

[文章编号] 1007-385X(2003)0 -

卵巢癌的自杀基因治疗

贾雪梅 综述; 王淑玉 审校(南京医科大学第一附属医院妇产科, 南京 210029)

[摘 要] 自杀基因治疗是目前研究较多的治疗恶性肿瘤的方法,用于卵巢癌的自杀基因主要有 HSV-tk-GCV 和 CD-5-FC 系统。本文对其作用机理,研究方法,治疗效果及现存问题进行了总结,并对其发展方向进行了展望。

[关键词] 卵巢癌; 自杀基因; 治疗

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

卵巢癌在女性生殖器癌瘤中的发生率占第 3 位,但死亡率却居第 1 位,因其治疗困难,晚期卵巢癌的 5 年存活率始终保持在 30% 左右。近年来肿瘤的基因治疗研究已取得长足进展,自杀基因治疗就是最富有希望的方法之一。

1 概述

自杀基因(suicide genes)疗法又称为前药敏感基因(pro-drug sensitive genes)疗法,是利用转基因的方法,将哺乳动物不含有的药物酶基因转入肿瘤细胞内,该基因表达的产物可以将无毒的药物前体转化为有毒性的药物,影响细胞的 DNA 合成,从而杀死肿瘤细胞。

2 自杀基因的种类

目前已知的自杀基因有:单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(herpes simplex virus-thymidine kinase ,HSV-tk),大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(*E. coli* cytosine deaminase ,EC-CD),酵母菌胞嘧啶脱氨酶基因(yeast cytosine deaminase ,yCD),大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(glutamine phosphoribosyl transferase , GPT),细胞色素基因 p450 基因等。

在卵巢癌的治疗中研究较多的自杀基因主要是单纯疱疹病毒胸苷激酶基因-丙氧鸟苷(或称为更昔洛韦,羟甲基无环鸟苷)系统(HSV-tk-GCV)和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因-5-氟胞嘧啶(CD-5-FC)系统,而后者在卵巢癌治疗中的作用日益得到重视。

3 作用机理、研究现状及应用前景

3.1 HSV-tk-GCV 系统

HSV-tk 能将无毒的药物前体丙氧鸟苷(GCV)转变为细胞毒性药物丙氧鸟苷三磷酸(GCVTP),GCVTP 可进入 DNA 合成途径,作为链的终止剂,干扰细胞分裂时 DNA 的合成,从而杀伤肿瘤细胞^[1]。HSV-tk 抗肿瘤的另一机制是“旁观者效应”,即不但转染了自杀基因的肿瘤细胞被杀死,其周围大量未被转染的细胞也被杀死^[2],旁观者效应的意义在于只需少量的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效应。

HSV-tk 首先由 Moolten 等^[3]于 1986 年报告,肿瘤细胞基因修饰后表达 HSV-tk,1990 年报告应用逆转录病毒载体将 HSV-tk 基因导入肿瘤细胞,被转导的肿瘤细胞对 GCV 高度敏感^[4]。1991 年报道,在 BALB/c 小鼠两侧背部皮下分别接种携带和不携带 HSV1-tk 基因小鼠成纤维母细胞,成瘤后给予 GCV 腹腔注射治疗,可使 HSV1-tk 阳性的肿瘤明显缩小甚至消失^[5]。

HSV-tk 介导的自杀基因疗法近年来在卵巢癌的研究中甚为广泛。Behbakht 等^[6]在动物实验中研究发现,卵巢肿瘤细胞很容易被重组腺病毒转染,并且在转染了 Ad. HSV-tk 后对 GCV 敏感;在国内,上海医科大学妇产科医院的徐丛剑等^[7]用 HSV-tk 转导卵巢癌细胞 AO,3AO,结果表明,在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丙氧鸟苷作用下,96% 的阳性克隆可在 5 d 内死亡,其他克隆最终也发生完全死亡,提示 HSV-tk 在宿主细胞内有足够的表达活性。

Tong 等^[8]在动物实验中发现,转染了 HSV-tk 的荷瘤小鼠的生存期明显延长,后来他们建立荷人卵巢癌裸鼠腹水瘤模型,比较单用 ADV/HSK-tk 或 GCV(单药组)或联合应用 ADV/HSK-tk 及 GCV(联合用药组)发现,联合用药组裸鼠的平均生存时间比单药组至少延长 2 倍,且疗效与用药剂量及裸鼠肿瘤负荷有依赖关系^[9]。徐丛剑等^[10]研究结果显示: HSV-tk-GCV 对 AO 裸鼠网膜移植瘤的抑制率为 46.8%,而 AO/HSV-tk 裸鼠网膜移植瘤经 GCV 治疗后,多数仅残留显微镜下可见的癌灶。姜洁等^[11]用腺病毒载体将 HSV1-tk 转入卵巢癌细胞株 TYK 中,发现 TYK 细胞发生凋亡,故而认为,GCV,ACV 对带有 HSV1-tk 基因的 TYK 细胞有杀伤作用,杀伤的机理可能是细胞凋亡。

Al-hendy 等^[12]观察到,HSV-tk-GCV 具有明显的旁观者效应,转染 1/20 的卵巢癌细胞,可得到 1/3 的杀伤力。Tong 等^[13]研究表明,HSV-tk 系统对卵巢癌细胞除了自杀基因本身的杀伤作用之外,还可以提高肿瘤细胞对化疗的敏感性。

另外,还有一些研究将 HSV-tk-GCV 和某些细胞因子(如 IL-2,IFN 等)或其他治疗手段相结合也取得了明显的治疗效果。

3.2 CD-5-FC 系统

CD 基因只在真菌和某些大肠杆菌中存在,编码胞嘧啶脱氨酶,该酶可将胞嘧啶通过脱氨基作用转换成尿嘧啶,使 5-FC 转化为 5-FU。5-FC 是一种治疗真菌感染的药物,而 5-FU 是临床上常用的化疗药,它可抑制细胞 DNA 和 RNA 合成,从而杀死肿瘤细胞。Mullen^[14]将其改造成可在真核细胞中表达的 pCD2 基因后,CD 基因在肿瘤基因治疗中发挥的作用日益成为人们研究的热点。

CD-5-FC 系统也存在与 HSV-tk 相同的旁观者效应,相对于其他自杀基因来说,CD 基因的旁观者效应在机理上有一点较明确,即 5-FU 可以自由穿过细胞膜,从 CD 阳性细胞传递到 CD 阴性细胞而引起后者死亡。

近年来,以逆转录病毒或腺病毒作为载体介导大肠杆菌 CD 基因转染肿瘤细胞,合并应用 5-FC 已被广泛应用于各种肿瘤治疗的研究中,如消化道的肝癌,结肠癌,胰腺癌,脑胶质细胞瘤,黑色素瘤,红白血病,乳腺癌,肺腺癌等。其中,某些肿瘤的治疗已经进入临床阶段(如脑胶质瘤)。CD-5-FC 在卵巢癌中的应用正逐渐引起人们的重视。Xie 等^[15] 研究认为,CD-5-FC 对卵巢癌细胞株具有较好的抑制效果;Peng 等^[16] 研究发现,卵巢癌细胞株 Ovar-5 和 Skov-3 经腺病毒载体转染了 CD 基因后对 5-FC 高度敏感,而且 CD-5-FC 可以明显缩小卵巢癌瘤结节。姚远等^[17] 用 CD 基因联合 5-FC 应用观察对卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用,结果发现,实验组裸鼠肿瘤生长明显受抑制,差异有显著性。

CD-5-FC 系统与其他自杀基因相比具有一定的优越性,对 5-FU 的抗癌机理的研究表明,5-FU 必须在细胞内代谢为毒性产物才能发挥抗癌作用;5-FU 转变为 5-FdUTP,抑制胸苷酸合成酶,从而影响 DNA 的合成,主要作用于肿瘤细胞的 S 期;5-FU 在细胞内经过转化后也掺入 RNA,干扰蛋白质的合成,故对细胞其他各期都有作用。另外,Kievit 等^[18] 研究表明,酵母菌的 CD 使 5-FC 转化为 5-FU 的能力比大肠杆菌中 CD 的转化能力强 20 倍以上。还有,尿嘧啶磷酸核糖转移酶(uracil phosphoribosyltransferase,UPRT)能直接将 5-FU 转换为 5-FUMP,而哺乳动物缺乏该种酶。近来有许多学者将 CD 基因和 UPRT 基因联合应用于肿瘤治疗的研究中发现,CD 基因 + UPRT 基因更能提高细胞对 5-FC 的敏感性^[19],提示 CD 基因 + UPRT 基因是一个令人瞩目的治疗肿瘤的新方案。因此我们可以预见,CD-5-FC 系统在卵巢肿瘤的治疗上具有广阔的应用前景。

4 发展方向

4.1 双自杀基因治疗

双自杀基因疗法是将两种自杀基因整合在一起,通过载体转导进入肿瘤细胞,使其在肿瘤细胞内表达融合基因产物,然后给予双前体药物治疗,而发挥双功能的杀伤作用。

单自杀基因治疗肿瘤有很多优点,但是各类自杀基因系统治疗肿瘤都存在一定的局限性。HSV-tk-GCV 系统发挥旁观者效应必须依靠肿瘤细胞之间的紧密连接和连接蛋白,而 CD-5-FC 系统引起旁观者效应则不需要细胞之间的紧密连

接;再者,HSV-tk-GCV 系统直接杀瘤效果显著,而 CD-5-FC 系统的旁观者效应突出;还有,双自杀基因的产物具有两种酶的活性,因此,双自杀基因疗法可以大大提高抑制肿瘤生长的功效,同时使得前药的用量减半^[20]。目前双自杀基因多为 CD-tk 融合基因。

4.2 自杀基因联合细胞因子基因治疗

近年来许多学者将自杀基因与各种细胞因子基因(如 IL-2,IL-4,IL-6,IFN- α 及 GM-CSF 基因)联合应用,研究它们对肿瘤的杀伤效果,结果认为,自杀基因联合细胞因子基因治疗肿瘤可以通过产生持续的抗肿瘤免疫,或使肿瘤瘤体内或瘤周 CD4,CD8 细胞浸润增加,或使肿瘤细胞提呈抗原能力增强,或直接杀伤肿瘤细胞,减轻瘤负荷,并提高机体对肿瘤的免疫应答,起到抑制肿瘤生长、实验动物生存延长的作用。

4.3 自杀基因联合放疗

自杀基因联合放疗于近几年产生,其中 CD 基因联合放疗对恶性肿瘤的治疗是当今研究的重点之一。自杀基因的产物可以将无毒的药物前体转化为有毒性的药物,影响细胞的 DNA 合成;放疗可以使细胞的遗传物质发生突变,可以干扰遗传物质的修复,而且放疗可以促进基因的转染效率。自杀基因疗法和放疗联合应用可以增强肿瘤细胞对放疗的敏感性,增强对肿瘤细胞的杀伤力。

5 问题与展望

尽管自杀基因治疗肿瘤已取得了较满意的效果,但仍有一些问题有待改进。如:载体问题,目前常用的病毒载体有逆转录病毒和腺病毒,均存在转染效率、感染特异性或表达的稳定性和安全性的问题,还应加强基因治疗的靶向性研究,开发出既安全又高效的载体系统;进一步探讨自杀基因治疗的机理以及与免疫系统相互作用的机制,以达到优化治疗效果的目的,等等。

自杀基因治疗肿瘤已经获得比较满意的效果,在卵巢癌中的应用已有初步的实验研究证实有效,前景令人乐观,它有着传统疗法所不可比拟的优越性。随着自杀基因研究的不断深入,新一代载体的开发和新的自杀基因系统的研究,多种疗法的联合应用,这些都将为治疗晚期卵巢肿瘤,改善患者生存质量,延长生存时间,甚至治愈卵巢肿瘤提供美好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Furman PA, Mcguirt PV, Keller PM, *et al.* Inhibition of ACV of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpes virus genetic information[J]. *Virology*, 1980, 102: 420-430.
- [2] Freeman SM, Abbound CN, Whartenby KA, *et al.* The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified[J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 5274-5283.
- [3] Moolten FL. Tumor Chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. *Cancer Res*, 1986, 46: 5276-5281.
- [4] Moolten FL, Wells JM, Heyman RA, *et al.* Lymphoma regression

- induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene[J]. *Hum Gene Ther*, 1990, 1: 125-134.
- [5] Moolten FL, Wells JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(4): 297-300.
- [6] Behbakht K, Benjamin I, *et al*. Adenovirus-mediated gene therapy of ovarian cancer in a mouse model[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, 175(5): 1260-1265.
- [7] 徐丛剑, 徐秀兰, 张惜阴, 等. 逆转和病毒介导 I 型单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因转导卵巢细胞的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 1996, 31(11): 664-666.
- [8] Tong XW, Block A, Chen SH, *et al*. *in vivo* gene therapy of ovarian cancer by adenovirus-mediated thymidine kinase transduction and ganciclovir administration[J]. *Gynecol Oncol*, 1996, 61: 175-179.
- [9] 童晓文, 施维, 顾美皎, 等. 腺病毒介导胸苷激酶基因治疗卵巢癌的动物试验研究[J]. *中华妇产科杂志*, 1997, 32(12): 712-714.
- [10] 徐丛剑, 张惜阴, 金志军, 等. 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因/羟甲基无环鸟苷系统对人卵巢癌裸鼠网膜移植瘤的作用[J]. *中华妇产科杂志*, 1999, 34(3): 165-167.
- [11] 姜洁, 孔北华, 江森, 等. I 型单纯疱疹病毒胸苷激酶基因转染人卵巢癌细胞株后联合抗肿瘤药物诱导该细胞株凋亡的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35(12): 736-739.
- [12] Al-hendy A, Auersperg N, *et al*. Applying the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir approach to ovarian cancer: An effective *in vitro* drug-sensitization system[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 1997, 43(4): 268-275.
- [13] Tong X, Shine DH, Agoulnik I, *et al*. Adenovirus mediated thymidine kinase gene therapy may enhance sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(5A): 3421-3426.
- [14] Mullen CA. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: A negative selection system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 33-37.
- [15] Xie Y, Gilbert JD, Kim JH, *et al*. Efficacy of adenovirus-mediated CD/5-FC and HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapies concomitant with p53 gene therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 4224-4232.
- [16] Peng XY, Won JH, Rutherford T, *et al*. The use of the L-plastin promoter for adenovirus-mediated, tumor-specific gene expression in ovarian and bladder cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(11): 4405-4413.
- [17] 姚远, 彭芝兰. 胞嘧啶脱氨酶基因联合 5-氟胞嘧啶对卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(4): 195-197.
- [18] Kievit E, Bershad E, Ng E, *et al*. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 1417-1421.
- [19] Kanai F, Kawakani T, *et al*. Adenovirus-mediated transduction of *E. coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1946-1951.
- [20] Uckert W, Kammertons T, Haack K, *et al*. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells *in vivo* [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(6): 855-865.

[收稿日期] 2003 - 02 - 17

[修回日期] 2003 - 04 - 20