

# 基因靶向治疗肝癌的新进展\*

修阳阳 综述, 赵建农, 郭大静, 曾 燕<sup>△</sup> 审校(重庆医科大学附属第二医院放射科, 重庆 400010)

【关键词】 原发性肝癌; 基因治疗; 靶向性; 转染率

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.052 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1424-03

原发性肝癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 是世界范围内男性第 2 位、女性第 6 位的癌症死亡原因, 肝癌已严重威胁到人们正常的生活<sup>[1]</sup>。目前, 肝脏手术切除与肝移植是治疗肝癌比较有效的方法, 但大多数患者就诊时已是晚期, 失去最佳手术和肝移植机会, 因此探索新的治疗方法是当前肝癌治疗研究的热点。随着科技和医学的进步和发展, 现已明确肝癌的发生和发展是一系列长期复杂及多因素逐步演进的过程<sup>[2]</sup>, 但其本质上是一个多基因相关的疾病。因此, 从基因层面上将靶基因通过载体协助导入机体, 并特异性地在靶组织中以可调控的形式表达, 但不影响正常肝细胞的表达作用, 从而达到治疗肝癌的目的<sup>[3]</sup>, 将会在临床上拥有广阔的应用前景。与传统疗法相比, 它从根源上破坏了异常表达的基因但不损害正常表达的基因, 具有无可比拟的优越性。本文就靶向基因治疗肝癌的现状 & 载体选择、转染率等问题来进行综述。

## 1 靶向基因的选择现状

靶向基因治疗肝癌的关键环节在于如何选择有效的靶基因和安全高效的传递治疗基因载体系统, 从而发挥自杀基因破坏或修复异常基因的作用。因此, 如何在这些方面取得关键性的进展成为基因治疗肝癌的热点。基因要进入肝癌细胞正常表达并产生相应的酶, 需要载体协助质粒 DNA 穿透肿瘤细胞生物膜, 基因转亦需要合适的载体。所以择取安全、合适的基因及其传递载体能够使目的基因靶向、可控高效的表达是其亟待解决的问题。

基因治疗肝癌目前较为成熟的是自杀基因疗法, 即直接或间接地诱导癌细胞凋亡, 从而影响肿瘤细胞 DNA 合成, 最终引起肿瘤细胞死亡。杨六成等<sup>[4]</sup>通过腺病毒介导的 KDR 启动子驱动 CD/TK 双自杀基因联合 survivin 基因干扰小鼠实验成功证明了自杀基因是抑制小鼠肝癌细胞的有效方法。

目前治疗肝癌最常用的靶向基因有疱疹病毒 I 型胸苷激酶/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)体系和胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-Fc)体系。HSV-TK/GCV 体系是将无毒性的抗病毒药物丙氧鸟苷单磷酸化杀死肝癌细胞, 其旁杀作用强大, 有研究表明即使 10% 的癌细胞被转染即可杀灭整个肿瘤组织, 具有明确、高效、安全的抗癌活性, 已用于多种恶性肿瘤的治疗<sup>[5]</sup>, 但同别的基因治疗一样, 因缺乏靶向性的基因转染系统及较低转染率成为限制自杀基因临床应用的瓶颈。有研究人员采用与 CD/TK 系统联合应用优势互补, 已经在肝癌的基因治疗中取得显著的效果<sup>[6-7]</sup>。

## 2 靶向自杀基因治疗肝癌的载体选择

靶向自杀基因治疗肝癌理想的载体应具备以下条件: (1)

载体能有效地保护自杀基因, 使其免受破坏; (2) 无毒性, 对患者及环境无危害; (3) 稳定性好、转染率高、容易制取; (4) 在靶细胞内表达长久。常用作治疗肝癌的基因载体有病毒载体、非病毒载体。

**2.1 病毒载体** 病毒载体是用转换方式完成基因转送, 以病毒为载体将目的基因重组于其中从而去感染肝癌细胞, 使其在癌细胞中表达, 而不损伤正常的组织细胞。病毒没有细胞结构, 较为容易地吸附于生物细胞, 注入遗传物质, 通过反转录或者整合到宿主 DNA 中进行增殖, 所以病毒具有高效的转染率。较常使用的病毒载体有: 反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺病毒相关病毒载体等。其中腺病毒作为基因载体应用范围广泛, 有转导安全高效、稳定、易操作等优点, 特别是体内的腺病毒有明显的嗜肝性和高效性转染肝细胞, 从而使其成为基因治疗肝癌的首选载体<sup>[8]</sup>。但是, 病毒的生物学毒性和免疫原性限制了其应用, Chang 等<sup>[9]</sup>应用相关动物模型对带有不同表达 TK 基因的 4 种腺病毒载体进行研究, 其结果表明: 当基因表达量超出某一限值时, 不仅不能增强其疗效, 而且还造成了致命的肝毒性。因此, 适量的基因表达与适当的载体是肝癌基因治疗的一个重要因素。病毒载体因其潜在的免疫原性及致突变性等安全性问题使得病毒载体成为肝癌基因治疗载体选择的主要限制因素<sup>[10]</sup>。

**2.2 非病毒载体** 相比病毒载体, 非病毒载体具有低毒、免疫原性佳、靶向性强和易于组装等优点, 已成为靶向基因治疗肝癌领域新的研究热点<sup>[11]</sup>。常用的非病毒载体有: 脂质体、聚合物、树状大分子、干细胞载体、肽类载体、细菌类载体和真核细胞类质粒载体等, 但一般的非病毒载体不具备特异性和靶向性, 转染效率低而且容易被吞噬, 基因表达时间短等问题引起许多研究人员对这些载体进行各种修饰和改进。本文就较为成熟的脂质体和磁性纳米粒载体、阳离子聚合物进行探讨。

**2.2.1 脂质体载体** 脂质体作为载体已有多年, 现代技术可以通过凝胶电泳及紫外光度法等测定其载基因量和包封率, 已由定性发展到定量阶段<sup>[12]</sup>。脂质体是疏水相互作用和多层次的有序组合自发形成的磷脂分子的脂质双层膜囊泡。脂质体有中性脂质体、阴离子脂质体和阳离子脂质体, 在靶向基因治疗肝癌的过程中应用较多的是阳离子脂质体, 因为基因多带负电荷, 阳离子脂质体具有安全性高、免疫原性低、易于对 DNA 进行操作和结合、可以有效与细胞吸附等优势, 已经被广泛应用于基因治疗肝癌的研究<sup>[13-14]</sup>。

带有正电荷的阳离子脂质体可以通过静电吸附作用结合带有负电荷的细胞, 入胞的目的基因脱离阳离子脂质体在细胞

\* 基金项目: 重庆市卫生局重点项目(2013-1-021)。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 1294583212@qq.com。

核表达相应蛋白质发挥其治疗或修复作用。有研究发现,利用阳离子脂质微粒作为载体向小鼠肝癌模型导入 miRNA 可以高度靶向肝癌细胞,抑制其增生<sup>[15]</sup>。但是,在研究中发现,阳离子脂质体在血液循环过程中易与血液中带有负电荷的血清蛋白发生吸附,而造成目的基因转染效率低<sup>[16]</sup>。因此如何提高阳离子脂质体的转染率是需要克服的难题<sup>[17]</sup>。因此,研究人员对阳离子脂质体进行加工修饰,制备新型的阳离子脂质体,例如用聚乙二醇(PEG)及其衍生物对阳离子表面进行修饰。Hatakeyama 等<sup>[18]</sup>利用 PEG-多肽-DOPE(PPD)脂质分子修饰阳离子载体,发现 PPD 修饰有效地抑制了肿瘤的生长且无免疫反应。

近年来发展起来的超声脂质微泡因其靶向性高而且安全被广泛应用于体内外的基因转染,其结合了超声微泡和阳离子脂质体的优势,具有广阔的应用前景。丁璐等<sup>[19]</sup>采用超声微泡破裂技术联合阳离子脂质体介导 pEGFP 质粒转染,证明了超声微泡破裂法增强了阳离子脂质体介导基因转染效果,可以应用于肝癌的基因治疗。

**2.2.2 磁性纳米粒载体** 磁性纳米粒能包裹、浓缩、保护核酸且在体内循环时间明显高于普通尺寸的颗粒,不会在短时间内被吞噬细胞消灭能更多地渗出到血管以外组织间隙,从而延长与靶细胞的接触时间,提高其转染效率<sup>[20]</sup>。磁性纳米颗粒不仅具有粒径小,比表面积大、偶联容量高的优势而且能够在恒磁场下聚集和定位、在交变磁场下吸收电磁波产热。研究表明,低能量超声能够通过磁性  $Fe_3O_4$  粒子对肝癌细胞进行杀灭,其效果与作用的时间和功率呈正比,其功率越大或者时间越长效果越明显<sup>[21]</sup>。夏婷等<sup>[22]</sup>发现磁性纳米粒子有诱导肝癌 HepG2 肿瘤细胞凋亡作用,且几乎无不良反应。磁性纳米粒子作用于肝癌的靶向基因治疗具有很强的靶向性和较高的转染率,成为了非常具有应用前景的非病毒载体。

**2.2.3 阳离子聚合物** 阳离子聚合物有高度的安全性和可操作性,其容易加以修饰改造常用于基因治疗<sup>[23]</sup>,但其转染效率较低。阳离子聚合物与基因结合后的稳定性取决于聚合物的结构与基因所带的电荷比,聚合物要抵达靶细胞也需要穿过组织及胞内胞外的屏障,所以不同的靶器官需要结合不同的受体。如半乳糖化的阳离子聚合物可以增加对肝细胞的特异性吸附,增强其转染作用<sup>[24-25]</sup>,同时提高了基因的靶向性和转染效率。

将脂质体、磁性材料等予以加工修饰制成纳米级粒子,可以作为安全有效的基因载体成功转染细胞,赵红云等<sup>[26]</sup>用超声辐照包裹液态氟碳的脂质纳米粒致液-气相变成功证明其可以抑制肝 HepG2 细胞增殖。对于所有的靶向肝癌治疗基因载体来说,其转染效率和安全性是首要解决的问题。很多研究表明,载体的转染效率越高其生物毒性也就越高;反之,如果安全性高其转染效率就会有所妥协。最好的方法就是载体可以跨越靶细胞的解剖学障碍,即细胞周围的内皮细胞、上皮细胞或者间质细胞;物理途径例如,电穿孔转染、超声微泡破碎、磁转染技术在一定程度上解决了这些问题,给基因疗法带来新的希望。

### 3 提高肝癌治疗靶向性

目前,在提高肝癌治疗靶向性时多是将抗体或者多肽、基因等与载体连接,通过表面所携带的特异性抗体或者配体从而达到靶向治疗的目的。在胎儿肝脏中表达较高的磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3),在成人肝脏中不表达,但是发生肝癌时

GPC3 会再次激活。据统计,在原发性肝癌中 GPC3 阳性率约为 80%,其特异性约为 90%,表示可以用 GPC3 作为生物标志物用于指导肝癌的诊断和预后评价,可能成为肝癌治疗的新的特异性靶点<sup>[27-28]</sup>。周景宏等<sup>[29]</sup>用生物素桥接亲和素的方法成功制备出靶向超声微泡结合肝癌细胞 GPC3 抗体的模型,结合其体外寻靶实验验证了载 GPC3 抗体的超声微泡对肝癌具有较强的特异性。但其靶向性的结合率、载体的稳定性及其潜在的免疫安全性需要进一步探讨。近年来研究较多的分子影像学的特异造影剂也对肝癌的诊断和治疗提供新思路,张辉等<sup>[30]</sup>成功构建了靶向结合肝癌表面的 Hab-18g 抗体的高分子造影剂,有望结合靶向基因治疗肝癌用于临床研究。

### 4 问题与展望

肿瘤生物治疗、靶向基因治疗为中晚期肝癌及肝癌术后的辅助治疗开辟新的途径,人们对肝癌治疗有了新的希望。近期研究较多的双自杀基因治疗,阳离子微泡、纳米级超声微泡、磁性纳米粒子,高分子材料等新型造影剂作为基因载体都成为靶向基因治疗肝癌的新思路,但是将靶向基因疗法用于肝癌临床治疗仍有许多问题需要解决和完善,例如安全高效的基因系统、最佳靶向给药途径、载体选择、安全性、时效与量效关系等都需要进一步的实验验证。近年来发展迅速的 RNA 干扰技术即 RNAi,可以阻断特定基因表达,在靶向基因治疗肝癌中也有巨大的潜力。可以预见,随着靶向基因治疗肝癌技术的成熟,会对肝癌的治疗产生革命性的影响,为肝癌患者带来巨大的福音。

### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. JAMA, 2013, 310(9):982-988.
- [2] Moeini A, Cornella H, Villanueva A. Emerging signaling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Cancer, 2012(1):83-89.
- [3] de Ilarduya CT, Sun Y, Düzgünes N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 40(3): 159-170.
- [4] 杨六成, 吴凯, 黄宗海, 等. KDR 启动子驱动的 CD/TK 双自杀基因联合 survivin 基因干扰抑制肝癌细胞生长的体内研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(1):57-62.
- [5] Hwang LH. Gene therapy strategies for hepatocellular carcinoma[J]. J Biomed Sci, 2006, 13(4):453-468.
- [6] Su GQ, Su G, Huang ZH. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the CDgly TK gene for the treatment of breast Cancer[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(2):321-329.
- [7] Qiu Y, Peng GL, Liu QC, et al. Selective killing of lung Cancer cells using carcinoembryonic antigen promoter and double suicide genes, thymidine kinase and cytosine deaminase(pCEA-TK/CD)[J]. Cancer Lett, 2012, 316(1):31-38.
- [8] Prieto J, Qian C, Hernandez-Alcoceba R, et al. Gene therapy of liver diseases[J]. Exper Opin Biol Ther, 2004, 4(7):1073-1091.
- [9] Chang CJ, Tai KF, Roffler S, et al. The immunization site of cytokine-secreting tumor cell vaccines influences the trafficking of tumor-specific T lymphocytes and antitumor efficacy

against regional tumors[J]. *J Immunol*, 2004, 173(10): 6025-6032.

[10] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenoviral vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(11): 1034-1044.

[11] Liang YR, Liu ZL, Shuai XT, et al. Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(4): 690-695.

[12] Li SD, Huang SL. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(18): 1313-1319.

[13] Bolhassani A, Javanad S, Saleh T, et al. Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting Cancer and infectious diseases[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(2): 321-332.

[14] Im GI. Nonviral gene transfer strategies to promote bone regeneration[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(10): 3009-3018.

[15] Hsu SH, Yu B, Wang XM, et al. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor [J]. *Nanomedicine*, 2013, 9(8): 1169-1180.

[16] Yang XZ, Du JZ, Dou S, et al. Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(1): 771-781.

[17] Tiera MJ, Shi Q, Winnik FM, et al. Polycation-Based gene therapy: current knowledge and new perspectives [J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(4): 288-306.

[18] Hatakeyama H, Akita H, Ito E, et al. Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(18): 4306-4316.

[19] 丁璐, 陈云超, 刘晓玲, 等. 超声微泡破裂法联合阳离子脂质体介导基因转染的实验研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2013, 22(8): 691-695.

[20] Gemeinhart RA, Luo D, Saltzman WM. Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles[J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2): 532-537.

[21] 刘洋洋, 钱志余. 基于超声驱动磁性纳米粒子的肿瘤细胞灭杀[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 64(5): 502-509.

[22] 夏婷, 唐萌, 殷海荣, 等. 磁性三氧化二铁纳米粒子对 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2008, 41(3): 29-33.

[23] Im GI. Noviral gene transfer strategies to promote bone regeneration[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(10): 3009-3018.

[24] Qin Z, Liu W, Li L, et al. Galactosylated N-2-hydroxypropyl methacrylamide-b-N-3-guanidinopropyl methacrylamide block copolymers as hepatocyte-targeting gene carriers[J]. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(8): 1503-1512.

[25] Kunath K, von HA, fischer D, et al. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency [J]. *J Control Release*, 2003, 88(1): 159-172.

[26] 赵红云, 梅浙川, 郑元义, 等. 液态氟碳纳米粒液-气相变治疗肝癌的体外实验[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2015, 12(2): 114-117.

[27] Wang HL, Anatelli F, Zhai QJ, et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(11): 1723-1728.

[28] Shirakawa H, Nishimura Y. Glypican-3 is a useful marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver Cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(3): 649-656.

[29] 景周宏, 何承俊, 潘万龙, 等. 载肝癌细胞 GPC3 抗体的纳米级脂质超声微泡制备及体外寻靶研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(5): 449-453.

[30] 张辉, 冉海涛, 王志刚, 等. 靶向高分子造影剂的制备及其体外寻靶实验[J]. *中国超声医学杂志*, 2010, 26(3): 193-196.

(收稿日期: 2015-12-25 修回日期: 2016-02-24)

• 综 述 •

## 内镜逆行胆胰管造影术后胰腺炎药物预防的研究进展

何 鑫<sup>1</sup>, 刘 刚<sup>2</sup>综述, 范德庆<sup>1△</sup>审校(1. 贵州省遵义医学院 563000; 2. 重庆市涪陵中心医院肝胆外科 408000)

**【关键词】** 内镜逆行胆胰管造影术后胰腺炎; 药物预防; 研究进展

**DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 10. 053 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1426-03**

20 世纪 60 年代内镜逆行胆胰管造影(ERCP)的临床应用, 尤其是 1974 年内镜下乳头括约肌切开术(EST)的临床应用, 使 ERCP 成为胆胰疾病临床诊断和治疗的重要手段。随着内镜技术的不断进步, 其在胆胰疾病诊治中的作用越发重要, 但 ERCP 相关并发症制约了其广泛使用。ERCP 术后并发症

包括急性胰腺炎、出血、穿孔、感染等。急性胰腺炎是 ERCP 术后最常见、最严重的并发症之一, 不同国家、地区, 不同级别研究机构、文献报道 ERCP 发生率不尽相同。Parsi<sup>[1]</sup>报道 ERCP 发生率为 1.00%~10.00%, 高危患者发生率 30.00%; Dimagno 等<sup>[2]</sup>报道发生率为 1.00%~40.00%。大多数患者 ERCP

△ 通讯作者, E-mail: Flfandeqing@126.com.