

· 论 著 ·

^{18}F -氟代脱氧葡萄糖诱导 MCF-7 细胞株的凋亡研究

李爱梅, 林夏雯, 贾 鹏, 郭万华

[摘要] 目的 研究 ^{18}F -氟代脱氧葡萄糖(^{18}F -FDG)诱导体外培养 MCF-7 乳腺癌细胞的凋亡情况。方法 不同剂量 ^{18}F -FDG 加入体外培养 MCF-7 乳腺癌细胞中共培养,以 γ 计数器测定细胞摄取 ^{18}F -FDG 的量;用流式细胞仪测定细胞早期和晚期凋亡率;用 TUNEL 法测定细胞凋亡的数量。结果 ①相同数量级的 MCF-7 细胞对 ^{18}F -FDG 的摄取量与剂量增加呈线性;②流式细胞结果示:经 12 h ^{18}F -FDG 孵育引起 MCF-7 的平均早期凋亡率为 12.5%,平均晚期凋亡率为 39.3%,总平均凋亡率为 51.8%。经 24 h ^{18}F -FDG 孵育引起 MCF-7 的平均早期凋亡率为 10.4%,平均晚期凋亡率为 42.1%,总平均凋亡率为 52.5%;③TUNEL 显示:用凋亡指数 (apoptotic index, AI) 表示,与空白对照组 AI (5.13 \pm 1.51)% 相比, ^{18}F -FDG 孵育 12 h 爬片的 AI 为 (45.93 \pm 1.51)%, ^{18}F -FDG 孵育 24 h 爬片的 AI 为 (46.93 \pm 1.52)%。结论 一定剂量范围内, ^{18}F -FDG 对 MCF-7 细胞诱导凋亡效果显著。

[关键词] ^{18}F -氟代脱氧葡萄糖;MCF-7 细胞;凋亡

[中图分类号] R730.55 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)02-0112-04

Effect of 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose on apoptosis of human MCF-7 cells

LI Ai-mei, LIN Xia-wen, JIA Peng, GUO Wan-hua. Nuclear Medicine Department of Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing, Jiangsu 210008, China

[Abstract] **Objective** To investigate effect of 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose on apoptosis of human MCF-7 cells. **Methods** Different doses of ^{18}F -FDG were co-cultured with MCF-7 *in vitro*. γ -ray high energy counting machine was used to count ^{18}F -FDG uptaking in MCF-7 cells. The cell apoptosis percent was detected by flow cytometry. The number of apoptosis cells was counted by using a TUNEL kit. **Results** ① *In vitro*, uptaking ^{18}F -FDG of the same number MCF-7 cells related with dose in line. ② FCM displayed that after ^{18}F -FDG incubating for 12h the early average apoptosis percent was 12.5%, the later average apoptosis percent was 39.3%, and total average apoptosis percent was 51.8%. After ^{18}F -FDG incubating 24h, the early average apoptosis percent was 10.4%, the later average apoptosis percent was 42.1%, total average apoptosis percent was 52.5%. ③ TUNEL kit analysis showed that AI was (45.93 \pm 1.51)% after ^{18}F -FDG incubating 12h, AI was (46.93 \pm 1.52)% after ^{18}F -FDG incubating 24h, compared with control of AI was (5.13 \pm 1.51)%. **Conclusion** Apoptosis of human MCF-7 cells was induced by moderate ^{18}F -FDG dose.

[Key words] ^{18}F -FDG; MCF-7 cells; apoptosis

乳腺癌发病率和死亡率呈逐年直线上升趋势,而目前治疗方法包括外科手术、化学药物治疗及局部外照射疗法等,会在杀伤肿瘤细胞的同时损伤周围正常细胞,虽在一定程度上抑制了肿瘤的进展,但由于靶向性差和对细胞毒副作用大等因素,学者们一直在寻找更为精准的靶向药物治疗。

^{18}F -氟代脱氧葡萄糖 (^{18}F -2-Deoxy-2-fluoro-D-

glucose, ^{18}F -FDG) 是葡萄糖的类似物,根据 Warburg 效应,代谢旺盛的恶性肿瘤细胞会优先摄取并浓聚,目前已经广泛应用于正电子发射计算机断层扫描 (positron emission tomography, PET) 成像以进行恶性肿瘤的筛查、诊断、分期、疗效检测及预后评估^[1]。本课题主要研究 ^{18}F -FDG 除了 PET 成像之外,其诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌 MCF-7 细胞株由本院肿瘤科友情提供,胎牛血清 (杭州四季青公司), LG-DMEM (low-glucose dulbecco's modified eagle medium)、胰酶

基金项目: 南京市医学重点科技发展项目 (ZKX07009)

作者简介: 李爱梅 (1979-), 女, 河南新乡人, 硕士, 医师, 从事 PET/CT 影像诊断工作

作者单位: 210008 江苏南京, 南京大学附属鼓楼医院核医学科

粉(GIBCO 公司), AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒(凯基生物公司), 3'-粘性末端标记 UTP (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling, TUNEL) 试剂盒(Promga 公司), 细胞培养瓶、细胞培养板(Corning 公司), 流式细胞仪(FACS-Canto 型, 美国 Becton Dickinson 公司), γ 计数仪(中佳 GC-911 型, 无锡原子能研究所), ^{18}F -FDG 由南京军区南京总医院提供, 其放化纯度 >95%。

1.2 方法 ①细胞培养: 将人乳腺癌 MCF-7 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 LG-DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO_2 孵育箱培养。②细胞体外 ^{18}F -FDG 摄取实验: 取生长期细胞, 分别加入 0、 1.85×10^6 Bq、 3.7×10^6 Bq、 7.4×10^6 Bq 等不同剂量 ^{18}F -FDG, 孵育 1 h, 分别做复管, 经胰酶消化后, 用磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 遍, 尽量洗掉未摄取的 ^{18}F -FDG, 用 γ 计数仪测定细胞摄取 ^{18}F -FDG 的量。③ ^{18}F -FDG 孵育: 盖玻片(22 mm \times 22 mm)用多聚赖氨酸包被后, 置于平皿中, 将细胞接种至平皿中制成细胞爬片, 传代 24 h 后细胞均匀铺满约 80%, 分别加入 ^{18}F -FDG, 放射性剂量为 0、 1.85×10^7 Bq、 3.70×10^7 Bq, 孵育 12 h 和 24 h 后分别进行流式细胞仪检测和 TUNEL 检测。

1.3 流式细胞术(flow cytometry, FCM) 用于检测 ^{18}F -FDG 对 MCF-7 细胞的诱导凋亡作用。孵育 12 h 和 24 h 后收集细胞, 离心冲洗完毕后, 取出 195 μl 细胞悬液, 依 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒说明书操作, 加入 5 μl AnnexinV-FITC, 混匀并且室温放置 10 min。再加 20 μl 的碘化丙啶避光 10 min, 检测早期和晚期细胞凋亡情况。

1.4 TUNEL 检测 用于检测爬片细胞凋亡情况。

经 ^{18}F -FDG 分别孵育 12 h 和 24 h 后将细胞爬片捞出, PBS 冲洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 按照 TUNEL 试剂盒操作说明进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射性活度结果 体外培养的处于生长期的 MCF-7 细胞对不同剂量 ^{18}F -FDG 摄取如图 1 所示, 在一定范围内, 随着 ^{18}F -FDG 剂量的增加, 其放射性活度即 MCF-7 摄取的 ^{18}F -FDG 量逐渐呈线性增加。

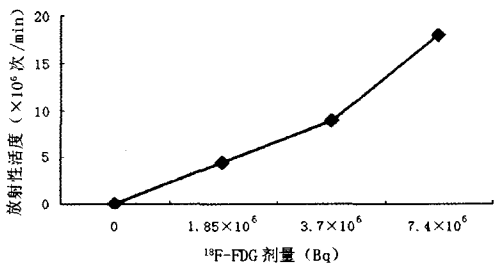


图 1 体外 MCF-7 细胞 ^{18}F -FDG 摄取结果

2.2 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术结果 ^{18}F -FDG 孵育 MCF-7 细胞 12 h 的平均早期凋亡率为 12.5%, 平均晚期凋亡率为 39.3%, 总平均凋亡率为 51.8%。 ^{18}F -FDG 孵育 24 h 引起 MCF-7 的平均早期凋亡率为 10.4%, 平均晚期凋亡率为 42.1%, 总平均凋亡率为 52.5% (图 2)。与对照组总的凋亡率 10.1% 相比, 凋亡明显增高。

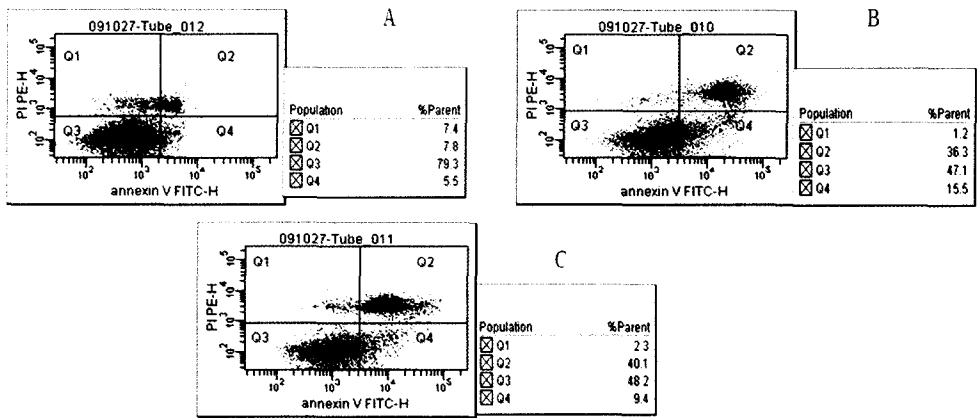


图 2 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术结果

正常细胞在 FCM Q1 区为死亡及碎片细胞群, Q2 区为晚期凋亡细胞群, Q3 区为正常细胞群, Q4 区为早期凋亡细胞群。图上显示为 LR 区细胞簇。A: 空白对照; B: ^{18}F -FDG 孵育 12h; C: ^{18}F -FDG 孵育 24 h

2.3 TUNEL 结果 与上述的实验条件相同,爬片按说明书操作进行,实验结果以凋亡指数 (apoptotic index, AI) 表示, $AI = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$ 。加入 ^{18}F -FDG 孵育 MCF-7 细胞 12 h 后,引起 MCF-7 的 AI 为 $(45.93 \pm 1.51)\%$, 24 h 后引起 MCF-7 的 AI 为 $(46.93 \pm 1.52)\%$ 。空白对照 MCF-7

的 AI 为 $(5.13 \pm 1.51)\%$, 与之相比, ^{18}F -FDG 孵育组凋亡细胞明显增加 ($F_1 = 249.2, P_1 < 0.05$) (图 3), 与流式细胞仪结果基本一致。而两组不同剂量的 ^{18}F -FDG 对细胞凋亡影响并无明显差异 ($F_2 = 3.0, P_2 > 0.05$)。

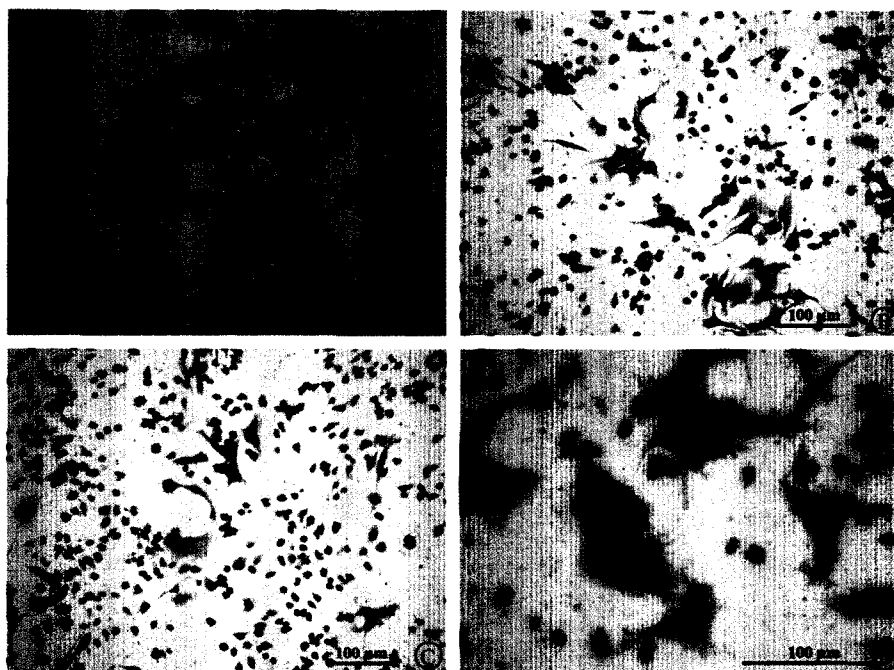


图 3 DAB 染色 TUNEL 结果

A: MCF-7 空白对照 ($\times 200$); B: MCF-7 细胞共孵育 12 h ($\times 200$), 平均约 258/500 个核固缩 (为棕色深染, 蓝色为正常细胞形态); C: MCF-7 细胞共孵育 24 h ($\times 200$), 平均约 290/500 个核固缩; D: MCF-7 细胞共孵育 24 h ($\times 400$), 凋亡细胞形态失常, 体积明显缩小, 核固缩, 深染

3 讨论

^{18}F -FDG 作为一种潜在的肿瘤靶向性治疗药物^[2], 一方面作为葡萄糖类似物, 它具有与葡萄糖相似的生物学性质, 参与三羧酸循环, 但不能经己糖异构酶催化成糖酵解的底物, 不能产生 ATP^[3-5], 从而起到能量阻滞剂的作用, 使肿瘤细胞凋亡。另一方面, 短半衰期的 ^{18}F 衰变, 通过湮没辐射产生 γ 射线, 对浓聚部位的肿瘤细胞具有一定的诱导凋亡作用^[6]。

研究表明, 相同数量级的 MCF-7 细胞对 ^{18}F -FDG 的摄取与 ^{18}F -FDG 剂量呈线性关系。随着 ^{18}F -FDG 剂量的增加, MCF-7 细胞内 γ 射线的计数 (放射性活度) 会随之增加, 即 ^{18}F -FDG 的摄入量逐渐增加, 这为 ^{18}F -FDG 在细胞内浓聚从而形成内照射源提供前提。

相同条件下, 用 AnnexinV-FITC/PI 双染经 ^{18}F -FDG 孵育后的 MCF-7 细胞, 经流式细胞仪得出, ^{18}F -FDG 诱导凋亡主要集中在晚期, 早期相对较少, 且随着 ^{18}F -FDG 剂量的增加和孵育时间的延长, 早期凋亡减少, 晚期凋亡增加, 这可能与 γ 射线引起的 G_2M 期阻滞即“周期特异性凋亡”相关^[7-8]。也有报道 HL-60 细胞经紫外线灯照射, 在 G_1 期发生凋亡、DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂 camptothecin 处理为 S 期发生凋亡、 γ 射线处理为 G_2M 期发生凋亡及 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂 fostriecin 处理为全周期凋亡。这表明凋亡是多点启动, 可发生在周期各个时相, 不同的理化因素刺激引起不同周期的细胞受损, 且程度各异, 细胞对损伤的修复能力也因周期而异。在周期各个时相内, 损伤和修复两种能力的变化, 导致了细胞凋亡的周期特异性。也可能与 ^{18}F 本身半衰期较短, 随着时间延长而能量逐渐减弱, 从而影响其

对细胞的早期电离作用^[9]。

TUNEL 结果显示¹⁸F-FDG 诱导 MCF-7 细胞凋亡作用明显,且与流式细胞仪结果相吻合。本实验旨在探索¹⁸F-FDG 对细胞的治疗作用,所给予的剂量较大。¹⁸F 的半衰期较短,发射出的正电子在组织内射程为 0.1~0.2 mm,通过与组织细胞湮没辐射产生 γ 射线从而对细胞产生损伤^[10]。图片显示细胞核有明显变化,出现核碎裂、染色质边集、凋亡小体,这是电离辐射诱导凋亡的特点之一^[11],且随着¹⁸F-FDG 剂量的增加和孵育时间的延长,总的凋亡率也随之增加。本课题亦有不足之处,TUNEL 通过 DNA 末端转移酶将带标记的 dNTP (多为 dUTP) 间接或直接接到 DNA 片段的 3'-OH 端,需通过酶联显色检测定量分析结果。该方法有信号放大的作用,检测灵敏度高,但难免有假阳性。

本研究表明:¹⁸F-FDG 可以诱导增殖旺盛的肿瘤细胞凋亡,且对肿瘤细胞靶向性强,治疗作用前景看好,下一步应积极探索其治疗的剂量并明确其引起的不良反应,以早日应用于临床。

【参考文献】

[1] Filippi V, Malamitsi J, Vlachou F, et al. The impact of FDG-PET/CT on the management of breast cancer patients with elevated tumor markers and negative or equivocal conventional imaging modalities[J]. Nucl Med Commun, 2011, 32(2): 85-90.

[2] Moade RM, Nguyen AV, Elaine YL, et al. Positron emission tomography agent 2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucose has a therapeutic potential in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2003, 5(6): 199-205.

[3] Maher JC, Wangpaichitr M, Savaraj N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 732-741.

[4] Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, et al. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro[J]. Anticancer Res, 2006, 26(5A): 3561-3566.

[5] Metin K, Ningguo G, Jie S, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(11): 3049-3058.

[6] Van de Wiele C, Lahorte C, Oyen W, et al. Nuclear medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(1): 5-15.

[7] Guillof C, Rosselli F, Krishnaraj K, et al. p53 involvement in control of G₂ exit of the cell cycle role in DNA damage-induced apoptosis[J]. Oncogen, 1995, 10(11): 2263-2270.

[8] 焦建峰,陈冠英,黄 玫,等. rhTFAR19 蛋白质对 γ 射线诱导 MCF-7 细胞周期及凋亡影响的初步研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(2): 102-104.

[9] Chung HK, Cheon GJ, Choi CW, et al. Comparison of cellular metabolic responses of (¹⁸)F-FDG according to the effect of beta-irradiation in p53 wild and deleted cell lines [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(5): 636-643.

[10] Dong L, Qing Y, Liwen L, et al. Correlation Between Hybrid ¹⁸F-FDG PET/CT and Apoptosis Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer[J]. Cancer Biol, 2007, 6(9): 1442-1448.

[11] Toshiki T, Yuji K, Songji Z, et al. Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of ^{99m}Tc-Annexin V, ¹⁸F-FDG, and histologic evaluation[J]. J Nucl Med, 2005, 46(5): 794-799.

(收稿日期: 2011-01-06)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

欢迎基金论文投稿

期刊对基金资助课题成果的刊出是期刊学术质量的一种表现。基金资助课题的论文在本刊享有“优先用稿”的待遇。欢迎广大作者踊跃向本刊投寄各类基金课题论文,投稿时请注明基金项目名称、编号并附项目证书复印件。

本刊编辑部