

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0155-03

p53 与卵巢癌的基因治疗

闫雪冬 综述; 潘凌亚 审阅(中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院妇产科, 北京 100730)

[摘要] 卵巢癌是妇科恶性肿瘤的首要死亡原因,为了提高5年生存率,卵巢癌的生物治疗已经成为学者们关注的治疗方法。卵巢癌中 p53 的突变率最高, p53 与卵巢癌密切相关。卵巢癌的 p53 基因治疗已兴起十余年,本文着重从体外到临床试验阐述了 p53 基因与卵巢癌发病相关性,以及 p53 基因治疗在卵巢癌的应用和仍然存在的问题。目前重组人 p53 腺病毒注射液作为首个基因治疗产品已经问世,在美国、欧洲等国家仍有 50 多个临床试验正在实施,基因治疗有望成为继手术治疗、化学治疗、放射治疗之后的又一种治疗卵巢癌的有效方法。

[关键词] 卵巢癌; p53; 基因治疗

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

卵巢癌在女性恶性肿瘤中发病率占第四位,死亡率占第一位。在肿瘤细胞减灭术的基础上辅助化疗虽能有效地改善卵巢癌的生存时间,但是晚期卵巢癌的5年生存率只有20%左右。因此,进一步探索新的诊断和治疗途径成为研究的焦点。由于卵巢癌具有腹腔内广泛种植的生物学特性,这种扩散方式为肿瘤的生物治疗提供了机会和可能。在探索卵巢恶性肿瘤的生物治疗过程中,随着分子生物学的发展,人们对肿瘤中基因的改变的认识日益加深,基因治疗备受关注。其中, p53 基因与卵巢癌的发生、发展、耐药、预后有着密切的关系,其基因治疗在卵巢癌的生物治疗中具有重要的地位。

1 p53 与卵巢癌的关系

p53 基因定位于人的17号染色体短臂17p13.1,长约20 kb,属于公认的抑癌基因。其表达产物为分子量为53 kD的蛋白质,称为“基因组的保护者”。P53 蛋白具有调控细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制血管生成、DNA 修复、在非诱导状态具有核酸外切酶活性等作用。自从1979年发现 p53 基因,人们做了大量的相关研究,发现许多肿瘤中最常见的遗传学改变是 p53 基因的突变或者等位基因的缺失,而在妇科肿瘤中以卵巢癌 p53 基因的突变发生率为最高。据统计,卵巢癌中约55%的患者表达突变型 P53 蛋白^[1],其中浆液性原发性卵巢癌中 p53 基因的突变或过度表达更为常见。p53 基因的改变会随着期别的增高而增加,特别是与Ⅲ、Ⅳ期的病变有关^[2]。此外,在对化疗不敏感的患者中 p53 的突变率更高。研究证明,具有失活的 p53 的恶性肿瘤细胞系具有普遍的耐药趋势^[3]。在近10年开展的 p53 与疾病预后的相关研究中,获得一些有争论的结果^[2]。

2 p53 的基因治疗与卵巢癌

目前认为,肿瘤细胞内添加抑癌基因则有可能逆转肿瘤的恶性表现。鉴于 p53 与卵巢癌的密切关系,提出了卵巢癌

p53 基因治疗的最新策略。基因治疗是采用基因转移的方法(体内或回体)将外源基因(治疗基因)导入细胞并在体内有效表达,以纠正或补偿基因缺失或异常,从而达到治疗疾病的一种新型疗法。基因添加就是基因治疗的一种方法。通常载体可分为病毒载体(包括逆转录病毒)和非病毒载体(如脂质体)。在卵巢癌的 p53 基因治疗中,用于研究最多的重组腺病毒 p53 一般为2种:dl1520 和 SCH58500,均是 C 群腺病毒载体。dl1520 为第一代选择性复制腺病毒,是第2和第5血清型的嵌合体,在 E1B 区的第2496~3323 位核苷酸被删除, E1B 区的表达产物为55 kD 蛋白质,结合并使 p53 失活、允许连续 DNA 合成和病毒复制;在这个蛋白质的第三个密码子(第2022 位核苷酸)由 C 变成 T,使之成为终止密码,这种突变物缺乏早期基因产物而丧失在宿主细胞中的复制能力;在 E3 区插入野生型 p53(wtp53)基因,这就构成了 dl1520 的基本结构^[4]。SCH58500 属第5血清型腺病毒,删除了腺病毒的整个 E1 区,被1.4 kb 的全长 p53 基因所代替(rAdp53)^[5]。在 p53 基因上游可插入巨细胞病毒的强大启动子,来创造选择性复制;有的载体又在 p53 基因上游插入 *E. coli* 的 lacZ,编码 β-半乳糖苷酶(β-gal),使转基因产物易于检测。

近年来在理论研究的基础上,应用日新月异、迅猛发展的基因工程技术,对 p53 的基因治疗研究进行了不断深入的探索,基本分为以下几个阶段:

2.1 体外研究

将带有野生型 p53 基因的腺病毒载体(Adp53)转染卵巢癌细胞,可以观察到 p53 基因的存在并且细胞成功转录、表达 P53 蛋白。在此基础上,将 Adp53 转染耐受紫杉醇的卵巢癌细胞系,可以观察到 p21 水平增加,而在未转染 wtp53 的两个细胞系中,没有检测到 p21 的存在,说明转染 p53 基因使卵巢癌细胞系产生的 P53 蛋白是有功能的,而且转染后的细胞克隆形成明显减少^[6]。Wolf 等^[7]又证实了 Adp53 对具有内源性 wtp53 和突变型 p53 基因的卵巢癌细胞转染均有效。

他们发现只要有 50% 的载体发生转染,生长抑制效应即达 90% 以上。另外又有报道显示,Adp53 转染卵巢癌细胞后,可引起端粒酶的活性下降^[8],Xiap 的表达下调^[9],可以协同顺铂^[10]的作用,且凋亡指数均增加。这些均说明体外的 p53 转基因是有效的、可行的,这就给进一步的体内试验打下了坚实的基础。

2.2 临床前试验

体外试验的结果预示转基因治疗可能存在的巨大潜力,开始了有关 p53 基因治疗的动物实验研究。在重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠或裸鼠的腹腔内注射卵巢癌细胞(如 SK-OV3 细胞),建立人卵巢癌异体移植模型,腹腔内注射 dl1520 或 SCH58500,24 h 后切除肿瘤组织进行研究。研究结果显示,给予单次注射后,使用免疫组化染色检测到在肿瘤表面细胞中,表达野生型 p53 基因及 P53 蛋白可达 10 个细胞的渗透深度,并且细胞凋亡数量明显增加^[11]。在确定 p53 基因治疗确实可以在异体移植肿瘤组织中起到一定的作用,但结果仍不够理想后,为提高载体的生物学作用,进行了大量与化疗药物联合使用的临床前研究。研究发现,SCH58500 与紫杉醇、顺铂等合用,比较单纯使用者,肿瘤细胞凋亡水平显著增加^[11-12],并且 SCH58500 与紫杉醇、顺铂合用组中肿瘤体积明显减小,动物的生存时间增加显著。对于将耐顺铂卵巢癌肿瘤细胞异体移植到裸鼠的模型,SCH58500 腹腔注射后,可观察到肿瘤细胞广泛死亡,较对照组生存时间增加。在此基础上,再给予顺铂的治疗,生存时间又可增加 30% ~ 40%^[12],这些研究结果表明,p53 的基因治疗与化疗药物合用更加有效,由此提供了耐药后肿瘤治疗的新思路。另外还有研究显示,无论在裸鼠卵巢癌模型中野生型 p53 的表达与否,p53 基因治疗联合化疗后均可使 p21^[5],Bax^[13]等基因的表达明显升高,提示它可以作为一个治疗卵巢恶性肿瘤的新策略。Nielsen^[14]进一步对环磷酰胺做了相关研究,认为环磷酰胺与 SCH58500 联合使用不能增加 SCH58500 的作用,其结果与其它研究相反。此外,虽有很多研究明确了 p53 基因治疗与化疗药物(如紫杉醇、顺铂、柔红霉素等)的协同作用,以及联合治疗较单纯治疗在生存时间上有明显的增加,但在长期的生存率方面并没有显示出明显的优势。因此尚需进一步的研究探讨相关的问题。

2.4 临床试验

由于临床前试验带来了可喜的结果,美国 FDA 于 1995 年批准重组腺病毒用于人体试验,期望它能够成为改善复发型、难治型卵巢癌预后,提高生存率的一个新途径。2002 年 Buller 等^[15]对在人体使用 p53 基因治疗的安全性、转基因的有效性、宿主的免疫反应、药物代谢动力学方面进行了 I/II 期临床研究。结果显示,不同剂量治疗组均未发生与剂量相关的毒性反应。发热、恶心、呕吐是最常见的副作用。因此腹腔内注射 SCH58500 是安全的、可以耐受的。虽然病人血清中抗腺病毒抗体的滴度显著增加,但可在 85% 的病人中检测到转基因。在 24 h 后可在肿瘤中检测到载体,并可持续 7 d,在尿液、粪便中未测到载体。有 50% 多次剂量联合治疗后

的病人血清中,CA125 降低 50% 以上。这些结论均与 Vasey 等^[16]所观察的结果相似。另外, Buller 等^[17]对复发性卵巢癌病人的基因治疗做了回顾性分析,发现使用单次剂量 SCH58500 治疗的病人生存时间为 5 个月,这与对卵巢癌病人进行姑息性放疗和紫杉醇化疗失败的生存期相同。而在顺铂化疗基础上进行多次剂量、多个循环的治疗组,平均生存时间达 12 ~ 13 个月,这与紫杉醇二线治疗的平均生存时间(16 个月)相似。显然多次给药要比单次给药效果好,SCH58500 治疗效果可以达到紫杉醇二线药物治疗的水平。尽管如此,关于 SCH58500 的研究仍然是需要进一步深入的。

在 Buller 等^[16-17]建立了 SCH58500 局部注射的安全性和可行性的基础上,Wen 等^[18]对载体的生物学行为和转基因后的表达水平进行了评估。研究结果表明,进入肿瘤的 SCH58500 的水平对于诱导 p53 介导的转录活性来说是足够的,虽然它诱导的下游基因 bax,mdm2,caspase-3 并没有呈现持续的升高,但 p21 基因的转录活性却持续升高;在每个周期给药前和第 4 次给药后的病人活检肿瘤组织中,可观察到细胞凋亡呈明显的增加趋势。即使腺病毒抗体不断增加,rAdp53 的 DNA 和 RNA 仍升高,可能由于这种抗体不足以穿透实体肿瘤而影响肿瘤细胞中 p53 的表达行为有关。还无证据说明转基因得到的 P53 蛋白的表达水平是否足以达到有效的抗肿瘤作用。值得注意的是,在此试验中有一个病人在 3 个周期的治疗后,盆腔软组织团块、肺小结节样转移物和恶性腹水完全消失,肾脏的团块减小,虽然不能确定完全是基因治疗的结果,但可以肯定的说,基因治疗至少起到一定的作用。

3 存在的问题和展望

重组人 p53 腺病毒注射液于 2003 年 10 月获中国 SFDA 颁发的新药证书,标志着世界首个基因治疗产品问世,2004 年 1 月获中华人民共和国准字号批文正式上市,但学者们对于 p53 的基因治疗仍颇有争议。目前关于卵巢癌 p53 的基因治疗已获得一定成效,但无论是关于它的基础研究还是临床试验仍有大量工作有待完成。p53 基因治疗在关于细胞凋亡、转基因、剂量的探索等方面获得了一些进展,但在提高长期生存率、增加总体有效性等方面尚未达到所期望的结果。究其原因,可能有下列几点:

3.1 肿物大小

任何药物作用于肿瘤中心都是依赖于血管的作用,因此在局部给药中肿瘤团块的大小成为 p53 基因治疗腹腔内注射的决定性因素,Heise 等^[19]研究异体移植小鼠模型中,直径小于 2 mm 的肿瘤基因治疗后可完全消失,而大于 2 mm 的肿瘤却没有明显抑制生长,因此治疗效果不佳可能与肿瘤体积大,药物无法进入有关。

3.2 给药方式

基因治疗的三种给药方式为肿瘤内注射、局部注射(包括近治疗部位的动脉注射和腔隙注射)及静脉注射。究竟哪一种方法更适用于卵巢癌的治疗,还需更多的研究定论。

3.3 宿主免疫功能

虽然有的研究认为在可检测到抗腺病毒抗体不断增加时,肿瘤细胞中仍可检测到转基因的表达^[15,18],但确实有证据表明腺病毒载体激发了 MHC I 类分子限制的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对病毒抗原的免疫应答,足以影响腺病毒载体的作用^[20]。所以宿主的免疫反应已成为基因治疗的主要障碍,将来的研究方向可能会集中于使用一些细胞因子来抑制 CTL 的作用。

3.4 多基因改变和后遗传性改变

癌症是一种多基因改变、多步骤的疾病,虽然 p53 基因的改变在卵巢癌的发病中起着不可替代的作用,但仍有其它基因如 *brcal* 等的改变也很重要,是否需要同时转染多种基因多种载体还需进一步探索。

3.5 载体

目前正在致力于发展具有准确的定向作用、高转染率、高选择性、转基因表达的稳定、逃逸宿主免疫反应等能力的载体。

另外,在构建载体时,可以使用一些自杀基因如 HSV-TK 等,增强诱导作用;并且还可以通过插入不同的启动子如 COX2 或 MDC1/DF3 等,来增加目的基因的选择性复制。此外,还有转基因有效性的问题、确立统一的临床比较参数和标准等也有待于解决。随着生物技术的提高、分子生物学研究的进展,会给 p53 基因治疗带来新的契机。相信基因治疗会成为继手术治疗、化学治疗、放射治疗之后的又一种治疗卵巢癌的有效方法。

[参 考 文 献]

- [1] Alvarez AA, Axelrod JR, Whitaker RS, *et al.* Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: Association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(2): 273-278.
- [2] Skirnisdottir I, Seidal T, Gerdin E, *et al.* The prognostic importance of p53, bcl-2, and bax in early stage epithelial ovarian carcinoma treated with adjuvant chemotherapy[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2002, 12(3): 265-276.
- [3] Cimoli G, Valenti M, Ottoboni C, *et al.* HPV16-E6 enhances mitoxantrone sensitivity in a human ovarian cancer line: An isolated instance or a trend? [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 759-765.
- [4] Dobbstein M. Replicating adenoviruses in cancer therapy[J]. *Curr Top microbiol Immunol*, 2004, 273: 291-334.
- [5] Wen SF, Xie L, McDonald M, *et al.* Development and validation of sensitive assays to quantitate gene expression after p53 gene therapy and paclitaxel chemotherapy using *in vivo* dosing in tumor xenograft models[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(11): 1469-1480.
- [6] Balachandran R, Welsh MJ, Day BW. Altered levels and regulation of stathmin in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(55): 8924-8930.
- [7] Wolf JK, Mills GB, Bazzet L, *et al.* Adenovirus-mediated p53

growth inhibition of ovarian cancer cells is independent of endogenous p53 status[J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 75(2): 261-266.

- [8] Akeshima R, Kigawa J, Takahashi M, *et al.* Telomerase activity and p53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(11): 1551-1555.
- [9] Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F, *et al.* Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5659-5666.
- [10] Kigawa J, Terakawa N. Adenovirus-mediated transfer of a p53 gene in ovarian cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 465: 207-214.
- [11] Grace MJ, Xie L, Musco ML, *et al.* The use of laser scanning cytometry to assess depth of penetration of adenovirus p53 gene therapy in human xenograft biopsies[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(6): 1869-1878.
- [12] Song K, Cowan KH, Sinha BK. *in vivo* studies of adenovirus-mediated p53 gene therapy for cis-platinum-resistant human ovarian tumor xenografts[J]. *Oncol Res*, 1999, 11(3): 153-159.
- [13] Shimada M, Kigawa J, Kanamori Y, *et al.* Mechanism of the combination effect of wild-type TP53 gene transfection and cisplatin treatment for ovarian cancer xenografts[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(14): 1869-1875.
- [14] Nielsen LL. Combination therapy with SCH58500 (p53 adenovirus) and cyclophosphamide in predinical cancer models[J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(6): 1191-1196.
- [15] Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY, *et al.* A phase I / II trial of rAd-p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(7): 553-566.
- [16] Vasey PA, Shulman LN, Campos S, *et al.* Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(6): 1562-1569.
- [17] Buller RE, Shahin MS, Horowitz JA, *et al.* Long term follow-up of patients with recurrent ovarian cancer after Ad p53 gene replacement with SCH 58500 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(7): 567-572.
- [18] Wen SF, Mahavni V, Quijano E, *et al.* Assessment of p53 gene transfer and biological activities in a clinical study of adenovirus-p53 gene therapy for recurrent ovarian cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(3): 224-238.
- [19] Heise C, Lemmon M, Kim D. Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: Dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(12): 4908-4914.
- [20] Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits E1B-deleted adenoviruses for gene therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(10): 4407-4411.

[收稿日期] 2005 - 05 - 15

[修回日期] 2005 - 06 - 01

[本文编辑] 王莹