

[文章编号] 1007-385X(2006)06-

## 重组 p53 腺病毒联合中药治疗腹水瘤的疗效

### Synergistic antitumor effect of adenoviral-mediated p53 gene transfer and DeLisheng in an ascitic tumor-bearing mouse model

张开通<sup>1</sup>, 戚晓东<sup>1</sup>, 黄 灵<sup>1</sup>, 杨之斌<sup>1</sup>, 姜乃佳<sup>1</sup>, 翟红岩<sup>2</sup>(1. 首都医科大学 附属北京同仁医院肿瘤中心, 北京 100730; 2. 泰安市肿瘤医院放三科, 山东泰安 271000)

[摘要] 目的: 探讨 p53 腺病毒注射液(简称 Ad-p53)联合中药得力生及消癌平治疗腹水瘤的协同作用。方法: 建立昆明小鼠 H22 肝癌腹水瘤模型, 建模 48 h 后分组分别给予 Ad-p53、中药得力生和消癌平或两药联用。用药 1 周后检测体重、腹围、腹水量、腹水瘤细胞计数, 流式细胞仪测定瘤细胞凋亡百分比以及细胞周期情况。结果: Ad-p53、得力生、消癌平单药治疗组, 除体重以外的上述指标与对照组比较均有统计学差异( $P < 0.05$ ), Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组的腹围增长率、腹水量、瘤细胞计数、晚期细胞凋亡率均明显少于各单药治疗组( $P < 0.05$ )。结论: 腹腔注射 Ad-p53、得力生和消癌平均可抑制 H22 细胞生长并减少腹水形成, Ad-p53 与中药得力生、消癌平联合腹腔内给药对治疗腹水瘤有协同作用。

[关键词] p53; 基因治疗; 得力生; 消癌平; 腹水瘤

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A

腹膜转移是胃肠、卵巢等腹、盆腔恶性肿瘤术后治疗失败的重要原因之一, 平均自然生存期不到 6 个月<sup>[1]</sup>。关于腹膜转移的治疗有多种手段<sup>[2]</sup>, 但尚无理想的方法。近年来用重组腺病毒 p53 制剂治疗腹腔转移取得了一定疗效<sup>[3]</sup>, 源于 50% ~ 60% 的腹膜转移癌中有 p53 基因的突变<sup>[4]</sup>。重组腺病毒 p53 制剂(Ad-p53)以腺病毒为载体将野生型 p53 基因导入肿瘤细胞, 能恢复 p53 基因的功能, 正在成为临床肿瘤基因治疗的一种新药物, 对晚期恶性肿瘤有一定的控制和改善<sup>[3]</sup>。抗癌中药得力生、消癌平具有诱导癌细胞凋亡<sup>[5]</sup>以及提高机体免疫力、减毒增效的作用。本课题将 rAd-p53 分别与中药得力生、消癌平联合腹腔给药, 观察其控制癌性腹水的协同作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及实验动物

雌性昆明小鼠 60 只, 20 ~ 22 g; 小鼠肝癌 H22 瘤株(购自中国医学科学院细胞中心); 重组 p53 腺病毒注射液(rAd-p53, 深圳赛百诺基因技术有限公司, 批号 20041205); 中药得力生(北京正邦制药有限公司, 批号 050504); 中药消癌平(南京圣和药业有限公司, 批号 200412231)。

### 1.2 H22 肝癌腹水瘤小鼠模型的建立

将 -80 °C 冷冻之 H22 肝癌细胞复苏后, 注射入昆明鼠腹腔传代, 7 ~ 9 d 后, 腹水生成明显。在无茵条件下取腹水, 以 1640 培养液调整腹水中瘤细胞密度, 每只小鼠腹腔注射等量瘤细胞悬液 1 ml (含  $1 \times 10^6$  个瘤细胞), 建立腹腔转移动物模型。

### 1.3 实验动物分组

将模型小鼠随机分 6 组, 分别为: (1) 空白对照组; (2) Ad-p53 组; (3) 得力生组; (4) Ad-p53 + 得力生组; (5) 消癌平组; (6) Ad-p53 + 消癌平组。每组模型鼠 10 只。治疗实验(建模后 48 h 起给药, 共 1 周): (1) 空白对照组, 不给药带瘤生存; (2) Ad-p53 组, 隔日 1 次腹腔注射 Ad-p53 0.2 ml ( $1 \times 10^{10}$  vp, viral particle), 共 3 次; (3) 得力生组, 每日 1 次腹腔注射得力生原液 0.2 ml/只, 共 6 次; (4) Ad-p53 + 得力生组, 用药同单用组; (5) 消癌平组, 每日 1 次腹腔注射消癌平 0.4 ml/只, 共 6 次; (6) Ad-p53 + 消癌平组, 用药同单用组。

### 1.4 小鼠肿瘤的一般指标测定

(1) 体重增长率: 注射瘤细胞当天及最后一天以天平测量体重, 计算体重增长率(体重增长率 = 体重差值/初始体重); (2) 腹围增长率: 注射瘤细胞当天及最后一天以软尺测量腹围, 计算腹围增长率(腹围增长率 = 腹围差值/初始腹围); (3) 腹水量: 实验结束, 处死小鼠, 以无茵注射器抽取并测量; (4) 腹水瘤细胞计数: 稀释腹水, 显微镜下计数。

### 1.5 鼠 H22 肝癌腹水瘤细胞凋亡的测定

取腹水原液 100  $\mu$ l, 冷 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 离心 1 000 r/min, 5 min, 4 °C, 弃上清液。250  $\mu$ l 结合缓冲液重新悬浮细胞, 加入 5  $\mu$ l Annexin-V/FITC 和 10

[作者简介] 张开通(1980-), 男, 江苏徐州人, 住院医师, 主要从事腹部肿瘤的防治研究。

[通讯作者] 戚晓东, E-mail: qixiaot@yeah.net

μl 20 μg/ml 的 PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 再加入 250 μl 结合缓冲液, 1 h 内上流式细胞仪分析, 比较各组早期及晚期凋亡率。

### 1.6 H22 肝癌腹水瘤的细胞周期测定

取腹水原液 100 μl, 用冷 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次(1 000 r/min, 5 min, 4 °C, 弃上清液), 加入 70% 冰乙醇 1 ml, 置于 4 °C 冰箱中 1 h, 离心, PBS 液重悬, 用 300 目滤网过滤后离心, 加入 PI/RNase-A 酶配方液 1 ml, 避光, 4 °C 存放 30 min 后流式分析, 测定 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub>-M 期各期百分比。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件, 正态分布资料以均值 ± 标准差(  $\bar{x} \pm s$  )表示。组间先行单因素方差分析, 如有统计学意义, 再行析因分析。

## 2 结 果

表 1 重组 p53 腺病毒联合中药治疗小鼠腹水瘤的疗效观察(  $\bar{x} \pm s$  )

分 组	腹围增长 率( % )	腹水量 ( ml )	瘤细胞计数 ( ml <sup>-1</sup> , ×10 <sup>7</sup> )	凋亡率( % )		细胞周期( % )		
				早期	晚期	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M
空白对照组	0.40 ± 0.02	11.1 ± 2.1	13.3 ± 1.2	0.71 ± 0.18	1.17 ± 0.28	22.84 ± 4.56	71.86 ± 3.66	5.30 ± 1.76
p53 组	0.36 ± 0.02	9.1 ± 1.6	12.8 ± 1.0	0.80 ± 0.16	3.69 ± 0.46	26.55 ± 3.52	68.74 ± 3.95	4.71 ± 1.64
得力生组	0.38 ± 0.03	9.7 ± 1.31	2.8 ± 1.3	0.65 ± 0.13	2.82 ± 0.26	26.18 ± 2.32	61.16 ± 2.01	12.66 ± 1.32
p53 + 得力生组	0.31 ± 0.03*	5.3 ± 1.0* <sup>△</sup>	7.8 ± 1.1* <sup>△</sup>	0.78 ± 0.14	6.13 ± 0.51* <sup>△</sup>	29.09 ± 4.54*	52.20 ± 4.86*	18.71 ± 0.82*
消癌平组	0.37 ± 0.03	9.2 ± 1.3	12.7 ± 1.4	0.63 ± 0.19	2.24 ± 0.35	26.18 ± 2.31	69.17 ± 2.01	4.65 ± 1.32
p53 + 消癌平组	0.30 ± 0.02*	5.0 ± 1.3* <sup>▲</sup>	7.7 ± 1.0* <sup>▲</sup>	0.78 ± 0.13	5.43 ± 0.52* <sup>▲</sup>	35.08 ± 4.55* <sup>▲</sup>	60.22 ± 4.85*	4.70 ± 0.84*

\* P < 0.05 与空白对照组比较; <sup>△</sup> P < 0.05 与 Ad-p53 组或得力生组比较; <sup>▲</sup> P < 0.05 与 Ad-p53 组或消癌平组比较

### 2.4 各种用药方案对肝癌腹水瘤细胞细胞周期的影响

空白对照组、Ad-p53 组、得力生组及 Ad-p53 + 得力生组之间比较: G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期无统计学差异( P > 0.05 )。各用药组 S 期均较对照组缩短, 药物合用组最明显; G<sub>2</sub>-M 期, 得力生组较对照组延长, Ad-p53 组较对照组缩短( G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期相应延长), 两药合用后 G<sub>2</sub>-M 期明显延长( P < 0.05 )。空白对照组、Ad-p53 组、消癌平组及 Ad-p53 + 消癌平组之间比较: G<sub>2</sub>-M 期无统计学差异( P > 0.05 )。G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期各用药组均较对照组延长, 药物合用组最明显; S 期各用药组均较对照组相应缩短, 药物合用组最为显著( P < 0.05 )。

## 3 讨 论

p53 基因是一个重要的抑癌基因, 人类肿瘤中发现有 50% 以上存在 p53 基因的突变或缺失<sup>[6]</sup>, p53 功能缺失导致肿瘤细胞恶性程度增加, 并对放、化疗敏感性降低<sup>[2]</sup>。rAd-p53 以腺病毒为载体将野生型 p53 基因导入

### 2.1 成功建立 H22 肝癌腹水瘤小鼠模型

接种瘤细胞后 1 周腹水生成明显, 乳白色, 2 周存活率 100%。

### 2.2 各种用药方案对小鼠肿瘤一般指标的影响

用药组除体重增长率与对照组无差别( P > 0.05 )以外, 腹围增长率、腹水量、瘤细胞计数均较对照组减小, 两个药物合用组最明显( P < 0.05, 表 1 )。Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组小鼠腹水量及瘤细胞计数均明显少于 Ad-p53、得力生、消癌平各单药治疗组( P < 0.05 )。

### 2.3 各种用药方案对肝癌腹水瘤细胞致凋亡作用

表 1 显示各组间早期凋亡无统计学差异( P > 0.05 )。晚期凋亡: 各用药组晚期凋亡率均高于对照组( P < 0.05, 表 1 )。Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组的细胞凋亡率显著高于各单药治疗组( P < 0.05 )。

肿瘤细胞, 恢复 p53 基因的功能, 从而调控细胞周期和诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>, 增加肿瘤对化、放疗的敏感性<sup>[3]</sup>, 还可通过旁观者效应, 抑制肿瘤血管内皮生长因子、抑制肿瘤血管生成, 从而杀灭肿瘤细胞<sup>[7]</sup>。大量基础和临床研究结果表明 p53 基因治疗恶性肿瘤安全有效<sup>[3,8]</sup>。本实验以 rAd-p53、得力生、消癌平三药单用及 rAd-p53 与两中药分别联用治疗 H22 肝癌腹水瘤, 结果显示, 3 个药物单用组腹围增长率、腹水量、腹水瘤细胞计数均较空白对照组减小, 晚期凋亡百分比明显增加, 说明三药均显示出了杀灭肿瘤细胞的作用, 诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。药物联用之后上述指标更优, 可认为药物联用有协同作用。细胞周期分析则显示, p53 组和消癌平组 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期延长, S 期相应缩短, 可推测两种药物均使肿瘤细胞阻滞于 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期, 这与相关文献报道一致<sup>[5,9]</sup>。得力生组 G<sub>2</sub>-M 期百分比增加, 说明药物作用使细胞周期阻滞于此期<sup>[5]</sup>。rAd-p53 与得力生合用后细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>-M 期, 可能是由于两药联用后得力生阻

滞细胞周期的作用更为明显所致;与消癌平合用 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期阻滞更明显,表明两药协同作用于此期。肿瘤是一个全身性疾病,综合治疗已成为共识。p53 基因治疗为综合治疗肿瘤开辟了新的天地,本试验通过重组 p53 腺病毒注射液联合中药对腹水瘤的实验研究,希望能为其进一步临床应用提供参考依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, *et al.* Peritoneal carcinomatosis from non - gynecologic malignancies: Results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study[ J ]. *Cancer*, 2000, 88: 358-363.

[ 2 ] 戚晓东, 王 江, 魏政立, 等. 纤维蛋白粘合剂包埋顺铂治疗腹膜移植瘤的研究[ J ]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20( 10 ): 955.

[ 3 ] 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.

[ 4 ] Soslow RA, Slomovitz BM, Saqi A, *et al.* Tumor suppressor gene, cell surface adhesion molecule, and multidrug resistance in Mu<sup>+</sup> llerian Serous Carcinomas: Clinical divergence without immunopheno-

typic differences[ J ]. *Gynecologic Oncology*, 2000, 79: 430-437.

- [ 5 ] Hong CY, Huang SC, Lin SK, *et al.* Norcantharidin - Induced post - G<sub>2</sub>/M apoptosis is dependent on wild-type p53 gene[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276( 1 ): 278-285.
- [ 6 ] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[ J ]. *Cell*, 1997, 88( 3 ): 323-331.
- [ 7 ] Zhang LL, Yu DH, Hu M, *et al.* Wild - type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression [ J ]. *Cancer Res*, 2000, 60: 3655-3661.
- [ 8 ] Ohtani S, Kagawa S, Tango Y, *etc.* Quantitative analysis of p53 - targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo* [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3( 1 ): 93-100.
- [ 9 ] 李茂全, 沈建华, 胥 彬, 等. 消癌平对 SGC27901 胃癌细胞的作用及机制的实验研究[ J ]. *介入放射学杂志*, 2001, 10( 4 ): 228-231.

[ 收稿日期 ] 2006 - 10 - 08

[ 修回日期 ] 2006 - 11 - 20

[ 本文编辑 ] 王 莹