

# 辐射敏感性早期生长应答-1 基因启动子的研究

张春智 郭阳 吕仲宏

**【摘要】** 肿瘤基因放射治疗已成为研究热点, 早期生长应答-1(Egr-1)基因启动子为肿瘤基因放射治疗提供一种可能的方法。综述了 Egr-1 基因启动子及应用 Egr-1 基因启动子构建辐射诱导调控系统的研究。

**【关键词】** 基因, Egr-1; 放射疗法; 基因疗法

**【中图分类号】** Q345.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)02-0120-02

## The study on Egr-1 promoter which is radioactive promoter

ZHANG Chun-zhi, GUO Yang, LÜ Zhong-hong

(Department of X-Knife, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China)

**【Abstract】** Radiogenetic therapy is a heated research on oncotherapy. Early growth response gene-1 (Egr-1) gene promoter is a probably means in radiogenetic therapy. The article review studying on Egr-1 gene promoter and constructing regulating gene expressing system by radiation-inducible Egr-1 gene promoter.

**【Key words】** Gene, Egr-1; Radiotherapy; Gene therapy

放射治疗是目前临床上应用最普遍、最重要的肿瘤治疗手段, 但肿瘤临近部位正常组织的辐射损伤和某些辐射抗拒肿瘤等问题影响着肿瘤放疗的疗效。目前, 基因治疗和放射治疗相结合的治疗方法成为研究热点, 其含义是将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因转入体内, 在对肿瘤实施局部放疗时诱导肿瘤杀伤基因表达, 造成射线和基因对肿瘤的双重杀伤作用。这样, 一方面可相对降低等效照射剂量, 缓解正常组织的损伤; 另一方面通过射线的局部照射来实现肿瘤杀伤基因的定位表达。有研究发现, 早期生长应答因子-1(early growth response -1, Egr-1)启动子可以感受电离辐射产生的氧自由基的刺激而诱导基因表达。利用 Egr-1 基因启动子的这一特性与相应的目的基因构建辐射诱导基因表达调控系统可能成为一种肿瘤基因治疗的有效方法。

## 1 Egr-1 基因启动子

早在 1991 年, Hallahan 等<sup>[1]</sup>对电离辐射诱导的

Egr-1 启动子进行了详细分析, 证实 6 个 CarG 盒介导了电离辐射诱导 Egr-1 的转录。随后, Datta 等<sup>[2]</sup>于 1992 年首次报道了参与由电离辐射引起的调节基因转录的特异 DNA 序列 CarG 盒 [CC (A+T)<sub>6</sub>GC]。用 20Gy 的 X 射线照射人骨髓白血病细胞 HL525, 发现照射 1h 后 Egr-1 mRNA (3.4kb) 水平升高, 3h 达高峰; 射线诱导 Egr-1 表达基本是由转录机制调控的; 进一步研究发现, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 亦能增强 Egr-1 的转录, 虽然电离辐射与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 Egr-1 诱导动力学机制不同, 但氧自由基可能作为 Egr-1 诱导活化信使。由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与电离辐射引起的 Egr-1 表达增强能被抗氧化剂 N-乙酰-半胱氨酸阻遏, 证实氧自由基是通过血清反应因子或 CC(A+T)<sub>6</sub>GC/CarG 结构域诱导 Egr-1 的转录。细胞对氧自由基的反应可能涉及由细胞膜向细胞核的信号转导途径。

## 2 Egr-1 启动子与治疗基因构建辐射诱导调控系统

在深入研究 Egr-1 基因启动子辐射诱导特性的基础上, Weichselbaum 等<sup>[3]</sup>于 1994 年首次将 Egr-1 启动子与人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) cDNA 基因构建质粒 pEgr-TNF- $\alpha$ , 将转染

作者单位: 1. 300057, 天津市环湖医院 X 刀治疗中心 (张春智、郭阳); 2. 300052, 天津市总医院 X 刀治疗中心 (吕仲宏)  
通讯作者: 张春智 (E-mail: zhchzh\_6@hotmail.com)

pEgr-TNF- $\alpha$  的人造血干细胞 HL525 注射到对辐射有抗拒的人鳞状细胞腺癌 SQ-20B 株转移瘤内, 给予 20Gy 放射治疗后发现瘤内 TNF- $\alpha$  水平较对照组(未照射)高 2.7 倍, 在荷瘤裸鼠的血清中未检测到 TNF- $\alpha$ , 肿瘤生长明显受到抑制, 未观察到 TNF- $\alpha$  造成局部及系统毒性作用。此实验证实 TNF- $\alpha$  与放疗配伍可提高肿瘤的治疗效果, 不增加正常组织的毒性作用。放疗敏感启动子与编码毒素的 cDNA 配伍, 细胞因子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, 又使得细胞因子的系统毒性作用最小化。在此实验之后, 又有一些关于构建重组质粒 pEgr-TNF- $\alpha$  并通过脂质体介导法将 pEgr-TNF- $\alpha$  质粒转入肿瘤细胞, 在放疗的同时激活 Egr-1 启动子, 诱导下游 TNF- $\alpha$  基因在肿瘤局部表达, 避免了 TNF- $\alpha$  给全身带来的副作用, 同时提高放疗的敏感性<sup>[4]</sup>。但是, Egr-1 启动子构建的辐射诱导基因表达调控系统的局限性在于 Egr-1 的辐射诱导相对短暂, 诱导 2d 后转基因产物的可表达恢复至原水平。Ma 等<sup>[9]</sup>用 2Gy 的辐射剂量诱导 Egr-1 启动子, 这一剂量与标准临床放疗剂量接近, 多次小剂量照射使正常细胞的损伤最小化, 又可多次诱导 TNF- $\alpha$  基因, 使 TNF- $\alpha$  持续至一较高水平, 且每次辐射剂量与临床放疗剂量接近, 因而易被临床接受。

Egr-1 启动子除可以连接 TNF- $\alpha$  基因外, 还与自杀基因配伍。自杀基因治疗肿瘤是进展较显著的肿瘤基因治疗方法之一, 但单纯自杀基因治疗尚不能杀死全部肿瘤细胞<sup>[6]</sup>, 使用自杀基因与放疗联合应用却能使部分肿瘤(如肝癌、肺癌等)完全消退。其机制可能为辐射诱导的细胞凋亡可促进临近未转染细胞摄取含有更昔洛韦(ganciclovir, GCV)毒性代谢产物的凋亡小体, 从而大大增强活体内的旁观者效应, 最终导致肿瘤细胞被完全杀伤。早在 1999 年, Kawashita 等<sup>[7]</sup>发现 Egr-1 基因在正常肝细胞中不表达, 而在人肝癌细胞中高表达, Egr-1 启动子的活性在人肝癌细胞中呈辐射剂量依赖性。利用 HVJ(日本细胞凝集素病毒)-脂质体将 pEgr-单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)转移至裸鼠移植瘤, 然后放疗, 发现在 3 周内肿瘤几乎消退, 且无毒副作用; 同时还发现辐射可显著提高转导 HSV-TK 基因的靶

细胞对 GCV 的敏感性, 最终达到抑制肿瘤生长的目的。魏道严等<sup>[8]</sup>利用腺病毒构建 AdEgr-胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)/TK, 以绿色荧光蛋白基因为报告基因, 感染小鼠肝细胞株 MM45T.Li 的移植瘤, 然后放疗, 发现辐射增强 AdEgr-CD/TK 受感染细胞对前药 5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FU)、GCV 的敏感性, 在体外从 mRNA 及蛋白质水平证实不同剂量的  $\gamma$  射线照射可以有效诱导 CDg-lyTK 基因在肝癌细胞内表达, 并呈剂量依赖性。在通过瘤内注射 AdEgr-CDglyTK 加腹腔注射 5-FU+GCV 合并肿瘤局部照射处理后 2 个月内, 约 30% 的小鼠肿瘤完全消退, 且未见明显的全身毒性反应增加。该结果提示, 利用辐射诱导调控 CDg-lyTK 基因的表达进行小鼠肝癌的放射-基因治疗是一种安全、有效的途径。另外, Jin 等<sup>[9]</sup>报道了构建 pEgr-IL-18-B7.1 质粒(将 mIL-18 基因和 B7.1 基因构建于 Egr-1 启动子下游), 将其单独或联合放疗治疗黑色素瘤, 结果发现在联合治疗组中, 荷瘤小鼠机体的抗肿瘤免疫性被大大增强。

最近, 王卫东等<sup>[10,11]</sup>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, 缺氧反应元件是介导细胞缺氧反应的重要调控序列, 他们通过将 Egr-1 启动子与缺氧诱导因子-1 特异性结合诱导下游基因表达, 构建缺氧反应元件-Egr 启动子, 驱动 HSV-TK 基因表达, 该启动子具有辐射和缺氧双重敏感性, 可显著提高 HSV-TK 基因表达。Greco 等<sup>[12]</sup>也有相似报道。

总之, 随着对 Egr-1 基因启动子及应用 Egr-1 基因启动子构建辐射诱导调控系统的进一步研究, 我们可以相信此方法必将成为一种有效的肿瘤治疗方法。

#### 参 考 文 献

- 1 Hallahan DE, Sukhatme CP, Sherman ML, et al. Protein-kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers Egr-1 and jun. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(4): 2156-2160.
- 2 Rakesh D, Neelam T, Vikas P, et al. Reactive oxygen intermediates target CC (A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(6): 2419-2422.
- 3 Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- 4 吴丛梅, 李修义. pEgr-TNF $\alpha$  质粒的构建及基因-放射治疗小

(下转第 126 页)

- SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res*, 2002, 157(1): 45-51.
- 8 Geng L, Donnelly E, MacMahon G, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2413-2419.
  - 9 Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenographs. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 39-44.
  - 10 Williams KJ, Telfer BA, Brave S, et al. ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling, combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8587-8593.
  - 11 Hess C, Vuong V, Riesterer O, et al. Effect of VEGF inhibitor PTK787/ZK222548 combined with ionizing radiation on endothelial ZK222548 combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumor growth. *Br J Cancer*, 2001, 85(12): 2010-2016.
  - 12 Zips D, Krause M, Hessel F, et al. Experimental study on different combination schedules of VEGF-receptor inhibitor PTK787/ZK222548 and fractionated irradiation. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3869-3876.
  - 13 Griscelle F, Li H, Cheong C, et al. Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6698-6703.
  - 14 Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, et al. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in anti-tumor therapy. *Nature*, 1998, 394(6690): 287-291.
  - 15 Gorski DH, Mauceri HJ, Salloun RM, et al. Prolonged treatment with angiostatin reduces metastatic burden during radiation therapy. *Cancer Res*, 2003, 63(2): 308-311.
  - 16 Huang SM, Li J, Armstrong EA, et al. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839(lressa). *Cancer Res*, 2002, 62(15): 4300-4306.
  - 17 Ansiaux R, Baudelet C, Jordan BF, et al. Thalidomide radiosensitizes tumors through early changes in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(2 Pt 1): 743-750.
  - 18 Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance?. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(19): 1440-1452.
  - 19 Fenton BM, Paoni SF, Ding L, et al. Effect of VEGF receptor-2 antibody on vascular function and oxygenation in spontaneous and transplanted tumors. *Radiother Oncol*, 2004, 72(2): 221-230.
  - 20 Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cell. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 13313-13316.
  - 21 Geng L, Donnelly E, McMahon G, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2413-2419.
  - 22 Park JS, Qiao L, Su ZZ, et al. Ionizing radiation modulates vascular endothelial factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependent pathways. *Oncogene*, 2001, 20(25): 3266-3280.
  - 23 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(9): 4604-4613.
  - 24 Zips D, Hessel F, Krause M, et al. Impact of adjuvant inhibition of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases on tumor growth delay and local tumor control after fractionated irradiation in human squamous cell carcinomas in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 61(3): 908-914.
  - 25 Winkler F, Kozin SV, Tong RT, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 553-563.
  - 26 Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005, 307(5706): 58-62.
  - 27 Siemann DA, Shi WY. Efficacy of combined antiangiogenic and vascular disrupting agents in treatment of solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 60(4): 1233-1240.

(收稿日期: 2005-08-23)

(上接第 121 页)

- 鼠黑色素瘤的实验研究. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(3): 143-145.
- 5 Ma JK. Genes, greens, and vaccines. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1141-1142.
  - 6 王卫东、陈正堂. 缝隙连接与自杀基因旁观者效应研究进展. *中华肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(3): 231-233.
  - 7 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.
  - 8 魏道严, 戴冰冰, 陈诗书. 放射诱导经 Egr-1 启动子调控的腺病毒介导 CDglyTK 基因的肿瘤靶向表达. *中华医学杂志*, 2001, 81(16): 999-1003.
  - 9 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.
  - 10 王卫东, 陈正堂, 李德志, 等. 缺氧/辐射双敏感性启动子调控 HSV-TK 表达对肺癌移植瘤的作用. *癌症*, 2004, 23(7): 788-793.
  - 11 Zhu H, Jackson T, Bunn HF. Detecting and responding to hypoxia. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(1): 3-7.
  - 12 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.

(收稿日期: 2005-08-31)