维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0402－04

HSV－TK 基因治疗泌尿系肿瘤的研究近况

叶 钢 综述，金锡御 审校

(第三军医大学新桥医院泌尿外科，重庆 400037)

【中国图书分类法分类号】Q342;R737 【文献标识码】B 【收稿日期】2002－12－05

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus，HSV)染色体上有编码胸苷激酶(thymidine kinase，TK)的基因。HSV－TK 基因所编码的酶蛋白可使核苷类药物转化为细胞毒物质，导致细胞死亡。1986 年，Moolten[1]首次报导将 HSV－TK 基因转移到癌细胞中，可提高核苷类药物对癌细胞的杀伤敏感性。因此，HSV－TK 基因又称为药敏基因(drug sensitive gene)或自杀基因(suicide gene)。目前，药敏基因治疗是抗癌研究的活跃领域。HSV－TK 基因治疗已应用于脑、肺、肝、结肠、卵巢等各部位肿瘤研究。本综述介绍 HSV－TK 基因在泌尿系肿瘤基因治疗中的应用近况。

1 HSV－TK 基因的抗癌作用机理

1.1 细胞毒性作用

更昔洛韦(Ganciclovir，GCV)等核苷类似药物对哺乳动物细胞无毒害作用。当 GCV 进入含 HSV－TK 基因的细胞后，在 HSV－TK 作用下形成单磷酸化 GCV，其在细胞磷酸化酶作用下转化成三磷酸化 GCV(GCV－triphosphate，GCV－TP)。GCV－TP 能终止 DNA 合成，导致细胞死亡。

1.2 旁观者效应(bystander effect)：

研究表明转染 TK 基因的癌细胞，经药物攻击后而死亡，但却同时杀死未被 TK 基因转染的瘤细胞。这种现象为“旁观者”效应。目前，对“旁观者”效应的机理还没搞清楚，研究者提出了如下几种解释。1、缝隙连接而实现毒性产物交流。2、细胞凋亡。3、通过释放细胞因子产生抗癌免疫效应。4、肿瘤血管内皮细胞坏死，缺血导致细胞死亡。

作者介绍：叶 钢(1958－)，男，副教授，博士，
主要研究方向：泌尿系肿瘤的免疫治疗和基因治疗。

1.3 免疫作用

HSV 有 3 组病毒基因，按表达先后顺序分类为 α、β 和 γ 基因，HSV－TK 基因归类为 β 基因。HSV－TK 基因转染肿瘤细胞后，可能使瘤细胞膜表达病毒抗原，使癌细胞更具“异己性”，从而诱导机体抗肿瘤免疫，加速肿瘤消退。

2 HSV－TK 基因的转导途径

向细胞内转移目的基因的方法可分为两大类，病毒载体途径和非病毒载体途径(表 1)。就 HSV－TK 基因抗癌的实验研究与临床试验而言，逆转录病毒载体和腺病毒载体以及脂质体复合物的基因转导应用较多。

表 1 目的基因的转导途径

病毒载体途径：	非病毒载体途径：
逆转录病毒载体	阳离子脂质体
腺病毒载体	基因枪
腺相关病毒载体	受体介导
牛痘病毒载体	DNA 直接注射
单纯疱疹病毒载体	电穿孔
乳头状病毒载体	磷酸钙－DNA 共沉淀

3 HSV－TK 基因的靶向转移

基因靶向转移的方法主要有两种。一是将 DNA 与细胞特异性载体分子偶联，载体分子与细胞表面特异性受体结合，将 DNA 转入细胞内；另一方法是利用肿瘤细胞特异的调控序列与目的基因结合，使目的基因只在靶细胞中表达。迄今，以后者的研究进展较迅速。前列腺癌表达前列腺特异性抗原(PSA)，Suzuki[2]等以 PSA 启动子和 CMV 增强子调控 HSV－TK 基因构建腺病毒载体。该载体可以感染所有细胞，但 TK 基因却只在前列腺癌细胞中

维普资讯 http://www.cqvip.com

表达,杀死癌细胞。另外,多数转移性前列腺癌细胞过度表达 Caveolin－1,最近,Pramudji[3] 等用 Caveolin－1 启动子序列构建 HSV－TK 基因的腺病毒载体,在鼠和人前列腺癌细胞中的特异性表达已取得较好效果。同样的原理也适应于治疗胎甲球(AFP)表达水平较高的睾丸肿瘤。组织特异性基因调控序列的应用,不仅使 HSV－TK 基因的转移具有靶向特异性,而且可提高 HSV－TK 基因的表达水平。因此,构建 HSV－TK 基因靶向转移载体有广阔前途。

4 HSV－TK 基因的治疗操作方法

目前常用的治疗操作方式,可以归纳为如下三种[4]。

4.1 体外体内(ex－vivo)两步法

该技术是目前研究最多,使用最成熟的方法。具体内容为:(1)术或穿刺活检取材,根据需要可取淋巴细胞或成纤维细胞或肿瘤乃至正常组织;(2)离所需细胞体外培养;(3)入目的基因;(4)定目的基因转入并按要求表达;(5)将重组改造的细胞植回体内。

4.2 体内原位(in situ)治疗法

以病毒或脂质体作载体,或用裸 DNA 直接注射将目的基因导入靶组织或靶器官。具体方式有:(1)肿瘤部位直接注射种植;(2)腔道内灌注,如注入膀胱、呼吸道、关节腔、胸腹腔、脑室和蛛网膜下腔等;(3)肿瘤所在器官选择性血管内注入。针对泌尿系统特殊的解剖结构,腔内灌注转基因治疗展示出诱人的前景。用鼠做模型,经尿道灌注腺病毒载体 HSV－TK 基因能高效转染膀胱癌细胞,并获得有效表达[5]。

4.3 体内(in vivo or system)一步法[6]

像许多药物注入体内一样,医生实施肌注或外周静脉注射后,以病毒载体或脂质体介导的目的基因便定向进入靶细胞,安全有效的表达目的基因而不影响其它细胞功能。本法正在成为研究和开发的热点和重点。目前,在确保载体进入特定靶细胞方面已取得了令人鼓舞的进展。如果进一步完善成熟,将对基因治疗的应用带来不可估量的前景。

5 HSV－TK 基因对泌尿系肿瘤的疗效

5.1 前列腺癌

Suzuki 等[2]体外研究证明,以 PSA 序列为启动子的 HSV－TK 可杀伤雄激素依赖及非依赖型产生 PSA 的前列腺癌细胞。Pantuck 等[7] 证实 HSV－TK/GCV 系统在体外对人类前列腺癌细胞有强烈的抑制作用;体内 SCID 鼠皮下和原位模型实验与体外结果类似。在体内小鼠实验组,肿瘤生长缓慢或被抑制,无转移发生,动物存活时间长。Hall 等[8]发现 HSV－tk/GCV 通过旁观者效应导致。免疫组化结果显示细胞凋亡。通过长期观察发现,HSV－TK/GCV 系统能明显抑制前列腺癌细胞的生长和自发转移,受转染鼠的存活期明显延长。并且,无论肿瘤是否再发,HSV－TK/GCV 系统都能产生全身性的抗转移能力。近来 Miles 等[9]将 HSV－TK/GCV 系统应用于Ⅰ/Ⅱ期临床研究,向 36 例放疗失败的患者行前列腺内直接注射腺病毒载体 HSV－TK 基因,然后静注 GCV。经几个周期治疗后大多数前列腺癌病人的 PSA 水平显著降低并长时间维持,外周血中 CD8(＋) T cells 显著增加,穿刺活检证实有肿瘤细胞凋亡。病人无明显毒副作用表现,说明此系统安全性可靠,为进一步临床应用打下基础。

5.2 肾癌

将人肾癌细胞 Cake－2 种植于裸鼠肾脏建立模型,用 ex vivo 法 和瘤体直接注射转导病毒载体 HSV－TK 基因。GCV 治疗后肿瘤消退,腺病毒载体 TK 直接注射效果特别明显[10]。Adachi 等[11]用肝素结合型生长因子中间素(Midkine, MK)作为启动子来调控腺病毒载体 HSV－TK 基因在 G401(Wilms′瘤) 中表达,经 GCV 治疗后,大量的 G401 肿瘤细胞死亡,并证实了 MK 启动子优于 CMV 启动子。Uckert 等[12]体外实验证实,双自杀基因疗法(HSV－TK/GCV 联合 CD/5FC)对人肾癌细胞具有杀伤作用,比单一 TK 或 CD 基因治疗更显著。在 BALB/c 小鼠人类肾细胞癌模型中,发现 HSV－TK/GCV 系统激发免疫反应,产生了肿瘤特异性细胞毒 T 细胞,其中以大量 CD8 细胞为主。肿瘤出现排斥反应和明显生长抑制,并发现Ⅰ型主要组织相容性复合体抗原的表达增加,这说明免疫效应在消灭肿瘤,避免肿瘤复发和转移中的作用也很重要。

5.3 膀胱癌

刘为池等[13]将逆转录病毒载体 TK 基因(PLSN－HyTK)转入鼠膀胱癌细胞株 T739,实验证明 GCV 对 T739－TK 细胞有明显的杀伤作用,而且对其周围未转染 TK 基因的膀胱癌细胞存在旁

维普资讯 http://www.cqvip.com

观杀伤效应。Cheon 等[14]建立鼠膀胱癌细胞(MBT-2)模型,用腺病毒载体 HSV-TK 和 GCV 治疗后,肿瘤中心出现坏死和细胞凋亡;肿瘤生长被显著抑制、体积是对照组的 1/3,动物存活期较对照组明显延长。Akasaka 给老鼠口服亚硝胺(BBN)建立类似人膀胱移行细胞癌模型,经尿道灌注腺病毒载体 HSV-TK 基因,GCV 治疗后,肿瘤生长显著抑制。该研究预示,应用膀胱灌注对膀胱癌、肾盂癌和输尿管癌实施 TK 基因治疗的可能,为临床试验提供了理论基础及实践依据。

5.4 睾丸恶性肿瘤

Rahman 等[15]成功地完成了性腺肿瘤转基因 TG 鼠的模型,其中建立了睾丸 Leydig 细胞瘤雄性小鼠 TK+的模型,经 GCV 或无环鸟苷(ACV)治疗后发现肿瘤的进一步生长被阻断,说明了 HSV-TK/GCV 系统对睾丸 Leydig 细胞瘤治疗的有效性。而且,HSV-TK 不会导致雄性不育。

6 结 语

综上所述,HSV-TK 基因转导治疗肿瘤是肿瘤治疗研究的活跃领域。现有的实验研究已证实 HSV-TK 基因可使前列腺癌、膀胱癌、肾癌等泌尿生殖系肿瘤获得对 GCV 杀伤敏感性,并显示了临床治疗价值与应用前景。前列腺癌的 HSV-TK 基因治疗已进入临床实验[9,16],证明了 HSV-TK/GCV 系统的有效性和安全性。虽然癌症基因疗法还存在有待解决的问题,但我们相信,经过基础科学家和临床医师的不懈努力,肿瘤自杀基因治疗将会不断完善,成为临床肿瘤治疗的一种有效手段。针对泌尿系特殊的解剖结构,采用更为安全可靠、副作用更小的经尿道膀胱灌注或经输尿管肾盂灌注或经肾血管介入的 HSV-TK 基因疗法似乎是未来探索与研究的方向和重点。

参 考 文 献

[1] Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes simplex virus thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Res, 1986; 46(10):5276-5281.

[2] Suzuki S, Tadakuma T, Kunitomi M, et al. Liposome-mediated gene therapy using HSV-TK/ganciclovir under the control of human PSA promoter in prostate cancer cells[J]. Urol Int, 2001;67(3):216-223.

[3] Pramudji C, Shimura S, Ebara S, et al. In situ prostate cancer gene therapy using a novel adenoviral vector regulated by the caveolin-1 promoter[J]. Clin Cancer Res, 2001;7(12): 4272-4279.

[4] Anonymous. Human gene transfer protocols: summary table[J]. Hum Gene Ther, 2000;11:2619.

[5] Akasaka S, Suzuki S, Shimizu H, et al. Suicide gene therapy for chemically induced rat bladder tumor entailing instillation of adenoviral vector[J]. Jpn J Cancer Res, 2001;92(5): 568-575.

[6] Fenske DB, MacLachlan I, Cullis PR. Long-circulating vectors for the systemic delivery of genes[J]. Curr Opin Mol Ther, 2001;3:153-158.

[7] Pantuck AJ, Matherly J, Zisman A, et al. Optimizing prostate cancer suicide gene therapy using herpes simplex virus thymidine kinase active site variants[J]. Hum Gene Ther, 2002;13(7):777-789.

[8] Hall SJ, Canfield S E, Yan Y, et al. A novel bystander effect involving tumor cell-derived Fas and FasL interactions following Ad. HSV-tk and Ad. mIL-12 gene therapies in experimental prostate cancer[J]. Gene Ther, 2002;9(8):511-517.

[9] Miles B J, Shalev M, Aguilar C E, et al. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy[J]. Hum Gene Ther, 2001;12(16):1955-1967.

[10] Pulkkanen KJ, Parkkinen JJ, Laukkanen, et al. HSV-TK gene therapy for human renal cell carcinoma in nude mice [J]. Cancer Gene Ther, 2001; 8(7): 529-36

[11] Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, et al. Midkine promoter-base adenoviral vector gene delivery for pediatric solid tumor[J]. Cancer Res, 2000;60(16):4305-4310.

[12] Uckert W, Kammertons T, Haack K, et al. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo[J]. Hum Gene Ther, 1998;9 (6):855-865.

[13] 刘为池,叶 刚,张荣贵. 体内 HSV-TK 基因转导联合 GCV 对鼠膀胱癌的治疗效果[J]. 第一军医大学学报, 2002;22(1):41-42.

[14] Cheon J, Moon du G, Cho H Y, et al. Adenovirus-mediated suicide-gene therapy in an orthotopic murine bladder tumor model[J]. Int-J-Urol, 2002; 9(5): 261-267.

[15] Rahman NA, Kananen Rilianawati K, Paukku T, et al. Transgenic mouse models for gonadal tumorigenesis[J]. Mol Cell Endocrinol, 1998;145(1-2): 167-174.

[16] Nasu Y, Kusaka N, Saika T, et al. Suicide gene therapy for urogenital cancer: current outcome and prospects[J]. Mol Urol, 2000; 4(2): 67-71.