

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.011

重组人 P53 腺病毒增强肝癌细胞放疗的敏感性

张沁宏¹, 向德兵¹, 卿毅², 仲召阳², 杨志祥², 廖玲², 王东^{2*} (1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科, 重庆 400042; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

[摘要] 目的: 探讨重组人 P53 腺病毒(recombinant human adenovirus P53, rAd-P53)对不同 P53 状态肝癌细胞生长的抑制和放射增敏作用。方法: 以重组人 P53 腺病毒分别感染突变型 P53 肝癌细胞 PLC/PRF/5 和野生型 P53 肝癌细胞 SMMC-7721, Western blotting 检测肝癌细胞 P53 蛋白表达, MTT 法检测细胞存活率, 台酚蓝染色绘制细胞生长曲线。肝癌细胞感染 rAd-P53 48 h 后照射不同剂量的 X 射线, 克隆形成法检测放射增敏比, TUNEL 法检测细胞凋亡。结果: 50 MOI rAd-P53 转染 PLC/PRF/5 和 SMMC-7721 细胞后转染效率分别为 89.37% 和 87.53%, 转染 48 h 可见 P53 蛋白高表达, MTT 法显示细胞存活率分别为 3.41% 和 35.44%, 细胞生长曲线显示感染后第 5 天两种细胞生长抑制率分别为 41.91% 和 17.03% ($P < 0.01$), PLC/PRF/5 细胞的凋亡率[(8.8 ± 1.4)%]显著高于 SMMC-7721 [(4.1 ± 1.1)%] ($P < 0.01$)。应用 20 MOI 的 rAd-P53 转染细胞 48 h 后加 X 射线(4 Gy)照射, PLC/PRF/5 细胞的凋亡率为(26.9 ± 5.6)%, 显著高于 SMMC-7721 细胞凋亡率(16.4 ± 2.9)% ($P < 0.01$); 20 MOI 的 rAd-P53 转染后加照射 PLC/PRF/5 和 SMMC-7721, 细胞的放射增敏比 SER(D_q)值分别为 1.30 和 1.16; SER(D_0)值分别为 1.57 和 1.25。结论: rAd-P53 能显著抑制人肝癌细胞生长、诱导细胞凋亡并提高细胞的放射敏感性, 其对 PLC/PRF/5 细胞作用显著强于 SMMC-7721 细胞; 表明不同内源性 P53 状态的肝癌细胞对 rAd-P53 治疗及其协同的放疗敏感性可能不同。

[关键词] 肝癌; 重组人 P53 腺病毒; 放射治疗; 敏感性; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0458-06

Recombinant human adenovirus P53 enhances radiosensitivity of human hepatocellular carcinoma *in vitro*

ZHANG Qin-hong¹, XIANG De-bing¹, QING Yi², ZHONG Zhao-yang², YANG Zhi-xiang², LIAO Ling², WANG Dong^{2*} (1. Department of Pathology, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Center of Cancer, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of recombinant human adenovirus P53 (rAd-P53) against human hepatocellular carcinoma cell lines with different P53 statuses and its enhancing effect on radiosensitivity. **Methods:** Two human hepatocellular carcinoma cell lines with different P53 genetic statuses, PLC/PRF/5 (MT P53) and SMMC-7721 (WT P53) were infected with recombinant adenovirus carrying wild-type P53 gene (rAd-P53) with increasing multiplicities of infection (MOI). P53 protein expression was detected by Western blotting assay; cell survival was evaluated by MTT; radiosensitivity was evaluated using a clonogenic assay; and cell apoptosis was assayed by TUNEL. **Results:** Infection efficiency of 50 MOI values of rAd-P53 to PLC/PRF/5 and SMMC-7721 cells were 89.37% and 86.53%, respectively. The expression of P53 protein was significantly increased in both cell lines 48 h after infection, and cell survival rates of PLC/PRF/5 and SMMC-7721 cells were 3.41% and 35.44%, respectively. Inhibitory rates of PLC/PRF/5 and SMMC-7721 cells 5 d after infection were 41.91% and 17.03%, respectively. Cells were treated with rAd-P53 at 20 MOI for 48 h and then cells were irradiated (4 Gy); the apoptotic rates in PLC/PRF/5 and SMMC-7721 cells were (26.9 ± 5.6)% and (16.4 ± 2.9), respectively ($P < 0.01$). Clone formation assay showed that rAd-P53 enhanced sensitivity of PLC/PRF/5 and SMMC-7721 cells to radiotherapy, and SER (sensitive enhancement ratio) of D_q were 1.30 and 1.16, respectively, and SER of D_0 were 1.57 and 1.25, respectively. **Conclusion:** rAd-P53 can greatly inhibit proliferation,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30872975)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872975)

[作者简介] 张沁宏(1975-), 男, 四川省新津县人, 硕士, 主治医师, 主要从事肝癌基因治疗的研究, E-mail: zqh941@sohu.com

* Corresponding author. E-mail: Dongwang64@hotmail.com

induce 1 apoptosis and increase radiosensitivity of human hepatocellular carcinoma cells. But the aforesaid efficacy of rAd-P53 in PLC/PRF/5 cells is stronger than in SMMC-7721 cells, which suggests that hepatocellular carcinoma cells with different P53 statuses responds differently to treatment with rAd-P53 or combination of rAd-P53 and irradiation.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; recombinant human adenovirus P53; Radiotherapy; sensitivity; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 458-463]

原发肝细胞性肝癌是我国常见的、预后极差的恶性肿瘤之一,由于其难于早期发现,手术根治切除率低,对多种抗肿瘤药物不敏感,因此放疗已成为肝癌的治疗手段之一。但放疗中遇到了难以解决的问题,如果采用正常组织可耐受的照射剂量进行放疗,肿瘤治愈率很低;但放疗中遇到了难以解决的问题;如果采用杀灭癌组织的放射剂量则常损伤正常肝组织。野生型 P53 基因具有致细胞周期阻滞、凋亡和细胞增殖生长抑制的作用,能够提高肿瘤细胞对放射的敏感性^[1]。本研究采用携带野生型 P53 基因的重组腺病毒 rAd-P53 感染肝癌细胞,观察外源性野生型 P53 基因在肝癌细胞内的表达、诱导凋亡、抑制肿瘤细胞增殖以及提高肿瘤细胞内在放射敏感性的作用,为 P53 基因与放疗结合的临床使用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

重组人 P53 腺病毒(rAd-P53)由深圳市赛百诺基因技术有限公司馈赠,rAd-P53 病毒滴度为 3.0×10^{12} PFU/ml;含加强绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)报告基因的 Ad-EGFP 由本元正阳公司馈赠,本实验中作为对照重组腺病毒载体,病毒滴度为 6.3×10^9 PFU/ml。人肝癌细胞株 SMMC-7721(野生型 P53)、PLC/PRF/5(突变型 P53)购自湘雅细胞库,DMEM 高糖培养基传代培养。TUNEL 原位凋亡试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 重组腺病毒感染肝癌细胞的感染效率检测

对照病毒 Ad-EGFP 构建方式及载体的结构分别与 rAd-P53 完全相同,仅目的基因不同。检测被对照腺病毒感染细胞 EGFP 的表达即可反映 rAd-P53 的感染效率。

SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 两种细胞各自在 6 孔培养板内等量培养到 80% 汇合,细胞计数,吸出培养液,Ad-EGFP 分别以 5、25、50、75 MOI 感染该两种细胞,每一 MOI 值重复 4 孔。5% CO₂ 孵育 2 h 后弃去病毒感染液,换新鲜培养液。继续培养 48 h 后于荧光倒置显微镜下观察 SMMC-7721 细胞 EGFP 表达,并收集细胞,流式细胞术检测 EGFP 阳性细胞

比例。

1.3 MTT 法检测病毒感染滴度与细胞存活的关系

两种细胞各自在 96 孔培养板内等量培养到 80% 汇合,细胞计数,吸出培养液,rAd-P53 和对照腺病毒 Ad-EGFP 分别以 5、25、50、75 MOI 感染单层细胞,并与非感染细胞为对照,每一 MOI 值重复 4 孔。37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h 后弃去病毒感染液,换新鲜培养液。48 h 后每孔加入 0.5% MTT 20 μl,孵育 4 h 后 DMSO 终止反应,酶标仪测定光密度值(D),根据下列公式计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(感染组 D 值/对照组 D 值)×100%

1.4 Western blotting 法检测肝癌细胞中 P53 蛋白表达

以 6 孔培养板等量培养两种细胞,80% 汇合时取 50 MOI 值的 rAd-P53 分别感染两种肝癌细胞,设空白对照。感染 90 min 后,吸出病毒液继续培养。感染后每 24 h 提取 1 次感染组及对照组的总蛋白冻存。5 d 后取各组 75~100 μg 蛋白电泳、转膜、杂交,一抗为鼠抗人 P53 蛋白单克隆抗体。

1.5 台盼蓝染色绘制细胞生长曲线

两种细胞各自在 24 孔培养板内等量培养到 80% 汇合,细胞计数,吸出培养液,以 50 MOI 的 rAd-P53 分别感染两种肝癌细胞,设未感染细胞为对照。每天计数 1 次,每次每组计数 4 孔,到感染后第 5 天为止,绘制生长曲线。细胞计数用台盼蓝+冰醋酸活细胞计数法。

1.6 克隆形成法检测 rAd-P53 联合放射处理后细胞的放射增敏比

以 6 孔培养板等量培养该两种细胞,80% 汇合时取 20 MOI 值的 rAd-P53 或对照腺病毒 Ad-EGFP 分别感染 2 种肝癌细胞 90 min,然后吸弃感染液继续培养 48 h。之后用 0、2、4、6、8、10 Gy 不同剂量的 X 射线照射细胞,照射后立即制成单细胞悬液,根据照射剂量大小分别接种 500、1 000、2 000、10 000、100 000 个细胞于 60 mm 培养皿中,每个剂量点设 3 个平行样品。培养皿细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养 14 d。14 d 后各组细胞用 95% 乙醇固定,Giemsa 染色,>50 个细胞计数为一个存活集落,计算照射细胞克隆形成率和存活分数(surviving frac-

tion, SF)。未照射细胞克隆形成率, 即接种效率 (plating efficiency, PE) 根据以下公式计算:

$$PE = \frac{\text{未照射细胞形成的克隆数}}{\text{接种细胞数}}$$

SF 的计算公式为:

$$SF = \frac{\text{照射后细胞形成的克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times PE$$

根据不同的放疗剂量得到相应的一系列 SF, 再用单击多靶数学模型 (single-hit multitarget model) 求出平均致死剂量 (D_0) 值和准域剂量 (quasithreshold dose, D_q) 值。用 GraphPad Prism 4.0 软件拟合细胞存活曲线, 计算放射增敏比 (sensitive enhancement ratio, SER), $SER(D_0) = \frac{\text{对照 } D_0}{\text{照射后 } D_0}$; $SER(D_q) = \frac{\text{对照 } D_q}{\text{照射后 } D_q}$ 。单击多靶数学模型公式:

$$SF = 1 - (1 - e^{-kD})^N$$

$$SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$$

$$(D_0 = \frac{1}{k})$$

1.7 TUNEL 法检测 rAd-P53 联合放射处理后细胞的凋亡

对数期生长的两种细胞接种于 6 孔板内盖玻片上, 每孔 1×10^5 个细胞。每株细胞随机分为 4 组: Ad-EGFP 组、rAd-P53 组、Ad-EGFP + 放疗 (irradiation, IR) 组、rAd-P53 + IR 组。Ad-EGFP 组、rAd-P53 组予 20 MOI 的相应腺病毒感染 72 h 后, TUNEL 法检测细胞原位凋亡; Ad-EGFP + IR 组、rAd-P53 + IR 组以 20 MOI 的相应腺病毒感染 48 h 后, 予 4 Gy X 线照射细胞, 照射后继续培养 24 h, TUNEL 法检测细胞原位凋亡。

以细胞核呈棕黄色或褐色为凋亡阳性染色。在 400 倍高倍视野下随机选取 5 个视野, 计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例。凋亡指数 (apoptosis index, AI) (%) = (凋亡细胞数/癌细胞总数) \times 100%。

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS 10.0 统计软件处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每组处理前后及多组两两之间的比较用配对 t 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒对肝癌细胞的感染效率

重组腺病毒 Ad-EGFP 感染 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞, 48 h 后于荧光倒置显微镜下观察细胞 EGFP 表达。在蓝色荧光激发下, 可见部分细胞发出强度不等的绿色荧光, 随着 MOI 的增加, 两种细胞发绿色荧光细胞数量及发光强度均逐渐升

高。经流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞显示, Ad-EGFP 为 50 MOI 时 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞的转染效率均已 $>80\%$ (表 1, 图 1)。

表 1 腺病毒感染肝癌细胞 48 h 后 EGFP 阳性细胞的比例 (%)

Tab.1 EGFP positive cells after infection with Ad-EGFP (%) for 48 h

Cell	MOI			
	5	25	50	75
SMMC-7721	14.2 \pm 2.4	36.0 \pm 2.6	87.5 \pm 2.7	93.0 \pm 1.1
PLC/PRF/5	16.0 \pm 4.6	39.3 \pm 7.3	89.4 \pm 2.6	93.4 \pm 1.9

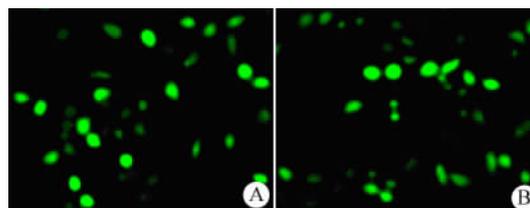


图 1 50 MOI Ad-EGFP 感染肝癌细胞 48 h 后 EGFP 的表达情况 ($\times 200$)

Fig.1 EGFP expression of HCC cells after infection with 50 MOI of Ad-EGFP for 48 h ($\times 200$)

A: SMMC-7721 cells; B: PLC/PRF/5 cells

2.2 病毒感染滴度与肝癌细胞存活的关系

与对照病毒 Ad-EGFP 相比, rAd-P53 对 2 种肝癌细胞有明显抑制作用, 随着 MOI 的增加, 外源性 WT-P53 对细胞的抑制作用逐渐增强。rAd-P53 对这两种不同内源性 P53 功能状态的肝癌细胞影响也不同。当病毒量为 50 MOI 时, PLC/PRF/5 细胞已接近于最大抑制, 细胞存活率为 3.41%; 而 SMMC-7721 细胞在 50 MOI 值时细胞存活率为 35.44% (图 2), 说明含突变型 P53 的 PLC/PRF/5 细胞对 rAd-P53 的敏感性显著高于含野生型 P53 的 SMMC-7721 细胞 ($P < 0.01$)。

2.3 rAd-P53 感染后两种细胞 P53 的表达

Western blotting 法检测显示, 以 50 MOI 剂量 rAd-P53 感染 PLC/PRF/5 细胞和 SMMC-7721 细胞后 24 h, P53 蛋白表达量较正常对照升高, 48 ~ 72 h 表达量最高 (图 3), 到第 5 天则已为弱阳性表达, 第 6 天接近对照组。

2.4 rAd-P53 对肝癌细胞生长的抑制效应

与未感染细胞相比, 50 MOI 的 rAd-P53 感染

后,两种肝癌细胞的生长均受到明显抑制;到第5天时 SMMC-7721 细胞的抑制率[抑制率 = (1 - 感染组活细胞数/对照组活细胞数) × 100%]为 17.03%,而 PLC/PRF/5 细胞的抑制率为 41.91%,提示 rAd-P53 对 PLC/PRF/5 细胞生长抑制作用显著高于 SMMC-7721 细胞($P < 0.01$,图 4)。

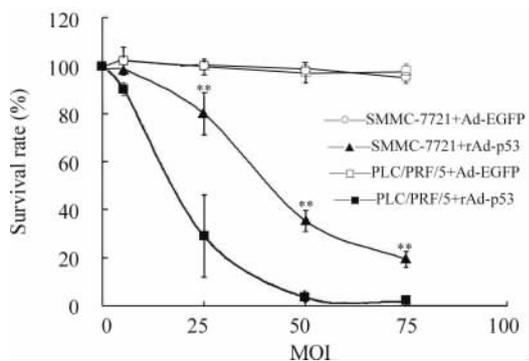


图 2 肝癌细胞感染 rAd-P53 48 h 后的细胞存活率

Fig. 2 Survival rate of HCC cells after infection with rAd-P53 for 48 h

** $P < 0.01$ vs PLC/PRF/5 + rAd-P53



图 3 rAd-P53 感染肝癌细胞后 P53 蛋白的表达情况

Fig. 3 Expression of P53 protein in HCC cells after infected with rAd-P53

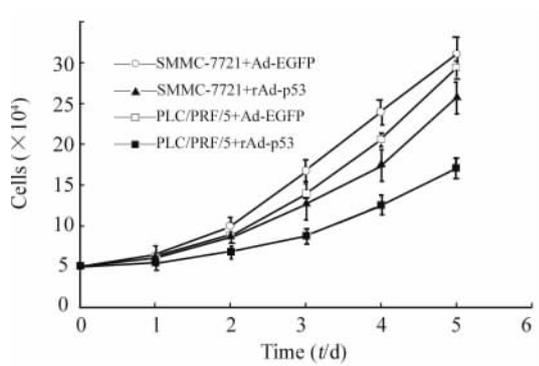


图 4 肝癌细胞感染 rAd-P53(50 MOI)后的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of HCC cells after infection with rAd-P53

2.5 rAd-P53 与放疗联合作用对人肝癌细胞放射敏感性的影响

感染 20 MOI 的 rAd-P53 和对照 Ad-EGFP 腺病

毒的 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞接受 0 ~ 8 Gy 的 X 线照射,培养 14 d 后均可见大小不等的典型细胞克隆。用克隆形成分析法检测细胞增殖和放射敏感性,采用单靶多击数学模型[$SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$],经 GraphPad Prism4.0 软件拟合两种细胞的存活曲线,见图 5A、B(半对数坐标图)。SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞单纯照射组的 D_q 值分别为 2.76、2.98; D_0 值分别为 1.33、1.49。rAd-P53 感染后照射组的 D_q 值分别为 2.38、2.30; D_0 值分别为 1.06、0.95。两种细胞的放射增敏比 $SER(D_q)$ 值分别为 1.16、1.30; $SER(D_0)$ 值分别为 1.25、1.57。提示腺病毒 rAd-P53 能够增加 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞的放射敏感性。

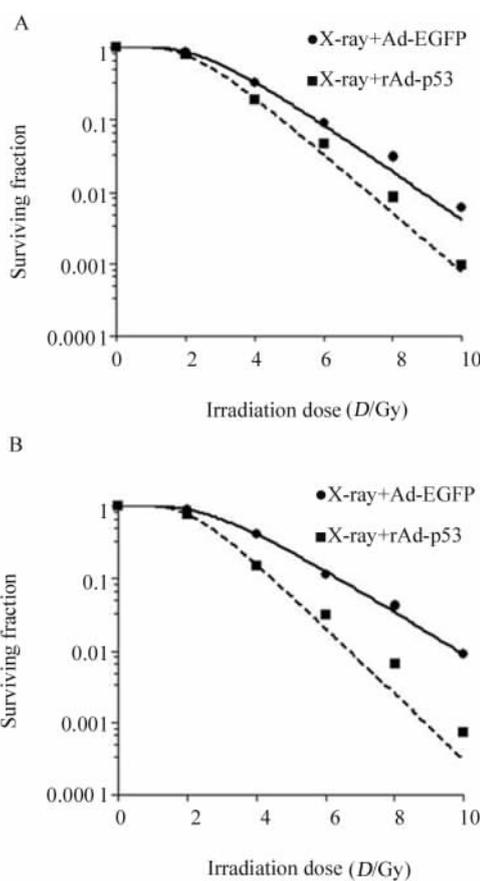


图 5 rAd-P53 联合放疗作用后肝癌细胞的存活曲线

Fig. 5 Survival curve of HCC cells after combined treatment with rAd-P53 and irradiation

A: SMMC-7721 cells; B: PLC/PRF/5 cells

2.6 rAd-P53 联合放疗对肝癌细胞凋亡的影响

检测结果见表 2。以治疗方式分组进行比较: Ad-EGFP 感染组偶见凋亡细胞,而其他 3 组的凋亡细胞都增加,比较均有显著差异(P 均 < 0.01); rAd-P53 + IR 组凋亡细胞增加最明显(图 6),凋亡率显

著高于 Ad-EGFP 组、rAd-P53 组、Ad-EGFP + IR 组 (P 均 < 0.01)。相同的治疗方式对两种细胞的凋亡影响比较发现:Ad-EGFP 联合放疗对两种细胞的凋亡影响无差别 ($P > 0.05$),单纯性 rAd-P53 感染和 rAd-P53 联合放疗对 PLC/PRF/5 细胞的凋亡影响都明显高于 SMMC-7721 细胞 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

表 2 rAd-P53 联合放疗对肝癌细胞凋亡的影响(%)

Tab.2 Apoptotic rate of HCC cells after combined treatment with rAd-P53 and irradiation(%)

Group	Ad-EGFP	rAd-P53	Ad-EGFP + IR	rAd-P53 + IR
SMMC-7721	2.1 ± 0.3	4.1 ± 1.1	8.0 ± 1.2	16.4 ± 2.9 ^{△△}
PLC/PRF/5	3.1 ± 1.3	8.9 ± 1.4 [*]	6.8 ± 0.6	26.9 ± 5.6 ^{**△△}

^{△△} $P < 0.01$ vs rAd-P53 or Ad-EGFP + IR or Ad-EGFP; ^{*} $P < 0.05$,

^{**} $P < 0.01$ vs SMMC-7721 group

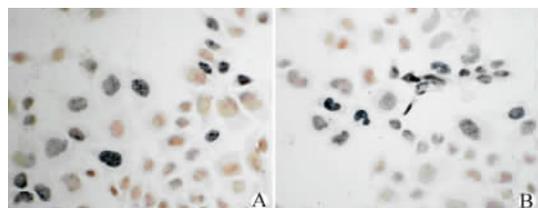


图 6 rAd-P53 联合放疗诱导肝癌细胞的凋亡(×200)

Fig.6 Apoptosis of HCC cells after combined treatment with rAd-P53 and irradiation (×200)

A: SMMC-7721 cells; B: PLC/PRF/5 cells

3 讨论

野生型基因 *P53* 在维持细胞生长、抑制恶性繁殖中起重要作用。当细胞基因组 DNA 遭受损害, wt-*P53* 将参与 DNA 的修复;如果修复失败, wt-*P53* 又能启动细胞程序性死亡过程,诱导细胞凋亡。大量研究^[2-4]表明,利用重组腺病毒将外源性 wt-*P53* 基因转入肿瘤细胞内能增强肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长。Reiser 等^[5]报道肝癌细胞感染 Ad-*P53* 后,*P53* 蛋白在细胞核内表达,并伴有 *p21* 基因和 *Bax* 基因表达增强, *CD95* 基因表达上调,可能是 Ad-*P53* 感染使细胞周期阻滞和诱导凋亡的机制。然而研究也发现,转染外源性 wt-*P53* 对同一组织学起源的不同类型肿瘤细胞的抑制作用并不一致,这可能与肿瘤细胞的内源性 *P53* 功能状态不同有关。郭英等^[6]的研究发现,外源性野生型 *P53* 基因对具

有不同内源性 *P53* 功能状态肝癌细胞生长的影响是不同的,Ad-*P53* 对 *P53* 野生型 Bel-7402 和突变型 PLC/PRF/5 细胞株的生长均有明显的抑制效应,但对后者的抑制作用更敏感;对 PLC/PRF/5 的抑制作用表现为既可诱导凋亡,又可诱导细胞周期阻滞;而对 Bel-7402 细胞的抑制作用主要表现为诱导细胞周期阻滞;但在 *P53* 野生型 QGY-7701 细胞,即使使用超量的 Ad-*P53*,其生长亦未受明显影响。张珊文等^[7]的研究也发现:Ad-*P53* 感染 4 种不同内源性 *P53* 功能状态的胃癌细胞都出现细胞的杀伤作用,但以含突变型 *P53* 基因的胃癌细胞作用最明显。为比较 rAd-*P53* 对不同内源性 *P53* 功能状态的肝癌细胞生长抑制及放疗增敏效应有无差异,本研究选用了 SMMC-7721 细胞(野生型 *P53*)和 PLC/PRF/5 细胞(突变型 *P53*)^[8]为研究对象,研究发现,50 MOI 的 rAd-*P53* 对两种不同 *P53* 基因型细胞株的生长均有明显的抑制效应,能显著提高细胞凋亡率,转染 rAd-*P53* 可提高细胞内 *P53* 蛋白的表达;而且还发现,在细胞存活实验中,rAd-*P53* 在 50 MOI 时 PLC/PRF/5 细胞存活率(3.41%)与 SMMC-7721 细胞存活率(35.44%)比较有显著差异 ($P < 0.01$);细胞凋亡实验中,rAd-*P53* 感染后 PLC/PRF/5 细胞的细胞凋亡率也较 SMMC-7721 细胞高 ($P < 0.01$);在生长抑制实验中,感染腺病毒后第 5 天 PLC/PRF/5 的细胞抑制率(41.91%)也显著高于 SMMC-7721 细胞抑制率(17.03%, $P < 0.01$)。以上结果均提示 rAd-*P53* 对 PLC/PRF/5 细胞的生长抑制作用显著高于 SMMC-7721 细胞。因此本研究认为,rAd-*P53* 对内源性 *P53* 基因为突变型的肝癌细胞的治疗作用强于对野生型 *P53* 基因的肝癌细胞的作用。

放射治疗是恶性肿瘤综合治疗的主要方法之一,肝脏一度被看作是放射抗拒器官,肝癌可能不用于放射治疗。然而,现代基础与临床研究的结果认为肝癌细胞并不是抗拒射线的^[9],无论是单纯放疗、辅助放疗还是对晚期肿瘤的姑息性放疗,都有一定疗效。但是肝癌放射治疗的效果并不令人满意,与其他放疗敏感的肿瘤相比,肝癌仍然属于放射抵抗的肿瘤。放射线治疗的主要作用是产生细胞损伤导致肿瘤细胞周期阻滞并诱导细胞凋亡。野生型 *P53* 基因在放疗引起 DNA 损伤与凋亡的平衡过程中起“微调”作用。放疗引起 DNA 损伤时,*P53* 的 N 末端会因磷酸化而影响其与 DNA 和 HDM2 结合的能力,从而 *P53* 发挥其功能,通过对靶基因的调控引起细胞周期的停滞及肿瘤细胞凋亡^[10-11]。研究^[12]发现 *P53* 基因突变不仅失去这种功能,还可使

细胞对放疗的敏感性降低。由于 50 MOI rAd-P53 感染 PLC/PRF/5 后的细胞存活率仅 3.41%, 因此本实验在联合放疗实验中选用了 20 MOI 的 rAd-P53 感染细胞, 以利于检测放疗增敏效应。结果证实: 不同 P53 基因型的细胞株转染 20 MOI 的 rAd-P53 后联合 4 Gy 的 X 射线照射均增加了肿瘤细胞凋亡 ($P < 0.01$), SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞的放射增敏比 $SER(D_q)$ 值分别为 1.16、1.30; $SER(D_0)$ 值分别为 1.25、1.57, 说明 rAd-P53 对两种肝癌细胞能产生放疗增效作用。实验发现, 不仅 PLC/PRF/5 细胞的放射增敏比 $SER(D_q)$ 和 $SER(D_0)$ 值均高于 SMMC-7721, 而且 rAd-P53 联合放疗所致 PLC/PRF/5 细胞的凋亡也显著高于 SMMC-7721 ($P < 0.01$), 该结果提示 rAd-P53 对 PLC/PRF/5 细胞的放疗增敏作用强于对 SMMC-7721 的作用。研究^[13]发现 P53 介导的信号系统是一个复杂的网络系统, 本实验中自然生长的 SMMC-7721 和 PLC/PRF/5 细胞虽然内源性 P53 功能状态不同, 但细胞凋亡率(分别为 2.13%、3.06%)并无差异, 因此推测 rAd-P53 对不同内源性 P53 功能肝癌细胞的放疗增敏效果不同可能是由于肿瘤细胞内部 P53 介导的信号系统存在差异所致。

来自体内外的多项转导实验证实腺病毒介导的 wt-P53 导入并表达抑制了多种肿瘤细胞的表型改变, 并增强了肿瘤放化疗的细胞毒性; 初步的动物实验和临床试验结果也表明, wt-P53 的转导能使放射抗拒的肿瘤诱导出放射敏感性^[14]。本研究也证实了在体外通过导入野生型 P53 能够重建肝癌细胞内变异的 P53 功能, 并可以增强肝癌细胞的放疗敏感性; 而且还发现 rAd-P53 对内源性 P53 基因呈突变型的肝癌细胞的治疗及放疗增敏作用强于对野生型 P53 基因肝癌细胞的作用。本研究结果为基因转导疗法联合放疗作为肝癌的新治疗方案提供了初步依据。

[参 考 文 献]

[1] Ohnishi T, Takahashi A, Mori E, *et al.* P53 targeting can enhance cancer therapy via radiation, heat and anti-cancer agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(5): 564-570.

- [2] 张沁宏, 王东, 牟江洪, 等. 重组腺病毒介导的 P53 基因对肝癌细胞生长抑制作用的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(2): 121-124.
- [3] Hoshino I, Matsubara H, Akutsu Y, *et al.* Role of histone deacetylase inhibitor in adenovirus-mediated P53 gene therapy in esophageal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2A): 665-671.
- [4] Oshima Y, Sasaki Y, Negishi H, *et al.* Antitumor effect of adenovirus-mediated P53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(7): Epub ahead of print
- [5] Reiser M, Neumann I, Schmiegel W, *et al.* Induction of cell proliferation arrest and apoptosis in hepatoma cells through adenoviral-mediated transfer of P53 gene[J]. *J Hepatol*. 2000, 32(5): 771-782.
- [6] 郭英, 王坤, 陈积圣. 野生型 P53 基因对不同内源性 P53 状态的肝癌细胞生长的影响[J]. *中华普通外科杂志*, 2001, 16(12): 722-724.
- [7] 张珊文, 肖绍文, 杨敬贤. 腺病毒介导 P53 基因转染增加人胃癌细胞的放射敏感性[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24(4): 308-311.
- [8] Puisieux A, Galvin K, Troalen F, *et al.* Retinoblastoma and P53 tumor suppressor genes in human hepatoma cell lines[J]. *FASEB J*, 1993, 7(14): 1407-1413.
- [9] Zeng ZC, Jiang GL, Wang GM, *et al.* DNA-PKcs subunits in radiosensitization by hyperthermia on hepatocellular carcinoma hepG2 cell line[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(5): 797-803.
- [10] Jazayeri A, Falck J, Lukas C, *et al.* ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1): 37-45.
- [11] Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, *et al.* p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 50157-50166.
- [12] Schwartz JL, Rasey J, Wiens L, *et al.* Functional inactivation of P53 by HPV-E6 transformation is associated with a reduced expression of radiation-induced potentially lethal damage[J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(3): 285-291.
- [13] Horhat RF, Mihalas GI, Neamtu M. The P53 network modeling-current state and future prospects [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2008, 136: 561-566.
- [14] Roth JA, Grammer SF, Swisher SG, *et al.* Gene replacement strategies for treating non-small cell lung cancer[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2000, 10(4): 333-342.

[收稿日期] 2008-07-20

[修回日期] 2008-08-26

[本文编辑] 郁晓路