

pEgr-IFN γ 基因-放射治疗对荷瘤小鼠抑瘤效应的研究

杨巍 李修义 李秀娟 田梅 龚守良

(吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 探讨 pEgr-IFN γ 基因-放射治疗小鼠体内抗肿瘤作用的适宜照射剂量和质粒注入量。观察不同剂量 X 射线照射及瘤内不同量 pEgr-IFN γ 重组质粒注入, 基因-放射治疗在接种 B16 黑色素瘤小鼠体内抑瘤效应的差异, 并用酶联免疫吸附法 (ELISA) 法检测各组小鼠外周血 IFN γ 含量。结果表明, 质粒注入后接受 20Gy X 射线照射组照后 3—27d, 肿瘤生长速率明显低于 2Gy 和 10Gy 照射组 ($p < 0.001$), 且小鼠平均生存时间明显延长 ($p < 0.001$)。质粒注入量为 20 μ g 或 30 μ g 的联合治疗组照后 3—27d, 肿瘤生长速率明显低于注入量为 10 μ g 的联合治疗组 ($p < 0.05—0.001$), 且平均生存时间明显延长 ($p < 0.01$)。基因-放射联合治疗组受照射后第 1 天和第 3 天外周血 IFN γ 含量明显高于单纯基因治疗组均为 ($p < 0.05$) 和对照组, 分别为 ($p < 0.01, p < 0.05$)。结果显示, pEgr-IFN γ 基因-放射治疗小鼠体内抗肿瘤作用的适宜照射剂量为 20Gy, 质粒注入量为 20 μ g; 联合治疗组可能通过诱导瘤内 IFN γ 基因表达增强, 使血液中的 IFN γ 浓度升高, 进而增强机体免疫功能和抗肿瘤能力。

关键词 pEgr-IFN γ 重组质粒, 基因-放射治疗, B16 黑色素瘤, X 射线

中图分类号 Q785, R811.5, R322

肿瘤的基因-放射治疗是将辐射诱导性基因的调控序列与肿瘤杀伤基因相偶联, 转染肿瘤细胞, 在对肿瘤实施局部放疗的同时诱导肿瘤杀伤基因表达增强, 产生辐射和基因表达产物的协同抑瘤作用。该疗法一方面将放疗与基因治疗有机结合, 发挥协同作用^[1, 2]; 另一方面, 由于辐射具有靶向性和可控性, 实现了对杀伤基因表达的时空调控^[3]。因此, 基因-放射治疗近年来成为肿瘤治疗领域新的研究热点之一。大量资料表明^[4, 5], 电离辐射可激活 Egr-1 启动子并诱导下游抗肿瘤基因表达增强。根据上述机理, 文献[6]成功构建了 pEgr-IFN γ 重组质粒, 并进行了辐射诱导下的抑瘤实验研究。结果表明, 在电离辐射诱导下, 与 Egr-1 启动子连接的 IFN γ 基因表达增强并且提高了放疗效果。本研究在此基础上进一步观察不同剂量 X 射线照射及瘤内不同量质粒注入, 基因-放射治疗在小鼠体内抑瘤效应的差异, 以选择适宜治疗方案, 探讨电离辐射、基因

表达水平及放疗效果三者之间的关系, 为肿瘤 IFN γ 基因-放射治疗的临床应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及细胞

昆明小鼠, 雌性, 体重 16—18g, 健康, 购自本校实验动物部。B16 黑色素瘤细胞株, 本室保存, 体外完全培养基传代培养。

1.2 质粒的提取与注入

将转化 pEgr-IFN γ 重组质粒 (吴丛梅博士构建并提供) 的大肠杆菌接种于 100mL LB 培养基中, 37°C、170r/min 振摇 16—18h, 碱裂解法大量提取质粒。每只动物移植肿瘤内局部注射由 20 μ g 脂质体 (GIBCO 公司) 包裹的质粒 (P), 对照组及单纯照射组注射 0.1mL PBS。

1.3 实验动物分组方法

于每只小鼠右后肢皮下接种 0.1mL 浓度为

国家自然科学基金 (39970229) 资助

第一作者: 杨巍, 男, 1976 年 10 月出生, 1998 年毕业于白求恩医科大学临床医学专业, 助教, 在读医学博士生, 主要从事肿瘤的基因-放射治疗研究

通讯联系人: 李修义

收稿日期: 初稿 2002-07-15, 修回 2002-09-05

$5 \times 10^6/\text{mL}$ 的 B16 细胞悬液,待肿瘤生长至直径约 5mm 时,将动物随机分组。选择适宜照射剂量时分组方法:(1)对照组(Control)瘤内注射 0.1mL PBS;(2)单纯质粒组(P alone):瘤内注射 20 μg 质粒;(3) 20Gy 照射组(20Gy):瘤内注射 0.1mL PBS;(4) 质粒加 2Gy 照射组(P+2Gy):瘤内注射 20 μg 质粒后局部接受 2Gy X 射线照射;(5) 质粒加 10Gy 照射组(P+10Gy);(6) 质粒加 20Gy 照射组(P+20Gy);选择适宜质粒给入量时分组方法:(1)对照组(Control):瘤内注射 0.1mL PBS;(2) 20Gy 照射组(20Gy):瘤内注射 0.1mL PBS;(3) 10 μg 质粒加 20Gy 照射组(10 μg +20Gy);(4) 20 μg 质粒加 20Gy 照射组(20 μg +20Gy);(5) 30 μg 质粒加 20Gy 照射组(30 μg +20Gy)。

1.4 照射条件

采用国产 X 射线深部治疗机,电压 220kV, 电流 10mA, 滤板 0.5mm Cu 和 1.0mm Al, 剂量率为 0.287Gy/min。注射质粒后 42h 肿瘤局部接受不同剂量 X 射线照射,其它部位铅板屏蔽。

1.5 肿瘤体积测定

用游标卡尺测量肿瘤最长径(L)和垂直方向最

大横径(W),每 3d 测量 1 次,肿瘤体积 $V=LW^2/2$ 。不同时间所测体积与照射前体积之比为肿瘤生长速率(f)。

1.6 外周血中 IFN γ 的检测

应用小鼠 IFN γ ELISA 检测试剂盒(晶美公司)。

1.7 统计学处理

两样本均数比较采用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 中等量(20 μg)质粒给入后经不同剂量照射,各组小鼠肿瘤生长速率及平均生存时间

3 个基因-放射治疗组与对照组相比,肿瘤生长速率均明显降低($p < 0.05 \sim 0.001$),平均生存时间均明显延长($p < 0.001$)。其中,P+20 Gy 组照后第 3—27 天,肿瘤生长速率明显低于 P+2 Gy 组($p < 0.001$)和 P+10Gy 组($p < 0.001$),而平均生存时间明显延长($p < 0.001$)。P+10Gy 组照后第 9—27 天肿瘤生长速率明显低于 20Gy 组($p < 0.05 \sim 0.001$),平均生存时间亦明显延长($p < 0.05$)见表 1。

Tab.1 Effects of gene-radiotherapy on tumor growth after different dose irradiations

($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	$f(V/V_0)$ of different days after irradiation					Mean survival period / d
	3 d	9 d	15 d	21 d	27 d	
Control	1.99 $\pm$ 0.39	11.64 $\pm$ 1.48	24.35 $\pm$ 5.29	32.54 $\pm$ 6.82	36.45 $\pm$ 8.50	27.80 $\pm$ 2.49
P alone	1.35 $\pm$ 0.13 [★]	3.79 $\pm$ 0.59 [▲]	9.86 $\pm$ 1.97 [▲]	21.64 $\pm$ 5.58 [▲]	29.12 $\pm$ 7.11 [▲]	35.74 $\pm$ 2.73 ^{★★}
20Gy	1.38 $\pm$ 0.18 [★]	3.59 $\pm$ 0.40 [▲]	7.16 $\pm$ 1.84 [▲]	13.25 $\pm$ 2.52 [▲]	19.69 $\pm$ 5.33 [▲]	49.03 $\pm$ 2.74 [▲]
P+2Gy	1.33 $\pm$ 0.19 [★]	2.81 $\pm$ 0.39 [▲]	5.48 $\pm$ 1.12 ^{▲*}	10.25 $\pm$ 3.73 ^{▲*}	18.84 $\pm$ 6.74 [▲]	46.42 $\pm$ 2.51 [▲]
P+10Gy	1.28 $\pm$ 0.19 [★]	2.28 $\pm$ 0.35 ^{▲*}	5.05 $\pm$ 0.90 ^{▲*}	8.11 $\pm$ 1.96 ^{▲***}	12.87 $\pm$ 3.98 ^{▲**§}	55.04 $\pm$ 3.16 ^{▲***}
P+20Gy	0.53 $\pm$ 0.16 ^{▲°§^}	0.18 $\pm$ 0.10 ^{▲°§^}	0.12 $\pm$ 0.10 ^{▲°§^}	0.48 $\pm$ 0.14 ^{▲°§^}	0.71 $\pm$ 0.23 ^{▲°§^}	68.95 $\pm$ 6.59 ^{▲°§^}

★ $p < 0.05$, ★★ $p < 0.01$ and ▲ $p < 0.001$ vs Control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and § $p < 0.001$ vs 20 Gy group, ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$ and °°° $p < 0.001$ vs P+2 Gy group, ^ $p < 0.001$ vs P+10 Gy group

2.2 10、20、30 μg 质粒给入后经 20Gy X 射线局部照射, 各组小鼠肿瘤生长速率及平均生存时间(20 μg +20Gy) 组与 (30 μg +20Gy) 组之

间差异无统计学意义, 但与 (10 μg +20Gy) 组相比, 肿瘤生长速率均明显降低($p < 0.05 \sim 0.001$), 平均生存时间明显延长($p < 0.01$) 见表 2。

Tab.2 Effects of gene-radiotherapy on tumor growth after plasmid injection with different doses ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	$f(V/V_0)$ of different days after irradiation					Mean survival period / d
	3 d	9 d	15 d	21 d	27 d	
Control	1.96 $\pm$ 0.33	12.93 $\pm$ 2.93	26.24 $\pm$ 6.62	34.43 $\pm$ 9.09	39.75 $\pm$ 9.84	27.22 $\pm$ 3.43
20Gy	1.48 $\pm$ 0.31 [★]	3.48 $\pm$ 1.05 [▲]	6.63 $\pm$ 0.85 [▲]	13.78 $\pm$ 1.45 [▲]	20.17 $\pm$ 5.91 [▲]	46.64 $\pm$ 3.79 [▲]
10 μ g+20Gy	1.20 $\pm$ 0.46 [★]	2.21 $\pm$ 1.15 [▲]	4.72 $\pm$ 1.62 ^{★▲}	7.93 $\pm$ 2.13 ^{§▲}	12.74 $\pm$ 4.53 ^{§▲}	54.21 $\pm$ 3.53 ^{▲*}
20 μ g+20Gy	0.64 $\pm$ 0.19 ^{▲•§}	0.42 $\pm$ 0.16 ^{▲°§}	0.26 $\pm$ 0.23 ^{▲°§}	0.07 $\pm$ 0.11 ^{▲°§}	0.64 $\pm$ 0.29 ^{▲°§}	70.21 $\pm$ 5.84 ^{▲•▲§}
30 μ g+20Gy	0.64 $\pm$ 0.15 ^{▲•§}	0.36 $\pm$ 0.08 ^{▲°§}	0.16 $\pm$ 0.12 ^{▲°§}	0.12 $\pm$ 0.10 ^{▲°§}	0.76 $\pm$ 0.36 ^{▲°§}	68.37 $\pm$ 6.82 ^{▲•▲§}

★ $p<0.05$, ★★ $p<0.01$ and ▲ $p<0.001$ vs Control, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and § $p<0.001$ vs 20 Gy group, • $p<0.05$,
● $p<0.01$ and ° $p<0.001$ vs 10 μ g + 20Gy group

2.3 外周血中 IFN γ 含量

(20 μ g+20Gy) 组照后第 1 天和第 3 天外周血 IFN γ 含量明显高于对照组 ($p<0.01, p<0.05$) 和 20 μ g 基因治疗组 ($p<0.05$) ; 20 μ g 基因治疗组注入质粒后第 1 天外周血 IFN γ 含量明显高于对照组 ($p<0.05$) , 第 3 天两者之间无明显差异 ; 第 5 天各组之间无明显差异 (见图 1) 。

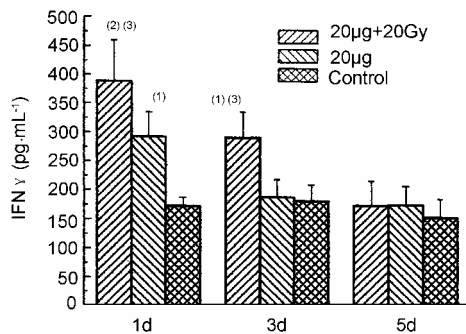


Fig.1 Concentration of IFN γ in peripheral blood $n=3$, (1) $p<0.05$, (2) $p<0.01$, vs, control group (3) $p<0.05$, vs,20 μ g group.

3 讨论

恶性肿瘤是当前人类健康面临的主要威胁之一，其有效治疗方案是国内外持续研究的热点。放射治疗是目前临床上应用最广泛和最重要的治疗手段之一，但长期以来，肿瘤临近部位正常组织的放射损伤和某些肿瘤对辐射具有抗性等问题，影响着放疗的疗效和应用。根据放射治疗和基因治疗各自的特点，美国肿瘤放射治疗专家 Weichselbaum^[1]于 1992 年提出将两者联合应用，即肿瘤的基因-

放射治疗的设想，其含义是将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因转入体内，在对肿瘤实施局部放疗时诱导肿瘤杀伤基因表达，造成射线和基因表达产物对肿瘤的双重杀伤作用，以达到降低照射剂量、减少正常组织损伤和增强放疗效果的目的。在深入研究 Egr-1 基因启动子辐射诱导特性的基础上，首先利用 Egr-1 基因启动子和 TNF α 基因构建表达质粒 pEgr-TNF α ，将转染该质粒的靶细胞注入对辐射具有抗性的异种移植瘤内，当肿瘤局部给予 X 射线照射后，瘤内 TNF α 水平较未照射组高 2.7 倍，肿瘤生长受到明显抑制，且未见局部和全身毒性的增加^[2]。目前，国内外研究结果表明在电离辐射诱导下，与 Egr-1 启动子连接的治疗基因均有较明显的辐射诱导表达并可提高放疗效果。由于肿瘤的发生和发展是涉及多种因素、多种途径和多种基因变化的复杂的多阶段过程，因此选择有效的治疗基因是进一步提高基因-放射治疗效果的关键。IFN γ 的抗肿瘤作用早已得到充分肯定，IFN γ 由 CD $_4^+$ 和 CD $_8^+$ T 淋巴细胞分泌，NK 细胞也能分泌 IFN γ 。IFN γ 可直接抑制肿瘤细胞增殖，激活巨噬细胞和 NK 细胞，诱导 MHC- I 类和 II 类抗原表达，促进 T $_H$ 与 APC 和 CTL 与靶细胞的识别和相互作用，还可通过上调 TNF 受体，增强 TNF 抗肿瘤作用。

以往研究资料表明^[6]，pEgr-IFN γ 基因-放射治疗组抑瘤作用明显高于单纯放疗和单纯基因治疗组，联合治疗后第 3 天肿瘤局部 IFN γ mRNA 表达水平明显高于单纯基因治疗组，而单纯照射组和对照组均无明显表达，第 15 天其脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN γ 分泌活性均明显升高。本实验又探讨了不同剂量 X 射线照射及不同质粒

注入量,对基因-放射治疗在荷瘤动物体内抑瘤效应的影响,并用 ELISA 法检测各组小鼠血清 IFN γ 含量。

国内外相关研究中均采用较大剂量(20Gy)照射^[8,9],为探讨中、小剂量基因-放射治疗的抑瘤效应,本实验设置了 2Gy、10Gy 联合治疗组,并与 20Gy 联合治疗组抑瘤效应相比较。结果表明,2、10、20Gy 3 个不同剂量基因-放射治疗组与对照组相比,肿瘤生长速率均明显降低,平均生存时间均明显延长,且抑瘤效果随照射剂量增加而增强。其中 P+20Gy 组于照后 3—27 d,肿瘤生长速率明显低于 P+2Gy 组和 P+10Gy 组,而平均生存时间明显延长,故选择 20Gy 可作为荷瘤小鼠联合治疗的适宜照射剂量。另外, P+10Gy 组照后 9—27 d 肿瘤生长速率明显低于 20Gy 组,平均生存时间亦明显延长,提示基因-放射治疗可降低照射剂量,取得比单纯较大剂量放疗更好的抑瘤效果。脂质体介导治疗基因瘤内注射量变化范围较大,可能因治疗基因和肿瘤种类等因素不同而不同,以往研究结果表明,注入 20 μ g pEgr-IFN γ 重组质粒的联合治疗组已取得较佳抑瘤效果^[6],考虑到 IFN γ 过量表达的毒副作用,本研究中我们将质粒注射的大剂量设为 30 μ g,小剂量设为 10 μ g,研究不同量质粒注入后联合治疗的抑瘤效应差异。实验结果表明,(20 μ g+20Gy)组与(10 μ g+20Gy)组相比,肿瘤生长速率明显降低,平均生存时间明显延长,但其与(30 μ g+20Gy)组之间差异无统计学意义,提示在 20 μ g 基础上增加质粒注入量抑瘤效果无明显提高,故 20 μ g 可能成为有效、安全而又经济的治疗剂量。

研究中,联合治疗组外周血中 IFN γ 含量照射后第 1 天即达峰值,随后下降,但第 3 天仍明显高于单纯基因治疗组和对照组,第 5 天各组之间无差异。该结果的产生可能与 Egr-1 启动子的辐射诱导特性密切相关,Egr-1 启动子的活性受控于诱导因素^[10](如电离辐射、过氧化氢)。在电离辐射作用下,Egr-1 启动子下游基因的表达可增加数倍,但其辐射诱导作用相对短暂,一般诱导

2 天后转基因产物的表达回复至原来的较低水平^[3]。本实验表明联合治疗在短时间内诱导瘤内 IFN γ 基因表达显著增强,瘤内高浓度的 IFN γ 有可能部分进入血液循环,导致血液中 IFN γ 暂时升高,并通过其免疫调节作用,增强机体免疫功能和抗肿瘤能力。

另外,本研究表明,单次质粒注入后单次照射,为达到较佳抑瘤效果所需的最佳照射剂量较高。为降低照射剂量,减少正常组织放射损伤,并进一步提高基因-放射治疗疗效,使治疗方案更加接近临床实际应用,我们将在此基础上进一步探讨每次质粒注入后较小剂量照射,多次给入、多次照射的抑瘤效应。

参考文献

- 1 Weichselbaum R R, Hallahan D E, Sukhatme V P. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, **24**(3): 565-568
- 2 Weichselbaum R R, Hallahan D E, Beckett M A *et al.* *Cancer Res*, 1994, **54**(16): 4266-4269
- 3 Hallahan D E, Mauceri H J, Seung L P *et al.* *Nat Med*, 1995, **1**(8): 786-791
- 4 Staba M J, Mauceri H J, Kufe D W *et al.* *Gene Ther*, 1998, **5**(3): 293-300
- 5 Mauceri H J, Hanna N N, Staba M J *et al.* *Life Sci*, 1999, **322**(2): 225-228
- 6 吴丛梅,李修义,刘树铮. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, **21**(4): 236-238
WU C M, LI X Y, LIU S Z. *Chin J Radiol Med Prot*, 2001, **21**(4): 236-238
- 7 Gorspi D H, Maweri H J, Salloum R M *et al.* *Cancer Res*, 1998, **58**(24):5686-5689
- 8 吕星,刑瑞云,路萍. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, **8**(1): 27-30
LV X, XING R Y, LU P. *Chin J Cancer Biother*, 2001, **8**(1): 27-30
- 9 Datta R, Taneja N, Sukhatme V P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(6): 2419-242

EXPERIMENTAL STUDY ON ANTI-TUMOR EFFECT OF pEgr-IFN γ GENE-RADIOTHERAPY IN TUMOR-BEARING MICE

YANG Wei LI Xiuyi LI Xiujuan TIAN Mei GONG Shouliang

(MH Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT To investigate the optimal doses of X-ray irradiation and plasmid injection in the anti-tumor effect of the pEgr-IFN γ gene-radiotherapy in vivo, we observed the anti-tumor effect of the pEgr-IFN γ gene-radiotherapy with different doses of X-ray irradiation and plasmid injection in mice with B16 melanoma and detected the concentration of IFN γ in peripheral blood by ELISA. The results showed that the tumor growth rate of the mice irradiated locally with 20Gy X-rays after the plasmid injection was significantly lower ($p < 0.001$) than that of the mice irradiated locally with 2Gy or 10Gy X-ray from the third day after irradiation and the mean survival period was longer ($p < 0.001$). The results also showed that the tumor growth rate of the mice injected locally with 20 μ g or 30 μ g plasmid was significantly lower ($p < 0.05$ — 0.001) than that of the mice injected locally with 10 μ g plasmid and the mean survival period was longer ($p < 0.01$). It was found that the concentration of IFN γ in peripheral blood of the mice treated with gene-radiotherapy was higher than that of the mice of plasmid-treated group ($p < 0.05$, $p < 0.05$) or control group ($p < 0.01$, $p < 0.05$) on the first day and the third day after irradiation. These results suggested that the optimal dose of X-ray irradiation of the pEgr-IFN γ gene-radiotherapy in vivo was 20Gy and the optimal dose of plasmid injected into tumors was 20 μ g. By inducing the higher expression of IFN γ gene in the tumor, the pEgr-IFN γ gene-radiotherapy could increase the concentration of IFN γ in peripheral blood, so as to enhance the body's immunologic function and anti-tumor ability.

KEYWORDS pEgr-IFN γ reconstruction plasmid, Gene-radiotherapy, B16 melanoma, X-ray

CLC Q785, R811.5, R332