

文章编号: 1007-4627(2005)03-0284-04

辐射介导自杀基因和 *p53* 及其靶基因靶向治疗*

刘兵^{1,2}, 张红¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 由于临床治疗剂量对正常组织造成严重损伤, 使得放疗存在一些不足。刚刚兴起的肿瘤基因治疗同样存在一些弊端, 如对肿瘤组织缺乏特异性, 治疗基因表达水平有限, 有潜在的生物危险性等。在一定程度上, 辐射靶向诱导自杀基因和 *p53* 基因及 *p53* 靶基因靶向基因治疗可弥补以上两种疗法的不足。该治疗方法不仅可以弥补单独放疗或单独基因治疗的不足, 而且可在降低各自治疗剂量的基础上提高疗效。目前已有几种符合要求的表达载体进入临床试验。着重介绍了离子辐射介导自杀基因或 *p53* 基因及 *p53* 靶基因的辐射靶向基因治疗的研究进展。

关键词: 离子辐射; 自杀基因; *p53* 基因; 肿瘤; 基因治疗

中图分类号: TL99 **文献标识码:** A

1 引言

肿瘤的放疗和基因治疗都不同程度地存在一些不足。例如, 临床治疗剂量放疗可造成正常组织严重损伤, 基因治疗存在潜在的生物安全性和危险性等。分子生物学技术的发展使通过离子辐射诱导提高肿瘤基因治疗效果成为可能。目前研究的肿瘤辐射基因治疗是通过导入基因的表达使受照细胞对辐射的敏感性增加或使放射标记药物易于吸收, 或通过体外辐射使前体药活化。辐射诱导的以自杀基因或 *p53* 基因及 *p53* 靶基因为目的基因辐射诱导靶向基因治疗是一项全新的极有前途的肿瘤治疗方法。本文着重论述辐射靶向介导自杀基因和 *p53* 基因及 *p53* 靶基因靶向基因治疗。

2 离子辐射靶向自杀基因治疗

将治疗基因转入肿瘤或正常组织细胞还有许多困难亟待克服, 为此, Weichselbaum 等^[1] 根据“辐射靶向诱导基因治疗”的新思想设计了一种治疗性基因表达系统。他们将编码毒作用或免疫调节功能的蛋白基因 cDNA 插入辐射诱导型启动子的下游,

通过辐射诱导激活治疗基因转录, 从而从时间和空间上对转入基因实施调控。该研究小组利用辐射诱导型 SGE (cArG) 元件构建了由 425 bp (base pair) 的碱基组成的嵌合体, 位于 EGR-1 基因 (与编码肿瘤坏死因子 α (TNF- α) cDNA 连接) 的转录起始点上游, 内含 6 个 SRE 结构。将上述嵌合体克隆到复制缺陷型腺病毒载体, 构成重组腺病毒 Ad. Egr. TNF, 辐射即可诱导增加肿瘤 TNF- α 的表达。Hallahan 等^[2] 对 TNF- α 静脉注射和定向辐射治疗进行了临床 I 期研究。与 Ad. Egr. TNF- α 治疗比较, Ad. Egr. TNF- α 与辐射联合治疗不仅可以促进肿瘤消退, 而且提高辐照区瘤组织内 Ad. Egr. TNF- α 表达, 联合治疗的抗癌作用也明显增强^[3]。联合治疗因辐射诱导不仅使肿瘤组织中 TNF- α 浓度增加, 而且使作用时间延长, 从而引发以血管栓塞和肿瘤细胞坏死为主的病理变化。近来, Mauceri 等^[4] 的研究表明, TNF- α 通过血管形成阻滞因子的释放抑制肿瘤血管的形成。由此可见, 无论是肿瘤细胞还是肿瘤组织血管都是 Ad. Egr. TNF- α 与辐射联合作用靶组织。Ad. Egr. TNF- α 是目前唯一用于病人的自杀性基因治疗药物^[5, 6]。

收稿日期: 2004-12-10; 修改日期: 2005-03-28

* 基金项目: 中国科学院百人计划资助项目 (BR030601)

作者简介: 刘兵 (1964-), 男 (汉族), 甘肃渭源人, 博士生, 副研究员, 从事离子束治癌生物基础研究;

E-mail: liub626@yahoo.com.cn

单纯疱疹病毒胸腺嘧啶脱氧核苷酸激酶 (HSVTK)/Ganciclovir (GCV) 系统是已开发的另一种与放疗联合治疗肿瘤的 EGR-1 自杀基因结构。研究发现, 嵌合体 *pEgr-TK* 结合 GCV 再加辐射对鼠脑瘤和肝脏肿瘤有一定的疗效^[7]。

辐射靶向 EGR-1 自杀基因治疗可降低 EGR-1 基因启动子活化所需辐射剂量, 从而减少放疗对敏感个体造成损伤。对 EGR-1 基因启动子缺失突变的研究表明, 多重 SRE 结构对免疫和特殊生长因子的诱导比单一 SRE 结构强^[8]。基于以上结果, 研究者开发了含有 4 个 SRE 结构的人工启动子, 该启动子对低至 1 Gy 的辐射即可产生反应(野生型 EGR-1 启动子产生反应的理想剂量为 3 Gy)^[9]。最近, 又将由不同数目、不同序列和不同排列顺序构成的启动子转入腺癌细胞和神经胶质瘤细胞, 并对其辐射敏感性进行了研究。结果发现, 虽然 SRE 结构数目的增加可增强低剂量辐射诱导效应, 但并不提高非特异性基因的表达。体外研究表明, SRE 结构核心的 A/T 序列的特异性改变将明显增强辐射诱导效应。体内试验表明, 人工启动子通过调节辐射诱导的自杀基因治疗机制抑制肿瘤生长^[10]。为了确保治疗基因长期有效, Scott 等设计了一种以噬菌体 P1 结合为基础的“分子开关”, 当受到离子辐射时, 人工 EGR-1 增强子/启动子诱导结合酶 Cre 表达, 后者通过 loxP 位点介导的结合激活 HSV-TK。因此, 即使是低至 1 Gy 辐射也可通过 CMV 启动子使 HSV-TK 基因表达, 最终使辐射效应明显放大^[11]。用肿瘤、组织、条件或酶环境特异性启动子代替 CMV 启动子即可发展更特异、更安全和有选择性的辐射靶向基因治疗。

乏氧是恶性实体瘤对辐射产生耐受的主要因素之一。Greco 等^[12]利用与乏氧反应元件 (HREs) 结合的辐射反应 SRE 元件的荒诞启动子, 仅使定位于肿瘤的载体表达。通过优化间距、数目、方向和两个元件之间的距离等, 不仅可使联合启动子进一步优化, 而且可调节这些双重增强子结构对单纯乏氧/单纯辐射或乏氧和辐射同时刺激的反应。最近, Salloum 等^[13]的体内试验印证了 Greco^[12]等的体外试验结果。将人直肠腺癌细胞注入裸鼠四肢, 然后用 Egr-TNF- α 单独治疗或 Egr-TNF- α 与辐射联合治疗, 发现联合治疗组不仅使肿瘤生长速度明显变慢, 而且肿瘤组织中 TNF- α 增加了 30%。

最近, 人们研究了 X 线和启动子诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 基因对血管内皮系统肿瘤的治疗作用^[14, 15]。实体瘤产生的 NO⁻ 不仅增加血管内皮的通透性, 而且增加肿瘤组织血流量。iNOS 基因治疗就是试图使肿瘤组织特异产生 NO⁻。现已证明, iNOS 基因治疗潜力很大^[16]。有关 *p21^{Cip/WAF}/iNOS* 结构对辐射靶向自杀性基因的研究表明, 该治疗方法通过调节毛细血管紧张性来促进化疗药物转运或增强氧的转运, 从而减少辐射耐受性乏氧细胞^[14]。用 4 Gy (相当于临床剂量) 辐照动物后, 将 *p21^{Cip/WAF}/iNOS* 注入鼠尾动脉, 辐射治疗组 iNOS 的诱导量是非辐射组的 5 倍, 1 h 后动脉血管明显舒张。与 CMV/iNOS 启动子比较, 转染细胞中 *p21^{Cip/WAF}/iNOS* 的细胞毒最小。作者认为, 虽然在体外试验中辐射诱导的 *p21^{Cip/WAF}* 启动子活化, 但其持续时间过短不足以引发机体内一氧化氮依赖性细胞杀伤作用^[17]。

现代科学技术不仅使我们增加了对辐射-反应途径的了解, 而且提供了更为先进的自杀性基因治疗方法^[18-21]。

3 离子辐射所致的 p53 依赖性细胞周期阻滞

3.1 p53 肿瘤抑制蛋白

p53 蛋白在决定基因毒性逆境细胞进入细胞周期阻滞或走向凋亡中起关键作用, 该“基因组卫士”的丢失在肿瘤形成中起着重要作用^[21, 22]。一旦 DNA 损伤, p53 浓度因其转录活性和稳定性的增加而增高^[23]。p53 含量及其活性主要取决于转录后修饰。新模型认为, DNA 损伤后染色体结构的改变可能使 ATM 迅速活化^[24]。细胞受到辐射后, 通过这些激酶作用于 N 末端转录活化区的几个特异丝氨酸残基, 使 p53 磷酸化。一旦 DNA 损伤得到修复, p53 介导的 Mdm2 表达增加, 后者又反馈调节 p53 活性。

人的 p53 有 3 个明显功能区。细胞核定位和细胞核输出信号调节 p53 的亚细胞定位, 而寡聚化区使 p53 形成具有转录活性的同源二聚体或异源二聚体。序列特异性 DNA 结合所必需结构位于 p53 的中心区 (第 100—293 位氨基酸)。中心区在 p53 与 DNA 的结合中起重要作用, 多数肿瘤因 p53 中央区

发生突变而影响了 p53 与 DNA 的结合^[25]。第一种机制认为, 辐射引起 DNA 损伤后, 通过 p53 转录活性区的磷酸化和减少与 Mdm2 结合使 p53 的稳定性增加; 第二种机制认为, 磷酸化和/或乙酰化使 p53 C 末端构象改变^[26-28]。

3.2 与细胞周期阻滞有关的 p53 靶基因

3.2.1 细胞周期抑制子 p21^{Cip1/WAF}

作为转录因子, 活化而稳定的 p53 通过对辐射诱导的转录后修饰, 激活连接在 -2 283 到 -2 262 和 -1 395 到 -1 376 的两个 p53 反应元件, 使 p21^{Cip1/WAF} 基因转录活化, p21^{Cip1/WAF} 基因最近的启动子区(距转录起始点 -120 和 -50)与 p53 相互作用使 p21 启动子活化^[29]。Russo 等^[30]的研究表示, 氧化应激时, p53 功能缺失的人体细胞的 ERK/MAP 激酶诱导型 p21^{Cip1/WAF} 始终处于活化状态。Akashi 等^[31]的研究表明, 虽然人原粒细胞辐照后 PKC 的活化是诱导 p21^{Cip1/WAF} 所必需的, 但 p21^{Cip1/WAF} 的诱导通路的选择依赖于 p53。

p21^{Cip1/WAF} 的增加促使非激酶活性 p21^{Cip1/WAF}/细胞周期素/CDK 复合物形成。虽然 p21^{Cip1/WAF} 抑制 CDK 的确切机制还不完全清楚, 但有证据表明, 在 G₁/S 期转化中, p21^{Cip1/WAF} 并非细胞周期素/CDK 复合物形成唯一抑制因素。p21^{Cip1/WAF} 蛋白通过与增殖细胞核抗原(PCNA)的相互作用抑制 DNA 复制。进一步的研究表明, 如果 p21^{Cip1/WAF} 与 G₁ 期细胞周期素/CDK 复合物结合, 使其磷酸化成视网膜细胞瘤蛋白(pRb)的功能受阻。因此, p21^{Cip1/WAF} 通过其独特的通路引起细胞周期阻滞和 G₁/S 期转化停滞。另有研究表明, p21^{Cip1/WAF} 通过依赖于 p53 的机制在 G₂/M 检查点起关键作用^[32]。p53 依赖型 G₂ 期阻滞

可能与由 p21^{Cip1/WAF} 介导的具有促进细胞有丝分裂作用的细胞周期素 B/Cdc2 激酶复合物形成障碍有关。尽管目前已经清楚 p53 缺失导致 G₁ 期停滞, 但 p53 在 G₂ 期停滞中作用仍不清楚, 特别是辐射细胞 G₂ 期停滞好象与除 p53 或 p21^{Cip1/WAF} 之外的其它因素有关。

3.2.2 参与细胞周期停滞的其它 p53 靶基因

14-3-3 脚手架蛋白缺失导致 DNA 损伤, G₂ 期检查点失控和提前进入分裂期。一般认为, 14-3-3 σ 表达增加有助于调节细胞周期素 B/Cdc2 复合物的亚细胞位置, 14-3-3 σ 蛋白与 Cdc2 结合使胞浆激酶得以保护^[33], 在 p53 诱导的 G₂ 期停滞中, 14-3-3 σ 蛋白似乎有细胞系特异性。

现已证明, 生长阻滞和 DNA 损伤诱导型基因 45(GADD45)是 p53 的直接靶基因。虽然 GADD45 的确切功能目前还不清楚, 但有证据显示其不仅在 G₂ 期阻滞中发挥作用, 而且通过与细胞周期素 B/Cdc2 复合物结合使细胞周期素 B/Cdc2 复合物解离, 从而抑制其活性^[34]。离子辐射诱导的人体细胞 GADD45 很可能通过该基因的第三个内含子的 p53 结合元件起作用^[35]。

4 小结

辐射靶向自杀基因和 p53 基因或 p53 靶基因治疗可选择性诱导特异杀死肿瘤细胞, 是很有前途的肿瘤治疗方法。该方法在降低放疗和基因治疗剂量基础上, 不仅可提高肿瘤治疗效果, 而且减少对正常组织的损伤。目前, 我们正在开展有关离子束辐射诱导转基因治疗肿瘤的研究, 现已取得了较理想的结果。

参 考 文 献:

- [1] Weichselbaum R R, Hallahan D E, Sukhatme V P, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, 24: 565.
- [2] Hallahan D E, Mauceri H J, Seung L P, *et al.* Nat Med, 1995, 1: 786.
- [3] Chung T D, Mauceri H J, Hallahan D E, *et al.* Cancer Gene Ther, 1998, 5: 344.
- [4] Mauceri H J, Seetharam S, Beckett M A, *et al.* Int J Cancer, 2002, 97: 410.
- [5] Kircheis R, Wagner E T. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5: 437.
- [6] Kufe D, Weichselbaum R R. Cancer Biol Ther, 2003, 2: 326.
- [7] Joki T, Nakamura M, Ohno T. Hum Gene Ther, 1995, 6: 1 507.
- [8] Chrity B A, Lau L F, Nathans D. Proc Natl Acad Sci, USA, 1988, 85: 7 857.
- [9] Marples B, Scott S D, Hendry J H, *et al.* Gene Ther, 2000, 7: 511.
- [10] Scott S D, Joiner M C, Marples B. Gene Ther, 2002, 9: 1 396.
- [11] Scott S D, Marples B, Hendry J H, *et al.* Gene Ther, 2000, 7: 1 121.

- [12] Greco O, Marples B, Dachs G V, *et al.* *Gene Ther*, 2002, **9**: 1 403.
- [13] Salloum R M, Saunders M P, Mauceri H J, *et al.* *Am Surg*, 2003, **69**: 24.
- [14] Worthington J, Robson T, Murray M, *et al.* *Gene Ther*, 2000, **7**: 1 126.
- [15] Marples B, Greco O, Joiner M C, *et al.* *Curr Pharm Des*, 2003, **9**: 2 105.
- [16] Soler M N, Bobe P, Benihoud K, *et al.* *J Gene Med*, 2000, **2**: 344.
- [17] Worthington J, Robson T, O'Keeffe M, *et al.* *Gene Ther*, 2002, **9**: 263.
- [18] Amundson S A, Fornace A J. *Radiat Prot Dosim*, 2001, **97**: 11.
- [19] Khodarev N N, Park J O, Yu J, *et al.* *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2001, **98**: 12 665.
- [20] Amundson S A, Bittner M, Fornace Jr. *Oncogene*, 2003, **22**: 5 828.
- [21] Amundson S A, Bittner M, Chen Y, *et al.* *Oncogene*, 1999, **18**: 3 666.
- [22] Hanahan D, Weiberg R A. *Cell*, 2000, **100**: 57.
- [23] Levine A J. *Cell*, 1997, **88**: 323.
- [24] Bakkenist C J, Kastan M B. *Nature*, 2003, **421**: 499.
- [25] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. *Nature*, 2000, **408**: 307.
- [26] Wang Y H, Tsay Y G, Tan B C, *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 25 568.
- [27] Nikolac A Y, Li M, Puskas N, *et al.* *Cell*, 2003, **112**: 29.
- [28] Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, *et al.* *Nature*, 2002, **419**: 853.
- [29] Kousodontis G, Tentis I, Papakosta P, *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 29 116.
- [30] Russo T, Zambrano N, Esposito F, *et al.* *J Biol Chem*, 1995, **270**: 29 386.
- [31] Akashi M, Hachiya M, Osawa Y, *et al.* *J Biol Chem*, 1995, **270**: 19 181.
- [32] Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, *et al.* *Science*, 1998, **282**: 1 497.
- [33] Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, *et al.* *Mol Cell*, 1997, **1**: 3.
- [34] Zhan Q, Antinore M J, Wang X W, *et al.* *Oncogene*, 1999, **18**: 2 892.
- [35] Amundson S A, Do K T, Fornace Jr A J. *Radiat Res*, 1999, **152**: 225.

Suicide Genes or p53 Gene and p53 Target Genes as Targets for Cancer Gene Therapy by Ionizing Radiation*

LIU Bing^{1,2}, ZHANG Hong¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract: Radiotherapy has some disadvantages due to the severe side-effect on the normal tissues at a curative dose of ionizing radiation (IR). Similarly, as a new developing approach, gene therapy also has some disadvantages, such as lack of specificity for tumors, limited expression of therapeutic gene, potential biological risk. To certain extent, above problems would be solved by the suicide genes or p53 gene and its target genes therapies targeted by ionizing radiation. This strategy not only makes up the disadvantages from radiotherapy or gene therapy alone, but also promotes success rate on the base of lower dose. By present, there have been several vectors measuring up to be reaching clinical trials. This review focused on the development of the cancer gene therapy through suicide genes or p53 and its target genes mediated by IR.

Key words: ionizing radiation; gene therapy; suicide gene; p53 gene; target