论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0462-04

放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路对肺腺癌细胞周期、凋亡及放射敏感性的影响

毛丽伟[1],廖国清[1],王红梅[1],王卫东[2],陈正堂[2] (100091 北京,解放军309医院肿瘤科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所[2])

[摘要] 目的 研究体外环境放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路对肺腺癌细胞细胞周期、凋亡率及放射敏感性的影响。**方法** 采用直线加速器 8 MV-X 线,400 MU/min、4 Gy、源皮距 100 cm 的照射条件照射治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 转染细胞和对照组 H1299($p53^{-/-}$)、pE6-p53-EGFP/H1299 和 pR4-p53-EGFP/H1299 转染细胞,12 h 后收集各组细胞,流式细胞仪分析该环路在放射线诱导下对肺腺癌细胞周期和细胞凋亡率的影响;绘制细胞放射剂量-存活曲线,计算平均致死剂量(Do)值及放射增敏比(sensitive enhancement ratio,SER)。**结果** 4 Gy 8 MV-X 线照射治疗组和对照组细胞后12 h,治疗组细胞在照射后(75.13±1.42)%发生明显 G_0/G_1 期阻滞;照射后各组细胞凋亡率均高于照射前,照射后治疗组细胞凋亡率为(23.73±0.21)%,分别是对照组 H1299($p53^{-/-}$)细胞[(4.17±0.12)%]、pE6-p53-EGFP/H1299 细胞[(15.67±0.32)%]、pR4-p53-EGFP/H1299 细胞[(9.23±0.15)%]的 5.69、1.51 倍和 2.57 倍。治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 细胞和对照组 pE6-p53-EGFP/H1299、H1299($p53^{-/-}$)细胞 Do 值分别 0.91、1.073、1.413 Gy,根据 Do 值计算 SER 分别为 2.63 和 1.34。**结论** 放射可诱导 wt-p53 蛋白正反馈基因环路上调 wt-p53 蛋白表达,从而调控肺腺癌细胞发生显著 G_0/G_1 阻滞,使细胞凋亡比例增加,显著提高了肺腺癌细胞放射敏感性。

[关键词] 放射治疗剂量;肿瘤抑制蛋白 p53;基因环路;非小细胞肺癌;细胞系,肿瘤;辐射耐受性;体外研究

[中图法分类号] R394.2;R703.55;R734.2 **[文献标志码]** A

Effect of irradiation-induced wt-p53 positive circuit on cell life cycle, apoptosis and irradiation sensitivity of lung adenocarcinoma cells

Mao Liwei[1], Liao Guoqing[1], Wang Hongmei[1], Wang Weidong[2], Chen Zhengtang[2] ([1]Department of Oncology, No. 309 Hospital of PLA, Beijing, 100091; [2]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] Objective To study the effects of irradiation-induced wt-p53 positive feedback circuit on cell life cycle, apoptosis rate and irradiation sensitivity of adenocarcinoma of lung *in vitro*. **Methods** The therapeutic group pE6R4-p53-EGFP/H1299 cells and the other 3 control groups H1299 ($p53^{-/-}$), pE6-p53-EGFP/H1299 and pR4-p53-EGFP/H1299 cells were irradiated with 8-Mev electron beam generated by a linear accelerator at a dose rate of 400 cGy/min and a source-skin distance (SSD) of 100 cm, 12 h exposure to irradiation. The cell life cycle and the rate of apoptosis were analyzed by FCM. Mean lethal dose (Do) and sensitive enhancement ratio (SER) index were calculated from the irradiation dose-survival curve. **Results** In 12 h post 4-Gy 8MV-X-ray irradiation, FCM analysis showed that most cells in therapeutic group were arrested at G_0/G_1 stage [(75.13±1.42)%], compared with the 3 control groups [(38.47±0.87)%, (62.57±0.76)% and (51.23±2.41)%, respectively]. After irradiation, the cell apoptotic rate in each group was higher than that in the cells without irradiation. The apoptotic rate in the therapeutic group was (23.73±0.21)%, which was 5.69, 1.51 and 2.57 folds respectively higher in the 3 control groups[(4.17±0.12)%, (15.67±0.32)% and (9.23±0.15)%]. Do values were 0.91, 1.073 and 1.413 Gy respectively in pE6R4-p53-EGFP/H1299, pE6-p53-EGFP/H1299 and H1299 cells. The SER, derived from Do values, was 2.63 and 1.34, respectively. **Conclusion** Irradiation up-regulates wt-p53 gene expression, regulates cell cycle and induces cell apoptosis. Thus this positive feedback circuit increases the sensitivity of lung adenocarcinoma to irradiation.

[Key words] radiotherapy dosage; tumor suppressor protein p53; gene circuits; carcinoma, non-small-cell lung; adenocarcinoma of lung; cell line, tumor; radiation tolerance; *in vitro*

Corresponding author: Chen Zhengtang, Tel: 86-23-68755626, E-mail:zhengchangchen@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:zhengchangchen@yahoo.com.cn

放射-基因治疗即同时将具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因转入人体细胞内,对肿瘤局部实施照射时诱导肿瘤杀伤基因的表达,造成射线和基因对肿瘤的双重杀伤作用[1,2]。文献[3]报道 Egr-1 在照射后可使其下游基因表达迅速增加,其启动子是一种辐射敏感性调控序列 cArGs(即 E6)。p53 反应元件(pREs,5′-GAACATGTCCCAACATGTTG-3′)是 p53 蛋白上调下游基因表达的增强子序列,p53 通过与之特异性结合,能够诱导目的基因的表达增强[4]。然而,在常规照射分割剂量下,cArGs 诱导的治疗性基因表达强度低且持续时间短,治疗效果不理想[5]。正反馈是基因环路中的一种重要模式,指由特定基因编码蛋白与目的基因相互作用,构成对目的基因表达放大调控的基因亚网络[6,7]。本研究将正反馈基因环路引入放射-基因治疗,即将放射敏感性反应元件(cArGs)与 p53 反应元件(pREs)和 p53 基因串联构成的正反馈基因环路相耦联,构建放射控导的野生型 p53(wt-p53)蛋白正反馈基因环路重组质粒 pE6R4-p53-EGFP,拟利用 E6 对放射的敏感性,增加 wt-p53 的表达;表达增多的 p53 又正反馈作用于 p53 增强子序列 R4,进一步增强 p53 表达,从而大大提高 p53 的表达量,提高照射条件下体内外抗肿瘤效果。前期我们研究了该环路体外环境动力学特征及放大效应[8],本研究旨在此基础上进一步探讨体外环境中该环路在放射线诱导下对肺腺癌细胞的细胞周期、凋亡率和放射敏感性的影响,旨在为进一步研究该环路对裸鼠动物学模型的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 转染细胞、对照组 pE6-p53-EGFP/H1299 和 pR4-p53-EGFP/H1299 细胞均由本所前期实验稳定转染、筛选并鉴定获得;对照组 H1299($p53^{-/-}$)购于北京肿瘤检测中心细胞库,于含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中,5% CO_2、37 ℃培养;Giemsa 染液、碘化丙锭购于晶美试剂公司;Annexin V-APC 试剂盒 Bender 公司。

1.2 照射条件

采用直线加速器 8 MV-X 线,400 MU/min、4 Gy、源皮距 100 cm 的照射条件进行实验。

1.3 检测放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路对细胞周期的影响

将对照组 H1299($p53^{-/-}$)细胞、pE6-p53-EGFP/H1299 细胞、pR4-p53-EGFP/H1299 和治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 细胞分别给予 4 Gy 照射,12 h 后,予 0.25% 胰酶消化,10% FCS RPMI1640 培养基中和胰酶消化作用,收集细胞并调整至 1×10^7个细胞的单细胞悬液,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清;PBS 轻柔洗涤细胞,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,重复洗涤 1 次。向离心管中加入70%冰乙醇,4 ℃固定 18 h 以上,1 000 r/min,离心 5 min,弃乙醇;用 PBS 重悬细胞,1 000 r/min,离心 5 min,重复 3 次;离心后细胞团中加入 50 μg/ml RNase ,37 ℃消化 30 min,碘化丙啶(PI) 50 μg/ml,4 ℃避光染色 30 min 以上;流式细胞仪(FCM)检测细胞周期分布。

1.4 检测放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路对细胞凋亡的影响

将对照组 H1299($p53^{-/-}$)、pE6-p53-EGFP/H1299、pR4-p53-EGFP/H1299 细胞和治疗组 pE6R4-p53-EGFP/ H1299 细胞分别给予照射,24 h 后,常规消化、收集细胞,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,PBS 轻柔洗涤细胞,1 000 r/min,离心 5 min,重复此操作 2 次;用去离子水按 1∶4稀释结合缓冲液(4 ml 结合缓冲液 + 12 ml 去离子水);用 4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其浓度为 1×10^6/ml;取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-APC 和 10 μl 碘化丙锭溶液(20 μg/ml);混匀后于室温避光孵育 15 min;在反应管中加 400 μl PBS,流式细胞仪(FCM)分析。

1.5 细胞辐射剂量-存活曲线的绘制及 SER 的计算

将稳定转染 pE6-p53-EGFP 和 pE6R4-p53-EGFP 载体肺腺癌 H1299($p53^{-/-}$)细胞和未转染的阴性对照 H1299($p53^{-/-}$)细胞,按照射剂量大小分别接种 500、800、1 000、2 000、10 000、100 000 个细胞于 60 mm 的培养皿,每个剂量点设立 3 个平行样品;分别给予 0、1、2、4、6、8 Gy 照射;培养皿细胞置于 37 ℃、5% CO_2孵箱中常规培养,每隔 2 ~ 3 d 换液 1 次,共培养 10 d;用 PBS 将细胞轻柔清洗 2 遍,Giemsa 染色,克隆计数;按照如下公式计算细胞存活分数(survival fraction,SF),并用未照射组的集落形成率(plating efficiency,PE)进行校正[9]:PE = 未照射组克隆数/细胞克隆数 × 100% ;SF = 某一照射实验组克隆数/(该组细胞接种数 × PE) × 100% 。根据不同放疗剂量得到相应的一系列 SF,用单击多靶数学模型拟合细胞的存活曲线,并求出平均致死剂量(Do)值和准域剂量(Dq)值。单击多靶数学模型公式:$SF = 1-(1-e^{-KD})^N$;$SF = 1-(1-e^{-D/Do})^N$;$Do = 1/K$。用 Graph-pad Prism 4.0 程序按多靶单击模型进行曲线拟合,获得辐射剂量-存活曲线,求出 Do、Dq 值。放射增敏比(sensitive enhancement ratio, SER)按照下列公式进行计算:$SER(Do) = Do_{对照组}/Do_{实验组}$;$SER(Dq) = Dq_{对照组}/Dq_{实验组}$。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 13.0 进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路对肺腺癌细胞周期的影响

如图 1 所示,对照组 H1299($p53^{-/-}$)、pE6-p53-EGFP/H1299 细胞和 pR4-p53-EGFP/H1299 细胞在放射线作用下,发生 G_0/G_1阻滞的比例分别为(38.47 ± 0.87)%、(62.57 ±

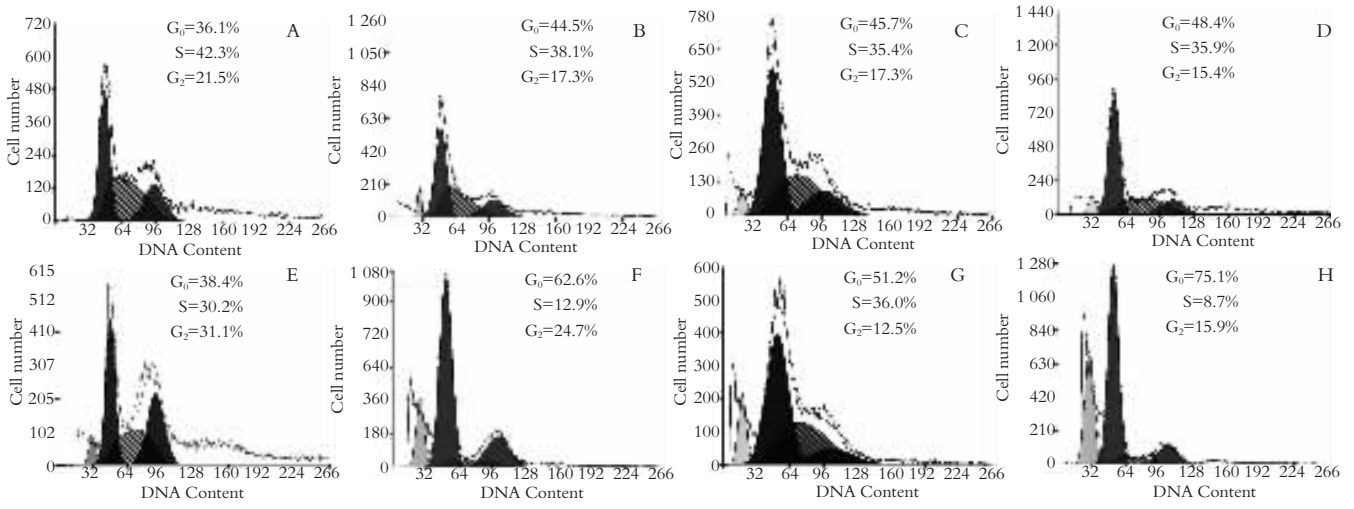
0.76)%和(51.23±2.41)%,与上述3组细胞照射前相比,其发生的G_0/G_1期阻滞分别增加了2.37%、18.04%和5.5%。而治疗组pE6R4-p53-EGFP/H1299肺腺癌细胞(75.13±1.42)%细胞发生G_0/G_1期阻滞,与该组细胞照射前相比增加了26.76%。

2.2 放射控导的wt-p53蛋白正反馈基因环路对肺腺癌细胞凋亡的影响

结果如图2所示,放射后各组细胞的凋亡率均高于放射前组;放射后治疗组pE6R4-p53-EGFP/H1299细胞的凋亡率(23.73±0.21)%,分别是对照组H1299($p53^{-/-}$)细胞[(4.17±0.12)%]、pE6-p53-EGFP/H1299细胞[(15.67±0.32)%]、pR4-p53-EGFP/H1299细胞[(9.23±0.15)%]凋亡率的5.69倍、1.51倍和2.57倍。

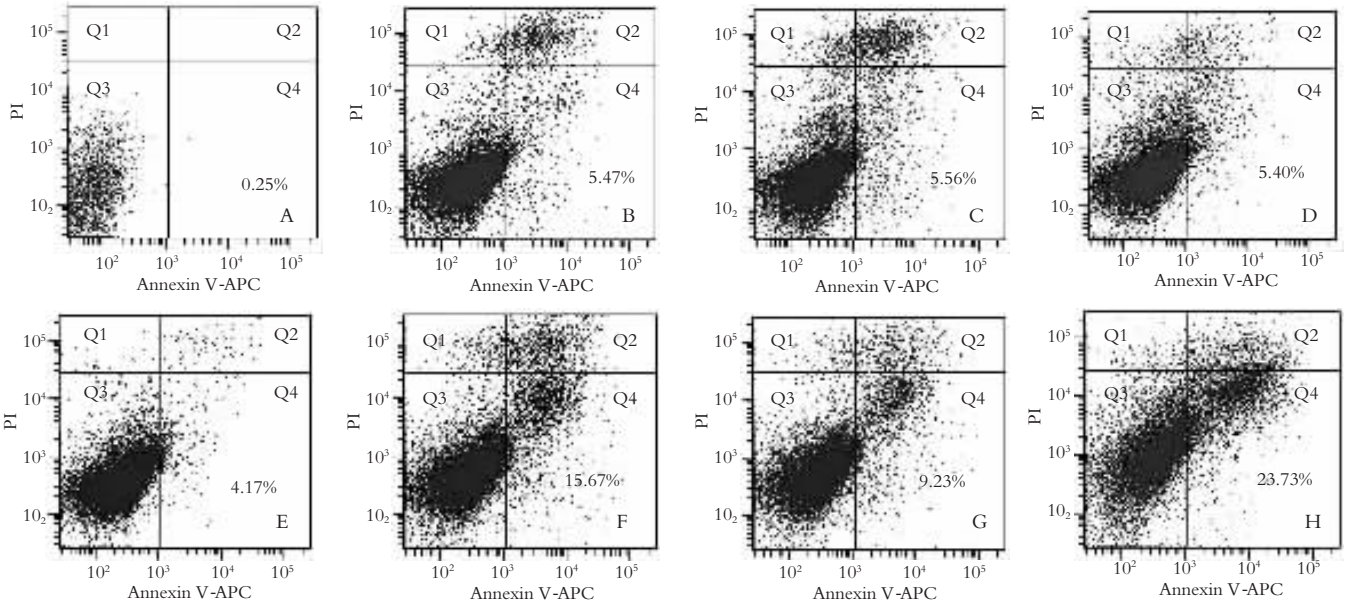
2.3 放射控导的wt-p53蛋白正反馈基因环路对肺腺癌细胞放射敏感性的影响

治疗组pE6R4-p53-EGFP/H1299细胞和对照组H1299($p53^{-/-}$)、pE6-p53-EGFP/H1299细胞在接受不同照射剂量8 MV-X线照射后,培养10 d,在倒置显微镜下可见大小典型的细胞克隆,用克隆形成分析法检测细胞增殖和放射敏感性,经GraphPad Prism 4.0软件拟合各组肺腺癌H1299细胞的半对数



A:放射前对照组H1299($p53^{-/-}$)细胞;B:放射前对照组pE6-p53-EGFP/H1299细胞;C:放射前对照组pR4-p53-EGFP/H1299细胞;D:放射前治疗组pE6R4-p53-EGFP/H1299细胞;E:放射后对照组H1299($p53^{-/-}$)细胞;F:放射后对照组pE6-p53-EGFP/H1299细胞;G:放射后对照组pR4-p53-EGFP/H1299细胞;H:放射后治疗组pE6R4-p53-EGFP/H1299细胞

图1 放射控导的wt-p53蛋白正反馈基因环路对细胞周期的影响



A:放射前对照组H1299($p53^{-/-}$)细胞;B:放射前对照组pE6-p53-EGFP细胞;C:放射前对照组pR4-p53-EGFP细胞;D:放射前治疗组pE6R4-p53-EGFP细胞;E:放射后对照组H1299($p53^{-/-}$)细胞;F:放射后对照组pE6-p53-EGFP细胞;G:放射后对照组pR4-p53-EGFP细胞;H:放射后治疗组pE6R4-p53-EGFP细胞

图2 放射控导的wt-p53蛋白正反馈基因环路对细胞凋亡的影响

存活曲线,pE6R4-p53-EGFP/H1299 重组质粒可显著降低肺腺癌细胞的生存率,且呈照射剂量依赖性。这种增强的靶细胞杀伤效应是由于放射控导的 wt-p53 蛋白正反馈基因环路显著提高了靶细胞的放射敏感性。治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 细胞组 Do 值(0.91 Gy)和 Dq 值(0.77 Gy)较对照组 pE6-p53-EGFP/H1299 细胞 Do 值(1.073 Gy)和 Dq 值(1.52 Gy)、H1299($p53^{-/-}$)细胞 Do 值(1.413 Gy)和 Dq 值(2.03 Gy)显著降低,而治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 SER(Do)1.55 和 SER(Dq)2.63 较 pE6-p53-EGFP/H1299 SER(Do)1.32 和 SER(Dq)1.34 显著升高。

3 讨论

50% ~60% 的非小细胞肺癌(NSCLC)和 70% ~90% 的小细胞肺癌(SCLC)中 p53 基因发生突变[10]。研究[11]表明野生型 p53 蛋白可通过其内源性和外源性途径参与细胞周期调控,阻止细胞从 G_1 期进入 S 期,对细胞分裂与增殖起负调节作用。纠正 p53 缺陷或促进其表达是肿瘤基因治疗的一种有效方法。国内外学者将 Egr-1 基因和许多治疗性基因相耦联,通过放射线诱导其内部的 cArGs(即 E6)反应元件,促使其下游治疗性基因表达,以期最终达到提高肿瘤细胞对放射线的敏感性,抑制肿瘤细胞生长的目的[3]。前期实验研究[8]中我们成功筛选出稳定转染放射控导 wt-p53 正反馈基因环路载体的肺腺癌细胞株,并发现该环路在射线诱导下对目的基因 wt-p53 蛋白表达在空间和时间上起到显著的调控作用。为验证该正反馈基因环路对肺腺癌细胞生物学效应的影响,我们采用 FCM 技术检测其对肺腺癌细胞周期的影响,结果显示:给予 4 Gy X 线照射,细胞 DNA 受到损伤,G_1/S 期检查点功能受到干扰,与对照组 pE6-p53-EGFP/H1299、pR4-p53-EGFP/H1299 细胞和 H1299($p53^{-/-}$)细胞相比,治疗组 pE6R4-p53-EGFP/H1299 细胞的细胞周期明显阻滞于 G_0/G_1(75.13 ± 1.42)%,S 期(8.63 ± 0.31)% 比例下降,提示通过辐射反应元件 cArGs,激活其下游基因表达即可诱导野生型 p53 蛋白急剧表达,野生型 p53 蛋白和下游分子之间相互作用,使野生型 p53 基因发挥其基因网络的“瀑布效应”,从而使细胞周期阻滞于 G_0/G_1,此期抑制可使受照射细胞获得时间来进行 DNA 修复,野生型 p53 蛋白监视 G_1/G_0 期事件得以完成。同样,我们用 FCM 检测了该环路对肺腺癌细胞凋亡率的影响,结果发现:照射后各组细胞凋亡率均高于照射前组;照射后治疗组凋亡率分别是对照组的 2.57、1.51 倍和 5.69 倍,提示将 cArGs(E6)与 p53 反应元件(pR4)串联取代 pCI-neo 载体的 CMV 增强子序列,在放射线诱导下,可发挥正反馈基因环路放大目的基因表达的作用,使野生型 p53 蛋白在低剂量放射诱导下在肺腺癌细胞中持续表达,诱导细胞凋亡。

Do 值是细胞放射敏感性的一个主要指标。本实验中用其探讨该环路对肺腺癌细胞放射敏感性的影响,结果发现细胞受不同放射剂量照射后,集落形成能力随剂量增加而下降,在同一剂量照射下,治疗组细胞 Do 值(0.91)明显低于转染对照组细胞。治疗组细胞和对照组细胞放射增敏比(SER)分别为 1.55 和 1.32,说明该环路具有提高细胞放射敏感性作用,其作用机制与转染细胞体内大量表达的 wt-p53 蛋白密切相关。与国外报道[12]的 p53 基因状态与肿瘤放射敏感性的关系最为密切的结论相一致。

总之,我们通过对放射控导的 wt-p53 正反馈基因环路对肺腺癌细胞生物学特性的研究发现,放射-基因治疗不仅可增强 wt-p53 基因表达的可控性,也有利于克服 p53 突变引起的辐射抗性,提高肿瘤放射敏感性,降低等效照射剂量,减轻正常组织损伤,为肺癌治疗提供新的模式,具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Weichselbaum R R, Kufe D W, Advani S J, *et al*. Molecular targeting of gene therapy and radiotherapy[J]. Acta Oncol, 2001, 40(6): 735 – 738.

[2] Hu Y, Ouyang W, Wu F, *et al*. Enhanced radiosensitivity of SW480 cells via TRAIL up-regulation mediated by Egr-1 promoter[J]. Oncol Rep, 2009, 22(4): 765 – 771.

[3] Kufe D, Weichselbaum R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 326 – 329.

[4] Nakamura Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis [J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 7 – 11.

[5] Scott S D, Marples B, Hendry J H, *et al*. A radiation-controlled molecular switch for use in gene therapy of cancer[J]. Gene Ther, 2000, 7(13): 1121 – 1125.

[6] Kobayashi T, Chen L, Aihara K. Modeling genetic switches with positive feedback loops[J]. J Theor Biol, 2003, 221(3): 379 – 399.

[7] Karig D, Weiss R. Signal-amplifying genetic circuit enables *in vivo* observation of weak promoter activation in the Rhl quorum sensing system [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 89(6): 709 – 718.

[8] 毛丽伟, 王卫东, 李德志, 等. 放射控导正反馈基因环路对肺癌 wt-p53 基因靶向性表达的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(19): 1921 – 1923.

[9] 沈瑜, 糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 178 – 183.

[10] Maniwa Y, Yoshimura M, Obayashi C, *et al*. Association of p53 gene mutation and telomerase activity in resectable non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2001, 120(2): 589 – 594.

[11] Malkin D. The role of p53 in human cancer[J]. J Neurooncol, 2001, 51(3): 231 – 243.

[12] Lacroix M, Toillon R A, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(2): 293 – 325.

(**收稿**:2009-08-24;**修回**:2009-09-25)

(编辑 王小宴)