

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )02-0146-03

## 自杀基因在肝癌治疗中的应用现状

苏 丹<sup>1</sup>综述; 项 涛<sup>1</sup>, 金英花<sup>2</sup>审阅 ( 1. 四川大学华西医学中心基础与法医院解剖教研室, 成都 610041; 2. 清华大学生物科学与技术系结构生物实验室, 北京 100084 )

[ 摘要 ] 目前, 在自杀基因治疗肝癌的研究中, 通过联合基因治疗, 受体介导定位、改变酶特性, 寻找新的自杀基因系统, 以及选择不同用药策略和途径等, 方法将自杀基因高效导入靶细胞, 并使之表达, 从而增强特异性杀伤肝脏肿瘤细胞作用。临床应用前景广阔。

[ 关键词 ] 自杀基因; 基因治疗; 肝肿瘤

[ 中图分类号 ] R735.7 [ 文献标识码 ] A

自杀基因因其高度特异性的负选择标记, 杀伤多种耐药性肿瘤细胞等优势成为肝癌基因治疗的研究热点。其杀伤肿瘤细胞的分子机制和具体类型已经有大量文献报道, 本文就目前自杀基因在肝癌治疗中的应用现状做一综述。

一段时间内, 研究者主要使用各种载体和不同的自杀基因系统组合, 进行肝癌的基因治疗研究。有利用逆转录病毒载体和 HSV-tk/GCV( 单纯疱疹病毒-胸腺嘧啶脱氧核苷酸激酶/更昔洛韦) 系统, 通过体内直接注入法治疗鼠肝细胞癌 ( hepatocellular carcinoma, HCC ); 还有利用腺病毒载体和 CD/5-FC 作用鼠 HCC 细胞系; 也有使用质粒为载体的 CD/5-FU 作用大鼠转移性肝癌细胞系; 以及通过鼠肝动脉将载有 HSV/tk 的腺病毒直接注入肿瘤, 都取得了明显的抑制肿瘤生长和杀伤肿瘤细胞的作用。Gnant 等<sup>[1]</sup>比较了 VZV-CD/5-FC( 水痘带状疱疹病毒-胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶) 和 VZV-HSV/tk 两种系统各自对大鼠肝癌的疗效后, 提出 VZV-HSV/TK 具有较好的疗效和临床应用前景。但是总体上单一的自杀基因治疗肝癌的效果并不十分理想。于是人们又进行了一系列的增强自杀基因治疗肝癌有效性和特异性的研究。

### 1 联合自杀基因治疗

联合细胞因子与自杀基因治疗大鼠转移性肝癌模型已

经取得了明显的疗效。Drozdik 等<sup>[2]</sup>利用了 IL-12 和 tk/GCV 联合疗法, 通过 IL-12 活化细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞, 从而增强机体抗肿瘤免疫性, 取得了较好的疗效, 并且证明了在治疗小鼠 HCC 中, 联合治疗有更好的抑制肿瘤生长的作用。Kawashita 等<sup>[3]</sup>使用脂质体将自杀基因 tk 转入经过放射线照射的原发性肝癌细胞中, 结果发现, 经照射过的细胞对药物呈高敏感性。Kanazawa 等<sup>[4]</sup>利用  $\gamma$  射线照射, 可以增强腺相关病毒互补链的合成, 以它为载体将 HSV/tk 转入肿瘤细胞并配合放疗, 可以提高杀伤肿瘤细胞疗效。Nakamura 等<sup>[5]</sup>利用滤过性病毒溶瘤作用与自杀基因联合治疗肝癌, 在单纯疱疹病毒和 CD/5-FU 联合作用下, 增强了“旁观者效应”, 延长了小鼠的存活时间。Kenneth 等<sup>[6]</sup>构建双自杀基因 CD/5-FC 与 HSV-1 tk/GCV 联合应用, 实验表明该系统杀伤肿瘤作用强于单个自杀基因系统, 再加上放射性疗法, 可以最终使肿瘤完全消失。Sakai 等<sup>[7]</sup>利用腺病毒载体分别将 tk/GCV 和单核细胞趋化蛋白-1 ( MCP-1, ) 同时转入动物 HCC 中, MCP-1 通过增加肿瘤组织中的巨噬细胞活性和数量来增强自杀基因的杀伤肿瘤作用。

### 2 特异性受体介导自杀基因治疗

目前, 作为转基因的载体设计已经有了很大的改进, 这

[ 15 ] Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, *et al.* Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression *in vivo*[ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 29 ): 4558-4566.

[ 16 ] Paster A, Vorburger SA, Barber GN, *et al.* Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7( mda7 ) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase( PKR )[ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 8 ): 2239-2243.

[ 17 ] Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Mhashilkar AM, *et al.* Down-regulated melanoma differentiation associated gene( MDA-7 ) expression in human melanomas[ J ]. *Int J Cancer*, 2001, 94( 1 ): 54-59.

[ 18 ] Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, *et al.* Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins, regulators of programmed cell death[ J ]. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 406: 99-112.

[ 19 ] Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7834-7838.

[ 20 ] Ellerhorst JA, Prieto VG, Ekmekcioglu S, *et al.* Loss of mda-7 expression with progression of melanoma[ J ]. *J Clin Oncol*, 2002, 20( 4 ): 1069-1074.

[ 收稿日期 ] 2003 - 03 - 02

[ 修回日期 ] 2003 - 05 - 20

对有效控制目的基因表达是非常重要的。很多自杀基因在病毒启动子的调控下转录表达是非常有效的,但是由于存在组织毒性作用被严格限制使用。利用细胞或组织特异性启动子能够使目的基因在特定的靶细胞中表达,从而最大程度地减少对正常组织的毒副作用。但是许多肿瘤特异性启动子对目的基因的表达水平较低,不能达到治疗所需要的浓度。研究表明,一种与逆转录病毒特异性结合的受体,鼠阳离子氨基酸转运因子-1(mouse cationic amino acid transporter-1, MCAT-1),可以使逆转录病毒携带的目的基因在人细胞中特异性的表达。Uto 等<sup>[8]</sup>利用两步基因转导法提高了逆转录病毒载体转导效率,先在以腺病毒或腺相关病毒为载体 HCC 特异性启动子 AFP 的作用下,在靶细胞膜表面先表达 MCAT-1 受体,然后加入装有强启动子的目的基因逆转录病毒载体,使其与 MCAT-1 特异性的结合,将目的基因转入靶细胞中。这样就相对提高了目的基因的转录效率。

### 3 改变自杀基因系统的酶特性

前体药物的组织毒性作用限制了杀伤肿瘤产物的有效浓度。为了减少副作用,增强疗效,Kokoris 等<sup>[9]</sup>针对 tk/GCV 系统利用半随机突变方法,得到的突变产物中筛选出 7 个突变体,其中突变体 SR39 与 SR26 活性较野生型分别增加 14 倍和 124 倍。这样就极大地减少了前体药物的浓度和对肝组织的毒性作用,并保证了治疗需要的药物剂量。Wybraniec 等<sup>[10]</sup>在 CD 基因两端加入 HSV-1 外壳蛋白 VP22 基因通过腺病毒转入 HCC 细胞中,通过 VP22 使药物有效地向周围细胞转运,增强了“旁观者效应”。

### 4 改变自杀基因系统给药策略及途径

Engelmann 等<sup>[11]</sup>在研究 tk/GCV 自杀基因系统治疗肝癌时,将前体药物 GCV 装入脂质体(lip-GCV)中进行治疗,发现 lip-GCV 经过静脉注射后,能很快降低药物在外周血浆中的浓度和提高在肝脏血中的药物浓度。并且比单纯注射 GCV 更有效的杀伤 TK<sup>+</sup> 细胞。Gnant 等<sup>[12]</sup>通过研究不同的给药途径来观察自杀基因在转移性肝癌细胞中的表达,发现通过门静脉和腹腔注射的目的基因表达效率较外周静脉注射的有显著提高。而门静脉与腹腔注射之间无显著差异。Baque 等<sup>[13]</sup>将表达 CD 的质粒直接注入鼠转移性肝癌瘤体内,然后用 5-FU 治疗,肿瘤体积明显缩小。Gerolami 等<sup>[14]</sup>比较了在鼠 HCC 中直接注射和经肝动脉注射 tk/GCV 的治疗效果,发现了较大的肿瘤体中采取直接注入更能有效发挥药物杀伤作用,而对大量的小肿瘤结节则可采取经动脉注射法。

### 5 寻求新的载体

病毒性载体能够将目的基因高效转入宿主细胞并有效表达目的基因的能力,但是它具有较大的组织毒性作用、插入突变、免疫原性以及病毒侵袭性恢复等缺点也限制了其临床应用。而非病毒性载体由于转导效率低下也很难广泛使

用。Iwai 等<sup>[15]</sup>利用复制缺陷型单纯疱疹病毒 QOZ/HG 和 TOZ.1 为载体,能有效的将 tk 转入癌细胞中。Maruyama-Tabata 等<sup>[16]</sup>在质粒的基础上增加了 EB 病毒的核抗原 1 基因(EBV nuclear antigen 1 gene)和 EB 病毒 Orip 区,即潜伏期病毒 DNA 复制起始点的两个区域,这就是 EBV-based plasmid。它具有病毒和质粒两者的优点,安全性高,转导效率高。Iwai 等<sup>[17]</sup>在 V-based plasmid 的基础上,又与多聚乙基亚胺(polyethylenimine, PEI)结合使用,发现具有更高的转导效率。PEI 是近年来发现的一个多聚阳离子型的 DNA 载体,具有较强的缓冲能力。DNA/PEI 复合物内吞进入溶酶体后,能够避免 DNA 在酸性条件下的降解作用,因此,具有较高的表达效价。Hasegawa 等<sup>[18]</sup>使用日本血凝病毒-质粒(HVJ-liposomes),利用病毒外壳上含有的 HN 和 F 糖蛋白促进质粒和细胞的融合,将 HSV/tk 转入 HCC 细胞,并通过多次注射增强其杀伤肝癌细胞的作用,在 GCV 浓度为 100 g/ml, 20% 的细胞被转染的条件下,有 1/3 的肿瘤细胞发生死亡。

### 6 构建高效特异性启动子

使用特异性的启动子将自杀基因转导到特定的组织和细胞中的方法能够显著增强自杀基因的临床应用前景。Gerolami 等<sup>[14]</sup>将 tk 基因分别装入巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子和甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)启动子的腺病毒中,然后转入鼠 HCC 中,发现 Ad. CMVtk 组织毒副作用大,而 Ad. AFPtk 具有较好的肿瘤特异性。但是,在 AFP 阴性或少量表达的肝脏肿瘤细胞中,tk 的表达量将减少。Ido 等<sup>[19]</sup>构建了一个含有人类内皮血管生长因子、缺氧反应因子(hypoxia responsive element)与 AF0.3 启动子融合的混合启动子,并特异性在低 AFP 肝细胞中表达。Qiao 等<sup>[20]</sup>在肝癌细胞中建立了二元启动子系统来增强目的基因特异性高效表达。其中,肿瘤细胞特异性的癌胚抗原启动子(CEA promoter)控制一种合成转录因子,该因子是由单纯疱疹病毒 VP16 的转录活性区域与酵母菌蛋白 GLA4 的 DNA 结合区域联合构成,编码的 GLA4/VP16 结合蛋白质与启动子的 5 个 GLA4 结合区结合,又可激活下游由 TATA 启动子控制的自杀基因 HSV/tk。从而达到特异性和高效性的统一。结果显示,该系统不仅转录活性高,并且对肝脏的组织毒性作用较常规方法要小。Cao 等<sup>[21]</sup>将 AFP 增强子导入 HCC,以逆转录病毒为载体,在磷酸甘油酸激酶启动子的控制下,在肝肿瘤细胞中特异性表达 HSV/tk。该系统在肝细胞中表达效率远高于无 AFP 增强子的载体系统。Majumdar 等<sup>[22]</sup>利用端粒末端转移酶启动子控制 tk 的表达,通过腺病毒转入肿瘤细胞,具有良好的肿瘤特异性,并对肝细胞毒性较小。

### 7 寻找新的自杀基因系统

目前发现在治疗 HCC 中,使用嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP)/氟达拉滨(fludarabine)系统比 HSV/tk 系统具有更强的“旁观者效应”。Krohne 等<sup>[23]</sup>从诱导癌细胞凋亡的机制方

面比较了两种系统的作用。实验表明,在 P53<sup>+</sup> 癌细胞中,两者最终的疗效相当,但是 PNP/fludarabine 在诱导细胞凋亡早期,能够迅速使大量癌细胞凋亡。而在 P53<sup>-</sup> 的癌细胞中,PNP/fludarabine 明显优于 HSV/tk,因为前者是不依赖 P53 诱导细胞凋亡的。在研究植物防御昆虫的氰化物生成系统时,发现八仙花属和非洲马铃薯等植物含有一种称为 linamarase 的酶,这是一种生氰的  $\beta$  糖苷酶( a cyanogenic beta-glucosidase ),能够将底物亚麻苦甙( Linamarin )最终分解成葡萄糖、酮和氰化物。Cortes 等<sup>[24]</sup>就利用 linamarase/linamarin ( lis/lin )这种新的自杀基因系统产生的氰离子起到杀伤肿瘤细胞,并且观察到明显的“旁观者效应”。

综上所述,利用自杀基因治疗肝癌无疑有美好应用前景。通过实验研究,不断地增强抗肿瘤细胞特异性和基因表达的高效性,并且尽可能减少其毒副作用。虽然,还有很多作用机制尚不明确,但是随着对肿瘤发病机制研究的深入和分子生物学相关技术的不断发展,相信利用自杀基因治疗肝癌必将成为一种有效的途径。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Gnant MF, Puhlmann M, Alexander HR, *et al.* Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice[ J ]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3396-403.
- [ 2 ] Drozdziak M, Qian C, Xie X, *et al.* Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma[ J ]. *J Hepatol*, 2000, 32: 279-286.
- [ 3 ] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, *et al.* Regression of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation [ J ]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 1509-1519.
- [ 4 ] Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, *et al.* Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells[ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 99-106.
- [ 5 ] Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, *et al.* Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5447-5452.
- [ 6 ] Kenneth R, Mark W, Dell P, *et al.* Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization[ J ]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11: 67-76.
- [ 7 ] Sakai Y, Kaneko S, Shimizu M, *et al.* Enhanced anti-tumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system by codelivering monocyte chemoattractant protein-1 in hepatocellular carcinoma[ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 695-704.
- [ 8 ] Uto H, Ido A, Hirono S, *et al.* Hepatoma-specific gene therapy through retrovirus-mediated and targeted gene transfer using an adenovirus carrying the ecotropic receptor gene[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265: 550-555.
- [ 9 ] Kokoris MS, Black ME. Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity[ J ]. *Protein Sci*, 2002, 11: 2267-2272.
- [ 10 ] Wybranietz WA, Gross CD, Phelan A, *et al.* Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase ( CD ) fusion gene[ J ]. *Gene Ther*, 2001, 8: 1654-1664.
- [ 11 ] Engelmann C, Panis Y, Bolard J, *et al.* Liposomal encapsulation of ganciclovir enhances the efficacy of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy against hepatic tumors in rats [ J ]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 1545-1551.
- [ 12 ] Gnant MF, Puhlmann M, Bartlett DL, *et al.* Regional versus a systemic delivery of recombinant vaccinia virus as suicide gene therapy for murine liver metastases[ J ]. *Ann Surg*, 1999, 230: 352-60; discussion 360-361.
- [ 13 ] Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, *et al.* Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology*, 2002; 35: 1144-1152.
- [ 14 ] Gerolami R, Cardoso J, Lewin M, *et al.* Evaluation of HSV-tk gene therapy in a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 855-860.
- [ 15 ] Iwai M, Harada Y, Ishii M, *et al.* Suicide gene therapy of human hepatoma and its peritonitis carcinomatosis by a vector of replicative-deficient herpes simplex virus[ J ]. *Cancer Res*, 2000, 60: 993-1001.
- [ 16 ] Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, *et al.* Effective suicide gene therapy *in vivo* by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine[ J ]. *Gene Ther*, 2000, 7: 53-60.
- [ 17 ] Iwai M, Harada Y, Tanaka S, *et al.* Polyethylenimine-mediated suicide gene transfer induces a therapeutic effect for hepatocellular carcinoma *in vivo* by using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 48-54.
- [ 18 ] Hasegawa H, Shimada M, Yonemitsu Y, *et al.* Preclinical and therapeutic utility of HVJ liposomes as a gene transfer vector for hepatocellular carcinoma using herpes simplex virus thymidine kinase[ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8: 252-258.
- [ 19 ] Ido A, Uto H, Moriuchi A, *et al.* Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: Selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3016-3021.
- [ 20 ] Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, *et al.* Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy[ J ]. *Gene Ther*, 2002, 9: 168-175.
- [ 21 ] Cao G, Kuriyama S, Gao J, *et al.* Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein ( AFP ) enhancer and a housekeeping gene promoter[ J ]. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 140-147.
- [ 22 ] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, *et al.* The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters[ J ]. *Gene Ther*, 2001, 8: 568-578.
- [ 23 ] Krohne TU, Shankara S, Gelssler M, *et al.* Mechanisms of cell death induced by suicide encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cell *in vitro* [ J ]. *Hepatology*, 2001, 34: 511-518.
- [ 24 ] 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.

[ 收稿日期 ] 2002 - 12 - 20

[ 修回日期 ] 2003 - 03 - 28