

碘标记 bcl-2 反义寡核苷酸的研究及其稳定性与生物分布的评价

刘 生¹ 刘长征² 梁碧玲³ 梁昌盛² 蒋宁一¹

1(中山大学第二附属医院核医学科 广州 510120)

2(中山大学中山医学院实验核医学教研室 广州 510120)

3(中山大学第二附属医院放射科 广州 510120)

摘要 为了建立 Iodogen 直接法碘标记反义寡核苷酸 (ASON) 方法, 评价探针的稳定性及生物分布特征。用 Iodogen 对 15mer bcl-2 mRNA 的反义寡核苷酸进行直接标记, Sephadex G-25 凝胶柱纯化, 测定标记率和纯度, 评价标记 ASON 的稳定性。在 BALB/c 裸鼠及荷 CNE2 瘤小鼠中研究其生物分布特征。结果显示: 1) 在适当条件下, 本法标记率可达 85%, 放射性纯度为 90%, 放射性比度为 4.77×10^4 Bq/ μ g (ASON)。2) 标记 ASON 室温下 96 h 保持较稳定, 但新鲜血浆下部分分解。3) 标记 ASON 在大多数组织器官中的放射性活度随时间减少迅速, 大多数曲线呈示踪剂为两相分布。30 min 时胃肠道和甲状腺放射性浓集明显, 提示标记探针体内不稳定。肿瘤对探针的摄取较少, 免疫组化证实肿瘤组织 bcl-2 表达极低。结果表明 Iodogen 直接法碘标记反义寡核苷酸 (ASON) 方法简单可靠, 可获得标记率高、纯度较高且稳定性较好的标记探针; 但碘标寡核苷酸在体内因核酶的分解而稳定性较差。

关键词 bcl-2 反义寡核苷酸, 碘-125, 稳定性, 生物分布

中图分类号 R817.42

A

目前, 已开展了 ^{125}I (或 ^{131}I)、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{67}Ga 和 ^{153}Sm 核素标记反义寡核苷酸, 标记时需要连接一个功能基团才能进行有效标记, 中间物的纯化较烦琐。在碘标记的研究中, 文献报道的均以氯胺-T 法进行间接标记。本文拟利用 Iodogen 法对 bcl-2 反义寡核苷酸进行 ^{125}I 直接标记, 探索其标记效能、稳定性及在荷 CNE2 瘤的裸鼠模型中的分布情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 bcl-2 反义寡核苷酸的合成

bcl-2 反义寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成, HPLC 纯化, 纯度 >99%。其碱基的序列为: $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{OPO}_3-5'\text{CCCAGCGTGC GCCAT}3'$, 其中将第 1-2、2-3、13-14、14-15 碱基的磷酸二酯键进行硫代修饰。每管 33 μ g, 备用。

1.2 实验动物

BALB/c 裸鼠, 4—5 周龄, 由中山大学中山医学院动物中心提供。CNE2 细胞株, 由中山大学中

山医学院动物中心提供, CNE2 细胞培养至 3×10^6 /mL, 取 0.5 mL 注射入 2 只 BALB/c 裸鼠颈部皮下, 1 周后, 取肿瘤组织剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小接种于 BALB/c 裸小鼠 23 只 (重量约 25 g 左右), 至瘤体体积约 1.2 cm $\times$ 1.2 cm (约 3 周), 选择 20 只随机分成 6 组作为实验组: 30 min 组 3 只、1 h 组 5 只、2 h、4 h、12 h 和 24 h 组各 3 只。对照组: 正常 BALB/c 裸鼠, 共 9 只。分成 3 个组: 1 h、2 h 及 4 h 组各 3 只。

1.3 标记

1.3.1 低温冰箱中取出 bcl-2 反义寡核苷酸 (ASON) 33 μ g, 2500 r/min 10 min 离心沉淀。然后加入 PBS (pH 7.0) 100 μ L。备用。

1.3.2 将预先密封好的 Iodogen 50 μ g (将 Iodogen 溶于二氯甲烷溶液中, 取出 20 μ L 置入玻璃试管内, 然后氮气吹干, 再锻烧封口。)开封, 管内依次加入 0.25 mmol/L PB (pH 7.4) 20 μ L、 ^{125}I -NaI 18.5 MBq (约 10 μ L)。然后, 将 ASON 备用液加入, 用 PBS 加至 200 μ L, 密封管口。

1.3.3 将上述混合液置室温 (约 26 $^{\circ}\text{C}$) 下连续摇震,

第一作者: 刘 生, 男, 1963 年出生, 2003 年于中山大学获博士学位, 影像医学与核医学专业

收稿日期: 2003-01-23, 修回日期: 2003-05-29

分别于 15、30 min 时取样测标记率。然后置 45℃ 下保温 15、30、45 min 后, 各取样测标记率。

1.4 标记率及比活度测定

自制 Al₂O₃ 层析板, 以 85% 的甲醇为展开剂进行层析。约 1 h 后 (展开距离约 15 cm), 取出层析板置放射性层析扫描仪上进行扫描, 以游离 ¹²⁵I 为对照, 计算其标记率。根据如下公式计算标记物的比放射性。比活度 = (放射性核素的投入量 × 标记率) / 投入的反义寡核苷酸质量。

1.5 纯化

用葡聚糖凝胶 G-25 (1 cm × 15 cm) 层析柱纯化, 0.06 mol/L PBS (pH 7.0) 洗脱, 每管 0.3 mL, 测量放射性, 以峰值管的纯化物再进行层析, 条件同标记率的测定。

1.6 稳定性测定

将标记寡核苷酸置室温下 72 h 和 96 h, 在新鲜血浆中 1 h 和 4 h, 各取样层析, 测定标记物的变化。

1.7 动物实验

按小鼠体重约 1.11 × 10⁴ Bq/g, ¹²⁵I-bcl-2 反义寡核苷酸自尾静脉注入荷 CNE2 瘤小鼠和正常 BALB/c 裸鼠体内, 每只小鼠 ASON 约 2 μg。分别于注射后 0.5、1、2、4、12、24 h 处死动物并取出血液、各脏器和瘤组织, 测定其放射性, 计算单位重量组织器官的放射性占总放射性的百分数。

1.8 肿瘤组织免疫组化检查

按试剂盒规定方法进行。

2 结果

2.1 标记结果

用 Iodogen 法直接法碘标记 bcl-2 反义寡核苷酸的标记率与标记温度及标记时间关系密切。在近中性、室温 (26℃) 下不断震荡情况下 15 min 和 30 min 标记率分别约为 15 % 和 35 %, 呈缓慢增高。升高温度, 标记率明显增高, 将反应物放在 45℃ 下保温震荡 15 min 时标记率达 80 %, 30 min 时达 83 %, 45 min 时为 85 %, 延长时间, 标记率不再增加。标记的 bcl-2 反义寡核苷酸的比活度可达 4.77 × 10⁵ Bq/μg。经葡聚糖凝胶 G-25 (1 cm × 15 cm) 层析柱纯化, 放化纯可达 90 %。层析图见附图 1(a)—1(e)。

2.2 标记探针的稳定性

标记寡核苷酸置室温下 24、48、72、96 h, 标记物仍保持稳定, 其放化纯度维持基本不变, 96 h 约 80 %, 见图 1(f)、1(g), 说明 Iodogen 法直接标记的 bcl2 反义寡核苷酸能稳定结合, 并且能保留较长时间。但在新鲜血浆中, 主峰前移, 并出现多峰, 时间延长越明显。游离碘峰明显, 提示标记 ASON 与血浆蛋白结合和部分分解, 见图 1(h)、1(i)。图 1(j) 为 ¹²⁵I-NaI 对照, 图 1(k) 为经 Sephadex 纯化的标记 ASON。

2.3 生物分布特征

¹²⁵I-bcl-2 反义寡核苷酸在正常 BALB/c 裸鼠及荷 CNE2 瘤小鼠的分布特征, 见表 1 和表 2。

2.4 免疫组化结果

肿瘤组织细胞的 bcl-2 表达阳性率 < 3%。

表 1 ¹²⁵I 标记 bcl-2 反义寡核苷酸在正常 BALB/c 裸鼠体内分布
Table 1 Biodistribution of ¹²⁵I-ASON to bcl-2 in normal BALB/c nude mice (x̄ ± s) %ID/g

器官 Organ	1.V.1h (n=3)	2h (n=3)	4h (n=3)
血液 Blood	2.63 ± 0.13	1.18 ± 0.07	0.47 ± 0.09
肺脏 Lung	1.92 ± 0.07	0.74 ± 0.11	0.29 ± 0.11
心脏 Heart	0.55 ± 0.08	0.38 ± 0.10	0.17 ± 0.07
肝脏 Liver	1.13 ± 0.12	0.76 ± 0.13	0.31 ± 0.12
脾脏 Spleen	0.89 ± 0.07	0.71 ± 0.05	0.19 ± 0.09
肾脏 Kidney	1.67 ± 0.12	1.21 ± 0.17	0.45 ± 0.07
肌肉 Muscle	0.47 ± 0.05	0.32 ± 0.07	0.11 ± 0.03
骨骼 Bone	0.62 ± 0.14	0.33 ± 0.06	0.15 ± 0.08
胃肠 GI	2.23 ± 0.21	1.34 ± 0.17	0.41 ± 0.08
甲状腺 Thyroid	4.35 ± 0.15	2.54 ± 0.14	0.76 ± 0.12
脑 Brain	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01

表 2 ¹²⁵I 标记 bcl-2 反义寡核苷酸在荷 CNE2 瘤裸鼠体内分布
Table 2 Biodistribution of ¹²⁵I-ASON to bcl-2 in CNE2 bearing nude mice

($\bar{x} \pm s$) %ID/g

器官 Organ	1.V.30 min (n=3)	1 h (n=5)	2 h (n=3)	4 h (n=3)	12 h (n=3)	24 h (n=3)
血液 Blood	3.25±0.15	2.02±0.06	1.44±0.11	0.80±0.09	0.26±0.04	0.18±0.05
肺脏 Lung	2.43±0.09	1.74±0.12	0.79±0.09	0.50±0.05	0.34±0.08	0.22±0.07
心脏 Heart	0.85±0.07	0.67±0.09	0.47±0.06	0.44±0.11	0.21±0.01	0.14±0.02
肝脏 Liver	2.43±0.11	1.31±0.08	0.59±0.14	0.36±0.17	0.32±0.21	0.22±0.07
脾脏 Spleen	1.52±0.08	1.05±0.06	0.58±0.09	0.33±0.05	0.23±0.04	0.13±0.06
肾脏 Kidney	0.46±0.06	1.84±0.13	1.37±0.06	0.94±0.17	0.75±0.21	0.62±0.22
肌肉 Muscle	0.72±0.06	0.47±0.06	0.34±0.14	0.17±0.15	0.12±0.06	0.11±0.02
骨骼 Bone	1.05±0.09	0.68±0.13	0.42±0.15	0.36±0.11	0.27±0.11	0.20±0.01
胃肠 GI	4.52±0.23	2.01±0.12	1.60±0.09	1.29±0.17	0.81±0.12	0.41±0.06
甲状腺 Thyroid	4.26±0.16	3.76±0.16	3.12±0.14	1.73±0.06	1.67±0.34	0.83±0.15
脑 Brain	0.19±0.03	0.11±0.04	0.06±0.05	0.05±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01
肿瘤 Tumour	2.19±0.15	1.40±0.23	0.93±0.09	0.80±0.11	0.23±0.13	0.13±0.05

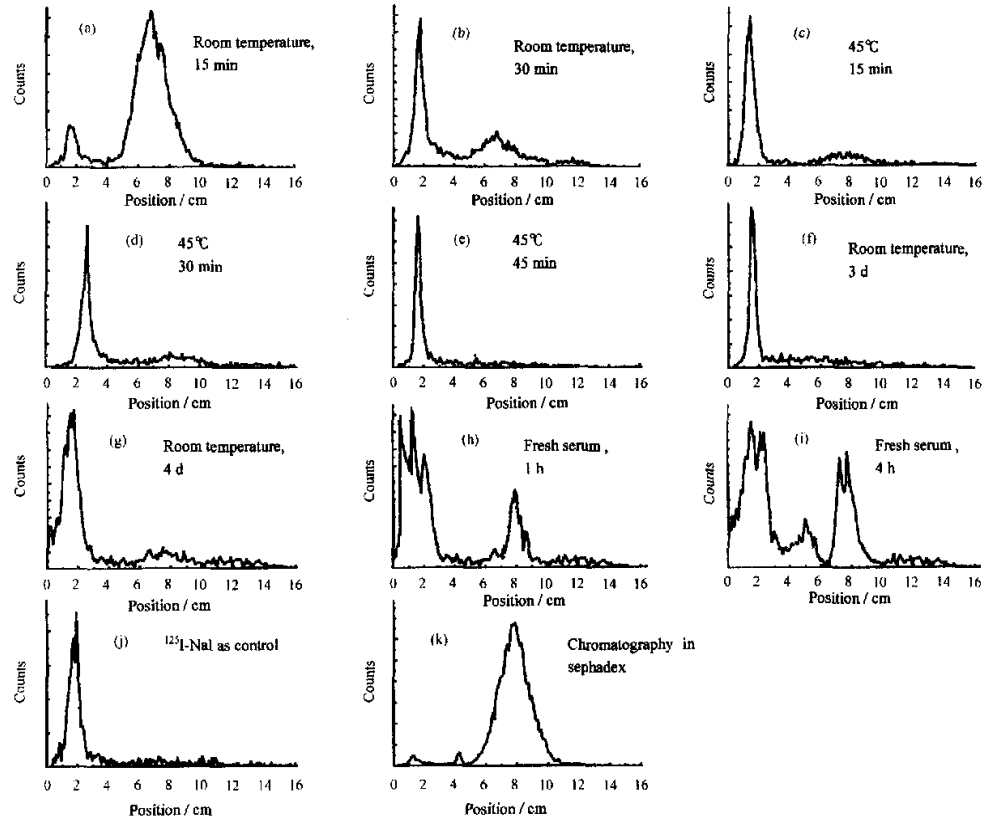


图 1 层析图

Fig.1 Chromatograms

3 讨论

反义基因显像是目前核医学研究的热点和难点。要成功地进行反义基因显像,除了靶组织有高表达的基因、特异性高的反义寡核苷酸片段、标记探针的体内稳定性等外,可靠的、简易实用的标记方法也十分重要。

目前研究的 ^{125}I (或 ^{131}I)、 ^{111}In 、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 、 ^{67}Ga 和 ^{153}Sm 反义寡核苷酸标记^[1],均需要连接一个功能基团才能进行有效标记,中间物的纯化较烦琐。Cammilleri 等^[2]利用寡核苷酸 5'端戴帽的酪氨酸,以氯胺-T 法进行了稳定标记;刘炳辰等^[3]通过 5'端与对甲基苯异硫氰酸盐(PMPITC)连接后进行氯胺-T 法标记,明显地提高标记率约 12—16 倍,而无连接 PMPITC 者标记率仅为 2.5%—3.6%。反义寡核苷酸的标记是微量标记,除 HPLC 外,一般方法如葡聚糖凝胶 G-25 层析柱纯效果不理想,一般实验室下开展该项工作有一定难度。

文献报道,应用 TiCl_3 作为氧化剂可进行直接碘标记 DNA 或 RNA,标记率可达 50%。这种直接标记是一种取代反应,能使活性碘特异性地与核酸分子中的胞嘧啶环上的碳-5 位置处与原有的氢替代。但 TiCl_3 为一种剧毒品,获取困难,且不能进行体内实验。本文应用的 bcl-2 反义寡核苷酸,内含有 7 个胞嘧啶环,适宜于进行直接法标记,用常规氯胺-T 法,得到的标记率不到 20%,可能与氧化剂的选择有关(本文未提供该方面数据)。改用 Iodogen 后,可获得较高的标记率,在室温、近中性 pH 值下,标记反应较温和,15 min 和 30 min 标记率分别约为 15%和 35%,并随时间的延长和温度的增高而增高,在 45℃ 保温震荡下 15 min 时标记率达 80%,30 min 时达 83%,45 min 时为 85%,达高峰。明显高于刘炳辰等^[3]报道的 2.5%—3.6%。放射性活度可达 $4.77 \times 10^5 \text{ Bq}/\mu\text{g}$ 。放射化学纯度可达 90%,获得的标记探针稳定性好,4 d 后仍保持 80%的纯度。提示该方法简单、实用。我们在实验中发现,在标记过程中,反应体系不要立即进行 45℃ 下反应,先在室温下温和反应一段时间后

置 45℃ 反应,并且要不断震荡,以充分氧化 I^- 成活性 I_2 ,反应时间共 75 min,其中室温和 45℃ 分别 30 min 和 45 min 即可获得较完全的标记。

标记探针在动物体内的分布表明,30 min 时胃肠道和甲状腺内即有放射性浓集,在 CNE2 裸鼠中分别达 4.52%和 4.26%,高于血液水平,提示标记探针体内不稳定,部分标记物脱标或是体内酶对寡核苷酸的迅速分解,胃肠道和甲状腺吸收游离 ^{125}I 所致。体外实验亦证实标记 ASON 在血浆中的不稳定性。血液、各脏器及肿瘤的放射性活度随时间迅速减少,其中 2 h 内减少最快,然后相对缓慢,大多数曲线呈踪剂为两相分布。肿瘤对探针的摄取较少,免疫组化证实肿瘤组织 bcl-2 表达极低,并未能说明肿瘤对该探针的特异性结合差。该探针能否适合反义基因显像,可以通过基因转染来提高靶的 bcl-2 表达后来证实。尽管鼻咽癌(NPC)临床病人有高 bcl-2 表达^[4,5],但 CNE2 细胞株并非如此。因此,能否证实该寡核苷酸片段能适合鼻咽癌的反义基因显像诊断,研究工作仍十分艰巨。

参考文献

- 1 Dewanjee M K, Ghafouripour A K, Kapadvanjwala M, et al. *J Clin Immunoassay*, 1993, 16: 276—289
- 2 Cammilleri S, Sangrajrang S, Perdereau B, et al. *Eur J Nucl Med* 1996, 23: 448—452
- 3 刘炳辰, 岳井银, 穆传杰, 等. 中华核医学杂志, 2000, 20(1): 33—34
LIU Bingchen, YUE Jingyin, MU Chuanjie, et al. *Chinese Journal of Nuclear Medicine*, 2000, 20(1): 33—34
- 4 李智, 宗永生. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(2): 127—129
LI Zhi, ZONG Yongsheng. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1999, 15(2): 127—129
- 5 郭琳琅, 肖莎, 曹长安. 临床耳鼻喉科杂志, 1998, 12(9): 395—397
GUO Linlang, XIAO Sha, CAO Chang'an. *Journal of Clinic Otorhinolaryngology*, 1998, 12(9): 395—397

Study of iodine labeling bcl-2 antisense oligonucleotides and the evaluation of its stability and biodistribution

LIU Sheng LIU Changzheng LIANG Biling LIANG Changsheng JIANG Ningyi

1 (Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120)

2 (Institution of Experimental Nuclear Medicine, Sun Yat-sen Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120)

3 (Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120)

Abstract To establish a method for directly labeling antisense oligonucleotide (ASON) with iodine and evaluate the stability and biodistribution of labeled ASON, 15mer bcl-2 ASON to mRNA was labeled with iodine by Iodogen, purified with Sephadex G-25. Labelling efficiency and purity of labeled ASON were measured, and the stability was evaluated. Biodistribution of labeled ASON was studied in BALB/c nude mice and CNE2 bearing mice. Results showed that 1) The Labelling efficiency was 85% under suitable conditions and radiopurity was 90%, and specific radioactivity was $4.77 \times 10^5 \text{Bq}/\mu\text{g}$ (ASON). 2) The labeled ASON was stable at room temperature, but disintegrated partly in fresh serum. 3) The radioactivity of labeled ASON decreased fast in most of organs, presenting a two-phase distribution. The uptakes of radioactivity in thyroid gland and gastrointestinal were obvious, indicating labeled ASON were not stable. Tumor tissues had little ASON uptake, and immunohistological test confirmed that the expression of bcl-2 in CNE2 was very low. These findings indicated that directly iodine labeling ASON with Iodogen was simple and reliable, and it could provide high labelling efficiency, high specific activity and stable labeled ASON. But stability of labeled ASON was poor in vivo due to disintegration of nucleotidase.

Key words bcl-2 antisense oligonucleotide, Iodine-125, Stability, Biodistribution

CLC R817.42