

文章编号:0253-9950(2009)04-0246-04

两株人肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 的比较

俞惠新^{1, 2}, 谭成¹, 张莉¹, 李卫一¹, 林秀峰¹,
陈波¹, 曹国宪¹, 王正武²

1. 江苏省原子医学研究所, 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063;

2. 江南大学 化工学院, 江苏 无锡 214122

摘要:比较2株人肺癌细胞对亲肿瘤显像剂 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的不同摄取特征。细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的动力学行为显示 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI在小细胞肺癌(H446)中的摄取显著高于肺腺癌(SPC-1), H446细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的摄取在120 min内逐渐升高至最大峰值, 然后缓慢下降; 此摄取可被未标记的MIBI所抑制; H446细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的摄取与细胞数量呈正相关而与放射性浓度呈负相关; SPC-1细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的摄取处于低水平状态, 无明显峰值。结果显示, 不同的肺癌细胞具有对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI的不同摄取特性, 这与临床不同类型肺癌患者的 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI显像结果不同相符。

关键词:人肺癌细胞; $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI; 细胞摄取

中图分类号:R817 **文献标志码:**A

Comparison of the Uptake of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI in Two Lung Cancer Cell Lines

YU Hui-xin^{1, 2}, TAN Cheng¹, ZHANG Li¹, LI Wei-yi¹, LIN Xiu-feng¹,
CHEN Bo¹, CAO Guo-xian¹, WANG Zheng-wu²

1. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, The Key Laboratory of Nuclear Medicine,
Ministry of Health, Wuxi 214063, China;

2. School of Chemical and Material Engineering of Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: The uptake characters of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI in two lung cancer cell lines (human small cell lung cancer H446 cells and human lung adenocarcinoma SPC-1 cells) were investigated. The uptake kinetic data show that H446 cells absorb significantly higher level of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI comparing with SPC-1 cells. The uptake percentage of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI in H446 cells increases time-dependently and reaches its peak value at about 120 min, and then droppes slowly. This uptake in H446 cells is positively correlated with the number of cells while negatively with the concentration of radiolabelled $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI. Furthermore, it is markedly inhibited by excessive unlabelled MIBI. However, the uptake of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI in SPC-1 cells maintains at low levels without a visible peak during the experiment time. These results suggest that the uptake characters of $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI are different in two lung cancer cell lines, which is accordant with the clinical

收稿日期:2008-05-29; 修订日期:2009-01-03

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2006026); 无锡市自然科学基金资助项目(CK040004)

作者简介:俞惠新(1966—), 男, 江苏江阴人, 副研究员, 生物化学和核医学专业

facts that patients with lung cancers displayed diverse ⁹⁹Tc^m-MIBI imaging patterns.

Key words: human lung cancer cell lines; ⁹⁹Tc^m-MIBI; cellular uptake

随着肺癌发病率的逐年提高,临床上肺部占位病变需要鉴别良恶性的患者也逐渐增多。核医学显像中,PET 虽然对肿瘤的诊断灵敏度及准确性高,但由于设备及检查费用高昂,一般医院和患者无法常规应用。SPECT 药物⁹⁹Tc^m-甲氧基异丁基异腈(⁹⁹Tc^m-MIBI)是一种心肌灌注显像剂,临床上广泛应用于诊断心肌功能^[1]。自 1987 年 Muller^[2]首次报道⁹⁹Tc^m-MIBI 在甲状腺癌肺转移灶中浓集以来,其亲肿瘤特性受到广泛关注,被越来越多地用于基础及临床肿瘤如乳腺癌、鼻咽癌等^[3-4]的显像研究,也有不少用于肺癌显像诊断的报道^[5],甚至可用于肺癌多药耐药性预测^[6-7]。

⁹⁹Tc^m-MIBI 被肿瘤摄取的机制尚无定论,目前普遍认为⁹⁹Tc^m-MIBI 分子的亲脂性使其以被动扩散的形式进入细胞,并进一步与线粒体中的蛋白质作用,而进入细胞的量与细胞膜电位差有关。肿瘤细胞一般代谢旺盛,膜电位差较高,因而可高摄取⁹⁹Tc^m-MIBI^[8]。但临床上许多肺癌患者的⁹⁹Tc^m-MIBI 显像呈阴性,这被认为主要是由于肿瘤的多药耐药性引起的。特别对于肺癌来说,除 p-糖蛋白(Pgp)外,还发现有肺相关耐药蛋白(LRP)、多药耐药蛋白(MRP)等的过度表达。这些耐药相关蛋白一般位于细胞膜上,将进入细胞的化疗药物清除出肿瘤细胞,而作为 Pgp 等底物的⁹⁹Tc^m-MIBI 因此可被泵出肿瘤细胞,使肿瘤组织积聚⁹⁹Tc^m-MIBI 减少,从而使显像呈假阴性^[9]。该类患者一般化疗疗效欠佳。本工作拟通过 2 株肺癌细胞(小细胞肺癌 H446 及非小细胞肺癌的肺腺癌 SPC-1)体外摄取⁹⁹Tc^m-MIBI 的分析比较,以期对⁹⁹Tc^m-MIBI 显像在临床肺癌诊断中的应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

RPMI 1640 为 GIBICOL(美国)产品;小牛血清由中国科学院上海实生细胞生物技术有限公司提供;甲氧基异丁基异腈(MIBI),江苏原子医学研究所江原制药厂提供;其他试剂均为国产分析纯。

人肺癌细胞株(小细胞肺癌 H446 和肺腺癌 SPC-1)均来自中国科学院上海细胞生物研究所;

2 株肺癌细胞均用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 100 U/mL 青霉素,100 mg/L 链霉素)于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱(thermo scientific forma 3110,美国)中维持培养。

PACKARD-C5002 型 γ 计数仪,英国 PAN-GBOURNE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ⁹⁹Tc^m-MIBI 配合物的制备 按药盒说明书操作。用生理盐水从医用⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m发生器中淋洗得到⁹⁹Tc^mO₄⁻洗脱液,取 1.5 mL(约 55.5 MBq)新鲜的洗脱液加入到甲氧基异丁基异腈药盒中,摇匀后置于沸水浴中加热 15 min,冷却,得标记物⁹⁹Tc^m-MIBI,经 TLC 分析其放化纯大于 95%,可用于进一步的试验。

1.2.2 肺癌细胞摄取⁹⁹Tc^m-MIBI 分别取正常培养的肺癌细胞 H446 和 SPC-1,经消化、计数,以不含血清培养液调整细胞浓度至每毫升 5 × 10⁵ 个细胞,加入标记物⁹⁹Tc^m-MIBI 至其最后的活度浓度为 185 MBq/L,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中继续孵育,在此期间每 5 min 轻摇 1 次使成细胞悬液状,于不同时间点(5, 10, 30, 60, 120, 240, 360 min)以每管 200 μL 吸取均匀细胞悬液至预先置有 200 μL 正常细胞培养液的测量试管中(*n* = 6),以 1 000 r/min 离心 5 min,小心弃去上清液,以 4 ℃预冷的生理盐水洗涤细胞 2 次,每次以 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清液。测各管细胞沉淀中的计数率(min⁻¹)。以不含细胞而加入等量标记物为空白对照(非特异吸附)。每项实验重复 3 次,计算细胞摄取百分数:

细胞摄取率(%) =

$$\frac{\text{反应管计数率} - \text{空白对照管计数率}}{\text{每管总计数率}} \times 100\%$$

1.2.3 肺癌细胞摄取⁹⁹Tc^m-MIBI 的竞争抑制试验 与⁹⁹Tc^m-MIBI 同时加入不同浓度的冷化合物(MIBI 原药),混匀后,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中继续孵育 120 min。经换算,试验溶液中标记前 MIBI 浓度为 3.3 mg/L,因此加入的 MIBI 原药为 33 和 330 mg/L(分别为 10 和 100 倍)。其余操作同 1.2.2 节。

1.2.4 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的动力学变化

两株肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 随时间的变化结果示于图 1。所有时间点均取 6 个平行样。由图 1 可以看出, $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 在小细胞肺癌 (H446) 中的摄取显著高于肺腺癌 (SPC-1) (10 min 后, $P < 0.01$); H446 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取在 120 min 内逐渐升高, 达到最大平衡值, 然后缓慢下降; SPC-1 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取基本处于较低水平的平衡状态, 无明显峰值。

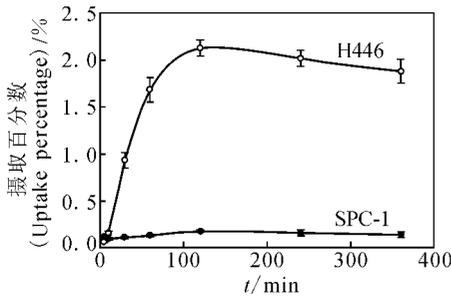


图 1 2 株肺癌细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 摄取的动力学变化

Fig. 1 Uptake kinetics of $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ in lung cancer cell lines SPC-1 and H446

2.2 肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的竞争抑制

未标记 MIBI 抑制 2 株肺癌细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取结果示于图 2。由图 2 可知, 随着未标记 MIBI 量的增加, 小细胞肺癌 H446 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取被明显抑制, 当 100 倍于 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的未标记 MIBI 存在时, H446 对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取被完全抑制。而肺腺癌 SPC-1 细胞由于对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的低摄取, 因而无法显

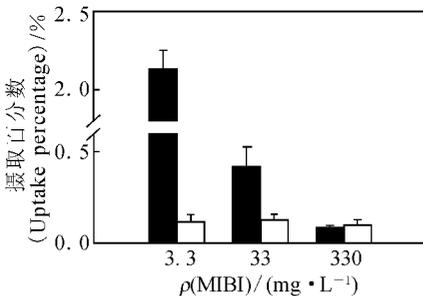


图 2 未标记 MIBI 对肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的影响

Fig. 2 Effects of unlabelled MIBI against $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ uptake of lung cancer cell lines

■——H446, □——SPC-1

现未标记 MIBI 的竞争抑制作用。

2.3 肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 与细胞量和放射性活度浓度的关系

肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 与所加入的细胞量和放射性活度浓度的关系分别示于图 3, 4。由图 3 可知, 固定放射性浓度, 随着细胞数量的增加, 小细胞肺癌 H446 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取也逐渐升高, 摄取百分数与细胞数量呈一定的正相关, 但在整个试验范围内 ($0.5 \sim 15 \times 10^5$ 个细胞), 两者并不呈良好的线性关系 ($r < 0.89$)。肺腺癌 SPC-1 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取随细胞数量增加也略有升高, 但并不显著 ($P > 0.05$)。

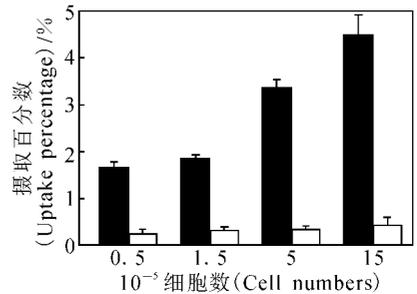


图 3 肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 与细胞量的关系

Fig. 3 Relationship between cell numbers and uptake percentage of $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$

■——H446, □——SPC-1

图 4 则表明, 在细胞数量一致的情况下, 随着加入 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 放射性浓度的升高, 2 株细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取百分数明显减小, 而摄取的放射性计数 (min^{-1}) 则明显上升 (由图 4 计算可得)。当放射性浓度为 14.8 MBq/L 时, H446 对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 的摄取百分数达 10% 以上, SPC-1 的摄取百分数也近 2%; 而当浓度达 1 850 MBq/L

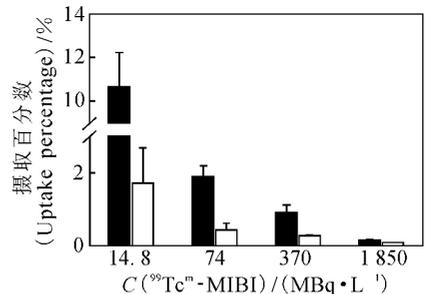


图 4 肺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$ 与放射性活度浓度的关系

Fig. 4 Relationship between radioactivity concentration and uptake percentage of $^{99}\text{Tc}^m\text{-MIBI}$

■——H446, □——SPC-1

L时,2个细胞的摄取百分数均在0.15%以下。

3 讨论

实验结果显示,小细胞肺癌 H446 对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 有明显摄取,而非小细胞肺癌的肺腺癌 SPC-1 基本不摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI,这不仅与临床上小细胞肺癌 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 显像多阳性、非小细胞肺癌 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 显像多阴性相符,而且与前者对放疗比较敏感、疗效明显好于后者也一致^[5, 10]。

许多研究认为, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 分子的亲脂性使其通过被动扩散作用进入细胞内。不过被动扩散是不受共存类似物影响,无饱和现象和竞争抑制现象,这与本实验结果存在明显矛盾。这说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 进出细胞的机制并不单一,除了被动扩散进入细胞及耐药相关蛋白将进入胞内的药物泵出外,在细胞膜上可能还存在其他一些位点参与了对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的转运,这些位点可被过量 MIBI 所封闭。

从实验结果看,细胞摄取百分数不仅与细胞类型和反应时间等相关,而且可随细胞数量、放射性浓度等的改变而改变,即使是单位细胞的放射性摄取量也随上述条件的变化而变化。因此,细胞摄取百分数只能是个相对值,在比较不同细胞对不同放射性药物的摄取时应该考虑细胞数量、放射性浓度等因素的影响。

总之, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 用于肺癌等肿瘤显像有益于肿瘤的诊断和放疗敏感的检测,对肺癌等肿瘤细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的具体机制及涉及因素的进一步考察研究将有助于临床对肿瘤显像结果的分析、放疗方案的选择及预后的判断。

参考文献:

[1] Jones A G, Abrams M J, Davison A, et al. Biological Studies of a New Class of Technetium Complexes; the Hexakis (Alkylisonitrile) Technetium (I)

Cations[J]. Int J Nucl Med Biol, 1984, 11(3-4): 225-234.

- [2] Muller S T, Guth T B, Creutzig H. Imaging of Malignant Tumor With $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI SPECT[J]. J Nucl Med, 1987, 28(4): 562.
- [3] Vecchio S D, Zannetti A, Salvatore B, et al. Functional Imaging of Multidrug Resistance in Breast Cancer[J]. Phys Med, 2006, 21(Suppl 1): 24-27.
- [4] Pui M H, Du J Q, Yueh T C, et al. Imaging of Nasopharyngeal Carcinoma With Tc-99m MIBI [J]. Clin Nucl Med, 1998, 23(1): 29-32.
- [5] Akgun A, Cok G, Karapolat I, et al. Tc-99m MIBI SPECT in Prediction of Prognosis in Patients With Small Cell Lung Cancer[J]. Ann Nucl Med, 2006, 20(4): 269-275.
- [6] 朱爱芝,陈丽蓉,郭秋菊,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -tetrafosmin 在肿瘤细胞的摄取和在荷瘤小鼠体内的分布 [J]. 核化学与放射化学, 2000, 22(4): 215-221.
- [7] Shih C M, Hsu W H, Huang W T, et al. Usefulness of Chest Single Photon Emission Computed Tomography With Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile to Predict Taxol Based Chemotherapy Response in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Cancer Lett, 2003, 199(1): 99-105.
- [8] Moretti J L, Hauet N, Caglar M, et al. To Use MIBI or not to Use MIBI? That is the Question When Assessing Tumour Cells[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(7): 836-842.
- [9] Ballinger J R. Experimental and Clinical Observations of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI Uptake Correlate With P-Glycoprotein Expression in Lung Cancer[J]. Nucl Med Commun, 2008, 29(3): 303.
- [10] Yuksel M, Cermik T F, Doganay L, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI SPET in Non-Small Cell Lung Cancer in Relationship With Pgp and Prognosis[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002, 29(7): 876-881.