

# DTPA-c-myc 反义核酸的合成及其<sup>113</sup>In<sup>m</sup> 标记

陆巍巍, 金小海, 张锦荣, 尹 卫, 白红升, 樊宏强, 张文辉, 高惠波

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

**摘要:** 合成了 DTPA-c-myc 反义核酸, 并对其进行了<sup>113</sup>In<sup>m</sup> 标记; 考察了标记物<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸在生理盐水和牛血清中的稳定性和对平滑肌细胞增殖的影响。标记结果显示, 在最佳标记条件下标记率为 35%~40%, 标记物纯化后放化纯度>90%。<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸在生理盐水中 48 h 放化纯度>94.0%, 在血清中 48 h 放化纯度仅为 76.1%。细胞增殖结果显示:<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸浓度达到 10 μmol/L(92.5 GBq/L) 时抑制率达到最大,<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸(放射性反义治疗组)和反义核酸(反义治疗组)、<sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub> 溶液(放射性治疗组)、不加核酸或<sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub> 溶液(对照组)和 c-myc 正义核酸(正义治疗组)对平滑肌细胞增殖的抑制率分别为 84.5%、69.3%、20.6%、15.2%、0, 放射性反义治疗组与反义治疗组、放射性治疗组、对照组相比有显著性差异(P<0.05、P<0.01、P<0.01), 反义治疗组和正义治疗组相比也有显著性差异(P<0.01)。这说明合成的<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸在体外可有效抑制猪血管平滑肌细胞增殖。

**关键词:** DTPA-c-myc 反义核酸; <sup>113</sup>In<sup>m</sup>; 标记

**中图分类号:** TL92; R817-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2005)04-0201-06

## Synthesis of DTPA-c-myc Antisense Oligonucleotides and Labeling With <sup>113</sup>In<sup>m</sup>

LU Wei-wei, JIN Xiao-hai, ZHANG Jin-rong, YIN Wei, BAI Hong-sheng,  
FAN Hong-qiang, ZHANG Wen-hui, GAO Hui-bo

(Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

**Abstract:** DTPA-c-myc antisense oligonucleotides is synthesized and labeled with <sup>113</sup>In<sup>m</sup>. The stability of <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides in saline and bovine serum and the inhibition of cell proliferation are studied. The labeling yield in the optimal conditions is 35%~40% and the radiochemical purity is more than 90% after purification. The radiochemical purity of <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc is more than 94.0% for 48 h in saline, and 76.1% for 48 h in serum. When the concentration of <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides is 10 μmol/L(92.5 GBq/L), the inhibition rate reaches the highest. The inhibition rate of <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides (radionuclide antisense-treated group), antisense oligonucleotides (antisense-treated group), <sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub> solution (radionu-

slide-treated group), without oligonucleotides or  $^{113}\text{In}^m\text{Cl}_3$  solution (control group) and c-myc sense oligonucleotides (sense-treated group) is 84.5%, 69.3%, 20.6%, 15.2% and 0, respectively. The inhibition of radionuclide antisense-treated group is significantly higher than that of antisense-treated group ( $P < 0.05$ ), radionuclide-treated group ( $P < 0.01$ ) and control group ( $P < 0.01$ ), and the inhibition of antisense-treated group is significantly higher than that of sense-treated group ( $P < 0.01$ ). Which demonstrates that  $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc antisense oligonucleotides can inhibit the proliferation of porcine VSMCs in vitro.

**Key words:** DTPA-c-myc antisense oligonucleotides;  $^{113}\text{In}^m$ ; labeling

经皮穿刺冠状动脉成形(PTCA)是治疗血管狭窄或阻塞性疾病的有效手段之一,但术后6个月内再狭窄的高发生率已严重阻碍了其发展。将放射性技术和反义治疗相结合的放射性核素反义治疗是近年发展起来的治疗再狭窄的新方法<sup>[1]</sup>。本工作拟合成放射性核素反义治疗剂 $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc反义核酸,通过反义核酸与靶组织中互补mRNA(信使核糖核酸)特异结合,抑制靶基因表达,加以 $^{113}\text{In}^m$ 电离辐射损伤细胞作用达到基因治疗和放射治疗的双重目的。c-myc原癌基因参与血管平滑肌细胞增殖过程,选择其反义核酸,以封闭其靶基因表达。 $^{113}\text{In}^m$ 发射内转换电子和 $\gamma$ 射线,内转换电子在组织中射程短,线性能量传递高,近距离治疗作用强<sup>[2]</sup>, $\gamma$ 射线穿透力强,可使血管壁各层吸收剂量分布均匀,防止边缘再狭窄<sup>[3]</sup>。观察制备的 $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc反义核酸对形成再狭窄的最主要因素——血管平滑肌细胞增殖的影响<sup>[3,4]</sup>,可为将其应用于血管再狭窄治疗提供理论基础和实验依据。本工作拟制备 $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc反义核酸,并初步观察其在体外对血管平滑肌细胞增殖的影响。

## 1 主要试剂与仪器

### 1.1 主要试剂

$^{113}\text{Sn}$ - $^{113}\text{In}^m$ 发生器:原子高科股份有限公司提供。二乙撑三胺五乙酸(DTPA):分析纯,北京市兴津化工厂提供,用前将110 mL水缓慢加入25 g DTPA中,加热至70℃,搅拌至DTPA完全溶解,热过滤,滤液在室温下冷却至有晶体析出时再用冷水浴冷却至晶体近完全析出,抽滤,晶体按前述方法二次重结晶,120℃干燥备用。吡啶:分析纯,用前在200 mL吡啶中加入约2 g NaOH过夜干燥,将液体倾出备用。乙酸酐:分析纯,用前将3 g无水乙酸钠加入200 mL

乙酸酐中,回流30 min,蒸馏,收集134℃馏分备用。无水乙醚、盐酸、醋酸钠:均为分析纯,由北京市化学试剂公司提供。醋酸、柠檬酸钠:分析纯,由北京化工厂提供;柠檬酸:分析纯,由成都化学试剂厂提供。c-myc反义核酸3'-cholesterol-TAC GGG GAG TTG CAA-C3 NH<sub>2</sub> 5'(3'末端作硫代修饰),纯度>95%,为本实验室制备,并经高效液相色谱法(HPLC)和标准品比对及飞行时间质谱鉴定确认为所需产品。

ITLC-SG纸为Pall Corporation产品;超滤管(Microcon Ym-3柱)为密里伯公司产品;Bondapak HC<sub>18</sub> HA柱为WATERS公司产品;猪的血管平滑肌细胞、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、谷氨酰胺、胰蛋白酶由北京环亚泰克生物医学技术有限公司提供。

### 1.2 主要仪器

真空干燥箱为北京兴争仪器设备厂产品;熔点仪为瑞士BUCHI535产品;放射性薄层扫描仪为德国LB-2852产品。

## 2 实验方法

### 2.1 DTPA环酐(cDTPA)的合成<sup>[5]</sup>

称取9.8 g二次重结晶的DTPA置于三颈瓶中,加入12.75 mL干燥过的吡啶、18.9 mL干燥过的乙酸酐,64±1℃油浴加热,机械搅拌反应24 h,得淡黄色固体,抽滤后用乙酸酐洗涤3次,每次5 mL,抽滤;再用无水乙醚洗涤3次,每次10 mL,抽滤。50℃、真空干燥12 h,产品在真空干燥器内保存,之后用红外谱(IR)、核磁共振谱( $^1\text{H}$  NMR)进行鉴定。

### 2.2 cDTPA和c-myc反义核酸的偶联

将10  $\mu\text{g}$  c-myc反义链冻干品溶于10  $\mu\text{L}$  HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid)缓冲液(0.1 mol/L, pH =

8.5)中,加入5 μL cDTPA的二甲基亚砜(DMSO)溶液(128.52 g/L, DMSO溶液预先干燥),室温反应0.5 h后,再加入5 μL此溶液,反应0.5 h<sup>[6,7]</sup>,最终摩尔比  $n(\text{cDTPA}) : n(\text{c-myc 反义核酸}) = 2\ 000 : 1$ 。反应液用超滤管纯化:管中加入反应液,每次加入0.2 mL蒸馏水,10 000 r/min离心,重复3次,收集滤后浓缩液。

HPLC法测定偶联率。使用Bondapak HC<sub>18</sub> HA柱梯度洗脱,流动相A为V(0.2 mol/L CH<sub>3</sub>COONa水溶液):V(CH<sub>3</sub>OH)=80:20;流动相B为V(0.2 mol/L CH<sub>3</sub>COONa水溶液):V(CH<sub>3</sub>OH)=40:60。流速为1 mL/min,于紫外(UV)254 nm检测。0~2 min内,100%A;2~30 min内,100%A~100%B;30~40 min内,100%B。偶联率= $[\text{DTPA-c-myc 反义核酸峰面积}/(\text{DTPA-c-myc 反义核酸峰面积} + \text{c-myc 反义核酸峰面积})] \times 100\%$ <sup>[5]</sup>。

### 2.3 DTPA-c-myc 反义核酸的<sup>113</sup>In<sup>m</sup>标记

将10 μg DTPA-c-myc反义核酸偶联物加入到15 μL醋酸盐缓冲液(ABS,1 mol/L,pH=4.6)中,再加入15 μL<sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub>淋洗液(约0.1~0.06×37 MBq),37℃水浴保温1 h<sup>[8]</sup>。用超滤管纯化,纯化方法同2.2。ITLC-SG纸为载体,柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L,pH=5.0)为展开剂,上行展开测定标记率。<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc反义核酸的标记率= $[\text{原点}(R_f 0\sim 0.30)\text{的计数}/\text{总计数}] \times 100\%$ 。

### 2.4 体外稳定性实验

<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc反义核酸分别加入生理盐水、新鲜牛血清中,使其浓度为5 g/L,37℃保温,分别于6、12、24、48 h纸层析法测定放化纯度。

### 2.5 细胞培养

从猪身上分离血管平滑肌细胞(VSMCs)后继续人工培养,使用DMEM培养基,补加入10%热惰性的胎牛血清(FBS)、100 IU/mL青霉素、100 mg/L链霉素和2 mol/L谷氨酰胺(10%的FBS-DMEM),37℃下在含5%CO<sub>2</sub>湿润的恒温箱中培养,细胞会呈现典型的血管平滑肌细胞形态学特征,即纺锤状、“峰-谷”样式<sup>[9]</sup>。

### 2.6 平滑肌细胞增殖测定

猪的血管平滑肌细胞在10%的FBS-

DMEM中培养至密度达5 000/cm<sup>2</sup>。贴壁一天后,用0.5%的FBS-DMEM抑制48 h,用10%的FBS-DMEM激活,激活的同时加入1(9.25 GBq/L)、2(18.5 GBq/L)、4(37 GBq/L)、8(74 GBq/L)和10 μmol/L(92.5 GBq/L)<sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc反义核酸(放射性反义治疗组)、10 μmol/L正义寡聚核苷酸(正义治疗组)、10 μmol/L反义核酸(反义治疗组)、92.5 GBq/L<sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub>溶液(放射性治疗组)、不加核酸和<sup>113</sup>In<sup>m</sup>Cl<sub>3</sub>(对照组),细胞用0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA进行胰蛋白酶化,3天后检测细胞数。同一实验作3个平行样,重复3次。细胞的存活率用Trypan Blue排除法进行。抑制率= $(1 - \text{观察组细胞净增长数}/\text{正义治疗组细胞净增长数}) \times 100\%$ ,细胞净增长数=细胞激活继续培养3天后细胞数-激活开始时细胞数<sup>[10]</sup>。

## 3 结果和讨论

### 3.1 合成cDTPA的鉴定

得产品7.675 8 g,产率86.3%。熔点仪测得其熔点为175~180℃,与Hnatowich等<sup>[5]</sup>报道的175~185℃相符。

产品的IR示于图1。由图1可见:在1 820.59、1 776.59 cm<sup>-1</sup>处有环化酸酐羰基振动峰,1 641.05 cm<sup>-1</sup>处有较强的吸收峰,说明分子中间的羰基离子化,酸酐有可能是两性离子;1 113.54 cm<sup>-1</sup>为C-O振动峰。

<sup>1</sup>H NMR示于图2。δ=3.7表明酸酐环上有亚甲基氢,δ=3.3表明连接羧基的是亚甲基氢;峰高比4:1,符合二者氢原子数比。没有δ=2.0甲基氢的峰,说明无甲基,即该反应没产生混合酸酐。

综合分析,所合成终产物为所需的cDTPA。

### 3.2 cDTPA和c-myc反义核酸的偶联

3.2.1 cDTPA与c-myc反义链的摩尔比对偶联率的影响 结果示于图3。由图3可知,偶联率随 $n(\text{cDTPA}) : n(\text{c-myc 反义链})$ 的增大而增大,2 000:1时偶联率最大,为89.6%;此后变化不大。因此偶联时选用 $n(\text{cDTPA}) : n(\text{c-myc 反义链}) = 2\ 000 : 1$ 。

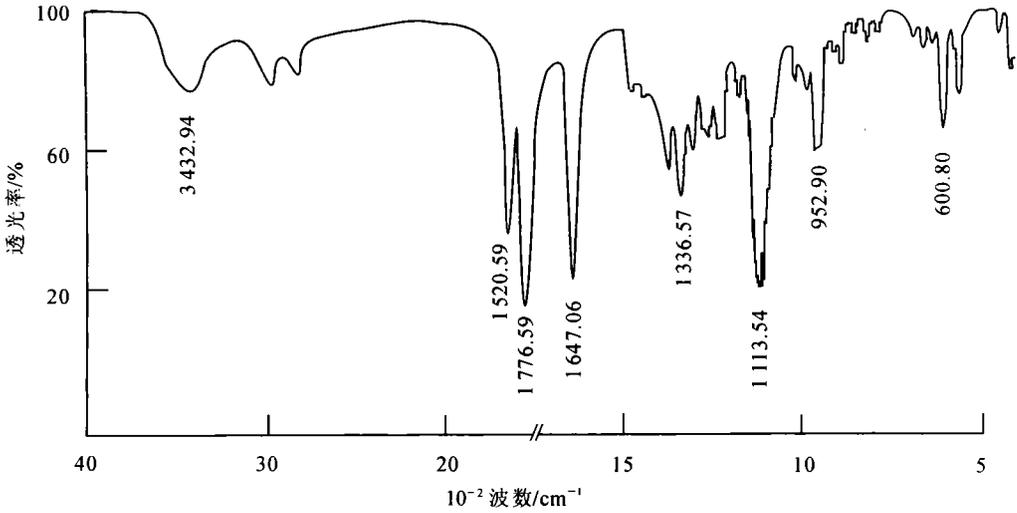
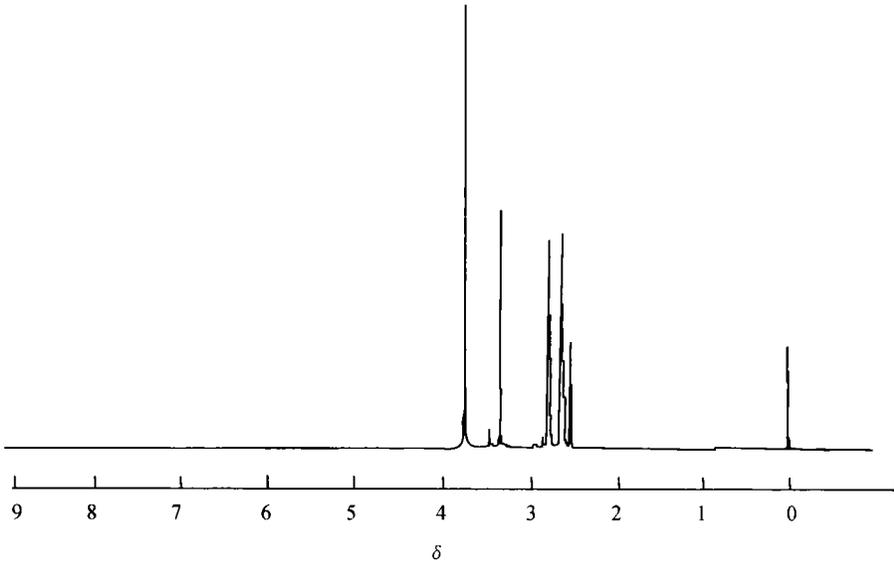
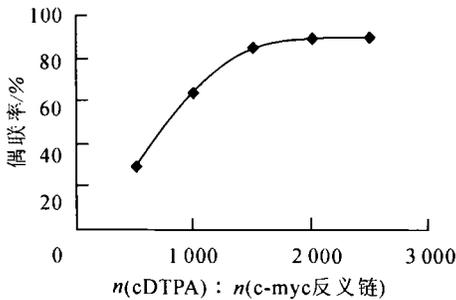


图 1 cDTPA 的 IR 谱

图 2 cDTPA 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图 3 cDTPA 与 c-myc 反义链的摩尔比  
对偶联率的影响

3.2.2 相同量 cDTPA 的 DMSO 溶液两次加入和一次全部加入对偶联率的影响 同样量 cDTPA 一次加入偶联率只有 72.0%，分两次加入偶联率迅速提高到 89.0%，可见同样量 cDTPA 两次加入比一次全部加入有助于获得高的偶联率<sup>[6]</sup>。

### 3.3 $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc 反义核酸的标记

用 cDTPA 代替 DTPA-c-myc 考察  $^{113}\text{In}^m$  的标记条件。改变欲考察的反应条件，其余条件同 2.2，观察其对标记率的影响，以优化标记条件。

3.3.1 反应时间对标记率的影响 结果示于图 4。由图 4 可看出，标记率随反应时间的延长而

增加, 60 min 时标记率达到最大, 此后没有明显升高, 因此选择反应时间为 60 min。

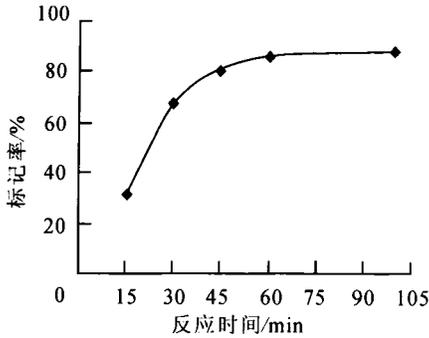


图 4 反应时间对标记率的影响

3.3.2 缓冲液 pH 对标记率的影响 结果示于图 5。由图 5 可看出 ABS 缓冲液 pH=4.6 时标记率最高, >4.6 后标记率随 pH 的增加反而下降, 因此选择缓冲液的 pH=4.6。

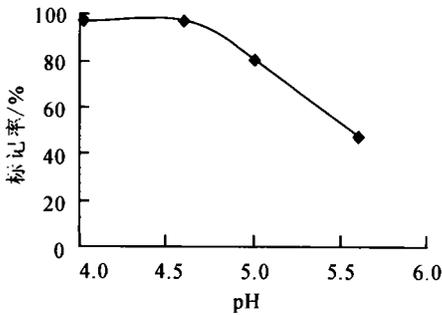


图 5 pH 对标记率的影响

3.3.3 温度对标记率的影响 37 °C 标记率平均达到 97.5%, 室温反应标记率仅为 85.7%, 因此选择在 37 °C 下反应。

3.3.4 <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸的标记 在以上所选出的条件下进行 <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸的标记, 标记率为 35%~40%, 经超滤管纯化后放化纯度 >90%。

### 3.4 体外稳定性

结果示于图 6。由图 6 可知 <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸在生理盐水中稳定性较好, 48 h 放化纯度 >94%; 在血清中稳定性较差, 48 h 放化纯度仅为 76.1%。这是由于 cDTPA 是用一个羧基和 c-myc 反义核酸的氨基缩合, 占用了 <sup>113</sup>In<sup>m</sup> 的一个结合位, 形成二乙撑三胺四乙酸 (DTTA) 配体, 因此 DTTA 在体内与 <sup>113</sup>In<sup>m</sup> 解离比 DTPA 容易得多。

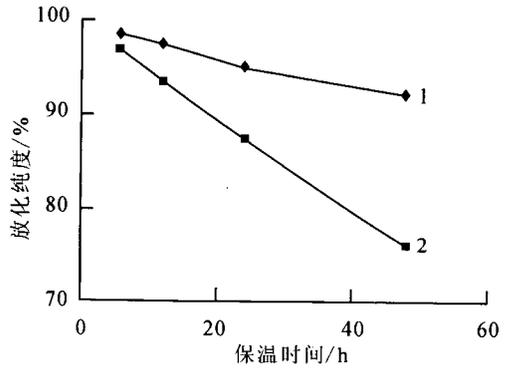


图 6 <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DTPA-c-myc 反义核酸在血清和生理盐水中的稳定性  
1——生理盐水中; 2——牛血清中

### 3.5 标记物对平滑肌细胞增殖的抑制效果

放射性反义治疗组、反义治疗组、放射性治疗组、对照组、正义治疗组抑制平滑肌细胞增殖的实验结果列于表 1。由表 1 可知, 放射性反义治疗组和反义治疗组、放射性治疗组、对照组相比均有显著性差异; 反义治疗组和正义治疗组相比也有显著性差异。

放射性反义治疗组的抑制率随 <sup>113</sup>In<sup>m</sup>-DT-PA-c-myc 反义核酸浓度增大而增大, 当浓度达到 10 μmol/L (92.5 GBq/L) 时抑制率最大, 为 84.5%, 因此选定其浓度为 10 mol/L, 放射性浓度为 92.5 GBq/L, 这也与 Shi Yi 等<sup>[10]</sup> 的实验考察结果相吻合。

正义治疗组对平滑肌细胞的抑制率低于对照组, 这是由于正义治疗组的序列与调节平滑肌细胞增殖的靶基因 c-myc mRNA 相同, 可能加入正义核酸相当于靶基因浓度增加, 反而使平滑肌细胞增殖加强; 反义治疗组和正义治疗组比较差异具有显著性, 说明反义治疗对平滑肌细胞增殖具有抑制作用; 由于靶基因 c-myc mRNA 在细胞内, c-myc 反义寡聚核苷酸对靶基因的抑制作用 (即抑制平滑肌细胞增值) 说明其已进入细胞内, 与细胞内的靶基因结合, 产生了抑制作用。放射性反义治疗组和对照组比较差异有显著性, 说明放射性反义治疗组对平滑肌细胞具有显著的抑制作用; 放射性反义治疗组和反义治疗组、放射性治疗组比较差异有显著性, 放射性反义治疗组的抑制率相对于反义治疗组、放射性治疗组有显著提高, 可见放射性反义治疗起到了反义治疗和放射性核素治疗的双重作用。

表 1 各组抑制平滑肌细胞增殖实验结果

组 别	抑制率/%	P
放射性反义治疗组	84.5	
反义治疗组	69.3	<0.05 <sup>1)</sup>
放射性治疗组	20.6	<0.01 <sup>1)</sup>
对照组	15.2	<0.01 <sup>1)</sup>
正义治疗组	0	<0.01 <sup>2)</sup>

注:1)与放射性反义治疗组比较;2)与反义治疗组比较

#### 4 小 结

(1)合成了双功能螯合剂 cDTPA,考察得到 cDTPA 和 c-myc 反义核酸的最优偶联条件和偶联后标记  $^{113}\text{In}^m$  的最佳标记条件。在优化的标记条件下,标记率为 35%~40%,经超滤管纯化后放化纯度>90%。

(2)标记物在生理盐水中稳定性较好,48 h 放化纯度>94.0%;在血清中稳定性较差,48 h 放化纯度仅为 76.1%。

(3) $^{113}\text{In}^m$ -DTPA-c-myc 反义核酸在体外可有效抑制血管平滑肌细胞增殖,抑制率为 84.5%,预示其具有抑制冠脉再狭窄的潜力。

#### 参考文献:

- [1] 侯英萍,邓敬兰.放射性核素反义治疗防治血管再狭窄的应用前景[J].同位素,2000,13(2):111~113.
- [2] 匡安仁,谭天秩.放射性核素治疗的发展与思考[J].中华核医学杂志,2003,23(6):325~326.

- [3] 罗全勇,朱珺. $^{103}\text{Pd}$ 对血管平滑肌细胞增殖和凋亡影响的实验研究[J].中华核医学杂志,2002,22(6):372~373.
- [4] 顾健人,曹雪涛.基因治疗[M].北京:科学出版社,2001.291.
- [5] Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL. The P-reparation and Labeling of DTPA-coupled Albumin[J]. Int J Appl Radiat Isot, 1982, 33: 327-332.
- [6] Karamrchev VN, Reed MW, Neumann RD, et al. Distribution of DNA Strand Breaks Produced By Iodine-123 and Indium-111 In Synthetic Oligodeoxynucleotides[J]. Acta Oncologica, 2000, 39:687-692.
- [7] Hnatowich DJ, Winnard JP, Virzi F, et al. Technetium-99m Labeling of DNA Oligonucleotides [J]. The Journal Of Nuclear Medicine, 1995, 36: 2 307.
- [8] Brechbiel MW, Gansow OA, Atcher RW, et al. Synthesis of 1-(p-Isothiocyanatobenzyl) Derivatives of DTPA and EDTA [J]. Inorg Chem, 1986, 25: 2 773-2 776.
- [9] 静国忠.基因工程及其分子生物学基础[M].北京:北京大学出版社,1999.1~3.
- [10] Shi Yi, Hutchinson HG, Hall DJ, et al. Down-regulation of c-myc Expression by Antisense Oligonucleotides Inhibits Proliferation of Human Smooth Muscle Cells[J]. Circulation, 1993, 88 (3): 1 190-1 195.

### 《国外医学·放射医学核医学分册》更名为《国际放射医学核医学杂志》

根据国家新闻出版总署(新出报刊[2005]809号)文件精神,由卫生部主管、中华医学会和中国医学科学院放射医学研究所主办的《国外医学·放射医学核医学分册》自2006年1月起,正式更名为《国际放射医学核医学杂志》(International Journal Radiation Medicine and Nuclear Medicine)。

更名后的《国际放射医学核医学杂志》在报道内容方面除保留代表先进信息的综述、研究进展类文章外,将增加与放射医学和核医学密切相关的论著、临床经验、病例报告等。欢迎广大作者踊跃投稿。

又:2006年起,更名后的《国际放射医学核医学杂志》由48页增加至64页,每册定价不变,仍为6.00元,全年36元。欢迎广大读者订阅。2006年本刊邮局订阅代号仍为:6-102。凡在邮局漏订者,可直接由编辑部邮购。

编辑部地址:天津市南开区白堤路238号;邮政编码:300192

联系人:王晓凤

联系电话:(022)87890607

E-mail: gjfh2006@yahoo.com.cn