

恶性肿瘤基因治疗和放射治疗相互作用的机制及联合治疗展望

赵艳芝 李进 王芹 穆传杰

【摘要】 放疗和基因治疗是恶性肿瘤治疗的两种手段, 放疗通过提高基因的转移效率、DNA的重组整合及诱导基因的表达等机制增强基因治疗的效果, 基因治疗通过提高辐射敏感性、减少正常组织放疗损伤、修复辐射受损的基因及提高血管的功能等机制提高放疗的效果, 两者的联合治疗有协同作用。

【关键词】 肿瘤; 放射疗法; 基因疗法; 联合疗法

【中图分类号】 R730.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)04-0250-04

The mechanisms of inter-effect about gene therapy and radiotherapy to tumor and the prospect of therapeutic alliance

ZHAO Yan-zhi, LI Jin, WANG Qin, MU Chuan-jie

(Department of Biology, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 The way about oncotherapy include radio therapy and gene therapy, in the recent years there are some improve about the therapy alliance, by the mechanism of improving the efficiency of the gene transferring, the recombination and conform of the DNA and induction the expressing of the gene et. The radiotherapy can enhance the effect of the gene therapy. By the mechanism of improving of radiosensitivity some, reducing the radiation damage of radiotherapy, repairing the radiation impaired gene the gene therapy can enhance the effect of the radiotherapy.

【Key words】 Neoplasms; Radiotherapy; Gene therapy; Therapeutic alliance

在恶性肿瘤的治疗中, 放射治疗是通过辐射诱导肿瘤细胞原发DNA损伤或者细胞凋亡, 从而导致肿瘤细胞的死亡。基因治疗是把外源的功能基因导入病变组织或细胞内进行表达, 以矫正或替代异常基因。单一的基因治疗或者放射治疗疗效差, 但两者结合起来表现了良好治疗效果。

1 放射治疗对基因治疗作用的机制

1.1 提高基因靶向转移的效率并增强治疗基因的表达

辐射使受照细胞表面受损及穿孔, 引起细胞膜通透性和跨膜电位的改变, 便于带负电荷的外源DNA主动进入细胞。随着辐射剂量的增加细胞内基因产物的量也相应增加。Stevens等^[1]发现, 用9 Gy

的 γ 射线照射可以将质粒载体介导的DNA的初始转染效率提高1400倍。Tang等^[2]采用腺病毒载体AdCMVlu感染 γ 射线照射后的小鼠肺癌细胞, 可造成细胞内lu基因编码产物呈剂量依赖性扩增, 扩增效率最高可达24倍, 抑制了肿瘤的生长。

基因是通过载体来转染肿瘤细胞的, 辐射能促进病毒的复制, 从而促进治疗基因在肿瘤细胞中的含量进而提高表达量。Kanazawa等^[3]用腺相关病毒-单纯疱疹病毒胸苷激酶/羟甲基无环鸟苷联合放疗作用于体外的HeLa和HEp-2细胞, 先用腺相关病毒LacZ转染细胞再用Mung bean nuclease消化单链细胞, 就能清楚显示双链复制型腺相关病毒vector genome, 在4 Gy时复制型双链有明显提高。

1.2 提高外源DNA与受体细胞DNA的重组和整合

辐射导致受体细胞DNA的损伤, 从而激活细胞的修复机制, 在修复过程中由于剪切和重组的发生, 很容易使外源DNA和受体DNA发生重组整合。Stevens等^[1]发现, γ 射线照射组细胞内游离质

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(05YFJMJC12100)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院 中国协和医科大学 放射医学研究所生物学研究室

通讯作者: 赵艳芝 (E-mail: zhaoyanzhi229@yahoo.com.cn)

粒的数目是未照射组的 50%，但质粒整合入细胞基因的细胞数目却显著高于未照射组。

1.3 诱导并控制基因的表达

辐射产生的活性氧类介质可作用于辐射诱导基因的启动子而诱导该基因的表达，从而激活或增加下游基因的表达。Kawashita 等^[4]构建了表达型质粒 pEgr-tk 和 pEgr-luc，将这两种质粒转染肝癌细胞系，结果表明，转染 pEgr-luc 后照射细胞 luc 的表达是未照射细胞的 15~28 倍，其表达水平与受照射剂量呈正相关；将 pEgr-tk 转染肝癌细胞系后给予射线照射，照射细胞对羟甲基无环鸟苷的敏感性较未照射细胞增强；该细胞系的裸鼠模型同样证实了质粒转染合并照射的动物肿瘤体积较未照射组或单一药物治疗组明显减小，3 周内肿瘤完全消退。

2 放射治疗和肿瘤免疫基因治疗的协同作用

人类肿瘤的免疫原性大多较弱，肿瘤细胞会产生免疫抑制因子，抑制细胞免疫和体液免疫，逃避宿主杀伤肿瘤细胞的途径。如将免疫相关因子基因转入细胞，使其在宿主体内或肿瘤局部持续产生特定的表达产物，可刺激机体免疫功能或直接对肿瘤起抑制和杀伤作用，而辐射可杀死癌细胞，减少肿瘤来源的免疫抑制因子的生成，间接增加肿瘤的抗原性，诱导机体的免疫应答。Weichselbaum 等^[5]构建了质粒 pEgr-TNF，将其转染人肿瘤细胞 HL525 后注入人鳞癌细胞系 SQ-28B 的裸鼠模型，并且给予 20 Gy 的照射，结果显示，单一照射组在治疗后 36 d 肿瘤体积缩小至对照组的 1.1%，此后肿瘤继续生长，治疗后 50 d 因肿瘤负荷过重而死亡；有 1 只裸鼠(1/7)肿瘤完全消退；联合治疗组于治疗后 20 d 肿瘤完全消退，仅有 1 只(1/7)在 36 d 复发，其余均达到完全治愈。

3 基因治疗对放射治疗的增强机制

3.1 基因治疗可提高辐射敏感性

临床上不同种类的肿瘤细胞、或者种类相同分期不同的肿瘤细胞其辐射敏感性不同，使用与放射治疗敏感相关的基因可以改变肿瘤细胞的敏感性，从而提高放疗的疗效。改变肿瘤细胞敏感性的机制主要是通过促进促凋亡基因 bax 的转录、抑制凋亡基因 bc1-2 的转录以增强肿瘤细胞对放疗的敏感

性，或者使肿瘤细胞阻滞于 G₁ 期，减少了进入 S 期的细胞，而 G₁ 后期对放疗比较敏感，从而提高肿瘤细胞对辐射的敏感性。

3.2 辐射保护性基因治疗对放射治疗的影响

放疗中射线使人体组织间液发生电离，产生自由基，这些自由基再与生物大分子发生作用，形成不可逆损伤，导致细胞死亡，这样在杀伤肿瘤细胞的同时也使肿瘤周围的正常组织细胞受到损伤。为了保护正常的组织，可以采取辐射保护基因治疗，提高正常组织对射线的耐受性，应用于辐射保护的基因应具有抑制细胞凋亡途径、削弱氧自由基和辐射诱导的损伤、中和细胞因子作用。目前对 p53^[6]和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 研究得比较多，SOD 的功能是催化超氧自由基分解为氧和过氧化氢，锰(Mn)作为 MnSOD 的活性成分主要作用是保护线粒体膜免受自由基损伤，利用质粒/脂质体或腺病毒表达载体，可将 MnSOD 基因转入特定的组织或器官，使其在这些细胞内过表达，发挥稳定线粒体膜的作用，从而对这些组织细胞产生放射性保护作用。动物研究表明，与 Cu/ZnSOD 组和空载组相比，放疗前给予 MnSOD 基因治疗，可对正常组织器官起明显的放射性保护作用，而对肿瘤细胞无放射性保护作用^[7]。

3.3 修复相关基因治疗对放射治疗的影响

在放射治疗时，射线直接作用于 DNA，引起 DNA 分子出现断裂、交联。放疗停止后，这些受损的 DNA 分子会在细胞的修复机制下进行修复恢复，使受辐射损伤的细胞得以存活，如果阻断辐射损伤的 DNA 的修复，则受损的细胞得不到修复而发生凋亡或者死亡，从而促使肿瘤的消亡，减少肿瘤的复发。转染的修复相关基因的表达产物可以与受损的 DNA 结合，使修复机制不能进行，受损的肿瘤细胞就会死亡。Trofimova 等^[8]用前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)调节的 cDNA 转染前列腺癌细胞，表达的聚 ADP 核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)-DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD)加强了辐射的敏感性，促进了肿瘤细胞的凋亡。PARP-DBD 可以和辐射造成的断裂受损的 DNA 链结合而导致修复的终止。小分子干扰 RNA 也可与辐射受损的 DNA 结合从而阻止修复，导致肿瘤细胞的死亡^[9,10]。

3.4 抗血管生成基因治疗对放射治疗的影响机制

抗血管生成基因也能增强放疗的作用。李勇等^[11]用构建的 pCMV2-endostatin 质粒转染大鼠乳腺癌 Walker2256 细胞种植性肿瘤的动物模型并结合放疗, 基因与放疗联合组肿瘤的生长速率和重量均明显小于单纯基因治疗和放疗组。肿瘤内新生成的血管在结构和功能上是异常的, 从而使肿瘤内乏氧, 而抑制血管生成的基因产物可以通过消除过多的异常内皮细胞而使血管系统正常化, 提高并正常化血管的功能, 使血供相对提高, 从而提高对放疗的敏感性^[12, 13]。

4 展望

4.1 低剂量辐射兴奋效应和放射治疗的结合

辐射兴奋效应的重要表现之一是全身低剂量照射增强机体的免疫功能, 基因治疗可提高放疗的敏感性, 使低剂量照射就能抑制或杀死肿瘤细胞, 因此低剂量辐射和基因治疗结合起来能使副作用进一步减小, 再加上低剂量辐射的兴奋作用能进一步促进基因治疗的效果, 促进肿瘤的消亡。所以, 低剂量辐射治疗和基因治疗的联合是可行的、有效的。

4.2 双(多)基因治疗联合放射治疗

肿瘤的发生与发展本来就是一个多因素、多阶段的复杂过程, 针对单一因素的治疗并不能达到理想的抑瘤效应, 多基因治疗联合放射治疗是发展的必然结果。Rogulski 等^[14]构建了 CD/5-FC 系统和羟甲基无环鸟苷系统, 动物体内外实验证明均能提高肿瘤对辐射的敏感性; 后又构建了含有 CD 与单纯疱疹病毒胸苷激酶融合基因的重组逆转录病毒载体, 将其感染 9L 胶质细胞后接种到裸鼠体内, 结果发现 5-FC/羟甲基无环鸟苷联合放疗组可以使 60% 的肿瘤治愈 (局部肿瘤完全消退并持续至第 90 日), 治愈率较 5-FC/羟甲基无环鸟苷组高 3 倍, 而单纯照射组仅能减慢肿瘤的生长, 未见肿瘤消退现象。可见, 双自杀基因之间具有协同作用, 并可明显增强肿瘤的辐射敏感性。多基因治疗也有报道: CD 基因构建于逆转录病毒载体 pLxSN, mIL-2 和 mGM-CSF 基因构建于 pIRES, 先用 CD/5-FC 治疗胃癌细胞株, 然后联合 mIL-2/mGM-CSF 两种细胞因子基因治疗小鼠模型胃癌, 体外结果显示, 20% 的转基因细胞可杀灭 70%~80% 的肿瘤细胞; 动物实验结果表明, 应用 CD/5-FC 即可产生很强的抗肿瘤作用, 结合 mIL-2/mGM-CSF 两种细胞因子基因,

抗肿瘤作用会得到进一步强化, 大部分肿瘤完全消退^[9]。以上实验结果表明, 多种基因和放疗联合治疗有可能起到更大的治疗作用, 是一个很好的切入点。

参 考 文 献

- 1 Stevens CW, Zeng M, Cerniglia GJ, et al. Ionizing radiation greatly improves gene transfer efficiency in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(14): 1727-1734.
- 2 Tang DC, Jeniglia RS, Shi Z, et al. Overexpression of adenovirus-encoded transgenes from the cytomegalovirus immediate early promoter in irradiated tumor cells. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(17): 2117-2124.
- 3 Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, et al. Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther*, 2003, 10(1): 51-58.
- 4 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.
- 5 Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- 6 Li JH, Lax SA, Kim J, et al. The effects of combining ionizing radiation and adenoviral p53 therapy in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Biol*, 2001, 77(1): 71-81.
- 7 Epperly MW, Bray JA, Krager S, et al. Intratracheal injection of adenovirus containing the human MnSOD transgene protects athymic nude mice from irradiation-induced organizing alveolitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999, 43(1): 169-181.
- 8 Trofimova I, Dimtchev A, Jung M, et al. Gene therapy for prostate cancer by targeting poly (ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 6879-6883.
- 9 Collis SJ, Ketner CW, Hicks JL, et al. Expression of the DNA-PK binding protein E4-34K fails to confer radiation sensitivity to mammalian cells. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79(1): 53-60.
- 10 Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, et al. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1550-1554.
- 11 李勇, 金宁, 杨海山, 等. 内皮抑素基因联合放射治疗对大鼠 Walker2256 细胞种植性肿瘤的抑制作用. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25 (6): 531-533.
- 12 Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*, 2001, 7(9): 987-989.
- 13 Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade

differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6248-6252.

14 Rogulski KR, Wing MS, Paielli DL, et al. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent -lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization.

Hum Gene Ther, 2000, 11(1): 67-76.

15 郭善禹, 顾琴龙, 刘炳亚, 等. CD 基因联合mIL-2/mGM-CSF 基因治疗胃癌的研究, *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(3): 191-194.

(收稿日期: 2006-04-11)

·临床放射医学·

干细胞移植的磁性标记及磁共振成像活体示踪

周翠屏 沈君 梁碧玲

【摘要】 干细胞移植的临床应用需要解决植入活体内干细胞在体内存活、迁移及分化的监测问题。通过对干细胞进行顺磁性标记, 磁共振成像(MRI)能够在活体上显示标记的干细胞, 并进行特异性地追踪及定位, 是目前干细胞活体示踪极具前景的方法。干细胞进行磁性标记主要利用铁类或钆类对比剂, 两者各有优缺点。利用铁类或钆类对比剂标记干细胞并进行 MRI 活体监测取得了成功。并在心脑血管缺血损伤的疾病模型中得到应用, 但在干细胞磁性标记的载体选用及其标记率、标记的持久性、标记对细胞活力及遗传性状方面尚存在一定的问题。

【关键词】 造血干细胞移植; 磁共振成像; 磁性标记; 示踪; 活体内

【中图分类号】 R445.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)04-0253-04

Magnetic labelling of transplanted stem cells and in vivo tracking with magnetic resonance imaging

ZHOU Cui-ping, SHEN Jun, LIANG Bi-ling

(Department of Radiology, Zhongshan University of the Second Affiliated Hospital, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 How to monitor and track the survival, migration and differentiation of grafted stem cell in vivo is necessary for the widespread clinically application of stem cell transplantation. Magnetic resonance imaging(MRI), which can display and specifically track and localize labelled stem cell by paramagnetically labelling of the stem cell, is an extremely prospective method to monitor stem cell in vivo. The ferrum and gadolinium derivative contrast agents were mainly used to paramagnetically label the stem cell, and each had its own advantages and disadvantages. Currently, on the basis of paramagnetically labelling of the stem cell with ferrum and gadolinium derivative contrast agents, MRI had been successfully used to monitor the stem cell in vivo and had been applied into animal model of the heart and brain stroke, but these are still some problems exist such as the selection of vehicle transferring the contrast agents into stem cells, the labeling efficiency, the duration of labelling and the viability and heredity changes of the stem cell after labelling.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Magnetic resonance imaging; Magnetic labeling; Tracking; In vivo

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞, 根据来源可分为胚胎干细胞和成体干细胞。大

量的动物实验研究表明, 干细胞移植在神经系统的损伤和中枢神经系统退行性变疾病、心肌梗死、血液病等方面的治疗取得了可喜的效果, 显示了不可估量的应用前景。但是, 干细胞广泛应用于临床尚需解决较多问题, 其中关键的是如何监测移植的干细胞在体内存活、迁移及分化情况。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400115); 广东省自然科学基金博士启动项目(04300241)

作者单位: 510120 广州, 中山大学第二附属医院放射科

通讯作者: 沈君(E-mail: vencentsj@tom.com)