

辐射基因治疗黑色素瘤的实验研究

闵凤玲^{1,2} 张 红¹ 李文建¹ 高清祥³ 刘 兵¹ 周清明¹ 段 昕¹ 周光明¹

1 (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2 (中国科学院研究生院 北京 100039)

3 (兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 研究低剂量辐射结合腺病毒(AdCMV)载体介导的 p53 基因转导对人黑色素瘤 A375 细胞系基因转移效率和辐射敏感性的影响。用复制缺陷的重组腺病毒载体(AdCMV-p53)介导人 p53 基因转染 1 Gy X-射线预辐照的 A375 细胞系, RT-PCR 检测 mRNA 水平, 流式细胞仪测定细胞周期阻滞及外源性 P53 蛋白表达情况, 克隆形成率测定辐射后细胞存活率。用携带报道基因的复制缺陷重组腺病毒载体 AdCMV-GFP 作为对照。实验结果表明, 1 Gy X-射线辐照可较高地增加 AdCMV-p53 对 A375 细胞的基因转导效率, 转导的外源性野生型 p53 可在 A375(wtp53)细胞中高效表达, 并诱导细胞周期 G1 期阻滞; 单纯转导 p53 对 A375 细胞无明显诱导凋亡和生长抑制效应; 而转导 p53 后给予 X-射线辐射, 当剂量达到 4 Gy 及其以上时, 48h 后 AdCMV-p53 感染组细胞开始出现明显形态改变, 克隆存活率明显低于 AdCMV-GFP 感染组和未感染组, 显示存活曲线下移, 4Gy 时细胞存活率就减少了 1 个量级。小剂量辐射既可有效增加 AdCMV-p53 介导的 p53 转导, 又不会对患者产生明显副作用; 转导野生型 p53 的人黑色素瘤 A375 细胞系显示 P53 过表达; 过表达的 P53 蛋白虽然对 A375 细胞无明显生长抑制及凋亡诱导作用, 但可明显增加其辐射敏感性。这表明 p53 是基因治疗黑色素瘤较好的候选基因, 也为临床上放疗联合基因治疗黑色素瘤提供了实验室依据, 即减轻临床上对于辐射敏感性差的肿瘤单纯大剂量照射或单纯基因疗法中 rAd-p53 制品用量过大而给病人造成的毒副作用。

关键词 p53 基因, 腺病毒载体, 辐射, 基因治疗, 黑色素瘤

中图分类号 Q274

放射治疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一。但是由于肿瘤细胞的异质性, 对放疗的反应相差悬殊。随着分子生物学的发展, 肿瘤基因治疗在许多体外实验中已显示出可喜的结果, 但是由于缺少满意的高效基因转移载体、有效的靶基因以及基因治疗的安全性等问题, 使肿瘤基因治疗也面临诸多困难。如何有机地将基因治疗与放射治疗结合起来, 已成为放射治疗和基因治疗新的研究方向之一。皮肤黑色素瘤具有高度侵袭性, 且对放化疗高度耐受。p53 作为重要的抑癌基因, 在黑色素瘤中作用复杂, 原发性及转移性黑色素瘤中 p53 基因编码区的突变并不常见 (2%—25%), 更常检测到的是野生型 P53 蛋白^[1]。已经证明 p53 野生型肿瘤较 p53 突变型肿瘤对辐射更敏感, 许多研究者已成功地将野生型 p53 基因导入 p53 突变型的肿瘤细胞中, 增加辐射敏感性和诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4], 但是具有内源性野生型 p53 的黑色素瘤细胞却对射线极为耐受。这就提示, 一方面, 单纯放射治疗黑色素瘤不

会产生满意疗效; 另一方面, 内源性野生型 p53 在黑色素瘤细胞中可能不能发挥正常作用。有研究报告通过 p53 基因过表达可抑制肿瘤细胞生长并诱导细胞凋亡, 这使我们联想到外源性野生型 p53 基因能否对黑色素瘤细胞凋亡诱导和辐射增敏起一定作用^[5,6]。目前, 采用腺病毒介导的 p53 基因治疗头颈部肿瘤、食管癌、非小细胞肺癌和肝癌等已进入 II 期临床试验。虽然腺病毒载体具有良好的应用前景, 但也存在着一些问题, 如出现发热、寒战等毒副反应, 有些腺病毒会引起急性感染等。由于目前使用的腺病毒载体是复制缺陷型病毒, 不能在体内自主复制, 在治疗中需要连续重复给药, 反复使用后宿主体内存在病毒基因会引起特异性免疫反应, 外源性基因 (p53) 的转导率低也影响了肿瘤基因治疗的效果^[7-9]。为了将肿瘤的放射治疗与基因治疗有机结合, 弥补单纯一种治疗的缺陷, 探索临床优化腺病毒介导 p53 治疗黑色素瘤方案的可能性, 为 p53 导入联合放射治疗耐放化疗的黑色素瘤提供实验依

据, 在本实验中我们采用携带野生型 p53 基因的复制缺陷的腺病毒载体 (AdCMV-p53) 转导小剂量预照射的 p53 野生型的人黑色素瘤 A375 细胞系, 然后选择合适的外源性 P53 表达时间段给予辐射杀伤处理。结果表明小剂量辐射即可有效增加 AdCMV-p53 介导的 p53 转导, 又不会对患者产生明显副作用; 转导野生型 p53 的人黑色素瘤 A375 细胞系显示 P53 过表达; 过表达的 P53 蛋白虽然对 A375 细胞无明显生长抑制及凋亡诱导作用, 但可明显增加其辐射敏感性。

1 材料与方法

细胞系及细胞培养: A375 细胞, 为人黑色素瘤细胞系 (本室冻存, 确认为 P53 野生型)。培养条件: 用含 10% 小牛血清 (杭州四季青) 的 RPMI1640 培养液培养。293 细胞为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系, 用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基培养。

重组体腺病毒的扩增、纯化及滴度测定: p53 重组体腺病毒 (Ad5CMV-p53) 及含有报道基因 GFP 的重组体腺病毒 (Ad5CMV-GFP) 由 E1 区缺失的复制缺陷型腺病毒载体构建而成。用 293 细胞进行病毒扩增, 病毒纯化采用美国 BD Adeno-X™ Virus Purification Kits (BD Biosciences Clontech), 噬斑形成测定病毒滴度。Ad5CMV-P53、Ad5CMV-GFP 分别为 3×10^{10} pfu/mL 和 6×10^{11} pfu/mL。

基因转导: 1 Gy X-射线, 能量为 8 MeV, 剂量率为 400 cGy/min, 照射处于对数生长期的 A375 细胞后, 立即加 Ad5CMV-GFP 感染, MOI 分别为 30、50、80、100、150、200 pfu/cell。无血清培养 4 h 后改 5% 血清继续培养, 第 12、24、48、72 和 96 h 后荧光显微镜观察, 基因转导效率为观察细胞中 GFP 阳性细胞所占百分比。未照射组病毒感染方法相同。比较 X-射线对基因转导的影响, 根据辐射+Ad5CMV-GFP 转导效率, 选择合适的病毒剂量, 用辐射+Ad5CMV-p53 转导 A375 细胞。

样本辐射: 将 1 Gy-X 射线预照射的 A375 细胞分为三组: A375、Ad5CMV-GFP-A375、Ad5CMV-P53-A375, 其中 Ad5CMV-GFP 组和 Ad5CMV-P53 组分别为腺病毒 (MOI 80) 感染组, 24h 后给予 X 射线辐射处理, 照射剂量为 0—10 Gy。辐射后 24h 和 48h 进行形态学观察和台盼蓝染色行死活细胞计数。所有操作均在室温下进行。

细胞存活: 采用克隆形成测定。照射后细胞用胰酶消化, 离心、洗涤后, 一部分按稀释比例和预期克隆存活情况, 接种于直径 35mm 培养皿, 14—21d 计数克隆, 大于 50 个细胞为一个克隆。根据公式: 存活率=处理组的细胞集落形成率/对照组的细胞集落形成率, 求得细胞存活率。剩余部分细胞接种于培养瓶继续培养, 24h 和 48h 观察形态变化并行台盼蓝染色。

细胞生长及形态学观察: 以 AdCMV-GFP 和 AdCMV-p53 MOI150 感染 A375 细胞, 观察 p53 转导和重组腺病毒本身对细胞形态和生长的影响。

RT-PCR 检测外源 p53 mRNA 表达: 用 TRIzol (Life Technology) 提取 A375 细胞和 Ad5CMV-P53 转导后 12h、1、2、3、4、5 和 10d 的 A375 细胞总 RNA, 所提取的总 RNA 经电泳可见明显的 28S 和 18S 两条带。cDNA 合成采用 OligdT 引物法, 所需试剂为 Promega 产品。PCR 引物由上海 Sangon 公司合成。p53 (扩增产物 310 bp): 上游 (载体特异性启动子 CMV3): 5'-GGT GCA TTG GAA CGC GGA TT-3, 下游 (p53 exon 8): 5'-CAA ATC ATC CAT TGC TTG GGA-3^[10,11]; β -actin: 上游: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3, 下游: 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'。PCR 反应条件: p53: 94℃ 2min, 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 5min, 36 个循环; β -actin: 94℃ 2min, 94℃ 1min, 54℃ 1min, 72℃ 2min, 28 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 然后用荧光成像系统扫描。

流式细胞仪 (FCM) 检测细胞周期阻滞和 P53 蛋白表达情况: 收集 1Gy X-射线照射+Ad5CMV-p53 转导后 12h、1、2、3、4、5d 的 A375 细胞, 以自身未转导细胞为对照。一部分经 95% 乙醇固定, PI 染色后测定细胞周期, 另一部分用间接荧光法测定 P53 蛋白表达。

统计学分析: 细胞周期结果分析采用 Student-*t* 检验, 细胞存活曲线用“线性平方模型”拟合。

2 结果

2.1 辐射增加 AdCMV-GFP 基因转导效率

未照射组细胞经 AdCMV-GFP 不同 MOI (30、50、80、100、150、200 pfu/cell) 感染后, 发现 GFP 基因转导效率随病毒剂量增加而增加, 感染后 12h 就有绿色荧光蛋白表达, 24h 和 48h 荧光最强, 96h 荧光大部消失; 预先给予 1 Gy X-射线照射组在相同 MOI 感染时基因转导效率明显提高, 当达到 80%

以上感染率时,照射组与未照射组的病毒 MOI 分别为 80 pfu/cell 和 200pfu/cell,病毒用量减少了 60%,如图 1 所示。

2.2 AdCMV-p53 对 A375 细胞形态学及生长的影响

用 AdCMV-p53 和 AdCMV-GFP (MOI150) 感染 A375 细胞后,第 1—3d 与未转染组相比,AdCMV-p53-A375 组出现细胞生长速度变慢、少数细胞变圆、浮起。4—5d 后逐渐恢复。测定 A375、

Ad5CMV-GFP-A375、Ad5CMV-p53-A375 的细胞倍增时间 (倍增时间= $(N_{T2}-N_{T1})/n$, N_{T2} 和 N_{T1} 分别代表计数时细胞数和接种时细胞数, n 为细胞倍增次数, $N_{T2}/N_{T1}=2^n$),发现 A375 和 Ad5CMV-GFP-A375 细胞倍增时间无明显差别,分别为 $(29.1\pm1.51)\text{h}$ 和 $(30.14\pm1.04)\text{h}$,而 Ad5CMV-p53-A375 细胞在病毒感染后 1—3d 倍增时间明显延长,达 $(40.1\pm1.51)\text{h}$,细胞周期明显比 A375 和 Ad5CMV-GFP-A375 细胞为长,第 5d 后恢复至 $(31.1\pm0.93)\text{h}$,与 A375 和 Ad5CMV-GFP-A375 无明显差别。

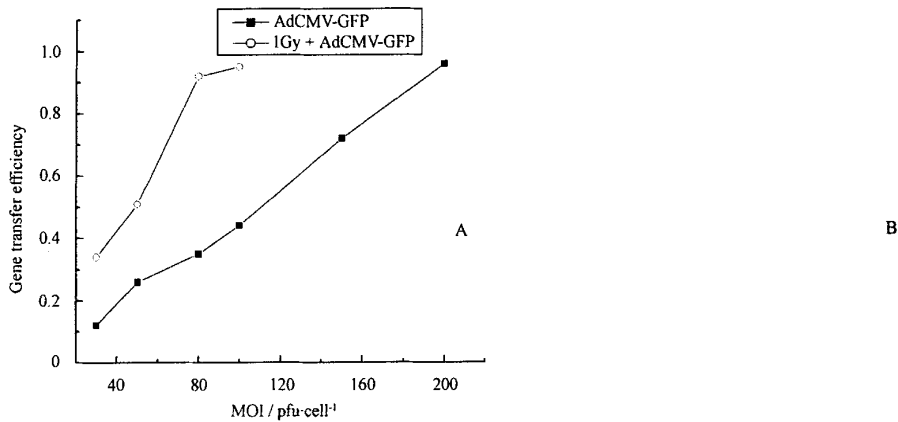


图 1 辐射+AdCMV-GFP 载体感染 A375 的基因转移效率
A. AdCMV-GFP 载体在不同 MOI 感染 A375 的基因转移效率; B. AdCMV-GFP 载体 MOI 80 时 GFP 基因转移效率
上图为 AdCMV-GFP 载体感染, 下图为 1 Gy 辐射+AdCMV-GFP 载体感染

Fig.1. Analyses of gene transfer efficiency for radiation combined with AdCMV-GFP vector infected A375 cells by GFP
A. Gene transfer efficiency of A375 cells with AdCMV-GFP vector at different MOI; B. GFP gene transfer efficiency at 80 MOI.
The upper is AdCMV-GFP vector infection without radiation and the lower is 1Gy X-ray combined with Ad-GFP vector infection.

2.3 AdCMV-p53-A375 细胞 p53 mRNA 表达水平

RT-PCR 方法检测腺病毒载体感染 A375 细胞后不同时间 p53 mRNA 水平,发现对照组 (未感染病毒)无表达,AdCMV-p53 感染后第 12h 就有 mRNA 表达,且表达量逐渐增高,48h 达最高水平,以后逐渐下降,第 10d 仍有表达,见图 2。

2.4 AdCMV-p53-A375 细胞周期阻滞和 p53 蛋白表达水平

FCM 分析 A375 细胞和 A375 细胞经 Ad5CMV-p53 转导后 G1 期、G2/M 期、S 期百分比,显示 Ad5CMV-p53-A375 组转染后第 12h 已有 G1 期阻滞趋势,1d、2d 阻滞最明显,4d、5d 后细胞周期阻滞消失 (见表 1); P53 蛋白表达与细胞周期变化相似,AdCMV-p53 感染后第 12h P53 蛋白已经表达,为 24.86%,第 1d、2d 和 3d 表达持续增高,分

别为 64.18%、76.76%、60.96%,第 4d 下降为 48.44%,第 5d 为 18.51%,第 10d 接近对照水平,为 4.28%。

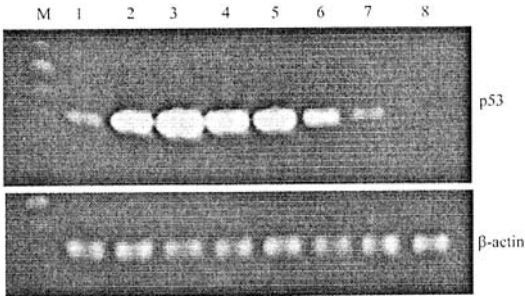


图 2 RT-PCR 分析 AdCMV- p53 感染后第 12h, 1, 2, 3, 4, 5 和 10d A375 细胞 p53 mRNA, β -actin 为阳性对照
M: 100 bp Marker, Lane 1-7: 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 10d, Lane 8: 未感染组

Fig.2 RT-PCR analysis of mRNA expression of p53 gene in A375 cells at different time points after infected with AdCMV-p53. β -actin was the internal control. M: Marker; Lane 1-7: 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 10d; Lane 8: A375 cells control

表 1 外源性 p53 基因对 AdCMV-p53-A375 细胞周期的影响

Table 1 Effect of exogenous p53 on cell cycle distribution of AdCMV-p53-A375 cells

Cell cycle /%	A375 cells	AdCMV-p53-A375 cells					
		12h	1d	2d	3d	4d	5d
G ₀ /G ₁	50.93	61.8	68.62 [*]	73.21 [*]	65.02 [*]	58.72	52.2 [△]
S	37.64	28.02	20.88	18.55	25.17	30.15	35.4
G ₂ /M	11.43	10.18	10.5	8.24	9.81	11.13	12.4

Note: ^{*} Compared with A375 group, $P < 0.05$; [△] Compared with A375 group, $P > 0.05$; Each data was the mean of three different experiments.

2.5 AdCMV-p53 转导后细胞辐射敏感性的变化

辐射后 24h 和 48h 经台盼蓝染色，显示第 24h A375、AdCMV-GFP-A375 和 AdCMV-p53-A375 三组细胞死亡数差别尚不明显；第 48h 后，AdCMV-p53-A375 组蓝染细胞（死细胞）百分数在各辐射剂量组均与两对照组有明显差异；倒置显微镜观察发现第 24h 三组细胞形态学改变不明显，而第 48h 后 AdCMV-p53-A375 组细胞从 4 Gy 剂量开始出现细胞整体轮廓模糊、胞膜变形、细胞内出现颗粒状物质、纤维状物质及空泡，并有细胞碎片出现，呈死亡状。6 Gy 时 Ad-p53-A375 组细胞基本完全浮起，细胞形态消失，另两组细胞尽管细胞形态也有所改变，但尚处于贴壁状态。由克隆存活率绘制的存活曲线也显示 Ad-p53-A375 组细胞较 A375 组和 Ad-GFP-A375 组相比，辐射敏感性明显提高，A375 组、AdCMV-GFP-A375 组和 AdCMV-p53-A375 组的 D_{50} (Gy) 分别为 3.68、3.60 和 0.99； D_{10} (Gy) 分别为 6.7、6.29 和 3.03，见图 3。

3 讨论

许多研究已经证明，辐射可以增加基因转导效率^[12,13]，实验中我们也发现用 AdCMV-GFP 病毒剂量梯度感染 A375 细胞，其基因转导效率的增加依赖辐射剂量的增长（数据未发表）。本实验之所以选择 1Gy 低剂量辐射增加 p53 转导效率，其原因是：一方面，黑色素瘤细胞本身耐辐射，而且有很强的修复能力。增加辐射剂量能够提高基因转导效率，但会损伤正常组织，同时也不会有效杀伤黑色素瘤细胞；另一方面，预照射剂量过低，感染所需的病毒剂量较大，其生物安全性又会受到质疑。1Gy 剂量辐照可保证最大限度提高基因转导效率、减少病毒使用量，同时降低辐射损伤，使 p53 转导效率提高 2.6 倍，同时减少 60% 病毒用量。辐射增加外源基因转导率的机制可能为：①辐照使受体细胞表面受损和穿孔，引起细胞膜通透性和跨膜电位改变，便于带负电荷的外源 DNA 主动进入细胞；②辐照导致受体细胞 DNA 损伤，激活细胞的修复机制，使外源 DNA 与受体细胞 DNA 重组和整合^[14]。

由于肿瘤类型不同，临床治疗方案也要因“瘤”而异。如，临床 rAd-p53 制品治疗非小细胞肺癌方案为先给予一定剂量的辐射治疗，然后注射 rAd-p53 制剂才能取得较好效果^[15]。基于我们的实验结果，在对黑色素瘤患者进行放射治疗时，小剂量辐射—rAd-p53 制剂—辐射的方案可能有一定参考意义。实验中发现单纯转导 p53 对 A375 细胞生长抑制和诱导凋亡无明显作用，从 Ad-p53 感染后 A375 细胞的生长状况和倍增时间来看，瘤细胞仅出现短暂生长减慢，4d 以后恢复正常生长速度，未见明显细胞凋亡，与 Satyamoorthy 和 Sauter 等^[16,17]的结果一致。如此看来，单纯的 p53 基因治疗对黑色素瘤是无效的。

我们发现由于 p53 导入，A375 细胞无论是细胞周期阻滞，还是 P53 高峰表达，都出现在基因转导后 24h 和 48h。为了将外源性 P53 的作用与辐射损

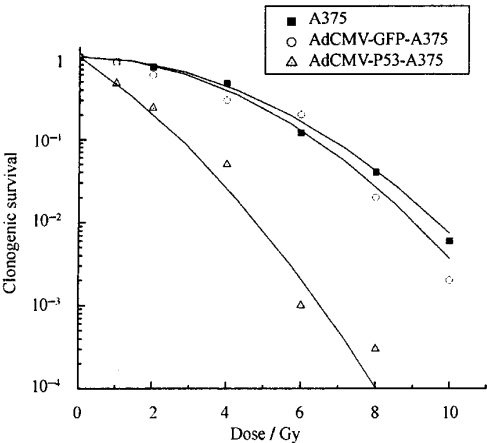


图 3 A375、Ad-GFP-A375 和 Ad-p53-A375 X 射线辐射后的细胞存活曲线

Fig. 3 Colony-forming ability of A375, AdCMV-GFP-A375 and AdCMV-p53-A375 cells after exposure to graded dose of ionizing radiation

伤结合起来,我们在 A375 细胞转导 p53 后 24h,给予 0—10 Gy X 射线辐射处理。与对照组 (A375 组和 Ad-GFP 转导组) 相比,Ad-p53-A375 细胞组对辐射的敏感性明显提高,存活曲线下移,4Gy 时细胞存活减少 1 个数量级,可见外源性 P53 蛋白对 A375 细胞的辐射增敏作用极为明确。Pirollo^[18]等认为存活曲线下移可能是 AdCMV-p53 的感染干扰了辐射损伤的 DNA 的修复。那么,具有野生型 P53 基因的 A375 细胞为何不象人们预期的那样对射线敏感,相反却很耐辐射?有研究表明,黑色素瘤细胞耐辐射的原因与辐射后其内源性野生型 P53 蛋白活化缺失有关,这一缺失引起 P53 与 14-3-3 蛋白不能相互作用。14-3-3 蛋白在 P53 蛋白上的结合位点包括 Ser-376 和 Ser-378,只有 Ser-376 发生去磷酸化,而 Ser-378 磷酸化时,14-3-3 才能与 P53 蛋白结合。作用于此过程的一些激酶和磷酸酶的缺陷可能与此有关^[16, 19]。但是,本实验中之所以能够获得明显的辐射效应,其原因可能在于外源性野生型 p53 导入后 3d 之内, S 期细胞减少, G1 期细胞增加,提高了对射线的敏感性,加之存在丰富的 P53 蛋白,能很快诱导辐射致 DNA 损伤的细胞凋亡。一方面, DAN 损伤可以使 P53 诱导的细胞凋亡更敏感^[20]; 另一方面,携带野生型 p53 高表达载体主要诱导肿瘤细胞凋亡^[21]。以上结果为临床放疗联合基因治疗黑色素瘤提供了实验室依据,同时也说明了肿瘤细胞的辐射敏感性并不完全依赖 p53 状态^[22]。

4 结论

本实验采用耐辐射、具有内源性野生型 p53 状态的人黑色素瘤细胞,把辐射与重要的抑癌基因 p53 结合起来。一方面,通过低剂量辐照增加基因转导效率,减少感染所需 Ad-p53 剂量,保证生物安全性;另一方面,选择外源性 P53 在 A375 细胞中的高峰表达时间段进行辐照,提高其对 X 射线的辐射敏感性,这对临床优化腺病毒介导 p53 治疗黑色素瘤方案有一定参考意义。不同的肿瘤细胞具有不同的生物学特性,即使肿瘤细胞类型相同,其对治疗的反应也不尽一样,所以有必要将各种治疗措施有机结合起来,扬长避短,达到对肿瘤细胞最大杀伤作用。需要指出的是,本实验只用了 A375 一种细胞系,存在一定局限性,尚需其它黑色素瘤细胞系进一步印证。

致谢 感谢解放军军事医学科学院吴祖泽院士惠赠重组体腺病毒和 E1 基因转化的人胚肾 293 细胞系;感谢中国科学院近代物理研究所靳根明研究员对本文修改付出的辛勤劳动。

参考文献

- 1 Alkhalaf M, El-Mowafy A M. *J Endocrinol*, 2003, **179**(1): 55—62
- 2 Meng R D, McDonald E R 3rd, Sheikh M S, *et al.* *Mol Ther*, 2000, **1**(2): 130—144
- 3 徐从高, 张茂宏, 杨兴季译. 癌:肿瘤学原理和实践 (第 5 版). 济南: 山东科学技术出版社, 2002. 2008—2016
XU Conggao, Zhang Maohong, Yang Xingji (Translated). *Cancer: principles & practice of oncology* (5th ed). Jinan: Shandong Science and Technology Press. 2002. 2008—2016
- 4 Jekunen A, Miettinen S, Maenpaa J. *Gene Mol Biol*, 2002, **5**: 22—35
- 5 Shono T, Tofilon P J, Schaefer T S, *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**(4): 1069—1076
- 6 Sasaki R, Shirakawa T, Zhang Z J, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **51**(5): 1336—1345
- 7 张珊文, 肖绍文, 刘长清等. 中华医学杂志, 2003, **83**: 2023—2028
ZHANG Shanwen, XIAO Shaowen, LIU Changqing, *et al.* *Natl Med J China*, 2003, **83**: 2023—2028
- 8 陈传本, 潘建基, 徐鹭英. 中华医学杂志, 2003, **83**: 2033—2035
CHEN Chuanben, PAN Jianji, XU Luying. *Natl Med J China*, 2003, **83**: 2033—2035
- 9 Swisher S G, Roth J A, Komaki R, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2003, **9**: 93—101
- 10 Nishizaki M, Fujiwara T, Tanida T, *et al.* *Clin Cancer Res*, 1999, **5**: 1015—1023
- 11 Swisher S G, Roth J A, Nemunaitis J, *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1999, **91**: 763—771
- 12 Stevens C W, Zeng M, Cerniglia G J. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(14): 1727—1734
- 13 Zeng M, Cerniglia G J, Eck S L, *et al.* *Hum Gene Ther*, 1997, **8**(9): 1025—1032
- 14 Herrlich P, Bender K, Knebel A, *et al.* *C R Acad Sci III*, 1999, **322**(2-3): 121—125
- 15 Merritt J A, Roth J A, Logothetis C J. *Semin Oncol*, 2001, **28**(5 Suppl 16): 105—114
- 16 Satyamoorthy K, Chehab N H, Waterman M J F, *et al.* *Cell Growth & Differentiation*, 2000, **11**: 457—474
- 17 Sauter E R, Takemoto R, Litwin S, *et al.* *Cancer Gene Ther*, 2002, **9**(10): 807—812
- 18 Pirollo K, Hao Z, Rait A, *et al.* *Oncogene*, 1997, **14**: 1735—1746
- 19 Pan S, Sehnke P C, Ferl R J, *et al.* *Plant Cell*, 1999, **11**:

- 1591—1602
20 Linke S P, Clarkin K C, Wahl G M. *Cancer Res*, 1997, 7(6): 1171—1179
21 Chen X, Ko L J, Jayaraman L, *et al.* *Gene Develop*, 1996, 10: 2438—2451
22 Essmann F, Engels I H, Totzke G, *et al.* *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7065—7072

Experimental research of radiogenic therapy on human melanoma

MIN Fengling^{1,2} ZHANG Hong¹ LI Wenjiang¹ GAO Qingxiang³ LIU Bing¹
ZHOU Qingming¹ DUAN Xin¹ ZHOU Guangming¹

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

2 (Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

3 (School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract To investigate the effect of low dose irradiation on gene transfer efficiency and the effect of adenoviral-mediated exogenous P53 overexpression on radiosensitivity of radioresistant human melanoma cell line A375 with wild type p53, control vector, a replication deficient recombinant adenoviral vector containing a CMV promoter and green fluorescent protein (AdCMV-GFP), was used to transfect the A375 cells preirradiated with or without 1 Gy X-ray radiation. The transduction efficiency of GFP gene was determined with fluorescence microscope directly. A375 cells radiated by 1 Gy X-ray were transfected with a replication deficient recombinant adenoviral vector carrying human wild p53 (AdCMV-P53), and mRNA level was detected by RT-PCR. The cell cycle delay and the expression of exogenous P53 were detected using flow cytometry (FCM) at different time after transfection. The radiosensitivity of A375 cells after p53 transduction was assayed by clonoy formation. We found that 1Gy exposure increased the gene transfer efficiency of A375 cells. The expression of exogenous P53 was found to be 60% to 80% of transfected cells during the first three days after transduction and then declined continuously down to the control level on the day 10. The G1 cell cycle arrest was also observed after p53 gene transfer. A375 cells that were transfected with p53 showed higher sensitivity to X-ray -induced cell killing than those cells that either were transfected with the viral vector carrying a green fluorescent protein gene or were not transfected at all. Low dose ionizing radiation can improve gene transfer efficiency of A375 cells mediated by adenovirus vector. Although the overexpresion of exogenous P53 may not inhibit cell growth and induce apoptosis of melanoma cell line A375 in vitro, it made the tumor cells much sensitive to death by irradiation. The data suggested that p53 gene might be a potential gene for melanoma therapy and provide the experimental evidences to clinically using the combination of radiation with gene therapy on melanoma. Namely, there may be a reduction of side effects resulting from high dose radiation on radioresistant tumors or rAd-P53 administration alone in clinical applications.

Keywords p53 gene, Adenovirus vector, Irradiation, Gene therapy, Melanoma

CLC Q274