

文章编号:1005-6947(2008)07-0668-05

· 基础研究 ·

mda-7/IL-24 联合阿霉素诱导裸鼠肝癌凋亡的初步研究

夏岚¹, 薛新波¹, 陈堃¹, 王从俊¹, 李雁², 于愿¹, 吉文伟¹, 郑建伟¹, 胡回忆¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科中心, 湖北 武汉 430030; 2. 武汉大学中南医院肿瘤科、武汉大学肿瘤防治研究中心, 湖北 武汉 430000)

摘要:目的 探讨重组腺病毒介导的 mda-7/IL-24 基因联合阿霉素(ADM)治疗裸鼠肝癌的作用及机制。方法 采用 mda-7/IL-24 的重组腺病毒载体(Ad-mda-7)和/或 ADM 治疗实验性肝癌裸鼠, 观察各组裸鼠生长时间及肿瘤体积变化, 并对各组瘤体组织进行 TUNEL 检测。结果 成功构建了重组腺病毒 mda-7/IL-24 基因载体。Ad-mda-7 + ADM 联合治疗组裸鼠平均生存时间为 (83.8 ± 4.82) d, 明显长于其他 3 组 ($P < 0.01$); Ad-mda-7 + ADM 组肝癌体积明显缩小, 抑癌率为 79.78%, 与单独用药组和对对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组癌组织凋亡增加, 凋亡指数为 $38.1\% \pm 4.2\%$, 与其余 3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 重组腺病毒介导 mda-7/IL-24 联合阿霉素有明显的协同抗肿瘤作用, 效果优于单独治疗组, 主要作用机制与促进癌组织凋亡有关。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 668-672]

关键词: 癌; 肝细胞; mda-7/IL-24; 阿霉素; 基因治疗; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

A preliminary study on apoptosis of hepatoma of nude mice treated by adenovirus-mediated mda-7/IL-24 combined with adriamycin

XIA Lan¹, XUE Xinbo¹, CHEN Kun¹, WANG Congjun¹, LI Yan², YU Yuan¹,
JI Wenwei¹, ZHENG Jianwei¹, HU Huiyi¹

(1. Department of Biliary and Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University and Cancer Center of Wuhan University, Wuhan 430000, China)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of adenovirus-mediated mda-7/IL-24 and/or adriamycin treatment of hepatoma in nude mice. **Methods** The recombinant adenovirus vector carrying melanoma differentiation-associated gene-7 (Ad-mda-7) and/or ADM were injected into the tumor-bearing mice. Their effects on the volume of the tumor and the survival rate of the mice were observed, and the apoptosis of cancer tissue was detected by TUNEL staining in each group. **Results** Ad-mda-7 was successfully constructed and expressed in vivo. Compared with the other three groups, the mice treated with Ad-mda-7 combined with adriamycin had longer average survival time (83.8 ± 4.82) d ($P < 0.01$); the average size of tumor in combined group was reduced significantly, the tumor inhibition rate was 79.78%, which was higher than the other groups ($P < 0.05$). Enhanced induction of apoptosis by Ad-mda-7 combined with adriamycin was observed. The TUNEL-positive cells showed that apoptotic index in combination therapy group was $38.1\% \pm 4.2\%$, which was higher than that of the other 3 groups ($P < 0.05$).

基金项目:湖北省科技攻关资助项目(2006AA304B52-4)

收稿日期:2007-11-27; **修订日期:**2008-03-13。

作者简介:夏岚,男,华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生,主要从事普外科肿瘤临床与实验方面的研究。

通讯作者:薛新波 E-mail: xuexinbo@163.com

Conclusions Ad-mda-7 combined with adriamycin has stronger antitumor potency and has more synergistic effect on metastatic hepatoma mouse model than mda-7/IL-24 or adriamycin alone, and the mechanism is related to the promotion of apoptosis of tumor cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (7) : 668 - 672]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; mda-7/IL-24; Adriamycin; Gene Therapy; Apoptosis

CLC number: R 735.7

Document code: A

黑素瘤分化相关基因7 (melanoma differentiation associated gene-7, mda-7) 系利用亚减法技术从黑色素瘤细胞中首先取得^[1], 尔后根据其生物学特性和染色体定位被命名为 IL-24^[2-3]。迄今已有许多实验证明 mda-7/IL-24 具有显著的选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡的作用, 包括神经胶质母细胞瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等, 而对正常细胞无任何效应^[4-7], 提示其对恶性肿瘤具备选择性。本课题组前期体外实验^[8]证明, 重组腺病毒介导的 mda-7/IL-24 基因对人肝癌细胞株生长有明显的抑制作用, 可选择性地诱导肝癌细胞凋亡。本实验通过建立裸鼠肝癌皮下移植瘤模型, 研究 mda-7/IL-24 基因联合阿霉素 (ADM) 对裸鼠肝癌的治疗效果并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因、载体和细胞株 载体 pCA13-IL24, 穿梭质粒 pSG-CMV 及腺病毒骨架质粒均购于上海新基因公司; 具氨苄青霉素抗性的大肠杆菌 DH5 α 及 HEK293 细胞株为同济医院儿科肾病研究室保存。

1.1.2 引物 依据基因库 BC009681 hIL24 的 cDNA 序列, 选其编码序列为目的片段, 大小约 630 bp, 设计上、下游引物分别为 VT371 与 VT372, 并于引物的 5' 端分别引入限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Sal* I 的酶切位点。引物 VT371 序列为 5'-CGGCTAGCACCATGAATT TTCAACAGA-3'; VT372 序列为 5'-GCGTCGACTTATCAGAGCTTG-TAGAAT-3'。

1.1.3 试剂 限制性内切酶 *Nhe* I, *Sal* I, *Not* I, 高保真 pfu 酶及快速连接试剂盒购于 New England Biolabs 公司; 质粒小样提取试剂盒、胶回收试剂盒为 Qiagen 公司的产品; DMEM 培养基及胎牛血清均为美国 Hyclone 公司产品; 青霉素、链霉素、琼脂及 ADM 为 Sigma 公司产品; 原位细胞凋亡检测试剂盒为 Roche 公司产品。

1.1.4 实验动物 BALB/C 裸鼠 (nu/nu; Harlan), 4 ~ 5 周龄 32 只, 雄性, 体重 20 ~ 24 g, 饲养

于武汉大学动物中心清洁级动物房内 (SPF 级)。

1.2 实验方法

1.2.1 携带目的基因的重组腺病毒载体的构建

以 pCA13-IL-24 为模板, 上、下游引物分别为 VT371 与 VT372, 采用聚合酶链反应 (PCR) 扩增 hIL24 基因片段。其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、切胶, 用胶回收试剂盒回收大小约 630 bp 的片段, 命名为 hIL-24。用 *Nhe*I 和 *Sal*I 进行双酶切, 直接过柱回收作为插入片断, 同时用相同的酶消化穿梭质粒 pSGCMV, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳、切胶, 回收线性的 pSGCMV (约 5.0 kb) 作为载体片断。将插入片断与载体片断按 3:1 的比例进行定向连接, 16 $^{\circ}$ C 反应过夜; 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5, 并铺于氨苄青霉素阳性的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。挑取 6 个单克隆进行小量培养, 扩增质粒, 用 *Nhe*I 及 *Not*I 进行双酶切鉴定。将 293 细胞培养于 6 孔板中 (1×10^6 / 孔), 当细胞汇合率达 90% 左右时, 取纯化的穿梭质粒 pSGCMV-IL24 及腺病毒骨架质粒, 以 Polyfect 介导转染 293 细胞, 挑取 2 个空斑, 分别转入 500 μ L 5% DMEM 培养液中 37 $^{\circ}$ C 清洗腺病毒 24 h 后, 储存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2.2 腺病毒的扩增、纯化和滴度测定 取 100 μ L 病毒液 (约 103 病毒颗粒) 感染 293 细胞, 采取反复“感染 - 收集 - 冻融”法获取高滴度病毒, 最后 CsCl 离心纯化。待测病毒上清液倍比稀释后感染 293 细胞, 2 d 后根据细胞出现细胞病变反应 (CPE) 的状况计算腺病毒滴度。

1.2.3 肝癌裸鼠治疗分组观察 每只裸鼠背部皮下注射 0.1 mL 含 10^5 个对数生长期的高转移性人肝癌细胞系 HCCLM6。1 周后待肿瘤生长至直径约 5 ~ 6 mm 时; 将裸鼠随机分为 4 组, 每组 8 只。(1) 对照组: 荷瘤裸鼠给予生理盐水 0.3 mL, 右侧腹腔内注射, 每天 1 次, 共 3 次。(2) ADM 处理组: ADM 采用裸鼠 LD₅₀ 的 1/3, 即 6 mg/kg, 用生理盐水稀释成 1 mg/mL, 注射入腹腔, 每天 1 次, 共 3 次。(3) Ad-mda-7 处理组: 给予携带 mda-7 的重组腺病毒载体 Ad-mda-7, 肿瘤局部多点注射, 每鼠 3×10^{10} vp。(4) Ad-mda-7 + ADM (A + A) 处理

组:ADM 的用法同 ADM 组,而剂量为 4 mg/kg; Ad-mda-7 在第 3 次化疗后 24 h 进行;注射部位和剂量同 Ad-mda-7 处理组。隔天用游标卡尺测量各组裸鼠肿瘤直径(a)及垂直正交径(b)。肿瘤大小 $V(\text{mm}^3) = a \times b^2/2$ 。肿瘤生长抑制率(%) = $(V - V_{\text{实验组}}) / V_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.4 TUNEL 法检测肝癌裸鼠治疗 36 d 后瘤体组织中的细胞凋亡 上述 4 组干预 36 d 后分别随机取出瘤组织,4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、包埋、制片,然后用原位缺口末端标记(TUNEL)试剂盒按说明书操作以检测瘤体组织中的细胞凋亡情况。以细胞核呈棕黄色为凋亡细胞阳性判断标准,在光镜下($\times 400$)随机取 10 个视野,每个视野数 100 个细胞,记数凋亡细胞。凋亡指数(AI) = $[\text{凋亡细胞数} / (\text{凋亡细胞数} + \text{未凋亡细胞数})] \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据处理应用统计学软件 SPSS12.0 进行;组间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒克隆的鉴定

2.1.1 光镜所见 感染后的 HEK293 细胞出现病变效应表明重组腺病毒能使培养细胞感染后产生细胞变性(图 1)。

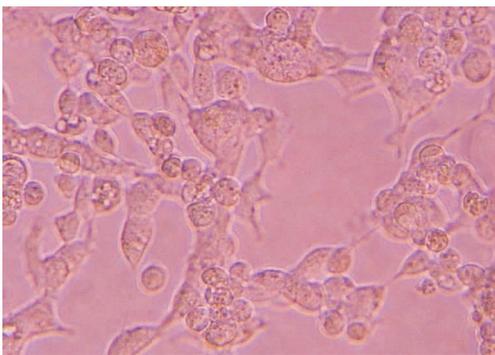


图 1 出现 CPE 反应的 HEK293 细胞

2.1.2 PCR 鉴定 取克隆 1 和克隆 2 的病毒 DNA 各 1 μL 为模板,通过 PCR 方法扩增出约 630 bp 的特异性片段,其大小与阳性对照相符(图 2)。表明所得的腺病毒即为 mda-7 基因重组腺病毒。

2.2 重组腺病毒 Ad-mda-7 的扩增和纯化及滴度测定结果

重组腺病毒 Ad-mda-7 可在 HEK293 细胞中大

量扩增,经 CsCl 密度梯度离心,可获高浓度、高纯度的灰白色病毒带。据空斑测定法测得纯化前其滴度为 2×10^{10} pfu/mL,纯化后为 3.0×10^{12} pfu/mL。表明扩增的 Ad-mda-7 经密度梯度离心后可获得动物实验所需病毒滴度。

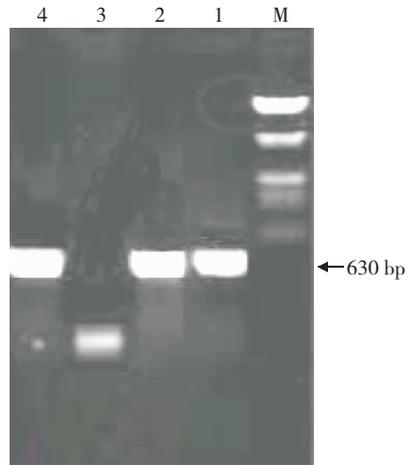


图 2 重组腺病毒 pSGCMV-M PCR 鉴定 M: Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker; 1, 2: 克隆 1, 2; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照

2.3 裸鼠生存时间

对照组裸鼠平均生存时间为 (43.4 ± 1.67) d, ADM 组和 Ad-mda-7 组分别为 (64.2 ± 4.14) d 和 (61.4 ± 1.67) d, 均较对照组明显延长 ($P < 0.01$), 但两组间差异无统计学意义 ($P = 0.21$)。ADM 组大多于给药后 4 周开始出现腹泻、进食减少、消瘦等表现; Ad-mda-7 组则在用药 40 d 后出现衰竭症状。A + A 处理组裸鼠平均生存时间为 (83.8 ± 4.82) d, 较其他 3 组明显延长 ($P < 0.01$), 且裸鼠体重增加。表明 A + A 组动物经治疗后无明显衰竭症状, 营养状态良好, 其效果明显优于 ADM 组和 Ad-mda-7 组(图 3); Ad-mda-7 + ADM 组有 12.5% 的裸鼠达到无瘤生存, 而其余 3 组却没有此现象。

2.4 裸鼠肿瘤生长情况(图 4)

对照组裸鼠肿瘤生长最迅速; ADM 组和 Ad-mda-7 组用药后肿瘤逐渐增大, 但增长幅度较对照组小, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ADM 组肿瘤生长幅度比 Ad-mda-7 组小 ($P < 0.05$); A + A 组用药后较之 ADM 组和 Ad-mda-7 组的肿瘤缩小更明显 ($P < 0.01$), 且在第 36 天之后的各时点表现出的差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

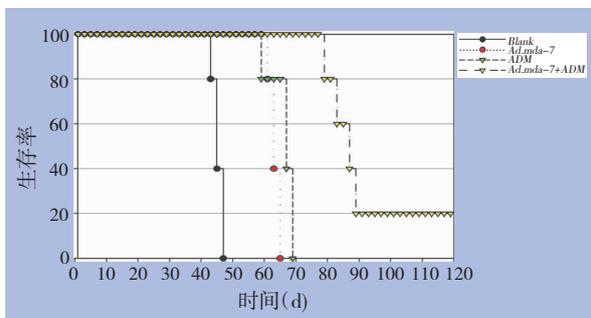


图3 各组裸鼠生存时间的比较

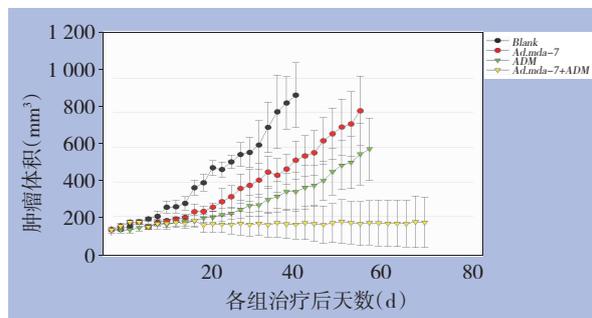


图4 各组裸鼠肿瘤生长大小的比较

2.5 各制剂对各组裸鼠肿瘤的抑制作用

A + A 组治疗后 36 d 的抑癌率为 79.78% , 分别高于 Ad-mda-7 组的 45.96% 和 ADM 组的 60.88% ($P < 0.05$) ; ADM 组的抑癌率高于 Ad-mda-7 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 。

2.6 TUNEL 反应检测肿瘤细胞的凋亡情况

治疗后第 36 天, A + A 组的肿瘤组织标本可见明显细胞异型性, 凋亡细胞胞核呈棕黄色, 核浓缩、大小不一; AI 为 $(38.1 \pm 4.2)\%$, 显著高于 Ad-mda-7 组、ADM 组和对照组 [AI 分别为 $(25.7 \pm 3.1)\%$, $(17.3 \pm 2.8)\%$ 和 0%] ($F = 81.8$,

$P < 0.01$) (图 5) 。

表 1 各组对肝癌裸鼠抑制作用的影响 ($n = 8$)

| 组别 | 肿瘤体积 (mm^3 , $\bar{x} \pm s$) | 肿瘤生长抑制率 (%) |
|-----------------------|--|-----------------|
| 对照 | 805.30 ± 212.76 | $0^{1),2)}$ |
| Ad-mda-7 | 438.18 ± 91.46 | $45.96^{1),2)}$ |
| ADM | 315.06 ± 88.50 | $60.88^{1)}$ |
| Ad-mda-7 + ADM(A + A) | 162.80 ± 72.65 | 79.78 |

注:1)与 A + A 组比较, $P < 0.05$; 2)与 ADM 组比较, $P < 0.05$

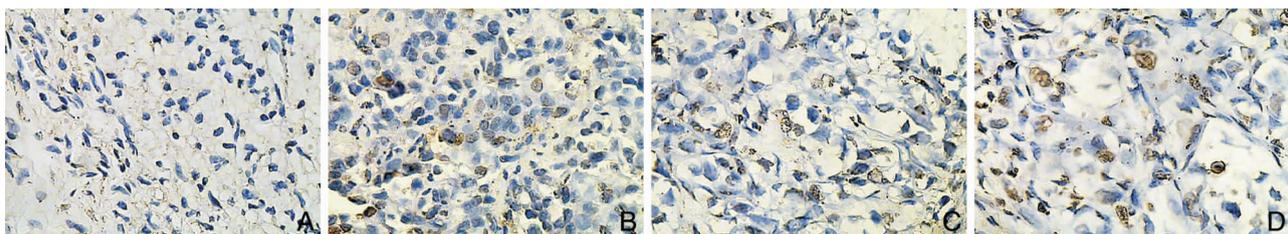


图 5 干预第 36 天后各组瘤体组织的 TUNEL 染色 ($\times 400$) A:空白对照组; B:ADM 组 C Ad-mda-7 组; D: Ad-mda-7 + ADM 组

3 讨论

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最常见致死性的恶性肿瘤之一。我国 HCC 的年发病率为全球之首, 严重威胁着人民的健康。寻找一种既能有效杀伤肝癌细胞, 又能对机体正常细胞无毒副作用的药物十分重要。目前, 有一种很有希望的分子靶向治疗策略, 即“基因治疗” (gene therapy)。基因治疗中诱导癌细胞凋亡已成为筛选抗肿瘤药物的重要研究方向。本实验结果显示, 3 个治疗组对裸鼠人肝癌移植瘤的生长均有抑制作用, 而对照组肿瘤的生长未受到抑制。Ad-mda-7 组肿瘤的生长速度较之对照组明显减慢, 体积明显缩小, 生存时间明

显延长, 而且在裸鼠生存期间, 未观察到类似 ADM 组的毒副作用, 生存质量优于 ADM 组。表明 mda-7/IL-24 抑制裸鼠肝癌, 且无明显副作用。但 Ad-mda-7 组治疗后肿瘤体积大于 ADM 组和 A + A 组, 说明单一 mda-7 基因治疗效果有限; 而 A + A 组与 ADM 组和 Ad-mda-7 组相比, 肿瘤体积明显缩小, 平均生存时间明显延长, 裸鼠体重增加, 抑癌率和凋亡指数也分别高于 Ad-mda-7 组、ADM 组和对照组。表明联合治疗效果明显优于单用 ADM 组或 Ad-mda-7 组。另外, 联合组中 ADM 剂量比单用 ADM 组的剂量减少了 1/3, 但抑癌效果更为明显。说明 mda-7/IL-24 和 ADM 联合治疗肝癌比单一治疗更有效。而且联合小剂量化疗与单一治疗相比前者可以增强疗效, 减轻

化疗对正常细胞产生的毒性^[9]。

有研究认为,mda-7/IL-24可能系通过诱导细胞凋亡和抑制肿瘤细胞转移而发挥作用^[10]; Ad-mda-7可以明显地、有选择性地抑制肿瘤的生长并诱导其凋亡,而与细胞中p53, RB, p16, ras, Bax和p21 waf等的状态无关^[11]。另有研究发现,mda-7可以激活多种信号通路,并可在不同类型的细胞中调节促进凋亡和抑制凋亡分子的比例,从而发挥促凋亡作用^[12-13]。

本课题组前期的体外实验^[8]表明,重组腺病毒介导mda-7/IL-24能明显地促进多种HCC细胞株的凋亡,并阻滞增殖;但对正常的肝细胞L02却无任何的毒性作用。在另外的体外实验中,笔者等还发现:Ad-mda-7在HCC细胞内可以下调Bcl-2的表达,上调Bax的表达,降低Bcl-2/Bax的比例,从而诱导HCC细胞凋亡。提示Ad-mda-7抗肝癌的机制可能与抗凋亡蛋白(Bcl-2, Bcl-xL)和促凋亡蛋白(Bax)有关(资料待发表)。本次实验通过TUNEL法证明了重组腺病毒介导的mda-7/IL-24在活体内也能明显诱导HCC细胞凋亡。至于其在活体内通过何种机制杀死肝癌肿瘤,目前仍不甚明了,尚需更深入的研究。

综上所述,mda-7/IL-24能在活体中抑制HCC的生长,有效地促进肝癌细胞凋亡,延长裸鼠的生存时间,并可显著增强ADM药物治疗的抗肿瘤效果,降低其毒副作用,有协同化疗的作用。有理由相信,随着分子生物学和生物技术的发展,以mda-7为基础的基因治疗将会成为一种治疗肝细胞癌的有效途径。

致谢:美国哥伦比亚大学Fisher教授在百忙中多次在关键技术给予指导;同济医院儿科肾病研究室周建华教授对本研究给予技术指导及实验设备支持,谨致谢意。

参考文献:

[1] Jiang H, Lin JJ, Su Z Z, *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [J]. *Oncogene*, 1995, 11(2): 2477 - 2486.

[2] Gupta P, Su ZZ, Lebedeva IV, *et al.* mda-7/IL-24: multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111(3): 596 - 628.

[3] Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, *et al.* mda-7/IL-24: exploiting cancer's achilles' heel [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(1): 4 - 18.

[4] Ramesh R, Ito I, Gopalan B, *et al.* Ectopic production of mda-7/IL-24 inhibits invasion and migration of human lung cancer cells [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(4): 510 - 518.

[5] McKenzie T, Liu Y, Fanale M, *et al.* Combination therapy of Ad-mda7 and trastuzumab increases cell death in Her-2/neu-overexpressing breast cancer cells [J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 437 - 442.

[6] Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, *et al.* Induction of reactive oxygen species renders mutant and wild-type K-ras pancreatic carcinoma cells susceptible to Ad-mda-7 induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2005, 24(4): 585 - 596.

[7] Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53 independent manner [J]. *Oncogene*, 2003, 22(8): 1164 - 1180.

[8] 王从俊, 薛新波, 易继林, 等. mda-7/IL-24选择性杀伤肝癌细胞HepG2的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(11): 849 - 854.

[9] 张俊峰, 陈规划, 陆敏强, 等. 他克莫司及阿霉素对肝癌细胞抑制作用的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(7): 536 - 538.

[10] Wang CJ, Xue XB, Yi JL, *et al.* Melanoma differentiation-associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by replication-incompetent adenovirus vector [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(11): 1774 - 1779.

[11] Sarkar D, Lebedeva IV, Gupta P, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7)/IL-24: a 'magic bullet' for cancer therapy? [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(5): 577 - 586.

[12] Sarkar D, Lebedeva IV, Su ZZ, *et al.* Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5434 - 5442.

[13] Chada S, Bocangel D, Ramesh R, *et al.* Ad-mda-7 kills pancreatic cancer cell via the Wnt/PI3K signaling pathways: evidence of IL-20 receptor-mediated bystander activity against pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(5): 724 - 733.