

E1B 缺陷性腺病毒对 p53 缺失性白血病细胞的作用

饶进军 袁正光 袁伟 袁曙光 第一军医大学药物研究所 广东 广州 510515 免

摘要目的 研究 E1B 缺陷性腺病毒 dl1520 对 3 种 p53 缺失性白血病细胞 K562、Jurkat 和 HL-60 的作用。方法 以病毒空斑试验检测 dl1520 在上述 3 种宿主细胞中的复制情况,用锥虫蓝染色检测 dl1520 的杀细胞作用。结果 dl1520 在 3 种白血病细胞中的复制明显低于阳性对照组,且对白血病细胞没有显著的致死作用。结论 dl1520 对上述三种血液恶性细胞不能产生有效的抑制作用。

关键词腺病毒;复制;白血病

中图分类号 R979.1 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2001)11

袁正光,袁伟,袁曙光,饶进军,第一军医大学药物研究所,广东 广州 510515 免

RAO Jin-jun, Zhu Zheng-guang, XU Wei, WU Shu-guang

(Institute of Pharmaceutical Science, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

摘要目的 研究 E1B 缺陷性腺病毒 (dl1520) 对 3 种 p53 缺失性白血病细胞 K562, Jurkat 和 HL-60 的复制效率。方法 用空斑试验检测 dl1520 在上述 3 种宿主细胞中的复制情况,用锥虫蓝染色检测 dl1520 的杀细胞作用。结果 dl1520 在 3 种白血病细胞中的复制明显低于阳性对照组,且对白血病细胞没有显著的致死作用。结论 dl1520 对上述三种血液恶性细胞不能产生有效的抑制作用。

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 dl1520 是其中研究进展最快的一种。研究发现腺病毒在宿主细胞中的复制会受到 E1B55000 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 E1B55000 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。dl1520 系第 5 型腺病毒,其基因组核苷酸 2022bp 处有 C→T 的点突变,2496~3323bp 之间缺失 827bp 的核苷酸片段。由于这些缺陷,dl1520 不能表达 E1B55000 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常见,dl1520 成为了恶性肿瘤的治疗研究热点。目前关于 dl1520 对实体瘤的治疗作用已进入一期临床试验,并被认为可用于治疗几乎所有的恶性肿瘤。

为探讨 dl1520 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

收稿日期 2001-04-19

基金项目 国家自然科学基金资助项目(980203)

作者简介 饶进军,1963 年,男,江西玉山人,1986 年毕业于第一军医大学,博士,电话 020-85148167

1.1 病毒与细胞

E1B 缺陷性腺病毒 dl1520 由本所自备。p53 缺失的人白血病细胞株 K562、Jurkat 和 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 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 dl1520 的感染

上述各种细胞株分别取 3×10^5 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 +dl1520,每组总体积小于 500 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育,每隔 15min 晃动 1 次,1 h 后去感染液,各加入 3ml 全培养液于 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 中培养。

1.3 dl1520 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。

1.4 dl1520 的致死作用

各细胞株分别取 1×10^5 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 dl1520 的复制

按每个细胞 5 个空斑单位进行感染 72 h 后检测病毒的复制情况。结果发现 dl1520 几乎不能在 HL-60 和 Jurkat 细胞中复制。在 K562 细胞中则仅有很低的复制。

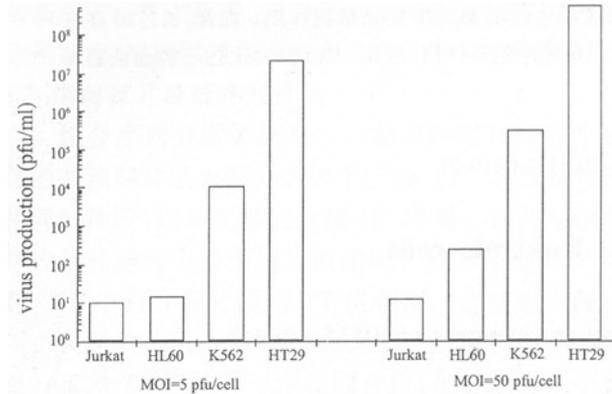


图 1 dl1520 在各细胞株的复制结果源于两次独立的实验。The results were obtained from two separated experiments.

2.2 dl1520 的致死作用

按每个细胞 5 个空斑单位进行感染。连续观察 10 天。结果发现 dl1520 对这 3 种血液恶性细胞株均不能有效地诱导死亡。

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 dl1520 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 dl1520 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 dl1520 的全身给药易诱发机体免疫系统产生针对 dl1520 的免疫反应，不仅清除病毒，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。

我们的结果还表明仅以 p53 的状况并不能确定 dl1520 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

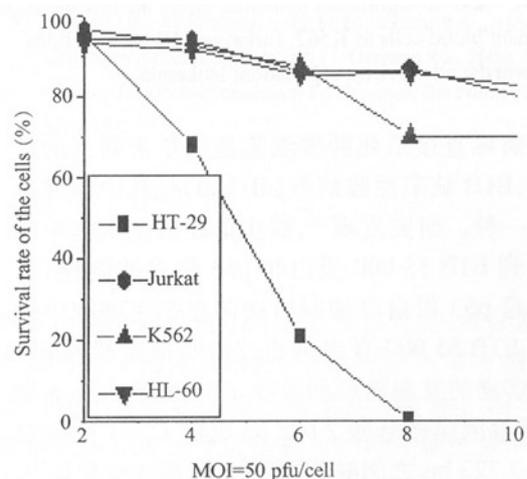
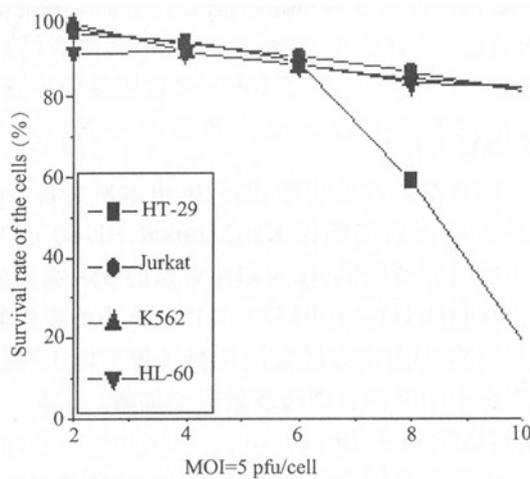


图 2 dl1520 对各细胞株的致死作用结果源于两次独立的实验。The results were obtained from two separated experiments.

知因素的调节，可能严重影响 dl1520 的抗癌作用。近年来的研究还发现 dl1520 能在 p53 正常的肿瘤细胞中复制。显示 dl1520 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 dl1520 的复制产生质疑。但最新的研究认为 dl1520 之所以能在 p53 正常的肿瘤细胞中复制，是由于这些细胞的 p14ARF 缺失造成 p53 功能失活所致。

尽管存在理论上的争议，可临床试验结果表明 dl1520 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。至于 dl1520 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

dl1520 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. 见金正均, 王永铭, 苏定冯主编. 药理学进展. 北京: 科学出版社, 1998. 169-77.

2 Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. A replication-selective adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science, 1996, 274(5286): 373-6.

3 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. Phase I trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J Clin Oncol,

- 2001,19(2):289-98.
- 4 Kirn D, Hermiston T, McCormick F. ONYX-015: clinical data are encouraging. *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 adenoviruses are independent of host cell P53 status. *J Virol*, 1999, 73(3): 2074-83.
- 6 Jones N, Shenk T. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 8. *Cell*, 1978, 13: 181-6.
- 7 Heise CC, Williams AM, Xue S. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumor efficacy. *Cancer Res*, 1999, 59(6): 2623-8.
- 8 Rothmann T, Hengsterman A, Whitaker NJ. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, 1998, 72(12): 9470-8.
- 9 Stefan JR, Christian HB, Alicia SC. Loss of p14^{arf} in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat Med*, 2000, 6(10): 1128-33.
- 10 Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I. 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. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879-85.

鼻出血的微波治疗 68 例临床分析

江 刚 (第一军医大学珠江医院耳鼻咽喉科 广东 广州 510282)

摘要 目的 探讨鼻出血微波治疗的效果。方法 在局麻下对 68 例鼻出血患者的出血点接受微波热凝固治疗。结果 除 8 例经再次治疗痊愈外,其余 60 例均 1 次治愈。随访 3~6 个月无复发,无并发症。结论 微波治疗鼻出血具有设备简单、操作方便、安全有效和患者痛苦少的优点,在一定程度上可替代传统的鼻腔填塞法。

关键词 电凝法;微波;鼻出血 / 治疗

中图分类号 R765.23 文献标识码 B 文章编号 1000-2588(2001)11

临床上除血液和心血管疾病等出血因素外,由于出血部位隐蔽导致治疗时不能有效封闭出血血管是反复鼻出血最常见的原因。1999 年 2 月~12 月我科采用微波治疗鼻出血 68 例,效果满意,现报告分析如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

男性 45 例,女性 23 例,年龄 10~75 岁,平均 37.5 岁。病史 1d~2 年,其中近期反复出血者 35 例,合并高血压者 17 例,糖尿病 5 例,尿毒症 6 例,贫血 29 例,4 例曾接受前鼻孔填塞,1 例无效,1 例前后鼻孔填塞,1 例无效,出血部位 Little 氏区 39 例,鼻甲 9 例,中鼻甲 3 例,鼻中隔中后部 10 例,其他部位 7 例,左侧 38 例,右侧 25 例,双侧 5 例。

1.2 治疗方法

患者取坐位,先用吸引器吸净患侧鼻腔的血液,再用含有少量 0.1% 肾上腺素的 1% 的地卡因棉片置入患侧鼻腔内实施表麻并收缩鼻粘膜,然后从前向后仔细检查出血灶,对于鼻腔中后部的出血灶,借助鼻内窥镜或纤维鼻咽喉镜查明出血部位,并在其引导下实施治疗。采用珠海和佳系统工程有限公司研制的 EBH-III 型耳鼻咽喉综合治疗仪,选择输出功率 50~60W,时间 2~4s,将微波发射头轻贴出血点,点射,按照先凝固周围后凝固中央的顺序进行,可根据出血范围多次间断点射,至热凝部位粘膜发白为止,适当出血灶出血停止,周边干洁时,凝固效果最好。治疗后鼻腔交替滴用 1% 呋麻合剂和复方薄荷油,不需填塞。

2 结果

60 例 1 次治愈,8 例需次日再次治疗痊愈者多为鼻腔后部出血,治疗后 3~5d 热凝部假膜形成,局部可结痂或有少量粘性分泌物,约 10d 假膜脱落,周左右粘膜光滑,一般无疤痕,随访 3~6 个月无复发,治疗时无疼痛及其他不适,治疗后无鼻塞,鼻腔粘连或鼻中隔穿孔,患者不需住院或留观。

3 讨论

填塞止血法是临床应用了多年的治疗鼻出血的方法,但其有一定的盲目性,且创伤大,病人痛苦也大。微波治疗的原理主要是通过微波作用于组织细胞后产生强烈的分子运动,形成特殊的组织内生热效应,在组织内部引起蛋白质热凝固,导致血管闭塞,组织变性,收缩而达到治疗目的。本组病例使用微波热凝固法治疗鼻出血,在确定出血灶的前提下,仅需数秒即可止血,同时鼻腔不需填塞,大大减轻了患者的痛苦。电灼、冷冻、激光也常用于治疗鼻出血,但有碳化、烟雾、汽化、组织糜烂坏死等缺点。微波治疗克服了这些不足,且创面完整,无并发症,仪器设备简单,操作简便,易为医护人员和患者接受,值得在临床推广应用。但对于合并有全身性疾病的患者,为确保疗效,应同时积极治疗原发病。对于无法明确出血灶或反复治疗无效的患者,仍应尽早进一步采取其他有效的止血措施,以免延误病情。

参考文献

- 1 黄红彦,崔永华,高起学.鼻出血失败的相关因素及分级治疗. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1996, 10(6): 352-4.
- 2 江 刚,钟健略,焦粤龙,等.微波治疗常年性变应性鼻炎的初步观察. *第一军医大学学报*, 1999, 19(5): 471-2.

收稿日期 2000-11-20

作者简介 江 刚 (1963-),男,广东花都人,1991 年毕业于中山医科大学,硕士,主治医师,讲师,电话 020-85142768