

超声引导下瘤体内注射重组人 p53 腺病毒治疗晚期肝癌*

贡雪灏¹ 朱志兵² 张家庭¹ 李泉水¹ 张 琪¹

深圳市第二人民医院 ¹ 超声科 ² 肿瘤科, 深圳 518035

摘要 目的 评价超声引导下瘤体内注射重组人 p53 腺病毒治疗晚期难治性肝癌的临床疗效及超声导入基因治疗的临床应用价值。**方法** 对 57 例晚期肝癌患者行超声引导下瘤体内注射重组人 p53 腺病毒(rAd-p53), 每次剂量 1×10^{12} VP 或 2×10^{12} VP, 每周 1 次, 4 次 1 疗程, 治疗后选择完成 1 个疗程及以上, 并符合基因治疗入选标准者 38 例, 采用彩色多普勒超声(彩超)及病理学检查评估其临床疗效。**结果** 彩超结果显示: 肝脏肿块均有不同程度缩小, 其中 4 例患者肿块缩小明显 ($>50\%$); 16 例患者肿块周边和内部彩色血流信号减少或消失。大部分患者病情稳定, 症状好转, 一般状况改善, Karuafsky 评分明显提高[术前(55.79 ± 11.30) vs 术后(61.05 ± 21.64), $P < 0.05$]。11 例患者行肝穿刺活检组织病理学检查, 7 例可见肿瘤组织纤维化伴淋巴细胞浸润及肿瘤组织明显变性坏死。治疗的不良反应主要为一次性自限性发热。**结论** 超声引导下瘤体内注射既能控制肝癌基因治疗的靶向性, 又能对基因药物疗效进行影像学评估, 具有较高的临床应用价值。

关键词 肝癌; 基因治疗; 超声引导; 重组人 p53 腺病毒

中图分类号 R445.1 **DOI:** 10.3870/j.issn.1672-0741.2008.04.022

Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma with Ultrasound-Guided Intratumoral Injection of Recombinant Adenovirus p53 Agent

Gong Xuehao¹, Zhu Zhibing², Zhang Jiating¹ et al

¹Department of Ultrasonography, ²Department of Oncology, The Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035

Abstract Objective To evaluate the efficacy of treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) with recombinant adenovirus-p53 (rAd-p53) and the clinical value of ultrasound-guided method for gene therapy. **Methods** Fifty-seven patients with HCC were subjected to ultrasound-guided intratumoral injection of rAd-p53 at 1×10^{12} VP or 2×10^{12} VP once a week, 4 times each course of treatment. Of the 57 patients, 38 who met the inclusion criteria for gene therapy and received one or two course(s) of treatment were enrolled. Color Doppler ultrasonography and pathologic examination were used for the assessment of the clinical efficacy. **Results** Color Doppler flowing imaging (CDFI) showed the tumor size in all the 38 cases was decreased to varying degrees and especially in 4 patients, the tumors shrank by more than 50%. The color Doppler flow signal in or around the lesions was reduced or even disappeared. Symptoms in most of the patients were alleviated and Karuafsky score was obviously increased after treatment (55.79 ± 11.30 vs 61.05 ± 21.64 , $P < 0.05$). In 11 patients subject to liver biopsy, tumor tissue fibrosis, accompanied by robust lymphocytic aggregation and remarkable necrosis, was observed in 7 patients. The main side-effect was a fleeting fever. **Conclusion** Ultrasound-guided intratumoral injection of rAd-p53 could not only help target the gene therapy for HCC, but also facilitate evaluating the clinical efficacy.

Key words hepatocellular carcinoma; gene therapy; ultrasound guidance; recombinant adenovirus p53

近年, 肿瘤的基因治疗取得突破性进展, 以复制缺陷型重组腺病毒为载体的 p53 基因替代疗法在治疗鼻咽癌、喉癌及头颈部鳞癌等肿瘤的临床研究^[1-3]中取得很好的临床疗效, 而且也证实了其临床应用的安全性。因此, 我们在动物实验研究的基础上^[4], 在超声引导下, 对 57 例晚期难治性肝癌患者行重组人 p53 腺病毒 (recombinant adenovirus-p53, rAd-

p53) 瘤内注射治疗, 探讨 rAd-p53 治疗晚期难治性肝癌的临床疗效和介入性超声技术在肝肿瘤基因导入治疗中的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料

仪器: 采用百胜公司 Technos^{MPX} Du8 彩色多普勒超声仪, 配置附带穿刺支架的探头, 频率 2.5~5.0 MHz。PTC 针 20 G, 长 20 cm。

* 深圳市科技计划资助项目 (No. 200404068)

贡雪灏, 男, 1970 年生, 副主任医师, E-mail: fox_gxh@sina.com

基因治疗药物:rAd-p53注射液,商品名为“今又生”,由深圳赛百诺基因技术有限公司研制生产,水针剂型,规格为 1×10^{12} VP/支。

1.2 研究对象

2003年10月至2004年10月,我院经超声引导下瘤内注射 rAd-p53 治疗晚期肝癌 57 例,每次剂量 1×10^{12} VP 或 2×10^{12} VP,每周1次,4次1疗程,其中完成1个疗程及以上,并符合基因治疗入选标准者38例,男性28例,女性10例,平均年龄53.3岁(32~76岁);原发性肝癌27例,继发性肝癌11例。38例患者总共完成52个肝癌肿块的瘤内基因药物注射治疗,其中最大肿块大小为 $148.6 \text{ mm} \times 98.3 \text{ mm}$,最小者为 $18.5 \text{ mm} \times 11.1 \text{ mm}$,平均为 $53.8 \text{ mm} \times 28.6 \text{ mm}$ 。

入选者均为经病理学检查证实,临床无法手术切除的晚期难治性原发性和继发性肝癌患者,既往经过化疗、放疗、经动脉化学栓塞(TACE)等治疗效果不佳。治疗前,患者血常规检查示白细胞正常或接近正常、凝血功能、肝功能(ALT、AST)、肾功能(BUN、血肌酐)基本正常或轻度异常,生存质量评分(KPS) ≥ 40 分,心、肺等重要脏器功能基本正常,末次化疗、放疗或TACE等治疗间歇期 ≥ 1 个月。研究经医院伦理委员会讨论通过,患者及家属签署知情同意书。

1.3 操作方法

患者采取仰卧位或左侧卧位,行超声扫描并选择要进行注射治疗的肿块,观察其声像图特征及彩色血流分布情况,测量肿块大小。调出穿刺引导线,确定穿刺路径,选择进针角度,测量进针深度。在无菌条件下行局麻后嘱患者屏气,在超声实时监控下进针,确认针尖到达瘤体深部边缘后缓慢推注药物。推注过程中,徐徐退针并转动针尖,使注入的药物能在瘤体内均匀弥散,当药物扩散到肿块周边(超声显示强回声团覆盖肿块边缘)即止。拔针,压迫穿刺点数分钟。治疗后,患者须静卧观察30 min。1周后,于同一肿块重复注射1次,4次为1疗程。

1.4 疗效评估

1~2个疗程后,观察患者症状、体征,采用Karnofsky评分评价患者生存质量,比较治疗前后患者生化常规检查结果及肿瘤标志物(AFP、CEA、FER)的变化。11例患者于治疗后在超声引导下经皮肝穿刺活检行组织病理学检查。治疗后2~3个月行彩超复查,观测肿块大小、内部回声特征及血流信号等改变。临床疗效评估按WHO《肿瘤客观评定标准》进行。

2 结果

2.1 rAd-p53 瘤内注射时肿块声像图特征

超声实时监控引导瘤体内注入 rAd-p53 时,最初于针尖所在部位出现较小的异常高回声区,随注入量的增加,异常高回声区的体积逐渐增大,呈一圆形高回声团,直至覆盖肿块边缘,见图1。



超声引导下瘤内注射 rAd-p53,药物在肿块内均匀弥散,呈一圆形强回声团

图1 rAd-p53 瘤内注射时肿块声像图特征

2.2 瘤内注射治疗后彩超复查结果

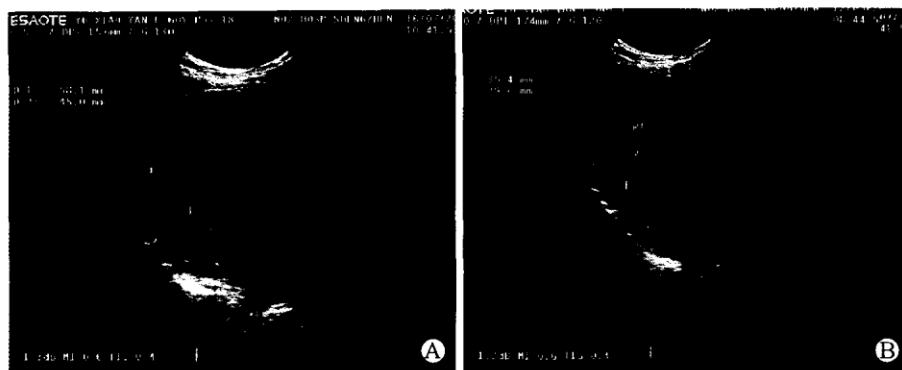
肿块的大小均有不同程度的缩小,其中4例患者共9个瘤结节缩小明显($>50\%$)。注射治疗后肿块内部回声普遍增高,较大的肿块内部回声变得更加强弱不均,出现强光斑或光团。16例原血流信号较丰富的原发性肿瘤结节周边及内部彩色血流信号减少或消失。见图2。

2.3 临床疗效观察

治疗后,患者腹胀、气促等症状好转,一般状况改善,生存期生活质量明显改善;术前患者Karnofsky评分为 (55.79 ± 11.30) ,术后明显提高,为 (61.05 ± 21.64) ($t=2.186, P<0.05$);4例患者疗效明显,病灶明显缩小或病灶数量减少,缓解率为 10.5% (4/38)。大部分患者病情稳定,15.79% (6/38) 患者长期稳定(6个月以上),少数患者病情进展,4例于治疗后1个月内死亡。

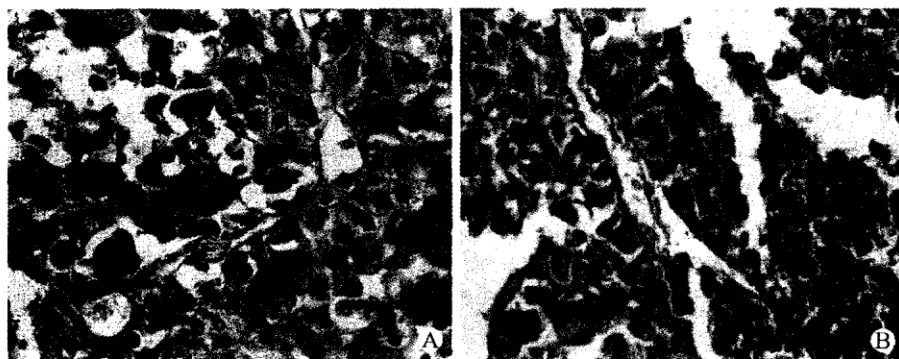
2.4 肿瘤标志物及病理学检查结果

治疗前后,患者血常规及肿瘤标志物(AFP、CEA、FER)检查结果未见有明显改变。11例于治疗后行肝穿刺活检组织病理学检查,7例可见肿瘤组织纤维化伴淋巴细胞浸润或明显变性坏死,见图3。



A: 治疗前, 肝右后叶一肿块, 大小约 58 mm×45 mm; B: 治疗后 2 个月, 肿块明显变小, 大小约 35 mm×30 mm, 内部回声不均匀

图 2 一患者治疗前后彩色多普勒超声图片



A: 治疗前病理学检查示肝细胞性肝癌Ⅲ级; B: 治疗后病理学检查示癌细胞片状变性坏死

图 3 治疗前后肝癌组织病理学变化 (苏木精-伊红染色, ×200)

2.5 副作用

副作用主要为一次性自限性发热, 大部分患者于治疗后 3~5 h 开始发热, 持续 4~10 h。其中高度发热 (39℃~41℃) 占 33.3%, 1 例出现次超高热 (41℃以上), 另有 9 例出现恶心, 4 例出现胸闷, 5 例出现腹泻。上述症状短期内自行缓解, 或经对症治疗后缓解。

3 讨论

晚期难治性肝癌患者病情进展迅速, 生存期短, 一般约 2~5 个月, 且生存质量极差, 对现有治疗措施反应均不佳。本研究针对这类患者, 开展了 p53 基因治疗: 通过超声引导, 将新型基因治疗药物“今又生”直接注入肝肿瘤患者的瘤体内, 旨在尝试一种新的姑息性治疗手段, 以达到改善肝癌晚期患者生活质量, 延缓病情进展, 延长患者生命的目的。

p53 基因是目前被研究得最为广泛和深入的基因之一, 也是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因。研究表明: 肝癌组织均存在不同程度 p53 基因缺失, 失活突变或异常表达^[4-5]。

作为一种抑癌基因, p53 基因调控合成 p53 蛋白。正常组织中, p53 蛋白表达量很低, 当受到 DNA 损伤等刺激时, p53 蛋白表达量升高, 发挥细胞增殖调控作用, 通过调控下游靶基因的表达或直接激活凋亡信号途径, 抑制细胞分裂, 诱导肿瘤细胞凋亡^[6]; p53 基因能上调多种抗癌基因及下调多种癌基因的活性; 还能通过上调新生血管形成抑制因子 (thrombospondin-1, TSP-1) 或下调血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达^[6-9], 抑制肿瘤内新生血管的生成, 导致肿瘤组织因局部血供障碍而发生坏死。此外, 高表达的 p53 蛋白还可刺激机体特异性的抗肿瘤免疫反应, 吸引 T 淋巴细胞在瘤组织聚集, 亦可通过“旁观者效应”杀灭肿瘤细胞^[8-10]。

如果能通过导入外源性野生型 p53 基因来替代缺失或异常表达的抑癌基因, 恢复或增强 p53 抑癌基因的表达或功能, 就可能达到抗肿瘤的目的。

本研究中, rAd-p53 瘤内注射后, 通过腺病毒感染肿瘤细胞, 将 p53 基因导入细胞, 使其表达 p53 蛋白, 从而可抑制细胞分裂, 诱导肿瘤细胞凋亡。研

(下转第 505 页)

(上接第 501 页)

究结果表明:治疗后,短期内大部分患者病情缓解,患者生存质量明显提高。彩超复查示瘤结节均有不同程度的缩小,部分瘤组织血供减少或消失。组织病理学表现为肝癌组织纤维化伴淋巴细胞浸润或大片变性、坏死。且治疗中不良反应主要为自限性发热,少数患者出现恶心、胸闷及腹泻,症状均于短期内自行缓解,或经对症治疗后好转,未出现严重不良反应及穿刺并发症。这些均提示:通过超声引导瘤体内直接注射的方法,能有效地将野生型 p53 基因导入肝癌细胞内,抑制肿瘤细胞生长,且基本安全。

作为一种新的治疗手段,肿瘤基因药物治疗,理论上只杀灭肿瘤细胞,而对正常组织细胞无损伤,因而临床应用前景光明,但仍存在许多问题需要深入研究。我们发现,对于直径小于 5 cm 的肿块,超声引导瘤内注射“今又生”治疗效果较好,肿块明显缩小甚至消失,肿块周边及内部彩色血流信号明显减少或消失;而对于较大的肿块(直径>5 cm),治疗后肿块大小及周边、内部彩色血流信号减少不明显,考虑可能因肿块较大,药物不易弥散至肿块边缘所致,改进操作(如瘤内多点注射)能否提高疗效,尚待进一步临床观察。此外,如何将 p53 基因与增强超声照射、新型超声造影剂相结合,以增强基因在瘤体内的表达;如何将肝癌基因治疗与手术、化疗、放疗相结合以提高肝癌临床疗效等,仍需我们进一步研究探讨。

综上所述,超声引导下应用重组人 p53 腺病毒治疗无法手术的晚期难治性肝癌患者基本安全、可靠,能取得较好的近期疗效,明显提高肝癌晚期患者生存期生活质量。该方法不仅能有效控制基因替代

治疗的靶向性,而且还能从超声影像学角度对药物疗效进行评估以及根据需要顺行经皮肝穿刺活检取材,因而在肿瘤的基因导入治疗方面存在技术操作优势,值得深入研究、应用和推广。

参 考 文 献

- [1] 张珊文,肖绍文,刘长清. 重组人 p53 腺病毒注射液联合放射线治疗头颈鳞癌的 II 期临床试验[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(23): 2023-2028.
- [2] 韩德民,黄志刚,张伟. 重组人 p53 腺病毒注射液治疗喉癌的 I 期临床试验及追踪观察[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(23): 2029-2032.
- [3] 陈传本,潘建基,徐鹭英. 重组人 p53 腺病毒注射液结合放射治疗鼻咽癌 II 期临床试验观察[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(23): 2033-2035.
- [4] 程文,张青萍,贡雪源. 超声引导下瘤体内注入超声造影剂和 p53 基因治疗大鼠肝癌的初步研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(7): 543-546.
- [5] HSU I C, METCALF R A, SUN T, et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas [J]. Nature, 1991, 350(6317): 427-428.
- [6] LAWLER J, MIAO W M, DUQUETTE M, et al. Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p53-deficient mice[J]. Am J Pathol, 2001, 159(5): 1949-1956.
- [7] LINDERHOLM B, KARLSSON E, KLAAR S, et al. Thrombospondin-1 expression in relation to p53 status and VEGF expression in human breast cancers[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(16): 2417-2423.
- [8] DAMERON K M, VOLPERT O V, TAISKY A, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1[J]. Science, 1994, 265(8): 1582-1586.
- [9] PAL S, DATTA K, MUKHOPADHYAY D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6952-6957.
- [10] SHIRAIISHI K, FUKUDA S, MORI T, et al. Identification of fractalkine, a CX3C-type chemokine, as a direct target of p53[J]. Cancer Res, 2000, 60(14): 3722-3726.

(2007-03-05 收稿)