

世界华人消化杂志®

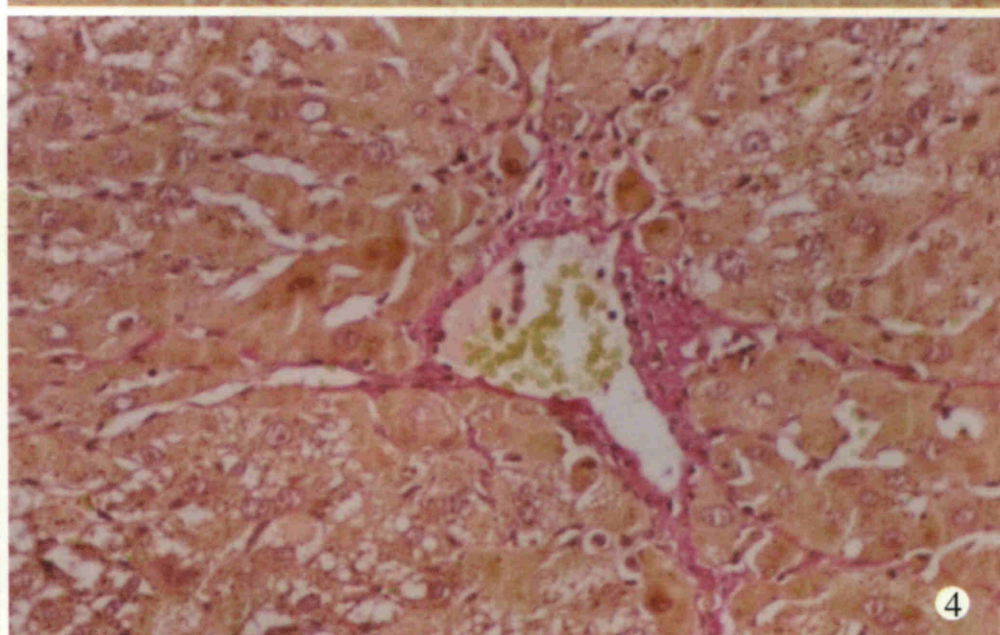
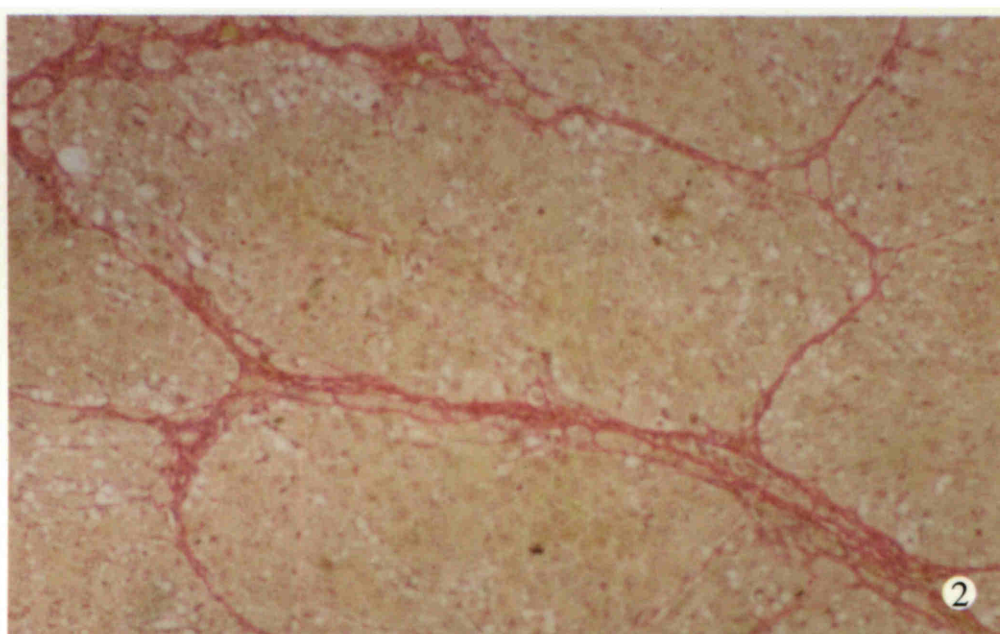
WORLD CHINESE

JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年7月15日 第11卷 第7期

(Volume 11 Number 7)



7/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期 (总第 111 期)

述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭
997 p⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

焦点论坛	1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军 1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林 1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军 1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林
课堂讨论	1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青
文献综述	1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海 1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为 1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植 1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳 1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义 1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华 1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书 1059 NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶 1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超 1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎
消 息	907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 993 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 1030 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 附 1 Journal Citation Reports 2002-China 附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY 附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊 附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊
封面故事	970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
 陈可冀 题写版权刊名
 (月刊)
 创 刊 1993-01-15
 改 刊 1998-01-25
 出 版 2003-07-15
 原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀 张金哲
 黄象谦 张学庸
 黄志强 赵东海
 黎介寿 周殿元
 刘耕陶 社长总编辑 马连生
 裘法祖 中文编辑 潘伯荣
 汤钊猷 王瑾晖
 王宝恩 英文编辑 张建中
 危北海 排 版 李少华
 吴孟超 校 对 李天华
 吴咸中

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
 030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
 E-mail:wcjd@wjgnet.com
 出版 世界胃肠病学杂志社
 100023, 北京市 2345 信箱
 E-mail: wcjd @ wjgnet.com
 http://www.wjgnet.com
 电话 (010)85381892
 传真 (010)85381893
 印刷 北京科信印刷厂
 发行 国内 北京报刊发行局
 国外 中国国际图书贸易总公司
 (100044, 北京 399 信箱)
 订购 全国各地邮电局
 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
 (100023, 北京市 2345 信箱)
 电话:(010)85381892
 传真:(010)85381893
 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
 检索系统收录
 美国《化学文摘(CA)》
 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
 俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
 中国科技论文统计与分析
 中国学术期刊文摘
 中国中医药信息服务网
 中国生物医学文献光盘数据库
 《中文科技资料目录(医药卫生)》
 中国生物医学期刊目次数据库
 中国医学文摘外科学分册(英文版)
 中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠
 病学杂志社和本刊编委会的观点, 除
 非特别声明. 本刊如有印装质量问题,
 请向本刊编辑部调换.

TK基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展

刘占奎, 张 超

刘占奎, 张超, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科 重庆市 400038
全军医学科学研究十五重点课题, No.01Z069
项目负责人: 张超, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号, 中国人民解放军
第三军医大学西南医院普外科.
电话: 023-65399044
收稿日期: 2002-10-17 接受日期: 2002-11-16

摘要

胃癌是我国人群中发病率和死亡率均占第一位的恶性肿瘤, 近年来大肠癌的发病率呈明显上升趋势. 胃肠道肿瘤的治疗以手术治疗为主, 同是辅以化疗, 但化疗对肿瘤非特异性, 敏感性低, 全身副作用大, 效果欠佳, 5 a 生存率在 50 % 左右. 肿瘤的基因治疗是近年来研究的热点, 尤其是 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究取得了令人瞩目的成就, 本文收集国内外近期文献, 就 TK 基因的作用机制、载体、靶向性表达、旁观者效应以及其在胃肠道肿瘤的应用进行了综述.

刘占奎, 张超. TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;
11(7):1064-1067

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1064.asp>

0 引言

“自杀基因治疗”作为一种新兴的基因治疗方法, 是众多基因治疗策略中效果最明显、最有前途的策略之一^[1-17]. 该疗法是利用基因工程技术, 将一些病毒或细菌基因组中前药转换酶基因(也叫自杀基因)导入肿瘤细胞, 该基因编码特殊的酶, 可将原先对哺乳动物细胞无毒性的前药, 在肿瘤细胞中代谢为毒性产物, 从而引起这些细胞的死亡, 所以又称为“病毒导向的酶解前药疗法”或“分子化疗”. 目前应用的自杀基因前药系统主要有以下几种^[18]: (1) 丙氧鸟苷 / 胸腺嘧啶脱氢酶系统(GCV/HSV-TK); (2) 5- 氟胞嘧啶 / 胞嘧啶脱氨酶系统(5-FC/CD); (3) 6- 巯基嘌呤 / 黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶系统(6TX/GPT); (4) 丙氧鸟苷 / 潮霉素磷酸转移酶 - 胸腺嘧啶脱氢酶融合蛋白系统(GCV/hytk); (5) 6- 甲基嘌呤 - 2- 脱氧核糖核苷酸 / 嘌呤核苷酸磷酸酶系统(Mep-DR/PNF); (6) 环磷酰胺 / 细胞毒素 P⁴⁵⁰2B1 系统(CPA/cyt P⁴⁵⁰2B1). 其中研究最深入、应用最广泛的是 GCV/HSV-TK 和 5-FC/CD^[19].

1 作用机制

TK 基因编码胸苷激酶, 该酶可将核苷类似物(NA)代谢为二磷酸化物, 后者在细胞内酶的作用下生成有毒的

三磷酸化物而发挥抗肿瘤作用. TK 酶能选择性地使抗病毒药物 GCV 磷酸化成为单磷酸化产物, 并在细胞内磷酸激酶的作用下, 形成三磷酸产物, 干扰、阻断 DNA 的正常合成和细胞增生^[20-24]. 病毒、细菌、哺乳动物细胞中均含有 TK 基因, 但不同来源的 TK 基因结构及蛋白产物的理化性质、生物功能有明显的差异. 在肿瘤的治疗中以 HSV-TK 和 VZV-TK 最为常用. 早在 1979 年人类就已经克隆出 HSV-TK 基因序列, HSV-TK 编码区共 1 128 个核苷酸, 编码 376 个密码子, 基因中无内含子, 其转录起始部有 107 个核苷酸的非翻译区. 用于 HSV-TK 基因治疗的前药有两类, 一是嘌呤核苷类似物, 包括 ACV 及其衍生物 GCV、PCV、BCV. 其中 GCV 对转基因瘤细胞的抑制作用比 ACV 强 100 倍, 故成为目前肿瘤 TK 基因治疗中最常用的前药^[25]. 另一类是嘧啶核苷类似物, 包括 BVDU、BVFL、ZVDL 等. 研究表明: BVDU 对哺乳动物细胞无毒性, 而其代谢产物可引起 DNA 合成受阻, 导致细胞死亡.

2 TK 基因治疗的载体

基因治疗的关键之一是如何将外源基因导入相应靶细胞并获得安全、有效的表达. 常用的基因转移方法可分为两类, 一类是非病毒载体介导的基因转移技术, 包括电穿孔技术、离子轰击基因转移技术(基因枪)、显微注射技术、DNA 直接注射术、脂质体介导的基因转移和受体介导的基因转移等. 在自杀基因治疗中, 利用脂质体包裹的目的基因转导有较多的报道. 由于脂质体对人体无毒, 无致癌性, 易于大量制备, 有望成为一种较为理想的载体. 另一类为病毒介导的基因转移技术, 相对于非病毒而言, 其转染率高, 易于改造和操作, 且病毒基因组以转座子的方式整合, 其基因组不发生重排, 外源基因不会受影响. 在自杀基因治疗中, 经常使用的有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等.

2.1 逆转录病毒(Retrovirus) 是人类基因治疗研究中使用最多的病毒, 该病毒为单链 RNA 病毒, 其特征是只转染处于分裂期的细胞, 且其基因能稳定地整合入宿主细胞染色体内, 逆转录病毒转染宿主细胞时, 依赖被膜蛋白与细胞表面受体结合后穿透进入细胞质内, 在胞质中, 逆转录酶被激活, 以病毒 RNA 为模板逆转录为互补的 DNA, 再由依赖 DNA 的 DNA 聚合酶作用形成双链前病毒 DNA, 后者转运进入细胞核, 最终整合入宿主细胞染色体基因组内. 有人将 TK 基因逆转录病毒载体的包装细胞直接注射到小鼠结肠癌肝

转移灶, 辅以 GCV 治疗后, 瘤体明显缩小, 残余癌组织呈现大量纤维化. 逆转录病毒较突出的优势是他可以有效地整合入靶细胞基因组, 并稳定持久地表达所带的外源基因. 病毒基因组以转座子的方式整合, 其基因组不发生重排, 外源基因不会受影响. 近几年来, 人们在增强逆转录病毒的靶向性方面做了许多尝试, 并取得了一定成果. 逆转录病毒的宿主范围由病毒颗粒表面的包被蛋白(Env)决定, Env 来自何种病毒, 包装出的逆转录病毒颗粒就叫该病毒的假病毒(pseudotype). 通过改变 Env 蛋白可以改善载体细胞靶向性. 如用水泡性口炎病毒的 G 蛋白包装逆转录病毒基因组产生假病毒, 可以拓展逆转录病毒的靶细胞范围并赋予病毒颗粒新的特性^[9].

2.2 腺病毒载体(Adenovirus) 也是转基因治疗中较常用的一种有效运载工具. 他的宿主范围广, 分裂和非分裂细胞均能感染. 与逆转录病毒家族载体不同, 腺病毒基因组不能整合到宿主细胞基因组中, 而是以附加体的形式存在, 不随宿主细胞分裂而复制, 是典型的一过性表达(transient expression)载体, 治疗中有时需要反复转导. 这一特性对于免疫基因治疗来说是非常有利的, 用腺病毒载体将不会导致象能整合的载体那样, 使用后出现对免疫系统持久的刺激^[26]. 目前人们已构建出了删除病毒基因中, 所有开放阅读框架的新型重组腺病毒第三代腺病毒载体, 他仅含有必要的顺式元件(也就是 ITR 和邻近的包装信号序列). 需要在辅助病毒存在情况下, 在包装细胞中繁殖, 其安全性很高. 另外, 这种新一代腺病毒载体不但可容纳较大的外源基因(32 kb), 而且较容易获得高滴度(109 cfu/mL). 现已成功地利用这种新型重组病毒, 将治疗基因转至血友病动物的体细胞中, 活性表达已持续数月^[27,28].

2.3 腺相关病毒(adeno associated virus, AAV) 在应用上较逆转录病毒和腺病毒要晚. 他属于细小病毒科, 是动物病毒中最小的一种, 基因组长 4 675 kb, 两侧是 145 kb 长的倒转末端重复序列(ITR), 其中外侧的 125 个核苷酸呈发夹结构, 在复制时有弱启动子作用.

3 靶向性表达

肿瘤自杀基因治疗研究的最终目的是用于临床, 其关键的一步是要求自杀基因准确、特异地表达于肿瘤局部, 避免进入正常组织细胞中而引起不良反应. 目前所用的靶向方法主要有靶向性转导和靶向性转录两种方式. (1)靶向性转导: 普通病毒载体和脂质体等导入外源基因的方法都缺乏组织细胞特异性, 如果使这些载体表面带上肿瘤细胞特异性的识别分子, 通过这些分子引导载体到达特定肿瘤细胞, 从而将所携带动外源基因带入细胞内, 这方面的工作正在开展, 有可能为肿瘤的基因治疗提供有效的基因靶向性载体. (2)靶向性转录: 通过肿瘤组织特异性的调控元件与自杀基因相连接, 实现自杀基因靶向性表达, 辅以前药治疗后, 使肿瘤

环境中浓集毒性产物, 从而增强抗癌效果. Tanaka et al^[29]将 HSV-TK 基因置于 CEA 启动子的下游, 用重组腺病毒载体转染结肠癌细胞株 MKN15 及胃癌细胞株 MKN28, 结果表明 TK 基因仅在 CEA 阳性细胞中表达, 增加癌细胞对 GCV 的敏感性, IC_{50} 从 300 mmol/L(对亲本细胞)下降到 2.1-5.8 mmol/L(对转基因细胞).

4 旁观者效应

早在 1986 年 Moolten et al^[30]就观察到这一效应, 他将转导 TK 基因的纤维肉瘤细胞和非转导细胞混合培养, 发现 GCV 能杀灭大部分混合细胞. 随后许多人都在体外培养细胞和活体内肿瘤实验中观察到这一效应, 并命名为旁观者效应(bystander effect). Lechanteur et al^[31]用逆转录病毒携带 HSV-TK 基因治疗 bd-ix 鼠结肠癌 DHD/K12 细胞腹膜种植瘤, 体外发现稳定表达 TK 基因的 DHD/K12 细胞被低浓度的 GCV 杀死. 旁观者效应是指在肿瘤自杀基因治疗过程中, 不仅已转染自杀基因的肿瘤细胞被杀死, 并且邻近的未转染自杀基因的肿瘤细胞也被杀死. 正是由于旁观者效应, 弥补了目的基因转染效率不高的缺点, 明显增加了抗肿瘤效果. 目前研究认为, 旁观者效应的机制主要是间隙连接信息交流(GJIC)、凋亡机制和免疫机制^[31]. (1) GJIC: 间隙连接是相邻细胞间由连接蛋白(connexin Cx)组成的通道, 每 6 个哑铃型的连接蛋白亚单位 Cx 组成一个连接子(connexin), 相邻两个细胞间的连接子相连形成间隙连接通道, 离子、小分子物质可通过该通道, 达到相邻细胞间的信息交流, 协调细胞间的功能^[32]. (2) 凋亡机制: 转基因细胞死亡后释放凋亡小体, 被周围细胞吞噬而引起凋亡, 通过阻断凋亡小体的转移可抑制旁观者效应. (3) 免疫机制: 通过激活免疫机制增强抗肿瘤作用, 表达外源基因的肿瘤细胞增强了自身的免疫原性, 同时体内通过释放细胞因子(IL-6 等), 或导入免疫相关因子 IL-2、IL-12、IFN、TNF 等, 以增强或诱发机体抗肿瘤免疫反应. 研究证实, 经基因治疗的瘤体内可见大量的 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞浸润^[33].

5 TK 基因应用于胃肠道肿瘤治疗

自从 1986 年 Moolten 首先应用 TK 基因进行肿瘤治疗研究以来, 该基因已被广泛用于各系统肿瘤治疗研究. 美国等国家正式批准该基因进入临床治疗肿瘤, 包括肝癌、黑色素瘤、前列腺癌、脑胶质瘤等. 现将 TK 基因在胃肠道肿瘤方面的研究综述如下.

5.1 胃癌 王毅 et al^[35]应用 PA 317 细胞包装的逆转录病毒介导的 HSV-TK 基因系统, 转染 MKN28 人胃癌细胞株, 并观察 GCV 对转染 TK 基因的 MKN28 胃癌细胞的杀死作用, 结果显示: 逆转录病毒介导的 HSV-TK 基因系统对人胃癌细胞有较高的转染率, GCV 对转染阳性的胃癌细胞有显著的杀死作用. Yoshida et al^[36]用逆转录病毒携带 HSV-TK 基因经脂质体包裹后转导人胃癌

细胞株 TMK-1, 给予不同浓度(0.1-100 mg/L)的 GCV 治疗, 转基因癌细胞(TMK TK)均有死亡, 并呈现时间剂量依赖关系, 将 1×10^6 个 TMK TK 细胞接种到 Balb/c 裸小鼠皮下, 2 wk 后腹腔注射 GCV(20 mg/kg·d \times 14 d), 结果实验组中 13 只动物有 12 只瘤体直径由治疗前平均 65 mm 减少到 <1 mm, 取得了满意的疗效. Tanaka et al^[29,37]将癌胚抗原(CEA)启动子与 TK 基因相接, 构建特异性嵌合基因 pCEA/Tk, 用腺病毒载体将其导入 CEA 分泌型胃癌细胞株 MKN28 及 MKN45 和 CEA 非分泌型细胞 MKN1, 发现 GCV 对前两种细胞的半数抑瘤浓度(IC₅₀)分别为 21 mg 及 58 mg, 并发现有明显的旁观者效应(bystander effect), 而对 MKN1 的 IC₅₀ 则大于 300 mg. 随后将 2×10^6 个 MKN45 细胞接种到裸鼠皮下, 第 3 天瘤体直径达 3-4 mm, 将腺病毒载体直接注入瘤体, 经 GCV 作用后, 发现 TK 基因选择性表达于 30 % 左右 CEA 阳性癌细胞, 瘤体生长明显受限. 郭善禹 et al^[32]应用逆转录病毒转导自杀基因 TK, 应用脂质体方法转导细胞因子基因 Mgm-CSF. 结果显示, 20 % 的转 TK 基因可以杀伤 70-80 % 以上的肿瘤细胞, 即表现了强大的“旁观者效应”.

5.2 大肠癌 于波 et al^[38]用腺病毒介导 HSV-TK 基因和人野生型 p53 基因共转染 SW837 直肠癌细胞, 该细胞 p53 基因第 248 密码子发生了突变, 结果显示, 突变的 p53 可促进肿瘤细胞的增生, 对抗 HSV-TK/GCV 的杀伤作用, 转染野生型 p53, 一方面发挥正常 p53 的癌功能, 对抗突变 p53, 同时也增强了 HSV-TK/GCV 的效能, 还表现了强大的“旁观者效应”.

6 联合基因治疗

将自杀基因与其他的目的基因联合应用以求增强疗效, 获得最佳抗肿瘤效果, 其中以自杀基因与细胞因子基因、放射线联合应用最为常见. Chen et al^[39]用携带 TK 基因及 mIL-2 基因的重组腺病毒载体直接注射入小鼠结肠癌的肝转移灶, 同时辅助以 GCV 治疗, 发现联合 HSV-TK/ mIL-2 基因或 HSV-TK/ Mgm-CSF 与单独使用 HSV-TK 比较, 残留瘤体明显缩小(P < 0.05). 并诱导出对远处接种瘤块显著的系统免疫反应, 抑制野生型细胞继发接种时的成瘤能力, 此免疫力与肿瘤细胞特异性 CD8⁺ 细胞的存在有关. 并且发现小鼠体内产生的抗肿瘤免疫更持久, 明显延长荷瘤动物的生存期. 顾琴龙 et al^[40]用 TK 基因联合 mIL-2/mGM-CSF 基因治疗小鼠模型胃癌, 得出了同样的结果.

总之, 肿瘤自杀基因治疗作为一种全新的肿瘤治疗手段, 已经进行了大量的细胞学和动物实验研究, 并且取得了可喜的成绩, 但要自杀基因用于临床治疗, 还有大量的工作要做, 今后的研究应寻找更多、更有效的自杀基因、构建更为有效的靶向性载体、提高基因靶向转染效率、选择简便实用的治疗策略、建立合理搭配的联合基因治疗方案等. 相信随着关键技术和一些问题

的逐步解决, 我们将能从各个方面更加精确地调控自杀基因的治疗, 自杀基因可以在治疗胃肠道肿瘤以及其他恶性肿瘤方面作出特殊的贡献.

7 参考文献

- Wadhwa PD, Zielske SP, Roth JC, Ballas CB, Bowman JE, Gerson SL. Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu Rev Med* 2002;53:437-452
- Otsu M, Wada T, Candotti F. Gene therapy for primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:497-501
- Cupp CL, Bloom DC. Gene therapy, electroporation, and the future of wound-healing therapies. *Facial Plast surg* 2002;18:53-57
- Yamaoka T, Itakura M. Gene therapy for diabetes mellitus. *Curr Mol Med* 2001;1:325-327
- Seto M, Yamazaki T, Sonoda J, Matsumine A, Shinto Y, Uchida A. Suppression of tumor growth and pulmonary metastasis in murine osteosarcoma using gene therapy. *Oncol Rep* 2002;9:337-340
- Enlgemann C, Heslan JM, Fabre M, Lagarde JP, Klatzmann D, Panis Y. Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors. *Cancer Lett* 2002;179:59-69
- Okada Y, Okada N, Nakagawa S, Mizuguchi H, Kanehira M, Nishino N, Takahashi K, Mizuno N, Hayakawa T, Mayumi T. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett* 2002;177:57-63
- Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, Qian C, Prieto J. Gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:324-332
- Li S, Xia X, Zhang X, Suen J. Regression of tumors by IFN- α electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. *Gene Ther* 2002;9:390-397
- Manninen HI, Makinen K. Gene therapy techniques for peripheral arterial disease. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002;25:98-108
- Adachi O, Nakano A, Sato O, Kawamoto S, Tahara H, Toyoda N, Yamato E, Matsumori A, Tabayashi K, Miyazaki J. Gene transfer of Fc-fusion cytokine by in vivo electroporation: application to gene therapy for viral myocarditis. *Gene Ther* 2002;9:577-582
- Johnson-Saliba M, Jans DA. Gene therapy: optimising DNA delivery to the nucleus. *Curr Drug Targets* 2001;2:371-399
- Baum BJ, Kok M, Tran SD, Yamano S. The impact of gene therapy on dentistry: a revisiting after six years. *J Am Dent Assoc* 2002;133:35-44
- Havlik R, Jiao LR, Nicholls J, Jensen SL, Habib NA. Gene therapy for liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29:202-208
- Li YM, Okegawa T, Lombardi DP, Frenkel EP, Hsieh JT. Enhanced transgene expression in androgen independent prostate cancer gene therapy by taxane chemotherapeutic agents. *J Urol* 2002;167:339-346
- Rieger PT. The role of oncology nurses in gene therapy. *Lancet Oncol* 2001;2:233-238
- Ohana P, Bibi O, Matouk I, Levy C, Birman T, Ariel I, Schneider T, Ayesh S, Giladi H, Laster M, De Groot N, Hochberg A. Use of H19 regulatory sequences for targeted gene therapy in cancer. *Int J Cancer* 2002;98:645-650
- 范应方, 黄宗海. 结直肠癌基因治疗研究进展. *世界华人杂志* 2001;9:427-430
- 徐克成, 吴建文. 消化系统癌肿的自杀基因疗法. *世界华人消化杂志* 1997;7:679-684
- Princen F, Lechanteur C, Lopez M, Gielen J, Bours V, Merville MP. Similar efficiency of DNA-liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-tk suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis. *J Drug Target* 2000;8:79-89
- Floeth FW, Shand N, Bojar H, Prissack HB, Felsberg J, Neuen-

- Jacob E, Aulich A, Burger KJ, Bock WJ, Weber F. Local inflammation and devascularization--in vivo mechanisms of the "bystander effect" in VPC-mediated HSV-Tk/GCV gene therapy for human malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:843-851
- 22 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumour regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Research* 1993;53:5274-5283
- 23 Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Research* 1993;53:4619-4626
- 24 Crystal R, Hirschowitz E, Lieberman M, Daly J, Kazam E, Henschke C, Yankelevitz D, Kemeny N, Silverstein R, Ohwada A, Russi T, Mastrangeli A, Sanders A, Cooke J, Harvey BG. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Human Gene Therapy* 1997;8:985-1001
- 25 Carrio M, Mazo A, Lopez-Iglesias C, Estivill X, Fillat C. Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin 26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 2001;94:81-88
- 26 Addison C, Brociak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Intratumoural injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8522-8526
- 27 Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Kayda DB, Pinkstaff AM, Kaloss M, Tinlin S, Cameron C, Notley C, Hough C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S. In vivo evaluation of an adenoviral vector encoding canine factor VIII: high-level, sustained expression in hemophilic mice. *Hum Gene Ther* 1999;10:1791-1802
- 28 Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker M, Savino R, Caskey CT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1002-1007
- 29 Tanaka T, Kanai F, Lan KH, Ohashi M, Shiratori Y, Yoshida Y, Hamada H, Omata M. Adenovirus-mediated gene therapy of gastric carcinoma using cancer-specific gene expression in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:775-779
- 30 Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986;46:5276-5281
- 31 Lechanteur C, Princen F, Lo Bue S, Dertoz B, Fillet G, Gielen J, Bours V, Merville MP. HSV-1 thymidine kinase gene therapy for colorectal adenocarcinoma-derived peritoneal carcinomatosis. *Gene Ther* 1997;4:1189-1194
- 32 郭善禹, 顾琴龙, 朱正纲, 尹浩然, 林言箴. TK 基因 /9- 丙氧鸟苷联合 mGm - CSF 基因治疗胃癌. *中华实验外科杂志* 2000;17:297-299
- 33 Tanaka T, Yamasaki H, Mesnil M. Stimulation of intercellular communication of poor-communicating cells by gap-junction-competent cells enhances the HSV-TK/GCV bystander effect in vitro. *Int J Cancer* 2001;91:538-542
- 34 Agard C, Ligeza C, Dupas B, Izembart A, El Kouri C, Moullier P, Ferry N. Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis. *Cancer Gene Ther* 2001;8:128-136
- 35 王毅, 胡志前, 徐学俊, 王元和, 王强, 孔宪涛. 逆转录病毒介导的 HSV - TK 基因系统对人胃癌细胞的转染及杀伤作用. *第二军医大学学报* 2001;22:328-330
- 36 Yoshida K, Kawami H, Yamaguchi Y, Kuniyasu H, Nishiyama M, Hirai T, Yanagihara K, Tahara E, Toge T. Retrovirally transmitted gene therapy for gastric carcinoma using herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer* 1995;75:1167-1471
- 37 Tanaka T, Kanai F, Okabe S, Yoshida Y, Wakimoro H, Hamada H, Shiratori Y, Lan K I, Shitobi M, Omata M. Adenovirus mediated prodrug gene therapy for carcinoma embryonic antigen producing human gastric carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1996; 56:1341-1345
- 38 于波, 李世拥, 安萍, 陈钢, 蔡惠云, 郭文华. 腺病毒介导 HSV - tk 联合野生型 p53 基因对直肠癌细胞的杀伤作用. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001;8:69
- 39 Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo LC. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996;56:3758-3762
- 40 顾琴龙, 郭善禹, 朱正纲, 尹浩然, 林言箴. TK 基因联合白介素 - 2 / 粒、巨噬细胞集落刺激因子基因治疗胃癌的实验研究. *中华消化杂志* 2001;21:138-141



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

