

# E1B55kDa 缺陷型腺病毒对人肝癌细胞的杀伤研究

赵健 吕岩 郭亚军

**【摘要】**目的 探讨 E1B55kDa 缺陷型腺病毒 dl1520 对肝癌细胞的体内外杀伤作用。方法 用 dl1520 分别感染 p53 基因型不同的人肝癌细胞,感染后第 4 天用染色的方法检测存活细胞。用 RT-PCR 检测细胞内 p53 和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达的改变,通过检测腺病毒衣壳蛋白 hexon 基因的表达证实腺病毒的感染。在 SCID 裸鼠瘤体内注射 dl1520,观察 dl1520 对肝癌细胞的体内杀伤作用。结果 p53 基因缺失的肝癌细胞 Hep3B 对 dl1520 诱导的细胞毒性作用最敏感,超过 60% 的细胞被杀伤,而不足 20% 的 HLC/PRF/5 (p53 基因突变型) 和 HepG2 (p53 基因野生型) 肝癌细胞被杀伤。腺病毒感染后, HepG2 细胞内 p53 和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达水平平均明显升高。瘤体内注射 dl1520,可显著抑制 Hep3B 裸鼠移植瘤的生长,而对 HLC/PRF/5 和 HepG2 的裸鼠移植瘤则无明显的生长抑制作用。结论 E1B55kDa 缺失的腺病毒可以选择性地杀伤 p53 基因缺失的肝癌细胞,是一种潜在的肿瘤治疗手段。

**【关键词】** 腺病毒; 癌,肝细胞; p53 基因

**Anti-tumor effect of E1B55kDa-deleted adenovirus on human hepatocellular carcinoma cell lines** ZHAO Jian, LÜ Yan, GUO Yajun. Cancer Research Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the in vitro and in vivo anti-tumoral effect of E1B55kDa-deleted adenovirus (dl1520) on human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. **Methods** Human HCC cell lines with different p53 genotypes were infected with dl1520. Four days after infection, the percentage of survival cells was determined by colorimetric assay. RT-polymerase chain reaction (PCR) was used to examine alterations of p53 and p21<sup>Waf-1</sup> expression. Adenovirus hexon gene expression was applied to prove the presence of adenovirus infections. Effects on vivo anti-tumor dl1520 were examined with intratumor injection of dl1520 in the SCID mice. **Results** After the infection, the p53-null HCC cell line, Hep3B was most vulnerable to dl1520 induced cytotoxic effect with a cell death rate of more than 60%. Whereas, less than 20% HLC/PRF/5 (p53-mutant) and HepG2 (p53-wild type) HCC cell lines were killed. The expression of p53 and p21<sup>Waf-1</sup> was considerably enhanced after the dl1520 infection in HepG2. The intratumor injection of dl1520 significantly reduced the tumor growth in Hep3B xenografts. In contrast, no obvious tumor repression was observed in HepG2 and HLC/PRF/5 xenografts. **Conclusion** dl1520 selectively kills the p53-null hepatocellular carcinoma, showing potential application for cancer treatment.

**【Subject words】** Adenovirus; Carcinoma, hepatocellular; p53 gene

1996 年 Bischoff 等<sup>[1]</sup>提出 E1B55kDa 缺失的腺病毒可以选择性地杀伤 p53 基因突变或功能缺陷的肿瘤细胞,现 E1B55kDa 缺陷型腺病毒已被用于检测对各种组织的肿瘤细胞的抗肿瘤活性<sup>[2-5]</sup>。我们通过 E1B55kDa 缺陷型腺病毒 dl1520 对 3 种不同基因型的人肝癌细胞进行体内外感染实验,以探讨缺陷型腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用。

## 材料与方法

### 1. 病毒及扩增纯化: E1B55kDa 缺陷型腺病毒

dl1520 由美国加州大学 AJ Berk 博士赠送。腺病毒在 293 细胞中扩增后,用氯化铯梯度离心分离,透析纯化,用空斑形成实验测定病毒滴度,表示为:空斑形成单位/毫升 (PFU/ml)。

2. 细胞株:人肝癌细胞株 Hep3B (p53 基因缺失)、HepG2 (p53 基因野生型) 和 HLC/PRF/5 (p53 基因突变型) 均由本室常规传代培养。

3. 细胞毒性检测:于 96 孔板中传入细胞 (1 000 细胞/孔),第 2 天用 dl1520 感染细胞,浓度分别为 1,10 和 100 MOI (空斑形成单位/细胞),每组实验有 8 孔细胞重复。4 d 后用 sulphorhodamine B (SRB) 染色的方法<sup>[6]</sup>检测存活细胞,绘制曲线。存活细胞百

作者单位:200433 上海,第二军医大学肿瘤研究所

$\text{占比}(\%) = \frac{\text{实验组 } A_{560}}{\text{对照组 } A_{560}} \times 100\%$ 。肿瘤细胞杀伤率(%) = 100% - 存活细胞百分比(%)。

4. 半定量 RT-PCR: 用 RNeasy 小量试剂盒(Qiagen)提取细胞中总 RNA。10  $\mu\text{g}$  RNA 中加入 10  $\mu\text{l}$  RNase-free DNase (Promega)和 1  $\mu\text{l}$  RNasin, 37 作用 15 min, 清除 RNA 中 DNA 污染。取 2  $\mu\text{g}$  RNA, 加入 1  $\mu\text{l}$  Superscript RNase H reverse transcriptase (Gibco/life Technologies), 按产品说明制备 DNA。在 50  $\mu\text{l}$  的反应总体积中加入 2  $\mu\text{l}$  cDNA, 引物 1 和引物 2 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{l}$ , dNTP (12.5 mmol/L) 1  $\mu\text{l}$ , 10  $\times$  缓冲液 5  $\mu\text{l}$ , TaqDNA 聚合酶 (Qiagen, 5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ 。用于扩增 p21<sup>Waf-1</sup> 基因的引物为 5' CAGTGGACAGCGAGCAGCTG 3' 和 5' GTACAAGACAGTGACAGGTC 3'; 用于扩增 p53 基因的引物为 5' GTTGGCTCTGACTGTACC 3' 和 5' GTTCCGICCCAGTAGATTACC 3'; 用于扩增腺病毒衣壳蛋白 hexon 基因的引物为 5' CGCAGTGGICTTA-CATGCAC 3' 和 5' GTACGCAGTATCCTCACGG 3'。同时扩增  $\beta$ -actin 作为质量控制, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

5. 体内杀伤实验: 皮下注射  $5 \times 10^6$  肝癌细胞于 SCID 裸鼠双侧肋部, 待肿瘤直径达 3~5 mm 时, 随机将荷瘤鼠分为 2 组: 治疗组连续 3 d 瘤体内注射  $10^8$  PFU dl1520 (肿瘤数 = 6); 对照组注射等体积 PBS 稀释液 (肿瘤数 = 6)。每周测量肿瘤大小 2 次, 计算肿瘤体积, 绘制生长曲线, 用学生式 *t* 检验进行统计分析, 并计算抑瘤率。肿瘤体积 = 肿瘤最大直径  $\times$  横径<sup>2</sup>/2; 抑瘤率 = (1 - 治疗组肿瘤体积/对照组肿瘤体积)  $\times$  100%。

## 结 果

细胞毒性实验显示, dl1520 对肝癌细胞的细胞毒性作用随着病毒滴度的增加而增强, 当 MOI 为 100 时, dl1520 对肝癌细胞的细胞毒性作用最强(图 1)。其中 dl1520 对 p53 基因缺失的肝癌细胞 Hep3B 的杀伤作用最明显, 用 100PFU/细胞的缺陷型腺病毒感染后 4 d, 63.3% 的细胞被杀伤; 而 dl1520 对 p53 基因野生型的肝癌细胞 HepG2 和 p53 基因突变型的肝癌细胞 PLC/PRF/5 的杀伤作用较弱, 杀伤率分别为 14.6% 和 12.3%。

RT-PCR 结果显示, 腺病毒感染后 24 h, 即可在 HepG2 和 Hep3B 细胞中检测到腺病毒衣壳蛋白 hexon 基因的表达。腺病毒感染后 24 h, HepG2 细胞内 p53 基因和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达水平即开始增高, 并一直持续到感染后 72 h; 而 Hep3B 细胞中则未见

p53 基因和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达(图 2)。

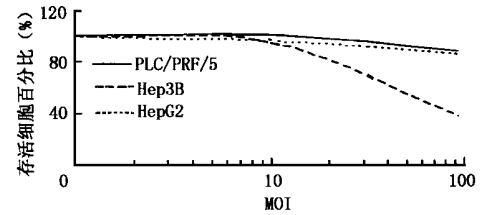


图 1 dl 1520 对 3 种肝癌细胞的细胞毒性作用

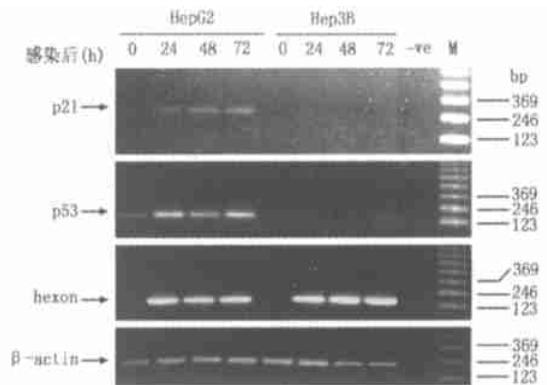


图 2 半定量 RT-PCR 检测细胞内基因表达水平

与注射 PBS 稀释液比较, 瘤体内注射  $10^8$  PFU dl1520 可显著抑制 Hep3B 移植瘤在裸鼠体内的生长, 而对 HepG2 和 PLC/PRF/5 的裸鼠移植瘤的生长抑制作用不明显(图 3)。注射后 21 d, Hep3B 移植瘤 PBS 对照组的肿瘤平均体积为  $(525.00 \pm 117.71) \text{ mm}^3$ , 而 dl1520 治疗组的肿瘤平均体积为  $(190.35 \pm 88.97) \text{ mm}^3$ , 肿瘤生长明显受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 抑瘤率为 63.7%。HepG2 移植瘤和 PLC/PRF/5 移植瘤 PBS 对照组的肿瘤平均体积分别为  $(563.50 \pm 107.05) \text{ mm}^3$  和  $(551.47 \pm 89.98) \text{ mm}^3$ ; dl1520 治疗组的肿瘤平均体积分别为  $(478.58 \pm 107.71) \text{ mm}^3$  和  $(487.05 \pm 97.31) \text{ mm}^3$ 。结果显示, 瘤体内注射 dl1520 对 HepG2 和 PLC/PRF/5 移植瘤的体内生长无明显抑制作用 ( $P > 0.05$ ), 抑瘤率分别为 15.1% 和 11.7%。

## 讨 论

用病毒治疗肿瘤是一种日益引起人们重视的肿瘤治疗手段<sup>[7]</sup>。早在 50 年代, 人们就开始利用腺病毒的细胞毒性进行治疗宫颈癌的试验。近年来, 随着人们对病毒与细胞之间相互作用认识的提高, 一些病毒被发现可以选择性地杀伤肿瘤细胞, 如 E1B55kDa 蛋白缺失的腺病毒可选择性地杀伤 p53

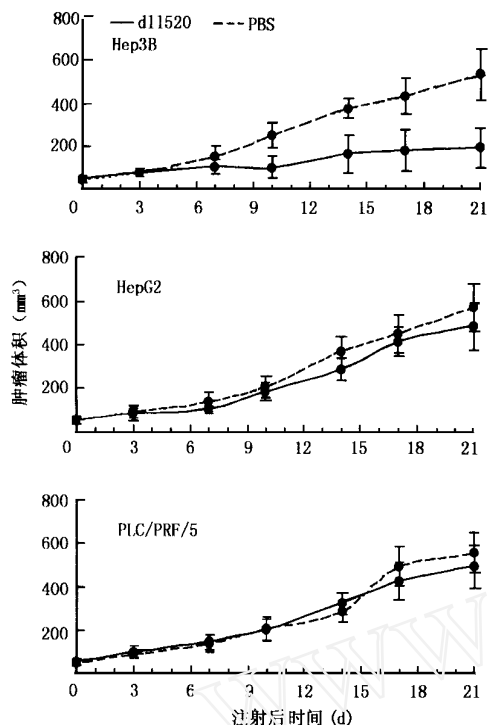


图3 dl1520 对肝癌细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用

基因突变或功能缺陷的肿瘤细胞<sup>[1]</sup>; 呼肠孤病毒可选择性地杀伤 ras 途径激活的肿瘤细胞<sup>[8]</sup>; 水痘性口炎病毒可选择性地杀伤对干扰素无反应的肿瘤细胞<sup>[9]</sup>。

腺病毒的 E1B55kDa 蛋白可以与 p53 蛋白结合并抑制 p53 的功能, 因此, 人们设想 E1B55kDa 缺失的腺病毒可以在 p53 缺陷的肿瘤细胞中繁殖, 而不能在 p53 野生型的细胞中繁殖<sup>[1]</sup>。但扩大缺陷型腺病毒感染的肿瘤细胞种类后发现, 缺陷型腺病毒对肿瘤细胞的选择性杀伤作用并不完全依赖于肿瘤细胞的 p53 状态<sup>[2-5]</sup>。我们通过 E1B55kDa 缺陷型腺病毒 dl1520 对 3 种不同基因型的肝癌细胞的细胞毒性研究发现, dl1520 可以选择性地杀伤 p53 基因缺失的肝癌细胞 Hep3B, 而对 p53 基因野生型的肝癌细胞 HepG2 和 p53 基因突变型的肝癌细胞 PLC/PRF/5 的杀伤作用较弱。此项研究结果显示, E1B55kDa 缺陷型腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用与细胞的 p53 基因状态有关, 但其他因素可能亦参与调节缺陷型腺病毒对肝癌细胞的选择性杀伤。

对腺病毒感染后细胞内 p53 和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达改变的研究显示, dl1520 感染后, HepG2 细胞内

p53 和 p21<sup>Waf-1</sup> 基因表达水平均显著提高, 而在 Hep3B 细胞内则未见表达。宿主细胞被腺病毒感染后, 细胞内的 p53 基因可以被腺病毒的 E1A 蛋白激活, 并通过反式激活一些基因(如 p21<sup>Waf-1</sup> 和 bax)抑制细胞周期或诱导细胞凋亡。p21<sup>Waf-1</sup> 是一种细胞周期素依赖型蛋白激酶 (CDKs) 的抑制剂, 起负性调节细胞周期的作用。此结果提示, 缺陷型腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用与 p53 和 p21<sup>Waf-1</sup> 的表达呈负相关, 与细胞的增殖状态有关。

瘤体内注射 10<sup>8</sup>PFU dl1520, 可显著抑制 Hep3B 移植瘤在裸鼠体内的生长, 但对 HepG2 和 PLC/PRF/5 移植瘤无明显的生长抑制作用, 此结果与 dl1520 对肝癌细胞的细胞毒性作用一致。然而单独注射 dl1520 不能完全抑制 Hep3B 移植瘤的生长或使肿瘤完全消退。已有报道, 联合使用缺陷型腺病毒和化疗药物可以提高腺病毒的抗肿瘤效果<sup>[5]</sup>。

本研究通过观察 E1B55kDa 缺陷型腺病毒对肝癌细胞的体内外杀伤作用, 证明 E1B55kDa 缺陷型腺病毒可以选择性杀伤 p53 基因缺失的肝癌细胞, 是一种潜在的治疗肝癌的途径。

#### 参 考 文 献

- 1 Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 1996, 274: 373-376.
- 2 Hall AR, Dix BR, O Carroll SJ, et al. p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med*, 1998, 4: 1068-1072.
- 3 Godrum FD, Ornelles DA. p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol*, 1998, 72: 9479-9490.
- 4 Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al. Replication of ONYX015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, 1998, 72: 9470-9478.
- 5 Vollmer CM, Ribas A, Butterfield LH, et al. p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1999, 59: 4369-4374.
- 6 Craig C, Wersto R, Kim M, et al. A recombinant adenovirus expressing p27kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1997, 14: 2283-2289.
- 7 Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biol*, 2000, 18: 723-727.
- 8 Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, et al. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science*, 1998, 282: 1332-1334.
- 9 Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*, 2000, 6: 821-825.

(收稿日期: 2000-08-30)