

# 肿瘤细胞<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin摄取量与P-糖蛋白表达水平的关系

朱爱芝 陈丽蓉 郭振泉 郭秋菊 王祥云

**【摘要】** 目的 比较肿瘤细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-甲氧基异丁基异腈(MIBI)和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取情况,研究细胞的药物摄取量与细胞P-糖蛋白(Pgp)表达水平的关系。方法 用放射性核素示踪法研究人子宫颈癌细胞Hela、人乳腺癌细胞MCF-7、人乳腺癌细胞Bca61和抗阿霉素人乳腺癌细胞MCF-7/Adr对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取动力学。研究奎尼丁作用于肿瘤细胞时对肿瘤细胞药物摄取量的影响。用免疫组织化学染色法对这4种癌细胞的Pgp表达水平进行研究。结果 免疫组化法检测出Hela、MCF-7、Bca61的Pgp表达呈阴性,MCF-7/Adr的Pgp表达呈强阳性。Pgp阴性的癌细胞对2种药物的摄取量较高,并且对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI的摄取量较对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin高,而Pgp强阳性的MCF-7/Adr对2种药物的摄取量很低。奎尼丁可使MCF-7/Adr对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取量分别提高3.5和4.3倍。结论 肿瘤细胞Pgp的表达水平与细胞的药物摄取量呈负相关,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin与<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI一样,可作为衡量与Pgp相关的多药耐药性的标度。奎尼丁对MCF-7/Adr的耐药性有一定的抑制作用。

**【关键词】** MIBI; Tetrofosmin; 肿瘤细胞, 培养的; 放射性示踪剂; 免疫组织化学; P-糖蛋白

**Relationship between the cellular uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin with the Pgp expression levels in carcinoma cell lines** ZHU Aizhi\*, CHEN Lirong, GUO Zhenquan, et al. \*Division of Applied Chemistry, Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871, China

**【Abstract】 Objective** To study the relationship between the cellular uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin and the Pgp expression levels in four carcinoma cell lines, and the effect of quinidine on the uptake. **Methods** <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin were used as radioactive tracers to study the uptake kinetics in the carcinoma cell lines Hela, MCF-7, Bca61 and MCF-7/Adr, and the effect of quinidine on the uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin. The Pgp expression levels in carcinoma cell lines were estimated by using immunocytochemical method. **Results** The cellular uptake of both <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin was remarkably lower in MCF-7/Adr which gave a strong positive reaction in the Pgp immunocytochemical assay than Hela, MCF-7 and Bca61 did, which gave negative reactions in the immunocytochemical assay. Furthermore, the cellular uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI was higher than that of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin in the three Pgp negative carcinoma cell lines. The uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin exhibited a 3.5 fold and a 4.3 fold increase respectively in the presence of quinidine. **Conclusions** The cellular uptake of these two univalent cationic fat-soluble medicines in carcinoma cell lines is negatively correlated with the Pgp expression levels in the cells. Similar to <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin seems also to be a good candidate as a noninvasive marker for the diagnosis of multi-drug resistance (MDR) relating to the Pgp levels in tumors. Quinidine can inhibit the drug resistance of MCF-7/Adr in some degree.

**【Key words】** MIBI; Tetrofosmin; Tumor cells, cultured; Radioactive tracers; Immunohistochemistry; P-glycoprotein

临床实践表明,化疗对于某些肿瘤无效或疗效甚微,或者经过一段时间化疗后产生抗药性。化疗失败的原因是多方面的,多药耐药性是癌症化疗效果不佳的主要原因。迄今对于肿瘤细胞的耐药性机制已有较多研究,多药耐药基因(multi-drug resistance, MDR)编码的P-糖蛋白(Pgp)是其中之一,并起关键作用<sup>[1]</sup>。因此,如何预测肿瘤中Pgp的表达水

平尤为重要,生物学方法必须将组织从病人体内取出后检测,而无创性的放射性核素示踪法显得比较优越。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-甲氧基异丁基异腈(MIBI)不仅用于心肌显像和肿瘤显像,还被认为是Pgp的底物<sup>[2,3]</sup>,可用于Pgp的检测<sup>[4]</sup>。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin亦具有亲心肌和亲肿瘤的性质,也被认为是Pgp的底物<sup>[5]</sup>,但对它的研究较少。本研究比较了子宫颈癌细胞Hela、乳腺癌细胞MCF-7、乳腺癌细胞Bca61和抗阿霉素人乳腺癌细胞MCF-7/Adr对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取动力学。并研究了Pgp抑制剂奎尼丁<sup>[6]</sup>

国家自然科学基金资助项目(29731020-02)

作者单位:100871 北京大学技术物理系应用化学专业(朱爱芝、陈丽蓉、郭秋菊、王祥云),生命中心(郭振泉)

作用于肿瘤细胞时对 Pgp 的逆转效果。用免疫组织化学染色法对这 4 种癌细胞的 Pgp 表达水平进行了研究,以探讨肿瘤细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrafosmin 的摄取量与肿瘤细胞 Pgp 表达水平之间的关系。

### 材料和方法

1. 示踪剂的制备。由<sup>99</sup>Mg-<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 发生器(中国原子能科学研究院同位素所)新鲜淋洗的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>O<sub>4</sub><sup>-</sup>, 加入 MIBI, tetrafosmin 药盒(北京师范大学师宏药物中心),按说明书制备<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrafosmin, 放化纯度均大于 90%,放射性浓度约为 3.7 × 10<sup>7</sup> Bq/mL。

2. 细胞培养。Hela, Bca61(北京大学生命科学学院), MCF-7 和 MCF-7/Adr(中国医学科学院药物研究所)均培养于组织培养瓶中,培养液为含 10% 新生牛血清的 DMEM(Gibco)。培养箱(Cole-Parmer)为 37 °C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 湿润气氛。将对数生长期的 Hela, MCF-7, Bca61 和 MCF-7/Adr 用质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化,吹打成单个悬浮细胞,计数,将细胞悬浮于无血清 DMEM 中,细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup>/mL。实验前和实验中用台盼蓝检测,细胞存活均在 85% 以上。

3. <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrafosmin 摄取实验。为了减少非特异性吸附,塑料管均先用含 1% 新生牛血清的 PBS 浸泡 1 h,然后用 PBS 洗涤 3 遍。实验开始将 50 μL 示踪剂分别加入 5 mL 各细胞悬液中,37 °C 恒温培养。在间隔 1、5、15、30、45、60、90 min 时取样。取 100 μL 细胞悬液加入含有 200 μL 新生牛血清 0.5 mL 塑料离心管中,1 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,将附有细胞沉淀的离心管尖部剪下,用 γ 计数器(北京核仪器厂)检测放射性。空白实验即非特异性吸附实验方法同上,只是不含细胞。

4. 奎尼丁对肿瘤细胞<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrafosmin 摄取量影响实验。肿瘤细胞在加入示踪剂前先与奎尼丁(Sigma)37 °C 恒温培养 15 min,奎尼丁浓度为 0~200 μmol/L(最终浓度)。与示踪剂 37 °C 恒温培养 60 min,其它同摄取动力学实验。

5. 数据处理。结果用摄取百分数表示:特异性细胞摄取计数(沉淀计数-空白计数)除以总计数(100 μL 细胞悬液计数)再乘以 100%。所有数据点均取 5 个平行样,每个实验均独立重复 2~3 次。结果用  $\bar{x} \pm s$ , 数据比较用 *t* 检验。

6. 免疫组织化学染色法检测 Pgp 的表达水平。将对数生长期的细胞接种于六孔板内的盖玻片上,

细胞贴壁后,将盖玻片取出用 PBS 洗涤 2 次,室温干燥 1 h,用丙酮固定 10 min,用含体积分数为 30% NBS 的 PBS 洗涤,加上 1:50 稀释的 Pgp 单抗 JSB-1(Vector),阴性对照用 PBS 代替一抗,37 °C 恒温培养 1 h,用 PBS 洗涤 6 次,加上生物素化羊抗鼠 IgG(Vector),37 °C 恒温培养 1 h,用 PBS 洗涤 6 次,加上辣根过氧化酶标定的链霉亲和素(Vector),37 °C 恒温培养 1 h,用 PBS 洗涤 6 次, DAB 显色 30 min,苏木精复染。最后,干燥封片。用显微镜观察,拍照。

7. 阳性标准。以细胞出现棕黄色为阳性染色。当 10% 以上细胞呈阳性且染色明显,肿瘤细胞系认为是强阳性(++);当阳性细胞少于 10% 且染色较淡,肿瘤细胞系是弱阳性(+);当没有细胞呈阳性时,肿瘤细胞系阴性。

### 结 果

1. 免疫组化法检测 Pgp 的表达水平。Pgp 表达水平可从染色情况和染色细胞数量看出。MCF-7/Adr 呈强阳性(图 1),定位于胞膜及胞浆位置,而 MCF-7(图 1)、Hela、Bca61 均呈阴性。

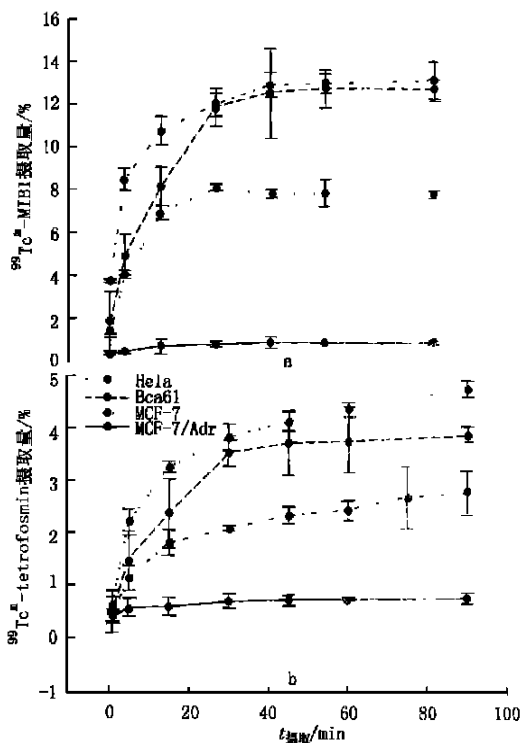


图 2 肿瘤细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI(a) 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrafosmin(b) 的摄取曲线

2. 细胞的药物摄取动力学。Hela、MCF-7、Bca61、MCF-7/Adr 在培养 50 min 后对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 的摄取形成动态平衡,达到最大值,90 min 仍处于平衡

状态(图2a)。对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI的摄取量以Hela最大, MCF-7/Adr最小。这4种细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取,与图2a类似,在培养50 min后形成动态平衡,达到最大值,90 min仍处于平衡状态(图2b)。对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取量以MCF-7最大, MCF-7/Adr最小。除MCF-7/Adr外,其它3种细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI的摄取量都比对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin大。

3. 奎尼丁对细胞药物摄取量的影响。奎尼丁浓度在0~200 μmol/L,对Hela、MCF-7、Bca61的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI摄取量均无明显变化,而MCF-7/Adr呈明显上升趋势,奎尼丁200 μmol/L时,摄取量提高了约3.5倍(图3a)。奎尼丁浓度在0~200 μmol/L,对Hela、MCF-7、Bca61的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin摄取量也无明显变化,而MCF-7/Adr呈明显上升趋势,奎尼丁200 μmol/L时,摄取量提高了约4.3倍(图3b),表明奎尼丁对Pgp有一定的抑制作用。

大体维持在较低水平。而Pgp表达阴性的细胞株,对药物的摄取量在早期呈明显升高,在30~60 min分别达到最高峰,90 min时未见下降,比耐药细胞株相对要高得多。这表明Pgp对药物摄取量的高低起着非常重要的作用。奎尼丁在不影响细胞活力(生存率>85%)的浓度范围内,对Pgp有一定的抑制作用,使MCF-7/Adr对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin摄取量分别提高3.5和4.3倍。表明耐药性是可以逆转的,只要找到低毒、高效的抑制剂,就可改善化疗效果。

从摄取动力学曲线的比较可推测,细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI的摄取和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取机制不同。有人证明<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI有90%以上浓集在线粒体内,而<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin只有一部分浓集在线粒体内<sup>[7]</sup>。尽管它们在细胞中的浓集机制尚不十分清楚,但已有实验证明,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin是Pgp的底物,Pgp表达高的细胞对药物的摄取量低<sup>[2-4]</sup>。本实验也证明<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin都是Pgp的底物。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI可用于Pgp检测显像,而<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin在Pgp功能显像中可能具有更大的优势,由于它标记简单、肾脏清除快、经肝胆排泄量少,用于腹部肿瘤的显像比<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI更优,很有发展前景。

志谢 北京师范大学王学斌教授、唐志刚副教授提供了<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin药盒,北京肿瘤医院杨志先提供<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>

(本文图1见插图页第9页)

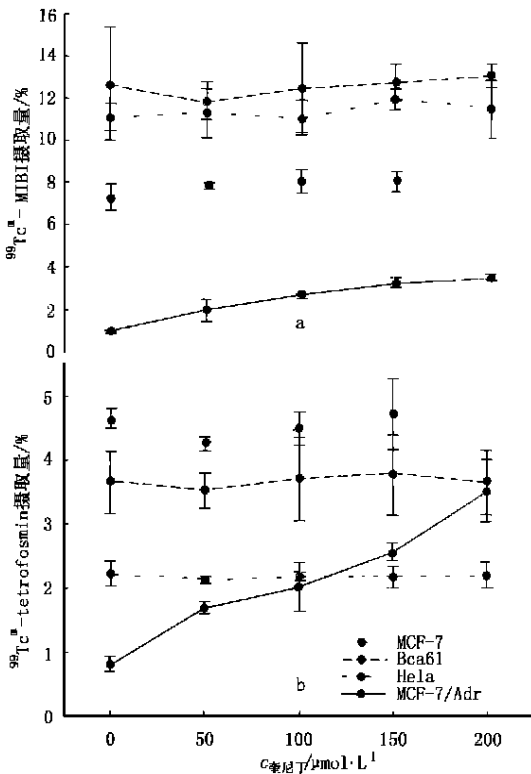


图3 奎尼丁对细胞摄取<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI(a)和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin(b)的影响

### 讨 论

本研究用放射性核素示踪法研究了4种细胞系对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin的摄取动力学。免疫组化法检测Pgp的结果与细胞的药物摄取实验结果一致。耐药细胞株Pgp表达水平高,药物摄取量

### 参 考 文 献

- 1 Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J, et al. Modulation of the multidrug resistance P-glycoprotein: detection with <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-sestamibi in vivo. J Nucl Med, 1997, 38: 369-372.
- 2 Cordobes MO, Starzee A, Delmon-Moingeon L, et al. <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-sestamibi uptake by human benign and malignant breast tumor cells: correlation with mdr gene expression. J Nucl Med, 1996, 37: 286-289.
- 3 Delmon-Moingeon L, Piwnicka-Worms D, Van den Abbele AD, et al. Uptake of the cation hexakis (2-methoxyisomethylisonitrile)-<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> by human carcinoma cells lines in vitro. Cancer Res, 1990, 50: 2198-2202.
- 4 邵虹, 吴靖川. <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI检测肿瘤多耐药基因表达产物P-gp的研究进展. 国外医学放射医学核医学分册, 1998, 22: 155-158.
- 5 Ballinger JR, Bannerman J, Boxen I, et al. <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin as a substrate for P-glycoprotein: in vitro studies in multidrug resistant breast tumor cells. J Nucl Med, 1996, 37: 1578-1582.
- 6 Kusuhara H, Suzuki H, Terasaki T, et al. P-glycoprotein mediates the efflux of quindine across the blood-brain barrier. J Pharm Exp Ther, 1997, 283: 574-580.
- 7 Arlab AS, Koizumi K, Toyama K, et al. Uptake of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI and <sup>201</sup>Tl in tumor cell line. J Nucl Med, 1996, 37: 1554-1556.

(收稿日期:1999-12-14)

## 肿瘤细胞<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-MIBI 和<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-tetrofosmin 摄取量与 P-糖蛋白表达水平的关系

(正文见第 266 页)

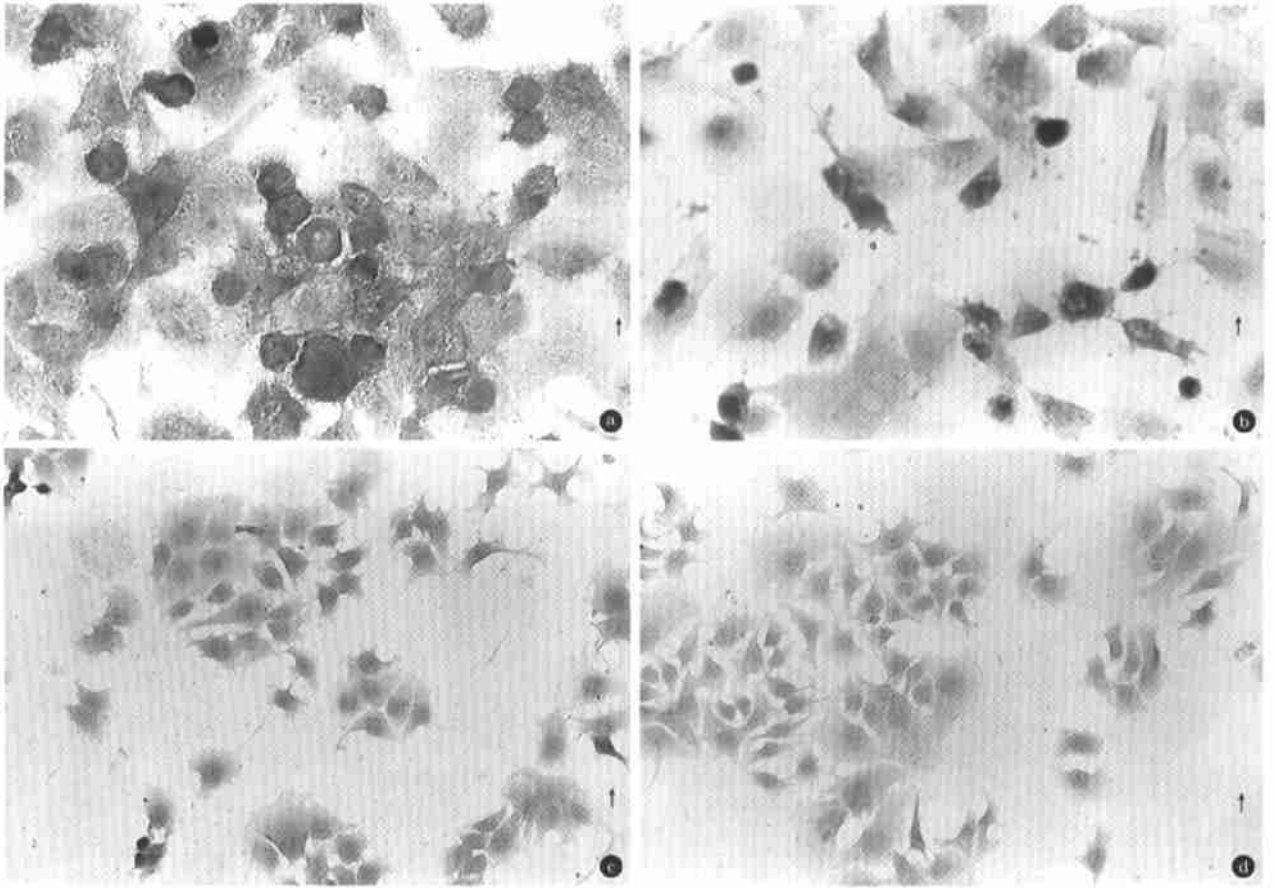


图1 MCF-7/Adr(a. 实验组, b. 空白对照组 LSAB法 × 3 000)和MCF-7(c. 实验组, d. 空白对照组 LSAB法 × 1 500)免疫组织化学染色结果

## 中枢多巴胺转运蛋白显像剂<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-TRODAT-1 的实验研究

(正文见第 285 页)

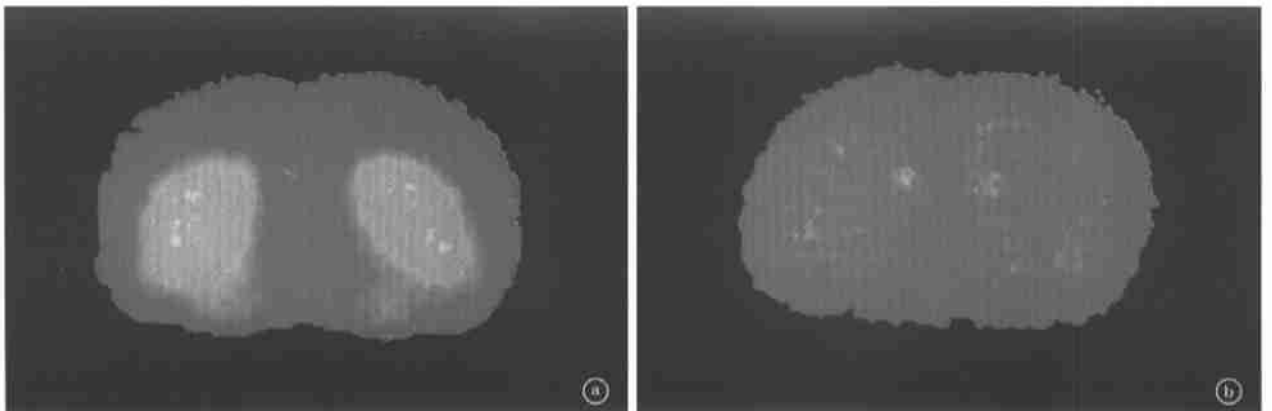


图1 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-TRODAT-1在大鼠纹状体的放射自显影图。a. 未注射β-CIT, b. 注射β-CIT