,其应用基础是组织 SSTR 表达量的多少。本文对15例乳腺癌患者术前进行^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像,术后检测肿瘤组织

SSTR 的表达水平,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 临床资料

我院15例女性乳腺癌患者,年龄43~78岁,平均59.8岁。术前行^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像,术后病理检查证实均为浸润性乳腺癌。

1.2 显像剂和显像方法

基金项目:江苏省社会发展科技项目(BS2004507)

作者单位:210006,南京医科大学附属第一医院临床核医学中心

通讯作者:王佳琼(E-mail:jqwmmc@hotmail.com)

1.2.1 显像剂

^{99m}Tc-奥曲肽由森科医药技术有限公司提供。

1.2.2 显像方法

显像前患者无特殊准备,在患者乳腺肿块对侧前臂的浅表静脉注入显像剂 ^{99m}Tc-奥曲肽 925 MBq 后 5~15min 采集早期像,显像仪为 GE 公司双探头 SPECT 仪(MILLENNIUM VG 型),采用低能高分辨率平行孔准直器,能峰 140 keV,窗宽 20%,矩阵 256×256。显像时患者俯卧于专用的乳腺显像装置上,双上肢向前伸直,采集左侧位和右侧位,然后患者取仰卧位,双手上抬,采集前位,显像范围包括双乳、腋窝和锁骨上淋巴结区,静态采集,每帧采集 6min。应用感兴趣区(region of interest, ROI)技术,每张图中均以相同像素勾画出肿瘤部位与对侧相同部位的 ROI,计算肿瘤与对侧正常组织的放射性比值(T/N)。

1.2.3 结果判定

由 3 名核医学科医师进行盲法阅片,以 T/N 大于 1.4 为显像阳性。受检者在两周内接受手术治疗,病理与显像结果进行双盲法对照。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测乳腺癌组织中 SSTR1~SSTR5 mRNA 的表达水平

1.3.1 逆转录

用一步法抽提总 RNA, 2μgRNA 模板加入随机引物寡聚脱氧胸苷 180.5μg, 70℃反应 5min, 冰浴 5min。逆转录体系 25μl: Moloney 鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus, MMLV) 200 U、5×MMLV-buffer 5μl、RNA 酶抑制剂(RNasin) 40 U、脱氧核糖核苷三磷酸 2.5μl, 加无 RNA 酶水至 25μl。37℃ 1h, 70℃ 5min 进行逆转录, 得到的 cDNA

于-20℃保存备用。

1.3.2 cDNA 扩增

根据文献^[1]合成引物,反应体系:Taq DNA 聚合酶 10×buffer 5μl、脱氧核糖核苷三磷酸 2μl, 上游、下游引物各 1μl, 25mmol/L MgSO₄ 3.5μl, Taq DNA 聚合酶 0.5μl, cDNA 2μl, 加水至 50μl。反应条件见表 1, 共 35 个循环。

1.3.3 电泳及分析

取 10μl PCR 产物, 溴化乙锭染色, 在 1.7%琼脂糖凝胶上进行电泳(100V, 30min), 电泳图谱经电泳图像分析系统拍照, 用 smart view 分析软件分析结果。

1.4 SP 免疫组化法比较乳腺癌与乳腺良性病变组织中的 SSTR2 与 SSTR5 的表达

1.4.1 材料

一抗兔抗人 SSTR2 抗体(购自美国 Novus 生物公司)和兔抗人 SSTR5 抗体(购自英国 Abcam 公司), 羊抗兔第二抗体(购自福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.4.2 方法

石蜡组织切片抗原热修复后进行 SP 法免疫组化染色: (1) 每张玻片滴加 4℃的丙酮液 1 滴, 室温下固定 5min; (2) 用磷酸缓冲液(pH7.4)冲洗 3 次, 每次 2min, 空气中自然干燥; (3) 每张玻片滴加 1 滴或 50μl 的第一抗体(兔 SSTR2 抗体, 1:100; 兔 SSTR5 抗体, 1:100), 4℃冰箱过夜; (4) 重复步骤(2); (5) 每张玻片滴加 1 滴或 50μl 生物素标记的羊抗兔第二抗体, 室温下孵育 10min; (6) 重复步骤(2); (7) 每张玻片滴加 1 滴或 50μl 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液, 室温下孵育 10min; (8) 重复步骤(2); (9) 每张玻片滴加 2 滴或 100μl 新鲜配制的

表 1 SSTR mRNA 的 RT-PCR 反应条件及其引物

引物	变性(℃)	退火(℃)	延伸(℃)	循环次数	长度(bp)
SSTR					
1 上游: 5'AGCCGGTTGACTATTACGCC3'	95	60	72	35	334
下游: 5'GCTCTCACTTCTACCAATTGTC3'					
2 上游: 5'GGTGAAGTCCTCTGGAATCC3'	95	63	72	35	461
下游: 5'CCATTGCCACTAGACAGAGC3'					
3 上游: 5'TCATCTGCCTCTGCTACCTG3'	95	65	72	35	221
下游: 5'GAGCCCAAAGAAGGCAGGCT3'					
4 上游: 5'CGCCAGTCTTCCTGGTCTAC3'	94	63	72	35	247
下游: 5'GCATCAAGGTCGGTCACGAC3'					
5 上游: 5'AACACGCTGGTACCTACCTGGT3'	94	60	72	35	211
下游: 5'AGACACTGGTGAACCTGGTTGAC3'					
GAPDH					
上游: 5'ATGACCCCTTCATTGACCTC3'	95	60	72	35	820
下游: 5'AAGTGCTCGTTGAGGGCAAT3'					

注: 变性: 30s; 退火: 1min; 延伸: 2min

二氨基联苯胺,显微镜下观察 3 min,阳性显色为棕色;(10)自来水冲洗,苏木素复染,0.1% HCl 乙醇分化,0.1% 氨水冲洗返蓝;(11)每张玻片经过梯度乙醇(80%, 90%, 95%, 无水乙醇)脱水干燥,中性树胶封固。

1.4.3 结果判断标准

SSTR2 和 SSTR5 表达水平以 0~5%为(-), 5%~25%为(+), 25%~50%为(++), >50%为(+++), 将(-)~(+)判断为阴性, (++)~(+++)判断为阳性。

1.5 统计学方法

应用 SPSS12.0 统计软件进行分析,实验结果数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 乳腺癌病理结果

结果显示,浸润性导管癌 14 例,浸润性小叶癌 1 例。

2.2 乳腺癌患者 ^{99m}Tc-奥曲肽 SSTR 显像

均为阳性, T/N 为 1.873 ± 0.341。

2.3 乳腺浸润性癌组织的 SSTRs mRNA 水平

乳腺浸润性癌组织的 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5 的 mRNA 表达阳性率分别为 100% (15/15)、93.30%(14/15)、100%(15/15)、46.70% (7/15)、86.70%(13/15),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因为内参基因计算的 mRNA 表达量: SSTR1 为 0.875±0.227, SSTR2 为 0.809±0.260, SSTR3 为 1.089±0.273, SSTR4 为 0.568 ± 0.176, SSTR5 为 0.718 ± 0.097。

SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5 的 mRNA 表达水平与 T/N 的相关性: SSTR2 mRNA 表达水平与乳腺癌显像 T/N 呈正相关, $r=0.728$, $P<0.01$,有显著统计学意义(见图 1); SSTR1、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5 的 mRNA 表达水平则与 T/N 没有相关关系。

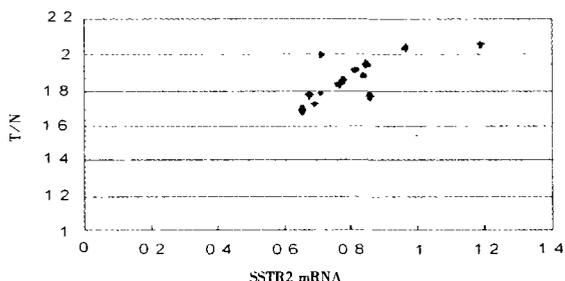


图 1 SSTR2 mRNA 表达水平与乳腺癌显像 T/N 呈正相关, $r=0.728$, $P<0.01$

2.4 乳腺癌与乳腺良性病变组织中 SSTR2 与 SSTR5 表达的免疫组化结果比较

见表 2、表 3、图 2~图 5。

表 2 乳腺癌和乳腺良性病变组织 SSTR2 受体免疫组化结果

	SSTR2 (-)	SSTR2 (+)	SSTR2 (++)	SSTR2 (+++)
乳腺癌	1	4	6	4
乳腺良性病变	4	9	5	0

表 3 乳腺癌和乳腺良性病变组织 SSTR5 受体免疫组化结果

	SSTR5 (-)	SSTR5 (+)	SSTR5 (++)	SSTR5 (+++)
乳腺癌	2	3	5	5
乳腺良性病变	2	12	4	0

3 讨论

生长抑素是一种具有广泛抑制作用的多肽类激素,能抑制肿瘤组织细胞的增殖,其机制包括抑制各种生长因子和激素的合成、抗新生血管的形成、诱导细胞凋亡和网状内皮细胞系统生长分化,文献报道其对转移性乳腺癌用生长抑素类似物治疗的有效率为 40%,作为临床一线药物时疗效更好^[2]。这些作用多是通过细胞表面的 SSTR 介导,细胞表面 SSTR 表达水平决定生长抑素的抗增殖效应。

SSTR 的基因也可作为肿瘤的报告基因,利用放射性核素标记生长抑素类似物进行靶向显像是检测 SSTR 基因表达水平的理想途径^[3]。放射性核素标记的生长抑素类似物可以与肿瘤细胞膜上的 SSTR 特异性结合,通过放射性核素的介导作用进行肿瘤定位和诊断。¹¹¹In-奥曲肽是目前最常用的生长抑素受体显像剂,但 ¹¹¹In 需加速器生产,价格昂贵,半衰期较长,注射药物 24~48h 后方能显像。^{99m}Tc 的物理性质优良,来源充足,用 ^{99m}Tc 标记的 SSTR 显像剂更具有实际应用价值。放射性核素的 β 射线可以直接杀伤相应的肿瘤细胞而起内辐射治疗作用,神经内分泌肿瘤采用发射 β 粒子核素标记的生长抑素类似物,治疗结果比较振奋,特别是 ¹⁷⁷Lu 标记,其摄取程度是 ¹¹¹In-DTPA-奥曲肽的 3~4 倍。放射性核素标记的生长抑素类似物奥曲肽治疗 SSTR 阳性的肿瘤具有广阔的应用前景^[4]。

SSTR 广泛分布于中枢神经系统及外周组织,多种肿瘤组织也表达 SSTR。神经内分泌肿瘤如小细胞肺癌、胃泌素瘤等和非内分泌瘤如乳腺癌、结

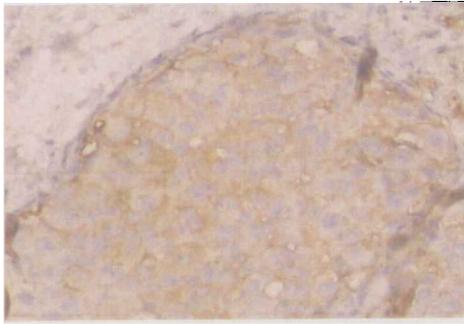


图2 乳腺浸润性导管癌 SSTR2 阳性

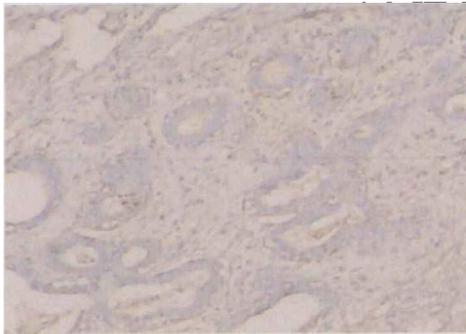


图3 乳腺增生 SSTR2 阴性

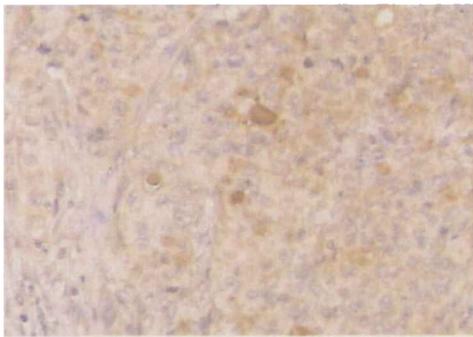


图4 乳腺浸润性导管癌 SSTR5 阳性

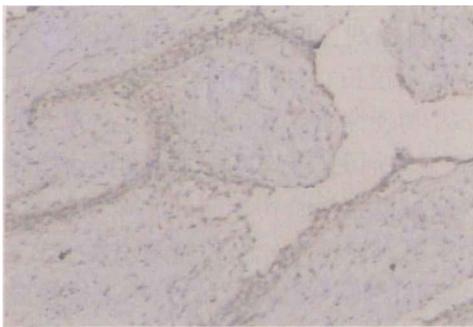


图5 乳腺纤维腺瘤 SSTR5 阴性

肠癌等均含有不同程度的 SSTR 表达。目前发现 SSTR 有 5 种受体亚型：SSTR1~SSTR5，而且许多细胞上存在不止一种受体亚型。本研究 RT-PCR 结果表明，乳腺癌组织有丰富的 SSTR mRNA 表达，

以 SSTR1、SSTR2、SSTR3 和 SSTR5 的 mRNA 为主，部分表达 SSTR4 mRNA，考虑与患者个体差异有关；表达量从高到低依次为 SSTR3、SSTR1、SSTR2、SSTR5、SSTR4 mRNA，为 SSTR 介导生长抑素类似物靶向治疗乳腺癌奠定了良好基础。本研究中 ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像的 T/N 为 1.873 ± 0.341 ，较适用于肿瘤的定位与诊断， ^{99m}Tc -奥曲肽显像阳性提示乳腺癌组织有丰富的 SSTR 表达。

从 SSTR mRNA 表达水平与 ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像 T/N 的关系的研究中可见，SSTR2 mRNA 水平与显像阳性乳腺癌组织的 T/N 呈正相关， $r=0.728$ ， $P<0.01$ ，有显著的统计学意义，与文献报道奥曲肽与生长激素释放抑制因子对 SSTR1 和 SSTR4 亲和力最低、对 SSTR3 亲和力稍低、而对 SSTR2 和 SSTR5 亲和力较高^[9]相符。本研究 SSTR5 mRNA 水平与显像阳性乳腺癌组织的 T/N 无显著相关性，考虑本研究的病例数有限，有待进一步追踪研究。Orlando 等^[6]报道，生长抑素类似物能抑制乳腺癌细胞株的生长，SSTR2 是主要的介导生长抑素类似物抑制效应的受体。本研究提示， ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 靶向性显像的 T/N 能反映乳腺癌肿瘤细胞 SSTR2 mRNA 水平高低，为 SSTR 介导生长抑素类似物靶向治疗乳腺癌提供影像学依据。

Schulz 等^[7]将 ^{111}In -pentetreotide 显像与 SSTR 的免疫组化结果比较，发现 SSTR2A 和 SSTR5 的表达与 ^{111}In -pentetreotide 显像结果明显相关，而与 SSTR1、SSTR3 无关。本研究免疫组化结果显示，乳腺癌的 SSTR2 与 SSTR5 的表达丰富，明显高于乳腺良性病变组织，SSTR2 mRNA 水平与乳腺癌 ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像的 T/N 呈正相关，与文献结果相符；SSTR5 mRNA 水平与 T/N 无显著相关性，考虑本研究的病例数有限，有待进一步研究。免疫组化结果提示，可以应用 ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像进行乳腺癌与乳腺良性病变初步鉴别诊断。

综上所述， ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像是一种无创伤、安全、经济、有效的检查方法，对乳腺癌有较好的靶向诊断价值。乳腺癌组织有丰富的 SSTR 表达，乳腺癌组织的 SSTR 表达水平明显高于乳腺良性病变组织， ^{99m}Tc -奥曲肽 SSTR 显像可以在活体中无创伤性反映乳腺癌组织的 SSTR 表达水平，为 SSTR 介导生长抑素类似物靶向治疗乳腺癌提供影像学依据。

参 考 文 献

- Zatelli MC, Tagliati F, Taylor JE, et al. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation in vitro of the human medullary thyroid carcinoma cell line TT. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(5): 2161-2169.
- Dolan JT, Miltenburg DM, Granchi TS, et al. Treatment of metastatic breast cancer with somatostatin analogues—a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8(3): 227-233.
- Gabriel M, Decristoforo C, Donnemiller E, et al. An inpatient comparison of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC with ¹¹¹In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med*, 2003, 44(5): 708-716.
- De Jong M, Valkema R, Jamar F, et al. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med*, 2002, 32(2): 133-140.
- Chiti A, Briganti V, Fanti S, et al. Results and potential of somatostatin receptor imaging in gastroenteropancreatic tract tumors. *Q J Nucl Med*, 2000, 44(1): 42-49.
- Orlando C, Raggi CC, Bianchi S, et al. Measurement of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in breast cancer and corresponding normal tissue. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(2): 323-332.
- Schulz S, Helmholz T, Schmitt J, et al. True positive somatostatin receptor scintigraphy in primary breast cancer correlates with expression of sst2A and sst5. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 72(3): 221-226.

(收稿日期: 2005-11-03)

·临床核医学·

存活心肌判断中存在的问题及其原因

杨斌 李殿富

【摘要】 存活心肌的判断有重要的临床意义。但目前常用的几项存活心肌检测技术的阳性预测值和特异性仍然偏低,其原因可能与冠脉搭桥术后自身冠脉或桥血管的通畅性、心肌功能恢复的评估时间、研究随访期间的心肌缺血和(或)损伤、血运重建术前的心室重构程度、心内膜下心肌瘢痕形成等因素有关。目前在存活心肌判断方面仍存在着一些尚待解决的问题。

【关键词】 心肌; 冠心病; 敏感性; 特异性

【中图分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)01-0021-03

The problems and the causes in viable myocardial detection

YANG Bin¹, LI Dian-fu²

(1. Department of Health Care, Air Oriental of China, Nanjing 210029, China; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Viable myocardial detection is very important in clinical practice. But the positive predictive value and specificities of all imagining modalities available are still relatively lower, and the causes may relative to the smooth of native or bridge coronary arteries after operation, the time to assess the function of viable myocardium, myocardial ischemia or damage after operation, the severity of left ventricular modification before revascularization and subendocardial muscle scarring formation. The problems of viable myocardial detection were still discussed here.

【Key words】 Myocardium; Coronary artery disease; Sensitivity; Specificity

1 存活心肌检查的临床意义及各种方法的比较

多项大型临床试验证实,血运重建术能够改善多支病变或有功能不全的冠心病患者的生存率,估计25%~40%的缺血性左室功能不全患者在血运

重建术后左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)得以提高^[1,2]。左室收缩功能的改善有着非常重要的临床意义,因为LVEF是冠心病患者的主要生存率指标,另一方面,这些患者无论是血运重建术中或术后均有较高的心脏事件发生率^[1,2]。¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG)PET是公认的无创伤评估存活心肌的“金标准”,但后来发现,只有经多巴酚丁胺负荷超声检查局部室壁运动异常有改善者才真正代表有存活心肌^[3,4]。不过

基金项目: 江苏省卫生厅重点项目(H200509)

作者单位: 210019 南京,东方航空公司卫生处(杨斌); 210019,南京医科大学第一附属医院核医学研究室(李殿富)

通讯作者: 李殿富(E-mail: lidianfu@vip.sina.com)