

文章编号: 1007-4627(2007)02-0112-05

# 辐射诱导促进 *AdCMV-p53* 转染前列腺癌细胞\*

张红<sup>1</sup>, 刘兵<sup>1,2</sup>, 高清祥<sup>3</sup>, 谢漪<sup>1</sup>, 郝冀方<sup>1</sup>,  
段昕<sup>1</sup>, 周清明<sup>1</sup>, 王燕玲<sup>1</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 兰州军区疾病控制中心, 甘肃 兰州 730020;

3 兰州大学生命科学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 用腺病毒重组体(*AdCMV-p53/GFP*)转染经 0.5, 1.0 和 2.0 Gy  $\gamma$  射线辐射处理的前列腺癌细胞[PC-3(*null p53*)], 用克隆形成法检测细胞增殖能力, 用流式细胞分析法测定腺病毒重组体转染率和外源性 p53 蛋白表达。结果提示, 辐射诱导使腺病毒重组体转染 PC-3 细胞提高 7%—39%。辐射联合 *AdCMV-p53* 转染组 p53 表达水平提高 18.5%—35.4%。与单纯 *AdCMV-p53* 转染组和单纯辐射组相比, 辐射联合 *AdCMV-p53* 转染组细胞存活率分别降低 25%—64% 和 22%—65%。

**关键词:** p53 基因; 辐射; 腺病毒载体; 前列腺癌; 辐射敏感性

**中图分类号:** Q256; Q279; Q274; Q37

**文献标识码:** A

## 1 引言

目前, 恶性肿瘤依然是严重威胁人类生命健康的一类常见病和多发病。在肿瘤治疗上, 恶性肿瘤治疗仍以手术、放疗和化疗为主, 其它治疗方法也在不断探索中。到目前为止, 尚未找到通用和有独特疗效的肿瘤治疗方法。许多研究业已证明, 肿瘤细胞对化疗敏感性差异远远高于对放疗敏感性差异(即在肿瘤治疗上, 放疗的通用性高于化疗), 与手术治疗相比, 放疗具有相对保留人体组织器官及其功能的特点, 因此, 放射治疗依然是其它方法无可替代的主要肿瘤治疗手段之一。

肿瘤基因治疗是近年来发展起来的极具发展前景的肿瘤治疗新方法, 但与其它肿瘤治疗方法一样存在一些不足。例如, 对肿瘤组织缺乏特异性、外源基因转导效率低、外源基因在机体内表达水平不高和潜在的生物危险性等。为此, 美国肿瘤放射治疗学家 Weichsebaum 等<sup>[1]</sup>于 1992 年提出了肿瘤基因-放射治疗的设想, 即将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导(radiation-inducible)特性的基因转入体内,

在对肿瘤实施局部放疗时诱导肿瘤杀伤基因表达, 辐射和基因对肿瘤产生协同杀伤作用。一些研究表明, 辐射联合 p53 基因可明显增强对肿瘤细胞的抑制作用<sup>[2-9]</sup>。但有关低剂量辐射(低于临床治疗剂量)对基因治疗影响的研究未见报道。本研究旨在探讨低剂量辐射联合 *AdCMV-p53* 转染治疗前列腺癌的可能性。

## 2 材料与方法

### 2.1 重组腺病毒载体和细胞系

重组腺病毒 *AdCMV-p53* 和 *AdCMV-GFP* 由军事医学科学院吴祖泽院士惠赠。293 细胞为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系, 购自 ATCC [American Type Culture Collection, 美国模式菌种收集中心, (ATCC CRL-10852<sup>TM</sup>)]; 人前列腺癌细胞系 PC-3 为 p53 缺陷型(*null p53*)。293 细胞和 PC-3 细胞均培养于 10% 胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司, A91110.05) DMEM [Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO (Gibco Indus-

\* 收稿日期: 2007-02-14

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(1075151); 甘肃省科技攻关计划资助项目(2GS052-A43-008-02); 甘肃省自然科学基金资助项目(3ZS061-A25-021)

作者简介: 张红(1959-), 女(汉族), 北京人, 研究员, 博士生导师, 从事辐射生物学、肿瘤治疗学研究;

E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

tries, Inc.), Lot No. 11136551]培养液中。

## 2.2 重组腺病毒的扩增、纯化和滴度测定

**重组腺病毒的扩增** 用 293 细胞扩增 AdCMV-p53 和 AdCMV-GFP<sup>[7-10]</sup>。

**AdCMV-p53 和 AdCMV-GFP 的纯化** 用 BD AdenoX™ 腺病毒纯化试剂盒 (Cat. Nos. 631532) 纯化<sup>[7-10]</sup>。

**重组腺病毒滴度测定** 用噬斑形成试验测定病毒滴度。

## 2.3 肿瘤细胞辐射与重组腺病毒载体转染

在底面生长面积为 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶 (CORNING, Cat. Nos. 3055) 内接种约 5×10<sup>5</sup> 个肿瘤细胞, 培养 24 h, 在室温下用 <sup>60</sup>Co γ 射线 (FTC-50H, 兰州大学第一附属医院, 上海医疗器械厂) 照射, 剂量为 0.5, 1.0 和 2.0 Gy, 剂量率为 0.2 Gy/min。按 80 MOI (Multiplicity of Infection, 感染复度) AdCMV-p53 或 AdCMV-GFP 转染肿瘤细胞<sup>[7-10]</sup>。

## 2.4 辐射诱导腺病毒重组体转染效率测定

以 AdCMV-GFP 转染细胞 GFP 的表达代表辐射诱导腺病毒重组体对肿瘤细胞的转染率。肿瘤细胞经 AdCMV-GFP 转染后, 37 °C 培养 24 h, 胰酶消化收集细胞悬液, 离心弃上清, 用 pH 7.2 的硫酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, 简称 PBS) 洗涤 2 次, 弃上清, 将沉淀用旋涡振荡器悬起, 加入 0.5 ml PBS 振荡混匀制成细胞悬液。用 FACS Calibur 流式细胞分析仪 (Becton, Dickinson Company, USA) 检测 GFP 表达, 计算 GFP 阳性细胞所占比率, 即外源基因腺病毒重组体对肿瘤细胞的转染率。

## 2.5 肿瘤细胞内外源性 P53 蛋白表达的测定

胰酶消化收集细胞, 用冷 PBS 洗两次, 用旋涡振荡器将沉淀振荡悬起, 加 4% 甲醛 PBS 溶液, 充分混匀, 室温固定 30 min, 离心弃上清。将沉淀振荡悬起后加入 0.5 ml 含 0.1% (v/v) Tween-20 和 0.5% 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, 简称 BSA) 混合稀释液 (溶剂为 PBS), 充分混匀, 室温孵育 30 min, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清。将沉淀悬起, 加 100 μl 1 : 100 稀释的鼠抗人 p53 mAb-1 (p53 Ab-6, DO-1, Lot: 187P402B, Neo Marker Fremont, CA, USA), 充分混匀, 室温孵

育 30 min, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清后将沉淀悬起, 加 100 μl 1 : 200 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (Southern Biotech, Southern Biotechnology Associates, Inc), 室温避光孵育 30 min 后用 FACS Calibur 检测 p53 蛋白表达。

## 2.6 抑瘤试验

用克隆形成法检测辐射联合 AdCMV-p53/GFP 转染对肿瘤细胞的抑制作用。辐射联合 AdCMV-p53/GFP 转染细胞培养 24 h 后, 胰酶消化, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基配比稀释制成细胞悬液, 按不同梯度将细胞定量接种于 60 mm 培养皿, 每个剂量点接种 3 个不同梯度, 每个梯度接种 3 皿, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。培养到第 10 d, 用甲醇 : 冰醋酸 (1 : 3) 溶液室温固定 30 min, 用 PBS 洗去多余固定液, 用 0.4% 姬母萨 (Giemsa) 染液染色 30 min, 用流水轻轻洗去染液, 统计细胞数大于 50 的克隆数。按下列公式计算细胞存活分数 (Survival fraction, 简称 SF):

$$SF(\%) = \left( \frac{S_T}{S_C} \right) \times 100\%,$$

式中, S<sub>T</sub> 为处理组细胞克隆形成率, S<sub>C</sub> 为对照组细胞克隆形成率。用线性平方模型拟合得到各不同处理组线性平方模型方程。

## 2.7 统计分析

用 SPSS 软件包进行分析。

# 3 结果

## 3.1 低剂量辐射促进腺病毒重组体转染 PC-3 细胞

处理后第 24 h, 各不同处理组 PC-3 细胞 GFP 表达见图 1。与单纯 AdCMV-GFP 转染组相比, 辐

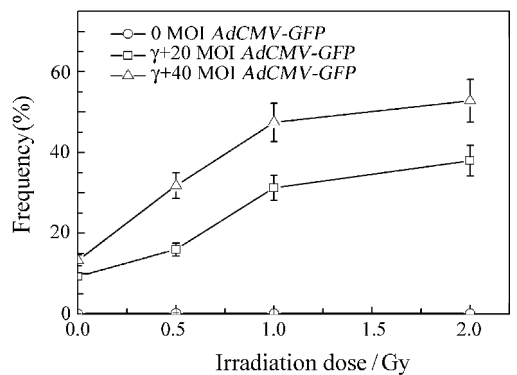


图 1 辐射对腺病毒重组体转染 PC-3 细胞的影响

射联合 AdCMV-GFP 转染组 GFP 阳性率增加

7%—39% ( $p < 0.05$ )。结果提示, 低剂量( $\leq 1.0$  Gy)预辐射明显促进腺病毒重组体转染 PC-3 细胞。

### 3.2 低剂量辐射增强 PC-3 细胞外源性 p53 表达

与单纯辐射组和单纯 AdCMV-p53 转染组相

比, 不同处理组 p53 阳性细胞所占比例分别增加 26.2%—31.6% 和 18.5%—35.4% ( $p < 0.05$ ) (见表 1)。结果提示, 低剂量( $\leq 1.0$  Gy)辐射明显增强 PC-3 细胞内外源性 p53 蛋白表达。

表 1 PC-3 细胞内外源性 p53 蛋白表达 (%)

组别	1 d		3 d	
	0 Gy	1.0 Gy	0 Gy	1.0 Gy
Control	0.11±0.0	0.13±0.0	0.21±0.1	0.14±0.0
20 MOI AdCMV-p53	6.60±1.1 <sup>a</sup>	32.80±1.4 <sup>a, b</sup>	18.50±1.7	37.0±2.0 <sup>a, b</sup>
40 MOI AdCMV-p53	14.2±1.3 <sup>a, b</sup>	45.80±1.8 <sup>a, b, c</sup>	24.60±1.5	60.1±1.9 <sup>a, b, c</sup>

a 为  $p < 0.05$ , 与 0 Gy 辐射比较; b 为  $p < 0.05$ , 与 0 MOI AdCMV-p53 转染比较; c 为  $p < 0.05$ , 与 20 MOI AdCMV-p53 转染比较。

### 3.3 低剂量辐射增强 AdCMV-p53 转染对 PC-3 细胞的抑制

各不同处理组细胞存活曲线如图 2 所示。与单纯 AdCMV-p53 转染和单纯辐射组相比, 辐射联合 AdCMV-p53 转染组 PC-3 细胞存活率分别降低 25%—64% 和 22%—65% ( $p < 0.05$ )。结果提示, 低剂量辐射明显增强 AdCMV-p53 转染对 PC-3 细胞的抑制。

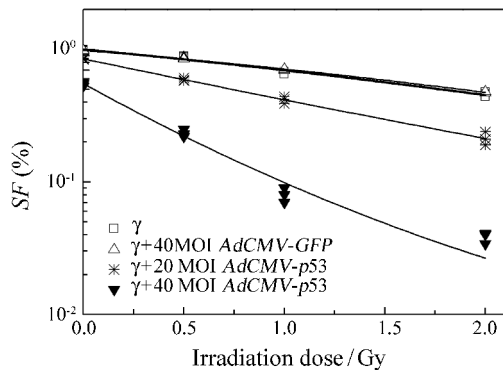


图 2 低剂量辐射诱导对 AdCMV-p53 /GFP 转染 PC-3 细胞存活曲线的影响

## 4 讨论

尽管腺病毒载体已广泛应用于基因转导<sup>[11-13]</sup>, 但也存在一些不足<sup>[14]</sup>。在基因治疗中, 外源基因的高效转入与高水平表达是基因治疗的关键。虽然已有研究证明, 辐射可提高外源基因对哺乳动物细胞的转导效率<sup>[15-17]</sup>, 但有关低剂量辐射诱导外源基因转导的研究未见报道。本研究结果显示, 在低剂

量( $\leq 1.0$  Gy)范围内, 腺病毒重组体对 PC-3 细胞的转染随辐射剂量的增加而增加。该结果与 Debenham 等<sup>[18]</sup>的报道不同。Debenham 等报道, 在低于 10 Gy 的剂量范围内, 外源基因对细胞的转导效率随辐射剂量的增加而增加。Iwamoto 等<sup>[19]</sup>的报道与我们的结果类似。Iwamoto 等的研究表明, 在低于 2 Gy 的剂量范围内, 外源基因对细胞的转导效率随辐射剂量的增加而增加。以上差异可能与研究所用细胞类型、基因转导方法和所采用的辐射线类型有关。Debenham 等以 V79 细胞为受体细胞, 以质粒为载体, 用 X 射线照射细胞<sup>[18]</sup>。Iwamoto 等以 Hela 细胞和 PA-1 细胞为受体细胞, 以质粒为载体, 用 X 射线照射细胞<sup>[19]</sup>。而我们以 PC-3 细胞为受体细胞, 以腺病毒为载体, 采用  $\gamma$  射线照射。

本结果显示, 腺病毒载体介导的外源性 p53 不仅成功转入 PC-3 细胞, 而且外源性 p53 在 PC-3 细胞内得到有效转录和表达(见表 1)。在低于 1 Gy 的剂量范围内, PC-3 细胞内外源性 p53 蛋白的表达似乎随辐射剂量的增加而增加。这可能与低剂量辐射促进外源腺病毒转染<sup>[18]</sup>、增加靶细胞膜通透性<sup>[20]</sup>、激活细胞内代谢活化系统、引起膜分子重排、改变膜电化亲性和增加外源基因在宿主细胞内的表达等有关。较大剂量辐射造成大多数细胞严重损伤, 甚至死亡, 即使是已转入靶细胞的基因也因细胞代谢活化系统功能的丧失而无法转录与表达。从我们的结果看, 辐射联合 AdCMV-p53 转染以辐射剂量不超过 1 Gy 为宜。

总之, 低剂量辐射不仅可明显促进 AdCMV-

p53 转染 PC-3 细胞、提高外源性 p53 在 PC-3 细胞内的表达, 而且有效增强对肿瘤细胞的抑制。在本研究的基础上, 我们将进一步开展重离子辐射联合 AdCMV-p53 转染治疗肿瘤的研究。

### 参考文献 (References):

- [1] Weichselbaum R R, Hallahan D E, Sukhatme V P, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, **24**: 565.
- [2] Sasaki R, Shirakawa T, Zhang Z J, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **51**(5): 1 336.
- [3] Spitz F R, Nguyen D, Skibber J M, *et al.* Clin Cancer Res, 1996, **2**: 1 665.
- [4] Gallardo D, Drazan K E, McBride W H. Cancer Res, 1996, **56**: 4 891.
- [5] Chang E H, Jang Y J, Hao Z, *et al.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1997, **123**: 507.
- [6] Li J H, Lax S A, Kim J, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999, **43**: 607.
- [7] Liu Bing, Zhang Hong, Li Wenjian, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2006, **24**(2): 102(in Chinese).  
(刘 兵, 张 红, 李文建等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(2): 102.)
- [8] Liu Bing, Zhang Hong, Li Wenjian, *et al.* Nuclear Technique, 2006, **26**(9): 674(in Chinese).

- (刘 兵, 张 红, 李文建等. 核技术, 2006, **29** (9): 674.)
- [9] Liu Bing, Zhang Hong. Acta Biophysica Sinica, 2006, **22** (Suppl): 438(in Chinese).  
(刘 兵, 张 红. 生物物理学报, 2006, **22**(增刊): 438.)
- [10] Liu B, Zhang H, Zhou G M, *et al.* Journal of Gastroenterology, 2007, **42**: 1.
- [11] Wilson J M. Nature, 1993, **365**: 691.
- [12] Brough D E, Jaffe H A, Hsu C, *et al.* Journal of Virology, 1996, **70**: 497.
- [13] Doerfler V. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1993, **46**: 1.
- [14] Couch R B, Chanock R M, Cate T T, *et al.* American Review of Respiratory Disease, 1963, **88**: 394.
- [15] Stevens C W, Zeng M, Cerniglia G J. Human Gene Therapy, 1996, **7**: 1 727.
- [16] Zeng M, Cerniglia G J, Eck S, *et al.* Human Gene Therapy, 1997, **8**: 1 025.
- [17] Sasaki R, Shirakawa T, Zhang Z J, *et al.* International Journal Radiation Oncology Biology Physics, 2001, **51**: 1 336.
- [18] Debenham P G, Webb M B T. International Journal of Radiation Biology, 1984, **46**: 555.
- [19] Iwamoto R, Fushimi K, Hiraki Y, *et al.* ACTA Med Okayama, 1977, **51**(1): 19.
- [20] Qian J, Yang J, Dragovic A F, *et al.* Cancer Research, 2005, **65**: 5 493.

## High-efficiency Transfer and Expression of AdCMV-p53 in Human Prostate Adenocarcinoma Cells Induced by Low-dose $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ -ray\*

ZHANG Hong<sup>1, 1)</sup>, LIU Bing<sup>1, 2</sup>, GAO Qing-xiang<sup>3</sup>, XIE Yi<sup>1</sup>, HAO Ji-fang<sup>1</sup>,  
DUAN Xin<sup>1</sup>, ZHOU Qing-ming<sup>1</sup>, WANG Yan-ling<sup>1</sup>

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Lanzhou Command Center for Disease Prevention and Control, Lanzhou 730020 China;

3 School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** To determine whether low-dose pre-irradiation could enhance adenovirus-mediated p53 transfer and expression in human prostate adenocarcinoma, the PC-3 cells were pre-exposed to  $\gamma$  rays, and then infected with replication-deficient adenovirus recombinant vectors, containing human wild-type p53 (AdCMV-p53) or green fluorescent protein gene (AdCMV-GFP) respectively ( $\gamma$ -ray irradiation + AdCMV-p53 /GFP infection). The exogenous gene transfer and expression were detected by flow cytometric

\* Received date: 14 Feb. 2007

\* Foundation item: National Natural Science Foundation of China (1075151); Scientific Technology Research Project of Gansu Province (2GS052-A43-008-02); Natural Science Foundation of Gansu Province (3ZS061-A25-021)

1) E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

analysis. The GFP transfer frequencies in  $\gamma$  irradiation + *AdCMV-GFP* infection groups were 7%—39% more than those in *AdCMV-GFP* infection groups. The p53 levels in the  $\gamma$  irradiation + *AdCMV-p53* infection groups were 18.5%—35.4% more than those in *AdCMV-p53* infection groups ( $p < 0.05$ ), suggesting that low-dose (less than or equal to 1.0 Gy) irradiation could significantly promote exogenous p53 transfer and expression in the PC-3 cells. The survival fractions for the  $\gamma$  irradiation + *AdCMV-p53* infection groups were 25%—64%, 22%—65% less than those for *AdCMV-p53* infection, or  $\gamma$ -irradiation groups, respectively ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** p53 gene; irradiation; adenovirus vector; prostate adenocarcinoma; radiosensitivity