

Apt-siRNA 联合多西他赛靶向治疗 PSMA 阳性前列腺癌及⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA 的显像监测

教玉颖 李丽 付鹏

哈尔滨医科大学附属第一医院核医学科, 哈尔滨 150000

通信作者: 付鹏, Email: fupeng0451@163.com

【摘要】 目的 前列腺特异膜抗原(PSMA)适配体 Apt-A10-3.2 可作为前列腺癌早期诊断和靶向治疗的特异性配体。鼠双微体(MDM2)与前列腺癌恶性程度密切相关,且 MDM2 小干扰 RNA(siRNA)可通过 RNA 干扰机制靶向沉默 MDM2 目的基因。设计合成 PSMA Apt-MDM2 siRNA 新型嵌合体,与多西他赛(DTX)联合以探讨 PSMA 阳性前列腺癌的靶向治疗及⁹⁹Tc^m 标记嵌合体显像监测相结合的诊疗新模式。**方法** PSMA Apt-A10-3.2 与 MDM2 siRNA 通过共价偶联合成嵌合体 Apt-siRNA,在 PSMA 表达阳性的前列腺癌细胞株(22RV1 及 LNCaP)中,采用 Apt-siRNA 单独或联合 DTX 对细胞株进行处理,通过 Western blot 检测 MDM2 及凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)及其相关 X 蛋白(Bax)、聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)、半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)]表达水平,评价治疗效果。取 22RV1 荷瘤裸鼠 15 只,分别予 PBS、DTX+Apt(200 pmol)和 DTX+Apt(400 pmol)处理,观察肿瘤体积与 MDM2 水平;行⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA SPECT 显像,获得肿瘤/肌肉放射性计数(T/M)比值。采用单因素方差分析和 Tukey 多重检验、线性回归分析等分析数据。**结果** 在 22RV1 及 LNCaP 细胞株中,Apt-siRNA 明显降低 MDM2 表达(0.25 ± 0.02 , $F = 183.40$, $P < 0.001$; 0.56 ± 0.03 , $F = 37.15$, $P < 0.001$);Apt-siRNA 联合 DTX 治疗前列腺癌后,Bcl-2 表达水平明显降低,Bax、PARP、caspase-3 表达水平明显升高。在 22RV1 荷瘤裸鼠中,Apt-siRNA 联合 DTX 明显抑制肿瘤 MDM2 蛋白表达(400 pmol : 0.59 ± 0.12 ; $F = 49.99$, $P = 0.023$)及肿瘤体积(400 pmol : $(0.22 \pm 0.07) \text{ cm}^3$; $F = 71.30$, $P = 0.039$];SPECT 显像示,治疗后 T/M 比值明显降低(400 pmol : 2.07 ± 0.22 ; $F = 34.99$, $P = 0.022$),与 MDM2 表达水平有线性回归关系($R^2 = 0.875$, $P < 0.001$)。**结论** Apt-siRNA 联合 DTX 能有效抑制前列腺癌进展,并通过偶联⁹⁹Tc^m 实现 PSMA 阳性前列腺癌可视化靶向诊疗。

【关键词】 前列腺肿瘤;前列腺特异膜抗原;RNA,小分子干扰;紫杉烷类;锝;放射性核素显像;小鼠,裸

基金项目:国家自然科学基金(81671714)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201027-00394

Targeted therapy of Apt-siRNA combining with docetaxel for PSMA-positive prostate cancer and monitoring imaging of ⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA

Jiao Yuying, Li Li, Fu Peng

Department of Nuclear Medicine, 1st Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China

Corresponding author: Fu Peng, Email: fupeng0451@163.com

【Abstract】 Objective Apt-A10-3.2 (aptamer of prostate specific membrane antigen (PSMA)) can be used as a specific ligand for early diagnosis and targeted treatment of prostate cancer. Mouse double minute 2 homolog (MDM2) is closely related to the malignancy of prostate cancer, and MDM2 small interfering RNA (siRNA) can silence MDM2 gene through RNA interference. To design a novel chimera of PSMA Apt-MDM2 siRNA and combine it with docetaxel (DTX) to explore a new diagnosis and treatment model combining targeted therapy of PSMA-positive prostate cancer with ⁹⁹Tc^m-chimera imaging monitoring. **Methods** Apt-siRNA were obtained by covalent connection of PSMA Apt-A10-3.2 and MDM2 siRNA, which was combined with DTX to treat PSMA-positive prostate cancer cell lines (22RV1 and LNCaP). Cell lines were treated with Apt-siRNA alone or in combination with DTX. The levels of MDM2 and apoptosis-related proteins (B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), poly ADP-ribose polymerase (PARP), caspase-3) were detected by Western blot, which were used to evaluate the therapeutic effect. Fifteen BALB/c mice bearing 22RV1 xenografts were treated with PBS, DTX+Apt-siRNA (200 pmol) and DTX+Apt-siRNA (400 pmol), respectively. Tumor volume and MDM2 level were observed, and ⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA SPECT imaging was performed to obtain the tumor/muscle (T/M) ratio. One-way analysis of variance,

Tukey's test and linear regression analysis were used for data analysis. **Results** The levels of MDM2 protein were significantly decreased by Apt-siRNA (0.25 ± 0.02 , $F = 183.40$, $P < 0.001$; 0.56 ± 0.03 , $F = 37.15$, $P < 0.001$) in 22RV1 and LNCaP cells. After the treatment of Apt-siRNA+DTX, the levels of Bcl-2 were significantly decreased, and the levels of Bax, PARP and caspase-3 were significantly increased. MDM2 protein level (400 pmol ; 0.59 ± 0.12 ; $F = 49.99$, $P = 0.023$) and tumor volume (400 pmol ; (0.22 ± 0.07) cm^3 ; $F = 71.30$, $P = 0.039$) were significantly inhibited by Apt-siRNA+DTX in mice bearing 22RV1 xenografts. As for $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA SPECT imaging *in vivo*, T/M ratio of treatment group was significantly decreased (400 pmol ; 2.07 ± 0.22 ; $F = 34.99$, $P = 0.022$), and there was a linear regression relationship between T/M ratio and the expression level of MDM2 ($R^2 = 0.875$, $P < 0.001$). **Conclusion** Apt-siRNA combined with DTX can effectively inhibit the progression of prostate cancer, and realize visual targeted diagnosis and treatment of PSMA-positive prostate cancer by coupling radionuclide technetium.

【Key words】 Prostatic neoplasm; Prostate-specific membrane antigen; RNA, small interfering; Taxoids; Technetium; Radionuclide imaging; Mice, nude

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81671714)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201027-00394

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是最常见的恶性肿瘤之一,也是导致男性癌症死亡的重要因素^[1]。目前 PCa 的治疗主要依靠手术、放疗、化疗及雄激素阻断疗法,虽然疗效较好,但也导致了正常组织的毒性及不良反应^[2]。多西他赛(docetaxel, DTX)是紫杉醇类药物,常用于 PCa 标准化疗方案,但在肿瘤后期易产生耐药性^[3]。因此,寻找新的治疗靶点及方法尤为重要。鼠双微体(mouse double minute 2 homolog, MDM2)在 PCa 中过度表达,与 PCa 的侵袭性、恶性程度及远处转移密切相关^[4-5],可作为 PCa 的潜在治疗靶点。目前,基因疗法可通过 RNA 干扰技术抑制 MDM2 在 PCa 中的表达^[6],但其靶向性及稳定性仍不确定。前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)在 PCa 表面高度表达,是靶向 PSMA 阳性 PCa 的良好靶点。2006 年,McNamara 等^[7]合成了 Apt-A10-小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)嵌合体,并验证了其作用机制。2009 年, Dassie 等^[8]合成了靶向及稳定性更好的 PSMA 适配体(Apt-A10-3.2),进一步获得稳定的 Apt-siRNA 嵌合体,可在体内有效抑制肿瘤生长。另外,适配体不仅可用作疾病治疗,也可用作疾病诊断^[9]。本研究选取 Apt-MDM2 siRNA 与 DTX 联合治疗 PSMA 阳性 PCa,并通过偶联 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 拟实现 PCa 的可视化靶向诊疗。

材料与方法

1.仪器与试剂。PCa 细胞株 LNCaP 和 22RV1 取自国家实验细胞平台。MDM2 siRNA 由前期实验筛选出,由苏州吉玛基因股份有限公司合成提供, Apt-A10-3.2 及 Apt-siRNA 由广州锐博生物技术有限公司合成提供,适配体序列与 Dassie 等^[8]合成优化的适配体序列一致。细胞增殖-毒性检测试剂盒(cell counting kit 8, CCK8)购于上海东仁化学科技有限公司。

DTX(T1034)购于美国 Targetmol 公司。PBS 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。抗体:MDM2 (ARG1392)购自中国 Arigo 公司;PSMA(#12815)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3;#9662)及聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP;#9542)购自美国 CST 公司;B 细胞淋巴瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax;50599-2-Ig)、治疗组 Bcl-2(12789-1-AP)、 β -actin(20536-1-AP)及山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗(SA00001-15)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。双功能螯合剂 6-胍基烟酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(succinimidyl 6-hydrazinonicotinate hydrochloride, SHNH)由美国 SoluLink 公司提供,乙二胺-N, N'-二乙酸(ethylenediamine-N, N'-diacetic acid, EDDA)及 SnCl_2 购于美国 Sigma 公司。Sep-Pak C18 小柱及 G25 凝胶购于美国 Waters 公司。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 由北京原子高科股份有限公司 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器生产。PSMA Apt-A10-3.2、Apt-siRNA、SHNH 及 DTX 二级结构见图 1。

2.实验动物。15 只无特殊病原体级 BALB/c 雄性裸鼠(4~5 周龄,16~18 g)购于北京维通利华实验动物技术公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006,均状态良好并饲养于屏障系统内。动物实验通过哈尔滨医科大学动物伦理委员会批准,遵守动物实验的各项伦理要求。

3. CCK8 细胞增殖-毒性检测。将细胞株 LNCaP 和 22RV1 种植于 96 孔板(5 000/孔)内,待贴壁良好后分别加入 0、5、10、15 和 20 nmol/L DTX,作用 24 h 后每孔加入 10 μL 新鲜配置 CCK 溶液,作用 3 h 后使用酶标仪于 450 nm 波长处测定每孔吸光度,计算细胞存活能力。同样,DTX(10 nmol/L)、Apt-siRNA(20 $\mu\text{mol/L}$)、DTX(10 nmol/L)+Apt-siRNA(20 $\mu\text{mol/L}$)

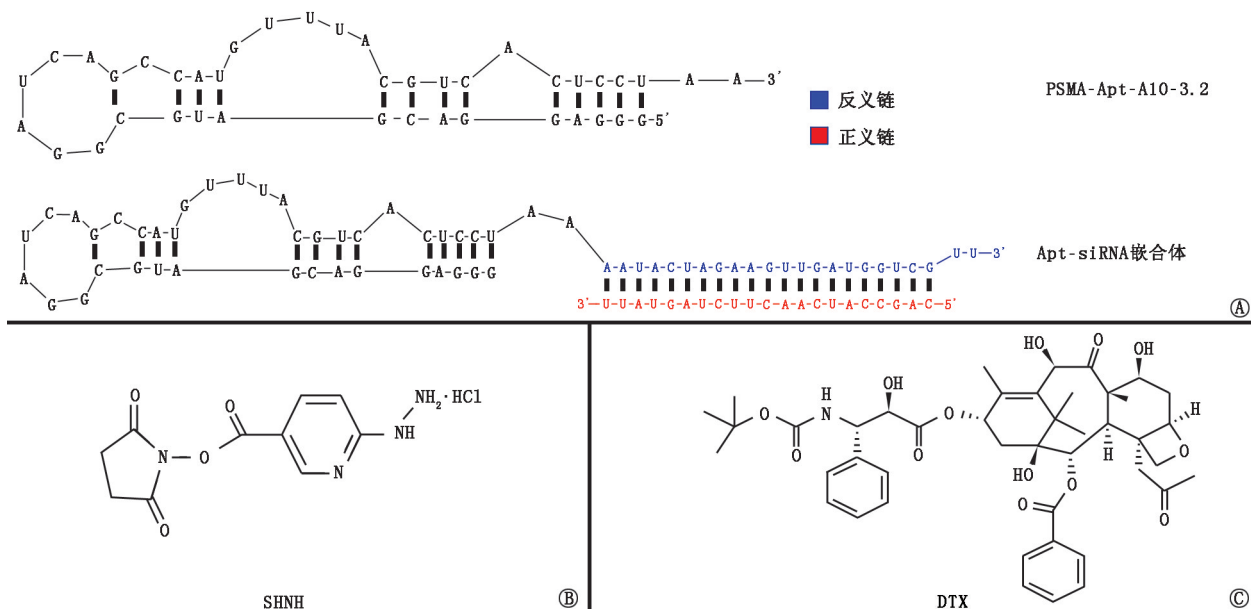


图1 前列腺特异膜抗原(PSMA)适配体-A10-3.2(Apt-A10-3.2)、PSMA 适配体与小干扰 RNA(Apt-siRNA)嵌合体、6-胍基烟酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHNH)及多西他赛(DTX)二级结构示意图

分别作用于 PCa 细胞株 24 h, 计算细胞存活能力。

4. Western blot。将细胞株 LNCaP 和 22RV1 种植于 6 孔板(2×10^5 /孔)内, 待贴壁良好后, 将 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 siRNA、Apt-空白及 Apt-siRNA 分别作用于 PCa 细胞株, 作用 48 h 后, 用胰酶消化, 蛋白质裂解, 测定相关蛋白质浓度。同样, DTX (10 nmol/L)、Apt-siRNA ($20 \mu\text{mol/L}$)、DTX (10 nmol/L) + Apt-siRNA ($20 \mu\text{mol/L}$) 分别作用 48 h 后, 测定相关蛋白质浓度。以聚丙烯酰胺凝胶电泳(dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法以等体积等浓度上样分离蛋白质样品, 恒压法将蛋白质转到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 并用质量分数 5% ($5 \text{ g}/100 \text{ ml}$) 牛奶封闭, 抗体温育, 利用上海天能科技有限公司的全自动数码凝胶图像分析系统进行蛋白质显影。

5. Apt-MDM2 siRNA 体内治疗及显像。将 15 只 22RV1 荷瘤裸鼠完全随机法分为 3 组(5 只/组), 即 PBS、DTX+Apt-siRNA (200 pmol) 及 DTX+Apt-siRNA (400 pmol) 组。于裸鼠右下肢皮下注入 $200 \mu\text{l}$ 细胞悬液(混有 $100 \mu\text{l}$ 基质胶), 待肿瘤体积(长 $\times$ 宽 $\times$ 宽/2)达 $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ 时, 腹内连续注射 DTX(5 mg/kg) + Apt-siRNA(200 pmol)、DTX(5 mg/kg) + Apt-siRNA(400 pmol) 14 d, 隔日测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积; 另外测量 MDM2 表达水平。

按照 Fu 等^[10]的方法合成并纯化获得 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA, 测定其放化纯、稳定性及标记率。尾静脉注射 $7.4 \text{ MBq } ^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA 后 2 h 行 SPECT

静态显像(500 计数), 缩放 1.7, 矩阵 256×256 , 计算肿瘤/肌肉放射性计数(tumor/muscle, T/M)比值。显像后处死小鼠, 取肿瘤组织用于后续 MDM2 蛋白检测。

6. 统计学处理。采用 IBM SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 7 软件行统计学分析。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 2 组数据间的关系分析采用线性回归分析。

结 果

1. Apt-siRNA 下调 PSMA 阳性 PCa 细胞株中 MDM2 的表达。LNCaP 与 22RV1 的 MDM2 蛋白表达水平差异没有统计学意义(0.85 ± 0.04 与 0.85 ± 0.03 ; $t = 0.21$, $P = 0.702$; $n = 3$), 两者 PSMA 蛋白表达水平差异有统计学意义(1.74 ± 0.06 与 0.78 ± 0.06 ; $t = 21.2$, $P < 0.001$; $n = 3$)。在 LNCaP 细胞株中, PBS、siRNA、Apt-空白组及 Apt-siRNA MDM2 蛋白表达水平分别为 1.15 ± 0.06 、 1.15 ± 0.08 、 1.12 ± 0.13 和 0.56 ± 0.03 ($F = 37.15$, $P < 0.001$), 表明 Apt-siRNA 能有效降低 MDM2 蛋白水平。在 22RV1 细胞株中, 相对于 PBS、siRNA 及 Apt-空白组, Apt-siRNA 亦能有效降低 MDM2 蛋白表达水平, 上述四者 MDM2 蛋白表达水平分别为 0.61 ± 0.03 、 0.59 ± 0.01 、 0.60 ± 0.02 和 0.25 ± 0.02 ($F = 183.40$, $P < 0.001$)。

2. DTX 联合 Apt-siRNA 抑制 PSMA 阳性 PCa 细

胞生长。(1)细胞存活情况。DTX 作用 24 h 后,在 LNCaP 细胞株中,0、5、10、15 和 20 nmol/L 浓度下的细胞存活相对表达依次为 1.00 ± 0.11 、 0.82 ± 0.05 、 0.47 ± 0.05 、 0.36 ± 0.03 和 0.25 ± 0.03 ($F=77.35$, $P<0.001$);在 22RV1 细胞株中,上述浓度细胞存活相对表达依次为 1.00 ± 0.05 、 0.81 ± 0.08 、 0.44 ± 0.05 、 0.36 ± 0.03 和 0.21 ± 0.03 ($F=108.00$, $P<0.001$)。DTX 与 Apt-siRNA 联合作用于 LNCaP 细胞 24 h 后,细胞存活(0.21 ± 0.03)低于 PBS(1.00 ± 0.03)、单独 Apt-siRNA(0.76 ± 0.06)、单独 DTX(0.46 ± 0.04 ; $F=212.80$, $P<0.001$);DTX 与 Apt-siRNA 联合作用于 22RV1 细胞 24 h 后,细胞存活(0.18 ± 0.03)低于 PBS(1.00 ± 0.09)、单独 Apt-siRNA(0.78 ± 0.06)、单独 DTX(0.46 ± 0.06 ; $F=99.13$, $P<0.001$)。结果表明,DTX 与 Apt-siRNA 联合可有效抑制 LNCaP 及 22RV1 细胞增殖。

(2)蛋白质表达情况(图 2)。DTX 与 Apt-siRNA 联合作用于 LNCaP 及 22RV1 细胞 48 h 后,凋亡蛋白 Bax、caspase-3、PARP 较 PBS 或两者单独作用组明显上调,而 Bcl-2 则明显降低,表明 DTX 联合 Apt-siRNA 促进 PCa 细胞凋亡。

3. DTX 联合 Apt-siRNA 体内治疗。在裸鼠肿瘤体积方面(图 3),相较于 PBS 组[$(1.18\pm0.39)\text{ cm}^3$],DTX 联合 Apt-siRNA 组肿瘤体积下降[200 pmol, $(0.48\pm0.15)\text{ cm}^3$;400 pmol, $(0.22\pm0.07)\text{ cm}^3$],且 DTX 联合 Apt-siRNA 400 pmol 组肿瘤体积下降较 200 pmol 组更明显($F=71.30$, $P=0.039$; $n=5$)。在 MDM2 蛋白表达水平方面,相较于 PBS 组(1.36 ± 0.07),DTX 联合 Apt-siRNA 组表达下降(200 pmol, 0.84 ± 0.09 ;400 pmol, 0.59 ± 0.12),且 DTX 联合 Apt-siRNA 400 pmol 组表达下降较 200 pmol 组更明显

($F=49.99$, $P=0.023$; $n=5$)。结果表明,DTX 联合 Apt-siRNA 有效抑制 22RV1 荷瘤裸鼠肿瘤生长。

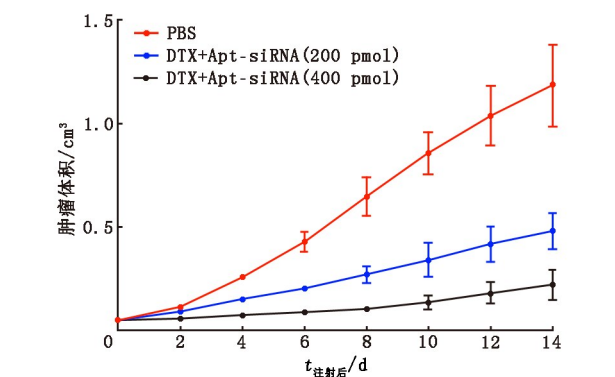


图 3 注射不同药物后 22RV1 荷瘤裸鼠肿瘤体积曲线图。可见分别注射 PBS、DTX+Apt-siRNA (200 pmol) 和 DTX+Apt-siRNA (400 pmol) 后,小鼠肿瘤体积受到不同程度抑制

4. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA SPECT 显像。制备的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA 具有良好的稳定性,放化纯 $>95\%$,标记率为 $(63.53\pm3.12)\%$ ($n=5$)。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA SPECT 显像(图 4)示,DTX 联合 Apt-siRNA 组较 PBS 组肿瘤放射性核素浓聚降低,所得 T/M 比值较 PBS 组(4.19 ± 0.32)明显降低(200 pmol, 2.92 ± 0.37 ;400 pmol, 2.07 ± 0.22),且 DTX 联合 Apt-siRNA 400 pmol 组较 200 pmol 组对应的 T/M 比值更低($F=34.99$, $P=0.022$)。此外, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA 所得的 T/M 比值与荷瘤裸鼠肿瘤内 MDM2 蛋白表达有线性回归关系($R^2=0.875$, $P<0.001$),提示 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Apt-siRNA SPECT 显像能够良好预测 DTX 联合 Apt-siRNA 治疗 PCa 的效果。

讨 论

利用 siRNA 的反义显像及治疗技术已出现多年,但其靶向性及稳定性仍有待提高,适配体的发展

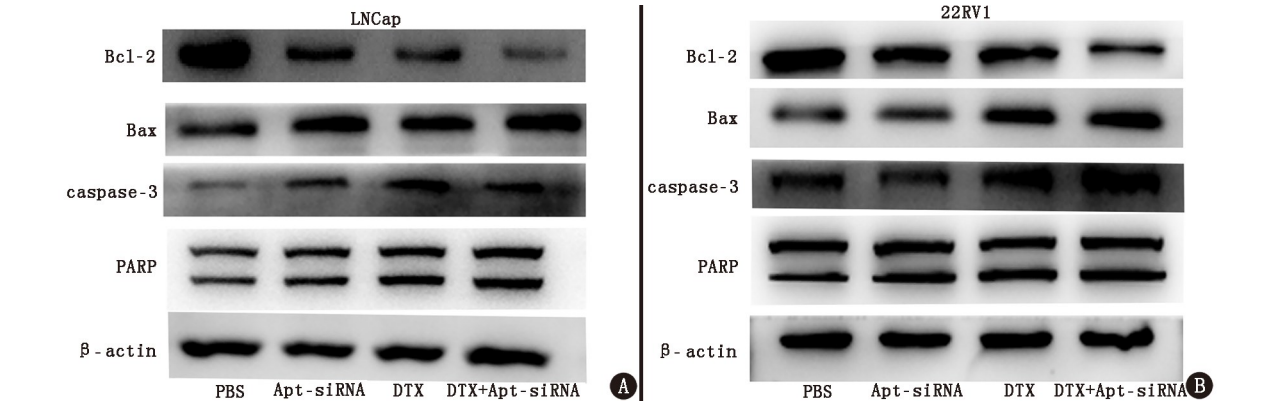


图 2 LNCaP 和 22RV1 前列腺癌细胞在不同组中的蛋白质表达情况。Western blot 图示,注射不同药物后,与其余组相比,多西他赛(DTX)+前列腺特异膜抗原适配体-小干扰 RNA (Apt-siRNA) 组 LNCaP 细胞(A)与 22RV1 细胞(B)的 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)表达降低,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)表达上调

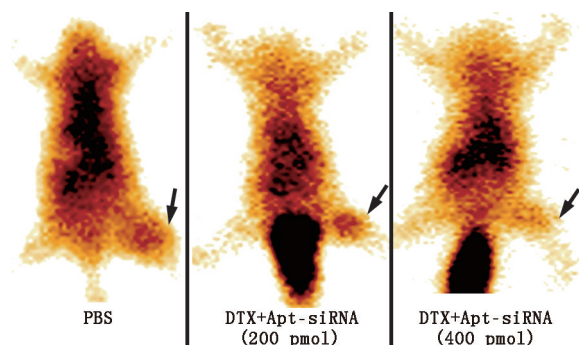


图4 注射不同药物后的小鼠 SPECT 显像图(箭头示肿瘤处显像剂浓聚情况)。可见前列腺特异膜抗原适配体-小干扰 RNA (Apt-siRNA) 组浓聚减低;DTX 为多西他赛

改善了这一状况,其可在提高靶向性的同时降低潜在的细胞毒性^[8]。目前,适配体已被广泛应用于分子成像与诊断治疗。早在 2006 年,McNamara 等^[7]合成了 PSMA Apt-A10-siRNA 嵌合体,并明确了其作用机制。嵌合体通过 Apt-A10 靶向到 PCa 表面,通过细胞内吞内化进入细胞内,随后启动 RNA 干扰机制,在 Dicer 酶的作用下定向剪切 Apt-A10-siRNA 嵌合体上相应 siRNA 片段形成沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),介导同源 mRNA 降解发挥抑制肿瘤的作用。此后,Wu 等^[11]通过优化的 PSMA 适配体(Apt-A10-3.2)实现了 PCa 靶向载药纳米粒子对 PCa 的诊断与治疗。MDM2 在 PCa 中过度表达,与 PCa 的转移、侵袭等关系密切^[12-14],本研究设计合成了 Apt-MDM2 siRNA,对其双链全部 U 碱基和 C 碱基进行 2'-F 修饰,以提高 Apt-siRNA 稳定性,同时在 Apt 的反义 3'端连接 2 个 U-U 悬浮碱基,以提高结合活力,提高嵌合体的干扰能力。最佳的反义转载是降低由于错误地将 siRNA 双链包裹在 RISC 中导致的脱靶效应^[15]。虽然本研究合成 Apt-siRNA 不能完全避免潜在的非靶效应,但该效应可能仅局限于 PSMA 阳性的 PCa 中,对其他组织器官影响很小。2'-F 修饰在人体内具有较好的耐受性及较低的细胞毒性^[16]。虽然有研究认为 2'-F 修饰的全硫代磷酸基寡核苷酸具有细胞毒性^[17],这可能不适用于双链 siRNA 或适配体^[18]。本研究中,在没有转染试剂的情况下,Apt-siRNA 明显降低了 MDM2 蛋白表达水平,表明合成的嵌合体具有良好的靶向性、稳定性及敲出率。

DTX 是去势抵抗型 PCa 的一线化疗药物,但在治疗后期仍不可避免会出现抗药性^[19],因此寻找新的治疗方法显得尤为重要。本研究使用 DTX 联合 Apt-siRNA 治疗 PCa,在 LNCaP 及 22RV1 细胞株中

较单独使用 DTX 或 Apt-siRNA 治疗组的细胞抑制效果更明显,促进凋亡效果更明显,表明 DTX 联合 Apt-siRNA 治疗 PSMA 阳性 PCa 有可能成为新的有效治疗模式。为进一步验证两者联合治疗效果,本研究将其以不同浓度作用于 22RV1 荷瘤裸鼠体内,结果示随着剂量增加,PCa 肿瘤体积逐渐变小。

MDM2 基因的高表达与常规放疗和化疗抵抗密切相关,对其进行抑制可增加化疗敏感性^[20],这也表明了 MDM2 已成为提高肿瘤放化疗敏感的相关靶点,准确评价肿瘤内 MDM2 表达对疾病治疗具有指导意义。近年来,⁶⁸Ga 或¹⁷⁷Lu 标记的 PSMA 在诊断和治疗 PCa 方面取得了良好的效果^[21-22],而⁹⁹Tc^m标记 PSMA 的研究则相对较少,但考虑到患者的经济成本及获取难易程度,使用放射性⁹⁹Tc^m标记 PSMA 仍不失为一个良好的研究方向。故本研究使用⁹⁹Tc^m标记 Apt-siRNA 合成靶向 PSMA 的分子探针,该探针具有良好的稳定性、标记率及放化纯,可用于可视化靶向治疗效果的评价及 MDM2 水平的可视化。研究结果显示,DTX 联合 Apt-siRNA (400 pmol) 治疗组肿瘤显像剂浓聚更低,T/M 比值更低,MDM2 表达水平更低,且两者呈线性回归。上述表明,本研究中⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA SPECT 显像能够良好预测 MDM2 的表达水平,进而作为预测 DTX 化疗效果的参考指标,实现⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA 的显像监测,但其机制仍有待于进一步研究。

综上,本研究合成的 Apt-siRNA 能够靶向 PSMA 阳性 PCa,通过 RNA 干扰机制降低 MDM2 表达实现靶向基因治疗,并能联合 DTX 抑制 PCa 细胞增殖,促进凋亡。此外,⁹⁹Tc^m-Apt-siRNA 还可实现可视化靶向治疗,并通过 SPECT 显像评价 MDM2 表达水平预测治疗效果,以上结果为 PSMA 阳性 PCa 的诊疗提供了新的思路。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 教玉颖:研究实施、论文撰写;教玉颖、李丽:统计分析;付鹏:研究指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [2] Lian L, Ashburn J, Remer EM, et al. Impact of prostate cancer and its treatment on the outcomes of ileal pouch-anal anastomosis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(12): 2147-2153. DOI:10.1097/MIB.0000000000001263.
- [3] Carbonetti G, Converso C, Clement T, et al. Docetaxel/cabazitaxel and fatty acid binding protein 5 inhibitors produce synergistic inhibition of prostate cancer growth[J]. Prostate, 2020, 80(1): 88-98. DOI:10.1002/pros.23921.

- [4] Hashemi M, Amininia S, Ebrahimi M, et al. Association between polymorphisms in TP53 and MDM2 genes and susceptibility to prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2483-2489. DOI: 10.3892/ol.2017.5739.
- [5] Rayburn E, Zhang R, He J, et al. MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(1): 27-41. DOI:10.2174/1568009053332636.
- [6] Jiang T, Zhou C, Gu J, et al. Enhanced therapeutic effect of cisplatin on the prostate cancer in tumor-bearing mice by transfecting the attenuated Salmonella carrying a plasmid co-expressing p53 gene and mdm2 siRNA [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(1): 133-142. DOI:10.1016/j.canlet.2013.05.028.
- [7] McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1005-1015. DOI:10.1038/nbt1223.
- [8] Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 839-849. DOI:10.1038/nbt.1560.
- [9] Santos S, de Sousa Lacerda CM, Ferreira IM, et al. Scintigraphic imaging of Staphylococcus aureus infection using ^{99m}Tc radiolabeled aptamers[J]. *Appl Radiat Isot*, 2017, 128: 22-27. DOI:10.1016/j.apradiso.2017.06.043.
- [10] Fu P, Shen B, Zhao C, et al. Molecular imaging of MDM2 messenger RNA with ^{99m}Tc-labeled antisense oligonucleotides in experimental human breast cancer xenografts[J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(11): 1805-1812. DOI:10.2967/jnumed.110.077982.
- [11] Wu M, Wang Y, Wang YR, et al. Paclitaxel-loaded and A10-3.2 aptamer-targeted poly(lactide-co-glycolic acid) nanobubbles for ultrasound imaging and therapy of prostate cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 5313-5330. DOI:10.2147/IJN.S136032.
- [12] Gupta A, Behl T, Heer HR, et al. MDM2-p53 interaction inhibitor with cisplatin enhances apoptosis in colon and prostate cancer cells *in-vitro*[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(11): 3341-3351. DOI:10.31557/APJCP.2019.20.11.3341.
- [13] Kanagasabai T, Venkatesan T, Natarajan U, et al. Regulation of cell cycle by MDM2 in prostate cancer cells through Aurora Kinase-B and p21WAF1/CIP1 mediated pathways [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109435. DOI:10.1016/j.cellsig.2019.109435.
- [14] Feng T, Zhao R, Sun F, et al. TXNDC9 regulates oxidative stress-induced androgen receptor signaling to promote prostate cancer progression[J]. *Oncogene*, 2020, 39(2): 356-367. DOI:10.1038/s41388-019-0991-3.
- [15] Sano M, Sierant M, Miyagishi M, et al. Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(18): 5812-5821. DOI:10.1093/nar/gkn584.
- [16] Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use[J]. *Oligonucleotides*, 2008, 18(4): 305-319. DOI: 10.1089/oli.2008.0164.
- [17] Janas MM, Jiang Y, Schlegel MK, et al. Impact of oligonucleotide structure, chemistry, and delivery method on *in vitro* cytotoxicity [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27(1): 11-22. DOI:10.1089/nat.2016.0639.
- [18] Shen W, De Hoyos CL, Sun H, et al. Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2204-2217. DOI:10.1093/nar/gky060.
- [19] Ito K, Kimura T, Onuma H, et al. Does docetaxel prolong survival of patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer? [J]. *Prostate*, 2018, 78(7): 498-505. DOI: 10.1002/pros.23493.
- [20] Fu P, Sun L, Cao X, et al. MDM2 molecular imaging for the prediction of chemotherapeutic sensitivity in human breast cancer xenograft[J]. *Mol Imaging*, 2014, 13(6): 1-10. DOI:10.2310/7290.2014.00018.
- [21] 冯亚琪, 崔邦平, 王朋, 等. ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT 在前列腺癌诊断中的研究进展[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2019, 39(4): 237-240. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.012. Feng YQ, Cui BP, Wang P, et al. Research progress of ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT in the diagnosis of prostate cancer[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 39(4): 237-240. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.012.
- [22] 雷蕾, 王学丹, 周志军, 等. ¹⁷⁷Lu-PSMA-RLT 治疗前列腺癌临床实践技术[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2020, 40(10): 621-624. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20191024-00233. Lei L, Wang XD, Zhou ZJ, et al. Clinical practice of ¹⁷⁷Lu-PSMA-RLT in the treatment of prostate cancer[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 40(10): 621-624. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191024-00233.

(收稿日期:2020-10-27)