

引用格式:王旻姝, 马文超, 朱 磊, 等. 葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT-1) 抑制剂 BAY-876 体内活性的正电子发射型计算机断层显像 (PET) 检测 [J]. 科学技术与工程, 2018, 18(1): 192—195

Wang Minshu, Ma Wenchao, Zhu Lei, et al. Identification of *in vivo* activity of glucose transporter (GLUT-1) inhibitor BAY-876 on hepatocellular carcinoma cells using positron emission computed tomography (PET) analysis[J]. Science Technology and Engineering, 2018, 18(1): 192—195

葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT-1) 抑制剂 BAY-876 体内活性的正电子发射型计算机断层显像 (PET) 检测

王旻姝 马文超 朱 磊 宋秀宇 徐文贵*

(天津医科大学肿瘤医院分子影像与核医学诊疗科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘 要 目前,葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter, GLUT) 不仅是细胞摄取葡萄糖的功能与物质保障,同时也是恶性肿瘤抗肿瘤药物治疗的新型干预靶点。建立 GLUT 抑制剂的体内活性评价方法具有重要意义。利用正电子发射型计算机断层显像检测仪 (positron emission computed tomography, PET) 对小动物肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 肿瘤模型进行 PET 检测,建立 GLUT 抑制剂的小动物体内活性检测方法。在 HCC 细胞系中检测 GLUT-1 的表达,选取 GLUT-1 表达水平最高的细胞系接种 BalB/c 免疫缺陷动物皮下,形成免疫缺陷动物皮下肿瘤模型。连续三日口服灌胃给药,给予动物 5 mg/kg 的 GLUT-1 抑制剂 BAY-876 后,进行 PET 检测。动物行尾静脉注射 200 μ Ci 的核素探针 18 F-FDG,约 30 min 后进行 PET 检测。在此基础上,使用盖革计数器检测动物肿瘤与血液的放射性强度比较。在所选细胞系中, MHCC-97H 细胞中 GLUT-1 的表达显著高于其他细胞系, BAY-876 治疗动物能够显著抑制 MHCC-97H 皮下肿瘤组织对 18 F-FDG 的摄取。GLUT-1 抑制剂 BAY-876 能够显著抑制 HCC 细胞对葡萄糖的摄取,成功建立了利用 PET 检测 GLUT 抑制剂动物体内活性的 PET 检测方法。

关键词 肝细胞癌 葡萄糖转运体 正电子发射型计算机断层显像 药物活性检测

中图分类号 R817.1 R817.4 R735.7; **文献标志码** B

中国有超过 8 000 万人感染各种肝炎病毒 (HBV 或 HCV 等) 或罹患肝炎病毒引起的慢性乙肝 (chronic hepatitis B)、肝纤维化 (hepatic fibrosis) 或肝硬化 (cirrhosis) 等各种慢性肝脏疾病^[1]。随着疾病的进展,有相当比例的患者最终会罹患肝细胞癌 (HCC)^[2]。因此,对 HCC 的临床诊疗具有重要意义。另一方面,多数 HCC 患者初诊即为进展期 (advanced HCC),失去肝移植 (liver transplant) 或手术切除 (surgical resection) 等根治性的治疗机会^[3]。HCC 具有对化疗药物的多药耐药 (multi-drug resistance, MDR),对几乎全部的细胞毒性化疗药物均极不敏感,以口服多

靶标蛋白激酶抑制剂 sorafenib 为代表的一线治疗药物存也存在明显的药物耐受,因此探究 HCC 对抗肿瘤药物的耐受机制,研究和开发新的抗肿瘤治疗策略具有重要意义^[4]。

HCC 细胞通过葡萄糖转运体 (GLUT) 摄取和转运葡萄糖^[5]。GLUT 蛋白家族共有 12 个成员,其中以 GLUT-1 与 GLUT-4 最为重要^[6]。早期的研究主要关注于 GLUT 与糖尿病相关糖代谢的关系,或在 II 型糖尿病治疗中的意义,其在抗肿瘤治疗中的作用的报道较少^[6]。本研究首先选取 GLUT-1 高表达的 HCC 细胞 MHCC-97H,建立 MHCC-97H 的免疫缺陷动物皮下肿瘤模型。对动物灌胃给予 GLUT-1 的抑制剂 BAY-876^[7],利用 PET 检测 BAY-876 对 MHCC-97H 细胞摄取 18 F-FDG 的影响。结果显示, BAY-876 能够显著降低 MHCC-97H 对 18 F-FDG 的摄取作用。这表明成功建立了 GLUT 抑制剂的动物体内活性的检测与评价方法,为开发靶向 GLUT 的新药奠定了坚实基础。

2017 年 6 月 22 日收到 国家自然科学基金(81501984)和天津市卫生局科技基金(2015KZ084)资助

第一作者简介:王旻姝(1992—),女,硕士研究生,住院医师。研究方向:分子影像学诊断及放射性核素治疗。E-mail: daisywms@163.com。

* 通信作者简介:徐文贵(1965—),男,博士,主任医师。研究方向:分子影像学诊断及放射性核素治疗。E-mail: wenguixy@163.com。

1 实验材料

1.1 实验试剂与耗材

细胞培养实验使用的胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基等常规细胞培养试剂购自美国 Hyclone 公司;细胞培养皿和细胞培养板等均为美国 Corning 公司产品。动物实验使用的吸入麻醉剂异氟烷(isoflurane)为深圳瑞沃德公司产品;PET 实验使用的核素探针¹⁸F-FDG 为本实验室制备与保存。GLUT-1 抑制剂 BAY-876 为美国 Selleck 公司产品(Catalog No. S8452);实验使用 RNA 提取与 qPCR 检测试剂盒均为 ABI 公司产品。其余实验使用耗材均为国产常规耗材。

1.2 仪器

细胞观察使用常规倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);qPCR 实验使用 ABI—7500 荧光实时定量仪;PCR 小动物麻醉剂机、盖革计数器和 PET 成像、分析系统由实验室提供。

1.3 细胞系

肝脏来源的正常细胞系 L-02, HCC 细胞 HepG2、MHCC-97H、MHCC-97L、BEL-7402 与 Hu7 等均为实验室保存。

1.4 实验动物

实验使用 BalB/c 免疫缺陷小鼠为北京维通利华公司提供。在清洁级动物房进行饲养。

2 实验方法

2.1 细胞培养实验与 qPCR 检测

肝脏来源的正常细胞系 L-02, HCC 细胞 HepG2、MHCC-97H、MHCC-97L、BEL-7402 与 Hu7 等培养于含有 10% 胎牛的 DMEM 中,置 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。收集细胞按照厂商提供的说明书提取总 RNA 样本并进行 qPCR 检测,确定各种细胞系中 GLUT-1 的表达水平。

2.2 动物皮下肿瘤

MHCC-97H 细胞培养至指数增长期,消化后使用 PBS 洗两次,使用 PBS 重悬后接种于免疫缺陷动物皮下,每个接种点接种 1 × 10⁷ 个细胞。待 2 ~ 3 周生长后形成皮下肿瘤,备用进行下一步实验。

2.3 动物灌胃给药实验

实验动物分两组,每组 3 只,分别灌胃 5 mg/kg BAY-876 或 PBS,每日给予一次,连续给予 3 d 后,进行下一步实验。

2.4 PET 检测

实验动物使用异氟烷吸入麻醉后,经尾静脉注射核素探针¹⁸F-FDG,每只注射 200 μCi 的探针。约

30 ~ 40 min 后进行 PET 检测。使用盖革计数器进行确证。

2.5 统计学分析

使用 SPSS17.0 软件,采用单因素方差分析比较均数 ± 标准差方法计算 P 值。

3 结果

3.1 GLUT-1 在细胞系中的表达

首先检测了 GLUT-1 在细胞系中的表达水平。收集 L-02、HepG2、MHCC-97L、MHCC-97H、BEL-7402、SMMC-7721 与 Hu7 等细胞样品,提取总 RNA 进行 qPCR 检测,确定 GLUT-1 在上述细胞系中的表达水平。以 L-02 为单位 1,计算相对 mRNA 表达。结果如图 1 所示:GLUT-1 在全部细胞中均有表达,HCC 细胞中的表达高于 L-02。MHCC-97H 中 GLUT-1 的表达高于其他细胞系,因此选取 MHCC-97H 细胞进行进一步实验。

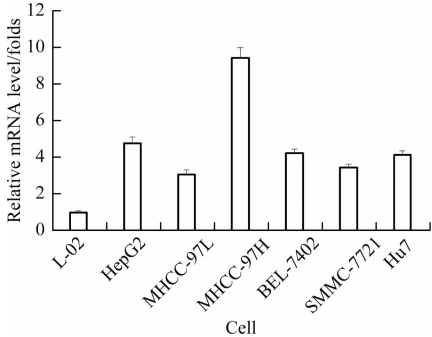
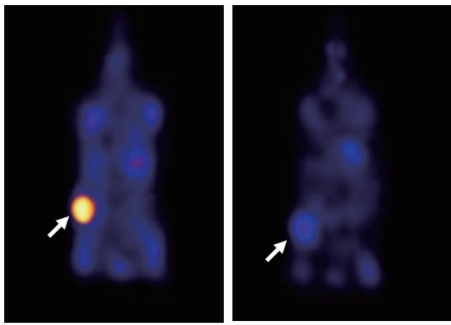


图 1 GLUT-1 在 L-02 与 HCC 细胞系中的表达

Fig. 1 The expression of GLUT-1 in L-02 and HCC cell lines

3.2 BAY-876 能够抑制 MHCC-97H 对核素探针的¹⁸F-FDG 摄取

进一步,进行了 PET 实验。结果显示,与对照相比,BAY-876 连续能够显著抑制 MHCC-97H 细胞对核素探针¹⁸F-FDG 的摄取作用。免疫缺陷动物建立 MHCC-97H 的皮下肿瘤模型,对小动物进行 PET 检测,出示代表性 PET 影像照片。图 2 为 PET 结果,BAY-876 治疗组肿瘤核素探针分布远低于对照组;手术剥取肿瘤组织,使用盖革计数器检测组织与血液的放射性强度比值,检测 BAY-876 对肿瘤组织的放射性强度的影响。图 3 为盖革计数器对核素信号的定量分析结果;BAY-876 不影响 MHCC-97H 皮下形成肿瘤的大小与质量。MHCC-97H 细胞形成免疫缺陷动物皮下后给予 Control(PBS)与 BAY-876 治疗后,解剖肿瘤。结果显示为照片与肿瘤称重。图 4 为肿瘤解剖结果,显示 3 d 的 BAY-876 治疗并未显著缩小肿瘤体积与质量,验证了 BAY-876 作用的特异性。



(a) 动物灌胃给予PBS (b) 动物灌胃给予BAY-876

图2 BAY-876抑制MHCC-97H细胞对¹⁸F-FDG核素探针的摄取作用

Fig.2 BAY-876 attenuates the absorbing ¹⁸F-FDG of MHCC-97H cells in nude mice

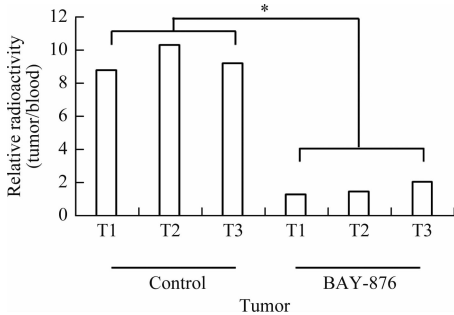


图3 肿瘤组织的放射性强度

Fig.3 The radioactivity of tumors

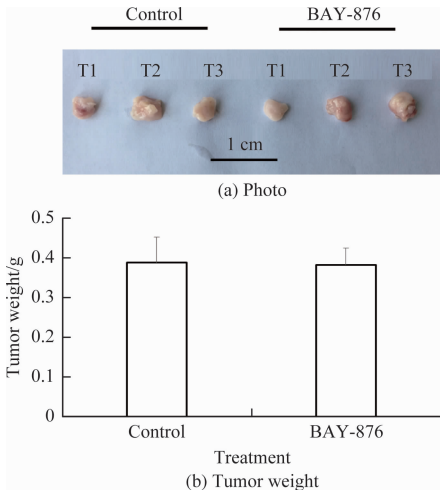


图4 肿瘤解剖结果

Fig.4 Dissection result of tumor

4 讨论

肝脏是人体物质与能量代谢的中心器官,HCC细胞具有更为旺盛的物质摄取与能量代谢。同位素¹⁸F取代的葡萄糖能够为HCC细胞所摄取,其放射性信号能够为PET所记录与检测^[8]。利用PET探查能够直接反映出HCC细胞对¹⁸F-FDG核素探

针的摄取作用,最终反映出HCC细胞对葡萄糖的摄取与转运^[8]。利用HCC细胞对葡萄糖的强烈摄取的特性,利用PET检测不仅能够检测肝脏原位组织的癌变,也能够对HCC的转移进行追踪与监控^[9]。利用PET对HCC细胞的免疫缺陷动物皮下肿瘤进行检测,实现了HCC皮下肿瘤的PET检测,这为进一步肿瘤学研究奠定了基础。

GLUT是哺乳动物细胞,特别是恶性肿瘤细胞摄取与转运葡萄糖的物质与功能基础,靶向GLUT的药物研究相关报道较少。目前尚无靶向GLUT的抗肿瘤药物进入临床诊疗^[10]。结果显示, GLUT-1的表达在MHCC-97H中的表达远高于其他HCC细胞。MHCC-97是高侵袭性的HCC细胞系,其物质摄取与能量代谢可能也有较高水平。GLUT-1等的拮抗剂不仅有可能通过抑制HCC细胞葡萄糖摄取延缓其增殖,也有可能通过改变HCC细胞的生理状态提高其他诊疗策略的效果。BAY-876是主要作用于GLUT-1的抑制剂,其与GLUT-1的体外亲和力 EC_{50} 值约为2 nmol/L^[7]。结果显示BAY-876能够显著抑制HCC细胞对¹⁸F-FDG核素探针的摄取作用,这不仅确证了BAY-876的体内活性,也建立了GLUT抑制剂活性的特异性检测方法,未来将利用该方法对各种新型GLUT抑制剂进行筛选与评价。

此外,BAY-876的作用具有较强的特异性,其作用于GLUT2-4的体外亲和力均远低于GLUT-1,其作用的 EC_{50} 值分别为0.29 μ mol/L、1.67 μ mol/L和10.8 μ mol/L^[8]。未来既可以发现GLUT2-4的特异性抑制剂,也可建立GLUTs的多靶标抑制剂。

参 考 文 献

- 1 Wang F S, Fan J G, Zhang Z, *et al.* The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology*, 2014; 60 (6) : 2099—2108
- 2 Wang C, Wang H, Yang W, *et al.* Multicenter randomized controlled trial of percutaneous cryoablation versus radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2015; 61 (5) : 1579—1590
- 3 Jia H, Yang Q, Wang T, *et al.* Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents. *Biochim Biophys Acta*, 2016; 1860 (7) : 1417—1430
- 4 Abou-Alfa G K, Puig O, Daniele B, *et al.* Randomized phase II placebo controlled study of codrituzumab in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2016; 65 (2) : 289—295
- 5 Kapoor K, Finer-Moore J S, Pedersen B P, *et al.* Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016; 113 (17) : 4711—4716
- 6 Stanirowski P J, Szukiewicz D, Pyzlak M, *et al.* Impact of pre-gesta-

tional and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta. *Endocrine*,2017;55(3):799—808

7 Siebeneicher H, Cleve A, Rehwinkel H, *et al.* Identification and optimization of the first highly selective GLUT1 inhibitor BAY—876. *Chem Med Chem*,2016;11(20):2261—2271

8 Zou Y, Tong J, Leng H, *et al.* Diagnostic value of using 18F-FDG PET and PET/CT in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*,2017;8(25):41518—41528

9 Feng M, Zhu H, Zhu Z, *et al.* Serial 18F-FDG PET demonstrates benefit of human mesenchymal stem cells in treatment of intracerebral hematoma: a translational study in a primate model. *J Nucl Med*, 2011;52(1):90—97

10 Kitamura K, Hatano E, Higashi T, *et al.* Proliferative activity in hepatocellular carcinoma is closely correlated with glucose metabolism but not angiogenesis. *J Hepatol*,2011;55(4):846—857

Identification of *in vivo* Activity of Glucose Transpoter (GLUT-1) Inhibitor BAY-876 on Hepatocellular Carcinoma Cells Using Positron Emission Computed Tomography (PET) Analysis

WANG Min-shu, MA Wen-chao, ZHU Lei, SONG Xiu-yu, XU Wen-gui *

(Department of Molecular Imaging and Nuclear Medicine, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

[**Abstract**] Glucose transporters (GLUTs) mediates the absorbing of glucose in mammal cells. However, the potential application of GLUT inhibitors in hepatocellular carcinoma (HCC) is largely unknown. To identify the *in vivo* activity of GLUT-1 inhibitor BAY-876 on hepatocellular carcinoma cells using positron emission computed tomography (PET). The expression of GLUT-1 in HCC cell line was identified by qPCR. MGCC-97H cells, which express highest GLUT-1, were injected to nude mice. After 2 ~ 3 weeks growth, mice were treated with control (PBS) or 5 mg/kg BAY-876 once per day for three days. Mice were injected with 200 μ Ci 18 F-FDG and analyzed by PET. MHCC-97H expresses highest GLUT-1 than other cell lines. Treatment of BAY-876 attenuates the absorbing of 18 F-FDG in MHCC-97H cells. In inhibitor of GLUT-1, BYA-876, could inhibit the absorbing of glucose in HCC cells. This work established a method to identify the *in vivo* activity of GLUTs inhibitor.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma glucose transporters positron emission computed tomography compounds activity screening