

MicroRNA 靶向的放射性标记探针的制备及条件优化

马超¹, 康磊¹, 王荣福¹, 徐小洁², 闫平¹, 张春丽¹, 陈雪祺¹

(1.北京大学第一医院, 北京 100034; 2.军事医学科学院, 北京 100850)

摘要: [目的] 以 microRNA-21(miR-21)为靶点, 探索制备放射性核素锝[^{99m}Tc]标记的反义寡核苷酸探针的方法与实验条件。[方法] 设计化学结构修饰的反义寡核苷酸序列并进行合成, 利用双功能螯合剂 NHS-MAG3 偶联待标记探针和 ^{99m}Tc, 优化不同实验条件下的标记率及放化纯, 并对标记产物进行凝胶电泳鉴定及稳定性评价。[结果] 降低氯化亚锡的用量、减少 ^{99m}Tc 的反应体积、适度延长标记反应时间均可显著提高标记率, 最高可达 97%。标记探针在血清 37℃ 条件下孵育 6h 其放化纯仍可维持在 96% 以上。凝胶电泳结果证实核酸条带与放射性分布一致。[结论] 通过优化探针设计和标记反应条件能够大大提高标记率和放化纯度, 无需纯化即可进一步应用, 达到简化制备程序的目的。

关键词: 锝[^{99m}Tc]; microRNA(miRNA); 放射性标记

中图分类号: R730.44 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0919-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B003

Preparation and Optimization of ^{99m}Tc-radiolabeled Antisense Oligonucleotide Targeting microRNA

MA Chao, KANG Lei, WANG Rong-fu, et al.

(Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: [Purpose] To explore the methods and optimized reaction conditions for the preparation of ^{99m}Tc radiolabeled antisense oligonucleotide targeted microRNA-21. [Methods] The antisense oligonucleotide probe with chemical and structural modifications was designed and synthesized. This probe was radiolabeled with ^{99m}Tc via the conjugation of a bifunctional chelator S-acetylmercaptoacetyltryglycine (NHS-MAG3). The labeled probe was tested for its radiolabeling efficiency, purity and its stability under different reaction conditions, as well as the identification with gel electrophoresis. [Results] The labeling efficiency reached to 97% under optimized reaction conditions of different volume of SnCl₂·2H₂O, ^{99m}Tc and reaction time. The radiochemical purity of ^{99m}Tc-anti-miR in fresh human serum at 37℃ could maintained more than 96% after 6h. [Conclusions] The labeling efficiency can be improved greatly by optimizing design and reaction conditions. Therefore, the probe could be prepared easily and simply for further applications without further purification.

Subject words: technium-99m; microRNA; radiolabeling

MicroRNA(miRNA, 即微小 RNA)是一类具有调控功能的内源性非编码 RNA, 长约 20~25 个核苷酸。miRNA 在转录前水平发挥对靶向基因表达的调控作用, 特别在肿瘤的发生发展中, miRNA 可以起

到类似癌基因或抑癌基因的作用^[1]。其中, miRNA-21(miR-21)已被证实在众多实体肿瘤中高表达, 能够通过调节人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)及细胞程序性死亡基因 (programmed cell death, *PDCD*)等抑癌基因的表达发挥着类似癌基因的作用, 是目前肿瘤研究中的热点分子^[2]。因此, 评价 miR-21 在活体中的表达水平, 可能在恶性肿瘤的早期诊断、靶向治疗方面具有潜在的应用价值。

基金项目: 国家自然科学基金(81101065, 81071183, 31100604); 国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03011409); 高等学校博士学科点新教师专项科研基金(20110001120043)

通讯作者: 王荣福, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 北京大学第一医院核医学科, 北京市西城区西什库大街 8 号(100034); E-mail: rongfu_wang@163.com
康磊, 助理研究员, 博士; 北京大学第一医院核医学科, 北京市西城区西什库大街 8 号(100034); E-mail: kanglei@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-20; **修回日期:** 2013-11-26

反义技术是一项基于靶基因序列特异性和碱基互补配对原理的核酸靶向识别技术,已有多年的发展历史,特别是依靠反义技术发展起来的反义显像和反义治疗已触及到核医学研究多个领域。其中,反义显像是以放射性核素标记靶向 DNA 或 mRNA 反义的寡核苷酸,经引入体内后通过与靶向核酸分子识别、结合进而进行基因显像的一种显像技术^[3]。放射性核素示踪方法具有灵敏度高、安全可靠、无创无毒等诸多优点,而 ^{99m}Tc 以其合理的物理特性和经济性已广泛应用于临床检查^[4]。因此,提高 ^{99m}Tc 对反义探针的标记率,获得高效稳定的标记产物,将对以 ^{99m}Tc 标记的反义寡核苷酸探针在活体显像中应用起重要推动作用。

基于以上优点,本文将反义技术与核素示踪技术相结合,选择恶性肿瘤高表达的 miR-21 作为反义靶点,探索了核素反义探针的制备及优化反应条件,拟构建一种 ^{99m}Tc 标记的 miR-21 靶向反义寡核苷酸,简化标记程序,以期 miRNA 体内无创示踪研究提供前期准备。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)购于 Waters 公司; NanoDrop 2000 紫外分光光度计购于 Thermo Scientific 公司;真空冻干机产自 SpeedVac 公司; RM905 放射性活度仪购于中国计量科学院。

Sephadex G25、Waterman 层析滤纸、琼脂糖凝胶均购于 GE Amersham 公司。双功能螯合剂 S-乙酰基-NHS-MAG3 由 Hnatowich (University of Massachusetts Medical School) 提供。氯化亚锡($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)购于 Sigma-Aldrich 公司,其他常用化学试剂均购于北京化学试剂公司。所用试剂均为分析纯度。放射性核素 ^{99m}Tc 液购自中国原子能研究院(China Institute of Atomic Energy)。

1.2 方法

1.2.1 探针的设计及化学合成

miR-21 的反义寡核苷酸序列为 5'-UCA ACA TCA GTC TGA TAA GCU A-3'。在结构设计中,对全

程序列进行磷酸骨架的磷酸酯修饰,以增加核酸稳定性及脂溶性,并且分别对探针两端各 3 个碱基进行 2'-甲氧基(2'-OMe)修饰以提高抗核酸酶能力并提高 T_m 值增加结合亲和力。探针 5'端连接 1 个 6 碳己基及乙酰基,以此作为连接双功能螯合剂 NHS-MAG3 的功能基团。探针的化学修饰及合成由生物工程股份有限公司(Sangon Biotech)完成。

1.2.2 偶联反应

以 0.3mol/L 的 HEPES(N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) 缓冲液配制 NHS-MAG3 溶液(7.25mg/ml),取适量体积溶解待偶联核酸,混匀后常温静置 1~2h 进行充分反应。反应结束后,向反应液中加入 5 μl 醋酸铵溶液(2.0mol/L),随即加入适量含 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20mg/ml) 的酒石酸钠缓冲液溶液(含 0.5mol/L 碳酸氢钠、0.25mol/L 醋酸铵和 0.175mol/L 的氢氧化铵,浓度为 100mg/ml)。将混合液沸水浴 10~20min 后低速离心 5min。取上清液进行 HPLC 柱层析(Sephadex G25 为填充剂)。回收物进行紫外吸光度值鉴定后回收冻干,于 -80°C 贮存备用。

1.2.3 ^{99m}Tc 的标记反应

向偶联产物中加入 45 μl 的醋酸铵溶液(0.25mol/L)和 15 μl 的酒石酸钠缓冲液(50mg/ml)使之充分溶解。向反应液中加入不同浓度新鲜配制的氯化亚锡溶液 5 μl (以 1mg/ml 维生素 C 稀盐酸溶液配制),随即加入不同体积及放射性活度的 ^{99m}Tc 液。充分混匀后常温静置反应 0~4h。不同条件的反应产物经 HPLC 柱层析(Sephadex G25 为填充剂)分离纯化。通过测定洗脱液的紫外吸光度及放射性活度峰值,以测定标记产物的标记率。此外,对未偶联探针以同样条件进行标记并测定紫外吸光度及放射性活度结果。

1.2.4 标记探针的标记率和放化纯的测定

标记探针的标记率和放化纯采用 HPLC 柱层析测定。流动相为不同浓度的水和乙腈,填充物为 Sephadex G25。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳实验

琼脂糖凝胶电泳实验用于鉴定 ^{99m}Tc 标记的寡核苷酸探针的完整性及标记效果,排除标记反应后的寡核苷酸发生降解或脱标现象。配制高浓度的琼脂糖凝胶(5%~10%)以提高凝胶对小分子探针的分辨率。分别依次加样分子量标准样品、未标记探针、

^{99m}Tc 液、标记探针(纯化前)和标记探针(纯化后)。120V 电压下电泳 20min 后,紫外光下观察核酸条带的位置,并等份切开凝胶测定相应放射性计数。

1.2.6 血清稳定性测定

将标记探针置于新鲜人血清中并在 37℃ 条件下孵育,探针浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。使用 HPLC 测定探针分别孵育 1、2、3、4、5、6h 的放化纯度。

2 结果

2.1 偶联及标记结果

将寡核苷酸探针与 NHS-MAG3 偶联后,其偶联产物经 Sephadex G25 柱层析分离,DNA 峰管集中于第 6 管(0.5ml/管)。将偶联产物及未偶联探针分别在相同的标记条件下反应 1h,NHS-MAG3 偶联后的标记探针的紫外分光光度及放射性计数峰值均集中于第 6 管,相比之下,未偶联探针于第 6 管可见紫外吸收峰,但放射性计数峰由第 8 管出现一直持续至第 20 管,紫外吸光度及放射性计数峰管不符(Figure 1)。NHS-MAG3 偶联后的标记产物其标记率可达 97%,放化纯不低于 98%。

2.2 不同标记条件对标记率的影响

2.2.1 氯化亚锡溶液的浓度

标记反应中过量的氯化亚锡会导致过多胶体的产生从而降低标记率,而过少的氯化亚锡可能会起不到足够的还原效果。固定其他标记条件,分别测定不同浓度下(2、4、6、8、10mg/ml)的氯化亚锡溶液使用量对标记率的影响,结果显示,当氯化亚锡投入量最低时(2mg/ml),标记产物的标记率最高,可达 94%以上,随氯化亚锡投入量增加,标记率明显降低(Figure 2a)。因此本实验选择 2mg/ml 为氯化亚锡最佳使用浓度。

2.2.2 ^{99m}Tc 液的体积

反应体系中加入的 ^{99m}Tc 液体积不同亦会影响标记效率。结果显示,在确定其他条件时,投入不同体积(5、10、15、20、25 μl)的 ^{99m}Tc 液,当 ^{99m}Tc 体积最小(5 μl)时,标记率最高为 96%,当 ^{99m}Tc 投入量增加,标记率降低,体积增加至 20 μl 时标记率已低于 90%(Figure 2b)。故使用高比活度 ^{99m}Tc 液是提高标记率的重要影响因素。

2.2.3 反应时间

按照不同的反应时间(0、30、60、90、120、150、

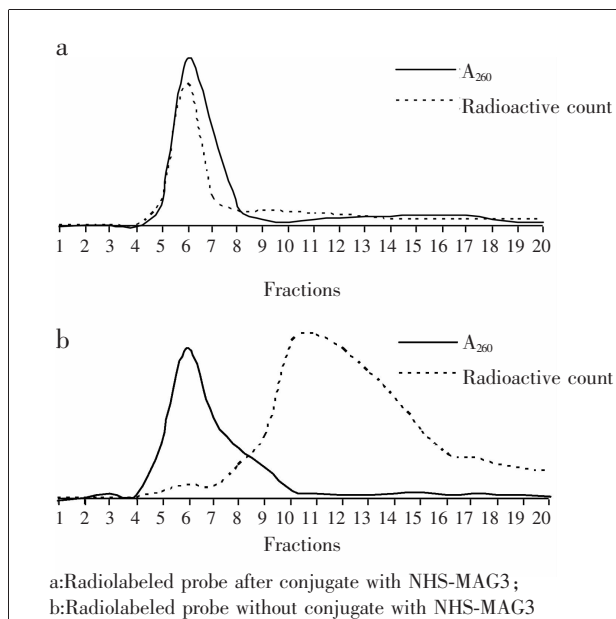


Figure 1 Absorbance and radioactive count analysis of purified products after radiolabeling

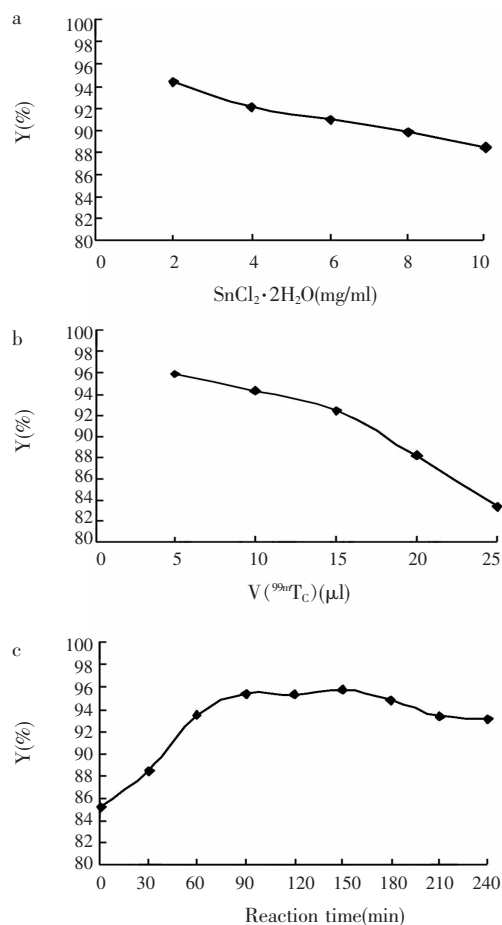


Figure 2 Effect on the labeling efficiency by different reaction conditions

180、210、240min)进行标记,结果显示,随着反应时间的延长,标记率显著提高,当反应进行 30min 时,标记率已达 88%,反应 1h 达 90%以上,延长反应时间至 3h 内,标记率升高并维持在 96%以上。但继续延长标记时间会导致标记率下降,至 4h 时标记率下降至 90%(Figure 2c)。因此,最终优化反应时间为 90min,既能获得最佳的标记效果,又能减少标记探针的准备时间。

2.3 标记探针的凝胶电泳鉴定

凝胶电泳结果显示未标记探针、纯化前标记探针以及纯化后标记探针的条带,位于同一位置,未见拖尾及降解现象 (Figure 3)。^{99m}Tc 液泳道无条带出现。测量凝胶放射性分布结果显示,标记探针的放

射性分布与条带位置完全一致,纯化前的标记样品可见 2 个放射性峰,左峰与纯化后样品一致,为标记探针所在位置;右峰与 ^{99m}Tc 液位置一致,提示为多余 ^{99m}Tc 液。纯化后标记样品仅见单独的标记探针峰,未见脱标现象。未标记探针无放射性计数峰值分布。由此可见,寡核苷酸探针在标记前后、纯化前后均具有良好的核酸完整性,为保持生物活性提供保障。

2.4 探针稳定性

分别测定标记探针在人新鲜血清中孵育 1、2、3、4、5、6h 时的放化纯度,HPLC 结果显示各时间点下探针的放化纯度为 96.3%~99.1%,6h 时最低,仍大于 96%,提示探针具有良好的血清稳定性 (Figure 4)。

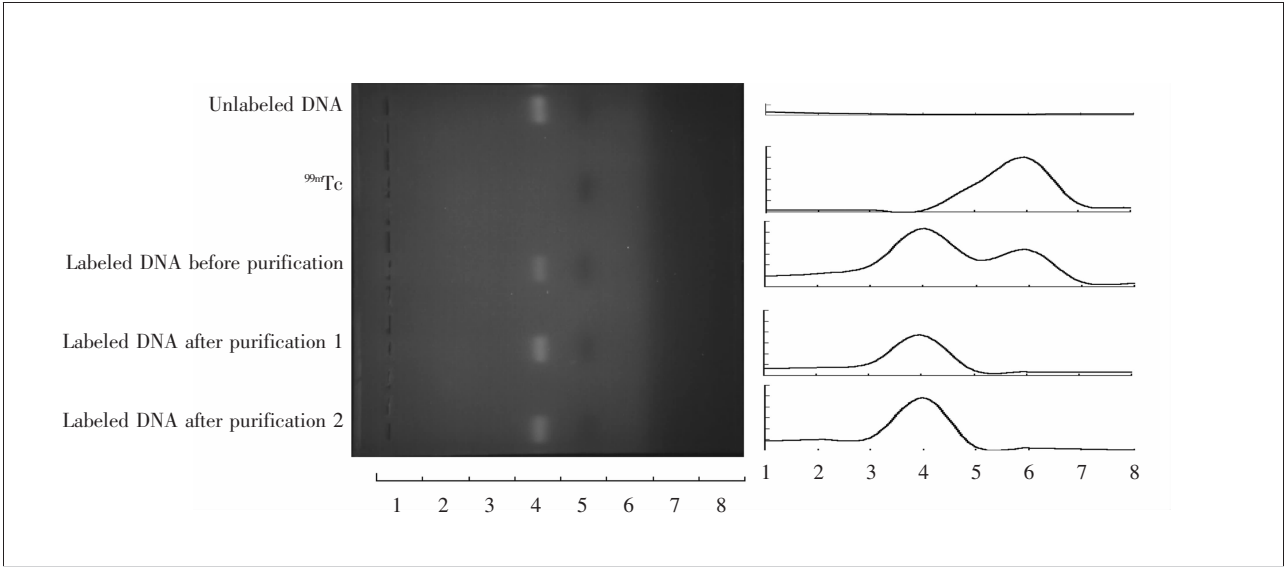


Figure 3 Agarose gel electrophoresis-molecular identification

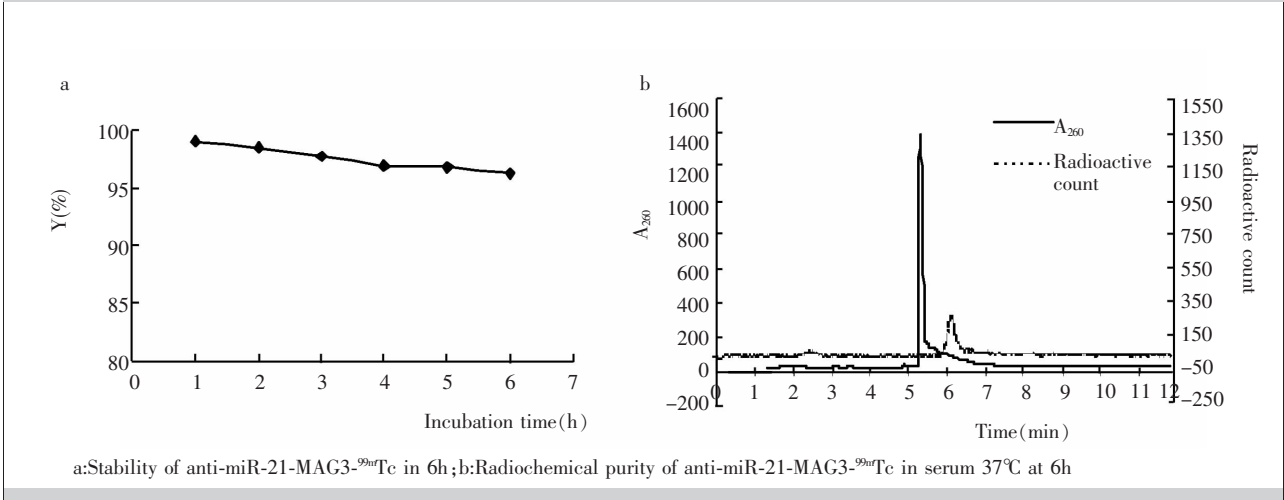


Figure 4 Stability of anti-miR-21-MAG3-^{99m}Tc(HPLC) in serum 37°C

3 讨论

近年来,小分子非编码 RNA 一直是肿瘤相关分子生物学的研究热点,其中,miRNA 是一类内源性转录后水平的基因调节因子,与肿瘤关系密切。miRNA 常通过调控多基因的表达进而影响肿瘤的发生发展,或者发挥促癌作用,或者发挥抑癌作用^[5,6]。miR-21 已被广泛证实是一个重要的促癌因子,在肺癌、乳腺癌、淋巴瘤、胰腺癌、肝癌等绝大多数恶性肿瘤中均具有过表达特性^[7]。在活体水平判断 miRNA 的表达遗传谱和表达水平成为分子影像新的研究方向,有助于实现肿瘤的早期诊断、分型及预后判断,同时为分子治疗提供新的靶标。

使用反义寡核苷酸的反义技术被广泛应用于 miRNA 活性功能研究。由于 miRNA 分子量小,因此反义寡核苷酸被认为是最佳甚至是惟一的 miRNA 特异性抑制的工具。这种特异性结合特性为在活体水平研究 miRNA 提供了有效基础。放射性核素显像与反义显像结合具有先天性的优势,使用放射性核素作为示踪载体,进行的活体成像具有使用安全可靠、毒性小、无创的优点^[8]。

合成高纯度、高活性、稳定的反义核素探针是进行反义显像的关键。探针结构的设计关系标记反应的成功与否,并影响后续活性实验的效果。目前反义显像探针的制备多通过双功能螯合剂的偶联作用,螯合剂包括二乙基三胺五乙酸 (diethylenetriamine pentacetate, DTPA)、胍基尼古酰胺 (guanidinonitrimide, HYNIC) 及 NHS 衍生物类,如 NHS-MAG3、NHS-MAG2、NHS-MAS3 等^[8]。本实验采用 NHS-MAG3 这一双功能螯合剂作为介导 ^{99m}Tc 标记寡核苷酸的偶联分子,通过在寡核苷酸 5' 末端添加己基及乙酰基结构基团,使两者紧密结合后再通过酒石酸缓冲液的转螯合作用达到标记效果。目前,已有一些研究将放射性核素示踪技术与反义技术相结合,以体内 mRNA 作为显像靶点。Liu 等^[9]、Kang 等^[10]分别通过构建基于寡核苷酸和小干扰 RNA 分子制备的标记探针在活体水平对人端粒酶逆转录酶 mRNA 进行活体显像。虽然以上实验与本研究使用的螯合剂均为 NHS-MAG3,但是本研究中标记反应的标记率达 96% 以上,远高于前者实验的标记率(70% 左右)。除探针本身结构和序列的差异,标记条件的优化可能

对标记率有着更明显的影响。

使用双功能螯合剂介导的 ^{99m}Tc 标记反应由于是两步法反应,因此影响标记率的因素较多。本文选择了氯化亚锡、 ^{99m}Tc 的投入量及反应时间这三个条件进行不同条件下标记率的测定,以期优化标记反应条件。第一,氯化亚锡能够还原高价态的 ^{99m}Tc ,还原后的 ^{99m}Tc 与 MAG3 分子进行偶联进而标记探针。氯化亚锡在空气中易被氧化,反应体系中过量的氯化亚锡可被氧化而导致锡胶体的产生。虽然配备氯化亚锡时需要加入维生素 C 作为抗氧化剂,但当氯化亚锡投入量远高于待标记分子时,仍可能产生锡胶体减低标记率。本研究结果显示,氯化亚锡溶液浓度为 2mg/ml 时,标记率最高,增加氯化亚锡的浓度会导致标记率下降。本研究进行优化后的标记率在同等条件下高于 Wang 等^[11]实验的标记率。第二,理论上偶联后的寡核苷酸与 ^{99m}Tc 标记的分子比例是 1:1,过量的还原价 ^{99m}Tc 容易生成过多的锡胶体从而降低标记率。因此,反应体系中加入 ^{99m}Tc 液量不应过大。而且,锡液体积越大,分子进行标记偶联的概率相对越低,也会降低标记率。本研究在使用同等锡液体积(20 μl 以及 25 μl)时,标记率优于 Qin 等^[12]实验中的标记率。第三,反应时间的延长可促使标记反应更充分,但同时已标记的探针可能会发生脱标现象,而且锡胶体产生的概率越大。本实验显示标记反应时间在 1.5~2.5h 之间时,标记反应最充分,所得标记率最高。考虑到缩短反应时间并减少锡胶体产生的几率,本实验最终选取 1.5h 作为最佳反应时间。因此,只有综合设定合适的氯化亚锡、 ^{99m}Tc 和反应时间等条件时,才能获得较高的标记率。

标记探针的体外或人新鲜血清的稳定性亦对于反义显像的效果有明显影响。本研究通过琼脂糖凝胶电泳实验和血清稳定性实验评价了标记后的分子探针有无被吸附、降解或者脱标现象的产生。实验结果显示,寡核苷酸探针在标记前后、纯化前后均具有良好的核酸完整性,且在血清中具有良好的抗核酸酶能力。不仅证明核酸探针被成功标记,并为进一步进行生物活性评价提供了良好的稳定性保障。

综上,miR-21 靶向的 ^{99m}Tc 标记的寡核苷酸反义探针经过通过结构设计和反应条件的多种优化,能够大大提高标记率,无需纯化即可进一步应用,简化制备程序,并进一步研究 miRNA 在肿瘤分子显像

的研究奠定良好的基础。

参考文献:

- [1] Stenvang J, Petri A, Lindow M, et al. Inhibition of micro RNA function by anti-miR oligonucleotides [J]. Silence, 2012, 3(1):1.
- [2] Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. Nature, 2010, 467(7311):86-90.
- [3] Skotland T. Molecular imaging: challenges of bringing imaging of intracellular targets into common clinical use [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2012, 7(1):1-6.
- [4] Banerjee S, Pillai MR, Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals[J]. Semin Nucl Med, 2001, 31(4):260-277.
- [5] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006):350-355.
- [6] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23:175-205.
- [7] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J]. Oncogene, 2007, 26(19):2799-2803.
- [8] Ma C, Kang L, Wang RF. Progress of researches on technetium-99m radiolabeling methods in antisense imaging[J]. Journal of Nuclear and Radiochemistry, 2013, 35(5):257-262. [马超, 康磊, 王荣福. 放射性核素锝[^{99m}Tc]标记方法在反义显像中的应用进展[J]. 核化学与放射化学, 2013, 35(5):257-262.]
- [9] Liu M, Wang RF, Zhang CL, et al. Noninvasive imaging of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA with ^{99m}Tc-radiolabeled antisense probes in malignant tumors[J]. J Nucl Med, 2007, 48(12):2028-2036.
- [10] Kang L, Wang RF, Yan P, et al. Noninvasive visualization of RNA delivery with ^{99m}Tc-radiolabeled small-interference RNA in tumor xenografts[J]. J Nucl Med, 2010, 51(6):978-986.
- [11] Wang Y, Liu G, Hnatowich DJ. Methods for MAG3 conjugation and ^{99m}Tc radiolabeling of biomolecules[J]. Nat Protoc, 2006, 1(3):1477-1480.
- [12] Qin G, Zhang Y, Cao W, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques with technetium-99m-labelled antisense oligonucleotides [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005, 32(1):6-14.

本期专题报道特邀组稿专家王荣福教授简介



王荣福,男,1955年出生于福建浦城。医学和药学博士,主任医师,博士生导师,北京大学二级教授,教育部“核技术应用”重点学科学术带头人。现任北京大学医学部核医学系主任和北京大学第一医院核医学科主任,北京大学第一临床学院—美国霍普金斯大学医学院分子影像中心主任,亚太核医学学院中国负责人,第十届国家药典委员会委员,国家科学技术奖励、中华医学科技奖和国家自然科学基金评审专家。兼任中国核学会核医学分会、中国医学装备协会核医学装备与技术和中国抗癌协会肿瘤影像专业委员会副主任委员及其他多个学术团体常委和国内外多种学术期刊编委、审稿专家。

从事核医学医教研31年。主要从事核素示踪分子功能影像技术在临床医学基础与应用研究、诊断与治疗靶向放射性药物研发等。多次应邀参加国内外学术交流大会报告和会议主持,承担多项国家级、部委级课题项目,主编专著3部和核医学教材11部。在国内外学术期刊发表400多篇论文(SCI收录40多篇),获得3项中国发明专利和美国核医学荣誉奖、北京科学技术进步二等奖、美国核医学最佳基础科学研究优秀论文奖、北京大学教学成果一等奖、北京大学《核医学》精品课程、北京市高等教育精品教材、北京市教学成果二等奖、北京大学优秀教学奖和北京大学医学部优秀人才计划奖励。

通讯地址:北京市西城区西什库大街8号北京大学第一医院核医学科(100034),联系电话:0086-10-83572594,传真:0086-10-66551706, E-mail:rongfu_wang@163.com