

【论著】

重组腺病毒 Ad-Rb94基因联合放疗对人肝癌细胞生长的抑制作用

张耀文¹, 王 芹², 李 进², 穆传杰², 曹永珍¹, 荣庆林¹

中图分类号: Q784 R815 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)01-0147-02

【摘要】 目的 探讨重组腺病毒 Ad-Rb94基因联合放射治疗对人肝癌细胞的联合抑瘤作用。方法 将重组腺病毒 Ad-Rb94基因导入人肝癌细胞株 HepG₂, 观察联合放射治疗对细胞生长、细胞周期及凋亡的影响。结果 Ad-Rb94基因组、放疗组和 Ad-Rb94基因联合放疗组 HepG₂ 细胞的生长均受到抑制, 尤其在转染后 96h细胞存活数量最低, 与 Ad-lacZ组和空白对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)。联合治疗组 HepG₂ 细胞生长最为缓慢, Rb94基因转染后 96h Ad-Rb94联合放疗组的抑制作用均明显高于 Ad-Rb94组和放疗组 ($P < 0.05$)。Ad-Rb94组、放疗组及 Ad-Rb94联合放疗组 HepG₂ 停留在 G₂/M期的细胞增加, G₀/G₁期和 S期细胞数量减少, 凋亡细胞数量增加, 其中以联合治疗组 G₂/M期细胞和凋亡细胞所占比例最高。结论 Ad-Rb94基因联合放疗具有协同作用, 有效地抑制肝癌细胞的生长。

【关键词】 Rb94基因; 放射治疗; 肝癌

Antitumor Effects of Recombinant Adenovirus-Rb94 Gene Therapy and Radiotherapy on Growth of Human Hepatic Carcinoma cells ZHANG Yao-wen, WANG Qin, LI Jin et al. Department of Radiation Oncology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of recombinant adenovirus-Rb94 and radiotherapy on the growth of human hepatic carcinoma cells. Methods Human hepatic carcinoma cells HepG₂ were treated with Ad-Rb94, radiotherapy or Ad-Rb94 combined with radiotherapy respectively. The cell growth curve, cell cycle and cell apoptosis of HepG₂ cells were examined. Results The growth of HepG₂ cells transfected with Ad-Rb94, radiation and combination of Ad-Rb94 and radiation was significantly slower than that of Ad-lacZ and blank control ($P < 0.05$), especially at 96h after transfection. The combination of Ad-Rb94 and radiation resulted in greater inhibition of cell growth compared with Ad-Rb94 infection and radiation at 96h after transfection ($P < 0.05$). The number of cells of G₂/M Phases transfected with Ad-Rb94 and radiation increased, while the number cells of G₀/G₁ and S Phases decreased, cells of apoptosis increased. The increase of cells of G₂/M Phases and apoptosis for the combination of Ad-Rb94 and radiation were the highest. Conclusion Ad-Rb94 gene therapy combined with radiotherapy show synergism for the inhibition of HepG₂ cells growth.

【Key words】 Retinoblastoma 94 Gene; Radiotherapy; Hepatoma

原发性肝癌是我国高发的恶性肿瘤之一, 近年来立体适形放疗的实践证实, 肝癌对射线有相当高的反应率^[1]。Rb基因是最早被发现的抑癌基因, 它的缺失或突变与很多肿瘤的发生有关。有研究表明, Rb基因的改变在肝癌的发生发展中起着一定作用^[2]。Rb94基因是 Rb基因的一部分 (野生型全长 pRb110的 NH₂末端缺失 112个氨基酸残基), 本研究应用重组腺病毒 Ad-Rb94基因感染人肝癌细胞系 HepG₂ 进行 X射线照射, 观察 Ad-Rb94基因联合放疗对肝癌细胞生长的影响, 探讨其联合抑瘤作用。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 1 国家自然科学基金资助项目 (30770638); 2 天津市自然科学基金资助项目 (05YFJJC12100)

作者单位: 1 天津医科大学总医院放疗科, 天津 300052; 2 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所分子核医学重点实验室, 天津 300192

作者简介: 张耀文 (1982~), 女, 河南人, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤的立体定向放疗。

通讯作者: 曹永珍 (cy4956@hotmail.com)

1.1.1 细胞系、培养条件及照射条件 人肝癌细胞系 HepG₂ 由中国医学科学院放射医学研究所提供。人胚肾 293细胞由天津医科大学微生物教研室惠赠。Varian600C直线加速器 6MV-X射线等中心照射, 射野大小为 10cm×10cm, 剂量率 320cGy/min, 照射时培养板上放置 1.5cm厚的有机玻璃板。

1.1.2 试剂 DMEM培养基、RPMI1640培养基购自 GIBCO公司, 新生小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 重组腺病毒介导的 Rb94基因 (Ad-Rb94) 及对照腺病毒 Ad-lacZ由中国医学科学院放射医学研究所构建保存。MTT为 Amresco公司产品, 分析纯 DMSO (二甲基亚砜) 为上海生物生物工程公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 Varian2100C直线加速器 (美国); 酶标仪 (Thermo, 美国); 流式细胞仪 (Beckman Altia II, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胚肾 293细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM培养基, 人肝癌 HepG₂ 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640培养基, 置 5% CO₂、饱和湿度、37℃培养箱中培养。

1.2.2 重组腺病毒颗粒的制备 利用已构建好的重组腺病毒 Ad-Rb94和 Ad-lacZ方法见文献[3], 转染人胚肾 293细胞

[5] 李英华, 韩冠英, 郭斌, 等. 鲨鱼软骨多糖对血脂的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2006 33(6): 760-761.
[6] 傅德华, 何志坚, 李领华, 等. 鲨鱼酸性粘多糖抗栓作用的研究 [J]. 中国海洋药物, 1992 43(3): 18-19.
[7] 王曦, 沈先荣, 贾福星, 等. 鲨鱼软骨提取物对小鼠 Lewis肺癌生长的抑制效应 [J]. 中华航海医学与高压医学杂志, 2002 9(1): 51-54.

[8] 黄朝前, 徐伟军, 张春菊, 等. 近十年鲨鱼软骨抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2004 4(10): 781-782.
[9] 李东霞, 张全全. 鲨鱼软骨活性物质研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2000 4: 48-51.
[10] 王劲, 杨锋, 张建雄, 等. 鲨鱼粉抗癌增效及调节免疫功能的研究 [J]. 中国海洋药物, 2000 19(2): 14-17.

(收稿日期: 2007-11-05)

制备粗腺病毒溶胞产物,然后扩增高滴度的腺病毒颗粒。

1.2.3 实验分组 分组设计为空白对照组、Ad-lacZ对照组、Ad-Rb94组、放疗组(吸收剂量为 400cGy)和 Ad-Rb94联合放疗组(加入 Ad-Rb94后 6h进行 400cGy X射线照射)。

1.2.4 MTT比色法 取对数生长期的 HepG₂ 细胞按 5×10³ 个/孔接种于 96孔培养板,每孔加 20μl Ad-Rb94(病毒滴度为 1.6×10⁸ pfu/ml),每组设 4个复孔。培养 24 48 72 96h后加入 0.5% MTT液 20μl,孵育 4h后酶标仪测定 492nm吸光度(OD值)。绘制细胞生长曲线图并计算细胞生长的抑制率:抑制率=(1-实验组 OD值/对照组 OD值)×100%。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率 取对数生长期的 HepG₂ 细胞按 2×10⁵ 个细胞/孔接种于 6孔培养板,每孔加 200μl Ad-Rb94(病毒滴度为 1.6×10⁸ pfu/ml),每组设 2孔。培养 24h后收集所有悬浮及贴壁细胞,每组各取一孔用冷 PBS液洗涤 2次,75% 冰乙醇固定 1h-20℃保存。检测前用冷 PBS液洗 2次后加入 500μl 碘化丙啶,轻轻混匀,暗处避光反应 30min上流式细胞仪 488nm波长检测细胞周期。每组各取另一孔,用冷 PBS液洗 3次,弃上清后加入 10μl Annexin V-FITC 和 500μl PI轻轻混匀,避光室温反应 15min上流式细胞仪 488nm检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0软件包进行统计分析,显著性检验采用单因素方差分析及^χ检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-Rb94联合放疗对肝癌 HepG₂ 细胞生长的抑制曲线 从生长曲线看出,空白对照组和 Ad-lacZ组 HepG₂ 细胞数量随培养时间延长呈增加的趋势,而 Ad-Rb94基因组、放疗组和 Ad-Rb94基因联合放疗组 HepG₂ 细胞的生长均受到抑制,尤其在转染后 96h细胞存活数量最低,与 Ad-lacZ组和空白对照组比较差异均有统计学意义(P<0.05),而 Ad-lacZ组和空白对照组差异无统计学意义(P>0.05),见图 1。其中联合治疗组 HepG₂ 细胞生长最为缓慢,与基因组和放疗组比较差异均有统计学意义(P<0.05)。

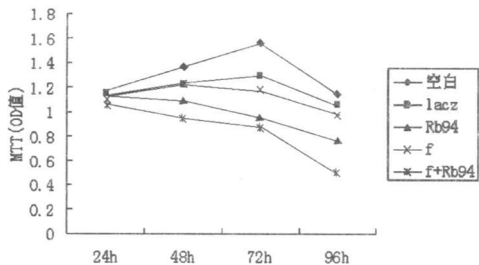


图 1 Ad-Rb94联合放疗作用于 HepG₂ 细胞的生长抑制曲线(指放疗)

2.2 Ad-Rb94联合放疗对肝癌 HepG₂ 细胞生长抑制率的比较 Rb94基因转染 HepG₂ 细胞后 96h Ad-Rb94组 HepG₂ 细胞生长抑制率与放疗组比较有明显差异(P<0.05),而 Ad-Rb94联合放疗组的抑制作用均明显高于 Ad-Rb94组和放疗组(P<0.05),见表 1。结果提示 Rb94基因对 HepG₂ 细胞的生长具有抑制作用,而 Rb94基因与放射治疗联合应用具有协同效应,能更有效地抑制肿瘤细胞的生长。

表 1 Ad-Rb94联合放疗对 HepG₂ 细胞生长的抑制效应

分组	例数	OD值(±s)	抑制率(±s%)
空白对照	4	1.1455±0.1262	
Ad-lacZ	3	1.0603±0.2598	
Ad-Rb94	3	0.7720±0.0373	32.61±3.25 ¹⁾
放疗	3	0.9700±0.1216	20.06±4.33
Ad-Rb94+放疗	4	0.50825±0.1187	55.63±8.97 ²⁾

注:1)与放疗组对照 P<0.05 2)与 Ad-Rb94组和放疗组对照 P<0.05

2.3 Ad-Rb94联合放疗对肝癌 HepG₂ 细胞周期及凋亡的影响 从流式分析结果可见,与空白对照组及 Ad-lacZ组相比,Ad-Rb94组、放疗组及 Ad-Rb94联合放疗组 HepG₂ 停留在 G₂/M期的细胞增加,G₀/G₁期和 S期细胞数量减少,凋亡细胞数量增加。其中以联合治疗组 G₂/M期细胞和凋亡细胞所占比例最高,分别达到 36.5%和 27.1%,见表 2。结果表明 Ad-Rb94联合放疗使 HepG₂ 细胞主要阻滞在 G₂/M期,促进细胞发生凋亡。

表 2 Ad-Rb94联合放疗后 HepG₂ 细胞的细胞周期及凋亡

分组	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)	凋亡细胞(%)
空白对照	59.9	32.1	8.0	0.6
Ad-lacZ	59.4	35.3	5.3	9.8
Ad-Rb94	58.2	27.8	14.0	18.2
放疗	47.0	30.2	22.8	11.3
Ad-Rb94+放疗	51.3	12.2	36.5	27.1

3 讨论

全长 Rb基因有调控细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞分化的作用。Rb94是 N端截短的 Rb蛋白,不仅具有全长 Rb基因的功能,而且因其半衰期长,比野生型 Rb蛋白的抑瘤作用更强。腺病毒介导的 Ad-Rb94基因转染头颈部鳞癌^[4]、膀胱癌^[5]、胰腺癌^[6]等细胞株,可导致细胞株转基因表达,细胞生长抑制和细胞凋亡。

放疗联合基因治疗是传统治疗方式与最新生物治疗技术相结合的产物。放射使受照细胞表面受损及穿孔,引起细胞膜通透性和跨膜电位的改变,便于带负电荷的外源基因主动进入细胞,提高基因转移的效率^[7]。基因治疗可干扰辐射诱发 DNA损伤修复,增强 DNA对辐射损伤的敏感性^[8],两者联合具有协同作用。

为了确定腺病毒表达载体上基因的作用,本研究以重组腺病毒 Ad-lacZ作为对照,我们发现 Ad-lacZ本身对肝癌细胞的生长没有抑制作用,表明对肿瘤细胞的抑制作用来自转导的 Rb94基因,而不是复制缺陷病毒载体本身。

本实验结果表明 Ad-Rb94 放疗、Ad-Rb94联合放疗对肝癌细胞的生长均有一定的抑制效果,其中以 Ad-Rb94联合放疗的抑制肿瘤细胞生长作用最强,这与相关文献的报道一致^[3]。有报道称人肝癌细胞系 HepG₂ 对 X射线有较高的放射敏感性,并且小剂量(<10Gy)照射后细胞周期 G₂ 监测点被激活,细胞凋亡特异性发生在 G₂ 期^[9,10]。本研究也证实了这一结果,Ad-Rb94联合放疗后 HepG₂ 细胞阻滞于 G₂-M期的细胞数最多,凋亡细胞最高,表明肿瘤细胞的 DNA合成受到了抑制,从而影响肿瘤细胞的分裂和增生。肿瘤细胞阻滞在 G₂ 期时对放疗比较敏感,从而提高肿瘤细胞对放疗的敏感性。本实验结果表明了 Rb94基因与放射治疗联合应用具有相加和协同效应,有效的抑制肿瘤细胞的异常增生。本研究为肝癌的基因治疗联合放疗研究以及可能的临床应用提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

[1] 朱小杨. 立体适形放疗在原发性肝癌中的应用进展[J]. 中华现代内科学杂志, 2006 3(9): 1002-1004

[2] ROTCHELL J M, ULNAL E, VAN BENEDEN R J, et al. Retinoblastoma gene mutations in chemically induced liver tumor samples of Japanese mink (Oryzias latipes)[J]. Mar Biotechnol 2001, 3(Supplement 1): 44-49

[3] 赵艳芝, 王芹, 李进, 等. 人 Rb94 基因联合 γ-辐射抑制乳腺癌细胞生长的研究[J]. 中国辐射卫生, 2007 16(3): 277-279

[4] LIU DAY K V, YU S, et al. The role of adenovirus mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer [J]. Cancer Res 2002 62(16): 4 637-4 644

耐辐射球菌 N^+ 离子注入后自由基变化的研究吕 平^{1,2}, 杨柳枝²

中图分类号: Q506 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)01-0149-02

【摘要】 目的 研究耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) N^+ 离子注入后自由基产生的剂量效应和清除的时间效应。方法 对耐辐射球菌进行 γ 射线照射和 N^+ 离子注入后用 ESR 波谱测定自由基含量。结果 随着 N^+ 离子剂量的增加, 耐辐射球菌自由基生成量先升高, 再下降, 最后在上升。在较高 N^+ 离子剂量下, 随着注入后时间的延长, 自由基含量降低; 在较低剂量下, 自由基的生成量较高。结论 抗辐射菌株对高剂量 N^+ 离子辐射有较强的自由基消除能力, 但在低剂量时反而比较弱, 出现这种情况的原因比较复杂, 需要进一步研究。

【关键词】 耐辐射菌; 自由基; N^+ 离子

Effects of Ion Implantation on Free Radicals Forming and Scavenging of *Deinococcus Radiodurans*. LY Ping YANG Liu—zhi Tianjin University School of Chemical Engineering Tianjin 300072 China

【Abstract】 Objective To study of the effects of N^+ ion implantation on free radicals forming and scavenging were investigated in *Dr* (*Deinococcus radiodurans*) and the relationship between AFR (the amount of free radicals) and DNI (dose of N^+ implantation) in *Dr*. Methods AFR in *Dr* was studied with ESR after N^+ implantation and γ —radiation. Results It is proved that AFR in *Dr* ascended at first, then descended after reaching the peak, finally ascended again with increase of DNI. In high dose, AFR descended after *Dr* irradiated, while in low dose, AFR ascended. Conclusion scavenging effects of *Dr* against free radicals from high DNI were stronger than that from low DNI.

【Key words】 *Deinococcus Radiodurans* Free Radicals N^+ ion Implantation

在众多的诱变方法中, 离子注入技术作为一种特殊的物理化学复合诱变方法, 已日趋成熟。由于该技术具有较高的方向性和可控性, 所以产生的生物学效应比单一辐射更为丰富^[1-3]。因此, 应用到多种工业微生物和农作物的诱变选育中。在其机理的研究中人们发现在离子注入情况下, 生物体内产生大量的氧自由基, 就其来源可能有两个方面: 一是离子注入过程中初级反应的产物, 二是注入离子和移位原子沉积后空间位阻作用。

耐辐射球菌是一种微小的红色球菌。由于它对电离辐射和紫外线照射都具有极强的辐射抗性而受到广泛的关注。经过近五十年研究, 普遍认为, 造成其抗辐射的主要原因是高效的 DNA 修复功能, 特殊的生存方式和对氧自由基的有效清除^[4-6]。如果将离子注入作为一种新的辐射手段研究耐辐射球菌中自由基的产生和消除无疑将推动耐辐射球菌抗氧化机理的分析^[7]。同时也有助于从一个新的角度认识离子注入诱变的机理。因此, 本实验拟用大肠杆菌为对照, 研究 γ 射线和 N^+ 离子注入对耐辐射球菌氧自由基产生及其清除的影响。

1 材料与方法

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金 (2005 Q003)

作者单位: 1 天津大学化工学院, 天津 300072; 2 天津职业大学
作者简介: 吕平 (1975~), 男, 安徽当涂人, 讲师, 在读博士, 从事生物技术方面的研究。

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 菌株 抗辐射菌株 *Deinococcus radiodurans* AS1633 购于中科院微生物所。

1.1.2 培养基 TGY 液体培养基 (g/L)、TGY 固体培养基 (g/L)、磷酸缓冲液 (PBS)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体的培养 将耐辐射球菌划线接种于 TGY 固体培养基上, 32℃ 下培养 48h, 挑取单一菌落接种于三角瓶中, 摇瓶培养至对数生长期 (36h 以上)。将液体种子按 8% 接种量, 接入发酵液体培养基 (TGY) 中, 于 32℃ 培养 36h。

1.2.2 菌株辐照

1.2.2.1 γ 射线辐射 菌液 4 000 r/min 离心, 磷酸缓冲液洗, 用 PBS 调节使其 OD 为 0.8, 分装成 9 份, 每份 2 mL, 用 ⁶⁰Co γ 射线辐照 (浙江大学核农学重点实验室), 剂量分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 kGy。大肠杆菌在同样条件下进行辐照。

1.2.2.2 离子注入 取菌液 0.1 mL 涂布在载玻片上, 无菌风吹干。把载玻片放入小靶室。以 N^+ 进行了辐照 (中国科学院等离子体研究所)。将离子加速到 30 keV 进行辐照, 剂量为 0.15×10^{14} 、 3.0×10^{14} 、 4.5×10^{14} 、 6.0×10^{14} 、 7.5×10^{14} ions/cm²。大肠杆菌同样处理。

1.2.3 细胞提取物的制备 γ 射线辐射的菌液, 直接稀释并取 5 mL。离子注入的菌体, 用无菌刀片将其刮下, 并稀释成 5 mL。再

- [5] ZHANG X, MULTANIA S, ZHOU JH, et al. Adenoviral-mediated retinoblastoma p4 produces rapid telomere erosion, Chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Research* 2003; 63(4): 760-765
- [6] ROIG JM, MOLNAR A, CASCANIE A, et al. Adenovirus-mediated retinoblastoma p4 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model. *Clinical Cancer Research* 2004; 10(4): 1456-1460
- [7] JIAN PT, GEWIRTZ DA. Sustained enhancement of liposome-mediated gene delivery and gene expression in human breast tumor cells by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*

1999; 75(2): 217-223

- [8] TEH B S, AGUKLAR—Cordova E, VLACHAKIM T, et al. Combining radiotherapy with gene therapy (from the bench to the bedside): A novel treatment strategy for prostate cancer [J]. *The Oncologist* 2002; 7(5): 458-466
- [9] 石卫民, 范义湘, 陈龙华, 等. 两株人肝癌细胞 QSG-7701 和 HepG2 放射敏感性的体外研究 [J]. *癌症*, 2002; 21(9): 1020-1021
- [10] 谢大兴, 冯永东, 张鹏等. 不同剂量 X 射线对细胞周期监测点和细胞凋亡的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005; 22(7): 798-800

(收稿日期: 2008-02-01)