

^{99m}Tc -YIGSR 与 ^{99m}Tc -MIBI 肿瘤细胞摄取比较研究

• 核医学 •

胡佳 张永学 田元 胡志红

【摘要】 目的: 利用肿瘤细胞表面含有大量层粘素受体, 而且能与层粘素特异性结合机制, 研究 ^{99m}Tc -YIGSR (层粘蛋白-小分子肽) 作为一种新型的肿瘤显像剂, 在埃氏腹水瘤细胞 (EAC) 中的摄取并与 MIBI 进行比较。方法: ① ^{99m}Tc -YIGSR 探针的制备: 利用 S-己基-琥珀酰亚胺-巯基甘肽 (S-Acetyl-NH₃-MAG₃) 作为螯合剂, 在适当还原剂作用下, 将 ^{99m}Tc 标记到层粘素-YIGSR 上, 用 Sephadex G10 凝胶柱纯化, 根据放射性计数及 280nm 紫外吸光值合并各峰管, 利用纸层析进行放射性化学纯度分析。②细胞培养及细胞存活率测定: EAC 在含小牛血清的 1640 细胞培养液中悬浮培养, 用台盼兰排除法计数活细胞。③细胞动力学研究: 用放射性核素示踪法研究 EAC 在 37℃ 和 22℃ 时对 ^{99m}Tc -YIGSR 及 ^{99m}Tc -MIBI 的摄取。结果: ① ^{99m}Tc -YIGSR 标记率为 (62±3)%, 放化纯为 95%, ^{99m}Tc -MIBI 标记率为 (96±2)%, 放化纯为 98%。②细胞存活率随孵育时间延长而下降, 实验前细胞存活率为 96%±1%, 孵育 2h 细胞及 3h 存活率分别为 (96±1)% 及 (90±2)%, 均在 85% 以上符合实验要求。③37℃ 60min 时, EAC 对 ^{99m}Tc -YIGSR 及 ^{99m}Tc -MIBI 的摄取峰值分别为 (43.16±2.4)% 和 (24.4±1.8)%; 在 22℃ 时 EAC 摄取峰值分别为 (26.5±2.1)% 和 (9.47±1.9)%。结论: 在相同条件下 EAC 对 ^{99m}Tc -YIGSR 摄取峰值高于 ^{99m}Tc -MIBI, 更适用于肿瘤显像, 在临床上具有潜在的应用价值。

【关键词】 层粘素-YIGSR (层粘蛋白-小分子肽); 甲氧基异 基异腈; 肿瘤; 细胞摄取; ^{99m}Tc

【中图分类号】 R817; R730.44 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2003)03-0208-02

A comparative study of ^{99m}Tc -YIGSR and ^{99m}Tc -MIBI uptake in tumor cells HU Jia, Zhang Yongxue, Tian Yuan, et al. Department of Nuclear Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022

【Abstract】 Objective: to investigate a new kind of tumor tracer ^{99m}Tc -YIGSR developed by a five amino structure (YIGSR) of the Laminin β chain binding to the Laminin receptor of tumor specifically to be radiolabeled with MAG₃. **Methods:** ①Preparation of the ^{99m}Tc -YIGSR probe: with S-Acetyl-NHS-MAG₃ as the chelator, YIGSR was labeled with ^{99m}Tc under the condition of proper reducer. ②Cell culture and viability measurement: EAC were maintained in 1640 supplemented with calf bovine serum. The trypan blue exclusion was applied to calculate the cell viability. ③Study of the cell dynamic: The EAC's uptake of ^{99m}Tc -YIGSR and ^{99m}Tc -MIBI was observed at both 37℃ and 22℃, respectively. **Results:** ①The labeling efficiencies of ^{99m}Tc -YIGSR and ^{99m}Tc -MIBI were 62% and 96%, respectively. ②The cell viability was declined with time of incubation. ③At 37℃, the EAC's uptake of ^{99m}Tc -YIGSR and ^{99m}Tc -MIBI reached their summit of (43.16±2.4)% and (24.4±1.8)% at 60min, respectively; and at 22℃, the highest uptake were (26.5±2.1)% and (9.47±1.9)% at 60min, respectively. **Conclusion:** The in vitro study suggests that the ^{99m}Tc -YIGSR is superior to ^{99m}Tc -MIBI in cell uptake and may have potential value in tumor imaging.

【Key words】 Laminin-YIGSR; Methoxyisobuty (MIBI-lisonitrile); Tumor; Cell uptake; ^{99m}Tc

笔者利用 Laminin-YIGSR 能与乳腺癌肿瘤细胞表面受体特异性结合的机制, 研究 ^{99m}Tc -YIGSR 作为一种新型肿瘤显像剂在埃氏腹水瘤细胞 (EAC) 中的摄取动力学, 并与 ^{99m}Tc -MIBI 进行比较, 探讨其临床的应用价值。

材料与方 法

材料: ①试剂: 层粘蛋白小分子肽-YIGSR (美国 Sigma 公司)、Na^{99m}TcO₄ (中国原子能科学研究院放射性核素研究所)、Sephadex G-10 (Pharmacia 公司)。②主要仪器: SN-695 γ 计数器 (调校为 ^{99m}Tc 测量)、Hitachi 2000 型紫外分光光度计、CO₂ 培养箱 (Shell AB)、超净台。③瘤细胞: EAC 由华中科技大学同济

医学院药理教研室提供。

方法: ① ^{99m}Tc -MAG₃-YIGSR 的合成、标记及纯化: 层粘蛋白小分子肽-YIGSR 购自美国 Sigma 公司。取 Laminin-YIGSR 0.2mg 溶于 0.5ml N-2-羟己基呱脒 N'-2-己磺酸 (HEPES) (0.1mol, pH 8.0) 缓冲液中, 再取 S-己基-琥珀酰亚胺-巯基甘肽 (S-Acetyl-NHS-MAG₃) 0.9mg 溶于 0.5ml 无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 将两种溶液混合, 室温下反应 5min, 反应物经 Sephadex G-10 凝胶柱纯化后, 将 MAG₃-YIGSR 与 $^{99m}\text{TcO}_4$ 在室温下混合均匀, 加亚锡盐酸溶液 0.5ml (1mg/ml) 在 37℃ 反应 30min 完成标记。经 Sephadex G-10 凝胶柱纯化, 洗脱液经紫外分光光度计和放射计数仪测量, 根据放射性计数及 280nm 紫外吸光值合并各峰管。以纸层析测定峰管放射化学纯度。

② ^{99m}Tc -MIBI 的制备: 药盒由中国原子能放射性核素研究所提供, 依照说明书制备和进行质量控制。制备成比活度为

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科 (胡佳、张永学、田元); 430074 武汉, 中国科学院武汉分院病毒研究所 (胡志红)

作者简介: 胡佳 (1963~), 女, 硕士, 武汉人, 主要从事核医学临床诊断工作。

表 1 37℃时 EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 及 ^{99m}Tc-MIBI 的摄取率比较 (%)

显像剂	保温时间					
	5min	30min	60min	90min	120min	180min
^{99m} Tc-YIGSR	30 ± 1.47 ^{* *}	39.48 ± 2.1	43.16 ± 2.4	30.16 ± 1.1 [*]	32.94 ± 1.5 [*]	29.15 ± 1.6 [*]
^{99m} Tc-MIBI	14.5 ± 1.36	17.02 ± 2.1	24.4 ± 1.8	16.9 ± 1.23	20.07 ± 1.42	19.87 ± 1.3
p	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05

^{*} P < 0.05; ^{**} p < 0.01

37MBq/ml 的 ^{99m}Tc-MIBI 的反应物。

③细胞的复苏:将冻存管中的 EAC 从液氮管中迅速取出,放入 40℃温水中,1~2min 后在无菌台中吸出,放入 7.5cm²培养瓶中,加入适量含 10% 小牛血清、100IU/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素的 1640 细胞生长培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,第 2 天观察细胞的生长情况,复苏良好的细胞,第 2 天即可铺满培养瓶。

④细胞培养: EAC 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,培养液为含 10% 小牛血清及 100IU/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素的 1640 细胞培养液。每 3d 换 1 次,5d 后肿瘤细胞的生长数目即达到要求,悬浮于无血清的 1640 细胞培养液中,吹打成单个悬浮细胞,用白细胞计数板计数,将细胞浓度调整至 1 × 10⁷/ml。

⑤细胞存活率测定: EAC 在含小牛血清的 1640 细胞培养液中悬浮培养,分别在实验前、实验 2h、实验 3h,用台盼兰排除法计数检测,细胞活力达到 85% 以上,即符合实验要求。

⑥细胞摄取实验: 为了减少非特异性吸附,试管先用含 0.5% 小牛血清的 PBS 浸泡 1h,然后用 PBS 洗涤 3 遍。实验开始将 100μl (3.7MBq) 示踪剂 ^{99m}Tc-MAG3-YIGSR 和 ^{99m}Tc-MIBI 分别加入 10ml 含 1 × 10⁷/ml EAC 培养瓶中,轻轻混匀。观察温度对细胞摄取动力学的影响,将加入示踪剂的细胞分别放在 37℃和 22℃时培养,于 5、30、45、60、90、120 和 180min 时取样,取样前轻轻混匀。取 100μl 细胞悬液加入含 200μl 细胞液的试管中,用 SN-695r 计数器测定总放射性计数,1000 转/分离心 3min 后弃去上清液,测沉淀计数。空白实验即非特异性吸附,方法同上,只是不含细胞。摄取实验结果用摄取百分数表示。所有细胞每个时相均取 4 个平行样,结果取其均值,数据用 t 检验进行统计学处理。

结 果

标记率与放化纯: ^{99m}Tc-YIGSR 标记率 (62 ± 3)%,放化纯为 95%; ^{99m}Tc-MIBI 标记率 (96 ± 2)%,放化纯为 98%。标记化合物在室温下放置 4h, ^{99m}Tc-YIGSR 与 ^{99m}Tc-MIBI 放化纯分别为 92% 及 94%。

细胞存活率: 细胞存活率随孵育时间延长而下降,实验前细胞存活率为 (96 ± 1)%,孵育 2h 细胞存活率为 (90 ± 2)%,孵育 3h 细胞存活率为 (85 ± 4)%,均在 85% 以上符合实验要求。

^{99m}Tc-YIGSR 及 ^{99m}Tc-MIBI 的摄取率比较: 37℃ EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 及 ^{99m}Tc-MIBI 的摄取率比较见表 1。EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 及 ^{99m}Tc-MIBI 的非特异性结合率分别为 (3.24 ± 4.5)% 及 (3.14 ± 5.1)%; 两种显像剂的峰时均发生在 60min。90min 进入平台期。60min EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 及 ^{99m}Tc-MIBI 的摄取

率分别为 (43.16 ± 2.4)%, (24.4 ± 1.8)%,前者明显高于后者 (P < 0.01)。5min 时 EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 的摄取值为峰值的 69%; EAC 对 ^{99m}Tc-MIBI 的摄取值为峰值的 59%。EAC 对两种显像剂的摄取具有温度依赖性,表现在 60min、22℃与 37℃条件下时, EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 摄取值分别为 (26.5 ± 2.1)% 与 (43.16 ± 2.4)% (P < 0.05); 对 ^{99m}Tc-MIBI 摄取值分别为 (9.47 ± 1.9)% 与 (24.4 ± 1.2)% (P < 0.05)。

讨 论

层粘素是 1979 年发现的一种非胶原性结构蛋白,是构成基底膜的主要成分,能促进各种细胞的粘附、生长、迁移、轴突分支、分化和转移。层粘素由 3 条链构成: A 链 (400ku)、B₁ 链 (230ku) 和 B₂ 链 (220 ku), 3 条链呈十字形结构。B₁ 链具有细胞附着、趋化和与层粘素受体结合的活性,其氨基酸序列为 YIGSR (throsyl- isoleucyl- glycyl- seryl- arginine)。乳腺癌肿瘤细胞株在早期含有大量高亲和层粘素结合位点,能够与放射性核素标记的小分子肽结合。研究表明层粘素在恶性肿瘤浸润和转移中起着重要的作用。层粘素能介导肿瘤细胞粘着基底膜,使高度恶性的肿瘤细胞容易与层粘素粘连,而无转移浸润倾向的肿瘤则嗜附纤维连接。Koliakos 等人探讨了用 ¹³¹I 标记层粘素 YIGSR 能否作为一种有潜力的肿瘤显像剂,通过显像和放射自显影发现, ¹³¹I-YIGSR 存在于肿瘤细胞表面,而正常细胞表面则没有。Koliakos 认为层粘素 YIGSR 是一种很有潜力的受体肿瘤显像剂,它能够在癌症的早期估计活体内肿瘤转移潜能,在癌症的分期和预后判断方面都有十分重要的作用。但是 ¹³¹I-YIGSR 存在成像时间长,血液清除慢,靶与非靶比值不高,显像效果不佳等缺点;而 ^{99m}Tc 则具备合适的能峰,物理半衰期短,血液清除快等优点。目前国内未见用 ^{99m}Tc 标记层粘素 YIGSR 的相关报道。

本实验用 ^{99m}Tc 标记层粘素 YIGSR 结果显示: ①EAC 对 ^{99m}Tc-YIGSR 的摄取值较高,明显高于 EAC 对 ^{99m}Tc-MIBI 摄取,两者具有显著性差异 (P < 0.01)。关于 MIBI 在肿瘤细胞中的浓聚的机制尚不十分清楚,但国外有人证明它主要依赖于肿瘤细胞较高的跨膜电势而进入细胞,而层粘素受体存在于肿瘤细胞表面,与配体结合时不需要进入细胞,结合的方式相对简单。②在 22℃时两种显像剂的摄取明显减低,表明其摄取具有温度依赖性,而细胞呼吸过程中的一系列酶只有在 37℃条件下才能发挥最佳效应,由于温度降低会抑制酶活性,导致 EAC 对两种显像剂的摄取减低。体外结果表明 ^{99m}Tc-YIGSR 较 ^{99m}Tc-MIBI 更适用于肿瘤显像,在临床上具有潜在的应用价值。

(2002-09-12 收稿, 2002-09-28 修回)