

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

酸二酯键对血中和细胞内核酸酶特别敏感,易于被降解^[2],为此人们不断研究对其进行修饰以提高其理化和生物学性质。

针对核酸的结构,修饰工作可从其骨架、核糖和碱基入手,也可在核酸片段的末端进行偶联修饰。由于核酸酶的作用位点主要是核苷酸中的磷酸二酯键,因此主要对核苷酸的骨架进行修饰。对磷酸二酯键的修饰包括①对 P-O 键的修饰;② C 取代 P;③ S 取代 P;④ 将含 N 衍生物引入核苷酸骨架。其中,以甲基化和硫代化的研究比较成熟。甲基化即用甲基 (CH₃-P) 取代羟基,硫代化即用 P-S 键代替 P-O 键。这种硫代化修饰易于自动合成,且能抗 DNase 的分解作用,因而在体内稳定。另外,此类物质属水溶性,与靶 mRNA 结合形成的复合物能被 RNase-H 所水解,因而在反义治疗中广为应用并已发展至临床试验。但硫代化修饰后会引入一个手性磷原子,产生立体异构体而表现出不同的稳定性和活性,硫代化修饰的副作用还在于它会引起非特异性的抑制作用,对此, Brown 等^[3]认为,细胞内非特异性的蛋白结合由硫代化程度而定,对整个核苷酸骨架进行硫代化后将增加非特异蛋白的结合和非序列特异性的抑制作用,由此建议仅对核苷酸的末端进行硫代化。此外,寡核苷酸主要依靠胞饮作用进入细胞,常态下进入细胞速度缓慢,研究表明寡核苷酸末端连上某些特殊功能基因如多聚 L 赖氨酸可增强其进入细胞的能力,多聚赖氨酸为多价阳离子,与细胞膜表面阴离子相结合而促进与其相连的寡核苷酸进入细胞。在寡核苷酸末端连上疏水性物质如胆固醇有利于细胞吸收。由上可知,在制备反义核酸时,须选择适当的方法进行修饰以提高其理化性质。

2 受体及免疫脂质体介导反义寡核苷酸

反义治疗时,为了使细胞内反义核酸达到一定浓度而用接近细胞毒性的大剂量反义

核酸进行治疗。但在反义显像中,由于要考虑辐射剂量及靶与非靶比值而不宜按上述原则进行。为此,利用受体及免疫脂质体介导的反义寡核苷酸在很大程度上能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。

(1)受体介导的反义寡核苷酸:利用配体与相应细胞表面受体结合的高特异性、高选择性及高亲和等特性,将反义寡核苷酸与配体相连接,形成相应的介导复合物。目前,反义治疗中常用的配体有去唾液酸糖蛋白或半乳糖化蛋白与肝细胞的糖蛋白受体结合^[4-5];转铁蛋白与转铁蛋白受体结合^[6];甘露糖化的多聚赖氨酸与巨细胞上的甘露糖受体结合。Lu 等^[4]比较了反义寡核苷酸 asialo-糖蛋白介导的反义寡核苷酸 sialo-糖蛋白介导的反义寡核苷酸在体内的分布,结果:asialo-糖蛋白介导的反义寡核苷酸较反义寡核苷酸及 sialo-糖蛋白介导的反义寡核苷酸能快速并大量聚集于肝细胞。经中介多价阳离子多聚赖氨酸,将 asialo-糖蛋白与³²P 标记的反义寡核苷酸连接,介导复合物在注入后 5 分钟约 40% 浓聚于肝脏并保持相对稳定,同时实验表明,大多数介导复合物未被溶酶体溶解而迅速进入肝细胞核内,因而 asialo-糖蛋白是将反义寡核苷酸导向肝细胞的有效载体。

(2)免疫脂质体介导反义寡核苷酸:脂质体作为药物及基因的运载工具,能将药物及基因有效运至靶组织。已发展多种脂质体作为载体,如将药物与脂质体直接共价结合^[7];阳离子脂质体^[8];隐型脂质体及免疫脂质体等。免疫脂质体由脂质体连接特异性抗体制成,集脂质体特性和抗体特性于一体。免疫脂质体介导的反义寡核苷酸具有双重特性:脂质体表面的抗体能选择性地与靶细胞表面的抗原特异性结合,使细胞摄取脂质体;在细胞内寡核苷酸通过碱基互补选择性地与相应互补序列的 mRNA 结合。脂质体、免疫脂质

体作为基因的载体在基因治疗研究中受到重视,但这一方法还未用于反义显像的研究,有必要将其引入反义显像并进行必要的研究。

3 反义寡核苷酸的标记

选择合适的放射性核素及适宜的标记方法对人工合成的寡核苷酸进行标记是反义显像的关键问题之一。由于 ^{99m}Tc 物理性能好,适于显像,容易获得,因而试用 ^{99m}Tc 对人工合成寡核苷酸标记成为人们研究的重点,其最初所用方法与 ^{111}In 标记寡核苷酸的方法相同,也是以 DTPA 作螯合剂,但同样存在 ^{99m}Tc 对抗体的标记物极不稳定,而用 SHNH (烟肼酰胺)代替 DTPA 在 ^{99m}Tc 对抗体的标记中却能形成稳定的复合物,因此 Hnatowich 等^[9]用 SHNH 代替 DTPA 作为螯合剂对寡核苷酸进行了 ^{99m}Tc 标记的研究,其方法是人工合成的寡核苷酸在一定条件下与 SHNH 偶联,然后进行 ^{99m}Tc 标记,其标记方法与标记抗体的方法相同。当用 $100\mu\text{g}$ 或更多的 SHNH 寡核苷酸浓度为 $250\mu\text{g/ml}$ 时,用 $37\text{MBq}(1\text{mCi})$ 的 ^{99m}Tc 进行标记,标记率为 $30\% \sim 60\%$,标记物比较稳定, ^{99m}Tc 的解离量很少,只有 4% ,但 ^{99m}Tc -SHNH 寡核苷酸较 ^{111}In -DTPA 寡核苷酸的血清蛋白结合率高,考虑到这种情况可能是 SHNH 引起,曾用 MAG_3 代替 SHNH 作螯合剂,但由于 MAG_3 中存在苯甲酰基而影响标记的进行,去除苯甲酰基进行标记则需加热至 100°C 并持续 10 分钟,而蛋白质与多肽不能耐受高温,故进行偶联前标记,即先对螯合剂标记,然后偶联,其应用受到一定的限制。Winnard 等^[10]用二步法合成 MAG_3 (其中 S-acetyl 代替苯甲酰基,主要因为 acetyl 更易去除,使 ^{99m}Tc 对寡核苷酸的标记可在中性 pH 及室温条件下进行),即首先合成 S-acetyl- MAG_3 ,并加 NHS 形成 S-acetyl-NHS- MAG_3 ,然后寡核苷酸与 NHS- MAG_3 进行偶联,标记结果,在不增加温度(室温)及标记时间(15 分

钟)时,其标记率为 84% ,比活度可达 $2.6\text{MBq}(70\mu\text{Ci}/\mu\text{g})$ 。本法优点:①合成 MAG_3 方法简单;②能产生较高的标记率及比活度;③与 ^{111}In 标记寡核苷酸 ^{99m}Tc -SHNH 寡核苷酸相比, ^{99m}Tc - MAG_3 寡核苷酸与血清蛋白无非特异性结合。S-acetyl-NHS- MAG_3 将是一种很有希望的标记寡核苷酸的双功能螯合剂。用同样方法, Mardirossian 等^[11]对肽类核苷酸(PNA)进行 ^{99m}Tc 标记,其标记率为 $30\% \sim 70\%$,比活度则高达 $3.7\text{MBq}/\mu\text{g}(100\mu\text{Ci}/\mu\text{g})$ 。对寡核苷酸的各种标记方法均有一定的缺点,还须对其进行不断的研究,但仍以 ^{99m}Tc 的标记为主,希望能获得一种标记简单、标记率高且标记复合物在体内非特异性结合低的标记方法。

4 其他

反义显像中,还要考虑合成反义寡核苷酸的长度和反义靶位的选择。反义核酸与细胞内正义核酸相互作用进行杂交,这种相互作用取决于氢键结合及所形成双螺旋碱基堆叠状况,至少 15 个核苷酸才能达到这种相互作用所要求的最低水平的亲和力,另一方面,由于可能有特异机制控制细胞摄取,因此限制核苷酸的长度最多为 20~25 个^[12],常用含 18 个核苷酸的寡核苷酸。对于反义靶位的选择,许多研究者选择 mRNA 的翻译起始部位作为反义核酸结合的靶点,因为此区重要且易于形成互补双链。

5 展望

综上所述,反义显像有其众多的优点:①核苷酸不引起免疫反应;②肿瘤摄取高;③探针分子小,易进入瘤组织;④小肿瘤可早期摄取,早期诊断;⑤标记方法简单。Dewanjee 等^[13]用 ^{111}In 标记反义寡核苷酸的动物实验研究表明:注入后早期即有较高的靶/非靶比值,在注入后半小时,瘤血和瘤肌肉比值分

别为 3.55 ± 0.23 和 21.48 ± 3.27 , 2 小时后分别为 3.05 ± 0.31 和 20.69 ± 2.68 他们成功地进行了体外显像,使人们对这一方法充满希望,但这一方法刚刚开始,还有许多问题有待解决,有必要进行更深入的研究。

成功的反义显像将为肿瘤的诊断提供帮助,也为肿瘤的治疗带来新的希望。许多研究表明,反义治疗能有效地抑制肿瘤细胞癌基因的表达^[14],抑制肿瘤细胞的增殖,但这种作用只对活动期细胞内有较大量 mRNA 的细胞有抑制作用,而对静止期的肿瘤细胞无效。同时,由于肿瘤细胞不断翻译 mRNA 以及反义核酸在体内的不断降解,因此需持续给药。而一旦反义显像获得成功,用治疗核素代替显像核素可对肿瘤进行治疗,由于治疗核素发射的 β 射线的射程达好几个癌细胞直径,利用其生物辐射效应可直接杀死细胞,因而对肿瘤的治疗可能更具疗效。正如 Urbain^[1]认为,表达特异性癌基因的肿瘤细胞将成为放射性核素标记反义寡核苷酸的适宜靶细胞,并预测在核医学领域将增添新的具有独特专一性的放射性药物,为肿瘤及其它疾病提供新的诊断和治疗途径,也将为核医学增添新的篇章。

参 考 文 献

- 1 Urbain JLC et al. Eur J Nucl Med, 1995; 22: 499-504
- 2 Peter TC et al. Semin Oncol, 1997; 24: 187-202
- 3 Brown DA et al. J Biol Chem, 1994; 269: 2680-2685
- 4 Lu xiao-ming et al. J Nucl Med, 1994; 35: 269-275
- 5 Madon J et al. Hepatology, 1996; 24: 474-481
- 6 Citro G et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92: 3318-3322
- 7 Krieg AM et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 1048-1052
- 8 Lewis JG et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 3176-3181
- 9 Hnatowich DJ et al. J Nucl Med, 1995; 36: 2306-2314
- 10 Winnard P et al. Nucl Med Biol, 1997; 24: 425-432
- 11 Mardrossian G et al. J Nucl Med, 1997; 38: 907-913
- 12 Wahlestedt C et al. Trend Pharmacol Sci, 1994; 15: 42-46
- 13 Deranjee MK et al. J Nucl Med, 1994; 35: 1054-1063
- 14 Skorski T et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 4504-4508

(收稿日期: 1998-09-15)

读者·作者·编者

本刊 1999年度主要报道内容预告

第一期	核医学: PET及肿瘤 放射医学: 辐射生物剂量	第四期	核医学: 临床核医学(1) 放射医学: 流行病学调查与危害评价
第二期	核医学: 分子核医学 放射医学: 辐射损伤与临床	第五期	核医学: 显像剂与药物研究 放射医学: 辐射分子生物学
第三期: 综合报道		第六期	核医学: 临床核医学(2) 放射医学: 药物与毒理