

文章编号: 1001-098X(2004)02-0074-04

· 放射医学 ·

对乏氧和射线应答的嵌合性基因启动子的研究进展

郑爱青 于金明

摘要 介绍两种应用射线和乏氧应答启动子调节的 GDEPT (定向基因酶前体药物治疗) 系统。用治疗性、条件性或肿瘤特异性启动子控制 GDEPT 是一种控制靶基因在肿瘤内表达的方法。通过选择性启动子, 使基因靶向肿瘤内表达, 提高特异性和靶向性, 解决了肿瘤基因治疗中的主要限制。

关键词 放射治疗; 基因治疗; 肿瘤;

中图分类号 Q691, R730.55 **文献标识码** A

Development of chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation

ZHENG Ai-qing, YU Jin-ming

(Basic Research Center, Shan dong Tumor Hospital, Jinan 250117, China)

Abstract We describe two systems that make use of gene-directed enzyme prodrug therapy, regulated by radiation or hypoxic-responsive promoters. The use of treatment-, condition- or tumor-specific promoters to control gene-directed enzyme prodrug therapy is one such method for targeting gene expression to the tumor. The development of such strategies that achieve tumor targeted expression of genes via selective promoters will enable improved specificity and targeting thereby addressing one of the major limitations of cancer gene therapy.

Key words radiotherapy; gene therapy; tumor

放疗是治疗肿瘤的主要手段之一, 但由于周围正常组织对射线的耐受性问题限制了放疗剂量, 影响了肿瘤治疗效果。这一问题可部分通过物理技术如适形调强放疗克服; 另一方法是放疗与药物或基因治疗联合, 提高射线对肿瘤的杀伤性。虽然基因导入尚缺乏特异性和肿瘤靶向性, 妨碍了基因治疗功效, 但新的方法正在逐步克服这些缺点。本综述描述选择性靶向肿瘤的两个不同策略: 一是通过射线介导, 二是通过乏氧介导。两者都利用选择性基因启动子, 激活定向基因酶前体药物治疗 (gene-directed enzyme-prodrug therapy, GDEPT) 系统, 辅助放射治疗。

1 射线应答的启动子

放射线介导的基因治疗是指射线照射肿瘤后, 激活肿瘤内的治疗基因, 增加基因治疗的靶向性, 提高肿瘤细胞对射线的敏感性, 实现基因表达的时空调控。细胞受电离辐射后, 上调某些细胞周

期控制基因和 DNA 修复基因 (如 p21^{WAF1/CIP1} 和 Egr-1) 的表达。这些基因中, 许多 (如 WAF1 和 GADD45) 以 p53 依赖的方式起作用, 因而在仅表达突变型 p53 的肿瘤中不能有效发挥作用。但是, Egr-1 基因的激活不依赖于 p53, 它的启动子被用来调节治疗基因表达。

现已知 Egr-1 启动子的射线应答区域是一个序列为 CC(A/T)₆GG 的 10 个核苷酸基序, 又称为 CArG 元件, 但似乎只有集中在 5' 增强子区域的 CArG 元件有助于 Egr-1 的射线应答。CArG 元件在致有丝分裂原刺激后参与多种立早基因 (如 Egr-1, c-fos, β -actin) 的调节, 因而经常被称为血清应答元件。人类和鼠 Egr-1 启动子还包含 Sp1 转录因子、Fos-Jun 异源二聚体 AP-1 (激活蛋白 1) 及 Egr-1 本身假定的结合位点, 这表明多种因素对 Egr-1 的应答有影响。

为产生没有潜在的拮抗结合位点的射线应答启动子, Marples B 等^[1]以孤立的 CArG 元件为基础构建了合成启动子, 这些启动子由一个包含 CArG 元件本身的增强子区域构成, 邻近一个包含

基本转录始动装置如 CCAAT/TATA 盒的基础启动子, 他们将在质粒载体中合成的启动子置于 EGFP (增强的绿色荧光蛋白) 报告基因编码序列的上游, 用构建的质粒转染 MCF-7 乳腺癌细胞和 U87-MG 胶质瘤细胞, 射线处理后用流式细胞仪测 EGFP 产物。结果显示, 包含 4 个 CA_RG 元件的合成启动子对低至 1Gy 的射线剂量产生应答; 在最适剂量 3Gy, CA_RG 元件对射线应答的敏感性较野生型 Egr-1 对照组高 (Egr-1 1.86±0.2 倍, CA_RG 3.1±0.2 倍); 用 3Gy 重复照射后, 诱导表达水平较单次剂量增高; 总剂量相同分割照射 (2×5Gy 和单次 10Gy, 5×1Gy 和 5Gy) 时, 在 U87-MG 和 MCF-7 细胞 GFP (绿色荧光蛋白) 表达水平增加。这些资料都显示, 合成启动子通过分割照射能被重复激活, 这在临床上对获得治疗基因的高表达水平是很重要的。实验也比较了包含 CA_RG 元件不同数目、顺序和排列的启动子对射线的应答性: 启动子中 CA_RG 元件数目增多, 使特异性射线应答提高和基础表达减少; CA_RG 元件核心序列不同, 也显著影响应答; 参与诱导的转录因子空间排列似乎也影响这些蛋白或蛋白复合体与 CA_RG 元件的结合。

为确保 CA_RG 启动子在中等剂量射线诱导后能够长期、高水平地表达治疗基因, Scott SD 等^[2]设计了一个新的分子开关系统——Cre/LoxP 系统, 它是一噬菌体 P1 源性的位点特异性重组酶系统^[3]。在这一系统中, Cre 重组酶催化 34bp 的 LoxP 识别序列间的重组, 通过基因打靶, LoxP 位点被整合到起关键作用的外显子而不影响正常基因功能, Cre 重组酶在选择性组织区域表达, 在 LoxP 位点间切割 DNA 片段, 使关键的外显子丢失, 随后使这一组织中基因功能丧失或获得新的基因功能。应用这一策略, 射线应答的启动子驱动 Cre 重组酶基因的表达, 通过 LoxP 位点介导的重组, 依次激活转录沉默的肿瘤敏感基因。因此, 射线的单次激活剂量通过强的 CMV (巨细胞病毒) 启动子诱导 HSVtk (单纯疱疹病毒胸苷激酶) 基因表达, 使激活信号强烈放大。在用 EGFP 报告系统的双质粒转染试验中, 证实照射后与未受照射的对照组相比, 荧光细胞数目增加 8.2 倍 (±1.2), 这些细胞的荧光强度较 CA_RG 启动子直接调节 EGFP 表达的细胞 (没有 Cre/LoxP 开关) 平均增加 15 倍, 与合成启动子直接调节 EGFP 表达约有 3.1±0.25 倍

相比, 此开关诱导 EGFP 产量约增加 40 倍。现已设计出在单一载体中应用这一系统, 避免了每个肿瘤细胞必须靶向两个载体。必要的次级启动子 (如 CMV 启动子) 的应用也确保治疗基因在射线照射结束后仍在肿瘤内继续表达, 因为这一系统有两个控制基因启动子, CMV 启动子可被肿瘤性、组织性、条件性或微环境特异性启动子所代替, 使其特异性、选择性和安全性更高。

2 乏氧应答的启动子

乏氧影响放疗对人类肿瘤的治疗效果。乏氧组织对射线的抗拒, 部分是由于射线介导的氧自由基不能完全杀灭肿瘤细胞, 也可能是乏氧环境直接诱导基因表达改变。除了设计克服乏氧抗拒的治疗策略, 很多研究小组选择利用肿瘤的乏氧特性获得治疗效益。细胞乏氧的适应性应答涉及多种控制过程蛋白合成的调节, 如葡萄糖动态平衡, 血管生成, 血管渗透性和炎症, 包括 PGK-1 (磷酸甘油酸激酶 1)、EPO (红细胞生成素)、LDHA (乳酸脱氢酶 A)、VEGF (血管内皮细胞生长因子) 和 iNOS (诱导型一氧化氮合酶)。控制氧应答基因表达的 DNA 调节元件已被确定, 并涉及特异性结合和被各种诱导性的、磷酸化依赖的和/或氧化还原敏感的转录因子转录激活, 这些调节元件包括 HIF-1 (乏氧诱导因子 1)、AP-1 (激活蛋白 1)、NF-κB (细胞核因子 κB)、p53 和热休克转录因子等。已有的研究表明, 只有 HIF-1 是特异性氧应答性的, 而其他的转录系统通过相关的氧化还原作用和代谢改变可能有助于乏氧的应答。

HIF-1 的亲水性纯化和分子克隆显示, 它包含两个基本的螺旋-环-螺旋蛋白 HIF-1α 和 HIF-1β, 以异源二聚体发挥作用。虽然这两个亚单位都被表达, 但 HIF-1α 是乏氧调节成分, 通过特异性结合 HRE (乏氧应答元件), 起到调控基因的目的。HRE 是包含核心序列 5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3' 的增强子, 在几个乏氧调节基因中, 它的编码区长度和方向不同。HRE/HIF-1 调节系统是哺乳动物细胞和人类组织所共有的, HIF-1α 亚单位在 68% 的肿瘤中过表达^[4]。不同组织起源人类肿瘤中, HIF-1 的高频率表达提示乏氧环境中可用 HRE 控制基因治疗。已经显示被鼠 PGK-1 HRE 调节的标志基因表达在乏氧肿瘤细胞中可被

诱导。Greco O 等^[5] 近来评价了包含射线应答的 CArG 元件与 HRE 联合的嵌合性启动子的功能。他们用包含来自 Epo、PGK-1 和 VEGF 基因的 HRE, 与来自 Egr-1 基因、对电离射线应答的 CArG 元件构建新型嵌合性启动子调节基因表达, 结果, 这些构建的双增强子在单用射线或乏氧或两种刺激均存在时都发挥作用, 并对人类 T24 膀胱癌和 MCF-7 乳腺癌细胞选择性控制标志基因表达; 包含 HRE 和 CArG 元件的增强子能对这两种触发因素应答, 并证明 Epo HRE/CArG 联合应答性最强。通过选择性增敏表达 HRP (辣根过氧化物酶) 的乏氧和/或受照细胞, 在前体药物吲哚-3-乙酸存在时, Epo HRE/CArG 能有效控制自杀基因治疗策略。这些资料提示, 在肿瘤微环境内, 在解决放疗中乏氧问题的基因治疗策略中, 嵌合性启动子可望有效调节治疗基因表达。

3 新型启动子调控的 GDEPT 的效应

肿瘤治疗的主要目的之一是使细胞毒性剂以选择性和特异性方式靶向肿瘤细胞, 避免对正常组织造成损害^[6]。用自杀基因治疗或 GDEPT, 将基因导入所编码的酶, 激活非毒性药物前体变为细胞毒性剂, 利用正常细胞和肿瘤细胞间的转录差异, 使自杀基因选择性表达。Marples B 等^[1] 用 GDEPT 途径来证明激活的 CArG 启动子的潜力, 这一途径由 HSVtk/GCV 自杀基因系统和一个肿瘤细胞生长抑制分析组成。HSVtk/GCV 系统最近已被用于临床试验中, 是酶/前体药物联合在肿瘤 GDEPT 最好的例子。Springer CJ 等^[7] 认为, HSVtk/GCV 的杀伤效应仅对增殖细胞有效。在增殖细胞中, HSVtk 可单磷酸化 GCV, GCV 进一步被细胞激酶磷酸化, 引起 DNA 合成终止和细胞死亡。因此, HSVtk/GCV 系统特别适合于杀灭侵袭到非增殖性组织 (invading non-proliferating tissue) 中快速分裂的肿瘤细胞。但是, HSVtk/GCV 对靶向实体瘤中分裂慢的乏氧细胞没有联合选择性, 而乏氧细胞是人类肿瘤对放化疗抗拒的原因之一。

用 GDEPT 选择性增强射线介导的毒性作用已在体外和体内证实, 射线照射和基因治疗有某种程度的协同作用^[8]。通过旁观者机制, 转染 HSVtk 细胞邻近的非转导细胞也可被杀灭。有人认为, 这一旁观者机制部分由于毒素分子通过缝隙连接

扩散所致; 也有人认为, 在体内宿主免疫系统增强这一效应。旁观者效应对前体药物介导的基因治疗非常重要, 因为即使最有效的转导系统也不能靶向肿瘤中所有细胞。研究者曾注意到在 GCV 存在时, 只要 10% 的黑色素瘤培养细胞表达 HSVtk, 就可杀灭培养基中所有的肿瘤细胞。而且, 在动物模型已经显示, 只要 10% 的肿瘤细胞产生 HSVtk 时, 肿瘤就显著退缩。

Marples B 等^[1] 将含 CArG 的载体 (约 20% 细胞) 转染肿瘤细胞在含有 GCV (50 μ mol/L) 的培养液中生长, 单次剂量 2Gy 照射后, 细胞生存率降至约 70%, 而对照组为 90%。如果这一结果被转化成临床治疗剂量, 70Gy 的治疗剂量 (2Gy \times 35 次), 到达肿瘤的量将几乎是 100Gy。他们也在 MCF-7 乳腺癌移植瘤模型中评价合成的射线应答启动子的潜力: 用含有 4 个 CArG 元件及受其调控的 HSVtk 基因的质粒转染 MCF-7 细胞, 通过 G418 选择和克隆, 建成被修饰的细胞系并进而建立裸鼠移植瘤模型, 用 X 线照射肿瘤, 3 Gy/d, 共 3d, 在照射前 2d、照射中和照射后 3d 腹腔注射 50 μ mol/L GCV, 以使肿瘤达到 500mm³ 所需要的时间评价处理效果。结果显示, GCV 联合射线照射治疗与单用 GCV 或射线治疗相比, 肿瘤生长明显延迟。尽管该研究规模尚小, 但清楚地证实了合成的射线应答启动子在体内能发挥作用。他们也研究了用细胞内转运蛋白 (HSV 蛋白 vp22) 增强旁观者效应的作用。vp22 是有效的细胞内转运子, 能够转移到相邻细胞和移位到靶细胞的核内。嵌合性 vp22/EGFP 基因的融合蛋白产物在初始转染者周围被有效输出到 200 个细胞的核内, 嵌合性 vp22 蛋白能在多种细胞系发挥作用, 运输修饰细胞的蛋白对射线损伤产生应答。Dilber MS 等^[9] 用保持酶活性的 vp22/HSVtk 融合蛋白证实了这一主动转运。他们用 vp22/HSVtk 转导没有缝隙连接的成神经纤维瘤细胞, 用 GCV 处理后能诱导有效的细胞杀灭效应, 说明 vp22 转运不依赖于细胞间连接。这一发现使它在肿瘤细胞中的应用特别有吸引力, 因为, 通常认为在肿瘤细胞中细胞间连接是受损的。vp22/EGFP 蛋白可从转染质粒的细胞输出到它相邻的细胞, 使这些细胞发出的荧光被镜检发现。当 EGFP 基因被 HSVtk 代替时, 转染 vp22/HSVtk 的细胞, 肿瘤细胞杀灭效应较单用

HSVtk增加5倍。因而, vp22蛋白的应用可能解决了基因导入的重要问题。

4 其他基因治疗途径

放疗已经和多种基因治疗策略联合。Rogulski KR等^[10]用包含胞嘧啶脱氨酶(CD)/HSVtk融合基因和有完全复制能力的细胞溶解性腺病毒三模型途径与放疗联合, 增强其抗肿瘤活性, 证实放疗、溶解病毒治疗和双自杀基因治疗联合, 在实验性C33A宫颈癌移植瘤模型中可望产生显著的肿瘤抑制作用。

Cunningham S等^[11]用操纵钠和碘的同向转运基因增加放射性标记的碘在体外球形体模型中的摄取, 这些膜转运子蛋白的过表达增加了¹³¹I-间碘苄胍治疗神经纤维瘤和吸碘的分化型甲状腺肿瘤的选择性。基因治疗也被用于减少射线对正常组织造成的损伤, 如Epperly MW等^[12]对负荷32D-v-abl细胞的正位胸部肿瘤的鼠放疗前气管内注射含有人类SOD2(超氧化物歧化酶2)转基因的载体, 预防被转导的组织受射线诱导的损害, 显示与DNA损伤有关的细胞因子白细胞介素-1、肿瘤坏死因子、干扰素诱导因子和 γ -干扰素mRNA显著减少, 并减少鳞状层细胞的凋亡、微小溃疡和食管炎, 减少射线诱导的气管狭窄和晚期肺纤维化, 这些放疗和基因治疗联合应用的实验说明其正在被广泛研究。

归根结底, 基因治疗的成功有赖于将基因切实地导入到肿瘤位置, 而在未来肿瘤基因治疗中, 这些提供精确的靶向肿瘤的策略或载体的发展将可望起重要作用。

参考文献

- [1] Marples B, Scott SD, Hendry JH, et al. Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 511-517.
- [2] Scott SD, Marples B. Comment on the use of the cre/loxP

recombinase system for gene therapy vectors [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(19): 1706.

- [3] Kaspar BK, Vissel B, Bengoechea T, et al. Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 9(4): 2320-2325.
- [4] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [5] Greco O, Marples B, Dachs GU, et al. Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(20): 1403-1411.
- [6] Fillat C, Carrio M, Cascante A, et al. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application [J]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(1):13-26.
- [7] Springer CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1161-1167.
- [8] Patterson AV, Saunders MP, Greco O. Prodrugs in genetic chemoradiotherapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(26):2131-2154.
- [9] Dilber MS, Phelan A, Aints A, et al. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(1): 12-21.
- [10] Rogulski KR, Wing MS, Paielli DL, et al. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(1): 67-76.
- [11] Cunningham S, Boyd M, Brown MM, et al. A gene therapy approach to enhance the targeted radiotherapy of neuroblastoma[J]. *Med Pediatr Oncol*, 2000, 35(6): 708-711.
- [12] Epperly MW, Gretton JA, DeFillippi SJ, et al. Modulation of radiation-induced cytokine elevation associated with esophagitis and esophageal stricture by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome(SOD2-PL) gene therapy [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1): 2-14.

收稿日期: 2003-12-11)

本期参与审稿的专家和学者名单: 高硕, 秦岚, 赵军, 黄峻, 刘庆伟, 林祥通, 于金明, 张良安, 康增寿, 卢倜章, 杨天恩, 鞠桂芝, 李修义。