

肿瘤基因治疗

Genetherapy for Cancer

章扬培

(军事医学科学院, 副研究员)

陈建敏

(军事医学科学院, 博士研究生)

提 要 在单基因缺陷遗传病的基因治疗取得重要研究进展的同时, 涉及多基因异常的肿瘤基因治疗研究也取得了令人瞩目的突破。从五个方面考虑肿瘤的基因治疗: 信息药物法, 导入反意核酸或核酸代酶信息药物抑制肿瘤恶性基因的表达; 遗传免疫调节法, 导入细胞因子基因刺激对肿瘤细胞毒的免疫反应; 正常组织保护法, 导入外源基因增强正常细胞对化疗和放疗的抗性, 最大限度减小化疗和放疗对正常组织的损伤; 药物打靶法, 导入外源病毒特殊酶的基因, 使这个基因选择性地肿瘤细胞中表达, 进而把一些低毒的原药转化为高毒药物, 有针对性地杀伤肿瘤细胞; 基因取代疗法, 导入外源基因纠正抑癌基因的缺陷, 恢复抑癌功能。

基因治疗是利用基因操作, 向患病细胞引入外源基因, 以纠正或弥补患病细胞的基因缺陷, 使功能恢复正常, 达到治疗疾病目的的一种生物技术手段。它是人类战胜自身遗传物质紊乱的一种大胆的尝试。过去的十年, 基因分离、基因表达调控、基因转移、细胞因子基因工程、癌基因和抑癌基因等方面的研究都取得重要进展, 为基因治疗奠定了基础。未来的十年, 科学家将完成人体全基因组图谱的序列测定, 从根本上揭示遗传病和肿瘤分子特征, 从理论上指导人们去根治肿瘤的恶性, 再加上同源重组、穿梭质粒、反意技术、PCR技术的合理应用, 必定会提高基因治疗操作的可行性。因此有充分的理由相信, 人类实现对遗传病和肿瘤的基因治疗已指日可待。

一、肿瘤基因治疗的基本策略

分子生物学家认为, 癌基因的过量表达、抑癌基因不能正常表达、抗肿瘤免疫调节异常是癌症发生的原因。出自这些考虑, 肿瘤基因治疗的基本策略是向肿瘤细胞导入外源基因, 以抑制癌基因

的表达, 或恢复抑癌基因的功能, 或增强机体抗肿瘤免疫反应能力, 或在实施化疗和放疗时能保护更多的正常组织。

在导入外源基因操作方法上, 与遗传病基因治疗一样, 肿瘤基因治疗多采用物理、化学和病毒介导方法, 如DNA-磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、原生质体融合、脂质体介导、受体介导转移、重组逆转录病毒、重组DNA病毒(腺病毒, 简单疱疹病毒)等。近年来发展起来的向患病组织内直接注射外源基因的方法格外引人注目, 如腹腔内、静脉、动脉、肝脏、肌肉或气管内, 注射的外源基因在靶部位周围表达, 就能扼制肿瘤的恶性增殖。

除了对体细胞可实行肿瘤基因治疗外, 科学家们还设想对生殖细胞进行肿瘤基因治疗。如向遗传性肿瘤视网膜母细胞瘤患者的受精卵中导入RB基因, 向Li-Fraumeni综合征患者受精卵中引入P53基因, 纠正新生儿中抑癌基因丢失的缺陷。因生殖细胞的基因治疗涉及伦理学问题, 实施时要格外谨慎。

肿瘤涉及多基因的异常, 在考虑基因治疗时也应注意与遗传病基因治疗相同的四个条件:(1)

危及生命;(2) 目的基因已经克隆;(3) 无需严格调控, 导入基因即可表达;(4) 基因导入途径切实可行。

进入90年代, 科技发达国家已经组织力量进行肿瘤基因治疗的试验研究。经美国国立卫生研究所重组DNA咨询委员会批准, 罗森伯格(Rosenberg)把新霉素抗性基因和肿瘤坏死因子TNF基因导入肿瘤浸润淋巴细胞, 追踪标记基因行迹, 提高细胞抗肿瘤免疫活性。他还把IL-2、TNF基因导入肿瘤细胞, 观察杀伤肿瘤细胞的效果。弗里曼(Freeman)把胸腺嘧啶核苷激酶基因导入肝癌细胞, 观察到这个基因的表达, 可使原药6-甲氧嘌呤阿拉伯糖核苷酸转化为具有强大杀伤肿瘤细胞作用的磷酸化阿拉伯糖核苷酸, 大幅度提高对肿瘤的治疗效果。1991年罗森伯格开始对50名晚期黑色素瘤患者实施基因治疗, 他从患者身上获取肿瘤浸润淋巴细胞TIL, 通过离体操作向其中导入TNF基因, 然后将携有TNF基因的TIL细胞输回患者体内, 期望发挥TIL的导向作用聚集到肿瘤部位, 实现提高TNF局部浓度, 杀伤肿瘤细胞之目的。

二、肿瘤基因治疗的基本途径

1. 信息药物法(Information drugs)

信息药物是指人工合成的载有特殊生物信息的药物分子, 如反意寡核苷酸、核酸代酶和一些特殊的蛋白酶。信息药物一般分子量较小, 容易抵达细胞靶部位。它们通过特殊方式作用于DNA转录系统, 控制转录产物形成。反意核酸有反意DNA和反意RNA, 它们的碱基排列序列与模板DNA或mRNA碱基序列恰恰互补, 因此可以和特定基因或mRNA分子形成双链结构, 起到抑制DNA转录和mRNA翻译的作用。如果反意核酸互补区域涉及到决定肿瘤恶性表型的基因或mRNA, 导入反意核酸后就可以抑制肿瘤细胞的增殖、成瘤和转移的特性。实验证明长度仅为21碱基对(bp)的c-myc基因的反意核酸可以明显抑制淋巴瘤细胞中mRNA的生成。N-myc反意核酸可以抑制皮肤神经细胞增殖。c-myc反意核酸可抑制结肠癌细胞增殖。cAMP受体蛋白激酶I型调节亚单位基因的反意核酸可抑制成神经细胞瘤、白血病、乳腺癌、结肠癌和胃癌细胞的增殖。bcr-abl基因反意核酸可抑制急性髓样白血病细胞增殖。把K-ras基因反意核酸导入小细胞肺癌细胞中, 可明显抑制K-ras癌基因表达, 并抑制裸鼠内的成瘤特性。这些实验表明, 反意核酸作为一种信息药物在肿瘤基因治疗上有着广阔的应用前景。

核酸代酶(ribozyme)是具有酶一样活性的

RNA顺序, 在没有任何酶和蛋白质分子存在时, 它们能催化内含子的剪切, 参与转录调控。向肿瘤细胞中导入核酸代酶可以抑制癌基因转录, 起到基因治疗作用。

目前在信息药物研究中亟待解决的问题有细胞膜通透性、药物分子化学稳定性、靶向性和毒性。

2. 遗传免疫调节 (Genetic immunomodulation)

细胞因子可以调节和增强机体抗肿瘤免疫反应能力。IL-2、IL-4、IL-6、TNF、干扰素等都可以调节患者体内细胞免疫系统和体液免疫系统, 减少肿瘤细胞的成瘤性和转移性。科学家们已开始尝试向肿瘤细胞内导入细胞因子基因, 实施肿瘤基因治疗。成功的例子是对TIL和TNF的研究。

在研究肿瘤自然杀伤细胞NK、细胞毒性T淋巴细胞CTL和淋巴因子活化的肿瘤杀伤细胞LAK的基础上, 人们发现肿瘤浸润淋巴细胞TIL具有存在于肿瘤局部, 在体外激活后可获得高效杀伤肿瘤细胞的功能, 是一类潜能很大的免疫活性细胞。向TIL中导入新霉素抗性基因作为示踪的标记物, 发现TIL能聚集在肿瘤部位周围, 新霉素抗性基因的表达可长达10个月。实验表明TNF有明显的杀伤鼠肿瘤细胞的作用, 但临床使用对人肿瘤细胞杀伤作用甚微。鼠可以承受400微克/千克TNF剂量, 而人最大承受限度为8微克/千克。罗森伯格设想如果将TNF基因导入TIL细胞, 然后再输回患者体内, 令载有TNF基因的TIL都集中在肿瘤部位周围, 就可以大幅度提高TNF在肿瘤部位局部分布浓度。如前述, 1991年罗森伯格开始对50名晚期黑色素瘤患者施行TNF-TIL基因治疗方案, 预计年内可获成功。

遗传免疫调节的另一项措施是发展基因疫苗。已知人乳头状瘤病毒16亚型(HPV-16)与宫颈癌发生有关。动物实验证明, 使用重组HPV核心蛋白E6、E7基因疫苗, 可以显著降低与HPV相关的肿瘤的发生。如果向成纤维样细胞中导入HPV-16 E7基因, 可用来免疫同基因小鼠, 使与HPV-16 E7相关的肿瘤细胞不能在免疫后的小鼠体内成瘤。提示制备基因疫苗可在一定范围和一定程度上降低肿瘤的发生。

3. 正常组织保护(Normal tissue protection)

放疗和化疗仍是目前治疗肿瘤的重要手段, 放疗和化疗中的一个重要问题是如何最大程度地杀死肿瘤细胞和最大程度地保护正常细胞。导入外源基因提高正常组织细胞的抗药性和辐射抗性, 形成了肿瘤基因治疗研究的另一个侧面。

成功的实验有向骨髓细胞中导入DHFR基

因,提高对化疗药MTX的抗性;导入MDR1基因,提高对放线菌素D、道诺霉素、Vp-16、长春新碱、长春花碱、正定霉素和Taxol等7种化疗药物的抗性;导入CSF、G-CSF和GM-CSF等造血因子基因,提高骨髓细胞对放射线和化疗药物的抗性。

4. 药物打靶(Drug targeting)

又称病毒酶指导的原药治疗法(Virally directed enzyme prodrug therapy, VDEPT)。其分子机制是某些病毒载体中携带的基因仅在肿瘤细胞或特定细胞中表达,而在正常细胞中不表达。典型的例子是:在正常肝细胞中,简单疱疹病毒TK基因与白蛋白启动子偶联时,TK基因表达;与 α -胎蛋白启动子偶联时,TK基因不表达。而在肝癌细胞中则相反,简单疱疹病毒TK基因与 α -胎蛋白启动子偶联时表达,与白蛋白启动子偶联时不表达。病毒TK基因表达后,通过胸腺嘧啶核苷激酶的作用,可使原药6-甲氧嘌呤阿拉伯糖核苷(Ara-M)磷酸化,在体内代谢为Ara-AMP、Ara-ADP、Ara-ATP。Ara-M原药对细胞毒性低,磷酸化后Ara-AMP、ADP、ATP则对肿瘤细胞有强大的杀伤作用。如果我们构建含TK基因和 α -胎蛋白启动子的病毒载体,用它感染肝癌细胞,病毒TK基因在肝癌细胞中表达,促使Ara-M转化为高毒Ara-AMP、ADP、ATP,达到肿瘤基因治疗之目的。

VDEPT另一个例子是构建含胞嘧啶脱氨酶基因的病毒载体,感染受体细胞后,胞嘧啶脱氨酶基因表达,产生胞嘧啶脱氨酶,使5-氟胞嘧啶(5-FC)原药转变为5-氟尿嘧啶(5-FU)。目前已报道的VDEPT控制基因选择性表达的体系有:癌胚抗原/胃肠癌和肺癌; α -胎蛋白/肝癌和畸胎瘤;多巴脱羧酶/小细胞肺癌;神经元特异烯醇酶/小细胞肺癌;前列腺特异抗原/前列腺癌;降钙素/甲状腺癌(髓质);甲状腺球蛋白/甲状腺癌;多态性上皮粘蛋白/乳腺癌和胰腺癌;Villin/胃肠癌和胰腺癌;erb-B₂/乳腺癌和胃肠癌;erb-B₃/乳腺癌和胃肠癌。

5. 基因取代疗法(Gene replacement therapy)

抑癌基因是人细胞正常基因组中的一个组成部分。抑癌基因发生突变或缺失,是引起细胞癌变的重要原因。文献已报道了不少抑癌基因。基因取代疗法的目的在于导入正常的抑癌基因去补偿和代替缺陷的抑癌基因的功能。

nm23抑癌基因编码的产物参与和ras相关蛋白的调控。nm23基因低表达或缺失会导致乳腺癌和结肠癌的高转移。把nm23基因导入小鼠高转移黑色素瘤细胞,可降低其恶性转移能力。

RB抑癌基因的丢失或失活在多种肿瘤细胞中都有发现。RB缺失突变的肿瘤细胞在接受外源

RB基因后,肿瘤的恶性表型随之消失。

野生型P53(WTP53)抑癌基因编码是一种半衰期很短的核磷酸蛋白,具有促进细胞分化和抑制肿瘤细胞生长的活性。已发现许多肿瘤发展到晚期常伴有P53基因突变或缺失。裸鼠实验证明,导入P53基因后的肿瘤细胞无法成瘤。体外实验证明P53基因可以抑制由P53缺陷而引起的肿瘤细胞增殖。有人设想向视网膜母细胞瘤患者和Li-Fraumeni综合症患者生殖细胞中引入RB或P53基因,期望通过同源重组,纠正新生儿中抑癌基因RB、P53的缺陷。

另一个令人感兴趣的分子是GC因子(GCF)。GCF基因参与对一些与肿瘤有关的基因的转录调节,GCF与DNA上富含GC区域有很高的亲合性。尽管GCF抑制肿瘤生长的机理有待阐明,但它提供了一个很好的、研究生长调节的模型。

列入科学家研究的基因取代疗法的基因还有:NF κ B、GAP、WT1、MHCH2K、 β -actin、E-Cadherin、JEMCP1、rap1A和cAMP受体蛋白基因等。

肿瘤基因治疗是采用生物高技术的临床治疗实验,需要临床医生、分子生物学家和病毒学家的通力合作,需要有专门部门负责审批管理,制定标准规范和加强公众教育。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第51页)

途径和方案,最后确定从整体上能够按照某种衡量准则以最佳方式实现的特定计划目标。计划行政机构则把计划总体设计组织的工作成果作为采取计划管理措施的科学依据,组织实施。

就现实情况而言国家制订产业政策时,不妨参照这一总体设计机构的设想,邀请有关专家学者会同有关部门一起来研究商讨,在已有的基础上,制订出切实有效,能起到指导和约束作用的产业政策。这些专家学者至少应该具备以下一些条件:既懂技术,又懂经济和社会学,具有比较宽广和渊博的知识,能考虑科学技术、经济和社会的协调发展;熟悉产业政策、产业结构和宏观间接管理的理论与实践;掌握技术经济分析,系统分析和综合平衡的原理与方法;有高度的责任心。

同时,还应加强宏观间接控制,早日制定有效的产业政策,引导部门和地区的产业结构向合理化和高度化方向调整。在此前提下,才能制订出合理有效的行业规划和地区规划,并加强指导和管理。最后,企业才有可能根据市场不断变化的需求,根据宏观指导和相应的信息,不断提高生产经营管理水平,有计划地实现技术进步和不断调整各自的产品结构。

(责任编辑 蔡 今)