

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.012

## E1A 抑制鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长并增强其对放疗的敏感性

肖华平<sup>1</sup>,周蓉蓉<sup>2\*</sup>,廖遇平<sup>1</sup>(1. 福建医科大学 附属第二医院 放疗科,福建 泉州 362000; 2. 中南大学 湘雅医院 肿瘤科,湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的:探讨 E1A 基因对人鼻咽癌 CNE2 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用和对放疗的增敏作用及其相关机制。方法:以腺病毒为载体,将 E1A 基因导入 CNE2 细胞,获得含 E1A 的阳性克隆。通过裸鼠致瘤实验,观察 E1A 基因的抑瘤作用。观察 E1A 基因疗法及其与放疗联合应用对 CNE2 细胞裸鼠移植瘤的疗效。RT-PCR 法检测 E1A 基因治疗对 P53 基因表达的影响。结果:建立稳定转染 Ad-E1A 的 CNE2 阳性细胞克隆(CNE2-Ad-E1A),CNE2-Ad-E1A 组小鼠细胞移植瘤较 CNE2 组和 CNE2-Ad-β-gal 组(稳定转染 Ad-β-gal 对照质粒的 CNE2 细胞)成瘤时间晚、肿瘤小。单纯放疗、单纯 Ad-E1A 基因治疗及 Ad-E1A + 放疗 3 种治疗方法均可抑制 CNE2 裸鼠移植瘤的生长,抑瘤率分别为(60.32 ± 5.34)%、(70.53 ± 6.12)%和(97.15 ± 4.87)%。E1A 基因治疗能上调鼻咽癌组织中 P53 的表达。结论:E1A 可抑制人鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长并增加其对放疗的敏感性,该作用可能与 E1A 上调 P53 基因的表达有关。

[关键词] E1A 基因;鼻咽肿瘤,P53;放射治疗

[中图分类号] R739.63;R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0614-05

## E1A inhibits growth and increases radiosensitivity of tumors in nude mice implanted with nasopharyngeal carcinoma cells

XIAO Hua-ping<sup>1</sup>, ZHOU Rong-rong<sup>2\*</sup>, LIAO Yu-ping<sup>1</sup>(1. Department of Radiotherapy, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China; 2. Department of Oncology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of E1A gene on the growth of tumors in nude mice implanted with nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells and its promotion effect on the radiosensitivity of CNE2-implanted tumors, and to investigate the related mechanism. **Methods:** E1A gene was transfected into CNE2 cells using adenovirus system, and stable E1A positive clones were established. The inhibitory effect of E1A on tumor formation-ability of CNE2 cells was observed in nude mice. The efficacy of E1A gene therapy with or without radiotherapy against CNE2 cell-implanted tumors was evaluated. The effect of E1A gene therapy on the expression of P53 was detected by RT-PCR. **Results:** CNE2 cells stably transfected with E1A gene (CNE2-Ad-E1A) were successfully established. The tumor formation time was later and tumor size was smaller in CNE2-Ad-E1A cell-implanted mice compared with those in CNE2 cell- and CNE2-Ad-β-gal cell-implanted mice (CNE2 cells stably transfected with Ad-β-gal). Radiotherapy, E1A gene therapy and E1A gene + radiotherapy all suppressed the growth of implanted tumors, with the tumor suppression rates being (60.32 ± 5.34)%, (70.53 ± 6.12)%, and (97.15 ± 4.87)%, respectively. E1A gene therapy significantly increased the expression of P53 gene in tumor tissues. **Conclusion:** E1A can inhibit the growth of tumors in mice implanted with nasopharyngeal carcinoma cells, and enhance its sensitivity to radiotherapy, which may be related to the increased expression of P53 gene in tumor tissues.

[Key words] E1A gene; nasopharyngeal neoplasms; P53 gene; radiotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 614-618]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国常见恶性肿瘤之一,由于解剖位置的特殊性及其对射线较为敏感的特点,目前国内外对其均采取放射治疗为主的综合治疗模式。放疗后局部复发和转移是患者死亡的重要原因,且肿瘤细胞对再次放疗的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30400118)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30400118)

[作者简介] 肖华平(1980-),男,湖南省郴州市人,硕士,住院医师,主要从事头颈肿瘤放疗、化疗临床与基础方面的研究

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: RRzhou99@yahoo.com

敏感性明显下降;加大放射剂量虽可提高治疗效果,但对周围正常组织的损害增大,并会带来严重的不良反应,甚至超过肿瘤本身对机体的伤害。因此,研究如何增强鼻咽癌对放疗的敏感性,以提高鼻咽癌的放疗效果具有重要的临床意义。

肿瘤的发生、发展是多因素、多阶段、多基因共同作用的结果。为此,很多学者认为肿瘤治疗效果的进一步提高可能依赖于新兴的生物治疗。近年来研究发现,5型腺病毒 *E1A* 基因作为一个具有抑制肿瘤作用的基因,在肿瘤细胞的基因调控、肿瘤的发生发展等方面具有重要的作用<sup>[1-3]</sup>。本研究以腺病毒 *E1A*(adenovirus-E1A, Ad-E1A)感染鼻咽癌细胞系,观察 *E1A* 基因对人鼻咽癌细胞裸鼠体内移植瘤生长的抑制作用,并观察 *E1A* 基因疗法联合放疗对鼻咽癌移植瘤的疗效。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及腺病毒载体

人鼻咽癌细胞系 CNE-2 购自中山大学细胞培养中心,用含 10% 新生牛血清的 1640 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。Adenovirus-E1A(Ad-E1A)和对照空载体 Adenovirus- $\beta$ -galactosidase(Ad- $\beta$ -gal)以及腺病毒载体包装细胞 293 细胞均由美国德州大学的 Zhichao Zhou 博士友情提供。293 细胞在直径为 100 mm<sup>2</sup> 的培养皿中培养后,每皿加入 20  $\mu$ l 滴度为 10<sup>9</sup> pfu 的 Ad-E1A 或 Ad- $\beta$ -gal,培养约 24 h,然后离心收集细胞,加入 PBS 反复冻融后,氯化铯密度梯度超高速离心收集病毒上清,纤维素酯膜透析后,噬斑分析法(plaque assay method)测定病毒滴定,病毒置 -80 °C 中保存。

### 1.2 Ad-E1A 转染后的阳性细胞克隆的鉴定

RT-PCR 检测 Ad-E1A 转染后 CNE-2 细胞中 *E1A* 的表达:细胞总 RNA 的提取按 TRIzol 试剂盒说明书,cDNA 第一条链的合成按 Gibco 公司说明书,将制备好的 cDNA 及相应引物制成反应混合物。*E1A* 基因的引物为:引物 1:5'-CGGGATCCCCAC-CATGAGACATATTATCTGCCACG-3';引物 2:5'-CGGAATTCTTACTCGAGGTCAATCCCTTCCTGCACC-3'。反应条件为:94 °C 5 min,94 °C 变性 50 s $\rightarrow$ 59 °C 退火 45 s $\rightarrow$ 72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。反应产物大小为 260 bp<sup>[4]</sup>,将得到的扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.3 成瘤实验观察 Ad-E1A 对 CNE-2 细胞成瘤的影响

4 周龄裸鼠(BALB/c, nu/nu, 动物合格证号:湘

动字 98012)由中南大学动物学部提供,随机分为 3 组,每组 5 只,分别右前肢腋部皮下接种 2.0  $\times$  10<sup>6</sup> 的 CNE2、CNE2-Ad- $\beta$ -gal(稳定转染 Ad- $\beta$ -gal 对照质粒的 CNE2 细胞)和 CNE2-Ad-E1A 细胞(稳定转染 Ad-E1A 质粒的 CNE2 细胞),观察肿瘤形成时间和肿瘤体积。肿瘤体积  $V_T = 1/2 \times$  长径  $\times$  短径<sup>2</sup>。接种后 21 d 处死裸鼠解剖肿瘤,称重。

### 1.4 Ad-E1A 联合放疗对 CNE2 移植瘤的治疗实验

取 20 只 4 周龄裸鼠,每只于右前肢腋部皮下接种 2.0  $\times$  10<sup>6</sup> CNE2 细胞,接种 7 d 后当肿瘤直径长至 1.0 ~ 1.2 cm 时,随机分为 4 组,命名为:Ad- $\beta$ -gal 对照组、Ad-E1A 组、放疗组、Ad-E1A + 放疗组。分别在肿瘤及肿瘤周围多点注射 5  $\times$  10<sup>9</sup> pfu/50  $\mu$ l 的 Ad-E1A 或 Ad- $\beta$ -gal,2 次/周。放疗组和联合组给予 6 MV 的 X 线、2 Gy/d 的放疗,连续 1 周,总剂量为 10 Gy。开始治疗后,每间隔 72 h 测量并计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。荷瘤后 24 d 后处死裸鼠,剥离肿瘤,计算抑瘤率。

### 1.5 RT-PCR 检测移植瘤组织中 P53 mRNA 的表达

剥离各治疗组肿瘤,10% 甲醛固定后,取 100 mg 肿瘤组织,按 TRIzol 试剂盒说明书提取组织总 RNA。反转录为 cDNA,然后扩增 P53 基因,P53 的引物为:上游:5'-TTCCTCTTCCTGCAGTACTC-3';下游:5'-GCAAATTCCTTCCACTCGG-3'。PCR 反应条件为:94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,30 个循环后 72 °C 延伸 10 min。反应产物大小为 214 bp<sup>[5]</sup>,扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.6 统计学处理

用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ad-E1A 转染后 CNE2 细胞中 *E1A* 基因的表达

Ad-E1A 转染鼻咽癌 CNE2 细胞后,RT-PCR 法检测 *E1A* 基因的表达,Ad-E1A 组可以观察到 *E1A* mRNA 的表达,而 CNE2 对照组和 CNE2-Ad- $\beta$ -gal 对照组的细胞中无 *E1A* mRNA 的表达(图 1)。

### 2.2 *E1A* 基因对 CNE2 细胞成瘤的抑制作用

人鼻咽癌 CNE2 细胞与稳定转染 Ad- $\beta$ -gal 的 CNE2 细胞(CNE2-Ad- $\beta$ -gal)在成瘤时间、肿瘤体积和生长速度上无明显差异;与 CNE2-Ad- $\beta$ -gal 组比较,接种 CNE2-Ad-E1A 细胞组小鼠成瘤时间晚,而且肿瘤生长速度明显减慢(图 2)。CNE2-Ad- $\beta$ -gal 组接种后 21 d 肿瘤平均体积为(131.5  $\pm$  18.2)

mm<sup>3</sup>, 平均瘤重为(339.8 ± 25.7)mg; CNE2-Ad-E1A 组肿瘤平均体积为(38.7 ± 9.43)mm<sup>3</sup>, 平均瘤重为(101.3 ± 17.5)mg(表 1), 表明 E1A 基因可抑制 CNE2 细胞成瘤及裸鼠移植瘤的生长。

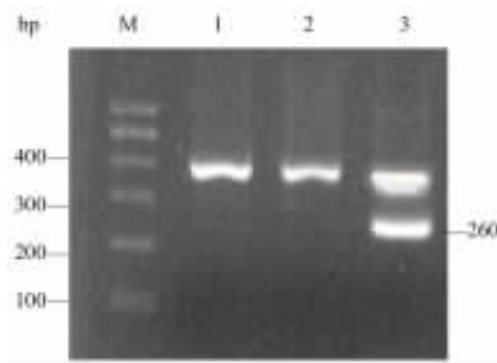


图 1 RT-PCR 法检测 Ad-E1A 转染后 CNE2 细胞中 E1A 基因的表达

Fig. 1 E1A gene expression in CNE2 cells transfected with Ad-E1A as detected by RT-PCR

M: Marker; 1: CNE2 cells; 2: CNE2-Ad-β-gal cells; 3: CNE2-Ad-E1A cells

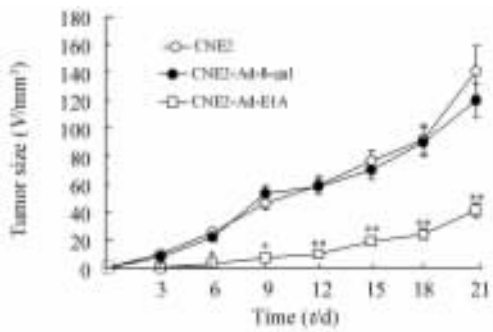


图 2 CNE2、CNE2-Ad-β-gal 和 CNE2-Ad-E1A 细胞荷瘤小鼠肿瘤生长曲线

Fig. 2 Tumor growth curves of CNE2, CNE2-Ad-β-gal, and CNE2-Ad-E1A cell-implanted mice

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs CNE2 or CNE2-Ad-β-gal

表 1 CNE2、CNE2-Ad-β-gal 和 CNE2-Ad-E1A 细胞荷瘤小鼠平均成瘤时间、肿瘤体积和瘤重 (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Tumor formation times, tumor sizes, and tumor weights of CNE2, CNE2-Ad-β-gal, and CNE2-Ad-E1A cell-implanted mice (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Time (t/d)	Tumor size (V/mm <sup>3</sup> )	Tumor weight (m/mg)
CNE2	3.8 ± 1.8**	149.8 ± 17.9*	357.5 ± 21.3**
CNE2-Ad-β-gal	4.1 ± 1.6*	131.5 ± 18.2*	339.8 ± 25.7*
CNE2-Ad-E1A	11.5 ± 1.1	38.7 ± 9.43	101.3 ± 17.5

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs CNE2-Ad-E1A

### 2.3 E1A 基因治疗增强 CNE2 移植瘤对放疗的敏感性

放疗、E1A 基因治疗、E1A 基因治疗 + 放疗这 3 种治疗方法均可抑制 CNE2 小鼠移植瘤的生长, 3 种治疗方法的抑瘤率分别为: (60.32 ± 5.34)%、(70.53 ± 6.12)% 和 (97.15 ± 4.87)%。E1A 基因治疗组对 CNE2 肿瘤的抑制率高于单纯放疗组, 而 E1A 基因 + 放疗组对肿瘤的抑制率明显高于单纯放疗组或 E1A 基因治疗组(图 3)。值得注意的是: E1A 基因 + 放疗组有 1 只裸鼠的肿瘤完全消退, 直至实验结束仍未有可见的肿瘤。

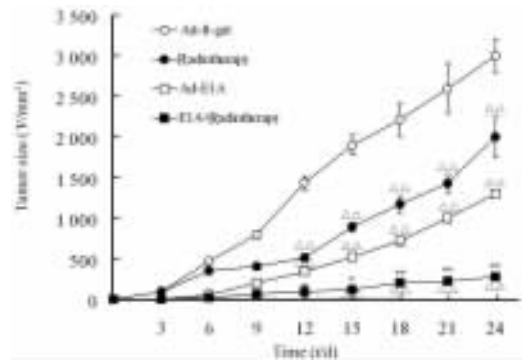


图 3 不同治疗方法对 CNE2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of different treatments on growth of CNE2 cell-implanted tumors in nude mice

△△ P < 0.01 vs Ad-β-gal; \* P < 0.05,

\*\* P < 0.01 vs radiotherapy or CNE2-Ad-β-gal

### 2.4 E1A 基因治疗上调移植瘤组织中 P53 基因的表达

RT-PCR 检测 E1A 基因治疗后移植瘤组织中 P53 基因的表达, 结果显示(图 4): Ad-β-gal 对照组、单纯放疗组小鼠肿瘤组织中的 P53 的表达水平均较低, Ad-E1A 治疗组以及 Ad-E1A + 放疗组小鼠肿瘤组织中的 P53 表达水平明显升高。说明 E1A 基因以腺病毒为载体转染到体内低表达 P53 的肿瘤后, 可提高肿瘤组织中 P53 的表达水平。

## 3 讨论

人类腺病毒 5 型 E1A 基因, 作为具有抑制肿瘤作用的基因, 在肿瘤细胞的基因调控、肿瘤的发生、发展中起到独特而重要的作用。E1A 基因转录后经过不同的拼接产生 12S 和 13S 两种 mRNA, 分别翻译 243R 和 289R 两种主要的转录调控蛋白<sup>[6]</sup>。E1A-289R 共有 3 个功能区, 即 N 末端 CR1、CR2、CR3 区。E1A-243R 无 CR3 区外, 但其他与 E1A-

289R 相同。N-末端的 CR1 区通过与转录因子 p300/CBP 结合,抑制 *HER22/neu* 基因的表达;CR2 区与 Rb 蛋白家族结合;CR3 区是转录活化区<sup>[7]</sup>。*E1A* 基因可以作用于多种癌基因和抑癌基因,如调控 *P53*<sup>[8]</sup>、*HER-2/neu*<sup>[7]</sup>、*Rb* 和 *nm23*<sup>[9]</sup> 等癌基因和抑癌基因,并且 *E1A* 基因的作用不依赖肿瘤细胞的基因状态<sup>[10]</sup>,这使得 *E1A* 基因治疗较其他以单一癌基因或抑癌基因为靶基因的基因治疗(如 *P53* 基因)具有更好的应用前景。Yoo 等<sup>[11]</sup>用 *E1A* 基因治疗 7 例不可切除的和复发的头颈癌患者,以 4 组不同的剂量(15、30、60 和 120  $\mu\text{g DNA/cm}^3$  肿瘤)进行瘤体注射,未发现明显的毒性作用。评估的 6 例患者中,4 例肿瘤得到控制,1 例部分缩小,1 例有较小的改变。Kim 等<sup>[12]</sup>用 E1B 缺失的 5 型腺病毒(ON-YX-015),对复发的、放化疗难以控制的 21 例头颈癌患者进行 II 期临床试验,每天肿瘤内注射 ONYX-015( $10^{10}$  pfu),连续 5 d,每 3 周重复治疗 1 次。13 例患者中 2 例肿瘤缩小 50% 以上,2 例完全消退,5 例肿瘤稳定 6~12 周,3 例症状(咬颌和语言)得到改善,1 例治疗后无改变。周蓉蓉等<sup>[13]</sup>亦报道了运用 Ad-E1A 转染人鼻咽癌细胞后 *E1A* 基因对鼻咽癌细胞有放疗增敏作用。以上结果均表明 *E1A* 基因对头颈部肿瘤的治疗是有效的。

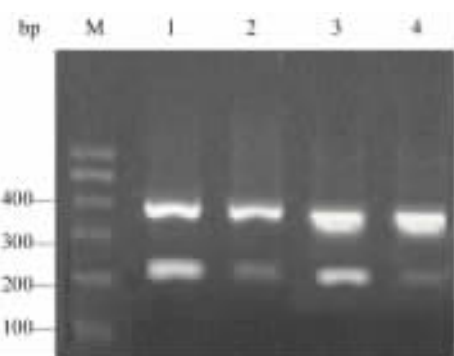


图 4 *E1A* 基因治疗上调移植瘤组织中 *P53* 的表达

Fig. 4 *E1A* gene therapy increased *P53* expression in implanted tumor tissues

M: Maker; 1: Ad-E1A therapy; 2: Ad- $\beta$ -gal therapy; 3: Ad-E1A + radiotherapy; 4: Radiotherapy

本研究前期实验结果显示:体外转染 *E1A* 基因后可使肿瘤细胞生长明显减慢,并对多种作用机理不同的化疗药物及射线有显著的增敏作用<sup>[14-15]</sup>。本研究体内实验结果显示:CNE2-Ad-E1A 细胞接种裸鼠后,成瘤时间延长,平均为 11.5 d,明显长于 CNE2 细胞和 CNE2-Ad- $\beta$ -gal 细胞组小鼠的平均成瘤时间(分别为 3.8 d 和 4.1 d),且 CNE2-Ad-E1A

细胞接种小鼠形成的肿瘤较 CNE-2 组和 CNE2-Ad- $\beta$ -gal 组的肿瘤生长慢、体积小、重量轻。在 *E1A* 基因治疗荷瘤裸鼠实验中,放疗联合 *E1A* 基因治疗对肿瘤的抑制显著大于单纯放疗组和单纯 *E1A* 治疗组,联合治疗使肿瘤生长减慢、肿瘤体积减小,说明在体内 *E1A* 基因能够有效抑制肿瘤的生长,并且能够增加对肿瘤细胞对放疗的敏感性。

目前认为基因治疗对放疗增敏的机制有:(1)通过改变细胞内某些基因的活性。如抑制 *erbB2*、*VEGF*、*VEGFR* 等基因的表达,促进野生型 *P53* 基因的表达。(2)通过阻断 NF- $\kappa$ B 的活性。转录因子 NF- $\kappa$ B 与肿瘤细胞对放疗的抵抗有关,射线能激活 NF- $\kappa$ B 的活性,使肿瘤细胞对放疗产生抗拒性;而阻断 NF- $\kappa$ B 的活性,可以提高肿瘤细胞对放疗的敏感性<sup>[16]</sup>。(3)改善肿瘤细胞缺氧状态。(4)促进肿瘤细胞凋亡。(5)抑制细胞增殖:细胞周期中不同时期的细胞,对射线的敏感性不同,M 期和  $G_2$  期细胞对放射敏感性高于 S 期和  $G_1$  期的细胞。

野生型 *P53* 基因是一重要的抑癌基因,编码的蛋白质是一种转录因子,控制着细胞周期的启动,具有反式激活功能和广谱的肿瘤抑制作用。其低表达或缺失与人类肿瘤,如头颈鳞癌、胃癌、肺癌、乳腺癌等的发生、转移和对放、化疗的抵抗密切相关<sup>[17-19]</sup>。*P53* 基因在头颈鳞癌组织中低表达,研究表明高表达的仅占 1%,中度表达的占 4%,而低度表达的占 95%<sup>[17]</sup>。本实验所用的亲本细胞 CNE-2 低表达 *P53* 基因,*E1A* 基因治疗后,RT-PCR 证实肿瘤组织中 *P53* 表达上调。Sanchez 等<sup>[20]</sup>用 *p53*、*mu-p53*(突变型)和 *P53* 缺陷的鼠胚成纤维细胞观察了表达 *E1A* 的细胞被照射后凋亡与 *P53* 的关系,结果发现 *P53* 阳性并表达 *E1A* 的细胞,照射后很快进入凋亡,表现出对射线高敏感。因此,上调 *P53* 基因表达是 *E1A* 基因治疗增强放疗敏感性的机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 赵正清,储大同,唐平章. *E1A* 基因抗癌作用机理及在肿瘤防治中的意义[J]. 癌症, 2000, 19(2): 187-189.
- [2] Pelka P, Ablack JN, Torchia J, et al. Transcriptional control by adenovirus E1A conserved region 3 via p300/CBP[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(4): 1095-1106.
- [3] Stoff-Khalili MA, Dall P, Curiel DT. Gene therapy for carcinoma of the breast[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(7): 633-647.
- [4] Zhou RR, Jia SF, Zhou Z. Adenovirus-E1A gene therapy enhances the *in vivo* sensitivity of Ewing's sarcoma to VP-16[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(5): 407-413.
- [5] Mirza A, Meguirik M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-

- dependent apoptotic pathway [ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 17 ): 2613-2622.
- [ 6 ] Nakajima T, Morita K, Ohi N, *et al.* Degradation of topoisomerase II  $\alpha$  during adenovirus E1A-induced apoptosis is mediated by the activation of the ubiquitin proteolysis system [ J ]. *J Biol Chem*, 1996, 271( 11 ): 24842-24849.
- [ 7 ] Somasundaram K, El-Deiry WS. Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP2 interacting region [ J ]. *Oncogene*, 1997, 14( 20 ): 1047-1057.
- [ 8 ] Timo S, Thomas DB. Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription [ J ]. *J Virol*, 2007, 81( 1 ): 95-105.
- [ 9 ] Daniel AK, Ke L, Jason SK, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1 [ J ]. *J Virol*, 2005, 79( 15 ): 9714-9724.
- [ 10 ] Miller DL, Myers CL, Rickards B, *et al.* Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival [ J ]. *Genome Biol*, 2007, 8( 4 ): R58.
- [ 11 ] Yoo GH, Hung MC, Lopez-Berestein G, *et al.* Phase I trial of intratumoral liposome E1A gene therapy in patients with recurrent breast and head and neck cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7( 5 ): 1237-1245.
- [ 12 ] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, *et al.* Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2001, 19( 2 ): 289-298.
- [ 13 ] 周蓉蓉, 肖志强, 廖遇平, 等. E1A 基因下调人鼻咽癌细胞血管内皮生长因子的表达提高放疗敏感性 [ J ]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22( 20 ): 933-936.
- [ 14 ] 廖遇平, 丁思娟, 肖华平, 等. E1A 基因对喉癌 Hep-2 细胞体外生长和增殖的影响 [ J ]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2009, 10( 2 ): 145-147.
- [ 15 ] 肖华平, 廖遇平, 周蓉蓉, 等. E1A 基因对人乳腺癌细胞化疗药物敏感性的影响 [ J ]. *中国医师杂志*, 2007, 9( 10 ): 1361-1363.
- [ 16 ] Shao RP, Karunakaran D, Zhou BH, *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappaB activity is involved in E1A-mediated sensitization of radiation-induced apoptosis [ J ]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 32739-32742.
- [ 17 ] Almazov VP, Kochetkov DV, Chumakov PM. Use of p53 for therapy of human cancer [ J ]. *Mol Biol ( Mosk )*, 2007, 41( 6 ): 947-963.
- [ 18 ] Barbara WR, Jacqueline RE, Karen SC, *et al.* Mechanisms of genotoxin-induced transcription and hypermutation in p53 [ J ]. *Cancer Cell Int*, 2006, 6( 13 ): 27-30.
- [ 19 ] Vicki K, Wei Wang, Joan Schiller, *et al.* Phase I study of adenovirus p53 administered by bronchoalveolar lavage in patients with bronchioloalveolar cell lung carcinoma: ECOG 6597 [ J ]. *J Clin Oncol*, 2008, 26( 25 ): 4166-4171.
- [ 20 ] Sanchez PR, Lieonart M, Cajal SR. Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity of DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1A mutants [ J ]. *Oncogene*, 2005, 11( 9 ): 675-682.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 09 - 30 [ 修回日期 ] 2009 - 11 - 04  
[ 本文编辑 ] 徐红梅

## · 科技动态 ·

### 人 DCs 表达的多聚唾液酸化的 NRP-2 调节 DCs 与 T 细胞间的相互作用

多聚唾液酸( polysialic acid, PSA )是唾液酸以  $\alpha$ -2,8 连接形成的线性聚合物,能调节神经细胞黏附分子( neural cell adhesion molecule, NCAM )及其他黏附分子介导的细胞间相互作用。CD56 分子是 NK 细胞上的一种 NCAM 亚型,是目前唯一已知的存在于免疫细胞上的 PSA 化的蛋白质,但是 PSA 在 NK 细胞上所发挥的功能尚未明确。

NRP-2( neuropilin-2 )存在于神经元和内皮细胞中,是 Semaphorin( 轴突导向分子 )和血管内皮生长因子的受体。论文作者发现 NRP-2 在人树突状细胞( dendritic cell, DCs )表面表达并且发生 PSA 化。

论文作者首先对分离提纯后的单核细胞进行培养,诱导其向 DCs 分化,并用抗 PSA-mAb 进行流式细胞检测,结果显示单核细胞在向 DCs 分化过程中,PSA 表达上调。SDS-PAGE 也证明在单核细胞向 DCs 分化过程中,DCs 高表达 PSA。用 PSA 进行免疫沉淀,然后通过质谱和氨基酸测序发现,成熟 DCs 中 NRP-2 发生 PSA 化。作者还发现在单核细胞向 DCs 分化过程中,NRP-2 的 mRNA 及蛋白质表达水平也上调;同时伴随着多聚唾液酸转移酶( PSA 合成的关键酶 )ST8Sia II 和 ST8Sia IV mRNA 表达水平的上调,与 NRP-2 的表达成正相关。PSA 修饰的 NRP-2 蛋白在碱性环境中可发生  $\beta$ -消除,但不能被肽糖苷酶 F( peptide N-glycosidase F, PNGase F )降解,提示 PSA 是以 O-糖苷键与 NRP-2 连接。去除 DCs 表面的 PSA 或用 PSA 中和抗体处理 DCs,可增强 DCs 诱导的 T 细胞活化与增殖,因此,DCs 表面 PSA 化的 NRP-2 可抑制 T 细胞的增殖。

总之,论文作者的实验证明,在单核细胞分化为 DCs 的过程中,PSA 化的 NRP-2 表达增加,使树突状细胞不能有效激活 T 细胞。但去除 DCs 表面 PSA 化的 NRP-2 能否提高 DCs 对外界刺激物(如 LPS)的反应性? NRP-2 的哪一位点发生 PSA 化? 这些问题均有待进一步探明。NRP-2 蛋白通过 PSA 修饰可调节 DCs 与 T 细胞间的相互作用,体现了 PSA 在免疫系统中的重要性,该研究具有重要的理论和实践意义。

[ 吕楠, 马文聪 摘译, 徐红梅 审阅. *Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, et al. J Bio Chem*, 2007, 282( 42 ): 30346-30356. ]