文章编号:1000-5404(2006)02-0121-04

论著

重组腺病毒介导的 p53 基因对肝癌细胞生长抑制作用的研究

张沁宏[1],王　东[1,2],牟江洪[1],李增鹏[1],卿　毅[2],杨宇馨[2]　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]病理科,[2]肿瘤中心,重庆 400042)

提　要: 目的　探索 p53 基因在肝癌基因治疗方面的可行性。**方法**　以人肝癌细胞系 SMCC-7721 为实验对象,将载有人野生型 p53 cDNA 的重组腺病毒(Ad-p53)感染 SMCC-7721 细胞及肿瘤组织,体外体内实验观察 Ad-p53 对 SMCC-7721 细胞生长的影响。**结果**　Ad-p53 对 SMMC-7721 细胞的抑制作用与感染浓度有关,MOI 值越高,抑制作用越强。当 Ad-p53 在 100 MOI 效靶比时, SMCC-7721 细胞基本达到完全抑制。感染 2 d 后 P53 蛋白表达达到高峰,SMCC-7721 生长受到明显的抑制。瘤内注射 Ad-p53 后, 荷瘤裸鼠的肿瘤体积明显减小。**结论**　Ad-p53 转导野生型 p53 基因可能是一种有效的肝癌基因治疗途径。

关键词: 肝癌;腺病毒;p53;基因治疗
中图法分类号: R394-33;R73.23;R735.7　　**文献标识码**: A

Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human hepatocellular carcinoma

ZHANG Qin-hong[1], WANG Dong[1,2], MOU Jiang-hong[1], LI Zeng-peng[1], QING Yi[2], YANG Yu-xin[2] ([1]Department of Pathology, [2]Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective**　To explore the potential use of adenovirus-mediated p53 gene (Ad-p53) therapy for hepatocellular carcinoma. **Methods**　A human hepatocellular carcinoma cell line SMCC-7721 was used. Recombinant adenovirus carrying wild-type p53 gene was transfected into SMCC-7721 cells *in vitro* and injected into tumor nodules *in vivo*. P53 protein expression was detected by immunohistochemistry. The growth of SMCC-7721 cells *in vitro* and established hepatocellular carcinoma nodules in nude mice was examined. **Results**　The transduction efficiency of SMCC-7721 cell line was 100% at ≥100 MOI. The P53 protein expression peaked on day 2 after infection and lasted for 5 d. Cell growth was greatly suppressed. *In vivo* studies, Ad-p53 transfer inhibited tumor growth of SMCC-7721 cells in nude mice. Intratumoral injection of Ad-p53 significantly inhibited hepatocellular carcinoma-implanted xenograft. **Conclusion**　Transfection of wild-type p53 gene *via* Ad-p53 is a potential approach to the therapy of hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma;adenovirus;p53;gene therapy

原发肝细胞性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,因其恶性程度高、预后差,目前临床采用的多种传统治疗手段都不能收到满意的效果。随着分子生物学、免疫学理论和基因转移技术的发展,以及对肿瘤发病机制的深入认识,基因治疗给肝癌的临床治疗开辟了一条新的途径。抑癌基因 p53 成为肿瘤基因治疗的研究热点,已有大量实验初步证明了野生型 p53 基因在某些肿瘤治疗方面的潜力[1,2]。在肝癌研究方面,也有研究者已经发现以受体介导基因转移系统介导野生型 p53 转染肝癌细胞株,可导致细胞株转基因表达,生长抑制和凋亡[3]。

本研究应用重组腺病毒介导的 p53 基因(adenovirus-mediated p53 gene, Ad-p53)感染肝癌细胞系 SMCC-7721,观察野生型 p53 基因对肝癌细胞在体外和体内生长的影响,探讨野生型 p53 基因对肝癌的治疗作用。

1　材料与方法

1.1　材料

重组腺病毒介导 p53 基因(Ad-p53)及对照病毒 Ad-LacZ(由深圳市赛百诺基因技术有限公司提供),Ad-p53 病毒滴度为 3.0×10^{12} pfu/ml, Ad-LacZ 病毒滴度为 2.0×10^{11} pfu/ml;人肝癌细胞株 SMMC-7721(内源性表达野生型 p53)由本中心实验室冻存,细胞在 DMEM-10 培养基传代培养。

作者简介:张沁宏(1975-),男,四川省新津县人,硕士研究生,医师,主要从事肝癌病理基础方面的研究。电话:(023)68757374
通讯作者:王　东,电话:(023)68757706,E-mail:Dongwang64@hotmail.com
收稿日期:2005-07-21;修回日期:2005-11-04

1.2 实验动物

BALB/c 裸鼠，共 18 只，雌性，4 周龄，体质量 14～18 g，饲养于无菌塑料透明隔离器内，动物实验时严格无菌操作。裸鼠购于并寄养于本院野战外科研究所动物室。

1.3 MTT 法检测病毒感染滴度与细胞存活的关系

在 24 孔培养板内等量培养 SMMC-7721 到 80% 汇合，细胞计数，吸出培养液，Ad-p53 以 5、25、50、75、100、125 效靶比（multiplicity of infection，MOI）感染单层细胞，并与非感染细胞为对照，每一 MOI 值重复 4 孔。37 ℃，5% CO_2 孵育 2 h 后弃去病毒感染液，换新鲜培养液。72 h 后每孔加入 0.5% MTT 20 μl，孵育 4 h 后 DMSO 终止反应，酶标仪测定光吸收度。

1.4 台盼蓝染色绘制细胞生长曲线

在 24 孔培养板内等量 SMMC-7721 培养到 80% 汇合，细胞计数，吸出培养液，以 100 MOI 值的 Ad-p53 和空载体腺病毒 Ad-LacZ 感染 SMMC-7721 细胞，设空白对照。每天计数 1 次，每次每组计数 4 孔，到感染后第 5 天为止，绘制生长曲线。细胞计数用台盼蓝 + 冰醋酸活细胞计数法。

1.5 免疫组化法检测 P53 蛋白表达

以 12 孔培养板培养 SMMC-7721 细胞，80% 汇合时取 100 MOI 值的 Ad-p53 感染。培养 90 min 后，吸出病毒液继续培养。感染后每 24 小时采用免疫组织化学法检测 1 次 P53 蛋白表达。方法如下：细胞离心涂片，100% 乙醇固定；1% H_2O_2 室温孵育，正常羊血清封闭；加鼠抗人 p53 单克隆抗体 Do-7（Dako 公司），工作浓度 1∶100，4 ℃过夜；滴加 1∶300 生物素标记羊抗鼠 IgG，37 ℃孵育 30 min；滴加 1∶300 辣根酶标记的链霉卵白素，37 ℃孵育 30 min，复染，脱水，封片。

1.6 裸鼠人肝癌模型的建立

SMMC-7721 细胞在 37 ℃，5% CO_2，含 10% 小牛血清的 DMEM-10 的培养基中培养，将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化，用无菌 PBS 液重悬制成 2.5×10^7/ml 的单细胞悬液，每只裸小鼠于右侧腋下皮下接种 0.2 ml（5×10^6）细胞悬液，每天观察各注射点有无红肿破溃。

1.7 Ad-p53 对裸鼠荷瘤的生长抑制作用

接种 6 d 后，将荷瘤裸鼠随机分为 3 组，于肿瘤小结节（或肿瘤接种部位）内分别注射 0.1 ml 的 PBS 液或含有 5×10^8 pfu 的 Ad-LacZ、Ad- p53 的 PBS。每隔 2 d 注射 1 次，共注射 6 次，每次注射前测量肿瘤体积。最后 1 次注射 2 d 后处死裸鼠，测量肿瘤最终体积，计算抑瘤率，抑瘤率 =（对照组相对体积 - 实验组相对体积）/对照组相对体积 ×100%。取瘤组织用 Western blot 方法检测各组 P53 蛋白表达情况。

1.8 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 病毒感染滴度与细胞存活的关系

与空白对照相比，Ad-p53 对 SMMC-7721 细胞有明显抑制作用，随着 MOI 的增加，外源性 WT-p53 对细胞的抑制作用逐渐增强。当病毒量为 100 MOI 时，SMCC-7721 细胞基本达到完全抑制（图 1）。

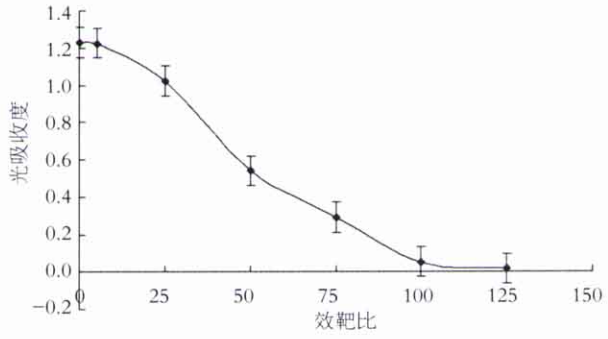


图 1 MTT 法显示 Ad-p53 对 SMCC-7721 细胞的生长抑制

2.2 Ad-p53 对肝癌细胞生长抑制的检测

100 MOI 值的空载体腺病毒 Ad-LacZ 对 SMMC-7721 细胞的生长影响与对照（正常生长细胞）相比没有差别，而以 100 MOI 值的 Ad-p53 感染 SMCC-7721 细胞能对细胞生长产生明显抑制（$P<0.01$，图 2）。这一结果表明，对肿瘤细胞的抑制作用来自转导的野生型 p53 cDNA，而不是缺陷腺病毒载体本身。

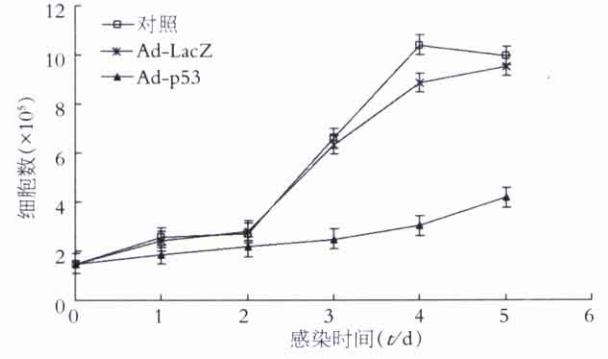


图 2 100 MOI 值感染 SMCC-7721 细胞的生长曲线

2.3 外源 p53 基因表达

免疫组织化学法检测显示，以 100 MOI 的 Ad-p53 感染 SMCC-7721 细胞后 24 h，P53 蛋白在核内已见表达，48 h 可见强阳性表达（图 3），到第 5 天则已为弱阳性表达，第 6 天接近对照组，对照细胞未见表达。

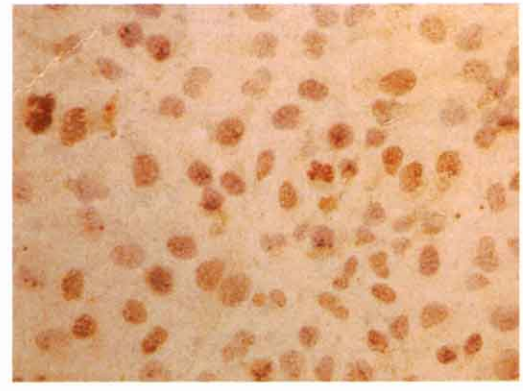


图 3 SMCC-7721 细胞转染 Ad-p53 48 h 后 P53 蛋白强表达（S-P ×400）

2.4　裸鼠人肝癌模型的建立

所有 18 只裸鼠在实验过程中均成活，各个细胞悬液接种点未见红肿破溃及出血表现。在细胞悬液接种的第 6 天，各个接种点均可见实体肿瘤结节，直径 0.4 ~ 0.6 cm。肿瘤组织从裸鼠上剥离下来进行肉眼观察，呈结节状，灰白色，质地偏硬，表面有假包膜，容易和周围组织剥离，用药组肿瘤切面可见局部出现明显的坏死灶，对照组则少见坏死灶。

2.5　Ad-p53 对裸鼠荷瘤生长的抑制作用

裸鼠荷瘤瘤体内注射 PBS 和 Ad-LacZ 后，体积仍持续增大；相反，注射 Ad-p53 后肿瘤的生长即受到十分明显的抑制（图 4，5）。当实验结束时，与 PBS 注射组相比，Ad-LacZ 组肿瘤体积并未见显著降低（$t = 1.932$，$P > 0.05$），而 Ad-p53 组的 6 个肿瘤结节中有 2 个体积明显缩小，另外 4 个肿瘤生长幅度均受到不同程度的抑制，平均体积较 PBS 组（$t = 14.605$，$P < 0.01$）和 Ad-LacZ 组（$t = 12.477$，$P < 0.01$）显著降低（表 1），肿瘤生长抑制了 80.12%。

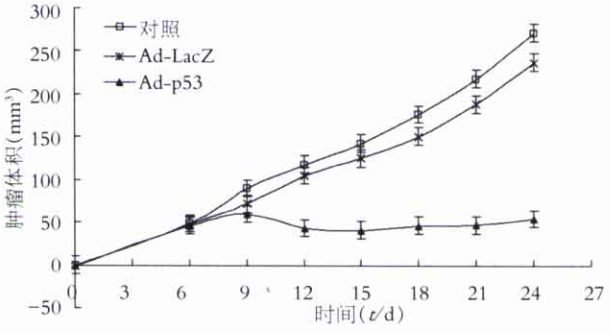


图 4　Ad-p53 对 SMCC-7721 裸鼠荷瘤的生长抑制作用



图 5　18 只裸鼠肝癌组织大体标本

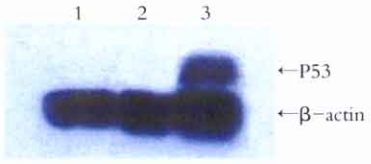
表 1　Ad-p53 对 SMCC-7721 裸鼠荷瘤的生长抑制作用

治疗方式	肿瘤数	最终肿瘤体积（V/mm³，$\bar{x} \pm s$）	抑瘤率（%）
PBS	6	271.72 ± 31.23[a]	
Ad-LacZ	6	237.24 ± 30.60[a]	12.69
Ad-p53	6	54.03 ± 18.91	80.12

a：$P < 0.01$，与 Ad-p53 比较

2.6　Western blot 法检测各组 P53 蛋白表达情况

Western blot 法检测显示，Ad-p53 组的肿瘤组织中有高表达的 P53 蛋白，注射 PBS 液和 Ad-LacZ 组的肿瘤组织中缺乏 P53 蛋白的表达（图 6）。



1：对照；2：Ad-LacZ；3：Ad-p53

图 6　Western blot 法检测 P53 蛋白在肿瘤组织中的表达

3　讨论

抑癌基因又称抗癌基因，是正常组织细胞内存在的能抑制细胞转化和肿瘤发生的一类基因。抑癌基因治疗是将正常的肿瘤抑制基因导入肿瘤细胞可代替和补偿缺陷的基因，以抑制肿瘤的生长，这是从根本攻克肿瘤的关键环节。p53 基因是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因，研究表明，野生型基因 p53 在维持细胞生长，抑制恶性繁殖中起重要作用；一旦细胞基因组 DNA 遭受损害，P53 蛋白将启动 DNA 的修复程序；如果修复失败，p53 又能启动细胞程序性死亡过程，诱导细胞自杀，阻止具有癌变倾向的基因突变的细胞产生[4]。在多类肿瘤的研究中表明[5-7]，以受体介导基因转移系统介导野生型 p53 转染肺癌、胃癌、大肠癌等细胞株，可导致细胞株转基因表达，生长抑制和凋亡。腺病毒因其宿主范围广、理化性质稳定、感染效率高、遗传毒性低等特点，被广泛应用于特异性抗体的检测以及制备基因工程疫苗中，利用腺病毒治疗肿瘤最多的是利用腺病毒作为载体表达野生型 p53 基因，它是一个较好的研究野生型 p53 基因产物对肿瘤生物作用的工具[8,9]，目前已成为最有应用前景的病毒载体之一。

本实验应用携带野生型 p53 基因的人类重组腺病毒感染体外培养的人肝癌细胞系 SMCC-7721，观察 Ad-p53 对肝癌细胞生长的影响。发现 Ad-p53 的抑制作用与感染浓度有关，随着感染浓度的增高，抑制作用逐渐增强。当 Ad-p53 对癌细胞在感染浓度 100 MOI 时能基本达到完全抑制，表明 Ad-p53 对肝细胞癌具有明显的抑制作用。通过与重组腺病毒 Ad-LacZ 对照，表明此抑制作用来自野生型 p53 基因的表达，而不是重组腺病毒本身。免疫组织化学检测证实，Ad-p53 感染 SMCC-7721 细胞后 48 h P53 蛋白可达高表达，到第 5 天尚可检测到弱表达的 P53，说明 Ad-p53 能够高效地介导野生型 p53 基因转染和持续高效地野生型 P53 蛋白表达，证实腺病毒载体是比较理想的野生型 p53 基因介导载体。在体外实验的基础上，我们观察了 Ad-p53 对荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用，体内实验显示经

Ad-p53注射的肿瘤结节生长受到了明显的抑制，肿瘤抑制率达80.12%；Western blot法检测到经注射Ad-p53的肿瘤组织中可见P53蛋白的高表达，提示Ad-p53确实能将野生型p53基因转染入肿瘤组织内，并能产生明显的治疗效果，Ad-p53实体瘤局部注射是可取的治疗方案。国内外在喉癌、鼻咽癌等肿瘤的Ⅰ或Ⅱ期临床试验已初步证明[10-13]，它不仅对一些肿瘤有治疗效果，而且未发现有明显的毒副作用。

本实验初步证实，导入外源性野生型p53基因虽不能使肝癌完全消退，但可延缓肿瘤的生长。希望我们的实验结果能为肝癌基因治疗研究以及可能的临床应用提供一定的理论基础。

参考文献：

[1] REN S P, WU C T, HUANG W R, *et al*. Adenoviral-mediated transfer of human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes results in growth suppression and autologous anti-tumor cytotoxicity of multiple myeloma cells *in vitro*[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 2(1): 1-11.

[2] MIYAKE H, YAMANAKA K, MURAMAKI M, *et al*. Therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer is synergistically enhanced by combined use of antisense oligodeoxynucleotide targeting cluster in genein a human bladder cancer model[J]. Neoplasia, 2005, 7(2): 171-179.

[3] LEE T K, HAN J S, FAN S T, *et al*. Gene delivery using a receptor-mediated gene transfer system targeted to hepatocellular carcinoma cells [J]. Int J cancer, 2001, 93(3): 393-400.

[4] CANMAN C E, CHEN C Y, LEE M H, *et al*. DNA damage responses: p53 induction, cell cycle perturbations, and apoptosis[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994, 59: 277-286.

[5] KAGAWA S, FUJIWARA T, TANAKA N. Clinical study of adenoviral mediated p53 gene therapy for non-smallcell lung cancer in Japan[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2003, 30(2): 193-197.

[6] SUN H W, TANG Q B, CHENG Y J, *et al*. Effects of dendritic cells transfected with full-length wild-type p53 and stimulated by gastric cancer lysates on immune response[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2595-2597.

[7] BAEK J H, AGARWAL M L, TUBBS R R, *et al*. *In vivo* recombinant adenovirus-mediated p53 gene therapy in a syngeneic rat model for colorectal cancer[J]. J Korean Med Sci, 2004, 19(6): 834-841.

[8] VOUSDEN K H. Activation of the p53 tumor suppressor protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1602(1): 47-59.

[9] FUJIWARA T, TANAKA N. Adenoviral p53 gene therapy for human lung cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2003, 30(4): 460-467.

[10] FRANK D K. Gene therapy for head and neck cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2002, 11(3): 589-606, vi-viii.

[11] 韩德民，黄志刚，张 伟，等. 重组人p53腺病毒注射液治疗喉癌的Ⅰ期临床试验及追踪观察[J]. 中华医学杂志，2003，83(23)：2029-2032.

[12] 张珊文，肖绍文，刘长清，等. 重组人p53腺病毒注射液联合放射线治疗头颈鳞癌的Ⅱ期临床试验[J]. 中华医学杂志，2003，83(23)：2023-2028.

[13] DORAZI G, MARCHETTI A, CRESCENZI M, *et al*. Exogenous wt-p53 protein is active in transformed cells but not in their non-transformed counterparts: implications for cancer gene therapy without tumor targeting[J]. J Gene Med, 2000, 2(1): 11-21.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)02-0124-01

分根术治疗下颌第1磨牙严重病变25例的疗效

黄达鸿[1]，张建明[2]，林天赐[1]，王海涛[1]（1.广东省佛山市口腔医院；2.同济西千口腔，口腔综合科，佛山 528000）

下颌第1恒牙萌出年龄早，在口腔中萌出时间早，萌出时处于混合牙列期，窝沟裂隙结构明显，是最容易龋坏的牙齿，而且一般认为残根、龋坏至髓底穿通者或根分叉病损经反复治疗后仍未愈合者均需拔除[1]。本研究采用根管治疗后进行分根术，改变根分叉部位的隐蔽环境，便于彻底清除根分叉病变的软硬组织，利于病变愈合[2]，将下颌第1恒牙换复成2个单根牙形态，减少残根的负载，为修复体的永久保留创造了条件，现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择2001年6月至2002年6月佛山市口腔医院同济口腔门诊患者25例，男性14例，女性11例，平均年龄55岁。25颗下颌第1磨牙，全部是其他医院或医生诊治后认为需要拔除者。15颗龋坏没全残根甚至两根已自然分牙；5颗下颌第1磨牙牙冠已破坏超过2/3，髓室底龋坏，甚至穿通；5颗下颌第1磨牙根分叉牙槽骨吸收，病变范围超过根长之分叉2/3。

1.2 材料

牙齿"富士"模型塑料，松风瓷粉及烤瓷制，超硬石膏。

1.3 治疗方法

5例患者牙均经过完善的根管充填，观察1周无症状后进

（下转128页）

作者简介：黄达鸿（1964-），男，广东省佛山市人，副主任医师，主要从事口腔修复与面颌畸形，电话：(0757)83283185，E-mail：gdfshdh@163.com

收稿日期：2005-09-13；修回日期：2005-11-17