

# E1A 基因对人鼻咽癌动物模型放射增敏的实验研究

周蓉蓉<sup>1</sup>, 陈嘉<sup>1</sup>, 肖志强<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医院肿瘤科, 长沙 410008; 2. 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

**[摘要]** 目的:探讨腺病毒 E1A 基因对人鼻咽癌动物模型放射增敏的实验研究。方法:取对数生长期的 CNE-2Z 细胞  $5 \times 10^5/0.2$  mL,接种于 4 周龄左右裸鼠右前肢腋部皮下致瘤,第 7 天裸鼠皮下肿瘤长至直径 0.6~0.8 cm 时,随机分为 6 组( $n=10$ ):PBS 组, Ad- $\beta$ -gal 组,放射组, Ad- $\beta$ -gal + 放射组, Ad-E1A 组, Ad-E1A + 放射组。Ad- $\beta$ -gal 组/Ad-E1A 组在第 2 周开始给予荷瘤裸鼠皮下肿瘤内滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad-E1A/ Ad- $\beta$ -gal 注射,每周 2 次,连续 2 周,放射组在第 3 周给予 6MV-X 照射,每天 2 Gy,连续 5 d。Ad- $\beta$ -gal + 放射组/Ad-E1A + 放射组在第 2 周开始,给予荷瘤裸鼠皮下肿瘤内滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad-E1A/ Ad- $\beta$ -gal 注射,每周 2 次,连续 2 周,在第 3 周给予 6MV-X 照射,每天 2 Gy,连续 5 d。第 1 次治疗后,每隔 4 天用卡尺测量 1 次肿瘤的体积,记录其直径,裸鼠的生存时间。当肿瘤的直径超过 2 cm 时,处死裸鼠,分离肿瘤组织,采用免疫组织化学方法分析血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 CD34 表达, TUNEL 分析细胞凋亡。结果:Ad-E1A + 放射组较其他组能明显延缓移植瘤生长时间, Ad-E1A + 放射组裸鼠的肿瘤平均体积比单独放射组小 4.7 倍,比单独用 Ad-E1A 组的小 5.3 倍。Ad-E1A + 放射组的裸鼠生存率显著高于其他治疗组。Ad-E1A + 放射组的 VEGF 蛋白表达和微血管密度较其他各组明显下降( $P < 0.01$ )。TUNEL 分析结果显示 Ad-E1A 组和 Ad-E1A + 放射组及放射组的肿瘤组织内均可明显观察到凋亡细胞。并且 Ad-E1A + 放射组肿瘤细胞凋亡数目明显高于 Ad-E1A 组或者放射组。结论:E1A 基因通过抑制肿瘤血管的形成和诱导肿瘤细胞的凋亡来提高人鼻咽癌细胞对放射的敏感性。

**[关键词]** 鼻咽癌; 放射治疗; E1A; 血管内皮生长因子; CD34

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)08-0744-08

## Effect of adenovirus-E1A gene therapy on in vivo radiosensitivity to nasopharyngeal cancer

ZHOU Rongrong<sup>1</sup>, CHEN Jia<sup>1</sup>, XIAO Zhiqiang<sup>2</sup>

(1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the effect of Ad-E1A gene therapy on in vivo radiosensitivity to nasopharyngeal carcinoma. **Methods** CNE-2Z cells ( $2 \times 10^5$ ) were subcutaneously injected into nude mice to develop tumor (1~3 mm) 6 days later. The tumor-bearing mice were then randomly divided into 6 groups (10 mice per group) for PBS treatment or treatment with radiotherapy, Ad-E1A, or Ad- $\beta$ -gal alone or radiotherapy in combination with Ad-E1A or Ad- $\beta$ -gal. The mice were treated with Ad-E1A or Ad- $\beta$ -gal ( $5 \times 10^9$  plaque forming units) by intratumoral injection.

收稿日期 (Date of reception) 2009-05-07

作者简介 (Biography) 周蓉蓉, 博士研究生, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤化疗方面的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 肖志强, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item) 国家自然科学基金(30400118)。 This work was supported by National Nature Science Foundation of China (30400118)。

tion twice weekly for 2 weeks at beginning of week 2. The mice treated with radiotherapy in combination with Ad-E1A or Ad- $\beta$ -gal received 2 Gy radiotherapy daily for 5 days following the first week of treatment with Ad-E1A or Ad- $\beta$ -gal. Control mice received PBS therapy or radiotherapy only after tumor cells were injected. When the size of tumor exceeded 2 cm, the mice were killed and the tumors underwent immunohistochemical analysis for VEGF and CD34 expression and TUNEL assay for apoptosis. **Results** The growth delay time was longest in the Ad-E1A plus radiotherapy group. Tumors treated with Ad-E1A plus radiotherapy were 4.7-fold smaller than those treated with radiotherapy alone and 5.3-fold smaller than those treated with Ad-E1A alone. The survival rate of tumor-bearing mice treated with Ad-E1A plus radiotherapy was significantly higher than that of other treatment groups. The vessel density and the VEGF expression were significantly lower in tumors treated with Ad-E1A plus radiotherapy than those treated with radiotherapy alone, Ad-E1A alone, Ad- $\beta$ -gal alone, or Ad- $\beta$ -gal plus radiotherapy ( $P < 0.01$ ). TUNEL staining revealing apoptosis can be detected in the Ad-E1A group, radiotherapy group, Ad-E1A plus radiotherapy group, and more apoptosis can be detected in tumors treated with Ad-E1A plus radiotherapy than those of other treatment groups. **Conclusion** E1A gene therapy can effectively enhance the nasopharyngeal carcinoma sensitivity to the radiotherapy by down-regulating VEGF expression and inducing apoptosis.

**Key words:** nasopharyngeal cancer; radiation therapy; E1A; VEGF; CD34

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(8):0744-08]

恶性肿瘤血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达高低和微血管密度的多少与肿瘤的血管生成、转移、预后密切相关。VEGF是重要的促血管生成因子,能通过与其特异受体(VEGF receptor, VEGFR)结合促使血管内皮细胞增强分化,分裂增殖,促使血管通透性增加。Smith等<sup>[1]</sup>对口腔及口咽癌研究发现,VEGF的高表达增强了肿瘤细胞对放射的抵抗,这是由于VEGF受乏氧的诱导,而乏氧的肿瘤具有放射抗拒性。宋士刚等<sup>[2]</sup>对宫颈癌的研究认为放射治疗可诱导肿瘤细胞VEGF的表达,阻止VEGF的表达可增加射线对肿瘤细胞的杀伤力,增加放射敏感性。姜武忠等<sup>[3]</sup>也报道鼻咽癌VEGF水平表达的高低与之放射敏感性、局部复发和转移呈正相关。因此,探讨抑制鼻咽癌VEGF水平的表达以提高鼻咽癌对放射治疗敏感性成为目前研究热点之一。

目前已有大量的研究证明,凋亡与肿瘤细胞的放射敏感性有关,诱导肿瘤细胞凋亡是放疗和化学治疗的主要目的之一,凋亡指数(AI)低的细胞对放射拮抗性大,放射效果差,因此诱导肿瘤凋亡已作为提高恶性肿瘤放射敏感性的重要方面备受关注。

腺病毒5型早期区E1A基因(early region 1A,

E1A)是一个具有抑瘤作用的基因,体内和体外研究均表明,在乳腺癌、卵巢癌、横纹肌软骨瘤、骨肉瘤、黑色素瘤和非小细胞肺癌等肿瘤中E1A基因均具有抑瘤作用<sup>[4]</sup>。笔者<sup>[5-6]</sup>曾报道在尤文氏肉瘤中E1A通过抑制VEGF的表达和诱导肿瘤细胞的凋亡来提高尤文氏肉瘤对化疗的敏感性。也曾用腺病毒(Ad-E1A)载体转染E1A基因进入这些鼻咽癌CNE-2Z细胞内,可以抑制VEGF的表达,增加鼻咽癌细胞对放射的敏感性<sup>[7]</sup>。但是,对于体内的鼻咽癌细胞,E1A基因是否能抑制鼻咽癌细胞VEGF的表达,是否能增加放射诱导鼻咽癌细胞凋亡的能力,是否能提高鼻咽癌细胞对放射的敏感性仍不清楚。因此,笔者用复制缺陷的腺病毒基因载体系统将E1A基因转染入鼻咽癌CNE-2Z细胞的荷瘤裸鼠的肿瘤内,旨在观察E1A基因治疗效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 腺病毒载体的来源、扩增、透析纯化、滴度和贮存

Adenovirus-E1A(Ad-E1A)由美国德州大学MD Anderson Cancer Center的Dr. Zhichao Zhou惠赠。Adenovirus- $\beta$ -galactosidase(Ad- $\beta$ -gal)购于北

京本元正阳公司。腺病毒载体包装细胞 293 细胞由中南大学肿瘤研究所提供。

腺病毒在 293 细胞中扩增、提取和纯化,按照 BD Adeno-XTM 病毒纯化试剂盒和 BD Aneno-XTM 快速滴定测定病毒试剂盒操作进行。病毒颗粒(Ad-E1A, Ad- $\beta$ -gal)分成每管 50  $\mu$ L,在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存,保存期限为 1 年。

### 1.2 细胞培养及裸鼠饲养

人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞购自中山医科大学细胞培养中心,培养在含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基中,37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。用于动物体内试验的细胞系是第 3 代到第 10 代年轻的人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞。

年龄为 2~3 周 BALB/C 雄性裸鼠购自上海试验动物中心,购买后先喂养 1~2 周再进行试验。

### 1.3 鼻咽癌动物模型的建立及体内实验

取对数生长期的 CNE-2Z 细胞  $5 \times 10^5/0.2$  mL,接种于 4 周龄左右裸鼠右前肢腋部皮下致瘤,第 7 天裸鼠肿瘤长至直径为 0.6~0.8 cm 时,随机分为 6 组( $n=10$ )。第 1 组为 PBS 组。第 2 组为 Ad- $\beta$ -gal 组,即第 2 周开始,于荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad- $\beta$ -gal 注射,每周 2 次,连续 2 周。第 3 组为放射组,即第 3 周开始给予 6MV-X 照射,将裸鼠用速眠新麻醉后,仰卧位固定,并充分暴露右前肢下肿瘤。肿瘤表面覆盖 1.0 cm 组织补偿胶体,正常组织覆盖铅安全屏障,直线加速器(西门子 PRIMUS M 型加速器),6 MV X 线照射,源轴距(SAD)=100 cm,剂量率为 2 Gy/min,射野 2 cm  $\times$  2 cm,每天 2 Gy,连续 5 d。第 4 组为 Ad- $\beta$ -gal + 放射组,即第 2 周开始,于荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad- $\beta$ -gal 注射,每周 2 次,连续 2 周,第 3 周给予 6MV-X 照射,同第 3 组。第 5 组为 Ad-E1A 组,即第 2 周开始,荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad-E1A 注射,每周 2 次,连续 2 周。第 6 组为 Ad-E1A + 放射组,即第 2 周开始,予荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予滴度为  $5 \times 10^9$  PFU/50  $\mu$ L 的 Ad-E1A 注射,每周 2 次,连续 2 周,第 3 周给予 6MV-X 照射,同第 3 组。第 1 次治疗后,每隔 4 天用游标卡尺测量 1 次肿瘤的体积,记录两端直径,肿瘤体积的计数公式为  $v=1/2ab^2$ <sup>[8]</sup>, a 和 b 分别为长径和短径。记录裸鼠的生存时

间;分别观察各组肿瘤最大径从  $(6.0 \pm 0.3)$  mm 生长至  $(20.0 \pm 0.3)$  mm 所用的时间,用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单位为 d(分别记为 TA, TB, TC, TD)。比较 Ad-E1A 组(TC)与对照组(TA)间、放射治疗 + Ad-E1A 组(TD)与放射治疗组(TB)间的差异。参考 Gordon Steel 等<sup>[9]</sup>计算肿瘤生长延缓时间(tumor growth delay, TGD)与增强因子(EF)公式如下:  $TGD = TB/TC/TD - TA$ ,  $EF = (TD^3/TC) / (TB^3/TA)$ 。以每组每天肿瘤体积的均数绘制生长曲线。当肿瘤的两端直径超过 2 cm 时,处死裸鼠,分离肿瘤组织进行如下分析:免疫组织化学分析 VEGF 和 CD34 表达;TUNEL 分析肿瘤细胞凋亡。

### 1.4 免疫组织化学方法分析 CD34 和 VEGF 的表达

肿瘤组织冰冻切片先用 100% 丙酮(0  $^{\circ}$ C)固定 5 min 后用 PBS 洗 3 次,然后浸在含有 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇中 10 min(室温)消除内源性过氧化物;PBS 洗 3 次,浸在含有 5% 正常马血清(NSH) + 1% 正常山羊血清(NGS)的 PBS 溶液 10 min 阻断非特异性结合后,滴加 CD34 一抗(1:200)或 VEGF 一抗(1:400)(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)0  $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 PBS 洗 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500)室温 60 min;PBS 洗 3 次,在 DAB 显色 1~2 min,用 Gill's 苏木素衬染、脱水封片,光镜观察。

CD34 表达于小血管内皮细胞,阳性染色为棕黄色颗粒。微血管密度(microvessel density, MVD)的测定方法参照 Weidner 等<sup>[10]</sup>的方法:CD34 阳性以血管内皮细胞呈棕色或棕黄色染色为标准;切片在 100 倍光镜下挑选微血管分布最高密度区域,在 200 倍光镜下计数 10 个不重复视野中被 CD34 染成棕黄色的微血管数,取其平均值作为 MVD。

VEGF 阳性表达主要在鼻咽癌 CNE-2Z 细胞质内和细胞膜上,染色由浅黄至棕褐色。选择高倍镜视野( $\times 400$ )视野,判定方法参考 Mattern 法<sup>[11]</sup>,按染色深浅分为 4 级:未见染色为 0 分(-),染成浅黄即轻度染色为 1 分(+),染成棕黄即中度染色为 2 分(++),染成棕褐色即重度染色为 3 分(+++);阳性细胞百分比:未见染色为 0 分(-),染色细胞 < 25% 为 1 分(+),染色细胞为 26%~50% 为 2 分(++),染色细胞 > 50% 为 3 分(+++)。两者积分 0~2 分判定

为阴性, >2 分为阳性。

### 1.5 TUNEL 分析鼻咽癌肿瘤细胞的凋亡

肿瘤组织冰冻切片用含 4% 甲醛的 PBS 溶液固定 10 min 后用 PBS 冲洗 3 次, 然后用 20 mg/L 蛋白酶 K 溶液在室温下处理 10 min; 增加细胞膜的通透性后用 PBS 冲洗 3 次, 用平衡溶液在室温下平衡 10 min, 在 TDT 培养缓冲溶液中, 用 12-dUTP 标记 DNA 片段, 37 °C 60 min, 切片放于 2 × SSC 溶液 (0.3 mmol/L NaCl, 0.03 mmol/L 柠檬酸钠, pH7.0) 中 15 min 终止反应; 再用 PBS 冲洗游离的 12-dUTP, 用 DAB 显色, 苏木素负染。凋亡的细胞呈现核浓缩, 胞浆为棕黄色。光镜下随机观察 10 个高倍视野, 计算核浓缩的凋亡细胞的数目。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS. 10 统计软件进行数据分析, 用 two-tailed student *t* test 统计评估肿瘤体积的大小和血量数目,  $P < 0.01$  被认为有统计学差异; 用 Log-rank test 来分析生存曲线,  $P < 0.05$  被认为有统计学差异。肿瘤倍增时间和生长延缓时间, 按资料分别进行  $\chi^2$  检验和方差分析,  $P < 0.01$  为有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 裸鼠皮下肿瘤的生长和裸鼠生存率的分析

通过观察 4 组裸鼠肿瘤平均最大径从 (6.0 ± 0.3) mm 生长至 (20.0 ± 0.3) mm 的时间, 可以看出瘤内注射 Ad-E1A 及肿瘤局部放射均使肿瘤生长延缓, 而且两者联合引起的肿瘤生长延缓 (27.2 d) 大于两者分别使用引起的相加作用

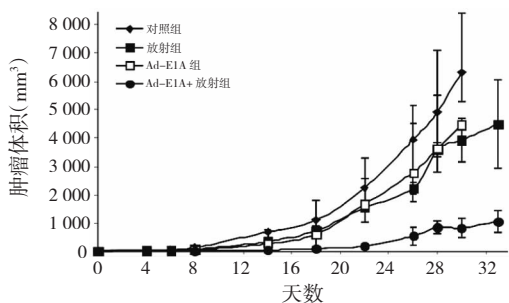


图 1 Ad-E1A 联合放射抑制裸鼠皮下肿瘤的生长。

Fig. 1 Ad-E1A plus radiotherapy inhibits the tumor growth of the nude mice.

(20.4 d, 表 1), 经计算, 增强因子为 2.58, 即 Ad-E1A 与放射联合应用引起的肿瘤生长延缓是单独照射的 2.58 倍。以每组每天肿瘤体积均数绘制肿瘤生长曲线, 见图 1。Ad-E1A + 放射组裸鼠的肿瘤平均体积比单独放射组的肿瘤平均体积小 4.7 倍, 比单独 Ad-E1A 组的肿瘤平均体积小 5.3 倍。Ad- $\beta$ -gal 组裸鼠的肿瘤体积与 PBS 组肿瘤体积比较无明显差别, Ad- $\beta$ -gal + 放射组与单独放射组肿瘤体积比较也无明显差别 (未提供数据)。当肿瘤的两直径大于 2 cm × 2 cm 时, Ad-E1A + 放射组的裸鼠生存率显著高于放射组、Ad-E1A 组、Ad- $\beta$ -gal 组或 Ad- $\beta$ -gal + 放射组 (图 2)。

### 2.2 免疫组织化学方法分析 VEGF 表达水平

免疫组织化学染色显示, PBS 组、Ad- $\beta$ -gal 组、放射组、Ad- $\beta$ -gal + 放射组、Ad-E1A 组和 Ad-E1A + 放射组的 VEGF 阳性表达率分别为 80% (36/45), 82% (41/50), 72.5% (29/40), 75% (30/40), 61% (22/36) 和 31% (4/13)。Ad-E1A + 放射组的 VEGF 蛋白表达较其他治疗组明显下降 ( $P < 0.01$ , 图 3)。

表 1 4 组裸鼠肿瘤平均最大径倍增时间和生长延缓时间 (d)

Tab. 1 Double time and tumor growth delay of tumors from 4 groups nude mice (d)

组别	最大径倍增时间	生长延缓时间
对照组	22.20 ± 0.80	-
放射组	31.40 ± 0.70	9.2
Ad-E1A 组	33.40 ± 4.90 **	11.2
放射 + Ad-E1A 组	49.40 ± 1.14 ##	27.2

与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与放射组比较, ##  $P < 0.01$ 。

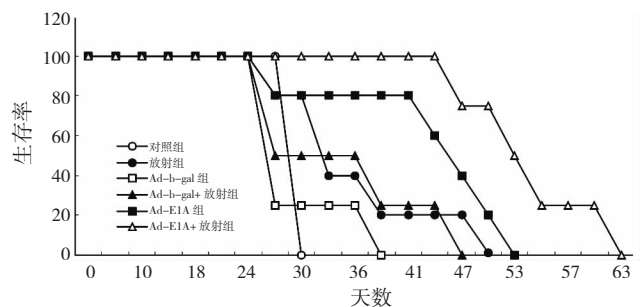


图 2 Ad-E1A 联合放射提高荷瘤裸鼠的生存率。

Fig. 2 Tumor-bearing mice treated with Ad-E1A plus radiotherapy had a longer survival rate than other groups.

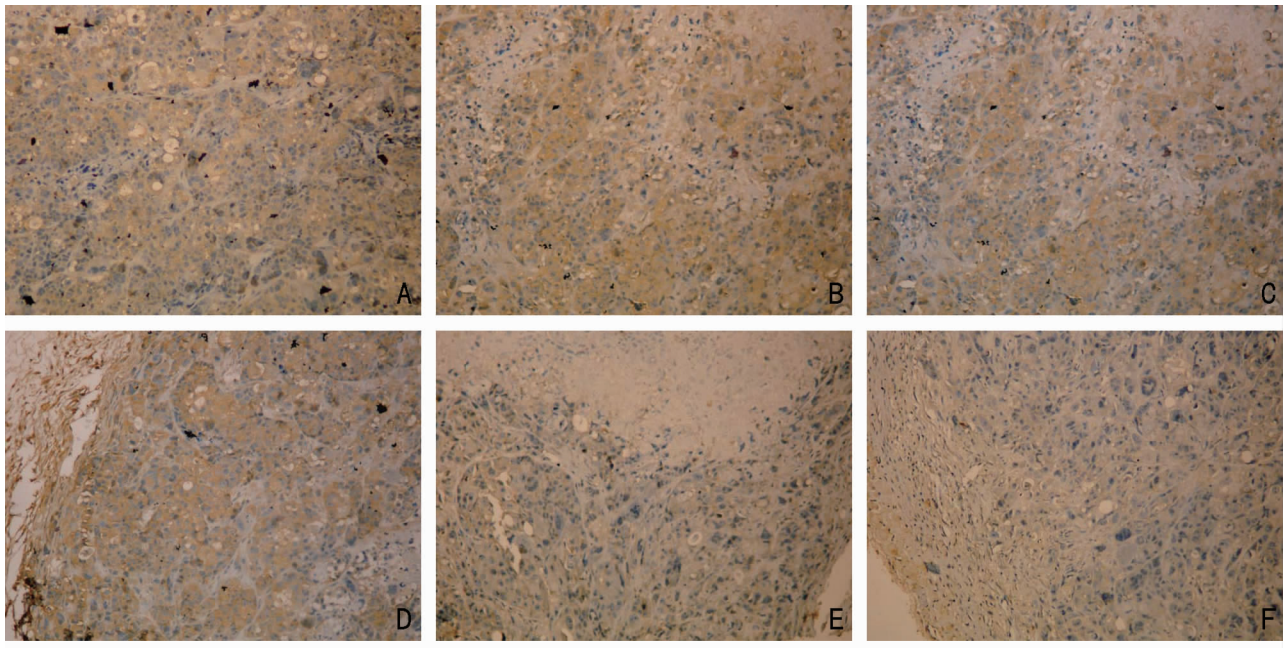


图3 免疫组织化学方法检测 VEGF 蛋白表达。A: PBS 组; B: Ad- $\beta$ -gal 组; C: 放射组; D: Ad- $\beta$ -gal + 放射组; E: Ad-E1A 组; F: Ad-E1A + 放射组。

Fig. 3 VEGF expression by immunohistochemical analysis. A: PBS group; B: Ad- $\beta$ -gal group; C: Radiotherapy group; D: Ad- $\beta$ -gal + radiotherapy group; E: Ad-E1A group; F: Ad-E1A + radiotherapy group.

### 2.3 免疫组织化学方法检测 CD34 表达

免疫组织化学方法结果显示, PBS 组、Ad- $\beta$ -gal 组、放射组、Ad- $\beta$ -gal + 放射组、Ad-E1A 组和 Ad-E1A + 放射组的 MVD 值分别为  $28.19 \pm 7.81$ ,  $26.23 \pm 6.73$ ,  $20.01 \pm 5.81$ ,  $23.19 \pm 6.21$ ,  $17.19 \pm 3.81$  和  $6.12 \pm 1.91$ , 与放射组、Ad- $\beta$ -gal 组、Ad- $\beta$ -gal + 放射组及 Ad-E1A 组比较, Ad-E1A + 放射组肿瘤组织的血管密度明显下降 ( $P < 0.01$ , 图 4, 5)。

### 2.4 TUNEL 分析人鼻咽癌细胞的凋亡

TUNEL 分析 PBS 组、Ad- $\beta$ -gal 组、放射组、Ad- $\beta$ -gal + 放射组、Ad-E1A 组和 Ad-E1A + 放射组的阳性细胞表达率分别为 10% (1/10), 11.7% (2/17), 20.6% (6/29), 20.0% (6/30), 27.7% (10/36) 和 58.3% (21/36), Ad-E1A 组和 Ad-E1A + 放射组及放射组的肿瘤组织内均可明显观察到凋亡细胞。并且, Ad-E1A + 放射组肿瘤细胞凋亡数目明显高于 Ad-E1A 组或者放射组 ( $P < 0.01$ , 图 6)。

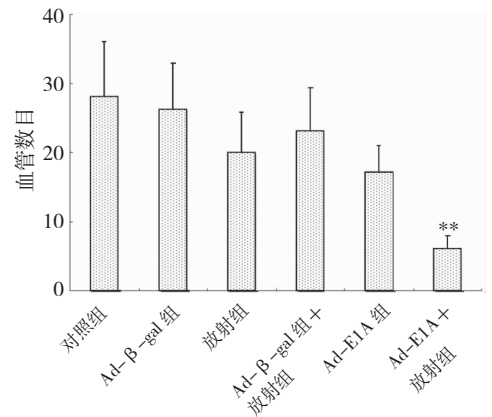


图4 荷瘤裸鼠肿瘤组织血管密度分析。\* \* Ad-E1A + 放射组的血管密度与其他组相比,  $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Microvessel density analysis of tumors from 6 groups. The vessel density expression in the tumors treated with Ad-E1A plus radiotherapy was significantly lower than those of other groups ( $P < 0.01$ ).



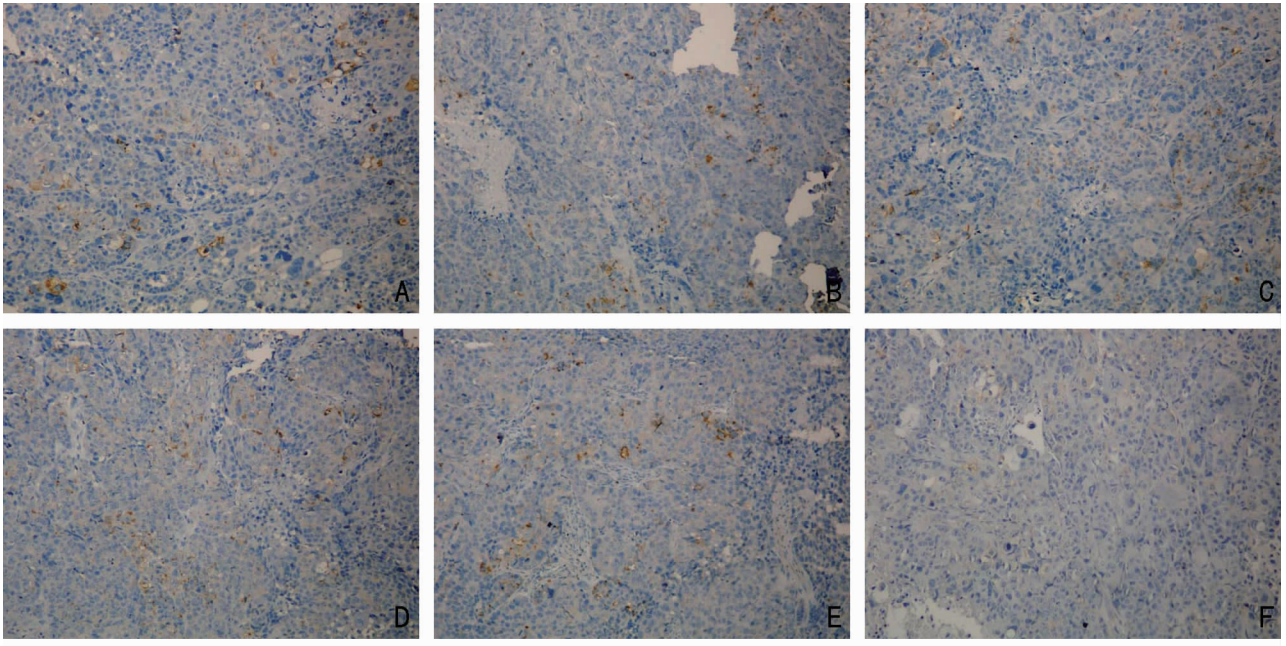


图5 免疫组织化学方法检测 CD34 表达。A: PBS 组; B: Ad- $\beta$ -gal 组; C: 放射组; D: Ad- $\beta$ -gal + 放射组; E: Ad-E1A 组; F: Ad-E1A + 放射组。

Fig. 5 CD34 expression by immunohistochemical analysis. A: PBS group; B: Ad- $\beta$ -gal group; C: Radiotherapy group; D: Ad- $\beta$ -gal + radiotherapy group; E: Ad-E1A group; F: Ad-E1A + radiotherapy group.

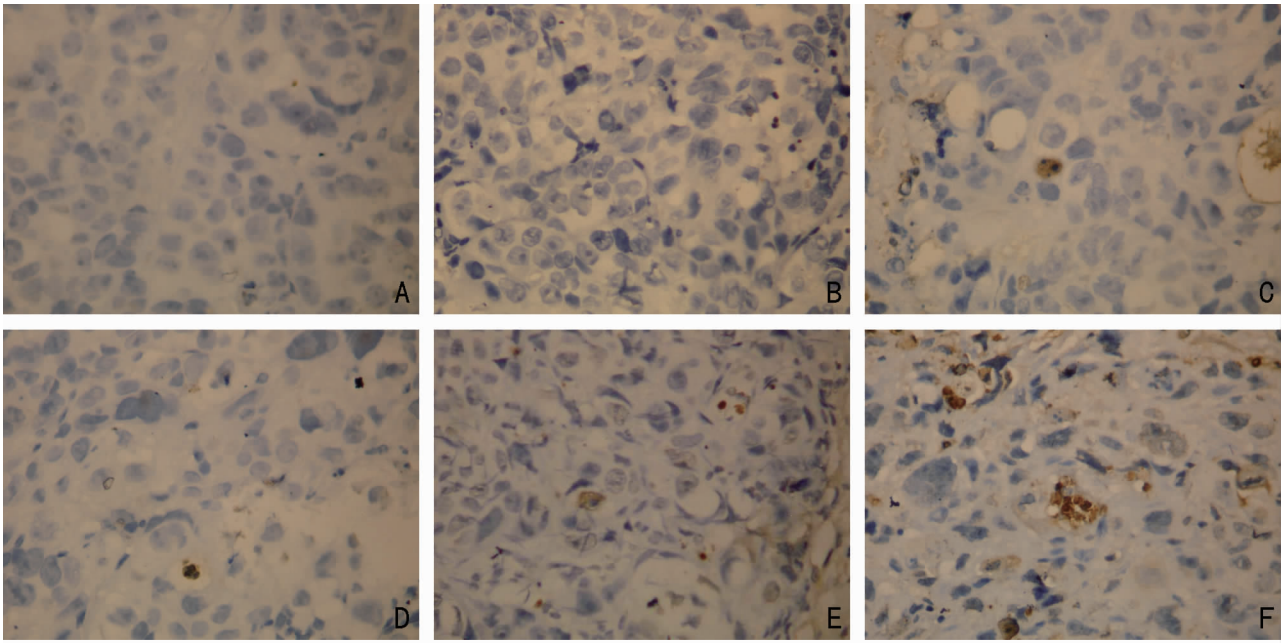


图6 TUNEL 分析法检测荷瘤裸鼠肿瘤组织的凋亡细胞。A: PBS 组; B: Ad- $\beta$ -gal 组; C: 放射组; D: Ad- $\beta$ -gal + 放射组; E: Ad-E1A 组; F: Ad-E1A + 放射组。

Fig. 6 Apoptosis cells from tumor by TUNEL staining. A: PBS group; B: Ad- $\beta$ -gal group; C: Radiotherapy group; D: Ad- $\beta$ -gal + radiotherapy group; E: Ad-E1A group; F: Ad-E1A + radiotherapy group.

### 3 讨 论

放射治疗是目前治疗鼻咽癌最有效的治疗手段,但放疗后肿瘤局部复发未控和转移是导致患者死亡的重要原因,并且肿瘤细胞对再次放射治疗的敏感性明显下降。如果加大放射剂量可提高治疗效果,但对周围正常组织的损害增大,并会带来严重的放射副作用,甚至超过肿瘤本身对身体的损伤。因此,研究如何增强鼻咽癌对放射治疗的敏感性以及提高鼻咽癌放射治疗效果有重要的临床意义。

*E1A* 是人腺病毒早期表达基因, *E1A* 通过与不同的 DNA 结合位点相互作用调控基因转录<sup>[12]</sup>。在 *HER2/neu* 过表达的肿瘤中 *E1A* 通过抑制 *HER2/neu* 基因转录对过表达 *HER2/neu* 的肿瘤细胞的生长和转移发挥抑制作用;对于 *HER2/neu* 表达低的肿瘤, *E1A* 能逆转肿瘤的恶性表型,还能通过抑制蛋白基因表达抑制肿瘤的转移,以及减少 *ras* 转化的鼠胚胎细胞的转移能力<sup>[13]</sup>。Sanchez-Drieto 等<sup>[14]</sup>认为 *E1A* 能使对肿瘤细胞损伤的药物和射线的敏感性提高 4~10 倍。王晓雷等<sup>[15]</sup>亦报道了 *E1A* 对头颈部淋巴结转移鳞癌细胞和人肺腺癌细胞有放疗增敏作用。在体外实验中, *E1A* 通过调节细胞周期,抑制 VEGF 的表达来提高鼻咽癌细胞对放射治疗的敏感性<sup>[7]</sup>。为了探讨 *E1A* 基因对体内人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞生长及放射敏感性的影响,笔者用复制缺陷的腺病毒基因载体系统将 *E1A* 基因转入鼻咽癌 CNE-2Z 细胞荷瘤裸鼠的肿瘤细胞内以观察 *E1A* 基因治疗效果。结果显示: Ad-*E1A* + 放射组与其他各组相比明显延缓了裸鼠生长时间, Ad-*E1A* + 放射组裸鼠的肿瘤平均体积比单独放射组的肿瘤平均体积小 4.7 倍,比单独用 Ad-*E1A* 治疗的小 5.3 倍。Ad-*E1A* + 放射组的裸鼠生存率显著高于其他 5 组。结果说明 *E1A* 基因在体内亦能通过抑制肿瘤细胞的生长来提高人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 对放射的敏感性。

但 *E1A* 对肿瘤细胞放疗增敏作用机制目前尚不十分清楚。Ye 等<sup>[16]</sup>报道 *E1A* 抑瘤功能是 *E1A* 在某些条件下通过 P53-依赖或 P53-非依赖的机制及依赖 Caspase-3 激活机制引起肿瘤细胞凋亡。新生血管的形成,对肿瘤的生长和转移非

常重要。本课题组曾报道 *E1A* 能下调尤文氏肉瘤 TC71 细胞 VEGF 和 MMP-9 及 CD31 的表达,诱导尤文氏肉瘤 TC71 的凋亡<sup>[5-6]</sup>。在本实验中, Ad-*E1A* + 放射组 VEGF 的蛋白表达和肿瘤组织的微血管密度表达较其他各组明显下降。说明 *E1A* 联合放射治疗能明显减少肿瘤的新生血管形成。TUNEL 分析结果显示 Ad-*E1A* + 放射组的肿瘤细胞凋亡数目明显高于其他组。以上结果说明, *E1A* 基因在体内亦能通过抑制 VEGF 的表达,抑制肿瘤微血管的形成以及增加放射诱导的鼻咽癌细胞的凋亡,来提高人鼻咽癌对放射的敏感性。

总之,在体内 *E1A* 基因治疗能提高人鼻咽癌细胞的放射治疗效果。由于鼻咽癌放疗后的复发患者对再次放疗的效果差,正常组织的损害增大,目前尚缺乏新的有效治疗方法,因此 Ad-*E1A* 基因治疗可能成为一种新的潜在的鼻咽癌放疗增敏的方法。

#### 参考文献:

- [1] Smith B D, Smith G L, Carter D, et al. Prognostic significance of vascular epithelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10):2046-2052.
- [2] 宋士刚,邢丽娜. VEGF 反义核酸联合放射治疗对裸鼠移植瘤宫颈癌的作用 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2009, 43(1):41-44.  
SONG Shigang, XING Lina. Effect of VEGF an tisen senucle ic ac ids un ited rad ia tion therapy on nude mouse tran splan ta tion tumor uterine cervix cancer [J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2009, 43(1):41-44.
- [3] 姜武忠,廖遇平,赵素萍. 鼻咽癌组织中转移抑制基因和血管内皮生长因子蛋白表达及其临床意义 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41(3):200-204.  
JIANG Wuzhong, LIAO Yuping, ZHAO Suping, et al. Expression clinical significance of nm23-H1 and vessel endothelium growth factor protein in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2006, 41(3):200-204.
- [4] Frisch S M. Antioncogenic effect of adenovirus *E1A* in human tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(20):9077-9081.
- [5] Zhou Z C, Zhou R R, Guan H, et al. *E1A* gene therapy inhibits angiogenesis in a Ewing's sarcoma animal model [J]. *Mol Cancer Therapeutics*, 2003, 2(12):1313-1319.
- [6] Zhou R R, Jia S F, Zhou Z, et al. Adenovirus-*E1A* gene

- therapy enhances the in vivo sensitivity of Ewing's sarcoma to VP-16 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(5):407-413.
- [7] 周蓉蓉,肖志强,廖遇平,等. *E1A* 基因下调人鼻咽癌细胞 VEGF 的表达来提高放射治疗的敏感性[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(20):339-639.
- ZHOU Rongrong, XIAO Zhiqiang, LIAO Yuping, et al. Enhancement of radio sensitivity in nasopharyngeal cancer cells by the ownregulation of VEGF expression after adenovirus-*E1A* gene therapy [J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2008, 22(20):339-639.
- [8] Vanhaesebroeck B, Mareel M, Van Roy F, et al. Expression of the tumor necrosis factor gene in tumor cells correlates with reduced tumorigenicity and reduced invasiveness in vivo [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(8):2229-2238.
- [9] Gordon GS. *Basic Clinical radiobiology* [M]. 3rd ed. London: Hodder Arnold, 2002:182-191.
- [10] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis; a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24):1875-1887.
- [11] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7):931-934.
- [12] Moran E, Mathews M. Multiple functional domains in the adenovirus *E1A* gene cell [J]. 1987, 48(2):177-178.
- [13] Frisch S M. Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(20):9077-9081.
- [14] Sanchez-Drieto R, Quintanilla M, Cano A, et al. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of adenovirus *E1A* gene [J] *Oncogene*, 1996, 13(5):1083-1092.
- [15] 王晓富, 千新来, 赵清正, 等. *E1A* 基因对头颈部淋巴结转移鳞癌细胞体外生长的抑制和化放疗增敏的作用 [J]. *癌症*, 2003, 22(11):1140-1146.
- WANG Xiaofu, QIAN Xinlai, ZHAO Qingzheng, et al. Effect of *E1A* gene on in vitro growth inhibition and radiosensitivity of lymph node metastasis cells of human head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2003, 22(11):1140-1146.
- [16] Ye Z, Wang X, Hao S, et al. Oncolytic adenovirus-mediated *E1A* gene therapy induces tumor-cell apoptosis and reduces tumor angiogenesis leading to inhibition of hepatocellular carcinoma growth in animal model [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2006, 21(3):225-234.

(本文编辑 陈丽文)