

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.06.018

外源基因治疗肿瘤研究进展*

孟圆[▲] 综述 马晓磊[△] 审校
(济宁医学院;济宁医学院基础医学院,济宁 272067)

摘要 肿瘤的发生和发展涉及单个或多个基因的改变。肿瘤的基因治疗已成为新的发展方向。外源基因治疗肿瘤的研究集中在以下 3 个方面:1)通过转入自杀基因引起肿瘤细胞表型的改变,从而引起药物对肿瘤细胞直接或间接杀伤作用;2)通过转入外源的小分子 RNA 干扰沉默肿瘤细胞中突变基因的表达;3)通过外源基因的引入增强药物化疗效果。本文就这 3 个方面的治疗机制及研究现状进行阐述。

关键词 肿瘤;基因治疗;自杀基因;RNA 干扰;信号通路

中图分类号:R730.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)12-457-05

The research status of exogenous gene treatment tumor mechanism

MENG Yuan, MA Xiaolei

(Jining Medical University; College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: The occurrence and development of tumor refer to single or multiple genetic changes. Gene therapy has become a new research direction. Exogenous gene therapy of tumor research focused on the following three aspects: suicide gene causing change in the phenotype of tumor cells, resulting in drug directly or killing tumor cells indirectly; small RNA interference and silence mutated gene expression in tumor cells; exogenous gene enhancing the effect of chemotherapy drugs. We will elaborate the mechanism and research status of these three aspects in the paper.

Keywords: Tumor; Tumor therapy; Suicide gene; RNA interference; Signal channel

基因治疗(gene therapy)是在 20 世纪 70 年代提出的一种针对遗传性疾病的治疗技术。它是利用外源基因定向地纠正或补偿有缺陷功能基因,从而恢复细胞正常功能,达到治愈疾病的目的。常用的策略包括基因修复、基因置换、基因增补、基因失活及自杀基因等。而肿瘤的发生涉及单个或多个基因的改变,往往与原癌基因、抑癌基因的突变累积有关。肿瘤的基因治疗可以通过修正与肿瘤发生发展的相关基因的表达,达到破坏肿瘤细胞的生长,促进细胞凋亡,防止相关基因突变后造成的肿瘤恶化转移。本文对自杀基因、小分子干扰 RNA 和增强药物化疗效果 3 个方面对肿瘤基因治疗的

研究现状进行综述。

1 自杀基因治疗

肿瘤自杀基因(suicide gene)是一类某些病毒或细菌的基因,该基因转入肿瘤细胞后的表达产物可将无毒的药物转变为细胞毒性物质,达到杀死肿瘤细胞的目的。自杀基因所产生的毒性物质不仅可对肿瘤细胞产生选择性的杀伤作用,同时还可产生旁观者效应,通过细胞间的桥传递到邻近细胞,对相邻细胞产生破坏作用,提高了对肿瘤细胞的杀伤能力。

目前的研究较多的自杀基因系统包括单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶/丙氧鸟苷系统(HSV-TK/GSV)、胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶系统(CD/5-FC)、带状疱疹病毒胸腺嘧啶激酶/阿糖甲氧基嘌呤系统、硝基还原酶/5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide[5-(1-氮丙啶)-2,4-二硝基苯甲酰胺]系

* [基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2013CL009);
济宁医学院科研计划项目(JY2015KJ015);
济宁医学院国家级大学生创新创业训练计划项目(201610443046)

△ [通信作者] 马晓磊, E-mail: xlma1981@163.com

▲ 孟圆, 济宁医学院 2014 级临床医学本科生

统(NTR/CB1954)、黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶/6-巯基黄嘌呤系统、嘌呤核苷磷酸化酶/6-甲基嘌呤脱氧核糖核苷酸系统等。其中研究较为深入的是 HSV-TK /GCV 自杀基因系统。该自杀基因系统杀伤肿瘤的作用机理是单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因 (HSV-TK) 转染肿瘤细胞后,其表达产物能够催化无毒前体药物丙氧鸟苷 (GCV) 发生磷酸化,成为有毒性的三磷酸核苷,通过抑制细胞中 DNA 聚合酶的活性阻止或者中断 DNA 链的合成,抑制肿瘤细胞的增殖,促进细胞死亡^[1]。在对不同的肿瘤进行自杀基因治疗时,研究进行了相应的改进,并在乳腺癌、肝癌和肺癌细胞中取得了良好

的实验效果,使用的改进自杀系统及相应的作用见表 1。目前,我国正在进行 III 期 TK 基因治疗产品的临床试验,已完成的实验发现,该自杀系统对肝癌、胶质瘤等肿瘤有明显的治疗效果^[2]。

自杀基因系统在杀伤肿瘤细胞上发挥着非常明显的作用。对自杀基因的作用机制研究发现,自杀基因往往是下面 3 种作用达到杀伤肿瘤细胞的目的:1)抑制肿瘤细胞中的 DNA 合成酶、胸腺嘧啶核苷酸合成酶和二氢叶酸还原酶;2)掺入到新合成的 DNA 产生毒性;3)破坏肿瘤细胞的细胞膜。见表 2。

表 1 常用的改进肿瘤自杀基因系统

自杀基因系统	主要适用病种	主要作用	参考文献
超声辐照微粒介导 CD/TK 双自杀基因系统 (Ad-KDRP-CD/TK)	乳腺癌	抑制肿瘤生长和肿瘤微血管的生成	[3]
B7-2 基因联合 Ad CD/5 FC 自杀基因系统	乳腺癌	B7-2 增强和诱导的特异抗肿瘤免疫,减少肿瘤负荷,增强 Ad CD/5 FC 系统对肿瘤的杀伤作用	[4]
Survivin 启动子介导的 CD/5-FC 自杀系统	肝癌	促进肿瘤细胞凋亡	[5]
Survivin 启动子控制自杀基因 HSV-TK 系统	肝癌	特异靶向杀伤人肝癌细胞	[6]
KDR 启动子驱动 CD/TK 双自杀基因系统 (Ad-KDRP-CD/TK)		高度靶向杀伤肝癌 HepG2 细胞	[7]
放疗联合 TK/GCV 自杀基因	肺癌	促进肿瘤细胞凋亡	[8]

表 2 常用的自杀基因系统的作用机制

酶	药物前体	药物	作用机制
单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶 (HSV-TK)	GCV	GCV-3P	抑制 DNA 聚合酶,阻断 NDA 合成
带状疱疹病毒胸腺嘧啶激酶 (VZV-tk) ^[9]	araM	araATP	抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶
胞嘧啶脱氨酶 ^[10]	5-FU	5-FU	催化产生抗肿瘤的 5-氟尿嘧啶
嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP)	6-甲基嘌呤-2-脱氧核苷	6-甲基嘌呤	掺入 DNA 分子中产生细胞毒性
E. coli 硝基还原酶	5-(1-氮丙啶)-2,4-二硝基苯甲酰胺 (CB1954)	5-(1-氮丙啶)-4-羟氨基-2-硝基苯甲酰胺	引起 DNA 发生链内交联、断裂
羧肽酶 A	氨甲叶酸 (MTX)-肽	MTX	抑制二氢叶酸还原酶
羧肽酶 G2	N, N-[(2-chloroethyl) (2-mesyloxyethyl)-amino] benzoyl-L-glutamic acid (CMDA)	N, N-[(2-chloroethyl) (2-mesyloxyethyl) amino] ben-zoic acid (CMBA)	掺入 DNA 分子中产生细胞毒性
辣根过氧化物酶 ^[11]	辣根吲哚 3-乙酸 (IAA) 及衍生物,对乙酰氨基酚	自由基	破坏细胞膜

尽管自杀基因是具有良好应用前景的一种肿瘤治疗方法,但目前的研究还在探索阶段,要想使自杀基因疗法成为临床上安全有效的肿瘤治疗手段,还需要解决很多问题,如载体的安全性和有效性、自杀基因的转染效率、精准的基因靶向,自杀基

因表达后的有效调控、长效性以及安全性等,这些有待于我们在今后的研究中加以改进。随着自杀基因的研究的不断深入,如何提高肿瘤组织特异性调控元件 - 启动子或增强子能驱动自杀基因表达于特定靶细胞,产生特异性杀伤已经成为自杀基因

系统靶向调控研究的重点和难点。

2 小分子干扰 RNA 治疗

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种通过小分子的干扰 RNA 抑制沉默细胞内特定基因表达的一项技术。该技术通过设计特定基因的小干扰 RNA, 通过一定的策略将该小 RNA 输入细胞内, 与靶 mRNA 发生特异性结合, 随后降解与小干扰 RNA 结合的 mRNA 部分同源序列, 使 mRNA 失去翻译的模板功能, 实现干扰和沉默靶基因的作用。在肿瘤基因治疗领域, 通过获得与肿瘤发生发展相关的基因序列, 即可设计特异的 siRNA 去沉默肿瘤的相关基因, 从基因水平上阻止肿瘤发生和发展。该项技术可用于调节肿瘤细胞的增殖及凋亡, 特异地抑制肿瘤细胞的靶基因增殖^[12]。

近年的研究发现, 受体酪氨酸蛋白激酶基因 (Eph A7) 在肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移过程中起促进作用^[13]。而 MED19 基因更是与已发现的多种肿瘤有关^[14]。针对两个靶基因设计的小分子干扰 RNA 可同时在肿瘤细胞中沉默靶基因, 对抑制肿瘤细胞的增殖、浸润、转移和促进凋亡方面的实验显示效果明显。见表 3。

表 3 RNAi 在肿瘤研究中的应用

Si-RNA	可抑制基因	适用肿瘤细胞
Livin-SiRNA	Livin	乳腺癌细胞 MCF-7
shRNA	DLL4	乳腺癌细胞 MCF-7
Let-7a	c-myc	乳腺癌细胞 MCF-7
Cdc42-SiRNA	Cdc42	乳腺癌细胞 MCF-7
VEGF-SiRNA	VEGF	舌癌细胞 Tca8113
VEGF-SiRNA	VEGF	胰腺腺癌 PANC21
VEGF-SiRNA	VEGF	肾癌细胞 786-0
Hsp70-SiRNA	Hsp70	胃癌细胞 SGC-7901
Hsp70-SiRNA	Hsp70	宫颈癌细胞 Hela

虽然小分子干扰 RNA 能有效地沉默肿瘤基因, 但实际操作中仍存在许多问题, 比如 siRNA 转入途径的安全性和转入效率, siRNA 对目标基因的靶向性转移, siRNA 转入后的稳定性, 是否能完全沉默高度表达的基因等。另外, 体内肿瘤细胞免疫逃逸的机制多而复杂, 能否在体内抗肿瘤免疫治疗得到预期效果还需更进一步的研究。尽管如此, RNA 干扰的高效特异性还是明显优于反义核酸技

术。该技术将是肿瘤基因治疗领域不可比拟的一项新技术, 如能将 RNA 干扰技术用于临床, 这将为肿瘤的基因治疗提供更多的选择。

3 增强药物化疗效果

3.1 导入药物增敏基因

药物增敏基因可增加细胞对抗肿瘤药物的敏感性, 明显提高化疗效果, 可实现药物作用的最大化, 增强肿瘤治疗效果。研究发现, 腺病毒介导的野生型 PTEN 基因转染联合表阿霉素使乳腺癌细胞 MCF-7 增加对表阿霉素的敏感度。内质网腔中的重链免疫球蛋白 GRP78 Bip (glucose-regulated protein78/binding immunoglobulin protein), 可增强口腔鳞癌细胞对奥沙利铂的敏感性。熊果酸在缺氧状态下抑制 HIF-1 α 的积累和 MDR1 的基因和蛋白表达, 并抑制新生血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 同时对结肠癌细胞的 5-FU 和奥沙利铂化疗有增敏作用^[15]。神经酰胺 (Ceramide, CE) 能介导组织细胞的生长、分化、凋亡等生理活动, 同时也能提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性且不增加药物毒副作用, 具有良好的联合抗肿瘤应用潜力^[16]。

3.2 针对耐药基因的治疗

抗癌药物的使用使得肿瘤细胞产生其耐药, 同时也会对与抗癌药物结构和作用机制相同的药物产生耐药。耐药性及大剂量化疗的骨髓抑制是化疗失败的原因。若能将耐药基因导入骨髓细胞使之获得耐药表型, 可大大增加骨髓对化疗药物的耐受性。传统方式治疗乳腺癌失败的重要原因之一是多种耐药 (multidrug resistance, MDR) 现象的出现。

在基因层面上研究发现, 耐药相关的基因有多药耐药基因 1 (multidrug resistance 1, MDR1)、多药耐药相关蛋白基因 (multidrug resistance associated protein, MRP) 和谷胱甘肽 S 转移酶基因 (glutathione S-transferase, GST- π) 等。细胞膜中 MDR1/P 糖蛋白的过度表达是引起 MDR 的主要机制之一, 而新型 COX-2 抑制剂塞来昔布 (celecoxib) 能够抑制 MDR1/P 糖蛋白表达, 联合化疗药物即可增加化疗药物的治疗效果。而突变型 p53 基因 (Ad-p53) 能够逆转乳腺癌细胞 MCF-7/MDR 多药耐药性, 抑制 MDR1/P 糖蛋白和 GST- π 的表达, MDR1 基因转入造血祖细胞可增加对多种相关化疗药物

的耐药性,为造血祖细胞耐受化疗提供保护作用^[17]。

3.3 抑制血管生成

肿瘤的发生与发展与肿瘤血管的形成有关。肿瘤细胞既可通过肿瘤血管从宿主获取生长必需的营养和氧气,又可通过肿瘤血管向宿主转移的细胞,形成肿瘤转移。肿瘤细胞的增殖与凋亡处于相对平衡,当肿瘤具有诱导血管新生能力时,增殖远远大于凋亡,细胞生长迅速^[18]。血管内皮抑制素(endostatin, ES)可阻断血管内皮生长因子传导通路,主要作用于 3 个位点:1)阻断 VEGF 受体 KDR/Flk-1 的酪氨酸磷酸化;2)阻断有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的激活;3)阻断细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulation protein kinase, ERK)激活。见图 1。

3.4 阻断细胞信号通路

肿瘤的发生与增殖抑制均是通过细胞信号传导实现的,因此,理清楚肿瘤发生的信号通路就能够有效研制抗肿瘤药物。在肿瘤细胞生命活动中,往往是多种信号通路相互联系,相互影响,通过多种不同的途径参与肿瘤细胞增殖、分化、免疫逃逸及凋亡的调节,如:ERK 信号传导通路^[19]、NF-KB

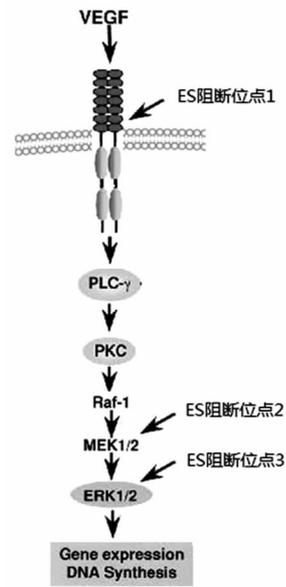


图 1 ES 阻断 VEGF 信号通路

信号传导通路^[20]、PD-1/PD-L 信号传导通路^[21]、TGF-β 信号传导通路^[22]、SATA3 信号传导通路^[23]等。运用相应的阻断剂控制信号通过中各种蛋白或酶对应基因的表达,就有望控制肿瘤细胞的增殖和凋亡。目前已有的研究证实信号通路与肿瘤的发生和发展机制有关。见表 4。

表 4 肿瘤相关的细胞信号通路及其作用物

信号通路	主要功能	作用物	主要适用病种
ERK	参与肿瘤细胞的生理病理过程	达沙替尼、去甲斑蝥素等	黑色素瘤、乳腺癌细胞
NF-KB	核蛋白调节因子,调节细胞增殖与凋亡		
PD-1/PD-L	负性调节因子,调节免疫反应	PD-1/PD-L 抗体	
TGF-β	细胞因子,抑制免疫细胞的免疫作用		
STAT3	调节细胞增殖、分化与凋亡		乳腺癌细胞

4 小结与展望

分子生物学技术的迅速发展必将为肿瘤的基因治疗提供更多的研究思路和研究方法。但是在取得成就的同时必须清楚地认识到从实验研究到临床应用还需要解决很多关键性的问题,如导致肿瘤发生的基因有多少,如何获得肿瘤发生相关基因的全部信息,外源基因转入之后的稳定性问题,是否有潜在的危险,目的基因的表达部位,能够有效地靶向攻击致病基因等。这些研究者都是从基础研究走向临床应用的必须克服的问题。应用外源

基因治疗肿瘤的研究目前多处于细胞或者动物的阶段,还需更多的研究去解决存在的问题,因此无法在短时间内取代传统的常规治疗方法。但是随着科技的发展,基因治疗肿瘤一定会取得更大的成就,能够从根本上彻底解决肿瘤。

参考文献:

[1] Wirth T, Parker N, Yl-Herttuala S. History of gene therapy[J]. Gene, 2013, 525 (2): 162-169. DOI: 10. 1016/j. gene. 2013. 03. 137.

[2] Ji N, Weng D, Liu C, et al. Adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase administration

- improves outcome of recurrent high-grade glioma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (4): 4369-4378. DOI: 10. 18632/oncotarget. 6737.
- [3] 钱滢,周平,田双明,等. 超声辐照微泡介导双自杀基因转染对乳腺癌杀伤作用的在体研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23 (11): 1487-1493. DOI: 10. 7659/j. issn. 1005-6947. 2014. 11. 007.
- [4] 贾琴,张玉英,吴爽,等. B7-2 基因联合自杀基因治疗乳腺癌移植瘤模型[J]. *解剖学研究*, 2017, 39 (1): 30-34.
- [5] 邵红伟,陈辉,李家明,等. Survivin 启动子介导的胞嘧啶脱氨酶(CD)自杀基因的抗肿瘤研究[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31 (3): 378-382, 392. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-8783. 2015. 03. 021.
- [6] 李勇芳,张英敏,赵娜,等. Survivin 启动子控制自杀基因 HSV-TK 真核表达载体对肝癌细胞杀伤活性的研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10 (2): 229-233. DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 1674-0785. 2016. 02. 017.
- [7] 谷洋,刘志毅,金虎,等. pAdKDR/CD/TK 双自杀基因系统对肝癌细胞的杀伤作用的试验研究[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21 (1): 132-135. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-4287. 2017. 01. 053.
- [8] Sarotra P, Medhi B. Use of bacteria in cancer therapy [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2016, 209: 111-121. DOI: 10. 1007/978-3-319-42934-2_8.
- [9] Pahle J, Walther W. Bacterial toxins for oncolytic suicidal cancer gene therapy [J]. *Recent Results in Cancer Research*, 2016: 95-110. DOI: 10. 1007/978-3-319-42934-2_7.
- [10] Altanerova V, Cihova M, Babic M, et al. Human adipose tissue - derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosine deaminase - uracil phosphoribosyl transferase inhibit intracerebral rat glioma - blastoma [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130 (10): 2455 - 2463. DOI: 10. 1002/ijc. 26278.
- [11] Dai M, Liu J, Chen DE, et al. Tumor-targeted gene therapy using Adv-AFP-HRPC/IAA prodrug system suppresses growth of hepatoma xenografted in mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19 (2): 77-83. DOI: 10. 1038/cgt. 2011. 65.
- [12] Sand M, Skrygan M, Georgas D, et al. Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1 and TARBP2 in epithelial skin cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 1 (11): 916-922. DOI: 10. 1002/mc. 20861.
- [13] Glendinning KA, Liu SC, Nguyen M, et al. Downstream mediators of Ten-m3 signalling in the developing visual pathway [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18 (1): 78. DOI: 10. 1186/s12868-017-0397-5.
- [14] Zhang X, Fan Y, Liu B, et al. Med19 promotes breast cancer cell proliferation by regulating CBFA2T3/HEB expression [J]. *Breast Cancer*, 2017, 24 (3): 433-441. DOI: 10. 1007/s12282-016-0722-3.
- [15] Shan JZ, Xuan YY, ZHANG Q, et al. Ursolic acid sensitized colon cancer cells to chemotherapy under hypoxia by inhibiting MDR1 through HIF-1 α [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2016, 17 (09): 672-682.
- [16] Che J, Huang Y, Xu C, et al. Increased ceramide production sensitizes breast cancer cell response to chemotherapy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79 (5): 933-941. DOI: 10. 1007/s00280-017-3292-y.
- [17] Marquette C, Nabell L. Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2012, 13 (2): 263-275. DOI: 10. 1007/s11864-012-0184-6.
- [18] Martinez A, López G, Bola Nos C, et al. Building a personalized cancer treatment system [J]. *J Med Syst*, 2017, 41 (2): 28. DOI: 10. 1007/s10916-016-0678-z.
- [19] Dholaria B, Hammond W, Shreders A, et al. Emerging therapeutic agents for lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9 (1): 138. DOI: 10. 1186/s13045-016-0365-z.
- [20] Li N, Song Y, Zhao W, et al. Small interfering RNA targeting NF- κ B attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *BMC Physiol*, 2016, 16 (1): 7. DOI: 10. 1186/s12899-016-0027-y.
- [21] Tan S, Chen D, Liu K, et al. Crystal clear: visualizing the intervention mechanism of the PD-1/PD-L1 interaction by two cancer therapeutic monoclonal antibodies [J]. *Protein Cell*, 2016, 7 (12): 866-877. DOI: 10. 1007/s13238-016-0337-7.
- [22] Liu Q, Zhang H, Jiang X, et al. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1): 176. DOI: 10. 1186/s12943-017-0742-4.
- [23] Zhong S, Han W, Hou C, et al. Relation of transcriptional factors to the expression and activity of cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferases 1A in human liver: Co-expression network analysis [J]. *AAPS J*, 2017, 19 (1): 203-214. DOI: 10. 1208/s12248-016-9990-2.

(收稿日期 2017-11-19)

(本文编辑:石俊强)