[7] Demierre B, Ruiz P, Kato A C. Grafting of embryonic motoneurons into spinal cord and striatum of adult mice[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 1990, 54—55: 328—336.
[8] 张 强, 廖维宏, 王正国, 等. 胚胎脊髓不同移植方法促进成鼠损伤脊髓功能恢复的研究[J]. 创伤外科杂志, 1999, 1(2): 89—91.
[9] 郭庆山, 王爱民, 蒋祖言, 等. 多种神经组织修复成鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 创伤外科杂志, 2002, 4(1): 20—23.
[10] Bamber N I, Li H, Aebischer P, *et al*. Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisected adult rat spinal cords[J]. Neural plast, 1999, 16(4): 103—121.
[11] Dumoulin A, Privat A, Gimenze R M. Transplantation of embryonic Raphe cells regulates the modifications of the gabaergic phenotype occurring in the injured spinal cord[J]. Neuroscience, 2000, 95(1): 173—182.
[12] Levinsson A, Holmberg H, Schouenborg J, *et al*. Functional connections are established in the deafferented rat spinal cord by peripherally transplanted human embryonic sensory neurons[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(10): 3589—3595.
[13] Lu J K, Feron F, Mackay S A, *et al*. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord[J]. Brain, 2002, 125(Pt 1): 14—21.
[14] Barami K, Diaz F G. Cellular transplantation and spinal cord injury[J]. Neurosurgery, 2000, 47(3): 691—700.
[15] Eaton M J, Martinez M, Karmally S, *et al*. Initial characterization of the transplant of immortalized chromaffin cells for the attenuation of chronic neuropathic pain[J]. Cell Transplant, 2000, 9(5): 637—656.
[16] Guest J D, Rao A, Olson L, *et al*. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 1997, 148(2): 502—522.
[17] Oudega M, Gautier S E, Chapon P, *et al*. Axonal regeneration into Schwann cell grafts within resorbable poly(alpha—hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal cord[J]. Biomaterials, 2001, 22(10): 1125—1136.
[18] Coumans J V, Lin T T, Dai H N, *et al*. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins[J]. J Neurosci, 2001, 21(23): 9334—9344.

(编辑 郭建秀)

文章编号: 1000-5404(2003)23-2145-03

综述

乳腺癌基因治疗进展

Advances in gene therapy of breast cancer

唐 波 综述, 姜 军 审校 (第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心, 重庆 400038)

乳腺癌是威胁妇女生命的常见疾病, 是导致女性患者死亡的重要原因之一。以手术、放疗、化疗和内分泌治疗为主的综合治疗模式极大地提高了乳腺癌患者的生存率, 但仍有较高的复发和转移率。随着医学分子生物学研究的深入和应用以及人们对疾病认识水平的提高, 基因治疗逐渐成为肿瘤生物治疗学中的重要组成部分, 在乳腺癌的治疗中显示出良好的应用前景。现就近年来乳腺癌的基因治疗进展作一综述。

1 乳腺癌基因治疗的方向和策略

1.1 恢复抑癌基因功能或抑制癌基因功能

乳腺癌的基因改变主要有两种形式: 特异性染色体臂的缺失与基因扩增。Rb、P53、BRCA-1、BRCA-2、FHIT、HIN-1等抑癌基因缺失或突变是乳腺癌中常见的分子遗传学改变。乳腺癌基因扩增常见于几种生长因子受体基因: 上皮生长因子受体(EGFR), c-erbB2, 成纤维细胞生长因子受体, 胰岛素样生长因子受体等。因此, 恢复抑癌基因功能或抑制癌基因功能是乳腺癌治疗中的重要策略。恢复抑癌基因功能, 常以腺病毒为载体, 转染相应抑癌基因(如P53、FHIT等)入乳腺癌细胞, 体内外实验证实能显著抑制乳腺癌细胞生长[1,2]。

常用的抑制癌基因功能的方法有: ①使用核酶、反义分子或siRNA技术阻止癌基因mRNA转录和翻译。许多与乳腺癌有关的基因可受反义寡核苷酸的有效靶击。实验证实, 反义寡核苷酸能显著下调乳腺癌细胞c-erbB2 mRNA表达, 抑制癌细胞增生, 且反义寡核苷酸与传统化疗药物联合能协同抗肿瘤[3]。最近有研究利用RNA聚合酶III依赖的H1—RNA基因启动子驱动的SiRNA重组腺病毒转染乳腺癌细胞, 获得稳定的转染体系, 显著抑制靶基因表达。该方法克服了传统反义技术的缺点, 即不能在细胞内稳定表达, 且抑制靶基因效率低等缺点[4]。②以显性负突变体干扰肿瘤细胞内信号转导, 如酪氨酸激酶受体基因可在乳腺癌中发生扩增及过量表达(erbB-1/EGFR, erbB-2和erbB-3), 这种过量表达的受体通过与相应配体(如EGF)结合而刺激肿瘤细胞的生长。向肿瘤细胞浆内转染该受体的突变型基因后, 其对EGF亲和力丧失, 受体内吞及生物学信号传导功能丧失, 肿瘤细胞生长受抑。另有研究证实, 约30%恶性肿瘤中可见ras癌基因的激活性突变, 而ras信号通路组成性激

作者简介: 唐 波(1976—), 男, 四川省阆中市人, 硕士, 医师, 主要从事乳腺癌治疗方面的研究。电话: (023)68754160
通信作者: 姜 军, 电话: (023)68754160
收稿日期: 2003-08-26; 修回日期: 2003-09-30
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活对于细胞的恶性转化是必需的，所以 ras 可成为肿瘤治疗的重要靶点[5]。Senmaru 等[6]将 v-h-ras 癌基因 116 位密码子的酪氨酸替换为天冬氨酸后表达显性负突变 ras 蛋白，竞争正常 ras 蛋白作用位点，干预 ras 信号通路，抑制肿瘤细胞增殖。Lee 等[7]在雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌中转入 ER 显性负突变体后也能显著抑制肿瘤细胞生长。③使用细胞内抗体预先占据胞内定位系统，隔离胞内生长因子受体，从而阻断癌基因蛋白到达其适宜的细胞内靶位。如转染了胰岛素样生长因子(IGF-1)结合蛋白的肿瘤细胞只能实现胞外结合 IGF-1，即便在高浓度 IGF-1 存在下 balb/c 细胞的生长也受抑，此外还可使生长因子受体在胞内的正常定位崩解[8]。

1.2 转导自杀基因

自杀基因又称药物敏感基因，一般为某种外源性酶解前药基因。该基因导入细胞后，其表达的编码产物可使无毒的前药成分酶解成对细胞有毒性的物质。这类基因包括单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)基因，水痘－带状疱疹病毒胸苷激酶(VZV-TK)基因、大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(EC-CD)基因、黄嘌呤－鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(XGPRT)基因、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)基因、大肠杆菌硝基还原酶(EC-NR)基因、亚麻苦甙还原酶基因(Linamarase)等。传统的自杀基因治疗策略为利用病毒载体转染单一酶解前药基因入肿瘤细胞，再加入前药物杀伤肿瘤细胞[9~11]。而目前研究显示，转染一种自杀基因，即使每一种前药物的浓度达到最高，也不能完全阻止肿瘤生长，而把两个自杀基因联合转染肿瘤细胞，即使每一种前药物的浓度很低，也能杀伤肿瘤，取得良好的治疗效果。因此，联合转染至少两个自杀基因效果更佳[12]。当前自杀基因治疗研究趋势为将靶向转导和靶向转录方法应用于自杀基因，设计组织特异性调控因子如癌胚抗原(CEA)、hTERT 启动子、热休克蛋白(HSP70)启动子、erbB-2 启动子/增强子调控靶基因在肿瘤细胞中选择性表达[13,14]。如 Hernandez 等[15]利用基因工程方法构建含雌激素反应元件和低氧反应元件的杂和启动子，调节 HSV-tk 基因在乳腺癌细胞中的转录，使自杀基因表达更具可控性。Pandha 等[16]利用含 erbB-2 启动子驱动的 CD 基因质粒 DNA 原位注射到肿瘤部位使 CD 基因在 erbB-2 阳性乳腺癌细胞中高效表达，加入前药物后，显著抑制了肿瘤生长。该方法安全，无明显毒副作用，提供了一个靶向驱动自杀基因转录的治疗模式。

1.3 基因免疫治疗

免疫治疗是一种诱发针对肿瘤细胞相关抗原特异性免疫反应的治疗。基因免疫治疗的目的是提高肿瘤细胞的免疫原性，激发机体抗肿瘤免疫。常用方法有：①导入免疫原性相关分子以增强肿瘤细胞的免疫原性，如将共刺激分子 B7、MHC-Ⅰ、Ⅱ类基因导入肿瘤细胞，增强肿瘤细胞免疫原性，激活 CTLs[17]。②导入免疫反应相关细胞因子如 IL-2、IL-12、IFN、TNF、GM-CSF 等，以增强或诱发机体抗肿瘤免疫。直接注射这些细胞因子效果差，且有一定副作用。而通过基因转导方法修饰肿瘤细胞或免疫效应细胞，能增强免疫细胞的活性，发挥机体抗肿瘤免疫功能，从而达到治疗目的。Shi 等[18]将 GM-CSF 基因修饰人体乳腺癌细胞后其成瘤性大为下降，并使机体具有抑制再植成瘤的免疫功能。③激发针对不同肿瘤相关抗原的免疫反应。树突状细胞(Dendritic cell，DC)作为专职抗原提呈细胞，因其抗原提呈功能和免疫佐剂作用，可诱导出高效而特异的抗肿瘤免疫，越来越引起国内外学者的重视。近年来通过遗传学改建 DC，将肿瘤抗原的编码基因转染 DC，能在 DC 内持续表达肿瘤抗原，既克服了肽与 DC 负载后 MHC-抗原多肽复合物的解离问题，又能使表达的抗原有效地与 MHC 分子结合并呈递给 CTL。动物试验及临床结果表明，它能诱导机体产生特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞特异性抗肿瘤免疫应答，且不良反应较小，显示了良好的应用前景。Wan 等[19]以腺病毒作为载体，将表达 PymT(Polyoma middle T)基因的腺病毒转染 DC，回输给乳腺癌小鼠动物模型后，全部动物都激发了特异性抗移植瘤反应，且均未出现明显的肝脏毒性反应。鉴于 MUC-1 在乳腺癌、卵巢癌等腺癌细胞上大量表达，Koido 等[20]将编码 MUC-1 抗原的 RNA 借助质粒转染 DC，并通过小鼠的尾静脉注入体内，对表达 MUC-1 蛋白的肿瘤细胞诱导出特异性免疫应答。但激发有针对性的免疫反应要求有明确的肿瘤抗原基因，而目前对肿瘤抗原 DNA 序列的了解非常有限，因而限制了该法的临床应用。

1.4 使用耐药基因提高骨髓化疗耐受性

骨髓抑制是化疗失败的重要因素之一。如何提高患者骨髓细胞对化疗的耐受性，一直是近年来人们所关注的问题。将耐药基因导入骨髓细胞使之获得耐药表型，就可以增加骨髓对化疗药物的耐受性，这将为临床超大剂量化疗以求最大限度地杀伤肿瘤以及多次重复化疗提供了可行性。目前研究的耐药基因包括多药耐受基因(MDR)、二氢叶酸脱氢酶(DHFR)基因及 O6 甲基鸟嘌呤－DNA 甲基转移酶基因(MGMT)等。它们均可增强骨髓细胞对抗瘤药物的耐受性。Takahashi 等[21]在乳腺癌的 MDR1 基因治疗临床研究中发现，进展期乳腺癌和复发性乳腺癌患者行大剂量化疗的同时移植已转入 MDR 基因的自体同源外周血干细胞，后再用多西他奇化疗，能明显抑制肿瘤生长，改善预后。

1.5 使用溶瘤病毒

溶瘤病毒不是靠携带外源基因转染肿瘤细胞杀伤肿瘤细胞，而是通过直接感染肿瘤细胞后“溶解”肿瘤细胞。常见的溶瘤病毒包括突变的腺病毒 ONYX-015(dl1520)、HSV-1 突变体 G207、人类逆转录病毒 3、水泡性口炎病毒(VSV)和 EB 病毒等。为了提高溶瘤毒素的靶向性，人们将组织和肿瘤特异性启动子插入溶瘤病毒的基因组，控制基因表达。Hernandez 等[22]将对低氧和雌激素反应的双特异启动子插入人类腺病毒 5 型基因组的 E1A 和 E4 区，利用该系统构建了 AdEHT2 和 AdEHE2F，从而杀死低氧条件和雌激素受体阳性的乳腺癌细胞。同理，因端粒反转录酶和 E2F-1 启动子在肿瘤细胞中常被激活，将其分别插入 AdEHT2 和 AdEHE2F 的 E4 区，能杀伤肿瘤细胞。

1.6 其它抗癌基因治疗策略

近年来，多种其它基因也被成功地用于基因治疗的实验研究中。如：应用血管生成因子(VEGF)反义寡核苷酸显著抑制人乳腺癌细胞株产生血管生成因子，进而抑制肿瘤新生血管形成达到抑制肿瘤生长与转移；将携带内皮他丁(Endostatin)和血管他丁(Angiostatin)的脂质体转入乳腺癌细胞后使细胞成瘤性大为下降[23]；利用腺病毒载体转染 TIMP-2，抑制血管生成，促

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进肿瘤细胞凋亡[24]; 将凋亡相关基因(如 Fas 基因或白介素-1β 转换酶基因 E)导入肿瘤细胞, 诱导肿瘤细胞发生凋亡等[25]。

2　存在的问题和展望

乳腺癌的基因治疗虽然取得了很多有意义的结果, 但仍和其它基因治疗一样面临许多困难。首先是缺乏高效的、特异的导向性载体, 所以开发新的、高效的、特异的持续表达靶向载体已成为今后基因治疗研究的重要课题; 其次为基因表达的可控性问题, 所以现在的研究趋向于用组织和肿瘤特异性基因启动子控制靶基因的表达, 以此来提高基因治疗的效率, 减轻其毒副作用; 再为用于临床治疗的新基因数量太少, 相信随着基因微阵列等新的分子学技术的发展和分子免疫学理论的不断完善, 将会不断的克隆出新的免疫相关基因, 用于临床基因治疗。迄今为止, 全世界尚无一项乳腺癌基因疗法临床治疗方案获得批准, 从基础实验研究过渡到临床仍有相当长一段路要走。但随着乳腺癌基础研究的不断深入和分子医学的不断完善, 相信在未来几年乳腺癌基因治疗的研究将会取得更大的进展。

关键词: 乳腺癌; 基因治疗
中图法分类号: 730.59　　文献标识码: A

参考文献:

[1] Seth P, Brinkmann U, Schwartz G N, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging[J]. Cancer Res, 1996, 56(6): 1346—1351.

[2] Sevignani C, Calin G A, Cesari R, *et al*. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2003, 63(6): 1183—1187.

[3] Xu L, Pirollo K F, Chang E H. Tumor targeted P53 gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy[J]. J Control Release. 2001, 74(1—3): 115—128.

[4] Shen C, Buck A K, Liu K., *et al*. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA[J]. FEBS Lett, 2003, 539(1—3): 111—114.

[5] Chin L, Tam A, Pomerantz J, *et al*. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance[J]. Nature, 1999, 400(6743): 468—472.

[6] Senmaru N, Shichinohe T, Takeuchi M, *et al*. Suppression of Erk activation and *in vivo* growth in esophageal cancer cells by the dominant negative Ras mutant, N116Y[J]. Int J Cancer, 1998, 78(3): 366—371.

[7] Lee E J, Jakacka M, Duan W R, *et al*. Adenovirus—directed expression of dominant negative estrogen receptor induces apoptosis in breast cancer cells and regression of tumors in nude mice[J]. Mol Med, 2001, 7(11): 773—82.

[8] Deshane J, Siegal G P, Alvarez R D, *et al*. Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB—2[J]. J Clin Invest, 1995, 96(6): 2980—2989.

[9] Link C J Jr, Kolb E M, Muldoon R R. Preliminary in vitro efficacy and toxicities studies of the herpes simplex thymidine kinase gene system for the treatment of breast cancer[J]. Hybridoma, 1995, 14(2): 143—147.

[10] Clark A J, Iwobi M, Cui W, *et al*. Selective cell ablation in transgenic mice expressing E. coli nitroreductase[J]. Gene Ther, 1997, 4(2): 101—110.

[11] Cortes M L, de Felipe P, Martin V, *et al*. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer in vivo[J]. Gene Ther, 1998, 5(11): 1499—1507.

[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] Iin T, Huang X, Gu J, *et al*. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP—TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2002, 21(52): 8020—8028.

[14] Braiden V, Ohtsuru A, Kawashita Y, *et al*. Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter[J]. Hum Gen Ther, 2000, 11(18): 2453—2463.

[15] Hernandez A R, Pihalja M, Nunez G, *et al*. Evaluation of a new dual—specificity promotor for selective induction of apoptosis in breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther: 2001, 8(4): 298—307.

[16] Pandha H S, Martin L A, Rigg A, *et al*. Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: a phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(7): 2180—2189.

[17] Daniel P T, Kroidl A, Cayeux S, *et al*. Retroviral B7.1 gene transfer in cancer cells protects cytotoxic T cells from deletion by "veto" apoptosis [J]. Adv Exp Med Biol, 1998, 451(3): 265—276.

[18] Shi F S, Weber S, Gan J, *et al*. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF[J]. Cancer Gene Ther: 1999, 6(1): 81—88.

[19] Wan Y, Bramson J, Carter R, *et al*. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination[J]. Hum Gene Ther: 1997, 8(11): 1355—1363.

[20] Koido S, Kashiwaba M, Chen D S, *et al*. Induction of antitumor immunity by vaccination if dendritic cells transfected with MUC1 RNA[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5713—5719.

[21] Takahashi S, Hatake K, Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2003, 30(4): 468—77.

[22] Hernandez A R, Pihalja M, Qian D, *et al*. New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(14): 1737—1750.

[23] Chen Q R, Kumar D, Stass S A, *et al*. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice[J]. Cancer Res, 1999, 59(14): 3308—3312.

[24] Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, *et al*. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis and metastasis, and prolongs survival in mice[J]. Hum Gene Ther: 2001, 12(5): 515—526.

[25] Gomez Navarro J, Arafat W. Gene therapy for carcinoma of the breast: Pro-apoptotic gene therapy[J]. Breast Cancer Res, 1999, 2(1): 32—44.

（编辑　刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net