

Recombinant adenovirus-p53 gene therapy combined with transcatheter arterial chemoembolization for p53-positive and p53-negative hepatocellular carcinoma

OU Sheng-qiu, MA Yi-long*, KANG Ping, LI Zhi-kun, MENG Zhi-bin, QI Feng
(Department of Interventional Therapy, Tumour Hospital of Guangxi
Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective To evaluate the clinical effect of recombinant adenovirus-p53 (rAd-p53) gene combined with transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Sixty patients with advanced HCC, 30 patients with p53 expression-positive and 30 with p53 expression-negative, were treated with rAd-p53 combined with TACE (therapy group). Another 60 patients with advanced HCC, 30 patients with p53 expression-positive and 30 with p53 expression-negative, were treated with TACE of the corresponding period (control group). The clinical effect of therapy group and control group with different expression of p53 was compared, and the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) before and after therapy was measured and compared respectively. **Results** In p53-positive patients, the effective rate of therapy group (73.33%) was higher than that of control group (46.67%) ($P < 0.05$). The increase range of VEGF in therapy group was lower than that in control group ($P < 0.05$). In the p53-negative patients, the effective rate in therapy group and control group was 66.67% and 60.00%, respectively ($P > 0.05$). The increase range of VEGF before and after therapy had no statistical difference between therapy group and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** In the therapy of advanced hepatocellular carcinoma, rAd-p53 combined with TACE can increase the clinical effect of the p53-positive patients and can inhibit the increase range of VEGF after TACE as well.

[Key words] Carcinoma, hepatocellular; Gene therapy; Genes, p53; Adenovirus, human; Embolization, therapeutic; Vascular endothelial growth factor A

重组人 p53 腺病毒联合经肝动脉化疗栓塞治疗不同 p53 表达的中晚期肝细胞癌

欧盛秋, 马亦龙*, 康平, 李志坤, 蒙志斌, 齐锋
(广西壮族自治区肿瘤医院介入治疗科, 广西南宁 530021)

[摘要] 目的 观察重组人 p53 腺病毒(rAd-p53)基因联合经导管动脉栓塞化疗术(TACE)治疗不同 p53 表达的中晚期肝细胞癌的临床疗效。**方法** rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗中晚期肝细胞癌患者共 60 例(治疗组),其中 p53 表达阳性、阴性各 30 例;同期接受常规 TACE 治疗的中晚期肝细胞癌患者 60 例(对照组),p53 表达阳性、阴性各 30 例,并分别比较 p53 表达阳性和阴性的治疗组与对照组的疗效;同时检测各组患者治疗前后血管内皮生长因子(VEGF)水平,并进行比较。**结果** p53 表达阳性患者中,治疗组有效率为 73.33%,明显高于对照组的 46.67% ($P < 0.05$);治疗前后 VEGF 升高的幅度比较,治疗组小于对照组 ($P < 0.05$)。p53 表达阴性患者中,治疗组及对照组有效率分别为 66.67% 和 60.00%,

[基金项目] 广西科技厅资助课题(桂科回 0144013)。

[作者简介] 欧盛秋(1972—),男,广西合浦人,硕士,副主任医师。研究方向:肿瘤介入治疗。E-mail: oushengqiu@126.com

[通讯作者] 马亦龙,广西壮族自治区肿瘤医院介入治疗科,530021。E-mail: MaYL74@Yahoo.cn

[收稿日期] 2009-11-10 [修回日期] 2010-03-10

差异无统计学意义($P>0.05$);治疗组与对照组治疗前后 VEGF 升高的幅度差异较亦无统计学意义($P>0.05$)。结论 rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗中晚期肝细胞癌,能够提高 p53 表达阳性的患者的疗效,并能有效抑制 TACE 术后 VEGF 升高的幅度。

[关键词] 癌,肝细胞;基因治疗;基因,p53;腺病毒,人;栓塞,治疗性;血管内皮生长因子 A

[中图分类号] R735.7;R816 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2010)04-0354-04

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,病程进展快,患者就诊时往往已属中晚期,绝大部分已失去手术机会。对于失去手术机会的中晚期 HCC 患者,经导管动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)疗效确切,为首选治疗方法。随着世界首个基因治疗药物重组人 p53 腺病毒(recombinant adenovirus-p53, rAd-p53)注射液上市,rAd-p53 已广泛用于 HCC、肺癌等多种恶性肿瘤的临床治疗,并取得较好疗效^[1-3];但对于 p53 基因治疗不同 p53 表达的 HCC 有无疗效则鲜见报道。2007 年 9 月—2009 年 5 月我科采用 rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗 p53 表达阴性及阳性的中晚期 HCC 患者 120 例,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 9 月—2009 年 5 月在我院住院的 HCC 患者 120 例,均为临床分期(TNM)Ⅲ~Ⅳ期,丧失手术机会或不愿接受手术治疗的患者。所有患者均经肝穿刺活检病理确诊,同时进行 p53 基因检测。其中 60 例 HCC 患者接受 rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗(治疗组),同期接受常规 TACE 治疗的 60 例 HCC 患者作为对照组,每组 p53 表达阳性及阴性患者各 30 例。所有患者均签署知情同意书,并经医院伦理委员会讨论通过。

阳性治疗组:男 22 例,女 8 例,年龄 19~71 岁,中位年龄 44 岁,临床分期(TNM)Ⅲ期 13 例,Ⅳ期 17 例,病理分级(Edmondson)Ⅰ~Ⅱ级 9 例,Ⅲ~Ⅳ级 21 例;阳性对照组:男 23 例,女 7 例,年龄 18~73 岁,中位年龄 41 岁,临床分期Ⅲ期 11 例,Ⅳ期 19 例,病理分级Ⅰ~Ⅱ级 11 例,Ⅲ~Ⅳ级 19 例。阴性治疗组:男 20 例,女 10 例,年龄 19~70 岁,中位年龄 43 岁,临床分期Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 18 例,病理分级Ⅰ~Ⅱ级 19 例,Ⅲ~Ⅳ级 11 例;阴性对照组:男 21 例,女 9 例,年龄 20~74 岁,中位年龄 45 岁,临床分期Ⅲ期 14 例,Ⅳ期 16 例,病理分级Ⅰ~Ⅱ级 20 例,Ⅲ~Ⅳ级 10 例。

p53 阳性(或阴性)治疗组与对照组患者的性别构成、年龄、临床分期、病理分级差异均无统计学意义($P>0.05$),两组疗效具有可比性;但 p53 阳性与 p53 阴

性患者的病理分级差异有统计学意义($P<0.05$)。

1.2 方法 对照组接受单纯 TACE 治疗,采用 Seldinger 法常规穿刺股动脉,将 5F RH 导管插入腹腔动脉干或肝总动脉进行造影,明确肿瘤数目、位置、类型、大小,供养血管以及动静脉瘘等情况,并行肠系膜上动脉或膈动脉造影,以寻找肝癌其他供血动脉。如有动-静脉瘘,先行明胶海绵栓塞。在肝固有动脉注入 5-FU 1 g、HCPT 30 mg 进行灌注化疗,然后将导管尽量超选至肿瘤供血动脉,根据血供情况确定栓塞剂用量。在透视监视下缓慢注入超液态碘化油+ADM 50 mg 混悬液 10~30 ml。一般间隔 4 周进行 1 次 TACE。治疗组采取 rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗,化疗用药同对照组,但栓塞剂选用液态碘化油 10~30 ml+rAd-p53 注射液 2×10^{12} VP 混悬液,连续 3~4 次。2 次治疗后评价疗效,主要观察治疗前后的肿瘤大小变化;术前及术后 1 周测定每例患者血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平。疗效按照 WHO《实体瘤疗效判定标准》分为:完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、无变化(stable disease, SD)、进展(progressive disease, PD)。

1.3 p53 检测采用抗生物素-生物素免疫染色法(S-P 法),S-P 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 显色剂购自福州迈新公司;VEGF 检测采用双抗夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA),VEGF 检测试剂盒购于深圳晶美生物公司。

1.4 rAd-p53 由深圳市赛百诺基因技术有限公司研制生产,水针剂型,规格 1×10^{12} VP/支,商品名:今又生,药品置于 -20°C 保存,使用时于室温静置融化。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 14.0 软件处理数据,计量资料采用 t 检验和方差分析,等级资料采用秩和检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 治疗次数 阳性治疗组接受 TACE 治疗次数平均为 3.6 次/例,对照组为 3.3 次/例;阴性治疗组接受 TACE 治疗次数平均为 3.4 次/例,对照组为 3.5 次/例,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 治疗效果 阳性治疗组 PR 22 例,SD 4 例,PD 4 例,无 CR 患者;阳性对照组 PR 14 例,SD 8 例,PD 8 例,无 CR 患者。阳性治疗组的有效率为 73.33% (22/30),明显高于阳性对照组(46.67%,14/30),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.440, P < 0.05$)。阴性治疗组 PR 20 例,SD 6 例,PD 4 例,无 CR 患者;阴性对照组 PR 18 例,SD 7 例,PD 5 例,无 CR 患者。阴性治疗组与阴性对照组的有效率分别为 66.67% (26/30)和 60.00% (25/30),差异无统计学意义($\chi^2 = 1.335, P > 0.05$)。

2.3 各组治疗前后 VEGF 的变化见表 1。p53 表达阳性或阴性的 HCC 患者,TACE 治疗后 VEGF 浓度均较术前增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 p53 表达阳性患者中,治疗后 VEGF 升高的幅度治疗组 [$(27.00 \pm 7.40) \text{ ng/ml}$] 小于对照组 [$(56.00 \pm 13.20) \text{ ng/ml}$],差异有统计学意义($t = 10.50, P < 0.05$);而在 p53 表达阴性的患者中,治疗组 [$(55.03 \pm 9.82) \text{ ng/ml}$] 及对照组 [$(51.10 \pm 8.23) \text{ ng/ml}$] 治疗前后 VEGF 升高的幅度差异则无统计学意义($t = -1.68, P > 0.05$)。

表 1 各组治疗前后 VEGF 的变化 (ng/ml)

组别	治疗前	治疗后	t 值	P 值
阳性治疗组	211.18±14.19	238.18±15.27	3.66	<0.05
阳性对照组	210.89±14.40	266.89±16.12	6.98	<0.05
阴性治疗组	198.18±13.19	253.21±14.16	4.02	<0.05
阴性对照组	195.89±12.40	246.99±13.12	4.04	<0.05

3 讨论

p53 是一种抑癌基因,所编码的蛋白称为 p53 蛋白,人体几乎所有组织都有 p53 蛋白的表达。p53 蛋白表达水平低,半衰期短,在正常人体组织中往往难以检测到 p53 蛋白;如能检测到 p53 蛋白的表达,多认为是发生突变的 p53 基因产物。

p53 基因突变与多种肿瘤的发生、发展和转归关系密切;HCC 中 p53 的异常表达已被大量的研究所证实。本研究组的前期研究表明,p53 阳性表达的 HCC 恶性程度较高,侵袭性较强,预后较差^[4-5]。研究表明^[6-7],p53 基因对肿瘤的治疗作用主要源于 p53 蛋白参与调节细胞周期的调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等抗癌生物学功能;与化疗或放疗联合应用,能增强肿瘤细胞对化疗、放疗的敏感性,并可降低化疗和放

疗的不良反应^[8]。经动脉内灌注被认为是最有效的释放基因药物的方法之一,灌注后可实现高浓度的药物大量到达肿瘤细胞^[9]。本研究应用 rAd-p53 联合 TACE 治疗 HCC,通过肝动脉途径,利用高浓度腺病毒的转染作用将 p53 基因导入 HCC 细胞,表达 p53 蛋白,从而发挥抑制细胞分裂、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。本研究结果显示,p53 基因联合 TACE 治疗 HCC,p53 表达阳性的患者中治疗组有效率为 73.33%,显著高于对照组的 46.67%,两种疗法联合有协同作用;而 p53 表达阴性的患者中治疗组与对照组的疗效比较差异无统计学意义。本研究结果提示,通过肝动脉灌注 rAd-p53 表达合成的 p53 蛋白,可能使在 p53 基因突变的 HCC 中所产生的杀伤癌细胞、诱导凋亡等一系列生物抑癌作用更加显著,而在 p53 基因无突变的 HCC 中上述生物效应的抑癌作用不明显。此研究结果对 p53 基因治疗 HCC 的患者选择有临床意义,但具体机制尚待进一步研究。

研究表明,野生型 p53 基因导入肿瘤细胞后,可以通过上调新生血管形成抑制因子 thrombospondin-1 的表达^[10]或下调 VEGF 的表达^[11],而 VEGF 在 HCC 生长、浸润、转移及复发的过程中发挥着至关重要的作用。TACE 治疗后肿瘤供血动脉栓塞、肿瘤组织缺血、肿瘤细胞缺氧,VEGF 的表达上调,诱导形成新生肿瘤血管,有利于残留的肿瘤细胞生长和转移;临床联合应用肿瘤血管抑制剂和栓塞化疗有望更好地切断肝癌的血供,杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞复发和转移^[12]。本研究中,无论 p53 表达阳性或阴性的 HCC 患者,TACE 治疗后 VEGF 浓度均较术前明显升高;但在 p53 表达阳性患者中,采用 rAd-p53 注射液联合 TACE 的治疗组 VEGF 升高的幅度小于采用常规 TACE 治疗的对照组;而在 p53 表达阴性的患者中,治疗组与对照组治疗前后 VEGF 升高幅度差异无统计学意义;对比结果表明,采用 rAd-p53 注射液联合 TACE 治疗 HCC,对 p53 表达阳性患者,rAd-p53 更能有效抑制 TACE 术后肿瘤缺血缺氧而致的 VEGF 增高,从而遏制肿瘤边缘血管的新生,降低 TACE 术后复发转移的危险性,达到延长患者生存期的目的。

本研究结果表明,p53 基因联合 TACE 治疗中晚期的 HCC,p53 表达阳性的患者较阴性患者临床获益更显著;但也有基础及临床研究发现肿瘤细胞内基因的状态与 rAd-p53 制品诱导肿瘤细胞凋亡的作用、疗效并无相关性。各项研究间可能存在给药方法、病例病种选择等方面的差异,也有可能由于本研究时间短、

病例较少等影响了结果的客观性和准确性。同时, p53 基因治疗肿瘤的机制复杂, 有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 官泳松, 孙龙, 周翔平, 等. 重组人 p53 腺病毒基因局部注射联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌. 世界华人消化杂志, 2005, 13(1):125-127.
- [2] 朱志兵, 刘积良, 隋捷, 等. 重组人 p53 腺病毒治疗晚期难治性肝癌的临床研究. 中华医药杂志, 2004, 3(11):11-14.
- [3] 官泳松, 刘源, 贺庆, 等. p53 基因(今义生[®])联合支气管动脉化疗治疗肺癌 15 例近期疗效观察. 中国介入影像与治疗学, 2005, 2(6):405-408.
- [4] 欧盛秋, 马亦龙, 崔英, 等. p53 表达与肝细胞癌临床病理学特征及 AFP、HBV 感染之间的关系研究. 广西医科大学学报, 2007, 24(1):14-16.
- [5] 黄必军, 朱振宇, 梁启万, 等. 肝细胞癌中 p53 基因的缺失与 HER-2 基因的扩增及其意义. 中华病理学杂志, 2003, 32(1):20-24.
- [6] Calmarini CM, Kamath K, Caniter-Viorneri A, et al. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. Br J Cancer, 2003, 88(11):1793-1799.
- [7] Ding HF, Lin YL, Mecill C, et al. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. J Biol Chem, 2000, 275(49):38905-38911.
- [8] Roth JA, Gramer SF. Gene replacement therapy for nonsmall cell lung cancer: a review. Hematol Oncol Clin North Am, 2004, 18(1):215-229.
- [9] 孙龙, 官泳松, 周翔平, 等. 介入放射学在肿瘤基因治疗中的意义. 中国介入影像与治疗学, 2004, 1(2):151-154.
- [10] Lawler J, Miao WM, Duquette M, et al. Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice. Am J Pathol, 2001, 159(5):1949-1956.
- [11] Fujisawa T, Watanabe J, Kamata Y, et al. VEGF expression and its regulation by p53 gene transfection in endometrial carcinoma cells. Hum Cell, 2003, 16(1):47-54.
- [12] 刘光元, 曹建民, 陈自谦. 肿瘤血管介入治疗. 南京: 江苏科学技术出版社, 2003:91-161.

