

自杀基因治疗恶性肿瘤的研究现状及展望

任涛¹,李枚娟¹,颜江华²

Research status and prospect of suicide gene therapy for malignant tumor

REN Tao¹, LI Mei-juan¹, YAN Jiang-hua²

¹ College of Medicine, Xiamen University, Xiamen, 361000, China; ² Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361000, China

【Abstract】The suicide gene therapy for tumor has been the heated research on gene therapy for tumor recently. It is potentially a clinical application as a new gene therapy for tumor. This review is based on the research achievements of suicide gene therapy in clinical treatment of tumor. It evolves the function mechanism of suicide gene therapy, the suicide gene system, the bystander effect, the transduction of suicide gene and combining gene therapy, etc.

【Key words】suicide gene; gene therapy; malignant tumor

Modern Oncology 2009, 17 (12): 2435 - 2437

【摘要】肿瘤的自杀基因疗法是近年来肿瘤基因治疗的研究热点,是一种具有潜在临床应用前景的新的肿瘤基因治疗策略。本文就近年来自杀基因疗法在肿瘤治疗中取得的研究进展,分别从作用机制、自杀基因系统、旁观者效应、自杀基因的转导以及联合基因治疗等几个方面进行综述。

【关键词】自杀基因;基因治疗;恶性肿瘤

【中图分类号】R730.54 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1672-4992-(2009)12-2435-03

基因治疗(gene therapy)作为恶性肿瘤治疗的一种新手段,已成为目前治疗恶性肿瘤的热点,其中自杀基因疗法(suicide gene therapy)是众多基因治疗策略中最有前途的策略之一。本文对该方面的研究进展作一综述。

1 自杀基因作用机制

自杀基因疗法又称为基因介导的酶前药治疗 - GDEPT (Gene-directed enzyme prodrug treatment),其原理是将某些细菌、病毒和真菌中的基因转导入肿瘤细胞,此基因编码的特异性酶类能将原先对细胞无毒或毒性极低的药物前体在肿瘤细胞内代谢成毒性产物,从而引起这些细胞自杀。

2 自杀基因种类及疗法

2.1 单自杀基因疗法

自杀基因在肿瘤治疗方面的研究已有多年的历史,其中单纯疱疹病毒胸腺激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)基因/苡昔洛韦(gancyclovir, GCV)系统与大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(Escherichia coli cytosine deaminase, Ec-CD)基因/5-氟胞嘧啶(5-FC)系统是目前研究最深入、应用最早、最广泛的自杀基因系统。除了上面两个常用的自杀基因治疗系统,羧酸酯酶/依立替康;细胞色素P450/环磷酰胺,2-氨基蒽;脱氧胞苷激酶/阿糖胞苷;硝基还原酶/2-硝基苯氮丙啶类化合物;水痘疱疹病毒胸苷激酶/6-甲羟嘌呤

等系统也被用于自杀基因治疗。近年来也出现了一些新型自杀基因系统,如亚麻苦甙水解酶/亚麻苦甙(linamarase/linamarin, lis/lin),嘌呤核苷酸磷酸化酶/氟拉达滨(purine nucleoside phosphorylase, PNP/fludarabine),源自热带植物木薯的亚麻苦甙水解酶/亚麻苦甙系统是一种新型自杀基因系统。文献研究报道,相比较以往自杀基因系统, lis/lin系统具有更高的杀伤效率以及更为强大的旁观者效应(bystander effect, BE)^[1]。

2.2 融合自杀基因疗法

在单自杀基因治疗过程中,单自杀基因系统治疗存在着对肿瘤细胞类型的依赖性,且易引起肿瘤耐药性。所谓融合基因就是利用基因工程技术将两种或多种自杀基因连接在一起,或将自杀基因与免疫基因联合应用。

2.2.1 CD-TK融合基因 目前应用最广泛者为CD-TK融合基因,融合自杀基因产物兼具两种前药转化酶活性,使两类自杀基因产物协同作用,突破了对肿瘤细胞类型的依赖性,尽可能地消除了瘤细胞对药物的耐药性,而且尚可扩大肿瘤治疗谱,从而提高该疗法的实用性。谭万龙等^[2]进行了动物实验,在C57BL/6鼠背部皮下接种MB49鼠膀胱癌细胞株,并用双自杀基因(CD-TK融合基因)治疗。结果表明,应用GCV或5-FC,肿瘤大小与对照组相比明显减小,腺病毒联合GCV+5-FC组比腺病毒联合GCV、腺病毒联合5-FC组肿瘤更小,表明双自杀基因系统联合应用能产生协同作用,抑制膀胱癌生长效果更好。

2.2.2 自杀基因与免疫基因联合 自杀基因与免疫基因联合,自杀基因可直接杀伤肿瘤细胞,而免疫因子能增强机体抗肿瘤免疫力。王金皋等^[3]进行了动物实验,将表达CD基因和GM-CSF基因的重组逆转录病毒,直接注射到荷瘤小鼠的瘤体内,综合自杀基因治疗和细胞因子基因治疗的作用

【收稿日期】 2009-02-16

【作者单位】 ¹厦门大学医学院,福建 厦门 361000

²厦门大学抗癌研究中心,福建 厦门 361000

【作者简介】 任涛(1979-),男,湖北十堰人,硕士研究生,主要从事内科研究工作。 E-mail: doctortantao@sina.com

【通讯作者】 颜江华(1963-),男,副教授,博士后,硕士生导师,主要从事肿瘤基因治疗及免疫治疗的研究。

特点,然后注射 5 - Fc,结果,联合治疗组荷瘤小鼠皮下肿瘤结节的生长明显受到抑制,疗效明显优于 CD 或 GM - CSF 基因单独治疗组,小鼠存活期明显延长,且联合治疗组肿瘤细胞表达 MHC - 1 和 B7 - 1 明显增高,瘤体内有大量的树突状细胞和 CD8⁺ T 细胞浸润。

3 自杀基因治疗中的旁观者效应

所谓旁观者效应 (bystander effect, BE),即在自杀基因抗肿瘤过程中,不仅转导了自杀基因的细胞可以在给予前药后被杀死,而且与其相邻的未转导自杀基因的细胞也可被杀死。旁观者效应的意义在于只需少量肿瘤细胞被转染自杀基因,就会对临近的肿瘤细胞产生广泛的杀伤作用,它明显扩大了自杀基因的杀伤作用,在相当程度上弥补了自杀基因转导效率低的问题,对恶性肿瘤的治疗有着十分重要意义。

3.1 远距离旁观者效应

Consalvo 等^[4]首先发现了远距离旁观者效应 (distant bystander effect),用 CD 转导的肿瘤细胞接种在鼠的一侧皮下,给予 5 - FC 后,可使肺内的转移灶消退。这种由免疫效应介导的旁观者效应,不但可引起邻近肿瘤细胞发生旁观者效应,也可引起周围较远的肿瘤细胞发生远程旁观者效应,此效应不仅发生于同一器官相互分离的肿瘤中,也可发生于其它相隔较远的器官的肿瘤中^[5]。

3.2 增强旁观者效应

旁观者效应在自杀基因治疗中发挥着重要的作用,增强此效应就显得尤为重要。在陈卫国等^[6]的研究中显示抗癌治疗达到明显旁观者效应时,HSV - TK/GCV 需要 TK⁺ PC - 3 (激素非依赖性前列腺癌细胞系)细胞数为 50%,而 ATRA (全反式维甲酸)联合 HSV - TK/GCV 需要 TK⁺ PC - 3 细胞数仅为 30%,两者比较差异显著。HSV - TK 可以抑制移植瘤生长,但 ATRA + HSV - TK 抗前列腺癌发生显效可提前 1 周,而且效果更显著。结果显示 ATRA 可增强 HSV - TK/GCV 系统治疗激素非依赖性前列腺癌的旁观者效应。

4 自杀基因的转导

自杀基因疗法应用于实践的一项关键技术是用载体将自杀基因转导至肿瘤靶细胞。

4.1 载体技术

目前载体包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体主要包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等。常用的非病毒载体有脂质体及多聚阳离子聚合物,具有低免疫反应、低毒性、无基因插片段大小限制等优势。但脂质体和阳离子聚合物介导基因转移缺乏组织的特异性和靶向性,转染效率较低且易被网状内皮系统吞噬,基因表达时间短,因此研制新型的非病毒载体已成为研究的热点。近年来开始应用一种新的纳米颗粒载体,作为基因治疗载体具有一些显著的优点:纳米颗粒能包裹、浓缩、保护核苷酸,使其免遭核酸酶的降解;比表面积大,具有生物亲和性,易于在其表面耦联特异性的靶向分子,实现基因治疗的特异性,在循环系统中的循环时间较普通颗粒明显延长^[7-8]。再者纳米颗粒的可控降解性,使载体中药物或基因可控性缓慢释放,明显延长作用时间,并维持有效的药物浓度,因而纳米成为了最有应用前景的非病毒载体之一^[9]。

4.2 增强基因转导效率

自杀基因疗法要求转染的自杀基因要有一定的表达效率,同时能选择性表达于靶细胞中,从而最大限度地杀伤肿

瘤细胞。目前所用的靶向方法主要有靶向性转导和靶向性转录两种方式。

4.2.1 靶向性转导 载体携带外源基因,在一定的反应环境中作用于靶细胞,完成基因转移,这一过程中,无论是载体、环境因素还是靶细胞的改变都将影响基因转导效率。恶性肿瘤细胞常有表面受体的异常表达或肿瘤特异性抗原表达,将载体与肿瘤表面特异表达、高表达受体相对应的配体或与相对应抗体相连,将提高外源基因的肿瘤效率,如转铁蛋白、血管内皮生长因子受体介导的基因转移。

4.2.2 靶向性转录 基因的表达受到多层次的调控,因此外源基因的表达调控可以通过对多个环节进行干预来实现。在自杀基因前端接上肿瘤特异性的启动子、增强子等转录调控元件,可以增强外源基因在肿瘤中的特异性表达,以加强自杀基因对肿瘤细胞的特异性杀伤效力,同时可以降低它对正常细胞的毒性作用。正常细胞因为缺乏特定的转录激活因子,也就不能使外源基因转录出特定的 mRNA。如原发性肝癌的甲胎蛋白 (AFP)、黑色素瘤的酪氨酸酶 (Tyr)、结肠癌的癌胚抗原 (CEA) 都受其肿瘤特异性调控序列的调控。CEA 转录调控元件包括增强子元件和在 5 侧翼区域的启动子,这些元素能调控目的基因在癌胚抗原 (CEA) 为阳性的癌组织中表达^[10]。在刘霆等^[11]的研究中,构建了载体介导 CEA 基因元件调控融合自杀基因系统,结果显示在 CEA 表达阳性的结肠癌细胞中,RT - PCR 与免疫荧光检测各组自杀基因都有表达,但在 CEA 表达阴性的 HeLa 细胞中,CEA 基因调控的融合自杀基因没有表达,证实该融合自杀基因在 CEA 阳性细胞中专一性表达。

5 自杀基因治疗与其他方法的联合应用

5.1 单纯自杀基因疗法的局限性

目前,自杀基因转移至肿瘤组织的效率还相对较低,自杀基因治疗的效果很大程度上取决于旁观者效应 (BE)。尽管有 BE 的存在,由于 BE 的选择性和局部区域性特点,仍不能保证高效杀伤率。此外,肿瘤细胞还可以产生耐药性,而且在实验中发现有肿瘤消退后停药,肿瘤又迅速复发的现象。为了克服上述缺点,最近很多研究已趋向于把自杀基因和其他抗癌方法联合应用,取得了明显的效果。

5.1.1 自杀基因联合放射治疗恶性肿瘤 自杀基因联合放射治疗主要利用辐射时空调控自杀基因的体内表达;利用辐射来提高自杀基因靶向转移的效率;自杀基因可以提高肿瘤对放射治疗的敏感性。因此可以在治疗中降低辐射剂量,减轻其对正常组织的毒副作用。陈道桢等^[12]研究显示,在体外实验中,自杀基因对宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制率为 45.18%,单纯放疗的抑制率为 42.14%,而基因治疗与放疗联用的抑制率为 87.15%;且联合治疗组对射线敏感性较单独治疗组明显增加,克隆形成率明显下降;在体内实验中,单纯基因治疗与放疗对 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑瘤率分别为 39.15% 和 35.18%,而基因治疗放疗联用的抑瘤率达到 87.19%;增效效应比值 (E/O) 为 3.2 (>1.4),提示 HSV - TK/GCV 对放疗具有增效作用。

5.1.2 自杀基因与免疫因子联合应用 自杀基因可直接杀伤肿瘤细胞,而免疫因子能增强机体免疫系统抗癌效力。如果把两者联合起来应用,可最大限度地提高杀灭肿瘤的效果。罗琪等^[13]应用 CD/5 - FC (腹腔给药)协同鼠 - 干扰素 (皮下给药)的方法,对在昆明小鼠体内肝癌 hepatoma 22

(H22)细胞的杀伤、抑制及远端旁观者效应做了动物实验研究,结果表明,在未给予前药 5 - FC但给予 γ - 干扰素的条件下,体内转 CD + 癌细胞被显著抑制,且诱导免疫攻击导致远距离未转染的癌细胞也被抑制;联合给予 5 - FC及 γ - 干扰素,对 CD + 癌细胞的抑制较仅给予 5 - FC有显著的增强,且远距离旁观者效应也较单独因素(单独给 5 - FC或 γ - 干扰素)显著增强。说明增强免疫力对提高 CD / 5 - FC直接杀伤癌细胞和远距离旁观者效应是很有必要的。 γ - 干扰素作为一种已被广泛应用的成熟生物因子,可以作 CD / 5 - FC抑制恶性肿瘤很好的增强因子。值得一提的是很多临床与实验研究均已证明许多中药方药具有确切的免疫药理作用,有可能通过免疫介导机制增强自杀基因疗法的旁杀伤效应。杜标炎等^[14]的研究显示 HSV - TK/GCV 自杀基因治疗系统联合六味地黄丸对小鼠移植性肝癌自杀基因治疗具有一定的增效作用,其疗效优于单纯自杀基因疗法或单纯六味地黄丸治疗。

5.1.3 自杀基因与热疗联合应用 肿瘤热疗是指通过提高肿瘤发生部位的温度从而达到治疗效果。利用热休克蛋白(HSP)启动子系统,即可利用热疗对肿瘤细胞进行杀伤,又可利用其热效应促成 HSP启动子下游自杀基因的表达。有研究报告显示在自杀基因的上游插入热休克蛋白 70(HSP70)启动子,转染头颈部肿瘤细胞后,通过加热诱导后,自杀基因的表达增强 5.83倍,肿瘤被明显抑制^[15]。

6 有待改进之处与展望

在肿瘤治疗中,尽管自杀基因疗法具有很大潜力,但目前进行的工作还是探索性的,绝大多数尚处于实验阶段,要使自杀基因治疗成为临床上安全有效的抗肿瘤治疗方法,尚存在许多问题需要解决。首先,还是如何增强基因转导效率、精确靶向转导、时空调控表达、长效稳定表达以及提高安全性等问题,这些问题的有效解决尚需新一代载体的开发应用。其次,单一自杀基因系统疗效欠佳,新型融合自杀基因系统的开发与完善是将来的发展方向。再者,对于旁观者效应机制的阐明,还需进一步的深入研究,才能更好地利用此效应最大限度地增强肿瘤杀伤效果,同时避免正常细胞损害。最后,鉴于肿瘤发病中的多因素、多步骤和多阶段的特点以及当前单纯应用自杀基因疗法的局限性,自杀基因疗法联合其它的较成熟抗肿瘤疗法将是未来发展的必然趋势。

【参考文献】

[1] Cortes ML, Garcia - Escudero V, Hughes M, et al Cyanide bystander effect of the linamarase/linamarin killer - suicide gene therapy system [J]. J Gene Med, 2002, 4: 407 - 414.

- [2] 谭万龙,谢毅,吴元东,等.腺病毒介导融合双自杀基因治疗膀胱癌[J].南方医科大学学报,2006,26(5):594-597.
- [3] 王金皋,王春英,李祖国,等.CD基因联合GM-CSF基因对胰腺癌治疗作用的实验研究[J].普通外科进展,2005,8(3):161-163.
- [4] Consalvo M, Mullen CA, Modesti A, et al 5 - Fluorocytosine - induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory [J]. J Immunol, 1995, 154: 5302 - 5312.
- [5] Agard C, Ligeza C, Dupas B, et al Immune - dependent distant bystander effect after adenovirus - mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8: 128 - 136.
- [6] 陈卫国,严春寅,侯健全,等.全反式维甲酸提高激素非依赖性前列腺癌自杀基因治疗的旁观者效应[J].中华男科学杂志,2008,14(2):122-125.
- [7] Zhang YD, Liu XS, Zhang L, et al Research current situation and prospect of Nanometer as gene carrier [J]. China J Modern Med, 2004, 14(22): 38 - 42.
- [8] Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers [J]. Int J Pharm, 2001, 229: 1 - 21.
- [9] 刘霆.新型非病毒载体介导融合自杀基因靶向治疗结肠癌的实验研究[D].长沙:中南大学,2007.
- [10] Li Y, Chen Y, Dille J, et al Carcinoembryonic antigen - producing cell - specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2: 1003 - 1009.
- [11] 刘霆,张桂英,陈玉祥,等.癌胚抗原启动子调控融合自杀基因yCDglyTK载体的构建及其应用研究[J].中国医学工程,2006,14(2):120-124.
- [12] 陈道桢,刘璐,唐秋莎,等.HSV - TK/GCV自杀基因系统联合射线放射治疗宫颈癌的实验研究[J].中华放射医学与防护杂志,2006,26(1):39-42.
- [13] 罗琪,卢毅卓,刘国彦,等.脂质体介导的CD/5-FC自杀基因体系协同干扰素体内抑癌及旁观者效应的观察[J].南方医科大学学报,2008,28(9):1621-1625.
- [14] 杜标炎,王慧峰,谭宇蕙,等.六味地黄丸对小鼠移植性肝癌自杀基因治疗的增效作用[J].广州中医药大学学报,2007,24(2):132.
- [15] Schmidt M, Heimberger T, Gnuensfelder P, et al Inducible promoters for gene therapy of head and neck cancer: an in vitro study [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2004, 261: 208 - 215.

(编校:王军)