

## Radionuclide imaging of large cell lung cancer in nude mice mode by transfected human sodium/iodide symporter gene

ZHENG Wei, TAN Jian\*, LI Wei, LI Ning, XU Jing

(Department of Nuclear Medicine, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the possibility of transfecting human sodium/iodide symporter (hNIS) gene into human large cell lung cancer cell line H460 to facilitate radioactive nuclide imaging in vivo. **Methods** ①hNIS gene was transfected into human large cell lung cancer cell line H460 by recombinant expression plasmids with lipofectamine 2000-plasmid complexes. Subsequently the biologic functions of stably expressing hNIS gene cell line (hNIS-460) were investigated. ② Large cell lung cancer nude mice model was established, and the radioactive isotopes  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and  $^{131}\text{I}$  imaging were performed in nude mice. **Results** ①The cell line hNIS-H460 could uptake  $^{125}\text{I}$ . The uptake of  $^{125}\text{I}$  was 50.97 times higher in cells hNIS-H460 than in cells H460 ( $t = 12.36, P < 0.01$ ). ②Radioactive isotopes  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and  $^{131}\text{I}$  imaging in xenografts of transfected group were successfully performed using ECT imaging system. **Conclusion** The transfected cells hNIS-H460 can uptake iodide, and the xenografts of which can be imaged in  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and  $^{131}\text{I}$ . The quality of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  imaging is better than  $^{131}\text{I}$  imaging.

**[Key words]** Human sodium/iodide symporter gene; Transfect; Radioactive nuclide; Human large cell lung cancer

## 裸鼠模型的人钠/碘转运体基因转染人大细胞肺癌介导放射性核素显像

郑薇, 谭建\*, 李玮, 李宁, 许静

(天津医科大学总医院核医学科, 天津 300052)

**[摘要]** **目的** 在动物体内实验观察人钠/碘转运体(hNIS)基因转染人大细胞肺癌介导放射性核素显像是否可行。 **方法** ①利用重组质粒以脂质体转染法将 hNIS 基因转染入人大细胞肺癌 H460 细胞系中, 获得稳定表达 hNIS 的细胞株 (hNIS-H460)。②用 hNIS-H460 细胞株建立大细胞肺癌荷瘤裸鼠模型, 进行放射性核素  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  显像和  $^{131}\text{I}$  显像。 **结果** ①体外实验表明 hNIS-H460 细胞株可以摄取碘。②裸鼠大细胞肺癌 (hNIS-H460) 移植瘤的  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  和  $^{131}\text{I}$  显像结果较清晰。 **结论** 转染后的 hNIS-H460 细胞具有一定的摄碘能力。裸鼠大细胞肺癌 (hNIS-H460) 移植瘤可以进行  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  和  $^{131}\text{I}$  显像;  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  显像的质量优于  $^{131}\text{I}$  显像。

**[关键词]** 人钠/碘转运体基因; 转染; 放射性核素; 人大细胞肺癌

**[中图分类号]** R-332; R817.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)01-0007-03

在过去的十余年中,核医学、磁共振光谱学、光学和生物发光等影像技术的进步有力地推动了分子影像学的发展,而报告基因的应用是上述各种影像学方法的共性之一。人钠/碘转运体(human sodium/iodide symporter, hNIS)基因具有无免疫原性、确切而有限的体内分布和表达、底物的广泛可利用

性、代谢状况已被详细了解、底物在体内可被清除、不可能与潜在的细胞生物化学过程起作用等优点,是一种理想的报告基因。

肺癌是严重危害人类生命和健康的常见病。本研究将转基因技术与核医学显像技术相结合,将 hNIS 基因转染至人大细胞肺癌 H460 细胞系中,使原本不摄碘的 H460 细胞摄取碘,扩大  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  和  $^{131}\text{I}$  显像的应用范围,为非甲状腺源性肿瘤的核素显像研究打下基础。

### 1 材料与方法

1.1 材料和仪器 人大细胞肺癌细胞系 H460 细胞由中国医学科学院放射医学研究所赠与,pcDNA3.1/hNIS 质粒由本实验室构建并保存。G418 硫酸盐、DMEM 高糖型培养基和脂质

**[基金项目]** 天津市应用基础及前沿技术计划(08JC2DJC23900)。

**[作者简介]** 郑薇(1982-),女(满族),天津人,硕士,医师。研究方向:甲状腺疾病的治疗,核素显像与治疗,基因显像。E-mail: chriess99@hotmail.com

**[通讯作者]** 谭建,天津医科大学总医院核医学科,300052。

E-mail: tanpost@163.com

**[收稿日期]** 2008-10-20 **[修回日期]** 2008-12-03

体(lipofectamine TM 2000)购自美国 Invitrogen 公司;实验用酶类均购自日本 TaKaRa 公司。BALB/C-nu/nu 品系(SPF 级)裸鼠购自中国医学科学院中国协和医科大学北京实验动物中心,饲养在天津医科大学实验动物中心无特定病原体(SPF)环境中。<sup>125</sup>I 与 <sup>131</sup>I 购自中国中核高通公司。1261 型  $\gamma$  计数器为澳大利亚 LKB 公司生产。SPECT-CT 为美国 GE 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 脂质体法转染重组质粒至 H460 细胞 实验前 1 天,采用传统的 SDS 碱裂解法,使用 TaKaRa 的 Mini BEST Plasmid Purification Kit Ver 2.0 试剂盒提取质粒 pcDNA3.1-hNIS。用 lipofectamineTM2000 进行转染,G418 筛选转染后的细胞,2 周后出现抗 G418 硫酸盐的阳性克隆,即稳定表达的细胞株。转染效率 30% ~ 35%。

1.2.2 稳定表达的细胞株的摄 <sup>125</sup>I 活性 将 hNIS-H460 细胞和 H460 细胞分别接种于 6 孔板,每孔细胞均在原培养基中加入 0.5  $\mu$ Ci 的 <sup>125</sup>I,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 60 min 后收集细胞,使用  $\gamma$  计数器测定细胞放射性计数。

1.2.3 测定细胞株的 NaClO<sub>4</sub> 抑制情况<sup>[1]</sup> 将 hNIS-H460 细胞接种于 6 孔板,其中 3 孔加入 20  $\mu$ l 的 1 mmol/ml 的 NaClO<sub>4</sub>,然后 6 孔中均加入 0.5  $\mu$ Ci 的 <sup>125</sup>I,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。90 min 时吸去含 <sup>125</sup>I 的旧培养基,收集细胞,测定各时段的细胞放射性计数。H460 细胞做上述相同处理。

1.2.4 荷瘤裸鼠的肿瘤 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 显像<sup>[2]</sup> 在转染后 3 周,当皮下瘤块直径达到 15 mm 以上时,取对照组和转染组各 2 只成瘤裸鼠,固定于透明硬塑板上,俯卧位,每只裸鼠腹腔内注射 1 mCi <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液,注射 10 min 后应用 SPECT 显像(ZOOM:5.0),采用低能高分辨准直器,采集总计数 300 K。

1.2.5 大细胞肺癌荷瘤裸鼠模型的 <sup>131</sup>I 实验性显像 在转染后 3 周,当皮下瘤块直径达到 15 mm 以上时随机选取对照组和转染组各 4 只成瘤裸鼠,每只裸鼠腹腔内注射 <sup>131</sup>I 1 mCi<sup>[2-3]</sup>。在注射 <sup>131</sup>I 后 1、10、20、30、40、50 和 60 min 随机选取转染组和对照组各 2 只裸鼠进行显像(ZOOM:5.0),采用高能准直器,采集总计数 600 K。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 使用脂质体转染法转染 hNIS 基因后,经浓度为 700  $\mu$ g/ml 的 G418 筛选后获得稳定表达 hNIS 基因的细胞株 hNIS-H460。

2.2 在 0.5  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I 孵育 60 min 后,hNIS-H460 细胞每分钟放射性计数(cpm)为 66991.21  $\pm$  5311.64,H460 细胞的 cpm 为 1314.39  $\pm$  44.20。前者较后者增高 50.97 倍(*t* = 12.36,*P* < 0.01),表明转染了 hNIS 基因后 H460 细胞可以摄取更多的 <sup>125</sup>I。

2.3 在 0.5  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I 孵育 90 min 后,未加入 NaClO<sub>4</sub> 的 hNIS-H460 细胞系有摄 <sup>125</sup>I 能力[cpm 为(44216.78  $\pm$  750.22)],加入 NaClO<sub>4</sub> 的 hNIS-H460 细胞摄 <sup>125</sup>I 能力明显受到抑制[cpm(552.23  $\pm$  27.95)],其 cpm 是前者的 1/50(*t* = 115.51,*P* < 0.01),表明 hNIS-H460 细胞的摄碘功能为 hNIS 基因所介

导。

2.4 应用 SPECT 对转染组及对照组裸鼠的肺癌移植瘤进行放射性核素 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 显像(图 1),转染组移植瘤显像清晰,其 B/L 比值为 2.5,提示表明 hNIS 基因可作为非甲状腺源性肿瘤应用 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 显像的报告基因。

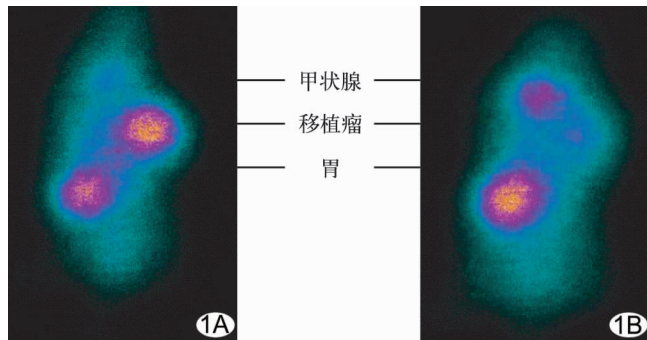


图 1 转染组(A)与对照组(B)荷瘤裸鼠 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 全身显像

2.5 荷瘤裸鼠 hNIS-H460 细胞移植瘤可以迅速摄取 <sup>131</sup>I,并在 10 min 内达到峰值,随后移植瘤部位 <sup>131</sup>I 浓集程度逐渐减低。裸鼠 <sup>131</sup>I 全身显像(图 2)可以看出转染组移植瘤部位可明显聚集 <sup>131</sup>I,其 L/B 比值为 2.1。而对照组相应体积大小的肿瘤则不显像,表明 hNIS-H460 细胞移植瘤可以摄取 <sup>131</sup>I,但 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 显像质量优于 <sup>131</sup>I 显像。

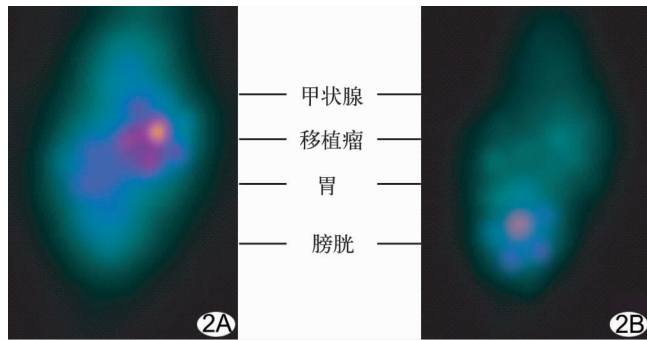


图 2 转染组(A)与对照组(B)荷瘤裸鼠 <sup>131</sup>I 全身显像

3 讨论

在甲状腺中,碘是通过 hNIS 基因被主动转运入细胞的<sup>[4,6]</sup>。hNIS 基因已经被广泛地转染到肿瘤细胞,如乳腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、宫颈癌、肝癌、结肠癌、骨髓瘤和肺癌等<sup>[7-12]</sup>,并成功地使这些肿瘤细胞具有摄碘功能。本研究使用脂质体法将质粒导入细胞,并通过 G418 筛选后成功获得了稳定表达 hNIS 基因的 H460 细胞株 hNIS-H460,结果显示稳定表达 hNIS 基因的细胞株 hNIS-H460 表现出明显增高的摄 <sup>125</sup>I 能力,比对照组增加了 50.97 倍;转染了 hNIS 基因的非小细胞肺癌移植瘤可以利用 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 和 <sup>131</sup>I 进行显像。

本实验发现稳定表达 hNIS 的 H460 细胞水平的摄 <sup>125</sup>I 能力与裸鼠移植瘤 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 和 <sup>131</sup>I 核素显像后的 L/B 比值之间

存在较大差异,其中体外实验 H460 细胞的摄 $^{125}\text{I}$ 能力为对照组的 50.97 倍,远远高于在进行裸鼠 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 和 $^{131}\text{I}$ 核素显像时所得到的 L/B 比值(两者分别为 2.5 和 2.1)。分析原因如下:实验测量细胞摄 $^{125}\text{I}$ 之前,细胞一直处于 $^{125}\text{I}$ 环境中,使细胞一直处在 $^{125}\text{I}$ 的饱和状态,从而不会出现细胞的 $^{125}\text{I}$ 外流,故体外实验结果显示细胞的摄 $^{125}\text{I}$ 能力较高。而 SPECT 的探头的探测效率、L/B 比值为半定量分析等都会影响显像结果。故两者之间的结果不能直接比较。同时,裸鼠的显像研究是在 hNIS 基因转染后的 3 周进行的,由于 hNIS 基因在裸鼠体内存留时间较短,大约 1 个月左右就会全部从体内流失,这也可能是造成核素显像 L/B 比值较低的原因。Vadysirisack 等<sup>[13]</sup>通过建立脱氧土霉素诱导钠碘转运体表达(Tet On/NIS)的人甲状腺癌细胞(FTC133)、人宫颈癌细胞(HELA)和鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)系观察总 NIS 蛋白水平与细胞表面 NIS 蛋白水平的相关性以及各种水平的 NIS 与 NIS 介导细胞内放射性碘吸收的关系,发现许多外源性 NIS 蛋白有效运输到细胞表面,放射性碘吸收在一定范围内与细胞表面 NIS 蛋白水平有关,测定体内成像信号能定量 NIS 表达。在一定范围内适度增加 NIS 蛋白水平能显著增加放射性碘的吸收,两者成线性关系;继续增加 NIS 蛋白水平并不增加放射性碘吸收,提示低水平的 NIS 表达已经足够体内应用放射性碘成像。研究表明 NIS 能用于报告基因成像并确定治疗基因在相关组织的局限化,并能用于监测基因表达水平和治疗基因持续时间。

作为显像剂, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 具有半衰期短、能量适中、发射单一的 $\gamma$ 射线、容易得到、价格便宜等优点,加之其显像质量明显优于 $^{131}\text{I}$ ,使 NIS 与放射性核素联合作为非甲状腺源性肿瘤的报告基因。目前国内外对于转染 NIS 基因介导医学显像还多处于实验研究阶段。随着各相关学科特别是分子生物学的发展,核素基因显像方面的研究还将取得更新的进展。

#### [参考文献]

- [1] Petrich T, Knapp WH, Pötter E. Functional activity of human sodium/iodide symporter in tumor cell lines. *Nuklearmedizin*, 2003, 42(1): 15-18.
- [2] Cho JY, Shen DHY, Yang W, et al. In vivo imaging and radioiodine therapy following sodium iodide symporter gene transfer in animal model of intracerebral gliomas. *Gene Ther*, 2002, 9(17): 1139-1145.
- [3] Smit JW, Schröder-van der Elst JP, Karperien M, et al. Expression of the human sodium/iodide symporter (hNIS) in xenotransplanted human thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(1): 52-55.
- [4] Dadachova E, Carrasco N. The Na/I symporter (NIS): imaging and therapeutic applications. *Semin Nucl Med*, 2004, 34(1): 23-31.
- [5] Kosugi S, Okamoto H, Tamada A, et al. A novel peculiar mutation in the sodium/iodide symporter gene in Spanish siblings with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(8): 3830-3836.
- [6] Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, et al. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(4): 1880-1888.
- [7] Zhang L, Sharma S, Zhu LX, et al. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Research*, 2003(63): 5065-5072.
- [8] Spitaweg C, Morris JC. Gene therapy for thyroid cancer: current status and future prospects. *Thyroid*, 2004, 14(6): 424-434.
- [9] Cengic N, Baker CH, Schutz M, et al. A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(8): 4457-4464.
- [10] Faivre J, Clerc J, Gerolami R, et al. Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 8045-8051.
- [11] Dwyer RM, Bergert ER, O'connor MK, et al. In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(4): 1483-1489.
- [12] Scholz IV, Cengic N, Baker CH, et al. Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Ther*, 2005, 12(3): 272-280.
- [13] Vadysirisack DD, Shen DH, Jhiang SM. Correlation of  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter expression and activity: implications of  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter as an imaging reporter gene. *J Nucl Med*, 2006, 47(1): 182-190.