论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0784-04

重组人 p53 腺病毒增强肝癌放疗敏感性的实验研究

余舒亮[1],王 东[1],张沁宏[2],卿 毅[1],林 俐[2],李增鹏[2],廖 玲[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察重组人 p53 腺病毒(recombinant human adenovirus p53, rAd-p53)联合放疗对肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**方法** 人肝癌细胞 SMMC-7721 荷瘤裸鼠 18 只,应用随机数字表法选取 2 只,1 只瘤内注射 rAd-p53,另 1 只注射 PBS,注射后 48 h 处死动物取瘤,Western blot 方法检测肿瘤 P53 蛋白表达;其余 16 只分为 4 组:对照组、单独放疗(IR)组、重组人 p53 腺病毒(rAd-p53)治疗组和重组人 p53 腺病毒 + 放疗(rAd-p53 + IR)联合治疗组。实验治疗第 16 天处死动物,绘制肿瘤生长曲线;光镜下观察肿瘤治疗后组织形态学变化;免疫组化 S-P 法检测 Ki-67,TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡。**结果** rAd-p53 成功感染了肝癌裸鼠移植瘤细胞,并增强肝癌细胞 P53 蛋白的表达;rAd-p53 + IR 联合治疗组、IR 组和 rAd-p53 治疗组的肿瘤生长抑制率分别为 81.49%、30.74% 和 33.67%,其中 rAd-p53 + IR 联合治疗组的肿瘤抑制最强($P<0.01$)。光镜下观察各治疗组的肿瘤组织均出现坏死,其中 rAd-p53 + IR 联合治疗组肿瘤坏死较多;rAd-p53 + IR 联合治疗组肿瘤细胞表达 Ki-67 明显低于对照组、IR 组和 rAd-p53 治疗组($P<0.01$),而肿瘤细胞凋亡显著增加($P<0.01$)。**结论** rAd-p53 + IR 联合治疗较单独放疗能显著抑制肝癌的生长,rAd-p53 能增强肝癌对放疗敏感性。

关键词: 肝癌;重组人 p53 腺病毒;p53 基因治疗

中图法分类号: R73-36; R730.55; R735.7 **文献标识码:** A

Recombinant human adenovirus p53 enhances radiosensitivity of human hepatocarcinoma-bearing nude mice

YU Shu-liang[1], WANG Dong[1], ZHANG Qin-hong[2], QIN Yi[1], LIN Li[2], LI Zeng-peng[2], LIAO Ling[1] ([1]Department of Oncology, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect of recombinant human adenovirus p53 (rAd-p53) combined with radiotherapy on human hepatocarcinoma in nude mouse model. **Methods** Nude mice hepatocarcinoma model was established by inoculating SMMC-7721 cells into the back of 18 nude mice. Firstly, two nude mice were taken out randomly, one was administered by intratumoral injection of rAd-p53, another was administered with PBS. After 48 h, the expression of P53 protein was detected by Western blotting. The rest 16 nude mice were divided into 4 groups randomly: the control group, the radiotherapy group, rAd-p53 group and rAd-p53 plus radiotherapy group. The tumor growth curve was plotted and the mice were sacrificed on the 16th day after the treatment and the tumor mass was taked. Meanwhile, the histology of specimens was examined by HE staining. The expression of Ki-67 protein was detected by immunohistochemistry. The apoptotic index was detected by Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. **Results** The infection of rAd-p53 in SMMC-7721 xenograft was succeeded in the animal model and the expression of P53 protein was increased in 48 h after injection. The tumor inhibitory rate were 81.49%, 30.74% and 33.67% in rAd-p53 plus radiotherapy group, radiotherapy group and rAd-p53 group respectively. Compared to the other groups, the inhibitory rate of rAd-p53 plus radiotherapy group was significantly higher ($P<0.01$). Tumor necrosis was observed in overall groups and mostly found in rAd-p53 plus radiotherapy group. The Ki-67 expression in the group of rAd-p53 plus radiotherapy was significantly lower than other groups ($P<0.01$), while the apoptosis index was much higher ($P<0.01$). **Conclusion** rAd-p53 combined with radiotherapy can significantly inhibit the growth and enhance radio-sensitivity of hepatocarcinoma in SMMC-7721 xenotransplant in animal model.

Key words: hepatocarcinoma; recombinant adenovirus; p53; gene therapy

基金项目: 国家自然科学基金(30872975)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872975)

作者简介: 余舒亮,男,河南省信阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝癌基因治疗方面的研究。电话:(023)68757169,E-mail:shlyu402@yahoo.cn

通信作者: 王 东,电话:(023)68757151,E-mail:Dongwang64@hotmail.com

收稿日期: 2008-10-17;**修回日期:** 2008-11-19

放射治疗（简称放疗）是临床治疗恶性肿瘤最常用的方法之一，而放射敏感性是决定肿瘤放射治疗成败的关键。因此，如何提高肿瘤放射敏感性进而提高放射疗效的措施已成为肿瘤治疗学领域一个研究的热点。近年来，随着肿瘤基础研究，尤其是分子生物学的发展，应用基因药物提高肿瘤放射敏感性正成为一种非常重要的发展趋势[1]。肿瘤抑制基因 p53 具有细胞周期阻滞、促进细胞凋亡和细胞增殖抑制作用，能够提高肿瘤细胞对放射的敏感性[2]。张沁宏等[3]研究表明，重组人 p53 腺病毒（recombinant human adenovirus p53，rAd-p53）能显著提高肝癌细胞对放疗的敏感性。为此，本研究旨在通过人肝细胞癌裸鼠移植瘤模型，观察重组人 p53 腺病毒联合放疗对肝癌生长的抑制作用，为临床开展肝癌基因与放疗联合治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

重组人 p53 腺病毒注射液（Genidicine，商品名今又生，产品批号 20070101）系深圳市赛百诺基因技术有限公司产品，规格为 1.0×10^{12} VP/支，病毒感染滴度为 1×10^{10} PFU/支，分装后 -20 ℃下保存；人肝癌细胞株 SMMC-7721，由中心实验室冻存；含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 DMEM10 培养基均系 HyClone 公司产品。

1.2　人肝细胞癌裸鼠模型的建立

近交系 BALB/c nu/nu 无胸腺裸小鼠由本所实验动物中心提供，共 18 只，4 周龄，雌性，体质量 16 ~ 20 g，饲养于 SPF 级环境中。将处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化，无菌 PBS 液重悬制成 $2.5\times10^{7}\,ml^{-1}$ 的单细胞悬液，每只裸鼠于右侧腋下皮下接种 0.2 ml（5×10^{6}）细胞悬液。

1.3　Western blot 检测 P53 蛋白

接种 7 ~ 10 d 后，肿瘤体积达到 45 ~ 55 mm^3 时，应用随机数字表法从 18 只荷瘤裸鼠中选取 2 只，1 只瘤内注射 0.1 ml（5×10^{7} PFU）rAd-p53 的 PBS 液，另 1 只注射 0.1 ml 的 PBS 液。注射后 48 h 处死动物取瘤，用组织匀浆法提取组织蛋白，用 Western blot 方法检测肿瘤 P53 蛋白表达，鼠抗人-p53 抗体（1∶500，北京中杉金桥生物技术有限公司），HRP 标记的羊抗鼠二抗（1∶2 000，Pierce 公司），化学发光试剂盒（Pierce 公司）。

1.4　动物分组和实验治疗

接种 7 ~ 10 d 后，肿瘤体积达到 45 ~ 55 mm^3 时，将余下的 16 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组：对照组、单独放疗（IR）组、rAd-p53 治疗组和 rAd-p53 + 放疗（rAd-p53 + IR）联合治疗组，每组 4 只。rAd-p53 治疗组和 rAd-p53 + IR 联合治疗组于 1、6、11 d 在瘤内多点注射 0.1 ml（5×10^{7} PFU）rAd-p53 的 PBS 液，对照组和 IR 组在瘤内多点注射 0.1 ml 的 PBS 液。

放射治疗采用直线加速器（Precise 全数字化直线加速器，ELEKTA 公司），8 mV X 射线，剂量率 200 cGy/min，动物与放射源的距离为 100 cm，以 3 mm 铅板防护动物正常部位。IR 组和 rAd-p53 + IR 联合治疗组于 3、8、13 d 用速眠新Ⅱ麻醉后（剂量 1.5 mg/kg），按上述放疗条件照射 5 Gy/次，总剂量 15 Gy。

1.5　肿瘤体积测量

每次治疗前以及处死动物前测量肿瘤长径和短径，按下列公式计算肿瘤体积：肿瘤体积 = 长径 × 短径^2/2，绘制生长曲线；抑瘤率 =（对照组相对体积 - 实验组相对体积）/对照组相对体积 ×100%。最后 1 次放疗 3 d 后（实验治疗第 16 天）处死裸鼠并剥离肿瘤。

1.6　组织学观察

肿瘤组织经 10% 甲醛固定，常规石蜡包埋切片，HE 染色，光镜观察组织结构改变。

1.7　免疫组化检测肿瘤细胞增殖指标 Ki-67

Ki-67Antigen 抗体为工作液（北京博奥森生物技术有限公司），免疫组化 S-P 法按说明书操作进行。光镜下细胞核着色为阳性，随机选择 10 个高倍视野（×400），共计数 1 000 个细胞，计算阳性细胞百分率，作为增殖指数。

1.8　TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡

按 TUNEL 凋亡检测试剂盒（美国 Roche 公司）说明书操作。光镜下细胞核着色，呈现棕黄色或褐色凋亡小体为阳性。随机选择 10 个高倍视野（×400），共计数 1 000 个细胞，计算凋亡细胞百分率，作为凋亡指数。

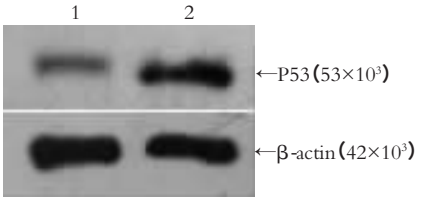
1.9　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析，组间比较行 t 检验。

2　结果

2.1　移植瘤组织 P53 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示，rAd-p53 注射后 48 h，肿瘤 P53 蛋白表达量较注射 PBS 显著升高，表明 rAd-p53 成功感染了肝癌移植瘤细胞，并增强肝癌细胞内 P53 蛋白的表达（图 1）。



1：对照组；2：rAd-p53 治疗组

图 1　Western blot 检测 rAd-p53 注射后 48 h 移植瘤 P53 蛋白的表达

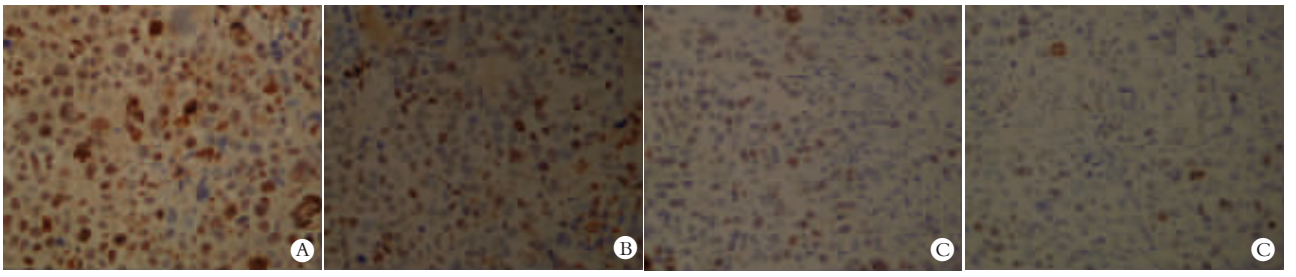
2.2　rAd-p53 联合放疗对移植瘤的抑制效应

rAd-p53 联合放疗对移植瘤的抑制效应的结果见表 1。4 组之间两两比较，对照组与实验各组均有统计学差异（$P<0.01$）；rAd-p53 + IR 联合治疗组、IR 组、rAd-p53 治疗组的抑瘤率分别为 81.49%、30.74% 和 33.67%，联合治疗组与单独治疗组存在统计学差异（$P<0.01$），而 IR 组与 rAd-p53 治疗组没有统计学差异（$P>0.05$）。

表1 各组移植瘤不同生长时间体积的变化(V/mm^3, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

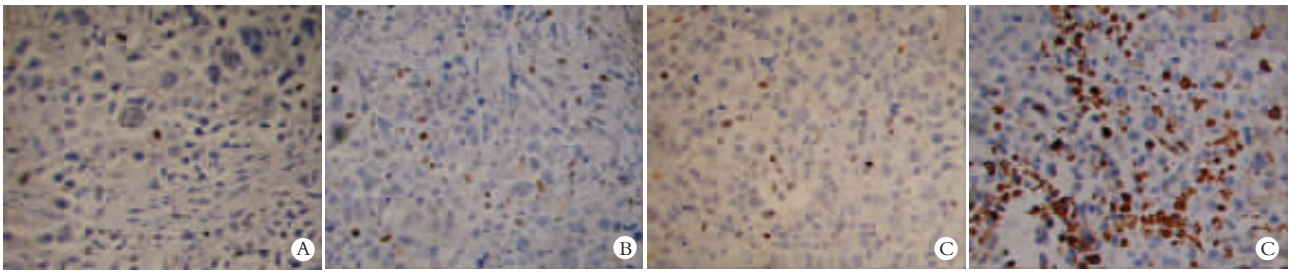
组别	1 d	3 d	6 d	8 d	11 d	13 d	16 d
对照组	55.30±6.71	137.24±13.73	282.22±32.42	425.19±29.92	656.22±38.65	838.04±36.34	1 197.06±125.73
IR 组	52.36±3.98	105.64±12.08	135.00±9.91[a]	271.84±28.73[a]	350.54±8.14[a]	547.04±13.17[a]	843.12±15.73[a]
rAd-p53 治疗组	58.09±4.90	85.21±9.42	136.17±11.18[a]	217.80±12.15[a]	361.17±5.95[a]	541.06±10.79[a]	815.46±25.28[a]
rAd-p53+IR 联合治疗组	51.75±5.94	75.35±7.93	116.36±8.87[a]	143.38±8.79[ab]	166.80±34.43[ab]	217.73±19.91[ab]	263.06±19.90[ab]

a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.01$,与 IR 组和 rAd-p53 组比较



A:对照组;B:IR 组;C:rAd-p53 治疗组;D:rAd-p53+IR 联合治疗组

图2 免疫组化染色观察各组移植瘤 Ki-67 的表达 (S-P×400)



A:对照组;B:IR 组;C:rAd-p53 治疗组;D:rAd-p53+IR 联合治疗组

图3 TUNEL 检测各组移植瘤细胞凋亡 (×400)

2.3 组织形态观察

镜下观察移植瘤肿瘤细胞呈上皮样、多角形,弥漫分布,亦可见腺样结构。各治疗组肿瘤内都出现程度不同的灶性坏死,其中 rAd-p53+IR 联合治疗组肿瘤坏死较多,而对照组未见坏死病灶。

2.4 肿瘤细胞增殖检测

Ki-67 免疫组化结果显示增殖细胞核着色,散在分布(图2)。rAd-p53+IR 联合治疗组肿瘤细胞增殖率为(19.30±4.67)%, rAd-p53 治疗组为(49.20±8.11)%,IR 组为(53.50±9.40)%, 对照组为 (87.90±7.39)%。rAd-p53+IR 治疗组显著低于与对照组和单独治疗组($P<0.01$), rAd-p53 治疗组和 IR 组显著低于与对照组($P<0.01$),而 rAd-p53 治疗组与 IR 组没有统计学差异($P>0.05$)。

2.5 肿瘤细胞凋亡检测

TUNEL 检测结果显示凋亡细胞核着色, 呈现棕黄色或褐色凋亡小体, 散在分布(图3)。rAd-p53+IR 联合治疗组肿瘤细胞凋亡率为(25.57±2.49)%, rAd-p53 治疗组为(8.27±1.23)%,IR 组为(7.99±1.23)%, 对照组为(3.10±1.07)%。rAd-p53+IR 治疗组肿瘤细胞凋亡率显著高于对照组和单独治疗组($P<0.01$),rAd-p53 治疗组、IR 组和对照组 3 组之间相比没有统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

肿瘤抑制基因 p53 是与放射敏感性关系最大的相关基因[4],在肿瘤放疗中,p53 基因的正常功能对肿瘤细胞的凋亡和提高放射敏感性起到了关键作用[5]。其主要通过以下作用实现抑癌增敏作用:首先,p53 基因主要是通过阻滞细胞周期而增加肿瘤细胞对放射治疗的敏感性。p53 基因不仅可以通过激活 p21WAF1/CIP1 基因抑制 Cdk-cyclinE 复合物(cyclin-dependent kinase,Cdk and cyclinE)的功能,导致细胞 G_1~S 期阻滞,使细胞停留在 G_1 期而抑制细胞周期[6],而且还可以通过激活 p21、14-3-3σ 和 Gadd45 基因,抑制 cyclinB 与周期蛋白依赖性激酶 cdc2 形成 cyclinB-cdc2 复合物的功能,而抑制肿瘤细胞由 G_2 期向 M 期转化和增殖,形成 G_2~M 期阻滞[7]。其次,p53 基因还能够抑制放疗后 DNA 损伤修复系统-非同源末端连接(nonhomologous end joining,NHEJ)修复系统,使放疗导致的 DNA 双链断裂不能修复,而使肿瘤细胞发生凋亡[8]。

目前已有很多研究证明 rAd-p53 能够有效地感染多种肿瘤细胞,并能增强肿瘤细胞对放射的敏感性[8-12]。本研究通过建立裸鼠人肝癌移植瘤模型,观察 rAd-p53 联合放疗对肝癌生长抑制的协同作用,结果显示联合治疗组裸鼠的肿瘤生长抑制率为 81.49%,而肿瘤体积增加倍数明显小于对照组,说明 rAd-p53 与放疗联合治疗对裸鼠肝癌抑制瘤有明显的生长抑制作用;与 rAd-p53 治疗组和 IR 组相比,联合治疗组的肿瘤体积增加倍数较小,而肿瘤生长抑制率

明显增加,说明联合治疗的疗效大于 rAd-p53 治疗及单独放疗。方差分析结果表明,当 rAd-p53 与放疗联合治疗肝癌时,两者之间存在着交互作用,而且这种交互作用的性质是协同作用,而非拮抗作用,即 rAd-p53 与放疗联合治疗肝癌具有协同增强抗肿瘤的作用,能显著地增加肝癌细胞凋亡和抑制其增殖。

本研究虽然证实了 rAd-p53 能够在体内增强肝癌细胞对放射治疗的敏感性,但是仍有许多问题需要深入研究,如怎样选择合适的照射剂量和基因给药的时间与放疗的间隔时间等。随着研究的深入及基因制品的日趋成熟,相信 rAd-p53 联合放疗治疗肝癌将成为一种新的治疗手段。本研究结果为 rAd-p53 联合放疗作为肝癌的新治疗方案提供了实验依据。

参考文献:

[1] McBride W H, Chiang C S, Olson J L, *et al*. A sense of danger from radiation[J]. Radiat Res, 2004,162(1): 1 - 19.
[2] Clarke A R, Purdie C A, Harrison D J, *et al*. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways[J]. Nature, 1993, 362(6423): 849 - 852.
[3] 张沁宏,向德兵,卿　毅,等. 重组人 P53 腺病毒增强肝癌细胞放疗的敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(5): 458 - 463.
[4] Lacroix M, Toillon R A, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(2): 293 - 325.
[5] 王　峰,王建华,许锡元. p53 基因增加肿瘤放射治疗敏感性的机制[J]. 国际肿瘤学杂志,2007,34(5):342 - 344.
[6] Andreassen P R, Lacroix F B, Lohez O D, *et al*. Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 Progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7660 - 7668.
[7] Winters Z E. P53 pathways involving G2 checkpoint regulators and the role of their subcellular localisation[J]. J R Coll Surg Edinb, 2002, 47(4): 591 - 598.
[8] Jovanovic M, Dvnan W S. Terminal DNA structure and ATP influence binding parameters of the DNA-dependent protein kinase at an early step prior to DNA synapsis[J]. Nucleic Acids Res, 2006,34(4): 1112 - 1120.
[9] 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.
[10] 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.
[11] 马洁韬, 郑　伟, 邹华伟. 重组人腺病毒 p53 提高肺腺癌放射敏感性的实验观察[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(4): 424 - 426.
[12] Kawabe S, Munshi A, Zumstein L A, *et al*. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts[J]. Int J Radiat Biol, 2001, 77(2): 185 - 194.

(编辑　王　红)

文章编号:1000-5404(2009)09-0787-01

个案与短篇

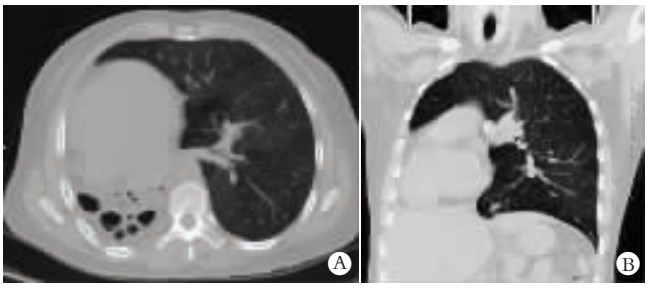
成人先天性右肺发育不全 1 例

刘清宇[1,2],何　勇[1],陈建明[1],伍　晗[1,2]　(第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042,[2]学员旅十队,重庆 400038)

先天性肺发育不全是少见的先天性畸形[1],多发生在左侧,右侧较为少见。本科收治 1 例先天性右肺发良不全患者,现报告如下。

1　临床资料

患者,女性,45 岁,因右下腹阵发性剧烈疼痛,伴恶心、呕吐及腹胀,停止排便排气 43 h 入院。查体:体温 37.4 ℃,脉搏 90 次/min,气管右偏,脊柱弯曲,右肺叩诊浊音,心音位于右侧,右下腹麦氏点压痛、反跳痛存在,全腹轻度肌紧张。平片提示右侧胸腔见片状高密度影,其内密度不均匀,可见多发囊状影,心影纵隔右移;胸腹部 CT 提示右肺发育不全伴多发性囊状影,心脏右移,但心房、心室及大血管无转位,右侧横隔升高至第 7 肋骨水平,上胸椎向右侧弯,左肺上叶尖后段及下叶基底段见感染性病变(图 1);腹部各脏器位置正常。腹部 B 超提示右下腹麦氏点区域回声异常,考虑炎性阑尾,肝、胆、胰、脾及双肾未见异常。入院诊断:①急性阑尾炎;②右肺发育不全伴多囊肺;③心脏右移。常规术前准备,行剖腹探查术及阑尾切除术,术后患者腹痛缓解,痊愈出院。



A:横断面可见右肺发育不全,呈多发性囊状影,心脏位于右侧胸腔;B:冠状面可见右侧胸廓被左肺充填,心脏位于右侧胸腔

图 1　先天性右肺发育不全患者胸腹部 CT 表现

(下转 793 页)

作者简介:刘清宇,男,吉林省梅河口市人,学员。E-mail: qingyusabor516@sina.com
通信作者:陈建明,电话:(023)68757986,E-mail:chenjm@mail.dph-fsi.com
收稿日期:2009-02-02;**修回日期**:2009-02-26