

重组腺病毒介导的前列腺癌基因治疗研究进展

杨月峰, 吴祖泽, 王立生*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验血液学研究室, 北京 100850)

摘要: 前列腺癌的基因治疗已逐渐成为研究热点。载体系统是基因治疗的基础。目前, 腺病毒载体在前列腺癌基因治疗中应用最为广泛。溶瘤腺病毒的研究进展为前列腺癌基因治疗开辟了新的途径。近年研究表明, 溶瘤腺病毒单独使用或与治疗基因联合应用, 能够有效发挥抗肿瘤效应。治疗基因是发挥功能的关键因素。自杀基因能将药物转化为毒性代谢产物, 细胞因子能增强抗肿瘤免疫效应, 血管生成抑制因子能抑制血管生成, 凋亡相关分子能诱导细胞凋亡, 这些基因在前列腺癌的基础和临床研究中均表现出一定的肿瘤生长抑制作用。本文对重组腺病毒介导的前列腺癌基因治疗基础及临床研究进展进行综述。

关键词: 前列腺癌; 基因治疗; 腺病毒科; DNA, 重组

中图分类号: R730.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)04-0316-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.04.004

前列腺癌是西方国家常见的男性恶性肿瘤, 近年来一直高居美国男性癌症发病率的第一位^[1]。虽然亚洲人群属于低危人群^[2], 但随着我国社会老龄化和饮食结构的改变, 前列腺癌正在影响老年男性的生活质量和寿命。目前, 前列腺癌常规治疗手段包括激素、放疗以及手术治疗等, 这些治疗手段对于局灶型患者有效, 但仍有部分患者复发, 且具有明显不良反应; 同时, 激素治疗易导致激素非依赖型前列腺癌^[3-4]。因此, 探索一种能够有效治疗前列腺癌的手段显得十分迫切。

近年来, 随着肿瘤分子生物学的发展, 基因治疗逐渐成为肿瘤学研究的热点, 而前列腺癌是适合进行基因治疗的疾病之一。肿瘤的基因治疗是通过一定方式导入能直接或间接杀灭肿瘤细胞的目的基因。因此, 载体系统和治疗基因是关系疗效的两大主要因素。载体系统是基础, 治疗基因是关键。目前, 国内已有多篇关于前列腺癌基因治疗的综述。本文以多个治疗基因的联合应用、治疗基因与常规治疗的联合应用以及治疗基因与溶瘤治疗的联合应用为重点, 结合最新

研究报道, 着重阐述近年来前列腺癌基因治疗的基础和临床研究进展。

1 重组腺病毒载体

基因治疗的理想载体系统能够特异性地靶向肿瘤细胞, 并有效表达目的基因, 同时不会对机体产生毒性、免疫反应或诱导突变。腺病毒载体因其载量大、滴度高、宿主范围广和安全性高等优势, 在肿瘤基因治疗中得到广泛应用。传统的复制缺陷型腺病毒不能在实体瘤组织中复制并扩散, 其感染效率及外源基因的表达效率低, 临床疗效并不理想。而溶瘤腺病毒 (oncolytic adenoviruses) 能够在肿瘤细胞中特异性地复制并裂解肿瘤细胞, 进而释放子代病毒, 再感染周围的肿瘤细胞, 通过级联放大效应最终消灭肿瘤, 提高疗效^[5]。应用溶瘤腺病毒治疗前列腺癌比较理想。目前, 已有多种溶瘤腺病毒治疗方案进入临床试验阶段^[6-8], 主要包括具有单纯溶瘤功能的腺病毒、具有靶向感染能力的溶瘤腺病毒和携带治疗基因的溶瘤腺病毒等。

2 治疗基因

治疗基因, 是基因治疗方案的核心部分, 是发挥疗效的关键因素。随着肿瘤分子生物学的发展, 多种能够抑制肿瘤形成、发生和发展的基因被应用于肿瘤治疗。目前, 应用于前列腺癌基因治疗的基因主要包括自杀基因、细胞因子基因、血管生成抑制基因以及凋亡相关基因等。

2.1 自杀基因

自杀基因, 是指一些酶类基因, 如单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, *HSV-TK*)、大肠埃希菌胞嘧啶脱氨酶和大肠埃希菌硝基还原酶 (nitroreductase, *NR*) 等, 这类基因的表达能够将相应的药物前体转化为具有细胞毒性的产物, 进而发挥细胞杀伤作用。

研究表明, 携带 *HSV-TK* 的重组腺病毒能够将 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 转化为毒性代谢产物, 进而杀伤肿瘤细胞。近期研究表明, 自杀基因的联合应用及与常规治疗联合应用, 均能有效提高抗肿瘤效应。重组腺病毒介导的自杀基因 *HSV-TK* 与胞嘧啶脱氨酶融合表达治疗方案, 先后给予 5-FC 和更昔洛韦 (ganciclovir) 能发挥更强的抗肿瘤效应^[9]。*NR* 与热休克蛋白 70 共表达可发挥协同效应, 不仅能增强对肿瘤局部的杀伤作用, 还能杀伤远端肿瘤^[10]。此外, 自杀基因与常规治疗手段如激素、放疗和化疗等联合应用, 能有效增强抗肿瘤效应^[11]。

收稿日期: 2009-04-07 接受日期: 2009-05-22

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制资助项目 (2009ZX09503-019)

作者简介: 杨月峰 (1981 -), 男, 浙江省德清人, 博士研究生, 主要从事基因治疗研究。

* 联系作者 E-mail: wangls@nic.bmi.ac.cn

2.2 细胞因子基因

目前,应用于前列腺癌基因治疗的细胞因子基因主要包括白细胞介素3(interleukin-3, *IL-3*), *IL-12*, 干扰素 γ (interferon- γ , *IFN- γ*), *IFN- β* 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *GM-CSF*)等。

前列腺癌的发生发展与局部和系统的免疫功能密切相关。因此,导入具有免疫激活作用的细胞因子,能够有效增强抗肿瘤效应。研究表明,携带*IL-3*, *IL-12*和*IFN- γ* 的重组腺病毒在前列腺癌的基因治疗中具有明显的抗肿瘤效应。其中,携带*IL-12*的重组腺病毒能激活小鼠自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的杀伤作用^[12];携带*IFN- γ* 的重组腺病毒能够明显抑制肿瘤细胞增殖^[13]。

近期研究表明,携带*IL-3*和*IL-12*的重组腺病毒与放射治疗联合应用,能够有效增强抗肿瘤效应。携带*IL-12*的重组腺病毒与放射疗法联合应用,能降低肿瘤细胞的体外克隆生成能力,增加凋亡和肿瘤坏死因子 α 的表达;能增强体内NK细胞活性、延长动物生存时间并抑制转移发生^[14]。携带*IL-3*的重组腺病毒与放射疗法联合应用,能诱导机体的特异性抗肿瘤免疫效应,包括*IFN- γ* 的分泌及细胞毒T淋巴细胞的激活;同时,采用四环素可控方式可保证其安全性^[15]。此外,降低机体的糖皮质激素水平,有助于增强抗肿瘤效应^[12]。

*GM-CSF*能促进树突状细胞的成熟和分化,对于机体产生特异性的抗肿瘤免疫反应具有重要意义,但是其单独使用对于机体特异性免疫的激活作用有限。研究表明,携带前列腺酸性磷酸酶和*GM-CSF*融合蛋白基因的重组腺病毒能成功激活自身抗原递呈细胞^[16]。此外,还有研究表明,*GM-CSF*能通过非免疫途径直接发挥抗肿瘤效应,但具体机制仍不明确^[17]。

IFN- β 的免疫功能较弱,主要通过下调血管生成相关因子*IL-8*和血管内皮生长因子A的表达来抑制肿瘤生长^[18]。

2.3 血管生成抑制基因

血管及血管系统的形成,在肿瘤生长和转移中起着重要作用。肿瘤细胞通过血管系统获取能量和营养物质,同时,也能通过血管转移到机体的其他部位。因此,抗血管生成治疗对于抑制肿瘤的生长和转移具有重要意义。目前,已有多种血管生成抑制基因应用于前列腺癌基因治疗的基础和临床研究,包括血管生成抑素(angiotatin)、内皮生成抑素(endostatin)和色素上皮源性因子等^[19]。血管生成抑素和内皮生成抑素单独作用或联合应用均具有一定的抗血管生成作用。研究表明,将血管生成抑素和内皮生成抑素融合表达,以腺病毒为载体,注射于前列腺癌局部,能有效抑制血管生成、肿瘤生长和转移^[20]。近期研究表明,将抗血管生成治疗与溶瘤治疗相结合,制备携带血管生成抑素和内皮生成抑素融合蛋白的前列腺癌特异性溶瘤腺病毒具有更强的抗肿瘤效应^[21]。

2.4 凋亡相关基因

肿瘤的发生、生长及转移,与细胞凋亡抑制密切相关。前列腺癌细胞中高表达抗凋亡蛋白Bcl-2和(或)Bcl-x(L),

是其对激素疗法、放疗和化疗不敏感的原因之一。采用特异性启动子启动促凋亡基因在前列腺癌细胞中的特异性表达,不但能够有效发挥抗肿瘤效应,还能保证其安全性。研究表明,*PEG-3*(progression elevated gene-3)启动黑色素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation-associated gene-7, *MDA-7*)/*IL-24*表达的重组腺病毒,具有明显的凋亡诱导作用和抗肿瘤效应^[22]。*p53*靶基因*RTVP-1*(related to testes-specific, vespid, and pathogenesis protein-1)的高表达能有效抑制高转移性前列腺癌细胞的生长和转移,增强NK和细胞毒T淋巴细胞的活性^[23]。

凋亡相关基因的联合应用能够增强凋亡诱导作用。近期研究表明,前列腺特异性启动子*ARR₂PB*(two androgen response elements of the PB promoter)调控Bax表达的重组腺病毒,具有前列腺癌细胞特异性的促凋亡作用,但有效时间短,容易复发;而与*bad*基因联合应用,能够明显延长有效时间,增强抗肿瘤效应^[24]。同时,将凋亡诱导与溶瘤治疗相结合,能够增强治疗的效果和安全性。研究表明,由前列腺特异性增强子序列调控复制必需基因及Fas配体表达的重组腺病毒,不但具有溶瘤作用,还能通过Fas配体的特异性表达,增强凋亡诱导能力及对周围正常细胞的保护作用^[25]。

2.5 其他

*CD40-CD40L*是特异性免疫系统的一对重要共刺激分子,参与机体体液和细胞免疫的激活。研究表明,携带*CD40L*的重组腺病毒能够降低小鼠前列腺癌细胞系TRAMP-C2的活力,诱导细胞凋亡;在体内,能够诱导抗肿瘤免疫,抑制肿瘤生长^[26]。此外,携带碘化钠共输送体的重组腺病毒与¹³¹I同时注射入肿瘤局部,能够发挥旁观者效应,使细胞生长阻滞,肿瘤生长得到有效抑制^[27]。

3 前列腺癌基因治疗的临床试验方案

3.1 溶瘤腺病毒介导

目前,应用于临床试验的重组腺病毒基因治疗方案主要以溶瘤腺病毒为主。将前列腺癌特异性溶瘤腺病毒CV706应用于放射治疗后局部复发前列腺癌的患者,I期临床试验证明是安全有效的^[6]。而且,除局部注射外,溶瘤腺病毒静脉给药是可行的。I期临床试验表明,前列腺特异性抗原靶向的溶瘤腺病毒CG7870,静脉给药治疗激素抗拒型前列腺癌转移患者是安全的,且能诱导细胞因子表达^[7]。

3.2 自杀基因介导

自杀基因介导的治疗是目前应用于前列腺癌基因治疗临床研究的另一主要方案。Nasu等^[28]用携带*HSV-TK*基因的重组腺病毒治疗局部复发但未转移的患者,能使血清前列腺特异性抗原水平下降,CD8⁺T淋巴细胞占人类白细胞抗原-DR⁺细胞比例增加,且无明显毒性作用。降钙素启动子调控*HSV-TK*的重组腺病毒治疗方案Ad-OC-TK/VAL,能降低转移性前列腺癌患者的前列腺特异性抗原水平,同时安全有效^[29]。此外,携带化疗-辐射敏感基因的溶瘤腺病毒也已进入I期临床。结果表明,其与放疗化疗联合应用,能够增强前列腺癌对放疗化疗的敏感性,有效发挥抗肿瘤效应^[8]。

4 存在的问题与展望

腺病毒载体虽然具有独特的优势,但由于包含大量的骨架蛋白,容易受到机体免疫系统的攻击,产生天然免疫及中和抗体,进而导致组织炎症反应和病毒的清除。因此,目的基因不能持久稳定地表达,进而影响治疗效果。依赖辅助病毒的腺病毒载体系统(又称三代腺病毒),去除了所有的病毒结构蛋白编码基因,能够不受免疫系统攻击,从而在静止期细胞中持久稳定的表达,同时还能插入长达 30 kb 的目的基因^[30]。因此,以三代腺病毒为载体进行前列腺癌基因治疗具有重要意义。

肿瘤细胞的最终清除需要细胞毒 T 淋巴细胞的参与,机体针对肿瘤抗原的特异性免疫反应是肿瘤治疗及预防复发的关键。因此,以细胞因子、免疫相关分子以及肿瘤抗原为基础的免疫基因治疗具有十分良好的前景。已有研究表明,基因治疗与放疗、化疗和激素疗法等常规治疗方法的结合能有效提高抗肿瘤治疗的疗效。

5 参考文献:

- [1] American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2004* [M]. Atlanta: American Cancer Society, 2004:16-17.
- [2] Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide* [M]. IARC Cancer Base No.5, Version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004.
- [3] Scattoni V, Montorsi F, Picchio M, Roscigno M, Salonia A, Rigatti P, et al. Diagnosis of local recurrence after radical prostatectomy [J]. *BJU Int*, 2004, **93**(5):680-688.
- [4] Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, **351**(15):1513-1520.
- [5] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, **274**(5286):373-376.
- [6] DeWeese TL, van der Poel H, Li S, Mikhak B, Drew R, Goemann M, et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy [J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(20):7464-7472.
- [7] Small EJ, Carducci MA, Burke JM, Rodriguez R, Fong L, van Ummersen L, et al. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2006, **14**(1):107-117.
- [8] Freytag SO, Movsas B, Aref I, Stricker H, Peabody J, Pegg J, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, **15**(5):1016-1023.
- [9] Boucher PD, Im MM, Freytag SO, Shewach DS. A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2006, **66**(6):3230-3237.
- [10] Lipinski KS, Pelech S, Mountain A, Irvine AS, Kraaij R, Bangma CH, et al. Nitroreductase-based therapy of prostate cancer, enhanced by raising expression of heat shock protein 70, acts through increased anti-tumour immunity [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, **55**(3):347-354.
- [11] Fujita T, Teh BS, Timme TL, Mai WY, Satoh T, Kusaka N, et al. Sustained long-term immune responses after *in situ* gene therapy combined with radiotherapy and hormonal therapy in prostate cancer patients [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, **65**(1):84-90.
- [12] Raja Gabaglia C, Diaz de Durana Y, Graham FL, Gaudie J, Sercarz EE, Braciak TA. Attenuation of the glucocorticoid response during Ad5IL-12 adenovirus vector treatment enhances natural killer cell-mediated killing of MHC class I-negative LNCaP prostate tumors [J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(5):2290-2297.
- [13] Zhao P, Zhu YH, Wu JX, Liu RY, Zhu XY, Xiao X, et al. Adenovirus-mediated delivery of human IFN γ gene inhibits prostate cancer growth [J]. *Life Sci*, 2007, **81**(9):695-701.
- [14] Fujita T, Timme TL, Tabata K, Naruishi K, Kusaka N, Watanabe M, et al. Cooperative effects of adenoviral vector-mediated interleukin 12 gene therapy with radiotherapy in a preclinical model of metastatic prostate cancer [J]. *Gene Ther*, 2007, **14**(3):227-236.
- [15] Tsai CH, Hong JH, Hsieh KF, Hsiao HW, Chuang WL, Lee CC, et al. Tetracycline-regulated intratumoral expression of interleukin-3 enhances the efficacy of radiation therapy for murine prostate cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13**(12):1082-1092.
- [16] Burch PA, Croghan GA, Gastineau DA, Jones LA, Kaur JS, Kyslstra JW, et al. Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a Phase 2 trial [J]. *Prostate*, 2004, **60**(3):197-204.
- [17] Young JG, Green NK, Mautner V, Searle PF, Young LS, James ND. Combining gene and immunotherapy for prostate cancer [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2008, **11**(2):187-193.
- [18] Lee J, Wang A, Hu Q, Lu S, Dong Z. Adenovirus-mediated interferon-beta gene transfer inhibits angiogenesis and progression of orthotopic tumors of human prostate cancer cells in nude mice [J]. *Int J Oncol*, 2006, **29**(6):1405-1412.
- [19] Guan M, Jiang H, Xu C, Xu R, Chen Z, Lu Y. Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, **6**(3):419-425.
- [20] Raikwar SP, Temm CJ, Raikwar NS, Kao C, Molitoris BA, Gardner TA. Adenoviral vectors expressing human endostatin-angiostatin and soluble Tie2: enhanced suppression of tumor growth and antiangiogenic effects in a prostate tumor model [J]. *Mol Ther*, 2005, **12**(6):1091-1100.
- [21] Li X, Liu YH, Lee SJ, Gardner TA, Jeng MH, Kao C. Prostate-restricted replicative adenovirus expressing human endostatin-angiostatin fusion gene exhibiting dramatic antitumor efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(1):291-299.

- [22] Sarkar D, Lebedeva IV, Su ZZ, Park ES, Chatman L, Vozhilla N, *et al.* Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(11): 5434–5442.
- [23] Nariishi K, Timme TL, Kusaka N, Fujita T, Yang G, Goltsov A, *et al.* Adenoviral vector-mediated PRVP-1 gene-modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13**(7):658–663.
- [24] Zhang Y, Yu J, Unni E, Shao TC, Nan B, Snaboon T, *et al.* Monogene and polygene therapy for the treatment of experimental prostate cancers by use of apoptotic genes bax and bad driven by the prostate-specific promoter ARR(2)PB[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(17):2051–2064.
- [25] Li X, Liu YH, Zhang YP, Zhang S, Pu X, Gardner TA, *et al.* Fas ligand delivery by a prostate-restricted replicative adenovirus enhances safety and antitumor efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(18 Pt 1):5463–5473.
- [26] Dzojic H, Loskog A, Tötterman TH, Essand M. Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model [J]. *Prostate*, 2006, **66**(8):831–838.
- [27] Mitrofanova E, Unfer R, Vahanian N, Link C. Rat sodium iodide symporter allows using lower dose of ¹³¹I for cancer therapy[J]. *Gene Ther*, 2006, **13**(13):1052–1056.
- [28] Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, *et al.* Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy[J]. *Mol Ther*, 2007, **15**(4):834–840.
- [29] Shirakawa T, Terao S, Hinata N, Tanaka K, Takenaka A, Hara I, *et al.* Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, **18**(12):1225–1232.
- [30] Morral N, Parks RJ, Zhou H, Langston C, Schiedner G, Quinones J, *et al.* High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity[J]. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**(18):2709–2716.

Progress of adenovirus-mediated gene therapy for prostate cancer

YANG Yue-Feng, WU Zu-Ze, WANG Li-Sheng*

(Department of Experimental Hematology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Gene therapy for prostate cancer has been becoming a hot research. Vector system is the foundation of gene therapy. Until now, adenovirus is the most popular vector in gene therapy for prostate cancer. The development of oncolysis adenovirus provides new ways for prostate cancer therapy. Recent researches showed that oncolysis adenovirus alone or combined with therapeutic genes can produce antineoplastic effect. Therapy genes play key roles in gene therapy. Suicide genes can convert the drug into toxic metabolic product, cytokines can enhance the antineoplastic and immunologic responses, angiogenesis inhibitors can inhibit the development of new vessels, and apoptosis related fac-

tors can induce the apoptosis of tumor cells. These genes have been confirmed for their antineoplastic effects in both basic and clinical researches in prostate cancer. This paper reviewed the advancement of adenovirus based gene therapy for prostate cancer in both basic and clinical researches.

Key words: prostatic neoplasms; gene therapy; Adenoviridae; DNA, recombinant

Foundation item: The project supported by National Mega-project of Science Research of China(2009ZX09503-019)

* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)