

文章编号: 0253-9950(2005)04-0242-06

$^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸的合成 及其抑制血管平滑肌细胞增殖

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:为研究 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸对血管平滑肌细胞增殖的影响,合成了 *c*-myc 反义核酸,与双功能团连接剂 *p*-SCN-Bz-DTPA 偶联后又进行了 $^{113}\text{In}^m$ 标记,考察了标记物 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸在生理盐水和牛血清的体外稳定性、杂交能力和对平滑肌细胞增殖的影响。测得标记率为 45%~55%,纯化后放化纯 > 90%。标记物在生理盐水和牛血清的体外稳定性均较好,48 h 后放化纯 > 95%。杂交实验中放射性反义链和正义链杂交结合形成大分子,说明偶联和标记没有破坏放射性反义链杂交反应活性。细胞增殖实验显示, $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸对平滑肌细胞增殖的抑制率具有剂量依赖性,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ (2.5 $\times 37$ GBq/L) 时抑制率最大; $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-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)、 $^{113}\text{In}^m\text{Cl}_3$ 溶液(放射性治疗组)、不加核酸或 $^{113}\text{In}^m\text{Cl}_3$ 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 94.92%, 69.28%, 20.55%, 15.24%, 0%。放射性反义治疗组和反义治疗组、放射性治疗组、对照组比较有显著性差异 ($p < 0.01$),反义治疗组和正义治疗组比较具有显著性差异 ($p < 0.01$)。说明 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-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: 血管; 平滑肌细胞; 增殖; $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸

中图分类号: R817 **文献标识码:** A

经皮冠状动脉腔内血管成形术(PTCA)和经皮肾动脉腔内血管成形术(PTRA)分别是冠心病和以肾动脉狭窄为代表的外周血管疾病介入性治疗领域的重大进步,特别是 PTCA 技术已被公认是治疗冠心病的最有效手段之一,手术成功超过 90%,外周血管狭窄介入性治疗的代表——PTRA,手术成功也达到 85%,但 PTCA 和 PTRA 术后 3—6 个月分别有 30%~40% 和 15% 左右的再狭窄发生率,影响了心血管和外周血管疾病介入性治疗的中远期疗效^[1]。目前所采取防治再狭窄的方法主要有全身药物治疗、支架置入、新的血管内治疗器械、基因治疗(反义治疗)、放射性核素治疗和放射性核素反义治疗。全身药物治疗采取全身给药,属超生理剂量,具有严重的毒副作用,难以临床推广应用。支架作为一种异物在血管内留置,存在着易移动、易形成血栓及血管内膜增殖等问题。新的血管内治疗器械不断地应用

于临床,但新的器械价格昂贵,难以普及,并且再狭窄发生率也较高。随着对再狭窄发生机制的认识,采取基因方法防治再狭窄方兴未艾,反义治疗和放射性核素反义治疗是再狭窄基因治疗的重要方法之一^[2]。

血管平滑肌细胞增殖是形成再狭窄的最主要因素。对 *c*-myc 反义核酸进行硫代等结构修饰可保证其进入细胞内,且反义核酸的细胞内摄取并不能保证靶核酸对反义核酸的生物利用度。因此,考察 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸抑制平滑肌细胞增殖的程度,可预示其是否具有抑制再狭窄的潜力。*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,以封闭其基因表达。 $^{113}\text{In}^m$ 发射内转换电子和 γ 射线,内转换电子在组织中射程短,传能线密度高,近距离治疗作用强^[3], γ 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^[4]。采取放射性

收稿日期:2004-10-10; 修订日期:2005-09-20

作者简介:陆巍巍(1972—),女,黑龙江牡丹江人,助理研究员,博士,从事放射性药物研究。

核素反义治疗的方法,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,加上放射性电离辐射损伤作用达到基因治疗和放射治疗的双重目的。本文制备¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸,观察其对血管平滑肌细胞增殖的影响,为其应用于血管再狭窄提供理论和实验依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

亚磷酰胺单体、脱保护剂、激活剂、盖帽剂、氧化剂、TETD 均由美国 Beckman 公司提供;5-Amino-Modifier C3-TFA、Cholesteryl-CPG 柱由美国 GLEN RESEARCH 提供;反义寡聚核苷酸标准品、有义寡聚核苷酸,中国成都法玛基因公司提供;色谱纯乙腈、盐酸、醋酸钠,北京市化学试剂公司提供;¹¹³Sn-¹¹³In^m 发生器,北京原子高科股份有限公司提供;醋酸、柠檬酸钠,北京化工厂提供;柠檬酸,成都化学试剂厂提供;超滤管为密里伯(中国)公司产品;Bondapak HC₁₈ HA 柱(ϕ 8 mm \times 100 mm),美国 WATERS 公司产品;p-SCN-Bz-DTPA,自制;Sherogel TSK-300 柱, ϕ 7.5 mm \times 30 cm,美国 Waters 公司产品。

BIFLEX 型 MALDI-TOF 质谱仪,美国 Bruker Daltonics 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 c-myc 反义核酸的合成 采用亚磷酰胺法和二硫化四乙基秋兰姆硫化法手工合成 c-myc 原癌基因翻译起始点的反义寡聚核苷酸(AONS) 3 cholestyl-TAC GGG GAG TTG CAA-C3 NH₂ 5 (3 末端作硫代修饰),经 HPLC 法纯化,并与所购反义核酸标准品进行保留时间比对,经飞行时间质谱验证,所得产物即所需核酸^[5]。

1.2.2 p-SCN-Bz-DTPA 和 c-myc 反义核酸的偶联 取 8 μ L HEPES 缓冲液(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer, 0.1 mol/L, pH = 8.5) 加入到 10 μ g c-myc 反义核酸冻干品中,样品溶解后,55 $^{\circ}$ C 预热 0.5 h,再加入 2 μ L p-SCN-Bz-DTPA (10 μ g/ μ L) (摩尔比 p-SCN-Bz-DTPA : c-myc 反义核酸 = 20 : 1),混匀,密封膜密封,55 $^{\circ}$ C 保温 24 h。

用超滤管(Microcon YM-3 柱)纯化,管中加入反应液后,加入 0.2 mL 蒸馏水,在 10 000 r/min 转速下离心,重复 3 次,收集滤后浓缩液。10 μ g 为

一等份,冻干保存^[6]。

HPLC 法测定偶联率,色谱条件: Bondapak HC₁₈ HA 柱,流速 1 mL/min,UV 检测(254 nm)。流动相 A: V(0.2 mol/L CH₃COONa 水溶液) V(CH₃OH) = 80 : 20; 流动相 B: V(0.2 mol/L CH₃COONa 水溶液) V(CH₃OH) = 40 : 60。采用梯度洗脱,0—2 min,100 % A; 2—40 min,100 % A : 100 % B; 40—50 min,100 % B。偶联率 = [p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸峰面积 / (p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸峰面积 + c-myc 反义核酸面积)] \times 100 %^[7]。

1.2.3 p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸的¹¹³In^m标记 往 10 μ g p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸偶联物中加入 15 μ L 醋酸盐缓冲液(ABS, 1 mol/L, pH = 4.6),和 15 μ L ¹¹³In^mCl₃ 淋洗液(约(0.06 ~ 0.1) \times 37 MBq),37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 h^[8]。按 1.2.2 中的方法用超滤管纯化后,在柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH = 5.0) 体系中用 ITLC-SG 纸展开测定标记率,¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸的标记率 = [原点(Rf = 0 ~ 0.30) 计数 / 总计数] \times 100 %。

1.2.4 体外稳定性实验 将¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸分别加入到生理盐水、新鲜牛血清中,使偶联物的质量浓度为 5 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 保温,分别于 6, 12, 24, 48 h 后纸层析法测定放化纯。

1.2.5 杂交实验 将 122 μ g ¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc 反义核酸和 10 μ g 有义寡聚核苷酸(最终浓度为 0.022 μ mol/mL) 加入含磷酸盐缓冲体系的生理盐水中(含 0.9 % NaCl 的 0.1 mol/L, pH = 7.0 的 PBS),反应液总体积为 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 保温 2 h,放射性反义寡聚核苷酸和有义寡聚核苷酸摩尔比为 10 : 1,使用体积排阻 HPLC 分析,色谱条件: Spherogel TSK-300 柱,流动相为 0.06 mol/L 的磷酸盐缓冲液,含 0.1 mol/L 的 NaCl, pH = 7.0,流速 1 mL/min,进样量 10 μ L,UV 检测分析(254 nm)。

1.2.6 细胞培养 从猪身上分离血管平滑肌细胞(VSMCs)后,在组织培养皿上继续人工培养,使用 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基,补加入 10 % 的热惰性的胎牛血清(FBS),100 mL⁻¹ 青霉素,100 μ g/mL 链霉素和 2 mmol/mL 谷氨酰胺(10 % 的 FBS-DMEM),在 37 $^{\circ}$ C 含 5 % CO₂ 的湿润恒温箱中培养,细胞呈现

典型的血管平滑肌细胞形态学特征,即纺锤状、“峰谷”样式。通过平滑肌-肌动蛋白染色可对血管平滑肌细胞进一步鉴定^[9]。

1.2.7 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 5000 cm^{-2} 。贴壁后一天,用 0.5% 的 FBS-DMEM 抑制细胞生长 48 h,用 10% 的 FBS-DMEM 激活细胞使其生长,同时加入 $10 \mu\text{mol/L}$ ($2.5 \times 37 \text{ GBq/L}$) $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义寡聚核苷酸(放射性反义治疗组)、 $10 \mu\text{mol/L}$ 有义寡聚核苷酸(正义治疗组)、 $10 \mu\text{mol/L}$ 反义寡聚核苷酸(反义治疗组)、 $2.5 \times 37 \text{ GBq/L}$ $^{113}\text{In}^m\text{Cl}_3$ 溶液(放射性治疗组)和不加核酸和 $^{113}\text{In}^m\text{Cl}_3$ (对照组),用 0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 进行细胞胰蛋白酶化,3 d 后在 Coulter 计数器上测细胞数,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^[10]。

2 结果和讨论

2.1 *c*-myc 反义寡聚核苷酸的合成

目前,合成寡聚核苷酸的方法主要有亚磷酸酰胺法和氢磷酸酯法。由于亚磷酸酰胺法更便于进行点硫代,本研究采用亚磷酸酰胺法。

反义寡聚核苷酸产率约为 20%。产率低的缘由是合成过程中的偶联反应进行的不充分和纯化带来的损失。

合成的反义寡聚核苷酸($t_R = 14.08 \text{ min}$)与反义寡聚核苷酸标准品($t_R = 14.12 \text{ min}$)保留时间基本一致,测定值飞行时间质谱测定分子量 5 570 与理论分子量 5 570 一致,确定所合成寡聚核苷酸为期望目标产物 3 cholestyl-TAC GGG GAG TTG CAA-C3 NH₂ 5 (3 末端作点硫代)。

2.2 *p*-SCN-Bz-DTPA 和 *c*-myc 反义核酸的偶联

2.2.1 pH 值对偶联率的影响 pH 值对偶联率的影响示于图 1。由图 1 可看出,偶联率随 pH 值增加而增加。当 pH 为 8.5 时,偶联率最大,为 88%,之后随 pH 升高偶联率开始下降。因此选定偶联时最优 pH 值为 8.5。

2.2.2 *p*-SCN-Bz-DTPA/*c*-myc 反义核酸摩尔比对偶联率的影响 考察 *p*-SCN-Bz-DTPA/*c*-myc 反义核酸摩尔比对偶联率的影响,实验结果

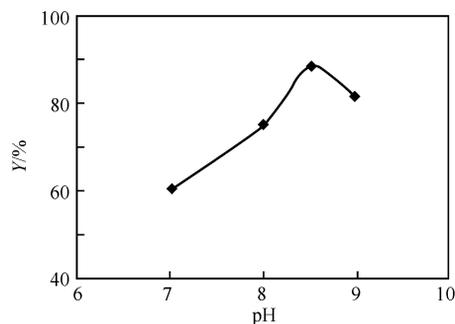


图 1 pH 对偶联率的影响

Fig. 1 Effect of pH on the coupling yield

示于图 2。由图 2 可看出,偶联率随摩尔比增大而增大,达到 20/1 时偶联率最高,为 89%,之后偶联率摩尔比增大并没有显著增加,因此选定偶联时最优 *p*-SCN-Bz-DTPA/*c*-myc 反义核酸摩尔比为 20/1。

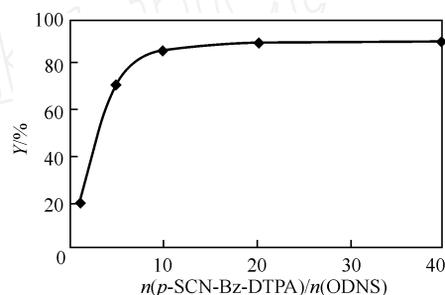


图 2 *p*-SCN-Bz-DTPA 与 ODNS 摩尔比对偶联率影响

Fig. 2 Effect of the molar ratio of *p*-SCN-Bz-DTPA and ODNS on the coupling yield

2.2.3 反应时间对偶联率的影响 考察反应时间对偶联率的影响,实验结果示于图 3。由图 3 可看出,偶联率随反应时间的增加而增加,达到 24 h 时偶联率最高,为 90%,之后偶联率没有显著增加,因此偶联最优时间选为 24 h。

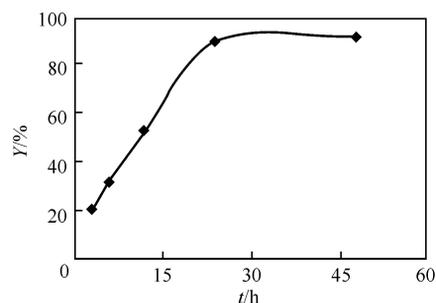


图 3 反应时间对偶联率的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on the coupling yield

2.2.4 温度对偶联率的影响 温度对偶联率的影响示于图 4。由图 4 可看出,偶联率随温度的增加而增加,反应温度为 55 时偶联率较高,为 91%,之后偶联率没有显著增加,因此选定偶联时最优温度为 55。

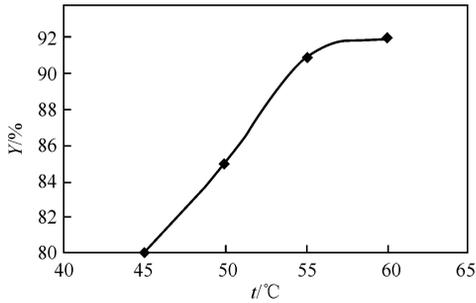


图 4 温度对偶联率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the coupling yield

2.3 p -SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸的 $^{113}\text{In}^m$ 标记

2.3.1 反应时间对标记率的影响 反应时间对标记率的影响示于图 5。由图 5 中可看出,标记率随反应时间的增加而增加,反应时间 > 60 min 后,标记率没有大幅度提高,因此反应时间为 60 min 即可。

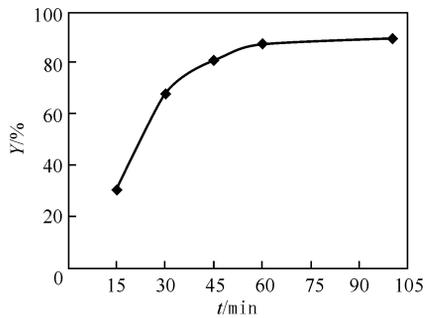


图 5 反应时间对标记率的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on the labeling yield

2.3.2 缓冲液 pH 对标记率的影响 缓冲液 pH 对标记率的影响示于图 6。由图 6 看出,缓冲液 pH = 4.6 的 ABS 体系标记率最高,超过 4.6 时标记率随 pH 的增加而降低,因此反应缓冲液选为 pH = 4.6 的 ABS 体系。

2.3.3 温度对标记率的影响 37 时标记率平均达到 97.7%,室温下反应的标记率仅为 85.66%,37 比室温下反应标记率高,因此反应温度选为 37。

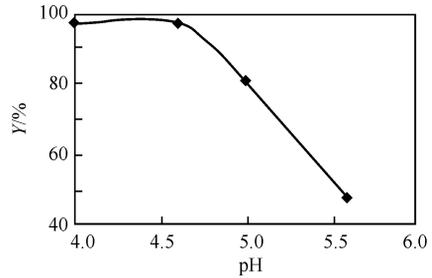


图 6 pH 值对标记率的影响

Fig. 6 Effect of pH on the labeling yield

由于 *p*-SCN-Bz-DTPA 仅用异硫氰基与 *c*-myc 反义核酸偶联,没占用 $^{113}\text{In}^m$ 和 *p*-SCN-Bz-DTPA 的结合位,因此制备 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸可直接采用 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA 的最佳制备条件。实验测得 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸的标记率为 45% ~ 55%,经超滤管纯化后放化纯 > 90%。

2.4 体外稳定性实验

体外稳定性实验结果示于图 7。由图 7 可看出, $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸在生理盐水和牛血清中保温 48 h,放化纯 > 95%,稳定性均较好。

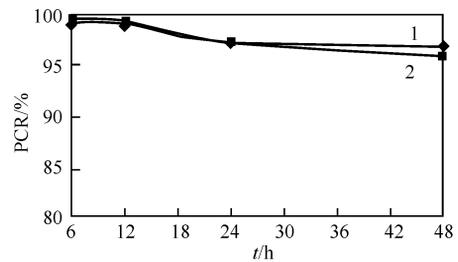


图 7 $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc 反义核酸体外稳定性实验结果

Fig. 7 Stability of $^{113}\text{In}^m$ -*p*-SCN-Bz-DTPA-*c*-myc antisense oligonucleotide

1——生理盐水(Saline), 2——牛血清(Bovine serum)

2.5 杂交实验

用体积排阻色谱法分析时,大分子保留时间短,先出柱,小分子保留时间长,后出柱,其结果示于图 8。从图 8 可看出,除过量的放射性反义链峰 2 ($t_R = 16.19$ min) 外,还出现一保留时间较短的新峰 ($t_R = 7.81$ min),且带有放射性,放射性峰部分迁移,保留时间变短,先于放射性反义链出柱,这说明放射性反义链和非放正义链杂交结合形成大分子,偶联和标记没有破坏放射性反义链

杂交反应活性。

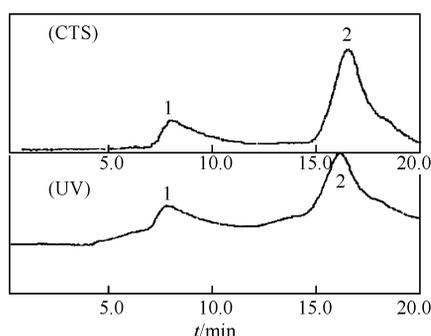


图 8 放射性反义链和正义链杂交 HPLC 图谱

Fig. 8 HPLC chromatography of the hybridization of radionuclide antisense chain with sense chain

1——放射性反义链和正义链杂交物

(Hybridization of radionuclide antisense chain with sense chain);

2——放射性反义链(Radionuclide antisense chain)

2.6 平滑肌细胞增殖测定

考察不同浓度的放射性反义寡聚核苷酸对平滑肌细胞增殖抑制率的影响,实验结果示于图 9。由图 9 可看出,对平滑肌细胞增殖的抑制率随放射性反义寡聚核苷酸的浓度增大而增大,增大到 $10 \mu\text{mol/L}$ ($2.5 \times 37 \text{ GBq/L}$) 时,抑制率最大,为 92.38%。因此,选定 $^{113}\text{In}^m\text{-DTPA-c-myc}$ 反义核酸的摩尔浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,放射性浓度为 $2.5 \times 37 \text{ GBq/L}$ 。

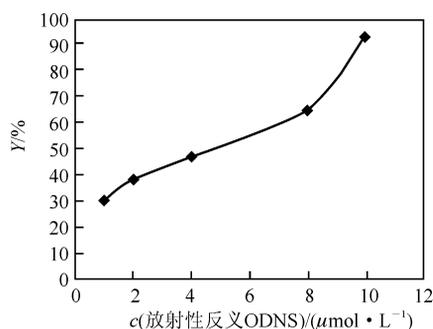


图 9 不同浓度的放射性反义 ODNS 对平滑肌细胞增加抑制率的影响

Fig. 9 Influence of various concentration of antisense oligonucleotides on the inhibition rate of smooth muscle cell proliferation

放射性反义治疗组、反义治疗组、放射性治疗组、对照组、正义治疗组对平滑肌细胞增殖的抑制率分别为 94.92%, 69.28%, 20.55%, 15.24%,

0%。放射性反义治疗组和反义治疗组、放射性治疗组、对照组比较,差异有显著性(均 $p < 0.01$);反义治疗组和正义治疗组比较,差异具有显著性($p < 0.01$)。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* 反义寡聚核苷酸只有进入细胞内才能与靶基因结合,产生反义抑制作用,*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殖)证明其已进入细胞内。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。放射性反义性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组对平滑肌细胞的抑制作用具有反义治疗和放射性核素的双重作用。放射性核素反义治疗组对平滑肌细胞增殖显著的抑制作用,预示其具有一定的抑制冠脉再狭窄的潜力。

3 结论

(1) 合成了 *c-myc* 反义核酸,得到 $^{113}\text{In}^m\text{-p-SCN-Bz-DTPA}$ 和 *c-myc* 反义核酸的最优偶联条件和偶联后标记最佳的 $^{113}\text{In}^m$ 标记条件。在此条件下,制备了 $^{113}\text{In}^m\text{-p-SCN-Bz-DTPA}$ 和 *c-myc* 反义核酸,标记率为 45% ~ 55%。经超滤管纯化后放化纯 $> 90\%$ 。

(2) $^{113}\text{In}^m\text{-p-SCN-Bz-DTPA}$ 和 *c-myc* 反义核酸的体外稳定性为 48 h 放化纯 $> 95\%$ 。偶联和标记没有破坏放射性反义链杂交反应活性。 $^{113}\text{In}^m\text{-p-SCN-Bz-DTPA}$ 和 *c-myc* 反义核酸抑制血管平滑肌细胞增殖的能力,在体外可抑制血管平滑肌细胞增殖,抑制率为 94.92%, $^{113}\text{In}^m\text{-p-SCN-Bz-DTPA}$ 和 *c-myc* 反义核酸对平滑肌细胞增殖显著的抑制作用,预示了其具有抑制冠脉再狭窄的潜力。

参考文献:

- [1] 中文江,霍勇. 血管介入放射治疗[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998. 1.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 罗全勇,朱 2. ^{103}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.
- [5] 金冬雁,金奇,侯云德. 核酸和蛋白质的化学合成和序列分析[M]. 北京:科学出版社,1996. 2—7, 12—13.
- [6] Dewanjee M K, Ghafouripour A K, Kapadvanjwala M, et al. Noninvasive Imaging of c-myc Oncogene Messenger RNA With Indiu-111-Antisense Probes in a Mammary Tumor-Bearing Mouse Mode[J]. J Nucl Med, 1994, 35:1 054.
- [7] Hnatowich D J, Layne W W, Childs R L. The Preparation and Labeling of DTPA-coupled Albumin [J]. Int J Appl Radiat Isot, 1982, 33:327—332.
- [8] Martin W, Brechbiel, et al. Synthesis of 1-(p-Isothiocyanatobenzyl) Derivatives of DTPA and EDTA Antibody Labeling and Tumor-imaging Studies[J]. Inorg Chem, 1986, 25(16):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 H G, Hall D J, 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.

Synthesis of ¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc Antisense Oligonucleotides and Investigation of Its Inhibition Effects on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

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: To investigate the effect of ¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides (ASON) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), the c-myc ASON (3'-cholestyl-TAC GGG GAG TTG CAA-C3 NH₂ 5', 3' end has been sulfurized) is synthesized and conjugated with the chelating agent p-SCN-Bz-DTPA, and then labeled with ¹¹³In^m. The labeling yield is 45% ~ 55%, and the radiochemical purity is higher than 90%. The stability of ¹¹³In^m-DTPA-c-myc ASON in saline and in bovine serum is good, as indicated by its radiochemical purity still higher than 90% for 24 h. The hybridization ability of the radiolabeled ASON with its sense oligonucleotide (SON) counterpart demonstrates its bioactivity not damaged during the synthesis. Its inhibition of the proliferation of VSMCs is dose dependent. The best inhibition occurs at a dose of 10 μmol/L (92.5 GBq/L). The inhibition rates of ¹¹³In^m-DTPA-c-myc ASON (radiolabeled ASON-treated group), ASON (ASON-treated group), ¹¹³In^mCl₃ solution (radionuclide-treated group), blank (control group), and SON (SON-treated group) are 94.92%, 69.28%, 20.55%, 15.24% and 0%, respectively. The inhibition by radiolabeled ASON treatment is significantly higher ($p < 0.01$) than that of all other treatments. These experimental results show ¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides can effectively inhibit the proliferation of VSMCs *in vitro*.

Key words: blood vessels; smooth muscle cells; proliferation; ¹¹³In^m-p-SCN-Bz-DTPA-c-myc antisense oligonucleotides