

Correlations between $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI uptake and membrane potential of mitochondrion or lung resistant protein of tumor tissues

HU Shuo^{1*}, FU Chun-yan², HUANG Bai-ying³, LIANG Chang-hua¹

(1. Department of Nuclear Medicine, 2. Department of Pathology, 3. Center of Measurement, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI examining the resistance of lung adenocarcinoma A549DDP cells. **Methods** The method of methoxyisobutylisonitrile (MTT) was applied to test IC_{50} of cisplatin to A549 cells, to test IC_{50} of cisplatin to A549DDP cells after dealing with or without micro dose of cisplatin. The cells above were all injected under the skin of nude mice to observe growth status of tumors. After setting up of the tumor models, the nude mice were performed using SPECT with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI. Lung resistant protein (LRP) of transplanted tumor cells were determined with immunohistochemical method. Membrane potential of mitochondrion ($\Delta\Psi$) of the cells were measured by flow cytometry. **Results** IC_{50} of cisplatin to A549 cells was 24 μM . That to A549DDP cells which did not deal with micro dose of cisplatin was 182 μM , and to A549DDP cells dealt with micro dose of cisplatin was 325 μM . Tumors developed by reason of injecting $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI in all mice. The R value in A549 mice was remarkably higher than that in A549DDP mice ($P < 0.05$). LRP in A549 cells from transplanted tumor did not express otherwise that in A549DDP cells strongly expressed. $\Delta\Psi$ of A549DDP cells dealt with micro dose of cisplatin were observably higher than that of both A549DDP cells which dealt without micro dose of cisplatin and A549 cells. **Conclusion** The mechanism of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI examine the resistance of lung adenocarcinoma A549DDP cells may correlate with both $\Delta\Psi$ of cells and expression of LRP of cells.

[Key words] $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI; Drug resistance; Transmembrane potential; Lung resistant protein

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在癌组织中的摄取与跨膜电位或肺耐药蛋白相关性

胡 硕^{1*}, 付春燕², 黄柏英³, 梁昌华¹

(1. 中南大学湘雅医院核医学科, 2. 病理科, 3. 现代测试中心, 湖南 长沙 410008)

[摘 要] **目的** 探讨 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 检测肺腺癌 A549DDP 细胞的耐药性的机制。 **方法** 用 MTT 法检测顺铂对敏感 A549 细胞的 IC_{50} 及有或无顺铂再处理后的 A549DDP 细胞的 IC_{50} 。将上述细胞注入裸鼠皮下建立模型后, 用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 进行 SPECT 显像, 以免疫组化方法检测移植瘤细胞的 LRP 蛋白表达, 流式细胞仪检测癌细胞的跨膜电位。 **结果** 顺铂对 A549 细胞、A549DDP 细胞的 IC_{50} 分别为 24、325、182 μM 。A549 裸鼠 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 显像可见瘤块放射性浓聚影, A549DDP 裸鼠亦可见瘤块的放射性浓聚影, 其放射性浓度较前者明显减淡($P < 0.05$)。A549 移植瘤细胞 LRP 蛋白呈阴性, 无顺铂再处理的 A549DDP 移植瘤细胞 LRP 蛋白表达呈阳性, 顺铂再处理的 A549DDP 移植瘤细胞 LRP 蛋白表达呈强阳性, 三者间有显著性差异($P < 0.01$)。各组细胞的 LRP 蛋白的表达与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值呈弱的负相关($r = -0.59, P < 0.05$)。三种细胞跨膜电位有显著性差异, 跨膜电位与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值呈较强的负相关($r = -0.71, P = 0.005$)。 **结论** $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 检测肺腺癌耐药的 A549DDP 细胞的耐药性与细胞的跨膜电位关系密切, 能在某种程度上反映肺癌 LRP 蛋白的表达。

[关键词] $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI; 耐药; 跨膜电位; 肺耐药蛋白

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2005)07-1078-04

[基金项目] 本文受湖南省科技厅课题基金(03SSY3054)资助。

[作者简介] 胡硕(1971—), 女, 湖南郴州人, 博士, 主治医师。

[通讯作者] 胡硕, 中南大学湘雅医院核医学科, 410008。

E-mail: hushuo_xy@sina.com

[收稿日期] 2005-03-25 **[修回日期]** 2005-04-25

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 作为肿瘤非特异性显像剂已研究 10 余年, 近几年来作为肿瘤耐药的检测手段越来越受到研究者的关注^[1], 但其机制仍不十分清楚。本研究探讨肿瘤细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 与细胞的跨膜电位及肺耐药蛋白(lung resistant protein, LRP)之间的关系。

1 材料与方法

1.1 MTT 法检测肿瘤细胞的 IC_{50} 将常规培养传代 10 个月后的肺腺癌耐药细胞株 A549DDP 细胞,一部分用小剂量顺铂再作用 1 周,另一部分细胞不作处理,MTT 法检测顺铂 (Cisplatin, DDP) 对这两部分细胞及敏感细胞株 A549 细胞的 IC_{50} 。

1.2 动物模型建立 将对数生长期的 A549 细胞和上述两部分 A549DDP 细胞分别随机注入裸鼠右侧腋窝皮下,每组 5 只裸鼠,每只裸鼠注入的细胞数为 1×10^7 个。隔日用游标卡尺测量肿瘤直径,观察肿瘤生长速度。

1.3 $^{99}Tc^m$ -MIBI 显像 接种肿瘤细胞前,将裸鼠进行单光子发射计算机断层显像 (single photon emission computed tomography, SPECT),观察 $^{99}Tc^m$ -MIBI 在裸鼠体内的分布情况。接种 2 个月后对各组动物进行 SPECT, SPECT 仪系美国 GE 公司生产的 VG5-Hawkeye 型。从裸鼠尾静脉注入 18.5 MBq $^{99}Tc^m$ -MIBI 40 min 后,将裸鼠固定俯卧于检查床上,进行平面显像,矩阵 128×128 ,采集计数为 1000 kpm。观察肿瘤的显影情况,在裸鼠的右侧腋窝长肿瘤的部位、与其对

称的左侧腋窝分别画感兴趣区,计算感兴趣区内的平均放射性计数,根据公式^[2]计算 $^{99}Tc^m$ -MIBI 的相对摄取值 R 。

$$R = \frac{\text{右侧腋窝(肿瘤)的平均放射性计数}}{\text{左侧腋窝的平均放射性计数}} \quad (1)$$

1.4 LRP 的检测 细胞接种 2 个月后,处死动物,分离出瘤块,测直径后,置于 10% 的福尔马林溶液中固定,然后脱水,石蜡包埋,切片,按北京中山生物技术有限公司提供的试剂盒说明书进行操作,检测 LRP 的表达。细胞质黄染为阳性,依染色深浅分为:-(阴)、+(弱)、++(中)、+++ (强),计分分别为 0(-)、1(+)、2(++),3(+++),每个样本计数 200 个细胞,算出各种染色细胞计分。

1.5 跨膜电位的检测 将瘤块消化,PBS 洗涤重悬,加入 20 μM 的 Rh123 染液,37℃ 避光染色 30 min, PBS 液洗涤 2 次,重悬后在流式细胞仪上检测,激发波长 488 nm,吸收波长 525 nm。

1.6 统计学处理 组间 IC_{50} 的差异性采用单因素方差分析, $^{99}Tc^m$ -MIBI 摄取值与跨膜电位或与 LRP 间的相关性采用 Spearman 秩相关分析。

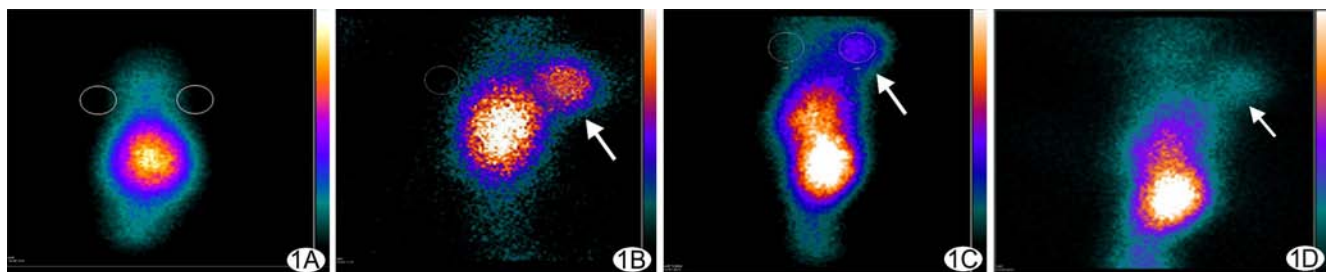


图 1A 正常裸鼠 $^{99}Tc^m$ -MIBI 影像(后位)裸鼠胸腔下部和腹腔大量放射性浓聚,圆圈为感兴趣区示意图 图 1B A549 组裸鼠 $^{99}Tc^m$ -MIBI 影像右侧腋窝较浓的放射性浓聚影(箭头所示)系移植瘤 图 1C 对照组裸鼠 $^{99}Tc^m$ -MIBI 显像右侧腋窝较淡的放射性浓聚影(箭头所示)系移植瘤 图 1D 对照组裸鼠 $^{99}Tc^m$ -MIBI 显像右侧腋窝很淡的放射性浓聚影(箭头所示)系移植瘤

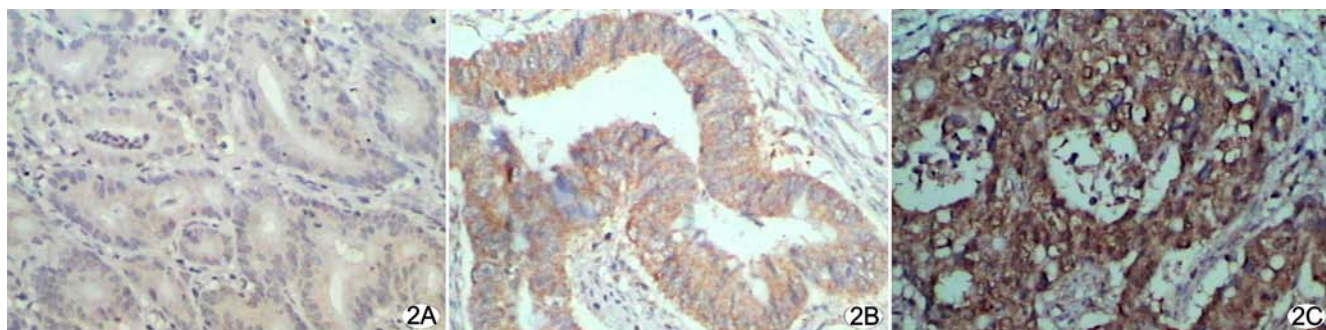


图 2A A549 移植瘤细胞 LRP 染色(200 $\times$)细胞质染色极淡(-) 图 2B 无顺铂处理的 A549DDP 细胞 LRP 染色(200 $\times$)细胞质被染成浅棕黄色(++) 图 2C 顺铂处理的 A549DDP 细胞 LRP 染色(200 $\times$)细胞质被染成棕黄色(+++)

2 结果

2.1 细胞的 IC_{50} 顺铂对 A549 细胞的 IC_{50} 为 24 μM ;小剂量顺铂再处理前 A549DDP 细胞的 IC_{50} 为 182 μM ,再处理后的 IC_{50} 为 325 μM ;三组细胞间的 IC_{50} 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 移植瘤生长情况 细胞接种 2 个月后,A549 组裸鼠移植瘤生长迅速,瘤体直径为 25.5~38.7 mm,平均 34.1 mm;未用顺铂再处理的 A549DDP 裸鼠移植瘤生长较缓慢,瘤体

直径为 7.1~14.5 mm,平均 11.2 mm。顺铂再处理的 A549DDP 裸鼠移植瘤生长十分缓慢,瘤体直径为 5.2~10.1 mm,平均 8.4 mm。

2.3 $^{99}Tc^m$ -MIBI 显像 接种瘤细胞前的正常裸鼠,心、肝、肠道摄取 $^{99}Tc^m$ -MIBI,表现为胸腔下部和腹腔大量放射性浓聚,(受分辨率影响,胸腹腔影像融合在一起),颈部和尾巴根部的影像极淡 ($R = 0.99 \pm 0.06$,图 1A)。A549 裸鼠除了胸腔下

部腹腔大量放射性浓聚,在右侧腋窝部位可见局部放射性浓聚影($R=7.49\pm0.12$,图 1B)。无顺铂再处理的 A549DDP 裸鼠在右侧腋窝部位亦可见局部放射性浓聚影,其放射性浓度较 A549 组淡($R=4.24\pm0.10$,图 1C,与 A549 组比较, $P<0.05$)。顺铂再处理的 A549DDP 裸鼠在右侧腋窝部位局部放射性浓聚影极淡($R=1.92\pm0.08$,与 A549 组比较, $P<0.01$,图 1D)。

2.4 移植瘤 LRP 的表达 A549 组裸鼠移植瘤细胞质染色极淡,呈—~+(图 2A),染色积分为 57.0 ± 8.6 ;无顺铂再处理的 A549DDP 移植瘤细胞质被染成浅棕黄色,呈+~++(图 2B),染色积分为 204.8 ± 7.3 ;而顺铂再处理后的 A549DDP 裸鼠移植瘤细胞质被染成棕黄色,呈++~+++ (图 2C),染色积分为 468.0 ± 20.4 。三组间积分有显著性差异($F=113.544, P<0.01$)。细胞的 LRP 的表达与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值呈弱的负相关($r_s=-0.59, P<0.05$)。

2.5 移植瘤细胞线粒体跨膜电位的检测 顺铂再处理后的 A549DDP 细胞平均跨膜电位高于无顺铂再处理的 A549DDP 细胞, ($P<0.05$),更高于 A549 移植瘤细胞的跨膜电位,三者间的跨膜电位有显著性差异($F=38.211, P<0.01$,图 3)。跨膜电位与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值呈较强的负相关($r_s=-0.71, P=0.005$)。

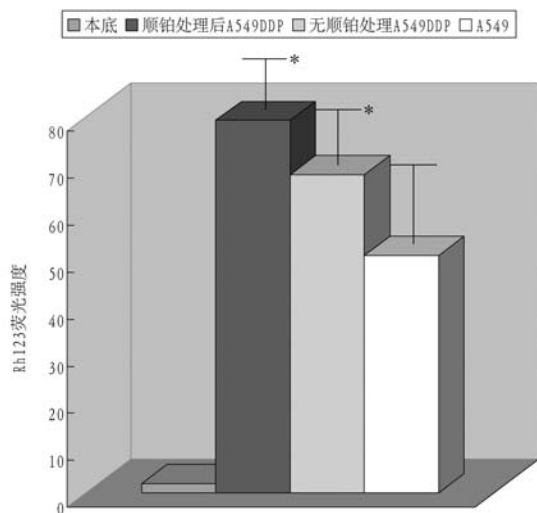


图3 各细胞平均跨膜电位直方图 * : 与 A549 组比较, $P<0.05$

3 讨论

A549DDP 耐药细胞系由敏感细胞株 A549 细胞经低浓度的 DDP 长期诱导而成,在无 DDP 的培养中培养 20 周后,耐药性仍稳定。有研究表明^[3],A549DDP 细胞的倍增时间为 34 h, A549 细胞的倍增时间为 28 h,即 A549DDP 细胞的倍增时间较其亲代增加 6 h,因此 A549DDP 细胞的生长速度明显缓于 A549 细胞。本研究发现, A549DDP 细胞培养半年后,耐药性下降较快,至 10 个月其 IC_{50} 下降近一半。从移植瘤生长情况看,接种 A549DDP 细胞的裸鼠移植瘤块,明显比接种 A549 细胞的裸鼠移植瘤块小,说明 A549DDP 细胞在裸鼠体

内增殖速度明显缓于 A549 细胞,与文献报道一致。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 作为一种肿瘤显像剂,它被肿瘤细胞摄取量与肿瘤的耐药性相关,已经证实 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在敏感细胞内的聚集量比多药耐药肿瘤细胞更多,因此 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 有望成为多药耐药表型体内显像诊断的一个好的显像剂^[4,5]。本研究在裸鼠体内,敏感的 A549 细胞增殖活跃,其对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 聚集量明显高于增殖相对缓慢的 A549DDP 细胞,而未经顺铂再处理的 A549DDP 细胞增殖活力较顺铂再处理的 A549DDP 细胞强,前者对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 聚集量明显高于后者,说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取与细胞的增殖代谢关系密切,与文献报道相符^[6]。

近年来有关 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 与肿瘤耐药的关系有不少报道,但其机制仍不十分清楚。目前研究较多的是 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在肿瘤细胞内的聚集与细胞 MDR、P-gp 等基因或蛋白表达的关系^[7-9],但尚无一致结论。LRP 是新近发现的一种多药耐药蛋白,首先发现于肺癌细胞中,故命名为肺耐药蛋白^[10],是穹窿蛋白的主要成分,其过度表达明显影响药物的胞内转运和分布,致靶点药物有效浓度下降而介导对铂类、烷化剂等耐药。肺癌中 LRP 的高表达是预测化疗敏感性和预后的重要指标,阳性表达者对化疗敏感性差,化疗效果不好。文献报道^[11]在实体瘤中,LRP 比 P-gp、MRP 具有更高的耐药诊断价值,是体外一种更好的耐药预警指标。LRP 的表达可作为一种很强和独立的预测化疗敏感性的指标。本研究结果提示,对于 A549DDP 细胞,其耐药性越强,LRP 表达越高,顺铂再处理过的 A549DDP 细胞,LRP 表达呈强阳性;未用顺铂再处理过的 A549DDP 细胞,LRP 表达呈弱阳性;而敏感的 A549 细胞 LRP 表达呈阴性。了解肿瘤的耐药机制对于合理化疗至关重要,本研究证实 A549 细胞系对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的聚集量与细胞的 LRP 表达有弱的负相关性,说明细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的聚集量能在一定程度上反映细胞的 LRP 的表达,这为临床上肺癌患者的化疗方案提供了一定的辅助指导价值。

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 是异腈类化合物中的一种亲脂性阳离子,线粒体和质膜的跨膜电位及肿瘤细胞的线粒体含量被认为在肿瘤摄取机制中起重要作用,Arbab 等^[12]研究了 MIBI 在肿瘤细胞株中的动力学、细胞摄取及细胞内分布,发现 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 总是聚集在富含线粒体的肿瘤中。Cutrone 等^[13]评估了乳腺癌细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的程度与乳癌组织学关系,包括新生血管形成、促结缔组织增生反应、细胞增殖、线粒体密度,未发现线粒体密度与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取明显相关;而发现 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取与细胞增殖和结缔组织增生中等相关。本研究中,敏感的 A549 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取量明显高于耐药的 A549DDP 细胞,而 A549 细胞的线粒体跨膜电位则显著低于 A549DDP 细胞,二者之间呈负相关,说明 A549 细胞线粒体跨膜电位低, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 转运至细胞线粒体的浓度高; A549DDP 细胞线粒体跨膜电位高, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 转运至细胞线粒体的浓度低。曾有文献报道 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 是被动跨膜转运至肿瘤细胞内,与 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶无关^[14];但近几年有学者对细胞生理学研究后认为, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在肿瘤细胞外逆向电能梯度主动转运^[5]。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在肿瘤细胞中聚集,究竟是被扩散还是主动转运,尚需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Wang RF. Nuclear Medicine[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2003.
王荣福. 核医学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003.
- [2] Furuta M, Nozaki M, Kawashima M, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI scintigraphy for early detection of locally recurrent non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003, 30(7): 984-987.
- [3] Cai P, Liu XY, Han FS, et al. Establishment of human lung adenocarcinoma cisplatin-resistant cell line A549DDP and the mechanism of its drug resistance[J]. Chin J Clin Oncol, 1995, 22(8): 582-587.
蔡鹏, 刘叙仪, 韩复生, 等. 耐顺铂人肺癌细胞系 A549DDP 的建立及耐药机制[J]. 中国肿瘤临床, 1995, 22(8): 582-587.
- [4] Utsunomiya K, Ballinger JR, Piquette-Miller M, et al. Comparison of the accumulation and efflux kinetics of technetium-99m sestamibi and technetium-99m tetrofosmin in an MRP-expressing tumor cell line[J]. Eur J Nucl Med, 2000, 27(12): 1786-1792.
- [5] Shih CM, Hsu WH, Huang WT, 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.
- [6] Sarikaya A, Huseyinova G, Irfanoglu ME, et al. The relationship between $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -sestamibi uptake and ultrastructural cell types of thyroid tumours[J]. Nucl Med Commun, 2001, 22(1): 39-44.
- [7] Changlai SP, Tsai CS, Ding HJ, et al. Using technetium-99m methoxyisobutylisonitrile lung single-photon-emission computed tomography to predict response to chemotherapy and compare with P-glycoprotein expression in patients with untreated small cell lung cancer[J]. Med Oncol, 2003, 20(3): 247-253.
- [8] Del Vecchio S, Zannetti A, Aloj L, et al. MIBI as prognostic factor in breast cancer[J]. Q J Nucl Med, 2003, 47(1): 46-50.
- [9] Shi D, Huang G, Miao J, et al. Correlation of the uptake of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile with expression of multidrug resistance genes *mdr-1* and *MRP* in human lung cancer[J]. Chin J Med, 2002, 82(12): 824-827.
- [10] Izquierdo MA, Van Der Zee AG, Vermorken JB, et al. Drug resistance-associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(16): 1230-1237.
- [11] Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, et al. Majorvault protein LRP related multidrug resistance[J]. Eur J Cancer, 1996, 32(6): 979-984.
- [12] Arbab AS, Koizumi K, Toyama K, et al. Ion transport systems in the uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -tetrofosmin, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI and ^{201}Tl in a tumour cell line[J]. Nucl Med Commun, 1997, 18(3): 235-240.
- [13] Cutrone JA, Khalkhali I, Yospur LS, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -sestamibi scintimammography for the evaluation of breast masses in patients with radiographically dense breasts[J]. Breast J, 1999, 5(6): 383-388.
- [14] Delmon-Mongeon LI, Warms D, Vanden AD, et al. Uptake of the cation $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -sestamibi by human carcinoma cell lines in vitro[J]. Cancer Res, 1990, 55(7): 2198-2201.

欧盟—亚洲远程医学图像合作项目启动

《科学时报》讯 英国伦敦皇家学会日前宣布正式启动“欧盟—亚洲远程医学图像合作项目”, 该项目得到了欧盟—亚洲信息技术与通信程序的支持, 旨在加强欧盟与亚洲在远程医学图像和远程医疗方面的合作, 为工业界和学术界提供一个机会, 从而能够分享他们的信息和观点, 并在医学图像和远程医学领域的协作中形成一个宽广的平台。

据了解, 该项目将历时 3 年, 分别在三个阶段完成不同的任务。第一、第二阶段通过互联网、专家交流和互访、远程医学图像课题合作开发等多种手段, 共同探讨有关适用的医学图像标准格式、可行的远程医疗实施方案, 向亚洲和中国介绍或提供欧洲先进的医疗设备、影像设备, 以及先进技术。第三阶段通过远程医疗和专家会诊等手段, 促进亚洲国家和中国边远地区的医疗和保健水平的提高, 以及欧洲国家医疗设备与影像设备工业的发展。

该项目合作单位包括欧洲和亚洲的 3 个国家的 5 个单位, 它们分别是中国首都医科大学、中国福州大学、英国弥得赛克斯大学、希腊雅典经贸大学和英国剑桥大学。

据首都医科大学教授罗述谦介绍, 目前我国已经建成了多个医学图像研究实验室, 首都医科大学医学图像实验室在医学图像处理、中国第一个女虚拟人数字化三维重建以及应用研究方面所做的工作, 得到了国际同行的高度评价。

据介绍, 在第三阶段完成后, “欧盟—亚洲远程医学图像合作项目”的课题总结性会议将于 2007 年 8 月在我国北京举行。