

文章编号: 1001-098X(2002)06-0246-03

·核医学·

放射性核素反义治疗

欧晓红

摘要: 放射性核素反义治疗将反义寡核苷酸阻断癌基因表达作用及放射性核素杀伤癌细胞作用结合在一起, 是一项新兴的治疗技术。这项研究目前仍处于初步阶段, 只有少量放射性寡核苷酸细胞毒性、动物体内药代动力学及组织学分布的报道。简要综述了目标基因的选择和反义寡核苷酸的标记、导入细胞及其毒副作用等几个放射性核素反义治疗有关的重要环节及其最新进展。

关键词: 放射性核素; 反义治疗; 寡核苷酸

中图分类号: R817.5; Q74 **文献标识码:** A

Radionuclide antisense therapy

OU Xiao-hong

(Department of Nuclear Medicine, West China Hospital of Si Chuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Radionuclide antisense therapy achieves the joint goals of antisense therapy and internal radioation therapy. There have been a small number of investigations on the radionuclide antisense therapy in tissue culture and in animal studies. Considerable research is required before this novel technique can become a working practice. We reviewed some question and development on the radionuclide antisense therapy, such as selection of the target gene sequence, labelling the antisense oligonucleotide, improvement of the uptake and target of radionuclide antisense oligonucleotides and evaluation of the toxicity of the radionuclide antisense therapy.

Key words: radionuclide; antisense therapy; oligonucleotide

反义治疗指人工合成单链的反义寡核苷酸, 与致病关键基因的正链或其mRNA互补、特异性结合, 通过某种机制阻断该基因的表达以达到治疗疾病的目的。近年来, 随着分子生物学发展, 反义治疗作为一种新的医学技术得以迅速发展, 多种反义治疗方案在初步临床实验中取得令人鼓舞的成果。目前反义治疗的应用范围涉及多种恶性肿瘤、病毒细菌感染及炎症等疾病。

但是, 单纯反义制剂对疾病特别是恶性肿瘤的治疗尚难以达到满意效果, 因为运用目前的转染技术, 反义核苷酸转染病变细胞的效率低。而且, 恶性肿瘤的发生发展过程涉及复杂的基因变化, 针对单个癌基因的反义寡核苷酸难以有效抑制恶性肿瘤增生。如果将反义核苷酸标记上放射性核素, 使

其具有抑制癌基因表达和射线损伤病变细胞的双效作用, 可有效地增强反义治疗的效果。

1 靶基因及反义寡核苷酸的选择

与单纯反义治疗一样, 放射性核素反义治疗需要首先确定靶基因。目前正在研究的许多反义治疗靶序列都可用于放射性反义治疗, 如肿瘤的癌基因、人免疫缺陷病毒的病毒基因等。只要将针对这些基因的反义寡核苷酸标记上有治疗作用的放射性核素, 就有可能实现对这些疾病的放射性反义治疗。而放射性反义治疗要广泛应用于临床, 需要进一步明确更多种类疾病发生发展过程中基因的异常改变, 确定合适的靶基因序列, 这有待于分子生物学、分子病理学等学科的进一步发展。

人工合成反义寡核苷酸可以针对致病关键基因的正链, 通过与其双股DNA螺旋特异结合形成三股螺旋体, 阻止该基因的转录; 也可以针对致病基因所转录的mRNA, 通过与目的mRNA特异结合,

收稿日期: 2001-11-20

作者简介: 欧晓红 (1974-), 女, 四川广安人, 四川大学华西医院核医学科 (成都, 610041) 博士研究生, 主要从事放射性反义治疗研究。

审校者: 四川大学华西医院核医学科 谭天秩

进而激活能识别DNA/mRNA杂交体的RNase H(核糖核酸酶H)将目的mRNA降解。

直接针对特异性DNA序列的反义单链寡核苷酸链,确切说即“反基因”(antigene)链,稳定的三股超螺旋的形成不仅要求有与目标序列严格互补的序列,还要求该序列含有多聚嘌呤或多聚嘧啶区域。只有与靶序列形成稳定的三股超螺旋才能有效抑制该基因的转录^[1]。针对mRNA序列的反义寡核苷酸链仅仅能简单地与目标mRNA杂交也是不够的,在反义治疗中,只有DNA/mRNA杂交体激活了RNase H,降解mRNA,才能有效抑制mRNA的翻译,而为了保证寡核苷酸在体内的稳定性而对其所作的化学修饰,常使其丧失激活RNase H的作用。硫代寡核苷酸(将寡核苷酸骨架磷酸上的一个氧原子替换为硫原子)既能抵抗核酸酶的降解又能作为RNase H底物,是目前应用最广的寡核苷酸形式^[2]。在放射性核素反义治疗中,硫代寡核苷酸也有着广泛的应用前景。

2 反义寡核苷酸的标记

从理论上说,发射 α 、 β 射线或俄歇电子的放射性核素都可以用来标记反义寡核苷酸链,达到杀伤病变细胞的目的。

目前,在放射性核素反义治疗中研究较多的发射俄歇电子的核素是¹²⁵I。¹²⁵I标记寡核苷酸可在合成寡核苷酸链时,将¹²⁵I标记的单核苷酸直接渗入其序列中^[3],也可在合成寡核苷酸链时,在其末端连接一个酪氨酸残基,然后将碘原子标记于酪氨酸^[4]。¹²⁵I所发射的俄歇电子能量较低,其杀伤范围只有10 bp左右,所以用¹²⁵I标记的反义寡核苷酸链只有在与靶基因紧密结合时,其发射的俄歇电子才有可能通过打断目标链使细胞死亡^[5],故¹²⁵I只适合标记直接针对靶基因且能与靶基因形成紧密三股螺旋的“反基因寡核苷酸链”。曾有报道用¹¹¹In标记反基因寡核苷酸链。¹¹¹In发射的俄歇电子能量较¹²⁵I略低,能引起目标序列的局限性断裂^[6],其射线能量和半衰期更适合放射性反义治疗。

与用作显像的 γ 射线发射体一样,用作核素治疗的发射 β 粒子的元素多为金属离子。目前,放射性核素反义显像研究开展较多,显像用的放射性核素如^{99m}Tc^[7]及¹¹¹In^[8]都已被成功地用于标记反义寡核苷酸^[7,8]。治疗用放射性核素的标记可借鉴其方法,在

寡核苷酸链上连接一个氨基,再将DTPA(二乙三胺五乙酸)、MAG₃(巯基乙酰三甘氨酸)、SHNH(联胍尼克酰胺衍生物)等双功能螯合剂与该氨基相连,用适当的转螯合剂将放射性金属离子标记于寡核苷酸链。利用这种方式,研究者们已成功进行了寡核苷酸链的⁹⁰Y的标记^[9]。目前,有报道将寡核苷酸链中脱氧胸腺嘧啶替换为带有氨基的脱氧尿嘧啶,使寡核苷酸链能够连接上更多双功能螯合剂,从而使放射性标记寡核苷酸链的比活度大大提高^[10]。

另外,某些 β 粒子发射体如³⁵S、³²P等可替代单核苷酸上某些原子,在寡核苷酸链的合成中通过放射性标记的单核苷酸的渗入,标记于寡核苷酸链。

3 放射性标记寡核苷酸导入细胞

游离的寡核苷酸链为水溶性且带有大量负电荷,很难进入细胞。目前,用以帮助寡核苷酸进入细胞的方法主要有脂质体包裹,阳离子多聚体联合运用及分子载体与某种配体偶联借助特异性受体介导的吞噬及胞饮作用进入细胞。脂质体包裹后,DNA透过细胞膜的能力增加,是目前转移寡核苷酸较常用的方法。通过改良脂质体组成,增加DNA比例,可提高其稳定性和基因转移效率。阳离子多聚体的联合运用可中和寡核苷酸所带负电荷,提高其通透性,目前,这方面研究已取得初步进展^[11]。利用受体配体结合的特异性和高亲和力,将寡核苷酸链与配体相连形成复合物后,通过受体介导的内吞作用可将其靶向转运到特定的细胞,大大提高反义寡核苷酸链的转运效率,降低反义寡核苷酸链进入非靶细胞造成的毒副作用^[12,13],为反义治疗用于临床提供了光明的前景。

4 放射性标记反义寡核苷酸链的毒副作用

放射性标记反义寡核苷酸链的毒副作用主要有两个方面:一方面为反义寡核苷酸链本身对人体的毒副作用,另一方面是标记的放射性核素进入人体引起的非特异性损伤。目前的动物实验发现,在大剂量应用反义寡核苷酸后,一过性副反应有血压增高、心搏徐缓及凝血时间延长,可能与反义寡核苷酸链互补活性及激活纤维蛋白酶有关。远期副作用有肾脏形态改变。在临床实验中,当剂量在2 mg/kg以下时,未观察到明显毒副作用^[14],目前也未发现用反义寡核苷酸链引起的基因突变,及反义寡核

苷酸链与非靶mRNA非特异结合干扰正常基因表达。放射性标记反义寡核苷酸链引起的非特异性辐射损伤理论上与其他放射性药物相似。由于反义寡核苷酸链的靶向载体作用,不会对正常细胞造成严重损害,但某些双功能螯合剂在标记中的应用,使得标记后反义寡核苷酸链与血浆蛋白结合率增大,进入人体后在肝脾等脏器中滞留时间过长^[5],使这些脏器所受辐射剂量增加。故要减低放射性标记反义寡核苷酸链的毒副作用,应从增强其靶向性和标记时选择适当的双功能螯合剂着手。

5 放射性标记反义治疗的研究现状

放射性标记反义治疗的研究刚刚起步,主要为少量细胞毒性的研究,部分作者利用动物进行了放射性标记寡核苷酸的组学分布及药代动力学研究。

¹²⁵I标记特异序列的单链寡核苷酸,将标记寡核苷酸用脂质体包裹导入培养的肿瘤细胞,对肿瘤细胞的生长产生明显的抑制作用^[5]。另有作者报道,用⁹⁰Y通过双功能螯合剂SCN-BN-EDTA标记反义寡核苷酸链,标记后反义寡核苷酸链保持与正义链杂交的活性,与人血清共同孵育72 h保持稳定^[9]。提示⁹⁰Y标记反义寡核苷酸链用作放射性核素反义治疗的可能,但其对细胞的毒性等未见报道。

为了研究适合放射性反义治疗的核素,有作者进行了³⁵S、³²P及³³P标记反义寡核苷酸的体内药代动力学及肿瘤吸收剂量的测定,认为在肿瘤相对较大时,在肾脏吸收剂量相同的情况下,肿瘤对³²P的吸收剂量最大,而在肿瘤<1 g时,³⁵S及³²P的吸收剂量较³³P大,故在治疗较小肿瘤时,³²P与³⁵S标记反义寡核苷酸链优于³³P^[16]。

6 展望

总之,放射性核素标记反义治疗是联合反义寡核苷酸链阻断基因表达作用和放射性核素产生辐射生物效应杀伤病变细胞达到治疗疾病的目的。目前,在反义寡核苷酸链的选择、标记、增强其靶向性和降低毒副作用等方面存在大量问题尚需解决,进入临床实验更是需要先做大量动物实验。这项研究如能取得突破性进展,必将为多种疑难疾病的治疗带来新的希望。

参考文献:

- [1] Casey BP, Glazer PM. Gene targeting via triple-helix formation[J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 67(2): 163-192.
- [2] Temsamani J, Agrawal S. Antisense oligonucleotides as antiviral agents[J]. *Adv Antiviral Drug Des*, 1996, 10(1):21-39.
- [3] Panyutin IG, Neumann RD. Sequence specific DNA breaks produced by triplex-directed decay of iodine-125 [J]. *Acta Oncol*, 2000, 35(7): 817-823.
- [4] Cammilleri S, Perdereau B, Brixy F, et al. Imaging and biodistribution of ¹²⁵I tyramine oligonucleotide in nude mice bearing human breast tumor. Preliminary report [J]. *Bull Cancer Paris*, 1996, 83(1): 23-26.
- [5] Sedelnikova OA, Panyutin IG, Thierry AR, et al. Radiotoxicity of iodine-125-labeled oligodeoxyribonucleotides in mammalian cells[J]. *J Nucl Med*, 1998, 39(8): 1412-1418.
- [6] Karamychev VN, Panyutin IG, Kim MK, et al. DNA cleavage by ¹¹¹In-labeled oligodeoxyribonucleotides [J]. *J Nucl Med*, 2000, 41 (6) :1093-1101.
- [7] Winnard PJ, Chang F, Rusekowski M, et al. Preparation and use of NHS MAG₃ for technetium -99m labeling of DNA [J]. *Nucl Med Biol*, 1997, 24(5): 425-432.
- [8] Fujibayashi Y, Nakagawa K, Waki A, et al. Basic studies on the ¹¹¹In labeled antisense oligonucleotide for tumor imaging [J]. *Kaku Igaku*, 1996, 33(2): 115-122.
- [9] Watanabe N, Sawai H, Endo K, et al. Labeling of phosphorothioate antisense oligonucleotides with yttrium-90[J]. *Nucl Med Biol*, 1999, 26(2): 239-243.
- [10] Fujibayashi Y, Yoshimi E, Waki A, et al. A novel ¹¹¹In-labeled antisense DNA probe with multi-chelating sites (MCS-probe) showing high specific radioactivity and labeling efficiency[J]. *Nucl Med Biol*, 1999, 26(1): 17-21.
- [11] Gonzalez Ferreiro M, Tillman L, Hardee G. Characterization of complexes of an antisense oligonucleotide with protamine and poly-L-lysine salts[J]. *J Control Release*, 2001, 73(2-3): 381-390.
- [12] Sugano M, Makino N, Sawada S, et al. Effect of antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl estertransfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(9): 5033-5036.
- [13] Reddy JA, Low PS. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers[J]. *Crit Rev Ther Carrier Syst*, 1998, 15(6): 587-627.
- [14] Agrawal S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials[J]. *Tibtech*, 1996, 14(10): 376-387.
- [15] Hnatowich DJ, Winnard PJ, Virzi F, et al. Labeling deoxyribonucleic acid oligonucleotides with ⁹⁹Tc^m [J]. *J Nucl Med*, 1995, 36(12): 2306-2314.
- [16] Kairemo KJ, Tenhunen M, Jekunen AP. Dosimetry of radionuclide therapy using radiophosphonated antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates based on animal pharmacokinetic and tissue distribution data[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1996, 6(3): 215-220.