

文章编号: 1007-4627(2006)03-0326-05

$p53$ 基因转导联合放射治疗恶性肿瘤的研究进展*

段 昕^{1,2}, 张 红¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 肿瘤治疗是目前医学研究的重点方向, 其方法包括传统的放疗、化疗、手术以及目前热门的各种基因治疗等, 各有其优缺点。而 $p53$ 基因治疗与放射治疗方法的结合越来越受到重视。综述了近年来 $p53$ 基因转导联合放射治疗恶性肿瘤的研究结果以及可能的作用机理及进展。

关键词: $p53$ 基因; 基因治疗; 放射治疗; 重离子; 恶性肿瘤

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

因突变、缺失或失活是多种肿瘤的发生原因。

放射治疗是肿瘤治疗的常规手段之一, 约 70%—80% 的肿瘤病人在治疗过程中需接受放疗。肿瘤对辐射不敏感或对辐射产生抗拒性, 已被公认为恶性肿瘤难以为放射治疗根治的主要原因之一。人类大约 60% 的肿瘤都与 $p53$ 基因的突变有关, 近年发现 $p53$ 的状态与放疗、化疗治疗肿瘤的效果及预后密切相关。如何进一步利用 $p53$ 基因转导提高肿瘤对放射治疗的敏感性, 一直是人们关注的问题。本文讨论了 $p53$ 与肿瘤放射敏感性的关系, 并就目前 $p53$ 基因转导联合放射治疗的研究进展做一简介。

2 $p53$ 基因的结构与功能

$p53$ 基因位于人类第 17 号染色体短臂上, 全长约 20 kb, 由 10 个内含子和 11 个外显子组成。野生型 $p53$ (wt $p53$) 基因能抑制多种癌基因的转化活性, 被认为是一种抑癌基因, 它能诱导终末分化, 维持基因稳定, 触发衰老和诱导细胞凋亡, 是负生长调控因子; 而突变型 $p53$ (mt $p53$) 不但没有抑癌功能, 还能抑制野生型 $p53$ 的活性, 从而引起细胞的转化, 促进细胞癌变^[1]。众多研究表明, $p53$ 基

* 收稿日期: 2005-12-19; 修改日期: 2006-04-12

* 基金项目: 中国科学院百人计划基金资助项目(BR030601)

作者简介: 段 昕(1977-), 女(汉族), 甘肃兰州人, 博士研究生, 从事辐射与基因治疗研究; E-mail: duanxin823@yahoo.com.

3 *p53* 基因与辐射敏感性

辐射可以直接导致 DNA 的损伤,一般认为,肿瘤抑制蛋白 *p53* 是 DNA 链损伤后最早、最关键的反应分子,细胞受到射线照射之后所发生的一系列变化都与 *p53* 基因有关^[2-4]。射线引起细胞内 DNA 双链断裂之后,共济失调性毛细血管扩张症突变基因 (mutated in ataxia telangiectasia, 简称 ATM) 把信号传递给 *p53* 基因,其表达产物为 *p53* 蛋白。*p53* 蛋白利用其羧基端直接识别 DNA 损伤,同时通过反式激活上调另一种抑癌基因 WAF1/CIP1 (wild-type *p53*-activated fragment 1/CDK interacting protein 1), 表达产生一种相对分子质量为 21×10^3 的蛋白质 p21, 后者抑制多种细胞周期蛋白,如细胞由 G₁ 期进入 S 期所必需的细胞周期蛋白 D (cyclin D)、细胞周期蛋白依赖的激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, 简称 CDK4) 及 cyclin E 和 CDK2, 使分裂细胞阻滞于 G₁ 期,保证细胞在复制 DNA 之前有足够的时间修复损伤的 DNA^[5]。如果细胞 DNA 损伤未能得到及时修复,则通过 *p53* 蛋白下调 *bcl-2* 基因和(或)上调 *ba_x* 基因,引起细胞凋亡。野生型 *p53* (wt *p53*) 基因发生突变后,不但诱导凋亡的作用消失,反而能抑制凋亡^[6]。Dahm-Daphi^[7] 认为, *p53* 是人类肿瘤中影响细胞生物学和辐射反应的最普通的突变基因。*p53* 在造血组织中主要是凋亡的调节者,辐射后控制细胞周期和 DNA 修复。

研究表明 *p53* 基因与肿瘤放射敏感性密切相关,如:放射治疗疗效较好的肿瘤(髓母细胞瘤、头颈肿瘤、宫颈癌)一旦 *p53* 基因发生突变,则提示预后不良^[8];表达内源性突变型 *p53* 的细胞和野生型 *p53* 敲除的细胞的放射敏感性下降^[8];放射敏感的肿瘤(精原细胞瘤和神经母细胞瘤) *p53* 突变率低;神经系统中抗辐射的星形细胞瘤 *p53* 突变率高^[9]。研究表明,放射线可产生细胞损伤,导致肿瘤细胞周期阻滞并诱导细胞凋亡,正常功能的野生型 *p53* 对射线引起的细胞周期阻滞和凋亡起促进作用,而 *p53* 基因的变异将失去这种功能,这是产生肿瘤细胞放射抵抗性的重要原因之一。通过腺病毒介导 *p53* 基因 (adenovirus-mediated *p53* gene, Ad-*p53*) 转染的方法,可有效重建肿瘤细胞内变异的 *p53* 基因功能,使肿瘤细胞的放射敏感性明显提高。

4 *p53* 基因转导联合放射治疗恶性肿瘤的研究现状

肿瘤基因-放射治疗是将某些可经射线诱导表达并对肿瘤具有杀伤作用的基因转入肿瘤细胞,在实施局部放疗时,通过射线诱导肿瘤杀伤基因表达,让射线和基因对肿瘤产生协同杀伤作用。细胞受到射线照射之后所发生的一系列变化都与 *p53* 基因有关, *p53* 基因转导联合放射治疗的原理正是基于此。通过对各种肿瘤的研究,进一步探究了 *p53* 基因转导联合放射治疗的可行性。

4.1 *p53* 基因转导与 X 射线、 γ 射线辐射联合治疗恶性肿瘤

4.1.1 头颈部鳞癌

Pirollo 等^[10] 采用腺病毒载体 (adenoviral vector, Avl) 携带 *p53* 基因 (Avl *p53*), 并用 Avl 携带 β -半乳糖苷酶 (Avl *lacZ*) 作对照,研究了 *p53* 基因对细胞放射敏感性的影响。结果表明: wt *p53* 转染能提高放射抗拒的头颈鳞癌细胞系 JSQ-3 的放射敏感性,这种效应具有时间和重组病毒感染剂量依赖性,感染 20MOI 的 Avl *p53* 后 36 小时放射增敏效应最大。用头颈鳞癌细胞系 JSQ-3 接种裸鼠,待种植肿瘤体积长至 12 mm³ 时,一次性注射 $2.5 \times 10^8 - 1.5 \times 10^9$ PFU (噬菌斑形成单位) 的 Avl *p53*, 36—48 小时后利用 2.5 Gy γ 射线照射,隔天 1 次,总剂量 20 Gy。实验组开始照射后 42—65 天肿瘤全部消失,观察 5 个月未见复发,而单纯 Avl *p53* 局部注射组肿瘤持续生长或缩小至 50% 后又开始生长,单纯照射组早期肿瘤缩小,但 5 周后又复发。病理切片也显示 *p53* 转导加照射组肿瘤组织坏死程度明显重于单纯照射组或单纯基因转染组。这些结果表明,传统的放疗结合 *p53* 基因治疗头颈部肿瘤将更有效。Wakasas 等^[11] 利用腺病毒载体将 wt *p53* 基因转染到口腔鳞癌细胞 HSC4 和 SAS 中,然后进行 X 射线辐照,发现这两种细胞的 *p53* 蛋白表达有显著增加,并且诱导了明显的细胞凋亡。结果提示, *p53* 基因治疗和放射治疗联合可相互促进,为我们寻求更有效、安全的临床治疗提供了有益的探索。

4.1.2 肺癌

体外实验表明, *p53* 基因突变会降低肿瘤对放射治疗的敏感性,复制缺陷型 *p53* 重组腺病毒载体

(Ad-*p53*)转染会增强肿瘤的放射敏感性。动物实验也证实 Ad-*p53* 和放射治疗有协同的抗肿瘤效应。为证实 Ad-*p53* 在人体内也具有这一作用, Rusch 等^[12, 13]开展了Ⅱ期临床试验研究。研究对象由两组共 19 例患者组成, 一组是因为生理因素不能接受手术治疗的早期非小细胞肺癌(NSCLC)患者, 另一组是不能耐受化疗的ⅢA/ⅢB期 NSCLC 患者。局部放疗总剂量为 60 Gy, 在放疗后的第 1, 18 和 32 天, 分别在纤维支气管镜和 CT 的引导下, 瘤体内注射 3×10^{12} 病毒颗粒(vp)。结果表明, 受试患者 1 年生存率达 45.5%, 而且没有明显的副作用。引起患者死亡的原因并非局部病灶的进展, 而是肿瘤的远处转移。这说明瘤体内注射 Ad-*p53* 并对局部病灶实施放疗, 能对局部病灶有较好的控制作用, 但对远处的肿瘤细胞却没有杀伤效应。

4.1.3 乳腺癌

Putzer 等^[14]研究发现, *p53* 基因转导与 IL-2 联合治疗小鼠乳腺癌取得较佳效果, 提示免疫调节基因和抗细胞增殖基因联合具有协同作用。

4.1.4 卵巢癌

Guan 等^[15]将 wt *p53* 基因导入 *p53* 缺失的卵巢癌 SKOV-3 细胞中, 观察经 X 射线照射后其集落形成的变化。结果显示, 外源性 *p53* 基因的表达使 X 射线照射后的卵巢癌细胞集落形成数明显下降, 说明外源性 *p53* 基因的表达使卵巢癌细胞对 X 射线的敏感性增加。Gallardo^[16]研究了 *p53* 基因缺失的卵巢癌细胞系经腺病毒介导的 wt *p53* 基因转染后放射敏感性的改变。结果发现, MOI 为 10 : 1 的 Ad-*p53* 感染 48 小时后, 几乎所有细胞均表达 *p53* 蛋白; 每隔 48 小时计数一次细胞数, 7 天后转染 wt *p53* 的细胞数仅为对照组的 1/3, 说明 wt *p53* 转染有一定的抑制肿瘤细胞生长作用; 经 2 Gy 或 4 Gy γ 射线照射后发现转染 wt *p53* 的细胞放射敏感性明显高于对照组($P < 0.05$)。体内实验采用 5×10^6 SKOV-3 细胞接种 SCID 小鼠, 4 周后肿瘤直径长至 0.5—0.6 cm 时, 实验组和对照组分别注射 1×10^8 PFU 的 Ad-*p53* 和 Ad *LacZ*, 注射 3 天后, 当免疫组化 *p53* 蛋白染色表明 *p53* 转染率达 50% 时, 用 24 Gy 的 γ 射线照射, 共 6 次。结果发现, Ad-*p53* 加照射组肿瘤控制率达 45%, 明显高于单纯照射组和单纯 Ad-*p53* 转染组, 而且观察 50 天后无肿瘤复发。这提示 *p53* 基因治疗与放疗联合应用能在更大程度上杀伤肿瘤细胞。

4.1.5 鼻咽癌

Chen 等^[17]将 29 位Ⅱ期鼻咽癌患者随机分为两组, 一组给予 *p53* 基因转导联合放射治疗, 即 GTRT 组, 另一组为单纯辐射治疗组。接受放疗剂量为 60—70 Gy, 治疗 4 周后, 两组的肿瘤下降率分别为 $(71 \pm 18)\%$ 和 $(49 \pm 23)\%$ ($P < 0.001$), 治疗 8 周后, 下降率分别为 $(95 \pm 10)\%$ 和 $(80 \pm 17)\%$ ($P < 0.01$), 肿瘤完全消退率为 75% 和 15%, 未发现毒副作用。由此可见, 联合治疗对于Ⅱ期鼻咽癌是一种安全、有效的治疗方案。

4.1.6 神经胶质瘤

恶性神经胶质瘤是恶性程度较高的肿瘤, 常规治疗的效果不明显, 患者的预后通常很差, 存活时间一般为 3 年。Badie 等^[18]报道了用携有 wt *p53* 基因的腺病毒转染鼠的神经胶质瘤 9L 细胞, 然后用 X 射线辐照。发现联合治疗可以诱导更明显的细胞凋亡, 使细胞阻滞于 G_1 期。并且在小鼠肿瘤模型中, 联合治疗相对单独治疗组可以明显减小肿瘤体积, 延长荷瘤小鼠的生存期。

4.2 *p53* 基因转导与重离子束辐射联合治疗恶性肿瘤

放射治疗是治疗恶性肿瘤最主要手段之一, 临床上常用的 X 和 γ 射线的传能线密度(LET)低, 对乏氧肿瘤细胞和 G_0 期细胞作用弱, 组织剂量分布不理想, 限制了治疗疗效。经过半个多世纪的探索, 发现高 LET 射线的生物效应优于 X 和 γ 射线。已研究的高 LET 射线有中子、质子、介子和重离子等 4 种荷电粒子束^[19], 其中重离子的生物和物理特性在治疗肿瘤中明显优于其他射线。重离子的作用特点是: (1) 能量沉积在入射坪区较小, 且保持相对恒定, 而靠近射程末端则急剧升高, 形成布拉格峰; (2) 单个粒子可在细胞的敏感位点沉积大量的能量; (3) 重离子对物质的作用特点依赖于有效的电荷和速度; (4) 重离子具有较高的相对生物效应和较低的氧增强比^[20, 21]。因此, 重离子不仅可以杀灭对低 LET 辐射不敏感的肿瘤细胞, 而且靶区内能量沉积呈布拉格峰分布, 是增加治疗增益因素(TGF)最理想的射线。大量分子、细胞学的研究, 以及皮肤、神经等组织水平的研究都证明高 LET 射线的相对生物效应(RBE)高于低 LET 射线^[22—24]。日本和德国在重离子治疗肿瘤的临床试验中已取得了很好的疗效^[25, 26]。我们课题组利用

兰州重离子加速器装置(HIFRL)提供的重离子束,做了大量的关于 $p53$ 基因转导与重离子束辐射联合治疗恶性肿瘤的基础实验,取得了一些非常有意义的结果。

利用复制缺陷型 $p53$ 重组腺病毒载体(AdCMV- $p53$)转染经 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射的人黑色素瘤 A375 细胞,发现辐照可增加 AdCMV- $p53$ 对 A375 细胞的基因转导率,转导的外源性 wt $p53$ 基因可在 A375 细胞中高效表达,转导后 3 天表达最高,并诱导细胞周期 G_1 期阻滞;单纯转导 $p53$ 基因对 A375 细胞无明显诱导细胞凋亡和生长抑制效应。我们还发现高 LET 比低 LET 或 X 射线能更有效地抑制细胞生长^[27]。克隆存活曲线中,随着 LET 的增加,存活曲线的肩部减少并且变得陡峭,说明细胞增殖受到抑制(见图 1)。无论高 LET 或低 LET,辐照后 48—72 小时会出现凋亡率的峰

值。虽然各个实验组的凋亡率有所不同,但是细胞凋亡率的动态分布还是很类似的。A375/ $p53$ 细胞的凋亡率要高于 A375 细胞(见图 2)。说明外源性 $p53$ 基因的导入能诱导细胞凋亡和抑制细胞生长,可明显提高抗辐射的人黑色素瘤 A375 细胞的辐射敏感性。

利用 AdCMV- $p53$ 转染经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束预照射的人宫颈癌细胞系(Hela)。辐照诱导转染组的细胞生长增殖明显受到抑制,与未辐射、未转染组相比,单纯转基因对 Hela 细胞的抑制作用提高 6%;与相同预辐照剂量单纯转染组比较,辐射诱导转基因对 Hela 细胞的抑制作用提高 5%—18%;辐照能诱导细胞周期 G_1 和 G_2 期阻滞的发生;辐照可明显增加 AdCMV- $p53$ 在 Hela 细胞中的表达,转染后 3 天 $p53$ 的表达最高,与等剂量辐射对照相比, $p53$ 表达增加 20%—70%。

图 1 X 射线和不同 LET 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照 A375 和 A375/ $p53$ 细胞的克隆形成率^[27]

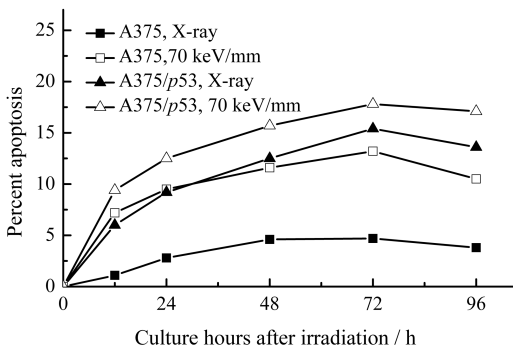


图 2 X 射线和 70 keV/ $\mu\text{m}^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照 A375 和 A375/ $p53$ 细胞诱导的凋亡率与时间的关系^[27]

利用 AdCMV- $p53$ 转染经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束预照射的人肝癌细胞系(Hep G2)。结果显示辐照诱导转染组细胞生长增殖明显受到抑制,与对照组相比,单纯转染组克隆形成率降低 30%—50%;辐照诱导细胞 G_1 和 G_2 期阻滞的发生;辐照可明显增加 AdCMV- $p53$ 在 Hep G2 细胞中的表达,转染后 3 天 $p53$ 的表达最高,与相同剂量预辐射对照相比, $p53$ 表达增加 15%—38%。

这些结果表明:重离子辐照可显著提高外源性基因的转导效率,即有望克服常规基因转导技术存在的缺陷,如转导效率低、表达时间短和表达不稳定等问题。wt $p53$ 基因的导入明显提高了肿瘤细胞的辐射敏感性,为临床肿瘤的放疗联合基因治疗提供了实验室依据,即减轻临床上对于辐射敏感性差的肿瘤单纯大剂量照射或者单纯基因疗法中 Ad- $p53$ 制品用量过大而给病人造成的毒副作用。

5 结论

总之, $p53$ 基因治疗与放疗的结合,既可提高放疗效果,又可解决基因治疗中面临的基因靶向转移效率低、转移基因的体内表达缺乏有效调控手段等问题,使两者之间的优势得以互补,抗肿瘤效果得以进一步提高。相比 X 射线、 γ 射线、电子束和快中子,重离子在肿瘤治疗中具有能量沉积高、定位精确和实时监控等独特优势,如果能有效地与 $p53$ 基因治疗结合,会取得更理想的结果。相信随着研究的深入,诸多问题的逐渐解决, $p53$ 基因-放射治疗会成为恶性肿瘤治疗的最有效方法之一。

参 考 文 献:

- [1] Zhu J, Zhang S, Jiang J, *et al.* J Biol Chem, 2000, **275**(51): 399.
- [2] Yarnold J. Radiother Oncol, 1997, **44**(1): 127.
- [3] Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, *et al.* Oncogene, 1997, **15**(16): 1 903.
- [4] Mcilwrath A J, Vasey D A, Ross G M, *et al.* Cancer Res, 1994, **54**(14): 3 718.
- [5] Andrew R C, Robert G B. Cancer and Metastasis Reviews, 2004, **23**: 237.
- [6] Lowe S W, Bodis S, Mcclatchey A, *et al.* Science, 1994, **266**(5 186): 807.
- [7] Dahm-Daphi J. Strahlenther Onkol, 2000, **176**(6): 278.
- [8] Bistow R G, Benchimol S, Hill R P. Radiother Oncol, 1996, **40**(3): 197.
- [9] Gupta R K, Patel K, Bodmer W F, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**(71): 2 817.
- [10] Pirollo K F, Haoz, Rait A, *et al.* Oncogene, 1997, **14**(14): 1 735.
- [11] Wakasa T, Inoue T, Kawal N, *et al.* The British Journal of Radiology, 2002, **75**(896): 657.
- [12] Rusch V W, Giroux D J, Kraut M J, *et al.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, **121**(3): 472.
- [13] Swisher S G, Roth J A, Komaki R, *et al.* Clin Cancer Res, 2003, **9**(1): 93.
- [14] Putzer B M, Bramson J L, Addison C L, *et al.* Hum Gene Ther, 1998, **9**(5): 707.
- [15] Guan Ting, Jin Zhen, Cui Manhua, *et al.* Journal of Zhengzhou University (Medical Science), 2003, **38**(6): 910.
- [16] Gallardo D. Cancer Res, 1996, **56**(21): 4 891.
- [17] Chen C B, Pan J J, Xu L Y, *et al.* National Medical Journal of China, 2003, **83**(23): 2 033.
- [18] Badie B, Kramar M H, Lau R, *et al.* Journal of Neuro-Oncology, 1998, **37**: 217.
- [19] Skarsgard L D. Phys Med, 1998, **14**: 11.
- [20] Eleanor A B, Amy K. Radiat Res, 1998, **150**(Suppl): S126.
- [21] 党秉荣, 李文建, 马秋峰等. 原子核物理评论, 2005, **22**(1): 44.
- [22] Li W J, Ding X F, Li D X, *et al.* IMP & NLHIAL Annual Report. Beijing: Atomic Energy Press, 1999, 48.
- [23] Debus J, Scholz M, Haberer T, *et al.* Radiat Res, 2003, **160**: 536.
- [24] 李文建, 周光明, 卫增泉等. 高能物理与核物理, 2002, **26**: 742.
- [25] Kamada T, Tsujii H, Tsuji H, *et al.* AIP Conference Proceedings, 2003, **680**: 1 142.
- [26] Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, **58**: 631.
- [27] Min F L, Zhang H, Li W J, *et al.* In Vitro Cell & Dev Biol—Animal, 2005, **41**: 284.

Status and Advances of *p53*-Genetherapy and Radiotherapy in Malignant Tumor^{*}

DUAN Xin^{1, 2}, ZHANG Hong¹

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cancer treatment is one of the most important fields in medical research. All strategies such as radiotherapy, chemotherapy, surgery, and gene-based therapy have their own advantages and disadvantages. Nowadays, a novel method which combined *p53*-gene therapy with radiotherapy plays an important role in the field of cancer research. This review summarized the current state of combined therapies of *p53*-genetherapy and radiotherapy, possible mechanism and recent progress.

Key words: *p53* gene; gene therapy; radiotherapy; heavy ion; malignant tumor