

# 用 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 在体外评价肿瘤细胞多药耐药 逆转剂逆转细胞多药耐药的效果

李 娜<sup>1</sup>, 李亚明<sup>1</sup>, 刘云鹏<sup>2</sup>, 刘 静<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院 核医学科, 辽宁 沈阳 110001;

2. 中国医科大学附属第一医院 肿瘤内科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:** 通过观察 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 细胞内摄取变化探讨了单独或低剂量联合应用多药耐药逆转剂逆转肿瘤细胞多药耐药的效果, 期望为进一步解决临床恶性肿瘤化疗面临的问题提供实验依据。选择人类髓系白血病 K562 细胞及其耐药细胞系 K562/D 各  $2 \times 10^6$  个, 分别加入 8 MBq  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI, 观察不同时间不同浓度多药耐药逆转剂环孢菌素 A(CsA 0.1~0.4 mg/L) 和/或维拉帕米(Ver 2.5~10 mg/L) 存在时, K562 细胞及 K562/D 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 摄取变化。结果显示: ①不同浓度 Ver 或 CsA 存在时, K562 细胞 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 摄取略有增加, 但差异无显著性( $P > 0.05$ ); K562/D 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 的摄取均明显增加, 但不同浓度 Ver 间及不同浓度 CsA 间, 摄取增加的差异没有显著性( $P > 0.05$ )。②2.5 mg/L Ver 及 0.1 mg/L CsA 同时加入 K562 细胞系中, 60 min 时 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 摄取率为  $0.303 \pm 0.076$ , 增加率为 183%, 接近单独应用 Ver(10 mg/L) 或单独应用 CsA(0.4 mg/L)。这说明低剂量逆转剂联合应用能达到与单一较大剂量应用逆转剂相似的效果, 为临床逆转 Pgp 介导的多药耐药提示新的信息。

**关键词:**  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI; 多药耐药; P 糖蛋白(Pgp); 多药耐药逆转剂

中图分类号: R817.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)01-0010-04

## In Vitro Nuclear Analysis of MDR Mediated by Pgp and Usage of MDR Reversing Agents With $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI

LI Na<sup>1</sup>, LI Ya-ming, LIU Yun-peng<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>2</sup>

(1. Department of Nuclear Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** The value of MDR reversing agents was studied by detecting the uptake of  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI in cells to find simple but effective methods for estimating the MDR of tumor cells and the effect of reversing agents.  $2 \times 10^6$  cells of human myelogenous leukemia cell line K562 and its resistant subline (K562/D) were incubated with 8 MBq  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI, with accumulating with presence of reversal agents cyclosporin A(0.1-0.4 mg/L) and/or verapamil(2.5-10 mg/L) at various time intervals were observed. The results were as follows: ①Different concentration of verapamil or cyclosporin A significantly increased the  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI uptake of K562 resistant subline, while the uptake of K562 cell line expressing nondetectable Pgp was not affected. ②Combination of low dose verapamil (2.5 mg/L) and cyclosporin A (0.1 mg/L)

L) had similar effect on <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI accumulation with higher dose of inhibitor lonely. The results indicated that combination of lower dosages modulators may play same reverse effect with less side effects.

**Key words:** <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI; multidrug resistance; P-glycoprotein; multidrug resistance reversing agents

目前,化疗仍然是治疗恶性肿瘤的重要手段之一,尽管随着化疗方案的改进及新药的使用,临床化疗效果越来越好,但仍然有一些患者在化疗后对某些化疗药物产生耐药性,从而影响化疗效果<sup>[1]</sup>。研究发现,导致肿瘤化疗失败的原因之一是肿瘤对化疗药物的多药耐药(Multidrug Resistance, MDR)特性。目前的研究表明,MDR的产生是多种基因产物共同作用的结果,参与多药耐药发生的因素之一是肿瘤细胞表面ATP结合膜蛋白的表达增加或活性提高,包括P糖蛋白(Pgp)<sup>[2-3]</sup>、多药耐药相关蛋白(MRP)、肺抗药性相关蛋白(LRP)、乳腺癌抗药性相关蛋白(BRCP)等几类<sup>[4]</sup>,其中目前临床证实与一些肿瘤耐药相关的只有Pgp,所以Pgp仍是临床克服多药耐药主要的靶点和观察指标。

<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI是一种亲脂性阳离子复合物,因其具有稳定的物理性质及良好的显像效果而广泛应用于临床核医学。恶性肿瘤高代谢需要保持较高的负电势,从而导致<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI浓聚,因此<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI是目前公认的肿瘤阳性显像剂<sup>[5]</sup>,有研究显示<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI也是Pgp的转运底物。肿瘤细胞内Pgp蛋白高表达,能将<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI泵出细胞外<sup>[6]</sup>。因此可利用<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI动力学变化评价Pgp所致的MDR。

为克服肿瘤细胞的MDR,人们对其逆转方式进行了大量的研究,并发现了一些有效的途径,大多数肿瘤多药耐药逆转剂是通过抑制Pgp泵的功能对抗MDR,使MDR细胞内化疗药物浓度升高。目前临床通常使用的多药耐药逆转剂有环孢菌素A(CsA)和维拉帕米(Ver),但由于剂量限制性毒性作用影响了其临床使用。

本工作拟利用<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI在细胞内摄取变化评价单独或联合应用逆转剂逆转肿瘤细胞多药耐药的效应,以期为进一步解决目前临床恶性肿瘤化疗面临的问题提供有意义的实验依据。

## 1 主要实验材料

### 1.1 主要仪器

超净工作台、CO<sub>2</sub>培养箱、4℃冰箱、KDC-2046台式低温离心机;科大创新股份有限公司中佳分公司;GC-1200型γ计数器;中国科技大

学中佳光电仪器分公司产品。

### 1.2 药品与试剂

环孢菌素A(CsA):瑞士Sandoz公司产品;维拉帕米(Ver):上海禾丰制药有限公司产品;于实验前用注射用水配制,4℃保存。MIBI:江苏原子医学研究所江原制药厂产品;<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>O<sub>4</sub><sup>-</sup>:原子高科股份有限公司产品;<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI:按说明书制备,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI放化纯度>96%。

### 1.3 细胞培养

K562细胞及耐药细胞系(K562/D)均由中国医科大学肿瘤研究所肿瘤与药物生物治疗研究室提供。K562/D细胞系与K562细胞相比,Pgp高度表达<sup>[7]</sup>。在37℃、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中,将K562细胞及耐药细胞系K526/D培养于体积分数为10%的小牛血清、12 U/mL庆大霉素的RPMI 1640培养液中,每2~3天传代一次。所有实验用细胞均处于对数生长期。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI摄取

将K562细胞与K562/D细胞分别分为4组,第1组为加<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI组;第2组为加<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI及逆转剂Ver组;第3组为加<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI及逆转剂CsA组;第4组为<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI及逆转剂Ver和CsA同时加入组。其中第2组和第3组按加入的逆转剂量的不同分别分为2.5、5.0、10.0 mg/L组和0.1、0.2、0.4 mg/L组。

具体方法是:37℃RPMI培养液中加入体积分数为10%胎牛血清、2×10<sup>6</sup>个K562(D)细胞、8 MBq的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI及不同浓度Ver和/CsA,分别于0、10、20、30、40、50、60 min时用5 mL 4℃0.08 mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗脱,以180g离心5 min,重复洗脱及离心3次。用γ计数器探测<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI摄取<sup>[8]</sup>。摄取率用细胞内<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI浓度除以加入<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI浓度表示。本实验重复6次,结果取均值。

### 2.2 统计学处理

用SPSS13.0进行统计学分析。结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,逆转剂存在前后数据比较行配对t检

验,组间数据比较行  $q$  检验。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 K562 细胞及 K562/D 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取

K562 细胞及 K562/D 细胞对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取结果示于图 1。由图 1 可以看出,2 种细胞对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取趋势一致,在开始的 30 min 内摄取率呈线性上升,且在最初的 10 min 内上升最快,30 min 后达到平台期。但其摄取率在各时间点均有明显差异,差异最大的时间点为 60 min 时,此时, K562 及 K562/D 细胞对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取率分别为  $1.559 \pm 0.529$  及  $0.107 \pm 0.036$ , K562 细胞的摄取率比 K562/D 细胞高 15 倍。这与其他学者<sup>[9-10]</sup>在其它细胞系中的研究结果一致,进一步证实了  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 可用于评价 K562/D 肿瘤细胞 Pgp 介导的多药耐药。

#### 3.2 逆转剂对 K562 及 K562/D 细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的影响

逆转剂 Ver 与 CsA 对 K562 及 K562/D 细胞

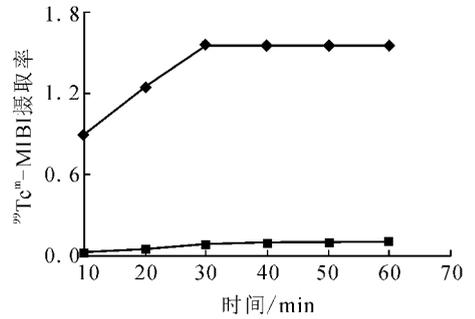


图 1 K562 细胞及 K562/D 细胞系对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取曲线  
◆—K562; ■—K562/D

摄取  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的影响列于表 1。由表 1 可以看出,逆转剂对 K562 细胞  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取略有影响,逆转剂存在时,对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取略有增加,但与不加逆转剂时相比,差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); K562/D 细胞中加入 Ver 或 CsA 后,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取均显著增加 ( $P < 0.05$ ),但不同浓度 Ver 间及不同浓度 CsA 间,差异没有显著性 ( $P > 0.05$ )。

表 1 不同浓度 Ver 及 CsA 对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取影响比较

逆转剂浓度/(mg · L <sup>-1</sup> )	次数	K562			K562/D		
		摄取率均值	增加率/%	$t$	摄取率均值	增加率/%	$t$
0	6	$1.559 \pm 0.529$			$0.107 \pm 0.036$		
Ver	2.5	$1.624 \pm 0.415$	4.17	0.236 <sup>1)</sup>	$0.213 \pm 0.045$	99	4.510 <sup>2)</sup>
	5	$1.671 \pm 0.382$	7.18	0.421 <sup>1)</sup>	$0.256 \pm 0.083$	139	4.038 <sup>2)</sup>
	10	$1.648 \pm 0.466$	5.71	0.309 <sup>1)</sup>	$0.337 \pm 0.066$	215	7.492 <sup>2)</sup>
CsA	0.1	$1.628 \pm 0.433$	4.43	0.247 <sup>1)</sup>	$0.221 \pm 0.053$	106	4.350 <sup>2)</sup>
	0.2	$1.706 \pm 0.391$	9.43	0.549 <sup>1)</sup>	$0.264 \pm 0.071$	148	4.832 <sup>2)</sup>
	0.4	$1.629 \pm 0.657$	4.49	0.237 <sup>1)</sup>	$0.281 \pm 0.063$	163	5.878 <sup>2)</sup>

注:1)与不加逆转剂相比  $P > 0.05$ ; 2)与不加逆转剂相比  $P < 0.05$

K562 细胞系中加入不同浓度的 Pgp 逆转剂(Ver 2.5~10 mg/L, CsA 0.1~0.4 mg/L)后  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取略有上升,增加率为 4.17%~9.43%,但与不加逆转剂时  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取率之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。K562/D 细胞中加入不同浓度的 Pgp 逆转剂(Ver 2.5~10 mg/L, CsA 0.1~0.4 mg/L)后  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取明显上升,增加 2~3 倍,与不加入逆转剂时差异均有显著性。研究表明 Pgp 发挥能量依赖性外排泵的作用对象是无特异性的,也就是说对化疗药物以外的许多非细胞毒性化合物, Pgp 也能

将其从细胞内转运到细胞外。因此当膜上的 Pgp 含量恒定时,化疗药物与其它非细胞毒性化合物同 Pgp 的结合就存在竞争<sup>[11]</sup>。Ver 及 CsA 就是与 Pgp 发生竞争性结合,与 Pgp 相互作用减弱 Pgp 药物泵功能,减少了对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的外排作用,增加了细胞内  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取。

#### 3.3 低剂量 Ver 及 CsA 共存时 K562/D 细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的变化

将 2.5 mg/L Ver 及 0.1 mg/L CsA 同时加入 K562/D 细胞系中, K562/D 细胞系对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取示于图 2。由图 2 可见, Ver (2.5

mg/L)及 CsA (0.1 mg/L)联合应用也能使 K562/D 对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取增加,在各时间点两者联合应用使 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取增加接近单独应用逆转剂 Ver(10 mg/L)或 CsA(0.4 mg/L)。

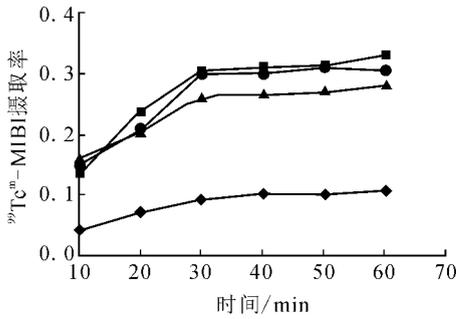


图 2 同时使用 Ver 和 CsA 对细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的影响

◆——K562/D; ■——K562/D+10 mg/L Ver;  
▲——K562/D+0.4 mg/L CsA;  
●——K562/D+2.5 mg/L Ver+0.1 mg/L CsA

随着逆转剂浓度的增加,细胞耐药逆转率也随之增加,但随着逆转剂浓度的增加,其细胞毒性作用也逐渐增加,很难在逆转剂浓度及逆转效果间取得平衡,因而限制了在临床的应用。本实验中联合应用低剂量 Ver(2.5 mg/L)及 CsA(0.1 mg/L),其增加了 K562/D 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取,这与单独应用 Ver(10 mg/L)或 CsA(0.4 mg/L)的逆转效果相仿,这样可以降低单一逆转剂的用量,获得较好的逆转效果。

## 4 结 论

理想的 Pgp 逆转剂应具备以下条件:安全,对正常组织毒性小,在体内及肿瘤细胞中能达到体外有效浓度,稳定且体内半衰期较长<sup>[12]</sup>。在新型逆转剂问世前,低剂量 Ver 及 CsA 联合应用不失为逆转 Pgp 介导的多药耐药的好方法。但本实验仅对体外细胞培养得出上述结论,体内微环境复杂,能否得到和体外实验相同的结论有待进一步研究。

## 参考文献:

[1] ZINEB B, ANNE MF, LYDIA S, et al. MRP3, BCRP, and P-Glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2005,11(21): 7 764-7 772.  
[2] YANG A, XUE J, LI X, et al. Experimental and

clinical observations of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI uptake correlate with P-glycoprotein expression in lung cancer [J]. Nucl Med Commun, 2007, 28(9): 696-703.

- [3] PAUWELS EKJ, MCCREADY VR, STOOT JH-MB, et al. The mechanism of accumulation of tumor-localising radiopharmaceuticals [J]. Eur J Nucl Med, 1998,25(2): 277-305.  
[4] 张志红, 宋朝晖. 肿瘤化疗增敏剂研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, 33(7): 506-508.  
[5] LAZAROWSKI A, DUPONT J, FERNÁNDEZ J, et al.  $^{99\text{m}}$ Tcnetium-SESTAMIBI uptake in malignant lymphomas: correlation with chemotherapy response[J]. Lymphat Res Biol, 2006, 4 (1): 23-28.  
[6] CORDOBES MD, STARZEC A, DELMON-MOINGEON L, et al. Technetium-99m-sestamibi uptake by human benign and malignant breast tumor cells: correlation with mdr gene expression[J]. J Nucl Med, 1996,37(2):286-289.  
[7] 尚世丽, 刘云鹏, 罗影, 等. 异搏定对白血病 K562 细胞耐药性的逆转作用[J]. 中国医科大学学报, 2000, 29(3): 189-191.  
[8] HENDRIKSE NH, FRANSSSEN EJF, VAN DER GREAL WTA, et al.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -sestamibi is a substrate for P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein [J]. British J Cancer, 1998, 77(3): 353-358.  
[9] SATO T, KAWABATA Y, NITTA T, et al. Expression of permeability-glycoprotein (Pgp) and uptake of technetium-99m-hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile ( $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI) in malignant tumour of the head and neck[J]. Dentomaxillofac Radiol, 2005, 34(5): 274-278.  
[10] MÁRIÁ NT, SZABÓ G, GODA K, et al. In vivo and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance[J]. Eur J Nucl Mol Imaging, 2003, 30(8): 1 147-1 154.  
[11] MÁRIÁ NT, BALKEY L, SZABÓ G, et al. Biphasic accumulation kinetics of [ $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile in tumour cells and its modulation by lipophilic P-glycoprotein ligands [J]. Eur J Pharm Sci, 2005, 25(2-3): 201-209.  
[12] PETRANEL TF, MICHELLE JF, SHOO-PENG S, et al. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib(STI571) in vitro[J]. Blood, 2003,102(7): 4 499-4 503.