

# 携带 p53 基因增殖性腺病毒影响肝癌细胞对化疗药物的敏感性

段纪成<sup>1</sup>, 钱其军<sup>2</sup>, 岳海燕<sup>3</sup>, 沈丽<sup>1</sup>, 丁光辉<sup>1</sup>, 杨家和<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院综合三科, 上海 200438; 2. 东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室; 3. 长征医院消化内科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:** 研究携带 p53 基因增殖性腺病毒 CNHK600-p53 载体能否增加肝癌细胞株对化疗药物的敏感性。**方法:** 构建携带 p53 基因增殖性腺病毒 CNHK600-p53 载体, 采用四甲基偶氮唑盐法 (methylthiazolyl tetrazolium assay, MTT), 观察并比较单用化疗药物 [5-氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-Fu)、丝裂霉素 (mitomycin, MMC) 和表柔比星 (epirubicin, EPI)]、单用 CNHK600-p53 和 CNHK600-p53 联合上述化疗药物对肝癌细胞株 BEL-7404 的杀伤效应。**结果:** 肝癌细胞株 BEL-7404 在 5-Fu 浓度为 100 μg/ml 时细胞抑制率为 (47±3)%, MMC 浓度为 1 μg/ml 时细胞抑制率为 (20±4)%, EPI 浓度为 2.5 μg/ml 时细胞抑制率为 (73±2)%, 联合 CNHK600-p53 (MOI=10) 后上述浓度的化疗药物细胞抑制率分别增高为 (59±4)%、(44±4)% 和 (86±2)% (率的 U 检验, P<0.01)。**结论:** 携带 p53 基因的 CNHK600-p53 能提高肝癌细胞株 BEL-7404 对化疗药物的敏感性, CNHK600-p53 联合化疗药物治疗可望开辟克服肝癌耐药的新途径。

**[关键词]** p53 基因; 肝肿瘤; 抗药性, 肿瘤; 基因疗法

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0628-03

## Effect of replicating adenovirus harboring p53 gene on chemosensitivity of hepatocarcinoma cell line

DUAN Ji-cheng<sup>1</sup>, QIAN Qi-jun<sup>2</sup>, YUE Hai-yan<sup>3</sup>, SHEN Li<sup>1</sup>, DING Guang-hui<sup>1</sup>, YANG Jia-he<sup>1\*</sup> (1. Department of Comprehensive Treatment III, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Lab of Virus-gene Treatment, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital; 3. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct a replicating adenovirus vector CNHK600-p53 carrying p53 gene and investigate its effect on the chemosensitivity of hepatocarcinoma cell line. **Methods:** Chemotherapy of hepatocarcinoma cells BEL-7404 were carried out using Fluorouracil, Mitomycin, Epirubicin, CNHK600-p53, CNHK600-p53 + Fluorouracil, CNHK600-p53 + Mitomycin, and CNHK600-p53 + Epirubicin, separately. MTT assay was used to evaluate the killing effects after therapy. **Results:** The inhibition rate on BEL-7404 cells was (47±3)% when using 100 μg/ml 5-Fu, was (20±4)% when using 1 μg/ml MMC, and was (73±2)% when using 2.5 μg/ml EPI. The inhibition rates of BEL-740 cells in CNHK600-p53 (MOI=10) + Fluorouracil (100 μg/ml), CNHK600-p53 (MOI=10) + Mitomycin (1 μg/ml), and CNHK600-p53 (MOI=10) + Epirubicin (2.5 μg/ml) groups were (59±4)%, (44±4)% and (86±2)%, respectively (P<0.01). **Conclusion:** Adenovirus CNHK600-p53 carrying p53 gene can enhance chemosensitivity of BEL7404 hepatocarcinoma cell line. Gene therapy using adenovirus CNHK600-p53 in combination with chemotherapy may be a new strategy for hepatocarcinoma treatment.

**[KEY WORDS]** p53 gene; liver neoplasms; drug resistance, neoplasm; gene therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6):628-630]

p53 基因是重要的肿瘤抑制基因, 与肿瘤的发生、发展以及预后关系密切。已证明超过 50% 以上的肿瘤存在 p53 基因的异常, 且发现 p53 基因的突变可能与肿瘤的耐药性密切相关<sup>[1]</sup>, 因而 p53 基因导入成为重要的肿瘤基因治疗手段, 也可能是解决肿瘤耐药性的方法之一。本实验构建携带 p53 基因增殖性腺病毒 CNHK600-p53 载体, 研究其是否增加肝癌细胞株对化疗药物的敏感性。

### 1 材料和方法

1.1 材料 293 细胞、腺病毒载体 pUC19 购自加

拿大 MICROBIX BIOSYSTEMS 公司; 腺病毒载体 pClon17、腺病毒载体 CNHK600、腺病毒载体 ppE3 为本室构建; 限制性内切酶、胎牛血清、DMEM 和 Lipofectamine2000 试剂盒购自 Gibco 公司; Taq 酶、Pfu 酶购自 MBI 公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 PROMEGA 公司; 琼脂糖、溴化乙锭购自 GENE 公司; 胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒 DNA 制备试剂盒和病毒 DNA 提取试剂盒购自

[作者简介] 段纪成, 硕士, 住院医师。

\* Corresponding author. E-mail: jhyang@ehbh.cn

QIAGEN 公司;人肝癌细胞株 BEL-7404 购自中国科学院上海细胞生物研究所;化疗药 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、丝裂霉素(MMC)和表柔比星(EPI)由本院药房惠赠。

1.2 增殖性腺病毒载体 CNHK600-p53 的构建  
上游引物:5'-CCG GAA TTC GCC ATG GAG GAG CCG CAG T-3';下游引物:5'-CGC GGA TCC TTA TCA GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3',PCR 方法扩增 p53 基因,用胶回收试剂盒回收大小为 1 179 bp 的 DNA 片段,回收片段及 pUC19 载体分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切,将酶切后的 p53 目的基因片段与酶切后的 pUC19 载体连接,连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态,挑取生长的细菌单克隆,PCR 法筛选阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒 DNA,酶切鉴定并测序(TaKaRa)正确后命名为 pUC19-p53,将 pUC19-p53 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切,pClon17 载体用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切,将酶切后 p53 目的基因片段与酶切后的 pClon17 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态,挑取生长的细菌单克隆,PCR 法筛选阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒 DNA,PCR 及酶切鉴定,鉴定正确后命名为 pClon17-p53,将 pClon17-p53 用 *Age* I、*Not* I 和 *Sca* I 酶切,CNHK600 用 *Age* I、*Not* I 酶切,37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h,分别电泳切胶回收 2 469 kb 和 1 035 kb 的片段,将酶切后含 CMV 启动子 + p53 基因 + SV40 poly-A 加尾信号的目的片段与酶切后的 CNHK600 载体连接,转化、挑克隆、抽提质粒,PCR 及酶切鉴定。

1.3 增殖性腺病毒 CNHK600-p53 的包装及鉴定 利用 Lipofectamine2000 试剂盒,将质粒 CNHK600-p53 和 5 型腺病毒骨架载体 ppE3 共转染至 293 细胞。转染后 9~14 d 细胞出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化,应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取腺病毒 DNA(其具体方法参见 QIAGEN 公司操作说明)。一组引物(见构建部分)检测 p53 基因的存在,另一组引物(上游引物:5'-CTG GCC AAT ACC AAC CTT A-3';下游引物:5'-ATA TGA GCT CAC AAT GCT TC-3')用来排除野生型腺病毒的存在。对病毒重组体进行 PCR 鉴定正确者命名为 CNHK600-p53,即携带 p53 基因的双调控增殖型腺病毒,氯化铯密度梯度离心法纯化病毒,TCID<sub>50</sub> 方法测得病毒滴度  $1.99 \times 10^{10}$  Pfu/ml,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 化疗药物对肝癌细胞株 BEL-7404 增殖的影响 实验分 3 大组:(1)单纯化疗药物组;(2)

CNHK600-p53 组;(2)CNHK600-p53 联合化疗药物组。取对数生长期的肝癌细胞株 BEL-7404 接种于 3 板 96 孔细胞培养板(约  $1 \times 10^4$ /孔),培养 24 h,待细胞贴壁生长良好后吸去培养基。CNHK600-p53 组:加入病毒 100  $\mu$ l/孔(MOI=0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、100);CNHK600-p53 联合化疗药物组:除空白对照孔外每孔加入 CNHK600-p53 (MOI=10)病毒 100  $\mu$ l/孔,然后置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 72 h。CNHK600-p53 联合化疗药物组加入含 5-Fu(3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ g/ml)、MMC(0.062、0.125、0.25、0.5、1、10  $\mu$ g/ml)、EPI(0.312、0.625、1.25、2.5、5、10  $\mu$ g/ml)的培养基;单纯化疗药物组:于铺板 96 h 后加入含上述相同浓度梯度的化疗药物 5-Fu、MMC、EPI 的培养基。每个浓度设 4 个复孔,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h,弃去培养液,加入无血清培养液 100  $\mu$ l/孔,加 MTT 10  $\mu$ l/孔,轻拍 96 孔板边缘 5 min,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内 4~6 h;加 10% SDS+0.01 mol/L HCl 100  $\mu$ l/孔,轻拍 96 孔板边缘 5 min,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内,过夜;ELISA 仪测定 570 nm 波长光密度值(D)。以上实验均重复 3 次。

1.5 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,细胞抑制率=(对照孔  $D_{570}$  值-实验孔  $D_{570}$  值)/对照孔  $D_{570}$  值  $\times 100\%$ ,统计分析采用率的 *U* 检验分析。

## 2 结果

单用 CNHK600-p53 组,当 MOI 为 0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、100 时,BEL-7404 细胞的  $D_{570}$  值及细胞抑制率相应分别为  $1.922 \pm 0.160$ 、 $1.887 \pm 0.132$ 、 $1.830 \pm 0.143$ 、 $1.733 \pm 0.101$ 、 $1.695 \pm 0.025$ 、 $1.618 \pm 0.034$ 、 $0.235 \pm 0.004$  和 1%、2%、5%、10%、12%、16%、88%,提示单用 CNHK600-p53 时效果一般,只有当 MOI=100 时才有较强的抑制作用;单用化疗药组和 CNHK600-p53 联合化疗药物组  $D_{570}$  值和细胞抑制率详见表 1,可见随着浓度的增高化疗药物杀伤 BEL-7404 细胞能力也增强;CNHK600-p53 联合化疗药物 5-Fu、MMC 和 EPI 时可明显提高肝癌细胞对化疗药物的敏感性( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),但当单用化疗药的细胞抑制率达到 85%左右时,CNHK600-p53 转入与否无明显统计学意义。

## 3 讨论

1996 年美国 ONYX 药物公司研究的 E1B55KD 缺陷的增殖型腺病毒(ONYX-015),它利用肿瘤细

表 1 单用化疗药和化疗药联合 CNHK600-p53 时细胞的  $D_{570}$  值及细胞抑制率

Tab 1  $D_{570}$  value and inhibitory rate of liver cell line BEL-7404 in single chemodrug group or in combination with CNHK600-p53

Concentration ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	MOI=0		MOI=10	
	$D_{570}$	Inhibitory rate(%)	$D_{570}$	Inhibitory rate(%)
5-FU				
3.125	1.432±0.132	6±2	0.983±0.007	28±3**
6.25	1.280±0.117	16±3	0.887±0.005	35±3**
12.5	1.279±0.120	16±2	0.846±0.004	38±2**
25	1.264±0.083	17±3	0.833±0.006	39±2**
50	1.263±0.076	17±4	0.710±0.002	48±5**
100	0.807±0.034	47±3	0.601±0.003	59±4*
MMC				
0.062	1.332±0.123	13±3	0.997±0.005	33±3**
0.125	1.317±0.107	14±2	0.996±0.004	33±2**
0.25	1.240±0.112	19±2	0.893±0.003	40±2**
0.5	1.225±0.063	20±3	0.892±0.008	40±4**
1	1.224±0.056	20±4	0.833±0.001	44±4**
10	0.168±0.031	89±5	0.143±0.004	90±5
EPI				
0.312	1.437±0.118	8±3	0.976±0.010	28±3**
0.625	1.093±0.097	30±2	0.759±0.004	44±2**
1.25	0.875±0.102	44±2	0.569±0.004	58±2**
2.5	0.422±0.033	73±2	0.190±0.005	86±2**
5	0.203±0.026	87±5	0.163±0.003	88±5
10	0.187±0.021	88±4	0.149±0.004	89±4

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs MOI=0 group

胞中 p53 基因突变而正常细胞中 p53 正常的差异使病毒在肿瘤细胞中特异性增殖。目前该病毒已进入 III 期临床试验。但是,单用该病毒疗效甚微,有效率低于 20%,所以必须与放化疗联合应用才能有效的杀伤肿瘤<sup>[2]</sup>。同时 ONYX-015 存在着诸多不足,如在体内半衰期短,需要反复注射等。为此我们设想应用上面介绍的肿瘤特异性增殖型腺病毒携带某种对肿瘤治疗有明确疗效的抗癌基因,利用这类病毒在肿瘤细胞内特异性增殖及复制,而在正常细胞内不增殖的特点,从而使包括 p53 在内的抗癌基因在肿瘤细胞内特异性高效表达,这种结合病毒治疗与基因治疗优点的新型治疗方案称为基因病毒治疗法。

在前期的研究中,本实验室构建了肿瘤特异性增殖腺病毒 CNHK500,体内及体外实验结果均表明 CNHK500 在选择性增殖和抗肿瘤疗效上明显优于 ONYX-015,且在静脉大剂量用药的情况下未观测到明显的肝细胞毒性<sup>[3,4]</sup>。为了进一步降低病毒对正常细胞的毒性作用,提高安全性,我们利用正常细胞和肿瘤细胞的另一大差异——Rb 基因,在 CNHK500 的基础上构建了 CNHK600。最近国外研究发现导入野生型 p53 基因联合化疗或放疗,可

取得较好的治疗效果<sup>[5]</sup>;p53 基因的缺失或突变在肿瘤是非常常见的基因异常,p53 基因突变影响肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性<sup>[6]</sup>。本实验将 p53 基因插入增殖型腺病毒 CNHK600,构建携带 p53 基因的增殖性腺病毒 CNHK600-p53,该病毒缺失 E1A 中与 Rb 蛋白结合的基因序列,保留使腺病毒有效逃避宿主免疫监视及有效裂解宿主细胞而释放子代病毒的 E3 区,用人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子及缺氧反应(HRE)启动子来分别调控腺病毒的 E1A 及 E1B 基因,从而使病毒的复制更准确地靶向肿瘤细胞,力图达到广谱、特异、安全、高效的抗癌效果。通过体外实验对 CNHK600-p53 选择性杀伤肿瘤细胞的能力进行评估。本研究发现转入 CNHK600-p53 基因后再联合应用上述浓度范围的化疗药物,在原本不敏感的药物浓度作用下肝癌细胞 BEL-7404 的生长出现了明显的杀伤效应,我们还发现当单用化疗药的细胞抑制率达到 85%左右时,CNHK600-p53 转入与否无明显统计学意义,这可能与大部分细胞被抑制有关;实验结果不仅肯定了以上的推测,也表明了恢复 p53 基因的功能可以提高肝癌细胞株 BEL-7404 对化疗药物的敏感性。可见,CNHK600-p53 基因联合化疗药物对某些肝癌的治疗是一种安全、可行、有效的治疗手段。同时本实验也显示单纯导入 CNHK600-p53 基因并不能显著抑制 BEL-7404 细胞的生长,如 MOI=10 时其细胞抑制率为 16%,只有当 MOI=100 时其细胞抑制率为 88%,其具体原因值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Chan KT, Lung ML. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 53: 519-526.  
 [2] Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting [J]. Mol Ther, 2004, 10: 958-966.  
 [3] 李月敏,宋三泰,江泽飞,等. 选择性增殖腺病毒 CNHK500 治疗乳腺癌的实验研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2005,12: 124-128.  
 [4] 张琪,彭林辉,吴红平,等. 双重调控选择增殖型腺病毒 CNHK500 的构建及初步研究 [J]. 中华实验外科杂志,2004, 21:1366-1368.  
 [5] El-Anead A. Current strategies in cancer gene therapy [J]. Europ J Pharmacol, 2004, 498: 1-8.  
 [6] Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, et al. Apoptosis: target of cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8: 2024-2034.

[收稿日期] 2006-01-10

[修回日期] 2006-04-10

[本文编辑] 尹 荼