

· 综 述 ·

电基因疗法治疗肿瘤的研究进展

张 玉 综述,熊正爱[△] 审校

(重庆医科大学附属第二医院妇产科 400010)

关键词:电穿孔;基因疗法;肿瘤;电基因疗法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.035

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1324-03

迄今大量研究已经证实,肿瘤发生与发展的生物学基础是基因突变,所以,肿瘤基因治疗已成为广大肿瘤学者研究的热点。基因转导和策略选择是肿瘤基因治疗的关键。目前基因转导方法包括 DNA-磷酸钙共沉淀、脂质体介导、电穿孔、显微注射、受体介导转移、DNA 直接注射、基因枪及病毒介导等,但仍存在许多问题,如基因转移效率低、靶向性不确切、安全性低等。1996 年,Toru Nishi 等利用电穿孔法转染 lacZ 基因和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)DNA 治疗神经胶质瘤,并首次将此法命名为“电基因疗法”(electrogene therapy),为肿瘤治疗提供一种新的思路。

1 电基因疗法的理论基础与原理

基因治疗是指把某些遗传物质转移到患者体内,使其在体内表达,最终达到治疗某种疾病的方法。目前基因转移的方法分为生物学方法、物理学方法和化学方法。电基因疗法就是一种借助电脉冲诱导细胞膜电穿孔(electroporation,EP)和电渗透(electropermeabilization)作用从而进行高效基因转移的物理学方法。

1.1 电基因疗法的理论基础 细胞膜是维持细胞内环境相对稳定、也是细胞内外物质、信息交换的中介场所。细胞膜属于生物膜,具有流动性、不对称性、相变性、蛋白极性和通透性,在适宜的环境下,其脂质双分子层维持相对稳定,但当细胞膜受到外界生物学或理化因素干扰时,其结构发生变化,静息电位和通透性随之改变。电脉冲的生物学效应首先发生在细胞膜上,引起细胞膜变化,细胞膜再将信息传递至细胞内,引发一系列生物学效应。

1.2 电基因疗法的原理 电基因疗法将 2 个或多个电极插入肿瘤组织内或组织周围,当外加电脉冲场强达到 kV/cm 量级、脉宽为 $\mu\text{s}\sim\text{ms}$ 量级时,本身不导电的细胞膜双层磷脂膜骨架构形发生变化,出现大量微孔,使细胞膜的通透能力激增,表面产生疏水或亲水的 50~115 nm 微小通道,这种通道能维持几毫秒到几秒,然后自行恢复;DNA 带负电荷,在电流的作用下产生电泳效应而聚集到细胞膜周围;同时,电场作用使细胞外液积聚负电荷而细胞内液积聚正电荷,当电压差大于临界电压时细胞膜被击穿形成亲水孔道,聚集的 DNA 通过此孔道向细胞内转移^[1]。Vernier 等^[2]认为细胞膜通道的形成可能是位于细胞膜内面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)外翻所致。

细胞在高效电场作用下,细胞膜出现孔隙,而细胞核、线粒体等细胞膜内细胞器不受影响,细胞内仍具有完整的细胞骨架系统,因此细胞依旧保持活性,转移进入的目的基因有效表达,进而发挥其抑瘤或杀瘤作用。

2 电基因疗法的实验研究

2.1 体外细胞实验 1982 年,有学者首次用电穿孔法把外源

DNA 导入小鼠成纤维细胞。历经 20 多年,他的实验已成为基因电转染的标准实验室方法。

Cemazar 等^[3-4]运用体外和在体实验,探讨不同电脉冲参数(场强、脉宽、频率、时间)组合和细胞浓度对基因转染效率的影响。结果显示,电脉冲转染法采用较小场强和较大脉宽对绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)表达质粒的转染率更高,细胞大小及浓度也会影响电脉冲基因转染效率,浓度与电转染效率呈负相关。

Beebe 和 Schoenbach^[5]研究发现采用经典电穿孔参数转染 GFP 表达质粒后,紧跟一个不致凋亡的纳秒级不可逆电脉冲将会大大提高其转染效率。

Van Bockstaele 等^[6]比较不同基因转染技术治疗慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)的有效性和实用性,发现体外电穿孔转录 mRNA 获得了 90% 的构建携带增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)和 CLL 细胞,而对生存率无影响,处理后 2 周仍可检测到转录基因的表达。此外,运用 ζ 链结合蛋白激酶 70(ZAP70)或 ZAP70-EGFP mRNA 电穿孔转染后可检测到 ZAP70 的过度表达和 ZAP70-EGFP 融合蛋白。由此认为 mRNA 电转染是 CLL 基因治疗简单而新颖的方法,可以促进 CLL 细胞的功能研究和临床研究。

Vidic 等^[7]在体外和在体实验中探索 miRNA 分子对 K-ras 突变表达水平和结肠直肠癌 LoVo 细胞株生长的影响,利用电穿孔法将质粒 DNA 编码 miRNA-K-ras 转染进 LoVo 细胞株。结果显示,体外实验中靶向 K-ras 的 miRNAs 能有效减少 K-ras 的表达和细胞生存率;在体实验也证实电穿孔是局部调整 miRNA-K-ras 分子进入 LoVo 细胞的简单高效的基因传递技术,几乎没有不良反应,有望成为治疗结肠直肠癌极具潜力的治疗方法。

2.2 动物实验 有学者利用电穿孔法将质粒 DNA 传递至新生小鼠皮肤,首次实现了外源基因的体内转移。之后的研究发现在肌肉、肿瘤或皮肤组织局部注射 DNA 后施加电脉冲,其转染率比单独局部注射提高了 100~1 000 倍^[8-10],同时基因表达可持续数月^[11]。肿瘤治疗中用于电转染的基因或 cDNA 包括免疫调节因子(TNF、LT、IFN、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 等)、细胞周期调节因子(p27)、自杀基因(HSV-TK)、抗血管生成基因、反义核酸、肿瘤抗原基因、共刺激因子(B7.1)、肿瘤抑制基因(p53)和基因编码毒素等。

Goto 等^[8]研究发现,CT26 荷瘤小鼠给予单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶(HSV-TK)或白喉菌素 A(DT-A)基因后施加电脉冲,相对于对照组有 90% 的肿瘤组织生长大大受到抑制。

McCray 等^[12]在荷 B16 黑色素瘤小鼠皮下注射 HIV-1 辅助蛋白 Vpr(viral protein R)表达质粒,给予电脉冲促转染,结

果肿瘤完全消退,小鼠的长期生存率分别为 14.3%和 7.1%;还发现该法能诱导肿瘤细胞凋亡。

Ugen 等^[13]将荷 B16 黑色素瘤的 C57BL/6 鼠随机分为未治疗组(P-V-E-)和实验组,实验组给予 pIL-15 治疗(P+),骨架质粒(V+)或电穿孔(E+)。于第 1、4、7 天肿瘤内注射 IL-15 质粒 50 mg,给予电脉冲促转染。治疗后第 100 天,P-V+E+组、P+V-E-组、P+V-E+组和 P-V-E-组中,肿瘤消退的鼠的生存率分别为 0%、12.5%、37.5%和 0%。上述结果显示,质粒 IL-15 能使 B16 黑色素瘤消退,电转染能显著增强其作用。

上海交通大学 Zhu 等^[14]运用基因电转染法转染 IL-12,10 d 后再转染 IL-27,用于治疗对 IL-12 敏感的 CT26 相关肿瘤和高度恶性的 4T1 相关肿瘤,该法被称为 IL-12→IL-27 基因序贯疗法(sequential IL-12→IL-27)。发现 IL-12→IL-27 组对 CT26 相关肿瘤消除率达 100%,对 4T1 相关肿瘤消除率达 33%,比单纯电转染 IL-12 编码质粒 DNA 提高了两倍,且能诱导细胞毒性 T 细胞(CTL)激活、提高 T 细胞渗透能力、产生大量肿瘤特异 IFN- γ 阳性 CD8 T 细胞。

Palvin 等^[15]用电基因疗法将 IL-12 质粒转染进荷 SA-1 瘤鼠的瘤体和外周,在肿瘤局部和全身都有显著的抗癌作用。瘤体内取得了 90%以上的肿瘤完全缓解率,60%的处理鼠对 SA-1 肿瘤细胞有抵抗作用;瘤体外周肿瘤完全缓解率较低(16%),残留肿瘤组织生长显著推迟。可见该法显著抑制了肿瘤生长,对软组织肿瘤的治疗有效,具有局部和全身的抑瘤作用。

Deharvengt 等^[16]用电穿孔转染细菌嘌呤核苷磷酸化酶(ePNP)治疗巨大胰腺癌(pancreatic cancer,PC)。建立免疫缺陷小鼠人 PC 细胞皮下移植瘤和同系大鼠 PC 细胞常位移植瘤模型,分别在肿瘤内注射裸质粒 DNA,给予电脉冲,发现肿瘤对前体药物(6-甲基嘌呤脱氧核苷或磷酸氟达拉滨)的处理敏感,皮下移植瘤模型生长延迟 50%~70%,常位移植瘤模型 ePNP 电转染后给予磷酸氟达拉滨,动物生存期显著延长,其中 1 只鼠 6 个月后肿瘤消除。

Signori 等^[17]将抗原优化、免疫佐药、细胞因子共表达、分子共刺激等与电穿孔相联合治疗大鼠淋巴瘤,实验中电穿孔使肌细胞形态发生短暂改变,从而利于 DNA 疫苗的摄取,诱发局部危险信号产生内生细胞因子。该属性不仅使电穿孔法成为 DNA 疫苗方案强有力的辅佐技术,更让 DNA 疫苗克服了运用于临床的障碍,唤起更多肿瘤 DNA 疫苗防治的临床实验。

Golzio 等^[18]将电穿孔运用于 B16 黑色素瘤基因敲除,发现荷瘤小鼠在靶向电传递后使用化学合成 siRNAi,一次处理后 2~4 d 采用荧光成像和实时荧光定量 PCR 检验均取得高效基因沉默,可见该法可以用于局部给予 siRNAi 的基因功能分析和器官治疗。

2.3 临床实验 尽管基因电转染技术在动物模型各组织的不同适应证已进行了大量研究,且已取得显著的效果,但在人类的临床研究却报道甚少。

2004 年开始,美国佛罗里达州坦帕 H. Lee Moffitt 肿瘤研究中心首次在转移性黑色素瘤患者中开展电转染 IL-12 I 期临床剂量升级实验^[19]。患者在治疗第 1、5、8 天注射质粒 IL-12 DNA 后立即给予一定剂量电脉冲,24 例患者接受了 7 个剂量水平的治疗。治疗后组织切片显示质粒剂量与 IL-12 蛋白水平呈正相关,伴有显著瘤细胞坏死和淋巴细胞浸润;2 例患者

肿瘤完全消退,8 例患者病情稳定或仅有局部反应,全身毒性作用微弱。这是首次报道利用电穿孔转染基因的临床实验。

2005 年,美国加利福尼亚州圣地亚哥 Vical 公司也进行了电转染 IL-2 治疗黑色素瘤的 I 期临床实验,以评估该治疗方案的安全性和耐受性^[20-21]。两年后公布了 19 例受试者暂时性治疗结果:该法安全、有效;无与药物及脉冲处理相关的严重不良事件发生,受试者对治疗耐受性良好。

英国南安普敦大学开展了肌肉内电穿孔接种疫苗治疗前列腺癌的临床实验^[20]。美国新泽西州的默克公司也发起了肌肉内电穿孔传递 HER-2 和(或)癌胚抗原(CEA)的临床 I 期实验^[22]。

Gehl^[22]和 Tjelle 等^[23]分别系统提出了基因电转染临床实验协议草案,对协议的运作、患者知情同意、处理部位麻醉和消毒、DNA 注射和电脉冲给予等都进行了比较详细的介绍,对临床实验的开展有一定的指导意义。

老道明大学 Frank Reidy 生物电研究中心也在进行电基因免疫疗法治疗黑色素瘤临床实验^[24],电转染 IL-12 后绝大部分肿瘤组织产生显著细胞坏死,组织切片中可见明显的炎症细胞浸润。同时实验证实该法安全,无 3 级或 4 级毒性作用报道。

目前的临床前期研究已经证实了电基因转染的实用性,然而这种传输方式的真正潜能要到上述研究的结果出台和未进一步研究证实才能清楚。

3 结 语

电基因疗法在基础实验和临床研究中疗效显著,但由于该法横跨了生物医学工程、电工新技术、计算机技术、微电子技术、肿瘤治疗学等领域,是一项多学科交叉的综合性技术方法,仍有许多问题有待于进一步研究,如 II、III 期临床实验,体内肿瘤治疗的开展,相关治疗仪的设计开发以及电穿孔最佳剂量的确定等。只有不断在实践中积累经验,使之日趋成熟,才能更好地造福人类。

参考文献:

- [1] 巨兴达,俞华莉,王兴智,等.体内电穿孔法转基因技术的应用[J].神经解剖学杂志,2009,25(1):105-110.
- [2] Vernier PT, Sun Y, Marcu L, et al. Nanoelectropulse-Induced Phosphatidylserine translocation [J]. Biophys J, 2004,86(6):4040-4048.
- [3] Cemazar M, Wilson J, Tozer GM, et al. Effective to Activate Intracellular Signaling [J]. J Biomed Biotechnol, 2005,2005(4):297-300.
- [4] Cemzar M, Sersa G, Wilson J, et al. Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques; Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector[J]. Cancer Gene Ther, 2002,9(4):399-406.
- [5] Beebe SJ, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric fields; a new stimulus to activate intracellular signaling [J]. J Biomed Biotechnol, 2005,2005(4):297-300.
- [6] Van Bockstaele F, Pede V, Naessens E, et al. Efficient gene transfer in CLL by mRNA electroporation[J]. Leukemia, 2008,22(2):323-329.
- [7] Vidic S, Markelc B, Sersa G, et al. MicroRNAs targeting mutant K-ras by electrotransfer inhibit human colorectal adenocarcinoma cell growth in vitro and in vivo[J]. Canc-

- er Gene Ther, 2010, 17(6):409-19.
- [8] Goto T, Nishi T, Tamura T, et al. Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(1):354-359.
- [9] Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, et al. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1572(1):1-9.
- [10] Heller L, Jaroszeski MJ, Coppola D, et al. Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo[J]. Gene Ther, 2000, 7(10):826-829.
- [11] Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D' Aiuto L, et al. In vitro and in vivo delivery of intact BAC DNA-comparison of different methods[J]. J Gene Med, 2004, 6(2):195-209.
- [12] McCray AN, Ugen KE, Muthumani K, et al. Complete regression of established subcutaneous B16 murine melanoma tumors after delivery of an HIV-1 Vpr-expressing plasmid by in vivo electroporation[J]. Mol Ther, 2006, 14(5):647-655.
- [13] Ugen KE, Kutzler MA, Marrero B, et al. Regression of subcutaneous B16 melanoma tumors after intratumoral delivery of an IL-15-expressing plasmid followed by in vivo electroporation[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(10):969-974.
- [14] Zhu S, Lee DA, Li S. IL-12 and IL-27 Sequential gene therapy via intramuscular electroporation delivery for eliminating distal aggressive tumors[J]. J Immunol, 2010, 184(5):2348-2354
- [15] Pavlin D, Cemazar M, Kamensek U, et al. Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(22):2114-2122.
- [16] Deharvengt S, Rejiba S, Wack S, et al. Efficient electro-gene therapy for pancreatic adenocarcinoma treatment using the bacterial purine nucleoside phosphorylase suicide gene with fludarabine[J]. Int J Oncol, 2007, 30(6):1397-1406.
- [17] Signori E, Iurescia S, Massi E, et al. DNA vaccination strategies for anti-tumour eVective gene therapy protocols[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(10):1583-1591.
- [18] Golzio M, Mazzolini L, Paganin-Gioanni A, et al. Targeted Gene Silencing into Solid Tumors with Electrically Mediated siRNAi Delivery[J]. Methods Mol Biol, 2009(555):15-27.
- [19] Daud AI, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(36):5896-5903.
- [20] Heller LC, Heller R. In vivo electroporation for gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(9):890-897.
- [21] Horton HM, Lalor PA, Rolland AP. IL-2 plasmid electroporation: from preclinical studies to phase I clinical trial [J]. Methods Mol Biol, 2008(423):361-372.
- [22] Gehl J. Electroporation for drug and gene delivery in the clinic: doctors go electric [J]. Methods Mol Biol, 2008(423):351-359.
- [23] Tjelle TE, Rabussay D, Ottensmeier C, et al. Taking electroporation-based delivery of DNA vaccination into humans: a generic clinical protocol[J]. Methods Mol Biol, 2008(423):497-507.
- [24] Heller LC, Heller R. Electroporation gene therapy pre-clinical and clinical trials for melanoma [J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(4):312-317.

(收稿日期:2010-05-07 修回日期:2010-10-12)

• 综 述 •

造影剂肾病的研究进展

马兴杰,董岸莺 综述,韩国华 审校

(新疆库尔勒解放军第二七三医院心肾呼吸内科 841000)

关键词:造影剂;造影剂肾病;水化;冠脉介入

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.036

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1326-04

造影剂肾病(contrast-induced nephropathy, CIN)是含碘造影剂应用过程的重要并发症,是医院获得性肾功能衰竭的第三大原因^[1],病死率高达14%。虽然随着含碘造影剂不断改进及对CIN的研究不断深入并采取相应预防措施,CIN的发生率已由15%下降至7%^[2],但是依赖造影剂的诊疗操作不断增加,流行病学资料表明,美国每年有600万人行冠脉介入检查,消耗造影剂超过600 kg^[3]。在冠脉介入领域,CIN已成为继再狭窄和支架内血栓后心血管医师所面临的又一重大挑战。因此,CIN越来越受到医务工作者的重视。本文对近年来有关CIN的发病机制及防治措施的进展综述如下。

1 概念及临床表现

CIN目前尚无统一的诊断标准。多采用的标准是应用含碘造影剂后2~3 d血清肌酐(SCr)水平较基线水平升高大于或等于25%或44.2 μmol/L(5 mg/L),并排除其他原因所致的急性肾功能损害^[4]。临床通常表现为非少尿型急性肾功能衰竭,糖尿病、肾功能不全的患者可能表现为少尿型急性肾功能衰竭。尿液检查提示急性肾小管坏死,沉渣可见颗粒管型和肾小管上皮管型。病理改变为肾小管上皮细胞严重颗粒和空泡变性,肾间质弥漫水肿。肾小球病变不明显^[5]。

2 发病机制