

早期生长反应基因 1 启动子介导肿瘤基因-放疗的研究进展

郭睿 李彪

【摘要】 早期生长反应基因 1(Egr-1)启动子为 Egr-1 上游的顺式作用元件,其活性受电离辐射、自由基等诱导剂的调控。Egr-1 与治疗基因结合(如肿瘤坏死因子 α 基因、自杀基因等)构成基因-放疗治疗体系,利用辐射在肿瘤局部从时间、空间调控治疗基因的表达,使表达产物局限于肿瘤局部发挥肿瘤杀伤效应,并降低了不良反应。放射治疗与基因治疗的结合为肿瘤治疗提供了新方法。

【关键词】 基因表达调控;放射疗法;肿瘤;早期生长反应基因 1;启动区(遗传学)

The progress of tumor gene-radiotherapy induced by Egr-1 promoter

GUO Rui, LI Biao.

(Department of Nuclear Medicine, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 The promoter of early growth response gene-1(Egr-1) is a cis-acting element of Egr-1, and its activity is regulated by inducers such as ionizing radiation, free radical. In designated gene-radiotherapy system, radiation combined with therapeutic gene (such as tumor necrosis factor- α gene, suicide gene) can spatially and temporally regulate therapeutic gene expression in the irradiated field, produced a marked effect, while little systemic toxicities were observed. The combination of radiotherapy and gene therapy is promising in tumor therapy.

【Key words】 Gene expression regulation; Radiotherapy; Naoplasms; Early growth response gene-1; Promoter regions(genetics)

放射疗法是治疗恶性肿瘤的主要手段之一,近年来发展较快,但仍存在肿瘤辐射抗性和放疗对周边正常组织的一系列不良反应等问题。为优化治疗方案,基因治疗和放射治疗相结合的方法已成为研究热点,其含义是将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因导入体内,在对肿瘤实施局部放疗的同时诱导肿瘤杀伤基因的表达,形成射线和基因对肿瘤的双重杀伤作用。早期生长反应基因 1(early growth response gene-1, Egr-1)是一种即刻早期基因,其启动子可感受自由基、电离辐射等理化刺激,继而诱导自身及下游基因表达。将 Egr-1 与相应目的基因结合而构成辐射诱导基因表达调控系统,

为解决长期困扰肿瘤放疗的两个棘手问题——肿瘤的辐射抗性和受照部位周边正常组织的损伤开辟了新途径。

1 Egr-1 表达、功能、生物学分布及调控

人 Egr-1 定位于染色体 5q31.1 上,编码 3.3 kb 的成熟 mRNA。X 射线通过信号转导途径激活 Egr-1,表达相对分子质量为 $80 \times 10^3 \sim 82 \times 10^3$ 的磷酸化 Egr-1 蛋白。Egr-1 蛋白以锌指依赖方式与特异 DNA 序列(CGCCCCGC)结合,对基因转录进行调控。Egr-1 蛋白按功能划分为 3 个区域:1~280 位氨基酸残基为活化调节区;281~314 位氨基酸残基为阻遏调节区;315~330 位氨基酸残基为核定位信号区;331~426 位氨基酸残基形成锌指结构的指端,与被调控基因的相关序列结合而调节其转录;427~533 位氨基酸残基与配基激活有关^[1]。

Egr-1 在电离辐射、自由基等多种因素刺激下可快速、短暂表达,调节细胞生长;并且可以与靶基

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.04.004

作者单位:200025,上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科

基金项目:国家自然科学基金(81071181);上海市科委生物医药重点科技攻关项目(09431900900);上海市教委重点学科建设基金(S30203)

通信作者:李彪(E-mail:lb10363@rjh.com.cn)

因上特异结合位点作用, 调控不同靶基因的转录。Egr-1 的生物学功能主要是通过激活或抑制这些靶基因的表达来实现的^[2]。将 Egr-1 启动子与氯霉素乙酰转移酶报 CAT 告基因相连, 发现远端第 1、第 2 和第 3 个 CC(A/T)₆GG(CArG)元件缺失, 导致氯霉素乙酰转移酶的活性分别下降约 30%、60%、100%, 证实了 X 射线诱导的 Egr-1 转录由其启动子序列中的 CArG 元件介导。基因-放射治疗中, 多采用 Egr-1 启动子, 亦有采用 CArG 元件者; 对 Egr-1 的诱导多采用 X 射线, 也有采用放射性核素(如 ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁹Tc, ⁶⁷Ga)者。电离辐射对人工合成的 Egr-1 启动子的诱导作用较野生型强。此外, 利用增加 Egr-1 启动子中 CArG 元件的个数, 也可提高其对电离辐射的敏感性。

Egr-1 在正常成人脑、心脏、肺组织中高表达, 乳腺组织中亦有较高水平的表达, 其他组织呈低水平表达。Egr-1 基因是一种抑癌基因, 它通过 p53 基因介导凋亡起作用, 其持续表达阻断了血管生成和肿瘤生长, 所以在多种人类肿瘤中 Egr-1 表达减少或缺失^[3-4]。Parra 等^[5]发现, 在前列腺癌、肾母细胞瘤、胃癌中, Egr-1 呈高表达, 这便促进了血管的生成和肿瘤的转移。

2 Egr-1 启动子与治疗基因构成 X 射线辐射诱导基因表达调控系统

Egr-1 对靶基因的转录调控作用具有双重性: 对有些基因具有转录激活作用; 对另外一些基因则有转录抑制作用。对靶细胞中的 Egr-1 启动子进行辐射时, 基因产物呈时间性表达和空间性表达, 即时间调控和空间调控^[6]。时间调控是指 Egr-1 启动子可通过照射的时间长短进行辐射诱导表达; 空间调控是指在某些特定组织范围内用精确传递的射线激活 Egr-1 启动子而进行治疗基因的表达。X 射线辐射诱导基因表达调控系统的优越性在于辐射对 Egr-1 的诱导相对短暂, 多次、小剂量辐射可使正常细胞的损伤最小化, 又可多次诱导目的基因获得较高水平的持续表达, 且每次辐射剂量与临床放疗剂量接近, 易被临床接受。与其他方式比较, 基因-放射治疗具有许多优势: ①射线与基因不但均能杀伤肿瘤, 而且具有协同互补的作用, 能选择性增强局部肿瘤细胞对药物的敏感性^[7]; ②立体放疗技术将射线束准确地照射到肿瘤组织, 实现了对外

源基因表达的时间、空间调控, 放疗使局部表达的蛋白浓度大大提高, 与放疗作用叠加可明显降低肿瘤细胞对放疗的耐受性且不加重放疗对正常组织的损伤; ③利用亲肿瘤放射性核素作为诱导剂, 有望实现对转移性肿瘤的靶向协调治疗; ④辐射诱导调控机制可用于多种肿瘤, 易于临床推广。Egr-1 启动子与以下基因结合的研究较多。

2.1 Egr-1 启动子与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 基因的结合

TNF- α 能激活细胞免疫反应, 增加电离辐射的杀伤性。将 TNF- α 基因与 Egr-1 启动子相结合, 选择性地导致肿瘤内血栓形成、微循环破坏、肿瘤坏死, 但由于其存在不良反应(如发热、恶心等)限制了其治疗效果。如果通过合适的载体将 TNF- α 基因与 Egr-1 启动子结合而应用于基因-放射治疗系统中, 将发挥放疗和基因免疫治疗的多重作用。基因产物由于放射靶向性而局限于肿瘤局部, 既发挥细胞因子对肿瘤的治疗作用, 又使细胞因子的不良反应最小化。1994 年, Weichselbaum 等^[8]首次将 Egr-1 启动子与人 TNF- α 的 cDNA 结合构建成质粒 pEgr-TNF- α , 转染至对辐射有抗性的人鳞状细胞癌转移瘤内并给予 20 Gy 的放疗, 发现瘤内 TNF- α 水平较对照组高 2.7 倍, 而在荷瘤裸鼠的血清中未检测到 TNF- α , 并且肿瘤的生长明显受到抑制, 未观察到 TNF- α 的不良反应。

基因-放射治疗的临床试验中, 应用较多的是 TNFerade(adenovector, 一种可表达 TNF- α 的复制缺陷型腺病毒载体), 它由 Egr-1 启动子启动, 通过瘤内注射起作用^[9]。Senzer 等^[10]的临床试验结果显示, TNFerade 诱导放射治疗实体瘤的有效率为 70% (21/30); 测试其毒性和安全性发现, 最常见的不良反应是发热, 占 22%, 注射部位疼痛占 19%, 寒战占 19%等; 但无剂量限制性毒性。在鼠黑色素瘤转移模型及临床研究发现, 局部给予 TNFerade 可以通过宿主介导的反应来抑制原发性肿瘤的生长和转移^[11]。目前, TNFerade 已进入 III 期临床试验。

2.2 Egr-1 启动子与自杀基因的结合

自杀基因应用于肿瘤治疗的效果好, 但尚不能杀死全部肿瘤细胞, 然而自杀基因与放疗结合却能使部分肿瘤细胞完全消退。目前已有两种自杀基因用于临床试验: 胞嘧啶脱氧酶基因和单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase,

HSV-TK)基因,二者编码的酶分别对5-氟胞嘧啶和更昔洛韦敏感,具有良好的治疗效果。Kawashita等^[12]发现,Egr-1在正常肝细胞中不表达,而在肝癌细胞中高表达,Egr-1启动子的活性在肝癌细胞中呈辐射剂量依赖性,将pEgr-1-HSV-TK载体转染至裸鼠人肝癌细胞移植瘤中进行放疗,3周内肿瘤几乎消退,且无不良反应;同时发现,辐射使转入HSV-TK基因的靶细胞对更昔洛韦的敏感性提高了 $10^3\sim 10^4$ 倍,其原因可能是辐射激活了细胞内胸苷激酶对更昔洛韦的进一步磷酸化作用,从而抑制了DNA的合成,最终达到抑制肿瘤生长的目的。

2.3 Egr-1启动子与其他基因的结合

Hsu等^[13]利用细胞色素P450同工酶能将前体药物4-甘薯苦醇转变成毒性的烷基代谢物的原理,建立了基因-放射治疗系统,成功控制了药物毒性对正常细胞的损害。Scott等^[14]将携带有Egr-1启动子的造血生长因子基因载体转染骨髓基质细胞系,通过辐射诱导使得载体的表达明显提高。Jin等^[15]构建了pEgr-IL-18-B7.1质粒(一种共刺激分子,参与T细胞的激活,具有抗肿瘤的作用),联合放疗治疗黑色素瘤,使荷瘤小鼠机体的抗癌免疫效应大大增强。

考虑到实体瘤常处于缺氧状态,影响辐射调控序列的转录活性,需对低氧反应元件进行深入研究。低氧反应元件是介导细胞缺氧反应的重要调控序列,Greco等^[16]将低氧反应元件与Egr-1启动子偶联形成综合启动子,从而可以同时接受乏氧和电离辐射的诱导,调控下游基因表达,进行基因-放射治疗,更好地解决了恶性肿瘤乏氧细胞的辐射抗性,使目的基因在肿瘤的微环境中得到了更有效的表达,提高了疗效。

3 核素诱导 Egr-1 启动子

局部放射诱导的方法既可以是外照射,也可以利用放射性核素进行体内肿瘤局部照射,同时还可以诱导Egr-1启动子进行转录。Manome等^[17]利用腺病毒将Egr-1和半乳糖苷酶基因转染至鼠神经胶质细胞瘤内,分别给予2 Gy电离辐射和¹²⁵I-碘脱氧尿苷处理,结果显示两种方法均能增强肿瘤细胞中半乳糖苷酶的活性,同时半乳糖苷酶报告基因的诱导活性也增强了3倍。Kawashita等^[18]将Egr-1启动子和HSV-TK基因结合导入到肝癌细胞中,通过¹³¹I-碘油内照射治疗发现,此法对肝癌细胞有显著

疗效,其放射性选择性地聚集在肝细胞中,并且呈剂量依赖性。Takahashi等^[19]用⁶⁷Ga诱导Egr-1启动子启动转染有荧光素酶报告基因质粒的胰腺癌AsPc-1细胞株内荧光素酶的表达,结果发现照射后的荧光素酶活性是对照组的100~300倍;而且发现⁶⁷Ga在肿瘤局部聚集,受照肿瘤细胞的生长在2 d后明显抑制。由于外照射对转移瘤疗效不佳,核素内照射便为体积较小且广泛分布的转移瘤治疗提供了新思路。

4 问题与展望

虽然Egr-1基因及蛋白的结构早已阐明,但对其复杂的生物学功能和作用还有待于进一步研究。肿瘤基因-放射调控治疗不但可以通过射线与基因的双重作用杀伤肿瘤,更重要的是可以通过射线从时间、空间两方面来调控目的基因的表达,为恶性肿瘤治疗提供了新思路。但目前仍然面临基因治疗的特异性、安全性、下游基因表达效率等技术问题和社会问题;此外,寻找高效和定向的基因转染体系、寻找更有效的治疗基因等问题也急需解决。

参 考 文 献

- [1] Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(8): 4556-4571.
- [2] Bickenbach KA, Veerapong J, Shao MY, et al. Resveratrol is an effective inducer of CARγ-driven TNF-α gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(3): 133-139.
- [3] Wang WD, Li R, Chen ZT, et al. Cisplatin-controlled p53 gene therapy for human non-small cell lung cancer xenografts in athymic nude mice via the CARγ elements. *Cancer Sci*, 2005, 96(10): 706-712.
- [4] Lucerna M, Pomyje J, Mechtcheriakova D, et al. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*, 2006, 66(13): 6708-6713.
- [5] Parra E, Ortega A, Saenz L. Down-regulation of Egr-1 by siR-NA inhibits growth of human prostate carcinoma cell line PC-3. *Oncol Rep*, 2009, 22(6): 1513-1518.
- [6] Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, et al. Radiation-inducible caspase-8 gene therapy for malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 71(2): 517-525.
- [7] Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, et al. Radioresponsive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene therapy for malignant brain tumors. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(8): 706-716.

- 518-521.
- [13] Kim DJ, Chung JJ, Ryu YH, et al. Adrenocortical oncocytoma displaying intense activity on ^{18}F -FDG-PET: a case report and a literature review. *Ann Nucl Med*, 2008, 22(9): 821-824.
- [14] Hennings J, Lindhe O, Bergström M, et al. [^{11}C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(4): 1410-1414.
- [15] Gross MD, Avram A, Fig LM, et al. Contemporary adrenal scintigraphy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(4): 547-557.
- [16] Hennings J, Hellman P, Ahlström H, et al. Computed tomography, magnetic resonance imaging and ^{11}C -metomidate positron emission tomography for evaluation of adrenal incidentalomas. *Eur J Radiol*, 2009, 69(2): 314-323.
- [17] Gross MD, Rubello D. Something old, something new, PET in adrenal imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(7): 1233-1235.
- [18] Wadsak W, Mitterhauser M, Rendl G, et al. [^{18}F]FETO for adrenocortical PET imaging: a pilot study in healthy volunteers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(6): 669-672.
- [19] Yamaga LY, Thom AF, Wagner J, et al. The effect of catecholamines on the glucose uptake in brown adipose tissue demonstrated by (^{18}F)FDG PET/CT in a patient with pheochromocytoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(2): 446-447.
- [20] Mann GN, Link JM, Pham P, et al. [^{11}C]methoxyephedrine and [^{18}F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography improve clinical decision making in suspected pheochromocytoma. *Ann Surg Oncol*, 2006, 13(2): 187-197.
- [21] Brink I, Hoegerle S, Klisch J, et al. Imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *Fam Cancer*, 2005, 4(1): 61-68.
- [22] Imani F, Agopian VG, Auerbach MS, et al. ^{18}F -FDOPA PET and PET/CT accurately localize pheochromocytomas. *J Nucl Med*, 2009, 50(4): 513-519.
- [23] Tafef D, Tessonier L, Sebag F, et al. The role of ^{18}F -FDOPA and ^{18}F -FDG-PET in the management of malignant and multifocal pheochromocytomas. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2008, 69(4): 580-586.
- [24] Kaji P, Carrasquillo JA, Linehan WM, et al. The role of 6- ^{18}F fluorodopamine positron emission tomography in the localization of adrenal pheochromocytoma associated with von Hippel-Lindau syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2007, 156(4): 483-487.
- [25] Timmers HJ, Carrasquillo JA, Whatley M, et al. Usefulness of standardized uptake values for distinguishing adrenal glands with pheochromocytoma from normal adrenal glands by use of 6- ^{18}F -fluorodopamine PET. *J Nucl Med*, 2007, 48(12): 1940-1944.

(收稿日期: 2010-03-08)

(上接第 208 页)

- [8] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- [9] Hallahan DE, Qu S, Geng L, et al. Radiation-mediated control of drug delivery. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24(5): 473-480.
- [10] Senzer N, Mani S, Rosemurgy A, et al. TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors. *J Clin Oncol*, 2004, 22(4): 592-601.
- [11] MacGill RS, Davis TA, Macko J, et al. Local gene delivery of tumor necrosis factor alpha can impact primary tumor growth and metastases through a host-mediated response. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(7): 521-531.
- [12] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, et al. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(9): 1509-1519.
- [13] Hau H, Rainov NG, Quinones A, et al. Combined radiation and cytochrome CYP4B1/4-ipomeanol gene therapy using the EGR1 promoter. *Anticancer Res*, 2003, 23(3B): 2723-2728.
- [14] Scott SD, Marples B, Hendry JH, et al. A radiation-controlled molecular switch for use in gene therapy of cancer. *Gene Ther*, 2000, 7(13): 1121-1125.
- [15] Jin GH, Jin SZ, Liu Y, et al. Therapeutic effect of gene-therapy in combination with local X-irradiation in a mouse malignant melanoma model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3): 975-981.
- [16] Greco O, Marples B, Dachs GU, et al. Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation. *Gene Ther*, 2002, 9(20): 1403-1411.
- [17] Manome Y, Kunieda T, Wen PY, et al. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(10): 1409-1417.
- [18] Kawashita Y, Ohtsuru A, Miki F, et al. Eradication of hepatocellular carcinoma xenografts by radiolabelled, lipiodol-inducible gene therapy. *Gene Ther*, 2005, 12(22): 1633-1639.
- [19] Takahashi T, Namiki Y, Ohno T. Induction of the suicide HSV-TK gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(7): 827-833.

(收稿日期: 2010-02-22)