

## · 综述 ·

## 基因治疗在头颈恶性肿瘤的应用

朱鲁平 程雷

头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是头颈部恶性肿瘤的主要病理类型,约占所有头颈部肿瘤的90%,其发病率在过去20年内逐渐上升。据美国癌症学会2007年公布的数据,HNSCC位居恶性肿瘤发病率的第10位<sup>[1]</sup>。传统的治疗方式如手术切除和放(化)疗并未明显延长患者的5年生存率,肿瘤复发是致死的主要原因,解决这一难题需要探索新的治疗靶点和干预方式。随着HNSCC基因治疗的临床前期和临床试验的开展,证实了基因治疗与传统的手术、放疗和化疗一样具有有效性和可行性。鉴于对肿瘤分子生物学研究水平的限制,目前基因治疗的重点仍以肿瘤发病的分子机制研究以及安全、稳定、有效的载体构建和良好的动物模型建立为主要方向,其中靶向性基因治疗策略又是主要方向。本文就HNSCC基因治疗的相关研究进展作一综述。

## 一、HNSCC 基因治疗的基本策略

广义的基因治疗是指采用一系列治疗措施用遗传物质修饰细胞(包括体外和体内)以发挥治疗作用。实施癌症的基因治疗应具备几个条件,首先要了解癌症发生的分子机制,采用分子生物学技术用于临床诊断,并在此基础上克隆正常基因或有治疗作用的核酸片段,选择高效载体系统与目的基因重组,并靶向性转移到癌细胞,选择性杀伤癌细胞而对周围正常细胞不产生毒害作用。与人体其他部位的肿瘤相比,HNSCC因其特殊的解剖部位,易于行瘤内注射和组织学活检,且全身的毒副作用较小,更适于采用靶向性的基因治疗<sup>[2]</sup>。HNSCC的基因治疗可通过增强抑癌基因功能,阻断癌基因过表达、溶瘤病毒治疗、基因前体药物活化治疗,癌基因免疫调节治疗等途径抑制或者杀灭癌症。对HNSCC的基因治疗策略介绍如下。

1. 基因替代治疗:基因的突变或缺失是肿瘤发生的重要原因。HNSCC常存在抑癌基因的失活,如70%~80%的HNSCC存在染色体9p21的变异<sup>[3]</sup>,其CDKN2A基因位点编码p16蛋白,p16基因启动子区的甲基化和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)会导致HNSCC中p16基因失活<sup>[4]</sup>。超过50%的HNSCC患者存在染色体17p的LOH和p53基因的突变<sup>[5]</sup>。将上述有功能的正常基因导入肿瘤细胞内,以替代缺陷基因发挥作用,将有可能逆转由于相应基因突变导致的恶性表型。p53基因是研究最为广泛深入的基因之一。该基因的编码蛋白是细胞周期重要的调控因子,当转移野生型p53基因到癌细胞,通过诱导p53蛋白表达,可使癌细胞周期阻滞并发生凋亡,进而使肿瘤生长受抑。目前含有p53基因的重组腺病毒已率先进入HNSCC的临床应用<sup>[6]</sup>。

2. 自杀基因治疗:是指病毒载体介导的基因引导的酶分解药物前体疗法,通过将无毒性的药物前体转变为毒性药物,从而杀灭癌细胞。治疗分为两步,先将外源性基因转入细胞,编码一种酶,然后酶能将无毒性的药物前体活化为毒性药物。两种最具特征性的自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/更昔洛韦(ganciclovir, GCV)系统和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)/5-氟胞嘧啶(5-flucytosine, 5-FC)系统。如在HSV-TK/GCV系统中,HSV-TK能将无毒性的GCV磷酸化,后者继续在细胞内经酶促形成活化的三磷酸化复合物,通过抑制DNA聚合酶的活性,使新合成的DNA发生断裂,导致快速分裂期的癌细胞死亡<sup>[7]</sup>。CD能将常用的化疗药5-FC代谢为高度毒性的5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU),从而杀灭癌细胞。自杀基因还能通过旁观者效应<sup>[8]</sup>,将感染细胞产生的细胞毒性代谢产物通过缝隙连接转移到非感染细胞<sup>[9]</sup>,诱导瘤体炎性坏死及干扰肿瘤的血管生成。

3. 免疫基因治疗:这是另一种靶向性针对癌细胞的治疗方法。HNSCC患者常存在一些免疫细胞如自然杀伤细胞(natural killer, NK)、淋巴因子激活杀伤性细胞(lymphokine-activated killer, LAK)的缺失<sup>[10]</sup>,或树突状细胞的功能下降。虽然HNSCC和免疫细胞的相互作用非常复杂,但有证据表明免疫系统在肿瘤的发生发展过程中发挥免疫监视和免疫抑制作用。可通过直接转移编码主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的基因、细胞因子基因到肿瘤细胞,或通过遗传工程添加一个或多个基因到正常细胞或恶性癌细胞使其成为癌疫苗,经回输后更易被免疫系统识别,可引发免疫系统的识别和排斥反应,产生对癌细胞的靶向性攻击。最初的细胞可取自患者自体细胞或已确定的癌细胞系。这不仅可增强机体特异性免疫反应,如细胞毒T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞性反应,还能引发非特异性免疫反应(NK、LAK、巨噬细胞参与的免疫反应)。添加的免疫基因多是能产生免疫刺激分子的细胞因子基因,如白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)、IL-6、IL-7、IL-12、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)等<sup>[11]</sup>,也可通过树突状细胞递呈肿瘤相关抗原,或转移高抗原性蛋白基因,从而

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.09.030

基金项目:江苏省“科教兴卫工程”医学重点学科(XK200719)和重点人才(RC2007065);江苏高校优势学科建设工程(PAPD2010-2013)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院 江苏省人民医院耳鼻咽喉科

通讯作者:程雷,Email:jspent@126.com

有效引发抗肿瘤免疫反应。免疫治疗还可直接通过改变患者的免疫状态,增加针对癌细胞的敏感度。但传统的免疫治疗进展缓慢,HNSCC通过多种机制,如增强转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和IL-10的表达抑制免疫反应,降低了免疫治疗的疗效,故需要发展新的免疫治疗策略跨越这种障碍<sup>[12]</sup>。

4. 溶瘤病毒治疗:溶瘤病毒作为基因转移的载体,可选择性在癌细胞中复制,导致细胞溶解死亡,但不能调节癌细胞的基因表达。目前研发的多种溶瘤病毒经基因工程改造,具有不同的作用机制<sup>[13]</sup>:(1)本身固有的肿瘤选择性,如RNA病毒、痘苗病毒;(2)因缺失关键的病毒基因的病毒突变体,只能在肿瘤细胞而非正常细胞中复制,如腺病毒 ONYX-015、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)G207等;(3)通过基因工程使病毒的复制依赖于靶向性肿瘤特异性启动子,可使病毒复制仅局限于能活化启动子的肿瘤细胞内;(4)采用去除病毒正常嗜性的类病毒,仅能与肿瘤细胞表面特异性受体结合。

溶瘤病毒能特异性杀灭癌细胞而对正常体细胞无害,病毒通过扩增和表达细胞毒性蛋白导致癌细胞死亡或溶解。现有多种溶瘤病毒载体,包括牛痘苗、腺病毒、HSV-1、呼肠病毒(reovirus)和新城疫病毒(newcastle disease virus)等。这些病毒均具有对癌细胞的靶向性和遗传学上的可操纵性。其中最引人注目的溶瘤病毒是 ONYX-015,这是一种 E1B 基因缺失的条件复制性腺病毒<sup>[14]</sup>。E1 基因编码的蛋白是病毒复制期间 RNA 输出的必需蛋白<sup>[15]</sup>,缺少此蛋白,腺病毒不能通过正常 p53 信号通路在细胞内复制。而癌细胞因存在异常的 p53 通路<sup>[15]</sup>,使 ONYX-015 得以在缺乏 E1B 蛋白时进行病毒 RNA 输出,从而裂解癌细胞。

过去 10 余年的溶瘤病毒的人体治疗试验验证了其安全性,但疗效有限。可能的原因包括经基因工程改造使病毒出现靶向性衰减,宿主的免疫反应以及缺乏对肿瘤微环境的了解等。因此溶瘤病毒载体仍需不断改进。

5. 基因干预治疗:反义寡脱氧核苷酸(antisense-oligodeoxynucleotides, ASO)是经化学修饰或未修饰的单链 DNA 分子,长 13~25 个核苷酸,能通过反义沉默作用,拮抗新生血管生成和免疫调节效应而发挥抗癌活性。常采用 RNA 酶 H 依赖的寡脱氧核苷酸降解 mRNA,或通过空间构型的物理阻滞作用,阻止 mRNA 的剪切和翻译<sup>[16]</sup>。ASO 可作用于癌基因家族成员和(或)其下游的信号通路,通过抑制癌细胞存活所依赖的癌基因或分子发挥抑癌作用。HNSCC 生长和代谢的加速伴随着新生血管的生成,采用针对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的 ASO 行瘤内注射对 HNSCC 移植瘤产生良好的抑制作用。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,可通过序列特异性基因沉默现象,抑制肿瘤相关基因的表达上调<sup>[17]</sup>。RNAi 技术因其独特的作用原理,已成为癌症基因治疗极为有用的工具<sup>[18]</sup>。选择靶标基因是重要的环节,常见的靶向沉默基因包括涉及癌细胞增殖、转移、血管发生和药物抗性基因。另外,适当的药物传输系统也是关键环节。现已研制出多种药物传输系统,病毒介导的 RNAi 具有高效的转染效率和持续的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)蛋白产物表达。但在临床运用中,非病毒载体较之病毒载体显示出更好的安全性。

6. 联合基因治疗:恶性肿瘤的发生发展是一个多阶段、多因素的复杂过程,因此常需联合使用多种治疗手段,以期取得最大疗效<sup>[19]</sup>。基因治疗联合传统的放(化)疗,相对于单一的治疗方式将会取得更好的抗癌效果<sup>[19-21]</sup>。HNSCC 的放射治疗常存在局部治疗失败及损伤邻近重要结构等问题。为增加 HNSCC 的放疗敏感性,可采用基因治疗方法,用携带编码 Nijmegen 破裂综合征(Nijmegen breakage syndrome, NBS1)蛋白的腺病毒转染 HNSCC 细胞,表达全长的 NBS1 蛋白会增强 HNSCC 移植瘤对电离辐射的敏感性<sup>[20]</sup>。化疗联合基因治疗的疗效在临床前期的模型中得到验证。HNSCC 移植瘤转染携带编码金属蛋白酶 2 组织抑制子有复制能力的腺病毒载体,联合顺铂和放射治疗,产生了明显增强的抗癌活性<sup>[21]</sup>。

## 二、病毒载体及靶向性基因治疗

上述这些基因治疗策略的实施有赖于有效的载体特异性转移目的基因到靶细胞。病毒载体因其高效的基因转移效率、稳定的外源基因表达等特点,成为恶性肿瘤基础研究和临床试验中应用最为广泛的载体类型。目前有多种源于 DNA 病毒或 RNA 病毒的基因转移系统,可通过整合到宿主基因组或游离基因形式表达携带基因。但是由于基因治疗的载体往往缺乏靶向性,当载体进入机体后表达的目的基因往往会对正常组织细胞产生毒副作用,造成机体损伤。因此,基因治疗的靶向性是决定基因治疗成功与否的关键点之一。

1. 反转录病毒载体:反转录病毒(retroviruses)是一种单链 RNA 病毒,因为具有整合基因到宿主基因组的能力,且能长期稳定表达转入基因而被广泛应用。经过 20 余年对反转录病毒生物学特性的探索,反转录病毒载体的设计和病毒产物的获得取得了很大改进。多种假性包膜蛋白包括水泡性口炎病毒 G 糖蛋白(VSV-G)的采用,明显拓宽了复制缺陷型病毒载体的亲嗜性。并且在反转录病毒载体中整合了组织特异性启动子(tissue specific promoters, TSPs),使其可长期调节靶细胞中转移基因的表达。但反转录病毒不能感染非分裂相细胞,这使它的应用多限于后天获得性遗传疾病(如巴宾斯基征)、造血系统疾病及某些癌症。临床试验中因插入突变和激活癌基因,引发患者致癌或致白血病的事件<sup>[22-23]</sup>,也限制了反转录病毒在体内基因传递中的应用。

2. 腺病毒载体:腺病毒是一类 DNA 病毒,能感染非分裂象细胞和分裂象细胞,腺病毒 DNA 进入到细胞核内不整合到宿主染色体而以游离基因(episome)的形式存在,可产生短暂的治疗效应。但非复制性的腺病毒载体对实体瘤的感染效率不高以及非特异性针对癌细胞,需要采用有效的靶向性策略增强对癌细胞的靶向性感染,降低对正常组织的毒性。在原有的基础上对其进行改造,通过剔除更多或全部病毒结构基因,阻断免疫激活的共刺激信号,或通过加入免疫抑制剂、改造病毒表面的纤维蛋白等措施,可提高病毒的感染效率和对癌细胞的靶向性。研究表明,病毒衣壳纤维蛋白中的 knob 结构域可识别并结合细胞表面的柯萨奇病毒-腺病毒受体(coxsackie and adenovirus receptor, CAR),前者的表达密度决定了腺病毒的感染效率<sup>[24]</sup>。

但包括 HNSCC 在内的多种肿瘤细胞表面的 CAR 常存在变异,表达密度降低,这限制了腺病毒载体介导的基因治疗效率。因此对腺病毒衣壳蛋白进行遗传学修饰,增加病毒对癌细胞表面受体的亲和力,可增强抗癌活性<sup>[25]</sup>。另外,在腺病毒 E1A 基因上游插入 TSPs,使病毒仅能在特定癌组织中激活表达,而在正常组织不表达或表达极低。条件复制性腺病毒载体能优先在肿瘤细胞中复制,产生溶瘤效应并使子代病毒释放,进而感染邻近细胞,这是研制安全有效的腺病毒载体未来的发展方向。

腺病毒载体是一种较理想的 HNSCC 基因治疗的载体,对野生型病毒的多种基因修饰使其能更好地满足抗癌治疗的需要。在癌症特异性调节元件的控制下,无复制能力的腺病毒载体和条件复制腺病毒载体可用作多种基因如抑癌基因、凋亡基因及前体药物转化酶、抗血管生成因子和免疫刺激因子等基因的转移载体,广泛地应用于 HNSCC 的临床试验中。助手依赖性腺病毒的研制<sup>[26]</sup>,通过敲除所有病毒基因组,降低了病毒载体的免疫原性,延长了转基因表达的时间,更增加了腺病毒载体的应用前景。

3. 腺相关病毒载体:腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种无包膜的单链线状 DNA 病毒,属于复制缺陷型细小病毒,需要和其他病毒如腺病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒共同感染才能有效复制和感染。AAV 有 12 种血清型:AAV1 ~ AAV12,不同血清型均为正二十面体结构,但其衣壳蛋白在序列与空间构象上非常多样,目前已知的病毒衣壳有 100 多种变异形式<sup>[27]</sup>,使其对不同的组织或细胞具有不同的亲嗜性。目前,重组 AAV(recombinant AAV, rAAV)是在 AAV2 血清型的基础上改造的,针对不同组织可选用不同的 AAV 血清型外壳蛋白以提高感染效率。rAAV 具有 AAV 的天然生物学特性,但去除了病毒蛋白的编码基因,对宿主无致病性,在细胞中不会导致插入诱变,还具有极低的免疫原性。rAAV 通过两种机制感染细胞<sup>[28]</sup>,一种通过基因增补将外源基因进行染色体整合或以游离基因进行转基因表达,能高保真和特异地校正染色体基因突变<sup>[29]</sup>。另外可通过基因打靶(gene targeting)修饰同源染色体序列发挥作用。rAAV 能感染分裂象和非分裂象细胞,载体 DNA 主要以游离基因的形式存在,并能长时间保留转录活性。rAAV 对非易感细胞的感染效率不佳,单链 DNA 的 rAAV2 需要变为双链才能转录,这也是 rAAV 转移基因的主要障碍。在 AAV 的复制环中加入发夹状的中间体,可使转基因表达活性增强 10 ~ 100 倍,但因有限的包装容量,限制了其在 HNSCC 基因转移中的运用。病毒的包装主要产自贴壁细胞也限制了病毒产量和在大中型临床中的应用<sup>[30]</sup>。但 rAAV 的非致病性和较低的免疫原性使其成为目前最为安全的基因治疗病毒载体。

目前,反转录病毒和腺病毒是应用于 HNSCC 基因治疗的主要载体,而腺病毒载体因其良好的安全性,在临床试验中是最常用的基因转移载体。过去几年病毒载体构建技术的改进,包括通过基因删除降低病毒免疫原性,组织特异性启动子促使转基因的表达,调整病毒血清型外壳改变病毒的亲嗜性及免疫原性等,使 HNSCC 基因治疗在临床运用中出现了令人鼓舞的进展。近来出现了一种新型的日本血球凝集病毒(hemagglutinating virus of Japan, HVJ)包装载体,不仅载体具有内在的抗癌活性,促使癌细胞凋亡,另外还能通过装载有治疗作用的分子物质发挥多途径的抗癌疗效<sup>[31]</sup>。将来,改造新的病毒载体如 EB 病毒、SV-40 病毒、 $\alpha$ -病毒和负链 RNA 病毒等,并进一步发展疾病靶向性载体,将是病毒载体研制中的新挑战。

### 三、HNSCC 基因治疗的临床进展

自 1993 年第一个基因治疗临床试验治疗脑瘤实施以来<sup>[32]</sup>,至今已实施了 1000 余项恶性肿瘤的基因治疗临床试验<sup>[33]</sup>。对 HNSCC 患者的临床试验显示,基因治疗产生了令人欣喜的疗效。随着安全有效的基因转运方法的研发和运用,基因治疗将和传统的放疗和化疗手段一起联合用于恶性肿瘤的治疗。根据 HNSCC 的基因治疗策略,对基因治疗在临床前期和临床试验中的应用现状做一介绍。

1. 增强抑癌基因功能:INGN-201(又名 Ad5CMV-p53, Advexin)是一种携带 p53 治疗基因的复制缺陷性腺病毒载体,HNSCC 的 I 期和 II 期临床试验结果表明其具有较好的疗效和安全性<sup>[34-36]</sup>。对复发性 HNSCC 患者使用 INGN-201 的初步结果表明,p53 基因低度突变的患者具有较高的存活率,而针对高度突变的患者治疗反应差。采用 INGN-201 治疗的患者其存活率与甲氨蝶呤相比较没有差异。由此推测,增强 HNSCC 的 p53 表达能起到抗癌疗效。

Gendicine 是另一种携带 p53 的腺病毒载体(Ad-p53)基因治疗药物,II 期临床试验(9 种恶性肿瘤,共 107 例)充分证明重组人 p53 腺病毒是安全而有效的。Gendicine 结合放射治疗 42 例 HNSCC,证实 p53 基因具有提高肿瘤放疗敏感性的作用<sup>[37]</sup>。基于这些研究结果,中国食品药品监督管理局(SFDA)批准 Gendicine 用于 HNSCC 的治疗,使其成为世界上第一个上市的基因治疗药物<sup>[38-39]</sup>。

脂质体 E1A(TtgDCC-E1A)是另一种基因治疗载体。E1A 基因属于肿瘤抑制基因,可抑制癌基因蛋白表达,诱导癌细胞对化疗和放疗的敏感性。E1A 还具有抑制转录、下调 HER-2/neu 蛋白的作用,使组织丧失恶性表型。其不仅适用于 HER-2/neu 高表达的肿瘤,还能调节其他基因的表达,使某些癌细胞发生分化。另外,E1A 还能增强顺铂、紫杉醇和阿霉素等的抗癌活性。在动物实验中用阳离子脂质体包裹编码 E1A 的质粒 DNA 发挥了抑癌作用并具有较好的安全性,之后脂质体 E1A 开始用于人体临床试验<sup>[40]</sup>。

2. 阻断癌基因过表达:通过阻断转录因子的作用,采用转录因子诱饵结合到信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription-3, STAT3),可导致 HNSCC 细胞死亡<sup>[41]</sup>。肿瘤的快速生长以及高代谢状态伴随新生血管的生成,干预肿瘤的血管发生可抑制肿瘤发展。内皮他丁是一种 20 kD 的蛋白,具有抑制血管发生和肿瘤生长的作用。重组的内皮他丁具有良好的耐受性,但因较短的半衰期,常需反复多次注射才能产生抗癌效应<sup>[42]</sup>。将内皮他丁基因重组到高表达的腺病毒载体 E10A 上,在 HNSCC 中能产生持续的效果<sup>[43-44]</sup>。但这还需大样本的临床 II 期和 III 期试验进一步验证 E10A 腺病毒的疗效。

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在包括 HNSCC 的多种恶性肿瘤中过表达,而在生理条件下的大部分组织中检测不到。一种 COX-2 启动子驱动的选择性复制型腺病毒载体 Ad-COX2-E1a,对表达 COX-2 的 HNSCC 具有抗癌效应<sup>[45]</sup>。

超过 90% 的 HNSCC 中内皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达上调<sup>[46]</sup>。已获准上市的抗 EGFR 特异性抗体西妥昔单抗在单独使用的情况下,对 HNSCC 的治疗反应率低于 10%<sup>[47]</sup>。但在采用携带 EGFR 的反义质粒 DNA 行 HNSCC 瘤内注射的 I 期临床试验中,对 HNSCC 的治疗反应率提高到 29%<sup>[48]</sup>。

3. 溶瘤病毒治疗:ONYX-015 是 HNSCC 治疗中最常用的溶瘤病毒。采用 ONYX-015 治疗的 II 期临床试验表明,ONYX-015 联合化疗对 HNSCC 取得了较好的治疗效果<sup>[49-50]</sup>。腺病毒的 E1A 蛋白还可能促使癌细胞的 S 期细胞周期转换,增强了癌细胞对细胞周期选择性化疗药物的敏感性。因此,ONYX-015 感染后 E1A 蛋白的表达也增强了对肿瘤细胞的 p53 依赖性或非 p53 非依赖性杀灭效应。

H-101 是一种类似 ONYX-015 的 E1B-55kb 缺失和 E3 部分缺失的腺病毒载体,能感染和杀灭存在 p53 基因变异的细胞。在 HNSCC 的 III 期随机化临床试验中,H-101 联合顺铂及 5-FU 使癌细胞对化疗药物的反应性提高到 78%,远高于单独使用化疗药物 39% 的反应性<sup>[51]</sup>。2005 年,该药已获准在我国上市,用于癌症的治疗<sup>[51]</sup>。

4. 药物前体活化基因治疗:采用自杀基因 HSV-TK 的杀瘤效应的探讨还停留在基础研究阶段,目前尚无自杀基因用于 HNSCC 的基因治疗的临床试验。但临床前期研究表明,采用复制缺陷性腺病毒载体转移 HSV-TK 基因到 HNSCC 移植瘤产生了细胞毒效应。近来,也有采用微粒和脂质体转移 HSV-TK 基因治疗 HNSCC 移植瘤的实验报道<sup>[52-53]</sup>。

5. 免疫调节基因治疗:Alloectin-7(HLA-B7 质粒)是以质粒 DNA 为基础的治疗载体<sup>[54]</sup>,包含编码人类组织相容性 B7 抗原(HLA-B7)重链基因和  $\beta 2$ -微球蛋白基因。HLA-B7 是一种 MHC-I 类分子,在 HNSCC 的表达常下降。通过增强癌细胞表面 MHC-I 类分子的表达,可启动肿瘤特异性免疫反应。对进展期 HNSCC 患者采用 Alloectin-7 的 II 期临床试验也证实其具有一定疗效和安全性<sup>[55]</sup>。

6. 基因干预治疗:目前采用 siRNA 和小 RNA(microRNA, miRNA)针对 HNSCC 的靶向性治疗研究还停留在基础研究水平,尚未进入临床试验阶段。运用 siRNA 表达质粒载体的临床前期研究表明,在 HNSCC 移植瘤中针对人类细胞周期 S 期激酶相关蛋白的 siRNA 具有抗癌效应<sup>[56]</sup>。用反转录病毒载体携带表达尿激酶纤溶酶原激活物受体的 siRNA 在 HNSCC 的移植瘤模型中产生了抗癌效应<sup>[57]</sup>。近来识别的非编码 miRNA 涉及基因的转录后修饰,在 HNSCC 中因 DNA 高甲基化而使肿瘤抑制性 miRNA 转录水平下调<sup>[58]</sup>。有报道,以 miRNA-138 转染 HNSCC 抑制了 HNSCC 细胞迁移和诱导凋亡<sup>[59]</sup>。

7. 基因治疗联合传统治疗:随着安全、有效的基因转运方法的开发和利用,基因治疗和传统的放(化)疗方法一起更好地用于治疗恶性肿瘤。研究表明,全身应用 EGFR 反义基因治疗联合多西紫杉醇能减缓移植瘤的生长<sup>[60]</sup>,手术联合 IL-2 质粒治疗产生了更好的抗癌活性<sup>[61]</sup>,表达全长 NBS 蛋白的腺病毒载体可增强 HNSCC 移植瘤对放疗的敏感性<sup>[62]</sup>。在 HNSCC 移植瘤转移编码基质金属蛋白酶组织抑制子 2(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, TIMP-2)的有复制能力的腺病毒,联合顺铂和放射治疗较之单一药物治疗,抗癌效应明显升高<sup>[63]</sup>。

#### 四、结论和展望

基因治疗技术使以往难以置信的肿瘤多样化治疗变为了现实。该领域的快速发展无疑使其成为未来头颈恶性肿瘤治疗策略的一个重要部分。早期的临床试验表明,HNSCC 的基因治疗具有良好的安全性和疗效,但任何一种新的方法需要经过长期的临床观察才能明确其适应证和禁忌证,并在此基础上正确评价其有效性和安全性。对基因转移系统安全性能的不断改进和靶向性分子机制认识的加深,将促使制定更为合理的治疗策略,从而提高头颈恶性肿瘤基因治疗的临床疗效,并进一步拓展其应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin, 2007, 57:43-66.
- [2] Vattemi E, Claudio PP. The feasibility of gene therapy in the treatment of head and neck cancer. Head Neck Oncol, 2009, 1:3.
- [3] Mao L, Lee JS, Fan YH, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. Nat Med, 1996, 2:682-685.
- [4] Koscielny S, Dahse R, Ernst G, et al. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2007, 69:30-36.
- [5] Houten VM, Tabor MP, Brekel MW, et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. J Pathol, 2002, 198:476-486.
- [6] Ganly I, Kim D, Eckhardt G, et al. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. Clin Cancer Res, 2000, 6:798-806.
- [7] Neves SS, Sarmiento-Ribeiro AB, Simões SP, et al. Transfection of oral cancer cells mediated by transferrin-associated lipoplexes: mechanisms of cell death induced by herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758:1703-1712.
- [8] van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W, et al. Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. Curr Gene Ther, 2002, 2:307-322.

- [9] Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, et al. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol*, 2003, 18:495-507.
- [10] Whiteside TL. Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24:95-105.
- [11] Podhajcer OL, Lopez MV, Mazzolini G. Cytokine gene transfer for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18:183-194.
- [12] Badoual C, Sandoval F, Pere H, et al. Better understanding tumor-host interaction in head and neck cancer to improve the design and development of immunotherapeutic strategies. *Head Neck*, 2010, 32:946-958.
- [13] Liu TC, Kirn D. Gene therapy progress and prospects cancer; oncolytic viruses. *Gene Ther*, 2008, 15:877-884.
- [14] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. Adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 1996, 274:373-376.
- [15] O'Shea CC, Soria C, Bagus B, et al. Heat shock phenocopies E1B-55K late functions and selectively sensitizes refractory tumor cells to ONYX-015 oncolytic viral therapy. *Cancer Cell*, 2005, 8:61-74.
- [16] Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1:347-355.
- [17] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets*, 2010, 11:345-360.
- [18] 陈湘琦, 李志鹰, 林挺岩. RNA 干扰技术在肺癌基因治疗中的应用研究现状[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4:1028-1031.
- [19] Ambade AV, Joshi GV, Mulherkar R. Effect of suicide gene therapy in combination with immunotherapy on antitumour immune response & tumour regression in a xenograft mouse model for head & neck squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res*, 2010, 132:415-422.
- [20] Rhee JG, Li D, Suntharalingam M, et al. Radiosensitization of head/neck squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated expression of the Nbs1 protein. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 67:273-278.
- [21] McNally LR, Rosenthal EL, Zhang W, et al. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with replicative adenovirus expressing tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and chemoradiation. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16:246-255.
- [22] Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 2005, 433:561.
- [23] Ott MG. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*, 2006, 12:401-409.
- [24] Li D, Duan L, Freimuth P, et al. Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:4175-4181.
- [25] Li D, Guang W, Abuzeid WM, et al. Novel adenoviral gene delivery system targeted against head and neck cancer. *Laryngoscope*, 2008, 118:650-658.
- [26] Morsy MA, Caskey CT. Expanded-capacity adenoviral vectors-the helper-dependent vectors. *Mol Med Today*, 1999, 5:18-24.
- [27] Gao G, Alvira MR, Somanathan S, et al. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:6081-6086.
- [28] Srivastava A. Adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J Cell Biochem*, 2008, 105:17-24.
- [29] Paiboonsukwong K, Ohbayashi F, Shiiba H, et al. Correction of mutant Fanconi anemia gene by homologous recombination in human hematopoietic cells using adeno-associated virus vector. *J Gene Med*, 2009, 11:1012-1019.
- [30] Li C, Bowles DE, van Dyke T, et al. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12:913-925.
- [31] Kaneda Y. A non-replicating oncolytic vector as a novel therapeutic tool against cancer. *BMB Rep*, 2010, 43:773-780.
- [32] Oldfield EH, Ram Z, Culver KW, et al. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther*, 1993, 4:39-69.
- [33] Thomas SM, Grandis JR. The Current State of Head and Neck Cancer Gene Therapy. *Hum Gene Ther*, 2009, 20:1565-1575.
- [34] Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 1998, 16:2221-2232.
- [35] Clayman GL, Frank DK, Brusio PA, et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:1715-1722.
- [36] Nemunaitis J, Nemunaitis J. Head and neck cancer: response to p53-based therapeutics. *Head Neck*, 2011, 33:131-134.
- [37] 张珊文, 肖绍文, 刘长清, 等. 头颈鳞癌基因治疗结合放射治疗的临床研究. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27:426-428.
- [38] Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98:298-300.
- [39] Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer drug Targets*, 2007, 7:141-148.
- [40] Villaret D, Glisson B, Kenady D, et al. A multicenter Phase II study of tgDCC-E1a for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2002, 24:661-669.
- [41] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:4138-4143.
- [42] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res*, 2006, 312:594-607.
- [43] Li HL, Li S, Shao JY, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intratumoral injection of an adenovirus encoding endostatin in patients with advanced tumors. *Gene Ther*, 2008, 15:247-256.
- [44] Lin X, Huang H, Li S, et al. A phase I clinical trial of an adenovirus-mediated endostatin gene (E10A) in patients with solid tumors. *Cancer Biol*

- Ther, 2007, 6:648-653.
- [45] Nakagawa T, Tanaka H, Shirakawa T, et al. Cyclooxygenase 2 promoter-based replication-selective adenoviral vector for hypopharyngeal cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 135:282-286.
- [46] Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst, 1998, 90:824-832.
- [47] Karamouzis MV, Grandis JR, Argiris A. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. JAMA, 2007, 298:70-82.
- [48] Lai SY, Koppikar P, Thomas SM, et al. Intratumoral epidermal growth factor receptor antisense DNA therapy in head and neck cancer: First human application and potential antitumor mechanisms. J Clin Oncol, 2009, 27:1235-1242.
- [49] Ganly I, Kim D, Eckhardt G, et al. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. Clin Cancer Res, 2000, 6:798-806.
- [50] Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: A phase II trial. Cancer Res, 2000, 60:6359-6366.
- [51] Jia H, Kling J. China offers alternative gateway for experimental drugs. Nat Biotechnol, 2006, 24:117-118.
- [52] Neves S, Faneca H, Bertin S, et al. Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response. Cancer Gene Ther, 2009, 16:91-101.
- [53] Yu D, Wang A, Huang H, et al. PEG-PBLG nanoparticle-mediated HSV-TK/GCV gene therapy for oral squamous cell carcinoma. Nanomedicine, 2008, 3:813-821.
- [54] Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. AAPS J, 2005, 7:E61-77.
- [55] Gleich LL, Gluckman JL, Nemunaitis J, et al. Clinical experience with HLA-B7 plasmid DNA/lipid complex in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 127:775-779.
- [56] Fang L, Hu Q, Hua Z, et al. Growth inhibition of a tongue squamous cell carcinoma cell line (Tca8113) in vitro and in vivo via siRNA-mediated downregulation of skp2. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008, 37:847-852.
- [57] Zhou H, Tang Y, Liang X, et al. RNAi targeting urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits metastasis and progression of oral squamous cell carcinoma in vivo. Int J Cancer, 2009, 125:453-462.
- [58] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res, 2008, 68:2094-2105.
- [59] Liu X, Jiang L, Wang A, et al. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Lett, 2009, 286:217-222.
- [60] Thomas SM, Ogagan MJ, Freilino ML, et al. Antitumor mechanisms of systemically administered epidermal growth factor receptor antisense oligonucleotides in combination with docetaxel in squamous cell carcinoma of the head and neck. Mol Pharmacol, 2008, 73:627-638.
- [61] Li D, Jiang W, Bishop JS, et al. Combination surgery and nonviral interleukin 2 gene therapy for head and neck cancer. Clin Cancer Res, 1999, 5:1551-1556.
- [62] Rhee JG, Li D, Suntharalingam M, et al. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated expression of the Nbs1 protein. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 67:273-278.
- [63] McNally LR, Rosenthal EL, Zhang W, et al. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with replicative adenovirus expressing tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and chemoradiation. Cancer Gene Ther, 2009, 16:246-255.

(收稿日期:2011-02-09)

(本文编辑:巨娟梅)