

## E1B缺陷性腺病毒对p53缺失性白血病细胞的作用

应用病毒直接杀死肿瘤细胞是近年来新兴的抗肿瘤方法，E1B缺陷性腺病毒(d11520)是其中研究进展最快的一种。研究发现[2]，腺病毒在宿主细胞中的复制会受到E1B 55 000蛋白和p53蛋白的调控，其主要机制是p53蛋白可抑制腺病毒在宿主细胞中的复制，而E1B 55 000蛋白则通过抑制宿主细胞p53以确保腺病毒的复制能顺利进行。d11520系人第5型腺病毒，其基因组核苷酸2 022 bp处有C→T的点突变，2 496~3 323 bp之间缺失827 bp的核苷酸片段[1]。由于这些缺陷，d11520不能表达E1B 55 000蛋白，从而不能抑制p53，因此不能在p53功能正常的细胞中复制，但可以在p53功能缺陷的细胞中复制。由于p53缺陷现象在肿瘤细胞中非常多见，d11520成为了恶性肿瘤的治疗研究热点。目前，关于d11520对实体瘤的治疗作用已进入III期临床试验[3][4]，并被认为可用于治疗几乎所有的恶性肿瘤[4]。

为探讨d11520对血液恶性细胞的作用，我们选择了几个p53缺陷的细胞株进行了如下研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病毒与细胞

E1B缺陷性腺病毒d11520，由本所自备。p53缺失的人白血病细胞株K562、Jurkat、HL-60由上海细胞生物研究所提供，作为阳性对照的p53突变的人大肠癌细胞株HT-29(d11520在HT-29中能有效复制并杀死细胞[5])由南方医院消化科吴保平博士惠赠，293细胞由中山医科大学药理教研室惠赠。

#### 1.2 d11520的感染

上述各种细胞株分别取 $3 \times 10^5$ 个细胞(HT-29在感染前一天接种于6孔板中)，去除原培养液，加入不同滴度的感染液(RPMI1640+2%胎牛血清+d11520)，每组总体积小于500  $\mu$ l，37  $^{\circ}$ C孵育，每隔15 min晃匀1次，1 h后去感染液，各加入3 ml全培养液于37  $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>中培养。

#### 1.3 d11520复制的检测

感染72 h后，收集细胞及培养液。反复冻融3次后离心取上清，以病毒空斑试验在293细胞中测定病毒滴度[6]。

#### 1.4 d11520的致死作用

各细胞株分别取 $1 \times 10^5$ 个细胞(HT-29在感染前一天接种于6孔板中)进行感染，两天换液1次，不传代，在选定的时间点以锥虫蓝染色判别死细胞，计数500个细胞，求出死细胞比例。

### 2 结果

#### 2.1 d11520的复制

按每个细胞5、50个空斑单位(pfu)进行感染，72 h后检测病毒的复制情况，结果发现d11520几乎不能在HL-60、Jurkat细胞中复制，在K562细胞中则仅有很低的复制(图1)。

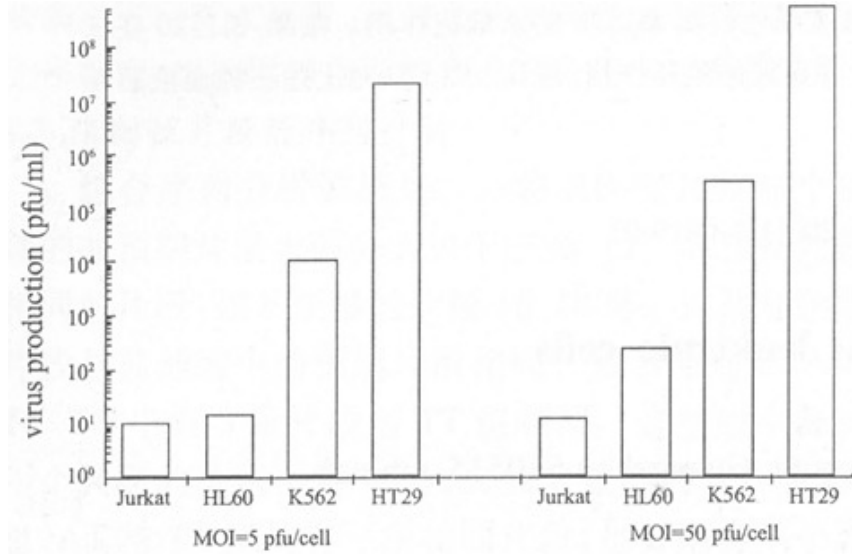


图1 d11520在各细胞株的复制 (结果源于两次独立的实验)  
 Fig.1 Replication efficiency of d11520 in various cell lines  
 The results were obtained from two separated experiments

## 2.2 d11520的致死作用

按每个细胞5、50 pfu进行感染, 连续观察10 d, 结果发现d11520对这3种血液恶性细胞株均不能有效地诱导死亡(图2)。

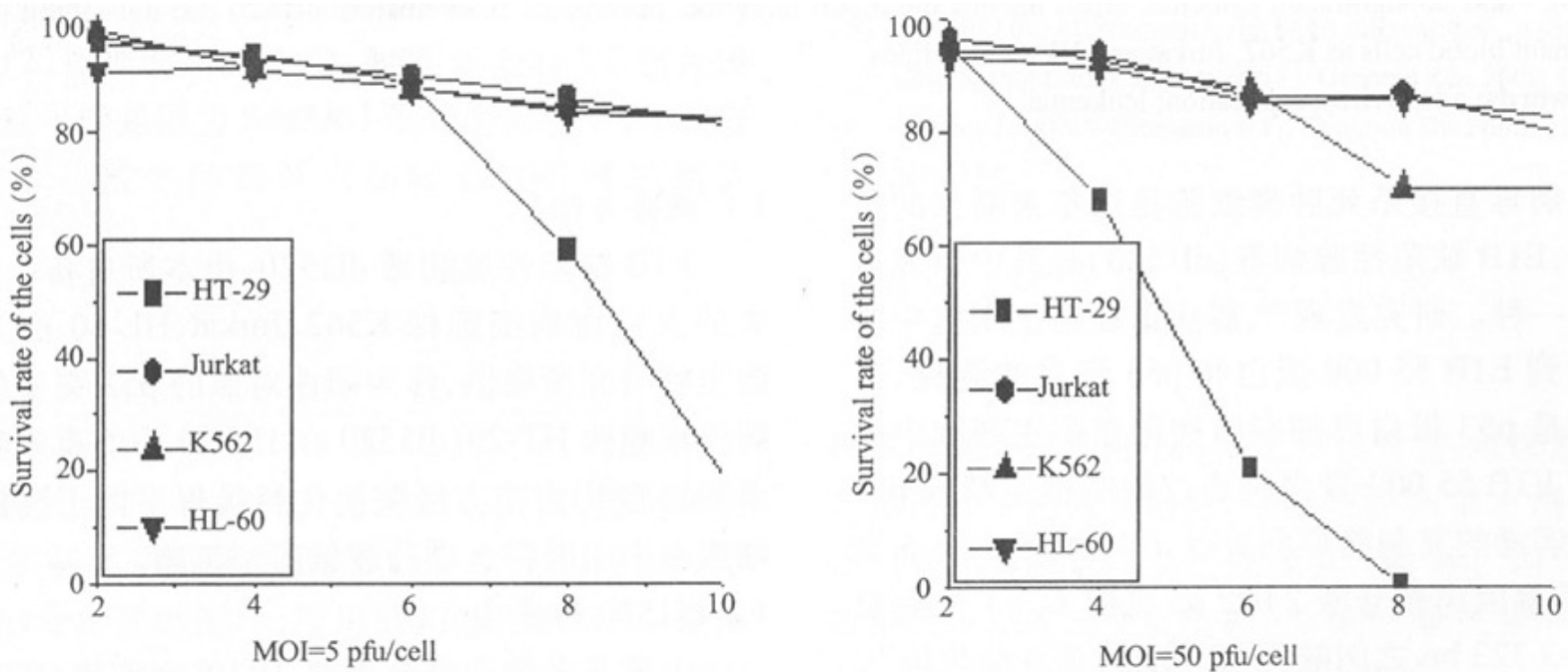


图2 d11520对各细胞株的致死作用 (结果源于两次独立的实验)  
 Fig.2 The cytopathic effect of d11520 on various cell lines  
 The results were obtained form two separated experiments

## 3 讨论

本研究发现, 尽管K562、Jurkat、HL-60这三种白血病细胞的p53是缺失的, 但d11520在其中的复制却非常低, 对这些细胞不能产生显著的杀死作用。鉴于上述结果, 我们认为应用d11520治疗白血病是无意义的。除了作用效果差以外, 给药途径也是一个问题, 因为d11520的全身给药易诱发机体免疫系统产生针对d11520的免疫反应, 不仅清除病毒体, 还可能对

人体产生损害；另外，全身给药也有造成身体其他重要脏器被感染的潜在危险[7]。

我们的结果还表明仅以p53的状况并不能确定d11520的靶细胞，一些恶性肿瘤细胞尽管其p53是缺失的，但由于诸如病毒受体、整合素以及其他一些未知因素的调节，可能严重影响d11520的抗癌作用。近年来的研究还发现d11520能在p53正常的肿瘤细胞中复制，显示d11520的复制与宿主细胞p53的状态并无关系。为此，不少学者对p53能否抑制d11520的复制产生质疑[5][8]。但最新的研究认为d11520之所以能在p53正常的肿瘤细胞中复制，是由于这些细胞的p14<sup>ARF</sup>缺失造成p53功能失活所致[9]。

尽管存在理论上的争议，可临床试验结果表明d11520对晚期头、颈癌具有显著疗效，不仅能直接杀肿瘤细胞，还具有促进化疗、放疗的效果，而对正常组织却没有损害[3][10]。至于d11520在上述三种p53缺陷的白血病细胞中复制率为何如此低下，我们考虑这与d11520对白血病细胞的感染率有很大的关系，相关的研究目前仍在进行中。

#### 参考文献：

- [1] 吴曙光, 徐伟. 缺陷性腺病毒抗肿瘤作用研究进展[A]. 见金正均, 王永铭, 苏定冯主编. 药理学进展[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 169-77.
- [2] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373-6.
- [3] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(2): 289-98.
- [4] Kirn D, Hermiston T, McCormick F. ONYX-015: clinical data are encouraging[J]. *Nat Med*, 1998, 4(12): 1341-2.
- [5] Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenovirus are independent of host cell P53 status[J]. *J virol*, 1999, 73(3): 2074-83.
- [6] Jones N, Shenk T. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5[J]. *Cell*, 1978, 13: 181-6.
- [7] Heise CC, Williams AM, Xue S, et al. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(6): 2623-8.
- [8] Rothmann T, Hengsterman A, Whitaker NJ, et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells [J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 9470-8.
- [9] Stefan JR, Christian HB, Alicia SC, et al. Loss of p14<sup>arf</sup> in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520(ONYX-015) [J]. *Nat Med*, 2000, 6(10): 1128-33.
- [10] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879-85.

#### 参考文献：

- [1] 吴曙光, 徐伟. 缺陷性腺病毒抗肿瘤作用研究进展[A]. 见金正均, 王永铭, 苏定冯主编. 药理学进展[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 169-77.
- [2] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373-6.
- [3] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(2): 289-98.
- [4] Kirn D, Hermiston T, McCormick F. ONYX-015: clinical data are encouraging[J]. *Nat Med*, 1998, 4(12): 1341-2.
- [5] Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenovirus are independent of host cell P53 status[J]. *J virol*, 1999, 73(3): 2074-83.
- [6] Jones N, Shenk T. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5[J]. *Cell*, 1978, 13: 181-6.
- [7] Heise CC, Williams AM, Xue S, et al. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(6): 2623-8.

[8] Rothmann T, Hengstermam A, Whitaker NJ, et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells [J]. J Virol, 1998, 72(12): 9470-8.

[9] Stefan JR, Christian HB, Alicia SC, et al. Loss of p14arf in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520(ONYX-015) [J]. Nat Med, 2000, 6(10): 1128-33.

[10] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. Nat Med, 2000, 6(8): 879-85.

---

[回结果列表](#)