



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.007

· 基础研究 ·

低剂量辐射联合人端粒酶逆转录酶C27过表达治疗非小细胞肺癌的实验研究

周洪帅¹,林桂焱²,王晓梅³,罗琳¹,杨柳²,卞东圆²,李沙沙²,蒋圣哲^{1,4},陈强¹(1. 包头医学院第一附属医院 医学影像科,包头医学院医学影像研究所,内蒙古 包头 014010;2. 深圳大学医学部公共卫生学院 毒理学教研室,广东 深圳 518060;3. 深圳大学医学部基础医学院 生理学教研室,广东 深圳 518060;4. 呼伦贝尔市人民医院影像科,内蒙古 海拉尔 021000)

[摘要] 目的:探讨低剂量辐射(LDR)与人端粒酶逆转录酶C末端多肽27(hTERTC27)过表达联合治疗对肺癌A549细胞增殖和凋亡的影响,同时观察LDR与常规放疗(CONV-RT)结合的体内抑瘤效应。方法:将pEgr-hTERTC27质粒转染人非小细胞肺癌A549及小鼠LLC肺癌(LLC)细胞,用G418筛选建立稳定表达C27的A549-C27细胞和LLC-C27细胞。细胞实验分为6组,分别是CONV-RT(A549-Con)、低剂量照射(A549-Low)、C27(A549-C27)、常规剂量联合C27(A549-C27-Con)、低剂量照射联合C27(A549-C27-Low)和对照(A549-Mock)组,其中Low组的辐照剂量仅为Con组的36%。MTT法检测各组细胞增殖活性,流式细胞术检测各组细胞凋亡率。通过皮下种植建立LLC肺癌移植瘤小鼠模型,动物实验分组同细胞实验;记录各组小鼠肿瘤生长情况,并检测各组肿瘤体积和质量,H-E染色观察各组移植瘤组织邻近肌肉浸润情况。结果:与A549-Mock比较,A549-Con和A549-Low组细胞增殖活性均显著降低(均P<0.01);而且A549-C27-Con和A549-C27-Low组细胞增殖活性显著低于A549-C27组(均P<0.01)。与A549-Mock组比较,A549-Con组和A549-Low组细胞凋亡率均显著升高(均P<0.01);A549-C27、A549-C27-Con和A549-C27-Low组细胞凋亡率无显著差异(P>0.05)。与未经照射治疗的荷瘤小鼠相比较,CONV-RT及LDR+CONV-RT均可使荷瘤小鼠肿瘤质量显著降低(均P<0.01)。此外,LDR+CONV-RT+C27组肿瘤质量显著减小,局部浸润减少(均P<0.01)。结论:LDR与CONV-RT相结合能够在降低辐射总剂量的同时达到与CONV-RT单独使用相似的非小细胞肺癌肿瘤抑制效果。而且,LDR与C27多肽有协同抗肿瘤作用,两者同时使用能够使移植瘤局部浸润减少。

[关键词] 低剂量辐射;人端粒酶逆转录酶C末端多肽27;基因治疗;非小细胞肺癌

[中图分类号] R734.2;R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)12-1218-09

Experimental study on low-dose radiation combined with hTERTC27 overexpression for the treatment of non-small cell lung cancer

ZHOU Hongshuai¹, LIN Guimiao², WANG Xiaomei³, LUO Lin¹, YANG Liu², BIAN Dongyuan², LI Shasha², JIANG Shengzhe^{1,4}, CHEN Qiang¹ (1. Department of Medical Imaging, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Institute of Medical Imaging, Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia, China; 2. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen 518060, Guangdong, China; 3. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China; 4. Department of Imaging, Hulunbuir People's Hospital, Hailaer 021000, Inner Mongolia, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of low-dose radiation (LDR) combined with human telomerase reverse transcriptase C-terminal polypeptide 27 (hTERTC27) overexpression on the proliferation and apoptosis of lung cancer A549 cells, and to observe the *in vivo* antitumor effects of LDR combined with C27. Methods: The pEgr-hTERTC27 plasmid was transfected into human non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells and mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells. Cells stably expressing C27 (A549-C27 and LLC-C27) were screened by G418 selection. The cells were divided into six groups: conventional radiation (CONV-RT) group (A549-Con), LDR group (A549-Low), C27 group (A549-C27), CONV-RT combined with C27 group (A549-C27-Con), LDR combined with C27 group (A549-C27-Low), and control group (A549-Mock). The irradiation dose in LDR group was only 36% of CONV-RT group. MTT assay

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(No. 2021SHZR0996);包头市青年创新人才项目资助

[作者简介] 周洪帅(1996—),女,硕士生,主要从事影像诊断与放疗研究,E-mail: 15735011324@163.com

[通信作者] 陈强,E-mail: xy198033@sina.com



was used to detect cell proliferation, and flow cytometry was used to measure cell apoptosis. LLC cell-transplanted tumor model in mice was established through subcutaneous implantation, and the animal experiment groups were similar with cell experiments. Tumor growth, volume, and mass were recorded in each group. Muscle infiltration near the transplanted tumors was observed using H-E staining. **Results:** Compared with A549-Mock group, the proliferative activity of A549-Con and A549-Low group was significantly decreased (all $P < 0.01$). Furthermore, the proliferation activity of A549-C27-Con and A549-C27-Low cells was significantly lower than that of A549-C27 cells (all $P < 0.01$). Compared with A549-Mock, the apoptosis rates were significantly higher in A549-Con and A549-Low groups ($P < 0.01$); however, no significant difference in apoptosis rates were observed among A549-C27, A549-C27-Con and A549-C27-Low groups (all $P > 0.05$). In tumor-bearing mice, both CONV-RT and LDR significantly reduced tumor mass compared with unirradiated mice (all $P < 0.01$). In addition, the tumor mass and local infiltration were significantly reduced in both LLC-C27-Low and LLC-C27-Con groups. **Conclusion:** LDR combined with C27 achieves similar antitumor effects to CONV-RT alone while reducing the total radiation dose in NSCLC. Moreover, LDR and C27 peptide synergize in their anti-tumor effects, with their combination reducing local tumor infiltration in transplanted tumor models.

[Key words] low-dose radiation (LDR); human telomerase reverse transcriptase C-terminal polypeptide 27 (hTERTC27); gene therapy; non-small cell lung cancer (NSCLC)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1218-1226. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.007]

肺癌是世界上最常见的癌症之一。有研究^[1]报道,每年约有2 200万新发肺癌病例和179万肺癌病死病例,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌病例的85%,是肺癌相关死亡的主要原因^[2-4]。放疗作为临床治疗癌症的有效方法^[5],对肿瘤的局部控制性强,在NSCLC的治愈性和姑息性治疗中都起着关键作用^[6-7],但最大辐射剂量通常受到正常组织耐受性的限制,从而制约了放射治疗的疗效。低剂量辐射(low-dose radiation, LDR)是指剂量<0.2 Gy的低传能线密度(linear energy transfer, LET)辐射或剂量<0.05 Gy的高LET辐射同时剂量率在0.05 mGy/min以内^[8]。目前,大量的研究资料^[9-11]证明LDR引起的生物学效应包括兴奋效应和适应性反应等,在恶性肿瘤治疗中存在巨大潜力和重要应用价值。研究^[12]证明,LDR(以全身或半身照射的形式)与化疗的联合能够有效地提高肿瘤治疗效果。hTERT-C27是一分子量为27 000的人类端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的C端多肽,能够促进染色体后期端至端的融合并诱导端粒功能障碍^[13]。此前的研究^[14-15]证实,该多肽的异位过表达能够明显降低人宫颈癌和胶质母细胞瘤细胞的增殖。本研究以人NSCLC细胞A549为体外研究模型,以小鼠LLC肺癌细胞建立动物研究模型,将LDR和hTERTC27基因药物联合应用于抗肿瘤研究,旨在探讨LDR的应用能否在降低辐射总剂量的同时达到理想的肿瘤抑制效果。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人A549细胞和小鼠LLC细胞由深圳大学医学部公共卫生学院毒理学教研室保存,pEgr-hTERTC27-GFP和pEgr-hTERTC27质粒为深圳大学

医学部基础医学院生理学教研室保存。健康清洁级C57BL/6小鼠36只,雄性,6~8周龄,体质量18~22g,购自珠海百试通生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(粤)2020-0051。Lipo6000™转染试剂购自碧云天公司,MTT试剂盒购自美国Sigma公司,凋亡试剂盒Annexin V -FITC/PI购自碧云天。荧光倒置显微镜(Eclipse Ts2)购自日本尼康公司,凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司,荧光酶标仪(INFINITE M PLEX)购自德国Tecan公司,小动物辐照仪(RS2000L)购自德国SIEMENS公司,小动物活体CT(Quantum GX2)购自美国PerkinElmer公司,流式细胞仪(CytoFLEX)购自美国BECKMAN COULTER公司。

1.2 质粒的构建和鉴定

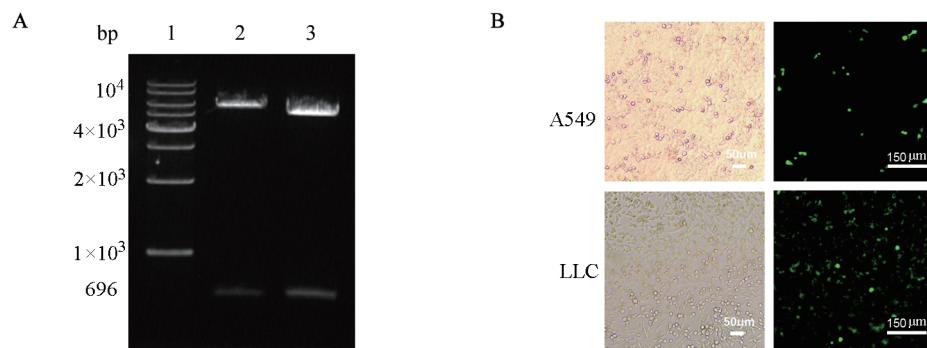
在pEgr-hTERTC27-GFP质粒中,巨细胞病毒启动子被Egr-1启动子取代。以pcDNA3.1-hTERTC27和pEGFP-N2(BD Biosciences)为模板,通过PCR分别获得hTERT C端多肽(hTERTC27,氨基酸残基882-1 132)和EGFP的cDNA。将hTERTC27 cDNA亚克隆到pEgr质粒的Kpn I和EcoR I位点,先得到pEgr-C27质粒;再将EGFP cDNA亚克隆到EcoR I和Xba I位点,生成共表达hTERTC27和EGFP融合蛋白的pEgr-C27-GFP质粒。按常规操作过程扩增、纯化和提取质粒。采用Kpn I和EcoR I双酶切法对提取的质粒进行鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果显示:真核表达载体pEgr-C27-GFP及pEgr-C27经Kpn I和EcoR I双酶切后,均各自产生一个长度为696 bp的C27特异基因片段和1个长片段(图1A),初步判定质粒构建成功。

1.3 细胞培养和转染

用含10%胎牛血清的DMEM(高糖)培养基培养A549细胞,用含10%胎牛血清的RPMI培养基培养

LLC 细胞,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。收集处于对数生长期细胞,悬浮细胞,调整其密度为 1×10^5 个/mL,按 2 mL/孔将细胞铺于 6 孔培养板中,待次日细胞汇合度达约 70% 时进行转染。使用 Lipo6000™ 转染试剂将 pEgr-C27-GFP 和 pEgr-C27 质粒分别转染到 A549 和 LLC 细胞。36 h 后用荧光显微镜观察转染 pEgr-C27-GFP 细胞中 EGFP 的表达情况,并以未经转染质粒的 A549 细胞(A549-Mock)和

LLC 细胞(LLC-Mock)作为阴性对照,转染效率 = 绿色荧光细胞数/细胞总数 × 100%。A549 及 LLC 细胞转染 pEgr-C27-GFP 质粒 36 h 后,荧光显微镜下显示 hTERTC27-EGFP 融合蛋白在转染的 A549 细胞和 LLC 细胞中大量表达,质粒转染效率均 > 50%,并且蛋白表达主要集中在细胞核内,这与 hTERTC27 蛋白多肽表达的位置一致,初步判定转染成功(图 1B)。



A: 梳道 1 为 DNA 标准分子量,梳道 2 为 pEgr-C27-GFP 质粒的酶切产物,梳道 3 为 pEgr-C27 质粒的酶切产物;B: 普通光和荧光显微镜下观察 A549 细胞和 LLC 细胞的转染效率(标尺 = 150 μm)。

图 1 质粒的酶切及细胞转染效率的鉴定

1.4 C27 过表达稳定株的筛选

G418 最佳作用浓度筛选:将 A549 细胞种板后,待细胞汇合度达约 60% 时分为未转染组和转染质粒组,加入浓度呈梯度变化的 G418,观察 1 周后,选取最佳工作浓度,LLC 细胞的筛选方法同 A549 细胞。其中 A549 细胞最佳工作浓度为 300 mg/L,LLC 细胞最佳工作浓度为 200 mg/L。稳定株的筛选:根据筛选出的最佳 G418 作用浓度转染 C27 重组质粒的 A549 和 LLC 细胞直至获得稳定存活的细胞,将稳定转染 pEgr-C27 载体的 A549 细胞和 LLC 细胞分别称为 A549-C27 细胞和 LLC-C27 细胞,未转染的 A549 细胞和 LLC 细胞称为 A549-Mock 细胞和 LLC-Mock 细胞。

1.5 细胞实验照射方案和分组

使用小动物辐照仪进行细胞照射。细胞实验照射方案分为常规放疗(convventional radiotherapy, CONV-RT, Con)和 LDR 联合 CONV-RT(LDR + CONV-RT, Low),均为每天照射 1 次,连续照射 3 d,其中 Con 照射每天的照射剂量均为 2 Gy(剂量率 1 Gy/min),总剂量 6 Gy,Low 照射第 1 天的照射剂量为 2 Gy(剂量率 1 Gy/min),后 2 d 的照射剂量为 0.075 Gy(剂量率 0.5 Gy/min),总剂量 2.15 Gy。细胞实验分为 6 组,分别是 CONV-RT(A549-Con)组、LDR(A549-Low)组、质粒转染(A549-C27)组、CONVT-RT 联合 C27(A549-C27-Con)组、LDR 联合 C27(A549-C27-Low)组及对照(A549-Mock)组(图 2A)。

1.6 MTT 法检测各组 A549 细胞的增殖活性

分别将 A549-C27 细胞和 A549-Mock 细胞(2×10^3 个/孔)接种于 96 孔板,终体积为 200 μL,每组设 4 个平行复孔,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,对细胞进行照射(A549-Con、A549-Low、A549-C27-Con 和 A549-C27-Low 组)。照射处理 24 h 后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,继续在 37 °C 培养箱培养 4 h,加入二甲基亚砜后低速振荡。用荧光酶标仪在 570 nm 处测定各孔的光密度(D)值,以仅加入培养液的空白孔为对照孔调零。以 D 值代表各组细胞的增殖活性。所有的实验均重复 3 次,取平均值后分析并绘图。

1.7 流式细胞术检测各组 A549 细胞的凋亡

分别将 A549-C27 细胞和 A549-Mock 细胞接种于 6 孔板(2×10^4 个/孔),37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后对 A549-Con 组、A549-Low 组、A549-C27-Con 组和 A549-C27-Low 组分别进行照射。照射 12 h 后收获细胞,在冰冷的 PBS 中洗涤一次,用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色,然后立即用流式细胞仪进行分析。

1.8 LLC-Mock 细胞和 LLC-C27 细胞移植瘤动物模型的构建、照射和分组

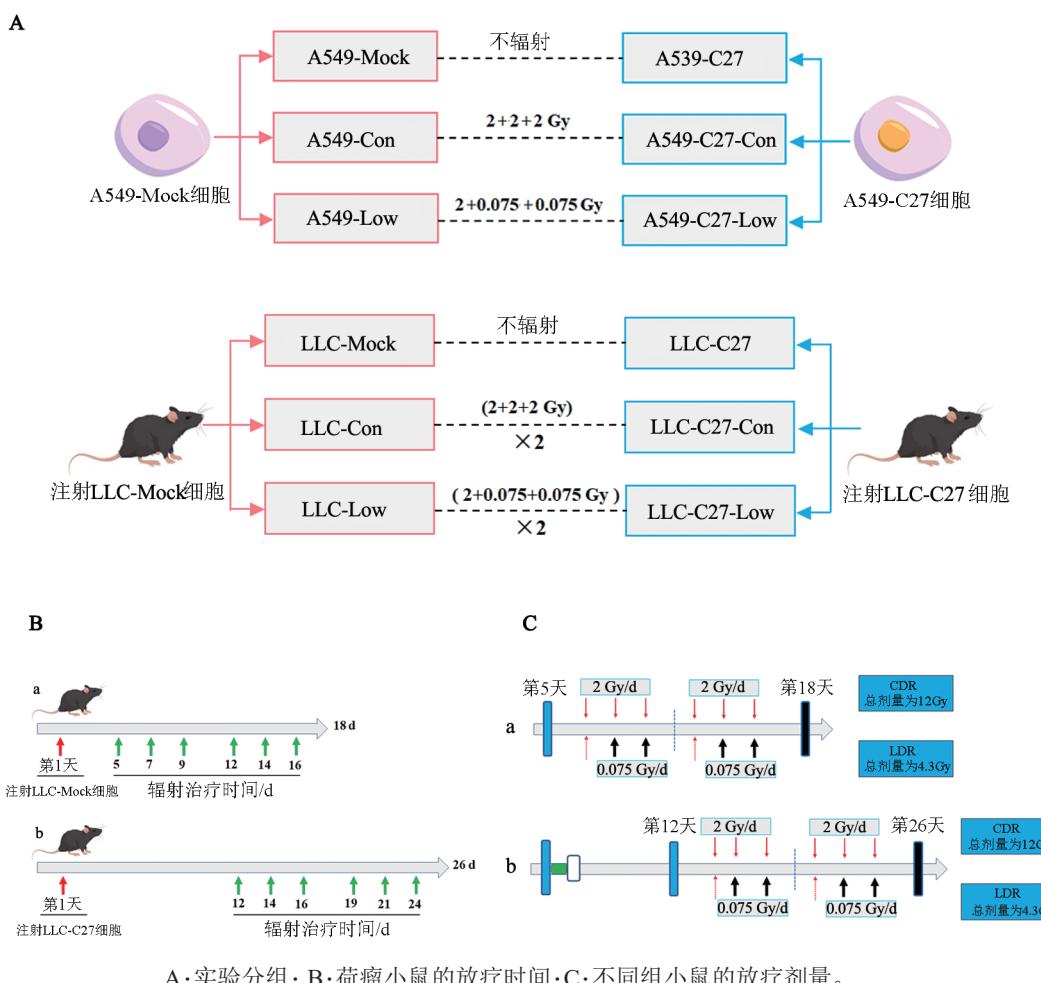
分别采集 LLC-Mock 细胞和 LLC-C27 细胞,调整细胞悬液密度至 5×10^6 个/mL,每只 C57BL/6 小鼠中背部皮下注射细胞悬液 0.2 mL,建立皮下移植瘤小鼠模型。待背部皮下形成肿块(直径约 2~3 mm),以



小动物活体CT进行扫描以确定肿瘤动物模型成功建立。

体外以小动物辐照仪对肿瘤局部进行照射。将18只移植瘤小鼠按随机数字表法分为3组,每组6只小鼠,体内实验分组设计与体外实验相似,具体实验设计如图2A所示。LLC-Mock组和LLC-C27组动物不做任何处理,LLC-Con组和LLC-C27-Con组动物

接受CONV-RT, LLC-Low和LLC-C27-Low组动物接受常规剂量联合低剂量照射,共进行2周,具体实验过程和照射剂量如图2B、C所示。CONV-RT每次的照射剂量均为2 Gy(剂量率1 Gy/min),总剂量12 Gy。常规剂量联合低剂量照射为每周第1次的照射剂量为2 Gy(剂量率1 Gy/min),后2次的照射剂量为0.075 Gy(剂量率0.5 Gy/min),总剂量4.3 Gy。



A:实验分组;B:荷瘤小鼠的放疗时间;C:不同组小鼠的放疗剂量。

图2 动物实验分组及荷瘤小鼠的放疗方案

1.9 称量各组小鼠移植瘤质量

从移植肿瘤细胞开始,每天用游标卡尺测量异种移植瘤的体积大小,根据公式 $V(\text{mm}^3) = L \times W^2/2$ 计算肿瘤体积,其中L和W分别为肿瘤的长径和短径,制作生长曲线。根据国际公认的实验肿瘤动物福利,当大多数小鼠肿瘤直径达到15 mm时即被处死。手术剥离获得移植瘤并进行称质量、测量大小。

1.10 H-E染色观察小鼠瘤旁肌肉组织的浸润程度

将移植瘤组织标本用4%多聚甲醛固定20 h、脱水、透明、浸蜡和包埋,将包埋好的移植瘤组织蜡块切片,厚度为5 μm,按H-E染色试剂盒进行后续步骤。染色完成后,显微镜下观察各组小鼠肿瘤组织病理形态及邻近肌肉组织的浸润情况,并用Image J软件测量各组

移植瘤组织浸润邻居肌肉组织的深度。

1.11 统计学处理

本研究所有数据的计算和统计均采用SPSS 26.0软件包(SPSS, Inc. Chicago, IL, U S A)进行,用GraphPad Prism 8.0绘制统计图。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用独立样本的t检验,多组之间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CONV-RT和LDR均可抑制A549细胞增殖活性

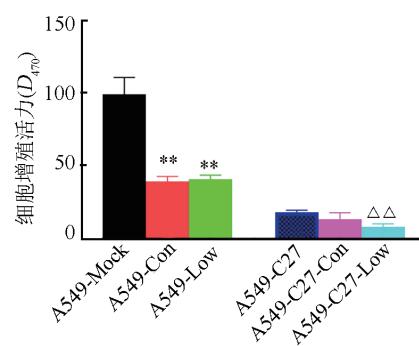
MTT法检测结果(图3)显示,在不同放疗剂量处

理 24 h 后, 未转染 pEgr-hTERTC27 质粒的 3 组 A549 细胞 (A549-Mock 组、A549-Con 组和 A549-Low 组) 的增殖活性存在显著差异 ($F = 89.921, P < 0.01$) , 其中 A549-Con 组和 A549-Low 组细胞的增殖活性均显著低于 A549-Mock 组 (均 $P < 0.01$), 而 A549-Con 组和 A549-Low 组两组之间细胞的增殖活性差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) ; 转染 pEgr-hTERTC27 质粒的 3 组 A549 细胞 (A549-C27 组、A549-C27-Con 组和 A549-C27-Low 组) 的细胞增殖活性也存在显著差异 ($F = 12.126, P < 0.01$), A549-C27-Low 组细胞增殖能力显著低于 A549-C27 组 ($P < 0.01$), 而在 A549-C27-Con 组与 A549-C27 组之间及 A549-C27-Con 组和 A549-C27-Low 组之间细胞的增殖能力均没有显著差异 (均 $P > 0.05$)。实验结果说明, CONV-RT 和 LDR 均能明显抑制 A549 细胞的增殖活性, 在过表达 C27 的基础上进行 LDR 能进一步抑制 A549 细胞的增殖活力。

2.2 CONV-RT 和 LDR 均可促进 A549 细胞凋亡率

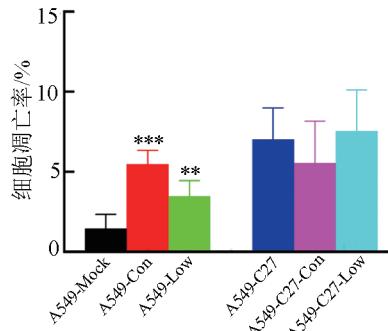
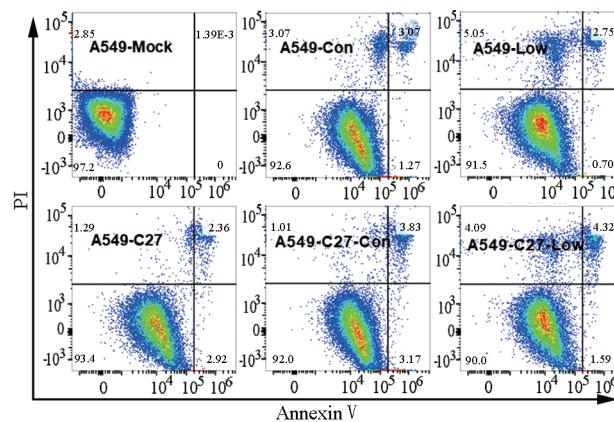
流式细胞术检测结果 (图 4) 显示, 未转染 pEgr-hTERTC27 质粒的 3 组 A549 细胞 (A549-Mock 组、A549-Con 组和 A549-Low 组) 的凋亡百分比之间存在显著差异 ($F = 41.077, P < 0.01$)。其中 A549-Con 组

和 A549-Low 组细胞的凋亡细胞率均显著高于 A549-Mock 组 (均 $P < 0.01$), 而 A549-Con 组和 A549-Low 组两组之间的细胞凋亡率无显著差异 ($P > 0.05$) ; 转染 pEgr-hTERTC27 质粒的 3 组 A549 细胞 (A549-C27 组、A549-C27-Con 组和 A549-C27-Low 组) 的凋亡细胞率均无显著差异 ($F = 0.924, P > 0.05$)。实验结果说明, CONV-RT 和 LDR 均能明显促进 A549 细胞凋亡, 但在过表达 C27 的基础上进行 LDR 并未见进一步促进 A549 细胞凋亡。



与 A549-Mock 比较, ** $P < 0.01$; 与 A549-C27 比较, △△ $P < 0.01$ 。

图 3 MTT 法检测各组 A549 细胞的增殖活性



与 A549-Mock 比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 流式细胞术检测各组 A549 细胞的凋亡水平

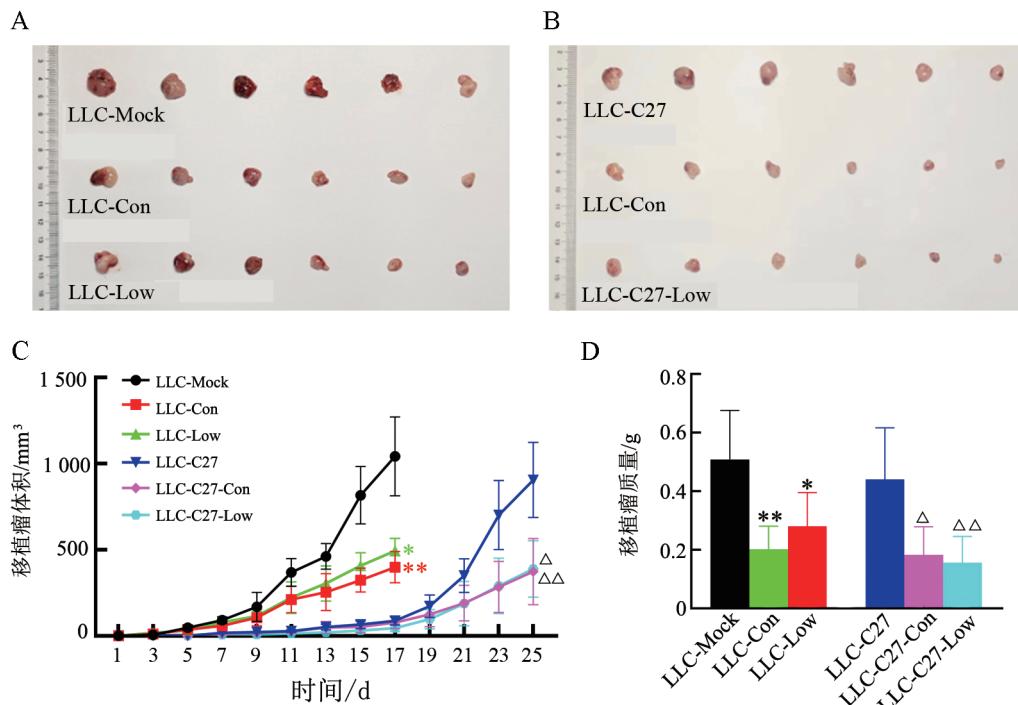
2.3 CONV-RT 和 LDR 均可抑制移植瘤的生长

每天监测肿瘤生长情况, 体内动物实验结果 (图 5) 表明, 对于接种 LLC-Mock 细胞的荷瘤小鼠, LLC-Mock 组、LLC-Con 组和 LLC-Low 组的肿瘤质量之间存在显著差异 ($F = 9.594, P < 0.01$)。与 LLC-Mock 组相比, LLC-Con 组和 LLC-Low 组肿瘤的体积和质量均显著减小 ($P < 0.05$), 而 LLC-Con 组和 LLC-Low 组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。对于接种 LLC-C27 细胞的荷瘤小鼠, LLC-C27-Con 组和 LLC-C27-Low

组的肿瘤质量均明显降低 ($F = 9.108, P < 0.01$), 与 LLC-C27 组比较, LLC-C27-Con 组和 LLC-C27-Low 组肿瘤质量均显著降低 (均 $P < 0.01$), 而 LLC-C27-Con 组和 LLC-C27-Low 组之间的肿瘤质量差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, LLC-C27 组与 LLC-Mock 组的肿瘤质量没有显著差异 ($F = 0.473, P > 0.05$), 但是 LLC-C27 组的生存时间明显延长, 接种 LLC-C27 细胞的 3 组荷瘤小鼠比接种 LLC-Mock 细胞的荷瘤小鼠的生存时间整体延长至 1.47 倍

(图5; $t = 50.88, P < 0.01$)。实验结果说明, CONV-RT 和 LDR 均能明显抑制移植瘤的生长, 在过表达 C27

的基础上进行 CONV-RT 和 LDR 能明显抑制移植瘤的生长, 过表达 C27 能明显延长小鼠的生存时间。



A: 接种 LLC-Mock 细胞的荷瘤小鼠移植瘤体积; B: 接种 LLC-C27 细胞的荷瘤小鼠移植瘤体积; C: 荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线; D: LLC 接种小鼠治疗第 18 天后及 LLC-C27 接种小鼠治疗 26 d 后移植瘤的质量。与 LLC-Mock 比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 LLC-C27 比较, $^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图5 荷瘤小鼠的肿瘤体积、肿瘤生长曲线及治疗后移植瘤的质量

2.4 CONV-RT 和 LDR 均可抑制移植细胞向肌肉组织的浸润

移植瘤组织 H-E 染色检测结果(图6)显示, 对于接种 LLC-Mock 细胞的 3 组荷瘤小鼠而言, LLC-Mock 组荷瘤小鼠的肿瘤全部出现了局部肌肉浸润, 肌肉浸润程度更深, 而 LLC-Con 组和 LLC-Low 组均只有 50.00% 的小鼠出现了局部肌肉浸润, LLC-Mock、LLC-Con 和 LLC-Low 3 组小鼠的肌肉浸润深度分别为 $(266.8 \pm 23.0)\text{ }\mu\text{m}$ 、 $(200.4 \pm 14.7)\text{ }\mu\text{m}$ 、 $(118.2 \pm 10.7)\text{ }\mu\text{m}$, 3 组之间存在显著差异 ($F = 96.46, P < 0.01$)。对于接种 LLC-C27 细胞的 3 组荷瘤小鼠而言, LLC-C27 组、LLC-C27-Con 组和 LLC-C27-Low 组出现肿瘤局部肌肉浸润的小鼠分别为 100.00%、50.00% 和 33.33%, 肌肉浸润深度分别为 $(271.2 \pm 12.6)\text{ }\mu\text{m}$ 、 $(211.4 \pm 8.7)\text{ }\mu\text{m}$ 、 $(42.4 \pm 6.1)\text{ }\mu\text{m}$, 3 组之间差异有统计学意义 ($F = 778.5, P < 0.01$)。具有代表性的肌肉浸润图片见图6。实验结果说明, CONV-RT 和 LDR 均能明显抑制肿瘤细胞向肌肉组织的浸润程度, 在过表达 C27 基础上进行 CONV-RT 和 LDR 也均能抑制肿瘤细胞向肌肉组织的浸润程度。

3 讨论

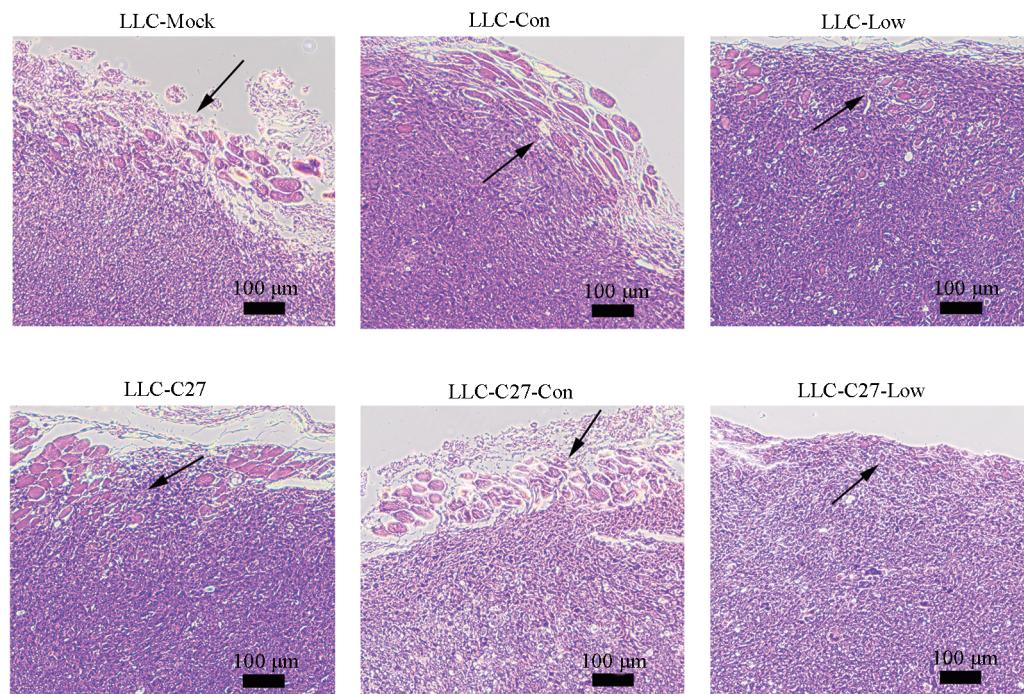
肺癌为全世界发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一^[16], 也是中国病死率最高的恶性肿瘤之一^[17], 其中近 80% 的肺癌为 NSCLC^[18], 目前手术切除是早期 NSCLC 的唯一治疗方法^[19]。然而, 57% 的肺癌患者在初诊时已经发生了远处转移^[20]。近几年, 放疗因其使用方便、疗效好已成为肺癌的主要治疗方法^[21-22]。然而, 由于高剂量引起的敏感性降低和不良反应, 患者通常不宜给予长期放疗。因此, 如何在降低肿瘤放射治疗总剂量的同时, 提高抑瘤效果, 减少正常肺组织损伤已成为放射医学研究的热点问题。

由于端粒酶在绝大多数癌症中(约 80%)都有表达^[23], 但在大多数正常细胞中未检测到, 因此它是癌症基因治疗的一个有吸引力的分子靶点^[24]。近年来, 人们正在研究多种针对端粒或端粒酶的治疗方法。端粒酶由 RNA 组分 hTR 和端粒酶的催化蛋白亚基端粒酶逆转录酶(TERT)组成^[25-26]。现在已知端粒酶在真核生物中几乎普遍保守, 在真核生物中发现了 7 个普遍保守的 RT 序列都可以在 TERT 蛋白的中



心区域内识别出来,蛋白质的多样化说明了TERT的N端基序和蛋白质其余部分之间存在很大的构象灵

活性^[27]。



黑色箭头指向肿瘤浸润肌肉部分。
图6 H-E染色显示肿瘤局部肌肉浸润情况

以往研究^[28]在许多生物体中发现了TERT的同源物,除了少数例外,这些同源物具有相同的结构域。TERT家族成员可以通过描述重要的保守序列来保持稳定,来自小鼠和大多数酵母的端粒酶通常是非进程性的,在标准反应中只能产生短产物。高度保守序列可能形成一个共同的支架,物种特异性结构附着在其上,VSR基序是哺乳动物特异性的。在体外表达时,hEST1A和hEST1B均能独立于RNA亚基结合的hTERT^[27]。迄今为止,从人类序列开始,鉴定出的TERT同源物经过六次迭代后,误差仅为0.005,表明整个结构都是守恒的。此外,大多数埋藏的TEN结构域疏水核心残基在家族成员中相对保守^[29],此前的实验已经证明hTERTC27能够在hTERT阳性的HeLa细胞中诱导端粒功能障碍和后期染色体端到端融合^[13],此外NG等^[15]通过RT-PCR检测到小鼠胶质瘤细胞中hTERTC27和EGFP转录物的表达,间接证实了其在小鼠体内的表达。基于上述研究,本研究将hTERTC27转染于小鼠LLC细胞,并进行了相关的动物实验。

LDR可以诱导多种生物效应,如兴奋效应、适应性反应和超敏感性等^[30-31]。WANG等^[32]研究证明,250 mGy低剂量间歇预照射可以显著提高大剂量放疗治疗的杀伤效果。因此,LDR被认为是临床肿瘤

放射治疗的一种有前景的辅助手段^[33]。魏新峰^[30]证实,在体外肺癌细胞与免疫细胞共存时,LDR可以增强大剂量辐射(HDR)对肺癌细胞的增殖抑制效应,以及诱导焦亡和凋亡的方式增强HDR的抑瘤效应。在体内,LDR局部预照射可以增强HDR局部照射对肿瘤的抑制作用。本研究结果显示,LDR与CONV-RT结合可以明显抑制A549细胞增殖,LDR可以使A549细胞对CONV-RT的处理更加敏感,从而在降低辐射剂量的条件下达到与CONV-RT同等的抑瘤效果。hTERTC27与LDR联合治疗能够明显抑制A549细胞增殖能力。

放射治疗的主要作用方式是诱导肿瘤细胞DNA损伤,该损伤未及时修复时可能导致凋亡^[33]。LDR诱导的超敏感性(low dose hyper-radiosensitivity, HRS)与DNA损伤和细胞凋亡密不可分,KRUEGER等^[34]研究发现,HRS与低剂量暴露后细胞凋亡水平升高有关,可导致剂量范围内凋亡显著增加.CHEN等^[35]进一步研究发现,与单纯接受高剂量X射线照射的细胞相比,LDR作为预照射使细胞凋亡增多。本研究结果发现,LDR与常规放疗结合能够在降低辐射总剂量的前提下,达到与常规放疗同等的促进A549细胞凋亡的作用。然而,LDR与hTERTC27协同促进肿瘤细胞凋亡的作用不明显,其机制尚需进一步研究。



在荷瘤小鼠模型中,注射LLC-Mock细胞的小鼠5 d后(肿瘤长径普遍达3~4 mm时)成瘤,第18天统一处死,而注射LLC-C27细胞的小鼠12 d后成瘤,第26天统一处死。结果显示,LDR与CONV-RT的结合可以在降低总辐射剂量的条件下,达到与CONV-RT同等的抑瘤效应,明显抑制肿瘤生长,这可能与LDR可以增强NSCLC的辐射敏感性有关,其机制涉及多种方面,如细胞因子、趋化因子和DNA损伤修复通路等。此前的研究^[36]表明,引入Egr-1启动子作为桥梁能够放大hTERTC27的抗肿瘤作用,Egr-1启动子通过5-FU引起的活性氧中间体增加了hTERTC27在NPC细胞中的表达,hTERTC27的高表达使细胞对5-FU更加敏感,使细胞产生更多的活性氧中间体,从而导致hTERTC27蛋白水平的进一步升高。本结果显示hTERTC27+CONV-RT与hTERTC27+LDR+CONV-RT的协同抗肿瘤作用无显著差异,但联合LDR的放射总剂量由12 Gy降低到4.3 Gy,有效减少对周围正常组织的损伤。此外,注射LLC-C27组小鼠成瘤时间明显晚于注射LLC-Mock组小鼠,且注射LLC-C27组小鼠整体的生存时间也明显延长,说明过表达hTERTC27多肽与放疗在体内具有协同抗肺癌肿瘤作用。

电离辐射能够激活Egr-1启动子的表达^[37],但其表达效率与辐射剂量是否有关尚无相关报道。本研究结果显示,LDR同样能够通过电离辐射产生的活性氧激活Egr-1启动子,从而诱导其下游基因hTERTC27在LLC细胞中的表达,hTERTC27的表达导致LLC细胞放射敏感性的增加,从而进一步导致治疗过程中活性氧的增多。相较于辐射剂量,这种类似于5-FU治疗所产生的活性氧生物放大效应应该是决定hTERTC27表达水平的主要原因。

综上所述,LDR结合CONV-RT的联合放射治疗能够在提高肿瘤控制率的前提下,抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,降低放射治疗的总剂量,减少肿瘤周围正常组织的损伤,从而提高肿瘤放射治疗的疗效。而LDR+CONV-RT与Egr-hTERTC27联合,能够发挥射线和基因药物的双重肺癌杀伤作用,提高肺癌的治疗效果,延长肺癌动物模型的生存期。这些结果提示LDR和hTERTC27的协同作用可能是肺癌治疗的潜在临床策略,并可能为提高肺癌的放射治疗疗效提供新的参考。

参 考 文 献

- [1] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00312-3.
- [2] MENG J S, LI Y, WAN C, et al. Targeting senescence-like fibroblasts radiosensitizes non-small cell lung cancer and reduces radiation-induced pulmonary fibrosis[J/OL]. JCI Insight, 2021, 6(23): e146334[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8675198/>. DOI: 10.1172/jci.insight.146334.
- [3] 钟娜, 王会杰, 赵文英, 等. 高表达RNF7增强非小细胞肺癌细胞的PD-1耐药: 基于活化NF-κB通路促进CXCL1表达和髓源性抑制细胞的募集[J/OL]. 南方医科大学学报, 2024, 44(9): 1704-1711. DOI: 10.12122/issn.1673-4254.2024.09.10.
- [4] KHWAJA R, CHU Q. Present and emerging biomarkers in immunotherapy for metastatic non-small cell lung cancer: a review[J]. Current Oncology, 2022, 29: 479-489. DOI: 10.3390/curroncol29020043.
- [5] 刘俊, 卢绪菁, 刘永萍, 等. 晚期非小细胞肺癌大分割调强放疗前后CTC变化临床意义研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(18): 1367-1372. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2019.18.09.
- [6] VISCH MARJOLEIN BIRGITTE M B, KREIKE BAS B, GERRITSEN MARIE-JEANNE PIETERNEL M J P. Long-term experience with radiotherapy for the treatment of non-melanoma skin cancer[J]. J Dermatolog Treat, 2020, 31(3): 290-295. DOI: 10.1080/09546634.2019.1592099.
- [7] 李爱杰, 贺科文, 穆向魁, 等. 低剂量照射在肿瘤治疗中的作用及机制[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(22): 1737-1742. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2019.22.14.
- [8] ESPOSITO G, CAMPA A, PINTO M, et al. Adaptive response: modelling and experimental studies[J]. Radiat Prot Dosimetry, 2011, 143(2/3/4): 320-324. DOI: 10.1093/rpd/ncq474.
- [9] ZHOU L, ZHANG X Y, LI H, et al. Validating the pivotal role of the immune system in low-dose radiation-induced tumor inhibition in Lewis lung cancer-bearing mice[J]. Cancer Med, 2018, 7(4): 1338-1348. DOI: 10.1002/cam4.1344.
- [10] 崔羽, 杨露, 杜雪, 等. 低剂量放疗联合免疫治疗在恶性肿瘤综合治疗中的研究进展[J]. 癌症进展, 2022, 20(14): 1424-1427, 1433. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2022.20.14.05.
- [11] 王丽. LDR对PM2.5引起肺损伤的影响及机制[D]. 吉林大学, 2024. DOI: 10.27162/d.cnki.gjlin.2024.004776.
- [12] YANG G Z, LI W, JIANG H Y, et al. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics[J]. Int J Cancer, 2016, 139(10): 2157-2168. DOI: 10.1002/ijc.30235.
- [13] HUANG J J, LIN M C, BAI Y X, et al. Ectopic expression of a COOH-terminal fragment of the human telomerase reverse transcriptase leads to telomere dysfunction and reduction of growth and tumorigenicity in HeLa cells[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 3226-3232.
- [14] HUANG J J, BAI Y X, HAN S W, et al. A human TERT C-terminal polypeptide sensitizes HeLa cells to H₂O₂-induced senescence without affecting telomerase enzymatic activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(3): 627-632. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)03049-8.
- [15] NG S S, GAO Y, CHAU D H, et al. A novel glioblastoma cancer gene therapy using AAV-mediated long-term expression of human TERT C-terminal polypeptide[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(6): 561-572. DOI: 10.1038/sj.cgt.7701038.
- [16] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics

- 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [17] 孙璇, 田之魁, 王东军, 等. 国内中医药防治肺癌临床试验注册现况分析[J]. 天津中医药大学学报, 2024, 43(3): 241-246.
- [18] 梁兴梅. 鞣向抑制DNA-PK 克服非小细胞肺癌三代EGFR-TKI 奥希替尼获得性耐药的机制探索[D]. 天津: 天津医科大学, 2020.
- [19] 胡慧莲, 赵雅春, 姜子奇, 等. 肺癌气腔播散的研究现状与展望[J]. 临床肺科杂志, 2024, 29(10): 1575-1579.
- [20] 石远凯, 孙燕, 于金明, 等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(1): 1-15. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2016.01.01.
- [21] LIU X, LI K W, YANG R J, et al. Review of deep learning based automatic segmentation for lung cancer radiotherapy[J/OL]. Front Oncol, 2021, 11: 717039[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8323481/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.717039.
- [22] 曾妮. 程序性死亡受体-1单抗联合靶动脉栓塞化疗治疗中晚期非小细胞肺癌的效果[J]. 医学理论与实践, 2024, 37(19): 3302-3305. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2024.19.018.
- [23] SHAY J W, WRIGHT W E. Role of telomeres and telomerase in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(6): 349-353. DOI: 10.1016/j.semcan.2011.10.001.
- [24] SHAY J W. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer [J]. Cancer Discov, 2016, 6(6): 584-593. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0062.
- [25] PODLEVSKY J D, CHEN J J. It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis[J]. Mutat Res, 2012, 730(1/2): 3-11. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.11.002.
- [26] 石长安, 张梦娜, 赵晓民, 等. 端粒酶与肿瘤相关性研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2024, 43(2): 54-58.
- [27] AUTEXIER C, LUE N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase[J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 493-517. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412.
- [28] OSTERHAGE J L, FRIEDMAN K L. Chromosome end maintenance by telomerase[J]. J Biol Chem, 2009, 284(24): 16061-16065. DOI: 10.1074/jbc.R900011200.
- [29] JACOBS S A, PODELL E R, CECH T R. Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase[J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13: 218-225. DOI: 10.1038/nsmb1054.
- [30] 魏新锋. LDR 对 HDR 抑瘤效应的影响及其 DNA 损伤修复机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [31] 魏新锋, 王蕊, 衣峻萱, 等. 低剂量辐射生物效应的研究进展[J]. 中国辐射卫生, 2022, 31(1): 113-118.
- [32] WANG Y, LI Y Z, YANG L, et al. Intermittent low dose irradiation enhances the effectiveness of radio- and chemo-therapy for human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29[J]. Oncol Rep, 2017, 38(1): 591-597. DOI: 10.3892/or.2017.5679.
- [33] ALBI E, CATALDI S, LAZZARINI A, et al. Radiation and thyroid cancer[J/OL]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): E911[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28445397/>. DOI: 10.3390/ijms18050911.
- [34] KRUEGER S A, JOINER M C, WEINFELD M, et al. Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity[J]. Radiat Res, 2007, 167(3): 260-267. DOI: 10.1667/RR0776.1.
- [35] CHEN Z Y, SAKAI K Z. Enhancement of radiation-induced apoptosis by preirradiation with low-dose X-rays in human leukemia MOLT-4 cells[J]. J Radiat Res, 2004, 45(2): 239-243. DOI: 10.1269/jrr.45.239.
- [36] LIN G M, LIN M C, LIN S X, et al. Early growth response protein-1 promoter-mediated synergistic antitumor effect of hTERTC27 gene therapy and 5-Fluorouracil on nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(7): 434-441. DOI: 10.1089/cbr.2011.1153.
- [37] 王海峰, 阿曼姑丽·艾合买提, 陆艳荣, 等. 辐射表达载体Egr1-survivin shRNA联合放疗对食管鳞癌ECA109细胞放疗敏感性的影响[J]. 武警医学, 2020, 31(2): 122-126. DOI: 10.14010/j.cnki.wjyx.2020.02.007.

[收稿日期] 2024-08-17

[修回日期] 2024-11-12

[本文编辑] 向正华