

[文章编号] 1000-1182(2011)06-0610-04

# 腺病毒为载体的单纯疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦系统联合光动力治疗口腔恶性肿瘤的初步观察

陈世璋 张燕升 范忠 李维弟 郭莹 王潇 陈剑飞 李宁

(首都医科大学附属北京佑安医院 口腔科, 北京 100069)

**[摘要]** 目的 应用腺病毒为载体的单纯疱疹病毒胸苷激酶(ADV-TK)/更昔洛韦(GCV)系统联合光动力疗法对口腔恶性肿瘤复发患者进行治疗, 探讨此法治疗口腔恶性肿瘤的临床效果。方法 选取10名口腔不同部位的恶性肿瘤复发患者, 用光敏剂——血卟啉衍生物(HPD)静脉给药, 选择相应激光输出功率定时照射, 以ADV-TK基因行瘤体及周边注射, 经GCV静脉输入治疗后, 通过影像学及瘤体血流动力学分析进行临床疗效评估。结果 经联合治疗后, 患者肿瘤明显缩小(甚至完全消失), 瘤体内血流量降低, 影像结果对比改变明显, 治疗效果理想。结论 将ADV-TK/GCV系统联合光动力治疗口腔恶性肿瘤具有显著的抗肿瘤效应, 具备副作用轻微、临床安全性高的特点, 为系统性治疗相关肿瘤提供了一种安全可靠的治疗手段。

**[关键词]** 腺病毒为载体的单纯疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦系统; 光动力; 血卟啉衍生物; 恶性肿瘤

**[中图分类号]** R 782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.06.012

**The initial observation of adenovirus vector-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene/ganciclovir system and photodynamic therapy for oral malignant tumor treatments** Chen Shizhang, Zhang Yansheng, Fan Zhong, Li Weidi, Guo Ying, Wang Xiao, Chen Jianfei, Li Ning. (Dept. of Stomatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the method of adenovirus vector-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene(ADV-TK)/ganciclovir(GCV) system and photodynamic therapy(PDT) for treating the oral malignant tumor. **Methods** Ten patients who were suffering from oral malignant tumor of the different positions were selected, and injected with the hematoporphyrin derivative(HPD), irradiated by picking the corresponding laser frequency, and injected the ADV-TK gene into the tumor body and periphery. By the imaging and the hemodynamics analysis, the clinical efficacy after infusing vein with GCV was assessed. **Results** After the combination method treatments, patients' tumors appeared clear shrinkage or complete extinction. There was obvious fall of the blood flow volume in the tumor body. Imaging results showed significantly differences. So it was a perfect and effective treatment. **Conclusion** There are many advantages to apply the ADV-TK/GCV system and PDT treatment on the oral malignant tumor, minimal side effects and greater clinical security. It is a safe and credible therapy which can be offered for curing the oral malignant tumor systematically.

**[Key words]** adenovirus vector-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene/ganciclovir system; photodynamic therapy; hematoporphyrin derivative; malignant tumor

口腔恶性肿瘤的传统治疗方法是手术切除结合术后放、化疗, 此方法存在着创伤大、副作用明显、预后不良及肿瘤多次复发等问题, 而且治疗后导致的患者面部畸形、功能障碍、体质下降等严重影响患者术后的长期存活质量。随着基因领域研究的突破, 传统的肿瘤治疗体系不断更新, 原有治疗方法

也由保存功能性外科的新治疗理念所取代。光动力治疗和基因生物学靶向治疗等方法是近年来发展极为迅速的一种肿瘤治疗新技术, 且受到广泛重视。本研究选用以腺病毒为载体的单纯疱疹病毒胸苷激酶(adenovirus vector-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene, ADV-TK)/更昔洛韦(ganciclovir, GCV)系统联合光动力(photodynamic therapy, PDT)疗法对10例口腔不同部位的复发恶性肿瘤且不宜再次实施手术的患者进行治疗, 旨在应用基因治疗具有选择性杀灭肿瘤细胞的特性和光动力治疗具

[收稿日期] 2010-10-22; [修回日期] 2011-08-03

[作者简介] 陈世璋(1957—), 男, 北京人, 主任医师, 学士

[通讯作者] 李宁, Tel: 010-83997001

备微创治疗的特点,探讨此法对口腔恶性肿瘤的临床治疗效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

光敏剂——血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivative, HPD)(重庆药业), YH-630型半导体激光治疗机(安徽养和医疗器械设备有限公司), GCV(湖北科益药业股份有限公司)。选取激光光纤头端输出功率密度为 $500\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、能量密度为 $400\sim 450\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、照射直径为3 cm的柱状石英光导纤维。ADV-TK基因制剂由深圳市天达康基因工程有限公司提供。

### 1.2 病例的选择

选取10例口腔不同部位的复发恶性肿瘤,其中舌癌2例,颊癌6例,腺癌2例。年龄46~82岁,均为手术及放疗术后患者(附病例资料各1例)。

病例1 女,64岁,体重58 kg。患者1年前发现右侧颊侧有一肿物,半年前经病理诊断为“鳞癌”,遂行肿物切除术和颈淋巴清扫术,术后放疗3个月。2个月后肿瘤复发,转首都医科大学附属北京佑安医院就诊,查见:右侧颊部皮肤呈桔皮样,口内肿物 $4\text{ cm}\times 3\text{ cm}$ ,达磨牙后区,质韧,不活动,表面溃烂(图1)。超声及CT检查肿物报告:左腭见 $4\text{ cm}\times 3\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 实性肿物,病变呈浸润性生长,边缘欠清。彩色多普勒超声(color doppler flow imaging, CDFI)检查内部见血流信号,B超显示肿瘤内血运丰富(图2)。



图1 颊癌治疗前口内情况

Fig 1 The oral condition of the buccal cancer patient before treatment

病例2 男,82岁,体重64 kg。患者半年前右腭部溃烂,吞咽困难,后进食困难渐加重,体重下降明显。病理诊断为右腭腺癌(低分化)。查体:患者有冠心病史合并肺心病,右侧腭部见溃烂面,肿物侵袭过腭中线(图3)。超声及CT检查肿物报告:左腭见 $3\text{ cm}\times 5\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 实性肿物,病变呈浸润性生长,部分边缘欠清,内部以低回声为主,伴散在砂砾样强回声,颈部可见多个增大淋巴结,CDFI内部见血流

信号,B超显示肿瘤内血运丰富(图4)。



图2 治疗前B超显示肿瘤内血流信号图

Fig 2 The ultrasound picture of the blood flow signal before treatment



图3 腭癌治疗前口内情况

Fig 3 The oral condition of the palate cancer patient before treatment

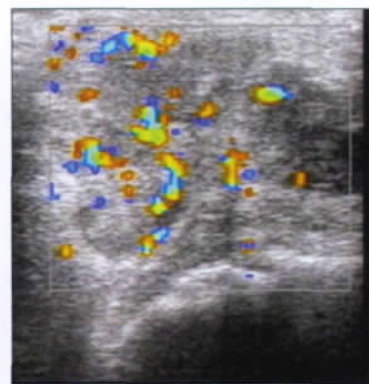


图4 治疗前B超显示肿瘤内血流信号图

Fig 4 The ultrasound picture of the blood flow signal before treatment

### 1.3 方法

1.3.1 血卟啉用法 以原液0.1 mL注射皮丘对患者进行药敏实验,观察15 min,如果皮肤发红的范围在直径2 cm以内则为阴性。先静脉滴入地塞米松5 mg 0.5 h后,以HPD按 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重计算药量加入生理盐水100 mL配置,静脉滴注,24~48 h后行光动力治疗。

1.3.2 光动力治疗 选取激光波长为630 nm,输出功率密度为 $500\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,能量密度为 $400\sim 450\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,

持续照射时间为30 min, 选取光照半径与肿瘤大小相适应的石英光纤。1%利多卡因行手术区浸润麻醉。应用一次性灭菌穿刺导管针(B型PTC针)18 G×150 mm, 插入瘤体后抽出针芯插入光纤达导针尖孔, 将导针部分退出, 使光纤照射工作区滞留在被照射的组织中(位置较深部位的肿瘤需在B超引导下进行穿刺定位操作, 咽旁等部位的肿瘤患者必要时做预防性气管切开术以保证安全性和准确性)。如瘤体较大, 可根据激光照射直径1 cm为标准确定穿刺位置及穿刺数目, 逐次选点照射使光照范围切实覆盖全部肿瘤)。结束前5 min, 边照射边将光纤及导针一同缓慢退出, 防止肿瘤细胞移植。

**1.3.3 基因治疗** 在光动力治疗结束时, 将ADV-TK基因按照每支制剂每毫升 $2 \times 10^8$ 病毒颗粒稀释于20~30 mL注射用生理盐水中, 行瘤体及肿瘤周边多点注射, 使基因试剂充分分布于瘤体内及其边缘界, 同时进行周围淋巴区域注射, 以阻断淋巴转移通路。

**1.3.4 GCV治疗** 基因注射36 h后, 每日给以GCV  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 静脉输入14 d。

光动力治疗后嘱患者注意避光3~4周, 防止由于光敏剂导致的皮肤副作用发生。应用该方法治疗的患者, 治疗前均了解本治疗程序和性质, 并在治疗知情同意书中签字。该综合治疗方法均经过伦理学论证。

## 2 结果

患者经ADV-TK/GCV联合光动力治疗48 h后, 术区反应明显, 出现水肿充血、肿物液化及坏死脱落等临床表现。1~2周反应消失, 4~6周后瘤体缩小, 3个月后复查瘤体均缩小85%以上或消失, 临床及组织修复症状明显改善(图5、6)。



图5 颊癌治疗后口内情况

Fig 5 The oral condition of the buccal cancer patient after treatment

CT及B超检查显示: 肿物较治疗前明显缩小, 回声增强, 可见片状强回声及小片状液性坏死区, 血流明显减少, 阻力指数(resistance index, RI)减低

(图7); 治疗后肿瘤区血流与正常侧血流情况基本相似。各患者随访30个月, 整体状况良好, 肿物均未复发。

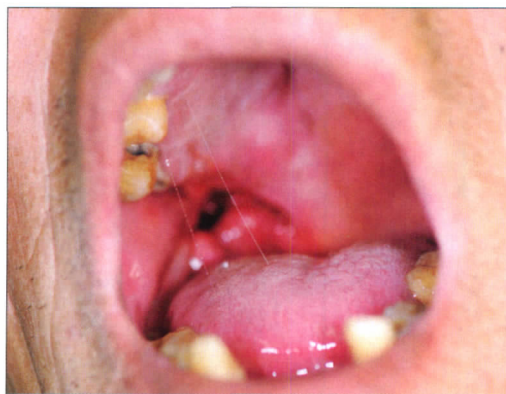


图6 腭癌治疗后口内情况

Fig 6 The oral condition of the palate cancer patient after treatment

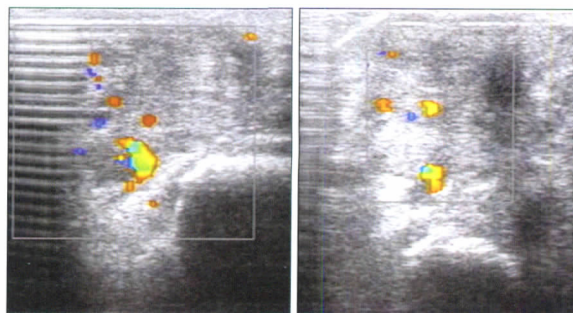


图7 颊癌(左)和腭癌(右)治疗后B超显示肿瘤内血流信号图

Fig 7 The ultrasound picture of the blood flow signal after buccal cancer(left) and palate cancer(right) treatment

## 3 讨论

大量研究认为, 口腔恶性肿瘤患者如果早期发现并接受手术切除及放射性辅助治疗, 治愈率也仅达到55%~65%, 这是由于传统治疗方法可因操作或杀灭不彻底造成肿瘤组织于术野播散、肿瘤局部种植和肿瘤残留而导致肿瘤复发<sup>[1]</sup>。因此, 尽管以手术为主的传统治疗对部分患者虽可以明显的延长生命, 但因其手术损伤大、可致功能障碍甚至毁容、术后易复发等严重影响生存质量的缺点令越来越多的患者及家属难以接受<sup>[2]</sup>。近年来, 由于肿瘤生物学和免疫学等的不断发展和取得的巨大成就, 综合治疗手段日益增多, 以尽量提高患者生存质量为目的——保存功能性外科的概念迅速为外科同人们所接纳和推崇。所以选择可靠的口腔癌系统性治疗法, 降低和避免肿瘤的复发, 减少组织和器官的损伤, 尽量保存患者的生理功能需求, 提高生存质量成为目前治疗工作的研究焦点。

基因及光动力治疗为近年来发展极为迅速的肿瘤治疗技术, 由于其不仅具备微创治疗特点, 可最大限度的保留患者正常组织器官, 达到提高受治者

生存质量的目的,特别是基因治疗有选择性杀灭肿瘤细胞的肿瘤生物学特性,杜绝肿瘤的复发,达到根治的目的,为保存功能性外科的理念成为事实创造了条件。

光动力疗法的基本原理:某些光敏剂能定向分布于或优先分布于新生物组织内<sup>[3]</sup>;这些光敏剂能被相应波长(能量)的光线激活,产生活性分子,如单态氧和游离根,这些分子对靶细胞和组织具有毒性作用,具备杀灭肿瘤细胞的同时对正常组织无损伤的特点<sup>[4]</sup>。现代意义的PDT系起于Lipson和Blades的研究,他们发现非纯质血卟啉能定位于肿瘤内,而纯体血卟啉则不具有此种特性。这一发现导致“合成”血卟啉衍生物,这是一种血卟啉经酸处理后产生的卟啉混合物,一般认为其活性成分是由卟啉寡分子和醚化化合物组成<sup>[5]</sup>。目前,PDT已广泛用于各个部位的肿瘤治疗,经临床治疗证实:该法针对某些应用传统疗法无效或不良反应大的肿瘤,其肿瘤的杀灭范围和控制率等不亚于传统疗法(如手术、放疗)的效果。研究证明:PDT方法对舌部、颊部、咽部以及骨性比较表浅且肿物大小为4 cm×4 cm的肿瘤进行治疗可取得极为理想的临床效果,特别针对于晚期且临床上不能再次承受手术及放、化疗的患者,此疗法具有安全、可靠的治疗效果<sup>[6]</sup>。虽然PDT治疗可选择性杀灭肿瘤,但其受到激光照射范围、投射角度、肿瘤实体或液体质地差异而引起的光散射强度衰减以及肿瘤形态质地对光吸收强弱等方面的限制,可能导致治疗后仍有部分的肿瘤细胞残存,这便为日后的肿瘤复发埋下了隐患。而肿瘤基因治疗则弥补了光动力治疗此方面的缺憾,提供了新的途径。

现今研究最广泛的外源基因是单纯疱疹病毒胸腺激酶(thymidine kinase, TK),全世界应用TK基因进行临床试验的记录已超过60个。它表达的酶将丙氧鸟昔转变为丙氧鸟普三磷酸,阻断肿瘤细胞DNA的合成。Sukin等<sup>[7]</sup>提出了采用TK基因治疗作为手术的辅助治疗方法,尽可能杀灭肿瘤细胞以达根治目的的观点。至此TK基因在肿瘤治疗中开始广泛应用,主要为单用、手术后的辅助治疗、联用放疗或化疗等。目前,ADV-TK基因是肿瘤基因治疗应用的主要方法之一,ADV-TK的作用机制主要体现为:1)直接抑制肿瘤生长。其编码特殊的酶将原先对哺乳动物细胞无毒性的前药GCV在肿瘤细胞中代谢为毒性产物,在转入肿瘤细胞后,ADV-TK基因在肿瘤细胞内表达产生的TK催化核苷类似物(常用的核苷类似物为无环鸟苷ACV及其衍生物GCV)形成单磷酸产物,并在细胞内磷酸激酶作用下形成三磷酸产物。GCV、ACV本无毒性,但其磷酸化产物却具有明显

的细胞毒性,不但能抑制细胞内DNA聚合酶的作用,从而抑制其DNA合成,还能够插入DNA链中引起碱基配对错误、DNA断裂、姐妹染色单体交换和致死性基因失稳定,而导致肿瘤细胞死亡。因GCV作为底物对经ADV-TK基因修饰的肿瘤细胞的抑制作用比ACV强10倍,所以GCV成为TK基因转染肿瘤细胞最常用的理想药物。目前的研究数据也表明:ADV-TK联用GCV对癌细胞的抑制显著高于单ADV-TK。2)旁观者效应(bystander effect, BSE)。指基因不仅能引起转染细胞的凋亡,还可以杀伤未导入基因的邻近细胞,尽管ADV-TK基因一次性注入的病毒颗粒量受到限制,但由于旁观者效应的存在,只要有30%~40%的细胞携带TK基因就能使肿瘤完全消退,从而克服了基因转导率低的缺点,增强了肿瘤杀伤作用,该作用机制已被广泛接受<sup>[8-9]</sup>。大量研究已证实:ADV-TK重组体具有明确的体外抗肿瘤活性,对14种肿瘤细胞的杀伤率达75%以上;同时由于其临床毒副作用轻、安全性高,故具有极大的临床应用价值<sup>[10]</sup>。

ADV-TK/GCV系统联合光动力治疗经过临床实施后,不仅在治疗肝癌方面取得了突破性进展<sup>[11]</sup>,而且在其他器官肿瘤的治疗实践中也显示出令人满意的疗效。应用ADV-TK/GCV系统联合光动力治疗方法对多种口腔恶性肿瘤进行临床试验性治疗,结果显示:此种治疗方法除具有显著的抗肿瘤效应外,还具备不良反应轻微、临床安全性高、应用方便,适用于各类不同身体状况患者等优势。认为该治疗系统应针对患者肿瘤的大小、位置以及综合患者全身的情况,应用PDT方法给予恰当而充分的照射、给肿瘤组织以最大的杀伤从而达到为基因治疗减负的目的后,再采用ADV-TK/GCV系统治疗,发挥该基因制剂对肿瘤细胞的杀灭具有相对选择性<sup>[12]</sup>的特点,通过对肿瘤细胞直接杀灭和旁观者效应,使注入的基因颗粒与残留的肿瘤细胞尽量完全转染,最终能够达到彻底消除复发灶、根治肿瘤的目的,从而为系统性治疗相关癌肿提供了一种安全可靠的治疗手段。依据口腔恶性肿瘤复发患者应用ADV-TK基因联合光动力治疗后1年半至3年的临床随访显示,1年半生存率为100%,2年半生存率为80%,3年生存率为50%。结果证实:本治疗方法对恶性肿瘤特别是肿瘤复发身体状况欠佳的患者是一种安全、有效的治疗手段,其不仅能尽量保存正常组织器官,还可大大提高患者生存质量。由于本研究存在观察时间短、病患标本量少等问题,对其远期疗效还有待于大量病例及长期研究进一步观察。

(下转第617页)

- An Weiwei, Wang Bangkang, Bai Yuxing. Clinical evaluation of the reproducibility of T-Scan II computerized occlusal analysis system[J]. Beijing J Stomatol, 2006, 14(2):112-115.
- [6] 王惠芸. 殆学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990:226-228.  
Wang Huiyun. Occlusion[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1990:226-228.
- [7] 张静露, 殷新民. 磨牙症患者殆接触特征的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2004, 20(3):319-322.  
Zhang Jinglu, Yin Xinmin. Characters of occlusal contact in patients with bruxism[J]. J Pract Stomatol, 2004, 20(3):319-322.
- [8] Olsson M, Lindqvist B. Occlusal interferences in orthodontic patients before and after treatment, and in subjects with minor orthodontic treatment need[J]. Eur J Orthod, 2002, 24(6):677-687.
- [9] Gazit E, Lieberman MA. The intercusp surface contact area registration: An additional tool for evaluation of normal occlusion[J]. Angle Orthod, 1973, 43(1):96-106.
- [10] Dinçer M, Meral O, Tümer N. The investigation of occlusal contacts during the retention period[J]. Angle Orthod, 2003, 73(6):640-646.
- [11] Williamson EH, Lundquist DO. Anterior guidance: Its effect on electromyographic activity of the temporal and masseter muscles [J]. J Prosthet Dent, 1983, 49(6):816-823.
- [12] Kerstein RB, Radke J. The effect of disclusion time reduction on maximal clench muscle activity levels[J]. Cranio, 2006, 24(3):156-165.
- [13] Ingervall B. Tooth contacts on the functional and nonfunctional side in children and young adults[J]. Arch Oral Biol, 1972, 17(1):191-200.
- [14] 徐樱华. 颞下颌关节紊乱与殆[J]. 华西口腔医学杂志, 1987, 5(3):214-216.  
Xu Yinghua. Temporomandibular disorders and occlusion[J]. West China J Stomatol, 1987, 5(3):214-216.
- [15] Kirveskari P, Jämsä T. Health risk from occlusal interferences in females[J]. Eur J Orthod, 2009, 31(5):490-495.
- [16] Razdolsky Y, Sadowsky C, BeGole EA. Occlusal contacts following orthodontic treatment: A follow-up study[J]. Angle Orthod, 1989, 59(3):181-185.
- [17] Morton S, Pancherz H. Changes in functional occlusion during the postorthodontic retention period: A prospective longitudinal clinical study[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2009, 135(3):310-315.
- [18] 贺淑珍, 厉松, 高晓辉, 等. 青少年错殆患者正畸治疗后动态殆接触特征变化初探[J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 45(9):556-559.  
He Shuzhen, Li Song, Gao Xiaohui, et al. A preliminary study on the occlusal contact changes during retention in adolescent patients[J]. Chin J Stomatol, 2010, 45(9):556-559.

(本文编辑 胡兴戎)

(上接第613页)

## 【参考文献】

- [1] Kurdow R, Boehle AS, Haye S, et al. Ganciclovir prodrug therapy is effective in a murine xenotransplant model of human lung cancer[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(3):905-910.
- [2] Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics 2003[J]. CA Cancer J Clin, 2003, 53(1):5-26.
- [3] Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, et al. Photodynamic therapy in oncology[J]. Expert Opin Pharmacother, 2001, 2(6):917-927.
- [4] McCaughan JS Jr. Photodynamic therapy: A review[J]. Drugs Aging, 1999, 15(1):49-68.
- [5] Bast RC, Bast RC Jr, Holland JF. Holland-frei cancer medicine[M]. 5th ed. London: B. C. Decker Inc., 2000:488-502.
- [6] 陈世璋, 曹经一. 激光定时照射后口腔及颈部肿瘤血流动力学及影像动态分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(5):923-925.  
Chen Shizhang, Cao Jingyi. Hemodynamic and imageological analysis of oral and maxillofacial tumor with photodynamic therapy[J]. J Clin Rehabilitative Tissue Engineering Res, 2007, 11(5):923-925.
- [7] Sukin SW, Chhikara M, Zhu X, et al. In vivo surgical resection plus adjuvant gene therapy in the treatment of mammary and prostate cancer[J]. Mol Ther, 2001, 3(4):500-506.
- [8] Aguilar LK, Teh BS, Vlachaki MT, et al. AdV-tk/Valacyclovir gene therapy in combination with radiotherapy for prostate cancer: Interim results of a phase I/II clinical trial[C]. Orlando: ASCO, 2002.
- [9] Hasenburger A, Fischer DC, Tong XW, et al. Histologic and immunohistochemical analysis of tissue response to adenovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene therapy of ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Cancer, 2002, 12(1):66-73.
- [10] 周剑峰, 陈刚, 卢运萍, 等. 重组腺病毒-胸苷激酶基因对多种肿瘤细胞的杀伤作用[J]. 癌症, 2003, 22(12):1264-1267.  
Zhou Jianfeng, Chen Gang, Lu Yunping, et al. Killing effect of adenovirus vector-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene recombinant construct on various cancer cells[J]. Chin J Cancer, 2003, 22(12):1264-1267.
- [11] Li N, Zhou J, Weng D, et al. Adjuvant adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase administration improves outcome of liver transplantation in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(19):5847-5854.
- [12] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy[J]. Oncologist, 2002, 7(1):46-59.

(本文编辑 胡兴戎)