

° 专论与综述 °

选择性复制型腺病毒介导的自杀基因 HSV-tk 在
肿瘤基因治疗中的应用^{*}

张巨峰 黄 倩

(上海交通大学附属第一人民医院中心实验室 上海 200080)

摘要: 自杀基因治疗是肿瘤基因治疗的手段之一, 治疗效果与自杀基因能否被高效、选择性的导入肿瘤细胞有关。肿瘤选择性复制型腺病毒(Conditionally replication adenovirus CRAAs)可以特异性的在肿瘤细胞中复制, 在复制的同时所携带的治疗基因也大量表达。由 CRAAs 介导的自杀基因, 实现了对肿瘤的病毒治疗和基因治疗的结合, 提高了治疗效率和使用复制型腺病毒的安全性。

关键词: 自杀基因; 选择性复制型腺病毒; 肿瘤基因治疗

中图分类号: R730.5 文献标识码: A

The application of conditionally replication adenovirus — mediated
suicide gene HSV-tk in the tumor gene therapy

ZHANG Ju-feng, HUANG Qian

Experimental Center, Affiliated 1st People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080

ABSTRACT: Suicide gene therapy is one of the approaches of tumor gene therapy. The effect of suicide gene therapy approach is concerned with genes can be delivered efficiently and selectly to the tumor site. Conditionally replication of adenovirus in tumor tissue leads to amplification of the input dose at the tumor site, while the adenovirus-mediated gene can also largely replicate. Conditionally replication adenovirus that contain suicide gene combine the advantages of virotherapy and suicide gene therapy, in addition, are improved significantly in both efficacy and safety.

Key words: Suicide gene therapy; Conditionally replication adenovirus; Tumor gene therapy

肿瘤选择性复制型腺病毒(CRAAs)也称为溶瘤型腺病毒(Oncolytic Adenovirus), 由于这类病毒利用肿瘤与正常组织细胞结构或代谢途径上的差异, 可较特异性地在肿瘤细胞内复制, 最后裂解肿瘤细胞。释放的病毒颗粒可继续感染邻近的肿瘤细胞。CRAAs在复制的同时还可使所携带的外源基因大量表达。因此CRAAs不仅具有溶解肿瘤细胞的作用, 能用于肿瘤病毒治疗, 还是高效特异的携带治疗基因的载体。

自杀基因(suicide gene)在肿瘤细胞内的表达, 可以将无毒的药物原形(prodrug)转化为有细胞毒性的药物(drug), 达到特异杀死肿瘤细胞的目的。目前已发展了多种自杀基因/前药系统, 研究最多的是单纯疱疹病毒I型胸腺嘧啶脱氢酶/戊环鸟苷系统(HSV-tk/GCV)。临床I期实验表明 HSV-tk/GCV 系统, 具有良好的肿瘤杀伤效果^[1]。

本文对 CRAAs 和自杀基因, 以及两者结合在肿瘤治疗中的研究进展做一个综述。

1 肿瘤选择性复制型腺病毒

1.1 构建肿瘤选择性复制型腺病毒的方法

目前构建 CRAAs 的方法主要有两种: (1)突变与腺病毒复制有关的早期基因, 使腺病毒只在某些肿瘤抑制基因缺陷的肿瘤细胞内复制, 而在正常细胞中不复制。(2)采用肿瘤特异性启动子调控与腺病毒复制有关的早期基因如 E1A 或 E1B 的表达。

1.1.1 突变与病毒复制有关的早期基因: E1B 是腺病毒表达的早期蛋白之一, 对于腺病毒的复制十分重要, 正常细胞中 p53 基因产生的 p53 蛋白能与 E1B 蛋白结合抑制腺病毒的复制。腺病毒 dl1520(也称为 ONYX-015) E1B 基因突变, 不能形成有功能的 E1B-55KD 蛋白。当 E1B 缺陷的腺病毒感染到 p53 功能正常的细胞时, p53 发挥“基因卫士”的作用, 阻止腺病毒的繁殖, 病毒对细胞的毒性作用也较小。当这种病毒感染 p53 突变的肿瘤细胞时, 由于没有 p53 的抑制, 病毒大量繁殖, 最终使细胞破裂死亡。这种方法巧妙地利用了大多数肿瘤细胞 p53 功能缺陷的特点, 可使腺病毒的复制限于肿瘤细胞。临床前期实验研究表明 dl1520 可以有效的使肿瘤体积变小^[2-3]。

另外的一个策略是突变腺病毒 E1A 保守区域 2。E1A 是

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划“973”项目资助(NO. 2004CB518800)

作者简介: 张巨峰, (1973—), 男, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向: 肿瘤基因治疗

通讯作者: 黄倩, E-mail: huangq@online.sh.cn

(收稿日期: 2006-05-18 接受日期: 2006-06-15)

病毒基因组第一个表达的基因, E1A 病毒蛋白与 pRb 结合后, 导致与 Rb 结合的 E2F 转录因子的释放, 刺激细胞从 G1 进入 S 期, 以利于病毒基因组复制。在 E1A-CR2 区域的缺失可以抑制 E1A 与 pRb 的结合, 这样可使 E1A-CR2 区域缺失的病毒复制限制在 Rb 基因缺如的肿瘤细胞中。

1.1.2 肿瘤特异性启动子调控腺病毒的复制: 某些肿瘤表达特异的“肿瘤标志”蛋白, 如前列腺癌高表达 PSA, 肝癌高表达 AFP。而另外一些肿瘤, 对正常分泌的激素敏感性增高。如乳腺癌, 对雌激素敏感。用“肿瘤标志”蛋白的启动子调控 E1A 基因的表达, 可以使腺病毒选择性的在肿瘤细胞中复制。如利用大多数的肿瘤细胞中端粒酶活性增高, 由端粒酶反转录酶启动子(TERT)调控 E1A 的腺病毒 TEhRT-Ad^[4] 可以选择性的在端粒酶活性高的细胞中复制。目前用“肿瘤标志”蛋白的启动子调控的 CRAbs 集中在胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、黑色素瘤、肺癌、结肠癌、成神经细胞瘤、卵巢癌等的治疗中。

1.2 CRAbs 用于肿瘤病人的临床实验

dl1520(ONYX-015)是第一个用于临床试验的 CRAbs, 起初是采用肿瘤内注射 dl1520 来治疗头颈部肿瘤和肺癌。在观察到腺病毒在瘤内使用的安全性和生物学活性后, 以后的试验中采用了系统给病毒的方式, 如 dl1520 经腹腔注射来治疗卵巢癌, 经肝动脉注射来治疗结肠癌的肝转移患者。也大胆尝试通过静脉给予 dl1520 来治疗其它的肿瘤。这些研究表明, 在局部和系统给予 dl1520 后, 人体能耐受高滴度的 CRAbs ($2 \times 10^{12} - 2 \times 10^{13}$ 颗粒数)^[5]。全身给予腺病毒后, 可以到达肿瘤组织。不管给病毒的途径、和肿瘤的类型, 在治疗的所有病人中, 都会产生抗病毒的抗体, 但抗体的反应不会阻断病毒的生物学效应。也没有发现有临床意义的肝脏和其它器官的毒性反应。感冒样症状(发烧、寒战、衰弱)是最主要的毒性反应。更为重要的是, CRAbs 表现出在肿瘤内特异的复制和对肿瘤细胞的杀伤。在一些肿瘤类型中与化疗药物联合使用, 可以提高疗效^[6]。

进一步的研究集中于改善病毒复制的效率、对肿瘤选择性的提高和杀伤肿瘤细胞的能力。

2 单纯疱疹病毒 I 型胸腺嘧啶激酶/戊环鸟苷系统(HSV-tk/GCV)

GCV 本身无毒性, 在 HSV-tk 作用下, 变成 GCV 单磷酸盐(GCV-MP), 再经内源性细胞激酶作用转化为其二磷酸盐(GCV-DP)和三磷酸盐(GCV-TP), 后者与 dGTP 竞争来抑制 DNA 的合成。HSV-tk 催化 GCV 转化的作用比哺乳动物细胞胸腺嘧啶激酶强 1000 倍。

Ram^[7] 用逆转录病毒介导的 HSV-tk 基因(Rv. HSV-tk), 肿瘤内注射, 再系统给予前药 GCV, 来治疗恶性脑瘤患者(MG n=12)。15 例患者中的 4 例产生抗肿瘤反应, 其中一个神经胶质瘤患者肿瘤消失, 在基因治疗后的 50 个月内没有复发。Klatzmann^[8] 和 Shand^[9] 用同样的方法治疗 12 例和 48 例复发性神经胶质瘤患者。治疗结果中各有一个患者显著延缓肿瘤生长, 各达到至少 34 和 24 个月。

但 Rainov^[10] 在进行的大规模的临床 III 期基因治疗试验中, 得出的结论不支持上述的观点。试验中 248 个原发脑肿瘤患者随机分组, 都接受手术治疗和化疗, 伴或不伴有 HSV-TK 基因治疗。HSV-TK 是由逆转录病毒介导的, 注射到手术切除肿瘤的部位, 随后系统给予 GCV。结果辅助的基因治疗并

没有提高常规疗法治疗后肿瘤生长抑制率、平均生存率。Pumalainen^[11] 以 LacZ 基因标记逆转录病毒经导管注射到恶性胶质瘤, 五天后 X-gal 染色显示标记基因局限于血管样结构的细胞中。绝大部分肿瘤组织没有被转导的细胞。原位杂交检测 HSV-tk 基因表达的 mRNA 也仅仅局限于注射部位的周围。同样的研究方法, 发现腺病毒尽管转导效率高过逆转录病毒, 但也仅仅在肿瘤组织的小范围内。那么从这里可以看出 Rainov 进行基因治疗失败的原因有可能由于逆转录病毒体内转导效率低, 治疗基因表达局限在邻近针头的范围内所造成的。

Sandnair^[12] 比较了复制缺陷型逆转录病毒介导的 HSV-tk(Rv. HSV-tk)和复制缺陷型腺病毒介导的 HSV-tk(Ad. HSV-tk)治疗效果。所有研究的恶性胶质瘤患者都进行了手术切除和放射治疗。7 名患者接受了 Ad. HSV-tk 治疗, 另外的 7 名患者接受了 Rv. HSV-tk 治疗。随后两组都静脉给予 GCV。平均生存时间 Ad. HSV-tk 治疗组(15 个月)显著长于($P < 0.012$) Rv. HSV-tk 治疗组(7.4 个月)。Immonen^[13] 对 Ad. HSV-tk 治疗恶性胶质瘤患者的效率做了进一步的研究, 结果也表明 Ad. HSV-tk 治疗的有效性。

综上所述, HSV-tk/GCV 系统的治疗效率很大程度上依赖载体的转导效率和表达的情况, 开发高效的载体系统成为基因治疗的关键。

3 条件复制型腺病毒介导的自杀基因 HSV-tk/GCV 系统在肿瘤治疗中的应用

尽管 CRAbs 理论上在正常人类细胞中复制效率很低, 但安全性仍然要引起重视。腺病毒还具有免疫原性, 引起的免疫反应可以清除掉机体内的腺病毒剂量, 从而影响腺病毒的反复使用, 减弱抗肿瘤效果。因此有必要结合另外的治疗策略, 达到(1)提高单位剂量的治疗效率, 减少病毒的使用量, 降低免疫反应的水平;(2)能有效控制病毒的复制和传播, 提高安全性。CRAbs 和自杀基因的结合可以显著提高效率和安全性。下面从这两个方面做一介绍。

1998 年, Wildner^[14] 构建了表达 HSV-tk 基因的溶瘤性腺病毒(Ad. TKRC), 其 E1B55kDa 区缺失。在 A375 黑色素瘤、ME180 宫颈癌裸鼠肿瘤模型中, 比较 Ad. TKRC 和 Ad. TK 体内的治疗效果时发现。Ad. TKRC 单独使用的效果等同于 Ad. TK 加上 GCV 使用的效果, 都可以使接种 A375 黑色素瘤裸鼠的存活时间增加两倍, 有 20% 接种 ME180 宫颈癌裸鼠长期存活。在 Ad. TKRC 使用三天后, 给予 GCV 治疗, 则接种两个不同肿瘤的裸鼠存活率显著延长, 60% 接种 ME180 宫颈癌裸鼠存活超过 160 天。说明 Ad. TKRC 单独应用就有抗肿瘤的作用, 与 HSV-tk/GCV 联合后, 显著改善 Ad. TKRC 的治疗效果。在对接种了 LS180、HT-29 结肠癌的裸鼠进行同样研究也得到相同的结果^[15]。

前药是否能抑制携带自杀基因的 CRAbs 的复制和传播呢? 是否能根据需要来清除掉机体内的腺病毒, 消除使用复制型腺病毒引起安全性的担忧。Freytag^[16] 用 Southern 的方法观察 FGR(E1B55kDa 区缺失, 携带 CD/TK 融合基因的复制型腺病毒)感染肿瘤细胞系(U251, DU145, HT29)后不久, 给予不同浓度的前药 GCV。HSV-TK/GCV 系统在较低的前药浓度时, 就可以抑制病毒 DNA 的复制, 提高前药的浓度时, 可以最大限度的抑制 FGR 复制。这样也带来一个问题, 在注射腺病

毒后, 什么时间给予前药, 和给予多大的剂量都将影响对肿瘤治疗效果。Wildner^[4]在给予前药的时间上进行了初步研究。单独用 Ad.TKRC 和注射 Ad.TKRC 一天后即给予 GCV, 对接种了 ME180 宫颈癌裸鼠治疗效果没有差异。而在注射 Ad.TKRC 三天后再给予 GCV, 疗效显著增加。说明在给予 GCV 时, 应该有 Ad.TKRC 充分感染体内肿瘤细胞的时间。但不同前药的剂量在不同时间点携带自杀基因的 CRAbs 杀伤肿瘤细胞的效果影响, 目前还没有详细的研究。

有趣的问题是, 如果使用前药完全抑制了携带自杀基因的 CRAbs 复制时, 治疗效果会是什么情况? Freytag^[5]发现, 尽管一定浓度的前药最大限度的抑制了 FGR 复制, 但 FGR 导致的细胞病变效应依然随着前药的浓度的增加而提高。这提示由自杀基因/前药系统所导致的细胞病变效应要强于由病毒复制所引起的细胞病变效应。然而到目前为止再没有类似的研究, 这个现象究竟是特殊性还是普遍性, 仍需值得关注。

Freytag^[6]第一次在人类基因治疗实验时, 使用 CRAbs 作为治疗基因的载体。实验中构建的重组选择性复制型腺病毒 (Ad5-CD/TKrep) 携带胞嘧啶脱氨酶 (CD)/单纯疱疹病毒 I 型胸腺嘧啶激酶 (HSV-tk) 的融合基因。选取 16 名再发性的前列腺癌患者, 分为四个组。对患者分别肿瘤内注射 (1010、1011、1012 病毒颗粒数) 的 Ad5-CD/TKrep, 两天后, 给予 5-FC (150mg/kg/day) 和 GCV (10mg/kg/day) 药物, 连续一周 (前三组) 或 2 周 (第四组)。没有发现 Ad5-CD/TKrep 剂量增加引起的毒性。94% 患者没有明显的副反应。44% 的患者血清中 PSA 抗原下降超过了 25%, 19% 的患者的血清中 PSA 抗原下降超过了 50%。组织化学方法检测到肿瘤内的自杀基因的表达和组织细胞的坏死。尽管 76 天后, 在患者的血中依旧能检测到 Ad5-CD/TKrep 的 DNA, 但在患者的血清和尿中没有检测到具有感染力的腺病毒。研究结果表明了 Ad5-CD/TKrep 结合前药对前列腺癌患者治疗的安全性和有效性。

4 问题和展望

近几年对 CRAbs 构建做了大量的工作, 不同的 CRAbs 用于肿瘤治疗的时候, 效率和安全性始终是研究者关注的问题。在 CRAbs 结合自杀基因/前药系统时, 动物实验和临床 I 期实验研究表明, 可以提高重组的 CRAbs 治疗效率和安全性。但可以看出, 给予重组 CRAbs 的形式多数还局限于瘤体内注射, 治疗的肿瘤也局限于一些实体瘤。而体内深部器官的肿瘤和转移性肿瘤要求能系统给予 CRAbs, 这要求 CRAbs 还要具有组织靶向性和更加特异性的只在肿瘤中复制, 未来为满足这两个方面要求, 还要对 CRAbs 改造策略不断的进行完善。

参考文献

- [1] Kubo H, Gardner T. A, Wada Y, et al. Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer [J]. Hum. Gene Ther. 2003, 14: 227-241
- [2] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy [J]. Cancer Res. 2000, 60: 1193-6

- [3] Wadler S, Kaufman H, Horwitz M, et al. The dl1520 virus is found preferentially in tumor tissue after direct intratumoral injection in oral carcinoma [J]. Clin Cancer Res. 2005, Apr 1; 11(7): 2781-2
- [4] With T, Zender L, Schulte B, et al. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer [J]. Cancer Res. 2003 63: 3181-8
- [5] Kim D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer; what have we learned? [J]. Gene Ther. 2001, 8(2): 89-98
- [6] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. Nat Med. 2000 6(8): 862-3
- [7] Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells [J]. Nat. Med. 1997, 3: 1354-1361
- [8] Klatzmann, D. A phase III study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 'suicide' gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma [J]. Hum. Gene Ther. 1998, 9: 2595-2604
- [9] Shand N, Weber F, Mariani L, et al. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group [J]. Hum. Gene Ther. 1999, 10: 2325-2335
- [10] Rainov N. G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme [J]. Hum. Gene Ther. 2000, 11: 2389-2401
- [11] Puimalainen AM, Vapalahti M, Agrawal RS, et al. Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses [J]. Hum. Gene Ther. 1998 9: 1769-1774
- [12] Sandmair AM, Loimas S, Puroinen P, et al. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma using replication-deficient retroviruses or adenoviruses [J]. Hum. Gene Ther. 2000, 11: 2197-2205
- [13] Immonen A, Vapalahti M, Tynnelä K, et al. AdHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study [J]. Mol. Ther. 2004 10: 967-972
- [14] Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, et al. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer [J]. Gene Ther., in press. 1998
- [15] Wildner O, Blaes RM, Morris JC. Therapy of Colon Cancer with Oncolytic Adenovirus Is Enhanced by the Addition of Herpes Simplex Virus-thymidine kinase [J]. Cancer Research. 1999, 59: 410-413
- [16] Freytag SO, Rogulski KR, Paielli DL, et al. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene and radiotherapy [J]. Hum Gene Ther. 1998, 10(9): 1323-33
- [17] Freytag SO, Khil M, Stricker H, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer [J]. Cancer Res. 2002, 62: 4968-4976