

。 综述与编译。

分子核医学浅议

中国医学科学院、中国协和医科大学放射医学研究所 (天津, 300192) 林 汉综述
中国医学科学院、中国协和医科大学协和医院 (北京, 100073) 王世真审

摘 要:概述了 Wagner关于分子核医学概念的要点,对 Wagner关于“通过化学型将表型与基因型联系起来”的观点进行了浅议,并结合我国具体情况提出了值得特别关注的几个研究领域,即受体显像、标记反义探针基因显像、重组单抗片段、肽类放射性药物等。提出:分子识别是分子核医学的重要理论基础之一,应将分子生物学技术引入核医学中来。

关键词:分子核医学 受体显像 分子识别 反义寡核苷酸探针 肽类放射性药物

1 发展中的分子核医学

1992年 1月份,美国能源部主持召开了一次分子核医学座谈会,会上主要由一些分子生物学家、生物化学家等报告了与核医学发展有关联的分子生物学的进展。1995年,美国《核医学杂志》将座谈会上报告的一些论文汇集起来发表,这就是《核医学杂志》第 36卷的“分子核医学”增刊。出版增刊的目的是什么?该座谈会主席 Reba在增刊的“序言”中写道:“分子生物学的进展从现在起将生动地影响今后的医学实践。由于核医学的特点是以示踪原理为基础的,而示踪本来就是‘分子的’,所以我们应毫不迟疑地担起未来医学发展的重要使命。分子生物学前进的脚步是急促的,但是,新的生物技术如何有效地应用于临床实践仍要多年的努力。为了预示那些有可能发展成未来医学示踪技术的分子技术,本杂志发表了分子核医学增刊”^[1]。

可见,分子核医学是处于发展中的一门学科,是刚刚起步的学科。或者说,目前是分子核医学时代的初级阶段。那么,分子核医学的内涵是什么?Wagner在增刊中表达了他的观点^[2]:

1. 受体显像是 Wagner观点的基础。他

认为,用放射性配体显像受体,是分子核医学开拓的一种更精巧的诊断领域,它可以“为观察细胞间和细胞内的生物学过程提供窗口”,特别是“观察执行基因编码指令的蛋白质生化过程”。他还认为,选择立体特异的配体作为放射性药物是很重要的,对它们必须在电荷、形状和亲脂性等方面进行修饰。Wagner还认为,适量的放射性配体与受体的特异结合不会引起副作用。

众所周知,受体的研究涉及细胞之间和细胞与其他分子之间的识别,信息跨膜转导(或称传递)和细胞的生理病理反应等生命基本现象。疾病往往反映在受体数目和亲和力的改变、信息转导功能异常,而这些均与受体基因缺陷和突变有关^[3]。所以,Wagner从这一角度开拓分子核医学的发展是有意义的。多年前,受体的检测在体外进行,分子核医学则于体内直接探测受体,这不能不说是一大飞跃,也只有核医学才能做到。

2. Wagner的主要观点是:病人的基因型总是可以由生化过程来表达其表型的。利用放射性示踪药物可以观察到体内生化过程的变化(Wagner称之为“化学型”)。分子核医学不仅让我们看到这种生化变化,而且让我们有可能将这种以某种生化过程的变化为表型的疾病与其相关的基因型联系起来。

Wagner甚至预言,随着分子核医学的发展,“诊断医学将不是根据临床指征和症状进行疾病分类,而是逐步地把疾病看作是某种生化过程而不是这些过程的临床表现”。虽然如此,Wagner也同时讲道,即使许多疾病都可以溯源到基因异常或基因损伤,代谢异常的评价仍然是核医学的任务之一。因为单个基因异常可有多种临床表现(即基因的多效性——pleiotropism),某种疾病又可与多种基因异常有关(即遗传异质性——genetic heterogeneity),因此,此时只有同时了解疾病的生物化学表型才能做出治疗决策。

Wagner为分子核医学描绘的发展方向,应该说是令人鼓舞的。虽然这一主要观点的某些细节的阐述并不是很清晰(目前也不可能讲得很清楚!),但这一观点的根据是充分的。

近年来,分子生物学家用分子克隆技术基本弄清了多种膜受体和胞内受体的结构,从而初步阐述了配体与受体的结合机制和受体影响细胞生化过程的机制。比如生长激素受体^[4,5],已知1个分子生长激素与2个受体胞外结构域相结合,形成受体的二聚体,而后又影响到受体胞内结构的寡聚化,最后作用于信号转导系统而引起有关生化过程;还有一类受体,它们与G蛋白偶联,叫做G蛋白偶联受体。有200多种这种受体已经被克隆。它们有不同的亚家族,分别为肽类激素、神经介质或其他因子所激活。激素与受体结合后,促进受体与多种杂三聚体G蛋白结合成复合物,这是信号转导级联反应的第一步。之后, $G\alpha$ 亚单位自复合物解离并激活(或抑制)相关的一种或几种效应酶,在信号转导级联反应的最后表达某种生化过程^[6]。关于类固醇激素与胞内受体的结合,总体上也清楚了^[7]:激素与受体结合后,进入胞核并与染色质上的特异调节部位紧密缔合,于是影响基因的转录。受体与DNA结合的部位为65~85氨基酸,而与激素的结合部位目前还不清楚。还

有一种所谓配体门控离子通道^[8],它具有尼克酸受体、GABA受体或甘氨酸受体,GABA与其GABA-A受体结合后可使通道打开,导致氯离子流入,突触后膜超极化及抑制作用。

GABA-A受体还有三个或更多的药物结合位点,其中一个可与苯并二氮杂草(BZ)结合,增加通道打开的几率,从而加强GABA的作用。不难看出,许多神经内分泌因子及其他因子(如血小板活化因子、凝血酶等)与其相关受体的结合都将通过信号转导级联反应而影响某些特定的生化过程。从核医学角度,应根据受体结构的特点,选择高亲和力、高特异性配体,并用适当核素进行标记,然后测定受体数目、浓度的改变,观察对相关的生化过程的影响。

关于如何与基因型相关联,目前的分子核医学研究已提供了希望。动物实验表明,用标记反义探针可以显像乳腺癌、白血病的癌基因^[9,10]。另据报道,发生在慢性粒细胞白血病或急性淋巴白血病的BCR与ABL的融合基因mRNA,正由许多实验室用反义探针进行检测研究^[11]。

至于今后分子核医学的发展如何影响疾病的分类和医学诊断学的基本概念,可能要根据多年的临床实践才能做出判断。

分子核医学的发展是科学发展的必然结果,每一位核医学工作者都要为卷入这一潮流做充分准备。正像生物化学家邹承鲁教授说的^[12]:“分子生物学的影响已经渗入到基础和应用生物学的每一个分支领域,从而全面地带动了生物学的发展”。分子生理学、分子遗传学、分子细胞生物学、分子药理学、分子病理学等早已为人们所熟知,分子核医学的出现也是顺理成章的。

2 几项值得关注的分子核医学研究领域

关键的问题是我们要在思考和评论Wagner观点的同时,怎样更积极地考虑将分子生物学成就及有关的技术结合到核医学

曾被称为生物导弹(或“魔弹”)的单克隆抗体,虽然仍不失为重要的显像示踪剂之一,但临床实践表明,它具有诸多不尽如人意之处。除有产生 HAMA 之虞外,分子量大小所带来的清除慢、T/N T 比值低、穿透能力差、靶组织分布不均匀等缺点,妨碍了它的特殊作用的发挥。为了加速完整抗体的排除速率和增加 T/N T 比值,科学家们想了不少办法,如在抗体分子上连接易自肝脏排出的无唾液酸 α 球蛋白,改变抗体分子表面电荷等,但都没有更多的效果。嵌合抗体和人源化抗体的研究并没有改变完整抗体分子的大小。有报道说,嵌合抗体在血中循环时间之长为鼠抗体的 6 倍^[14,15],作为治疗用是可以的,但作为显像试剂可能不适宜。人源化抗体的亲和力一般低于亲本抗体,同样不适用于显像。

人们逐步地将视线转移到 Fab'、F(ab')₂、Fab、ScFv,甚至超变区肽段(分子识别单元)^[14~16]。Fab 和 Fab' 大家都很熟悉了。ScFv 是由重链可变区与轻链可变区连接起来的多肽链,分子量大约为 Fab 的一半,虽然可以从完整抗体分子得到这一片段,但多数用基因重组技术制备,表达出的 ScFv 分子量为 25~30 kDa,重链可变区的羧基端通过一条 12~20 残基的肽与轻链可变区氨基端相连接,其特异性和亲和力与亲本抗体相同。近年的研究表明,ScFv 的肿瘤穿透能力为完整抗体分子的一百多倍,F(ab')₂ 和 Fab 的穿透能力则居中。自显影的结果更显示:ScFv 均匀地分布于肿瘤,而完整抗体分子则浓聚于接近血管的部分。用抗肌凝蛋白单抗的 Fab、Fab' 与 ScFv 在心肌梗塞犬模型的实验结果表明^[17]: ScFv 的血中半减期仅为 0.5 小时,血清除速率为 Fab 和 Fab' 的 5 倍,ScFv 的 T/N T (正常)高达 40,为 Fab' 的 3 倍和 Fab 的 2 倍。

用无花果蛋白酶或菠萝蛋白酶酶解抗体的方法制备 Fab 或 Fab' 在我国已初步成功,并证明显像效果优于完整抗体。Fab 或 Fab'

也可以用基因重组技术制备,这样可得到性能稳定的、产量较大的片段,如果成功,其价格应低于酶解产品。

超变区肽段的应用,也有人在提倡,并有初步结果报道。抗体可变区的超变部分,是结合抗原的主要部位,所以这些部分的肽类似物似应比 ScFv 更适用于显像。不幸的是,其特异性虽与亲本抗体相同,但亲和力低很多。不过,目前已有更好的方法来克服这种困难。据报道,根据超变区结构,设计并制备了一种保持一定构象的二聚体肽,其与抗原的亲合力为原来线性顺序的 40 倍^[18]。由于现在已经能利用核磁共振谱(NMR)和分子模型来测定出与抗原结合的那些特异氨基酸残基,从而可以设计与合成出高亲和力的肽。

另一个应用超变区肽的例子是:依据抗血小板糖蛋白 II b/III a 单抗 PAC1.1 的超变区顺序,制备了含 16~31 个氨基酸的肽类似物,而这些肽类似物均含有 RYD 或 GRD 的三肽顺序——识别抗原的顺序。这些肽类似物清除快,在注射其标记物后 1~2 小时便可显像血栓^[19]。顺便应提到的是,这些肽类似物都含有金属硫蛋白的顺序(KCTCCA),用来螯合 ^{99m}Tc。分子生物学技术的广泛用途于此可见一斑。

像人走路一样,当向前行进时,往往要下意识地向后看看。有的科学家注意到,有两个结合位点(即双价)的抗体,其功能性亲和力(即亲合力,avidity)较高,这是局部浓度效应的结果,即当抗体的一个结合位点与表面抗原结合后,第二个抗体结合位点就成了近邻,因此,Haunschild 等^[20]用基因重组技术合成了两种双价的微型抗体(miniantibody),即将两个 ScFv 片段通过一个可伸屈的铰链区融合起来,一种称为 scdHLX,其连接肽是一个四螺旋束;另一种称为 scZIP,其连接肽是一对平行的卷曲螺旋。如图 2 所示。

动物实验结果表明,血中半减期,完整抗体为 84 分钟(α)和 21.1 小时(β), ScFv

为 8.1分钟 ($t_{1/2\alpha}$)和 2.8小时 ($t_{1/2\beta}$), scZIP为 11.9分钟 ($t_{1/2\alpha}$)和 4.1小时 ($t_{1/2\beta}$), scdHLX为 17.5分钟 ($t_{1/2\alpha}$)和 3.4小时 ($t_{1/2\beta}$)。ScFv

scZIP和 scdHLX 24小时内尿和粪中共排出 8%~8%,而完整抗体的 24小时排出为 70%,有关的临床资料目前还没有看到

图 2 ScFv scdHLX和 scZIP结构示意图

2.4 肽类放射性药物

在生物多样性进化过程中,氨基酸始终扮演着枢纽作用,它是包括分子信息、信息转导以及识别/转化单元等在内的一个巨大阵列中的“结构单元”。小至一个氨基酸大至一个多肽、蛋白质分子,在生物学信息网络中起着重要作用。如 GABA(γ -氨基丁酸)、甲状腺素、组胺(组氨酸脱羧基)、5羟色胺(5羟色氨酸脱羧基)等都是一个氨基酸或其衍生物,TRH(促甲状腺素释放激素)仅有三个氨基酸,但它们都起着信息传递和调节的作用。至于含几个、十几个或数十个氨基酸的生物活性肽就更多了,它们组成几类信息物质:激素、神经介质、神经调变剂(neuromodulator)、生长和生长抑制因子以及细胞因子等。它们都有相应的受体,在与受体结合后,通过信号转导系统,与某些细胞的生化过程或生理过程相联系。正像大家所知道的,分子识别的精细协调系统是一切生物过程的基本特色之一^[4]。配体/受体的相互作用则是一种重要的分子识别系统。通过肽类放射性药物的受体显像,将导致与生物化学、生理学过程相联系,而这正是分子核医学的重要目标。当然,也并不忽视类固醇或其它化合物作为放射性药物的重要性。

近年来,用于血栓显像的肽类试剂的研究已成为一个热门课题。如 P280,它是一种二十六肽,其中含有 RGD顺序(即 -Arg-Gly-Asp-),并利用 Caccm-GCaccm顺序整合^{99m}Tc。因为其结构中有 RGD顺序,便可识别血栓中活化血小板的II_bIII_a受体,进行显像^[21]。目前,阜外医院使用的 P357的结构与 P280基本相同,只是 P357又加了 N₂S₂螯合剂。看来,国外的报道有些是“真真假假”,最终还要靠自己摸索。

如前所述,抗血小板II_bIII_a受体单抗的可变区含有 RGD顺序,而且几种能与血小板受体结合并抑制血小板凝集的蛇毒肽也均含有 RGD顺序^[22]。这也充分说明了分子生物学中分子识别的奥妙。

纤连蛋白(fibronectin, FN)的氨基端有一个 29kDa的肽段,是与纤维蛋白结合的部位,即 FBD(fibrin-binding domain),标记物为很好的血栓显像剂,现已有基因重组的人 FBD,而且目前的研究正在缩小范围寻找 29kDa中最有效的肽段^[23]。

层粘连蛋白(laminin)衍生物的粘连肽用^{99m}Tc标记后也可用于血栓显像^[24]。

动脉粥样硬化斑块的核医学早期检测迄今仍为未能很好解决的课题之一。人工合成

的去脂脂蛋白 B 的一段十八肽的标记物可定位在动脉粥样病变且具有较清楚的轮廓^[25]。最近又有人使用抗人动脉粥样斑块(匀浆)单抗的 $F(ab')_2$ 片段(附加负电荷)在兔模型上进行放免显像研究,得到了初步结果^[26],并强调了负电荷的作用^[25]。这项工作在第一期中美核医学座谈会上曾有报告。可见,一种成功的研究要付出多少艰辛!又据较新的报道,巨噬细胞的清道夫受体(scavenger receptor)可能与动脉粥样斑块形成有关,其化学结构已被弄清楚^[2],估计在此基础上设计出有效的配体不会太远,但临床效果也许不会很快出现。

如前所述,抗体片段和超变区肽段都是肽类放射性药物中必不可少的组成部分。

肽类的放射性药物有许多优点。肽的分子较小,在血中清除快,穿透能力强,而且与受体的亲和力也较高,因此容易得到较清晰的显像;肽比较容易合成(除结构特殊者——如奥曲肽),小的可用固相法或肽合成仪,大的可用基因重组技术,而且随着受体结构知识的深化和先进的“结构辅助的药物设计”方法的日渐成熟,只取大分子肽的一段与结合有关的肽段进行合成会节省很多人力、物力;相反的情况,如一个较小的趋化肽,因其羧基端与受体结合无关,也可按标记的需要延长;抗体片段的基因重组,在我国一些重点分子生物学实验室帮助下,困难也不会太大。

2.5 分子识别是分子核医学的重要理论基础之一

前面已经说过分子识别在分子生物学中的重要性。对于分子核医学来说,分子识别则是新思路的重要源泉。抗原分子表面的抗原决定簇与抗体可变区的抗原结合部位的结合是分子识别的结果。配体与受体结合的本质也是分子识别,奥曲肽的例子已说明问题。反义探针与癌基因的识别则建立在核苷酸碱基互补上。粘连蛋白与纤维蛋白的结合是两个分子的特殊肽段的互相识别引起的。RGD顺

序与血小板的结合,去脂脂蛋白 B 的一个肽段与动脉粥样斑块的结合也是配体与受体的结合。蛋白质与核酸分子间的识别也有一些例子,例如类固醇激素进入胞浆与受体结合,在进入胞核后其受体还要与 DNA 的特异调节性结合部位结合,最后才起到调节转录的作用。应该提到的是,酶与底物的识别也是有分子基础的,今后的分子核医学能否在这方面有所发现,有所突破?

总之,过去在考虑新的放射性药物时,其根据是药物对某器官、某组织是否“亲”,分子核医学开发新的放射性药物的理论基础主要是分子识别,因为核医学诊断和治疗的本质,是考虑放射性药物(示踪剂)与靶物质(或器官、组织)的特异的稳定结合。在分子识别基础上开发的放射性药物,与“靶”的结合具有更好的特异性和稳定性,而且用于显像时不仅仅是“解剖学”的,也是功能性的。

3 两点想法

1. 科学的发展是不以人们意志为转移的。分子生物学与核医学的结合,也是核医学发展到一定阶段的必然。90年代初,正当人们对单抗的放免显像产生不同看法的时候,美国临床配体分析学会(Clinical Ligand Assay Society, CLAS)召开了第18届全国会议,讨论了重构抗体(reshaping antibodies)的问题,包括重组抗体片段的应用(临床诊断与治疗)、模拟抗体结合部位的分子与计算机技术、抗体 Fab 结构的计算机辅助模拟、抗半抗原抗体特异性的调变、抗体片段在 *E. Coli* 的表达……等等。并于 1992 年在美国的权威杂志《Journal of Clinical Immunoassay》第 15 卷第 1 期以专辑形式发表,专辑的题名是: Reshaping Antibodies: New Designs and Functions。近几年来,在临床核医学中使用片段的增多,不能说不是受到了这方面的影响。应该说,使用 Fab 或 Fab' 于双位点 IRMA 系列方法中,对于排除

非特异抗体的干扰也是有益的。紧接着也是 1992年,在美国能源部主持下,召开了“分子核医学座谈会”,酝酿了三年之后,终于发表了“分子核医学”专辑,虽然这在我国反映不一,但大势所趋,人们必须认真思考,去伪存真,结合我国情况积极推进。在这期间,1993年美国核医学杂志第 34卷第 14期发表了麻省一批著名专家写的题为“A Ticket to Ride Peptide Radiopharmaceutica-1s”的论文,强调肽类放射性药物是 21世纪以后放射性药物发展的支柱。这三部分文章掀起了分子核医学的波澜,并为分子核医学的发展提出了方向性课题。自然,随着科学水平的提高,还会有新的思路出现,因为任何事情都不能绝对化。

2 我们应该怎么办? 首先要学习,无论临床工作者还是基础工作者。老同志要补课,硕士研究生和博士研究生起码要以生物化学为必修课,因为一般生化课中讲到了分子生物学的基本知识。博士生要学习分子生物学中某分支的专门课题。

有条件的核医学部门,最好与本研究机构或本学校的分子生物学科合作,或者更进一步在他们的指导和帮助下自己由小到大建立分子核医学研究组。当然,一些高层次的药物设计工作恐怕要较长时间依赖其他专家。

由于水平的限制,本文只能“浅议”。不当之处,望广大同仁不吝赐教。

参 考 文 献

- 1 Reba RC. J Nucl Med, 1995; 36(6) Suppl 1S
- 2 Wagner HN. J Nucl Med, 1995; 36(6) Suppl 2S

- 3 张世荣,周延冲. 生命科学前沿的研究,中国科协学会工作部,1988: 160
- 4 Kossiakoff AA et al. Biochem Soc Trans, 1993; 21(3): 614
- 5 Kossiakoff AA et al. J Nucl Med, 1995; 36(6) Suppl 14S
- 6 Fraser CM. J Nucl Med, 1995; 36(6) suppl 17S
- 7 Katzenellenbogen JA. J Nucl Med, 1995; 36(6)suppl 8S
- 8 Ragan CL et al. Biochem Soc Trans, 1993; 21(3): 622
- 9 Dewanjee M K et al. J Nucl Med, 1994; 35(6): 1054
- 10 Urbain JLC et al. Eur J Nucl Med, 1995; 22(6): 499
- 11 Snyder DS et al. Blood, 1993; 82: 600
- 12 邹承鲁. 基础分子生物学(刘培南、吴国利主编),北京高等教育出版社,1983: 1
- 13 龚岳亭. 生物活性肽——结构与功能,上海科技出版社,1985: 57-65
- 14 Better M et al. J Clin Immunassay, 1992; 15(1): 17
- 15 Serafini AN. J Nucl Med, 1993; 34(4): 533
- 16 Fischman AS. J Nucl Med, 1993; 34(12): 2253
- 17 Nedeman MA. J Nucl Med, 1993; 34(2): 234
- 18 Williams MV et al. J Biol Chem, 1991; 215: 5182
- 19 Knight LC et al. J Nucl Med 1990; 31: 737p
- 20 Haunschild J et al. Antibody, Immunoconj, Radiopham, 1995; 8(2): 111
- 21 Lastoria S et al. J Nucl Med, 1994; 35(5): 97p
- 22 Lu X et al. Biochem J, 1994; 304(pt. 3): 929
- 23 Matsuka YU et al. J Biol Chem, 1994; 269(13): 9539
- 24 Wang G J et al. J Nucl Med, 1994; 35(5): 106p
- 25 Shih IL et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 1436
- 26 Narula J et al. Circulation, 1995; 92: 474
- 27 Krieger M. TIBS, 1992; 17: 141

(收稿日期: 1996-04-22)