

放射性核素反义技术在肿瘤治疗中的研究

王亚飞 孟庆勇

【摘要】放射性核素反义治疗是放射性核素产生辐射生物效应杀伤病变细胞与反义寡核苷酸链阻断基因表达相结合而达到治疗疾病的目的,具有特异性强、靶向性高和损伤性小等优点,为肿瘤的治疗提供了新方法。

【关键词】放射性同位素; 寡核苷酸类,反义; 放射肿瘤学

【中图分类号】R730.55 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2006)03-0142-03

Application of the radionuclide antisense technique in the treatment of tumors

WANG Ya-fei, MENG Qing-yong

(Analytical Center in Medical College of Guangdong, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

【Abstract】Radionuclide antisense technique, which combined radiation biological effect with antisense therapy, treats polygenic diseases, especially tumors. Antisense oligonucleotidelabeled with radionuclide can target abnormal gene specially, thus radiation biological effect takes place in the abnormal part of cells, and does not damage normal part of cells. This will be a new way in the treatment of diseases.

【Key words】Radioisotopes; Oligonucleotides; antisense; Radiation oncology

肿瘤的发病率和病死率呈逐年升高的趋势,严重威胁人类的生命和健康。目前恶性肿瘤的治疗方法有手术切除、放疗和化疗,但放疗和化疗缺乏特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时也损伤正常的组织细胞,引起机体免疫功能和造血功能低下以及胃肠道等反应,使患者的生存质量下降,因此寻找更有效的治疗方法具有深远意义。随着分子生物学和分子核医学的发展,放射性核素靶向治疗进入了分子水平,放射性核素标记肿瘤抗体、生物活性肽和反义寡核苷酸等靶向药物研究日益增多。其中,放射性核素反义技术利用反义寡核苷酸链阻断基因表达和放射性核素杀伤肿瘤细胞共同达到治疗疾病的目的,显示了其在肿瘤治疗中光明的前景。

1 放射性核素反义技术治疗肿瘤的依据

肿瘤的发生、发展和转移涉及到多个基因质和量的改变,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活、转移基因的激活以及转移抑制基因的失活等。在基因水平治疗肿瘤有不少研究,其中反义技术是研究的一大热点。

反义治疗是人工合成的单链反义寡核苷酸

(antisense oligonucleotide)与致病基因的正链或其 mRNA 互补特异性结合,特异地阻断该基因的表达而达到治疗疾病的目的。理论上,反义技术能抑制任何已知序列的基因,然而目前采用的基因工程技术还不能达到理想的转染率,这使得用正常基因置换癌细胞中所有异常基因,用反义基因有效抑制癌基因的转录、mRNA 的翻译及抑制癌细胞过度增殖比较困难;并且在肿瘤细胞中有多种癌基因,通过反义技术抑制肿瘤中一种癌基因的表达是不能对其产生很大的影响,因而反义治疗在恶性肿瘤中的应用受到一定限制。

为提高肿瘤基因反义治疗效果,Kassis 等^[1]提出放射性核素反义治疗的策略。放射性核素反义治疗是将发射 α 、 β 或俄歇电子的放射性核素与反义寡核苷酸耦联,定向引入癌组织中,不仅可以抑制癌基因的过度表达和癌细胞的增殖,而且能够利用放射性核素的电离辐射生物效应破坏癌细胞,以达到基因治疗的目的。

2 放射性反义寡核苷酸的作用机制

放射性核素反义技术的抗肿瘤作用是结合了反义寡核苷酸的反义作用和放射性核素的电离辐射的双重作用。

作者单位:524023 湛江,广东医学院分析中心

通讯作者:孟庆勇(E-mail:mqy1586@sina.com)

人工合成的反义寡核苷酸一般为 15~25 聚体的小分子物质,其穿透力强,易到达肿瘤靶细胞,并通过特异性互补序列与癌细胞内原癌 mRNA 序列相结合,使癌基因灭活。根据反义寡核苷酸作用的细胞区域,可分为细胞核和细胞质两类作用机制:

(1) 作用于细胞核的反义寡核苷酸穿过核膜,与前体 mRNA 或 DNA 互补序列结合,从而干扰转录、剪接或转录物运输至细胞质,与单链或双链 DNA 结合形成三链 DNA 结构而影响转录;DNA-RNA 杂交体还可诱导 RNA 酶 H 的水解活性,也影响剪接后 mRNA 从细胞核运送至细胞质。

(2) 作用点在细胞质的反义寡核苷酸主要影响翻译过程,通过反义寡核苷酸-mRNA 杂交体阻止核糖体与 mRNA 结合或反义寡核苷酸结合的 mRNA 被 RNA 酶 H 降解^[2]。

常用的治疗用核素有 ¹²⁵I、¹³¹I、³²P、¹¹¹In、¹⁸⁸Re 等。¹²⁵I 标记的碘苷掺入培养细胞 DNA 后,¹²⁵I 以电子俘获方式衰变时可发射出低能俄歇电子和电子俘获特征 X 射线,产生高线性能量转换效应,在 DNA 链上形成高度局限性能量沉积,引起 DNA 双链断裂。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,其射线能量和半衰期更适合放射性核素反义治疗。

3 反义寡核苷酸的标记和修饰

选择合适的放射性核素及适宜的标记方式对反义寡核苷酸进行标记是放射性核素反义治疗的关键问题之一。目前,¹²⁵I 在放射性核素治疗中研究较多。¹²⁵I 发射的俄歇电子能量较低,其杀伤范围只有 10 bp 左右,用 ¹²⁵I 标记的反义寡核苷酸只有在与靶基因紧密结合时发射的俄歇电子才有可能通过打断目标链使细胞死亡^[3]。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掺入其序列,或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^[4-5]。用 Iodogen 法对 bcl-2 反义寡核苷酸进行 ¹²⁵I 直接标记,在室温、pH 值近中性条件下 30 min 标记率达 35%,并随时间和温度的升高而增加,而且标记物较稳定,96 h 的放化纯度仍可保持 80%^[6]。这对于鼻咽癌的反义显像和反义治疗有重要价值。

另外,某些 β 粒子发射体如 ³⁵S、³²P、³H 等可

替代单核苷酸上某些原子,在寡核苷酸链的合成中掺入标记于寡核苷酸链。

放射性核素标记反义寡核苷酸作为治疗药物同传统反义药物一样应具有以下条件:能被细胞有效摄取,具有充足的细胞内浓度;能拮抗血浆、体液及细胞内核酸酶的降解;能选择性地与特异性靶序列杂交,以减少与细胞内其他成分的非特异结合,降低毒性。但是,单链寡核苷酸易被细胞内的核酸酶消化,这使得反义技术在体内的应用受到一定限制。因此,提高反义寡核苷酸的稳定性是其发挥作用的关键问题之一,我们可以对核酸分子进行各种修饰来防止核酸内切酶的降解。

寡核苷酸中磷酸部分的改变相对容易,并且也是核酸酶的攻击位点。因此,磷酸基团是最常用的修饰部位。磷酸二酯中带电的氧原子可被甲基、硫基或乙基等取代,构成了甲基化、硫代化和乙基化寡核苷酸。由于硫代化寡核苷酸对核酸酶有更高的耐受性,易合成、毒性小、血浆清除率慢而被广泛应用。但是,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特异性序列抑制作用,因此,建议仅对核苷酸链末端进行硫代化。

4 放射性核素标记反义寡核苷酸的导入

尽管细胞膜上带有高密度的负电荷,寡核苷酸仍可以通过细胞膜在完整细胞中引起生物效应。放射性核素标记的寡核苷酸需 15 min 到数小时就可以进入细胞内,这种主动转移是通过细胞的内吞作用实现的,是一个可饱和的能量依赖过程。利用放射性核素反义治疗肿瘤需要瘤细胞内有足够的反义寡核苷酸积累,因此有必要提高瘤细胞对反义寡核苷酸的摄取率。目前,利用脂质体、L-聚赖氨酸载体和细胞表面受体的介导可有效地提高放射性核素标记的反义寡核苷酸的摄取。

4.1 利用脂质体导入

脂质体由单脂或多脂双层组成,以吞噬或吞饮作用进入细胞。用脂质体包裹放射性反义寡核苷酸可提高肿瘤对其摄取,同时保护其不被核酸酶降解,可极大地降低反义寡核苷酸的用量。在此基础上又发展了一种导向免疫脂质体(targeted immunoliposome),是将抗体插入到脂质体中确保它对相应表面抗原的细胞专一性进攻。免疫脂质

体介导的放射性反义寡核苷酸具有三重特性：脂质体表面的抗体能选择地与靶细胞表面的抗原特异性结合，使瘤细胞摄取脂质体；在细胞内反义寡核苷酸通过碱基互补选择性与相应互补序列结合，从而阻断靶细胞转录或翻译；放射性核素发出的射线可以作用于局部的遗传物质，破坏肿瘤细胞。

4.2 利用 L-聚赖氨酸导入

L-聚赖氨酸是通过共价键与放射性反义寡核苷酸结合提高细胞膜对它的亲和性。这样，不仅增加了反义寡核苷酸的摄取，而且放射性核素在靶细胞中的剂量也会相应升高，从而增强疗效。

4.3 利用受体介导

受体介导放射性反义寡核苷酸的摄取是利用受体与配体相互作用的高特异性、高亲和性和可逆性结合的特点，用适当的放射性核素标记反义寡核苷酸，再与配体或其类似物结合，导向到含高密度受体的靶组织。如：c-myc 原癌基因的过表达，对细胞增殖、恶性转化和细胞凋亡有重要作用，很容易扩增，同时在肿瘤细胞表面有高密度的表皮生长因子受体，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，然后与表皮生长因子耦联，注入机体，由于受体和配体的特异性结合而在很大程度提高了反义药物的靶向性，减少了反义寡核苷酸和放射性核素对正常组织的损害。

5 应用前景及存在的问题

以放射性核素标记肿瘤相关基因的反义寡核苷酸作为治疗肿瘤的靶向药物具有穿透力强、靶向速度快、特异性强及靶/非靶摄取比值高，可在基因水平实现靶向治疗等优点。Spitzweg 等^[7]用前列腺特异抗原定向启动子表达碘/钠同向转运体基因来实现放射性核素在前列腺癌细胞的浓聚，显示了放射性核素反义技术特异性强的特点。Ou 等^[8]将血管紧张素通过多聚赖氨酸与 ¹³¹I 标记 c-myc 原癌基因的反义寡核苷酸耦联，结果表明其能更高效地聚集

在肿瘤细胞内，并显示很好的抗瘤活性。

虽然放射性核素反义寡核苷酸技术已有很多的研究，但目前尚有许多问题有待解决：选择合适的靶位、提高核素标记反义寡核苷酸与靶位的亲和力及高效导入反义寡核苷酸、核素标记的反义寡核苷酸必须被大量截留于靶组织，并保持稳定性等。

放射性核素反义治疗肿瘤既克服了单用反义寡核苷酸治疗肿瘤时用量大、对肿瘤多基因抑制不完全的缺陷，又克服了单用放射性核素靶向性低、对周围正常组织的损伤等缺点，避免了不必要的内外照射。随着基因组学、分子核医学和生物技术的发展，放射性核素反义治疗在肿瘤中的应用将会越来越广。

参 考 文 献

- 1 Kassis AI, Adelstein SJ, Mariani G. Radiolabeled nucleoside analog cancer diagnosis and therapy. *J Nucl Med*, 1996, 40(3): 301-319.
- 2 孙晗笑, 陆大祥, 刘飞鹏, 等. 转基因技术理论与应用. 郑州: 郑州医科大学出版社, 2000. 346-364.
- 3 Sedelnikova OA, Panyutin IG, Thierry AR, et al. Radiotoxicity of iodine-125-labeled oligodeoxyribonucleotides in mammalian cells. *J Nucl Med*, 1998, 39(8): 1412-1418.
- 4 Panyutin IG, Neumann RD. Sequence-specific DNA breaks produced by triplex-direct decay of iodine-125. *Acta Oncol*, 1996, 35(7): 817-823.
- 5 Cammilleri S, Perdereau B, Brixy F, et al. Imaging and biodistribution of ¹²⁵I tyramine oligonucleotide in nude mice bearing human breast tumor. Preliminary report. *Bull Cancer Paris*, 1996, 83(1): 23-26.
- 6 刘生, 刘长征, 梁碧玲, 等. 碘标记反义寡核苷酸的研究及其稳定性与生物分布的评价. *核技术*, 2004, 27(5): 365-369.
- 7 Spitzweg C, Scholz IV, Bergert ER, et al. Retinoic acid induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3423-3432.
- 8 Ou X, Tan T, He L, et al. Antitumor effects of radioiodinated antisense oligonucleotide mediated by VIP receptor. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 313-320.

(收稿日期: 2005-06-08)