

。 综述与编译 。

放射性核素反义治疗在恶性肿瘤中的应用

华西医科大学第一附属医院核医学科 (成都, 610041) 郑建国综述 谭天秩审核

摘要: 放射性核素反义治疗是指将释放 α β 或俄歇电子的放射性核素采用一定的连接方法, 标记于癌基因或其 mRNA 的互补或反义寡核苷酸链上, 通过特定的载体定向运送到靶细胞或靶组织, 利用反义寡核苷酸与癌基因或其 mRNA 的特异性结合, 抑制癌基因的过度表达, 从而抑制癌细胞的增殖, 利用放射性核素的电离辐射生物效应, 破坏癌细胞, 达到反义治疗和内照射治疗的双重目的。本文对放射性核素反义治疗的几个技术问题及其临床应用作了前瞻性探讨。

关键词: 放射性核素反义治疗 肿瘤 受体 脂质体 反义寡核苷酸

恶性肿瘤的治疗, 通常采用外科手术、放疗、化疗等方法, 然而其治疗效果却有待进一步提高。并且, 癌症是当今人类主要死亡原因之一, 死亡数占总死亡数的四分之一。到了 21 世纪, 随着人口老化, 老年人口增多, 环境污染的日趋恶化, 死亡者中的三分之一将是因为癌症。面对日益严峻的形势, 对恶性肿瘤的治疗应予以特别重视。

1 提出放射性核素反义治疗的依据

反义寡核苷酸通常有两种用途: 与细胞核内的 DNA 结合形成三螺旋体结构, 从而阻断 DNA 转录^[1-3]; 更常用的是与靶 mRNA 结合, 抑制蛋白质的合成^[4,5]。反义技术作为一种特异性的方法阻断基因的表达, 理论上能抑制任何已知序列的基因, 因而反义寡核苷酸在治疗疾病方面的价值是可想而知的。

由于反义基因技术的内在缺陷, 目前所采用的基因工程技术还不可能使需要的基因百分之百地导入每个癌细胞内, 其转染效率通常很低。这样, 难以用正常基因去置换癌细胞中所有的异常基因, 难以用反义基因有效抑制癌基因的转录, mRNA 的翻译, 难以抑制癌细胞的过度增殖。并且, 在肿瘤细胞中有多个癌基因, 通过反义技术抑制肿瘤中一个癌基因的表达, 却不能对肿瘤产生巨大的影

响^[6]。因而, 反义治疗在恶性肿瘤中的应用受到一定的限制。

如果在相应的反义寡核苷酸链上, 用发射 α β 或俄歇电子的放射性核素进行标记, 定向到达癌组织, 既抑制癌基因的过度表达, 进而抑制癌细胞的增殖, 又利用放射性核素的电离辐射生物效应, 破坏癌细胞, 从而达到反义治疗和内照射治疗的双重目的。

2 放射性核素反义治疗的技术问题

但是, 如何将放射性核素标记的反义寡核苷酸定向运送到靶细胞或靶组织, 而不被细胞外的酶降解? 如何提高它在细胞内的稳定性? 如何增强肿瘤细胞的摄取? 却有待于深入的研究和探讨。

2.1 用脂质体作载体

脂质体易于制备, 来源充足, 无毒, 可以通过改变它的大小、电荷、脂质组成来控制它在体内的分布和药代动力学, 是公认的治疗药物的理想载体。它可提高分裂细胞和非分裂细胞对寡核苷酸的摄取, 同时在细胞外保护寡核苷酸不被酶所降解, 并已确认脂质体运送寡核苷酸到靶细胞, 可极大地降低寡核苷酸的用量, 即使在靶细胞的摄取低至百分之三, 而其作用的效率与未用脂质体相比却可以成倍、成十倍, 甚至达到上百倍的提高^[7]。因此, 脂质体可能成为放射性核素反义

治疗恶性肿瘤的重要载体

脂质体分为两种: 阴离子脂质体和阳离子脂质体, 它们都能增强细胞对寡核苷酸的摄取, 但是阴离子脂质体优于阳离子脂质体。因而, 本文以阴离子脂质体为例说明它的作用机理。

如图 1所示, 放射性核素反义序列与阴离子脂质体融合, 进入细胞, 由于细胞内 pH 值较细胞外低, 脂质体破碎, 释放出放射性核素反义序列, 然后反义序列与靶 mRNA 结合, 抑制蛋白质的产生; 同时, 放射性核素释放的射线还可以破坏肿瘤细胞。

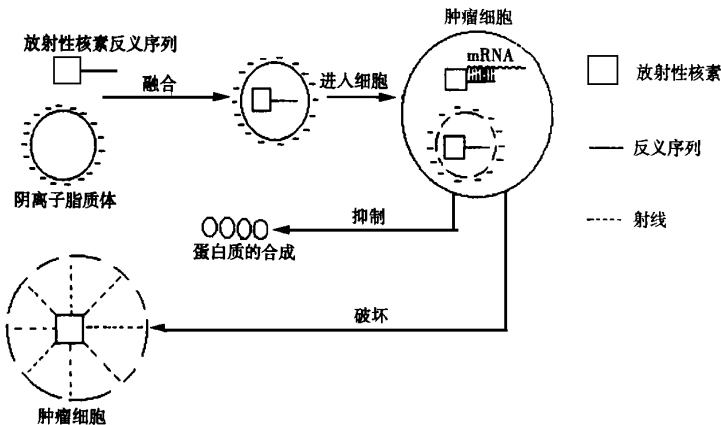


图 1 阴离子脂质体作载体

2.2 受体介导的放射性核素反义寡核苷酸的摄取

受体与配体的相互作用具有高特异性、高亲和性、饱和性及可逆性等特性, 用适当的放射性核素标记癌基因或其 mRNA 的反义序列, 再与配体或其类似物结合, 可导向到含有高密度受体的靶组织或靶器官。这样, 会大

大提高导入反义序列的转染效率, 增强反义抑制作用; 同时, 到达肿瘤组织中的放射性核素的量也随之增加, 可望达到较高的浓度, 提高了内照射治疗的疗效, 减少了对正常组织的损害, 充分发挥了内照射治疗和反义治疗的优势 (见图 2)。

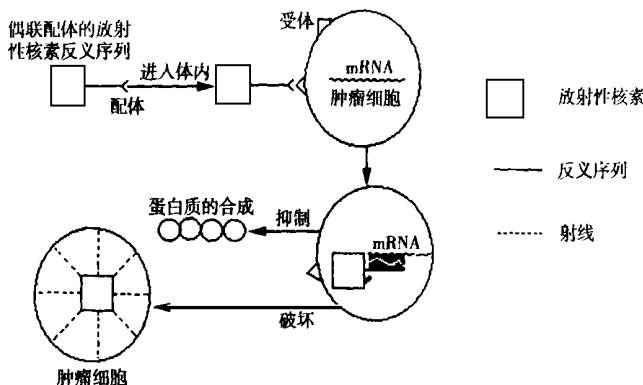


图 2 受体介导的放射性核素反义序列的摄取

例如, c-myc 原癌基因, 在细胞增殖、恶性转化和细胞凋亡中起着重要作用, 是最易

扩增的癌基因, c-myc 在人小细胞肺癌中其扩增倍数为 5 到 30 倍, 是反义治疗的潜在靶

基因,同时在小细胞肺癌中含有高密度的生长抑素受体,可将 c-myc或其 mRNA的反义序列标记上适当的治疗用放射性核素,然后与生长抑素或其类似物 octreoscan 相偶联,注入体内后,由于受体与配体的特异性结合而定向到达小细胞肺癌细胞,达到反义抑制与内照射治疗的双重目的; neu基因,是乳腺癌中一个瞩目的癌基因,它编码一个与上皮生长因子受体相关的生长因子受体,在人类乳腺癌中有明显的扩增和超表达,而乳腺癌中含有高密度的雌激素受体,具有放射性核素反义治疗的基础。

另外,在几乎所有神经内分泌肿瘤、部分乳腺癌中,均含有高密度的生长抑素受体;在胃肠道腺癌等肿瘤中,含有血管活性肠肽受体;在胃癌和粘液性卵巢癌中,促绒毛膜性腺激素受体密度较高。上述所有的肿瘤,都含有某种高密度的受体,只要在肿瘤中选择适当的靶基因,合成其放射性核素反义序列,偶联上配体或其类似物,即可以作为“生物导弹”,定向到肿瘤组织中,起到高效的治疗作用。

2.3 通过其它方法改进寡核苷酸的稳定性,提高靶组织对反义寡核苷酸的摄取

单链寡核苷酸易被细胞内的核酸酶消化,因而阻碍了反义技术的发展及在体内的应用,但可以通过改变寡核苷酸的结构来提高它在体内的稳定性,而不影响互补杂交。寡核苷酸中磷酸部分的改变相对来说容易进行,并且也是核酸酶的攻击位点^[8],因而寡核苷酸链上磷酸二酯的一个氧原子被硫原子取代,形成硫代磷酸寡核苷酸,它保留了原单链寡核苷酸的高水溶性和电荷性质,又能对抗核酸酶的降解,同时可大大提高靶细胞对寡核苷酸的摄取。有文献报道,不同的细胞表面蛋白质(受体)结合不同的寡核苷酸,而硫代磷酸寡核苷酸其结合量远远大于未改构的寡核苷酸^[6]。此外,还可将癌基因或其 mRNA的反义序列与多聚-L-赖氨酸结合,同样能提高靶细胞对寡核苷酸的摄取。因而,用放射性

核素标记改构的寡核苷酸或结合有多聚-L-赖氨酸的反义序列,会增加反义序列的摄取,同时放射性核素在靶组织中的浓度也相应升高,从而增强疗效。由此可见,只要选择适当的靶基因,反义技术与放疗相结合可能是肿瘤治疗的一个新方向。

3 放射性核素反义治疗的临床应用前景

肿瘤治疗研究的目的是寻找一种选择性杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无害的高效无毒副作用的治疗手段。这种目的的实现需要搞清楚正常细胞和肿瘤细胞基因组间的差异,对肿瘤发生和发展的分子病理有全面而深入的了解,确定肿瘤发生、发展过程中每一步的基因改变,找出放射性核素反义治疗的适宜靶基因。在绝大多数情况下,肿瘤的发生至少需要抑癌基因失活、原癌基因活化,通常还涉及到基因的突变、癌基因的扩增或过度表达、等位基因缺失和染色体结构重排等^[9]。反义技术正是在寻找靶基因的研究过程中发展起来的,在短短几年里,在细胞水平、动物水平的实验中均取得了令人振奋的结果,在临床应用方面也已做了不少有益的尝试^[10-11],为放射性核素反义治疗的应用提供了理论和实验依据。

但是,在放射性核素反义治疗的实际应用前还需要进行大量的研究^[12],如①放射性核素反义寡核苷酸的制备过程应简单、易行,尽量降低成本,便于大规模生产;②进一步探讨放射性核素反义寡核苷酸的摄取机理,增强靶细胞的摄取,开发有效的载体,使其能够完整地进入靶部位;③确保靶组织或靶器官中放射性核素反义寡核苷酸的有效治疗浓度,并能维持一定的时间;④尽量减少其用量,而能达到相同的治疗效果;⑤尚需广泛开展细胞水平、动物模型的研究,考察体内是否有急、慢性毒性作用,长期应用是否有致畸、致癌、致突变作用,对子代的发育、遗传有无影响;⑥尚需考察放射性核素反义治疗是否

会破坏人类基因库的平衡,是否符合伦理道德。

随着分子生物学技术在各学科的渗透,随着分子核医学的蓬勃发展,在恶性肿瘤的治疗中,反义治疗与化疗、放疗、免疫治疗的结合是医学科学发展的必然趋势。反义序列与靶目标作用特异抑制基因的表达,是治疗恶性肿瘤的一种理想方法,而放射性核素反义治疗兼有反义治疗与内照射治疗的双重优点,治疗肿瘤更加理想,它可能为攻克恶性肿瘤带来新的希望

参 考 文 献

1 Svinarchuk F et al. Nucleic Acid Res, 1996;

24(2): 295- 302

2 Benjamin DL et al. J Surg Res, 1995; 59: 485

3 Laird AD et al. Cancer Res, 1994; 54: 4224

4 Bonn D. Lancet, 1996; 347: 820

5 Wagner RW. Nature, 1994; 372 (24): 333

6 O'Brien SG et al. Eur J Cancer, 1994; 30 A: 1160- 1164

7 David DF et al. Leuk Res, 1996; 20: 925- 930

8 Hnatowich DJ et al. J Pharmacol Exp Ther, 1996; 276: 326

9 Whartenby KA et al. Lab Invest, 1995; 72: 131

10 Nyce JW et al. Nature, 1997; 385: 721- 725

11 Resnicoff M et al. Cancer Res, 1994; 54: 4848

12 Sein CA et al. Science, 1993; 261: 1004- 1012

(收稿日期: 1998-03-30)

肿瘤反义显像技术中的若干问题

上海第二医科大学附属瑞金医院核医学科(上海, 200025) 杨卫东综述 朱承谟审校

摘 要:反义显像是用放射性核素标记人工合成的反义寡核苷酸,经体内核酸杂交而显示特异基因表达或过度表达的组织。反义显像具有不引起免疫反应、探针分子小、易进入瘤组织等优点。反义显像要求标记的反义核酸易于透过细胞膜,在细胞内稳定、不易分解,并能特异性聚集于靶组织。因此,须对反义寡核苷酸进行化学修饰,增强其细胞通透性和膜内稳定性;利用受体或脂质体介导使反义寡核苷酸定向导入靶细胞;选择合适的放射性核素采用标记简单、标记率高、非特异性结合低且不影响反义寡核苷酸生物活性的标记方法,使其合乎显像要求。成功的反义显像对肿瘤的诊断具有重要意义。

关键词:反义显像 肿瘤 放射性核素 反义寡核苷酸

分子生物学的发展为肿瘤的诊断和治疗不断提供新的途径和方法,反义技术就是根据碱基互补原理,利用与目标靶 DNA 或 RNA 特定互补的短链核苷酸(反义核酸)封闭基因表达的方法。反义技术与核医学的有机结合形成反义显像,即用放射性核素标记与肿瘤过度表达的癌基因 mRNA 相互补的人工合成的寡核苷酸,经体内核酸杂交而进行肿瘤显像。反义显像技术使得对疾病的诊断进入基因水平而具有一定的研究和应用价值。成功的反义显像必须使细胞内反义寡核苷酸达到足够高的浓度,因此靶细胞必须有大量特异的 mRNA,能优先摄取并能特异性

滞留反义寡核苷酸^[1],并要求反义寡核苷酸易于合成、体内稳定、能被靶细胞特异性摄取、易于被核素标记且标记率高。因此,反义显像须考虑以下几个问题。

1 反义寡核苷酸的化学修饰

反义核酸的制备须符合以下标准:①制备方法简便、经济;②具有一定的稳定性;③具有较强的细胞通透性;④能在靶细胞内保持一定浓度;⑤能与靶细胞内的特定位点发生作用;⑥不发生非序列特异性反应。但是,由于寡核苷酸是带负电荷分子,类似多聚阴离子,其细胞摄取很低,未修饰寡核苷酸的磷