

细胞和血小板数量下降幅度较小,且回升趋势均较单纯照射组好。与单纯照射组相比,给药组小鼠的白细胞、血小板数量回升情况较好,提示 WHDA 对受照射小鼠的血液系统具有一定程度的辐射保护作用。

### 参 考 文 献

- [1] 张万福. 湖北“五鹤续断”的地道历史考证及开发前景. 湖北民族学院学报(医学版), 2002, 19(3): 24-26.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册). 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 135-136.
- [3] 严忠红. 川续断根部免疫调节多糖的分离和化学性质. 国外医药: 植物学分册, 1998, 13(3): 122-123.

- [4] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84.
- [5] Yamaguchi S, Sakurada S, Nagumo M. Role of intracellular SOD in protecting human leukemic and cancer cells against superoxide and radiation. *Free Radic Biol Med*, 1994, 17(5): 389-395.
- [6] Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002, 18(10): 872-879.
- [7] Shankar B, Kumar SS, Sainis KB. Generation of reactive oxygen species and radiation response in lymphocytes and tumor cells. *Radiat Res*, 2003, 160(4): 478-487.

(收稿日期: 2009-12-09)

## Ad-Rb94 联合 $\gamma$ 射线照射对食管癌细胞生长的影响

陈风华 李进 谭志军 姜恩海 宋力 王欣茹 王芹

**【摘要】目的** 探讨人视网膜母细胞瘤 94 基因重组腺病毒载体(Ad-Rb94)联合  $\gamma$  射线对人食管癌细胞体外生长的抑制作用。**方法** 采用随机数字表法将培养细胞分为空白对照组、 $\beta$ -半乳糖苷酶基因重组腺病毒载体(Ad-LacZ)对照组、Ad-Rb94 组、 $\gamma$  射线照射组和 Ad-Rb94 联合  $\gamma$  射线照射组(联合组), Ad-LacZ 和 Ad-Rb94 于体外转染人食管癌 EC109 细胞系, 转染 6 h 后进行 4 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射, 用噻唑蓝法检测细胞的生长抑制率。**结果** Ad-Rb94 组、 $\gamma$  射线照射组和联合组对 EC109 细胞生长均具有抑制作用, 其中, 联合组抑制率最高(40.30 $\pm$ 4.2)%, 明显高于 Ad-Rb94 组(18.3 $\pm$ 0.4)%和  $\gamma$  射线照射组(27.40 $\pm$ 2.9)%( $\chi^2=7.91, \chi^2=5.82, P<0.05$ );  $\gamma$  射线照射组与 Ad-Rb94 组比较差异具有统计学意义( $\chi^2=5.12, P<0.05$ )。**结论** Ad-Rb94 联合  $\gamma$  射线照射对食管癌细胞的抑瘤作用具有协同效应, 能有效地抑制肿瘤细胞的生长。

**【关键词】** 基因, 视网膜母细胞瘤 94; 食管肿瘤; 基因疗法; 放射疗法

### Effects of recombinant adenovirus mediated retinoblastoma gene 94 combined with $\gamma$ -ray on growth of esophageal carcinoma cells

CHEN Feng-hua\*, LI Jin, TAN Zhi-jun, JIANG En-hai, SONG Li, WANG Xin-ru, WANG Qin.  
(\*Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

**【Abstract】Objective** To study the combined effect of exogenous recombinant adenovirus-mediated retinoblastoma gene 94 (Ad-Rb94) combined with  $\gamma$ -ray on the growth of esophageal carcinoma cells. **Methods** Cell culture were randomly divided into 5 groups: control group, recombinant adenovirus vector containing  $\beta$ -galactosidase gene (Ad-LacZ) group, Ad-Rb94 group,  $\gamma$ -ray radiation group and Ad-Rb94 combined with  $\gamma$ -ray radiation group. EC109 cells were transfected by Ad-Rb94 and exposed to 4 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -ray irradiation 6 hours after transfection. The inhibition rate of EC109 cells were detected by MTT assay. **Results** EC109 cells

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.02.017

基金项目: 国家自然科学基金(30770638)

作者单位: 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室(陈风华, 李进, 姜恩海, 宋力, 王芹); 300192, 天津市第一中心医院外科(谭志军); 100088, 北京第二炮兵总医院检验科(王欣茹)

通信作者: 王芹 (E-mail: wangqin\_1005@yahoo.com.cn)

transfected with Ad-Rb94 group,  $\gamma$ -ray radiation group and Ad-Rb94 combined with  $\gamma$ -ray radiation group were all inhibited. The inhibition rate of Ad-Rb94 combined with  $\gamma$ -ray radiation group reached(40.30%±4.2%), significantly higher than Ad-Rb94 group(18.3%±0.4%) and  $\gamma$ -ray radiation group (27.40%±2.9%) ( $\chi^2=7.91$ ,  $\chi^2=5.82$ ,  $P<0.05$ ). The difference of inhibition rate between  $\gamma$ -ray radiation group and Ad-Rb94 group was extremely significant ( $\chi^2=5.12$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The recombinant Ad-Rb94 gene transfection combined with  $\gamma$ -ray shows the synergism for the inhibition of the growth of EC109 cells.

**【Key words】** Genes, retinoblastoma 94; Esophageal neoplasms; Gene therapy; Radiotherapy

人视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb)94 基因是目前公认的与人类肿瘤较为密切的抑癌基因,它在细胞周期调控、抑制细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡和肿瘤治疗等方面起着重要作用。研究发现腺病毒介导的 Rb94 基因转染头颈部癌、膀胱癌、前列腺癌细胞系及体内肿瘤后,具有明显的肿瘤抑制效应<sup>[1-3]</sup>。基因治疗联合放疗逐渐成为肿瘤治疗的一种新策略。本研究通过腺病毒介导,将人 Rb94 基因转染到人食管癌 EC109 细胞中,联合  $\gamma$  射线照射进行体外培养观察,探讨 Rb94 基因联合  $\gamma$  射线照射的抑癌作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系及培养条件

人食管癌 EC109 细胞系由天津医科大学总医院惠赠,将其加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,放置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃ 培养箱中培养。EC109 细胞为贴壁生长的细胞,每 2-3 d 传代一次,本研究所用为对数生长期的 EC109 细胞。

### 1.2 主要试剂和仪器

RPMI 1640 培养基购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,胎牛血清及胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司, $\beta$ -半乳糖苷酶基因重组腺病毒载体(an adenovirus vector containing  $\beta$ -galactosidase gene, Ad-lacZ)和 Rb94 基因重组腺病毒载体(an adenovirus vector containing Rb94 gene, Ad-Rb94)均由本实验室构建并保存,<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射源购自加拿大 Nordion 公司,剂量率为 0.75 Gy/min,酶标仪购自美国 Thermo 公司。

### 1.3 实验分组

采用数字随机表法将培养细胞分为空白对照组(不做任何处理)、Ad-LacZ 对照组(转染含 lacZ 基因但不含 Rb94 基因的腺病毒载体)、Ad-Rb94 组、 $\gamma$  射线照射组(4 Gy <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线照射)和 Ad-Rb94 联合  $\gamma$  射线照射组(转染 Ad-Rb94 后进行

4 Gy  $\gamma$  射线照射,以下简称“联合组”)。

### 1.4 转染 Ad-Rb94 后不同时间对 EC109 细胞生长的影响

取对数生长期的 EC109 细胞,按每孔  $3 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中,转染当日按上述分组处理,包括空白对照组、Ad-LacZ 对照组和 Ad-Rb94 组 3 组,每组 6 个复孔,空白对照组每孔加 100  $\mu$ l RPMI 1640 培养基,Ad-LacZ 对照组每孔加 100  $\mu$ l Ad-LacZ 稀释液(滴度为  $10 \times 10^{10}$  PFU/ml),Ad-Rb94 组每孔加 100  $\mu$ l Ad-Rb94 稀释液(滴度为  $10 \times 10^{10}$  PFU/ml)。每组分别于转染后培养 24 h、48 h 和 72 h,加入 20  $\mu$ l 0.5% 噻唑蓝液,孵育 4 h 后用酶标仪测定 492 nm 下的吸光度(A<sub>492</sub>)值,按下列公式计算细胞生长的抑制率:抑制率(%)=(1-实验组 A<sub>492</sub> 值/空白对照组 A<sub>492</sub> 值)×100%。

### 1.5 Ad-Rb94 联合 $\gamma$ 射线照射对 EC109 细胞生长的影响

接种对数生长期的 EC109 细胞于 96 孔板中,按 1.3 节中所述的分组,转染时空白对照组、Ad-LacZ 对照组和 Ad-Rb94 组的处理方法同 1.4 节中的方法,在  $\gamma$  射线照射组中每孔加 100  $\mu$ l RPMI 1640 培养基,联合组中每孔加 100  $\mu$ l Ad-Rb94 稀释液(滴度为  $10 \times 10^{10}$  PFU/ml)。培养 6 h 后对  $\gamma$  射线照射组和联合组进行 4 Gy  $\gamma$  射线照射,24 h 后通过噻唑蓝法测各组 A<sub>492</sub> 值并比较各组对 EC109 细胞生长的抑制率。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析及  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染 Ad-Rb94 后不同时间对 EC109 细胞生长的影响

转染后不同时间各组对 EC109 细胞的抑制率见

表 1, 其中, Ad-Rb94 组与 Ad-lacZ 组在转染 24 h、48 h 和 72 h 后对 EC109 细胞的抑制率比较, 差异有统计学意义 ( $F$  分别为 42.9、54.6 和 37.9,  $P$  均  $< 0.05$ )。Ad-lacZ 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ( $F$  分别为 6.03、5.66 和 7.14,  $P$  均  $< 0.05$ )。对 EC109 细胞的抑制率以转染后 24 h 为最高, 24 h 的抑制率与 48 h 和 72 h 的抑制率相比, 差异有统计学意义 ( $F=15.7, P<0.05$ ), 而 48 h 和 72 h 的抑制率差异无统计学意义 ( $F=2.54, P>0.05$ )。

表 1 Ad-lacZ 和 Ad-Rb94 转染后不同时间对 EC109 细胞生长的抑制率 [%、( $\bar{x} \pm s$ )]

	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
Ad-lacZ 对照组	3.9 ± 0.4	2.4 ± 1.4	4.3 ± 1.9
Ad-Rb94 组	18.3 ± 0.4	14.3 ± 1.9	13.2 ± 1.7

注:表中, Ad-lacZ:  $\beta$ -半乳糖苷酶基因重组腺病毒载体; Ad-Rb94: Rb94 基因重组腺病毒载体。

### 2.2 Ad-Rb94 联合 $\gamma$ 射线照射对 EC109 细胞生长的抑制

联合组对 EC109 细胞生长的抑制率最高 (40.30%±4.2%), 与 Ad-Rb94 组 (18.3%±0.4%) 和  $\gamma$  射线照射组 (27.40%±2.9%) 相比, 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=7.91$  和  $\chi^2=5.82, P$  均  $< 0.05$ ),  $\gamma$  射线照射组与 Ad-Rb94 组相比, 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=5.12, P<0.05$ )。结果提示, Rb94 基因对 EC109 细胞的生长具有抑制作用, Rb94 基因与  $\gamma$  射线联合应用具有协同效应, 抑制细胞生长的作用更强 (图 1)。

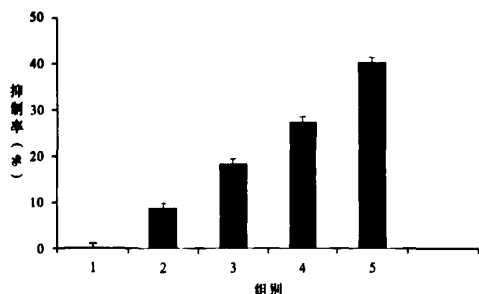


图 1 不同组别对 EC109 细胞生长的抑制率 [%、( $\bar{x} \pm s$ )]  
1: 空白对照组; 2: Ad-lacZ 对照组; 3: Ad-Rb94 组;  
4:  $\gamma$  射线照射组; 5: 联合组。

### 3 讨论

基因治疗联合放疗是最新生物治疗技术与传

统治疗方式相结合的产物。放疗使受照细胞表面受损及穿孔, 引起细胞膜通透性和跨膜电位的改变, 便于带负电荷的外源基因主动进入细胞, 提高了基因转移的效率, 基因治疗联合放疗对肿瘤的抑制具有协同作用。

为了确定腺病毒载体上基因的作用, 本研究以 Ad-lacZ 作为对照, 结果发现, Ad-lacZ 本身对食管癌 EC109 细胞的生长没有抑制作用, 表明对肿瘤细胞的抑制作用来自转导的人 Rb94 基因, 而不是复制缺陷病毒(腺病毒)载体本身。

本研究中 Ad-Rb94 转染 EC109 细胞后的不同时间内, 24 h 的抑制率高于 48 h 和 72 h 的抑制率, 可能与没有给予细胞换液、培养基中的营养物质减少而导致细胞生长减慢有关。Ad-Rb94 组、 $\gamma$  射线照射组和联合组对 EC109 细胞生长均具有抑制作用, 其中联合组的抑制率最强, 明显高于 Ad-Rb94 组和  $\gamma$  射线照射组。结果表明, 人 Rb94 基因能增强细胞对  $\gamma$  射线的敏感性, 两者联合应用具有相加和协同效应, 与文献结果一致<sup>[4-6]</sup>, 能有效地抑制肿瘤细胞的异常增生。本研究为食管癌的基因治疗联合放疗研究以及可能的临床应用提供了理论基础和实验依据。

### 参 考 文 献

- [1] Li D, Day KV, Yu S, et al. The role of adenovirus-mediated retinoblastoma 94 in the treatment of head and neck cancer. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4637-4644.
- [2] Zhang X, Multani AS, Zhou JH, et al. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Res*, 2003, 63(4): 760-765.
- [3] Roig JM, Molina MA, Cascante A, et al. Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1454-1462.
- [4] 张克君, 李德春, 朱东明, 等. 重组腺病毒 m1κBα 基因联合  $\gamma$  射线治疗肝癌的实验观察. *中华放射医学与防护杂志*, 2007, 10(27): 454-457.
- [5] 张耀文, 王芹, 李进, 等. 重组腺病毒 Ad-Rb94 基因联合放疗对人肝癌细胞生长的抑制作用. *中国辐射卫生*, 2008, 17(2): 147-148.
- [6] 王蕾, 李进, 姜恩海, 等. 人 Rb94 基因联合  $\gamma$  射线照射对 K150 细胞生长影响的体外研究. *中华放射医学与防护杂志*, 2009, 29(6): 568-570.

(收稿日期: 2009-12-10)