

- with acute ischemic stroke[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412 (5-6): 476-479.
- [3] Tsui DW, Chiu RW, Lo YD. Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma[J]. Chimerism, 2010, 1(1): 30-35.
- [4] Gormally E, Caboux E, Vineis P, et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance [J]. Mutat Res, 2007, 635(2-3): 105-117.
- [5] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.
- [6] Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, et al. Cell free circulating DNA: Diagnostic value in patients with renal cell cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 2785-2789.
- [7] Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6 (2): 286-290.
- [8] 傅士龙, 屠红, 张国玲, 等. 卵巢上皮性癌患者循环 DNA 的定量研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21 (11): 659-662.
- [9] 高玉洁, 杨再林, 钟晓明, 等. 白血病患者循环 DNA 定量和完整性分析及其临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(1): 24-27.
- [10] Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: Diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer[J]. J Urol, 2009, 181(1): 363-371.
- [11] Schmidt B, Weickmann S, Witt C, et al. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and non malignant lung disease [J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1137: 207-213.
- [12] Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients[J]. Int J Cancer, 2003, 105(3): 361-370.
- [13] Wang S, An T, Wang J, et al. Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(4): 1324-1330.
- [14] Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, et al. Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(4): 365-373.
- [15] Wang Z, Chen Z, Gao Y, et al. DNA hypermethylation of micro RNA - 34b/c has prognostic value for stage I non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(5): 490-496.
- [16] Liggett T, Melnikov A, Yi QL, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis[J]. Cancer, 2010, 116(7): 1674-1680.
- [17] Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia[J]. Blood, 1997, 90(12): 4953-4960.
- [18] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2): 142-165.

(收稿日期: 2010-12-04)

肿瘤基因治疗的研究进展

王 浩 综述, 张 铀 审校(昆明医学院第二附属医院血液科 650101)

【关键词】 肿瘤基因; 基因治疗; 遗传物质

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 09. 052 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)09-1112-05

基因治疗是以改变遗传物质为基础的 DNA 重组技术, 需要将目的基因传递到细胞内, 这一过程必须要有载体的协助才能达到目的, 因此载体在基因的转移中担任重要角色。随着免疫学的发展和基因技术, 研究的不断加深, 结合病毒载体、免疫基因和转基因等方法在肿瘤的基因治疗中取得了许多成就, 为肿瘤的治疗展现了广阔的应用前景。

1 基因沉默疗法

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在生物体细胞内, 与靶基因同源的外源性或内源性双链 RNA(dsRNA)诱导转录后引起特异性基因沉默(PTGS)。Shin 等^[1]和 Pang 等^[2]利用 RNAi 技术先后在胃癌、大肠癌和肝细胞癌治疗的实验研究中取得了明显的效果。国内也有许多 RNAi 研究的相关报道^[3]。

RNAi 发生机制的大致模型。(1)小干扰 RNA(siRNA)的形成阶段: 此阶段需要 Rde-1、Rde-4 和 dsRNA 特异性的核酸内切酶 Dicer 等共同参与。Rde-1, 4 编码的蛋白识别外源 dsRNA, 引导 dsRNA 与 Dicer 结合, 然后 Dicer 将 dsRNA 解旋, 再将其裂解为 21~25 nt 大小的 siRNA。Dicer 定位于胞浆中, 但核内 mRNA 剪切修饰后在向核外运输过程中也存在 RNAi 现象, 可能有其他类似功能的酶发挥作用。现认为 21~25 nt 大小并在 3' 端带有 2~3 个碱基悬端且 5' 端磷酸化的 siRNA 诱导的 RNAi 效应最强。Dicer 家族在进化上非常保守, 有 5 个组成部分: N-端 RNA 解旋酶结构域、1 个 PAZ 结构域(PAZ)、2 个 RNaseIII 结构域和 C 端 dsRNA 结合基序。Dicer 在体内一般是以二聚体的形式发挥作用的, 由于不同种族 Dicer 分子大小不一样, 所以 dsRNA 被切割成的 siRNA 大小具有

种族差异^[4]。(2) RNA 诱导的沉默复合物(RISC)形成阶段:生成的 siRNA 和 RNAi 特异性酶(如 AGO-2、MUT-7、RED-1、PAZ 蛋白和 DNA-RNA 螺旋酶)结合形成 RISC,具有序列特异性核酸内切酶、核酸外切酶和解旋酶活性,能特异地降解与 siRNA 同源的靶 mRNA。(3)效应阶段:siRNA 引导 RISC 与同源性的 mRNA 结合,在三磷酸腺苷及解旋酶(如 qde-3、mut-6、mut-14)的作用下使 siRNA 链解离^[5],并使 RISC 由 250×10^3 大小的前体形式变成约 100×10^3 左右活性形式,同时解旋酶催化同源 mRNA 与 siRNA 的正义链相互交换,核酸酶在 mRNA 与反义 RNA 所形成的双链区的 5' 起始端下游 7~10 个核苷酸处切断 mRNA,起到特异抑制基因表达的效果。(4)扩增阶段:该反应以 siRNA 中的一条链为引物,以靶 mRNA 为模板,在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)作用下,扩增靶 mRNA,产生新的二级 siRNA,而这些 siRNA 又能继续反作用于靶 mRNA。RdRP 不仅能增加 siRNA 的拷贝数,而且能将异常的单链 RNA 转变成 dsRNA。RdRP 还是一个重要的“传感器”,它能识别正常和异常的 RNA。转基因 RNA 和病毒 RNA 都是在 RdRP 的识别下启动 RNAi 的反应过程^[6]。此外, RNAi 的扩增效应还可能存在另外两种机制:(1) Dicer 将长 dsRNA 切成初级 siRNA,这一放大水平取决于 dsRNA 的长度;(2) siRNA 在酶的作用下可以多次应用,产生进一步的放大效应。

大多数学者认为, RNAi 具有以下 4 个重要特征。(1) 高度特异性: siRNA 只降解与其同源的靶向 mRNA,并不影响其他基因 mRNA 表达。(2) 高效性: 细胞仅需几个分子的 siRNA 即可产生明显的 RNAi 效应^[1],这得益于作用过程中的放大效应。(3) 可传播性和遗传性: RNAi 的效应不仅局限于单个细胞内,还可在细胞之间相互传递和维持效应,甚至可传递给子一代。Van 和 Brand^[7] 研究发现, sid-1 基因编码一种具有 11 次跨膜蛋白可能与此现象有关。(4) 种属时效性: Irie 等^[8] 发现,在低等生物中 RNAi 可持续存在,但 RNAi 在哺乳动物细胞中只能维持一段时间,一般注入 dsRNA 后的 2~3 d RNAi 的作用最明显,尔后 1~2 d 内,靶 mRNA 的丰度就能恢复到注射 RNAi 之前的水平。

2 自杀基因疗法

自杀基因疗法也称前药转换酶基因疗法,是将能编码某些药物敏感酶的基因转入肿瘤细胞,肿瘤细胞产生的这些酶将低毒或无毒的药物前体转化为细胞毒性产物,以达到杀死肿瘤细胞的目的。其作用是:促进免疫效应细胞的分化增殖、加强对肿瘤的杀伤力;直接杀伤癌细胞;增加肿瘤细胞的免疫原性。因这些基因多是由病毒载体转移入靶细胞,故该方法又称为病毒导向的酶解药物前体疗法。

自杀基因治疗系统的种类很多,主要包括单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶/丙氧鸟苷(HSV1-tk/GCV)系统、带状疱疹病毒胸腺嘧啶激酶/阿糖甲氧基嘌呤(VZV-tk/Ara-M)系统、胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-FU)系统和硝基还原酶/CB1954(NTR/CB1954)系统等^[9]。HSV-tk/GCV 系统将无毒的药物前体 GCV 磷酸化,转变为毒性药物丙氧鸟苷三磷酸。CD/5-FU 系统能将无毒的 5-FU 脱氨酶转变为 5-FU,5-FU 再转化为 5-FUTP 或 5-FdUMP,发挥细胞毒性作用,从而杀伤转染基因的肿瘤细胞,而且基因表达的细胞对邻近未转染的细胞有较强的旁路细胞毒效应(旁观者杀伤效应)。目前研究较多的是 HSV-tk/GCV 系统,研究者正在致力于提高自杀基因疗法的

效率。Okada 等^[10] 发现,将表达逆转录包蛋白的复合载体与腺病毒载体 AVC2、GCEGFP(二者均为腺病毒载体)共同转导可以提高转导的效率,提高了体外细胞对更昔洛韦前药的敏感性,而对种植于裸鼠的肿瘤抑制率也达到了 50%。Moriuchi 等^[11] 在 HSV-tk/GCV 系统中利用同时表达 HSV-tk 和核转录因子抑制剂 IkB 突变形态的 TOIkappaB(一种人工合成的复制缺陷载体),在 GCV 存在下 TOIkappaB 组细胞杀伤率达到 90%~100%,且细胞毒性极低,TOIkappaB+GCV 组裸鼠也比对照组存活率高。

在自杀基因的探索中,不少研究者发现,少量的自杀基因转染的癌细胞与未转染的癌细胞按一定的比例混合后培养,不仅转染的癌细胞被杀灭,二者相互接触后相邻的未转染的癌细胞也大量死亡,此即“旁观者效应”。治疗中“旁观者效应”是一重要特征,即有毒代谢物通过缝隙连接或凋亡小体从转染细胞移动到邻近细胞,对其产生杀伤作用,大大提高了自杀基因的杀伤效应。Ammerpohl 等^[12] 在用 HSV-tk 基因治疗脑胶质瘤时发现,作为增强瘤细胞间隙链接的 4-丁酸苯酯和更昔洛韦合用时显著增加了旁观者效应。

3 免疫基因疗法

免疫基因治疗是通过基因重组技术,将抗癌免疫增强细胞因子或 mhc 基因导入肿瘤组织,增强机体的抗肿瘤免疫功能,达到治疗肿瘤的目的,主要包括增强免疫效应细胞功能的细胞因子基因疗法、调节增强抗原识别能力的主要组织相容性复合物的基因疗法和共刺激分子基因疗法等。细胞因子基因疗法是将细胞因子导入人体细胞,提供一个合适的微环境,以有利于提高机体的抗肿瘤免疫应答。目前应用的细胞因子主要包括白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-18、 γ -干扰素(INF- γ)、INF- α 、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等,其中一些已进入临床实验,并取得良好效果。如 Trudel 等^[13] 用腺病毒介导的 IL-2 治疗前列腺癌,Tani^[14] 将 GM-CSF 转入自身癌细胞以治疗肾癌,以及 IL-12 应用于黑色素瘤及消化系统肿瘤的治疗^[15-16]。在肿瘤免疫治疗中,免疫活性细胞的免疫监督和杀伤活性起着重要作用。细胞毒淋巴细胞对肿瘤细胞低反应性的一个主要原因是肿瘤细胞表面共刺激分子 B-7 家族的低表达,导致 CD28 和 CD152 以及 B-7 之间的相互作用减弱。细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)是免疫系统的主要效应细胞,其介导的细胞毒作用需要识别细胞表面的 T 细胞抗原受体和主要组织相容性复合体分子。相反,Fas-FasL 介导的细胞毒作用无特异性。因为肿瘤表面通常表达 Fas,所以 FasL 和 CTL 是抗肿瘤的两大武器。Zhang 等^[17] 构建了包含有 B7-1 和 FasL 基因的重组腺病毒载体,感染人胃癌细胞株 SGC-7901,将 FasL+/B7-1+SGC-7901 注射到小鼠体内,结果成瘤性明显下降,受 SGC-7901/FB-11 诱导的 CTL 对 SGC-7901 的细胞毒作用明显增强。

树突状细胞(DC)是体内功能最强的专职抗原递呈细胞(APC),也是惟一能诱导初次免疫应答的 APC。在肿瘤的发生和发展中,肿瘤细胞通过抑制 APC,特别是 DC 的抗原递呈作用来逃避宿主对其进行的免疫攻击。DC 来源的肿瘤疫苗将是具有巨大潜力的肿瘤免疫治疗手段。关心等^[18] 用荧光染料绿色荧光(PKH67-GL)和红色荧光(PKH26-GI)分别标记 DC 和肝癌细胞系人类白细胞抗原分子细胞,成功构建了便于识别和筛选的人源 DC 与肝细胞的融合 DC 疫苗,并有效诱导产生特异性 T 淋巴细胞免疫杀伤肝癌细胞。Danielczyk 等^[19]

研制了一种抗黏蛋白 1(MUC1)糖链单克隆抗体,该抗体具有高肿瘤特异性、高亲和性以及多结合位点等许多优点,更重要的是它能引起强烈的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用活动和细胞毒素介导的杀伤作用。

MUC1 是由 MUC1 基因编码的一种高糖基化、高相对分子质量蛋白,它对正常的上皮起润滑和保护作用,同时还介导信号转导和细胞黏附功能,免疫活化和抑制作用等^[20]。在肿瘤组织中,MUC1 常出现异常表达,非极性分布,且由于糖基转移酶活性增高而导致的糖基化不完全,使正常情况下隐蔽的表位暴露出来,成为肿瘤生物学治疗的靶点。杨红等^[21]的研究证实了 MUC1 在血液系统恶性肿瘤,特别是多发性骨髓瘤、急性髓细胞白血病、淋巴瘤中呈高表达,也证实 MUC1 两串联重复区基因疫苗可诱导小鼠产生特异性细胞及体液免疫应答^[22]。

4 基因替代疗法

抑癌基因亦称抗癌基因,是指正常细胞内存在的能抑制细胞转化和肿瘤发生的一类基因群。基因替代治疗就是利用载体体内导入野生型抑癌基因,替代缺失或异常的抑癌基因表达,逆转肿瘤细胞的表型、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡,以达到治疗的目的。目前已分离克隆出 20 余种抑癌基因,p53 基因是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,肿瘤生成会伴随 p53 的缺失。Senatus 等^[23]发现一种 p53 羧基末端肽,可重新恢复 p53 的瘤细胞吞噬作用,而对其他的良性肿瘤及人外周骨髓瘤细胞作用较小,所以可作为新的抗癌因子。Baker 等首先观察到 p53 导入肿瘤细胞后,肿瘤细胞出现了明显的凋亡。相对于常规的 p53 基因治疗,Ito 等^[24]研究的 p53 促进细胞吞噬的调节基因,在转导 p53 腺病毒载体后,促进突变 p53 基因对脑胶质瘤细胞的吞噬作用,并不诱导野生 p53 基因对脑胶质瘤细胞凋亡的耐受性。有研究发现,人乳头瘤病毒癌基因与 p53 结合可促进 p53 的分解,从而影响其治疗的效果,因此他们采用不受 HPV 作用的 p53 同源体 p73 来治疗宫颈癌,结果发现治疗后 p73 β 的水平及 p21 基因均上升数倍,而且使细胞周期 G1 期受到阻遏,还诱发肿瘤细胞的凋亡^[25]。

p27 基因是一种抑癌基因,调控细胞周期并抑制细胞分裂,其编码的 P27 蛋白为细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子(CDKI)。Zhu 等^[26]将重组腺病毒介导的 p27 转染人胃癌细胞株 MNK-45,18 h 后观察到 G1~S 期前一亚二倍体凋亡峰,DNA 电泳发现特征性的凋亡带,原位缺口末端标记技术检测发现实验组的凋亡率明显高于对照组,证实了 p27 在体内和体外的诱导凋亡作用。

目前研究的抑癌基因还有 Fhit 及第 10 号染色体丢失的张力蛋白同源的磷酸酯酶等,但真正应用到临床,还需要大量的研究。

5 反义基因疗法

反义基因疗法就是通过人工合成的寡核苷酸与癌基因编码的 mRNA 互补结合,可以抑制 mRNA 的转录,达到封闭癌基因的目的。目前的治疗方案主要采用反义细胞癌基因 myc、neu、k-ras 等^[27]。根据碱基互补原则,用人工合成或生物体表达的特定 DNA 或 RNA 片断(反义核酸),抑制或封闭靶基因的技术。Survivin 是一种凋亡抑制基因,它在正常组织中不表达,但在胚胎发育组织和多数人类肿瘤组织中均有程度不同的表达。Tong 等^[28]在体外通过随机寡核苷酸库联合特定软件分析,选择合适的 Survivin 反义位点(AAS),并转染入胃

癌细胞株 MNK-45,实验组 Survivin RNA 和蛋白水平明显下降,部分肿瘤细胞呈现凋亡的特征性改变。并且这种作用与 AAS 的位置有关系,提示反义 Survivin 能够诱导凋亡,抑制肿瘤细胞生长。

分化抑制因子(Id)又称 DNA 结合抑制因子,属于螺旋-环-螺旋转录因子家族成员之一,与肿瘤的发生、侵袭及肿瘤血管生成等方面密切相关。Id 蛋白可成为肿瘤靶向治疗的一个新靶点。目前用于反义治疗的基因还有 B 细胞淋巴瘤、cerb-b2 基因和增殖细胞核抗原等。

6 多药耐药相关的基因疗法

多药耐药(MDR)是指在化疗药物治疗肿瘤中发现的肿瘤细胞的非特异普遍耐药性。导致肿瘤细胞 MDR 的一个重要原因是其 MDR1 基因扩增和过度表达。MDR 基因编码 P2 糖蛋白的跨膜蛋白,它有肿瘤药物位点和三磷酸腺苷位点 2 个结合位点,通过 ATP 供能可将细胞内药物泵出从而保护正常细胞免受药物损害,使细胞对化疗药物产生耐受。MDR 相关的基因治疗一般集中在抑制肿瘤细胞的 MDR1 基因表达,从而增加常规化疗的效果。郭华等^[29]以 MDR1 基因 mRNA 为靶点设计合成 2 个反义肽核酸(PNA)序列,利用 PNA-DNA 杂交,阳离子脂质体介导转染神经母细胞瘤耐药细胞株 SK-N-SH。检测显示,SK-N-SH 细胞 P-糖蛋白(P-gP)表达明显降低,MDR1mRNA 表达轻度下降,细胞内多柔比星聚集浓度明显增加,PNA 在人类多药耐药基因(mdr1)基因抑制中的特殊作用为逆转肿瘤的 MDR 提供了新的途径。

缺氧诱导因子-1(HIF-1)对于肿瘤 MDR 形成有多方面的作用,以 HIF-1 为靶点的肿瘤治疗为克服肿瘤放、化疗抵抗提供了新思路。马超等^[30]构建靶向 HIF-1 α 的短发夹状干扰基因(pSilencer-HIF)并转染到人乳腺癌耐 ADM 细胞株 MCF-7/ADR 中,细胞中 HIF-1 α 、MDR-1mRNA 水平明显降低,P-gP 的表达亦降低,细胞存活率由 76%下降到 43%,Rh123 荧光强度由 22.0%升为 86.6%,提示 pSilencer-HIF 有逆转 MDR 的作用。

7 抗肿瘤新生血管形成疗法

实体瘤的生长有赖于获得足够的血供以提供营养物质和氧气。抗血管生成基因治疗通过基因导入并表达的手段,在体内长期维持一定水平的血管生成抑制因子,抑制肿瘤血管的生成,从而达到抑制肿瘤增殖、复发和转移。血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子是促进新生血管生成的主要生长因子,以 VEGF 作用最强。与其他基因治疗相比,该疗法无需直接转染肿瘤靶基因,只需转染肿瘤 4 周,创造抑制血管生成的环境。在小鼠血管内给予针对 VEGF 受体的 siRNA 时发现,VEGF 受体表达减少,肿瘤的生长速度和血管生成明显减少。

8 抗端粒酶疗法

端粒是位于染色体末端的复合结构,调控细胞的有丝分裂,随着细胞分裂将逐步缩短,最后导致细胞凋亡。所以端粒的持续存在是肿瘤细胞增殖的基础。端粒酶是一种逆转录酶,能够以自身 RNA 为模板合成端粒的末端重复序列 5'-TTAG-3,以补偿端粒片段的缺失,在正常组织中通常处于抑制状态,但在恶性肿瘤和永生化的细胞中常处于激活状态。人端粒酶逆转录酶(hTERT)是端粒酶的活性限速成分。迄今已发现 6 种类型的核酶,其中锤头状核酶由于结构简单,设计方便,成为基因治疗的首选。何霞等^[31]将端粒酶特异性核酶表达载体 pCIneo-hTR-RZ 和 pCIneo-hTERT-RZ 分别转染 A549 肺癌细

胞,证实了核酶对靶 RNA 切割的有效性,并且细胞端粒酶的活性降低。说明端粒酶 hTERT mRNA 及端粒酶 RNA 均可作为肺癌的治疗靶点,端粒酶特异性核酶有望成为肺癌基因治疗的手段。在人类正常胃组织中无端粒酶表达,而在胃癌组织中端粒酶阳性表达率达 85%~100%。Ye 等^[32]将人端粒酶反义寡核苷酸分别转染高、中和低分化的人胃癌细胞株 MNK-28、SGC-7901 和 MNK-45,当反义寡核苷酸的浓度由 5 U/mol 增加到 10 U/mol 时,3 组细胞株的端粒酶活性由部分降到完全被抑制。不同浓度的人端粒酶反义寡核苷酸治疗 96 h 后,3 组细胞生长抑制率分别为 40.89%、71.28% 和 15.86%,还观察到胃癌细胞株 MNK-45、SGC-7901 细胞有细胞凋亡现象。

9 抑制细胞信号传导道路

通过抑制细胞信号传导道路可抑制肿瘤细胞的增殖,信号传导道路中酪氨酸激酶与肿瘤的发生和发展有关,主要有上皮生长因子受体、血管内皮生长因子受体、血小板生长因子、细胞癌基因 scr、B 细胞抗药受体、细胞癌基因 abl 等。Kim 等^[33]采用表达 Cmet 核酶的腺病毒载体转染前列腺癌细胞时发现,细胞癌基因 scr 激酶活性明显下降,并认为靶向 Cmet 信号通路的治疗对于控制前列腺癌生长和转移有重要意义。还有研究采用 EGFR 反义 RNA 治疗胶质瘤也取得明显的疗效。Book-out 等^[34]通过抑制前列腺癌 G 蛋白信号传导道路而使肿瘤细胞死亡。

10 病毒介导的肿瘤溶解

在肿瘤细胞内突变的腺病毒作为癌溶解剂,无需加治疗基因,能有效地溶解肿瘤。如部分缺失腺病毒 1B 期的腺病毒可特异性地在缺乏 p53 的肿瘤细胞内复制。

11 联合基因疗法

由于肿瘤是多因素、多环节、多阶段的复杂疾病,依靠单一方法并不能达到理想的抗肿瘤效果,因此多种治疗方法联合,针对肿瘤的不同特征进行治疗已经成为基因治疗发展的一个趋势。不同目的基因之间的联合应用:(1)自杀基因与免疫基因之间的联合应用,如自杀基因 HSV-tk 与能增强抗癌免疫力的 mmIL-2 基因联合应用的抑瘤作用更强^[35];(2)免疫基因与免疫基因之间的联合应用,其他的联合疗法包括目的基因与化疗药物的联合以及目的基因与放射线之间的联合等。如 Yamazaki 等^[36]利用 HSV-tk/GCV 系统以及与 IL-12 联合治疗转移性甲状腺癌效果良好。Mikyskova 等^[37]利用 IL-12 和 GM-CSF 联合基因治疗 HPV16 相关肿瘤模型,也取得了良好的效果。

12 化疗保护性基因治疗

化疗保护性基因治疗是指化疗前向骨髓内导入耐药基因,保护骨髓细胞不受抗肿瘤药物的损害。MDR1 编码 P 糖蛋白的跨膜蛋白,它有抗肿瘤药物位点和 ATP 位点 2 个结合位点,通过 ATP 供能可将细胞内药物泵出,从而保护正常细胞免受药物的损害。通过基因转移技术转移耐药基因到正常器官组织,保护其免受化疗药物的毒性作用,该疗法可以提高化疗效果。目前,肿瘤耐药基因治疗的方案是转入 mdr1 基因、二氢叶酸还原酶基因、DNA 修饰蛋白-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因等,或者联合使用两种或多种耐药基因转入造血干细胞,使造血干细胞获得广谱抗药性;或使用耐药基因的突变体,以获得比野生型更有效的骨髓保护作用;也有将 gm-csf 基因等转入骨髓细胞,以提高机体对大剂量化疗的耐受力^[38]。应用此方法降低肿瘤细胞对化疗药物的耐受也可类归于干扰性

基因治疗。

13 主要问题及展望

基因治疗是 20 世纪末涌现出来的一种新的治疗模式,已取得了很大成就,它已被看成是对先天和后天基因疾病潜在有效的治疗方法。由于肿瘤的发生、发展机制比较复杂,涉及多种基因的表达异常,故单一的单基因治疗可能疗效有限。因此联合应用多种基因对肿瘤进行基因治疗其效果可能会更好。另外,基因治疗配合其他肿瘤治疗方式(如手术、放疗、化疗)以达到最佳治疗效果,根据不同肿瘤患者的个体差异而采取相应的措施,这些都有待进一步的研究。成功的基因治疗应以安全、有效、简便、实用为目的。尽管目前肿瘤基因疗法的研究大多还停留在实验研究阶段,相信在不久的将来,该疗法将成为一种治疗肿瘤的重要手段而被广泛应用于临床实践。

参考文献

- [1] Shin J, Kim J, Ryu B, et al. Caveolin21 is associated with hVCAM-1 dependent adhesion of gastric cancer to endothelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2006, 17(5): 211-215.
- [2] Pang RW, Lee TK, Man K, et al. PIN1 expression contributes to hepatic carcinogenesis[J]. J Pathol, 2006, 210(1): 19-21.
- [3] 李允光,濮德敏,刘雪梅,等. RNAi 沉默环氧酶 22 对宫颈癌 Hela 细胞细胞周期影响的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(20): 1535-1538.
- [4] 吴元明,陈苏尼. RNA 干涉的最新研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(4): 411-412.
- [5] 张翊,裴德宁. RNA 干扰研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(1): 68-73.
- [6] Iyer LM, Anantharaman V, Aravind L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins[J]. BMC Genomics, 2003, 4(1): 5-13.
- [7] Van RP, Brand AH. Spreading silence with sid[J]. Genome Biol, 2004, 5(2): 208-210.
- [8] Irie N, Sakai N, Ueyama T, et al. Subtype-and species-specific knockdown of PKC using short interfering RNA[J]. Biochem Bioph Res Co, 2002, 298: 738-743.
- [9] Kim D, Niculescu DI, Hallden G, et al. The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4): 68-73.
- [10] Okada T, Caplen NJ, Ramsey WJ, et al. In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy invitro and in vivo[J]. J Gene Med, 2006, 8(3): 288-299.
- [11] Moriuchi S, Glorioso TC, Maruno M, et al. Combination gene therapy for glioblastoma involving herpes simplex virus vector-mediated codelivery of mutant IkappaBalpha and HSV thymidine kinase[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(5): 487-496.
- [12] Ammerpohl O, Thormeyer D, Khan Z, et al. HDAGi phenylbutyrate increases bystander killing of HSV-tk trans-

- fecting glioma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,324(1):8-14.
- [13] Trudel S, Trachtenbery J, Toi A, et al. A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (Ad IL-2) in high-risk localized prostate cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2003,10(10):755-763.
- [14] Tani K. Current status of gene therapy clinical studies for renal cell carcinoma[J]. Nippon Rinsho, 2005,63(3):454-463.
- [15] Heinzerling L, Burg G, Dummer R, et al. Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin-12 into patients with meta-static melanoma: clinical efficacy [J]. Hum Gene Ther, 2005,16(1):35-48.
- [16] Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors[J]. J Clin Oncol, 2004,22(8):1389-1397.
- [17] Zhang SY, Zhao J, Ge JF. Anti gastric cancer active immunity induced by FasL/B7-1 gene-modified tumor cells [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(21):3204-3211.
- [18] 关心, 彭吉润, 冷希圣, 等. 人树突状细胞与肝癌细胞系 HLE 融合细胞的建立[J]. 中华肿瘤杂志, 2005,27(8):465-467.
- [19] Danielczyk A, Stahn R, Faulstich D, et al. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006,55(11):1337-1347.
- [20] Gendier SJ. MUC1, the renaissance molecule[J]. J Mammmary Gland Biol Neoplasia, 2001,6(3):339-353.
- [21] 杨红, 张铀, 杨玲, 等. muc1 基因在血液系统恶性肿瘤中的表达及临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2006,15(6):438-441.
- [22] 翁羽蕙, 张铀. 多发性骨髓瘤 muc1-2vnt 基因疫苗诱导小鼠免疫应答的实验研究[J]. 山东医药, 2010,50(13):4-6.
- [23] Senatus PB, Li Y, Mandigo C, et al. Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide[J]. Mol Cancer Ther, 2006,5(1):20-28.
- [24] Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, et al. Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status[J]. Hum Gene Ther, 2005,16(6):685-688.
- [25] Das S, El-Deiry WS, Somasundaram K. Efficient growth inhibition of HPV16 E6 2expressing cells by an adenovirus-expressing p53 homologue p73 beta [J]. Oncogene, 2003,22(52):8394-8402.
- [26] Zhu JS, Wang L, Cheng GQ, et al. Apoptosis mechanisms of human gastric cancer cell line MKN-45 infected with human mutant p27 [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(47):7536-7540.
- [27] Chen HX. Clinical development of antisense oligonucleotides as anticancer therapeutics [J]. Methods Mol Med, 2003,75:621-631.
- [28] Tong QS, Zheng CD, Chen FM, et al. Selection of optimal antisense accessible sites of surviving and its application in treatment of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2005,11(5):634-640.
- [29] 郭华, 张庆林, 王成伟, 等. 反义核酸阻断人神经母细胞瘤多药耐药相关蛋白 P-糖蛋白的表达[J]. 中国医学科学院学报, 2005,27(3):300-304.
- [30] 马超, 周庚寅, 肖颖, 等. RNA 干扰沉默缺氧诱导因子-1a 逆转乳腺癌的耐药性[J]. 中华病理学杂志, 2006,35(6):357-360.
- [31] 何霞, 周俊宜, 朱振宇, 等. 端粒酶锤头状核酶抑制肺癌细胞端粒酶活性及细胞增殖的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007,14(18):1372-1375.
- [32] Ye J, Wu YL, Zang S. Inhibitory effect of human telomerase antisense variant tumor pathological subtype [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(15):2230-2237.
- [33] Kim SJ, Johnson M, Koterba K, et al. Reduced c-2Met expression by an adenovirus expressing a c-2Met ribozyme inhibits tumorigenic growth and lymph node metastases of PC3-LN4 prostate tumor cells in an orthotopic nude mouse model[J]. Clin Cancer Res, 2003,9(14):5161-5170.
- [34] Bookout AL, Finney AE, Guo R. Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth [J]. J Biol Chem, 2003,278(39):37569-37573.
- [35] Guo SY, Gu QL, Zhu ZG, et al. TK gene combined with ml-2 and mGM-CSF genes in treatment of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2003,9(2):233-237.
- [36] Yamazaki M, St raus FH, Messina M. Adenovirus mediated tumor-specific combined gene therapy using herpes simplex virus thymidine/ganciclovir system and murine interleukin-12 induces effective antitumor activity against medullary thyroid carcinoma [J]. Cancer Gene Ther, 2004,11(1):8-15.
- [37] Mikyskova R, Indrova M, Simova J. Treatment of minimal residual disease after surgery or chemotherapy in mice carrying HPV16 associated tumors: cytokine and gene therapy with IL22 and GM-CSF[J]. Int J Oncol, 2004,24(1):161-167.
- [38] Kobayashi H, Takemura Y, Miyachi H. Novel approaches to reversing anti-cancer drug resistance using gene-specific therapeutics[J]. Hum Cell, 2001,14(3):172-184.