

Survivin 反义寡核苷酸的^{99m}Tc 标记及在肝癌细胞中的表达

高再荣, 张凯军, 张永学

【摘要】 目的: 研究放射性核素^{99m}Tc 标记 Survivin 反义寡核苷酸(ASON)的方法及在肝癌细胞中的动力学, 探讨用于肝癌诊断的可能性。方法: 用 DNA 合成仪合成 18 碱基单链 Survivin ASON, 在 5' 末端经氨基修饰后, 用 S-acetyl-NHS-MAG₃ 作螯合剂, 进行^{99m}Tc 标记 Survivin ASON, 并对其标记率、放化纯、比活度、稳定性、细胞摄取率和细胞清除率进行了研究。结果: ^{99m}Tc-MAG₃-ASON 的标记率为 65.22%, 放化纯为 94%, 比活度为 1190kBq/μg。室温条件下与生理盐水温育 4h 后, 其放化纯为 92%。37℃ 5% CO₂ 条件下与新鲜人血清温育 4h, 未见明显的血清蛋白结合作用。肝癌细胞摄取率 10h 达 12.73%, 细胞滞留率 8h 为 54.22%。结论: 采用 S-acetyl-NHS-MAG₃ 作螯合剂标记 Survivin-ASON 的方法可行, 可获得较好的标记效果, ^{99m}Tc-survivin-ASON 在肝癌细胞中有较理想的摄取率, 可进一步研究用于肿瘤基因显像诊断的可能性。

【关键词】 基因; Survivin; 寡核苷酸类, 反义; 锝; 放射性核素显像; 肝肿瘤; 细胞

【中图分类号】 R817.4; R735.7 【文献标识码】 A 【文章编号】 1000-0313(2004)01-0050-03

Labeling of survivin antisense oligonucleotide with ^{99m}Tc and the research on the expression of ^{99m}Tc surviving ASON in hepatocellular carcinoma GAO Zai-rong, ZHANG Kai-jun, ZHANG Yong-xue. Department of Nuclear Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, P. R. China

【Abstract】 **Objective:** To establish a new labeling method of survivin antisense oligonucleotide (ASON) with technetium 99m (^{99m}Tc) and investigate the possibility of diagnosing hepatocellular carcinoma using ^{99m}Tc surviving ASON labeling. **Methods:** An 18 base single stranded antisense oligonucleotide sequence was synthesized and linked with a primary amine on the 5' end. The survivin ASON was labeled with ^{99m}Tc by conjugating the chelator Sacetyl NHS MAG 3. The properties of ^{99m}Tc surviving ASON, such as radiolabeling efficiency, radiochemical purity, were studied. **Results:** The radiolabeling efficiency, radiochemical purity and specific activity of ^{99m}Tc surviving ASON were 65.22%, 94% and 1190kBq/μg, respectively. The accumulation rate in hepatocellular carcinoma reached 12.73% at 10h. After incubation with normal saline at room temperature for 4h, the radiochemical purity was still 92%. No evidence for serum protein binding was observed after incubation with fresh human serum at 37℃ in 5% CO₂ for 4h. **Conclusion:** The labeling method of survivin ASON with ^{99m}Tc, conjugated by Sacetyl NHS MAG 3, has been successfully proved. ^{99m}Tc surviving ASON can be effectively taken in hepatocellular carcinoma, which may be used hopefully for clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma in the future.

【Key words】 Genes; Survivin; Oligonucleotides, antisense; Technetium; Radionuclide imaging; Liver neoplasms; Cells

Survivin 基因是新近发现并被认为是一个极具潜在价值的肿瘤标志物^[1]。我们试图研究将 Survivin 基因作为显像剂用于肿瘤基因显像的可能性, 但 Survivin 基因的放射性核素标记方法尚未见报道。

本文采用核酸标记中应用较普遍的巯基乙酰基三甘氨酸(MAG₃)作为螯合剂, 用放射性核素锝-99m(^{99m}Tc)标记 Survivin 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASON), 并对其生物学特性及在肝癌细胞中的表达情况进行了研究, 以探讨 Survivin ASON 的^{99m}Tc 标记方法, 并评价其用于肝癌基因显像诊断的可能性。

材料与方法

1. 实验材料的合成与制备

Survivin ASON 碱基序列为 5'-TGTGCTATTC TGTGAAT-3', 5' 末端加氨基修饰(由上海生工生物制品有限公司合成)。

S-acetyl-NHS-MAG₃(S-乙酰基-N-羟基琥珀酰亚胺巯基乙酰基三甘氨酸)。由美国麻萨诸塞州大学医学院 Hnatowich 教授赠送。

MAG₃-ASON 的制备: 取 Survivin ASON 165μg, 以碳酸氢盐缓冲液溶解, 配制成浓度为 2μg/μl 的溶液, 加入用无水二甲基甲酰胺(DMF)新鲜配制的 Sacetyl-NHS-MAG₃(0.3mg)溶液, 室温下避光放置 20min, 经 P-4 层析柱(0.7×20cm, Bio-Rad 公司产品)以醋酸胺缓冲液洗脱, 按每管 0.4ml 收集。经 260nm 紫外分光检测 ASON 含量, 收集峰管。每管按 10μg 分装, -20℃储存备用。

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

作者简介: 高再荣(1965-), 男, 湖北浠水人, 副教授, 副主任医师, 主要从事肿瘤核医学工作。

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金资助项目(编号 2002A B121)

2. ^{99m}Tc 标记 $\text{MAG}_3\text{-ASON}$

取 $\text{MAG}_3\text{-ASON}$ 20 μg , 以 100 μl 0.25M 醋酸胺缓冲液 (pH 5.2) 溶解, 用新鲜配制的 0.5M 酒石酸钠溶液调节 pH 值至 7.6, 使酒石酸钠最终浓度为 6~7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。依次加入 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 新鲜淋洗液 74MBq (2~10 μl) 和新鲜配制的 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 氯化亚锡溶液 2 μl (每 10 μg DNA 加入 1 μg 氯化亚锡, 以 1mM 的盐酸溶解)。混匀后在室温下反应 15min, 按上述方法分离纯化。测量各管放射性计数, 检测 ASON 含量, 收集峰管, 计算标记率。

3. ^{99m}Tc 直接标记 ASON

取未经化学修饰的 ASON 20 μg , 以三蒸水溶解后加入 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 新鲜淋洗液 74MBq (2~10 μl) 和新鲜配制的 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 氯化亚锡溶液 2 μl 。混匀后在室温下反应 30min, 按上述方法分离纯化、测量及计算结果。

4. 细胞培养

人源肝癌细胞 SMMG-7721 由华中科技大学同济医学院免疫教研室提供, 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI-1640 (美国 GIBCO 公司) 培养基培养。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下单层贴壁生长, 当细胞生长汇合达 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶与 0.02% EDTA 溶液 (1:1) 消化, 然后悬浮在 1% 的胎牛血清培养基中备用 [细胞浓度为 $(1\sim 2) \times 10^5/\text{ml}$]。

5. 细胞摄取实验

①以 1% 的胎牛血清稀释标记 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-ASON}$ 至浓度为 0.02~0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ②向用磷酸盐缓冲液预湿的 24 孔培养板每孔加入上述细胞悬液 1ml, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中单层贴壁生长 24h (培养板用磷酸盐缓冲液预湿以保证细胞贴壁生长的一致性), 然后换成 1% 的胎牛血清培养基继续培养 10h 左右, 直到 80%~90% 的细胞汇合, 用台盼蓝排除法鉴定细胞的活力须大于 85%; ③向上述培养板每孔内加入 1ml 标记的 ASON, 分别于 1、2、4、8 和 10h 按下面方法终止细胞摄取反应 (每时间点取 4 个平行孔); ④在终止细胞摄取时, 先将培养板每孔中的培养基吸出, 用 PBS 冲洗 3~4 次, 以除去未被结合的标记物。然后向每孔中加入 1ml 0.2M 的 NaOH 溶液和 1% 的 SDS 溶液溶解贴壁生长的细胞, 取出每孔的溶液置于试管中, 以 γ 计数器测量放射性计数, 标准源跟样测量进行衰变校正, 计算出各时间点的细胞摄取率。

6. ^{99m}Tc -ASON 的放射化学纯度分析

先以 10ml 无水乙醇、10ml 1mM 盐酸及 5ml 空气清洗 Sep-PaK C₁₈ 反相柱。将经 Sephadex G-25 凝胶柱分离纯化后的 ^{99m}Tc -ASON 上样后, 以 10ml 1mM HCl 去除

游离的 $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 再以 10ml 无水乙醇与生理盐水 (1:1) 洗脱出标记的寡核苷酸, 检测其放射性计数。放射性胶体将残留于柱中。

7. ^{99m}Tc -ASON 的稳定性

取 20 μCi ^{99m}Tc -ASON 与新鲜人血清和洗脱液 (生理盐水) 孵育, 分别于 5min、1、4 和 24h 以 Sep-PaK C₁₈ 反相柱检测放化纯。

8. 清除实验

向培养有 SMMG-7721 肝癌细胞的培养板中加入 80ng 的标记物 (体积为 1ml, 以 RPMI 1640 培养基配置), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育 16h (使其摄取尽量达到最大值时取出) 后, 用 1ml PBS 轻轻漂洗 2~3 次。取出其中 4 孔细胞溶解后溶液作为细胞摄取的总计数 (方法同细胞摄取实验), 其余各孔加入新鲜的 RPMI 1640 培养基继续孵育, 分别于 1、2、4、6 和 8h 按同样的方法测量细胞内放射性计数, 计算各时间点细胞内滞留率。

结 果

$^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-ASON}$ 的标记率为 $(65.22 \pm 6.87)\%$, 放化纯为 94%, 比活度为 1190kBq/ μg 。用 ^{99m}Tc 直接标记未经修饰的 ASON 测得的非特异性结合率为 2.7% (n 均为 5), 表明 ^{99m}Tc 对 ASON 的标记是通过 MAG_3 偶合进行的。

^{99m}Tc -ASON 的稳定性: 在室温条件下, 与生理盐水温育 4h 和 24h 后, 放化纯分别为 92% 和 86%。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 与新鲜人血清温育至 4h 时, 放射峰未见移动, 形态未发生明显改变, 说明未发生明显的血清蛋白结合反应; 但温育至 24h 时, 放射峰出现向前移动和变宽, 提示发生了血清蛋白结合反应, 放射峰向分子量大的方向移动, 峰的形态出现了改变。

肝癌细胞对 ^{99m}Tc -ASON 的摄取动力学: 随着温育时间的延长, ^{99m}Tc -ASON 在肝癌细胞中的摄取量呈上升趋势, 具体数据为 1h $(4.14 \pm 0.17)\%$ 、2h $(6.12 \pm 0.34)\%$ 、4h $(10.52 \pm 1.15)\%$ 、8h $(11.24 \pm 0.96)\%$ 、10h $(12.73 \pm 1.43)\%$ 。1~2h、2~3h、3~4h、4~5h 时间点之间的比较, t 值分别为 10.417 ($P < 0.05$)、7.338 ($P < 0.05$)、0.961 ($P > 0.05$) 和 1.731 ($P > 0.05$), n 均为 4。可见温育 4h 后, 肝癌细胞对 ^{99m}Tc -ASON 的摄取率进入平台期。

^{99m}Tc -ASON 的清除动力学: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的条件下, SMMG-7721 肝癌细胞与 ^{99m}Tc -ASON 孵育 16h, 尽量使 ^{99m}Tc -ASON 的细胞摄取率达到最大值。经过充分漂洗后继续培养, 于不同时间测量细胞中的放射性计

数, 计算各时间点的细胞内滞留率, 以评价^{99m}Tc-ASON 在细胞内的稳定性。具体数据分别为 1h (88.12±2.96)%, 2h (76.10±4.71)%, 4h (65.55±7.12)%, 6h (62.23±7.48)%, 8h (54.22±8.03)%。

讨 论

肿瘤反义基因显像诊断是近年来研究的热点之一。反义基因显像是通过人工合成的方法在体外合成与特定癌基因(DNA 或 RNA)能互补结合的单链寡核苷酸, 进行放射性核素标记后引入体内, 与癌细胞内的 DNA 或 RNA 发生特异性结合, 采用显像设备在体外显像, 从而达到肿瘤诊断的目的。理论上反义基因显像的特异性强, 并具有早期诊断的价值。

Survivin 基因是新近发现的高表达于人类大多数肿瘤组织, 而在终末分化的成人组织(胸腺、生殖腺除外)中则不表达的一种癌基因^[1]。初步的研究表明^[2,3], Survivin 基因参与了肿瘤的发生、发展, 与预后和肿瘤的耐药性也存在关联, 被认为是一个极具潜在价值的肿瘤标志物。因此, 我们试图研究 Survivin 基因用于肿瘤显像的可能性, 但其标记方法尚未见报道。

目前基因显像最常用的放射性核素是^{99m}Tc, 但由于空间位阻效应等原因, ^{99m}Tc 常不能直接标记核酸。本文结果也证实了这点, 直接标记率平均仅 2.7%, 因此核酸标记需用螯合剂。适合^{99m}Tc 标记的螯合剂主要有 HYNIC、MAG₃ 和 DTPA。这三种螯合剂的标记方法都不是很复杂, 标记条件也很温和, 但各有利弊, 如 DTPA 的标记物稳定性不佳。HYNIC 的标记物很稳定, 但与血清蛋白有很强的非特异性结合倾向, 这种情况对大分子物质如蛋白质的影响不会太大, 但对多肽和寡核苷酸的影响则非常明显。起初用作螯合剂的 MAG₃ 是由苯甲基基团进行硫保护, 在进行^{99m}Tc 标记前需要在 100℃高温下进行脱水反应以去除该保护基团, 故对稳定敏感的物质进行标记时就极为不利。后来 Winnard 等^[4]合成了一种新型的 MAG₃ 产物, 即 S-acetyl-NHS-MAG₃, 具有以下显著特点: ①采用二步法合成, 合成过程简单; ②终产物含有 NHS 基团, 有利于与伯胺基团进行偶联; ③采用乙酰基取代苯甲酰基进行硫保护, 因乙酰基易于脱去从而使得标记更加容易, 可在中性 pH 及室温条件下完成; ④在乙酰基的保护下, 该螯合剂非常稳定, 甚至可在室温下长时间存放, 便于运输和储存。研究结果表明本研究采用 S-acetyl-NHS-MAG₃ 标记 Survivin ASON 的方法可行、简便, 标记条件温和, 反应条件易控制, 螯合剂的偶联作用好, 其标记

率较高, 可达 65.22%。采用这种螯合剂标记的 ASON 经分离纯化后可获得较高的放化纯, 在体外性质稳定, 室温下在生理盐水中温育 4h, 其放化纯仍为 92%, 与新鲜人血清温育 4h 后, 亦未见有明显的血清蛋白非特异性结合作用, 在人源性肝癌细胞 SMMC-7721 中的摄取率达到 12% 以上。说明采用本研究方法合成的^{99m}Tc 标记 Survivin ASON 标记后的 ASON 活性正常, 性质稳定, 肿瘤细胞摄取率理想, 可进一步研究其在肿瘤细胞中的摄取特性, 以探讨用于肿瘤基因显像诊断的可能性。

Winnard 等^[4]也报道了 S-acetyl-NHS-MAG₃ 作为螯合剂标记 ASON 时标记条件温和(室温、中性 pH), 标记率高, 无明显血清蛋白结合反应, 认为是一个用于标记 DNA 很好的双功能螯合剂。最近有人用 MAG₃ 作为螯合剂用于^{99m}Tc 标记肽作为肿瘤受体显像剂也取得了很好的效果^[5]。更有人用 S-acetyl-NHS-MAG₃ 作为螯合剂用于¹⁸⁸Re 标记抗体用于炎症显像诊断, 同样得到了理想的结果^[6]。

核素标记的 ASON 在靶细胞中摄取量是受反义机制、ASON 在血液中的稳定性、细胞内溶酶体的分解作用、ASON 进入细胞后的洗脱作用等因素的影响^[7], 使得 ASON 在靶细胞中的聚集量远未达到人们预期的程度。

参考文献:

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [2] Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaihara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2002, 95(9): 1938-1945.
- [3] Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11(1): 33-40.
- [4] Winnard P Jr, Chang F, Ruscowski M, et al. Preparation and use of NHS-MAG₃ for technetium-99m labeling of DNA[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24(5): 425-432.
- [5] Okarvi SM, al-Jammaz I. Synthesis, radiolabelling and biological characteristics of a bombesin peptide analog as a tumor imaging agent[J]. Anti-cancer Res, 2003, 23(3B): 2745-2750.
- [6] Crudo JL, Edreira MM, Obenaus ER, et al. Optimization of antibody labeling with rhenium-188 using a pre-labeled MAG₃ chelate[J]. Int J Pharm, 2002, 248(1-2): 173-182.
- [7] Zhang YM, Wang Y, Liu N, et al. In vitro investigations of tumor targeting with^{99m}Tc-labeled antisense DNA[J]. J Nucl Med, 2001, 42(11): 1669-1669.

(收稿日期: 2003-08-08 修回日期: 2003-09-21)