

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0200-04

多次小剂量 pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗的抑瘤效应及其机制的研究

杨巍, 刘林林, 吴丛梅, 朴春姬, 潘艳, 龚守良, 李修义(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] 目的: 探讨多次小剂量 pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗对接种 B16 黑色素瘤小鼠的抑瘤效应及其免疫学机理。方法: 肿瘤局部注射脂质体包裹的重组质粒 pEgr-IFN- γ 后 36 h, 接受不同剂量 X 射线照射, 观察各组小鼠照后不同时间肿瘤生长速率和平均存活时间。照后第 3 天用 RT-PCR 法检测瘤内 IFN- γ 转录水平, ELISA 法检测小鼠血清中 IFN- γ 含量, 并于照后第 15 天检测小鼠部分免疫学指标。结果: 照后第 9 ~ 15 天, 4 次(质粒 + 5Gy)组小鼠肿瘤生长速率明显低于质粒 + 20 Gy 组, 且平均生存时间明显延长; 照后第 3 天质粒 + 20 Gy 组瘤内 IFN- γ 转录水平明显高于质粒组, 照后第 1, 3 天血清中 IFN- γ 含量明显高于质粒组和对对照组, 照后第 15 天脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN- γ 分泌活性均明显高于 20 Gy 照射组。结论: 多次小剂量基因-放射治疗的抑瘤效应优于单次大剂量基因-放射治疗。基因-放射治疗组可能通过诱导瘤内 IFN- γ 表达增强, 使血液中 IFN- γ 浓度升高, 从而提高荷瘤机体免疫功能和抗肿瘤能力。

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

[中图分类号] R730.5 **[文献标识码]** A

Anti-Tumor Effect of Repeated Low Dose pEgr-IFN- γ Gene-Radiotherapy and Its Immunologic Mechanism

YANG Wei, LIU Lin-lin, WU Cong-mei, PIAO Chun-ji, PAN Yan, GONG Shou-liang, LI Xiu-yi (MH Radio-biology Reserch Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect of repeated low dose pEgr-IFN- γ gene-radiotherapy in mice bearing melanoma and its immunologic mechanism. **Methods:** The pEgr-IFN- γ plasmids packed by liposome were injected locally into tumors, and then the tumors was irradiated by X-ray 36 hours later. The tumor growth rate at different time and mean survival period of the mice were observed. The IFN- γ mRNA level in tumors was detected by RT-PCR 3 days after irradiation. The concentration of IFN- γ in serum were detected by ELISA. The immunologic indexes was detected 15 days after irradiation. **Results:** The tumor growth rate of the mice in gene-radiotherapy group with pEgr-IFN- γ and 5 Gy X-ray irradiation four times were lower significantly than that with pEgr-IFN- γ and 20 Gy X-ray irradiation 9 ~ 15 days after irradiation and their mean survival period were longer. The IFN- γ mRNA level in tumors of the mice in gene-radiotherapy group were higher than that in reconstruction plasmids group significantly 3 days after irradiation; The IFN- γ concentration in serum of the mice in gene-radiotherapy group were higher than that in reconstruction plasmids group and control group 1 and 3 days after irradiation; NK cytotoxic activity, IL-2 and IFN- γ secretion activity of the mice in gene-radiotherapy group were higher than that in 20 Gy X-ray irradiation group 15 days after irradiation. **Conclusions:** The anti-tumor effect of repeated low dose gene-radiotherapy was better than that of high dose gene-radiotherapy for only once. By inducing higher expression of IFN- γ gene in the tumors, pEgr-IFN- γ gene-radiotherapy could increase the concentration of IFN- γ in serum, and therefore the body's immunologic function and anti-tumor ability were enhanced.

[Key words] pEgr-IFN- γ reconstruction plasmid; X-ray; B16 melanoma; gene-radiotherapy

* 肿瘤的基因-放射治疗方案将放疗与基因治疗有机结合, 发挥协同作用^[1,2], 既可以相对降低等效照射剂量, 又实现了对杀伤基因表达的时空调控^[3]。因此, 基

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170290)资助

[作者简介] 杨巍(1976-), 男, 吉林人, 博士生, 主要从事肿瘤基因-放射治疗研究

[通讯作者] 李修义, E-mail: xyli@jlu.edu.cn

因-放射治疗近年来成为肿瘤治疗领域新的研究热点之一。Egr-1 基因(Early growth response-1 gene)是一种即刻早期基因,其调控序列可直接感受一些理化因子(如氧自由基,电离辐射等)的刺激而诱导下游基因表达^[4],大量资料表明,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^[5-6]。本实验根据 Egr-1 启动子的辐射诱导特性和 IFN- γ 的直接和间接抗肿瘤作用,在已成功构建 pEgr-IFN- γ 重组质粒的基础上^[7],探讨 pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗在接种 B16 黑色素瘤小鼠体内的抑瘤效应及其免疫学机理,为恶性肿瘤 IFN- γ 基因-放射治疗的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及细胞

C57 BL/6 小鼠,雌性,16~18 g,健康,购自北京实验动物研究中心;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 荷瘤小鼠模型的建立及分组

于每只小鼠右后肢皮下接种 0.1 ml 浓度为 5×10^6 /ml 的 B16 细胞悬液,待肿瘤生长至直径约 5 mm 时,将动物随机分组:① 对照组;② 20 Gy 照射组;③ 空质粒 + 20 Gy 组;④ 质粒组;⑤ 质粒 + 20 Gy 组;⑥ 4 次质粒组;⑦ 4 次 5 Gy 照射组;⑧ 4 次(质粒 + 5 Gy)组。每只动物肿瘤局部注射 0.1 ml 阳离子脂质体 LI-POFECTAMINE(GIBCO 公司)包裹的质粒 20 μ g,对照组及单纯照射组注射 0.1 ml PBS,基因-放射治疗组于注射质粒后 36 h 肿瘤局部接受 X 射线照射,其它部位铅板屏蔽。

1.3 照射条件

采用国产 X 射线深部治疗机,电压 220 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mm Cu 和 1.0 mm Al,剂量率 0.287 Gy/min。

1.4 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3天测量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)。

1.5 IFN- γ 转录水平分析

照后第3天各组取4只小鼠,分离瘤组织,利用 RT-PCR 法检测瘤内 IFN- γ 转录水平。

1.6 IFN- γ 表达水平检测

应用小鼠 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(晶美公司)检测血清 IFN- γ 含量。

1.7 免疫学指标

照后第15天检测下列指标:①脾脏 NK 细胞毒活性,用³H-TdR 释放法;②脾脏 IL-2 分泌活性,用 ConA

诱导淋巴母细胞增殖分析法;③脾脏 IFN- γ 分泌活性,用结晶紫染色法。

1.8 统计学处理

两样本均数比较采用 student *t* 检验。

2 结果

2.1 pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗的体内抑瘤效应

我们观察了照射后不同时间各组荷瘤小鼠肿瘤平均生长速率的变化,发现照后第6~15天,质粒 + 20 Gy 组和4次(质粒 + 5 Gy)组肿瘤生长速率明显低于对照组($P < 0.01 \sim 0.001$);第9~15天,4次(质粒 + 5 Gy)组肿瘤生长速率明显低于质粒 + 20 Gy 组($P < 0.05 \sim 0.01$),而平均生存时间明显延长($P < 0.01$,见图1和图2)。

图1 照射后不同时间各组荷瘤小鼠肿瘤平均生长速率
Fig.1 The tumor growth rate at different time after irradiation

图2 各组小鼠平均生存时间(d)
Fig.2 Mean survival period of the mice (d)

1: Control; 2: 4 \times P; 3: 4 \times 5 Gy; 4: 20 Gy; 5: P + 20 Gy; 6: 4 \times (P + 5 Gy); $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, * $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.01$ vs P + 20 Gy group

2.2 各组小鼠肿瘤局部 IFN- γ 转录水平

RT-PCR 分析结果表明,质粒 + 20 Gy 组 IFN- γ mRNA 水平明显高于质粒组,约是其 1.52 倍,而其它各组均无明显表达(见凝胶电泳图 3)。

2.3 血清中 IFN- γ 含量

质粒 + 20 Gy 组照后第 1 d 和第 3 d 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 ($P < 0.05$);质粒组给入质粒后第 1 d 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(见图 4)。

图 3 肿瘤局部 IFN- γ 转录水平 RT-PCR 分析

Fig. 3 RT-PCR analysis of IFN- γ transcription level in tumor

1: Marker; 2: Control; 3: 20 Gy;
4: Blank P + 20 Gy; 5: P; 6: P + 20 Gy

图 4 血清中 IFN- γ 含量

Fig. 4 IFN- γ concentration in serum

$\bar{x} \pm s$, $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group,
$P < 0.05$ vs P group; A: P + 20 Gy; B: P; C: Control

2.3 各组小鼠脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN- γ 分泌活性的变化

质粒 + 20 Gy 组和质粒组脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN- γ 分泌活性均明显高于 20 Gy 照射组,质粒 + 20 Gy 组增高更为明显(见图 5)。

3 讨论

放疗是肿瘤治疗的常规手段之一,但如何进一步提高肿瘤的放射敏感性、减少辐射对正常组织的损伤仍是急待解决的问题;而基因治疗技术的突破需解决如何实现外源基因体内表达的可控性的问题。Egr-1

启动子的发现为解决上述问题提供了新思路,它使放疗与基因治疗有机结合,发挥协同作用,一方面 Egr-1 启动子的诱导剂——辐射本身对肿瘤也有治疗作用,且可从时间、空间调控治疗基因的表达;另一方面放疗与转基因产物可有协同作用。因此,Egr-1 启动子介导的基因-放射治疗成为肿瘤治疗领域新的研究热点之一,可望为恶性肿瘤的治疗开辟新的、有效的途径。

图 5 各组小鼠脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN- γ 分泌活性的变化

Fig. 5 Changes in cytotoxic activity of splenic NK cells and secretion of splenic IL-2 and IFN- γ in mice

1. Cytotoxic activity of NK cells ($\times 10\%$); 2. Secretion activity of IL-2 ($n/min \times 1000$); 3. Secretion activity of IFN- γ (OD); $\bar{x} \pm s$, $n = 5$, * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 20 Gy group; A: Control; B: 20 Gy; C: Blank P + 20 Gy; D: P; E: P + 20 Gy

我室前期研究结果表明^[7],pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗具有抗肿瘤作用,其抑瘤作用明显优于单纯放疗和基因治疗,但其基因-放射治疗方案是采用单次质粒注入后 20 Gy 大剂量照射。为避免大剂量辐射对正常组织的损伤,我们进一步探讨了多次小剂量基因-放射治疗的抑瘤效应。结果表明,多次小剂量基因-放射治疗的抑瘤效应优于单次大剂量基因-放射治疗,该治疗方案适合于临床肿瘤放疗通常所采用的分割剂量照射方案。

国内外研究结果表明,瘤体内直接注射脂质体包裹的细胞因子基因,可在肿瘤局部直接转染至肿瘤细胞内^[8],不仅可以激活肿瘤部位的免疫活性,局部表达的细胞因子也可通过循环系统作用于免疫器官而激活机体的抗肿瘤免疫功能^[9-10]。本研究发现质粒 + 20 Gy 组瘤内 IFN- γ mRNA 水平明显高于质粒组,而其它各组均无明显表达,其血清中 IFN- γ 含量亦明显高于质粒组和对照组。免疫学指标检测发现,质粒 + 20 Gy 组和质粒组脾脏 NK 细胞毒活性、IL-2 和 IFN- γ 分泌活性均明显高于 20 Gy 照射组,质粒 + 20 Gy 组增高更为明显。上述结果说明,注射脂质体包裹的重组质粒后,通过电离辐射的诱导,不仅可以促进 IFN- γ 基因在肿瘤

局部表达增强,而且局部富集的 IFN- γ 可进入循环系统进而提高荷瘤机体免疫功能,免疫参数明显高于照射组,接近甚至高于对照组,提示辐射诱导的 IFN- γ 局部高表达能够缓解荷瘤机体经放疗后产生的免疫抑制,增强机体的抗肿瘤免疫反应活性。这可能是 pEgr-IFN- γ 基因-放射治疗抑瘤效果优于单纯放疗的主要原因。本研究为恶性肿瘤 IFN- γ 基因-放射治疗的临床应用奠定了理论和实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme VP. Gene therapy targeting by ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, 24: 565-568.
- [2] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Becktt MA, *et al.* Gene therapy by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 4266-4269.
- [3] Hallahan DE, Maucaeri HJ, Seug LP, *et al.* Spatial and temporal control of gene therapy[J]. *Nat Med*, 1995, 1: 786-789
- [4] Datta R, Taneja N, Sukhatme VP. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)₆GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation

[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993(90): 2419-2422.

- [5] Staba MJ, Maucer HJ, Kufe DW, *et al.* Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft[J]. *Gene Ther*, 1998, 5(3): 293-300.
- [6] Maucer HJ, Hanna NN, Staba MJ, *et al.* Radiation-inducible gene therapy[J]. *Life Sci*, 1999, 322: 225-228.
- [7] 吴丛梅, 李修义, 刘树铮. pEgr-IFN- γ 基因治疗联合放射治疗抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, 21: 236-238.
- [8] Nomura T, Yasuda K, Yamada T, *et al.* Gene expression and antitumor effects following direct interferon-gamma gene transfer with naked plasmid DNA and DC-chol liposome complexes in mice [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(1): 121-129.
- [9] Yagi K, Ohishi N, Hamada A, *et al.* Basic study on gene therapy of human malignant glioma by use of the cationic multilamellar liposome-entrapped human interferon beta gene[J]. *Hum Gen Ther*, 1999, 10(12): 1975-1982.
- [10] Wang Q, Cao X, Wang J, *et al.* Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy[J]. *Chin Med J*, 2000, 113(3): 281-285.

[收稿日期] 2003 - 09 - 08

[修回日期] 2003 - 12 - 10

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0203-01

灵芝硒多糖 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 诱导 K562 细胞凋亡

崔 乔, 尚德静 (辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029)

近年来,许多文献报道,灵芝多糖具有明显的抗肿瘤活性,灵芝硒多糖是硒与灵芝多糖有机结合的产物,它具有抑制 K562 细胞生长的作用,但对其抑制 K562 细胞生长的作用机制尚不清楚。本研究拟探讨灵芝硒多糖 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 体外对 K562 细胞凋亡的诱导作用及对细胞周期的影响。

富硒灵芝菌丝体经热水和碱提取,乙醇沉淀后得到粗多糖。该粗多糖再经去蛋白、脱色和分级沉淀,得到的组分经 DEAE-纤维素柱层析,制备得灵芝硒多糖 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B。5 × 10⁴/ml 浓度的 K562 细胞接种在含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。实验组加入 0.0375 g/L 浓度的 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B, 培养 72 h 后,收集细胞进行 MTT 比色; 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定后,用乙醇脱水,环氧树脂包埋后切片,用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,透射电镜下观察形态改变;常规方法提取 DNA,做琼脂糖凝胶电泳;乙醇法固定,流式细胞仪检测 DNA 含量及细胞周期分析。

MTT 实验结果显示,SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 可以显著抑制 K562 细胞的生长。经 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 作用

后,电镜观察细胞呈现凋亡改变,包括细胞皱缩变小,胞浆致密,核固缩,染色质浓集、边聚,形成不同形状大小的块状,胞质空泡化等。观察电泳结果,SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 可诱导发生明显的 DNA 片段化,在琼脂糖凝胶电泳上形成有规律地(180 bp 整倍数)DNA ladder,随着时间的增加,梯带强度增加,细胞凋亡呈明显的时效关系。流式细胞仪分析,使用 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 的组出现了亚 G₀/G₁ 期,通常认为此期细胞为凋亡细胞,其凋亡程度与时间呈正相关。

研究表明,SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 在一定条件下可以诱导 K562 细胞凋亡,并呈一定的时效和剂量关系。经 SeGLP-2B 和 SeGLP-3B 作用后,K562 细胞周期发生明显变化,从 48 h 开始,S 期细胞明显减少,说明细胞周期被阻滞在 G₁ 期到 S 期的关键点上。

[关键词] 灵芝硒多糖; K562 细胞; 凋亡

[中图分类号] R73-3

[文献标识码] D

[收稿日期] 2004 - 02 - 13

[修回日期] 2004 - 05 - 10