of human Na+/I- symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery [J]. Gene Ther, 2000, 7(9): 740-749.

[11] Boyd M, Cunningham SH, Brown MM, et al. Noradrenaline transporter gene transfer for radiation cell kill by ^{131}I meta-iodobenzylguanidine [J]. Gene Ther, 1999, 6(6): 1147-1152.

Inducement of radionuclides targeting therapy by gene transfection

LUO Quan-yong
(*Department of Nuclear Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai* 200233, *China*)

Abstract This review presents an overview of gene transfection methods to genetically induce tumor cells to express enhanced levels of cell surface antigens and receptors to intake radiolabeled antibody and peptide targeting and thus increase their therapeutic effect in radiotherapy. The current research include inducement of radioimmunotherapy through CEA gene transfection, inducement of iodine-131 therapy by sodiumiodide symporter gene transfection and inducement of MIBG therapy by noradrenaline transporter gene transfection. These studies raise the prospect that gene-therapy techniques could be used to enable the treatment of a wide range of tumors with radiopharmaceuticals of established clinical acceptability.

Key words gene transfection; radiotherapy; sodium/iodide symporter; noradrenaline transporter

文章编号: **1001-098X(2001)02-0062-04**

反义显像技术的研究进展

夏劲松
(华中科技大学同济医学院附属同济医院核医学科,湖北 武汉 430030)

摘 要: 反义显像是利用放射性核素标记的反义寡核苷酸,通过体内核酸杂交而显示目的基因表达的一种显像方法,具有设计简便、合成简易、安全性高、免疫原性低等特点。成功的反义显像要求反义寡核苷酸易被细胞摄取、耐核酸酶、杂交稳定、标记简单。脂质体、受体等介导的反义RNA转移,反义寡核苷酸的化学修饰以及标记方法的改进将大大加快反义显像的临床应用。

关键词: 反义显像; 受体; 脂质体; 反义寡核苷酸
中图分类号: R817.4 文献标识码: A

反义(antisense)的概念于1967年被提出,用放射性核素标记反义寡核苷酸(antisense oligodeoxyribonucleotide, AS-ODN)经体内核酸杂交而进行显像,即为反义显像。作为一种基因监测系统,反义显像在肿瘤、动脉粥样硬化、艾滋病、遗传性疾病等的研究中具有广阔的应用前景,有望作为一种新的工具,广泛应用于体内生物机制的无创性研究。

收稿日期: 2000-06-29
作者简介: 夏劲松(1973-),男,湖北通山人,华中科技大学同济医学院博士研究生。主要研究方向: 特异性靶向药物的研制和肿瘤核医学。
审 校 者: 华中科技大学同济医学院附属同济医院核医学科 吴华

1 反义显像的优点

1.1 反义RNA设计简便,合成容易

在设计AS-ODN时,只需靶基因的很少一部分关键顺序,对读码框也无特殊要求,只要其顺序与靶mRNA分子的一部分或全部顺序互补即可[1]。自1984年Izant JG和Weintraub H等首次利用重组DNA技术设计和制备出反义单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-tK) mRNA的表达载体后,反义RNA的获得都可以通过体外转录得到。这样获得的反义RNA纯度高,成本低,制成药剂容易。

1.2 安全性高

反义 RNA只作用于特异的 mRNA分子,它不引入外源 DNA,不存在外源 DNA整合到靶细胞 DNA上的问题[2]。另一方面,反义 RNA是一种 RNA分子,无论怎样修饰,它还是无法抵抗细胞内 RNA酶的水解作用,最终都将被降解,即不留“残渣”,即使出现了一些未预料到的副作用,也可以通过停止用药来终止副作用。

1.3 反义 RNA及其配体复合物免疫原性低

反义 RNA分子一般很小(< 1kb),其自身没有抗体,临床研究发现,即使同一核酸复合物的掺入剂量很大,也从未检测到多肽或核酸的抗体。

2 反义显像技术需要解决的问题

反义显像所用寡核苷酸应符合以下要求:① 易被细胞膜摄取;② 较好的耐核酸酶的能力;③ 其杂交具有特异性和稳定性;④ 标记简单、标记率高[3]。根据以上要求,反义显像中需解决以下问题。

2.1 稳定性问题

作为显像用途的 AS-ODN,除了序列特异性外,动物体内的稳定性也是其基本的要求。天然型 AS-ODN在体内及体外(含血浆的培养基中)对核酸外切酶和核酸内切酶活性的降解极为敏感,一旦 AS-ODN被注射到动物体内,机体中的 RNA酶就会使反义 RNA的有效量迅速减少,同时剩下的没有被降解的反义 RNA也无法集中到病灶处,而是分散到动物全身[4]。

2.2 安全性问题

寡核苷酸具有一定的剂量毒性反应。尽管现在使用各种经过化学修饰的 AS-ODN,但大多仍必须使用较高剂量以获得显著效果。为了减少 AS-ODN的用量,有人尝试构建一些能转录特异反义 RNA的重组质粒,将这些质粒转入细胞中,让其在细胞中转录反义 RNA而发挥作用。但是,当进行人体实验时,这种方法无法使用,因为转移外源 DNA(反义 RNA表达质粒)进行细胞后,一方面转录出来的反义 RNA的量不易控制,另一方面,外源 DNA进入细胞后,有可能整合到细胞染色体上,这种整合位置是人们无法预见的,因此,安全问题很难保障。

2.3 专一性转移问题

即如何专一性地被病变的细胞摄取,而不影响其他正常细胞。目前有许多载体系统可用于增加病变细胞对 AS-ODN的靶向摄取和向靶 mRNA结合位点的释放,如将 AS-ODN结合到胆固醇、L多聚赖氨酸、转铁蛋白多聚赖氨酸以及阳离子或抗体靶向性脂质体中[5,6]。

3 反义 RNA技术的进展

反义显像中存在的问题,促使人们对反义显像技术进行改进。

3.1 脂质体作为载体的反义寡核苷酸转移

脂质体是由脂质双分子层组成的环形封闭囊泡,低毒、无免疫原性,可携载各种 AS-ODN,保护其不被核酸酶降解。目前制备脂质体的方法有多种,包裹反义核苷酸的脂质体的方法主要有反相蒸发(revers-phase evaporation, REV)和去污剂控制透析制备的负电荷脂质体,以及阳离子脂质体{N-[1-(2, 3-dioleyloxy)-propy-N, N, NK-trimethy]-ammonium chloride}(DOTMA)和二油酸磷脂酸乙醇脂(DOPE)超声制作的脂质体即 Lipofectin。

根据需要,可制备出不同大小(0.03~50μm)、不同电荷、不同流动性以及对 pH和热敏感的脂质体。亦可将归巢装置(homing devices)如抗体、糖脂等联于脂质体,以提高脂质体的靶向性[7]。已证实,阴离子和阳离于脂质体都可提高 AS-ODN与细胞的结合能力,增强其生物活性。研究表明,在脂质体介导下,血液循环中的 AS-ODN至少在 24h内保持完整,而单纯 AS-ODN 5 min后将不能被检测到。由于 AS-ODN与脂质体结合后主要集中在细胞核,而单纯 AS-ODN则主要位于细胞质中,因而脂质体改变了其在细胞内的分布,使 AS-ODN在细胞核内的作用时间延长。但在有血清或血浆存在时,脂质体的作用将受到抑制。同时,脂质体自身亦有一定的毒性,当脂质体的浓度高于 20μmol/L时,即具有细胞毒性。

3.2 受体介导的反义 RNA转移技术

受体介导的细胞吞噬作用是 70年代发现的细胞转移特异性外源物质进入胞内的一种方式。利用受体介导来特异性转移 AS-ODN对反义显像有帮助。

受体介导的吞噬作用有两个明显特点:① 具有细胞、组织或器官专一性;② 配体进入细胞的转移效率很高[8,9]。其基本技术为:首先,脱去血清类粘蛋白上的唾液酸,再通过中间连接物将脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)与多聚赖氨酸(PL)共价结合,得到 ASOR-PL复合物,即运载核酸的工具。在 pH中性的环境中,多聚赖氨酸带正电荷,而反义 RNA带负电荷,因此,将二者混合,借助于一定的处理就形成 ASOR-PL-

AS-ODN复合物。这种复合物可以专一性地被细胞表面的ASOR受体所识别,并吞噬到细胞中。这种转移有两个显著优点:①受体介导的AS-ODN转移是十分专一而且高效的;②被转移的核酸是被保护的,与周围环境之间存在PL的保护层,可以抵抗环境中核酸酶的降解作用,提高转移效率。

3.3 反义寡核苷酸的化学修饰

化学修饰的目的在于结合寡核苷酸本身序列识别特点,引入可产生期望功能的新的基团,克服未修饰ODN易被分解、细胞透过率低等缺陷,进一步改善ODN的功能。

ODN的三种结构成分即碱基、磷酸基团和糖均可被化学修饰[10],根据活性基团连接部位的不同可分为以下几种:① 3′-偶合物,② 5′-偶合物,③核苷酸间偶合物。其中,最有价值的是对以硫原子磷酸骨架进行修饰。硫代磷酸二酯寡核苷酸([S]ODN)是目前最成功的第一代寡核苷酸替代物,具有水溶性,核酸裂解稳定性,易于大量人工合成,最可能为临床所用。

3.4 反义寡核苷酸的放射性核素标记

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。目前的研究主要集中在对AS-ODN链结构的修饰,核素、络合物的选择以及标记部位等方面[11,13]。美国迈阿密大学的Lu Xiao-Ming[14]、Dewanjee MK[15]等已尝试制作用来标记放射性核素的试剂盒,他们成功地以二乙三胺五乙酸(DTPA)为螯合剂制备了^{111}In标记反义探针,进行了荷乳腺癌小鼠模型c-myc mRNA的显像,瘤/血、瘤/肌肉比值在注射后0.5h分别为3.55±0.23和21.48±3.27,2h后分别为3,05±0.71和20.69±2.68。

由于^{99}Tc^{m}物理性能好,容易获得,适于显像,因而试用^{99}Tc^{m}对人工合成ODN进行标记成为人们研究重点。Hnatowhich DJ等[16]用烟肼酰胺(SHNH)作为螯合剂对ODN进行了^{99}Tc^{m}标记的研究,标记物比较稳定、解离量较少,但^{99}Tc^{m}-SHNH-ODN血清蛋白结合率高。目前,对ODN的各种标记方法均有一定的缺点,仍有必要进一步寻找一种标记简单,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[17]。

4 结束语

反义RNA技术方法简单,无感染和致癌风险,并且作用时间短暂,有利于显像,是目前最有可能应用于临床的基因显像方法之一。从经济学角度和药理学等方面来说,目前还有许多关键的问题尚待进一步研究,但随着分子生物技术的迅猛发展,反义显像技术也必将进一步完善、成熟。

参考文献:

[1] Myers KJ, Dean NM. Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools[J]. Trends Phimacol Sci, 2000, 21: 19-23.

[2] Poston RS, Tran KP, Mann MJ, et al. Prevention of ischemically induced neointimal hyperplasia using *ex vivo* antisense oligodeoxynucleotide[J]. J Heart Lung Transplant, 1998, 17: 349-355.

[3] Hnatowich DJ. Changing focus: applying antisense to nuclear medicine imaging[J]. Mol Med Today, 1999, 5: 151.

[4] Mani S, Gu Y, Wadler S, et al. Antisense therapeutics in oncology: points to consider in their clinical evaluation[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1999, 9: 543-547.

[5] Asaoka K, Tadam, Sawamura Y, et al. Dependence of efficient adenviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the coxsackievirus and adenovirus recepter[J]. J Neursurg, 2000, 92: 1002-1008.

[6] Malatynska E, Matheson GK, Goldenberg R, et al. Effects of treatment with GABA(A) receptor subunit antisense oligodeoxynucleotides on GABA-stimulated 36C1-infiux in the rat cerebral cortex[J]. Neurochem Int, 2000, 36: 45-54.

[7] Cooper SR, Taylor JK, Miraglia LJ, et al. Pharmacology of antisense oligonucleotide inhiibitors of protein expression[J]. Pharmacol Ther, 1999, 82: 427-435.

[8] Hogrefe RI. An antisense oligonucleotide primer[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1999, 9: 351-357.

[9] Gauchez AS, Du Moulinet D'Hardemare A, Lunardi J, et al. Potential use of radiolabeled antisense oligonucleotides in oncology[J]. Anticancer Res, 1999, 19: 4989-4997.

[10] Alt M, Eisenhardt S, Serwe M, et al. Comparative inhibitory potential of diffently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation[J]. Eur J Clin Invest. 1999, 29: 868-876.

[11] Hnatowich DJ. Antisense and nuclear medicine[J]. J Nucl Med, 1999, 40(4): 693-703.

[12] Tavitian B. *In vivo* antisense imaging[J]. Q J Nucl Med, 2000, 44: 236-255.

[13] Dewanjee MK, Vargas R, Ghafouripour AK, et al.

Kinetics of intracellular hybridization of c-myc mRNA oncogene with ^{111}In labeled antisense deoxyoligonucleotide probes in leukemic cells[J]. J Nucl Med, 1994, 34: 224.

[14] Lu Xiao-ming, Alan J, Fischman, et al. Antisense DNA delivery *in vivo*: Liver targeting by receptor-mediated uptake[J]. J Nucl Med, 1994, 35: 269-275.

[15] Dewanjee MK, Ghafouripour AK, Kapadvanjwala M, et al. Radiolabeled antisense oligodeoxynucleotides: *in vitro* and *in vivo* applications[J]. J Clin Immunoassay, 1993, 16: 276-289.

[16] Hnatowich DJ, Winnard P, Virzi F, et al. Technetium-99m labeling of DNA oligonucleotides[J]. J Nud Mecl, 1995, 36: 2306-2314.

[17] Hnatowich DJ. Antisense imaging: Where are we now? [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2000, 15: 447-457.

Progression of antisense oligonucleotides for non-invasive imaging *in vivo*

XIA Jin-song

(*Department of Nuclear Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Hubei Wuhan* 430030, *China*)

Abstracts: Antisense imaging is widely used as a novel method to assess gene expression by nucleic acid hybridization with anisense oligonucleotide labelled by radionucide *in vivo*, with advantages of easy controlling for synthesis, high reliability and low immunogenicity. The requirements for ideal antisense imaging include easy intakeing by cells, convenient labelling, stable hybridization and the tolerance against nuclease. The progression in antisense imaging, such as the transfer of antisense RNA mediated by liposomes or receptor, chemical modification of antisense oligonucleotide and the improvement of labelling, will greatly improve the clinical application of antisense imaging.

Key words　antisense imaging; receptor; liposomes; antisense oligonucleotide

---

文章编号: **1001-098X(2001)02-0065-05**

肿瘤血管活性肠肽受体显像

王雪鹃，张梅颖，林保和

(北京大学临床肿瘤医院核医学科，北京　100036)

摘　要: 血管活性肠肽(VIP)是一种由28个氨基酸组成具有多种功能的神经递质,能通过其受体调节正常及肿瘤细胞的增殖和分化。VPAC(VIP受体)广泛存在于各种正常和肿瘤组织中,但其在肿瘤组织中的表达密度远大于正常组织,这为放射性核素标记的血管活性肠肽受体显像奠定基础。此种显像已应用于多种肿瘤的诊断、分期、治疗方案选择与预后评价。

关键词: 肿瘤;　血管活性肠肽;　受体显像

中图分类号: R817.4　　文献标识码: A

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide,简称VIP)是天然产生的具有28个氨基酸的小肽,具有广泛的生物活性[1]。其受体VPAC在多数恶性肿瘤细胞上均有表达,且受体的密度高于生长抑素受体。这为其在肿瘤受体显像的应用奠定了基础。

1　VIP和VPAC概况

1970年,Said ST等从猪小肠中分离纯化了一

收稿日期: 2000-05-11

作者简介: ① 王雪鹃(1974-),女,吉林长春人,北京大学临床肿瘤医院核医学科硕士研究生,主要从事肿瘤受体显像研究。

② 张梅颖(1944-),女,四川南充人,北京大学临床肿瘤医院副院长、核医学科主任、教授,主要研究肿瘤导向药物的研制及临床应用。

③ 林保和(1956-),男,广东惠乐人,北京大学临床肿瘤医院核医学科助理研究员,主要研究肿瘤放免显像、肿瘤多药耐药的检测。