

PET 报告基因显像

陈虞梅 黄钢

【摘要】 运用正电子发射断层显像(PET)及相关的PET报告基因及报告探针的活体显像技术可提供关于基因治疗定量及定性的信息,并可提供其他技术不能获得的参数,这对更好地理解基因治疗的过程及人类基因治疗的未来发展及临床应用很有意义。

【关键词】 体层摄影术,发射型计算机;基因,报告

【中图分类号】 R817.4 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-4114(2006)03-01 39-03

Investigation progress of PET reporter gene imaging

CHEN Yu-mei¹, HUANG Gang²

(1. Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital; 2. Institute of Nuclear Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200127, China)

【Abstract】 Molecular imaging for gene therapy and gene expression has been more and more attractive while the use of gene therapy has been widely investigated and intense research have allowed it to the clinical setting in the last two-decade years. In vivo imaging with positron emission tomography(PET) by combination of appropriate PET reporter gene and PET reporter probe could provide qualitative and quantitative information for gene therapy. PET imaging could also obtain some valuable parameters not available by other techniques. This technology is useful to understand the process and development of gene therapy and how to apply it into clinical practice in the future.

【Key words】 Tomography emission-computed; Gene, reporter

随着影像融合技术如 PET-CT、microPET-CT 等设备的开发应用及基因工程技术的迅速发展,通过 PET 基因显像监测机体疾病的发展过程、明确疾病或功能异常的原因,对基因治疗中被转染基因的定位和表达进行定量监测和直接显像,已成为分子成像技术中最具发展前景的影像手段之一。

报告基因显像是一种间接的基因显像方法,它主要是利用基因融合、双顺反子、双启动子及双向转录等重组技术,构建表达报告基因的病毒载体,将报告基因与治疗基因一同导入靶细胞或组织内,然后注射与报告基因耦合的核素标记的探针进行显像,从而间接监测治疗基因的表达。目前应用较广的报告基因为氯霉素乙酰转移酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶和绿荧光蛋白,但这些方法必须要细胞吸取或组织样品,且不可能反复应用,缺乏断层信息,不能在活体内显示基因表达的部位、数量及维

持的时间。

分子显像技术——PET 通过理想的 PET 报告基因在宿主细胞中形成受体、转运体或酶,与相应的 PET 报告探针相互作用或结合即可获得活体基因显像,可反复、无创伤地监测基因表达的位置、数量及维持时间,并通过适当的光子衰减、散射及部分容积效应的校正获得示踪剂水平的准确估量。有报道称,PET 是目前惟一可用于人类基因治疗的临床监测方法^[1]。

1 酶报告基因显像

野生型单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶(herpes simplex virus 1-thymidine kinase, HSV1-TK)和突变型 HSV1-TK 基因是目前 PET 分子显像研究中运用最广泛的酶报告基因。HSV1-TK 最初主要应用于自杀基因的临床治疗试验中,自杀基因与病毒结合感染靶组织后,将无毒的前体药物代谢成为细胞毒性药物,首先使导入自杀基因的细胞“自杀”,其次可通过“旁观者效应”杀死未导入自杀基因的邻近细胞,显著地扩大其杀伤作用。

基金项目:上海市科委重点基金项目(02DJ14037);上海市百人计划第三轮重点资助项目(97BR012)

作者单位:1. 200127,上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科(陈虞梅),2. 临床核医学研究所(黄钢)

通讯作者:黄钢(E-mail:huang2802@163.com)

放射性核素标记的核苷类似物经主动运输通过 HSV1-TK 转染细胞, 被该基因的编码产物 TK 磷酸化后, 不能再次穿过细胞膜而“陷入”被转染细胞中进行成像。因此, 探针在细胞内的聚集程度可反映 HSV1-TK 的活性及表达程度。

HSV1-TK 报告基因显像的两类主要底物为: 嘌呤核苷衍生物和无环鸟苷衍生物。Iyer 等^[2]用腺病毒作载体, 巨细胞病毒作启动子, 将 HSV1-TK 报告基因通过尾静脉注射引入鼠肝脏造成肝脏感染, 进行 ^{18}F -fluoropenciclovir (^{18}F -FPCV) microPET, 结果表明 ^{18}F -FPCV 可定量监测 HSV1-TK 报告基因的表达。Hospers 等^[3]用 ^{18}F -9-(1-氟-3-羟基-2-丙氧基甲基)鸟嘌呤 (^{18}F -FHPG) 作为示踪剂, 监测 HSV1-TK 基因的表达情况发现, 体外用 ^{18}F -FHPG 培育 2 h 后 C6 鼠神经胶质瘤细胞 TK⁺ 组对 ^{18}F -FHPG 的摄取是 TK⁻ 组的 7 倍; 将注入 ^{18}F -FHPG 2 h 后的荷瘤小鼠进行 PET 显像发现, TK⁺ 组肿瘤示踪剂的聚集是 TK⁻ 组的 3 倍; 通过 PET 的延迟显像发现, TK⁺ 组的示踪剂很快通过泌尿系统从非靶组织中清除, 因为只有无 TK 表达的小鼠, 其膀胱和肾脏在延迟显像中仍有显影。Hustinx 等^[4]也报道, HSV1-TK⁺ 肿瘤组织中的 ^{18}F -FHPG 摄取量是对照肿瘤组织 (HSV1-TK⁻) 的 27 倍, PET 同样证明了这一点。Alauddin 等^[5]通过体外细胞培养研究显示, HSV-TK 基因转导细胞对 ^{18}F -9-[4-氟-3-(羟甲基)丁基]鸟嘌呤 (^{18}F -9-[4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine, ^{18}F -FHBG) 1 h 和 5 h 后的摄取分别为对照组细胞的 31 和 71 倍; 小鼠活体显像发现, HSV-TK 基因转导小鼠肿瘤对 ^{18}F -FHBG 2 h 及 5 h 的摄取分别为对照组的 4 倍和 13 倍, 其 2 h 显像的靶本比为 25 : 2, 5 h 靶本比为 22 : 2; 2 h 后, 肿瘤细胞对 ^{18}F -FHBG 摄取是 ^{18}F -FHPG 的 4 倍, 其显像靶本比也显著高于 ^{18}F -FHPG, 故其图像质量优于 ^{18}F -FHPG。另外, 他们在同一细胞株中用 ^{14}C -2'-脱氧-2'-氟-5-甲基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖尿嘧啶 (^{14}C -2'-deoxy-2'-fluoro-5-methyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil, ^{14}C -FMAU) 作为探针的显像敏感性高于 ^{18}F -FHPG 和 ^{18}F -FHBG, 但特异性低于 ^{18}F -FHBG^[6]。Tjuvajev 等^[7]比较了核素标记的核苷探针在 PET 的 HSV1-TK 基因表达显像, 发现 ^{124}I 或 ^{131}I 标记的 2'-氟-2'-脱氧-5-碘-1-β-D-阿拉伯呋喃糖-5-碘-尿嘧啶 (^{124}I -2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-

arabinofuranosyl-5-iodouracil, FIAU) 灵敏度最高, 图像质量比 ^{18}F -FHBG 更好。Yaghoubi 等^[8]测定了 HSV1-TK 在健康志愿者体内的代谢动力学、分布、剂量学和稳定性: 将 73.3~229 MBq 的 ^{18}F -FHBG 静脉注射给 10 名健康志愿者, 然后行 PET 动态显像, 同时进行血样放射性分析生理功能观察, 用感兴趣区的时间-活性数据来计算吸收剂量, 结果表明, ^{18}F -FHBG 在体内稳定性好、血清清除快、本底信号低和安全等特性, 是很好的 HSV-TK 报告基因显像探针。Gambhir 等^[9]还发现, HSV1-sr39TK 作为 HSV1-TK 基因的突变型, 较野生型 HSV1-TK 能更有效的利用底物, 目前也已成功地运用于活体基因表达的 PET 中。

2 受体报告基因

受体报告基因显像基本原理是将某些受体蛋白基因与治疗基因克隆在同一启动子下, 然后利用放射性核素标记的相应配体进行显像, 观察受体基因的表达情况, 从而评价治疗基因的导入部位、表达水平和持续时间。当受体基因的 DNA 与治疗基因结合, 随着治疗基因表达, 受体基因开始刺激相应的酶生成, 而受体探针能与该酶特异性结合, 最后通过 PET 进行显像。目前主要有两种形式, 一种是受体基因所编码的蛋白质位于细胞内的酶, 显像用的受体探针必须穿过细胞膜再与酶结合; 另一种是受体基因所编码的蛋白质位于细胞膜表面, 显像用的受体探针无需穿过细胞膜, 直接与细胞表面的蛋白质或受体结合。

螺环哌丁苯与多巴胺是一种跨膜受体-配体报告基因系统。 ^{18}F 标记的 3-(2'- ^{18}F -氟乙基螺环哌啶酮) 3-(2'- ^{18}F -fluoroethyl) -spiperone, ^{18}F -FESP) 是多巴胺 2 型受体 (dopamine D₂ receptor, D₂R) 的拮抗剂, 可蓄积在 D₂R 表达的组织 and 细胞内通过 PET 进行显像。然而, 由于 D₂R 与多巴胺结合后, 可以激活抑制型 G-蛋白, 进而使腺苷环化酶失活, 细胞内 cAMP 水平降低, 出现第 2 信号系统的转导, 从而导致生物学变化, 即副反应。为此, 人们开始寻求不具备调控 cAMP 水平的突变 D₂R 基因。Liang 等^[10]利用在第 80 位或第 194 位突变的 D₂R 基因 (D₂R 80A 和 D₂R 194A) 进行报告基因显像, 由于这两种类型的受体不能使抑制型 G-蛋白的 α_i 亚单位激活, 因而不影响靶细胞的生理功能, 而且

这二者与 ^{18}F -FESP 的结合能力和野生型 D_2R 相等, 可以替代 D_2R 作为报告基因进行 PET。

生长抑素受体 2 (somatostatin receptor2, SSTR2) 类似物是另一类受体-配体报告基因系统。SSTR2 主要在脑垂体、许多良性肿瘤及一些其他类型的神经内分泌肿瘤中表达, 当 hSSTR2 用作报告基因时, 转导靶细胞后, 在细胞表面表达 hSSTR2, 用不同的生长抑素类似物示踪剂可以显示 hSSTR2 报告基因的表达情况。Wester 等^[11]首次报道了 ^{18}F 标记的奥曲肽糖类衍生物在 PET 中的应用, 提示该显像剂具有出色的显像优点并可获得较高的靶本比。

3 转运体报告基因显像

报告基因还可以编码一种转运蛋白, 它可以特异性地将示踪剂转运入细胞内, 从而使信号扩增, 检测低水平的基因转染。人源性转运因子无免疫源性, 但内源性表达会使 PET 检测的本底增大。目前成功应用的报告基因为钠 / 碘转运体 (sodium iodide symporter, NIS), NIS 主要在甲状腺中表达, 另外在唾液腺、胃、胸腺、乳腺及其他组织中也有少量表达。异位表达 NIS 蛋白的细胞并不能使碘有机化, 但是转染细胞中可聚集足够的放射性示踪剂通过 γ 像机甚至 PET 探测到。Groot-Wassink 等^[12]将人 NIS (human NIS, hNIS) 基因作为报告基因并注射 ^{124}I 为示踪剂, 通过免疫组织化学测得 NIS 阳性表达细胞与 PET 监测 hNIS 基因表达呈明显线性相关 ($r=0.9581$)。Niu 等^[13]通过 Cotton 鼠鼻孔输入腺病毒-hNIS, 并将无 hNIS 的腺病毒作为对照组, 结果 PET 在转染腺病毒-hNIS 的小鼠肺部可获得成像, 而对照组中未发现。该方法避免了放射性化学物质的合成, 故有望广泛使用。

综上所述, PET 及相关的 PET 报告基因和报告探针的活体显像技术可提供关于基因治疗定量及定性的信息。尽管大部分基因治疗和基因显像还处于试验阶段, 但随着人体基因治疗和分子显像技术的快速发展, 报告基因显像技术对更好的理解基因治疗过程、人类基因治疗未来的发展和临床应用都很有意义。

参 考 文 献

1 Penuelas I, Boan J, Marti-Climent JM, et al. Positron emission tomography and gene therapy: basic concepts and experimental

approaches for in vivo gene expression imaging. *Mol Imaging Biol*, 2004, 6(4): 225-238.

2 Iyer M, Barrio JR, Namavari M, et al. 8-[^{18}F]Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. *J Nucl Med*, 2001, 42(1): 96-105.

3 Hospers GA, Calogero A, van Waarde A, et al. Monitoring of herpes simplex virus thymidine kinase enzyme activity using positron emission tomography. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1488-1491.

4 Hustinx R, Shiue CY, Alasvi A, et al. Imaging in vivo herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer to tumour-bearing rodents using positron emission tomography and [^{18}F]FHPG. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28(1): 5-12.

5 Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, et al. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[(^{18}F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanidine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. *J Nucl Med*, 2001, 42(11): 1682-1690.

6 Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, et al. Evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro-5-methyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil as a potential gene imaging agent for HSV-TK expression in vivo. *Mol Imaging*, 2002, 1(2): 74-81.

7 Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-TK gene expression. *J Nucl Med*, 2002, 43(8): 1072-1083.

8 Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(^{18}F)FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med*, 2001, 42(8): 1225-1234.

9 Gambhir SS, Bauer E, Black ME, et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression with positron emission with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2785-2790.

10 Liang Q, Satynmurthy N, Barrio JR, et al. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther*, 2001, 8(19): 1490-1498.

11 Wester H, Schottelius M, Scheidhauer K, et al. PET imaging of somatostatin receptors: design, synthesis and preclinical evaluation of a novel ^{18}F -labelled, carbohydrate analogue of octreotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003, 30(1): 117-122.

12 Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, et al. Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal. *Mol Ther*, 2004, 9(3): 436-442.

13 Niu G, Krager KJ, Graham MM, et al. Noninvasive radiological imaging of pulmonary gene transfer and expression using the human sodium iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2005, 32(5): 534-540.