

文章编号: 1001-098X(2005)05-0238-04

PET 报告基因显像研究进展

赵伟 张秀丽

摘要 近 20 年的基因研究已经取得了许多研究成果,使基因治疗从实验室走向临床治疗成为可能。然而体内基因表达的监测仍有许多至关重要的问题没有解决,随着技术的发展,利用特定的报告基因和报告探针行 PET 显像,去推测基因在体内的表达成为可能。通过 PET,不但能够正确理解基因治疗的过程,也为基因治疗的发展和用于临床提供了依据。

关键词 基因治疗;正电子发射体层扫描;报告基因

中图分类号 R817.4 文献标识码 A

The progress of PET based reporter gene imaging

ZHAO Wei, ZHANG Xiu-li

(PET Center, Shandong Oncology Hospital & Institute, Jinan 250117, China)

Abstract More than two decades of intense research have allowed gene therapy to move from the laboratory to the clinical setting, where its use for the treatment of human pathologies has been considerably increased in the last years. However, many crucial questions remain to be solved in this challenging field. In vivo imaging with positron emission tomography (PET) by combination of the appropriate PET reporter gene and PET reporter probe could provide invaluable qualitative and quantitative information to answer multiple unsolved questions about gene therapy. PET imaging could be used to define parameters not available by other techniques that are of substantial interest not only for the proper understanding of the gene therapy process, but also for its future development and clinical application in humans.

Key Words gene therapy; positron emission tomography; reporter genes

在最近几年,大量的基因疗法已用于治疗人类疾病,但有些治疗结果令人失望。因为体内基因表达的监测尚有许多问题没有解决。随着技术的发展,分子核医学特别是正电子发射体层扫描(positron emission tomography, PET)可望在这方面显示出其巨大的潜力。

1 PET 基因显像的回顾

1982年, Saito 等首先提出应用单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶(herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, HSV1-TK)进行基因表达显像。然而,直到 1995 年 Truvajev 等才应用报告基因和报告酶解物作为基因的显像获得成功。数月之后,基于此观念的基因治疗监测技术被提出。PET 很快被证明在测量和识别不同水平 HSV1-TK 的基因表达方面是最好的^[1]。

2 报告基因显像的技术和方法

2.1 分子基因显像的分类

大致有 3 种方式^[2,3]:直接显像、间接显像、替代显像。直接显像指探针与抗原决定簇、酶结合后的显像,并可测定其位置与强度。临床核医学有许多直接显像的实例,如放射性标记的抗原抗体显像、放射性标记的反义核苷酸(radiolabeled antisense oligonucleotides, RASONS)对特定的 mRNA 或蛋白的显像、¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG)作为示踪剂反映己糖激酶活动的显像等。间接显像非常复杂,将在下面详述。替代显像是用来推测下游的一个或多个内源性基因表达过程的显像,然而,替代显像是否有代表性及是否与目的基因有直接相关方面还需要进一步的验证。

2.2 报告基因显像的条件

报告基因显像中的标记基因和标记底物应具有以下特征:①标记基因即报告基因在正常宿主细

胞中不表达, 基因产物是酶, 能在宿主细胞内表达, 对细胞无毒, 能与标记底物发生分解反应, 分解产物蓄积在转染细胞内; ②当报告基因未表达时, 在宿主细胞内不应有报告探针的蓄积; ③标记底物与标记基因匹配, 在宿主中不能或缓慢分解, 在非转染组织中不蓄积; ④报告基因产物不能扰乱细胞的正常功能; ⑤报告产物应无免疫反应; ⑥能用适当的核素进行放射性标记, 用 γ -像机、SPECT或PET进行临床试验, 标记底物能迅速通过细胞膜, 被标记基因底物代谢和在转染细胞内有效滞留一段时间, 积聚水平能用显像技术探测到; ⑦标记底物在转染细胞内积聚须反映基因产物的活性及在转染组织中标志基因的表达。

2.3 PET 报告基因和 PET 报告探针

2.3.1 概念

报告基因 PET 是以正电子放射性核素标记的报告探针为显像剂, 对报告基因表达进行显像定位的方法。报告探针是正电子放射性核素标记的配体, 其作用机制是受体-配体间的作用, 经过基因转导可明显提高靶细胞特异性受体的表达。

2.3.2 理想的 PET 报告基因和报告探针的条件

①报告基因不表达, 报告探针不应在细胞内积聚; ②在非靶细胞内尽可能的不表达或少表达、不产生代谢产物, 在靶细胞内稳定和高效的表达。不能影响表达基因的测定; ③PET 报告探针显像信号应与体内 PET 报告基因 mRNA 和蛋白质水平具有良好的相关性, 应当对宿主细胞无毒、不产生免疫源性、与 PET 报告基因关联、能够被代谢; ④PET 报告探针应容易用各种放射性核素标记而不改变其性质, 并应具有高活性。

2.3.3 报告基因表达的过程

报告基因被一定的受体载入靶细胞, 在靶细胞报告基因 DNA 被转录为相应的 mRNA, 经过加工、翻译转化为 PET 报告蛋白, 当给予报告探针药物后, 它应当仅被靶细胞摄取表达特定的 PET 报告蛋白, 从而能够产生 PET 定位图像。

3 PET 报告基因的分类及研究进展

至今有很多种类的报告基因被应用, 但仅有 3 大类被用于报告基因 PET 显像: 酶类、受体类和载体类。

3.1 以酶为基础的 PET 报告基因

HSV1-TK 是应用较广的 PET 报告基因。胸苷激酶(thymidine kinase, TK)能催化 ATP 的 γ -磷酸转移到胸苷 5'端, 形成胸苷脱氧核苷酸(deoxythymidine - 5'-monophosphate, dTMP)。细胞感染 HSV1-TK 基因后, 能表达病毒 TK, 使嘧啶和嘌呤核苷衍生物被磷酸化, 一旦磷酸化即可滞留于细胞内。两类主要底物嘌呤核苷衍生物和无环鸟苷衍生物用¹³¹I、¹²⁵I、¹³⁴I、¹²³I 和 ¹⁸F 等标记最近被作为报告探针用于 HSV1-TK 报告基因显像研究。如 Bengel FM 等^[4]用猪而 Simoes MV 等^[5]用小鼠应用嘌呤核苷衍生物 ¹²⁴I-2'-氟-2-脱氧-1- β -D-阿拉伯呋喃糖-5-碘-腺嘧啶 (¹²⁴I-2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-1-beta-darabino-furanosyluracil, ¹²⁴I-FIAU)作为报告探针行 PET 显示 HSV1-TK 报告基因表达。用携带 HSV1-TK 报告基因的腺病毒作载体将 HSV1-TK 报告基因通过外周静脉注射的方式引入动物心脏, 造成心脏感染, 用 PET 进行动态显像研究表明, FIAU 可定量 HSV1-TK 报告基因的表达。Simoes MV 等还应用大鼠离体心脏进行了报告探针的动力学研究, 认为有些核苷类似物可显著抑制 ¹²⁴I-FIAU 摄取, 从而影响基因显像。Ponde DE 等^[6]应用无环鸟苷衍生物 ¹⁸F-9-[4-氟-3-(羟甲基)-丁基]鸟嘌呤 (¹⁸F-9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)-butyl]-guanine, FHBG)作为报告探针用于小鼠转染 HSV1-TK 报告基因的肺部显像, 结果显示 HSV1-TK 能在肺部蓄积。Miyagawa M 等^[7]应用 24 只小鼠和 8 头猪对比了 ¹⁸F-FLAU 和 ¹⁸F-FHBG 对 HSV1-TK 报告基因的 PET 显像, 结果显示 ¹⁸F-FLAU 和 ¹⁸F-FHBG 在不同种类的动物中对转染的心肌显像均是可行的, 心肌对于 ¹⁸F-FLAU 和 ¹⁸F-FHBG 应用的动力学不同, 同时发现 ¹⁸F-FHBG 对于 HSV1-TK 显像更好, ¹⁸F-FHBG 随着时间的增加在心肌中的摄取增加, 在 105~120 min 时达最大值, 而 ¹⁸F-FLAU 的最大摄取仅在 10~30 min 时。

3.2 以受体为基础的 PET 报告基因

3.2.1 多巴胺 D₂ 受体 (dopamine type 2 receptor, D₂R) 报告基因系统

其作用机制为通过放射性或酶等标记的配体与 D₂R 结合而在表达 D₂R 报告基因的组织中蓄积显像。配体包括 3-(2'-¹⁸F-氟乙基环哌啶酮 (3-(2'-¹⁸F-fluoroethyl)-spiperone, ¹⁸F-FESP)、¹²³I-碘苯酰胺

(iodobenzamide, ^{123}I -IBZM)和 ^{11}C -雷氯必利(^{11}C -raclopride)等。Jucaite A 等^[8]将 ^{11}C -雷氯必利等作为配体应用 PET 对 10 例正常儿童和 12 例多动症患者多巴胺受体进行了对比研究,结果显示在多动症患儿的中脑中,多巴胺传送结合蛋白的量显著低于正常儿童,提示多巴胺信号在多动症患儿中是改变的。Aung W 等^[9]应用 D_2R 作为报告基因, ^{11}C -(S)-N-[(1-乙基-2-吡咯烷基)甲基]-55-溴-2,3-二甲氧基苯甲酰胺(^{11}C -(S)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-55-bromo-2,3-dimethoxybenzamide, ^{11}C -FLB 457)作为探针,通过构建包含 D_2R 基因的质粒植入裸鼠体内,用 D_2R -FLB 457 进行基因 PET 的定量研究,结果显示 D_2R -FLB 457 报告基因探针系统可有效测定基因在体内的表达。 D_2R 系统的优点为它是相对高比活度(185~370 GBq/ μmol)的报告探针,缺点为受体-配基结合的数量有限,不像 HSV1-TK 报告基因对底物酶的转换有信号放大作用。

3.2.2 生长抑素受体亚型 2 (somatostatin receptor subtype 2A, SSTR2) 报告基因系统

SSTR 受体分为 5 个亚型,广泛分布于脑、胃肠道、胰腺、肾脏及脾脏,与中性生长抑素肽结合。其作用机制为:用腺病毒感染细胞后,病毒 DNA 进入细胞核开始转录并在细胞质内翻译。SSTR 表达在细胞表面,结合并内化放射性标记肽可显示基因表达水平。生长抑素及相关类似物与受体结合后能产生抑制信号,在癌细胞中有抗增殖效应。SSTR2 报告基因配体较多,但是用于临床研究较多的是 ^{111}In -奥曲肽,其衍生物经 ^{64}Cu 或 ^{68}Ga 等标记后可用于 PET,而用 ^{18}F 标记的奥曲肽衍生物的临床可行性及临床前期研究也取得初步成果,如 Wester HJ 等^[10]详述了 ^{18}F 标记的奥曲肽衍生物善得定的合成、动力学和临床应用,结果显示对 SSTR2 的 PET 令人满意。Ginj M 等^[11]应用 ^{111}In -奥曲肽对比研究了人生长抑素受体 5 种亚型的显像,发现人 SSTR2 在裸鼠肿瘤细胞中 PET 最好,作者还建议可作为放疗靶向治疗的影像学依据。

3.3 以载体为基础的 PET 报告基因

基因编码载体蛋白与特定的示踪剂结合进入细胞作为报告基因。在此类报告基因中,Na/I 同向转运体(sodium iodide symporter, NIS)也许是最好的应用最广的报告基因载体,尽管其他的如去甲肾上

腺素载体也被应用^[12]。

NIS 主要在甲状腺中表达,尽管它也在唾液腺、胃、胸腺、乳腺及其他组织中低表达。当用 ^{123}I 或 ^{131}I 标记时,它可以用 γ -照像机摄像,而用 ^{124}I 标记时则可以用 PET^[13]。Shin JH 等^[14]用种植结肠肿瘤细胞的小鼠转染 HSV1-TK 和 NIS 进行了 PET 比较,认为 NIS 是潜力很大的 PET 报告基因。Niu G 等^[15]用人 NIS(human NIS, hNIS)作为报告基因行 PET,结果显示可监测转染了人肺癌细胞的小鼠在基因治疗时基因表达的位置、数量和表达时间。

每一种报告基因和报告探针均有自己的优缺点,现在的研究似乎倾向于应用 HSV1-TK,因其免疫源性比 hD_2R 、 hSSTR2 或 hNIS 大得多,然而 Yaghoubi SS 等^[16]的研究表明:它们作为 PET 报告基因,敏感性无显著性差异。因此,近年来更复杂、更深入的 PET 报告基因研究也已经开展。

4 PET 报告基因显像展望

4.1 多峰双功能基因显像

多峰性分子显像是一个新的和非常有意义的显像方式,它克服了以上每一种基因显像的局限性。构建一种双功能基因可以有两种显像方式:光学仪器显像和 PET,即双功能基因显像指应用绿色荧光和 HSV1-TK 融合蛋白,在体外组织用显微镜显像而在体内通过 PET。Ray P 等^[17]应用海洋腔肠动物的荧光与 HSV1-sr39TK 的融合蛋白在体外通过生物发光显像、在体内通过 PET 获得成功。Doubrovin M 等^[18]通过双功能或三功能报告基因融合技术,使小鼠能够通过荧光和生物体发光显像及 PET 成像。

4.2 二步转录放大系统(prostate specific two step transcriptional amplification, TSTA)

有些组织特异性的启动子有时因为转录活性太弱而不能在体内成像,这种启动子可以应用荧光素酶和 HSV1-sr39TK 等形成嵌合抗体、转录后增强基因产物及标志物活性和转录放大方法增加标志物的水平从而显像。这种显像被称为 TSTA。Iyer M 等^[19]应用 TSTA 及转基因技术把萤火虫荧光素酶转染到小鼠体内,结果显示通过特定的前列腺启动子,在 3 周后转基因鼠的前列腺比其他器官表现出更高的生物光效应,从而使信号相对弱的报告基因的表达起到放大作用。

参 考 文 献

- 1 Tjuvajev JG, Avril N, Oku T, et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19): 4333-4341.
- 2 Blasberg R. PET imaging of gene expression[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(16): 2137-2146.
- 3 Blasberg RG, Tjuvajev JG. Molecular-genetic imaging: current and future perspectives[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(11): 1620-1629.
- 4 Bengel FM, Anton M, Richter T, et al. Noninvasive imaging of transgene expression by use of positron emission tomography in a pig model of myocardial gene transfer[J]. *Circulation*, 2003, 108(17): 2127-2133.
- 5 Simoes MV, Miyagawa M, Reder S, et al. Myocardial kinetics of reporter probe 124I-FIAU in isolated perfused rat hearts after in vivo adenoviral transfer of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene[J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(1): 98-105.
- 6 Ponde DE, Dence CS, Schuster DP, et al. Rapid and reproducible radiosynthesis of [¹⁸F] FHBG[J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31(1): 133-138.
- 7 Miyagawa M, Anton M, Haubner R, et al. PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene[J]. *J Nucl Med*, 2004, 45(11): 1917-1923.
- 8 Jucaite A, Fernell E, Halldin C, et al. Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(3): 229-238.
- 9 Aung W, Okauchi T, Sato M, et al. In-vivo PET imaging of inducible D2R reporter transgene expression using [¹¹C]FLB 457 as reporter probe in living rats[J]. *Nucl Med Commun*, 2005, 26(3): 259-268.
- 10 Wester HJ, Schottelius M, Scheidhauer K, et al. PET imaging of somatostatin receptors: design, synthesis and preclinical evaluation of a novel ¹⁸F-labelled, carbohydrate analogue of octreotide[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003, 30(1): 117-122.
- 11 Ginj M, Chen J, Walter MA, et al. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1136-1145.
- 12 Anton M, Wagner B, Haubner R, et al. Use of the norepinephrine transporter as a reporter gene for non-invasive imaging of genetically modified cells[J]. *J Gene Med*, 2004, 6(1): 119-126.
- 13 Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine[J]. *J Nucl Med*, 2002, 43(9): 1188-1200.
- 14 Shin JH, Chung JK, Kang JH, et al. Feasibility of sodium/iodide symporter gene as a new imaging reporter gene: comparison with HSV1-tk[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(3): 425-432.
- 15 Niu G, Krager KJ, Graham MM, et al. Noninvasive radiological imaging of pulmonary gene transfer and expression using the human sodium iodide symporter[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2005, 32(5): 534-540.
- 16 Yaghoubi SS, Wu L, Liang Q, et al. Direct correlation between positron emission tomographic images of two reporter genes delivered by two distinct adenoviral vectors[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(14): 1072-1080.
- 17 Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(6): 1160-1165.
- 18 Doubrovina M, Serganova I, Mayer-Kuckuk P, et al. Multimodality in vivo molecular-genetic imaging[J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(6): 1376-1388.
- 19 Iyer M, Salazar FB, Lewis X, et al. Non-invasive imaging of a transgenic mouse model using a prostate-specific two-step transcriptional amplification strategy[J]. *Transgenic Res*, 2005, 14(1): 47-55.

(收稿日期: 2005-06-15)

· 消 息 ·

由解放军总医院制作, 中华医学电子音像出版社出版发行的《医院感染管理与监控》系列教材已经出版。

医院感染是指在医院内获得的感染症。医院感染是医疗质量的重要核心之一, 是医学界十分关心的新问题。医院感染管理不仅贯穿于医疗护理活动的全过程, 而且涉及医院管理的诸多方面。本系列教材从医院感染管理的组织体系、微生物学实验室的任务、医疗护理在医院感染管理中的地位、医院感染的监测以及医院感染管理的几个重要环节(手术室、中心供应室、产房婴儿室及母婴同室、骨髓移植室、重症监护病房、血液净化中心、抗生素的合理应用)和医务人员在医院感染及管理的多重作用等方面重点做了介绍, 有利于规范相关医疗行为, 减少和杜绝医院感染的发生。

全套教材分为七张光盘, 每张定价 30 元, 整套 210 元, 欢迎订购。地址: 北京东四西大街 42 号(100710), 联系人: 刘峰, 电话: 010-65133608, 传真: 010-65133608。