

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.006

Ad-ING4 联合放疗抑制肺腺癌 SPC-A1 细胞移植瘤的生长

赵大国¹, 黄锦宏², 金钧¹, 谢宇峰³, 盛伟华³, 杨吉成³, 凌春华²(1. 苏州大学附属第一医院急诊科, 江苏苏州 215006; 2. 苏州大学附属第一医院呼吸科, 江苏苏州 215006; 3. 苏州大学医学部细胞与分子生物学教研室, 江苏苏州 215123)

[摘要] **目的:** 研究腺病毒介导的肿瘤生长抑制因子 4 (inhibitor of growth family 4, ING4) 联合放疗对肺腺癌 SPC-A1 细胞移植瘤生长的抑制作用。**方法:** 制备 SPC-A1 细胞荷瘤小鼠模型, 随机分为 PBS 组、Ad 组、Ad-ING4 组、放疗组、Ad-ING4 + 放疗组。测量各组荷瘤小鼠移植瘤的体积变化, 治疗 15 d 后摘取瘤块, 称质量并计算抑瘤率; H-E 染色观察瘤体组织细胞的形态学变化, 免疫组化法检测瘤体组织中 Bax、caspase-3、Bcl-2、VEGF 等因子的表达。**结果:** 治疗后第 15 天 SPC-A1 移植瘤体积: Ad-ING4 组为 $(1\ 136.03 \pm 151.58)\text{mm}^3$ 、单纯放疗组为 $(1\ 035.67 \pm 86.27)\text{mm}^3$ 、Ad-ING4 + 放疗组为 $(743.84 \pm 109.06)\text{mm}^3$, 联合组可有效抑制肿瘤生长 ($P < 0.01$); 此外, 联合组抑瘤率也显著高于单纯 Ad-ING4 组或放疗组 ($69.62\% \text{ vs } 33.17\% \text{ vs } 35.41\%$, $P < 0.01$), 呈现放疗增敏协同作用 ($Q = 1.22$)。免疫组化结果显示, Ad-ING4 及其联合放疗组能明显上调 Bax、caspase-3 等蛋白的表达, 下调 Bcl-2、VEGF 等蛋白的表达, 且 Ad-ING4 + 放疗组对这些蛋白表达的调节作用强于 Ad-ING4 组、单纯放疗组 ($P < 0.01$)。**结论:** Ad-ING4 联合放疗可有效抑制肺腺癌 SPC-A1 细胞移植瘤的生长。

[关键词] 肺腺癌; SPC-A1 细胞; 移植瘤; 生长抑制因子 4; 放疗; 生长抑制

[中图分类号] R734.2; R730.54; R730.55

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0166-06

Ad-ING4 combined with radiotherapy suppresses growth of SPC-A1 cell-transplanted lung adenocarcinoma

Zhao Daguo¹, Huang Jinhong², Jin Jun¹, Xie Yufeng³, Sheng Weihua³, Yang Jicheng³, Ling Chunhua²(1. Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 3. Department of Cell and Molecular Biology, College of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anticancer effect of adenovirus-mediated inhibitor of growth family 4 (Ad-ING4) combined with radiotherapy on SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma. **Methods:** SPC-A1 tumor-bearing mice were established and anticancer experiment was conducted on these mice after being randomly divided into 5 groups: PBS group, Ad group, Ad-ING4 group, radiotherapy group and Ad-ING4 combined with radiotherapy group. Tumor growth was recorded by volume. All tumors were taken out and weighed at 15 days after treatment. The morphology of lung adenocarcinoma SPC-A1 cells was observed by H-E staining. The expressions of Bax, caspase-3, Bcl-2, and VEGF were detected by immunohistochemistry. **Results:** The tumor volume of the Ad-ING4 combined with radiotherapy group was much smaller than that of the Ad-ING4 group and the single radiotherapy group ($[743.84 \pm 109.06]\text{mm}^3 \text{ vs } [1136.03 \pm 151.58]\text{mm}^3$, $[1035.67 \pm 86.27]\text{mm}^3$, $P < 0.01$). The anticancer rate of the Ad-ING4 combined with radiotherapy group was also much better than that of the Ad-ING4 group and the single radiotherapy group ($69.62\% \text{ vs } 33.17\% \text{ vs } 35.41\%$, $P < 0.01$), which showed an enhanced radiosensitivity and a synergetic effect ($Q = 1.22$). Immunohistochemistry results showed that Ad-ING4 combined with radiotherapy could obviously up-regulate the expressions of Bax, caspase-3 and down-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81001016); 江苏省卫生厅医学科研基金资助项目 (No. H200914)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001016), and the Medical Research Foundation of Jiangsu Provincial Health Bureau (No. H200914)

[作者简介] 赵大国 (1982 -), 男, 安徽省马鞍山市人, 硕士, 住院医师, 主要从事肺部肿瘤的研究。E-mail: zdg01412001@sohu.com

[通信作者] 凌春华 (Ling Chunhua, corresponding author), E-mail: linchunhua88@hotmail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.006.html>

regulate the expressions of Bcl-2 and VEGF. And the effect of the combined group was better than the single Ad-ING4 or radiotherapy group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ad-ING4 combined with radiotherapy can effectively inhibit the growth of SPC-A1 cell-transplanted lung adenocarcinoma.

[**Key words**] lung adenocarcinoma; SPC-A1 cell; transplanted tumor; inhibitor of growth family 4; radiotherapy; growth suppression

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 166-171]

肺癌是当今世界发病率和病死率均较高的恶性肿瘤之一。尽管肺癌的手术治疗、化疗、放疗等取得了前所未有的发展,但肺癌患者5年生存率并无明显改善^[1]。基因治疗及其和其他治疗方法的联合是近年来肺癌治疗的研究热点。肿瘤生长抑制因子4(inhibitor of growth family 4, *ING4*)是新近发现的对肿瘤细胞具有选择性生长抑制和靶向诱导凋亡作用的抑癌基因^[2],该基因定位于染色体12p13-31区域内,由8个外显子和7个内含子组成,cDNA全长1380 bp,编码蛋白含249个氨基酸分子^[3]。*ING4*属ING家族成员,最初在人脑垂体中被分离出来^[4]。研究^[5-9]发现*ING4*基因对肺癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌等肿瘤细胞生长有明显抑制作用,并具有化疗增敏作用^[10-11],但*ING4*联合放疗尚无报道。本课题探讨重组腺病毒介导的*ING4*基因联合放疗对肺腺癌SPC-A1细胞移植瘤生长的抑制作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

QBI-293A细胞株(用于重组腺病毒多轮感染该细胞后大量克隆扩增)、SPC-A1肺腺癌细胞株、缺陷型重组腺病毒Ad-polyA-promoter(Ad)、Ad-ING4-polyA-promoter(Ad-ING4)由苏州大学基础医学院细胞和分子生物学教研室提供,Ad、Ad-ING4经多轮感染、扩增、纯化后可获得高纯度、高滴度的各重组腺病毒,其效价分别可至 4.0×10^9 、 3.5×10^9 (PFU/ml)。RPMI 1640培养基购自Gibco公司;小牛血清购自四季青公司;氯化铯纯化试剂盒购自杰美基因医药科技公司;免疫组化试剂盒及Bax、caspase-3、Bcl-2、VEGF等抗体均购自福州迈新生物技术公司。4周龄BALB/c雄性裸鼠购自上海斯莱克实验动物中心(实验动物合格号:沪动合证字132号),由苏州大学实验动物中心SPF级动物房饲养。Primus-m直线加速器购自德国西门子公司。

1.2 重组腺病毒的扩增、纯化和效价测定

将Ad、Ad-ING4分别感染QBI-293A细胞,48 h后收集细胞并将其悬液于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 及 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 间反复冻

融3次,离心后取上清粗提液。经多轮转染扩增后获得大量重组腺病毒,并进一步用氯化铯纯化法制备高纯度、高滴度的各重组腺病毒,置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。将对数生长期的QBI-293A细胞,以0.25%胰酶消化后,PBS调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,将细胞按每孔 $1 \times 10^4/100\text{ }\mu\text{l}$ 接种于96孔板上,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养24 h后,将纯化后的各重组腺病毒分别以 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 稀释,再将每个稀释度按 $100\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$ 分别接种,各设3个复孔,继续培养。18 h后于荧光显微镜下进行荧光计数,按公式计算重组腺病毒效价(PFU/ml),病毒效价=(每孔平均荧光数 $\times 10$)/稀释度。

1.3 建立SPC-A1肺腺癌细胞的裸鼠荷瘤模型

将对数生长期的SPC-A1细胞制成 $3.0 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。取4周龄SPF级BALB/c雄性裸鼠25只,裸鼠右前腋下常规消毒,每只皮下接种细胞悬液 $3.0 \times 10^4/\mu\text{l}$,接种后局部皮丘变实,7 d后其瘤体体积为(149.75 ± 29.71) mm^3 。

1.4 Ad-ING4和放疗单用或联合对荷瘤裸鼠的治疗作用

裸鼠瘤体体积约 150.00 mm^3 时,将裸鼠随机分成5组(5只/组)并进行抗肿瘤实验:(1)PBS组:PBS量 $50\text{ }\mu\text{l}/\text{只}$,瘤内多点注射,隔日一次,共5次;(2)Ad组、Ad-ING4组:Ad或Ad-ING4每只各 1.5×10^8 PFU/ $50\text{ }\mu\text{l}$,瘤内多点注射,隔日1次,共5次;(3)单纯放疗组:抗肿瘤实验开始后第5天,用10%水合氯醛($3\text{ }\mu\text{l}/\text{g}$)使裸鼠麻醉后进行局部瘤体照射,电压=5 MeV、皮源距=100 cm、剂量率=3 Gy/min,总剂量10 Gy/只,共1次;(4)Ad-ING4+放疗组:Ad-ING4每只 1.5×10^8 PFU/ $50\text{ }\mu\text{l}$,隔日一次,共5次;在开始治疗后第5天(即Ad-ING4已治疗2次),将裸鼠麻醉后进行局部瘤体照射,总剂量10 Gy/只,共1次。

治疗前及开始治疗后隔日测量各组瘤体长径(a)、短径(b),按公式计算瘤体体积($V = 1/2ab^2$),绘制瘤体体积-时间变化曲线。治疗15 d后,将裸鼠脱颈处死后摘取瘤体组织,称取瘤体质量,根据公

式计算抑瘤率(E): 抑瘤率(%) = (1 - 实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) × 100%。

1.5 H-E 染色法观察 SPC-A1 细胞的凋亡情况

将各组瘤体组织以 10% 中性甲醛液固定, 常规石蜡包埋并做组织切片, 再进行 H-E 染色。染色后观察瘤体组织细胞的形态学变化, 如细胞体积变小, 细胞质浓缩, 细胞核固缩、碎裂、溶解, 组织间有大量空泡形成, 判断 SPC-A1 细胞的凋亡情况。

1.6 免疫组化染色法检测瘤体组织中 Bax、caspase-3、Bcl-2 和 VEGF 的表达

将各组瘤体组织常规固定、切片, 再进行免疫组化染色, 用以检测瘤体组织中 Bax、caspase-3、Bcl-2、VEGF 等蛋白的表达, 其中 Bax、caspase-3 为促凋亡因子, Bcl-2 为凋亡抑制因子, VEGF 为血管形成相关因子。每张切片于 400 倍光镜下观察, 阳性细胞为胞膜或胞质呈淡黄色或棕黄色颗粒状染色, 共记数 10 个视野, 数据进行统计分析, 进一步探讨 ING4 及其联合放疗对 SPC-A1 肺腺癌移植瘤作用的分子机制。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 统计软件处理, 进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。ING4 基因放疗增敏作用的判断采用金正均法, 计算 Q 值: $Q = E(A + B) / [EA + (1 - EA) \times EB]$ 。当 Q 值 = 1 ± 0.15 时, 认为 A、B 间有相加作用; 当 Q 值 > 1.15 时, 认为两者间有协同作用; 当 $Q < 0.85$ 时, 认为两者间有拮抗作用。

2 结果

2.1 Ad-ING4 联合放疗抑制 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的生长

实验结果(图 1)表明, 治疗后第 15 天, Ad-ING4 组裸鼠 SPC-A1 肺腺癌移植瘤为 $(1136.03 \pm 151.58) \text{ mm}^3$ 、单纯放疗组为 $(1035.67 \pm 86.27) \text{ mm}^3$ 、Ad-ING4 + 放疗组为 $(743.84 \pm 109.06) \text{ mm}^3$, 均明显小于与 PBS 组的 $(1834.71 \pm 82.10) \text{ mm}^3$ 和 Ad 组的 $(1805.27 \pm 127.82) \text{ mm}^3$ ($P < 0.01$), 且 Ad-ING4 + 放疗组的抑瘤作用明显优于 Ad-ING4 组、单纯放疗组 ($P < 0.01$)。可见, Ad-ING4 联合放疗明显抑制 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的生长。

2.2 Ad-ING4 对 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的抑瘤及放疗增敏作用

治疗 15 d 后处死裸鼠并摘取瘤体组织, 称瘤体质量, 结果(图 2)显示, Ad-ING4 组、单纯放疗组、

Ad-ING4 + 放疗组的平均瘤体质量分别为 (1.275 ± 0.058) 、 (1.232 ± 0.042) 、 $(0.580 \pm 0.053) \text{ g}$, 明显低于 PBS 组的 $(1.907 \pm 0.103) \text{ g}$ 、Ad 组的 $(1.882 \pm 0.129) \text{ g}$ (均 $P < 0.01$); Ad-ING4 + 放疗组的抑瘤作用明显优于 Ad-ING4 组、单纯放疗组 ($P < 0.01$)。Ad-ING4 组、单纯放疗组、Ad-ING4 + 放疗组对裸鼠 SPC-A1 肺腺癌移植瘤抑瘤率分别为 33.17%、35.41%、69.62%, Ad-ING4 + 放疗组的抑瘤作用明显优于 Ad-ING4 组、单纯放疗组 ($P < 0.01$), 呈现放疗增敏协同作用 ($Q = 1.22$)。可见, Ad-ING4 可明显抑制 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的生长, 且对放疗具有增敏作用。

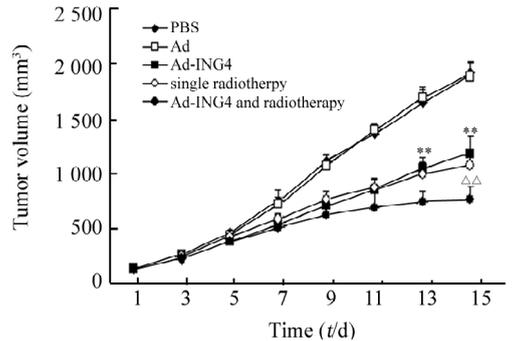


图 1 Ad-ING4 联合放疗抑制 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的生长
Fig. 1 Inhibition of SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma by Ad-ING4 combined with radiotherapy

** $P < 0.01$ vs PBS group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Ad-ING4 group or single radiotherapy group

2.3 Ad-ING4 联合放疗促进 SPC-A1 移植瘤组织细胞凋亡

瘤体组织 H-E 染色后 400 倍光镜下(图 2)观察, PBS 组和 Ad 组的 SPC-A1 移植瘤组织细胞排列密集、形态正常、结构完整; 而 Ad-ING4 组、单纯放疗组、Ad-ING4 + 放疗组可见大量移植瘤细胞呈凋亡特征, 表现为细胞核固缩、裂解或溶解, 细胞质浓缩, 细胞膜不完整, 组织间有较多纤维化空泡形成。可见, Ad-ING4 联合放疗对 SPC-A1 组织细胞具有促凋亡作用。

2.4 Ad-ING4 联合放疗上调 SPC-A1 移植瘤组织中 Bax 和 caspase-3 的表达

Bax 主要表达于 SPC-A1 细胞的胞质, 呈淡黄色或棕黄色颗粒状染色。免疫组化结果(图 3)表明, Ad-ING4 组、单纯放疗组、Ad-ING4 + 放疗组的 Bax 阳性细胞数分别为 (52 ± 5.94) 个、 (57 ± 5.71) 个、 (95 ± 4.68) 个, 均明显高于 PBS 组 (22 ± 4.45) 个、

Ad 组(24 ± 3.29)个($P < 0.01$), Ad-ING4 + 放疗组的 Bax 阳性细胞数明显高于 Ad-ING4 组、单纯放疗组($P < 0.01$)。Caspase-3 主要表达于 SPC-A1 细胞的胞质,呈淡黄色或棕黄色颗粒状染色(图 3)。结果表明,Ad-ING4 组、单纯放疗组、Ad-ING4 + 放疗组的 caspase-3 阳性细胞数分别为(43 ± 6.07)、($47 \pm$

3.74)、(77 ± 7.80)个,均明显高于 PBS 组的(13 ± 3.69)个、Ad 组的(15 ± 3.03)个($P < 0.01$), Ad-ING4 + 放疗组的 caspase-3 阳性细胞数明显高于 Ad-ING4 组、单纯放疗组($P < 0.01$)。以上结果可见,Ad-ING4 联合放疗能够上调 Bax 和 caspase-3 等促凋亡因子的表达。



图 2 H-E 染色法检测 Ad-ING4 联合放疗对 SPC-A1 移植瘤组织细胞的促凋亡作用($\times 400$)

Fig. 2 Ad-ING4 combined with radiotherapy induced apoptosis of SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma cells (H-E, $\times 400$)

A: PBS; B: Ad; C: Ad-ING4; D: Radiotherapy; E: Ad-ING4 + radiotherapy

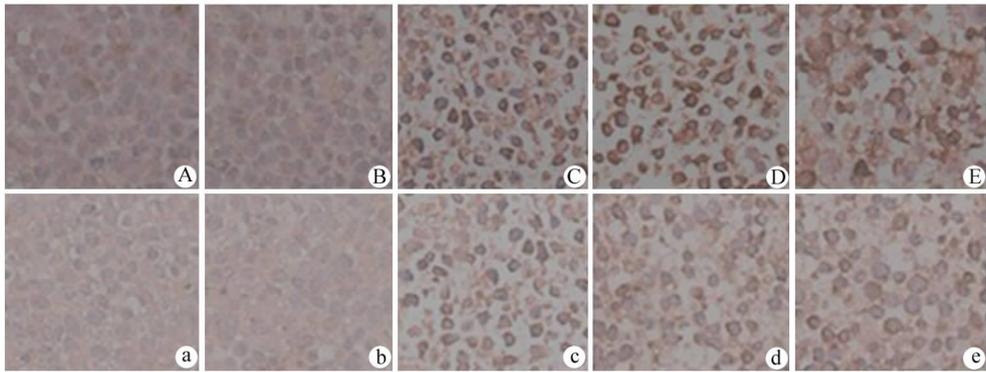


图 3 Ad-ING4 联合放疗上调 SPC-A1 移植瘤组织中 Bax 和 caspase-3 表达的影响($\times 400$)

Fig. 3 Ad-ING4 combined with radiotherapy up-regulated expressions of Bax and caspase-3 in SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma($\times 400$)

Bax expression: A: PBS; B: Ad; C: Ad-ING4; D: Radiotherapy; E: Ad-ING4 + radiotherapy

Caspase-3 expression: a: PBS; b: Ad; c: Ad-ING4; d: Radiotherapy; e: Ad-ING4 + radiotherapy

2.5 Ad-ING4 联合放疗下调 SPC-A1 移植瘤组织中 Bcl-2 的表达

Bcl-2 主要表达于 SPC-A1 细胞的胞膜或胞质,呈淡黄色或棕黄色颗粒状染色。结果(图 4)显示, Ad-ING4 组、单纯放疗组、Ad-ING4 + 放疗组的 Bcl-2 阳性细胞数分别为(59 ± 5.45)、(57 ± 6.44)、(37 ± 5.88)个,均明显低于 PBS 组(94 ± 6.30)个和 Ad 组(92 ± 7.27)个($P < 0.01$), Ad-ING4 + 放疗组的 Bcl-2 阳性细胞数明显低于 Ad-ING4 组、单纯放疗组($P < 0.01$)。以上结果说明,Ad-ING4 联合放疗能够下调 SPC-A1 移植瘤组织中 Bcl-2 等凋亡抑制因子的表达。

2.6 Ad-ING4 联合放疗下调 SPC-A1 移植瘤组织中

VEGF 的表达

VEGF 主要表达于 SPC-A1 肺腺癌细胞的胞质,呈淡黄色或棕黄色颗粒状染色。结果(图 5)显示, Ad-ING4 + 放疗组的 SPC-A1 移植瘤组织中 VEGF 阳性细胞数为(63 ± 6.17)个,明显低于 PBS 组(95 ± 5.93)个、Ad 组(96 ± 6.51)个($P < 0.01$),而 Ad-ING4 组(87 ± 3.52)个、单纯放疗组(89 ± 4.78)个与 PBS 组、Ad 组的差异无统计学意义($P > 0.05$), Ad-ING4 + 放疗组 SPC-A1 移植瘤组织中 VEGF 阳性细胞数明显少于 Ad-ING4 组、单纯放疗组($P < 0.01$)。以上结果说明,Ad-ING4 联合放疗能够下调 SPC-A1 移植瘤组织中血管形成相关因子 VEGF 的表达。

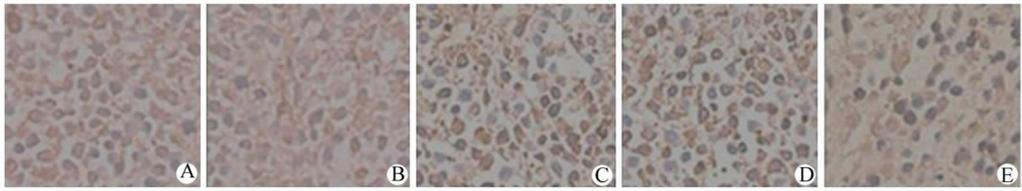


图 4 Ad-ING4 联合放疗下调 SPC-A1 移植瘤组织中 Bcl-2 的表达(×400)

Fig. 4 Ad-ING4 combined with radiotherapy down-regulated expression of Bcl-2 in SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma(×400)

A: PBS; B: Ad; C: Ad-ING4; D: Radiotherapy; E: Ad-ING4 + radiotherapy

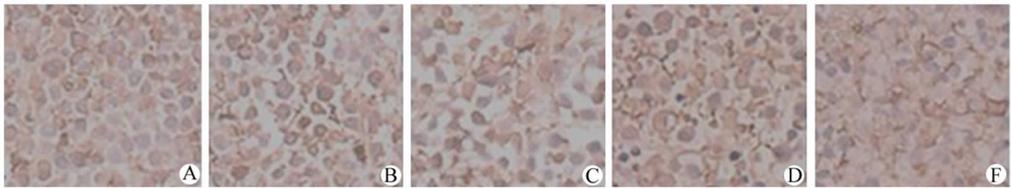


图 5 Ad-ING4 联合放疗抑制 SPC-A1 移植瘤组织中 VEGF 的表达(×400)

Fig. 5 Ad-ING4 combined with radiotherapy down-regulated expression of VEGE in SPC-A1 transplanted lung adenocarcinoma(×400)

A: PBS; B: Ad; C: Ad-ING4; D: Radiotherapy; E: Ad-ING4 + radiotherapy

3 讨论

近年来,随着医学分子生物学研究的深入,人们对肺癌有了进一步认识,其发生、发展是一个多因素、多基因参与的多阶段复杂病变过程。基因治疗作为一种高效性、特异性、靶向性的治疗方法,已成为肺癌治疗的新研究方向。目的基因的选择是肺癌基因治疗的关键所在。*ING4* 基因具有抑制肿瘤细胞生长和肿瘤血管的生成,诱导肿瘤细胞凋亡,调节肿瘤细胞生长周期、引起 G_2/M 期阻滞,增强 P53 活性等作用^[12],可能具有增加肿瘤放疗敏感性的作用,但该项研究目前国内外尚未见文献报道。

基因表达载体的选择亦是肺癌基因治疗的关键。缺陷型重组腺病毒作为理想的基因表达载体具有如下特点^[13]:(1)可制备高滴度的病毒液;(2)对多种细胞感染率高,可导入多种细胞;(3)不发生整合,安全性好;(4)装载容量大;(5)不能长期在细胞内维持高水平,对机体不会产生潜在的不良作用。

Bax (Bcl-2 associated X protein) 基因为促细胞凋亡基因,是 *Bcl-2* 基因家族一员,*Bax* 基因低表达是部分肺癌发生的早期事件,并在其中起着重要的作用。*Bax* 与 *Bcl-2* 可形成异源二聚体或与自身形成同源二聚体,当 *Bax* 在细胞内超表达时,细胞对死亡信号的反应增强,细胞死亡增多,因此被称为“死亡激动

剂”^[14]。*Caspase-3* 是 *caspase* 家族中最重要的凋亡执行者之一,与凋亡关系最为密切,参与多种因素诱导的细胞凋亡^[15]。*Caspase-3* 合成后通常以无活性的酶原形式存在于细胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活,可对多种蛋白底物进行降解,从而在细胞凋亡过程中起关键作用^[16]。*B* 细胞淋巴瘤/白血病-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*, *Bcl-2*) 基因是一种凋亡抑制基因,*Bcl-2* 蛋白抑制许多因素引起的细胞凋亡,异常延长细胞的生存时间,促进有转化作用的基因突变的积累,并协助细胞抵抗免疫系统的监视作用,从而参与肿瘤的发生发展^[17]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*) 是一种内皮细胞特异性致分裂原和体内血管生成的诱导因子,可特异性促进内皮细胞生长及血管生成,增加血管的通透性,有助于肿瘤侵袭转移,是目前诱导肿瘤血管形成作用最强、特异性最高的血管生长因子^[18]。大多数肿瘤组织中 *VEGF* 表达均升高,肺癌中同样呈 *VEGF* 高表达,且是预后的独立因子,*VEGF* 表达高的患者预后较差^[19]。

本实验以 Ad-ING4 及其联合放疗对裸鼠 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的抑瘤作用进行了实验研究。各组瘤体体积、瘤重、抑瘤率对比分析:与 PBS 组、Ad 组比较,Ad-ING4 组、单纯放疗组,Ad-ING4 联合放疗组对裸鼠 SPC-A1 肺腺癌移植瘤均有不同程度的抑瘤作用

($P < 0.01$), Ad-ING4 + 放疗组的抑瘤作用明显优于 Ad-ING4 组、单纯放疗组, 呈现放疗增敏协同作用 ($Q = 1.22$)。免疫组化法检测肿瘤生长相关因子的表达, 阳性细胞计数对比分析显示: 与 PBS 组、Ad 组比较, Ad-ING4 组、单纯放疗组, Ad-ING4 联合放疗组均能明显上调促凋亡因子 Bax、caspase-3 的表达 ($P < 0.01$), 下调凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达 ($P < 0.01$), 以及下调肿瘤血管形成相关因子 VEGF (除 Ad-ING4 组不能明显下调 VEGF 外) 的表达 ($P < 0.01$); 且 Ad-ING4 联合放疗组的作用明显强于 Ad-ING4 组和单纯放疗组 ($P < 0.01$), 表明 Ad-ING4 联合放疗对 SPC-A1 肺腺癌移植瘤的生长具有明显抑制作用。

综上, Ad-ING4 对 SPC-A1 肺腺癌细胞具有生长抑制和放疗增敏作用, *ING4* 基因联合放疗组的抗肿瘤作用明显优于单纯 *ING4* 基因组和单纯放疗组。可见, Ad-ING4 是较强的 SPC-A1 肺腺癌细胞放疗增敏剂, 可提高该肿瘤细胞对放疗的敏感性, 可显著提高放疗的疗效。 *ING4* 基因联合放疗的抗肿瘤体内实验结果为今后开展肺癌治疗临床研究提供了新的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] Gunduz M, Nagatsuka H, Nagai N, et al. Frequent deletion and down-regulation of *ING4*, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Gene, 2005, 356(10): 109-117.
- [3] Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity [J]. Cancer Res, 2003, 63(10): 2373-2378.
- [4] Hu RM, Han ZG, Song HD, et al. Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(17): 9543-9548.
- [5] 杜贤荣, 杨吉成, 谢宇锋, 等. Ad-ING4 抑制人 A549 肺癌细胞及其裸鼠移植瘤的生长 [J]. 江苏医药, 2010, 1(5): 541-545.
- [6] 焦玉娟, 曹婧媛, 杨蕊雯, 等. 腺病毒介导的 *ING4* 诱导人前列腺癌细胞凋亡的实验研究 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 1(5): 1065-1066.

- [7] 杨慧翠, 盛伟华, 谢宇锋, 等. Ad-ING4 对人前列腺癌细胞 PC-3 体内外抑癌效应的研究 [J]. 癌症: 英文版, 2009, 2(11): 1149-1157.
- [8] 李正祎, 盛伟华, 谢宇锋, 等. Ad-ING4 对乳腺癌的生长抑制作用研究 [J]. 中华普通外科杂志, 2010, 1(4): 313-317.
- [9] 张治国, 欧阳骏, 韩从辉, 等. 腺病毒介导的 *ING4* 基因对人膀胱癌细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制 [J]. 中华医学杂志, 2010, 90(42): 3008-3013.
- [10] Shen JC, Unoki M, Ythier D, et al. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1 [J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2552-2558.
- [11] Zhang X, Xu LS, Wang ZQ, et al. *ING4* induces G2/M cell cycle arrest and enhances the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells [J]. FEBS Lett, 2004, 570(13): 7-12.
- [12] 刘铁连, 张海峰, 杨吉成. 候选抑癌基因 *ING4* 的研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(3): 69-72.
- [13] 杨吉成, 缪竞诚, 盛伟华, 等. 现代肿瘤基因治疗实验研究方略 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 54-55.
- [14] Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and practice of oncology [M]. 5th eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, 79-102.
- [15] Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, et al. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis [J]. Brain Pathol, 2000, 10(2): 283-292.
- [16] Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells [J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(3): 367-373.
- [17] Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death [J]. Annu Rev Med, 1997, 48(6): 267-281.
- [18] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [J]. Clin Oncol, 2005, 23(5): 1011-1027.
- [19] Seto T, Higashiyama M, Funai H, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its fit-1 and KDR receptors in stage I non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2006, 53(1): 91-96.

[收稿日期] 2012 - 11 - 12

[修回日期] 2013 - 02 - 20

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
华威国际(香港)有限公司北京华威中仪科技有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四
上海白泽生物基因发展有限公司	插页