

·实验核医学·

心肌缺血性疾病基因治疗及分子影像监测进展

张国鹏 张永学

【摘要】心血管疾病是严重危害人类健康的疾病,目前已成为导致死亡的主要疾病之一。随着对心血管病发病的分子机制的研究进展,以及心血管病基因治疗的实验研究,基因治疗已成为心肌缺血治疗具有前景的有效方法,其中有些已经进入临床试验以验证其可行性和有效性。而如何在活体内无创性监测治疗基因的表达及其治疗效果也成为当今亟待解决的课题。

【关键词】心肌缺血;基因疗法;分子诊断技术

Advances in gene therapy of myocardial ischemia and the monitoring with molecular imaging

ZHANG Guo-peng, ZHANG Yong-xue

(Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Key Laboratory of Molecular Imaging, Hubei Province, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 Cardiovascular diseases are harmful for people. Recent advances in understanding the molecular basis of cardiovascular diseases, together with some studies of the gene therapy on cardiovascular disorders, have offered possibilities for new treatments. Gene therapies have demonstrated potential usefulness in treating myocardial ischemia. Therefore, the monitoring of the expression of therapy gene and therapeutic efficacy has become an important issue.

【Key words】 Myocardial ischemia; Gene therapy; Molecular diagnostic technique

心血管疾病是严重危害人类健康的疾病,传统的溶栓疗法、冠状动脉旁路移植术、经皮腔内冠状动脉成形术和冠状动脉支架植入术等治疗手段可改善冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)患者的存活率,提高其生活质量。但对于冠状动脉多支血管病变、弥漫性病变或小血管病变、支架内再狭窄及慢性完全闭塞等冠心病患者来说,侧支循环的建立就具有重要的临床意义。随着对心血管发病的分子机制的进一步了解,基因治疗可以促进侧支循环的建立,为心肌缺血的治疗提供新途径^[1],其中有些已经进入临床试验阶段。

1 心肌缺血的基因治疗

基因治疗是指将治疗基因通过相应载体导入靶器官或靶组织,并使其稳定表达,以达到治疗疾病的目的。目前的基因治疗多数是在缺血心肌的局部表达具有治疗作用的细胞因子。基因治疗要想获得

成功必须具备三个条件:①选择合适的载体;②载体具有良好的靶向性;③基因表达具有特异性^[2]。

1.1 治疗基因的选择

血管生成治疗心肌缺血性疾病主要利用一些血管源性的生长因子及其编码基因^[3],包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族、血管生成素家族、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、肝细胞生长因子以及单核细胞趋化蛋白1等,目前研究最多的是VEGF和FGF。从20世纪90年代开始,就有利用促进血管生成的生长因子编码基因成功地进行治疗心肌缺血的例子,并且已用于I期、II期临床试验,尽管结果仍具有争议性^[4]。

1.2 基因治疗载体的选择

理想的载体必须具有良好的靶向性,机体毒性小,可准确地把足够的治疗基因运输到病变部位,且表达时间足够长,不具有种系传播性至下一代。常用的载体可分为病毒载体与非病毒载体,其中病毒载体常采用腺病毒、腺相关病毒、慢病毒载体;非病毒载体包括质粒、裸DNA、脂质体等^[5]。目前,在冠心病的基因治疗中非病毒载体如质粒等由

基金项目:国家自然科学基金(30571816)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科,湖北省分子影像实验室

通信作者:张永学(E-mail: zhyx1229@163.com)

于其低转染效率而限制了在基因治疗中的作用。腺病毒载体本身无致癌性,携带的外源基因不与宿主基因整合,因此被视为心血管疾病的基因转移和基因治疗的理想载体^[6]。腺相关病毒和慢病毒无细胞毒性,能持续表达治疗基因,因而是慢性心血管疾病基因治疗的合适载体^[7-9]。在心肌缺血的治疗中,腺病毒载体已经用于II期、III期临床试验,同样,质粒载体也已应用于临床试验^[9]。

1.3 基因治疗途径的选择

常见的治疗途径有直接心肌注射和血管内途径。心肌缺血性疾病基因治疗多采用开胸心肌内注射的方式导入目的基因,这种方法能够实现基因的定位转移,且已证实能获得较好的效果^[9]。目前出现一种新的心脏机械检测系统,通过介入途径从心室内腔内标测缺血心肌并实现经心内膜的定向心肌内注射。Rutanen等^[10]利用该技术进行了VEGF₁₆₅基因治疗缺血心肌,发现心肌内血管密度、血液灌注均有增加,并可以使治疗基因定位转移,治疗效果比较满意。

血管内途径主要包括血管壁局部转移和冠状动脉内注射。冠状动脉内注射即指采用经皮穿刺导管法将基因载体直接注入冠状动脉内,是目前心脏基因导入的首选方法^[11]。其优点是给药浓度集中、对机体损伤小,缺点是导管气囊充气后可造成冠状动脉血液中断,有可能加重心肌缺血。新近的研究发现,治疗性超声可以显著增加血管壁局部基因转移的效率。Lawrie等^[12]的研究表明,超声微泡可使裸质粒DNA在血管内皮细胞的转染率提高10倍,联合声学造影剂后可使转染率增加300倍。

2 心肌缺血基因治疗的分子影像监测

目前,尚无理想的体外活体监测治疗基因的方法,因而很难确定是由于治疗基因的选择不当、治疗基因的表达不高、治疗途径的不适合,或是由于体内炎症反应导致的心脏功能改善效果不佳^[13]。因此,迫切需要一种可以在体外进行活体监测基因表达的途径。

分子影像可以在体外对活体动物及人体的生物过程进行监测,可在分子水平、细胞水平阐明疾病病理机制,并且可以动态地、无创伤地、精确地监测基因治疗的效果^[14]。根据监测所用的分子探针,分子影像可以分为直接分子显像和间接分子显像。

直接分子显像利用可直接与靶受体、靶抗原、酶或mRNA相互作用的探针,通过显像设备直接检测靶抗原、靶受体或酶的定位和密度^[15-17]。

间接分子显像主要是利用报告基因和报告探针来完成。报告基因是一段导入生物体内的被修饰的核苷酸系列,能够产生容易被测量的表型(蛋白)。报告基因可以通过病毒或者非病毒载体运输到体内,在运输载体中,其启动子可分为结构性持续作用型、诱导作用型及组织特异性型。到达靶点后,报告基因表达成蛋白,报告蛋白可以被报告探针所识别,进而被分子影像探测仪器等所显示。报告基因显像的优势在于不改变所研究系统的生物学特性,可以与多种物质融合在一起,通过报告蛋白的表达情况间接地反映所联合物质在体内的生物学特性,无需针对每种靶抗原、靶受体或酶合成特异性的探针,节省了大量的人力、物力和时间^[14]。

报告基因显像被广泛应用于放射性核素成像、光学成像及MRI^[18-21],其中放射性核素报告基因显像因其灵敏度高(10^{-12} ~ 10^{-10} mol/L),被认为是最适合人体的显像技术之一^[22]。常用的放射性核素报告基因-探针系统主要包括:酶-底物系统(enzyme-substrate)、受体-配体系统(receptor-ligand)、转运体-底物系统等。

在心肌缺血血管新生过程中, $\alpha\beta$ 整合蛋白可以在新生血管内皮中高表达。因此,可以通过监测 $\alpha\beta_3$ 整合蛋白从分子水平上直接监测血管新生过程。WinterTM等^[23]设计了一种针对 $\alpha\beta_3$ 整合蛋白的顺磁的全氟碳烟曲霉素毫微型颗粒,并且在兔动脉粥样硬化模型中成功地进行了实验。近年来,出现了一种¹¹¹In标记的喹诺酮类药物¹¹¹In-RP748,与 $\alpha\beta_3$ 整合蛋白可以高度特异性结合^[24]。Meoli等^[25]在大鼠心肌梗死模型建立后2周,对实验组和对照组分别通过静脉注射了¹¹¹In-RP748和¹¹¹In-RP790,发现后者与 $\alpha\beta_3$ 整合蛋白不具有特异结合性;90min后注射²⁰¹Tl监测心肌灌注情况,则¹¹¹In-RP748可以选择性浓聚在²⁰¹Tl灌注比较低的部位;心肌缺血模型建立2周后与缺血前相比,¹¹¹In-RP748的浓聚可以增加至2倍,而对对照组无明显变化。

对转入体内的治疗基因表达情况的监测,常用的是报告基因显像监测。Inubushid等^[26]以突变型I型单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因(HSV1-sr39tk)作为报告基因,利用鸟嘌呤类衍生物¹⁸F-9-

(4-fluoro-3-hydroxymethyl butyl) guanine (^{18}F -FHBG) 作为显像剂进行 PET 报告基因显像, 成功监测了小鼠心肌内 HSV1-sr39tk 的定位、定量和表达持续时间。

Wu 等^[27] 构建了包含 VEGF₁₂₁ 基因和 HSV1-sr39tk 基因的重组腺病毒载体 (Ad-CMV-VEGF₁₂₁-CMV-HSV1-sr39tk), 将其直接注射至小鼠模型的缺血心肌周围组织 [1×10^{10} 斑块形成单位 (plaque forming unit, pfu)], 阴性对照组注射空腺病毒载体, 阳性对照组注射 Ad-CMV-HSV1-sr39tk, 通过蛋白质印迹法和酶联免疫吸附法等方法检测报告基因 HSV1-sr39tk 和治疗基因 VEGF₁₂₁ 的表达, 结果表明二者的表达具有较好相关性 ($r=0.98, P<0.001$); 随后以 ^{18}F -FHBG 作为报告探针行 Micro PET, 显像时间为 0~64 d, 结果表明, 注射治疗基因后 1 d, 基因表达达到峰值, 而到了第 14 d, 几乎见不到基因表达; 第 60 日再次注射 Ad-CMV-VEGF₁₂₁-CMV-HSV1-sr39tk (1×10^{10} pfu), 分别于 62 d、64 d 进行 Micro PET: 扫描器探测不到 ^{18}F -FHBG 的信号, 因此可以说 HSV1-sr39tk 在体内不表达, 主要是由于腺病毒的宿主免疫反应导致。

同时, 在注射病毒载体后第 2 日进行了 ^{13}N -NH₃ 心肌灌注成像和 ^{18}F -氟脱氧葡萄糖 (^{18}F -fluoro-deoxyglucose, ^{18}F -FDG) 心肌代谢成像, 结果发现, 在前壁心肌梗死并注射治疗基因的部位有明显的 ^{18}F -FHBG 浓聚, 而在心肌灌注 (^{13}N -NH₃) 和心肌代谢显像 (^{18}F -FDG) 中显像剂均呈积聚减少。免疫组化染色结果表明, 与空病毒载体对照组相比, 在重组腺病毒注射部位, 可以看到 HSV-sr39tk 蛋白强染色, VEGF₁₂₁ 蛋白在缺血心肌组织扩散, 并且可以看到 CD-31 染色阳性血管; 然而超声心动图监测心脏功能发现, 基因治疗对心脏功能并无明显的改善。由此可见, 基因表达监测敏感性优于功能学上的监测。

3 结语

基因治疗心肌缺血在动物实验和临床试验中的应用及其影像监测均取得了初步成果。尽管血管生长因子理论上存在着病理性血管新生, 可加速恶性肿瘤、视网膜病的生长或动脉粥样硬化等的发生率, 治疗基因与报告基因运输载体存在转染效率、靶向性、体内免疫反应等问题, 报告基因显像存在

报告基因与治疗基因是否能成功共同表达、宿主免疫反应等问题, 但是随着对血管生成因子作用机制、血管新生机制、新型报告基因的显像剂和新型显像技术的研究, 相信心肌缺血基因治疗及分子显像监测必将有一个广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Ylä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy[J]. *Lancet*, 2000, 355(9199): 213-222.
- [2] Wu JC, Yla-Herttuala S. Human gene therapy and imaging: cardiology [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2005, 32(Suppl 2): S346-S357.
- [3] Markkanen JE, Rissanen TT, Kivela A, et al. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart-gene therapy [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 656-664.
- [4] Wu JC, Bengel FM, Gambhir SS. Cardiovascular molecular imaging [J]. *Radiology*, 2007, 244(2): 337-355.
- [5] Wu JC, Taeng JR, Gambhir SS. Molecular imaging of cardiovascular gene products [J]. *J Nucl Cardiol*, 2004, 11(4): 491-505.
- [6] 黎军, 何国祥, 唐兵. 腺病毒介导的 AT-2R 基因转染对培养大鼠颈动脉内膜增生的影响[J]. *重庆医学*, 2005, 34(5): 723-724.
- [7] Morahan PE, Samulski RJ. AAV vectors: is clinical success on the horizon? [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(1): 24-30.
- [8] Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(1): 20-23.
- [9] Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 694-701.
- [10] Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, et al. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart [J]. *Circulation*, 2004, 109(8): 1029-1035.
- [11] Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, et al. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(2): 263-270.
- [12] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(23): 2023-2027.
- [13] Pialaru S, Janssens SP, Gersh BJ, et al. Defining gene transfer before expecting gene therapy: putting the horse before the cart [J]. *Circulation*, 2002, 106(5): 631-636.
- [14] Tran TD, Caruthers SD, Hughes M, et al. Clinical applications of perfluorocarbon nanoparticles for molecular imaging and targeted therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2007, 2(4): 515-526.
- [15] Meoli DF, Sadeghi MM, Krassilnikova S, et al. Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(12): 1684-1691.
- [16] Schelbert HR. ^{18}F -deoxyglucose and the assessment of myocardial viability [J]. *Semin Nucl Med*, 2002, 32(1): 60-69.

- [17] Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Antisense imaging of gene expression in the brain in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(26): 14709-14714.
- [18] Iyer M, Barrio JR, Namavari M, et al. 8-[18F] Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET [J]. J Nucl Med, 2001, 42(1): 96-105.
- [19] Wang ZZ, Qu W, Wang F, et al. Expression of somatostatin receptor reporter gene and its correlation with targeted imaging in vivo for detection of pancreas carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2005, 27(11): 663-666.
- [20] Tsakiridis A, Tzouanacou E, Larralde O, et al. A novel triple fusion reporter system for use in gene trap mutagenesis [J]. Genesis, 2007, 45(6): 353-360.
- [21] Glunde K, Bhujwala ZM. Will magnetic resonance imaging (MRI)-based contrast agents for molecular receptor imaging make their way into the clinic?[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(1):187-188.
- [22] Lewis MR. A "new" reporter in the field of imaging reporter genes: correlating gene expression and function of the sodium/iodide symporter [J]. J Nucl Med, 2006, 47(1): 1-3.
- [23] Winter PM, Neubauer AM, Caruthers SD, et al. Endothelial alpha (v)beta3 integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(9): 2103-2109.
- [24] Harris TD, Kalogeropoulos S, Nguyen T, et al. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin alpha v beta 3 receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18(4): 627-641.
- [25] Meoli DF, Sadeghi MM, Krassilnikova S, et al. Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction [J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1684-1691.
- [26] Inubushi M, Wu JC, Gambhir SS, et al. Positron-emission tomography reporter gene expression imaging in rat myocardium[J]. Circulation, 2003, 107(2): 326-332.
- [27] Wu JC, Chen IY, Wang Y, et al. Molecular imaging of the kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium [J]. Circulation, 2004, 110(6): 685-691.

(收稿日期: 2008-06-10)

放射性碘间接标记抗体方法的研究进展

李楠 李培勇

【摘要】放射性碘标记单克隆抗体已广泛应用于临床疾病的诊治。内化型抗体的应用越来越受到重视,常规运用的碘直接标记法包括 Iodogen 标记法、氯胺-T 标记法等,制备的碘标记单克隆抗体在体内容易脱碘和损伤抗体免疫活性的特性而阻碍了其在体内应用。如何对抗体进行有效的碘标记来减少体内脱碘和抗体免疫活性损伤,对运用碘标记抗体进行肿瘤治疗是十分重要的,研究表明,间接标记法是一种较为恰当的方案。

【关键词】同位素标记;碘放射性同位素;抗体,单克隆

The recent development of the strategy for indirect antibody radiolabel with iodine

LI Nan, LI Pei-yong

(Department of Nuclear Medicine, Shanghai Ruijing Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Radioiodine labeled monoclonal antibodies have been widely used in the diagnosis and treatment of diseases. With the more and more attention which is attached to the application of the internalized McAb. The usual direct labeling methods, including Iodogen and chloramine-T, lead to obvious deiodination and decline of the McAb's immunological activity which impede their utilization in vivo. There is great importance for the tumor treatment with the radioiodine labeled antibodies to invent a new method in order to avoid the disadvantage described above. It is showed that indirect labeling way is a suitable strategy. In this review, we are introducing the recent advance of this method.

【Key words】 Isotope label; Iodine radioisotopes; Antibodies, monoclonal

1 传统直接碘标记方法所暴露的弊端

传统的放射性碘标记法主要采用直接标记的方

式,包括 Iodogen 标记法、氯胺-T 标记法、乳过氧化物酶标记法等,前两种方法使用较为普遍^[1-2],二者都是通过氧化碘化钠,使得碘分子直接结合在化合物酪氨酸苯环羟基的邻位而达到标记的目的,