

重组人 p53 腺病毒治疗原发性肝癌的血清 p53 蛋白检测及其临床意义

晓静,戴楠,杨志祥,金丰,仲召阳,李增鹏,王阔,王东[△]
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

【摘要】 目的:初步观察重组人 p53 腺病毒注射液 (recombinant adenovirus-p53, rAd-p53) 治疗肝癌临床疗效, 和治疗前后血清 p53 蛋白的变化及其临床意义。方法:对 38 例原发性肝癌患者,采用瘤内注射、血管介入和静脉滴注 rAd-p53 联合化疗和放疗,行至少 1 个疗程以上的治疗,治疗结束一个月后评价疗效。应用 ELISA 检测患者治疗前和治疗后血清 p53 蛋白。结果:38 例患者总的疾病控制率为 94.74%,其中 CR 7 例,PR 11 例,SD 18 例,PD 2 例。38 例肝癌患者经人 p53 腺病毒注射液治疗后血清 p53 蛋白含量比治疗前明显升高 ($P < 0.01$)。治疗前血清 p53 蛋白较高的患者比 p53 蛋白低的对人 p53 腺病毒注射液的治疗反应较好。结论:人 p53 腺病毒注射液治疗对肝癌具有一定疗效,临床应用安全;治疗前血清 p53 蛋白含量以及动态变化可能是预测 rAd-p53 治疗肝癌疗效的有价值指标,并对人 p53 腺病毒注射液的临床应用具有一定的指导作用。

【关键词】 重组人 p53 腺病毒; 原发性肝癌; p53 蛋白

【中图分类号】 R730.54; R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-0904(2009)01-0005-04

The Significance of Serum p53 Protein in Patients with Primary Hepatocellular Carcinoma Treated with rAd-p53

CAO Xiao-jing, DAI Nan, YANG Zhi-xiang, et al

(Cancer Center, Daping Hospital and Institute of Surgery Research, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

【Abstract】 Objective: To evaluate the level of serum p53 protein and clinical efficacy of recombinant adenovirus-p53 (rAd-p53, Genticine) combined with chemotherapy or radiotherapy in primary hepatocellular carcinoma patients (HCC). **Methods:** A total of 38 patients with HCC have been treated with rAd-p53 combined with chemotherapy or radiotherapy by local injection (intratumoral or transcatheter) or intravenous injection. At least one course of treatment was carried out. Serum p53 protein was detected with ELISA assay before and after the rAd-p53 treatment. All patients were assessed for the level of serum p53 protein and clinical efficacy one month after the treatment. **Results:** Among the 38 patients, 2 patients achieved in PD, 7 patients achieved in CR, 11 patients achieved in PR, 18 patients achieved in SD, and the disease control rate (DCR) was 94.74%. The results demonstrated a significant increase of serum p53 level in HCC patients treated with rAd-p53 compared to the level before treatment ($P < 0.01$). The treatment was more effective in group which had high concentration of serum p53 pre-treated than that with low concentration of serum p53. **Conclusion:** Treatment with rAd-p53 plus chemotherapy or radiotherapy on HCC is safe and effective. The pre-treated level of serum p53 protein, as well as its enhancement after the treatment may be a valuable factor to predict the efficacy of rAd-p53 treatment on HCC, which is significance of rAd-p53 treatment on HCC individually.

【Key words】 Recombinant Adenovirus-p53; HCC; p53 Protein

原发性肝癌在我国不论是发病率还是死亡率均

较高,而现阶段的所有治疗手段都存在这样或那样的不足。肿瘤抑制基因 p53 具有“分子警察”和诱导细胞凋亡作用,野生型 p53 基因可用于治疗多种恶性肿瘤。重组人 p53 腺病毒注射液 (rAd-p53, Genticine, 今又生) 是以 E1 区复制缺陷的腺病毒 5 型为载体,将人野生型 p53 基因导入肿瘤细胞进行

【收稿日期】 2008-08-19; **【修回日期】** 2008-11-17

【作者简介】 曹晓静 (1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事 DNA 损伤修复及肿瘤基因治疗方面的研究。

【通讯作者】 [△]王东, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。

肿瘤治疗的重组人 p53 基因临床治疗药物,它也是世界上第一个获准上市的肿瘤基因治疗药物。近年来有关重组人 p53 腺病毒注射液治疗恶性肿瘤的报道逐渐增多^[1-4],但有关治疗前后血清 p53 蛋白水平的变化,以及 p53 蛋白水平与治疗反应是否有关,国内外尚未见报道。本文着重研究重组人 p53 腺病毒注射液治疗原发性肝癌患者血清中 p53 蛋白的变化及其与临床疗效的关系,以期为进一步开展 p53 基因治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 实验材料

重组人 p53 基因腺病毒注射液(rAd-p53,今又生)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:1.0 × 10¹²VP/ml/支;人 p53 蛋白 ELISA 检测试剂盒购自美国 US CNLIFE 公司。

1.2 临床资料

2004年4月~2007年11月我科应用重组人 p53 腺病毒注射液治疗的 38 例原发性肝癌患者(其中肝移植术后复发者 5 例),其中男性 28 例,女性 10 例,年龄 36 岁~84 岁,平均 52.5 岁。依据 2001 年 9 月在广州召开的第八届全国肝癌学术会议“原发性肝癌的临床诊断与分期标准”,临床分期为:Ⅱ期 5 例,Ⅲ期 11 例,Ⅳ期 22 例。20 例为初治患者,18 例为转移复发患者(其中 5 例为肝移植术后复发患者)。同时选正常体检者 40 例检测血清 p53 蛋白作为对照。

入选标准:所有患者全部经病理组织学证实。年龄 15 岁以上,血象正常或接近正常(白细胞 ≥ 3.0 × 10⁹/L、血红蛋白 ≥ 80g/L、血小板 ≥ 100 × 10⁹/L),凝血功能基本正常,肝功能(ALT 及 AST 基本正常或轻度异常)、肾功能(BUN、血肌酐基本正常或轻度异常),Karnofsky 评分 ≥ 60 分,重要脏器功能无明显异常,末次化疗、放疗间歇期 ≥ 1 个月。患者及家属签署知情同意书。入选病例均完成 1 个疗程以上的治疗。

1.3 治疗方案

药品置于 -20℃ 保存,室温静置融化,采用瘤内注射以及血管介入方法,少数病例采用静脉滴注给药,每次剂量 1.0 × 10¹²VP,每周 1 次,4 次为 1 个疗程。联合放疗或化疗的均于 p53 腺病毒注射后 48 小时进行。静脉滴注为 1 支 rAd-p53 稀释于 100ml 生理盐水,60 分钟静脉滴注;瘤内注射为 B 超引导下 1 支 rAd-p53 稀释于 2ml 生理盐水;肝动脉血管介入,采用 seldinger 技术,以 40% 碘化油 10ml ~

50ml 混悬液栓塞,后灌注 1 支 rAd-p53(稀释于 10ml 生理盐水)给药。化疗方案应用奥沙利铂(L-OHP) 135mg/m² 静脉滴注 d1,5-氟尿嘧啶(5-Fu) 0.75g/m², 静脉滴注 d1 ~ d5,21 d 为 1 个周期或希罗达 2500mg/m²,口服 d1 ~ d14;放疗应用立体定向放射治疗(SRT),3Gy ~ 4Gy/次,9 次 ~ 12 次,36Gy ~ 42Gy。相应的化疗或放疗于 p53 腺病毒注射后 48 小时进行,其中静脉滴注给药病例多数联合化疗,而瘤内注射和血管介入给药病例多数联合放射治疗。

1.4 血清 p53 蛋白浓度测定

分别于给药前及治疗结束后 1 个月抽取肘静脉血约 3 ml,待血液充分凝固后 2 小时内 2 000r/min 离心,收集血清,贮存于 -80℃ 冰箱中待检。采用双抗体夹心 ELISA 法检测,实验操作遵循试剂盒提供的指导:预先包被鼠抗 p53 单克隆抗体,每孔先加 100μl 各标准液和待测血清样品,37℃ 孵育 1.5 小时;再分别加 100μl 兔抗 p53 多克隆抗体,37℃ 孵育 2 小时;洗涤 5 次;再加 100μl HRP 标记的二抗,37℃ 孵育 1 小时;洗涤 5 次;然后加 TMB 底物,37℃ 避光显色 10 min 后终止反应;于酶标仪 450 nm 测 OD 值,然后将各标准品所测的 OD 值输入微机中处理,绘制标准曲线,计算所测血清 p53 蛋白浓度。

1.5 临床疗效评价

治疗结束后 1 个月,通过腹部 CT 检查评价临床疗效。具体参照 WHO《实体肿瘤客观疗效评定标准》,以完全缓解(CR),部分缓解(PR),稳定(SD),进展(PD)表示。体力状态根据 Karnofsky(KPS)评分,治疗后较治疗前增加 ≥ 10 分者为改善,减少 ≥ 10 分者为下降。按 WHO《肿瘤药物常见毒性分级标准》评价毒副反应。重点监测体温;每周查血、尿及大便常规;每月行血生化(BUN、Cr、AST、ALT)及心电图、X 线胸片检查。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 血清 p53 蛋白水平与近期疗效的关系

38 例患者中人 p53 腺病毒注射液联合放疗者 31 例,联合化疗者 7 例,其中 CR 7 例,PR 11 例,SD 18 例,PD 2 例。依据我们的前期工作,以正常体检者 p53 蛋白水平 105.57 + 2 × 12.26 pg/ml 为临界值(另文发表),治疗前 p53 蛋白阳性者 22 例,阴性 16 例,阳性率为 57.89%。治疗的总体反应率(RR)分别为 63.64% 和 31.25%,p53 蛋白阳性的患者治

疗反应率明显高于 p53 蛋白阴性的患者 ($P < 0.05$)。疾病控制率 (DCR) 分别为 95.45% 和 93.75%, 二者差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。不同给药途径的治疗疗效差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。总的疾病控制率为 94.74%。除 2 例 PD 患者外其余患者均表现出精神状态好转、从乏力到自觉体力明显改善、疼痛缓解, 食欲增加, 腹胀减轻, 体重增加。卡氏评分增加值 ≥ 10 分。

表 1 rAd-p53 联合治疗 38 例患者近期疗效观察

p53 蛋白水平	N	CR	PR	SD	PD	RR(%) *	DCR(%) **
阴性	16	1	4	10	1	31.25	93.75
阳性	22	6	8	7	1	63.64 *	95.45
合计	38	7	12	17	2	50.00	94.74

注: *: $P < 0.05$ 。 **: $P > 0.05$ 。RR-response rate; DCR-disease control rate.

表 2 不同给药途径治疗疗效观察

给药途径	N	CR	PR	SD	PD	RR(%) *	DCR(%) **
瘤内注射	22	5	7	9	1	54.55	95.45
血管介入	6	2	1	3	0	50.00	100.00
静脉滴注	10	0	4	5	1	40.00	90.00
合计	38	7	12	17	2	50.00	94.74

注: **: $P > 0.05$ 。

2.2 治疗前后患者血清 p53 蛋白变化和疗效的关系

经 ELISA 方法检测, 所有患者血清中 p53 蛋白在治疗后浓度均较治疗前有所升高。治疗前血清 p53 蛋白水平为 $199.47 \text{ pg/ml} \pm 32.92 \text{ pg/ml}$; 治疗后血清 p53 蛋白水平为 $277.16 \text{ pg/ml} \pm 30.14 \text{ pg/ml}$ 。二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。治疗前 p53 蛋白阳性者 22 例, 血清 p53 蛋白水平为 $214.43 \text{ pg/ml} \pm 46.33 \text{ pg/ml}$, 治疗后其血清 p53 蛋白水平明显升高, 为 $288.36 \text{ pg/ml} \pm 40.29 \text{ pg/ml}$ ($P < 0.01$)。治疗前 p53 蛋白阴性者 16 例, 血清 p53 蛋白水平为 $102.53 \text{ pg/ml} \pm 28.74 \text{ pg/ml}$, 治疗后其血清 p53 蛋白水平显著升高, 为 $276.85 \text{ pg/ml} \pm 37.28 \text{ pg/ml}$ ($P < 0.01$)。不同给药途径患者的血清 p53 蛋白水平治疗前后的变化没有显著性差异 ($P > 0.05$)。从治疗疗效来看, 2 例 PD 患者血清 p53 蛋白水平在治疗前后变化不大, 而 CR、PR、SD 患者的血清 p53 蛋白水平变化较大 (表 3)。

结果提示 rAd-p53 成功地将 p53 基因导入肿瘤细胞, 表达野生型 p53 蛋白, 诱导肿瘤细胞凋亡, 经放、化疗后肿瘤细胞坏死崩解释放的 p53 蛋白入血使治疗后血清 p53 蛋白水平明显升高。

2.3 不良反应

所有患者各项血、尿、便常规检查和血生化指标

都在正常范围; 胸片、心电图在治疗前后无明显差别。最主要的不良反应为发热, 其次为寒战, 部分有注射部位疼痛和消化道不适反应。发热反应多数发生在第一次注射后数小时, 少数在第二日发热。38 名患者共接受 178 人次 rAd-p53 腺病毒注射液治疗, I 度发热 ($< 38^\circ\text{C}$) 34 人次 (19.2%); II 度发热 ($38^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$) 135 人次 (75.6%); III 度发热 ($> 40^\circ\text{C}$) 9 人次 (5.1%)。I 度发热可自退, II、III 度发热在使用退热药后数小时消退。热退后无明显不适, 不影响放疗和化疗。发生寒战的有 65 人次 (36.52%), 出现注射部位疼痛的有 20 人次 (11.24%), 出现胃肠道反应的有 13 人次 (7.3%), 均不影响治疗。

表 3 rAd-p53 联合治疗 38 例患者治疗前后血清 p53 蛋白变化 (pg/ml)

治疗疗效	N	治疗前 p53 蛋白水平	治疗后 p53 蛋白水平
CR + PR + SD	36	195.04 ± 27.56	276.57 ± 30.51
PD	2	205.76	215.42

3 讨论

p53 基因是与人类肿瘤相关性最高的肿瘤抑制基因。p53 基因突变后由于空间构象改变影响到转录活化功能、p53 蛋白的磷酸化过程, 并降低 Fas 介导的细胞凋亡, 这不仅失去野生型 p53 基因抑制肿瘤增殖的作用, 而且突变本身又使该基因获得癌基因功能^[5]。Hirohashi^[6] 通过实验发现肿瘤抑制基因 p53 的失活在肝癌发生过程中起了重要作用, 很可能直接或间接造就了染色体的不稳定性, 增强了细胞增殖和新生血管形成。

p53 基因的突变会引起 p53 蛋白空间构象的改变, 突变的 p53 蛋白会在细胞内大量积聚。另外, p53 蛋白属于核内隐蔽抗原, 由于肿瘤细胞本身的坏死或经过放、化疗后随肿瘤细胞的坏死崩解释放入血, 并刺激机体产生特异性抗体。有报道血清 p53 蛋白水平与 p53 基因的改变呈正相关, p53 过表达的患者多预后不良^[7]。因此, 测定血清 p53 蛋白对肿瘤预后评估有一定的临床意义。我们的前期工作也表明, 肝癌患者血清 p53 蛋白水平间接反映了 p53 基因突变的情况, 血清 p53 蛋白可作为一种潜在性的血清肿瘤学标志物辅助肝癌的诊断和治疗, 通过 ROC 曲线分析显示其检测结果与血清 AFP 检测结果有正相关关系, 二者的检测结果相吻合。并且血清 p53 蛋白在 HCC 的疗效评估、预测预后和指导治疗上也有十分重要的意义。

目前对于 p53 基因突变的检测主要通过分子生物学及免疫组化技术,费时费力。ELISA 是一种敏感性高、特异性强、重复性好的实验诊断方法。由于其试剂稳定,操作简单易行,血清标本易于得到,因此为临床提供了一种简便易行的 p53 基因突变检测方法。

利用 rAd-p53 治疗肝癌的疗效已在基础研究、动物实验研究中得到了验证,尤其是 rAd-p53 与介入治疗、放疗、化疗以及手术等手段相结合的方法越来越成为国内外专家们研究的重点^[8,9]。张沁宏^[10]等在体外实验的基础上,观察了 Adp53 对肝癌荷瘤裸鼠肿瘤生长的作用,结果显示经 Adp53 注射的肿瘤生长受到了明显的抑制,抑制率达 80.12%;Western blot 法检测,注射 Adp53 的肿瘤组织中可见 p53 蛋白的高表达。Guan 等^[11]采用经皮瘤内注射人 p53 腺病毒注射液联合 TACE 治疗中晚期肝癌 68 例,对照组单独应用 TACE 治疗,结果治疗组瘤体明显缩小,有效率为 67.6%,两组间差异有统计学意义($P=0.05$),术后 3 个月和 6 个月生存率方面治疗组也显著高于对照组($P<0.01$)。

本研究结果显示,38 例 HCC 患者血清中 p53 蛋白浓度在治疗后均较治疗前有所升高,治疗前血清 p53 蛋白水平为 $199.47 \text{ pg/ml} \pm 32.92 \text{ pg/ml}$;治疗后血清 p53 蛋白水平为 $277.16 \text{ pg/ml} \pm 30.14 \text{ pg/ml}$ 。二者有统计学意义($P<0.01$)。38 例患者中 CR 7 例,PR 11 例,SD 18 例,PD 2 例,总的疾病控制率 94.74%。治疗前 p53 蛋白阳性者 22 例,阳性率为 57.89%。p53 蛋白阳性的患者治疗反应率明显高于 p53 蛋白阴性的患者($P<0.05$)。不同给药途径的治疗疗效之间没有统计学意义($P>0.05$)。由于肝癌患者血清 p53 蛋白水平可间接反映 p53 基因突变的情况,因此,我们推测血清 p53 突变的患者对人 p53 腺病毒注射液的治疗反应较好。2 例 PD 患者其血清 p53 蛋白水平在治疗前后变化不大,而 CR、PR、SD 患者的血清 p53 蛋白水平则变化较明显。该结果表明,腺病毒可成功介导 p53 基因在肝癌细胞中持续表达,通过多种生物学途径抑制肝癌细胞的增殖并诱导肝癌细胞的凋亡,同时经放、化疗后肝癌细胞坏死碎裂,p53 蛋白释放到胞外,部分进入血液循环,在血清中可检测到持续高表达的 p53 蛋白。提示血清 p53 蛋白可作为肝癌治疗疗效动态监测的一个指标。除 2 例 PD 患者外其余患者均表现出精神状态好转、从乏力到自觉体力充沛、疼痛缓解,食欲增加,腹胀减轻,体重增加。卡氏评分

增加值 ≥ 10 分。最主要的不良反应为发热,其次为寒战,部分有注射部位疼痛和消化道不适反应。发热多为 I、II 度发热,仅 2 例发生 III 度发热。其中 I 度发热($<38^\circ\text{C}$)34 人次(19.2%);II 度发热($38^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$)135 人次(75.6%);III 度发热($>40^\circ\text{C}$)9 人次(5.1%)。发生寒战的有 65 人次(36.52%),出现注射部位疼痛的有 20 人次(11.24%),出现胃肠道反应的有 13 人次(7.3%),均不影响治疗。

目前 p53 基因突变在肝细胞肝癌中的诊断意义已得到大多数学者的肯定。以往的研究表明,血清 p53 蛋白与肿瘤转移、复发、化疗敏感性及预后有关。同时检测到 P53 基因突变和血清 p53 蛋白阳性的肝癌患者,其预后往往不好。本研究将血清 p53 蛋白水平和 rAd-p53 的临床疗效结合起来分析,可以根据患者血清 p53 蛋白水平来指导临床用药,以达到肝癌的个体化治疗。

[参考文献]

- [1] 肖绍文,刘长清,孙艳,等.重组人 p53 基因联合放疗、热疗治疗晚期软组织肉瘤的临床观察[J].中国肿瘤临床,2007,34(2):65-67.
- [2] Zhu Zhi-bing, Liu Ji-tang, Shui Jie, et al. Study of treatment of advanced hepatobiliary carcinoma in Patients with rAd-p53[J]. Chin J Intern Med,2004,3(11):1-14.
- [3] 汪进良,焦顺昌.重组人 p53 腺病毒治疗肿瘤临床研究进展[J].中国实用医药,2008,3(1):139-141.
- [4] 刘都户,刘文超,范黎,等.今又生联合热疗治疗浆膜腔恶性肿瘤液近期疗效[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(14):1108-1109.
- [5] 王东,史景泉.人原发性肝癌肿瘤抑制基因研究进展[J].国外医学-遗传学分册,1994,5:240-244.
- [6] Hirohashi S. Pathology and molecular mechanisms of multistage human hepatocarcinogenesis[J]. Princess Takamatsu Symp, 1991, 22:87-93.
- [7] Husgafvel-Pursiainen K, Kannio A, Oksa P, et al. Mutation, tissue accumulation and serum levels of p53 in patients with occupational cancers from asbestos and silica exposure[J]. Environ Mol Mut, 1997, 30:224-230.
- [8] Peng Z. Current status of gene therapy in China; recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers[J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(9):1016-1027.
- [9] Bourdon J C, Laurenzi V D, Melino G, et al. p53: 25 years of research and more questions to answer[J]. Cell Death and Differentiation, 2003, 10:397-399.
- [10] 张沁宏,王东,牟江洪,等.重组腺病毒介导的 p53 基因对肝癌细胞生长抑制作用的研究[J].第三军医大学学报,2006,28(2):121-124.
- [11] Guan YS, Liu Y, Sun L, et al. Successful management of postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma with p53 gene therapy combining transcatheter arterial chemoembolization[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24):3803-3805.