

# 反义显像技术在肿瘤诊断中的应用

第四军医大学病理教研室(西安, 710032) 赵利军 刘彦仿综述  
中国医学科学院协和医院核医学科(北京, 100037) 周 前审

**摘要:**反义显像技术以放射性核素标记的人工合成的寡核苷酸为显像剂,通过体内核酸杂交而显示特异性癌基因过度表达的癌组织。肿瘤癌基因的特异性、放射性核素的选择以及标记化合物的稳定性,比放射性等诸参数均影响显像效果。成功的反义显像要求寡核苷酸探针具有容易大量合成、体内稳定、能与靶序列结合并且不发生非序列特异性结合等特点。反义显像以癌基因为基础,使肿瘤显像进入基因水平。

**关键词:**反义显像 肿瘤诊断 寡核苷酸探针 癌基因

肿瘤的发生是一个多因素参与的、多步骤的复杂过程。原癌基因的激活与抑癌基因的失活是肿瘤发生的分子生物学基础。现已知许多癌基因在肿瘤中有过度表达。癌基因研究的发展产生了反义技术(Antisense technology)及其在肿瘤基因诊断和基因治疗中的应用。

## 1 反义技术和反义显像技术

反义技术<sup>[1]</sup>是利用人工合成的一段寡核苷酸序列特异地结合到靶基因上,达到封闭或裂解(核酶, Ribozyme)靶基因使其不能表达,从而达到治疗肿瘤的目的。要达到完全地配对且能灭活靶序列,反义寡核苷酸的长度一般为15~25聚体<sup>[2]</sup>。靶序列既可以是胞浆mRNA,也可以是核内不均一RNA<sup>[1]</sup>。人工合成的反义寡核苷酸是小分子物质,可以经胃肠道以外的途径通过一定的手段导向靶基因<sup>[2]</sup>。反义技术的发展和应用于反义显像技术提供了技术保证,使之成为肿瘤显像的又一手段。

反义显像技术利用放射性核素标记的人工合成的反义寡核苷酸注入受试对象后,通过体内核酸杂交而显示特异癌基因过度表达的癌瘤组织。

与反义基因治疗技术一样,反义显像技

术应用的首要问题是确定哪种癌基因在所研究的肿瘤发生过程中占主导地位。因为尽管目前已经发现了一百多个癌基因,而仅有一部分癌基因参与了与癌基因有关的肿瘤的发生过程<sup>[3]</sup>。

反义显像技术中选用哪种放射性核素是应用该技术要考虑的另一个问题<sup>[4]</sup>。标记 $\beta$ 射线发射体的探针稳定性差,而标记 $\gamma$ 射线发射体的探针稳定性好。另外,放射性核素标记的反义探针的诸参数:稳定性、比放射性、离子电荷、氢键空间位置与键长、核苷酸顺序、连接剂中供体原子的类型、络合物的种类、立体异构体以及探针的立体结构等均可影响探针在细胞膜的转运、杂交和滞留时间,这些也是影响显像效果的因素。

反义显像技术应用的寡核苷酸在血中的半衰期为30~60分钟,很快从血液中清除并分布到各组织。初步研究证明,100毫克/公斤体重的磷酸硫酸酯型寡核苷酸在小鼠体内14天是无毒的。寡核苷酸在许多组织中相当稳定,人工合成的寡核苷酸在肝脏中更为稳定。大部分寡核苷酸经2~3天后从肾脏排泄,粪便中几乎没有<sup>[1]</sup>。

## 2 肿瘤反义显像的实验研究

c-myc基因编码的一个定位于核内的

DNA 结合蛋白转录因子,其亮氨酸拉链结构能结合一种称之为  $m_{ax}$  的蛋白,形成的复合物能够结合到许多基因的 5'末端顺序 (CACGTG)。这样,  $c-myc$  基因的开启和过度表达就导致一系列基因表达,从而导致细胞的恶性增殖。 $c-myc$  的过度表达常出现在 Burkitt 淋巴瘤及小细胞肺癌等恶性肿瘤中<sup>[1]</sup>。Dewanjee 等<sup>[5]</sup>用  $^{111}In$  标记的  $c-myc$  反义寡核苷酸研究了其在白血病细胞 P388 内的转运及杂交过程:60 分钟时,70%~80% 的反义核酸与  $c-myc$  mRNA 结合。在另一实验中<sup>[6]</sup>,他们把  $^{111}In$  通过络合物 DTPA 标记到  $c-myc$  反义寡核苷酸上,进行荷瘤小鼠显像,讨论了最佳的标记条件,结果表明在 0.5, 2, 4, 24 小时各时相,瘤体血和瘤体肌肉均有较高的比值,分别为  $3.55 \pm 0.23$ ,  $3.05 \pm 0.31$ ,  $2.86 \pm 0.22$ ,  $2.59 \pm 0.26$  和  $21.48 \pm 3.27$ ,  $20.69 \pm 2.68$ ,  $20.34 \pm 3.19$ ,  $18.34 \pm 2.57$ , 使肿瘤早期显像成为可能。

$c-erbB_2$  是另一种癌基因,它的表达产物是生长因子受体,具有酪氨酸激酶活性,能够增强转录和增殖信号<sup>[1]</sup>。 $c-erbB_2$  在乳腺癌中有过度表达,可以其 mRNA 作为反义显像的合适靶序列。Dewanjee 等<sup>[7]</sup>用人工合成 15 聚体的  $c-erbB_2$  反义寡核苷酸,通过络合物 DTPA 把  $^{111}In$  标记在这段反义寡核苷酸上制成探针,静脉注射给荷乳腺癌小鼠,同时用  $c-erbB_2$  正义 (Sense) 探针作对照,于 1, 4, 8, 24 小时行  $\gamma$  显像,结果  $^{111}In$  标记的反义寡核苷酸于 4 小时在瘤体内有最大摄取,且组织学分布,瘤体血液比值及瘤体肌肉比值均为反义显像高于正义对照,说明  $c-erbB_2$  反义寡核苷酸在乳腺癌显像中特异、灵敏、无创伤。

黑色素瘤中有高水平免疫球蛋白重链 mRNA 的表达,而在细胞 702/313 中没有表达。Urban 等<sup>[8]</sup>用免疫球蛋白重链的反义寡核苷酸研究了上述两种细胞对放射性核素标记的反义寡核苷酸的摄取、滞留比值,结果表

明高水平表达免疫球蛋白重链 mRNA 的黑素瘤细胞具有高选择性摄取反义寡核苷酸的能力,摄取、滞留比值显著高于无免疫球蛋白 mRNA 表达的细胞,而且摄取、滞留比正比于反义寡核苷酸的浓度及靶细胞的数目。

体内标记中性粒细胞在感染定位方面具有靶向作用。以  $^{111}In$ -DTPA 标记的组蛋白-4<sup>[9]</sup> 反义寡核苷酸在体内标记中性粒细胞有很高的比活性,而血小板和红细胞的标记却很低,这种探针在体内具有抗核酸酶 (DNase 和 RNase) 活性,因而其穿透效率高,有望成为体内感染定位的新手段。

### 3 反义显像技术对寡核苷酸的要求

反义显像技术用反义寡核苷酸作为显像剂,由于其分子量小、穿透性强、特异性高、没有免疫原性,因而具有显像结果特异、显像时间短、靶/非靶器官比值高,可以在基因水平对组织器官进行显像和功能评价等特点。但是,这种新的显像方法在实际应用中仍存在一些问 题。成功的反义显像必须满足以下条件<sup>[10]</sup>:

① 寡核苷酸探针必须容易大量合成。反义寡核苷酸的合成已经实现了自动化,放射性核素的标记则复杂一些,这与寡核苷酸、链结构、金属络合物以及放射性核素的标记部位有关。临床常规应用前的重要一步,是建立用来标记放射性核素的试剂盒。Lu 等<sup>[6, 11]</sup>已经做了这方面的尝试。

② 寡核苷酸探针在体内必须稳定。利用特异性反义探针进行反义显像的重要一点是在靶部位必须有足够浓度的反义核酸<sup>[12]</sup>。其一,寡核苷酸中的磷酸二酯键很容易被血浆和组织中的核酸酶所降解。通常采用在寡核苷酸中加入磷酸基、糖基或嘌呤、嘧啶修饰便可显著抵抗核酸酶的活性。但是,这种修饰的同时,也影响了探针的穿膜能力及与靶序列的亲合力。经过修饰的含有磷酸硫酯键衍生物的反义寡核苷酸或用多聚酰胺取代磷酸二

酯键的反义寡核苷酸都具有很高的稳定性<sup>[6]</sup>。其二,寡核苷酸的链结构必须在体内稳定,这可以用脂质体作载体,也可以用多聚赖氨酸形成稳定的络合物增加核酸的稳定性。其三,放射性核素标记必须牢固。

③ 反义探针必须能进入靶细胞中。含有磷酸二酯键或磷酸硫酯键的寡核苷酸是多阳离子复合物,不能被动地透过细胞膜。许多肿瘤细胞膜具有结合多阳离子寡核苷酸的作用,但是非特异性的。如果探针滞留时间长、浓度大,则反义探针进入这些细胞就多。采用受体介导的胞饮作用<sup>[11]</sup>,亦可大大提高导入反义寡核苷酸的效率。值得一提的是,以多聚赖氨酸修饰 5'末端寡核苷酸能增加反义探针进入胞浆的效率<sup>[10]</sup>。

④ 放射性核素标记的反义寡核苷酸必须被靶细胞截留。如果反义寡核苷酸进入细胞后再游离出细胞的速率与反义寡核苷酸和靶 mRNA 杂交的速率相近,那么反义显像的效果将受到影响。其问题的关键是细胞溶酶体具有分解代谢核酸复合物的作用,从而使反义显像的本底增加。解决的办法可以在反义寡核苷酸复合物中加入溶酶体酶的抑制剂<sup>[13]</sup>,保证反义核酸在细胞内与靶序列特异性地结合。

⑤ 反义寡核苷酸必须能与靶序列相结合。设计反义核酸的结合位点没有规律可循,靶细胞 mRNA 5'末端以及起始编码区(AuG)是反义核酸常见的结合部位。3'末端

非转录区也可作为靶结合区。

⑥ 反义寡核苷酸不能与其他大分子物质发生非序列性、特异性结合。设计的反义探针必须具有序列特异性。其中,保证反义显像的特异性必须选择合适的探针长度,过长会增加杂交的非特异性。

反义显像技术使核医学显像进入了基因水平,但由于该技术刚刚起步,在临床应用前尚有许多问题需要克服。随着基因分子生物学的发展和新的肿瘤特异性癌基因的发现,必将促进反义显像技术的成熟和完善。

#### 参 考 文 献

- 1 Carter G et al. Br J Cancer, 1993, 67: 869-876
- 2 Evans HJ. Br J Cancer, 1993, 68: 1051-1060
- 3 Katharine AW. Lab Invest, 1995, 72: 131-145
- 4 Dew anjee M K et al. J Nucl Med, 1994, 35: 42p
- 5 Dew anjee M K et al. J Nucl Med, 1993, 34: 224p
- 6 Dew anjee M K et al. J Nucl Med, 1994, 35: 1054-1063
- 7 Dew anjee M K et al. J Nucl Med, 1994, 35: 65p
- 8 Urbain JL et al. J Nucl Med, 1994, 35: 65p
- 9 Dew anjee M K et al. J Nucl Med, 1993, 34: 174
- 10 David PW et al. J Nucl Med, 1994, 35: 1064-1066
- 11 Lu XM et al. J Nucl Med, 1994, 35: 269-375
- 12 Ian TM. Int J Cancer, 1994, 56: 163-166
- 13 Michael SI et al. Gene Therapy, 1994, 1: 223-232

(收稿日期: 1995-07-26)