

· 论 著 ·

腺病毒介导 p53 基因对人胃癌细胞热增敏的作用

张珊文 肖绍文 吕有勇

【摘要】 目的 评价腺病毒介导 p53 基因对人胃癌细胞热增敏的作用。**方法** 以重组腺病毒介导 p53 基因悬液(Adp53)感染 4 种不同 p53 状况的人胃癌细胞,用免疫组化法和 Western blot 法检测 p53 蛋白在胃癌细胞中的表达;用细胞存活分数来反映细胞增殖状况;用 TUNEL 法来检测细胞凋亡。感染 Adp53 的 W 和 M 胃癌细胞经 42℃ 2h 或 43℃ 0.5 h 加温后 24 h,用流式细胞计检测细胞周期分布和凋亡;胃癌细胞的种植肿瘤内注射 Adp53 悬液后 48 h,行 43℃ 0.5 h 加温,以肿瘤相对体积增长曲线观察肿瘤抑制情况。**结果** 高效靶比(100MOI)Adp53 产生细胞高转染率和 p53 基因在 4 种胃癌细胞中均高表达,并产生 G2/M 期阻滞和凋亡及细胞增殖抑制。Adp53 基因的作用不依赖胃癌细胞内在的 p53 状态。如果以凋亡作为热效应,Adp53 对 2 种加温方式的热增敏比,对 W 细胞为 1.6~3.3,而对 M 细胞为 1.8~2.1。Adp53 对 W 细胞肿瘤 43℃ 0.5 h 加温的热增敏比为 1.7,而对 M 细胞肿瘤为 1.6。**结论** 腺病毒介导 p53 基因提高了人胃癌细胞的热敏感性,这种作用不依赖于细胞内在 p53 状况。本实验为 p53 基因治疗与热疗结合提供了可靠的实验依据。

【关键词】 胃癌; 热疗; 腺病毒介导 p53 基因

Enhanced effect of adenovirus-mediated p53 gene on thermosensitivity of human gastric carcinoma cells

ZHANG Shanwen, XIAO Shaowen, LÜ Youyong. Department of Radiotherapy, The School of Oncology, Beijing University, Beijing 100036, China

【Abstract】 Objective To evaluate the enhanced effect of adenovirus-mediated p53 gene on thermosensitivity of human gastric carcinoma cell lines. **Methods** Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 gene (Adp53) was transfected into four human gastric carcinoma cell lines with different p53 genetic status. P53 protein expression was detected by immuno-histochemistry assay and the Western blot assay. Cell survival and apoptosis of the cells was assessed using a clonogenic and TUNEL assay, respectively. W and M cells which had been infected with Adp53 were heated at 42℃ for 2h or 43℃ for 0.5h. Then 24h later cell cycle distribution and apoptotic rate were determined by flow cytometry. Nude mice xenograft models of W and M cell were intratumorally injected with Adp53, 48h later, and after the heating at 43℃ for 0.5h, relative volume growth curve of the tumor was depicted to evaluate the tumor regression. **Results** Inducing of G2/M arrest and apoptosis and inhibition of tumor cell proliferation were observed after the infection of Adp53 at high MOI (100 MOI) which gave rise to high Adp53 transfer rate, and efficiently p53 protein expression was demonstrated in four human gastric carcinoma cell lines in this study. The thermo-enhancement ratio of Adp53 at two heating schedules described above was 1.6~3.3 for W cell and 1.8~2.1 for M cell in vitro. Thermo-enhancement ratio of Adp53 at 43℃ for 0.5h was 1.7 for W cell planting tumor and 1.6 for M cell planting tumor in vivo. **Conclusion** This study demonstrated that Adp53 transfer increases the cellular thermosensitivity of human gastric carcinoma in vitro and in vivo independent of its intrinsic p53 status, and supported that combination of p53 gene therapy with hyperthermia may enhance the adenovirus-mediated p53 gene on thermosensitivity of gastric cells.

【Key words】 Gastric carcinoma; Hyperthermia; Adenovirus-mediated p53 gene

热产生的 DNA 损伤导致肿瘤细胞周期阻滞,并引导细胞程序性死亡,即凋亡(apoptosis)。正常功能的野生型 p53 对热引起的细胞周期阻滞和凋亡起促进作用,而 p53 基因的变异将失去这种功能,这是产生肿瘤细胞热抵抗性的重要原因之一^[1,2]。通过腺病毒介导 p53 基因(adenovirus-mediated p53 gene, Adp53)转

染的方法,可以有效地重建肿瘤细胞内变异的 p53 基因,使肿瘤细胞的热敏感性明显提高^[3]。复制缺陷型重组腺病毒载体是目前应用最多的基因载体。它具有以下优点:易纯化,可获很高滴度,可用于临床肿瘤治疗^[4,5];宿主范围广,感染率高;基因组为 36 kb,可插入较大的外源基因;遗传毒性低,由腺病毒转载的外源基因是以附加型方式表达而不整合入宿主基因组,既有效又安全^[6,7]。Adp53 悬液感染肿瘤细胞,外源 p53 基因在细胞核内高度表达,并产生细胞周期 G2/M 期

基金项目:国家自然科学基金资助课题(No. 39670234)

作者单位:100036 北京大学临床肿瘤医院放射治疗科

阻滞和凋亡及细胞增殖生长抑制作用^[7-9]。Adp53 应用于肿瘤临床已成为肿瘤基因治疗的新策略^[4,5]。Adp53 可提高放疗和化疗的疗效,是否也可以提高热疗的疗效,所见报道极少^[3]。本研究的目的是采用更接近临床应用的 Adp53 感染胃癌细胞,观察外源 p53 基因在胃癌细胞内的表达、抑制肿瘤细胞增殖以及提高肿瘤细胞热敏感性的作用和机制,为 p53 基因与热疗结合的临床治疗提供实验依据。

材料与方法

一、细胞系与培养条件

胃癌细胞:基因转录方法构建的 3 种胃癌细胞,即含野生型 p53 基因的 BGC823 细胞(略写为 W)、含突变型 p53 基因的 BGC823 细胞(略写为 M)、含空载质粒即 p53 基因缺失的 BGC823 细胞(略写为 Neo);有 p53 变异的亲本人胃癌细胞 BGC823 细胞(略写为 823)。这 4 种不同 P53 状况的人胃癌细胞系应用于本实验中。

293 细胞:人胚肾细胞系,带有腺病毒的 E1 基因,作为腺病毒扩增的种子细胞。

胃癌细胞和 293 细胞都由本院肿瘤分子生物学实验室提供。以上细胞都以含有 10% 胎牛血清和抗生素的 DMEM 培养基传代培养。

二、重组腺病毒的扩增、纯化和滴度测定

重组腺病毒 p53 基因由中山医科大学肿瘤医院曾益新教授惠赠。Adp53 为野生型 p53 基因表达载体和 E1 基因缺失的 5 型腺病毒的重组体,其中 p53 基因表达载体由巨细胞病毒(CMV)启动子、野生型 p53 基因(cDNA)和 SV40 多聚腺苷信号组成,并携带绿色荧光蛋白基因(GFP)。在荧光显微镜下为可见绿光的 Adp53-GFP 阳性细胞^[6,7]。将 293 细胞接种在 250 cm² 的大培养瓶中,待细胞生长至 90% 汇合状态时,以 20 效靶比(multiplicity of infection, MOI)的病毒量感染细胞 24~48 h 后,待细胞出现病变效应(Cytopathic effect, CPE)而未破时,收获细胞,离心,PBS 重悬细胞,于 -196℃ 和 37℃ 间反复冻融 3 次后,离心,去除细胞碎片,取上清 15 000 r/min 离心 15 min,再经 Cscl 密度梯度离心法进一步纯化病毒^[2,8-10]。通过空斑实验测定病毒的滴度(单位为 plaque-forming units, pfu/ml,即空斑形成单位/毫升)^[8,9]。

三、重组腺病毒转染效率的测定

分别用 0、50、100、150 和 200 MOI 的 Adp53(带 GFP 荧光基因)感染 4 种胃癌单层细胞,每种滴度各 2 个平皿。2 h 后吸去病毒液,各加 3 ml 培养液继续培养,24~48 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 表达阳性的细胞数,同时在可见光下记数该视野内的总细胞数,计

算转染率(即 GFP 表达阳性的细胞数与总细胞数的比率)^[9]。以选择最佳滴度和感染时间。

四、免疫组化法检测 p53 蛋白表达^[8,9]

胃癌细胞以 5×10^5 /瓶接种于 75 cm² 的培养瓶中,12 h 后用 MOI 为 100 的 Adp53 感染单层细胞,0 h、12 h、24 h、48 h、3 d、4 d、5 d、6 d 分别消化细胞,离心涂片,以 100% 冷乙醇固定,通过免疫组化法检测 Adp53 介导的 p53 基因在细胞中的表达。所用抗体为鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体 D₀-1(D₀公司)。

五、Western blot 法检测 p53 蛋白表达^[8]

提取 Adp53(100 MOI)感染 2 d 后的 4 种胃癌细胞的总蛋白及相对应的未转染 Adp53 的 4 种胃癌细胞的总蛋白,用 BCA 法行蛋白含量测定。取 75~100 μg 蛋白在 10% (体积分数) SDS-PAGE 胶上电泳,然后转膜,杂交,采用 DAB 法染色,进行 Western blot 法检测。抗体为鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体 D₀-1。

六、细胞存活率测定

4 种胃癌细胞以 10^3 个分别接种于直径 60 cm 的培养皿中,6 h 后分别加入 100 MOI 的 Adp53,而对照组取 10^2 细胞/皿,不加 Adp53。细胞培养 14 d, Giemsa 染色,以克隆形成数计算存活率,以对照组的克隆形成率为着盘率。根据公式:细胞存活率 = 加 Adp53 后的克隆数/接种细胞数 × 着盘率,计算加入 Adp53(100 MOI)后 4 种细胞的存活率。

七、末端标记法原位检测凋亡效应(TUNEL 分析)^[9]

收集 Adp53 感染后 2 d 和未经处理的 4 种胃癌细胞,消化、离心、涂片,4% 多聚甲醛固定,通过 3' 末端标记法原位检测细胞凋亡(德国 Boehringer-Mannheim 公司)。

八、流式细胞仪分析细胞周期分布和凋亡比例^[9]

4 种细胞经 Adp53 感染后 48 h,或单纯加温后 24 h,或 Adp53 感染后 48 h 加温后 24 h 收获细胞,行流式细胞计分析(FACS240 型),测定细胞 DNA 含量,并勾绘出细胞周期分布直方图,在 G₀/G₁ 峰前出现独特的亚二倍体细胞的 Sub-G₁ 峰被确定为特异的伴 DNA 降解的凋亡细胞峰。

九、加温实验^[1]

W 细胞和 M 细胞,单层培养于培养瓶,单纯加温组或 Adp53 感染 48 h 后加温组,拧紧瓶盖,将培养瓶塑封后浸泡于恒温水浴锅中(JULABO LGMBH 型),控温误差为 $\pm 0.03^\circ\text{C}$, 42°C 2 h 或 43°C 0.5 h 加温后换以新鲜培养基,继续传代培养。每次实验每种细胞 2 瓶,重复实验 3 次。

W 细胞和 M 细胞悬液种植于裸鼠右下腹股沟皮下,肿瘤直径达 5~10 mm 时,麻醉后将裸鼠右下腹

固定,将荷瘤下肢浸泡于 43℃ 0.5 h。用游标卡尺量取瘤体的两个直径,以公式 $\pi/6 \{ (\text{直径} 1 + \text{直径} 2) / 2 \}^3$ 来计算肿瘤体积。以观察天数为横坐标,以加热当日的体积为 1,以肿瘤体积增加的倍数(即相对体积)为纵坐标,将对应于观察天数的相对体积点连接为肿瘤热抑制曲线。每次实验每种细胞种植裸鼠 4 只,重复实验 2 次。3 种试验下的抑瘤率 = (加温后 12 d 对照组相对体积 - 试验组相对体积) ÷ (对照组相对体积)。Adp53 的热增效比 = Adp53 结合加温的抑瘤率/单纯加温的抑瘤率。

结 果

一、高滴度重组缺陷型腺病毒的制备

经 293 细胞繁殖的重组病毒 p53 原液,经 CsCl 密度梯度超速离心后,再经空斑实验测定其滴度为 3.0×10^{12} pfu/ml,供实验使用。

二、腺病毒对胃癌细胞转染率与病毒剂量 MOI 密切相关

胃癌细胞对腺病毒比较敏感,并随病毒量的加大,转染率逐渐升高。当病毒量为 50 MOI 时,4 种胃癌细胞 GFP 阳性率均在 40% 左右;当病毒量为 100 MOI 时,感染率达 (80 ~ 90)%。故本实验病毒量以 100 MOI 为佳。

三、免疫组化法显示外源性 p53 基因在胃癌细胞中的表达

100 MOI 剂量 Adp53 感染 4 种胃癌细胞后 12 h, p53 蛋白在核内有表达,36 h 呈强阳性表达,48 h 表达最强,到第 5 天则已为弱阳性表达,第 6 天接近不加 Adp53 的对照组。本实验选病毒感染 48 h 后结合加温。而不加 Adp53 的 Neo 和 823 对照组细胞未见 p53 表达,而 W 和 M 对照组细胞则呈弱阳性表达。

Western Blot 结果显示,4 种胃癌细胞加 100 MOI 的 Adp53 后,在 53 KD 位置上均有一条清晰的杂交带,不加 Adp53 的对照组 823 和 Neo 细胞在同一位置无杂交带,而对照组 W 细胞和 M 细胞则在 53 KD 处有很浅的一条杂交带。

四、Adp53 对 4 种胃癌细胞生长的影响

加入 Adp53(100 MOI)后,4 种胃癌细胞的克隆形

成率分别为:W 细胞 45%、M 细胞 37%、Neo 细胞 41%、823 细胞 43%,而对照组 4 种胃癌细胞的克隆率分别为:W 细胞 72%、M 细胞 84%、Neo 细胞 79%、823 细胞 80%。故 Adp53 对 4 种胃癌细胞生长抑制率分别为:W 细胞 37%、M 细胞 56%、Neo 细胞 48%、823 细胞 46%,以对 M 细胞生长抑制作用最明显。

流式细胞分析结果显示,加入 Adp53(100 MOI)后,对该 4 种细胞,G2 期细胞增多,S 期细胞减少,与对照组比较,差异有非常显著性($P < 0.01$),而 G1 期细胞变化不大。

五、Adp53 基因可诱导 4 种胃癌细胞凋亡

以 100 MOI 的 Adp53 感染 4 种胃癌细胞 48 h 后,流式细胞分析结果显示,与对照组比较,W 细胞凋亡率平均增加近 1 倍,M 细胞凋亡率平均增加 2.6 倍,而 Neo、823 细胞凋亡率平均增加倍数分别为 1.6 倍、2.1 倍。TUNEL 结果显示,加入 Adp53 后,可诱导 4 种胃癌细胞凋亡,但凋亡比例不一样,其中 W 细胞约 20%,M 细胞、Neo 细胞、823 细胞约 25% ~ 30%,以 M 细胞为最高。

六、Adp53 结合加温后 24 h 细胞周期分布

对 W 细胞来说(表 1),与空白对照组比较,单纯 Adp53 作用出现 G2/M 期明显阻滞,凋亡率增加 2.3 倍;单纯 42℃ 2 h 或 43℃ 0.5 h 加温组的各细胞周期没有发生明显变化,凋亡率分别增加 1.5 倍或 4.5 倍;Adp53 结合 42℃ 2 h 或 43℃ 0.5 h 加温,发生 G2/M 期更明显阻滞,凋亡率分别增加 7.2 倍或 7.7 倍。如果以凋亡作为热效应,Adp53 对 42℃ 2 h 的热增效比为 3.3,而对 43℃ 0.5 h 的增效比为 1.6。对 M 细胞来说(表 2),结果也和 W 细胞结果一样,Adp53 对 42℃ 2 h 的增效比为 2.1,而对 43℃ 0.5 h 的增效比为 1.8。W 细胞种植肿瘤相对生长曲线(图 1)显示:单纯 43℃ 0.5 h 加温和单纯 Adp53 都使肿瘤生长受到抑制,肿瘤抑制率分别为 15.8% 和 21.8%。而 Adp53 结合 43℃ 0.5 h 肿瘤生产抑制更明显,肿瘤抑制率为 27.2%,Adp53 的热增效比为 1.7。M 细胞种植肿瘤相对生长曲线(图 2)显示结果与 W 细胞相似,单纯加温、单纯 Adp53 和 Adp53 结合加温,肿瘤抑制率分别为 24.2%、31.0% 和 37.8%,Adp53 的热增效比为 1.6。

表 1 Adp53 结合加温对 W 细胞周期和凋亡的作用($\bar{x} \pm s$)

条 件	G1	S	G2/M	Sub-G1	热增效比*
对照	38.7 ± 6.2	39.3 ± 7.3	22.0 ± 1.6	2.6 ± 1.7	-
Adp53	38.5 ± 2.4	26.8 ± 2.7	34.7 ± 1.0	8.5 ± 0.7	-
42℃ 2 h	36.8 ± 5.0	37.8 ± 3.9	25.3 ± 6.0	6.5 ± 4.8	-
43℃ 0.5 h	42.0 ± 7.1	34.0 ± 4.7	24.0 ± 4.3	14.2 ± 12.2	-
Adp53 + 42℃ 2 h	44.8 ± 5.1	21.8 ± 6.7	34.0 ± 2.9	21.4 ± 9.8	3.3
Adp53 + 43℃ 0.5 h	35.8 ± 2.1	40.5 ± 7.6	23.8 ± 7.1	22.5 ± 12.2	1.6

注: * 热增效比 = (Adp53 + 42℃ 2 h 凋亡率) / 42℃ 2 h 凋亡率

表 2 Adp53 结合加温对 M 细胞周期和凋亡的作用($\bar{x} \pm s$)

条 件	G1	S	G2/M	Sub-G1	热增效比
对照	45.8 ± 1.5	34.8 ± 0.5	20.0 ± 0.8	2.2 ± 1.5	—
Adp53	41.3 ± 2.4	33.5 ± 6.2	25.8 ± 7.8	8.2 ± 5.2	—
42℃ 2 h	41.3 ± 5.0	36.5 ± 12.2	22.0 ± 5.9	4.7 ± 1.5	—
43℃ 0.5 h	43.8 ± 3.9	38.5 ± 4.7	17.5 ± 5.1	7.5 ± 12.2	—
Adp53 + 42℃ 2 h	42.5 ± 10.8	32.0 ± 3.3	25.3 ± 13.4	9.8 ± 2.4	2.1
Adp53 + 43℃ 0.5 h	41.5 ± 2.5	36.3 ± 9.9	22.5 ± 12.5	13.3 ± 0.5	1.8

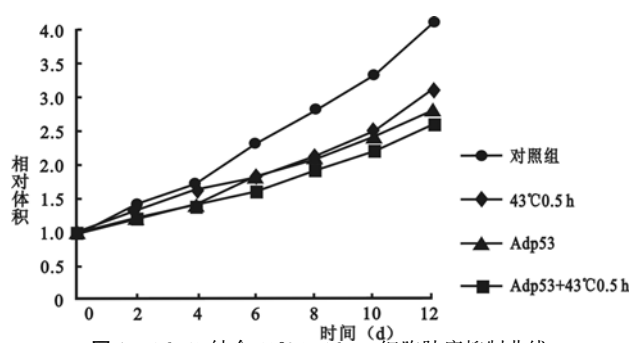


图 1 Adp53 结合 43℃0.5 h W 细胞肿瘤抑制曲线

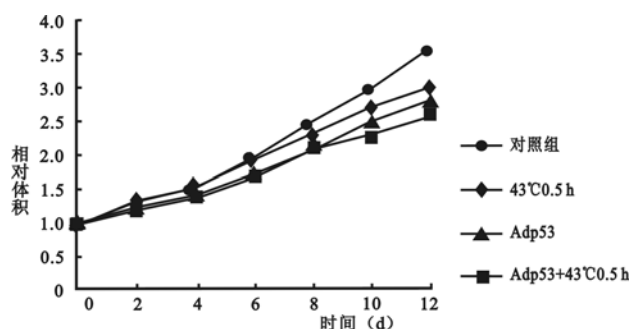


图 2 Adp53 结合 43℃0.5 h M 细胞肿瘤抑制曲线

讨 论

Reiser^[7]报道肝癌细胞感染 Adp53 后, p53 蛋白在细胞核内表达, 并伴以 p21 基因和 Bax 基因表达, 和伴以 CD95 (Apo-1/Fas) 基因表达上调, 这也许就是 Adp53 转染使细胞周期 G2/M 期阻滞和诱导凋亡和细胞增殖生长抑制的机制。细胞病毒感染率随病毒剂量即 MOI 的增加而增加, 本实验采用 100 MOI 达到细胞 90% 左右的高感染率, 伴以 p53 蛋白在细胞核内高效表达, 同时出现细胞周期 G2/M 期阻滞和诱导凋亡和细胞增殖生长抑制, 这与国内外报道一致^[6,9]。可引起 DNA 损伤的放射线、化学剂和热, 都产生细胞周期阻滞和诱导凋亡, 正常功能的野生型 p53 基因即促进这些效应, p53 基因缺失或变异即减弱甚至破坏了这些效应。人类肿瘤的 50% 以上都存在 p53 变异而功能失

常, 从而降低了治疗的疗效。通过导入野生型 p53 来重建细胞内变异的 p53 已成为肿瘤治疗的新策略^[4,5]。本研究结果证实: 无论用细胞培养共染还是细胞种植肿瘤采用瘤内注射方法, 都显示了 Adp53 对胃癌细胞的热增敏作用, 为热疗临床结合 p53 基因治疗提供了可靠的实验依据。

参 考 文 献

- 1 张珊文, 肖卫群, 吕有勇. 抑癌基因 p53 提高人胃癌细胞热敏感性的作用. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 2: 94-96.
- 2 Matsumoto H, Takahashi A, Wang X, et al. Transfection of p53 - knockout mouse fibroblasts with wild-type p53 increases the thermosensitivity and stimulates apoptosis induced by heat stress. Int J Radiat Oncol Phys, 1997, 1: 197-203.
- 3 Qi V, Weinrib L, Ma N, et al. Adenoviral p53 gene therapy promotes heat-induced apoptosis in a nasopharyngeal carcinoma cell line. Int J Hyperthermia, 2001, 1: 38-47.
- 4 Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. J Clin Oncol, 1998, 6: 2221-2232.
- 5 Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst, 1999, 91: 763-771.
- 6 He P, Tang Z, Ye S. The expression and localization of wild-type p53 - GFP fused gene on human high-metastasis hepatocellular carcinoma cell line. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2000, 2: 105-107.
- 7 Reiser M, Neumann I, Schmiegel W, et al. Induction of cell proliferation arrest and apoptosis in hepatoma cells through adenovirus-mediated transfer of p53 gene. J Hepatol, 2000, 5: 771-782.
- 8 Brand K, Klocke R, Pobetaling A, et al. Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. Gene Ther, 1999, 6: 1054-1063.
- 9 邱兆华, 劳妙芬, 王艳飞, 等. 腺病毒介导多基因在肺癌细胞中的表达及致凋亡效应. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 2: 83-86.
- 10 Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. Jpn J Med Sci Biol, 1994, 47: 157-166.

(收稿日期: 2002-03-29)

(本文编辑: 郭正成)