

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0338-04

腺病毒介导 IL-24 联合化疗药物增强对肝癌细胞 PLC/PRF/5 增殖的抑制

温莹浩,殷正丰*,康晓燕,李 瑾,钱海华,陈 玮(第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438)

[摘 要] 目的:研究腺病毒介导 IL-24 基因(Ad. IL-24)与化疗药物联用对肝癌细胞株 PLC/PRF/5 增殖的抑制作用。方法:用 Ad. IL-24 分别联合化疗药物氟尿嘧啶(fluorouracil, 5-Fu)和表柔比星(epirubicin, EPI)处理培养的肝癌细胞株 PLC/PRF/5, MTT 法检测细胞增殖抑制率,流式细胞术(FCM)检测细胞周期和凋亡率。结果:10 MOI Ad. IL-24 与 25 $\mu\text{g/ml}$ 5-Fu 联合应用后 72 h, PLC/PRF/5 细胞增殖抑制率达(67.4 ± 0.58)%, 显著高于单用 Ad. IL-24 组的(46.8 ± 0.74)% 和 5-Fu 组的(29.3 ± 0.60)%(均 $P < 0.05$); 10 MOI Ad. IL-24 与 2.5 $\mu\text{g/ml}$ EPI 联合应用后 72 h, PLC/PRF/5 细胞增殖抑制率达(72.5 ± 0.92)%, 显著高于单用 Ad. IL-24 组的(46.8 ± 0.74)% 和 EPI 组的(32.2 ± 0.69)%(均 $P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示, Ad. IL-24 与 5-Fu 或 EPI 联合应用明显导致细胞在 G_2/M 期阻滞; Ad. IL-24 + 5-Fu 组细胞凋亡率为(52.15 ± 2.32)%, 显著高于单用 Ad. IL-24 组的(28.36 ± 3.49)% 和 5-Fu 组的(8.27 ± 2.61)%(均 $P < 0.05$); Ad. IL-24 + EPI 组细胞凋亡率为(58.67 ± 1.73)%, 显著高于单用 Ad. IL-24 组的(28.36 ± 3.49)% 和 EPI 组的(11.82 ± 1.91)%(均 $P < 0.05$)。结论: Ad. IL-24 与 5-Fu 或 EPI 联用能显著提高对肝癌细胞株 PLC/PRF/5 增殖的抑制作用。

[关键词] 白介素 24; 肝肿瘤; 基因治疗; 化学疗法; 表柔比星; 氟尿嘧啶

[中图分类号] R730 [文献标志码] A

Enhanced inhibitory effect of adenovirus-mediated IL-24 combined with chemotherapy agent on growth of liver cancer cell line PLC/PRF/5

WEN Ying-hao, YIN Zheng-feng*, KANG Xiao-yan, LI Jin, QIAN Hai-hua, CHEN Wei(Molecular Oncology Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] Objective: To investigate the inhibitory effect of adenovirus-mediated IL-24(Ad. IL-24) combined with fluorouracil (5-Fu) or epirubicin (EPI) on growth of human liver cancer cell line PLC/PRF/5. **Methods:** Human liver cancer cell line PLC/PRF/5 was treated with Ad. IL-24 combined with 5-Fu or EPI separately. The growth inhibition rate of cells was analyzed by MTT assay; the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM). **Results:** Three days after combined treatment with Ad. IL-24(10 MOI) and 5-Fu(25 $\mu\text{g/ml}$), the growth inhibitory rate of PLC/PRF/5 cells was (67.4 ± 0.58)%, which was significantly higher than that in Ad. IL-24 group ([46.8 ± 0.74]%, $P < 0.05$) and 5-Fu group ([29.3 ± 0.60]%, $P < 0.05$); three days after combined treatment with Ad. IL-24 (10 MOI) and EPI (2.5 $\mu\text{g/ml}$), the growth inhibitory rate was (72.5 ± 0.92)%, which was also significantly higher than those in Ad. IL-24 group ([46.8 ± 0.74]%, $P < 0.05$) and EPI group ([32.2 ± 0.69]%, $P < 0.05$). FCM showed that combined administration of Ad. IL-24 and 5-Fu or EPI remarkably arrested PLC/PRF/5 cells at G_2/M phase. The cell apoptotic rate was (52.15 ± 2.32)% in Ad. IL-24 + 5-Fu group, which was significantly higher than those in Ad. IL-24 group ([28.36 ± 3.49]%, $P < 0.05$) and 5-Fu group ([8.27 ± 2.61]%, $P < 0.05$). The cell apoptotic rate of was (58.67 ± 1.73)% in Ad. IL-24 + EPI group, which was significantly higher than those in Ad. IL-24 group ([28.36 ± 3.49]%, $P < 0.05$) and EPI group ([11.82 ± 1.91]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** Ad. IL-24 combined with 5-Fu or EPI has enhanced inhibitory effect on growth of liver cancer cell line PLC/PRF/5.

[Key words] IL-24; liver neoplasms; gene therapy; chemotherapy; epirubicin; fluorouracil

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 338-341]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 30500477). Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30500477)

[作者简介] 温莹浩(1977-), 女, 江西省萍乡市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。

* Corresponding author. E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

IL-24 是一个具有抗肿瘤治疗潜力的热点分子^[1]。已有很多研究^[2-11]表明,高表达 IL-24 能选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡,并且和放疗、化疗^[12-13]等其他治疗方法联用具有互补潜力。肝细胞癌是我国的常见肿瘤,化疗效果并不理想,而且目前少见有关 IL-24 抑制肝癌细胞生长的实验报道。为此,本课题以体外培养的肝癌细胞株 PLC/PRF/5 为研究模型,单独或联合应用腺病毒介导的 IL-24 基因与化疗药物氟尿嘧啶(fluorouracil, 5-Fu)和表柔比星(epirubicin, EPI),观察对肝癌细胞增殖的协同抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞和主要试剂

重组腺病毒 Ad. IL-24、Ad. vector 和 Ad. GFP 由本实验室构建完成。采用目前常用的 AdEasy™ Adenoviral Vector System 构建携带人 IL-24 cDNA 的重组腺病毒质粒 pAd. IL-24, 转染 293 细胞后,通过筛选、包装、扩增和纯化,获得重组腺病毒 Ad. IL-24。同时构建携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的重组腺病毒 Ad. GFP 和空病毒 Ad. vector 用作实验对照。293 细胞、人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 为本室保存; RPMI 1640、胎牛血清、Lipofectamine 2000 试剂盒购自 GIBCO 公司; 氟尿嘧啶购自上海旭东海普药业公司, 表柔比星购自浙江海正药业公司。

1.2 腺病毒感染率测定

分别用 1、10、50、100 MOI 的 Ad. GFP 感染 PLC/PRF/5 细胞 2 h, 感染后 48 h 在荧光显微镜下计数细胞, GFP 阳性细胞数占总细胞数的百分比为感染率。

1.3 Ad. IL-24 与化疗药物的使用方法

Ad. IL-24(10 MOI)感染细胞 1 h, 每隔 15 min 摇晃 1 次。加含 5-Fu(终质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或 EPI(终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的含 10% FBS 的 RPMI 1640。

1.4 MTT 法检测 PLC/PRF/5 细胞的增殖情况

取对数生长期的 PLC/PRF/5 细胞接种于 96 孔细胞培养板(1×10^4 /孔), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后吸去培养液。Ad. IL-24 与化疗药物单用或联用, 分别继续培养 24、48、72、96、120 h 后, 弃培养液, 每孔加入 100 μl 无血清培养液和 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml), 继续培养 5 h, 吸去上清, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜(DMSO), 振荡 10 min, 用微板读数仪在 570 nm 波长下测定各孔光密度(D_{570})值, 计算

细胞抑制率。抑制率(%) = (1 - 实验组 D 值 / 对照组 D 值) $\times 100\%$ 。以上实验均重复 3 次。

1.5 FCM 检测 PLC/PRF/5 细胞周期和凋亡情况

Ad. IL-24 与化疗药物单用或联用, 4 d 后胰酶-EDTA 消化, 收集所有悬浮和贴壁细胞, 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h。加 RNase A(终质量浓度 50 mg/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。加入碘化丙啶(PI)染色 30 min。流式细胞术分析细胞周期及细胞凋亡情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析加 SNK 两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 腺病毒感染肝癌细胞的效率

当 MOI 为 1、10、50、100 时, Ad. GFP 对 PLC/PRF/5 细胞的感染率分别为 46%、84%、92% 及 96%, 呈明显的剂量-效应关系。虽然 MOI > 10 的感染效率更高, 但对细胞可产生一定的毒性反应。因此, 本实验选择 10 MOI 腺病毒进行感染。

2.2 Ad. IL-24 与化疗药物单用或联用对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制作用

检测结果显示, 10 MOI Ad. IL-24 与 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-Fu 或 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EPI 联用 72 h 时, 对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制率分别为($67.4 \pm 0.58\%$)% 和($72.5 \pm 0.92\%$)%, 而单独使用 Ad. IL-24、5-Fu 或 EPI 对肝癌细胞增殖的抑制率分别为($46.8 \pm 0.74\%$)%、($29.3 \pm 0.60\%$)% 和($32.2 \pm 0.69\%$)%, 联合用药的抑制率明显高于任何一种单独用药的抑制率(均 $P < 0.05$, 图 1)。

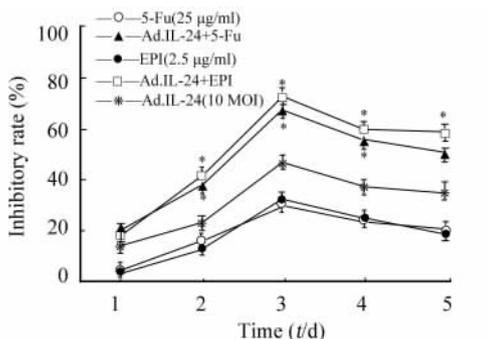


图 1 各组药物对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effects of different drug regimens against PLC/PRF/5 cells proliferation

* $P < 0.05$ vs Ad. IL-24(10 MOI) or 5-Fu (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or EPI(2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2.3 Ad. IL-24 与化疗药物单用或联用对 PLC/PRF/5 细胞周期和凋亡的影响

10 MOI Ad. IL-24 可导致 PLC/PRF/5 细胞 G₂/M 期阻滞, 25 μg/ml 5-Fu 及 2.5 μg/ml EPI 均可

导致 PLC/PRF/5 细胞不同程度地 G₀/G₁ 期阻滞, 而 Ad. IL-24 与上述化疗药物联用后, 对 PLC/PRF/5 细胞的 G₂/M 期阻滞更明显, 可见亚 G₁ 期凋亡峰(图 2 和表 1)。

表 1 各组药物对 PLC/PRF/5 细胞周期及凋亡的影响(%)

Tab. 1 Effects of different drugs on cell cycle and apoptosis of PLC/PRF/5 cells(%)

Groups	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apoptosis rate
Control	64.38 ± 2.09	20.56 ± 2.04	15.06 ± 1.66	0.74 ± 0.28
Ad. IL-24(10 MOI)	45.99 ± 2.49	18.74 ± 1.74	35.27 ± 2.11	28.36 ± 3.49
5-Fu(25 μg/ml)	72.42 ± 2.01	15.63 ± 1.66	11.95 ± 2.38	8.27 ± 2.61
EPI(2.5 μg/ml)	71.67 ± 2.34	17.46 ± 2.30	10.95 ± 1.98	11.82 ± 1.91
Ad. IL-24 + 5-Fu	49.87 ± 2.24	9.34 ± 1.71 *	40.79 ± 1.69 *	52.15 ± 2.32 *
Ad. IL-24 + EPI	50.96 ± 1.81	6.19 ± 1.58 *	42.85 ± 1.99 *	58.67 ± 1.73 *

* P < 0.05 vs Ad. IL-24(10 MOI) or 5-Fu(25 μg/ml) or EPI(2.5 μg/ml)

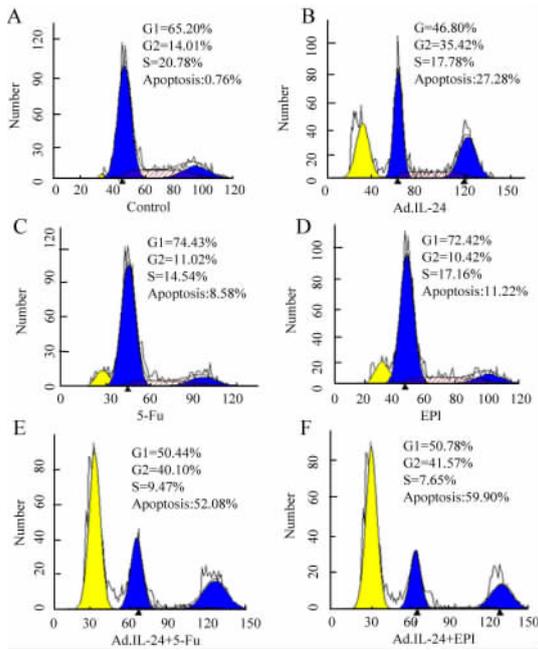


图 2 各组药物诱导 PLC/PRF/5 细胞凋亡的流式图

Fig. 2 Effects of different drugs regimens on apoptosis of PLC/PRF/5 cells as determined by FCM

A: Control; B: Ad. IL-24; C: 5-Fu; D: EPI; E: Ad. IL-24 + 5-Fu; F: Ad. IL-24 + EPI

3 讨论

IL-24 原名为黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation associated gene-7, mda-7), 最初是通过

消减杂交实验从终末分化的人类黑素瘤细胞中鉴定的, 后被确认为属于 IL-10 家族的分泌性细胞因子, 并重新命名为 IL-24^[14]。IL-24 基因含 7 个外显子和 6 个内含子, 与 IL-10 细胞因子家族成员 IL-10、IL-20 和 IL-22 组成一个基因簇定位于人类染色体 1q32.2-1q41。其全长 cDNA 大约为 2 kb, 阅读框架编码一个由 206 个氨基酸残基组成的多肽前体, 相对分子质量为 23 800, 呈四聚体螺旋结构。IL-24 受体属于 II 类细胞因子受体家族, 已鉴定出 2 个异二聚体受体 IL-22R1/IL-20R2 和 IL-20R1/IL-20R2^[15]。很多体内外实验结果证实, 高表达 IL-24 能诱导多种肿瘤细胞凋亡而不损害正常细胞, 且其抗肿瘤作用不依赖于这些细胞中其他肿瘤抑制基因 p53、pRB、p21 的状态^[16]。IL-24 还具有多种抗肿瘤活性, 如抗血管生成^[17-19]、免疫调节^[20]、增加放疗和化疗敏感性^[13]等。因此, IL-24 的抗肿瘤潜能已成为一个研究热点。

本研究通过体外实验检测 Ad. IL-24 与化疗药物单用或联用对肝癌细胞 PLC/PRF/5 的抑制作用。由于人类肝癌的 p53 基因常常发生改变, 而且 IL-24 的抗肿瘤作用与 p53 的状态无关^[16], 因此本实验选择应用 p53 突变型肝癌细胞 PLC/PRF/5, 以期实验结果更贴近实际应用。结果显示, Ad. IL-24 与 5-Fu 或 EPI 联用时细胞抑制率显著高于单用 Ad. IL-24 或 5-Fu 或 EPI, 而 Ad. IL-24 与 5-Fu 或 EPI 联用造成细胞明显的 G₂/M 期阻滞(与文献^[3,4,21]报道单用 Ad. IL-24 时的结果一致), 其细胞凋亡率显著高于

单用 Ad. IL-24 或 5-Fu 或 EPI。由此,本研究推测 Ad. IL-24 与 5-Fu 或 EPI 联用时其抑制细胞增殖的机制与通过上调凋亡作用及细胞周期阻滞有关。因此,IL-24 与化疗药物在肝癌的治疗上有一定的互补潜力,能提高抗肝癌的作用,并降低 IL-24 的病毒滴度及化疗药物的用量,达到减轻不良反应的目的。至于 IL-24 与化疗药物联用提高疗效的作用机制可能与 Ad. IL-24 与化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡具有不同的作用机制和分子基础有关,尤其是与 Ad. IL-24 可通过多种途径特异性诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[参考文献]

- [1] Inoue S, Shanker M, Miyahara R, *et al.* MDA-7/IL-24-based cancer gene therapy: translation from the laboratory to the clinic [J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6 (1): 73-91.
- [2] Chada S, Mhashilkar AM, Ramesh R, *et al.* Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism [J]. *Mol Ther*, 2004, 10 (6): 1085-1095.
- [3] Zheng M, Bocangel D, Doneske B, *et al.* Human interleukin 24 (MDA-7/IL-24) protein kills breast cancer cells via the IL-20 receptor and is antagonized by IL-10 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56 (2): 205-215.
- [4] Gopalan B, Shanker M, Chada S, *et al.* MDA-7/IL-24 suppresses human ovarian carcinoma growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 11.
- [5] Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, *et al.* Ionizing radiation enhances therapeutic activity of mda-7/IL-24: overcoming radiation- and mda-7/IL-24-resistance in prostate cancer cells overexpressing the antiapoptotic proteins bcl-xL or bcl-2 [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (16): 2339-2348.
- [6] Chada S, Bocangel D, Ramesh R, *et al.* mda-7/IL24 kills pancreatic cancer cells by inhibition of the Wnt/PI3K signaling pathways: identification of IL-20 receptor-mediated bystander activity against pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2005, 11 (5): 724-733.
- [7] Yacoub A, Mitchell C, Hong Y, *et al.* MDA-7 regulates cell growth and radiosensitivity *in vitro* of primary (non-established) human glioma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3 (8): 739-751.
- [8] Ishikawa S, Nakagawa T, Miyahara R, *et al.* Expression of MDA-7/IL-24 and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (3): 1198-1202.
- [9] Yacoub A, Mitchell C, Brannon J, *et al.* MDA-7 (interleukin-24) inhibits the proliferation of renal carcinoma cells and interacts with free radicals to promote cell death and loss of reproductive capacity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2 (7): 623-632.
- [10] Zhao L, Gu J, Dong A, *et al.* Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (7): 845-858.
- [11] Chen WY, Cheng YT, Lei HY, *et al.* IL-24 inhibits the growth of hepatoma cells *in vivo* [J]. *Genes Immun*, 2005, 6 (6): 493-499.
- [12] Oida Y, Gopalan B, Miyahara R, *et al.* Sulindac enhances adenoviral vector expressing mda-7/IL-24-mediated apoptosis in human lung cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4 (2): 291-304.
- [13] Chada S, Mhashilkar AM, Liu Y, *et al.* mda-7 gene transfer sensitizes breast carcinoma cells to chemotherapy, biologic therapies and radiotherapy: correlation with expression of bcl-2 family members [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13 (5): 490-502.
- [14] Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene-7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol*, 2002, 168 (12): 6041-6046.
- [15] Wang M, Tan Z, Zhang R, *et al.* Interleukin-24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (9): 7341-7347.
- [16] 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.
- [17] Inoue S, Branch CD, Gallick GE, *et al.* Inhibition of Src kinase activity by Ad-mda7 suppresses vascular endothelial growth factor expression in prostate carcinoma cells [J]. *Mol Ther*, 2005, 12 (4): 707-715.
- [18] Nishikawa T, Ramesh R, Munshi A, *et al.* Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation [J]. *Mol Ther*, 2004, 9 (6): 818-828.
- [19] Ramesh R, Mhashilkar AM, Tanaka F, *et al.* Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (16): 5105-5113.
- [20] Miyahara R, Banerjee S, Kawano K, *et al.* Melanoma differentiation-associated gene-7 (mda-7)/interleukin (IL)-24 induces anticancer immunity in a syngeneic murine model [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13 (8): 753-761.
- [21] 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.

[收稿日期] 2007-06-20

[修回日期] 2007-07-30

[本文编辑] 郁晓路