

重组腺病毒介导的野生型 p53 基因对 HepG2 细胞抑制作用的研究^{*}

★ 田耕^{**} 刘积良 董洪松 陈伟红 谭淑瑜 (南方医科大学深圳医院、深圳市第二人民医院 深圳 518035)

摘要:目的:研究重组腺病毒介导的野生型 p53 基因对人肝癌细胞系 HepG2 的抑制作用。方法:用 MTT 比色法检测重组人 p53 腺病毒(Ad-p53)在不同感染滴度、不同感染时间对人肝癌细胞 HepG2 生长的抑制作用,用流式细胞仪检测 Ad-p53 作用后 HepG2 细胞的凋亡率;采用瘤内注射的方法观察 Ad-p53 对裸鼠移植瘤的抑制作用。结果:Ad-p53 对 HepG2 细胞有明显的抑制效应,效靶比(MOI)越高、作用时间越长,抑制作用越强;当 rAd-p53 在 125MOI 效靶比时,细胞生长基本达到完全抑制;p53 转导显著增加了 HepG2 细胞的凋亡率;瘤内注射 Ad-p53 后,荷瘤裸鼠的肿瘤生长受到明显抑制。结论:Ad-p53 对人肝癌 HepG2 细胞有明显的抑制效应,其抑制效应具有时间、剂量依赖关系,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

中图分类号:R 394.233;R 73.23;R 735.7 **文献标识码:**A

Adenovirus Mediated p53 Gene Therapy for Human Hepatocellular Carcinoma

TIAN Geng, LIU Ji-liang, DONG Hong-Song, CHEN Wei-Hong, TAN Shu-Yu

The Shenzhen Affiliated Hospital of South Medical University & Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035

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 HepG2 was used. Recombinant adenovirus carrying wild-type p53 gene was transfected into HepG2 cells in vitro and injected into tumor nodules in vivo. The growth of HepG2 cells in vitro and established hepatocellular carcinoma nodules in nude mice was examined. Cell apoptosis was analysed by Annexin-V/PI labeling flow cytometry method. Results: Cell growth was greatly suppressed at ≥ 125 MOI. p53 transfection can increase HepG2 cells apoptosis rate. In vivo studies, 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

原发性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。p53 基因在肝癌细胞中的突变率达 50% 以上^[1],是肝癌细胞中突变频率最高的基因,因此成为肝癌基因治疗的最佳靶点之一。腺病毒 DNA 不整合到宿主细胞基因组中,对人体无遗传毒性,作为基因载体既可感染处于分裂状态的细胞,也可感染静息期细胞。本研究旨在探

讨重组人 p53 腺病毒(Ad-p53)对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 重组腺病毒介导 p53 基因(Ad-p53)由深圳市赛百诺基因技术有限公司提供,对照病毒 Ad-LacZ 由中山大学医学院伍庄博士惠赠。人肝癌细胞株 HepG2 (内源性表达野生型 p53)由中山大学医学院伍庄博士惠赠,细胞在 RPMI-

^{*} 基金项目:深圳市科技项目(7H200507120858A)

^{**} 作者简介:田耕(1971-),男,博士,副主任医师,主要从事肿瘤临床与研究工作。

1640 培养基传代培养。5~7 周龄 BALB/c 裸鼠,雌性,体重 18~21 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于无菌塑料透明隔离器内,动物实验时严格无菌操作。

1.2 MTT 法检测病毒感染滴度与细胞存活的关系 将 HepG2 细胞按每孔 500 个细胞分别接种于 96 孔板内,第 2 天用 Ad-p53 分别以 10、25、50、75、100、125、150 效靶比(multiplicity of infection, MOI)感染细胞,对照组不加药,每一 MOI 值重复 6 孔。37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 10 h 后弃去病毒感染液,换新鲜培养液,每孔加入 50 μg MTT,孵育 4 h 后二甲基亚砜(DMSO)终止反应,酶标仪测定光吸收度。

1.3 MTT 法检测病毒感染时间与细胞存活的关系 将 HepG2 细胞按每孔 500 个细胞分别接种于 96 孔板内,第 2 天用 Ad-p53 以 125 效靶比(multiplicity of infection, MOI)感染细胞,对照组不加药,每一时间值重复 6 孔。37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中分别培养 30、60、90、120、150 min 后弃去病毒感染液,换新鲜培养液,24 h 后换新鲜培养液,每孔加入 50 μg MTT,孵育 4 h 后二甲基亚砜(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 将 HepG2 细胞 1×10^5 接种于 60 mm 的平皿,培养到约 70% 汇合,细胞计数,吸出培养液,125MOI 值的 Ad-p53 和空载体腺病毒 Ad-LacZ 感染 HepG2 细胞,设空白对照,每天观察细胞生长状况,于感染的 2、4、6、8 d,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞,离心收集细胞,台盼蓝染色,细胞计数,每皿重复 3 次,取平均值,绘制细胞生长曲线。

1.5 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡 分别取 5×10^5 个对数生长期 HepG2 接种于 6 孔板,125MOI 值的 Ad-p53、Ad-LacZ 及 PBS 作用 24 h 后收获细胞,每个标本加入 Annexin V 2 μl、PI 荧光抗体 2 μl,室温避光双染色 15 min,加入 400 μl 结合缓冲液,上流式细胞仪上检测分析,获得标记阳性的细胞,计算细胞凋亡率。

1.6 Ad-p53 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用 HepG2 细胞在 37 ℃、5% CO₂,含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 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 5×10^7 /ml 的单细胞悬液,每只裸小鼠于右侧后肢外侧皮下接种 0.2 ml (1×10^7) 细胞悬液,共 18 只。接种 6 d 后,将荷瘤裸鼠随机分为 3 组,每组 6 只,于肿瘤结节(或肿瘤接种部位)内分别注射 0.1 ml 的 PBS 液、含有 5×10^7 pfu 的 Ad-LacZ、含有 5×10^7 pfu 的 Ad-p53。每隔 3 d 注射 1 次,共注射 5 次,每次注射前测量肿瘤体积。游标卡尺测量肿瘤结节的长度(a)和宽度(b),按公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。

1.7 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10 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 HepG2 细胞有明显抑制作用,随着 MOI 的增加,野生型 p53(wild type- p53, wt-p53)对细胞的抑制作用逐渐

增强,当病毒量为 125MOI 时, HepG2 细胞基本达到完全抑制(图 1)。

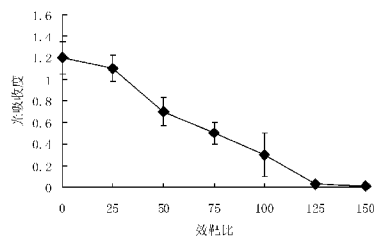


图 1 MTT 法检测 Ad-p53 病毒感染滴度与 HepG2 细胞存活的关系

2.2 MTT 法检测病毒感染时间与细胞存活的关系 Ad-p53 对 HepG2 细胞的抑制作用与病毒感染时间有关,随着感染时间的延长,wt-p53 对细胞的抑制作用逐渐增强。当感染时间达到 120 min 时, HepG2 细胞基本达到完全抑制(图 2)。

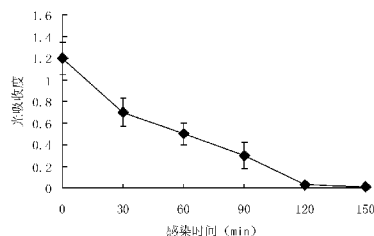


图 2 MTT 法检测 Ad-p53 病毒感染时间与 HepG2 细胞存活的关系

2.3 Ad-p53 对肝癌细胞生长抑制的检测 125MOI 值的空载体腺病毒 Ad2LacZ 对 HepG2 细胞的生长影响与对照组相比没有差别,而以 125MOI 值的 Ad-p53 感染 HepG2 细胞能对细胞生长产生明显抑制($P < 0.01$, 图 3)。这一结果表明,对肿瘤细胞的抑制作用来自转导的野生型 p53cDNA,而不是缺陷腺病毒载体本身。

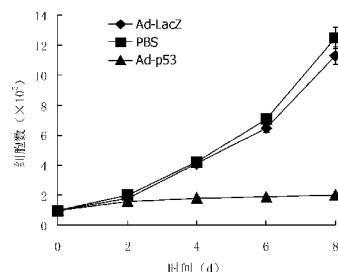


图 3 125MOI 值 Ad-p53、Ad-LacZ 及 PBS 对 HepG2 细胞体外增殖的影响

2.4 Annexin V/PI 双染色法检测细胞早期凋亡 125MOI 值的 Ad-p53、Ad-LacZ 及 PBS 作用于 HepG2 细胞 24 h 后,细

胞早期凋亡率(Annexin V + /PI-)和细胞总凋亡率(Annexin V + /PI-与 Annexin V + /PI+之和)结果见表 1。

表 1 Ad-p53、Ad-LacZ
及 PBS 作用后 HepG2 细胞凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率	总凋亡率
Control	5.78 ± 0.56	7.12 ± 0.67
Ad-p53	11.26 ± 0.89 *	16.06 ± 0.95 *
Ad-LacZ	6.36 ± 0.57	7.86 ± 0.56

注:与对照组及 Ad-LacZ 组比较, * $P < 0.01$ 。

2.5 Ad-p53 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用 所有 18 只裸鼠均成活,3 组裸鼠给药前体重和肿瘤体积经统计学分析组间均无显著性差异($P > 0.05$),表明各组裸鼠体重和肿瘤体积在治疗前均均衡性好。在细胞悬液接种后的第 6 天,各个接种点均可见实体肿瘤结节,直径 0.4~0.6 cm。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)。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($P > 0.05$),而 Ad-p53 组的肿瘤生长幅度均受到明显的抑制,平均体积较 PBS 组($P < 0.01$)和 Ad-LacZ 组($P < 0.01$)显著降低。

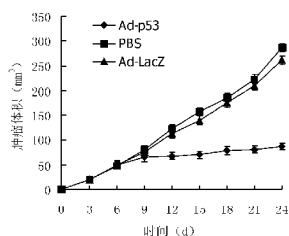


图 4 Ad-p53 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

3 讨论

p53 基因是正常细胞内关键的看家基因,是最重要的一个抑癌基因,其通过以下几个方面实现抑癌作用:(1)细胞周期阻滞、促进损伤细胞修复^[2];(2)诱导严重受损细胞凋亡^[3];(3)调节机体免疫反应;(4)抑制生存增殖信号途径^[4];(5)抑制血管生成及物质能量代谢;(6)抑制细胞-细胞粘附及其浸润转移。p53 基因异常而失去上述抗细胞增殖、促凋亡功能时细胞极易发生异常增生和癌变。可引起 DNA 损伤的放射线、化学剂和热,都产生细胞周期阻滞和诱导凋亡,正常功能的野生型 p53 基因即促进这些效应,p53 基因缺失或变异即减弱甚至破坏了这些效应。人类肿瘤的 50% 以上都存在 p53 变异而功能失常,从而降低了治疗的疗效。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,是肿瘤基因治疗的重要靶点之一,通过导入野生型 p53 来重建细胞内变异的 p53 已成为肿瘤治疗的新策略,是当前研究的热点。实验证实,野生型 p53 的导入对多类肿瘤产生明显的抑制作用^[5~7]。

本实验观察到以腺病毒为载体的 wt-p53 导入对肝癌细胞生长产生明显抑制。发现 Ad-p53 的抑制作用与感染浓度及感染时间有关,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。Ad-p53 感染时间越长,抑制作用越明显,当感染时间达到 120min 时,HepG2 细胞基本达到完全抑制。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。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,Ad-p53 实体瘤局部注射是可取的治疗方案。国内外在肺癌、头颈部癌、胶质瘤等肿瘤的 I 或 II 期临床试验已初步证明^[7~10],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。

本研究结果证实:无论用细胞培养转染还是种植瘤内注射的方法,都显示了 Ad-p53 对肝癌细胞的抑制作用,为临床应用 p53 基因治疗肝癌提供了可靠的实验依据。

参考文献

- [1]江文枢,陆启民,潘国章.肝细胞癌组织中 p53 基因突变的研究[J].中华外科杂志,1998,36(9):531-532.
- [2]Achisn M,Hupp TR.Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage[J].Oncogene,2003,22(22):3431-3440.
- [3]Balint E,Vousden KH.Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein[J].Br Cancer,2002,85:1 813-1 823.
- [4]Frank DK.Intragen advexin therapy halts tumor growth in advanced esophageal cancer patients[J].News Release,2003(6):2-8.
- [5]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.
- [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):2 595-2 597.
- [7]Lang FF,Bruner JM,Fuller GN,et al.Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma:biological and clinical results[J].J Clin Oncol,2003,21(13):2 508-2 518.
- [8]Swisher SG,Roth JA,Komaki R,et al. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy[J].Clin Cancer Res,2003,9(1):93-101.
- [9]Clayman GL,Frank DK,Bruso PA,et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers[J].Clin Cancer Res,1999,5(7):1 715-1 722.
- [10]Swisher SG,Roth JA,Nemunaitis J,et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer[J].J Natl Cancer Inst, 1999,91(9):763-771.

(收稿日期:2007-10-16)