

辐射联合 p53 腺病毒重组体转染对肿瘤细胞的影响

刘兵^{1,2,3} 张红¹ 高清祥⁴ 罗晓红³ 谢漪^{1,2} 郝冀芳¹
段昕^{1,2} 周清明^{1,2} 周光明¹

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

² (中国科学院研究生院 北京 100039)

³ (兰州军区疾病控制中心 兰州 730020)

⁴ (兰州大学生命科学院 兰州 730000)

摘要 以绿色荧光蛋白腺病毒重组体 (Replication deficient adenovirus green fluorescence protein recombinant, AdCMV-GFP) 为对照, 用 p53 腺病毒重组体 (Replication deficient adenovirus p53 recombinant, AdCMV-p53) 转染经 0、0.25、0.5、1.0、1.5 和 2.0 Gy γ 射线预辐射的 HepG2 (^{wt}p53)、Hela (^{wt}p53, ^{wt}P53 低水平表达) 和 HT-29 (^{mt}p53, ^{mt}P53 过表达) 细胞, 用克隆形成法检测肿瘤细胞存活, 探讨 AdCMV-p53 转染对 p53 基因状态与功能不同肿瘤细胞辐射敏感性的影响。结果显示, AdCMV-p53 转染不仅明显提高肿瘤细胞辐射敏感性, 而且与肿瘤细胞内在 p53 基因状态与功能有关。

关键词 p53 基因, 辐射, 腺病毒载体, 肿瘤细胞, 辐射敏感性

中图分类号 Q256, Q279, Q274, Q37

恶性肿瘤是严重威胁人类生命健康的一类常见病、多发病, 其不仅发病率高, 而且病死率极高。肿瘤因其病因复杂、病程进展快、发病机理不完全清楚, 尚无特异有效的肿瘤防治措施。在肿瘤治疗上, 恶性肿瘤治疗仍以手术、放疗和化疗为主, 其它治疗方法也在不断的探索中, 到目前为止, 尚未找到适应范围广和有独特疗效的肿瘤治疗方法。来源于不同组织器官, 或同一组织器官的不同类型细胞, 或同一类型细胞的不同发育阶段的肿瘤, 其恶性程度, 对放疗、化疗等的敏感性差异极大。即使是来源于同一组织器官同一类型细胞的同一发展阶段的肿瘤, 也会因其肿瘤细胞内在基因型的不同, 其恶性程度和对放、化疗等的耐受性产生很大差异。这种肿瘤细胞的异质性无疑使肿瘤治疗变得更加棘手。许多研究业已证明, 肿瘤细胞对化疗敏感性差异远远高于对放疗敏感性差异 (即, 在肿瘤治疗上, 放疗的通用性高于化疗), 与手术治疗相比, 放疗具有相对保留人体组织器官及其功能的特点。因此, 放射治疗依然是其它方法无可替代的主要肿瘤治疗手段之一。

肿瘤基因治疗是近年来发展起来的极具发展前景的肿瘤治疗新方法, 但与其它肿瘤治疗方法一样也存在一些不足, 如, 对肿瘤组织缺乏特异性、外源基因转导率较低、外源基因在机体内表达水平不高和潜在的生物危险性等。为此, 美国肿瘤放射治疗学家 Weichselbaum 等^[1]于 1992 年提出了肿瘤基因—放射治疗的设想, 即将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导 (Radiation-inducible) 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, 辐射和基因对肿瘤产生协同杀伤作用。一些研究表明, 辐射联合 p53 基因可明显增强对肿瘤细胞的抑制作用^[2-9]。但有关 p53 基因转导对组织器官来源, 及其细胞内在 p53 基因状态不同肿瘤细胞辐射敏感性影响的研究未见报道。本研究旨在通过对 p53 腺病毒重组体转染对 3 种组织器官, 及其内在 p53 基因状态不同的肿瘤细胞经受低剂量辐射敏感性的影响开展研究, 探讨辐射联合 p53 基因治疗肿瘤的可能性及其肿瘤细胞内在 p53 状态的影响。

国家自然科学基金 (10675151)、甘肃省重点科技攻关项目 (2GS052-A43-008-02)、甘肃省自然科学基金 (3ZS061-A25-021) 资助

第一作者: 刘兵, 男, 1964 年 8 月出生, 1993 年毕业于中国预防医学科学院, 医学硕士, 现为中国科学院近代物理研究所攻读离子物理与核物理专业博士学位研究生, 副研究员, 从事辐射生物学研究

收稿日期: 初稿 2007-01-21, 修回 2007-03-13

1 材料和方法

1.1 重组腺病毒载体和细胞系

p53 腺病毒重组体 (Replication deficient adenovirus p53 recombinant, AdCMV-p53) 和绿色荧光蛋白重组体 (Replication deficient adenovirus green fluorescence protein recombinant, AdCMV-GFP) (见图 1), 由军事医学科学院吴祖泽院士惠赠。293 细胞为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系, 购自美国模式菌种收集中心 (American Type Culture Col-

lection, ATCC), (ATCC CRL-10852™); 人肝癌细胞系 HepG2 【野生型 p53 (^wp53)】、人宫颈癌细胞系 Hela 【野生型 p53 (^wp53), 野生型 P53 蛋白 (^wP53) 低水平表达】人结直肠癌细胞系 HT-29 【突变型 p53 (^mp53), 突变型 P53 蛋白 (^mP53) 过表达】, 本室保存。293 细胞和 3 种肿瘤细胞均培养于含 10% 胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司, A91110.05) DMEM 【Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO (Gibco Industries, Inc.), Lot No. 11136551】培养液中。



Fig.1 The structure map of AdCMV-p53/GFP

1.2 重组腺病毒的扩增、纯化和滴度测定

1.2.1 重组腺病毒的扩增 用 293 细胞扩增 AdCMV-p53 和 AdCMV-GFP^[7-10]。

1.2.2 AdCMV-p53 和 AdCMV-GFP 的纯化 用 BD Adeno-X™ 腺病毒纯化试剂盒 (Cat. Nos. 631532) 纯化^[7-10]。

1.2.3 重组腺病毒滴度测定 用噬斑形成试验测定病毒滴度。

1.3 肿瘤细胞辐射与重组腺病毒载体转染

在底面生长面积为 25 cm² 细胞培养瓶 (CORNING, Cat. Nos. 3055) 内接种 1×10⁶ 肿瘤细胞, 培养 24 h, 在室温下用 ⁶⁰Co γ 射线 (FTC-50H, 兰州大学第一附属医院, 上海医疗器械厂) 照射, 剂量为 0、0.25、0.5、1.0、1.5 和 2.0 Gy, 剂量率为 0.2 Gy/min。在辐照后 1 h 内按 80 感染复度 (Multiplicity of infection, MOI) AdCMV-p53 或 AdCMV-GFP 转染肿瘤细胞 1 h^[7-10]。对照组细胞除不予辐照和转染外, 其余处理过程与辐照转染组完全相同。

1.4 P53 蛋白表达的检测

胰酶消化收集细胞, 用冷磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS) 洗两次, 将沉淀悬起, 加 4% 甲醛室温固定 30 min, 离心弃上清, 将沉淀震荡悬起后加入 0.5 mL 含有 0.1% (w/v) Tween-20 和 0.5% (w/v) 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 的 PBS, 充分混匀后室温孵育 30 min, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清, 将沉淀悬起, 加 100 μL 1:100 的鼠抗人 p53 mAb-1, 室温孵育 30

min, 用冷 PBS 洗两次, 离心弃上清后将沉淀悬起, 加 100 μL 1:200 的异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗鼠 IgG (Southern Biotech, Southern Biotechnology Associates, Inc), 室温避光孵育 30 min 后上机分析。用 CellQuest 软件处理数据。处理组外源性 p53 阳性率=处理组 p53 阳性率-对照组 p53 阳性率。

1.5 抑瘤试验

用克隆形成法检测辐射联合 AdCMV-p53/GFP 转染对肿瘤细胞的抑制作用。辐照联合 AdCMV-p53/GFP 转染细胞培养 24 h 后, 胰酶消化, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基配比稀释细胞制成细胞悬液, 按不同梯度将细胞定量接种于 60 mm 培养皿, 每个剂量点接种 3 个不同梯度, 每个梯度接种 3 皿, 置 37℃, 5% CO₂ 培养。培养到第 10 天, 用甲醇:冰醋酸 (1:3) 溶液室温固定 30 min, 用 PBS 洗去多余固定液, 用 0.4% 姬母萨 (Giemsa) 染液染色 30 min, 用流水轻轻洗去染液, 统计细胞数大于 50 的克隆数。按下列公式计算细胞存活分数 (Survival fraction, SF):

$$SF(\%) = (S_T/S_C) \times 100\%$$

式中, S_T 为处理组细胞克隆形成率, S_C 为对照组细胞克隆形成率。

用线性平方模型拟合得到各不同肿瘤细胞不同处理组线性平方模型方程, 通过计算得到各肿瘤细胞不同处理组细胞的 SF₁ (Survival fraction at 1 Gy, 辐射剂量为 1 Gy 时的细胞存活率) 和 D₅₀, 按下列公式计算辐照联合 AdCMV-p53 转染组 RBE₅₀ 值。RBE₅₀ = D_{50 辐射}/D_{50 联合}。

1.6 统计分析

用社会科学用软件包(Statistical Package for the Sosial Science, SPSS)统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 肿瘤细胞内外源性 P53 表达

辐照联合 AdCMV-p53 转染后, 三种细胞外源性 P53 表达如图 2 所示。处理后第 48h, 辐照联合 AdCMV-p53 转染组 HepG2、Hela 和 HT-29 细胞内外源性 P53 表达均明显高于单纯辐照组、单纯 AdCMV-p53 转染组、和辐照联合 AdCMV-p53 转染组同种细胞内外源性 P53 表达 ($p<0.05$)。

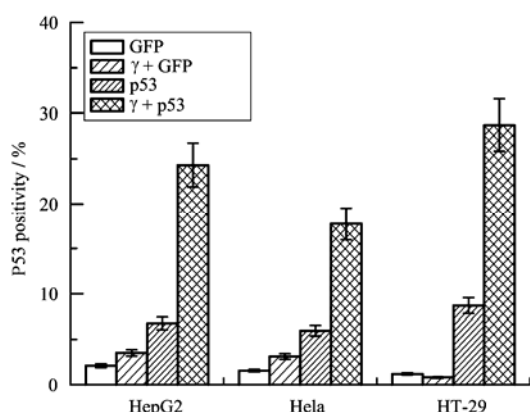


Fig.2 Exogenous P53 expression in tumor cells under the treatment

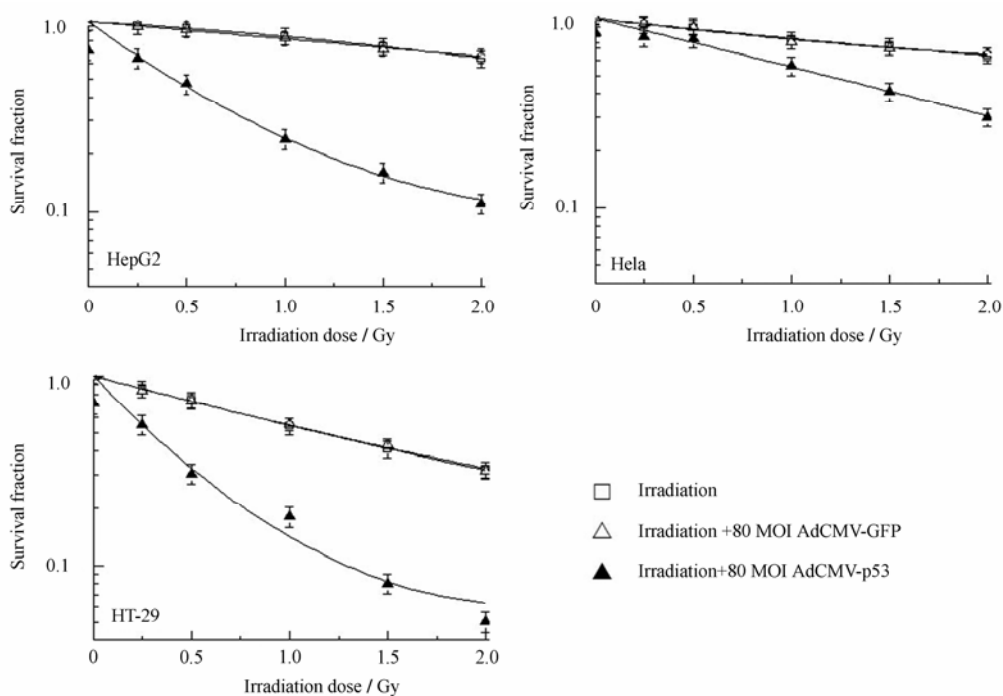


Fig.3 Survival curves of tumor cells under different condition

2.2 辐照联合 p53 基因对肿瘤细胞的抑制

从处理后第 24h 开始, 对照组细胞正常贴壁生长, 单纯辐照组、单纯 AdCMV-p53 转染组和辐照联合 AdCMV-p53 转染组细胞出现不同程度脱壁、变圆、浮起, 随观察时间的延长, 脱壁、变圆、浮起细胞逐日增多。辐照联合 AdCMV-p53 转染组脱壁、变圆、浮起细胞明显多于单纯辐照组和单纯 AdCMV-p53 转染组。不同处理条件下三种肿瘤细胞存活曲线如图 3 所示。结果显示, 辐照联合 AdCMV-p53 转染组肿瘤细胞存活率明显低于单纯辐照或单纯 AdCMV-p53 转染组和辐照联合 AdCMV-GFP 转染组同种肿瘤细胞存活率。辐照联合 AdCMV-p53 转染对肿瘤细胞的抑制作用与细胞内在 p53 基因状态与功能有关。不同处理条件下, 三种肿瘤细胞的 α 、 β 、 α/β 、 SF_1 、 D_{50} 和 RBE_{50} 如表 1 所示。辐照联合 AdCMV-p53 转染组 3 种细胞的 α 、 α/β 均明显高于单纯 γ 射线辐射组和辐照联合 AdCMV-GFP 转染组。辐照联合 AdCMV-p53 转染 HepG2、Hela 和 HT-29 细胞的 SF_1 分别为 10.70%、33.39%和 6.43%。辐照联合 AdCMV-p53 转染组 RBE_{50} 均明显高于辐照联合 AdCMV-GFP 转染组。

Table 1 Calculated values for Tumor Cells based under different condition on linear-quadratic model

Cell lines	Treatment	α/Gy^{-1}	β/Gy^{-2}	$\alpha/\beta/\text{Gy}$	$\text{SF}_1/\%$	D_{50}	RBE_{50}
HepG ₂	γ	0.123	0.050	2.44	63.98	2.69	
	$\gamma + \text{GFP}$	0.202	0.004	2.44	63.96	2.69	1.00
	$\gamma + \text{p53}$	1.673	-0.278	-6.03	10.70	0.45	6.01
Hela	γ	0.259	-0.017	-15.24	63.70	3.43	
	$\gamma + \text{GFP}$	0.259	-0.016	-15.79	63.65	3.42	1.00
	$\gamma + \text{p53}$	0.347	0.101	3.43	33.39	1.42	2.42
HT-29	γ	0.632	-0.030	-21.31	31.81	1.16	
	$\gamma + \text{GFP}$	0.622	0.023	27.61	31.54	1.16	1.00
	$\gamma + \text{p53}$	2.528	-0.578	-4.38	6.43	0.29	3.95

Survival fraction = $\exp(-\alpha D - \beta D^2)$; $\text{RBE}_{50} = \text{D}_{50}$ for γ -ray/ D_{50} for γ -ray combined AdCMV-p53/GFP

3 讨论

在肿瘤治疗新方法的探索中,将现有理化特性和/或生物学作用机理完全不同的两种或两种以上肿瘤治疗方法有机结合起来,充分利用各种治疗方法各自优势,使联合治疗效果叠加,发挥协同(或相加)抑制肿瘤作用。这种联合治疗措施的探索不仅可以大大缩短研发周期,而且可以直接应用于临床肿瘤病人治疗。本研究通过对 AdCMV-p53/GFP 转染经 γ 射线预辐照的肿瘤细胞,观察辐射联合 p53 腺病毒重组体转染对肿瘤细胞的抑制作用。

大量研究证明^[11],P53 蛋白不仅参与细胞生长、分化与死亡,而且与肿瘤的发生、发展和对放化疗的敏感性密切相关。当细胞受到辐照时,野生型 P53 参与细胞 DNA 修复、细胞周期和细胞凋亡等的调节。一旦细胞 DNA 受损,便诱导激活 p53 基因表达,并通过反式作用激活一系列细胞周期调节基因(如, p21 基因),使细胞阻滞于 G₁ 期,修复 DNA 损伤^[12]。一旦细胞 p53 基因突变或杂合性丢失,其 P53 依赖性细胞周期负调控作用丧失,使细胞染色体发生畸变,并逐步转化为增值异常迅速的癌细胞^[13,14]。图 3 和表 1 显示,辐照联合 AdCMV-p53 转染组三种细胞 α 值、 β 值和 α/β 值均明显高于单纯辐射组和辐射联合 AdCMV-GFP 转染组同种细胞 α 值、 β 值和 α/β 值。结果表明,不管组织器官来源及其细胞内在 p53 基因状态与功能如何,AdCMV-p53 转染明显增强肿瘤细胞 P53 依赖型死亡机制,抑制辐射所致 DNA 损伤的修复^[15]。AdCMV-p53 转染对 P53 依赖型细胞死亡的促进作用明显强于对辐射所致 DNA 损伤修复的抑制作用。另外,从结果看,AdCMV-p53 转染对肿瘤细胞辐射敏感性的增强作用与肿瘤细胞的组织器官来源和

细胞内在 p53 基因状态与功能有关。如,在本研究剂量范围内(0—2Gy),80 MOI AdCMV-p53 转染对 HepG₂、Hela 和 HT-29 细胞辐射敏感性的增强作用明显不同,依次为 HT-29 (D_{50} : 0.29; SF_1 : 6.43%)>HepG₂ (D_{50} : 0.45; SF_1 : 10.70%)>Hela (D_{50} : 1.42; SF_1 : 33.39%)。这种差异可能与 p53 腺病毒重组体转染细胞内活性外源性 P53 蛋白的量及其在活性 P53 蛋白总量中所占比例有关。p53 腺病毒重组体转染使 p53 基因突变细胞(如, HT-29) p53 基因相关功能恢复。然而对 p53 基因状态与功能正常的肿瘤细胞(如, HepG₂)来说, p53 腺病毒重组体转染虽可使靶细胞内 P53 蛋白过表达,其 p53 基因相关调节本底水平较高。但对 Hela 细胞来说,细胞内人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)的癌源蛋白 E6 与细胞内表达的部分外源野生型 P53 蛋白结合,通过泛素途径使外源性 P53 蛋白降解、失活,从而降低 p53 腺病毒重组体转染对肿瘤细胞辐射敏感性的增强作用^[16-21]。Avenia 等^[21]的研究表明,肿瘤细胞对低剂量辐射的敏感性取决于肿瘤细胞内活性野生型 P53 蛋白的量,与肿瘤细胞自身 p53 基因状态无关。

4 结论

本研究结果显示, p53 腺病毒重组体转染不仅明显提高肿瘤细胞辐射敏感性,而且与靶细胞内在 p53 基因状态与功能有关。因此,在对肿瘤实施治疗时,可根据肿瘤的组织器官来源和其细胞内在特性,确定具体的联合治疗方案(如, p53 腺病毒重组体剂量和辐照剂量等),以便在获得最大治疗效果的

前提下, 最大限度减少对患者的毒副作用和潜在危险性。

参考文献

- 1 Weichselbaum R R, Hallahan D E, Sukhatme V P, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, **24**(3): 565-567
- 2 Sasaki R, Shirakawa T, Zhang Z J, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **51**(5): 1336-1345
- 3 Spitz F R, Nguyen D, Skibber J M, *et al.* Clin Cancer Res, 1996, **2**(15): 1665-1671
- 4 Gallardo D, Drazan K E, McBride W H. Cancer Res, 1996, **56**(21): 4891-4893
- 5 Chang E H, Jang Y J, Hao Z, *et al.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1997, **123**(5): 507-512
- 6 Li J H, Lax S A, Kim J, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999, **43**(3): 607-616
- 7 刘兵, 张红, 李文建, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(2): 102-106
LIU Bin, ZHANG Hong, LI Wenjian, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2006, **24**(2): 102-106
- 8 刘兵, 张红, 李文建, 等. 核技术, 2006, **29**(9): 674-678
LIU Bin, ZHANG Hong, LI Wenjian, *et al.* Nucl Tech, 2006, **29**(9): 674-678
- 9 刘兵, 张红. 生物物理学报, 2006, **22**(增刊): 438-439
LIU Bin, ZHANG Hong. Acta Biophys Sin, 2006, **22**(Suppl): 438-439
- 10 Liu B, Zhang H, Li WJ, *et al.* Sci in China Ser G, 2007, **50**(2): 221-230
- 11 Lose S W, Bodis S, Mcclatchey A, *et al.* Science, 1994, **266**(5186): 807-810
- 12 Kastan M B, Onyekwew O, Sidransky D, *et al.* Cancer Res, 1991, **51**(23): 6304-6311
- 13 Nagasawa H, Li C Y, Maki C G, *et al.* Cancer Res, 1995, **55**(9): 1842-1846
- 14 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al.* Cell, 1997, **90**(4): 809-819
- 15 Hardenbergh P H, Hahnfeldt P, Hlatky L, *et al.* Int J Radiation Oncology Biol Phys, 1999, **43**(3): 601-605
- 16 Scheffner M, Werness B A, Huibregtse J M, *et al.* Cell, 1990, **63**(6): 1129-1136
- 17 Werness B A, Levine A J, Howley P M. Science, 1990, **248**(4951): 76-79
- 18 Innocente S A, Abrahamson J L, Cogswell J P, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**(5): 2147-2152
- 19 Agarwal M L, Agarwal A, Taylor W R, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(18): 8493-8497
- 20 Turek L P, Smith E M. Obstet Gynecol Clin North Am, 1996, **23**(4): 735-758
- 21 Avenia P D, Porrello A, Berardo M, *et al.* Cancer Letters, 2006, **231**(1): 102-112

Effect of combination of AdCMV-p53 and irradiation on tumor cells

LIU Bing^{1,2,3} ZHANG Hong¹ GAO Qingxiang⁴ LUO Xiaohong³ XIE Yi^{1,2}

HAO Jifang¹ DUAN Xin^{1,2} ZHOU Qingming^{1,2} ZHOU Guangming¹

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

²(Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

³(Lanzhou Command Center for Disease Prevention and Control, Lanzhou 730020)

⁴(School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

ABSTRACT The work is to investigate effect of AdCMV-p53 gene transfer on the radiosensitivity of tumor cells. HepG2 (^{wt}p53), Hela (^{wt}p53, low level ^{wt}p53 expression) and HT-29 (^{mt}p53, ^{mt}p53 over-expression) cells exposed to 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0Gy were infected with AdCMV-GFP, a replication deficient recombinant adenoviral vector containing a CMV promoter and green fluorescent protein, or AdCMV-p53, a replication deficient recombinant adenoviral vector containing a CMV promoter and carrying human wild-type p53 gene. Survival fraction of the cells was determined by clonogenic assay. Survival curves were generated by linear quadratic model. The results showed that AdCMV-p53 infection could significantly promote the radiosensitivity of tumor cells. There is a relationship between the effect of AdCMV-p53 infection and the cellular intrinsic p53 status.

KEYWORDS p53, Irradiation, Adenovirus vector, Tumor cell, Radiosensitivity

CLC Q256, Q279, Q274, Q37