

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0462-04

死亡受体 5 胞外区域的重组、表达及活性鉴定

张长弓¹, 宋玉国³, 李文珠², 王 莉², 陈彩霞², 庄国洪¹(1. 厦门大学 医学院, 福建厦门 361005; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建厦门 361005; 3. 北华大学 医学院, 吉林 132011)

[摘 要] **目的:** 构建死亡受体 5(death receptor 5, DR5)胞外区域(eDR5)的表达载体, 表达纯化重组蛋白并鉴定其生物特性。**方法:** 通过重叠 PCR 获得 DR5 胞外段编码序列, 构建 pET-22b(+)/DR5 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, Ni²⁺ 柱亲和纯化, SDS-PAGE、直接 ELISA 鉴定纯化产物的纯度和特异性, 用 MTT 法检测 eDR5 蛋白阻断 DR5 单抗隆抗体 FMU1.5 和 TRAIL 诱导人胶质瘤细胞株 U343(高表达 DR5)、U373(低表达 DR5)细胞凋亡的作用。**结果:** 获得了 DR5 胞外段编码序列, 目的蛋白在上清及包涵体中都有表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上, 纯化的重组蛋白纯度达 95% 以上, 蛋白产量达 9 mg/ml。ELISA 结果表明所纯化蛋白为 eDR5。eDR5 蛋白可部分阻断 FMU1.5 和 TRAIL 诱导人胶质瘤细胞株 U343 细胞凋亡的作用, 其阻断率与 DR5 表达相关。**结论:** 死亡受体 5 胞外段基因的成功重组、表达及纯化, 为进一步的功能研究奠定了基础。

[关键词] 死亡受体 5; 基因克隆; 表达; 胶质瘤细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Construction and expression of extracellular domain of human death receptor 5 and detection of its biological activity

ZHANG Chang-gong¹, SONG Yu-guo³, LI Wen-zhu², WANG Li², CHEN Cai-xia², ZHUANG Guo-hong¹(1. Medical College, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 3. Medical College, Beihua University, Jilin 132011)

[Abstract] **Objective:** To construct the expressing vector of the extracellular domain of death receptor 5 (DR5), express it *E. coli*, identify the purified DR5 protein, and study its biological activity. **Methods:** The extracellular domain of DR5(eDR5) was assembled by overlapping PCR. The expression vector pET-22b(+)/ DR5 was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3). The expression of eDR5 protein was induced by IPTG and purified by Ni²⁺-affinity chromatographic column. The purity and specificities were detected by SDS-PAGE and ELISA, respectively. The blocking effects of purified eDR5 on FMU1.5-induced apoptosis of U343, U373 cells were observed. **Results:** The extracellular domain of DR5 was obtained by overlapping PCR. The eDR5 protein was expressed in both supernatants and inclusion bodies with a yield more than 30% of total bacterial proteins. The purity of eDR5 was more than 95% and the yield reached 9 mg/ml. The result of ELISA showed the purified protein was eDR5. Purified eDR5 partially blocked the apoptosis of U343 cells induced by FMU1.5 and TRAIL. **Conclusion:** The successful construction, expression, and purification of the extracellular domain of DR5 protein lays a foundation for further study of DR5 function.

[Key words] death receptor 5; gene clone; expression; glioma cell; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6):462-465]

死亡受体 5(death receptor 5, DR5)是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的特异性、高亲和力受体之一, 与 TRAIL 结合后可有效激活细胞内信号转导途径, 诱导细胞发生凋亡反应^[1]。现有的研究^[2]表明, DR5 在肺癌、胃肠道肿瘤、脑恶性胶质瘤、胰腺癌、肝癌等恶性肿

瘤组织中都有不同程度的表达。抗 DR5 单克隆抗体

[基金项目] 厦门大学科研启动基金资助(No. z03103)

[作者简介] 张长弓(1964 -), 男, 福建人, 讲师, 主要从事抗体工程研究; 宋玉国(1962 -), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫学研究。张长弓与宋玉国共为第一作者

[通讯作者] 庄国洪, E-mail: zhuanguohong@ yahoo. com. cn

mDRA-6 可诱导人白血病 T 细胞(Jurkat)凋亡^[3]。研究提示, 抗 DR5 单克隆抗体与 IL-21 或抗 CD40 和抗 CD137 单克隆抗体联合应用具有协同抗肿瘤作用^[4,5]。Cao 等^[6]研究发现通过缺氧/复氧途径可以上调 DR5 的表达以增强 TRAIL 诱导肝癌细胞凋亡的作用。强心苷、毛地黄酮通过上调 DR5 的表达启动 TRAIL 诱导非小细胞肺癌等肿瘤细胞凋亡的作用^[7,8]。死亡受体 DR5 是肿瘤生物治疗的重要靶点, 以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗已成为研究热点^[9,10]。本实验采用重叠 PCR 方法成功获得人死亡受体 DR5 的胞外段区域编码序列, 并成功表达、纯化得到 DR5 胞外区蛋白质(extracellular domain of DR5, eDR5), 这将为进一步抗肿瘤的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3)菌株、质粒 pET-22b(+)均购自 Novagen 公司。引物由上海生工公司合成。限制

性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Pfu DNA 聚合酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。Ni²⁺ HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。抗 DR5 鼠单克隆抗体 FMU1.5 由第四军医大学金伯泉教授惠赠, 人神经胶质瘤细胞株 U343(高表达 DR5)、U373(低表达 DR5)由加拿大阿尔博塔大学郝春海博士提供。重组人可溶性 TRAIL(sTRAIL)为 Peprotech 公司产品, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体由厦门波生公司惠赠。

1.2 DR5 胞外段表达载体的构建

从 NCBI 上查得 DR5 cDNA 胞外段序列, 将其分成 10 个长引物片段分别合成, 每对引物有 12 个碱基互补, 通过重叠 PCR 拼接到 DR5 胞外段序列, 引入 *Nco*I 和 *Xho*I 酶切位点。与质粒 pET-22b(+)构建 pET22b(+)/DR5 重组载体。反应条件为: 95 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环数为 30。

表 1 DR5 胞外段引物及重叠 PCR 的操作流程

Tab. 1 Primers of extracellular domain of DR5 and overlapping PCR procedure

Order of overlapping PCR	Primer	Products (bp)
	F9 5'-TCTCTCCACAGCTGGGGCTTCCCCACTGTGCTTTGTACCTGATTCTTTGTGGACACAT-3'	106
	R10 5'-CTCGAGAGAACAGGGAGAGGCAGGAGTCCCTGGGCTGGAGGTCACCGTCTCCTCCACAG-3'	
	F1 5'-ATGGCCATGGATATCACCCAACAAGACCTAGCTCCCCAGCAGAGAGCGGCCCAACAAC-3'	106
	R2 5'-CGGCCCAACAACAAGAGGTCCAGCCCTCAGAGGGATTGTGTCCACCTGGACACCAT-3'	
	F3 5'-CCTGGACA CCATATCTCAGAAGACGGTAGAGATTGCATCTCCTGCAAATATGGACAGGA-3'	106
	R4 5'-TGGTGCAGCGCAAGCAGAAAAGGAGGTCATTCCAGTGAGTGCTATAGTCCTGTCCATATA-3'	
	F5 5'-TCTGGTCGTGGTGCACGACTTAGCTCCACTTACCTGAATCACACCTGGTGCAGCGCA-3'	106
	R6 5'-GAATCTTCTCCCGAAGGTGCCTTCTTCGACTGACACACTGTGTTTCTGGTCGTGGT-3'	
	F7 5'-AAGAAGATTCTCCTGAGATGTGCCGAAGTGCCGCACAGGGTGTCCAGAGGGATGGTC-3'	106
	R8 5'-AGAGGGATGGTCAAGGTCGGTGATTGTACACCCTGGAGTGACATCGAATGTGTCCACAA-3'	

1.3 eDR5 表达载体的构建及 eDR5 的表达和纯化

1.3.1 表达载体的构建 PCR 扩增产物及质粒分别用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Xho*I 消化, 胶回收。在 T4 DNA 连接酶催化下, 将 eDR5 基因克隆至质粒 pET-22b(+)中, 构建成重组质粒 pET-22b(+)/DR5, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。重组子进行菌液 PCR 鉴定、酶切鉴定, 阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.3.2 eDR5 的表达和纯化 挑测序正确的重组质粒 pET-22b(+)/DR5 的 *E. coli* BL21(DE3)单菌落, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1:100 稀释到 LB 培养液中, 振荡培养至 D_{600} 值约为 0.6 ~ 0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h。Ni 柱亲和层析纯化蛋白, 采用透析法复性, 12% SDS-PAGE 分析表达量与纯

度。Lowry 法^[11]绘制牛血清白蛋白标准浓度曲线, 经拟合获得蛋白浓度与 640 nm 波长光密值(D_{640})的直线方程, 按常规方法计算待测蛋白质的浓度。

1.4 ELISA 法鉴定 eDR5 蛋白的特异性

用纯化的 eDR5(5 μ g/ml)包被酶标板 100 μ l/孔, 4 °C 过夜, 以等浓度的 BSA 作为阴性对照, 各 3 复孔。37 °C 封闭 1 h。加 1:5 000 稀释的 FMU1.4、FMU1.5 各 100 μ l/孔, 37 °C 温育 1 h。加 HRP 标记的羊抗鼠抗体 100 μ l/孔, 37 °C 温育 30 min。加入过氧化氢和 TMB 各 50 μ l/孔, 避光显色 15 min。以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 每个步骤间都要 PBST 洗涤 5 次, 甩干。在酶标仪上波长为 450 nm 波段测定各孔光密度值。

P/N 值 = (被检样品 D 值 - 空白对照 D 值) / (阴

性样品 D 值 - 空白对照 D 值), 以样品的 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性, 反之则为阴性。

1.5 MTT 法^[12] 检测可溶性 eDR5 对 FMU1.5、TRAIL 诱导胶质瘤细胞凋亡的阻断效应

将 U343、U373 细胞种于 96 孔细胞培养板(每孔 2×10^5 细胞), 24 h 后细胞铺满 60% 左右, 分别用 1.25 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 eDR5 和 FMU1.5(40 $\mu\text{g/ml}$)、TRAIL(100 ng/ml)处理 U343、U373 细胞, 空白对照孔只加含血清培养液, 每种浓度设置 3 个平行复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养 4 h 后加 20 μl MTT(7.5 mg/ml)继续培养 4 h, 加 100 μl 异丙醇, 在混合震荡器上震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 以酶联检测仪测 D_{570} 光密度值。本实验重复 3 次, 取平均值。细胞毒性(%) = $(1 - \text{实验组 } D_{570} / \text{对照组 } D_{570}) \times 100\%$

2 结果

2.1 DR5 胞外域编码序列的重组

经重叠 PCR 将 10 个长引物片段拼接成完整的 eDR5 编码序列。第一步 PCR 反应: F1 + R2, F3 + R4, F5 + R6, F7 + R8, F9 + R10 分别生成产物 A1, A2, A3, A4, A5; 第二步 PCR 反应: A1 + A2, A3 + A4 分别生成产物 A6, A7; 第三步 PCR 反应: A5 + A6 生成产物 A8; 第四步 PCR 反应: A7 + A8 生成产物 A9, 即为带有酶切位点的 eDR5 胞外域序列。图 1 的 1 ~ 4 泳道中分别可见 A1(106 bp)、A6(200 bp)、A8(294 bp)、A9(465 bp) 的产物条带, 均与理论值相符。

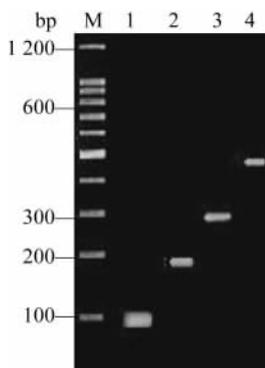


图 1 DR5 胞外域编码序列重组的 PCR 产物电泳图

Fig.1 Agarose gel eletrophoresis of PCR product of eDR5

M: DNA markers; 1: A1(102 bp) 2: A6(200 bp); 3: A8(294 bp); 4: A9(465 bp)

2.2 重组 pET22b(+)/DR5 质粒的鉴定

重组子利用通用引物和 eDR5 特异引物进行 PCR 鉴定, 阳性的克隆提取质粒经 *Nco* I 及 *Xho* I 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到两条目的条带, 分别为 eDR5 条带(465 bp)、pET-22b(+)条带(5 482 bp)(图

2)。阳性克隆送上海博亚公司测序, 测序结果表明获得一正确序列的重组子。

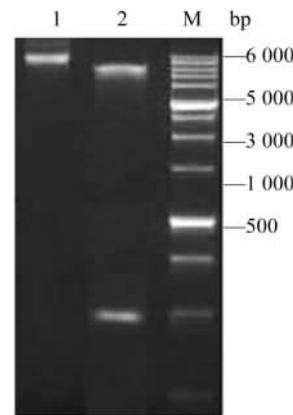


图 2 重组 pET22b(+)/DR5 质粒的双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant pET22b(+)/DR5

1: pET22b(+)/DR5; 2: pET22b(+), eDR5 (465 bp); M: DNA markers

2.3 DR5 胞外段在大肠杆菌中的表达及纯化

含重组质粒 pET-22b(+)/DR5 的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导, 目的蛋白在上清及包涵体中都有表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。包涵体经尿素洗涤和溶解, Ni^{2+} 柱纯化后复性。复性用透析法, 采用逐步降低尿素浓度的方法除去蛋白质溶液中的尿素。纯化蛋白的 SDS-PAGE(图 3) 显示, 在相对分子质量 17 000 附近有一特异条带, 符合目的蛋白理论推算值(约 16 740), 扫描分析显示其纯度达 95% 以上。

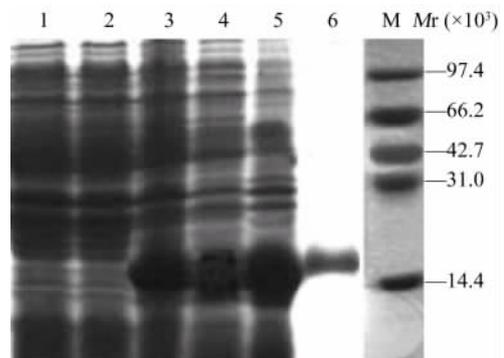


图 3 SDS-PAGE 分析 eDR5 的表达及纯化

Fig.3 SDS-PAGE analysis of eDR5 protein expression and purity

1: pET-22b(+)/DR5(-); 2: IPTG(-)pET-22b(+)/DR5(+); 3: IPTG(+)pET-22b(+)/DR5(+) 4: Bacterial surpernant; 5: Inclusion bodies; 6: After Ni^{2+} purifying; M: Protein markers

以 Lowry 法测定绘制牛血清白蛋白浓度标准曲线,其光密度(X)和浓度(Y)的相关系数 $r=0.999$,得直线方程为 $Y=0.0032X+0.063$ 。以此方程测定并计算纯化的 eDR5 蛋白浓度为 9 mg/ml。

2.4 目的蛋白 eDR5 的特异性鉴定

经过 ELISA 检测,纯化后得到的蛋白可以同 FMU1.5 特异结合,其 P/N 值均大于 2.1,而与 FUM1.4 无交叉反应,3 次所测得的结果均相同,说明复性后的融合蛋白是纯化的 eDR5 蛋白。

2.5 重组 eDR5 对 FMU1.5 和 TRAIL 诱导 U343 细胞凋亡的阻断作用

为检测 eDR5 的生物活性,将 eDR5 分别与 DR5 单抗 FMU1.5、TRAIL 联合作用 U343(高表达 DR5)及 U373(低表达 DR5)细胞。结果显示,在 U343 细胞(图 4A),在 eDR5 为 0 时,FMU1.5 可诱导细胞凋亡达 75% 以上,TRAIL 可诱导细胞凋亡达 90% 左右;加入 eDR5 后可部分阻断细胞凋亡,当 eDR5 40 $\mu\text{g/ml}$ 和 FMU1.5 共同作用时,细胞凋亡率减少至 13.87%。在 U373 细胞(图 4B),不论 eDR5 的剂量高低,都基本没有影响细胞凋亡率的变化。

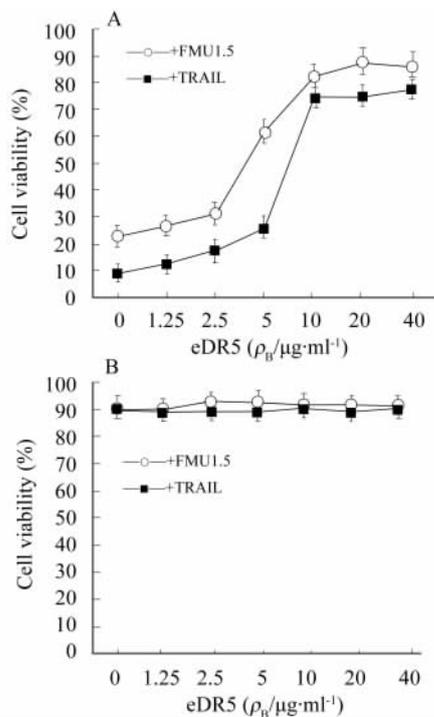


图 4 eDR5 阻断 Anti-DR5 mAb FMU1.5、TRAIL 诱导 U343 (A) 和 U373 (B) 细胞凋亡效应

Fig. 4 Blocking effect of eDR5 on apoptosis of U343 (A) and U373 (B) cells induced by Anti-DR5 FUM1.5, TRAIL

3 讨论

本实验通过重叠 PCR 获得完整的 DR5 胞外段序

列(465 bp),并成功构建 pET-22b(+)/DR5 重组体,基因产物在大肠杆菌 BL21 的培养上清及包涵体中都有表达,蛋白的表达量占菌体总蛋白的 30% 以上,经 SDS-PAGE 显示在相对分子质量为 17 000 附近有明显表达条带,与编码的理论推算值相符。经 Ni^{2+} 树脂亲和层析进行纯化后表达蛋白的纯度达 95%。ELISA 检测显示表达纯化产物可与 FMU1.5 特异结合,与 FMU1.4 没有反应,说明得到的蛋白是 eDR5 并具有一定的抗原活性。

文献[12]证实 U343 细胞高表达 DR5(86.5%),FMU1.5 40 $\mu\text{g/ml}$ 可诱导 77.33% U343 细胞凋亡。当 U343 细胞中加入外源 eDR5 时,eDR5 通过与 FMU1.5 特异性结合竞争抗体与膜 DR5 的结合从而阻断 FMU1.5 对 U343 细胞的凋亡诱导作用。实验证实加入 40 $\mu\text{g/ml}$ 外源 DR5 时 FMU1.5 对 U343 细胞的凋亡诱导率为 13.87%,其最高阻断率近 53.5%,说明 eDR5 具有一定的生物学活性。U373 细胞低表达 DR5(2.61%),FMU1.5 40 $\mu\text{g/ml}$ 可诱导 8.9% U373 细胞凋亡,当 eDR5 存在时 40 $\mu\text{g/ml}$ FMU1.5 对 U373 的凋亡诱导作用没有改变。eDR5 不能阻断 FMU1.4 的凋亡诱导作用。同样 eDR5 可以阻断 TRAIL 对 U343 细胞的凋亡诱导作用而对 U373 细胞的阻断作用不明显。这说明 eDR5 阻断 FMU1.5、TRAIL 的凋亡诱导作用与细胞表面 DR5 的表达相关,也证实所表达纯化的 DR5 胞外段具有生物活性。我们用表达纯化的 eDR5 免疫 BLAB/c 鼠已经制备了抗 eDR5 特异的单克隆抗体,该抗体可以诱导表达 DR5 的细胞凋亡(另见报道)。

本研究获得人 DR5 胞外段基因,获得高纯度(95%)有活性的 eDR5 蛋白,为人源性抗体的筛选和基因治疗以及凋亡途径的研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, *et al.* TRAIL-R2: A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL[J]. EMBO J, 1997, 16(17): 5386-5397.
- [2] Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, *et al.* TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL[J]. Curr Biol, 1997, 7: 693-696.
- [3] 刘广超,马远方,张军,等. 抗人 DR5 抗体 mDR5-6 细胞毒作用机制分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(6): 790-793.
- [4] Smyth MJ, Hayakawa Y, Cretney E, *et al.* IL-21 enhances tumor-specific CTL induction by anti-DR5 antibody therapy[J]. J Immunol, 2006, 176(10):6347-6355.
- [5] Kem MA, Haugg AM, Koch AF, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition (下转第 468 页)

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0466-03

重组 p53 腺病毒联合中药治疗小鼠腹水瘤的疗效

Synergistic antitumor effect of adenoviral-mediated p53 gene transfer and DeLisheng in an ascitic tumor-bearing mouse model

张开通¹, 戚晓东¹, 黄 灵¹, 杨之斌¹, 姜乃佳¹, 翟红岩²(1. 首都医科大学 附属北京同仁医院 肿瘤中心, 北京 100730; 2. 泰安市肿瘤医院放三科, 山东泰安 271000)

[摘要] 目的: 探讨 p53 腺病毒(简称 Ad-p53)注射液联合中药得力生及消癌平治疗小鼠腹水瘤的协同作用。方法: 建立昆明小鼠 H22 肝癌腹水瘤模型, 建模 48 h 后分组分别给予 Ad-p53、中药得力生和消癌平或两药联用。用药 1 周后检测体重、腹围、腹水量、腹水瘤细胞计数, 流式细胞仪测定瘤细胞凋亡百分率以及细胞周期情况。结果: Ad-p53、得力生、消癌平单药治疗组, 除体重以外的上述指标与对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$), Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组的腹围增长率、腹水量、瘤细胞计数、晚期细胞凋亡率均明显少于各单药治疗组($P < 0.05$)。结论: 腹腔注射 Ad-p53、得力生和消癌平均可抑制 H22 细胞生长并减少腹水形成, Ad-p53 与中药得力生、消癌平联合腹腔内给药对治疗腹水瘤有协同作用。

[关键词] p53; 基因治疗; 得力生; 消癌平; 腹水瘤

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A

腹膜转移是胃肠、卵巢等腹、盆腔恶性肿瘤术后治疗失败的重要原因之一, 平均自然生存期不到 6 个月^[1]。关于腹膜转移的治疗有多种手段^[2], 但尚不理想的方法。近年来用重组腺病毒 p53 制剂治疗腹腔转移取得了一定疗效^[3], 原因在于 50% ~ 60% 的腹膜转移癌中有 p53 基因的突变^[4]。重组腺病毒 p53 制剂(Ad-p53)以腺病毒为载体将野生型 p53 基因导入肿瘤细胞, 以恢复 p53 基因的功能, 正在成为临床肿瘤基因治疗的一种新药物, 对晚期恶性肿瘤有一定的控制和改善^[3]。抗癌中药得力生、消癌平具有诱导癌细胞凋亡^[5]以及提高机体免疫力、减毒增效的作用。本课题将重组 Ad-p53 分别与中药得力生、消癌平联合腹腔给药, 观察其控制癌性腹水的协同作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及实验动物

雌性昆明小鼠 60 只, 20 ~ 22 g; 小鼠肝癌 H22 瘤株(购自中国医学科学院细胞中心); 重组 p53 腺病毒注射液(Ad-p53, 深圳赛百诺基因技术有限公司, 批号 20041205); 中药得力生(北京正邦制药有限公司, 批号 050504); 中药消癌平(南京圣和药业有限公司, 批号 200412231)。

1.2 H22 肝癌腹水瘤小鼠模型的建立

将 -80 °C 冷冻之 H22 肝癌细胞复苏后, 注射入昆明鼠腹腔传代, 7 ~ 9 d 后, 腹水生成明显。在无菌条件下取腹水, 以 1640 培养液调整腹水中瘤细胞密度, 每只小鼠腹腔注射等量瘤细胞悬液 1 ml(含 1×10^6 个瘤细胞), 建立腹腔转移动物模型。

1.3 实验动物分组

将模型小鼠随机分 6 组, 分别为: (1) 空白对照组; (2) Ad-p53 组; (3) 得力生组; (4) Ad-p53 + 得力生组; (5) 消癌平组; (6) Ad-p53 + 消癌平组。每组模型鼠 10 只。治疗实验(建模后 48 h 起给药, 共 1 周): (1) 空白对照组, 不给药带瘤生存; (2) Ad-p53 组, 隔日 1 次腹腔注射 Ad-p53 0.2 ml (1×10^{10} vp, viral particle), 共 3 次; (3) 得力生组, 每日 1 次腹腔注射得力生原液 0.2 ml/只, 共 6 次; (4) Ad-p53 + 得力生组, 用药同单用组; (5) 消癌平组, 每日 1 次腹腔注射消癌平 0.4 ml/只, 共 6 次; (6) Ad-p53 + 消癌平组, 用药同单用组。

1.4 小鼠肿瘤的一般指标测定

(1) 体重增长率: 注射瘤细胞当天及最后一天以天平测量体重, 计算体重增长率(体重增长率 = 体重差值/初始体重); (2) 腹围增长率: 注射瘤细胞当天及最后一天以软尺测量腹围, 计算腹围增长率(腹围增长率 = 腹围差值/初始腹围); (3) 腹水量: 实验结束, 处死小鼠, 以无菌注射器抽取并测量; (4) 腹水瘤细胞计数: 稀释腹水, 显微镜下计数。

1.5 鼠 H22 肝癌腹水瘤细胞凋亡的测定

取腹水原液 100 μ l, 冷 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 离心 1 000 r/min, 5 min, 4 °C, 弃上清液。250 μ l 结合缓冲液重新悬浮细胞, 加入 5 μ l Annexin-V/FITC 和 10

[作者简介] 张开通(1980-), 男, 江苏徐州人, 住院医师, 主要从事腹部肿瘤的防治研究。

[通讯作者] 戚晓东, E-mail: qixiaot@yeah.net

μl 20 μg/ml 的 PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 再加入 250 μl 结合缓冲液, 1 h 内上流式细胞仪分析, 比较各组早期及晚期凋亡率。

1.6 H22 肝癌腹水瘤的细胞周期测定

取腹水原液 100 μl, 用冷 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次(1 000 r/min, 5 min, 4 °C, 弃上清液), 加入 70% 冰乙醇 1 ml, 置于 4 °C 冰箱中 1 h, 离心, PBS 液重悬, 用 300 目滤网过滤后离心, 加入 PI/RNase-A 酶配方液 1 ml, 避光, 4 °C 存放 30 min 后流式细胞仪分析, 测定 G₀-G₁ 期、S 期、G₂-M 期各期百分比。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件, 正态分布资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间先行单因素方差分析, 如有统计学意义, 再行析因分析。

2 结果

2.1 成功建立 H22 肝癌腹水瘤小鼠模型

接种瘤细胞后 1 周腹水生成明显, 乳白色, 2 周存活率 100%。

2.2 各种用药方案对小鼠肿瘤一般指标的影响

用药组除体重增长率与对照组无差别($P > 0.05$)以外, 腹围增长率、腹水量、瘤细胞计数均较对照组减少, 两个药物合用组最明显($P < 0.05$, 表 1)。Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组小鼠腹水量及瘤细胞计数均明显少于 Ad-p53、得力生、消癌平各单药治疗组($P < 0.05$)。

2.3 各种用药方案对肝癌腹水瘤细胞致凋亡作用

表 1 显示各组间早期凋亡无统计学差异($P > 0.05$)。晚期凋亡: 各用药组晚期凋亡率均高于对照组($P < 0.05$, 表 1)。Ad-p53 + 得力生和 Ad-p53 + 消癌平组的细胞凋亡率显著高于各单药治疗组($P < 0.05$)。

表 1 重组 p53 腺病毒联合中药治疗小鼠腹水瘤的疗效观察($\bar{x} \pm s$)

分 组	腹围增长率(%)	腹水量(V/ml)	瘤细胞计数(ml ⁻¹ , ×10 ⁷)	凋亡率(%)		细胞周期(%)		
				早期	晚期	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
空白对照组	0.40 ± 0.02	11.1 ± 2.1	13.3 ± 1.2	0.71 ± 0.18	1.17 ± 0.28	22.84 ± 4.56	71.86 ± 3.66	5.30 ± 1.76
p53 组	0.36 ± 0.02	9.1 ± 1.6	12.8 ± 1.0	0.80 ± 0.16	3.69 ± 0.46	26.55 ± 3.52	68.74 ± 3.95	4.71 ± 1.64
得力生组	0.38 ± 0.03	9.7 ± 1.31	2.8 ± 1.3	0.65 ± 0.13	2.82 ± 0.26	26.18 ± 2.32	61.16 ± 2.01	12.66 ± 1.32
p53 + 得力生组	0.31 ± 0.03*	5.3 ± 1.0* [△]	7.8 ± 1.1* [△]	0.78 ± 0.14	6.13 ± 0.51* [△]	29.09 ± 4.54*	52.20 ± 4.86*	18.71 ± 0.82*
消癌平组	0.37 ± 0.03	9.2 ± 1.3	12.7 ± 1.4	0.63 ± 0.19	2.24 ± 0.35	26.18 ± 2.31	69.17 ± 2.01	4.65 ± 1.32
p53 + 消癌平组	0.30 ± 0.02*	5.0 ± 1.3* [△]	7.7 ± 1.0* [△]	0.78 ± 0.13	5.43 ± 0.52* [△]	35.08 ± 4.55* [△]	60.22 ± 4.85*	4.70 ± 0.84*

* $P < 0.05$ 与空白对照组比较; [△] $P < 0.05$ 与 Ad-p53 组或得力生组比较; [▲] $P < 0.05$ 与 Ad-p53 组或消癌平组比较

2.4 各种用药方案对肝癌腹水瘤细胞细胞周期的影响

空白对照组、Ad-p53 组、得力生组及 Ad-p53 + 得力生组之间比较: G₀-G₁ 期无统计学差异($P > 0.05$)。各用药组 S 期均较对照组缩短, 药物合用组最明显; G₂-M 期, 得力生组较对照组延长, Ad-p53 组较对照组缩短(G₀-G₁ 期相应延长), 两药合用后 G₂-M 期明显延长($P < 0.05$)。空白对照组、Ad-p53 组、消癌平组及 Ad-p53 + 消癌平组之间比较: G₂-M 期无统计学差异($P > 0.05$)。G₀-G₁ 期各用药组均较对照组延长, 药物合用组最明显; S 期各用药组均较对照组相应缩短, 药物合用组最为显著($P < 0.05$)。

3 讨论

p53 基因是一个重要的抑癌基因, 人类肿瘤中发现有 50% 以上存在 p53 基因的突变或缺失^[6], p53 功能缺失导致肿瘤细胞恶性程度增加, 并对放、化疗敏感性降低^[6]。Ad-p53 以腺病毒为载体将野生型 p53 基因导入

肿瘤细胞, 恢复 p53 基因的功能, 从而调控细胞周期和诱导细胞凋亡^[5], 增加肿瘤对化、放疗的敏感性^[3], 还可通过旁观者效应, 抑制肿瘤血管内皮生长因子、抑制肿瘤血管生成, 从而杀灭肿瘤细胞^[7]。大量基础和临床研究表明 p53 基因治疗恶性肿瘤安全有效^[3,8]。本实验以 Ad-p53、得力生、消癌平三药单用及 Ad-p53 与两中药分别联用治疗 H22 肝癌腹水瘤, 结果显示, 3 个药物单用组腹围增长率、腹水量、腹水瘤细胞计数均较空白对照组减小, 晚期凋亡百分比明显增加, 说明三药均显示了杀灭肿瘤细胞的作用, 诱导细胞凋亡可能是其作用机制之一。药物联用之后上述指标更优, 可认为药物联用有协同作用。细胞周期分析则显示, Ad-p53 组和消癌平组 G₀-G₁ 期延长, S 期相应缩短, 可推测两种药物均使肿瘤细胞阻滞于 G₀-G₁ 期, 这与相关文献报道一致^[5,9]。得力生组 G₂-M 期百分比增加, 说明药物作用使细胞周期阻滞于此期^[5]。Ad-p53 与得力生合用后细胞周期阻滞于 G₂-M 期, 可能是由于两药联用后得力生阻

滞细胞周期的作用更为明显所致;与消癌平合用 G₀-G₁ 期阻滞更明显,表明两药协同作用于此期。肿瘤是一个全身性疾病,综合治疗已成为共识,p53 基因治疗为综合治疗肿瘤开辟了新的天地。本实验通过重组 p53 腺病毒注射液联合中药对腹水瘤的实验研究,希望能为其进一步临床应用提供参考依据。

[参 考 文 献]

[1] Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, *et al.* Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: Results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study[J]. *Cancer*, 2000, 88: 358-363.

[2] 戚晓东, 王 江, 魏政立, 等. 纤维蛋白黏合剂包埋顺铂治疗腹膜移植瘤的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(10): 955.

[3] Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY, *et al.* A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(7): 553-566.

[4] Soslow RA, Slomovitz BM, Saqi A, *et al.* Tumor suppressor gene, cell surface adhesion molecule, and multidrug resistance in mullerian serous carcinomas: Clinical divergence without immunophenotyp-

ic differences[J]. *Gynecologic Oncology*, 2000, 79: 430-437.

[5] Hong CY, Huang SC, Lin SK, *et al.* Norcantharidin-Induced post-G₂/M apoptosis is dependent on wild-type p53 gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(1): 278-285.

[6] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 323-331.

[7] Zhang L, Yu D, Hu M, *et al.* Wild - type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3655-3661.

[8] Ohtani S, Kagawa S, Tango Y, *et al.* Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(1): 93-100.

[9] 李茂全, 沈建华, 胥 彬, 等. 消癌平对 SGC27901 胃癌细胞的作用及机制的实验研究[J]. *介入放射学杂志*, 2001, 10(4): 228-231.

[收稿日期] 2006 - 10 - 08 [修回日期] 2006 - 11 - 20
[本文编辑] 王 莹

(上接第 465 页)

induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*. 2006, 66(14): 7059-7066.

[6] Cao L, Li Y, Cheng F, *et al.* Hypoxia/reoxygenation up-regulated the expression of death receptor 5 and enhanced apoptosis in human hepatocyte line[J]. *Transplant Proc* 2006, 38(7): 2207-2209.

[7] Frese S, Frese-Schaper M, Andres AC, *et al.* Cardiac glycosides initiate Apo2L/ TRAIL- induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5867-5874.

[8] Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, *et al.* Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells [J]. *Ongene*, 2005, 138(1): 71-77.

[9] Sloot AM, Tur V, Szegezdi E, *et al.* Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the eDR5 receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(23): 8634-8639.

[10] Park SJ, Wu CH, Choi MR, *et al.* P-glycoprotein enhances TRAIL-triggered apoptosis in multidrug resistant cancer cells by interacting with the death receptor eDR5[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(3): 293-307.

[11] 梁晓红, 孙汶生, 高立芬, 等. 重组人可溶性 eDR5 蛋白的表达、制备及其生物活性检测[J]. *山东大学学报*, 2004, 42(3): 252-255.

[收稿日期] 2006 - 08 - 30 [修回日期] 2006 - 12 - 10
[本文编辑] 王 莹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外),例如 *m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/(kg · d)或 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 A° (埃)已不用,应写作 0.1 nm; 时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec); 转速单位符号为 r/min(不是 rpm); 量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N, 也不是 mol/mm³); 力的单位“牛顿”符号为 N[不是 dyn(达因)、kgf(千克力)], 换算 1 dyn = 10⁻⁵ N; 热量单位“焦耳”符号为 J[不是 cal(卡)、kcal(千卡)], 换算 1 cal = 4. 187 J; 放射性活度单位符号为 Bq[不是 Ci(居里)], 换算 1 Ci = 3. 7 × 10¹⁰ Bq]。

(本刊编辑部)