

肿瘤基因治疗研究进展

庞晓军, 黄军章, 刘国勇, 李香乐 (钦州市第二人民医院, 广西 钦州 535000)

摘要 目的:介绍目前基因治疗肿瘤的研究进展。方法:参考国内外相关文献,进行综合、分析、归纳。结果:反义核苷酸技术、抑癌基因的合理应用、药物敏感基因治疗、肿瘤免疫基因治疗、细胞因子及其受体基因治疗、抗原抗体基因治疗、改善肿瘤传统化疗疗效的基因治疗、RNA 干扰技术和表达对蛋白酪氨酸激酶抑制的基因治疗等在实验室研究中取得一定进展。结论:随着医学科学技术的发展基因治疗将成为肿瘤治疗的常用医疗手段。

关键词 肿瘤;基因治疗;反义核苷酸技术;抑癌基因;药物敏感基因;肿瘤免疫基因;抗原抗体基因

中图分类号:R730.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1006-0111(2006)01-0004-03

继手术、化疗、放射几种经典的抗肿瘤治疗方法之后,随着分子生物学和分子药理学的迅速发展,肿瘤的基因治疗基本方法已逐步形成。作者就现在的肿瘤基因治疗方法作一简要概述。

1 肿瘤基因治疗策略

对于肿瘤的治疗最直接的方法就是采取适当的措施直接杀灭或直接抑制肿瘤细胞的生长,因而有以下几种方法:

1.1 反义核苷酸技术 癌基因 (oncogene) 的过度表达现已公认是肿瘤发生发展的重要分子病理机制之一。反义核苷酸技术治疗肿瘤的原理就是根据癌基因的特异致病碱基序列,用人工合成或生物合成的互补寡脱氧核苷酸 (ODNs) 与之相结合,从而封闭癌基因的表达;或者通过构建特定的反义基因表达载体使之表达反义 RNA,阻碍癌基因所转录的 mRNA 翻译;或者可以直接以人工合成的 ODNs 在胞质中与某种癌基因所表达的 mRNA 互补配对而形成杂种分子,从而激活内源性 RNA 酶,使其很快分解,达到封闭癌基因的目的。杨栓平等^[1]选用 HER-2 (一种与乳腺癌的发病、发展、预后等有密切相关的癌基因) 高表达的 SK-BR-3 乳腺癌细胞株作为实验株,利用 HER-2 特异性的反义寡核苷酸 HA824 孵育 SK-BR-3 乳腺癌细胞 8h 之后,采用逆转录 PCR 法与免疫化学检测 SK-BR-3 细胞 HER-2 mRNA 的表达水平,结果与对照序列相比较,HA824 更能强烈抑制 HER-2 mRNA 的表达。Bodnar 和 Vaziri 等分别用 hTERT 表达载体转染端粒酶阴性的人视网膜上皮细胞和纤维原

细胞,结果发现端粒酶阳性克隆伴随端粒酶的激活(端粒酶的激活可能在肿瘤的发生发展中起重要作用),端粒长度得到稳定并且增殖寿命延长,相反当细胞中端粒酶活性被 hTR 反义核苷酸所抑制时,端粒随着细胞分裂逐渐缩短,细胞最终死亡^[2,3]。同时,王宏光等利用人肝癌细胞系 SMMC7721 人工合成反义寡核苷酸,来研究血管内皮生长因子 (VEGF) 反义寡核苷酸 (ODN) 对人肝癌细胞系 VEGF 表达的抑制作用,结果表明反义 ODN 能够抑制人肝癌细胞的表达,并且作者认为其有望成为抗肝癌的新一代基因治疗药物^[4]。

1.2 抑癌基因的合理应用 一般认为如果确定某一种特定的组织或细胞的恶性肿瘤的抗癌基因,必须具备以下条件^[5]:①在该种癌的相应正常组织中必须有正常的表达;②在该种恶性肿瘤中,该基因理应有所改变,包括点突变。DNA 片段或全基因的缺失或表达缺陷;③将野生型基因导入该基因缺陷的恶性肿瘤细胞中将部分或全部抑制其恶性表型。符合上述标准的有 Rb-1、p53、APC、DCC、WT1、NF1 和 NF2、BRCA-1、p16、p15、DPC4 等,据研究表明人类目前发现大约有 50 个相关的肿瘤抑制基因。但随着研究的深入,新的抗癌基因还会不断发现。由于氧化铁磁性纳米颗粒具有易制备、安全可靠且价格便宜等优点^[6],因而可利用其作为抑癌基因载体,采用适当的途径注入体内来转染肿瘤细胞,这样可以成为利用抑癌基因治疗的方法之一。但是由于人们对癌基因和抑癌基因的变化和表达规律尚不完全了解,所以在实际应用中效果并不理想,尚需在加强对癌基因、抑癌基因的发现和研究的的同时更多地发展其他的肿瘤基因治疗的策略和方法,以获得对已存在的肿瘤的杀伤效应。

1.3 药物敏感基因治疗 又称为自杀基因治疗,其基本原理是向肿瘤细胞内导入可编码病毒或细菌所特有的酶类的基因(被称为自杀基因或药物敏感基因),该基因的表达产物,即病毒或细菌所特有的酶类可催化对真核细胞无毒或低毒、无活性的药物前体(通常为抗病毒药或抗菌药物),使其转变为具有抑制核酸合成效应的抗代谢药物,选择性地使转染该基因的肿瘤细胞自杀,而不伤及正常细胞。Miller等人构建的 PA317 包装细胞系及逆转录病毒载体(RV),并根据脑部肿瘤中成熟的神经细胞不再分裂,而肿瘤细胞则处于高度增殖状态以及血脑屏障的特点,利用 HSV-tk/GCV 基因治疗体系治疗脑部肿瘤取得较高的转染率,并能比较彻底地消灭肿瘤细胞^[7]。

2 现代肿瘤免疫基因治疗

主要根据现代医学免疫学的理论,以基因工程技术为基础来激发机体肿瘤免疫效应或提高免疫效应细胞功能来进行治疗。目前主要有细胞因子及其受体基因治疗和抗原抗体基因治疗两大类。

2.1 细胞因子及其受体基因治疗 因为细胞因子具有较强的抗肿瘤活性,但全身应用细胞因子治疗时具有很强的毒副作用,因此不能直接应用于临床肿瘤治疗,而通过点突变、基因靶技术等基因工程技术将已知对肿瘤细胞有强烈抑制或杀灭作用的细胞因子进行基因结构改造,得到其表达抗肿瘤活性的编码基因,再利用合适的载体经适当的途径注入体内或瘤内。目前研究较多的是,将 TNF 受体基因以及 RV 作为载体导入本身几乎不表达 TNF 受体的人结肠癌细胞,结果转染后的癌细胞与 TNF 特异性结合显著增加,且对 TNF 杀伤作用的敏感性大大增加。

2.2 抗原抗体基因治疗 王烈等利用逆转录病毒介导的重组单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)和 B 细胞活化抗原(B7)联合基因行乳腺癌瘤体内直接注射,发现 HSV-TK 和 B7 基因联合瘤体内注射不仅可以抑制肿瘤的生长,延长荷瘤动物的生存期,而且具有增强机体免疫力的作用^[8]。而王凡等采用 APAAP 法对 SEC 活化的淋巴细胞进行亚群分析,按 MTT 法测定经 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤的体外杀伤作用,并通过简历荷瘤动物模型及 SCID 小鼠免疫嵌合模型,以肿瘤生长曲线为指标观察超抗原 SEC 活化淋巴细胞对胶质瘤的杀伤作用,发现经 SEC 活化淋巴细胞对胶质瘤有强大的杀伤作用^[9]。表明采用抗原基因治疗是可行的,并将成为以后肿瘤基因治疗的主要方向之一。在普通的肿瘤生物治

疗中,抗体的应用主要是因为其可以产生诱导细胞毒反应,具有一定的抗肿瘤作用,这一作用被美国学者成功地应用到针对癌基因表达产生的基因治疗中——他们构建了一种编码单链抗体的载体(PGT₂₁),将其转染到 CerB₂ 高表达的肿瘤细胞中,结果发现其可以通过细胞内表达抗 CerB₂ 单链抗体,抑制肿瘤的生长^[10]。同时由于抗体的靶向性,所以可应用于逆转录病毒载体的定向转染,能较好的解决抗肿瘤基因治疗中的靶向性问题。

3 改善肿瘤传统化疗疗效的基因治疗

主要有两方面:一是化疗药物增敏基因治疗,二是耐化疗药物的基因治疗。影响化疗疗效的关键因素是某些肿瘤细胞对化疗药物具有一定的耐受性,如能将增加对化疗药物敏感的基因转入肿瘤细胞内,则可以使某些化疗药物的敏感性增加,这样再给予相应的化疗药物时就可以较大程度地杀伤肿瘤细胞。已有研究人员将鸡钙调素(CaM)基因导入小鼠乳腺癌细胞株 C₁₂₇ 后,可明显减低长春新碱对其生长的半数抑制量(ID₅₀),应用较低剂量的长春新碱或长春花碱即可抑制鸡 CaM 基因转导阳性的 C₁₂₇ 细胞的生长。其原理是 CaM 基因的表达产物作为细胞内信号转导系统的重要物质,可明显增加细胞对长春新碱和长春花碱的吸收而减少排泄量,从而提高了胞内药物浓度,导致细胞死亡^[11]。耐化疗药物的基因治疗主要是根据化疗药物对机体的毒副作用,如将 GM-SCF 基因导入淋巴细胞,它表达产生 GM-SCF 能保护淋巴细胞免受化疗药物的攻击,同时可支持骨髓造血功能,产生造血细胞的耐药效应。

4 表达对蛋白酪氨酸激酶抑制的基因治疗

蛋白酪氨酸激酶是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质,它调节着细胞体内生化、分化、死亡等一系列生理生化过程。蛋白酪氨酸激酶功能失调会引起一系列疾病。已有的资料表明^[12],超过 50% 的原癌基因和癌基因产物都具有蛋白酪氨酸激酶活性,它们的异常表达将导致细胞增殖表达调节发生紊乱,进而导致肿瘤的发生。此外,蛋白酪氨酸激酶异常表达还与肿瘤的侵袭和转移,肿瘤新生血管的生成,肿瘤的化疗耐药性密切相关。因此可以通过对蛋白酪氨酸激酶的基因序列的研究,采用反义核苷酸技术并利用合适的载体将蛋白酪氨酸激酶的基因在人体内反义表达,从而得到对蛋白酪氨酸激酶抑制作用。此外,还可采用分子外科技技术,实施病变基因敲除和正常基因置换也是以后基因治疗肿瘤等疾病的研究方向。

5 RNA 干扰技术^[13]

RNA 干扰技术 (RNAi) 通过产生短序列 RNA 诱导的封闭复合物 (RISC), 使双链复合物伸展开, 进而促进反义 RNA 结合到靶 mRNA 上, 然后由 RISC 裂解目的 RNA, 从而有效地封闭目的基因的表达而又不引起干扰素反应。同时与反义核苷酸技术比较, 其识别 RNA 序列的特异性要好。目前, 有研究人员利用该项技术封闭一些与癌症有关的基因, 如 ras、bcr-ab、p53 等。

6 讨论

目前的基因治疗操作复杂, 成本高, 要先从病人中取得细胞, 目的基因插入, 基因修饰再植入体内等。这种程序依赖特殊的设施、人员, 如果要广泛开展必须设计出更为简单的基因转移方法。同时现用于基因治疗的载体大多为病毒, 这就存在一个安全性的问题, 重组病毒有可能存在因随机插入而引起的基因失活、重组、激活癌基因、生成野生型病毒等问题, 同时, 目的基因在体内受到核苷酸酶的攻击也是基因表达效率不高的主要原因之一, 设想可以通过在基因载体内加入可抑制相应基因的核苷酸酶的药物, 并且该药物对目的基因无相互作用, 而且不影响其表达, 这可能是解决基因表达效率不高的主要办法之一。此外还可以采用多次重复感染, 浓缩病毒液; 在体外转导时加用相应的促进病毒载体与靶细胞结合的药物等方法提高目的基因的转染率。对于肿瘤的基因治疗还存在转导靶向性的问题, 因为从理论上说, 只要有一个肿瘤细胞没被杀死, 即有肿瘤复发的可能, 所以肿瘤的基因需要很好的靶向性。目前解决此类问题的主要办法是寻找合适的靶向基因转移治疗体系或理想的靶向表达载体, 而且很可能大多数肿瘤是多重基因致病, 而郑世营等^[14]采用重组腺病毒载体将 FasL、B7-1 基因导入人胃癌细胞 SGC-7901, 研究发现 FasL 促进胃癌细胞凋亡, B7-1 促进抗胃癌 CTL 的增殖、活化, 在效应阶段两基因发挥着重要的协同作用, 这为联合基因治疗提供了实验依据。目前我国在肿瘤的基因治疗方面绝大多数处于基础性研究, 尚没有进入临床研究, 而美国已经有大约 30 项肿瘤基因治疗项目进入临床试验。

就肿瘤基因治疗而言, 还涉及到社会伦理和管理的问题, 进行肿瘤基因治疗必须遵守国家的各项关于基因治疗的法律法规。总之, 肿瘤基因治疗研究和应用的前景是美好的, 然而所面临的问题和困难也非常严重, 各种不同的肿瘤有不同的致病机制, 而且有些肿瘤更是多基因致病, 所以需要我们医药人员认真探索和研究, 才能使这项技术获得妥善的应用。

参考文献:

- [1] 杨栓平, 宋海峰, 宋三泰, 等. 靶向 HER-2 mRNA 反义寡核苷酸对 SK-BR-3 乳腺癌细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(5):505.
- [2] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. Science, 1998, 27(5349):349.
- [3] Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomerase and extended replicative life span[J]. Curr Biol, 1998, 8(5):279.
- [4] 王宏光, 陈训如. 反义寡核苷酸抑制肝癌细胞血管内皮生长因子的表达[J]. 西南国防医药, 2003, 13(5):479.
- [5] 来茂德主编. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:62.
- [6] 向娟娟, 朱诗围, 吕红斌, 等. 用氧化铁磁性纳米颗粒作为基因载体的研究[J]. 癌症, 2001, 20(10):1009.
- [7] Miller AD. Human gene therapy comes of age [J]. Nature, 1992, 357(6378):455.
- [8] 王 烈, 卫立辛, 王 喻, 等. 单纯疱疹病毒胸苷激酶和 B 细胞活化抗原联合基因行乳腺癌[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(6):528.
- [9] 王 凡, 黄 强, 周丽英. 超抗原 SEC 抗胶质瘤的研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(5):518.
- [10] 顾琴龙, 尹浩然, 林言箴. 肿瘤免疫基因治疗中的争论问题及发展前景[J]. 国外医学·肿瘤学分册, 1994, 3:152.
- [11] Ido M, Lagace L, Chafouleas JG. Increased sensitivity to Vinca alkaloids in cells overexpressing calmodulin by gene transfection [J]. Cancer Res, 1990, 50(20):6554.
- [12] 苏定冯, 缪朝玉, 王永铭主编. 2003 药理学进展[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:46.
- [13] 马秉亮. 一类新的治疗技术—RNA 干扰[J]. 药学进展, 2004, 28(2):9.
- [14] 郑世营, 赵 军, 葛锦锋, 等. FasL、B7-1 联合基因修饰的胃癌细胞诱导抗胃癌主动免疫的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(12):1106.

收稿日期:2005-03-18

欢迎订阅《药学实践杂志》