

# 基因治疗联合放射治疗恶性肿瘤的分子机制

翟红彦 苏成海

**【摘要】**放射治疗是恶性肿瘤治疗的常规手段之一,对放射治疗的耐受性是影响放疗疗效的主要障碍之一。基因治疗联合放疗代表了恶性肿瘤治疗的一种新方式,在一系列联合治疗的研究中发现,基因治疗可以提高肿瘤的辐射敏感性,减少肿瘤的复发和转移,改善放射治疗的疗效。该文综述肿瘤基因治疗联合放射治疗的有关分子机制。

**【关键词】**肿瘤;基因疗法;放射疗法;辐射耐受性

## Molecular mechanism of genetherapy combined radiotherapy for malignant tumor

ZHAI Hong-yan, SU Cheng-hai

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

**【Abstract】** Radiotherapy is one of the routine treatment methods for malignant tumor. Resistance to radiation is one significant obstacle to the curative effects of radiotherapy. Genetherapy combined with radiotherapy represents a new approach to cancer treatment. A series of studies about combination therapy found that genetherapy could enhance tumor radiosensitivity, reduce recurrence and metastasis, and improve effects of radiotherapy. Review the relevant molecular mechanisms of genetherapy combined radiotherapy for malignant tumor.

**【Key words】** Neoplasms; Genetherapy; Radiotherapy; Radiation tolerance

辐射敏感性是肿瘤临床治疗的重要内容,如何采用各种药物或生物学手段提高对放疗不敏感肿瘤的辐射敏感性从而提高放疗疗效,是目前研究的热点。基因治疗能在增强放疗效应的同时减少放疗的不良反应,基因治疗与放射治疗相结合是肿瘤治疗学领域中一种非常重要的发展趋势<sup>[1]</sup>。

### 1 p53 抑癌基因联合放射治疗

p53 抑癌基因是人类肿瘤中最常见的突变基因之一,对细胞分裂和增殖起负向调节作用,其编码的野生型 p53 (wild-type p53, wtp53) 蛋白为多功能的转录调节因子,参与辐射等原因引起的 DNA 损伤的修复、细胞周期进展(G<sub>1</sub>期阻滞)的调控和细胞凋亡过程的启动等。wtp53 基因发生基因改变即成为突变型 p53 (mutant-type p53, mtp53) 基因,该基因不但丧失了抑癌功能,还能促进细胞恶性转化。早在 1990 年, Baker 等<sup>[2]</sup> 首先观察到 wtp53

基因导入 p53 基因突变和缺失的人大肠癌细胞后,肿瘤细胞出现了明显的凋亡。近年来, p53 基因用于治疗各种恶性肿瘤的研究报道越来越多。

研究表明, wtp53 基因可通过抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞周期阻滞及细胞凋亡,从而增强肿瘤细胞对放疗的敏感性, wtp53 基因缺乏或 p53 基因产物功能异常均会导致放疗不敏感<sup>[3-5]</sup>。肖绍文等<sup>[6]</sup> 发现,腺病毒载体介导的 wtp53 基因转染 4 种胃癌细胞后有明显的辐射增敏作用,他们将人 wtp53 基因导入不同 p53 基因状态的 4 种人胃癌细胞系,在高效靶比病毒剂量下,外源 p53 基因在 4 种胃癌细胞的胞核中均高效表达,并可使细胞产生明显的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞与凋亡,使细胞存活份数明显减少,而且这种作用不依赖细胞内在的 p53 基因状态;单独照射 4 Gy,对 wtp53 基因细胞的生长抑制和致凋亡效应明显,而对其他 3 种不含 wtp53 基因的细胞作用较弱;照射 4Gy 结合腺病毒载体介导的 p53 基因时,外源 p53 基因可显著增强照射引起的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞与凋亡及生长抑制作用,对 4 种胃癌细胞放射增敏比高达 2.3~3.6。临床试验也发现,将 wtp53 基因与放疗相结合治疗非小细胞肺癌、头颈部鳞癌等,均显示明显的放疗增敏作用<sup>[7]</sup>。

## 2 负向调控共济失调-毛细血管扩张突变 (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) 基因联合放射治疗

共济失调-毛细血管扩张是一种罕见的基因突变性疾病,患者因缺乏正常 ATM 基因功能而导致细胞循环抑制功能障碍、DNA 修复缺陷和对电离辐射高敏感性。ATM 基因的产物是分子质量为  $350 \times 10^3$  的 ATM 蛋白,属于磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 超家族中的成员,参与细胞周期中各个调控点的调节,并在减数分裂过程中具有调节监控作用,是辐射损伤 DNA 修复过程中的关键基因,当细胞受到射线或其他细胞毒性物质的作用而发生 DNA 双链损伤时,ATM 蛋白被激活,通过下游的多个信号途径,最终发挥其促进 DNA 修复和细胞存活的作用<sup>[9]</sup>。

Fan 等<sup>[9]</sup>选择 p53 基因突变的前列腺癌细胞系 PC-3,分别用表达 ATM 基因反义 RNA 或表达  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的腺病毒转染,前者 2 d 内即表现出 ATM 蛋白表达减弱,与后者相比,接受射线照射后 S 期细胞周期检查点控制异常,辐射敏感性增强,表明 ATM 基因突变的前列腺癌细胞的辐射敏感性增加。Guha 等<sup>[10]</sup>用针对 ATM 基因功能区的反义 RNA 导入人胶质瘤细胞,使 ATM 蛋白表达减弱,p53 基因和 p21 基因表达增加,结果 ATM 基因受抑制的瘤细胞表现出辐射敏感性增加,反义 ATM 基因联合放疗有望成为一种新的治疗方案。

## 3 负向调控表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 基因联合放射治疗

EGFR 是癌基因 ErbB 编码的一种蛋白,属于 I 型酪氨酸激酶受体家族,在多种人恶性肿瘤细胞中有表达或高表达<sup>[11]</sup>,并能通过自分泌因子和旁分泌因子刺激肿瘤细胞的生长。ErbB 受体家族能够激活调控多条胞内信号转导途径,其中研究最多的主要是 Ras-Raf-MEK-ERK 途径和 PI3K 信号通路,从而参与调控细胞的增殖、分化、迁移等细胞反应,与肿瘤的发生、发展密切相关。

EGFR 抑制剂可增强放疗的敏感性,提高放疗的疗效,其原理是选择性增加如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 27 (cyclin-dependent kinase inhibitor

27, CDKI 27) 基因的表达,降低细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 的活性,从而诱导 G<sub>1</sub> 期阻滞,辐射则会引起 G<sub>2</sub> 期阻滞,二种治疗的联合可以使 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 期同时阻滞,使细胞修复能力下降,促进其死亡;此外,抑制 EGFR 还可以引起凋亡增加,血管形成减少<sup>[12-13]</sup>。Taira 等<sup>[14]</sup>研究表明,吉非替尼 (gefitinib, 一种 EGFR 选择性酪氨酸激酶抑制剂) 在半抑制浓度下使 8 种人食管癌细胞系产生一种剂量依赖抑制,且均显示细胞增殖的抑制,而吉非替尼联合放疗组则在 2 种细胞系中显示协同作用,增强了癌细胞的放疗敏感性,这种现象在另外 5 种癌细胞系中也有显现。由此可见,放疗诱导了 EGFR 自身的磷酸化,使得 Ras-Raf-MEK-ERK 途径、PI3K 等信号途径通过一系列级联反应也被激活,将信号转导至核内,引起 EGFR 过表达,抑制了癌细胞的凋亡,从而表现出对放疗反应的抵抗性;同时,蛋白质印迹法显示:吉非替尼可阻断上述信号转导途径,使得 EGFR 表达降低,增强对放疗的敏感性。Dobelbower 等<sup>[15]</sup>通过对 11 例食管癌患者的临床药物试验研究证实了 EGFR 抑制剂埃罗替尼 (erlotinib) 联合放、化疗应用的安全性和可行性。因此,应用针对 EGFR 的拮抗剂可增加辐射敏感性,提高放疗疗效,不仅可以作为治疗肿瘤的靶点,还可作为放疗增敏作用靶点<sup>[12-13]</sup>。

## 4 自杀基因 (suicide gene) 联合放射治疗

自杀基因又称为前药敏感基因,来源于某些病毒、细菌及真菌等,被导入肿瘤细胞后,其特异性表达的酶类能将原来对哺乳动物无毒或低毒的药物前体生成细胞毒性和(或)对放疗敏感的药物,选择性杀伤转染了该基因的肿瘤细胞;自杀基因还可通过旁观者效应和远程旁观者效应杀伤相邻的未转染自杀基因的肿瘤细胞并抑制远处肿瘤组织的生长,提高治疗效果。目前,研究较多的自杀基因有单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 基因/丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 系统和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶 (cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC) 系统。

HSV-TK/GCV 系统增敏放疗的机制为:①

HSV-TK/GCV 系统通过产生局部高浓度磷酸化核苷酸类似物, 此种类似物可以促使 DNA 损伤、干扰 DNA 修复, 从而增加 DNA 对射线的敏感性; ② HSV-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放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>[16]</sup>。人体正常组织细胞因不含 HSV-TK 而受影响较小。Chhikara 等<sup>[17]</sup>将前列腺癌 RM-1 细胞系注射到 C57BL/6 鼠皮下, 建立转移瘤的模型进行治疗, 结果发现, HSV-TK/GCV 系统联合放疗组较单一治疗组的肿瘤生长缓慢、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。

CD 基因只在真菌和某些大肠杆菌中存在, 编码 CD, 该酶可将胞嘧啶通过脱氨基作用转换成尿嘧啶, 使 5-FC 转化为 5-FU。5-FC 是一种治疗真菌感染的药物, 而 5-FU 是临床上常用的化疗药, 它可抑制细胞 DNA 和 RNA 合成, 从而杀死肿瘤细胞。Stackhouse 等<sup>[18]</sup>用 CD 基因重组的腺病毒载体转染 WiDrL 结肠癌细胞及动物模型, 再用 5-FC 和体外照射, CD/5-FC 能显著提高肿瘤对射线的敏感性, CD/5-FC 结合多次低剂量体外局部照射也能抑制肿瘤生长, 从而在放疗过程中减少放疗剂量, 减轻对机体的损伤。Freytag 等<sup>[19]</sup>用腺病毒介导的双自杀基因 (HSV-TK, CD) 进行前列腺癌的临床治疗研究, 也取得了不错的治疗效果。

## 5 p16 抑癌基因联合放射治疗

p16 基因是 CDKIs 中 CDKI 4 家族中的一员, 位于人类染色体 6P21, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码分子质量约为  $16 \times 10^3$  的 p16 蛋白, 能和细胞周期蛋白 D 竞争与 CDK4 结合, 抑制 CDK4 的活性, 使细胞不能从 G<sub>1</sub> 期向 S 期转换, 从而参与细胞周期的负向调控。当 p16 基因缺失、突变或表达不正常时, 不能竞争结合 CDK4, 则细胞周期蛋白 D 与 CDK4 结合增加, 刺激细胞分裂, 增殖失控, 导致了细胞的恶性增殖。

研究显示, p16 基因与多种肿瘤的辐射敏感性密切相关, 联合放疗可以增强肿瘤的辐射敏感性。张燕等<sup>[20]</sup>研究发现, p16 基因的表达与否, 对非

小细胞肺癌放疗的疗效有明显的影 响, p16 阳性表达的肿瘤患者对放疗的疗效明显好于 p16 阴性的患者, 表明 p16 基因的表达能明显增强非小细胞肺癌对放疗的敏感性。同样, p16 基因增强肿瘤细胞对放疗的敏感性已在鼻咽癌、喉鳞癌等细胞系中得到证实, 而且 p16 蛋白表达强度越强, 肿瘤对放疗的敏感性越高<sup>[21-22]</sup>。

## 6 选择性环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂联合放射治疗

COX-2 是催化花生四烯酸合成前列腺素的限速酶, 正常情况下在多数组织中不表达, 但可被广泛的血管外激活物如肿瘤坏死因子、射线等诱导表达。选择性 COX-2 抑制剂能够增强肿瘤细胞对射线的敏感性, 但具体机制还未被阐明, 可能通过以下 3 个方面来实现: ①诱导肿瘤细胞凋亡; ②抑制肿瘤新生血管生成; ③增强宿主的免疫活性。

Han 等<sup>[23]</sup>研究发现, 在人和鼠的细胞系中, COX-2 和 p53 蛋白相互作用, 与表达 COX-2 的细胞相比, 被敲除 COX-2 的细胞经 p53 基因诱导的凋亡明显增加; 进一步研究发现, 在 p53 基因阳性的细胞中, 由 DNA 诱导的细胞凋亡可以被 COX-2 抑制剂 NS398 所增强, 随着 p53 蛋白的增加, COX-2 的表达也相应增加, 从而减少前凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-x (L) 的表达, 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 以保护细胞抵抗 p53 基因所诱导的凋亡, 而这种保护作用可以被选择性 COX-2 抑制剂所逆转。目前研究结果表明, 选择性 COX-2 抑制剂主要通过抑制 COX-2 的活性, 进而减少前列腺素 E、血栓素 A2 等前列腺素的生成, 同时阻断 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子等的释放来抑制肿瘤新生血管的生成, 从而提高肿瘤细胞对放疗的敏感性。由于前列腺素具有免疫抑制作用, 可以抑制 T、B 细胞的分化和自然杀伤细胞的活化, 同时抑制肿瘤坏死因子及其他淋巴因子的释放, 放疗可能诱导肿瘤细胞 COX-2 产生前列腺素增多, 从而抑制细胞免疫和体液免疫, 促进肿瘤的生长。选择性 COX-2 抑制剂能减少前列腺素的产生, 减小它对免疫反应的抑制作用, 有助于增强机体的抵抗力, 抑制肿瘤的生长, 提高放疗的效果。

综上所述, 基因治疗联合放疗的实验研究已经

取得了一定的成果,其中某些方法已经进入临床试验,但总体来说临床应用尚属起始阶段,疗效有待进一步观察。相信随着研究的进一步深入、技术的更新和发展,基因增敏技术和现代放疗技术的结合必将为放射治疗发展开辟一个新天地。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Collis SJ, DeWeese TL. Enhanced radiation response through directed molecular targeting approaches. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(3-4): 277-292.
- [ 2 ] Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 1990, 249(4971): 912-915.
- [ 3 ] Haupt S, Haupt Y. Importance of p53 for cancer onset and therapy. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(7): 725-732.
- [ 4 ] Mimeault M, Batra SK. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis*, 2006, 27(1): 1-22.
- [ 5 ] Guha A, Mukherjee J. Advances in the biology of astrocytomas. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17(6): 655-662.
- [ 6 ] 肖绍文, 张珊文, 吕有勇, 等. 外源性 p53 基因对人胃癌细胞的放射增敏作用. *北京大学学报(医学版)*, 2001, 33(5): 427-431.
- [ 7 ] Moon C, Oh Y, Roth JA. Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5055-5067.
- [ 8 ] Lavin MF, Khanna KK. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(10): 1201-1214.
- [ 9 ] Fan Z, Chakravarty P, Alfieri A, et al. Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer cells to radiation. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(10): 1307-1314.
- [ 10 ] Guha C, Guha U, Tribius S, et al. Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors. *Gene Ther*, 2000, 7(10): 852-858.
- [ 11 ] Normanno N, Maiello MR, De Luca A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors(EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action?. *J Cell Physiol*, 2003, 194(1): 13-19.
- [ 12 ] Harari PM, Huang SM. Epidermal growth factor receptor modulation of radiation response: preclinical and clinical development. *Semin Radiat Oncol*, 2002, 12(3 Suppl 2): 21-26.
- [ 13 ] Harari PM, Huang SM. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol*, 2001, 11(4): 281-289.
- [ 14 ] Taira N, Doihara H, Oota T, et al. Gefitinib, an epidermal growth factor receptor blockade agent, shows additional or synergistic effects on the radiosensitivity of esophageal cancer cells in vitro. *Acta Med Okayama*, 2006, 60(1): 25-34.
- [ 15 ] Dobelbower MC, Russo SM, Raisch KP, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib, and concurrent 5-fluorouracil, cisplatin and radiotherapy for patients with esophageal cancer: a phase I study. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(1): 95-102.
- [ 16 ] 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. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(4): 1008-1017.
- [ 17 ] Chhikara M, Huang H, Vlachaki MT, et al. Enhanced therapeutic effect of HSV-tk+GCV gene therapy and ionizing radiation for prostate cancer. *Mol Ther*, 2001, 3(4): 536-542.
- [ 18 ] Stackhouse MA, Pederson LC, Grizzle WE, et al. Fractionated radiation therapy in combination with adenoviral delivery of the cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine enhances cytotoxic and antitumor effects in human colorectal and cholangiocarcinoma models. *Gene Ther*, 2000, 7(12): 1019-1026.
- [ 19 ] Freytag SO, Stricker H, Pegg J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed intermediate-to high-risk prostate cancer. *Cancer Res*, 2003, 63 (21): 7497-7506.
- [ 20 ] 张燕, 涂文勇. 非小细胞肺癌 p16 基因表达与放疗敏感性的关系. *临床肿瘤学杂志*, 2005, 10(6): 637-640.
- [ 21 ] 伍海军, 申良方, 肖华平, 等. 增殖细胞核抗原和 p16 蛋白表达与鼻咽癌放射敏感性相关性研究. *中国医师杂志*, 2007, 9(5): 619-621.
- [ 22 ] 付艳军, 刘世喜, 鲜均明. 外源性 p16 基因与放疗联合治疗喉鳞癌的实验研究. *四川大学学报(医学版)*, 2004, 35 (2): 209-211.
- [ 23 ] Han JA, Kim JI, Ongusaha PP, et al. P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53-or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J*, 2002, 21(21): 5635-5644.

(收稿日期: 2009-01-13)