

基因表达正电子发射断层显像

唐刚华

(第一军医大学南方医院南方 PET 中心, 广东 广州 510515)

摘要: 分子生物学与核医学的结合形成了分子核医学, 基因表达正电子发射断层 (PET) 显像是当今分子核医学研究的热点和前沿领域之一。基因表达 PET 显像包括反义 PET 显像和报告基因 PET 显像, 反义 PET 显像由于技术上的问题, 远不如报告基因 PET 显像那样发展迅速, 报告基因 PET 显像已广泛用于动物实验研究, 可望不久的将来会用于临床研究。

关键词: 基因表达; 反义寡核苷酸或寡脱氧核苷酸; 报告基因; 正电子发射断层显像

中图分类号: R817.4 **文献标识码:** A

分子生物学在医学领域中的渗透和发展, 形成了分子医学^[1,2]。基因诊断和基因治疗已成为目前分子医学研究的热门领域, 分子核医学正面对着严峻的挑战。然而, 人体内基因表达的监测尚有许多问题没有解决, 分子核医学特别是正电子发射断层 (positron emission tomography, PET) 显像可望在这方面显示出其巨大的潜力。基因表达 PET 显像主要包括反义 (antisense) PET 显像和报告基因表达 (reporter gene expression) PET 显像两种方法^[1-4], 反义 PET 显像是一种内源性基因表达显像, 在这两种方法中尤为重要, 但难度更大^[2]。

1 反义正电子发射断层显像

1.1 原理与方法

反义技术是根据碱基互补原理, 利用与目标靶 DNA 或 RNA 特异互补的短链核苷酸 (反义核酸) 封闭基因表达的方法^[5], 基因的反向转录可产生相应的反义 RNA, 它和相应的 mRNA (正义 RNA) 核苷酸重叠互补, 可杂交成双链结构, 从而在抑制 mRNA 的翻译 (即基因治疗) 的同时起到基因诊断的作用。反义 PET 显像技术是反义技术与 PET 显像有机结合的产物, 即以正电子放射性核素标记的人工合成的反义寡核苷酸探针或反义寡脱氧核苷酸 (具有反义 RNA 或 DNA 性质) 为显像剂, 通过标记

反义寡核苷酸或反义寡脱氧核苷酸与体内基因表达产物 mRNA 结合, 利用 PET 技术对目标基因进行显像定位的方法。反义 PET 显像具有分辨率高、不引起免疫反应、探针分子小、易进入瘤组织、肿瘤摄取高及对疾病的诊断达到基因水平等优点, 可望用于肿瘤的早期诊断、良恶性鉴别、寻找肿瘤复发和转移灶等^[5]。

反义 PET 显像的机制是对基因表达的抑制, 寡核苷酸探针、放射性核素和靶细胞的选择是影响反义 PET 显像的三个关键因素^[5]。寡核苷酸探针的选择是反义 PET 显像技术应首先解决的问题, 成功的反义 PET 显像要求寡核苷酸探针必须满足以下条件^[2,4]: ① 寡核苷酸探针必须容易大量合成; ② 寡核苷酸探针在体内必须稳定, 能在靶细胞内保持一定的浓度。在体内, 寡脱氧核苷酸比寡核苷酸更稳定, 因此较为理想的可能是甲基磷酸化的寡脱氧核苷酸或具有优良药代动力学和细胞膜转运特点的第二代寡脱氧核苷酸; ③ 反义探针应具有较好的细胞膜转运性能, 必须能进入靶细胞; ④ 正电子放射性核素标记的反义寡核苷酸必须被靶细胞截留; ⑤ 反义寡核苷酸必须能以一定的亲和力与靶序列特异性结合, 利用受体、酶及免疫脂质体介导的反义寡核苷酸在很大程度上将反义寡核苷酸定向导入靶细胞, 有效提高反义寡核苷酸的靶向性; ⑥ 反义寡核苷酸不能与其他大分子物质发生非序列、非特异性结合; ⑦ 反义寡核苷酸的长度以含 12~35 核苷酸碱基较为适宜; ⑧ 反义寡核苷酸探针必须具有良好药代动力学和低毒的性能。正电子放射性核素的选择是反义 PET 显像技术必须考虑的问题。¹⁸F 和 ¹¹C 是较为合适的核素, 但体内基因表达时间一般都较长, 而 ¹¹C

收稿日期: 2001-01-03

作者简介: 唐刚华 (1968-), 男, 湖南东安人, 第一军医大学南方医院南方 PET 中心讲师, 博士后, 主要从事药物合成与代谢、PET 药物、神经递质受体 PET 显像以及基因表达 PET 显像研究。

审校者: 中国科学院上海原子核研究所放药中心 汪勇先

半衰期较短(只有 10 min),所以以 ^{18}F 最有应用前景。另外,应选择标记简单、标记率和比活度高、非特异性低且不影响反义寡核苷酸生物活性的标记方法。靶细胞的选择也是反义显像技术必须解决的重要问题。靶细胞必须有特异的 mRNA,能优先摄取并能特异性滞留反义寡核苷酸;反义靶位的选择,一般以靶细胞中 mRNA 5'末端以及起始编码区作为靶结合区,3'末端非转录区也可作为靶结合区^[5]。

对于反义 PET 显像,信号放大、靶与非靶的放射性比值及寡核苷酸探针的比活度是非常关键的问题,而问题焦点集中于 mRNA 和 mRNA 翻译的蛋白质产物上^[2]。mRNA 作为靶,由于许多蛋白质来源于单链 mRNA 的翻译,从而造成 mRNA 浓度很低^[5]。然而,mRNA 作为靶具有普遍性的优点,即任何基因显像均可通过只有 4 个碱基的短序列而获得正电子标记的基因显像探针,这样可以获得所要求的比活度。与 mRNA 相比,以蛋白质产物作为靶具有放大靶浓度的优点,如果蛋白质产物是受体(基于受体介导的反义寡聚核苷酸),具有固定的放大效应,但是如果蛋白质产物是酶(基于酶介导的反义寡聚核苷酸),就会出现更强的放大效应,然而,针对不同内源性基因表达产物受体或酶,需要研制相应特异标记配体或底物。

1.2 应用

目前,内源性基因的反义显像尚处于实验研究阶段,应用有限,特别是由于正电子核素半衰期短及标记寡核苷酸技术难度大等原因,反义 PET 显像远不如反义 SPECT(单光子发射计算机断层)显像技术发展迅速。以 mRNA 为靶的反义显像研究已取得一定进展,用于反义显像的第一个特异性放射性核素标记的反义寡脱氧核苷酸探针是以抗扩增 c-myc 癌基因为靶序列的 ^{111}In 标记的寡脱氧核苷酸^[6]。此后,由于 $^{99}\text{Tc}^m$ 物理性能好,非常适于 SPECT 显像,因而 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记寡核苷酸成为人们研究的重点^[5]。近来,用于 PET 显像的 ^{18}F 和 ^{11}C 标记的寡核苷酸也已研制成功^[7-9]。Tavitian B 等^[9]报道了狒狒体内 ^{18}F 标记的寡核苷酸体内分布,他们在 3'端用 ^{18}F 标记十八聚体的寡脱氧核苷酸,分别对磷酸二酯型、磷酸硫酸酯型和 2'-O-甲基型寡脱氧核苷酸体内分布进行了研究,结果表明:三种 ^{18}F 标记的寡脱氧核苷酸与预期的体内行为非常不一样;3'端 ^{18}F 标记的寡脱氧核苷酸不影响各探针的体内分布;PET 可以用来定量研究寡脱氧核苷酸的体内分布。然而,这些只是反义

PET 显像研究的开端,反义 PET 显像还有许多技术问题(如放化合成的寡脱氧核苷酸探针比活度低等)需要进一步研究,其进一步临床应用尚有许多艰苦工作要做。

2 报告基因表达正电子发射断层显像

2.1 原理与方法

报告基因表达 PET 显像是以正电子放射性核素标记的报告探针为显像剂,对报告基因表达进行显像定位的方法。报告基因表达 PET 显像必须具备两个基本要素:PET 报告基因和 PET 报告探针。PET 报告探针常用的标记正电子放射性核素为 ^{124}I 和 ^{18}F ,其中以 ^{18}F 最为常用。PET 报告探针的积聚直接依赖于 PET 报告基因的表达,其转录由启动子驱使,启动子将根据应用目的选择构建启动子或诱导启动子,构建启动子可用于 PET 报告基因的连续转录,诱导启动子用于控制转录水平,构建启动子或诱导启动子可以是外源性基因,也可以是内源性基因。报告基因表达 PET 显像必须将基因引入生物体内靶组织。如果 PET 报告基因在体内不转录,PET 报告探针将不会积聚;如果启动子导致 PET 报告基因在体内转录,PET 报告基因 mRNA 的翻译将引起蛋白质产物与 PET 报告探针发生作用,从而达到报告基因表达 PET 显像的目的^[3-4]。

报告基因表达显像又称转基因表达显像^[1,2]。报告基因 PET 显像技术分为两类^[1-4,10-12]:一类是酶介导报告基因与报告探针 PET 显像技术。即用转基因的表达物对特异标记前体底物进行代谢,转化为对分裂细胞具有杀伤作用的代谢产物,掺入到细胞 DNA 合成中,使 DNA 链延长终止而杀伤细胞,从而在抑制 mRNA 的翻译(即自杀基因治疗)的同时也起到基因诊断的作用。PET 报告基因在启动子的驱动下,被转录形成酶产物,PET 报告探针(底物)进入细胞内,被酶产物捕集并转化为可捕集的代谢物,PET 报告探针的积累产生信号放大作用,用来测定报告基因表达的部位、表达量及表达持续时间。另一类是受体介导报告基因与报告探针 PET 显像技术。PET 报告基因在启动子的驱动下,被转录成位于细胞表面、细胞内或细胞外的受体蛋白质产物,受体蛋白质与 PET 报告探针(配体)结合产生信号放大作用,用来测定报告基因表达的部位、表达量及表达持续时间。酶介导法由于一个酶分子可以代谢并捕集许多 PET 报告探针分子,因而具有放大信号

作用;受体介导法由于是一种受体与一种或几种配体的固定作用,因而信号放大作用不如酶介导法,但酶介导法较为复杂^[3,4]。

报告基因表达 PET显像主要用于外源性基因显像,但是,如果通过融合基因,将内源性基因和PET报告基因的启动子联结在一起,便可用于内源性基因表达显像。内源性基因和PET报告基因在共同的启动子作用下,PET报告基因随内源性基因的转录而被转录,从而可以实现报告基因表达PET显像监测内源性基因表达的目的^[1,4]。

当治疗基因不适于用作PET报告基因或没有合适的PET报告探针供基因治疗显像时,需要构建融合基因或双基因腺病毒载体^[2,4]。在双基因腺病毒载体中,治疗基因和报告基因可用内核糖体进入位点(IRES)序列将其连接在一起,并受同一启动子控制,这样,治疗基因和报告基因的表达被转录在同一mRNA上,通过监测报告基因的表达便可了解治疗基因的疗效。

理想的PET报告基因与PET报告探针显像系统应具备以下条件^[3,4]:(1)PET报告基因应存在于哺乳动物细胞中,但不表达;如果报告基因表达,报告基因蛋白质产物应只在表达的细胞内产生特异性报告探针积聚;如果报告基因不表达,细胞中不应存在明显的报告探针积聚。(2)PET报告基因产物在体内不应存在明显的免疫反应。(3)PET报告探针应在体内稳定,不向周边产生代谢物而使定量分析复杂化。(4)PET报告探针应快速从血液和组织非特异性位点中清除,具有不干扰测定特异性信号的消除路线。(5)PET报告探针应容易用各种放射性核素标记而不改变其性质,并应具有高比活度。(6)PET报告探针或其代谢物在所使用的浓度范围内不应有毒性。(7)PET报告基因及其启动子的大小受其传递载体容量的限制。(8)PET报告探针必须易于透过细胞膜而进入到感兴趣区。(9)PET报告探针显像信号应与体内PET报告基因mRNA和蛋白质水平具有良好的相关性。(10)如果PET报告基因用于监测内源性基因表达,报告基因表达分析应与内源性基因表达水平具有良好的相关性。目前,没有一种报告基因与报告探针显像系统完全满足以上条件,在实际应用中,应根据不同应用目的,尽量按照以上标准,选择不同报告基因系统。

2.2 应用

重复、无创伤的报告基因表达PET显像可用于

动物和人体内基因表达的监测、活体动物和人体器官或细胞移植的监测以及转基因动物基因表达调控的监测,主要用于基因治疗效果的监测。

对于受体介导报告基因与报告探针PET显像系统,其报告基因表达的蛋白质是一种受体,报告探针是正电子放射性核素标记的配体,其作用机制是受体-配体间的作用,经基因转导可明显提高靶细胞特异性受体的表达。目前研究最多的是多巴胺D₂受体(D₂R)报告基因,可望用于D₂R报告基因PET显像的配体有¹¹C-raclopride¹¹C-N-methylspiperone(¹¹C-MSP)和¹⁸F-fluoroethylspiperone(¹⁸F-FESP)等,它们已用于动物和人体的受体显像研究,但其在报告基因表达显像应用方面仍处于动物实验研究阶段,且目前文献报道甚少,D₂R与¹⁸F-FESP系统是用于D₂R报告基因表达PET显像的惟一例子^[13-14]。Maclaren DC等^[13]以D₂R作为PET报告基因,¹⁸F-FESP作为PET报告探针,用microPET和放射自显影术对同一小鼠体内D₂R报告基因表达显像进行了对比研究,结果发现,在这两种显像技术获得的纵断层显像中,肝中滞留的放射性具有很好的相关性,实验组(含有D₂R)肝中¹⁸F-FESP的滞留量显著高于对照组(不含有D₂R)此外,胃肠道和膀胱也有一定的放射性积聚,说明胃肠道和膀胱是主要清除器官。该研究表明,D₂R与¹⁸F-FESP PET显像系统是监测体内基因治疗载体和转基因表达的有效技术^[13]。

对于酶介导报告基因与报告探针PET显像系统,其报告基因表达的蛋白质产物是一种酶,报告探针是正电子放射性核素标记的酶底物,目前主要研究的PET报告基因是胞核嘧啶脱胺酶和单纯疱疹病毒I型胸腺嘧啶激酶(HSV 1-tk)。胞核嘧啶脱胺酶报告基因表达机制为脱胺作用,其标记底物6-³H-5-fluorocytosine已用于动物实验研究,但它在动物体内滞留时间短,发展前景有限^[3]。HSV 1-tk报告基因表达机制为酶-底物的酶促作用,使底物磷酸化,其标记底物分为两类:尿嘧啶核苷衍生物和无环鸟苷衍生物^[3]。用于PET显像的标记尿嘧啶核苷衍生物很少,主要是5-¹²⁴I-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil(¹²⁴I-FIAU)^[15];标记无环鸟苷衍生物较多,主要有8-¹⁸F-fluoroacyclovir(¹⁸F-FACV)、8-¹⁸F-fluoroganciclovir(¹⁸F-FGCV)、8-¹⁸F-fluoro-9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-1-butyl]guanine(¹⁸F-FPCV)、9-[(3-¹⁸F-

1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine(^{18}F -FHPG)和9-(4- ^{18}F -3-hydroxy methylbutyl)guanine(^{18}F -FHBG)等^[3]。以上 HSV 1-tk 标记底物均已用于动物 PET 显像研究,其中以 ^{18}F -FHPG PET 和 ^{18}F -FHBG PET 最有发展前景^[16-18]。Hospers GAP 等^[17]用 ^{18}F -FHPG PET 研究了 HSV 1-tk 基因表达情况,将转染和未转染 HSV 1-tk 基因的大鼠神经胶质瘤 C6 细胞与 ^{18}F -FHPG 孵育 2h,结果发现体内外转染 HSV 1-tk 基因的肿瘤内有高水平放射性摄取。由此可见, ^{18}F -FHPG 是检测 HSV 1-tk 酶活性很有前途的 PET 显像剂。另外,Alauddin MM 等^[18]合成了 ^{18}F -FHBG 并对其体外活性进行评价,结果发现在 3h 内转染 HSV 1-tk 基因的结肠癌细胞内摄取的放射性是对照组的 18.2 倍, ^{18}F -FHBG 有可能成为基因治疗中显像病毒感染或转染细胞极有用的工具。

报告基因表达 PET 显像也可用于活体动物靶基因表达的定量研究^[19,20]。近来,Gambhir SS 等^[21]对同一动物 HSV 1-tk 与 FGCV 报告系统分别进行了体内 micro PET 测定和体外测定的对比研究,体内法使用 HSV 1-tk 与 FGCV PET 显像系统,体外法采用 Northern blot 法测定 mRNA 表达,采用生化方法测定肝组织中 HSV 1-tk 酶活性,结果表明在研究范围内,体内 PET 测定的基因表达与体外测定的 HSV 1-tk mRNA 及酶活性间具有线性关系。另外,对于 D₂R 与 FESP 报告系统,分别采用 micro PET 测定体内基因表达和体外 Scatchard 分析法测定 D₂R,两法测定结果也具有良好相关性^[13]。然而,注射病毒载体量与任何方法测定基因表达量并不具有相关性^[21],这说明可以用 PET 直接评估体内组织靶位点的药物剂量^[1,2]。

3 前景

近年来,基因表达 PET 显像已取得巨大发展,但仍处于实验研究阶段。反义 PET 显像虽在很多方面优于报告基因表达 PET 显像,但尚有许多关键问题未得到解决,其发展可能会落后于报告基因表达 PET 显像^[4]。报告基因表达 PET 显像已用于动物实验研究并取得一定成果,可望用于人体研究。随着人类基因组计划的实施以及分子生物学、放射化学和 PET 技术(如用于小动物研究的 micro PET 以及 PET 与 CT 或 MRI 的融合技术等)^[1,2]的发展,基因靶向性放射性核素治疗将为一些难治之症提供新方法,PET 将成为研究活体动物和人体基因表达

显像最为重要的方法,从而促进分子核医学在基础科学研究和临床研究方面得到迅猛发展。

参考文献:

- [1] Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 9226-9233.
- [2] Phelps ME. PET: The merging of biology and imaging into molecular imaging [J]. J Nucl Med, 2000, 41(4): 661-681.
- [3] Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, et al. Assay for noninvasive imaging of reporter gene expression [J]. Nucl Med Biol, 1999, 26(5): 481-490.
- [4] Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, et al. Imaging gene expression: principles and assays [J]. J Nucl Cardiol, 1999, 6(2): 219-233.
- [5] Hnatowich DJ. Antisense and nuclear medicine [J]. J Nucl Med, 1999, 40(4): 693-703.
- [6] Dewanjee MK, Ghafouripour AK, Kapadvanjwala M, et al. Noninvasive imaging of c-myc oncogene messenger RNA with indium-111-antisense probes in a mammary tumour-bearing mouse model [J]. J Nucl Med, 1994, 35: 1054-1063.
- [7] Kobori N, Imahori Y, Mineura K, et al. Visualization of mRNA expression in CNS using ^{11}C -labeled phosphorothioate oligodeoxynucleotide [J]. Neuroreport, 1999, 10(14): 2971-2974.
- [8] Pan D, Gambhir SS, Toyokuni T, et al. Rapid synthesis of a ^{5}F -fluorinated oligodeoxynucleotide a model antisense probe for use in imaging with positron emission tomography (PET) [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8: 1317-1320.
- [9] Tavittian B, Terrazzino S, Kuhnast B, et al. *In vivo* imaging of oligonucleotides with positron emission tomography [J]. Nature Med, 1998, 4: 467-471.
- [10] MacLaren DC, Toyokuni T, Cherry SR, et al. PET imaging of transgene expression [J]. Biol Psychiatry, 2000, 48(5): 337-348.
- [11] Gambhir SS, Herschman HR, Cherry SR, et al. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies [J]. Neoplasia, 2000, 21(1-2): 118-138.
- [12] Herschman HR, MacLaren DC, Iyer M, et al. Seeing is believing: non-invasive, quantitative and repetitive imaging of reporter gene expression in living animals, using positron emission tomography [J]. J Neurosci Res, 2000, 59(6): 699-705.
- [13] MacLaren DC, Gambhir SS, Satyamurthy N, et al. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D₂

- receptor as a reporter gene in living animals [J]. *Gene Ther*, 1999, 6: 785-791.
- [14] Maclaren DC, Gambhir SS, Cherry SR, et al. Repetitive and non-invasive *in vivo* imaging of reporter gene expression using adenovirus delivered dopamine D2 receptor as a reporter gene and FESP as a PET reporter probe [J]. *J Nucl Med*, 1998, 39: 35P.
- [15] Tjuvajev JG, Avril N, Oku T, et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 4333-4341.
- [16] de Vries EFJ, van Waarde A, Harmsen MC, et al. ^{11}C -FM AU and ^{18}F -FHGP as PET tracers for herpes simplex virus thymidine kinase enzyme activity and human cytomegalovirus infections [J]. *Nucl Med Biol*, 2000, 27(2): 113-119.
- [17] Hospers GAP, Calogero A, van Waarde A, et al. Monitoring of herpes simplex virus thymidine kinase enzymic activity using positron emission tomography [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 1488-1491.
- [18] Alauddin MM, Conti PS. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4- ^{18}F -fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine (^{18}F -FHBG): A new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET [J]. *Nucl Med Biol*, 1998, 25: 175-180.
- [19] Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, et al. Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals [J]. *Nature Med*, 2000, 6(8): 933-937.
- [20] Wunderbaldinger P, Bogdanov A, Weissleder R. New approaches for imaging in gene therapy [J]. *Eur J Radiol*, 2000, 34(3): 156-165.
- [21] Gambhir SS, Barrio JR, Phelps ME, et al. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2333-2338.

Positron emission tomography imaging of gene expression

TANG Gang-hua

(Nanfang PET Centre, Nan Fang Hospital, First Military Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China)

Abstract The merging of molecular biology and nuclear medicine is developed into molecular nuclear medicine. Positron emission tomography (PET) of gene expression in molecular nuclear medicine has become an attractive area. Positron emission tomography imaging gene expression includes the antisense PET imaging and the reporter gene PET imaging. It is likely that the antisense PET imaging will lag behind the reporter gene PET imaging because of the numerous issues that have not yet to be resolved with this approach. The reporter gene PET imaging has wide application into animal experimental research and human applications of this approach will likely be reported soon.

Key words gene expression; antisense oligonucleotides or oligodeoxynucleotides; reporter genes; positron emission tomography

本刊 2002年度主要报道内容预告

- | | | | |
|------|-------------------------------|------|------------------------------|
| 第一期: | 核医学: PET与SPECT
放射医学: 放射治疗 | 第四期: | 核医学: 临床核医学
放射医学: 辐射损伤与临床 |
| 第二期: | 核医学: 实验核医学
放射医学: 放射生物学(1) | 第五期: | 核医学: 核医学技术
放射医学: 放射卫生学 |
| 第三期: | 核医学: 核素治疗
放射医学: 辐射流行病学与毒理学 | 第六期: | 核医学: 分子核医学
放射医学: 放射生物学(2) |