

◆ 实验研究

Uptake of 99m Tc-DTPA-DG by the nucleus of lung cancer cells Calu-3

LIANG Jie¹, CHEN Yue^{1*}, HUANG Zhan-wen¹, SUN Yuan-yuan¹, HE Ling²

(1. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the uptake of 99m Tc-DTPA-DG by the nucleus of lung cancer cells Calu-3, in order to observe if 99m Tc-DTPA-DG could cut down the false positive rates (FPR) of tumor diagnosis and the utility of 99m Tc-DTPA-DG in tumors.

Methods The lung cancer cells were assigned to five groups: group A, 99m Tc-DTPA-DG; group B, 18 F-FDG; group C, 99m Tc-DTPA; group D, 99m TcO₄⁻; group E, saline. One of the radioactive drugs (5, 10 or 20 μ Ci/0.10 ml) was added into each well; 0.10 ml NS was added in control groups. There were 5 duplicate wells in each group. The cells were incubated for another 2 h, then were digested and collected, finally the radiocounting was determined in each group. The cell nucleus were then isolated, and the radiocounting was determined again. The isolated cell nuclei were smeared and dyed with hematoxyline eosin (HE), then observed under microscope. **Results** The count results showed the proportion of isolated nuclei reached 95% under microscope. The uptake of 99m Tc-DTPA-DG and 18 F-FDG by lung cancer cells Calu-3 determined by γ counter were all more than that of the groups of 99m Tc-DTPA, 99m TcO₄⁻ and NS; the differences were significant ($P < 0.05$). The uptake rates of 99m Tc-DTPA-DG by cell nuclei were much higher than that of 18 F-FDG ($P < 0.05$). **Conclusion** 99m Tc-DTPA-DG can enter tumor cell nuclei, so might be valuable in distinguishing inflammation and tumors. It is a targeted molecular imaging agent in tumors diagnosis.

[Key words] 99m Tc-DTPA-DG; Radioactive drug; Cell line, tumor; Cell nucleus

肺癌 Calu-3 细胞核摄取 99m Tc-DTPA-DG 实验研究

梁 杰¹, 陈 跃^{1*}, 黄占文¹, 孙媛媛¹, 何 菱²

(1. 泸州医学院附属医院核医学科, 四川 泸州 646000; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 观察 99m Tc-DTPA-DG 是否进入肿瘤细胞核, 验证其用于肿瘤显像的潜在可行性。**方法** 将体外培养的肺癌细胞 Calu-3 分为 5 组: A 组为 99m Tc-DTPA-DG 组, B 组为 18 F-FDG 组, C 组为 99m Tc-DTPA 组, D 组为 99m TcO₄⁻ 组, E 组为生理盐水组。每组各设 3 个浓度, 即每孔加入放射性药物 5、10、20 μ Ci/0.10 ml, 对照组加入同等量生理盐水, 每组各设 5 个复孔。加入各种药物及生理盐水 2 h 后消化收集细胞, 检测各组细胞放射性计数后, 分离细胞核, 检测细胞核的放射性计数, 分离的细胞核涂片行苏木素伊红(HE)染色后镜检。**结果** 镜检结果显示细胞核计数占细胞总计数的比例达 95%。 γ 测量仪检测显示肺癌细胞 Calu-3 对 99m Tc-DTPA-DG 和 18 F-FDG 各放射性活度组的摄取均明显高于 99m Tc-DTPA、 99m TcO₄⁻ 及生理盐水组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞核计数结果显示 99m Tc-DTPA-DG 组进入细胞核比率明显高于 18 F-FDG 组($P < 0.05$)。**结论** 99m Tc-DTPA-DG 可以进入肿瘤细胞核, 故可降低肿瘤诊断的假阳性率, 在区分炎症与肿瘤方面有价值, 是一种潜在的可用于肿瘤显像的靶向分子显像剂。

[关键词] 99m Tc-DTPA-DG; 放射性药物; 细胞系, 肿瘤; 胞核

[中图分类号] R445.5; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)04-0551-04

18 F-脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG) PET 显像是目前最好的用于肿瘤诊断和治疗疗效评价的方法^[1-2], 然而其费

用较贵, 来源不便, 限制了其在临床的广泛应用, 且 18 F-FDG 只能进入细胞浆, 不能进入肿瘤细胞核^[3], 在肿瘤和炎症的鉴别方面特异性较差^[4]。研究^[5]发现宫颈炎和子宫内膜炎症等良性改变也可以导致 18 F-FDG 摄取增高, 故 18 F-FDG PET 显像鉴别肿瘤性质有一定的假阳性率。能够进入细胞核的用于肿瘤诊断的放射性药物将可降低肿瘤诊断的假阳性率, 提高在肿瘤与炎症鉴别方面的特异性。 99m Tc 标记的脱氧葡萄糖化合物现已成为核医学基础研究的热点。 99m Tc-双半胱

[基金项目] 国家自然科学基金(30670582)。

[作者简介] 梁杰(1980-), 女, 山东青岛人, 硕士, 医师。研究方向: 肿瘤的核素诊疗。E-mail: liangjie503@126.com

[通讯作者] 陈跃, 泸州医学院附属医院核医学科, 646000。

Email: chenyue5523@126.com

[收稿日期] 2008-10-06 **[修回日期]** 2008-12-10 表 1 肺癌细胞 Calu-3 对 4 种不同浓度放射性药物的摄取率比较(% $\bar{x} \pm s$)

氨酸-脱氧葡萄糖(ethylenedicycysteine-deoxyglucose, EC-DG)可以通过N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(N-acetylglucosaminyltransferase, GnT)进入细胞核,参与细胞信号的调节^[6],但其肿瘤/血液和肿瘤/肺比值均<1.0,低于¹⁸F-FDG,故尚不理想。陈跃等^[7]报道^{99m}Tc-二乙三胺五乙酸-脱氧葡萄糖(diethyle netriaminepentaacetate - deoxyglucose, DTPA-DG)动物实验显示靶/非靶(target/nontarget, T/NT)比值高,是一种潜在的分子靶向显像剂。为观察^{99m}Tc-DTPA-DG可否进入肿瘤细胞核,在肿瘤和炎症的鉴别方面提高特异性,本实验对体外培养的肺癌细胞Calu-3胞核对^{99m}Tc-DTPA-DG的摄取进行研究。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 ⁹⁹Mo-^{99m}Tc发生器由中国原子能科学研究院和中国核动力研究院提供;DL-6M大容量低速冷冻离心机由长沙湘仪离心机仪器有限公司提供;SN-695B型智能放免 γ 测量仪由上海核所日环光电仪器有限公司提供;IX51型荧光倒置显微镜为日本Olympus公司产品;肺癌细胞Calu-3由四川大学华西医院提供;DTPA-DG由四川大学华西药学院提供;¹⁸F-FDG由重庆第三军医大大坪医院提供;DTPA试剂盒由北京师宏药物研制中心提供;RPMI-1640培养基由美国Gibco BRL公司提供;Tris-HCl、PMSF由上海卓康生物科技有限公司提供;DTT由北京经科宏达生物技术公司提供。

1.2 细胞培养及实验分组 将肺癌细胞Calu-3种植于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI-1640培养基中,置37℃、5%CO₂培养箱中培养,常规传代扩增至所需总量时,于对数生长期收集细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 5×10^5 个/ml。于6孔板中每孔加入1 ml细胞悬液,即每孔加入 5×10^5 个细胞,培养过夜待细胞贴壁扩增至90%以上融合时,更换新鲜培养液,按继续培养条件不同将肿瘤细胞分为5组:A:^{99m}Tc-DTPA-DG组,B:¹⁸F-FDG组,C:^{99m}Tc-DTPA组,D:^{99m}TcO₄⁻组,E:生理盐水对照组。放射性药物组每组各设3个浓度,即每孔加入其中一种放射性药物5、10或20 μ Ci/0.10 ml,对照组加入同等量的生理盐水,每个浓度组各设5个复孔,总体积为2 ml。

1.3 药物制备 ①^{99m}Tc-DTPA-DG:在21 mg DTPA-DG中加入SnCl₂0.70 mg,放射性活度为740 MBq的^{99m}TcO₄⁻淋洗液1 ml,混匀后在沸水浴中反应10 min完成标记,得到标记物^{99m}Tc-DTPA-DG,测其放化纯度为98.50%。②在DTPA试剂盒中加入370 MBq的^{99m}TcO₄⁻淋洗液1 ml,充分振摇,使冻干物溶解,静置5 min,即得到标记物^{99m}Tc-DTPA,放化纯度达99%。③裂解缓冲液:含0.25 mol/L蔗糖(超级纯)、10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.40)、10 mmol/L氯化钠(NaCl)、3 mmol/L氯化镁(MgCl₂)、1 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)和0.50 mmol/L苯甲基碘酰氟(PMSF,使用前从溶于乙醇的100 mmol/L储存液中添加)。

1.4 各种放射性药物摄取检测 向6孔培养板中的细胞加入上述5组药物后继续培养2 h,吸除上清,加入0.02%EDTA消化收集细胞,PBS缓冲液冲洗两次,离心,弃上清,棉棒吸除管口残余液体, γ 测量仪检测细胞,总T管及本底的每分钟计数(count per minute, CPM),计算4种放射性药物在肺癌

细胞Calu-3中的摄取率。计算公式:肿瘤细胞摄取率=肿瘤细胞CPM值/总T管CPM值×100%。采用渗透溶胀法分离体外培养的肿瘤细胞胞核^[8]。用10倍体积裂解缓冲液重悬细胞沉淀,离心管在冰上放置10 min,将已经膨胀的细胞转移到预冷的匀浆器中,快速向上抽提研杵10~12次,破碎细胞后,将此悬液4℃1000 g离心3 min,吸弃上清,沉淀重悬于10倍体积的裂解缓冲液中,再离心、弃上清,即得到较纯的细胞核。测细胞核、总T管及本底的CPM值,计算胞核摄取几种放射性药物占细胞总摄取的比率。将各组细胞核计数后的沉淀涂片,用95%酒精固定后行苏木素伊红(hematoxylin eosin, HE)染色,镜检细胞核纯度。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各种放射性药物细胞摄取率之间及细胞核摄取占细胞摄取的百分比之间的比较均采用单因素方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 细胞核镜检 HE染色后细胞核被苏木素染成蓝紫色,细胞浆被伊红染成粉红色。计数结果显示细胞核计数占总计数的比例达95%,细胞核分离较纯,因此细胞核摄取放射性药物 γ 测量仪计数结果较准确。蓝紫色周围未见粉红色胞浆的即为分离所得的细胞核(图1)。

2.2 肺癌细胞Calu-3对各种放射性药物的摄取率测定 γ 测量仪计数结果显示肺癌细胞Calu-3对¹⁸F-FDG的摄取明显高于^{99m}Tc-DTPA-DG、^{99m}Tc-DTPA及^{99m}TcO₄⁻,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺癌细胞Calu-3对^{99m}Tc-DTPA-DG的摄取明显高于^{99m}Tc-DTPA组和^{99m}TcO₄⁻组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞对^{99m}Tc-DTPA组和^{99m}TcO₄⁻组的摄取与生理盐水组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

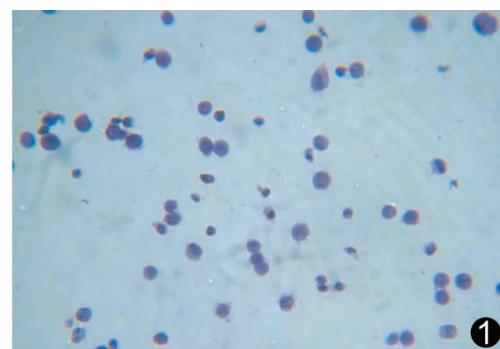


图1 肺癌细胞Calu-3分离所得的细胞核涂片染色后镜检,蓝紫色的为细胞核(HE, $\times 200$)

2.3 细胞核摄取^{99m}Tc-DTPA-DG与¹⁸F-FDG所占细胞总摄取的比率 ^{99m}Tc-DTPA-DG各放射性活度组细胞核摄取占细胞总摄取的比率均明显高于¹⁸F-FDG组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表2,图2)。

3 讨论

本实验采用渗透溶胀法从体外培养的细胞中提取细胞核,观察肺癌细胞Calu-3对几种常见放射性药物摄取的情

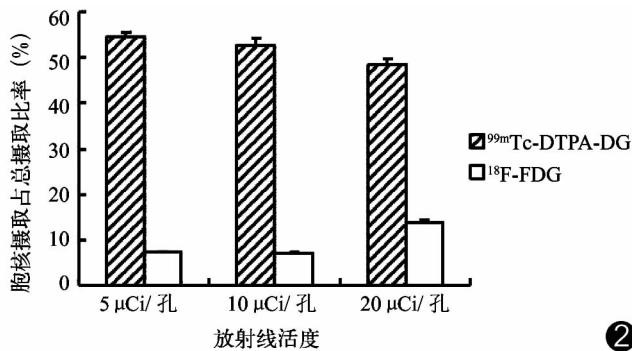


图 2 肺癌细胞 Calu-3 细胞核摄取^{99m}Tc-DTPA-DG 与¹⁸F-FDG 所占细胞摄取的比率,前者明显高于后者

况,结果显示肺癌细胞 Calu-3 对¹⁸F-FDG 的摄取明显高于其余 3 组药物,验证了¹⁸F-FDG 是目前最好的用于肿瘤显像的放射性药物。但是¹⁸F-FDG 进入细胞核所占细胞总摄取的比率却明显低于^{99m}Tc-DTPA-DG 组,说明¹⁸F-FDG 只进入细胞浆,不能进入细胞核或入核量太少,故不能参与细胞核增殖。用¹⁸F-FDG 进行 PET 显像评估恶性肿瘤临床虽已应用了将近 20 年,但 FDG 只能评估细胞质的感染,不能评估细胞核的活性,因而在区分肿瘤与炎症感染方面有局限性^[9]。Yang 等^[10]也曾报道,体外³H-胸腺嘧啶核苷(TdR)掺入实验表明,FDG 可能不进入细胞核,而 EC-DG 与 DG 类似,可能借助肿瘤细胞核膜上丰富的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶作用,进入肿瘤细胞核内调节细胞增殖信号,反映更多的细胞增殖信息。^{99m}Tc-EC-DG 虽已进入临床试验阶段,但其肿瘤/血液及肿瘤/肺组织比值均 < 1.00,低于¹⁸F-FDG,所以仍不理想。

本研究^{99m}Tc-DTPA-DG 组进入肺癌 Calu-3 细胞的量虽比¹⁸F-FDG 组低,但却明显高于^{99m}Tc-DTPA 组及^{99m}TcO₄⁻组($P < 0.05$)。陈跃等^[11-12]报道,^{99m}Tc-DTPA-DG 荷瘤裸鼠显像示肿瘤组织清晰可见,^{99m}Tc-DTPA 显像示肿瘤灶未见放射性浓聚;^{99m}Tc-DTPA-DG 在己糖激酶作用下被磷酸化形成 6-磷酸-DTPA-DG,但不能被进一步代谢,而滞留在细胞内;^{99m}Tc-DTPA-DG 荷瘤裸鼠肿瘤/本底比值明显高于炎症小鼠炎症/本底比值。本研究^{99m}Tc-DTPA-DG 组细胞核摄取所占细胞总摄取的比率明显高于其余三组($P < 0.05$),说明^{99m}Tc-DTPA-DG 不但能被肺癌 Calu-3 细胞摄取,而且可以通过某种途径进入细胞核,故可反映更多的细胞信息,在区分炎症与肿瘤方面较¹⁸F-FDG 特异性增强,有望降低肿瘤诊断的假阳性率。

本研究^{99m}Tc-DTPA 组和^{99m}TcO₄⁻组细胞计数较低,与生理盐水组之间比较差异无统计学意义,可能因其不被肿瘤细胞摄取或其不能稳定存在于细胞内一定的时间。故肺癌细胞 Calu-3 细胞对^{99m}Tc-DTPA 与^{99m}TcO₄⁻的摄取无统计学意义。

目前已有不少研究证实,蛋白质的动态化学修饰除磷酸化/去磷酸化以外,还存在着另外一种化学修饰,即氧连 N-乙酰氨基葡萄糖化(O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)^[13]。这一修饰主要发生在细胞液和细胞核蛋白质的丝/苏氨酸残基上,与经典的蛋白多糖和糖蛋白不同,属于单

糖修饰。细胞骨架蛋白、调节蛋白、转录因子、核孔蛋白及肿瘤抑制蛋白等许多可发生磷酸化修饰的蛋白质均可发生 O-GlcNAc 动态修饰。这种动态修饰的确切生物学功能尚不清楚,但已有的研究显示这种单糖动态修饰可能与磷酸化一样具有调节蛋白质功能的作用,二者之间可能具有相互制约的关系。了解细胞核和细胞质蛋白 O-GlcNAc 修饰有助于从新的角度阐明细胞的转录、核运输及骨架组装等有关的信号转导过程,为深入研究^{99m}Tc-DTPA-DG 在细胞以及肿瘤中的代谢机制奠定基础。DTPA-DG 分子包含氨基、乙酰基、羧基等,可能通过肿瘤细胞核膜上的 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶进入细胞核内,6-磷酸-葡萄糖胺介导 mRNA 表达、肿瘤增生信号和转运,反映肿瘤细胞增殖情况^[12]。有报道^[14]认为^{99m}Tc-DTPA-DG 可参与细胞 DNA 的合成,是一种分子代谢显像剂。^{99m}Tc-DTPA-DG、^{99m}Tc-EC-DG 和¹⁸F-FDG 三者在细胞内代谢途径不同,可能与前两者的螯合剂含的多种不同活性基团有关,有待进一步研究。

本实验结果表明,^{99m}Tc-DTPA-DG 不但可以被肿瘤细胞摄取,而且可以通过某种途径进入细胞核,故^{99m}Tc-DTPA-DG 虽与¹⁸F-FDG 均属肿瘤非特异性显像剂,却可能提高放射性药物在区分炎症与肿瘤方面的特异性,是一种有潜在价值的可用于肿瘤显像的靶向分子显像剂。

参考文献

- Ning XH, Li DJ, Wang BC, et al. The application of ¹⁸F-FDG PET in the diagnosis of malignant tumors. Chinese Clinical Oncology, 2006, 11(10): 760-764.
- 宁小红, 李冬晶, 王伯诚, 等.¹⁸F-FDG PET 显像在恶性肿瘤诊断中的应用. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(10): 760-764.
- Szyszko T, Al-Nahhas A, Canelo R, et al. Assessment of response to treatment of unresectable liver tumours with 90Y microspheres: value of FDG PET versus computed tomography. Nucl Med Commun, 2007, 28(1): 15-20.
- Yang DJ, Kim E. Tracer development and hybrid imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(9): 1001-1002.
- Kamel EM, McKee TA, Calcagni ML, et al. Occult lung infarction may induce false interpretation of ¹⁸F-FDG PET in primary staging of pulmonary malignancies. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(6): 641-646.
- Qin CJ, Huang SC, Yan LM, et al. Cause of physiological and benign focus high uptake of PET/CT imaging of the healthy females' pelvis in the child-bearing age. Chin J Med Imaging Technol, 2007, 23(11): 1713-1716.
- 秦朝军, 黄盛才, 颜李梅, 等.育龄妇女盆腔¹⁸F-FDG PET/CT 高代谢灶中生理性的和良性原因. 中国医学影像技术, 2007, 23(11): 1713-1716.
- Yang DJ, Kim CG, Schechter NR, et al. Imaging with ^{99m}Tc-EC-DG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. Radiology, 2003, 226(2): 465-473.
- Chen Y, Xiong QF, Yang X, et al. Noninvasive scintigraphic detection of tumor with ^{99m}Tc-DTPA-deoxyglucose: an experimental study. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(3): 403-405.

- [8] Zhang ZR. Cultural cytology and technique for cell culture. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2004: 164-166.
张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 164-166.
- [9] Pan ZY. Diagnostics of PET. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 18-24.
潘中允. PET 诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 18-24.
- [10] Yang D, Yukihiko M, Yu DF, et al. Assessment of therapeutic tumor response using ^{99m}Tc -ethylenediy cysteine-glucosamine. Cancer Biother Radiopharm, 2004, 19(4): 443-456.
- [11] Chen Y, Huang ZW, He L, et al. Preparation and experimental study of ^{99m}Tc -DTPA-deoxyglucose for tumor imaging. Chin J Nucl Med, 2005, 25(3): 176-178.
陈跃, 黄占文, 何菱, 等. ^{99m}Tc -DTPA-DG 的制备及其荷瘤裸鼠实验研究. 中华核医学杂志, 2005, 25(3): 176-178.
- [12] Chen Y, Xiong QF, Yang XQ, et al. Noninvasive scintigraphic detection of tumor with ^{99m}Tc -DTPA-deoxyglucose: an experimental study. Chinese Journal of Medical Imaging, 2006, 14(6): 472-473.
陈跃, 熊青峰, 杨西群, 等. ^{99m}Tc -DTPA-DG 肿瘤显像的实验研究. 中国医学影像学杂志, 2006, 14(6): 472-473.
- [13] Li JL, Ma L. The function of O-linked N-acetylglucosamine in signal transduction. Progress in Physiological Sciences, 2002, 33(4): 373-375.
李家立, 马兰. N-乙酰氨基葡萄糖在信号转导中的作用. 生理科学进展, 2002, 33(4): 373-375.
- [14] Zhao YL, Chen Y, Huang ZW, et al. Effects of ^{99m}Tc -diethylenetriamine pentaacetic acid glucosamine on proliferation of lung cancer A549 cells. Shandong Medical Journal, 2006, 46(23): 5-7.
赵燕凌, 陈跃, 黄占文, 等. ^{99m}Tc -DTPA-DG 对肺癌 A549 细胞增值的影响. 山东医药, 2006, 46(23): 5-7.

EIZO 推出 3 兆像素彩色医疗显示器

2009 年 3 月 24 日,艺卓公司(Eizo Nanao Corporation)新产品发布会在北京国航万丽酒店召开,除介绍多种普通及图像显示器外,还隆重推出了专为单色和彩色医疗成像的 3 百万像素诊断用液晶显示器:RadiForce RX320。

RadiForce RX320 的分辨率可达到 3 百万像素(1536×2048 自然分辨率),能够以完美的图像质量显示大多数医疗图像(从胸部 CR 到 3D/融合)。其 900 cd/m^2 的高亮度与 1000: 1 的对比度完全可与诊断用单色显示器媲美,而且 RadiForce RX320 达到了 DICOM 第 14 部分标准,非常适合显示彩色和单色图像。对每个 RGB 色调,RadiForce RX320 支持 10 位 RGB 输入,可同时显示多种颜色,为 3D 渲染和图像融合处理提供了完美的图像。

RadiForce RX320 采用了艺卓自行研发的最新专用集成电路(ASIC)。ASIC 包含数字均匀均衡器功能,对所有液晶面板普遍存在的亮度不均匀问题进行补偿,确保整个屏幕的亮度都均匀一致,还可修正色度的不均匀性,因此这款彩色显示器可在屏幕上的任何位置精确显示灰度图像。

RadiForce RX320 的 CAL 开关功能可帮助用户根据不同的医疗图像通过前面板按钮选择各种校准模式。而且其具有双通道输入支持,可再现流畅的运动图片,不会出现掉帧现象。背光节能功能可降低功耗,延长显示器的使用寿命。另外,该显示器提供 5 年制造商保修服务。

艺卓公司总部位于日本,是世界领先的高端显示设备制造商,生产多种类型的 LCD 显示器。其 RadiForce RX320 预计 2009 年第 3 季度将在中国发售。