

用⁹⁹Tc^m-MIBI 细胞内动力学变化评价 多药耐药及逆转剂作用

李娜 李亚明 刘云鹏

【摘要】 目的 用⁹⁹Tc^m-甲氧基异丁基异腈(MIBI)细胞摄取变化探测肿瘤细胞 P-糖蛋白(P-gp)表达及多药耐药(MDR)逆转剂存在时 P-gp 功能的变化。方法 人类髓系白血病 K562 细胞及其耐药细胞株 K562/D(高度表达 P-gp)各 2 × 10⁶ 个,分别加入⁹⁹Tc^m-MIBI 8 MBq,观察不同时间⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取清除情况,后在不同质量浓度 MDR 逆转剂环孢素 A(CsA, 0.1, 0.2 和 0.4 μg/ml)存在时,观察 K562 细胞及 K562/D 细胞对⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取变化。2 种细胞株间及采用逆转剂前后间比较采用 *t* 检验,组间比较采用 *q* 检验。结果 K562 细胞及 K562/D 细胞⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取值分别为 1.559 ± 0.529 及 0.107 ± 0.036, K562 细胞比 K562/D 细胞高 15 倍。不同质量浓度 CsA 作用下 K562 细胞对⁹⁹Tc^m-MIBI 的摄取较不用逆转剂略有增加,但差异无统计学意义(*t* = 0.25, 0.55, 0.24, *P* > 0.05); K562/D 细胞⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取均较不用逆转剂时明显增加,0.1, 0.2 和 0.4 μg/ml CsA 作用后分别增加 106%, 148% 及 163% (*t* = 4.35, 4.83, 5.88, *P* < 0.05)。结论 以⁹⁹Tc^m-MIBI 细胞内摄取变化可评价 P-gp 的功能及逆转剂 CsA 作用。

【关键词】 白血病;肿瘤细胞,培养的;锝;MIBI;糖蛋白类;环孢菌素

Comparison of the kinetics of ⁹⁹Tc^m-MIBI in tumor cells with or without MDR and the changes after MDR reversing agents Li Na, Li Ya-ming, Liu Yun-peng. Department of Nuclear Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: Li Ya-Ming, Email: yml2001@163.com

【Abstract】 Objective Overexpression of multidrug resistance (MDR) is one of the mechanisms that will lead to chemotherapy failure. Of the MDR pathways in tumor cells, P-glycoprotein (P-gp) encoded by MDR genes is one of the key points. ⁹⁹Tc^m-methoxyisobutylisonitrile (MIBI) is an imaging agent that can detect overexpression of MDR in tumor cells. The aim of this study was to observe the relationship between ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake kinetics and P-gp levels in tumor cells, with or without MDR reversing agents. Methods A total of 2 × 10⁶ cells of human myelogenous leukemia cell line K562 and its resistant subline (K562/D) were incubated with 8 MBq ⁹⁹Tc^m-MIBI respectively. ⁹⁹Tc^m-MIBI accumulation and efflux at various time intervals and the uptake difference with the presence of different cyclosporin A (0.1–0.4 μg/ml) were also observed. Comparison of different cell lines or without and with cyclosporin A were performed with the *t*-test, and the data of different groups were compared by *q*-test. Results ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake in K562 and K562/D cell line were 1.559 ± 0.529 and 0.107 ± 0.036, ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake in K562 was fifteen times higher than K562/D. As compared with K562 cell line with no expression of P-gp, significantly increased the ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake of K562/D to 106%, 148% and 163% after treated with cyclosporin A (0.1, 0.2, 0.4 μg/ml) was observed (*t* = 4.35, 4.83, 5.88, *P* < 0.05). Conclusion ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake can reflect the P-gp level and multidrug-resistance inhibitor may impact ⁹⁹Tc^m-MIBI uptake in P-gp overexpressing cells.

【Key words】 Leukemia; Tumor cells, cultured; Technetium; MIBI; Glycoproteins; Cyclosporins

肿瘤细胞对化疗药物的多药耐药(MDR)是导致肿瘤化疗失败的主要原因。其中MDR基因(mdr1)的过度表达是原因之一。mdr1编码的P-糖蛋白(P-gp)在肿瘤耐药机制中起重要作用^[1-2]。有研究证实⁹⁹Tc^m-甲氧基异丁基异腈(MIBI)为P-gp的转运底物,其在细胞内浓度与P-gp表达水平成反

比^[3]。本研究旨在用⁹⁹Tc^m-MIBI细胞内动力学研究探测肿瘤细胞P-gp表达及MDR逆转剂存在时P-gp功能的变化,从而寻找用一种简单有效的方法评价肿瘤细胞的MDR,望能为临床恶性肿瘤化疗提供有意义的实验依据,现报道如下。

材料与与方法

1. 细胞培养。K562细胞及其耐药细胞株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。将细胞放在含体积分数

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2009.02.005

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院核医学科(李娜·李亚明),肿瘤内科(刘云鹏)

通信作者:李亚明,Email: yml2001@163.com

10%的小牛血清、12 U/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 培养液中,再置于 37℃、含体积分数 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。每 2~3 d 传代 1 次。所有实验用细胞均处于对数生长期。

2. 药品与试剂。环孢素 A (CsA, 瑞士 Sandoz 公司)于实验前用生理盐水(北京原子高科股份有限公司)稀释,4℃保存。MIBI(江苏省原子医学研究所江原制药厂)及 ⁹⁹Tc^mO₄⁻(中国原子能科学研究院同位素研究所)按说明书制备,⁹⁹Tc^m-MIBI 放化纯 >96%。

3. WesternBlot 方法检测细胞内 P-gp。收集上述 2 种细胞株,置入 Eppendorf 管中,加入裂解缓冲液,并用加样器反复混匀,匀浆,提取胞膜蛋白,分装后保存于 -70℃ 环境。取 40 μg 提取蛋白质,经 120 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,加入抗人 P-gp170 单克隆抗体标记后,加二抗保温,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色,并用图像分析系统分析,以 P-gp/β-actin 作为 P-gp 表达的相对强度,并进行半定量分析。

4. ⁹⁹Tc^m-MIBI 细胞内摄取及清除。摄取:37℃ 时向含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 液中加入 2 × 10⁶ 个 K562 (或 K562/D) 细胞,8 MBq ⁹⁹Tc^m-MIBI 及不同质量浓度(0.1, 0.2 和 0.4 μg/ml) CsA,分别于 0, 10, 20, 30, 40, 50 和 60 min 时用 5 ml 冰 PBS 洗脱后离心(5 min, 180 × g, 4℃),重复 3 次,最后用 γ 计数器(GC1200 型,中国科技大学创新股份有限公司中佳分公司)测 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取情况。清除:37℃ 时向含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 液中加入 2 × 10⁶ 个 K562 (或 K562/D) 细胞及 8 MBq ⁹⁹Tc^m-MIBI,保温 30 min 后用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液洗脱,分别于 0, 10, 20, 30 min 时加入冰 PBS 洗脱后离心(条件同前),重复 3 次,后用 γ 计数器测放射性。

5. 实验分组。(1)非耐药肿瘤细胞组:①K562 + ⁹⁹Tc^m-MIBI;②K562 + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.1 μg/ml);③K562 + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.2 μg/ml);④K562 + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.4 μg/ml)。(2)耐药肿瘤细胞组:①K562/D + ⁹⁹Tc^m-MIBI;②K562/D + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.1 μg/ml);③K562/D + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.2 μg/ml);④K562/D + ⁹⁹Tc^m-MIBI + CsA(0.4 μg/ml)^[4]。

6. 统计学处理。摄取值用细胞内 ⁹⁹Tc^m-MIBI 计数值/加入 ⁹⁹Tc^m-MIBI 计数值表示,每组实验重复 6 次。用 SPSS 13.0 进行统计学分析。结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 种细胞株间及逆转剂加入前后数据比较行配对 *t* 检验,组间数据比较行 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异

有统计学意义。

结 果

1. K562 及 K562/D 细胞内 P-gp 表达。Western Bolt 检测示 K562/D 细胞在相对分子质量为 1.7 × 10⁵ 处出现了宽带, K562 细胞内未出现此现象(图 1)。K562 细胞及 K562/D 细胞相对灰度值分别为 0.02 ± 0.01 及 0.69 ± 0.07, 两者间差异有统计学意义 (*t* = 6.32, *P* < 0.01)。

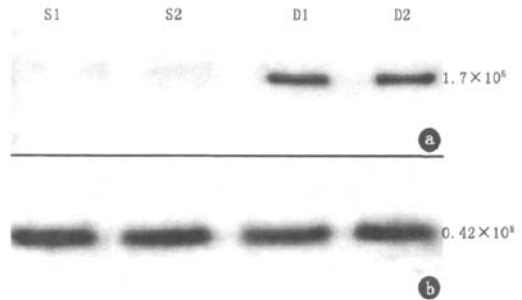


图 1 K562 细胞及 K562/D 细胞 WesternBlot 检测结果。a. S1、S2 为 K562 细胞组, D1、D2 为 K562/D 细胞组; b. 参照物 β-actin

2. K562 细胞及 K562/D 细胞 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取及清除比较。K562 及 K562/D 细胞在实验开始的 30 min 内对 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取均呈线性上升,且在最初的 10 min 内上升最快,30 min 后达到平台期。60 min 时, K562 及 K562/D 细胞对 ⁹⁹Tc^m-MIBI 的摄取值分别为 1.559 ± 0.529 及 0.107 ± 0.036, K562 细胞摄取值比 K562/D 细胞高 15 倍。清除相中, K562 及 K562/D 细胞株均于最初 10 min 迅速下降, ⁹⁹Tc^m-MIBI 分别降到摄取相 60 min 时的 57.1% 及 44.0%, 后逐渐减缓,至清除相 30 min 时下降至 48.4% 及 34.1%。

3. 不同质量浓度逆转剂存在时 K562 及 K562/D 细胞 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取变化。不同质量浓度 CsA (0.1 ~ 0.4 μg/ml) 作用时, K562 及 K562/D 细胞对 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取比较见表 1。K562 细胞在不同质量浓度逆转剂存在时 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取略有增加, 但与不加逆转剂组差异无统计学意义 (*t* = 0.25, 0.55, 0.24, *P* > 0.05)。K562/D 细胞加入不同质量浓度 CsA 后 ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取较不加逆转剂组明显增加 (*t* = 4.35, 4.83, 5.88, *P* < 0.05)。但不同质量浓度 CsA 间, ⁹⁹Tc^m-MIBI 摄取增加的差异无统计学意义 (*q* = 1.67, 0.66 和 2.33, *P* 均 > 0.05)。

讨 论

目前 P-gp 是临床克服 MDR 主要的靶点和观察指标。P-gp 是由 ABCB1 基因编码相对分子质量为

表 1 不同质量浓度 CsA 对 K562 和 K562/D 细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的影响比较

CsA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K562		K562/D	
	$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值	摄取 增加率	$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取值	摄取 增加率
0	1.559 \pm 0.529	0	0.107 \pm 0.036	
0.1	1.628 \pm 0.433	4% ^a	0.221 \pm 0.053	106% ^b
0.2	1.706 \pm 0.391	9% ^a	0.264 \pm 0.071	148% ^b
0.4	1.629 \pm 0.657	4% ^a	0.281 \pm 0.063	163% ^b

注:不同质量浓度 CsA 组各测 6 次。K562 细胞株,与不加逆转剂相比^a $P > 0.05$;K562/D 细胞株,与不加逆转剂相比^b $P < 0.05$

1.7×10^5 的糖蛋白。当转运蛋白的底物如抗肿瘤药物与 P-gp 跨膜结构域结合后, P-gp 蛋白的 2 个 ATP 结合位点靠近并与 ATP 结合, P-gp 构象发生变化,在其中部形成通道,可使中性或阳离子疏水性药物直接通过并排出细胞外^[3]。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 是一种亲脂性阳离子复合物,其在肿瘤细胞浓聚主要依靠细胞膜及线粒体膜电位,通过 Na^+/H^+ 反转运系统进入线粒体。肿瘤细胞由于代谢加快,负性电位加大,故可摄取更多的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI^[4]。但由于 P-gp 作用, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 并不在所有的肿瘤组织中浓聚。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 可作为 P-gp 的转运底物,肿瘤细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取与肿瘤细胞所含 P-gp 的量呈反比^[5]。

本研究中, K562 细胞在摄取实验 60 min 时对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取值比 K562/D 细胞高 15 倍,这与其他学者^[6]的研究结果一致。在本研究的摄取相中,最初 30 min 内 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取最快,呈直线上升,且 60% ~ 70% 的变化发生在最初 10 min 内,提示 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 能迅速进入细胞并浓聚于线粒体中达到平衡。有研究表明, K562 细胞与 P-gp 介导的耐药细胞株早期摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的速率相同,其最终细胞浓度的差异来自于 P-gp 泵的外排作用,且这一作用在最初 10 min 内已经开始出现。K562 细胞及 K562/D 细胞中 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取的差异与 P-gp 的表达相关,因此可用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取量反映细胞 P-gp 的表达情况。

本研究 K562 细胞株中加入不同质量浓度的 P-gp 逆转剂 CsA 后 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取略有上升,但与不加逆转剂时差异无统计学意义。K562/D 细胞中加入不同质量浓度的 P-gp 逆转剂 CsA 后 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取明显上升,与不加入逆转剂时差异均有统计学意义。但不同质量浓度 CsA 组间 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取差异无统计学意义,这可能与逆转剂质量浓度梯度较小或该细胞株对 CsA 摄取存在阈值相关。增大逆转剂的质量浓度梯度可能会得到不同结论,这需进一步实验验证。研究表明 P-gp 发挥能量依赖性外

排泵的作用对象无特异性,即对化疗药物以外的许多非细胞毒性化合物, P-gp 也能将其从细胞内转运到细胞外。因此,当胞膜上的 P-gp 含量恒定时,化疗药物与其他非细胞毒性化合物同 P-gp 的结合就存在竞争。CsA 就是通过与 P-gp 发生竞争性结合,与 P-gp 相互作用,减弱 P-gp 药物泵功能,减少对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的外排作用,以增加细胞内 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取^[7]。理论上,逆转剂存在时 K562/D 细胞摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的量应该与 K562 细胞系一致,但本研究结果显示,逆转剂能增加 K562/D 细胞 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取,摄取率仍低于 K562 细胞,这可能与下述两方面原因相关:首先逆转剂的质量浓度不够,并不是所有 P-gp 泵的功能均能被抑制;其次除 P-gp 以外还存在其他的因素可引起细胞 MDR,这种作用并不能被 CsA 所抑制。还应该注意的是使用不同的细胞株或逆转剂及 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 浓度不同时,细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取变化很大。

K562 细胞及 K562/D 细胞中 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取的差异与 P-gp 的表达相关,因此可用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 的摄取量反映细胞 P-gp 的表达情况;MDR 逆转剂 CsA 能增加 MDR 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 摄取,因此可用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 在细胞内浓度变化间接反映逆转剂逆转 MDR 的效果,提供化疗方案选择依据。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] Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res, 2005, 11: 7764-7772.
- [2] Wu J, Lu YH, Lee A, et al. Reversal of multidrug resistance by transferring-conjugated liposomes co-encapsulating Doxorubicin and verapamil. J Pharm Pharmaceut Sci, 2007, 10: 350-357.
- [3] 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. Nucl Med Commun, 2007, 28: 696-703.
- [4] 魏虎来,葛建国,赵怀顺,等. 干扰素和环孢霉素 A 协同逆转 K562/ADM 细胞对阿霉素的耐药性. 肿瘤防治研究, 2005, 25: 99-101.
- [5] Múrián T, Szabó G, Goda K, et al. *In vivo* and *in vitro* multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance. Eur J Nucl Mol Imaging, 2003, 30: 1147-1154.
- [6] 张雪梅,吴华. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 显像评价肿瘤多耐药药及其逆转效果. 中华核医学杂志, 2004, 24: 97-100.
- [7] Múrián T, Balkay L, Trón L, et al. Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile, 2- ^{18}F -fluoro-2-deoxy-*D*-glucose, daunorubicin and rhodamine123 in multidrug-resistant and sensitive cells. Eur J Pharm Sci, 2005, 24: 495-501.

(收稿日期:2008-07-28)