

单纯疱疹病毒胸苷激酶自杀基因显像研究进展

邢岩 赵晋华

【摘要】 自杀基因治疗是将来自病毒或细菌的自杀基因转染肿瘤细胞、编码特定的酶类,使无毒性的前体药物转化为细胞毒性代谢产物,从而导致肿瘤细胞死亡。利用放射性核素标记的探针可以显示自杀基因在体内的生物学特性,起到基因治疗的监测作用,其中研究最多的是单纯疱疹病毒胸苷激酶自杀基因显像。

【关键词】 基因, 自杀; 单纯疱疹病毒属胸苷激酶; 放射性核素显像

【中图分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)05-0268-03

The development of herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene imaging

XING Yan, ZHAO Jin-hua

(Department of Nuclear Medicine, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

【Abstract】 Suicide gene treatment of tumor catches more and more attention in recent years. Cells transferred with suicide gene from virus or bacteria will express specific enzymes and transform innocuous prodrugs into highly toxic chemotherapeutic drugs. As a result, the cells will be killed. Radionuclide labeled probe can display the biologic characteristics of suicide gene in vivo. This article reviews the development of HSV-tk gene imaging.

【Key words】 Gene suicide; Simplexvirus; Thymidine kinase; Radionuclide imaging

在一些病毒、细菌或真菌中存在哺乳动物细胞没有的酶,这些酶能将无毒或低毒的前体药物催化变成强毒药物。由于人体细胞中缺乏催化前体药物的酶系统,所以前体药物只在被转染了自杀基因(即药物敏感基因)的肿瘤细胞中被激活,而不损害正常细胞。自杀基因治疗就是把这种基因转入肿瘤细胞,使肿瘤细胞具有对前体药物代谢敏感性。当自杀基因转入肿瘤细胞内时,前体药物对患者治疗所产生的毒性被限定在转化细胞及其微环境中,而不产生显著的系统毒性。另外,自杀基因还可通过旁观者效应杀死邻近转染细胞的未转染肿瘤细胞。研究发现,旁观者效应在缝隙连接或细胞通道较多的肿瘤细胞中更为明显^[1-3]。

目前人们发现的自杀基因主要包括:单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)基因、胞嘧啶脱氨酶基因、水痘带状疱疹病毒胸苷激酶基因、大肠杆菌硝基还原酶基因、大肠杆菌鸟苷-黄嘌呤磷酸核糖基转移酶基因

和大肠杆菌脱氧核糖基因等。其中研究最多的是 HSV-tk 基因。

1 自杀基因介导肿瘤靶向治疗

HSV-tk 基因编码的胸苷激酶不仅可磷酸化胸腺嘧啶,而且能磷酸化嘌呤戊糖苷以及不能被细胞内激酶磷酸化的多种核苷类似物,如无环鸟苷和尿嘧啶衍生物。无环鸟苷以及尿嘧啶衍生物被胸苷激酶磷酸化为一磷酸盐,进而被细胞内激酶磷酸化为二磷酸盐和三磷酸盐,三磷酸盐能抑制 DNA 聚合酶,从而阻断细胞 DNA 合成,利用 HSV-tk 基因这个特点将其作为自杀基因转染肿瘤,配合应用无环鸟苷或尿嘧啶衍生物可治疗肿瘤。研究表明,HSV-tk 基因可有效治疗前列腺癌、卵巢癌和黑色素瘤等^[4]。

2 基因显像

基因显像是利用放射性核素标记的探针,在 DNA、mRNA 或蛋白质水平上无创伤性地显示生物体内基因及其表达产物的功能及动力学,并进行临床诊断或疗效评价。通过基因监测可了解基因转导是否成功;定位于靶组织的基因分布是否均匀;靶

作者单位: 200080, 上海交通大学附属上海市第一人民医院核医学科

通讯作者: 赵晋华(E-mail:zjh1963@gmail.com)

细胞中基因表达能否达到最佳疗效水平; 确定最佳给药时间以及二次给药时间。用放射性核素标记的探针注入接种转染自杀基因肿瘤细胞的动物体内, 经 SPECT 或 PET 可以反映自杀基因转导效率、生物体内分布及动力学变化, 为治疗方案的制订、随访及预后评估提供有用的信息。目前, 用于 HSV-tk 基因显像的探针主要有以下几种。

2.1 ^{18}F -FHGP 和 ^{18}F -FHBG

9-[3- ^{18}F -1-羟基-2-丙氧基]甲基] 鸟嘌呤 (9-[(3- ^{18}F -fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl] guanine, ^{18}F -FHGP) 与环氧鸟苷的代谢以及生物学性质非常相似, 用 ^{18}F -FHGP PET 监测 HSV-tk 基因治疗, 发现 ^{18}F -FHGP 在表达 HSV-tk 的 C6 鼠神经胶质瘤细胞株以及接种了该肿瘤细胞的大鼠中均有明显摄取; 进一步的研究还发现, ^{18}F -FHGP 是通过嘌呤核苷酸转运途径进入细胞内的^[8]。

9-(4- ^{18}F -3-羟甲基丁酰) 鸟嘌呤 (9-(4- ^{18}F -fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine, ^{18}F -FHBG) 是一种抗病毒的核苷类似物, 它能被病毒胸苷激酶迅速磷酸化而不被哺乳动物胸苷激酶磷酸化。Alauddin 等^[9]用 ^{18}F -FHBG 进行 PET, 研究 ^{18}F -FHBG 在转染了 HSV-tk 的人结肠癌 (HT-29) 细胞中的聚集和在体内的代谢: 体外实验显示, 在注入 ^{18}F -FHBG 后 1 h 和 5 h, 转染细胞的摄取量分别是未转染的野生型细胞的 31 倍和 71 倍; 体内试验显示, 注入 ^{18}F -FHBG 后 2 h 和 5 h, 转染的肿瘤细胞摄取量分别是未转染细胞的 4 倍和 13 倍, 2 h 和 5 h 靶/本底比值分别为 2~25 和 2~22, 再循环的 ^{18}F 标记代谢产物对 ^{18}F -FHBG 的生物学分布影响很小, 与 ^{18}F -FHGP 相比, 注射后 2 h ^{18}F -FHBG 的肿瘤/组织比值高得多。因此得出结论: ^{18}F -FHBG 能获得良好对比性的 PET 图像, 作为一种监测肿瘤基因治疗的放射性示踪剂, 前景良好。

2.2 ^{18}F -FACV、 ^{18}F -FGCV 和 ^{18}F -FPCV

^{18}F 标记的无环鸟苷衍生物例如 8- ^{18}F -无环鸟苷 (8- ^{18}F -fluoroacyclovir, ^{18}F -FACV)、8- ^{18}F -环氧鸟苷 (8- ^{18}F -fluoroganciclovir, ^{18}F -FGCV)、 ^{18}F -氟代 penciclovir (^{18}F -fluorinated penciclovir, ^{18}F -FPCV) 也可被 HSV-tk 磷酸化, 因此可作为 PET 显像剂用于 HSV-tk 基因显像。Iyer 等^[10]研究发现, FPCV 与 FACV 和 FGCV 相比有很多的优点, 在体外它被 HSV-tk 磷酸化成为一磷酸盐衍生物的速度是 ^{18}F -FACV 速度的 2 倍, 在

表达 HSV-tk 的细胞中 ^{18}F -FPCV 聚集的浓度比 ^{18}F -FGCV 高, 在小鼠血浆中比较稳定而且从血池中迅速清除; ^{18}F -FPCV 在表达 HSV-tk 的肿瘤组织中滞留量显著高于 ^{18}F -FGCV。

2.3 ^{18}F -FIAU、 ^{18}F -FMAU 和 ^{18}F -FFAU

研究显示, 2'-脱氧-2'- ^{18}F -5-碘-1- β -D-阿拉伯糖苷呋喃尿嘧啶 (2'-deoxy-2'- ^{18}F -fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosyluracil, ^{18}F -FIAU) 和 2'-脱氧-2'- ^{18}F -5-甲基-1- β -D-阿拉伯糖苷呋喃尿嘧啶 (2'-deoxy-2'- ^{18}F -fluoro-5-methyl-1- β -D-arabinofuranosyluracil, ^{18}F -FMAU) 作为探针比 ^{18}F -FHGP 和 ^{18}F -FHBG 更为敏感, 因为 ^{18}F -FIAU 和 ^{18}F -FMAU 在细胞内聚集的总量以及摄取比 (胸苷激酶阳性细胞/野生型细胞) 都高于 ^{18}F -FHGP 和 ^{18}F -FHBG^[11,12]。在脱氧尿嘧啶系列中, 除 2'-位上的氟外, 在 5'-位上再用一个氟取代能加强化合物抗病毒的能力, 因此 Alauddin 等^[13]合成了 2'-脱氧-2'- ^{18}F -5-氟-1- β -D-阿拉伯糖苷呋喃尿嘧啶 (2'-deoxy-2'- ^{18}F -fluoro-5-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyluracil, ^{18}F -FFAU), 将 ^3H -FFAU 和 ^{18}F -FFAU 用于转染 HSV-tk 基因的 HT-29 细胞体内和体外实验, 并且与 ^{14}C -FMAU 和 ^{18}F -FHBG 进行比较, 体内试验结果提示, ^3H -FFAU 在 HSV-tk 阳性肿瘤细胞中的摄取量是对照细胞的 8 倍, ^3H -FFAU 的肿瘤摄取量和靶/本底比值显著高于 ^{14}C -FMAU 和 ^{18}F -FHBG; 对接种 HT-29 肿瘤细胞的裸鼠进行 microPET 发现, ^{18}F -FFAU 在 HSV-tk 阳性肿瘤中的摄取显著高于对照组, 而且其他器官没有显著摄取。Choi 等^[14]还比较了 FIAU 的两种同分异构体作为 SPECT 显像剂的差别, 发现 ^{125}I -D-FIAU 在胸苷激酶阳性肿瘤细胞中的摄取量和靶/本底比值显著高于胸苷激酶阴性肿瘤细胞, 而 ^{125}I -L-FIAU 在胸苷激酶阳性肿瘤细胞中的摄取量和靶/本底比值与对照细胞相比无显著增高。

3 基因显像存在的问题

基因监测的成败与肿瘤中标志基因的表达水平、标志探针的敏感性和选择性有关。许多转运系统的转染效果仍不令人非常满意, 逆转录病毒转染率较高, 表达稳定, 但它对增殖活跃的细胞才有较高的转染率, 且在转染过程中可整合到宿主细胞中发生插入型突变和癌基因激活, 不适于介导人体内基因的转移; 腺病毒所携带的基因不整合到宿主细胞的染色体上, 且具有较高的转染率, 但表达不够

稳定。Frank 等^[19]用逆转录病毒作为 HSV-tk 载体转染 EL-4 淋巴瘤细胞,并接种于 C57Bl/6 小鼠建立了异系同基因模型,对小鼠给予环氧鸟苷全身治疗后发现转染的单克隆和多克隆肿瘤消失,然而随后又出现环氧鸟苷耐药病灶的复发,同时伴有转染基因插入后的突变或整个基因的丢失。通过染色体谱还证实了逆转录病毒融合的染色体整条丢失。因此得出结论,逆转录病毒介导自杀基因治疗的遗传学和实验胚胎学的不稳定性与肿瘤的生物特性、基因插入部位以及载体本身的局限性有关。

腺病毒取向杂乱而限制了其作为载体介导基因治疗的特异性,改变病毒取向的方法包括:在病毒库中选择特定的病毒,将短的目标肽或长的多肽连接区域插入病毒包被蛋白,将免疫球蛋白连接区域作为包被蛋白上基因融合位点,用单克隆抗体将载体与靶细胞相连,将病毒包被蛋白换成另一种能与宿主细胞结合的病毒的包被蛋白^[16]。

在腺病毒转染过程中,转基因的表达通常是短暂的,需要重复感染,因此改善基因表达十分重要。转基因序列的转录依靠细胞内以及 DNA 序列相关的因子,在构建转录靶向载体时,需要选择许多启动子、增强子、沉默子以及位点控制序列,因此需要理想的组织特异性启动子和调控序列。病毒载体的转录调节不是微不足道的,它需要重组基因的微调作用。例如巨细胞病毒启动子,尽管其特异性并不理想,但它能启动 HSV-tk 表达^[17]。

目前普遍认为,HSV-tk 的标志基质是通过多种细胞膜转运体特别是肽类转运体进入细胞的,因此 HSV-tk 的标志基质进入靶细胞不仅反映了酶的活性也反映了细胞膜的转运活动。选择理想的 HSV-tk 的标志基质作为探针并选择特异性的载体,既可以达到基因靶向治疗的目的,也可以通过显像监测基因表达情况和治疗效果。

参 考 文 献

- 1 Caroline JS, Ion ND. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1161-1167.
- 2 Burrows FJ, Gore M, Smiley WR, et al. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(1): 87-95.
- 3 Dilber MS, Gahrton G. Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Intern Med*. 2001, 249(4): 359-367.
- 4 Hasenburg A, Tong XW, Rojas-Martinez A, et al. Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(6): 839-844.
- 5 Ayala G, Wheeler TM, Shalev M, et al. Cytopathic effect of in situ gene therapy in prostate cancer. *Hum Pathol*, 2000, 31(7): 866-870.
- 6 Shalev M, Kadmon D, Teh BS, et al. Suicide gene therapy toxicity after multiple and repeat injections in patients with localized prostate cancer. *J Urol*, 2000, 163(6): 1747-1750.
- 7 Morris JC, Ramsey WJ, Wildner O, et al. A phase I study of intralesional administration of an adenovirus vector expressing the HSV-1 thymidine kinase gene (AdV.RSV-TK) in combination with escalating doses of ganciclovir in patients with cutaneous metastatic malignant melanoma. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(3): 487-503.
- 8 Buursma AR, van Dillen IJ, van Waarde A, et al. Monitoring HSVtk suicide gene therapy: the role of [(18) F] FHPG membrane transport. *Br J Cancer*, 2004, 91(12): 2079-2085.
- 9 Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, et al. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[18F] fluoro-3-hydroxy-methylbutyl) guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. *J Nucl Med*, 2001, 42(11): 1682-1690.
- 10 Iyer M, Barrio JR, Namavari M, et al. 8-[18F] fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. *J Nucl Med*, 2001, 42(8): 96-105.
- 11 Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, et al. Evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro-5-methyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil (FMAU) as a potential gene imaging agent for HSV-tk expression in vivo. *Mol Imaging*, 2002, 1(2): 74-81.
- 12 Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, et al. Direct comparison of HSV-tk PET imaging probes: FIAU, FHPG, FHBG. *J Nucl Med*, 2002, 43(8): 1072-1083.
- 13 Alauddin MM, Shahinian A, Park R, et al. Synthesis and evaluation of 2'-deoxy-2'-¹⁸F-fluoro-5-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosyluracil as a potential PET imaging agent for suicide gene expression. *J Nucl Med*, 2004, 45(12): 2063-2069.
- 14 Choi SR, Zhuang ZP, Chacko AM, et al. SPECT imaging of herpes simplex virus type1 thymidine kinase gene expression by [(123) I] FIAU. *Acad Radiol*, 2005, 12(7): 798-805.
- 15 Frank O, Rudolph C, Heberlein C, et al. Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood*, 2004, 104(12): 3543-3549.
- 16 Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 886: 158-171.
- 17 Shillitoe EJ, Noonan S. Strength and specificity of different gene promoters in oral cancer cells. *Oral Oncol*, 2000, 36(2): 214-220.

(收稿日期: 2005-11-08)