

## • 综述 •

## p53 在肿瘤基因治疗中的应用进展

卢勤 滕皋军

p53 基因在机体组织细胞的生长发育分化等过程中起重作用。其主要生物学功能是维持细胞基因组的稳定, 负调节细胞生长, 诱导细胞凋亡。研究发现人类恶性肿瘤中至少有 50% 发生了 p53 基因改变, 因此以 p53 基因治疗肿瘤的研究发展非常迅速。最近, 有学者引入介入技术经肿瘤供血动脉直接灌注重组 p53, 为 p53 基因治疗肿瘤开辟了一条新途径。本文就肿瘤中 p53 基因突变情况以及 p53 用于基因治疗的研究进展予以综述。

## 一、p53 基因及其产物的结构和特性

人类 p53 基因位于 17 号染色体的短臂上 (17p13.1), 全长 16~20kb, 有 11 个外显子和 10 个内含子, 编码 393 个氨基酸。正常 p53 又称野生型 p53 基因, 具有维持基因组稳定, 抑制或阻止细胞转化的功能, 从而抑制肿瘤的发生。其编码的蛋白质是一种与细胞分裂周期相关的核磷酸蛋白质, 相对分子质量  $53 \times 10^3$ , 对细胞的分化和增殖有抑制作用, 在正常人类细胞中其半衰期短, 故含量相对低, 呈现低水平表达。若 p53 基因突变, 则失去正常功能, 并能抑制野生型 p53 基因的活性或使之失活, 引起细胞转化, 癌变。突变型 P53 蛋白质的特性也改变, 半衰期延长, 表达水平增高。

## 二、肿瘤细胞的 p53 基因突变

在人类肿瘤中, p53 改变是最普遍的遗传异常。约半数以上的人类肿瘤存在 p53 缺陷。已发现 p53 基因中有 5 个高度保守区, 其中 4 个位于外显子 5~8, 是突变热点, 它们分别是编码 132~143, 174~179, 236~248 和 272~281 号氨基酸, 约 86% 的 p53 基因突变是集中在这部分区域<sup>[1]</sup>。

p53 基因的改变已在多种人类恶性肿瘤中报道, 例如肺癌, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 结直肠癌, 乳腺癌, 卵巢癌等。基因改变的方式多样, 据统计其中 83% 为错义突变, 6% 无义突变, 10% 为缺失和插入, 合成畸变的和截短的蛋白, 或不能合成蛋白, 丧失原有生物功能<sup>[2]</sup>。有研究认为: 只有缺失两个野生型 p53 的等位基因(一个缺失, 另一个发生点突变), 才

能造成细胞的非控制性生长; 而杂合子状态(一个正常, 另一个失活), 可产生有生长优势的非致癌细胞, 从而形成癌前病变<sup>[3]</sup>。

对肺癌的研究发现肺癌中突变的 p53 起了关键作用<sup>[1,4]</sup>。而且各型肺癌中均存在 p53 突变, 约 52% 的非小细胞性肺癌和 80% 以上的小细胞性肺癌存在突变。但正常的肺组织中未发现 p53 突变。肝癌中超过 50% 者存在 p53 基因突变, 在 36% 的进展期肝癌中发现 p53 基因的突变和缺失, 而早期肝癌中未发现 p53 基因结构改变, 因而认为肝癌中 p53 基因突变与肝癌发展阶段具有相关性<sup>[5]</sup>。对卵巢癌中 p53 基因改变的研究统计在人类上皮性卵巢癌中, 约 50% 甚至更高的比例存在 p53 基因的突变和其突变蛋白产物的过度表达<sup>[6]</sup>。研究发现, 发生在 CpG 二核苷酸位置的转换, 在很多肿瘤中都常见<sup>[6,7]</sup>。

对肿瘤 p53 基因突变的研究加深了对 p53 生物学特性的了解, 也对各类肿瘤细胞特性有了进一步的认识, 为利用 p53 基因进行肿瘤基因治疗提供了基础。

## 三、p53 基因治疗肿瘤中基因转移的载体及其应用

由于人类恶性肿瘤中至少有 50% 发生有 p53 基因的变化, 那么, 以 p53 基因进行肿瘤基因治疗就自然成为研究的热点。大量的离体细胞培养实验及动物实验已证实野生型 p53 基因的表达可以通过诱导凋亡而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[8,9]</sup>。

以正常的野生型 p53 基因替换肿瘤细胞中突变的 p53 基因称野生型 p53 基因的替代疗法, 是 p53 基因治疗肿瘤中研究最多者。如何将目的基因导入机体细胞或肿瘤细胞, 并获得安全有效的表达是这类研究的重点。向细胞内导入外源性基因的方法大体可分为非病毒法和病毒法两种。重组病毒具有天然侵袭细胞和整合于宿主细胞的能力, 是具有潜力的 DNA 转导方法, 以病毒为载体转导 p53 基因的报道较多。国内外目前研究和应用最多的是腺病毒载体, 逆转录病毒载体也有很多, 还有极少是以腺相关病毒, 单纯疱疹病毒为载体的。非病毒载体, 脂质

体,主要是阳离子脂质体的应用现在正日趋为人们所重视,以下对常用的几种载体进行简要的介绍。

(一) 腺病毒载体 腺病毒的分子生物学研究比较深入,这是一种 DNA 双链无包膜病毒,基因组 DNA 约有 36kb,可编码 14 种蛋白。腺病毒载体的最大特点在于它是高效表达的基因转移载体。由于腺病毒感染宿主范围广,不仅可感染复制分裂的细胞,也可感染静止期细胞,提高了感染效率,拓宽了靶细胞的选择范围;腺病毒感染细胞时 DNA 不整合到宿主细胞染色体中,不存在激活致癌基因或插入突变等危险;容易制备,可获得高效价病毒载体;操作简单,重组病毒可通过静脉注射,喷雾,气管内滴注或制备成胶囊口服经肠道吸收等方法进入体内;性质稳定,对人类相对安全等。腺病毒载体的诸多优点,使其在体内转移抑癌基因的各种方案中具有较大优势,成为目前应用最为广泛的载体之一。但它也存在一些问题,如毒副作用,有些腺病毒会引起急性感染,宿主体内存在病毒基因会引起特异性免疫反应等;因为基因不整合,目的基因在游离状态下表达,则表达时间短,对肿瘤的治疗需重复进行<sup>[10, 11]</sup>。

构建一个含野生型 p53 基因的重组腺病毒载体的基本原理是<sup>[8, 12-15]</sup>:以具复制缺陷的腺病毒为载体,将含人野生型 p53 基因的质粒与之混合,经酶切,连接,转化等过程,形成 p53-腺病毒重组体,再感染细胞(现通常用 293 细胞——一种人胚肾细胞系)进行病毒繁殖,PCR 扩增,纯化,获得一定滴度的病毒重组体。国内外很多实验室都构建了很多不同类型的重组腺病毒载体,进行 p53 基因治疗的实验,如美国加州大学的 ACN53,美国 ONYX 药业公司的 E1B 缺陷腺病毒(d11520),中国尹氏复制缺陷 5 型腺病毒等。大量实验已证实了腺病毒载体的优越性,为以腺病毒为载体的 p53 基因治疗奠定了基础。

(二) 逆转录病毒载体 以逆转录病毒为基因转移载体的研究开展最早。它具有高效转移,基因能整合入靶细胞从而能实现长期稳定的表达<sup>[15]</sup>。Roth<sup>[16]</sup>等采用逆转录病毒载体,进行非小细胞性肺癌的基因治疗,发现可以抑制肿瘤生长。但逆转录病毒只能感染分裂复制的细胞,因而对高分化而不分裂的细胞就不能实施基因转移;逆转录病毒相对于腺病毒而言滴度较低。最令人担忧的是逆转录病毒载体在辅助细胞中有同源重组为野生型病毒的可能,而引起恶性转化。另外,逆转录病毒介导的基因

转移操作复杂,技术要求高。因此,其介导的基因治疗受到了一定的限制。

(三) 脂质体包埋法 近年来,以脂质体包埋法进行基因治疗的研究越来越多。因为该法安全,价格相对便宜,操作非常简便,直接注入进行基因转移,因而成为一种极具希望的临床应用技术。将 p53 基因以脂质体介导入人胃癌细胞株,观察到突变型 p53 基因细胞的生长明显减少<sup>[17]</sup>。有研究者对转移性乳腺癌动物模型以 p53-脂质复合物注入进行治疗,发现肿瘤缩小,且肿瘤转移受到限制,其改变具统计学意义<sup>[18]</sup>。韩国学者也用构建的 p53-脂质复合物进行离体实验和注入肾癌及各种消化系统肿瘤动物模型实验,证实了该方法的安全性,有效性,并认为脂质体是一种极有潜力的基因治疗载体<sup>[19]</sup>。

脂质体是一种人工合成的单层或多层磷脂双分子层组成的封闭环状囊状结构。其主要功能成分是阳离子脂质,可直接与 DNA 作用而将其包于中心水相空间形成复合物,运载 DNA。外层中性磷脂包于 DNA-脂质复合物外,形成微团。阳离子脂质的结构决定转染效率,外层中性磷脂起辅助作用。该 DNA-脂质复合物与组织培养细胞接触并融合时,可以有效的发生 DNA 摄取和表达。这类方法不象病毒载体可以获得高浓度的重组体,转染效率也没有病毒载体高,但它最突出的优点在于宿主体不会出现外源性病毒基因所致的特异性免疫反应,这在病毒载体是无法避免的,因此虽然基因导入后不整合,也是短期表达,但它仍在需较长期进行注射的多发或转移肿瘤灶治疗中显示了巨大优势。脂质体包埋法的基因治疗除了操作简便,价格便宜外,转染效率也较高,表达时间较腺病毒载体长,注入方式也多样,经静脉注入,经导管或肿瘤局部注入均可。当然,不会出现特异性免疫反应,并不是说不会发生毒副作用。有人进行动物实验认为肿瘤局部注入一定剂量的 DNA-脂质复合物会出现局部的炎性反应,静脉注射 DNA-脂质复合物会出现肝功能的一过性改变。类似的反应在其它载体进行治疗时也同样会出现<sup>[20-23]</sup>。

有许多分子生物学公司均生产不同的产品用于阳离子脂质体介导的转染。最常用的阳离子脂质体是由阳离子脂质 DOTMA(2, 3 二油酰氧丙基-1-溴化三甲铵,产品名 Lipofectin)与中性磷脂 DOPE(二油酰磷脂酰乙醇胺)按 1:1 比例混合而成。新型阳离子脂质体不断出现,旨在提高转染效率,如 DC-

Chol/DOPE 和 DMRIE/DOPE 等。

#### 四、p53 基因治疗肿瘤的研究现状

对于肿瘤的基因治疗,有多种方案。最常用的以 IL-2、TNF 以及粒细胞集落刺激因子等细胞因子基因进行体外导入癌细胞的方法。但动物实验中这类疗法对肺癌和消化系统肿瘤等常见肿瘤效果并不好<sup>[3]</sup>。有人认为可能与肿瘤分子生物学特征有关。于是,各国研究者采用表达野生型 p53 基因的替代疗法,研究对象为具有 p53 基因异常的肺癌、肝癌、结肠癌等。治疗效果以肿瘤标记,CT、MRI 等影像诊断,或以尸体解剖直接观察作为指标进行判定。并取活体组织肿瘤细胞,进行 PCR 法观察 p53 基因表达状况。

在离体实验中,将含 p53 基因的载体溶液与肿瘤细胞共同生长,可以观察到癌细胞生长受到抑制,出现凋亡。在动物实验经血液或肿瘤局部注射含 p53 基因重组体溶液,可见肿瘤不同程度部分缩小。美国 Anderson 肿瘤研究中心的 Roth 等将重组病毒经支气管镜或在电视透视或 CT 导向下经皮直接注射至 9 例肺癌病人的瘤灶中,3 例瘤体明显缩小,3 例瘤体停止生长,这一结果肯定了 p53 基因治疗的临床价值和疗效<sup>[16]</sup>。

随着介入放射学的纵深发展,经介入放射方法进行基因治疗令人关注<sup>[19]</sup>。从介入放射学角度,可以经皮穿刺直接将治疗基因注入瘤体,也可经肿瘤供血动脉行导管引入,还可同时进行肿瘤血管的栓塞或灌注化疗,或制备带治疗基因的栓子,加强治疗效果。最近韩国研究者进行不同肿瘤多种治疗基因引入方法实验比较认为,经肿瘤供血动脉注入及经静脉同样为安全有效的方法,并且经肿瘤供血动脉注入毒副作用小,对肝癌、肺癌等更为有效。对肝癌合并使用化疗药物,同样获得较好效果。另有研究发现,正常 p53 基因导入,还可诱导癌细胞对抗癌药物的感受性,加快肿瘤细胞的凋亡。

用 p53 基因进行肿瘤的基因治疗已从离体细胞实验过渡到动物模型基因治疗,甚至已有进入临床实验观察阶段。随着分子生物学的不断进展,新型的基因治疗方法不断出现。反义 RNA 的发现使阻断突变型 p53 基因的疗法成为可能,以突变 P53 蛋白为疫苗进行肿瘤免疫治疗更拓宽了 p53 基因治疗的思路<sup>[17]</sup>,而以介入的方法进行基因治疗又提供了更为安全有效的新途径。各类研究成果喜人,p53 基因治疗将会成为肿瘤辅助治疗一个十分重要的方面。

#### 参 考 文 献

1. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. Journal of the National Cancer Institute, 1996, 88: 1442-1450.
2. 陈汉源. P53 蛋白结构和生物功能. 国外医学遗传学分册, 1995, 18: 239-243.
3. Nielsen LL, Maneval DC. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. Cancer Gene Therapy, 1998, 552-63.
4. 张骏, 郑杰, 方伟岗, 等. 肺癌 p53 蛋白表达和基因突变与临床病理的相关研究. 中华病理学杂志, 1998, 27: 286-289.
5. Kahlenberg MS, Stoler DL, Basik M, et al. p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. Journal of the National Cancer Institute, 1996, 88: 1665-1669.
6. 姚桂梅, 康志海. p53 肿瘤抑制基因与卵巢癌. 国外医学遗传学分册, 1995, 18: 152-155.
7. Schwartz DA, Quinn TJ, Thome PS, et al. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. J Clin Invest, 1997, 100: 68-73.
8. 郭洪涛, 刘彤华, 高洁. 重组腺病毒介导的野生型 p53 对人胰腺癌细胞凋亡的诱导作用. 中华病理学杂志, 1998, 27: 194-197.
9. 滕理送, 郑树, 曹江, 等. 野生型 p53 基因对人肠癌细胞株的抑瘤效应. 中华实验外科杂志, 1997, 14: 146-147.
10. Horn NA, Meek JA, Budahazi G, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. Human Gene Therapy, 1995, 6: 565-573.
11. Parker SE, Lee Vahlsing H, Serfilippi LM, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: safety evaluation in rodents and nonhuman primates. Human Gene Therapy, 1995, 6: 575-590.
12. 尹新华, 李耀平, 周令望, 等. 携带野生型 p53 基因的重组腺病毒载体的构建. 哈尔滨医科大学学报, 1997, 31: 441-443.
13. Waddill W, Wright W, Unger E, et al. Human gene therapy for melanoma: CT-guided interstitial injection. AJR, 1997, 169: 63-67.
14. Clayman GL, et Naggar AK, Lippman SM, et al. Adenovirus mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. Journal of Clinical Oncology, 1998, 16: 2221-2232.
15. Bookstein R, Demers W, Gregory R, et al. p53 gene therapy in vivo of hepatocellular and liver metastatic colorectal Cancer. Seminars in Oncology, 1996, 23: 66-77.
16. Roth JA, Nguyen DD, Lawrence BL, et al. Retrovirus mediated wild type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. Nature Medicine, 1996, 2: 985-991.
17. 王琪, 张伟. p53 基因治疗的研究进展. 国外医学耳鼻喉科学分册, 1997, 21: 160-161.
18. Lesoor Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, et al. Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. Hum Gene Ther 1995, 6: 395-405.
19. Moon WC. Clinical study on intraarterial p53 gene therapy for liver cancer. Chung Ang University, Seoul. Korea. 1999.
20. Zou Y, Zong G, Ling YH, et al. Effective treatment of early endo-

bronchial cancer with regional administration of liposome p53 complexes. Journal of the National Cancer Institute. 1998, 90: 1130-1137.

21. Alton EFWF, Middleton PG, Caplen NJ, et al. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. Nature Genetics. 1993, 5: 135-142.

22. Liu Y, Liggitt D, Zhong W, et al. Cationic Liposome-mediated Intravenous Gene Delivery. The Journal of Biological Chemistry. 1995, 270(42): 24864-24870.

23. Zhu N, Liggitt D, Liu Y, et al. Systemic Gene Expression After Intravenous DNA Delivery into Adult Mice. Science. 1993, 261: 209-211.

(收稿: 1999-11-12)

• 病例报道 •

血管内栓塞治疗外伤性颈内动脉海绵窦瘘二例

王德仁 马如钧 马积斌 徐建杰

搏动性突眼是颈内动脉海绵窦瘘的常见症状,但多发生在同侧,病情加剧后方累及对侧,引起双侧搏动性突眼。而我院自 1994 年来收治 2 例外伤性颈内动脉海绵窦瘘,表现为对侧搏动性突眼,经血管内球囊栓塞而治愈。报告如下。

例 1,男,30 岁。因车祸右额部着力,当即昏迷。即送某医院,2 小时后清醒,头痛,右眼失明,CT 示:“右额骨折累及右眶壁及右视神经管,右额脑挫裂伤”。经抗生素及脱水等治疗 15 天后左眼突出,球结膜水肿伴头痛于伤后 1 个月转入本院。检查:体温正常,神志清。左眼球突出约 1.0cm,球结膜高度水肿突出眼裂,左眼不能闭合,视力 0.6,视野无缺损,对光反射存在。右眼睑下垂,瞳孔对光反射消失,无光感,眼底视乳头苍白,眼球活动除外展外余均受限。余神经系无异常。双侧颞部均可闻及吹风样杂音,以右侧为明显。次日进行头颅 CT 检查,见脑室系统均扩大,诊断为①外伤性颈内动脉海绵窦瘘,②脑积水。第 3 天行脑室腹腔分流术,术后头痛及躁动症状消失。但眼部症状同前。考虑到患者虽然左眼搏动性突眼,但右侧额骨骨折,且右侧颞部血管杂音较左侧明显,压迫右颈动脉后杂音消失。故认为右侧颈内动脉海绵窦瘘可能性较大。于 5 天后行 DSA、经股动脉穿刺右侧颈内动脉海绵窦瘘可脱性球囊栓塞术。脑血管造影清楚显示在动脉早期右颈内动脉显影同时,海绵窦亦显影,瘘口位于颈内动脉虹吸部 C4 段,并经海绵间窦使对侧海绵窦显影,而右侧大脑前、大脑中动脉显影浅淡。遂行可脱性球囊栓塞术。因瘘口小球囊不易进入海绵窦,故在瘘口远侧

及近侧之颈内动脉各置一 3 号乳胶球囊,注入泛影葡胺充盈后,连续性血管杂音消失,血管造影见右颈内动脉海绵窦段以上不显影,未进入海绵窦,20 分钟后无不良反应,解脱球囊。术后 1 周左眼突出及结膜水肿均明显好转,消失。视力恢复至 0.8,右眼无变化。随访 2 年未见瘘口再通,能正常工作及生活。

例 2,男,25 岁。因车祸头部外伤后昏迷 2 小时入本院,CT 示:右额颞粉碎性骨折,脑挫裂伤及硬膜下血肿,立即开颅清除血肿及去骨瓣减压术。术后 3 天清醒。右眼失明,瞳孔对光反应消失。1 周后发现左侧眼球搏动性突出,球结膜充血水肿,双额颞部和眼眶附近可听到血管杂音,与颈内动脉搏动一致,压迫左颈内动脉仍存在,而压迫右侧颈内动脉杂音消失。即考虑有右侧颈内动脉海绵窦瘘之可能。于 2 天后行 DSA 经股动脉穿刺右侧颈内动脉海绵窦瘘可脱性球囊栓塞术。脑血管造影“见右侧虹吸部海绵窦区有团状病理充填影,并经海绵间窦使左侧海绵窦显影,右侧大脑前动脉及大脑中动脉显影变细,证实诊断后,用长导丝交换 8F 导引导管,在电视监视下将导管头端送至患侧颈内动脉平第二颈椎水平处,连接 Y 型接头,将装置好球囊的微导管缓慢推送,在血流冲击下进入瘘口,并注入 Omnipaque 使球囊充盈。然后,经导引导管注入造影剂,证实颈内动脉通畅,同样方法又置入 2 个球囊后瘘口完全闭塞。血管杂音随即消失,观察 15 分钟后无不良反应,10 天后左眼球突出及结膜水肿消失。视力 0.8,右眼仍失明。

(收稿: 1999-11-10)

作者单位: 200052 (上海)解放军第八五医院