

# p53基因在肿瘤基因治疗中的研究进展

张艳, 何凤田

张艳, 何凤田, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室 重庆市 400038  
项目负责人: 张艳, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室. zhangyan@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-65427852 传真: 023-68753462  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-26

## 摘要

p53基因是一种重要的抑癌基因. 在人类50%的肿瘤中都发现p53基因有缺失或突变, 可见其与肿瘤的关系十分密切. 因此, 利用p53基因治疗肿瘤已成为肿瘤继手术、放疗、化疗以及生物治疗后的又一种有希望的治疗方法. 本文就p53基因的结构、功能与肿瘤的关系以及在肿瘤基因治疗中的应用予以简要综述.

张艳, 何凤田. p53基因在肿瘤基因治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1593-1596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1593.asp>

## 0 引言

p53基因是一种重要的抑癌基因. 他在细胞周期调控, 抑制细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡等方面有重要的作用. 其与肿瘤的关系十分密切, 因为人类恶性肿瘤中至少有50%发生了p53基因的变化, 因此, p53成为近年来研究的热点. 以下就p53基因的结构、功能与以及在肿瘤基因治疗中的研究进展作简要综述.

## 1 p53的结构和功能

人类p53基因位于17号染色体的短臂上(17p13.1), 全长16-20 kb, 有10个内含子和11个外显子, 其中第1个外显子不编码, 其上游400 bp处有启动子P1, 下游1 kb处有启动子P2, 二者为转录起始点. 正常的p53基因又称野生型p53基因(wild type p53, wt-p53), 其编码的蛋白质是由393个氨基酸(aa)组成的与细胞分裂周期相关的核磷酸蛋白质,  $M_r$  53 000, 称为p53蛋白. p53可以分为5个部分: N-末端的转录活化区(1-42 aa), 能与一系列的蛋白结构(如MDM2、TBP、TAFs)结合, 而调节p53的转录功能<sup>[1]</sup>; 信号区(64-92 aa), 富含脯氨酸, 有5个脯-X-X-脯重复顺序. 此区不是转录活化所必须的, 但对诱导细胞凋亡是必需的<sup>[2]</sup>; DNA结合区(102-292 aa), 识别顺序专一的DNA序列; 四聚体化区(324-355 aa), 此区能抑制癌细胞的生长; C-末端的非专一DNA结合区(370-393 aa), 能与非特异性的DNA序列结合.

p53基因参与细胞周期调节, 调控细胞凋亡. DNA损伤或缺氧后, p53基因以序列专一的方式与DNA结合后, 起转录因子的作用, 活化CDK抑制剂p21<sup>WAF1/CIP1</sup>基因的转录, 其产物则可抑制CDK活性, 使CDK不能磷酸化Rb, 从而使细胞生长停止在G<sub>1</sub>/S期<sup>[3]</sup>. p53还可诱导gadd45基因表达, 其产物可与细胞周期相关蛋白Cdc2、PCNA相互作用, 使细胞生长停止在G<sub>2</sub>/M期, 有利于DNA的修复<sup>[4]</sup>.

wt-p53的抗肿瘤作用主要是阻滞G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期, 使细胞不能进入S期, 从而抑制细胞的增生. p53基因在DNA遭到破坏时, wt-p53可与细胞核内特异的DNA部位结合, 通过氨基酸的酸性激活区激活邻近基因的启动子而促进基因的表达, 对抑制细胞增生的基因起到转录激活因子的作用, wt-p53抑制肿瘤发生的另一途径是直接对某些基因的启动子起负调控作用, 受负调控的基因多数是一些与细胞增生有关的基因, 其机制可能是wt-p53通过与这些基因的TATA结合蛋白(TBP)结合后, 使TBP不能与启动子的TATA盒结合, 从而抑制转录的起始.

p53能下调其下游的与凋亡相关的bax、igf-bp3基因, 上调bcl-2基因, 从而调控细胞凋亡. 目前已发现了一些受p53调控的与凋亡相关的基因如killer/dr5、fas/apo1、nox、ei24/pig8、puma等<sup>[5-7]</sup>. 原癌基因c-myc的表达也受p53的抑制<sup>[8]</sup>, 因此当p53突变, c-myc过度表达时易发生肿瘤.

## 2 p53基因突变与肿瘤的相关性

p53基因突变是许多肿瘤发生的重要原因之一. 基因突变主要包括点突变和等位基因的缺失. 据报道, 在大约200多种不同的肿瘤中, 有50%的肿瘤带有p53基因突变. 已发现p53基因中有4个位于外显子5-8的突变热点, 虽然不同组织器官发生的肿瘤中, p53基因突变谱显示有差异, 但约有90%的突变是集中在这部分区域<sup>[9]</sup>. 他们分别编码132-143、174-179、236-248和272-281号氨基酸<sup>[10]</sup>.

在多种人类肿瘤中, 如食管癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠及直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤中p53基因的突变率在50%左右. 在黑色素瘤(原发)中p53基因突变率高达97%. 肺癌中各型肺癌均存在p53基因突变, 约52%的非小细胞性肺癌, 90%的小细胞性肺癌存在p53基因突变. 还有部分白血病、脑肿瘤、多发性骨

髓瘤、星形细胞瘤也存在 p53 基因的改变. 研究发现, 难治的肿瘤 p53 基因突变率较高, 而相对容易治疗的肿瘤较少发生 p53 基因突变<sup>[11]</sup>. 而且 p53 基因的突变与病情的发展, 肿瘤的转移以及对放疗、化疗的敏感性和预后都密切关系.

### 3 p53 基因与肿瘤的基因治疗

近年来, 随着分子生物学的不断发展, 对于疾病的病因、发生、发展的研究已深入到分子水平. 因此, 基因治疗正逐渐从理论成为现实, 它具有选择性强, 副作用小, 对晚期肿瘤及转移灶仍有效等优点, 从而成为肿瘤继手术、放疗、化疗以及生物治疗后的又一种有希望的治疗方法. 由于 p53 基因在调节细胞周期和生长, 诱导细胞凋亡的过程中发挥着重要作用, 而且在人类恶性肿瘤中 p53 基因突变率如此之高, 因此, 利用 p53 基因治疗肿瘤已成为研究的热点. 目前研究最多的是以正常的野生型 p53 基因(wt-p53)替换肿瘤细胞中突变的 p53 基因, 称为野生型 p53 基因的替代疗法. 此方法主要是通过转基因技术将野生型 p53 基因整合到恶性肿瘤的基因组中去, 以替换肿瘤细胞中突变的 p53 基因. 大量的实验已证实, 野生型 p53 基因可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[12]</sup>, 从而使 p53 在肿瘤的基因治疗中具有良好的应用前景. 因此, 如何将目的基因导入机体细胞或肿瘤细胞, 并获得安全有效的表达是这一研究的重点. 目前, 向细胞内导入外源基因的方法大体可分非病毒法和病毒法 2 种. 重组病毒具有天然侵袭细胞和整合于宿主细胞的能力, 是具有潜力的 DNA 转导方法. 以病毒为载体转导 p53 基因的报道较多, 目前研究和应用最多的是腺病毒载体, 逆转录病毒载体, 还有以腺相关病毒、单纯疱疹病毒为载体的. 而非病毒载体以脂质体为主. 主要是阳离子脂质体的应用现在正日趋为人们所重视.

**3.1 腺病毒载体** 腺病毒载体是目前介导 p53 基因转移的常用载体. 腺病毒是一种 DNA 双链无包膜病毒, 基因组 DNA 约长 36 kb, 可编码 14 种蛋白. 腺病毒载体的主要优点有: (1) 性质稳定, 能高效表达, 对人类相对安全; (2) 感染的宿主细胞范围广, 可感染分裂期及静止期细胞; (3) 腺病毒感染细胞时无需整合到宿主细胞基因组中, 不存在激活致癌基因或插入突变等危险; (4) 操作简单, 重组病毒可通过静脉注射、喷雾、气管内滴注或制备成胶囊口服经肠道吸收等方法进入体内, 容易复制, 可获得高效价病毒载体. p53-rAd 中 p53 有时会发生自发性突变, 常发生在转录活化区和调控区, 而 DNA 结合区却几乎不发生, 而这一区却是发生肿瘤的主要突变位点<sup>[13]</sup>. 腺病毒介导的 p53 基因治疗肿瘤已广泛开展, 包括食管癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌等. 大量的研究表明, 腺病毒介导的 p53 基因感染肿瘤细胞后, 能有效地控制肿瘤细胞生长或引起凋亡. 目前, 运用腺病毒介导的

p53 基因治疗食管癌、非小细胞肺癌、肝癌已进入 II 期临床试验<sup>[14-16]</sup>. 研究者还发现, 运用腺病毒载体协同转运 GM-CSF 和 p53 感染喉癌细胞, 较单独转运 p53 治疗肿瘤效果更好<sup>[17]</sup>. 虽然腺病毒载体具有良好的应用前景, 但其也存在着一些问题, 如: 毒副作用, 有些腺病毒会引起急性感染, 宿主体内存在病毒基因会引起特异性免疫反应, 由于目前使用的腺病毒载体是复制缺陷型病毒, 不能在体内自主复制, 在治疗中需要连续重复给药, p53 基因进入周围肿瘤细胞的效率低也影响了 p53 基因作用于肿瘤细胞的效果. 因此, 人们正在寻找新的方法和载体, 使目的基因能够高效率、特异性地作用于肿瘤细胞, 并能够在肿瘤细胞中连续自我复制. 目前, 一种能够在体内复制的腺病毒载体 ATVs 得到应用, p53-ATV 中 p53 不会干扰 ATV 的复制, 甚至可增加 ATV 的溶胞作用, 是一个有效的基因治疗的载体系统<sup>[18]</sup>. Roy I et al<sup>[19, 20]</sup> 将 p53 融合 VP22 (一种重要的细胞间运输蛋白), 这样有效的提高了 p53 由腺病毒转移入肿瘤细胞内的效率. 还有人将腺病毒改造成选择性感染肿瘤细胞, 而不感染正常细胞, 有一种改良的腺病毒 ONYX-015 已运用于超过 300 例肿瘤患者, 取得了良好的效果<sup>[21]</sup>.

**3.2 逆转录病毒载体** 以逆转录病毒为基因转染载体的研究开展得最早. Roth et al<sup>[22]</sup> 采用逆转录病毒载体, 进行非小细胞肺癌的基因治疗, 发现可以抑制肿瘤生长. 它具有高效转移、基因能整合入靶细胞从而能实现长期稳定的表达等特点. 但逆转录病毒只能感染分裂复制的细胞, 因而对高分化而不分裂的细胞就不能实施基因转移, 逆转录病毒相对于腺病毒而言滴度较低. 最令人担忧的是逆转录病毒载体在辅助细胞中有同源重组为野生型病毒的可能, 而引起恶性转化. 另外, 逆转录病毒介导的基因转移操作复杂, 技术要求. 因此, 其介导的基因治疗受到了一定的限制.

**3.3 脂质体包埋法** 近年来, 以脂质体包埋法进行基因治疗的研究越来越多. 因为该方法安全, 价格相对便宜, 操作非常简便, 可直接注入进行基因转移, 故成为一种极具希望的临床应用技术. 脂质体是一种人工合成的单层或多层磷脂双分子层组成的封闭环状囊状结构. 其主要功能成分是阳离子脂质, 可直接与 DNA 作用而将其包于中心水相空间形成复合物运载 DNA. 外层中性磷脂包于 DNA 脂质复合物外形成微团. 阳离子脂质的结构决定转染效率, 外层中性磷脂起辅助作用. 该 DNA 脂质复合物与组织培养细胞接触并融合时, 可以有效地发生 DNA 摄取和表达. 这类方法不同病毒载体可以获得高浓度的重组体, 转染效率也没有病毒载体高, 但他最突出的优点在于宿主不会出现外源性病毒基因所致的特异性免疫反应, 这在病毒载体是无法避免的. 当然, 不会出现特异性免疫反应, 并不是说不会发生毒副作用. 有人进行动物实验认为, 肿瘤局部注入一定剂量的 DNA 脂质复合物会出现局部的炎症反应, 静脉注射

DNA脂质复合物会出现肝功能的一过性改变. 类似的反应在其他载体进行治疗时也同样会出现. 但其仍在需较长期进行注射的多发或转移肿瘤灶治疗中显示了巨大优势. 脂质体包埋法的基因治疗的注入方式也是多样的, 经静脉注入、经导管或肿瘤局部注入均可. 有研究者对转移性乳腺癌动物模型以p53脂质复合物注入进行治疗, 发现肿瘤缩小、肿瘤转移受到限制, 目前的研究主要是怎样提高脂质体复合物进入肿瘤细胞的效率. 如吸入气雾剂治疗肺癌, 气雾剂中有聚乙烯亚胺(PEI)-p53, 一种新型的非病毒载体<sup>[23-25]</sup>. 另一种给合转铁蛋白(Tf)的阳离子脂质体能提高p53的转染效率<sup>[26]</sup>. 应用结合胆固醇的阳离子脂质转运p53治疗肺癌, 提高p53的转染效率, 明显抑制了肺癌细胞生长, 且毒性小. Xu et al<sup>[27]</sup>将anti-TfR scFv结合到脂质体的3'-半胱氨酸上, scFv-DNA-脂质体复合物用于治疗乳腺癌, scFv分子小, 能提高DNA-脂质体复合物进入肿瘤细胞的效率, 并有效表达. 虽然此方法仍处于初期阶段, 临床疗效的判定还有待于进一步的验证, 但目前的成果已令人满意. 研究者正在对这一方法的安全性、应用剂量、生物学效能进行更进一步的评价和探讨.

#### 4 p53基因的应用前景

随着介入放射学向纵深发展, 经介入放射学方法进行基因治疗令人关注. 从介入放射学角度, 可以经皮穿刺直接将治疗基因注入瘤体, 也可经肿瘤供血动脉行导管引入, 还可同时进行肿瘤血管的栓塞或灌注化疗, 或制备带治疗基因的栓子, 以加强治疗效果. 经介入放射学方法进行基因治疗, 可清除手术后残留的恶性癌细胞, 防止复发<sup>[28]</sup>. 目前, 经动脉导管引入复制缺陷型腺病毒(rAd-p53, SCH58500)和选择复制型腺病毒(dl1520, aka Onyx-015; CG7870)治疗肿瘤已进入II期临床试验<sup>[29]</sup>. 利用Ad-p53(INGN 201)结合放疗治疗非小细胞肺癌已进入II期临床, 是一种安全有效的方法<sup>[30]</sup>. 经脑动脉注入Ad-p53, 能有效抑制脑肿瘤大小<sup>[31]</sup>. Asami et al<sup>[32]</sup>用热放疗结合p53基因的方法, 将p53基因转染人唾液腺癌细胞, 转染率达到62.3%, 提示这一方法能有效的治疗人唾液腺癌. 这些都肯定了介入技术在基因治疗中的应用前景, 为介入放射学的发展开辟了新领域.

总之, p53基因作为一个重要的肿瘤抑制基因, 在肿瘤细胞的发生、发展中都具有重要作用. 在其他疾病方面也有作用, 如研究者还发现, 运用腺病毒载体将p53转移至关节腔内, 能诱导滑膜液炎症细胞凋亡, 从而治疗类风湿关节炎<sup>[33]</sup>. 因此, p53基因具有良好的应用前景, 但目前所进行的工作还处于探索阶段, 进一步研究应集中在以下几个方面: (1) 寻找更有效的载体, 提高转染效率, 降低其毒副作用; (2) 更深入地研究其作用机制; (3) 进一步了解其与多种肿瘤的相关性; (4) 研究其与化疗、放疗及免疫治疗的相互关系以及与其他基

因治疗的协同关系. 随着各种基因治疗工作的深入开展, p53基因治疗将会成为肿瘤治疗的又一种有希望的治疗方法.

#### 5 参考文献

- Chao C, Saito S, Anderson CW, Appella E, Xu Y. Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:11936-11941
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 1998;17:4668-4679
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:111-126
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999;18:2892-2900
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* 2001;7:683-694
- Gu Z, Flemington C, Chittenden T, Zambetti GP. ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. *Molecular Cellular Biol* 2000;20:233-241
- Baudino TA, Cleveland JL. The Max network gone mad. *Molecular Cellular Biol* 2001;21:691-702
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999;285:1733-1737
- Nielsen LL, Maneval DC. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 1998;5:52-63
- Zou Y, Zong G, Ling YH, Hao MM, Lozano G, Hong WK, Perez-Soler R. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1130-1137
- Ugai H, Suzuki E, Inabe K, Murata T, Hamada H, Yokoyama KK. Spontaneous mutations in the human gene for p53 in recombinant adenovirus during multiple passages in human embryonic kidney 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:448-456
- Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. p53 gene therapy for esophageal cancer. *J Gastroenterol* 2002;14:87-91
- Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:521-535
- Warren RS, Kirn DH. Liver-directed viral therapy for cancer p53-targeted adenoviruses and beyond. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:571-588
- Qiu Z, Lao M, Wu C. Co-transfer of human wild-type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngeal cancer cells. *Cancer Letters* 2001; 167:25-32
- Haviv YS, Takayama K, Glasgow JN, Blackwell JL, Wang M, Lei X, Curiel DT. A model system for the design of armed replicating adenoviruses using p53 as a candidate transgene. *Mol Cancer Ther* 2002;1:321-328
- Roy I, Holle L, Song W, Holle E, Wagner T, Yu X. Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22-p53 fusion protein in human tumor cells in vitro. *Anti-cancer Res* 2002;22:3185-3189

- 20 Zender L, Kuhnel F, Kock R, Manns M, Kubicka S. VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2002;9:489-496
- 21 Post LE. Selectively replicating adenoviruses for cancer therapy: an update on clinical development. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:1768-1772
- 22 Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996;2:985-991
- 23 Gautam A, Waldrep JC, Kleinerman ES, Xu B, Fung YK, T' Ang A, Densmore CL. Aerosol gene therapy for metastatic lung cancer using PEI-p53 complexes. *Methods Mol Med* 2003;75:607-618
- 24 Dolivet G, Merlin JL, Barberi-Heyob M. In vivo growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector. *Cancer Gene Ther* 2002;9:708-714
- 25 Gautam A, Densmore CL, Melton S, Golunski E, Waldrep JC. Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 2002;9:28-36
- 26 Seki M, Iwakawa J, Cheng H, Cheng PW. p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 gene therapy of human prostate PC-3 carcinoma xenograft, using transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy. *Hum Gene Ther* 2002;13:761-773
- 27 Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin YZ, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF, Chang EH. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther* 2002;1:337-346
- 28 Oakley R, Phillips E, Hooper R, Wilson D, Partridge M. A preclinical model of minimal residual cancer in the muscle highlights challenges associated with adenovirus-mediated p53 gene transfer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1984-1994
- 29 Reid T, Warren R, Kirn D. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: Lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther* 2002;9:979-986
- 30 Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, Ro JY, Hong WK, Merritt JA, Ahrar K, Atkinson NE, Correa AM, Dolormente M, Dreiling L, El-Naggar AK, Fossella F, Francisco R, Glisson B, Grammer S, Herbst R, Huaranga A, Kemp B, Khuri FR, Kurie JM, Liao Z, McDonnell TJ, Morice R, Morrello F, Munden R, Papadimitrakopoulou V, Pisters KM, Putnam JB Jr, Sarabia AJ, Shelton T, Stevens C, Shin DM, Smythe WR, Vaporciyan AA, Walsh GL, Yin M. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53(INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:93-101
- 31 Abe T, Wakimoto H, Bookstein R. Intra-arterial delivery of p53-containing adenoviral vector into experimental brain tumors. *Cancer Gene Ther* 2002;9:228-235
- 32 Asaumi J, Higuchi Y, Murakami J, Matsuzaki H, Wakasa T, Inoue T, Shigehara H, Konouchi H, Hisatomi M, Kawasaki S, Kuroda M, Hiraki Y, Kishi K. Thermoradiotherapy combined with p53 gene therapy of human salivary gland adenocarcinoma cell line. *Oncol Rep* 2003;10:71-74
- 33 Yao Q, Wang S, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Oligino TJ. Gene transfer of p53 to arthritic joints stimulates synovial apoptosis and inhibits inflammation. *Molecular Therapy* 2001;3:901-910