

- [12] Tai YT, Teoh G, Lin B, et al. Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage[J]. *J Immunol*, 2000, 165(11): 6347-6355.
- [13] Chang HW, Kim SY, Yi SL, et al. Expression of Ku80 correlates with sensitivities to radiation in cancer cell lines of the head and neck[J]. *Oral Oncol*, 2006, 42(10): 979-986.
- [14] Wilson CR, Davidson SE, Margison GP. Expression pattern of ku correlates with survival in carcinoma of the cervix[J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(12): 1702-1706.
- [15] Shintani S, Mihara M, Li C, et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(10): 894-900.
- [16] Kim SH, Kim D, Han JS. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16): 4012-4017.
- [17] Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6134-6139.
- [18] Nimura Y, Kawata T, Uzawa K, et al. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 2007, 30(6): 1477-1484.
- [19] He F, Li L, Kim D, et al. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative Ku70 fragment radiosensitizes human tumor cells under aerobic and hypoxic conditions [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 634-642.
- [20] Li GC, He F, Shao X, et al. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res* 2003, 63(12): 3268-3274.
- [21] Belenkov AI, Paiement JP, Panasci LC, et al. An antisense oligonucleotide targeted to human Ku86 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(20): 5888-5896.
- [22] 张捷, 杨贵贞, 大森繁成, 等. 反义 Ku80 在人肺癌细胞的表达及对放射线的敏感性研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(10): 694-696.

(收稿日期:2007-09-10)

## 恶性肿瘤的放射治疗联合基因治疗研究进展

田玥 苏成海

**【摘要】**放射治疗是恶性肿瘤治疗的常规手段之一,并早已用于临床。而基因治疗是一种新型的治疗方法,但由于肿瘤的形成是多因素、多基因参与的复杂过程,单纯基因治疗的效果并不理想。因此,放射治疗联合基因治疗是目前的研究热点,也将成为肿瘤治疗研究的重要方向之一。

**【关键词】**放射疗法; 基因疗法; 肿瘤治疗方案

**【中图分类号】** R730.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-4114(2008)01-0043-04

### Advancement of researches on the malignant tumor radio-genetic therapy

TIAN Yue, SU Cheng-hai

(Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

**【Abstract】** Radiotherapy is one of the routine methods of malignant tumor treatment and used in clinical many years, while gene therapy is one of the new therapy. But the formation of tumor is the complicated process effected by many factors and many genes. The effect of polygene therapy is not ideal. Therefore, radio-genetic therapy is the hot spot of the present study and will become one of the important direction of cancer therapy.

**【Key words】** Radiotherapy; Gene therapy; Antineoplastic protocols

放射治疗是肿瘤治疗的常规手段之一, 70%~80%的恶性肿瘤患者在治疗过程中需接受放射治疗。肿瘤对辐射不敏感或对辐射产生抗拒性, 是放

射治疗难以根治恶性肿瘤的主要原因之一。近年来, 随着对肿瘤发病分子机制及细胞生长调控机理研究的深入, 肿瘤基因治疗已取得一些令人振奋的成果<sup>[1]</sup>, 但针对单一环节的转基因治疗常常不能达到令人满意的治疗效果。Weichselbaum等<sup>[2]</sup>于

1994年提出肿瘤基因-放射治疗的新思路,其原理是将辐射诱导型基因的调控序列与肿瘤杀伤基因相耦联,转染肿瘤细胞,对肿瘤实施局部照射的同时诱导基因表达,通过射线与基因的双重作用杀伤肿瘤,以达到降低照射剂量、缓解正常组织损伤的目的。因此,将放射治疗与基因治疗相结合,将成为肿瘤治疗研究的重要方向之一。

## 1 免疫基因治疗与放射治疗的联合

人类肿瘤的免疫原性大多较弱,容易逃避机体的免疫监视,而且肿瘤细胞还会产生多种免疫抑制因子,抑制机体的细胞免疫和体液免疫。利用分子生物学技术将某些免疫相关因子基因转入细胞,使之在体内或肿瘤细胞中持续表达、刺激宿主自身的免疫功能或增加肿瘤细胞的免疫原性,从而可使机体免疫系统识别或杀伤肿瘤。将免疫基因治疗与放射治疗相结合,理论上在加强免疫因子的抗肿瘤免疫作用的同时给予快速的外照射放射治疗,可取得比单一治疗更佳的疗效。研究表明,放射治疗结合白细胞介素2 (interleukin2, IL-2)、IL-12和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等免疫因子基因治疗已取得较好的抗肿瘤效果<sup>[3,4]</sup>。

辐射诱导细胞因子基因表达最早是由 Sherman 等<sup>[5]</sup>发现的,研究证明,辐射除了引起哺乳动物 DNA 损伤,还能增加细胞因子的分泌,产生对肿瘤的杀伤效应。近年来对 IL-2、IL-12 基因治疗与放射治疗联合治疗肿瘤的研究发现,IL-2、IL-12 能增强细胞免疫并抑制远处肿瘤的生长;抑制血管生成的作用并可加强放射治疗的疗效;而放射治疗可杀伤肿瘤细胞,降低肿瘤细胞免疫逃逸,从而增强 IL-2、IL-12 基因治疗肿瘤的作用。Xian 等<sup>[6]</sup>为了证实非病毒载体介导的鼠 IL-2 (murine IL-2, mIL-2) 及 mIL-12 基因治疗联合 X 射线治疗 (X-ray therapy, XRT) 可以加强头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous-cell carcinoma, HNSCC) 鼠模型的基因治疗效果,采取随机对照实验,在无免疫活性的小鼠口底注射鳞状细胞癌 VII 细胞建立肿瘤模型,干预组分别给予 mIL-2、mIL-2+XRT、mIL-12、mIL-12+XRT、mIL-2+mIL-12、mIL-2+mIL-12+XRT、mIL-2 空载体、mIL-12 空载体、XRT、生理盐水,建立模型后第 6 日进行基因治疗,第 7 日给予 XRT,第 8 日杀小鼠并取肿瘤组织标本进

行酶联免疫法及细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 活性、免疫组化染色等分析,发现免疫基因联合放射治疗使小鼠肿瘤生长受抑制,体积明显缩小,疗效明显优于其他处理组;免疫基因联合放射治疗组小鼠脾细胞的培养上清液中可见干扰素  $\gamma$  水平的显著提高,并诱导产生特异性的 CTL 活性;免疫组化结果显示,免疫基因联合放射治疗的肿瘤组织中有大量 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 阳性淋巴细胞浸润,说明免疫基因治疗与放射治疗联合具有协同抗肿瘤作用,并诱导产生特异性肿瘤免疫反应。

## 2 抑癌基因与放射治疗的联合

p53 作为抑癌基因,是许多肿瘤中最常发生突变的基因之一。野生型 p53 能够抑制多种癌基因的转化活性,参与调控细胞周期 ( $G_1$  期阻滞),维持基因组稳定并诱导细胞凋亡;而突变型 p53 不但没有抑癌功能,还能够抑制野生型 p53 的活性,从而促进细胞的癌变。近年来的研究表明,野生型 p53 基因的表达对肿瘤放、化疗的敏感性也具有一定的影响,它可通过细胞周期阻滞或促进促凋亡基因 bax 的转录、抑制抑凋亡基因 bcl-2 的转录,从而增强肿瘤细胞对放、化疗的敏感性<sup>[7,8]</sup>。

1990年, Baker 等<sup>[9]</sup>首先将野生型及突变型 p53 基因导入 p53 基因缺失的人大肠癌细胞,发现野生型 p53 基因转染的细胞形成的克隆数比突变型 p53 基因转染的少 5~10 倍。近年来有研究表明,野生型 p53 基因的表达与放射治疗效果相关;腺病毒介导的 p53 基因转染肿瘤细胞系后可明显提高肿瘤的辐射敏感性,抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞  $G_1$  期阻滞及细胞凋亡<sup>[10]</sup>。张珊文等<sup>[11]</sup>进行了今又生 (Gendicine, 一种具有我国知识产权的重组人 p53 腺病毒注射液) 与放射治疗联合治疗 HNSCC 的相关研究,结果表明,今又生与常规放疗联用可明显增加疗效,比单纯放射治疗组提高了 2.3 倍,并且未发现其他剂量限制性毒性和不良反应。

## 3 自杀基因治疗与放射治疗的联合

目前,研究较多的为单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-TK) / 丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 自杀基因治疗体系,即酶药物前体基因治疗系统,其基本原理是将同时具有肿瘤杀伤和辐射增敏作用的基因导入肿瘤组

织,在对肿瘤实施局部放射治疗时,造成辐射和基因对肿瘤的联合杀伤作用,发挥放射治疗和基因治疗的各自优势以提高疗效并克服单独治疗时的不良反应。在HSV-TK/GCV作用系统中,TK能催化胸苷磷酸化,是DNA合成的关键酶之一。TK也可催化GCV,使GCV磷酸化为三磷酸GCV,而后者是一种潜在的DNA聚合酶抑制剂,与正常脱氧核糖核苷酸竞争,在参与DNA复制过程中掺入DNA链,阻碍DNA复制,抑制细胞分裂,导致细胞死亡。研究表明,HSV-TK基因具有辐射增敏作用<sup>[12]</sup>。目前认为HSV-TK/GCV系统增敏放射治疗的机理为:①HSV-TK/GCV系统通过产生局部高浓度磷酸化核苷酸类似物,促使DNA损伤、干扰DNA修复,从而增加DNA对射线的敏感性;②HSV-TK/GCV系统和射线分别作用于细胞周期中的S期及G<sub>2</sub>-M期,联合应用可提高疗效;③辐射产生的细胞膜损伤,可将核苷酸类似物传递到邻近非转染细胞,提高局部和全身的免疫反应,从而强化了基因治疗的“旁观者效应”<sup>[13]</sup>。人体正常组织细胞因不含HSV-TK而受影响较小。

Chhikara等<sup>[14]</sup>将前列腺癌RM-1细胞注射到C57BL/6鼠皮下,待肿瘤长至50~60 mm<sup>3</sup>,瘤内注射HSV-TK,而后每日2次腹腔内注射GCV,共6 d,注射基因载体48~72 h后,给予5 Gy的XRT;为建立转移瘤的模型,还将RM-1细胞注入鼠尾静脉,结果发现,HSV-TK/GCV系统联合放射治疗较单一治疗的肿瘤生长缓慢,荷瘤动物生存期延长,CD4<sup>+</sup>T细胞渗出增加以及肺转移瘤的发生率降低。其他研究也证实,自杀基因系统联合放射治疗与单一治疗相比疗效更显著,所需的病毒转染载体滴度、前体药物浓度及照射剂量均较单一治疗更低,并且有效减少了治疗中的不良反应<sup>[15]</sup>。故此种联合作为一种新型有效的抗肿瘤方法有望在未来的临床治疗中得到广泛应用。

#### 4 抗血管生成基因治疗与放射治疗的联合

抗血管生成基因治疗也能增强放射治疗的疗效。李勇等<sup>[16]</sup>用构建的血管生成抑制因子内皮抑素(pCMV-ssendostatin)的重组质粒转染了大鼠乳腺癌Walker2256细胞种植性肿瘤的动物模型,并联合放射治疗,结果显示,联合治疗组肿瘤的生长速率和质量均明显小于单纯基因治疗组或放射治疗

组,基因治疗能够明显促进放射治疗的抑瘤效果。内皮抑素作用的直接靶点为新生血管内皮细胞,内皮抑素是通过有效抑制肿瘤血管内皮细胞的生长,进而抑制肿瘤血管生长,阻滞血液供应而达到抑制肿瘤生长和转移的目的<sup>[17]</sup>。肿瘤内新生成的血管在结构和功能上是异常的,从而使肿瘤内乏氧,而抑制血管生成的基因产物可以通过消除过多的异常内皮细胞而使血管系统正常化,提高并正常化血管的功能,使血供相对提高,从而提高对放射治疗的敏感性。

#### 5 特异性启动子基因治疗与放射治疗的联合

在恶性肿瘤基因治疗多年的研究基础上,许多学者开始进行特异性启动子基因治疗的研究,以提高基因治疗的效果,并把它应用在辐射增敏的研究中。其中较常用的方法为:辐射诱导启动子、热诱导启动子及氧依赖性启动子的基因治疗。辐射诱导的启动子是近期采用的新方法,该方法是应用射线激活早期基因启动子,以启动下游治疗基因的转录、表达。早期生长效应因子1基因启动子在经射线照射后呈一过性表达,其表达水平呈照射时间依赖性和剂量依赖性。根据这些特性,可以选择特定的照射剂量来启动治疗基因的表达,从而进一步提高基因治疗的效率和安全性。早期生长效应因子基因启动子具有在辐射诱导下增强下游基因表达的特性<sup>[18]</sup>。国内外学者在早期生长效应因子启动子下游连接HSV-TK<sup>[12]</sup>,TNF<sup>[19,20]</sup>,干扰素 $\gamma$ <sup>[21]</sup>等不同基因,与放射治疗联合应用,均取得一定抑瘤效果。杨巍等<sup>[22]</sup>就将早期生长效应因子启动子与干扰素 $\gamma$ 结合构建重组质粒,研究其对肿瘤生长的抑制作用,并得出多基因、较少剂量放射治疗的抑瘤效果优于单基因、较大剂量放射治疗的结论。

#### 6 辐射保护性基因治疗与放射治疗的联合

射线虽然能够有效杀伤肿瘤细胞,但对其周围正常组织也有一定的损伤作用,从而限制了放射治疗的处方剂量。为了最大限度地增加肿瘤细胞的辐射杀伤效果,保护正常组织及器官处于正常耐受剂量范围内,采用正常组织导入辐射保护性基因,达到在有效治疗肿瘤的同时最大限度的保护邻近正常组织。其中研究最多的是锰超氧化物歧化酶基因,它是目前比较理想的辐射保护基因。1998年

Greenberger 等<sup>[23]</sup> 首先报道, 抑癌基因——锰超氧化物歧化酶基因转导后能避免辐射诱导的正常组织损伤。实验表明, 多药耐药 1 基因可使骨髓对化疗、化疗耐受性增加 10 倍, 因此可以用多药耐药基因导入人骨髓细胞, 使骨髓细胞能耐受多种化疗药物的抑制作用, 从而可加大化疗剂量, 使放、化疗的结合得以顺利进行。

此外, 在放射治疗时射线直接作用于 DNA, 引起 DNA 分子出现断裂、交联。放射治疗结束后, 这些受损的 DNA 分子会通过修复机制进行修复, 使受损伤的细胞得以存活, 如果阻断辐射损伤的 DNA 的修复, 则受损伤的细胞得不到修复而发生死亡或者凋亡, 从而抑制肿瘤增殖, 减少肿瘤的复发。转染的修复相关基因的表达产物可以与受损的 DNA 结合, 使修复程序不能正常进行, 受损伤的肿瘤细胞死亡<sup>[24]</sup>。

基因治疗联合放射治疗的实验研究已经取得了一定的成果, 其中某些方法已经进入临床试验, 但临床应用尚属起始阶段, 疗效有待进一步观察。总之, 基因治疗联合放射治疗能够提高肿瘤对放射治疗的敏感性, 减少肿瘤的复发和转移。

#### 参 考 文 献

- [1] Connell PP, Weichselbaum RR. Gene therapy: the challenges of translating laboratory research into clinical practice [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2230-2231.
- [2] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- [3] Seethram S, Staba MJ, Schumm IP, et al. Enhanced eradication of local and distant tumors by genetically produced interleukin-12 and radiation [J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(4): 769-773.
- [4] Gridley DS, Baer JR, Cao JD, et al. TNF-alpha gene and proton radiotherapy in an orthotopic brain tumor model [J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(2): 251-259.
- [5] Sherman ML, Datta R, Hallahan DE. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene [J]. *Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(15): 5663-5670.
- [6] Xian J, Yang H, Lin Y, et al. Combination nonviral murine interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy and radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 131(12): 1079-1085.
- [7] Haupt S, Haupt Y. Importance of p53 for cancer onset and therapy [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2006, 17(7): 725-732.
- [8] Mimeault M, Batra SK. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(1): 1-22.
- [9] Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53 [J]. *Science*, 1990, 249 (4971): 912-915.
- [10] Guha A, Mukherjee J. Advances in the biology of astrocytomas [J]. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17(6): 655-662.
- [11] 张珊文, 肖绍文, 刘长青, 等. 头颈鳞癌基因治疗结合放射治疗的临床研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(7): 426-428.
- [12] Tan PH, Chan CL, Chan C, et al. The evolving role of gene-based treatment in surgery [J]. *Br J Surg*, 2005, 92(12): 1466-1480.
- [13] Vlachaki MT, Chhikara M, Aguilar L, et al. Enhanced therapeutic effect of multiple injections of HSV-TK +GCV gene therapy in combination with ionizing radiation in a mouse mammary tumor model [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(4): 1008-1017.
- [14] Chhikara M, Huang H, Vlachaki MT, et al. Enhanced therapeutic effect of HSV-TK +GCV gene therapy and ionizing radiation for prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(4): 536-542.
- [15] 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.
- [16] 李勇, 金宁, 杨海山, 等. 内皮抑素基因联合放射治疗对大鼠 Walker2256 细胞种植性肿瘤的抑制作用 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25(6): 531-533.
- [17] 隋刚, 徐志飞, 孙耀昌, 等. 内皮抑素基因治疗对小鼠肿瘤组织内新生血管形成抑制作用的实验研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(12): 904-907.
- [18] Ma B, Bristow RG, Kim J, et al. Combined-modality treatment of solid tumors using radiotherapy and molecular targeted agents [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(14): 2760-2776.
- [19] Wu C, Li Xi, Tian M, et al. Effect of pEgr-TNF [alpha] gene radiotherapy on mice melanoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 15 (3): 185-190.
- [20] Quentin T, Henke C, Korabiowska M, et al. Altered mRNA expression of the Rb and p16 tumor suppressor genes and of CDK4 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2): 1011-1023.
- [21] Liu LL, Wang JH, Sun BS, et al. Combined IFN-gamma-endostatin gene-therapy and radio-therapy attenuates primary breast tumour growth and lung metastases in a murine model via enhanced CTL and NK cell activation and attenuated tumour angiogenesis: 9565 [J]. *Br J Surg*, 2006, 93(S3): 11-12.
- [22] 杨巍, 吴丛梅, 李修义, 等. pEgr-INF $\gamma$  重组质粒辐射诱导表达及其抑瘤作用的实验研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, 23(4): 238-240.
- [23] Greenberger JS, Bahri S, Jett J, et al. Consideration in optimizing radiation therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Chest*, 1998, 113 (1Suppl): 46-52.
- [24] Collis SJ, Ketner GW, Hicks JL, et al. Expression of the DNA-PK binding protein E4-34K fails to confer radiation sensitivity to mammalian cells [J]. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79(1): 53-60.