

基因治疗视网膜母细胞瘤的研究进展

郑敏明, 周希媛

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 30872826)
作者单位: (400010) 中国重庆市, 重庆医科大学附属第二医院眼科
作者简介: 郑敏明, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 周希媛, 女, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病。zhouxiyuan2002@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-01-06 **修回日期:** 2010-01-21

Research progress in retinoblastoma gene therapy

Min-Ming Zheng, Xi-Yuan Zhou

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30872826)
Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
Correspondence to: Xi-Yuan Zhou. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China. zhouxiyuan2002@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-06 **Accepted:** 2010-01-21

Abstract

• Gene therapy of retinoblastoma (RB) is a new type of treatment in recent years. In this paper, We make a review about gene therapy status, progress and problems of RB from three aspects of suicide genes, tumor suppressor genes, anti-angiogenic genes.
• **KEYWORDS:** retinoblastoma; gene therapy

Zheng MM, Zhou XY. Research progress in retinoblastoma gene therapy. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):501-503

摘要

基因治疗视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是近年来新型的治疗方法。我们从自杀基因、抑癌基因、抗血管生成基因这三方面对 RB 的基因治疗现状、相关进展及存在问题作一综述。

关键词: 视网膜母细胞瘤; 基因治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.032

郑敏明, 周希媛. 基因治疗视网膜母细胞瘤的研究进展. *国际眼科杂志* 2010;10(3):501-503

0 引言

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是婴幼儿眼病中性质最严重, 危害最大的一种恶性肿瘤。RB 的治疗大多采用患眼眼球摘除术, 局部保守治疗包括化学治疗、光凝治疗、冷冻治疗、加热治疗等。基因治疗是多种肿瘤治疗研究的热点, 因为肿瘤的发生往往与人体内基因的变异或

表达异常密切相关, 基因治疗的目的就在于从基因水平上对这些异常予以纠正。作为基因治疗的靶组织, 眼球因为其特殊的部位和结构, 便于准确地将目的基因导入靶细胞, 具有独特的优势。关于 RB 的基因治疗的研究已有十几年, 现对近十年其研究现状、存在的问题及发展方向予以综述。

1 自杀基因的治疗

自杀基因疗法又称药物敏感基因疗法, 即利用转基因的方法将前药酶解基因导入肿瘤细胞内, 其基因表达产物能将原本无毒性的药物转化为细胞毒性物质, 从而杀死细胞^[1]。其中将单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk) 基因导入肿瘤细胞中表达, 联合应用更昔洛韦 (gancyclovir, GCV) 进行自杀基因治疗是目前最为有效的一种治疗方法。Hurwitz 等^[2]采用腺病毒作为载体, 在体外观察到 HSV-TK/GCV 系统可以杀死视网膜母细胞瘤细胞 (Rb)。在体内采用裸鼠的玻璃体腔内注射制造 RB 模型, 经 HSV-TK/GCV 系统治疗后, 70% 的肿瘤消失。治疗组的生存期较对照组显著的延长。自杀基因还有“旁观者效应”, 有人称之为“代谢协同”、“相邻细胞杀伤作用”等。当肿瘤细胞被转导自杀基因后, 不仅转导细胞被杀死, 而且相邻的未转导的细胞也被杀死。Hayashi 等^[3]报告在体外 Rb 肿瘤细胞实验中用细胞生存分析测试旁观者效应证明, 将 10% 的 Y79Rb-tk 细胞和 90% 的 Y79Rb 细胞共同培养并用 GCV 敏感, 5d 内有 80% 以上的未转染的 Y79Rb 细胞死亡, 50% 的 Y79Rb-tk 细胞死亡。由于不可能通过载体将所有的肿瘤细胞都转入 HSV-tk 基因, 而“旁观者效应”明显扩大了自杀基因的杀伤作用, 在相当程度上弥补了对肿瘤细胞转染效率低的问题, 因此对恶性肿瘤的治疗有着十分重要的意义。关于旁观者效应的机制尚不十分清楚。目前, 多数研究者认为, 旁观者效应是由于转基因细胞产生的杀伤性物质通过细胞间的缝隙连接传递到邻近细胞, 引起细胞死亡, 这需要转基因与邻近细胞的直接接触^[4]。还有学者认为凋亡的 HSV-tk (+) 细胞释放凋亡小体, 引起 HSV-tk (-) 细胞凋亡^[5]。李涛等^[6]观察到 HSV-tk/GCV 系统对 Rb 细胞的杀伤过程中存在明显的“旁观者效应”, 当只有 10% 的 HXO-Rb44/tk 细胞存在时, 前体药物即可对混合细胞产生明显的杀伤作用。进一步对其机制进行研究发现, GCV 作用下的 HXO-Rb44/tk 上清对 HXO-Rb44 细胞不具有杀伤作用, 表明 GCV 的代谢产物不能弥散进入培养基, 旁观者效应的发生需要细胞间的相互接触, 从而说明 GCV 代谢产物通过细胞间缝隙连接进行转运可能是此旁观者效应的主要机制。Rb 自杀基因治疗的研究已取得相当可喜的成果, 展示了良好的发展前景。但是由于研究的时间太短, 还远未达到成熟的程度, 要真正走向临床还有很长的路要走。目前的研究绝大部分仍是基础方面的, 还有相当多的问题尚待解决与完善: (1) 有待开发新一代的自杀基因系统, 进一步提高对肿瘤的杀伤功效。(2) 由于旁观者效应对自杀基因疗法抗肿瘤作用的重要

意义,应进一步以各种措施加强其效应。(3)进一步研究自杀基因疗法与其它治疗手段的联合,采用多系统综合疗法治疗RB,如基因与细胞因子的联合疗法,可一方面抑肿瘤生长,另一方面又提高机体对肿瘤的免疫应答,增加抗肿瘤作用,因此是一条行之有效的途径。

2 导入抑癌基因的治疗

Rb 基因是与 RB 形成关系最为密切的基因,其定位于人 13 号染色体的长臂 1 区 4 带(13q14)上。Rb 基因经两次突变而失活被公认为是 RB 发生的重要分子机制。Rb 基因作为一种抑癌基因,其抑制肿瘤细胞生长的机制与细胞周期阻滞作用有关^[7]。当 Rb 基因失活后,促使细胞提前从 G1 期进入 S 期。细胞分裂加速,使 DNA 损伤修复不完全,进而导致肿瘤的发生。张晓玮等^[8]以逆转录病毒为载体,用脂质体 Dospers 介导法将 Rb 基因导入裸鼠眼玻璃体腔 RB 移植瘤内,Rb 基因可诱导 RB 移植瘤细胞凋亡。近期研究发现,去除 N 端的 Rb 蛋白-PRb94(野生型全长 PRb110 的 NH₂末端缺失 112 氨基酸残基)在头颈部癌^[9]、膀胱癌^[10]、前列腺癌^[11]细胞系及体内肿瘤中具有比 PRb110 更强的肿瘤抑制效应。有研究显示,转染 Rb94 基因的膀胱癌细胞停滞于 G1 期,G2 和 S 期细胞减少^[12]。G1 期细胞增加使转入 S 期的肿瘤细胞减少,表明肿瘤细胞的 DNA 合成受到了抑制,从而影响肿瘤细胞的分裂和增生。提示 Rb94 基因有助于细胞保持在静止期,可有效抑制肿瘤细胞的异常增生。在 RB 的发生发展中除 Rb 基因外,p53 和 p21 等基因在其中起着重要作用。p53 基因是迄今发现的与人类恶性肿瘤相关性最高的一种抑癌基因。大量的体外实验已证实了野生型 p53 基因转染肿瘤细胞可以抑制其生长,诱导肿瘤细胞出现凋亡。相应的动物实验对肿瘤细胞动物模型经血液或肿瘤局部注射含一定浓度的 p53 基因重组体,可以观察到肿瘤不同程度的缩小,动物生存期延长^[13]。国内已有学者研究证实野生型 p53 基因对 Rb 细胞有明显抑制生长的作用^[14]。正常 p53 基因的导入还可以诱导肿瘤细胞对化疗药物及放疗的敏感性,加快肿瘤细胞的凋亡^[15]。

3 抗血管生成基因治疗

1971 年,Folkman 正式提出“肿瘤生长依赖于血管生成”的观点。肿瘤生长分为两个阶段,血管前期和血管期。血管前期肿瘤主要通过弥散作用获得营养和氧,并运走代谢废物。当肿瘤体积增至 1~2mm 以上时,如无新血管长入,肿瘤组织将保持静止状态或退化^[16]。一旦血管长入肿瘤,血液供应变为灌注,新生血管不仅为肿瘤组织提供足够的营养和氧,还提供大量的生长因子,促使肿瘤迅速生长。抗血管生成治疗以肿瘤新生血管为作用靶点,目的是切断肿瘤生长转移所需要的营养,从而达到“饿死”肿瘤的目的,目前已成为重要的抗癌策略。VEGF 是目前发现的最重要的促血管生成因子之一,在肿瘤血管生成过程中发挥重要的调节作用。在众多血管调控因子中,VEGF 是唯一能特异作用于血管内皮细胞的有丝分裂素。它一方面可以增加血管通透性,有利于血浆蛋白、纤维蛋白原外渗,促进血管生成和新基质形成,另一方面,VEGF 促进血管内皮细胞有丝分裂,刺激血管内皮细胞增殖^[17]。Jia 等^[18]将针对 VEGF 的小干涉性 RNA 质粒转染入人 Rb 细胞内,发现稳定转染的血管内皮生长因子 siRNA 可以抑制 Rb 细胞 VEGF 的表达,对 RB 瘤体血管的生成和肿瘤的发生起到了抑制作用。Mahasreshti 等^[19]采用鼠皮下的 RB 模型,以重组腺病毒为载体,将编码可溶性 VEGF 受

体-1 的 cDNA 导入,发现肿瘤体积明显缩小。微血管密度被证实了在肿瘤的发生和机制上所起的作用。Rossler 等^[20]在 107 例 RB 患者中,通过 CD₃₁免疫组织化学法来检测微血管密度,发现血管化程度的增高与侵入脉络膜与视神经有关。18 例转移癌患者的微血管密度显著性的高于未发生转移的癌症患者。Marback 等^[21]做了类似的研究,在 25 例 RB 患者中,研究人员用 CD₃₄检测肿瘤血管区,发现肿瘤的供血越丰富发生转移的可能性越大。目前,抗肿瘤血管生成基因治疗尚处于实验研究阶段,但初步结果是令人鼓舞的。由于肿瘤血管的新生是一个复杂的生理、病理过程,肿瘤生成涉及诸多方面,对于其分子机制还有待于进一步研究。目前尚未明确肿瘤血管的特异性标志,即肿瘤血管与正常血管的差异性标志,如果能在在这方面取得更多的发现,将有助于开发出特异性的抗肿瘤血管生成抑制剂。但由于抗血管生成基因治疗较传统抗癌治疗具有不可比拟的优势:(1)抗血管新生基因治疗的靶向性:内皮细胞具有遗传稳定性,不易产生耐药;(2)直接作用于肿瘤血管内皮细胞,局部浓度高。总之,血管生成是肿瘤生长转移过程中的重要环节,抗血管生成治疗,尤其是抗血管生成的基因治疗作为抗肿瘤治疗的新靶点,具有广阔的应用前景。在整个基因治疗的研究领域中,安全、高效、靶向基因载体的研究和开发是关键和瓶颈问题^[22]。目前关于基因转移多采用病毒载体,具有较高的转染率和高表达能力,这是其他非病毒载体无法比拟的优势。但把一个外源性病毒引入体内,会引起机体的免疫反应和潜在的致突变性,导致目的基因不能持续表达进而需要反复治疗,而对眼球进行反复操作势必带来不必要的损伤。使用短效免疫抑制剂可使目的基因表达时间延长,但免疫抑制的副作用又会接踵而至。况且某些病毒本身就具有一定毒性,对机体是一个潜在的危害^[23]。也有少数学者采用脂质体等非病毒载体进行试验,但转染效率较低^[24],在体内应用具有一定毒性。近年来,有学者在研究中发现,携带有目的基因的微泡造影剂经静脉注入体内后能够通过肺循环到达全身各个器官的靶组织,用低强度超声作用于靶组织,可使微泡在超声的“空化作用”下爆破,使目的基因释放到靶组织^[25]。微泡在一定声能的作用下使靶细胞的胞膜发生“微穿孔效应”,携带有目的基因的质粒可从胞膜上的微孔进入靶细胞内达到基因转导的目的^[26]。这种声能的调控可使微孔的开放呈可逆性的,即不损伤靶细胞;也可使微孔的开放呈永久性的,即引起靶细胞的破裂死亡。超声微泡介导基因治疗仍处于实验研究的起步阶段,还面临许多亟待解决的问题。

总之,基因治疗如能在靶向性、安全性和高效表达等方面加以完善和发展,基因治疗在肿瘤治疗中的地位将会越来越重要。综合治疗将是 RB 治疗的发展趋势。因此,基因治疗若能协同或增强化学药物治疗、放射治疗、激光光凝、PDT、TTT 等的疗效,将会在 RB 的治疗中起重要作用。

参考文献

- 1 Moolten FL. Drug sensitivity (“suicide”) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994;1(4):279-287
- 2 Hurwitz MY, Marcus KT, Chevez-Barríos P, et al. Suicide gene therapy for treatment of retinoblastoma in a murine model. *Hum Gene Ther* 1999;10(3):441-448
- 3 Hayashi N, Ido E, Ohtsuki Y, et al. An experimental application of gene therapy for human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(2):265-272

- 4 Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, *et al*. Gap junction play a role in the "bystander effect" of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system *in vitro*. *Gene Ther* 1996;3(1):85-92
- 5 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, *et al*. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically. *Cancer Res* 1993;53(21):5274-5283
- 6 李涛,张虹. HSV-tk/GCV 自杀基因系统对 RB 的体外抗肿瘤效应. 眼科新进展 2003;23(5):305-308
- 7 Sun A, Bagella L, Tutton S, *et al*. From G0 to S phase: A view of the roles played by the retinoblastoma family members in the Rb E2F pathway. *J Cell Biochem* 2007;102(6):1400-1404
- 8 张晓玮,陈大年,罗成仁. Rb 基因诱导视网膜母细胞移植瘤细胞凋亡的实验研究. 眼科研究 2002;20(1):23-26
- 9 Li D, Day KV, Yu S, *et al*. The role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62(16):4637-4644
- 10 Zhang X, Multani AS, Zhou JH, *et al*. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Res* 2003;63(4):760-765
- 11 Roig JM, Molina MA, Cascante A, *et al*. Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1456-1462
- 12 Pirolo KF, Rait A, Zhou Q, *et al*. Tumor-Targeting nanocomplex delivery of novel tumor suppressor RB94 chemosensitizes bladder carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):2190-2198
- 13 Matheu A, Maraver A, Klatt P, *et al*. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 2007;448(7151):375-379
- 14 罗霁菡,周希媛. 超声微泡介导野生型 p53 基因转染 Y79 细胞的实验研究. 中国超声医学杂志 2008;24(12):1060-1062
- 15 Xu L, Pirolo KF, Tang WH, *et al*. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation in regression of human head and neck cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 1999;10(18):2941-2952
- 16 Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy. *Cancer and Metastasis Rev* 2000;19(1-2):45-49
- 17 Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K, *et al*. Mechanism of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000;19(53):6122-6129
- 18 Jia RB, Zhang P, Zhou YX, *et al*. VEGF-targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 2007;39(2):108-115
- 19 Mahareshti PJ, Kataram M, Stockard CR, *et al*. Anti-angiogenic gene therapy for retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4968
- 20 Rossler J, Dietrich T, Pavlakovic H, *et al*. Higher vessel densities in retinoblastoma with local invasive growth and metastasis. *Am J Pathol* 2004;164(2):391-394
- 21 Marback EF, Arias VE, Paranhos A Jr, *et al*. Tumour angiogenesis as a prognostic factor for disease dissemination in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2003;87(10):1224-1228
- 22 Verma IM, Somia N. Gene therapy-promise, problems and prospects. *Nature* 1997;389(6648):239-242
- 23 Campochiaro PA. Gene therapy for retinal and choroidal diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2(5):537-544
- 24 Lai CC, Wu WC, Chen SL, *et al*. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2401-2407
- 25 Price RJ, Kaul S. Contrast ultrasound targeted drug and gene delivery: an update on a new therapeutic modality. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2002;7(3):171-180
- 26 Tsutsui JM, Xie F, Porter RT. The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovasc Ultrasound* 2004;2(1):23-27