

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0014-07

· 论 著 ·

## 依托泊苷提高复制缺陷型腺病毒介导外源基因在肿瘤细胞中的表达水平

张圣海, 吴继红, 刘新建, 陈霞芳, 田毓华, 谢匡成, 于 慧, 潘 虹, 黄 倩(上海交通大学附属第一人民医院 中心实验室, 上海 200080)

**[摘要]** **目的:** 研究化疗药物依托泊苷对腺病毒载体介导的外源基因在肿瘤细胞内表达水平的影响。**方法:** 携带外源基因增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的复制缺陷型腺病毒 Ad5-CMV-EGFP(MOI 为 1 或 10)单独或联合终质量浓度为 0.2、2、20、40、80、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的依托泊苷感染体外培养的肿瘤细胞 NCI-H446(人非小细胞肺癌细胞株)、A549(人肺腺癌细胞株)、SMMC-7721(人肝癌细胞株)、SGC7901(人胃癌细胞株)、SKBR-3(人乳腺癌细胞株)和 BTT(小鼠膀胱移行上皮癌细胞株)后不同时间, 流式细胞仪分析肿瘤细胞 EGFP 阳性率和平均荧光强度, Western blotting 检测 EGFP 蛋白表达, RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测肿瘤细胞内 EGFP 的 mRNA 表达量和 DNA 拷贝数。**结果:** 不同剂量的依托泊苷可不同程度地提高 Ad5-CMV-EGFP 在 7 种肿瘤细胞内的表达水平, 但对 EGFP 阳性率无明显提高。10 MOI 的 Ad5-CMV-EGFP 联合 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  依托泊苷分别感染肿瘤细胞 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 24 h 后, 细胞内 EGFP 的荧光强度分别是单独感染的 3.3、3.5、3.1、6.2、7.0、5.4 和 3.4 倍。Ad5-CMV-EGFP 联合应用依托泊苷后肿瘤细胞内 EGFP 蛋白表达增加 2~5 倍, EGFP mRNA 表达量提高, 但 DNA 拷贝数未见明显改变。**结论:** 依托泊苷可提高腺病毒载体介导的外源基因在肿瘤细胞内的表达水平, 该作用可能是在转录水平上发挥作用的。

**[关键词]** 复制缺陷型腺病毒; 依托泊苷; 肿瘤; 基因表达

**[中图分类号]** R730

**[文献标志码]** A

## Etoposide enhances transgene expression mediated by recombinant replication-defective adenovirus in tumor cell lines

ZHANG Sheng-hai, WU Ji-hong, LIU Xin-jian, CHEN Xia-fang, TIAN Yu-hua, XIE Kuang-cheng, YU Hui, PAN Hong, HUANG Qian (Central Laboratory, The First People's Hospital of Shanghai Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of chemotherapeutic agent Etoposide on transgene expression mediated by recombinant replication-defective adenovirus in tumor cell lines. **Methods:** Cultured tumor cells, including NCI-H446, NCI-H460, A549, SMMC-7721, SGC7901, SKBR-3, and BTT were infected by Ad-CMV-EGFP alone (MOI being 1 and 10) or in combination with Etoposide at different final concentrations (0.2, 2, 20, 40, 80, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). GFP positive cell rates and the mean intensities of GFP fluorescence in tumor cells were detected by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) after cultured with different strategies. EGFP protein expression in tumor cells was analyzed by Western blotting. Quantitative analysis of mRNA and DNA copies of EGFP in tumor cells were performed by RT-PCR and real-time PCR. **Results:** FACS results indicated that Etoposide efficiently enhanced the mean intensities of EGFP fluorescence to different degrees in all 7 cell lines but had no evident effects on the EGFP positive rate. Twenty-four hours after cultured at the presence of 10 MOI Ad5-CMV-EGFP and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Etoposide, the mean intensities of EGFP fluorescence in NCI-H446, NCI-H460, A549, SMMC-7721, SGC7901, SKBR-3, and BTT cells were respectively 3.3, 3.5, 3.1, 6.2, 7.0, 5.4, and 3.4 folds that cultured with 10 MOI Ad5-CMV-EGFP alone. Western blotting showed that EGFP protein expression in cells co-cultured with Ad5-CMV-EGFP and Etoposide was 2-5 times that cultured with 10 MOI Ad5-CMV-EGFP alone. EGFP mRNA expression had a similar tendency as EGFP protein, but the copies of EGFP DNA had no evi-

**[基金项目]** 国家自然科学基金杰出青年资助项目(No. 30325043); 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2004CB518804);

上海市卫生局医学领军人才基金资助项目; 上海市科学技术委员会“登山计划项目”(No. 064119539)

**[作者简介]** 张圣海(1972-), 男, 山东省泰安市人, 博士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

**[通讯作者]** 黄 倩, Email: qhuang@sjtu.edu.cn

dent changes. **Conclusion:** Etoposide can enhance transgene expression mediated by recombination replication-defective adenovirus in several tumor cell lines, which may play a role at the transcriptional level.

[ **Key words** ] replication-defective adenovirus; etoposide; tumor; gene expression

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 1 ):14-20 ]

基因治疗作为一种新兴的肿瘤治疗手段, 能否成为安全有效的肿瘤综合治疗的一部分还有待于深入地研究。国外研究报道<sup>[1-4]</sup>肿瘤基因治疗可能可提高化疗、放疗的敏感性, 抑制肿瘤生长、减少肿瘤的复发和转移起一定作用。国内也有报道<sup>[5-6]</sup>基因治疗可以使化疗药物增敏, 联合应用化学疗法和基因治疗可对肿瘤的治疗起到叠加或协同作用, 获得更好的治疗效果。本课题从化疗药物是否对基因治疗起促进作用的角度, 研究化疗药物依托泊苷对基因治疗中腺病毒载体介导的外源基因在肿瘤细胞内表达水平的影响, 为化疗药物与基因治疗联合应用提高恶性肿瘤的治疗效果提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞和主要试剂

人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H446、人小细胞肺癌细胞株 NCI-H460、人肺腺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 SMMC-7721、人胃癌细胞株 SGC7901 和人乳腺癌细胞株 SKBR-3 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库, 人卵巢癌细胞株 SKOV-3 由上海交通大学肿瘤研究所惠赠, 小鼠膀胱移行上皮癌细胞株 BTT 由本实验室构建。

A549 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液培养, NCI-H446 细胞、NCI-H460 细胞、SMMC-7721 细胞、SKBR-3 细胞和 BTT 细胞均采用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液培养, SGC7901 细胞用含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。表达 EGFP 的复制缺陷型腺病毒 Ad5-CMV-EGFP 由本实验室构建并保存; 化疗药物注射用依托泊苷(VP-16)为国药集团国瑞药业公司生产, 批号为 VP051101。

DMEM 培养液、DMEMF-12 培养液、RPMI 1640 培养液、一步法总 RNA 抽提试剂 TRIzol Reagent、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG 和 Superscript™ III First-Strand Synthesis system for RT-PCR 均购自 Invitrogen 公司, 细胞基因组 DNA 抽提试剂盒为 TAKARA 公司产品, 小鼠抗 EGFP 单克隆抗体购自 MBL 公司, 羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司, 化学发光试剂盒 Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit 购自 Roche 公司。

### 1.2 荧光显微镜观察和 FACS 检测肿瘤细胞感染后 EGFP 的表达

分别将 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 细胞按每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔细胞培养板中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后细胞贴壁。Ad5-CMV-EGFP 的 MOI 分别为 1 和 10。联合应用的依托泊苷的终质量浓度分别为 0.2、2、20、40、80、100 和 200 μg/ml。不同感染复数的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合不同剂量的依托泊苷分别感染上述肿瘤细胞。每种肿瘤细胞都设有空白对照孔和单用依托泊苷孔。感染后 24 和 48 h 用倒置荧光显微镜(德国 Zeiss Axio 100)观察并照相记录被感染细胞 EGFP 的荧光亮度、细胞形态与病变状态。然后弃去培养液, PBS 洗细胞 2 次, 经 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 800 × g 离心 5 min 后收集细胞。PBS 重悬细胞, 流式细胞仪(BeckMan coulter EPICS XL)检测 EGFP 阳性率和平均荧光强度。实验重复 3 次。

### 1.3 Western blotting 检测肿瘤细胞感染后 EGFP 蛋白的表达

分别将 NCI-H460、A549、SGC7901 和 SMMC-7721 细胞按每孔  $5 \times 10^5$  接种于 6 孔培养板中, 24 h 后细胞贴壁。采用 MOI 为 10 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合终质量浓度为 40 μg/ml(40 μg)的依托泊苷感染上述 4 种细胞, 每种细胞都设有空白对照孔和单用依托泊苷孔。48 h 后弃培养液, 用细胞刷收集细胞, 按  $2 \times 10^7$ /ml 加入蛋白裂解液, 收集上清, 95 °C 变性 10 min。10% SDS-PAGE 2 h 后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 加入 1:10 000 稀释的 EGFP 小鼠单克隆抗体 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后加入 1:2 000 稀释的羊抗小鼠二抗, 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用发光试剂在暗盒中压片曝光, 显影, 定影, 洗片。

### 1.4 RT-PCR 和实时定量 PCR 检测 EGFP mRNA 的表达

将上述 7 种肿瘤细胞以  $5 \times 10^4$ /孔接种在 24 孔细胞培养板中, 贴壁后以 MOI 为 10 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合终质量浓度为 40 μg/ml(40 μg)的依托泊苷感染细胞, 每种肿瘤细胞都设有空白对照孔和单用依托泊苷孔。分别于感染后 24、48 和

72 h 用 TRIzol Reagent 抽取各孔细胞总 RNA, 紫外分光光度计 (Ultraspec3000, Pharmacia Biotech 公司) 测定 RNA 的纯度和含量。经逆转录试剂盒 Super-script™ III First-Strand Synthesis system for RT-PCR 制备 cDNA。EGFP 引物序列: 上游引物为 5'-AGAAGAACGGCATCAAGGTG-3', 下游引物为 5'-GAACTCCAGCAGGAC CATGT-3'; GAPDH 引物序列: 上游引物为 5'-ATGGAAATCCCATCACCA TCTT-3', 下游引物为 5'-CGCCCACTTGATTTTGG-3'。以看家基因 GAPDH 作为内参照, 所有待测样本均做复孔, 每孔取反转录产物 5  $\mu$ l, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ l, Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (2  $\times$ ) 10  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ l, 分别对 EGFP 和 GAPDH 进行扩增。实时动态定量 PCR 采用 DNA Engine Opticon 2 PCR 仪 (MJ Research 公司)。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C、2 min 预变性, 然后按 94  $^{\circ}$ C、10 s, 55  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、30 s, 扩增 40 个循环。将不含 cDNA 模板的 PCR 反应体系设为阴性对照, 反应结束后对各样本 mRNA 拷贝进行分析。

### 1.5 实时定量 PCR 检测肿瘤细胞感染后 EGFP 基因的 DNA 拷贝数

按照上述方法将 7 种细胞铺板后进行感染, Ad5-CMV-EGFP 的感染复数和依托泊苷的用量以及对对照孔的设立均与 1.4 中检测 mRNA 时相同。分别于感染细胞后 24、48 和 72 h 用 TAKARA 公司的细胞基因组 DNA 抽提试剂盒提取各孔细胞总 DNA, 测  $D_{260}$  和  $D_{280}$ , 计算 DNA 含量和纯度。根据结果, 将 DNA 稀释为 20 ng/ $\mu$ l, 以 GAPDH 作为内参照, 每个待测样本均做复孔, 将不含 EGFP 模板的 PCR 反应体系设为阴性对照, 分别对 EGFP 和 GAPDH 进行扩增。扩增反应由 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG 试剂盒和 DNA Engine Opticon 2 PCR 仪完成。反应体系和扩增条件与上述相同。

荧光实时 PCR 数据采用比较 Ct 法进行分析, 计算式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组 mRNA Ct 或 DNA Ct} - \text{实验组 GAPDH mRNA Ct 或 DNA Ct}) / (\text{阴性对照组 mRNA Ct 或 DNA Ct} - \text{阴性对照组 GAPDH mRNA Ct 或 DNA Ct})$ , 计算式所得结果表示实验组目的基因 mRNA 或 DNA 表达量对阴性对照组目的基因 mRNA 或 DNA 表达量的比值<sup>[7-8]</sup>。

## 2.1 结果

### 2.1 肿瘤细胞感染后 EGFP 表达的强度及细胞形态变化

MOI 为 10 的 Ad5-CMV-EGFP 单独感染 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 细胞 24 h 后, 倒置荧光显微镜观察到各种肿瘤细胞内均有部分或大部分细胞表达 EGFP 荧光, 但荧光较弱; 48 h 后 EGFP 阳性细胞数量和荧光亮度均有所增加。MOI 为 1 的 Ad5-CMV-EGFP 单独感染上述肿瘤细胞后 24 h 和 48 h, 无论 EGFP 阳性细胞数还是荧光亮度均较 MOI 为 10 时明显降低。感染复数为 1 或 10 的 Ad5-CMV-EGFP 联合应用终质量浓度分别为 0.2、2、20、40、80、100 和 200  $\mu$ g/ml 的依托泊苷感染各种肿瘤细胞后 24 和 48 h, 观察到肿瘤细胞内 EGFP 荧光比单独 Ad5-CMV-EGFP 感染时亮度增加 (图 1)。Ad5-CMV-EGFP 联合 80、100 或 200  $\mu$ g/ml 依托泊苷感染的细胞或仅加入 80、100 或 200  $\mu$ g/ml 依托泊苷的细胞, 在 24 和 48 h 时即可出现细胞死亡, 药物浓度越高细胞死亡越多, 表现为细胞不贴壁, 漂浮于培养液中, 细胞变圆, 细胞膜破裂, 细胞固缩, 呈凋亡征象, 在这些细胞内仍可见 EGFP 荧光表达。而 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合应用 0.2、2、20、40  $\mu$ g/ml 依托泊苷或 0.2、2、20、40  $\mu$ g/ml 依托泊苷单独作用的细胞, 未见明显细胞病变或凋亡。

### 2.2 依托泊苷对 Ad5-CMV-EGFP 在肿瘤细胞内表达的影响

MOI 为 1 或 10 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合不同浓度的依托泊苷感染肿瘤细胞后 24 和 48 h, 收集各孔细胞, 流式细胞仪检测 EGFP 阳性率和平均荧光强度。结果显示: 依托泊苷可以显著提高 Ad5-CMV-EGFP 感染多种肿瘤细胞后 EGFP 的平均荧光强度, 但对 EGFP 阳性率无明显提高或提高幅度较小。以 10 MOI 的 Ad5-CMV-EGFP 联合使用 40  $\mu$ g/ml 依托泊苷为例, 分别感染肿瘤细胞 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 细胞 24 h 后, 细胞内 EGFP 的平均荧光强度依次分别是单独 Ad5-CMV-EGFP 感染时的 3.3、3.5、3.1、6.2、7.0、5.4 和 3.4 倍, 感染 48 h 后分别是 2.7、2.6、2.4、5.1、3.1、4.0 和 2.7 倍 (图 2)。当联合使用的依托泊苷剂量大于 80  $\mu$ g/ml 时, 因活细胞绝对数量的减少导致 EGFP 阳性率反而降低, 但 EGFP 平均荧光强度却是随着联合应用的依托泊苷剂量增大而增加 (图 3)。

### 2.3 依托泊苷对 Ad5-CMV-EGFP 感染肿瘤细胞后 EGFP 蛋白表达的影响

10 MOI 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合为 40  $\mu$ g/ml 的依托泊苷感染 NCI-H460、A549、SGC7901

和 SMMC-7721 细胞后 48 h, Western blotting 检测肿瘤细胞内 EGFP 蛋白表达结果如图 4 所示, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  依托泊苷联合 Ad5-CMV-EGFP 感染肿瘤细胞

NCI-H460、A549、SGC7901 和 SMMC-7721 后, EGFP 蛋白表达量分别增加 1.5、1.8、2.1 和 4.1 倍。

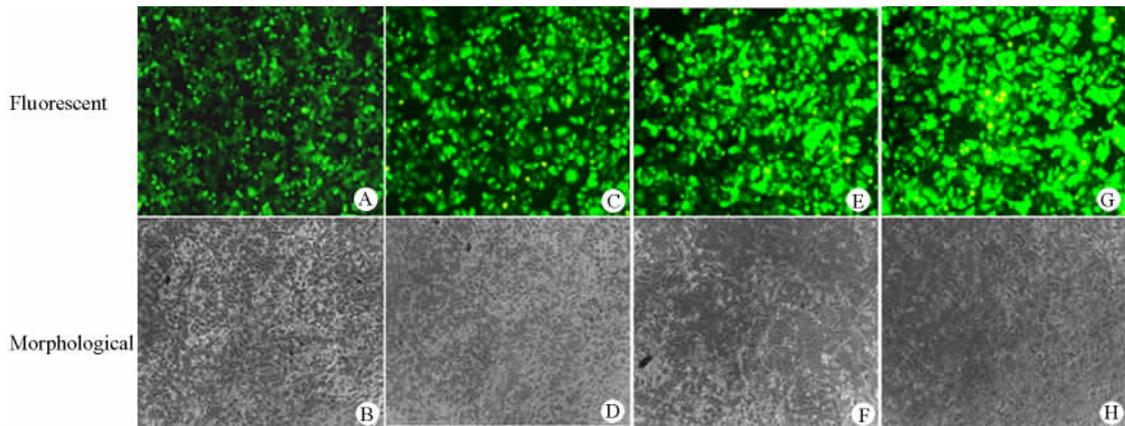


图 1 荧光显微镜观察 NCI-H460 肿瘤细胞中 EGFP 的荧光表达 (  $\times 100$  )

Fig.1 EGFP expression in NCI-H460 tumor cells detected by fluorescent microscope(  $\times 100$  )

A, B: Ad5-CMV-EGFP alone at 48 h after infection in the same visual field; C, D: Ad5-CMV-EGFP combined with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  VP-16 at 48 h after infection; E, F: Ad5-CMV-EGFP combined with 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  VP-16 at 48 h after infection; G, H: Ad5-CMV-EGFP combined with 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  VP-16 at 48 h after infection

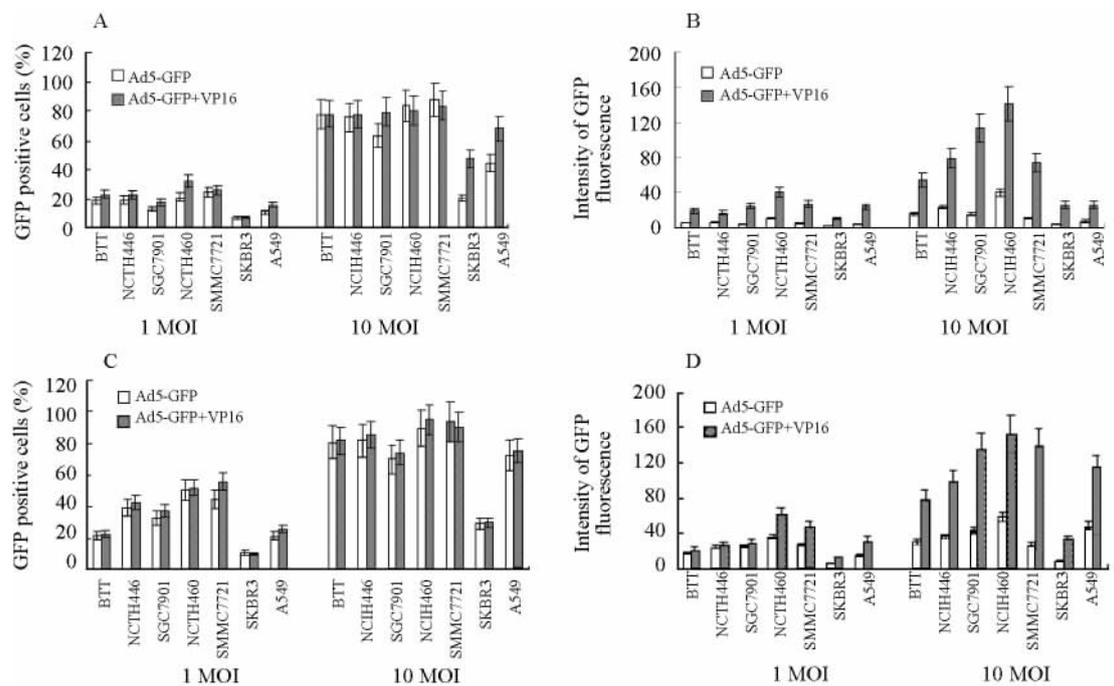


图 2 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合依托泊苷 ( 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) 感染肿瘤细胞后 EGFP 的表达水平

Fig.2 EGFP expression in tumor cells infected by Ad5-CMV-EGFP alone or combined with VP-16 ( 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) at 24 h and 48 h after infection by cytometry

A, B: 24 h; C, D: 48 h

2.4 依托泊苷对 Ad5-CMV-EGFP 感染肿瘤细胞后 EGFP 基因 mRNA 表达的影响

10 MOI 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合 40

$\mu\text{g}/\text{ml}$  依托泊苷感染肿瘤细胞 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 后 24、48 和 72 h, 抽取各种细胞内总 RNA 后经 RT-

PCR 和 Real-time PCR 定量检测 EGFP 基因 mRNA 表达。结果可见,40  $\mu\text{g/ml}$  依托泊苷可以促进肿瘤细胞内外源基因 EGFP mRNA 表达,在感染后 24 h 即可检测到,到感染后 72 h 仍然持续存在(图 5)。

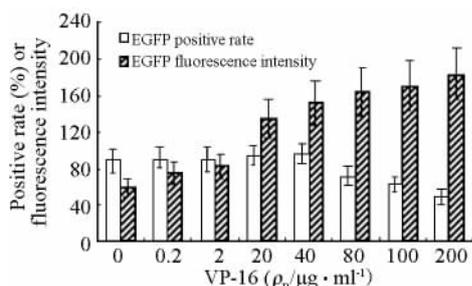


图 3 Ad5-CMV-EGFP 与不同剂量依托泊苷联合作用对肿瘤细胞 EGFP 表达的影响

Fig. 3 Effects of Ad5-CMV-EGFP combined with VP-16 at various dosage at 48 h on EGFP expression in tumor cells

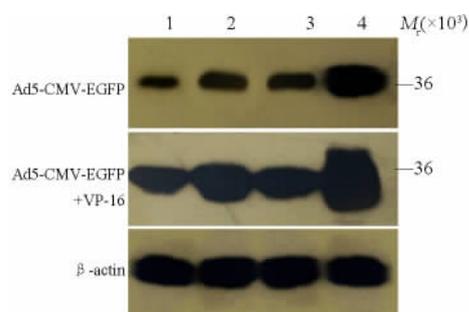


图 4 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合依托泊苷感染肿瘤细胞后 EGFP 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of EGFP protein in tumor cells infected by Ad5-CMV-EGFP alone or combined with VP-16  
1: A549; 2: SMMC7721; 3: SGC7901; 4: NCIH460

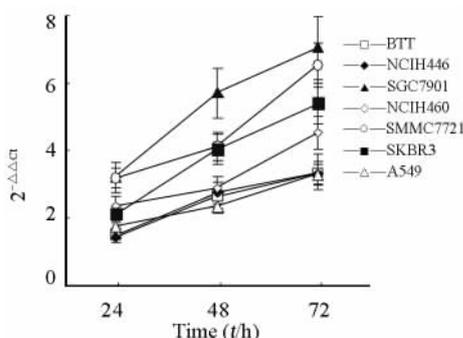


图 5 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合依托泊苷感染肿瘤细胞后 EGFP 基因 mRNA 的表达

Fig. 5 Expression of EGFP mRNA in tumor cells infected by Ad5-CMV-EGFP alone or combined with VP-16

2.5 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合依托泊苷感染肿

瘤细胞后 EGFP 基因的拷贝数

10 MOI 的 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合 40  $\mu\text{g/ml}$  依托泊苷感染肿瘤细胞 NCI-H446、NCI-H460、A549、SMMC-7721、SGC7901、SKBR-3 和 BTT 后 24、48 和 72 h,提取细胞内总 DNA,实时定量荧光 PCR 检测 EGFP 基因拷贝数的变化。结果如图 6, Ad5-CMV-EGFP 单独感染肿瘤细胞与联合 40  $\mu\text{g/ml}$  依托泊苷共同感染相比,在感染后 24、48 和 72 h,外源基因 EGFP 的拷贝数未见发生明显改变。

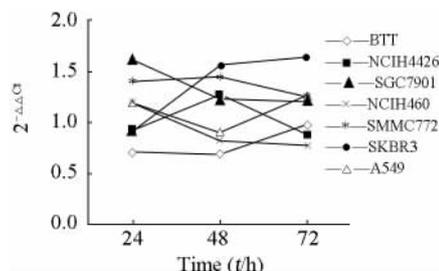


图 6 Ad5-CMV-EGFP 单独或联合依托泊苷感染肿瘤细胞后 EGFP 基因的拷贝数

Fig. 6 DNA copies of EGFP in tumor cells infected by Ad5-CMV-EGFP alone or combined with VP-16

3 讨论

病毒载体在肿瘤基因治疗研究和临床试验中广泛应用<sup>[9-12]</sup>。腺病毒载体具有宿主范围广、感染效率高、可插入外源片段容量大、可介导外源基因短病程高水平表达和无插入突变等特点,因而受到特别的重视<sup>[12-14]</sup>。然而,以腺病毒为载体的肿瘤基因治疗与传统的肿瘤综合疗法是否能够有机地结合起来,安全、有效地提高肿瘤的治疗效果,基因治疗与放疗或化疗之间的相互关系是彼此促进还是相互拮抗,两者的结合对肿瘤的治疗起到协同作用还是消减作用,以及两者相互作用的机理如何,还需要深入研究。You 等<sup>[15]</sup>研究发现 ONYX-015 联合化疗药物后的抗肿瘤作用大于单独应用 ONYX-015,而且作用具有协同性,但作用机制尚不清楚。Fadlo 等<sup>[16]</sup>在 II 期临床试验上证实,在复发的头颈部鳞状细胞癌内注射条件复制型腺病毒 ONYX-015 联合化疗药物顺铂和 5-FU 后,27% 的病人肿瘤完全消退,并不再复发,明显优于单独应用化疗药物或单独应用基因治疗的效果。国内也有研究报道认为以腺病毒为载体的基因治疗与化疗药物结合提高肿瘤治疗效果是由于基因治疗使化疗药物增敏<sup>[5,17-18]</sup>。但国内外对于化疗药物与基因治疗联合应用时化疗药物

对基因治疗的影响的报道极少。本实验中使用携带外源基因 EGFP 的 5 型复制缺陷型腺病毒单独或联合不同剂量的化疗药物依托泊苷(VP16)感染体外培养的多种肿瘤细胞,通过对 EGFP 在肿瘤细胞内表达的分析及 DNA 和 mRNA 的定量检测,探讨依托泊苷对 Ad5-CMV-EGFP 在肿瘤细胞内基因表达的影响。

依托泊苷是临床常用的化疗药,是一种细胞分裂抑制剂,通过抑制 DNA 拓扑异构酶 II,对细胞内 DNA 起作用,间接诱导 DNA 断裂,发挥细胞毒效应<sup>[19]</sup>。为了更好地研究依托泊苷的剂量与病毒载体携带的外源基因在肿瘤细胞内的表达水平是否存在量效关系,本实验将依托泊苷的浓度分为 0.2、2、20、40、80、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  7 种,或者分别单独加入肿瘤细胞中作为对照,或者与 Ad5-CMV-EGFP 联合感染细胞,观察 EGFP 的表达与仅使用 Ad5-CMV-EGFP 时的差异。显微镜观察发现,依托泊苷单独加入肿瘤细胞中,浓度高于 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,肿瘤细胞在 24 h 即出现凋亡,浓度越高作用时间越长细胞凋亡越多。这与王孝养等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。

流式细胞术和 Western blotting 检测结果表明,联合使用的依托泊苷的剂量从最低的 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  到最高的 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,相差 1 000 倍,均能不同程度的提高外源基因 EGFP 在不同肿瘤细胞内的表达水平。从化疗药物提高基因表达水平这一新的药物作用来看,依托泊苷的有效剂量范围是比较大的。不论 Ad5-CMV-EGFP 的感染复数是 1 还是 10,肿瘤细胞中外源基因 EGFP 表达提高的程度都随着联合使用的依托泊苷的增加而增加。相同剂量的依托泊苷联合 Ad5-CMV-EGFP 感染不同的肿瘤细胞,外源基因表达水平提高的程度不尽相同,提示在不同的细胞中,依托泊苷提高 Ad5-CMV-EGFP 基因表达水平的途径和作用机制可能不尽相同。同时,在本实验结果中还发现,依托泊苷对外源基因表达的提高在感染后 24 h 最为显著,例如,与单独使用 Ad5-CMV-EGFP 24 h 相比,联合依托泊苷可以使 EGFP 在 SGC7901 细胞中的表达提高 7.0 倍,而 48 h 后提高的幅度则降为 3 倍。说明依托泊苷可以促进外源基因在肿瘤细胞内短时、高效表达,使治疗基因起效更快更充分。

流式细胞术检测结果还表明,尽管依托泊苷可以显著提高 Ad5-CMV-EGFP 感染多种肿瘤细胞后 EGFP 的平均荧光强度,但对 EGFP 阳性率却无明显提高。甚至当联合应用的依托泊苷剂量大于 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,EGFP 阳性率反而低于 Ad5-CMV-EGFP

单独应用时,这可能是由于高浓度的依托泊苷引起肿瘤细胞特别是被腺病毒转导的细胞死亡,活细胞绝对数量减少造成的。

RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 结果表明,依托泊苷可以提高被 Ad5-CMV-EGFP 感染肿瘤细胞中外源基因 mRNA 的表达,但对 DNA 复制没有明显影响,这提示依托泊苷提高腺病毒载体基因表达水平可能是在转录水平上发挥作用的。

综上所述,本研究在体外实验中研究了化疗药物依托泊苷与 Ad5-CMV-EGFP 联合感染多种肿瘤细胞后,化疗药物对外源基因 EGFP 表达的影响以及可能的作用机制,发现依托泊苷除了具有其基本的杀伤肿瘤细胞的传统功效外,还具有提高外源基因表达效率的作用。本研究结果为进一步研究化疗药物与基因治疗的相互作用关系以及提高肿瘤的治疗效果提供了实验依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ganjavi H, Gee M, Narendran A, *et al.* Adenovirus-mediated p53 gene therapy in pediatric soft-tissue sarcoma cell lines: Sensitization to cisplatin and doxorubicin[ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12( 4 ): 397-406.
- [ 2 ] Raki M, Kanerva A, Ristimaki A, *et al.* Combination of gemcitabine and Ad5/3-D24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus for the treatment of ovarian cancer[ J ]. *Gene Ther*, 2005, 12( 15 ), 1198-1205.
- [ 3 ] Yamaguchi Y, Shiraki K, Fuke H, *et al.* Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 sensitizes hepatocellular carcinoma to TRAIL- and chemotherapeutic agent-induced cell death[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763( 8 ): 844-853.
- [ 5 ] 千新来,赵清正,王 争,等. E1A 基因对肺腺癌细胞化疗敏感性的影响[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7( 2 ): 124-126.
- [ 6 ] 周彩存,徐 瑛,倪 健,等. H101 溶瘤腺病毒联合长春瑞滨/顺铂一线治疗晚期非小细胞肺癌[ J ]. *肿瘤*, 2006, 26( 7 ): 613-617.
- [ 7 ] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29( 9 ): e45.
- [ 8 ] Peirson SN, Butler JN, Foster RG, *et al.* Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31( 14 ): 173-175.
- [ 9 ] Anklesaria P. Gene therapy: A molecular approach to cancer treatment[ J ]. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, 2( 4 ): 426-432.
- [ 10 ] Hendrie PC, Russell DW. Gene targeting with viral vectors[ J ]. *Mol Ther*, 2005, 12( 1 ): 9-17.
- [ 11 ] Liu Y, Deisseroth A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors[ J ]. *Blood*, 2006, 107( 8 ): 3027-3033.
- [ 12 ] Young LS, searle PF, Onion D, *et al.* Viral gene therapy strategies: From basic science to clinical application[ J ]. *J Pathol*, 2006, 208( 2 ): 299-318.

[ 13 ] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors[ J ]. Hum Gene Ther, 2004, 15( 11 ): 1034-1044.

[ 14 ] Kanerva A, Hemminki A. Adenoviruses for treatment of cancer [ J ]. Ann Med, 2005, 37( 1 ): 33-43.

[ 15 ] You L, Yang CT, Jablons DM, *et al.* ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients[ J ]. Cancer Res, 2000, 60( 4 ): 1009-1013.

[ 16 ] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, *et al.* A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[ J ]. Nat Med, 2000, 6( 8 ): 879-885.

[ 17 ] 王朝霞, 陆彬彬, 王 腾, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液( 今又生 ) 对人肺腺癌细胞生长及化疗敏感性研究[ J ]. 中国肺癌杂志, 2006, 9( 2 ): 127-131.

[ 18 ] 梁 云, 陆 斌, 李晓冬, 等. 野生型 p53 基因提高肝癌细胞化疗药物敏感性的实验研究[ J ]. 第二军医大学学报, 2002, 25( 1 ): 24-25.

[ 19 ] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy[ J ]. Nat Rev Cancer, 2002, 2( 3 ): 188-200.

[ 20 ] 王孝养, 张珍祥. 顺铂和依托泊苷下调肺癌细胞端粒酶量及端粒酶逆转录酶的表达[ J ]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16( 1 ): 41-46.

[ 收稿日期 ] 2006 - 11 - 16 [ 修回日期 ] 2006 - 12 - 23

[ 本文编辑 ] 韩 丹

· 简 讯 ·

### 肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知

由中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会及中国抗癌协会生物治疗专业委员会联合主办的“肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议”将于2007年11月在上海市召开。诚邀国内各位专家与同行投稿与参加会议交流,会议期间将邀请肿瘤免疫学、免疫治疗和生物治疗领域的国内外著名专家介绍各领域的新理论、新技术及其应用现状和发展趋势。

#### 征文要求

凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿

本次会议采用网络投稿,请将800~1000字英文或中文摘要(小4字号、1.5倍行间距,A4纸1页)送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所内《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部韩丹(biotherapy2007@126.com,联系电话:021-55620605,传真:021-25074547)。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言。所接受的论文摘要将录入会议文集。

#### 征文主题

(1) 肿瘤生物治疗(含肿瘤免疫学)新理论与新策略;(2) 肿瘤生物治疗的新技术;(3) 肿瘤生物治疗的临床应用与评价;(4) 细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植);(5) 细胞因子治疗;(6) 抗体治疗;(7) 疫苗治疗;(8) 基因治疗;(9) 中药免疫调节治疗;(10) 与常规治疗相结合而组成的新疗法。

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会  
中国抗癌协会生物治疗专业委员会

2007 - 02 - 05

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

### 文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1) 样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2) 标准差用英文小写  $s$ ,不用 SD;(3) 标准误用英文小写  $s_x$ ,不用 SE;(4)  $t$  检验用英文小写  $t$ ;(5)  $F$  检验用英文大写  $F$ ;(6) 卡方检验用希腊小写  $\chi^2$ ;(7) 相关系数用英文小写  $r$ ;(8) 自由度用希腊小写  $\nu$ ;(9) 样本数用英文小写  $n$ ;(10) 概率用英文大写  $P$ ;(11) 以上符号  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $s_x$ 、 $t$ 、 $F$ 、 $\chi^2$ 、 $r$ 、 $\nu$ 、 $n$ 、 $P$  均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)