

• 综 述 General review •

肝癌基因治疗研究新进展

曹海利, 孟 巍, 白 彬

【摘要】 肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 目前治疗方法较多, 其中基因治疗是当前热点问题。本文对肝癌基因治疗的几个方面: 反义基因治疗、自杀基因治疗、免疫基因治疗、抑癌基因治疗、联合基因治疗、基因载体等方面进行了综述。

【关键词】 肝癌; 基因治疗; 基因转移; 癌基因

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2008)-05-0375-04

New progress in research of gene therapy for hepatocellular carcinoma CAO Hai-li, MENG Wei, BAI Bin. Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China.

【Abstract】 Hepatocellular carcinoma(HCC) is a common malignant tumor, and there are many kinds of therapy at present. Among them, gene therapy is the hot spot of the current research and in turn that would have a comprehension of several aspects concerning about gene therapies in HCC, including the research and advance of antisense gene, suicide gene, immune gene, anti-oncogene, combined gene, gene vector etc. (J Intervent Radiol, 2008, 17: 375-378)

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Gene therapy; Gene transfer; Oncogene

肝癌是目前最常见且病死率较高的恶性肿瘤之一, 目前尚无有效的治疗措施。近年来, 随着分子生物学理论和基因重组技术的飞速发展, 为肿瘤的治疗开辟了新的途径。肝脏因其再生能力强、合成多种蛋白质等特点, 已成为基因治疗的理想靶器官, 肝癌基因治疗已显示出广阔的应用前景。本文就肝脏恶性肿瘤基因治疗的现状进行简要综述。

1 肝癌基因治疗的基本原理

1.1 基因治疗的基本概念

基因治疗的基本含义是通过遗传或分子生物学技术在基因水平上治疗各种疾病。基因治疗的方式有两类, 一类为基因矫正和置换, 即将缺陷基因的异常序列进行校正, 对缺陷基因进行精确的原位修复; 另一类为基因增补, 不去除异常基因, 而是通过外源基因的非定点整合, 使其表达正常产物, 从而补偿缺陷基因的功能。

1.2 基因治疗所用的载体

1.2.1 病毒载体 将基因转导至肿瘤靶细胞内需

要载体, 它是基因疗法能付诸于临床治疗的一项关键技术, 目前基因治疗常用的是反转录病毒和腺病毒。

反转录病毒载体为单链 RNA 分子, 是目前最常用的基因转移载体。常用的有鼠白血病病毒, 其重组病毒完全不具备复制性, 其转染谱广, 可转染多种类型的体细胞, 但主要转染分裂活跃的细胞, 所以该载体用于肝细胞的基因治疗时需采用体外、体内联合途径。1991 年 Huber 等^[1]首先采用反转录病毒载体携带 AFP/VZV-TK 嵌合基因转染人肝癌细胞并联合 araM 治疗, 达到了特异杀伤肝癌细胞的目的。

腺病毒载体为双链 DNA 分子, 具有容易制备, 理化性质较稳定, 感染靶细胞的范围大, 既可感染分裂细胞又可感染非分裂细胞等多种优点。由于腺病毒感染细胞时 DNA 不整合到宿主细胞染色体中, 不会激活宿主细胞的原癌基因或引起抑癌基因失活, 所以较为安全可靠。Lin 等^[2]构建了腺病毒介导的蜂毒肽基因(MEL)和 AFP 启动子重组系统, 在肝细胞癌体内、体外实验中都产生了明显的抗肿瘤效应。Penuelas 等^[3]将腺病毒介导的胸腺嘧啶激酶基因直接注入人肝癌瘤体内的临床研究, 证实了腺

病毒人体注射的可行性,并发现人体其他脏器包括与瘤体相邻的肝脏组织没有转基因的表达,为真正实现肝癌的基因治疗从动物实验转向临床应用奠定了基础。

1.2.2 非病毒性载体 非病毒类载体,常用的是脂质体。脂质体包被的重组质粒 DNA 载体很容易通过胞膜进入细胞内,且不损害细胞,经静脉注入可将基因有效的转移到多种器官内。脂质体介导的基因转染,为 DNA 转移到组织细胞提供了一种无毒、无免疫原性的方法,但转染效率较病毒载体低,稳定性也差。Zhang 等^[9]将自杀基因 pAFP-TK 的质粒 DNA(pDNA)包被入聚丁-氰基丙烯酸酯-溴化十六烷基三甲基铵微粒(PBCA-CTAB NPs),发现该微粒不仅保护 pDNA 防止被胰脱氧核糖核酸酶消化,而且高效转导 pDNA 进入靶细胞,提示 PBCA-CTAB NPs 载体携带 pAFP-TK/GCV 自杀基因可能有望治疗 AFP 阳性肝癌。

1.3 基因转移途径

基因转移途径有两类:一类是活体直接转移,即将带有目的基因的病毒、脂质体或裸露 DNA 直接注射到体内;另一类是离体转移,即将试验对象的细胞取出,经体外培养后导入基因,然后将这些细胞重新移回试验体内。目前,临床常采用瘤体内直接注射与肝动脉注射相结合的方法。Gevolami 等^[9]采用经大鼠门静脉、肝动脉、肿瘤内直接注射等途径,将重组腺病毒载体导入亚硝胺诱导的原发性肝癌内,结果证实以肝动脉注射和瘤体内直接注射,肝癌细胞表达目的基因的比率较高。

2 肝癌基因治疗的方法

2.1 反义基因治疗

肝癌的发生、发展过程中许多癌基因及生长因子的基因产物大量表达,运用反义技术可以抑制这些产物的过度表达,从而抑制肿瘤的生长。根据肝癌发病原因,导入反义寡核苷酸封闭肝癌基因的表达或用正常抑癌基因取代突变抑癌基因。Wang 等^[9]利用 AFP 反义寡核苷酸治疗体外和裸鼠的 SMMC-7721 肝癌模型取得了明显的抗癌作用,减少了 AFP 的表达,抑制 SMMC-7721 细胞的增生。Sun 等^[7]报道反义低聚核苷酸(ASO)能对抗凋亡抑制因子,加速肿瘤凋亡,抑制肿瘤生长,他们对比研究裸鼠肝癌细胞系 HepG2 模型,ASO 治疗组肿瘤生长明显受抑制,与对照组(生理盐水注射组)有显著差异,而且 ASO 治疗效果具有剂量依赖性。

2.2 自杀基因治疗

原理是把某些病毒、细菌中特有的转换酶基因-自杀基因导入体内后,利用其产生的酶将无毒或低毒的药物前体转成细胞毒性代谢产物,从而杀死肿瘤细胞的基因治疗方法。目前常用针对肝癌基因治疗的有单纯疱疹病毒 I 型胸苷嘧啶激酶/戊环鸟苷系(HSV-TK/GCV)和胞嘧啶脱氨酶/5 氟胞嘧啶(CD/5Fc)等系统。自杀基因治疗恶性肿瘤时存在的“旁观者”效应也越来越受到重视,它是指携带自杀基因的细胞被敏感药物杀伤的同时,其周围无自杀基因的肿瘤细胞也被累及的现象。有学者构建了单纯疱疹病毒 I 型 TK (HSV-I-TK) 基因并经 RVV 直接注射大鼠实验性肝肿瘤完成了 HSV-I-TK 基因的原位转导,被转导的肿瘤细胞产生 TK 酶将与核苷结构类似的无毒性抗病毒药物丙氧鸟苷(GCV)代谢成毒性产物并将肿瘤细胞杀伤,使肿瘤体积显著缩小,生存期延长。Cao 等^[9]认为 HSV-TK/GCV 杀伤恶性肿瘤细胞效率不高,主要原因:①“旁观者”效应不理想;②蛋白表达时间短。HIV-1 TAT 转导蛋白可提高 HSV-TK/GCV 基因疗效。他们构建 TAT-TK,TK-TAT 和 TK 聚合蛋白转导入肝癌细胞系 HepG2 细胞,发现 TAT-TK 能进入 HepG2 细胞,而且一部分进入细胞核内,结果转导的 HepG2 细胞被杀伤,而“旁观者”效应作用于非转导的 HepG2 细胞。Harada 等^[9]以 EB 病毒基因组成的质粒载体与非病毒载体 PAAD 结合成杂交载体介导 HSV-TK/GCV 系统,能有效治疗实验小鼠肝癌。Won 等^[10]通过单纯疱疹病毒将 AFP 反转剪接靶 RNA 构成酶导入肝癌细胞,取代 HCC 高效表达 AFP 的 RNA 残基,结果明显延缓肿瘤细胞生长并降低了细胞中表达 AFP 的 RNA 水平。

2.3 免疫基因治疗

免疫基因治疗通过基因重组技术增强机体的抗肿瘤免疫功能而达到治疗肿瘤的目的。将细胞因子基因导入肿瘤细胞、免疫效应细胞或成纤维细胞等,通过体内直接注射或基因转染方法,使肿瘤局部产生高浓度的细胞因子,从而激活或增强机体抗肿瘤免疫反应,是肿瘤生长受到抑制或坏死消退。目前应用的细胞因子有 IL-2、IL-12、IL-18、TNF α 、干扰素和集落刺激因子等。Martinet 等^[11]通过瘤体内注射携带 IL-12 和 4-1BB 配体基因的重组 AdV,使小鼠肝癌体积显著缩小,其抗肿瘤作用主要通过 NK 细胞和 CD8 + T 细胞实现。Noburu 等^[12]研究发现以 IL-12 基因治疗免疫抑制状态下的鼠肝癌模型,可

明显增加肿瘤细胞周围淋巴细胞的浸润并增强肿瘤特异性杀伤细胞的反应。Chang 等^[13]用结肠恶性肿瘤细胞在同系基因鼠 CT26 肝癌模型后,将编码 IL-18 质粒 DNA 注入肿瘤局部,注射 4 d 后局部 IL-18 增加,注射 7 d 后产生显著抗肿瘤作用。IL-18 抗肿瘤作用是通过增加脾脏和外周血 T 细胞、NK 细胞数量,促进 INF- γ 产生,进而加强 T 细胞和 NK 细胞活性。

2.4 抑癌基因治疗

通过恢复或添加肿瘤细胞中失活或缺乏的抑癌基因,恢复抑癌基因的功能,从而抑制肿瘤的生长和转移,常用野生型 p53、p16 等。p53 基因不仅可抑制癌细胞生长,还可诱导其凋亡,p16 基因能抑制细胞生长于 G₁-S 期,但不诱发凋亡。野生型 p53 基因是最常见的一种抑癌基因,人类肝癌组织中常可检测到 p53 基因突变,特别是在乙型病毒性肝炎(乙肝)高发区和饮食受黄曲霉素污染的地区。p16 启动子甲基化后,肝癌发生概率明显提高,尤其 HBV 感染者。Jicai 等^[14]研究发现乙肝合并肝癌,p16 启动子甲基化检出率为 90.6%,乙肝合并肝硬化为 46.7%。Zhang 等^[15]取 40 例冰冻肿瘤组织进行 DNA 检测发现,11 例 p53 基因突变(28%),24 例 p16 启动子甲基化(62%)。Okimoto 等^[16]将带有野生型 p53 基因的腺病毒载体 Adomv p53 通过肝动脉注入小鼠 RCN-9 结肠癌细胞肝转移模型,48 h 后,经腹腔注射 CDDP 治疗,发现转移的肝癌细胞广泛凋亡,而肝脏功能并未受损。Huang 等^[17]用携带 p16 基因的重组 RV 分别在体内和体外转染肝癌细胞系 SNU-449,都显著抑制了癌细胞的生长。

3.5 联合基因疗法

肝癌的发生涉及到多基因参与,因此单用一种基因治疗效果有限。不同的肝癌基因疗法是根据肝癌发病原因、发病过程的各个阶段及肝癌的特殊生物学特性设计的,杀伤的机制和作用途径各不相同,因此不同的基因治疗策略联合应用可相互协同,增强抗肿瘤效果常采用免疫基因和自杀基因的联合治疗,在肝癌联合基因治疗试验中,将自杀基因与免疫基因治疗联合应用,在增强机体抗肿瘤免疫能力同时直接杀伤肿瘤细胞,达到根治肿瘤、防止转移及复发的目的。Drozd 等^[18]联合 HSV-TK 和 IL-12 治疗效果都明显优于单个基因治疗。

3.6 抗血管生成基因治疗

肿瘤的生长和转移是一个依赖于血管生成的过程。肿瘤血管生成是由肿瘤细胞和肿瘤浸润炎症

细胞如巨噬细胞或肥大细胞产生的促血管形成因子所介导的。促血管形成因子是肿瘤生长所必需的,不少细胞因子与肿瘤血管形成密切相关,因此,抑制肿瘤血管形成可以导致肝癌细胞衰退。肿瘤血管生成中最主要的是血管内皮细胞生长因子(VEGF)。Gu 等^[19]将反义的 VEGF 165 真核表达载体 PCDNA-as-VEGF 165 转染 SMMC-7721 肝癌细胞株发现 VEGF 蛋白表达明显受抑,肝癌细胞凋亡增加、存活率降低。然而,欲使抗血管生成素基因治疗策略成为临床适用的治疗方法,就要设计能够满足选择性转染、持久高效表达的新载体;而且,各种抗血管生成素分子能够得到鉴定。

3 问题与展望

肝癌基因治疗具有广阔的应用前景,对于肝癌的基因治疗,目前研究主要集中在以下几方面:①构建高效特异载体系统,在新的病毒载体方面,HIV 病毒载体目前研究较热,有望成为代替腺病毒的基因治疗载体。近年来,有利用超声对比剂微泡作为基因载体并用超声技术处理,提高转染率取得成功^[20,21]。②寻找新的目的基因,以期提高在肝癌组织中的表达阳性率。③通过基因调控进行更加精确的基因治疗(亦称为第二代基因治疗),该方法大多通过 AFP 基因特异性地表达病毒转移基因^[22]。④联合治疗,虽然基因治疗有良好的应用前景,但目前研究发现基因治疗对肝癌的作用是有限的,因此可采用基因治疗与放疗、化疗等综合治疗方法^[23]。从理论上来说是治疗癌症的较好方法,但由于其是新生事物,有些问题仍在探索之中。相信随着分子生物学技术和肝癌病因、病理研究的发展,肝癌基因疗法最终将成为一种安全有效的临床治疗手段。

[参考文献]

- [1] Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8039 - 8043.
- [2] Lin CQ, Li B, Zhang C, et al. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma [J]. Ann Oncol, 2005, 16: 109 - 115.
- [3] Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF, et al. Positron emission graphy imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients [J]. Gastroenterology, 2005, 128: 1787 - 1795.
- [4] Zhang Y, Zhang Y, Chen J, et al. Polybutylcyanoacrylate

- nanoparticles as novel vectors in cancer gene therapy [J]. *Nanomedicine*, 2007, 3: 144 - 153.
- [5] Gerolami R, Cardoso J, Bralet MP, et al. Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene transfer to rat hepatocarcinomas by selective administration into the hepatic artery [J]. *Gene Ther*, 1998, 5: 896 - 904.
- [6] Wang XW, Yuan JH, Zhang RG, et al. Antihepatoma effect of alpha-fetoprotein antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides in vitro and in mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 345 - 351.
- [7] Sun Y, Lin R, Dai J, et al. Suppression of tumor growth using antisense oligonucleotide against survivin in an orthotopic transplant model of human hepatocellular carcinoma in nude mice[J]. *Oligonucleotides*, 2006, 16: 365 - 374.
- [8] Cao L, Si J, Wang W, et al. Intracellular localization and sustained prodrug cell killing activity of TAT-HSVTK fusion protein in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Cells*, 2006, 21: 104 - 111.
- [9] Harada Y, Iwai M, Tanaka S, et al. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7: 27 - 36.
- [10] Won YS, Lee SW. Targeted retardation of hepatocarcinoma cells by specific replacement of alpha-fetoprotein RNA [J]. *Biotechnol*, 2007, 129: 614 - 619.
- [11] Martinet O, Ernekova V, Qiao J Q, et al. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: longterm remission of liver metastases in a mouse model[J]. *Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 931 - 936.
- [12] Noboru H, Mitsuo S, Shinji O, et al. IL-12 gene therapy is an effective therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice[J]. *J Immunol*, 2004, 173: 6635 - 6644.
- [13] Chang CY, Lee J, Kim EY, et al. Intratumoral delivery of IL-18 naked DNA induces T-cell activation and Th1 response in a mouse hepatic cancer model[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 87.
- [14] Jicai Z, Zongtao Y, Jun L, et al. Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45: 530 - 536.
- [15] Zhang YJ, Rossner P Jr, Chen Y, et al. Aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119: 985 - 991.
- [16] Okimoto T, Yahata H, Ito H, et al. Safety and growth suppressive effect of intra-hepatic arterial injection of Adomv-P53 combined with CDDP to rat liver metastatic tumor[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003, 22: 399 - 406.
- [17] Huang JZ, Xia SS, Ye QF, et al. Effects of p16 gene on biological behaviours in hepatocellular carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 84 - 88.
- [18] Drozdzik M, Qian C, Xie X, et al. Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2000, 32: 279 - 286.
- [19] Gu S, Liu CJ, Qiao T, et al. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 535 - 539.
- [20] Azuma H, Tomita S, Kaneda Y, et al. Transfection of NK kappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of renal allografts[J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 415 - 425.
- [21] Miller DL, Don C, Song J. DNA transfer and cell killing in epidermoid cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies in vitro[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29: 601 - 607.
- [22] Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, et al. A novel tumor-specific replication restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 1721 - 1733.
- [23] Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J, et al. Gene therapy of liver cancer[J]. *Ann Hepatol*, 2007, 6: 5 - 14.

(收稿日期:2007-08-13)

作者: [曹海利](#), [孟巍](#), [白彬](#), [CAO Hai-li](#), [MENG Wei](#), [BAI Bin](#)
 作者单位: [哈尔滨医科大学附属第二医院介入放射科, 150086](#)
 刊名: [介入放射学杂志](#) **ISTIC PKU**
 英文刊名: [JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)
 年, 卷(期): 2008, 17(5)
 被引用次数: 2次

参考文献(23条)

1. [Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA](#) [Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy](#) 1991
2. [Lin CQ, Li B, Zhang C](#) [Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma](#) 2005
3. [Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF](#) [Positron emission graphy imaging of adcnoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients](#) 2005
4. [Zhang Y, Chen J, Chen J](#) [Polybutylcyanoacrylatenanoparticles as novel vectors in cancer gene therapy](#) 2007
5. [Gerolanfi R, Cardeso J, Bralet MP](#) [Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene transfer to rat hepatocarcinomas by selective administration into the hepatic artery](#) 1998
6. [Wang XW, Yuan JH, Zhang RG](#) [Antihepatoma effect of alpha-fetoprotein antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides in vitro and in mice](#)[期刊论文]-[World Journal of Gastroenterology](#) 2001
7. [Sun Y, Lin R, Dai J](#) [Suppression of tumor growth using antisense oligonucleotide against survivin in an orthotopic transplant model of human hepatocellular carcinoma in nude mice](#) 2006
8. [Cao L, Si J, Wang W](#) [Intracellular localization and sustained prodrug cell killing activity of TAT-HSVTK fusion protein in hepatocellular carcinoma cells](#) 2006
9. [Harada Y, Iwai M, Tanaka S](#) [Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer](#) 2000
10. [Won YS, Lee SW](#) [Targeted retardation of hepatocarcinoma cells by specific replacement of alpha-fetoprotein RNA](#) 2007
11. [Martinet O, Ermekova V, Qiao J Q](#) [Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model](#) 2000
12. [Noboru H, Mitsuo S, Shinji O](#) [IL-12 gene therapy is an effective therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice](#) 2004
13. [Chang CY, Lee J, Kim EY](#) [Intratumoral delivery of IL-18 naked DNA induces T-cell activation and Th1 response in a mouse hepatic cancer model](#) 2007
14. [Jicai Z, Zongtao Y, Jun L](#) [Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma](#) 2006
15. [Zhang YJ, Roasner P Jr, Chen Y](#) [Aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients](#) 2006
16. [Okimoto T, Yahata H, Itou H](#) [Safety and growth suppressive effect of intra-hepatic arterial](#)

[injection of Adorer-P53 combined with CDDP to rat liver metastatic tumor](#) 2003

17. [Huang JZ, Xia SS, Ye QF Effects of p16 gene on biological behaviours in hepatocellular carcinoma cells](#)[期刊论文]-[World Journal of Gastroenterology](#) 2003

18. [Drozdzik M, Qian C, Xie X Combined gent therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma](#) 2000

19. [Gu S, Liu CJ, Qiao T Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatecellular carcinoma cells](#)[期刊论文]-[World Journal of Gastroenterology](#) 2004(10)

20. [Azuma H, Tomita S, Kaneda Y Transfection of NK kappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of renal allografts](#) 2003

21. [Miller DL, Don C, Song J DNA transfer and cell killing in epidermoid cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies in vitro](#) 2003

22. [Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C A novel tumor-specific replication restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatoeellular carcinoma](#) 1999

23. [Heruandez-Alceceba R, Sangro B, Prieto J Gene therapy of liver cancer](#) 2007

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [黄建钊, 顾红光, 夏穗生 人类基因治疗的背景与肝癌基因治疗的研究概况](#) -[中国普外基础与临床杂志](#) 2003, 10(1)

目的 了解人类基因治疗的背景与肝癌基因治疗的研究概况。方法 采用文献复习的方法对人类基因治疗的临床研究历史与发展, 以及肝癌基因治疗方面的一些基础研究进展进行综述和分析。结果 基因治疗作为人类某些遗传疾病的替代治疗方法在临床研究中已取得了较好效果, 但在肿瘤的治疗研究中基本上还处于基础研究阶段。在肝癌的基因治疗研究中, 所有的病毒载体如逆转录病毒、腺病毒以及腺病毒的相关病毒各有优缺点, 逆转录病毒如能提高滴度, 应该更有前景; 所用目的基因TK及p53基因等已在体外及动物实验中取得了较好的效果, 但在治疗的特异性和安全性方面还存在较大的缺陷。结论 人类基因治疗的前景是乐观的, 肝癌的基因治疗研究也取得了一定成果, 但距临床应用还有一段距离。

2. 学位论文 [张艳 抑制肿瘤生长及调节免疫功能联合基因治疗小鼠肝癌的实验研究](#) 2006

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度高, 预后差。随着分子生物学的发展, 在肝癌的生物治疗中基因治疗已成为继手术、放疗、化疗后治疗肝癌最具潜力的方法之一。目前, 国内外学者对肝癌的基因治疗虽然开展了广泛探索, 但大多数仅局限于应用单基因进行治疗, 抑瘤效果不理想; 同时尚存在转基因载体毒性、基因治疗的靶向性或选择性作用等问题。为提高基因治疗的效果, 降低转基因载体引起的毒副作用, 本课题从抑制肿瘤生长及提高机体免疫两方面展开, 并使用高生物安全性转移载体, 探索了不同基因联合治疗肝癌的可能性, 通过阻断肿瘤细胞血供、诱导肿瘤细胞凋亡及调节机体免疫功能不同作用方式, 探讨更有效的基因联合治疗肝癌的模式。

肿瘤的生长维持及转移依赖于新生血管的形成, 血管内皮素(Endostatin)通过选择性抑制肿瘤血管内皮细胞增殖, 诱导其凋亡, 可直接抑制肿瘤新生血管生成, 减少血供, 进而抑制肿瘤生长, 但Endostatin并不能使肿瘤完全消退, 仅能让肿瘤消退至休眠期。在此条件下, 如再及时给予诱导肿瘤细胞凋亡的打击, 将会产生更好的效果。TNF相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)可以选择性的诱导肿瘤细胞凋亡, 同时也能诱导新生血管内皮细胞凋亡与Endostatin有很好的协同作用。基于以上分析, 本课题首次提出将Endostatin和TRAIL联合用于肝癌基因治疗的实验研究, 采用目前已被美国FDA批准的唯一可用于人体实验的安全、低毒、低免疫原性真核表达质粒pVAX1为载体, 构建表达人Endostatin和可溶性TRAIL(sTRAIL)的重组载体pVAX-sEN和pVAX-sT, 并用裸DNA直接瘤内注射的方法, 观察两者联合应用在肝癌裸鼠荷瘤模型上的抑瘤效果, 对肝癌的基因治疗进行探索。在抗肿瘤研究中, 抑制肿瘤生长与提高机体免疫力是必不可缺的两个方面, 如何提高机体主动抗肿瘤免疫能力是抗肿瘤研究中十分关键的问题。近年研究发现在免疫干预时IL-12可诱导明显的免疫偏离“效应”, 促进Th0向Th1的分化; 增强NK细胞和Tc细胞的细胞毒作用; 刺激活化的T细胞和NK细胞产生IFN- γ 。因此, IL-12的正调节效应在抗肿瘤免疫中发挥十分重要的作用。同时研究显示, IL-12在体内也具有抗血管形成作用, 可以抑制肿瘤的生长和转移。因此在研究了Endostatin和TRAIL联合基因治疗裸鼠荷瘤模型的基础上, 本课题进一步设计在BALB/c荷瘤鼠内研究pUMVC3-mIL12对荷瘤鼠的作用及pUMVC3-mIL12与pVAX-sEN、pVAX-sT联合应用的抑瘤作用。结果表明mIL-12与Endostatin/TRAIL联合基因治疗可以在肝癌治疗中取得很好的效果, 特别在肿瘤早期联合应用效果更好。

目的:

从阻断肿瘤细胞血供、诱导肿瘤细胞凋亡及调节机体免疫功能不同方面, 探索安全有效的联合基因治疗肝癌的方法, 为进一步临床应用研究奠定实验基础。

方法:

1. pVAX-sEN、pVAX-sT重组载体的构建、体外活性检测及pUMVC3-mIL12体外表达、生物活性的检测

2. 重组载体pVAX-sEN+pVAX-sT、pUMVC3-mIL12+pVAX-sEN及pUMVC3-mIL12+pVAX-sT体内作用研究

结果:

1. 重组载体pVAX-sEN、pVAX-sT、pUMVC3-mIL12体外作用研究

2. 重组载体pVAX-sEN+pVAX-sT、pUMVC3-mIL12+pVAX-sEN及pUMVC3-mIL12+pVAX-sT体内作用研究

结论:

1. 成功构建了表达分泌型人Endostatin、人sTRAIL基因的pVAX-sEN、pVAX-sT真核表达载体, 体外均能有效表达目的蛋白。

2. 本研究证实pVAX-sEN与pVAX-sT联合应用可通过协同抑制肿瘤新生血管形成、诱导肿瘤细胞凋亡, 有效抑制肝癌生长, 为两者联合进行肝癌基因治疗提供了实验依据。

3. pUMVC3-mIL12与pVAX-sEN/pVAX-sT联合应用有协同抑制肿瘤生长的作用, 其机制是pVAX-sEN/pVAX-sT诱导肿瘤细胞凋亡降低机体肿瘤负荷, pUMVC3-mIL12可更有效的调节机体抗肿瘤免疫反应。同时pUMVC3-mIL12与pVAX-sEN/pVAX-sT联合应用可更有效的协同抑制肿瘤新生血管生成、诱导肿

瘤细胞凋亡。pUMVC3-mIL12治疗肿瘤在肿瘤发生的早期效果更好。

4. 研究发现裸DNA瘤内注射可取得与脂质体体内转染相同的抑瘤效果，在基因治疗中裸DNA瘤内直接注射可作为一种简单有效的体内基因转染方法。

意义：

1. 本文系统的进行了肝癌基因治疗的研究，从阻断血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡及调节机体免疫功能的不同角度探讨了肝癌基因治疗的效果。
2. 本研究对联合基因治疗肝癌的协同作用、可行性及其机制进行了初步探讨，为进一步临床研究打下了基础。
3. 成功制备了可用于基因治疗的生物材料如pVAX-sEN、pVAX-sT等，为肝癌的基因治疗提供了有价值的实验依据。

3. 期刊论文 [徐鸿洁, 盖晓东, 魏大军, XU Hong-Jie, GAI Xiao-dong, WEI Da-jun 肝癌基因治疗机制研究 -北华大学](#)

[学报（自然科学版）2005, 6 \(2\)](#)

肝癌是由多基因突变引起的, 故用基因工程的手段进行肝癌的基因治疗是目前医学界研究的热点. 主要研究了肝癌基因治疗中的免疫基因治疗、抑癌基因治疗、自杀基因治疗、反义基因治疗、耐药基因治疗、联合基因治疗的机制.

4. 学位论文 [薛志刚 增强型肿瘤特异性人源载体的构建及其对肝癌基因治疗的研究 2006](#)

肝癌是最常见且死亡率较高的恶性肿瘤之一。肝癌临床上手术切除率低，对放、化疗敏感性差，转移情况普遍，预后极差，迫切需要新的治疗方法。近年来随着人们对肝癌分子病理机理研究的不断深入，为正在兴起的肝癌基因治疗提供了理论依据，促进了人们用分子手段治疗肝癌的探索性研究。

基因治疗面临的关键的问题就是基因导入系统即载体问题，理想的载体应具有安全性好、特异性强、转染率高和操作简便等特点。目前在肝癌的基因治疗实验中使用最多的是病毒载体系统，包括腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体、SV40病毒载体等；非病毒载体系统主要是脂质体、裸DNA。目前使用的载体各有其优缺点，尚无完美的理想载体，比较常用的病毒性基因治疗载体普遍存在遗传不稳定、容量小、安全性差及免疫原性等缺陷，而非病毒载体存在靶向性差等。夏家辉院士于1991年在进行新生儿染色体群体调查时发现一家系中2个携带双随体小染色体而表型正常的个体，创新性地提出小染色体可作为一种理想的基因治疗载体，并以此为基础，构建了人源基因载体-pHrneo，随后利用该人源基因载体将人凝血因子IX的cDNA导入D、G组染色体短臂靶位点，通过实验证明能有效、稳定表达人凝血因子IX。但该载体用于肿瘤的基因治疗，其体内转染效率低限制了其临床应用。

本研究是利用构建的人源基因载体作骨架进行肝癌的基因治疗，将具有肿瘤特异性启动活性元件和肿瘤自杀基因插入到人源基因载体内，转染肝癌病人的骨髓单核细胞，筛选得到的阳性细胞克隆经病人的肝门静脉注射，以期通过细胞融合，与体内肝细胞和肝癌细胞融合；如阳性的骨髓单核细胞克隆与体内正常肝细胞融合，肿瘤特异性启动元件在正常肝细胞不能启动下游肿瘤杀伤基因的表达，正常肝细胞不会受到损害；如阳性的骨髓单核细胞克隆与体内肝癌细胞融合，肿瘤特异性启动元件将启动下游肿瘤杀伤基因的表达，将肝癌细胞杀死，达到治疗肝癌的目的。

本研究中，构建具有肿瘤特异性的杀伤载体及检测此载体的作用效果。首先利用PCR扩增不同长度的具有肿瘤特异性启动活性的启动子—人端粒酶催化亚基hTERT启动子片段，与pEGFP-N1质粒连接构建hTERT-GFP载体，体外转染端粒酶阳性的肿瘤细胞和端粒酶阴性的人成纤维细胞，以期证明克隆的hTERT启动子具有肿瘤特异性；为了提高基因的表达，本研究中将SV40和(或)CMV增强子分别加入该启动子片段的前面，构建不同组合的质粒载体，通过pEGFP-N1、荧光素酶体系筛选在各种肿瘤细胞中明显提高外源基因表达的最优组合。同时将自杀基因CD、TK构建成融合基因，连至经优化的增强子、hTERT启动子下游，并一起连接至我室构建的人源基因载体形成肿瘤杀伤载体，体外转染肝癌细胞，经RT-PCR、HPLC、MTT检测CD / TK基因的表达和对肝癌细胞的杀伤效果。在动物实验方面采用先将肝癌细胞接种到裸鼠皮下致瘤，再用肿瘤杀伤载体与体内转染用脂质体混合直接瘤内注射观察瘤体的生长情况；另外先将肿瘤杀伤载体体外转染肝癌细胞，再把转染后的细胞接种到裸鼠皮下，观察瘤体的生长情况来检测我构建的肿瘤杀伤载体对肝癌的杀伤作用。

发现经PCR扩增的hTERT启动子片段(275bp)连至GFP载体后在肿瘤细胞中能特异性表达，而在人成纤维细胞中未见表达，但活性较弱；在肝癌细胞中发现CMV增强子能明显提高hTERT介导的GFP、荧光素酶基因表达；成功扩增了CD、TK基因并建成融合基因，构建了由CMV增强子、hTERT启动子介导、CD / TK融合基因、人源基因载体组成的肿瘤杀伤载体，体外转染肝癌细胞，经RT-PCR、HPLC证明CD / TK基因能在肝癌中表达，并能将前体药物5-Fc转化成毒性药物5-Fu；MTT证实肿瘤杀伤载体对肝癌细胞有明显毒性。动物实验结果发现肿瘤的大小在转染肿瘤杀伤载体的细胞组明显小于对照组，证明构建的肿瘤杀伤载体对肝癌细胞有较强的杀伤作用，为拟定的肝癌基因治疗设想提供了一个理想的载体。

5. 期刊论文 [张阳德, 孙颖 肝癌自杀基因治疗研究新进展 -中国现代医学杂志2003, 13 \(11\)](#)

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，恶性程度高，预后差。尽管其诊治水平不断提高，世界每年因肝癌致死的病人仍达百万人之多。传统的手术、放化疗等手段可一定程度改善早期病人的预后，但对转移、复发及中晚期患者却无能为力。随着分子生物学技术的不断进展。人们对肿瘤分子机制研究的不断深入，利用肿瘤与正常组织基因及调控区域的结构差异，从分子水平特异性杀伤肿瘤细胞的基因治疗成为肿瘤治疗中极具应用潜力的新策略。肝癌的发生并非某个基因的单独作用，而是一个多基因多阶段的复杂过程，因而不依赖于肿瘤细胞的遗传背景，直接向肿瘤细胞引入药物敏感基因而使前体药物对肿瘤细胞产生毒性作用的自杀基因治疗以其作用直接、合理、有效而备受关注，成为肝癌基因治疗的研究热点。本文就近年来自杀基因治疗肝癌的新进展作一简要综述。

6. 学位论文 [魏强 HIV Vpr蛋白应用于特异性肝癌基因治疗的研究 2004](#)

原发性肝癌(primarcarcinomaofliver)是指自肝细胞或胆管细胞发生的癌。原发性肝癌是世界上恶性程度极高，且预后极差的恶性肿瘤之一，每年全球约有25万人患病。在我国肝癌目前已处于恶性肿瘤死亡率的第二位，每年至少有10万名新发现病人，11万名肝癌病人死亡，占全球肝癌死亡数的45%。

尽管目前肝癌的治疗方法有许多种，但治疗效果都十分有限。大部分肝癌病人对化疗和放疗均不敏感，因此寻找新的有效的治疗方式一直是研究者追求的目标。随着分子生物学和免疫学理论及技术的不断发展和对肿瘤发病机制认识的不断深入，利用基因工程手段对肝癌进行基因治疗已取得了很大成功，日益受到研究者的重视。基因治疗及有可能成为一种新的治疗方式应用于肿瘤的治疗之中。

腺病毒载体因其具有安全性好、外源基因表达效率高、滴度高、既可感染分裂期细胞又可转染非分裂期细胞以及包装容量大等优点而成为当今使用最多的病毒载体之一。

HIVvpr基因是I型人类免疫缺陷病毒的非结构基因，编码一14Kda大小分子量的蛋白。研究表明，该蛋白是HIV重要的调控蛋白，Vpr蛋白不依赖于HIV其他蛋白的存在即可引起细胞的G2周期阻滞和诱导细胞凋亡，单独表达的Vpr蛋白也可引起细胞的G2周期阻滞和诱导细胞凋亡。文献报道Vpr蛋白可引起分裂细胞，包括肿瘤细胞发生凋亡。我们的前期工作表明，HIVVpr对HeLa细胞表现出明显的细胞周期阻滞作用。由此可见Vpr很有可能作为一种新的治疗性基因而应用于以抑制肿瘤生长为目的的基因治疗中。

目前在多数原发性肝细胞中有甲胎蛋白的表达，将外源治疗基因置于AFP特异性启动子增强子下游，通过肝癌中AFP的特异性反式作用于该启动子，以激活转录，可实现目的基因的选择性表达，从而可实现有效的靶向性治疗，目前AFP启动子介导的肝癌特异性基因治疗已成为肝癌特异性基因治疗领域的主要方面。

理想的基因治疗应具有目的基因高效性、靶向性转移和可控性表达的特点。鉴于以上认识，我们应用非复制型腺病毒载体制备了甲胎蛋白启动子控制下表达HIVvpr基因的重组腺病毒rvAdAFP-vpr，实现其对肝癌的特异性基因治疗作用，并对其生物学特征及其体外体内的治疗效果进行研究，得到如下实验结果：

1. 通过重组非复制型5型腺病毒pAdEasy系统，利用E.coliBJ5183的同源重组机制获得的甲胎蛋白启动子控制下表达HIVvpr基因重组非复制型腺病毒rvAdAFP-vpr，经PCR及Southernblot检测证实重组腺病毒基因组中整合有特异性的HIVvpr和AFP的上游调控序列。
2. 重组腺病毒rvAdAFP-Vpr感染两种肝癌细胞：AFP蛋白表达阳性的BEL-7402细胞和AFP蛋白表达阴性的SMC-7721细胞，实验结果表明：Vpr蛋白在AFP蛋白表达阳性的肝癌细胞BEL-7402细胞中特异性表达，并且可引起BEL-7402细胞的细胞周期G2阻滞，G2期细胞数目在病毒感染后的96小时达到最大值，表现出一定的时间依赖性。对于AFP蛋白表达阴性的SMC-7721细胞而言，却未能检测出Vpr蛋白的表达也未见细胞周期阻滞作用。
3. 通过荧光染色和和细胞线粒体膜电位改变等指标看到，重组腺病毒rvAdAFP-vpr可诱导肝癌细胞凋亡。流式细胞术检测各个与细胞凋亡有关的蛋白Bax、Caspase9、Caspase8、Capase3、细胞色素C表达情况。结果显示，Bax蛋白表达量明显升高，Caspase9、Capase3、细胞色素C等表达较对照都高；而caspase8蛋白表达未见明显变化。提示Vpr蛋白可能通过线粒体途径引起细胞凋亡。
4. 我们在裸鼠建立AFP蛋白表达阳性的人肝癌模型，并进行了1个月的分组治疗。免疫组化检测表明，rvAdAFP-vpr可在肝癌组织中有效表达Vpr蛋白。治疗效果表明，CPA治疗组、rvAdAFP-vpr治疗组和rvAdAFP-vpr联合CPA治疗组相对于空白对照组，都在不同程度上显著抑制肿瘤生长，特别是rvAdAFP-vpr联合CPA组抑制肿瘤增长的作用更为明显。CPA治疗组、rvAdAFP-vpr治疗组和rvAdAFP-vpr联合CPA治疗组的抑瘤率分别达到了41%、31%、

66.7%，表明单独注射rvAdAFP-vpr组的抑瘤效果要好于CPA治疗组，说明单独注射rvAdAFP-Vpr即可一定程度上起到抑制肿瘤生长的作用；另一方面，两者联合治疗组的抑瘤率显著高于rvAdAFP-vpr组和CPA组的单独治疗，提示两者具有协同作用。

5. 空白对照组和rvAd-null对照组的Ki-67指数明显高于CPA治疗组、rvAdAFP-vpr治疗组、rvAdAFP-vpr联合CPA治疗组。其中对照组和rvAd-null组的Ki-67指数对比于rvAdAFP-vpr联合CPA组具有统计学意义， $P<0.05$ 。表明Vpr蛋白细胞周期G2期阻滞的作用有效地减缓了细胞分裂增殖速度、抑制了肿瘤的快速增殖。CPA治疗组、rvAdAFP-vpr治疗组、rvAdAFP-vpr联合CPA治疗组的凋亡指数明显高于对照组和rvAd-null组，其中rvAdAFP-vpr联合CPA组与对照组对比具有统计学意义， $P<0.05$ 。体内实验结果表明Vpr蛋白可以引起肿瘤细胞的凋亡，特别是Vpr蛋白与CPA联合应用后，两者引起细胞凋亡的作用更为明显。

以上结果初步表明，重组腺病毒rvAdAFP-vpr有可能作为一种有效的抗肿瘤生物制剂，也可与传统的化学药物治疗结合，发挥其抗肿瘤协同作用，但其有效性、安全性和最佳的治疗方案还有待于进一步的实验和摸索。本研究内容未见报道，为新型肝癌治疗方法的研究打下了基础。

7. 期刊论文 蒋永芳,苏先狮 肝癌基因治疗现状与展望 -国外医学（流行病学传染病学分册）2002,29(3)

肝癌的治疗,由于现有的几种方法(包括化疗、放疗及手术等)疗效差,基因治疗被认为是其治疗的第五种模式.本文对肝癌基因治疗的几个方面:免疫基因治疗、反义基因治疗、抑癌基因治疗、自杀基因治疗、联合基因治疗、载体与存在的问题及展望进行了综述.

8. 学位论文 董雪松 针对肝癌缺氧微环境的基因治疗策略研究 2009

肝脏恶性肿瘤包括原发和转移癌是普外科治疗效果最差的癌症之一，也是我国高发疾病，发病率位居所有癌症的第二位，严重威胁我国人民的身体健康。肝癌早期诊断困难，手术切除率低，病人预后差。外科手术切除肿瘤是目前唯一确切的治疗手段，但只适用于不足15%的患者，而且复发率仍然很高，其中较早发生转移是其难以治愈的关键问题之一。放疗和化疗对肝癌不敏感。经动脉栓塞治疗能够暂时抑制肝癌生长，但患者可快速引起周围血管的继发生长。虽然肝移植在符合条件的肝癌患者治疗中取得了令人振奋的结果，但适应症狭窄、供肝的缺乏以及昂贵的后续治疗严重制约着肝移植在肝癌治疗中的应用。因此亟需寻找新的治疗方法来提高肝癌的治疗效果。

目的:探讨肝脏恶性肿瘤局部缺氧微环境的分子生物学特征，针对其缺氧微环境进行基因治疗的可行性研究，并进一步对实体肿瘤基因治疗策略进行探讨。

方法:在近交系BALB/c小鼠皮下接种H22小鼠肝癌细胞系，建立实体肿瘤的动物模型；克隆反义缺氧诱导因子-1 α 、VHL基因，装载于真核表达质粒pcDNA3；对肿瘤模型进行治疗，与空白载体注射对照组进行比较，在肿瘤大小、血管化程度、肿瘤生长相关基因检测等方面进行统计分析。

结果:在成功建立小鼠肝癌转移瘤模型、构建反义HIF1 α -pcDNA3及mVHL-pcDNA3载体的基础上，进行治疗研究。1、基因治疗抑制肿瘤生长:空载体组继发性肿瘤生长迅速，3周增加676mm³，相比之下VHL或反义HIF-1 α 组转移瘤体积仅增加356 mm³和274mm³，结合治疗甚至更为有效，在第21d时仅增加156mm³，分别比空白对照组小44%、55%和70%，联合治疗组宜比单独治疗效果更好，结果 $p<0.05$ 。2、基因治疗提高带瘤小鼠生存期:单独使用VHL或反义HIF-1 α 治疗组显著提高了小鼠的生存时间($P<0.05$)，治疗后中位生存时间由33d提高到59d或65d。而结合治疗组提高至89d($P<0.01$)，并显著比单独治疗组高($P<0.05$)，且有3只小鼠存活超过100d。3、基因治疗抑制肿瘤血管化:基因治疗后抗CD31单克隆抗体标记与最近血管距离显著提高，提示血管密度显著下降，VHL和反义HIF-1 α 单独治疗使肿瘤血管密度下降43%和41%，结合治疗效果更为明显，达到57%($P<0.01$)。4、基因治疗导致肿瘤凋亡:TUNEL法检测发现空载体组肿瘤有小量细胞凋亡，而VHL或反义HIF-1 α 组凋亡数超过2倍于对照组，结合组则超过达3倍以上。单一治疗组较对照组有显著差异($P<0.01$)，结合组治疗导致凋亡程度也比单一用VHL或反义HIF-1 α 治疗效果明显($P<0.05$)。

结论:1、针对缺氧诱导因子的基因治疗抑制小鼠肝癌转移瘤模型的生长，延长荷瘤小鼠生存期限。2、反义缺氧诱导因子1 α 和VHL基因治疗均能达到抑制肿瘤血管新生的效果，并能增加肿瘤细胞的凋亡。3、VHL基因对缺氧诱导因子的治疗效果有协同强化作用，作用机制可能除降解HIF外尚有其他途径。

9. 会议论文 杨守京,胡沛臻,刘雁萍,王小平,刘彦仿,王彩云,马福成 肝癌中的伴侣分子机制及其用于肝癌免疫基因治疗的基础研究 2002

原发性肝癌是我军常见的严重危害人类生命的恶性肿瘤之一，HSPs在肝癌发病机制中的作用和意义仍然不清.我们近年研究发现，在人肝细胞肝癌(HCC)组织中有多种热休克蛋白表达，其中HSP70的阳性表达与p53之间存在着密切关系,即p53核阳性者同时伴有HSP70核阳性.为此,为了进一步明确这种相关性的本质,进而深入探讨HSPs特别是HSP70在HCC中的作用机制,本研究采用原位分子杂交及免疫组化技术检测了原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)及其癌旁肝组织(percancerous tissue)中HSP70 mRNA及其表达产物的分布及其与p53的关系;同时结合乙型肝炎病毒感染情况,分析HSP70在人原发性肝细胞肝癌的表达是否与HBV感染有关,进一步从两例肝癌病例组织中提取了复合物进行了自身免疫实验,为基于HSP70及其复合物的抗肝癌主动性免疫研究打下实验基础。

10. 学位论文 杨永久 联合靶向基因抑制裸鼠人肝癌切除术后复发转移的实验研究 2008

研究背景:

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一，肝癌手术切除、肝移植、其它综合性治疗手段等虽有进展，仍不能有效提高肝癌病人的长期存活率。肝癌术后高复发转移率阻碍了临床疗效的进一步提高。如何降低肝癌术后的复发转移率成为本学科的研究重点。随着分子生物学技术的不断发展和人们对肿瘤发病机制认识的不断深入，联合基因治疗恶性肿瘤成为肿瘤基因治疗研究中的热点。它们可以从不同途径通过不同作用机制来治疗恶性肿瘤，最大限度地利用各个基因治疗的优点，以求优势互补提高治疗效果。血管生成抑制素和IL-24与肿瘤生长、转移具有密切的关系，它们通过不同的作用机制来影响肿瘤的发生和发展，是目前研究较多的肿瘤抑制基因。本实验建立了人原发性肝癌裸鼠肝脏原位移植瘤模型，行肝癌切除术，以模拟最大限度切除肿瘤原发灶，并采用重组腺相关病毒介导的靶向血管抑素基因和IL-24基因联合治疗，以探讨联合基因治疗对肿瘤复发转移的抑制作用及其相关机制。

目的：研究联合应用重组腺相关病毒介导的靶向血管抑素基因和IL-24基因对人肝癌裸鼠模型肿瘤切除术后复发转移的抑制作用，为肝癌术后复发转移的基因治疗提供新的途径和理论依据。

材料和方法：采用荧光素酶基因标记的人原发性肝癌细胞株MHCC97-H制备裸鼠人肝癌切除术后肿瘤复发转移模型。4只裸鼠用于观察基因转染情况；50只裸鼠随机分为对照组、空载体组、血管抑素组、IL-24组、联合基因组，各组于肝断面、腹膜后组织内分别注射等体积(100 μ l，含基因病毒载体1 \times 10¹²VP)的PBS、空载体、血管抑素基因、IL-24基因或联合血管抑素基因和IL-24基因。治疗后第21天、第28天，用活体生物发光成像法检测肿瘤复发转移的情况；术后第30天处死，取静脉血检测AFP浓度，计算肝、肺转移瘤的数目和体积，免疫组化化学法检测肿瘤标志物VEGF、Bcl-2蛋白表达和微血管密度(MVD)，RT-PCR法检测肿瘤标志物VEGF mRNA、Bcl-2 mRNA的表达，TUNEL法检测肿瘤细胞凋亡情况。

结果：1.活体生物发光成像法观察肿瘤复发转移情况：对照组和空载体组检测到较多的光子数，可见明显肿瘤复发转移；血管抑素组和IL-24组光子数明显少于对照组($P<0.05$)，不同程度的抑制了肿瘤复发转移；联合基因组的光子数显著少于单一基因治疗组($P<0.05$)，明显抑制了肿瘤复发转移。

2.组织病理学观察肝脏、肺脏的肿瘤复发转移情况：对照组和空载体组肝、肺内可见较多散在的转移瘤；血管抑素组和IL-24组肝、肺内转移瘤的数目、体积均明显低于对照肝、肺($P<0.05$)；联合基因组肝、肺内转移瘤的数目、体积较单一基因治疗组显著减少($P<0.05$)。

3.血清AFP浓度观察：对照组和空载体组AFP浓度显著高于正常范围；血管抑素组和IL-24组AFP浓度均明显低于对照组($P<0.05$)；联合基因组AFP浓度较单一基因治疗组显著降低($P<0.05$)。

4.肝脏转移微组织MVD检测：对照组和空载体组MVD值较高，转移瘤组织内可见较多微血管生成；血管抑素组和IL-24组微血管生成明显减少，其MVD值显著低于对照组($P<0.05$)；联合基因组可见较少的微血管生成，其MVD值显著低于单一基因治疗组($P<0.05$)。

5.肝脏转移瘤组织VEGF蛋白和VEGF mRNA表达：对照组和空载体组有较多VEGF蛋白和VEGF mRNA表达；血管抑素组和IL-24组的VEGF蛋白、VEGF mRNA表达明显少于对照组($P<0.05$)；联合基因组VEGF蛋白和VEGF mRNA的表达显著低于单一基因治疗组($P<0.05$)。

6.肝脏转移瘤细胞凋亡情况：对照组和空载体组肿瘤细胞凋亡少，凋亡指数较低；血管抑素组和IL-24组瘤细胞凋亡增多，凋亡指数明显高于对照组($P<0.05$)；联合基因组有较多的肿瘤细胞凋亡，凋亡指数显著高于单一基因治疗组($P<0.05$)。

7.肝脏转移瘤组织Bcl-2蛋白和Bcl-2 mRNA表达：对照组和空载体组有较多Bcl-2蛋白和Bcl-2 mRNA表达，血管抑素组仅轻度降低，三组无统计学差异；IL-24组Bcl-2蛋白、Bcl-2 mRNA的表达量明显少于对照组($P<0.05$)；联合基因组Bcl-2蛋白和Bcl-2 mRNA的表达量显著低于IL-24组($P<0.05$)。

结论：

1.重组腺相关病毒介导的靶向血管抑素基因和IL-24基因联合应用对抑制肝癌切除术后复发转移有协同效应，而且其效果优于单一基因治疗。

2.联合基因治疗在抑制肝癌组织新生血管生成、下调VEGF的表达方面有协同作用，其抑制肿瘤血管生成作用可能与调节VEGF表达有关。

3.联合基因治疗在诱导肝癌细胞凋亡、调节bcl-2表达方面有协同作用，其诱导肝癌细胞凋亡作用可能与调节Bcl-2表达有关。

4. 联合基因部分通过协同抑制肿瘤血管生成和诱导肿瘤细胞凋亡的作用来抑制肝癌切除术后复发转移。

引证文献(2条)

1. 王军, 刘德慧, 郑江涛, 曹广东 原发性肝癌临床治疗研究进展[期刊论文]-[中国老年学杂志](#) 2010(3)
2. 周钟萍, 何少健 肝癌基因治疗的进展[期刊论文]-[中国临床新医学](#) 2009(5)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200805021.aspx

授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: cd1a9f43-3920-4ead-b2d2-9df7017a84d5

下载时间: 2010年9月20日