

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0417-06

人 *mda-7/IL-24* 对淋巴瘤细胞 Namalwa 的抑制作用

段永娟, 马小彤*, 董成亚, 张 芳, 林永敏, 杨宾霞(中国医学科学院 中国协和医科大学 血液学研究所 血液病医院实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘 要] 目的: 研究黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7*, 又称 *IL-24*)对淋巴瘤细胞系 Namalwa 细胞的抑制作用。方法: 用半定量 RT-PCR 方法检测 10 个造血系统恶性肿瘤细胞系(Namalwa、Raji、K562、NB4、U937、Ramous、CEM、KG1a、HL60、J6-1)中 *mda-7/IL-24* 的表达情况。用 RT-PCR 方法从活化的人外周血单个核细胞(PBMC)中克隆 *mda-7/IL-24* 编码区, 构建真核表达载体 pTarget-IL-24。经测序鉴定后, 用脂质体法转染 Namalwa 细胞, 筛选稳定表达细胞株。转染细胞经 RT-PCR 和 Western blotting 证实 *mda-7/IL-24* 的表达。通过 MTT 法、集落形成试验、流式细胞术、裸鼠体内成瘤实验来评价 *mda-7/IL-24* 对肿瘤细胞增殖、生长特性、集落形成、凋亡情况、体内致瘤能力的作用。结果: 10 个造血系统恶性肿瘤细胞系中未检测到 *mda-7/IL-24* 的表达; 转染重组质粒 pTarget-IL-24 的 Namalwa 细胞在 mRNA 与蛋白水平都有 *mda-7/IL-24* 的表达; 稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞增殖活力以及集落形成能力与转染空载体的对照组相比明显下降($P < 0.05$); 但是两者的凋亡率比较无统计学意义。裸鼠体内移植瘤实验结果显示稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞株的致瘤性明显低于转染空载体的对照组($P < 0.05$)。结论: *mda-7/IL-24* 对来源于 Burkitt 淋巴瘤的 Namalwa 细胞系具有明显的增殖抑制作用, 为 Burkitt 淋巴瘤的基因治疗提供了新的思路。

[关键词] 黑素瘤分化相关基因-7; IL-24; 淋巴瘤; 基因治疗

[中图分类号] R730.54; R733.4 [文献标志码] A

Inhibitory effect of human *mda-7/IL-24* on proliferation of lymphoma cell line Namalwa

DUAN Yong-juan, MA Xiao-tong, DONG Cheng-ya, ZHANG Fang, LIN Yong-min, YANG Bin-xia (State Key Laboratory For Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of melanoma differentiation associated gene-7(*mda-7/IL-24*) on lymphoma cell line Namalwa *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Using RT-PCR, the expression of *mda-7/IL-24* was examined in 10 malignant hematopoietic cell lines, including Namalwa, Raji, K562, NB4, U937, Ramous, CEM, KG1a, HL60, J6-1, etc. The coding region of *mda-7/IL-24* was cloned from LPS-treated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by RT-PCR, and the eukaryotic expression vector pTarget-IL-24 was constructed. The recombinant vector, after sequenced, was transfected into Namalwa cell line *via* lipofectamine reagent. The stable expression transfectants were selected by G418. The expression of *mda-7/IL-24* mRNA and protein was verified by RT-PCR and Western blotting. MTT assay, colony forming assay, apoptosis detection, and tumorigenesis in nude mice were used to assess the effects of *mda-7/IL-24* on tumor proliferation, growth characteristics, colony forming, apoptosis, and tumorigenesis. **Results:** Expression of *mda-7/IL-24* mRNA was not found in any of the 10 malignant hematopoietic cell lines and the expression of *mda-7/IL-24* mRNA and protein was found in Namalwa cells transfected with recombinant plasmid pTarget-IL-24. Significant decrease in tumor cell viability was observed in Namalwa cells stably transfected with *mda-7/IL-24*, compared with control cells transfected with empty plasmid pTarget ($P < 0.05$). Transfection with *mda-7/IL-24* also inhibited the colony forming ability of Namalwa cells ($P < 0.05$). However, there was no significant change in the number of Annexin V-positive cells in *mda-7/IL-24* transfected Namalwa cells compared with pTarget-transfected cells. The results of BALB/c nude mice

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672364), 天津市应用基础研究基金重点资助项目(No. 07JCZDJC07600). Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672364); The Key Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin(No. 07JCZDJC07600)

[作者简介] 段永娟(1978 -), 女, 天津市人, 硕士研究生, 主要从事细胞因子与肿瘤治疗研究, E-mail: dyj78112280@yahoo.com.cn

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

transplantation experiment showed that Namalwa cells stably expressing *mda-7/IL-24* had significantly lower tumorigenicity than those transfected with blank vectors ($P < 0.05$). **Conclusion:** Human *mda-7/IL-24* can efficiently inhibit the proliferation of lymphoma cell line Namalwa *in vitro* and *in vivo*, which provides a novel strategy for gene therapy of Burkitt lymphoma.

[**Key words**] melanoma differentiation associated gene-7; IL-24; lymphoma; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 417-422]

黑素瘤分化相关基因-7/*IL-24*(melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7/IL-24*) 是 1995 年采用减数杂交技术在 β -干扰素(interferon- β , INF- β)和密执毒素(mezerein)诱导终末分化的人黑素瘤细胞 H0-1 中发现的一个新基因^[1]。Jiang^[2-8]等最先发现 *mda-7/IL-24* 对黑素瘤细胞有抑制生长的作用。随后,不同研究机构采用复制缺陷的腺病毒表达载体 Ad . *mda-7* 研究发现, *mda-7/IL-24* 在大多数实体瘤中异位过表达时都具有明显的肿瘤特异性抑制生长和诱导凋亡作用。但是,迄今为止,国内外有关 *mda-7/IL-24* 的肿瘤抑制研究均局限于实体瘤,其对造血系统恶性肿瘤的作用尚无文献报道。本实验采用分子克隆技术,构建 *mda-7/IL-24* 重组真核表达载体,转染 Namalwa(Burkitt 淋巴瘤细胞系)细胞,通过观察肿瘤细胞的生长、增殖活力、软琼脂集落形成能力、肿瘤细胞的凋亡变化以及裸鼠体内移植瘤的形成,评价 *mda-7/IL-24* 在造血系统恶性肿瘤中的作用,为造血系统恶性肿瘤的基因治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

主要试剂: RPMI 1640 粉剂、胎牛血清、G418、Trizol、MML-V 逆转录盒、LipofectamineTM2000、OPTI-MEM 低血清培养液、T4 DNA 连接酶、谷氨酰胺、2-巯基乙醇、甲基纤维素、Annexin-V/PI 凋亡试剂盒均购自 Invitrogen 公司。质粒小量提取试剂盒、ExTaq DNA polymerase、限制性内切酶(*Bam*H I、*Sal* I)、胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。ECL 化学发光试剂盒购自上海普飞生物公司。MTT、DMSO 均购自 Sigma 公司,预染蛋白 Marker(相对分子质量 20 000 ~ 118 000) 购自 Fermentas 公司,小鼠抗人 IL-24 单抗购自 R&D systems,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥生物公司。

菌株: *E. coli* DH5 α 菌株由我室保存。

细胞系: KG1a、HL60、J6-1、NB4、U937 为髓系白血病细胞系;CEM、Ramous 为淋巴细胞白血病细胞系;Namalwa、Raji 是淋巴瘤细胞系;K562 为红系

巨核系白血病细胞系,均由我室保存,在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中 37 $^{\circ}$ C 恒温、5% CO₂ 孵箱中培养。实验动物: BABL/c 裸鼠,雌性,6 周龄,购自军事医学科学院实验动物中心[实验动物合格证号: SCXK(军)2002-002]。

1.2 引物合成

根据 Genbank 的 *mda-7/IL-24* 基因序列用 PCR PRIMER 计算机软件辅助设计引物。*mda-7/IL-24* 特异的克隆引物序列为:上游 5'-ATTGGATCCG-GAACACGAGACTGAGAGATG-3',引入 *Bam*H I 酶切位点;下游 5'-ATGTCGACAAGGGAACAAAC-CAGTGCCA-3',引入 *Sal* I 酶切位点;扩增产物长度 684 bp。引物由北京奥科生物合成,PAGE 纯化。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C \times 1 min, 57 $^{\circ}$ C \times 1 min, 72 $^{\circ}$ C \times 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。选用人 β -actin 作为内参照,序列为:上游 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'; 下游 5'-CAG-GTCCAGACGCAGGATGGC-3',扩增产物长度 270 bp。扩增条件同 *mda-7/IL-24* cDNA。引物由北京奥科生物合成,PAGE 纯化。

Neo 基因上游引物:5'GGTGGAGAGGCTATTCCG-GCT3';下游引物:5'-GA-TAGAAGCCGATGCCGCT-GC3',PCR 产物的长度为 627 bp。引物由上海 Sangon 合成,PAGE 纯化。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C \times 1 min, 57 $^{\circ}$ C \times 1 min, 72 $^{\circ}$ C \times 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 pTarget 真核表达载体的构建与鉴定

采用 Ficoll-Hypaque 分离正常人 PBMC,调整细胞密度为 2×10^6 /ml 接种于 24 孔板,加 LPS(1.5 μ g/ml)刺激 6 h 后收集细胞抽提总 RNA。通过 RT-PCR 方法扩增人 *mda-7/IL-24* 基因编码区全长,PCR 产物经电泳检测长度为 684 bp,利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点将 *mda-7/IL-24* 进行双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳回收,再与同样双酶切回收的 pTarget 载体 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,以含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板筛选,挑取单菌落后摇菌提取质粒,*Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定,*mda-7/IL-24* PCR 产物 *Eco*R I 单酶切鉴定正

确后,送上海博亚公司序列测定,将测序结果与 Genebank 序列比对以证实序列和读框正确。

1.4 脂质体介导 Namalwa 细胞的转染

实验细胞分 3 组:未加任何处理的野生型 Namalwa 细胞、转染 pTarget 空载体的细胞、转染 *mda-7/IL-24* 的细胞。在 24 孔板中接种,调整细胞密度为 5×10^5 /孔,参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™2000 产品说明进行转染。转染后 48 h 加入 G418(终质量浓度为 $1\ 400\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 筛选阳性克隆,筛选后第 14 天,极限稀释细胞至 5 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 $100\ \mu\text{l}$ 。接种后 24~36 h 之间标记已形成单克隆的孔,继续培养至合适密度移至 24 孔板。

1.5 *mda-7/IL-24* 基因表达的检测

RT-PCR 法:按 Trizol 说明书提取总 RNA。RT 采用 M-MLV 逆转录酶标准体系,PCR 扩增采用 $25\ \mu\text{l}$ 反应体系:模板 cDNA $2\ \mu\text{l}$, $10 \times$ PCR 反应缓冲液 $2\ \mu\text{l}$, 上游引物 $25\ \text{pmol}$, 下游引物 $25\ \text{pmol}$, $10\ \text{mmol}/\text{L}$ dNTP Mix $0.5\ \mu\text{l}$, ExTaqDNA 聚合酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{l}$) $0.125\ \mu\text{l}$ 。扩增条件为: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $2\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ $\times 1\ \text{min}$, $57\ ^\circ\text{C}$ $\times 1\ \text{min}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $\times 1\ \text{min}$, 30 个循环后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $10\ \text{min}$; 同时做 β -actin 内参照。

Western blotting 法:取 1×10^7 细胞,加 $400\ \mu\text{l}$ 细胞裂解液冰上裂解 $30\ \text{min}$, 超声 3 次,每次 $10\ \text{s}$, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 下 $11\ 000 \times g$ 离心 $20\ \text{min}$, 收集上清经 10% SDS-PAGE 电泳后转硝酸纤维薄膜,用 5% 脱脂奶粉 $4\ ^\circ\text{C}$ 封闭过夜,将膜与特异性一抗(鼠抗人 IL-24 单克隆抗体) $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 $2\ \text{h}$, 冲洗后将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 $1\ \text{h}$ 。按照 ECL 化学发光试剂盒说明书进行胶片显色。

1.6 MTT 法检测 Namalwa 细胞的增殖

收集并计数稳定表达 pTarget、pTarget-IL24 的 Namalwa 细胞及未转染细胞,调整密度至 8×10^4 /ml,以每孔 $180\ \mu\text{l}$ 接种于 96 孔板,每组平行 5 孔,并设立空白对照。分别培养 0、24、48、72 h 后加入 $20\ \mu\text{l}$ MTT ($5\ \text{mg}/\text{ml}$) 继续培养 $4\ \text{h}$,离心后去除上清,加入 $150\ \mu\text{l}$ DMSO 振荡 $10\ \text{min}$ 后使用酶标仪检测 $492\ \text{nm}$ 波长处的光密度值(D)。

1.7 软琼脂集落形成实验

取对数生长期转染及未转染细胞, $250 \times g$ 离心 $10\ \text{min}$, 弃上清,用无血清 RPMI 1640 洗涤,配密度为 5×10^4 /ml 的细胞悬液,加入集落培养体系(1 ml RPMI 1640 液中含有 2.3% 甲基纤维素 $400\ \mu\text{l}$ 、2-巯基乙醇 $10\ \mu\text{l}$ 、Gln $10\ \mu\text{l}$ 、G418 $28\ \mu\text{l}$ 、胎牛血清的终体积分数为 20%)。96 孔板中,每孔加 $100\ \mu\text{l}$ 上述

液体,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养 $7\ \text{d}$,于倒置显微镜下观察,大于 50 个细胞的细胞丛为一集落,计集落数。

1.8 FACS 检测 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞凋亡的影响

按照 Invitrogen 公司 Annexin-V/PI 凋亡检测盒说明进行。收集细胞用 $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用稀释好的结合缓冲液 $250\ \mu\text{l}$ 重新悬浮细胞,调节其密度为 1×10^6 /ml。取 $100\ \mu\text{l}$ 的细胞悬液于 $5\ \text{ml}$ 流式管中,加入 $5\ \mu\text{l}$ Annexin-V/FITC 和 $10\ \mu\text{l}$ PI,混匀后室温避光孵育 $15\ \text{min}$,在反应管中加入 $400\ \mu\text{l}$ PBS, FACS 分析。

1.9 裸鼠移植瘤的抑制作用观察

BALB/c 裸鼠接种当天予以亚致死量 ($300\ \text{cGy}$) 的 ^{137}Cs 放射源照射,随机分为 2 组,每组 6 只。调整转染细胞密度为 $5 \times 10^7/200\ \mu\text{l}$,于左腋下皮下注射,一组注射转染 pTarget-IL-24 的 Namalwa 细胞,另一组注射转染 pTarget 空载体的 Namalwa 细胞。观察 2 组裸鼠成瘤时间、成瘤率;待肿瘤出现后每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤块 2 个方向的直径,分别记为 a、b,瘤子体积计算公式^[9]: $V = 1/2ab^2$, 21 d 后将裸鼠处死。

1.10 统计学处理

检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间比较采用配对 t 检验,超过两组的均数间比较用 Kruskal-Wallis 检验(ANOVA),采用 SPSS10.0 软件包进行统计处理。

2 结果

2.1 *mda-7/IL-24* 在造血系统恶性肿瘤细胞中表达

采用半定量 RT-PCR 方法检测了 *mda-7/IL-24* 在造血系统恶性肿瘤细胞系中的转录情况,用 LPS 刺激的正常人外周血单个核细胞为 *mda-7/IL-24* 扩增反应阳性对照。在被检测的 KG1a、HL60、J6-1、NB4、U937、CEM、Ramous、Namalwa、Raji、K562 等 10 种造血系统恶性肿瘤细胞系中,均未检测到 *mda-7/IL-24* mRNA 的表达(图 1)。

2.2 *mda-7/IL-24* 真核表达载体的构建和鉴定

通过 RT-PCR 方法,从 LPS 刺激的正常人外周血单个核细胞中扩增出 *mda-7/IL-24* 基因的编码区全长,片段大小为 $684\ \text{bp}$,与预期结果一致。胶回收 *mda-7/IL-24* cDNA 片段,经 BamH I 和 Sal I 双酶切,克隆到真核表达载体 pTarget 的克隆位点,构建 pTarget-IL24 重组质粒。重组质粒转化感受态 DH5 α ,挑取阳性菌株,经菌液和质粒 PCR,酶切鉴

定均证实插入片段大小正确后(图2)对 pTarget-IL-24 进行插入片段全长测序,结果证实克隆至 pTarget 载体中的 *mda-7/IL-24* 基因与 GenBank 中公布的序列完全一致。

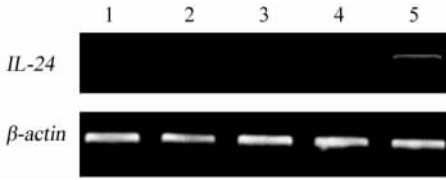


图1 半定量 RT-PCR 检测 *mda-7/IL-24* mRNA 在白血病细胞系中的表达

Fig. 1 Detection of *mda-7/IL-24* mRNA expression in leukemia cell lines by RT-PCR

1: Namalwa cell line; 2: HL-60 cell line; 3: U937 cell line; 4: CEM cell line; 5: Positive control using health adult's PBMC after stimulating with LPS

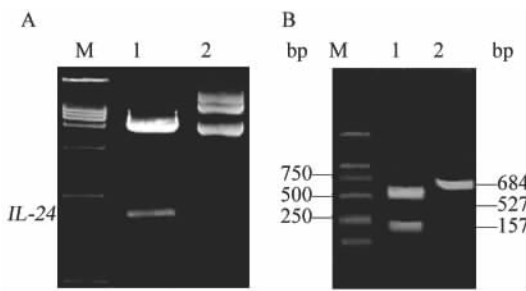


图2 重组质粒 pTarget-IL-24 的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pTarget-IL24

A. M: Marker DL 15 000; 1: pTarget-IL24 plasmid was cleave by *Bam*H I and *Sal* I; 2: pTarget-IL24 plasmid before cleaved; B. M: Marker DL 2 000; 1: The cleavage map of IL-24 by *E. co*R I; 2: IL-24 before cleave by *E. co*R I

2.3 重组质粒转染后 Namalwa 细胞 *mda-7/IL-24* mRNA 的表达

质粒载体 pTarget、pTarget-IL24 转染 Namalwa 细胞后,经克隆化培养获得表达空载体 pTarget (pTarget-V)和表达 *mda-7/IL-24*(pTarget-IL24)的细胞系,分别命名为 Namalwa-V、Namalwa-IL24。抽提上述细胞 mRNA 后进行 RT-PCR,在转染 Namalwa-IL24 中检测到 *mda-7/IL-24* mRNA 的表达(图3)。

选取 Namalwa-V 与 Namalwa-IL24 细胞株进行 Western blotting 实验。在稳定转染 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa-IL24 细胞株中检测到了 *mda-7/IL-24* 蛋白的表达,相对分子质量大约为 32 000,与文献报道一致(图4)。

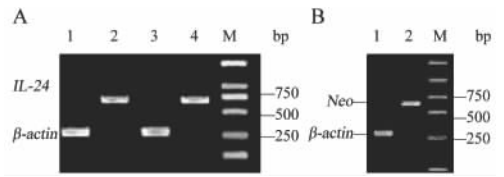


图3 重组质粒转染后 Namalwa 细胞 IL-24 mRNA 的表达
Fig. 3 Expression of IL-24 mRNA in Namalwa cells after transfection pTarget-IL-24 and pTarget-V

A. pTarget-IL24 Namalwa cell lines. 1,3: β -actin, about 279 bp; 2, 4: *mda-7/IL-24*, about 684 bp; M: Marker DL2000; B. pTarget-V Namalwa cell line. 1: β -actin, about 279 bp; 2: *Neo* gene, about 627 bp; M: Marker DL2000

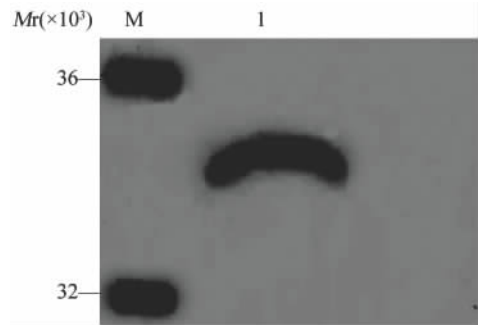


图4 Western blotting 检测重组质粒转染后 Namalwa 细胞 *mda-7/IL-24* 蛋白的表达
Fig. 4 Western blotting analysis of *mda-7/IL-24* protein expression in Namalwa cell line after transfection with recombinant plasmid
M: Protein marker; 1: Namalwa cells after transfection

2.4 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞增殖的抑制作用
为了评价 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞是否有抗肿瘤作用,本实验首先通过不同时间点的 MTT 实验,检测细胞增殖活力变化。结果显示,稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞系肿瘤细胞增殖活力明显低于转染空载体和未转染的 Namalwa 细胞系 ($P < 0.05$);转染 pTarget 的空载体 Namalwa 细胞系与未转染细胞相比,细胞增殖活力不具有显著差别 ($P > 0.05$,图5)。

2.5 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞集落形成的抑制
在软琼脂集落形成实验中,稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞系与转染 pTarget 空载体的对照组相比,前者集落形成数目明显减少,分别为 $(20.25 \pm 2.02) / 5 \times 10^4$ 细胞和 $(51 \pm 4.24) / 5 \times 10^4$ 细胞 ($P < 0.01$),并且稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞系形成的集落较小,而转染 pTarget 空载体的 Namalwa 细胞系与野生型 Namalwa 细胞系相比

无统计学意义 ($P > 0.05$)。

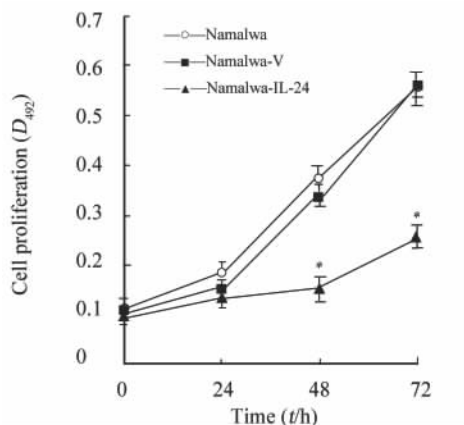


图5 *mda-7/IL-24* 抑制 Namalwa 细胞的增殖

Fig. 5 Inhibitory effect of *mda-7/IL-24* on proliferation of Namalwa cell *in vitro*

* $P < 0.05$ vs Namalwa-V cell

2.6 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞凋亡的作用

Namalwa-V/PI 凋亡检测试剂盒凋亡检测发现, 稳定表达 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞系凋亡率为 $(0.8 \pm 0.17)\%$, 与转染 pTarget 空载体的对照组 $(0.49 \pm 0.14)\%$ 相比, 凋亡百分率间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.7 *mda-7/IL-24* 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

为了评价体内抗肿瘤效果, 给照射裸鼠接种转染 *mda-7/IL-24* 和空载体的 Namalwa 细胞, 观察裸鼠接种后成瘤情况。结果如图 6 所示: Namalwa-V 的肿瘤生长速度明显快于 Namalwa-IL24, 即接种相同时间相同肿瘤细胞数量的条件下, Namalwa-V 的肿瘤体积与 Namalwa-IL24 相比具有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

mda-7/IL-24 是 Jiang^[1] 等人 1995 年新发现的一个肿瘤抑制基因, 具有肿瘤细胞特异性抑制生长和诱导凋亡作用。研究^[2-8,10-13] 发现, 通过脂质体与复制缺陷型病毒转染的方法将 IL-24 转染到不同实体肿瘤细胞, 对很多实体瘤, 如黑素瘤、乳腺癌、肺癌、宫颈癌、结肠癌、前列腺癌等都有抗肿瘤作用。尽管 *mda-7/IL-24* 的作用机制还不是很清楚, 但大量的实验结果表明该基因作为一个有效的肿瘤治疗基因, 能够区分出正常细胞和肿瘤细胞、诱导各种不同肿瘤细胞凋亡、启动抗肿瘤“旁观者效应”^[14-15]、增强肿瘤细胞对射线敏感性、抑制动物模型体内移植瘤的生长和血管新生以及具有调节免疫应答能

力。这些独特的性质使得 *mda-7/IL-24* 单独或者作为联合治疗中的一种成分都可能会对肿瘤治疗产生深远的意义。但是 *mda-7/IL-24* 在造血系统恶性肿瘤中的作用迄今还没有文献报道。本研究首先检测了 *mda-7/IL-24* 在造血系统恶性肿瘤细胞系中的表达, 结果表明 *mda-7/IL-24* 在被检测的 10 个代表不同来源的造血系统恶性肿瘤细胞系中均没有表达。这个实验结果和 *mda-7/IL-24* 在其他实体瘤中的研究报道一致^[16-17], 符合 *mda-7/IL-24* 的抑癌基因的特点。

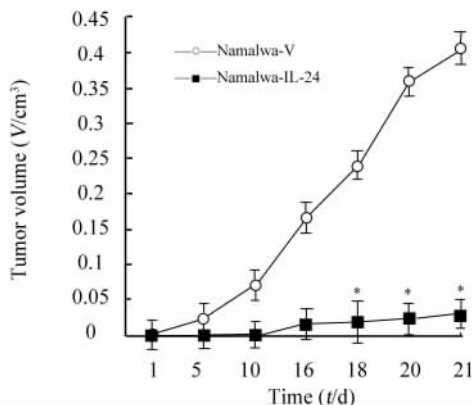


图6 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 移植瘤的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of *mda-7/IL-24* on Namalwa xenograft models

* $P < 0.05$ vs Namalwa-V

为了研究 *mda-7/IL-24* 对造血系统恶性肿瘤的作用, 本实验选取了来源于 Burkitt 淋巴瘤的 Namalwa 细胞系进行实验研究。首先通过 RT-PCR 方法, 从 LPS 刺激的正常人外周血单个核细胞中扩增出 *mda-7/IL-24* 基因的编码区全长, 将其插入到真核表达载体 pTarget 的多克隆位点, 构建了 pTarget-IL-24 重组质粒。由于绝大多数造血系统恶性肿瘤细胞均没有腺病毒受体, 本实验采用脂质体转染的方法将重组真核表达载体转染到 Namalwa 细胞中。通过 RT-PCR、Western blotting 方法进行 mRNA 水平、蛋白水平鉴定, 证实了 *mda-7/IL-24* 在转染后的 Namalwa 细胞中表达。在随后的 *mda-7/IL-24* 功能实验中发现, 与转染了 pTarget 空载体的 Namalwa 细胞以及野生型对照组相比, *mda-7/IL-24* 具有明显的抑制 Namalwa 细胞生长的特性 ($P < 0.05$)。随后的软琼脂集落形成实验发现, 转染了 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞形成的集落很小而且集落的数目很少, 明显低于对照组 ($P < 0.01$), 进一步证实了 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞集落形成能力的抑制。

凋亡检测过程中未发现 *mda-7/IL-24* 具有促进 Namalwa 细胞凋亡的作用,这与其它文献报道的 *mda-7/IL-24* 具有特异地诱导肿瘤细胞凋亡的作用有区别。推测,*mda-7/IL-24* 对不同类型的肿瘤细胞作用不尽相同。

经过上述体外实验证实了 *mda-7/IL-24* 对 Namalwa 细胞增殖的抑制作用后,本实验进行裸鼠体内致瘤性实验。结果发现,转染 *mda-7/IL-24* 的 Namalwa 细胞在裸鼠体内的成瘤能力明显降低。因此表明,*mda-7/IL-24* 无论在体内还是体外都能抑制 Namalwa 细胞的生长和肿瘤形成。本实验首次发现,尽管造血系统恶性肿瘤与实体瘤的肿瘤生物学特性明显不同,*mda-7/IL-24* 同样能够对来源于 Burkitt 淋巴瘤的 Namalwa 细胞具有抗肿瘤作用,为 *mda-7/IL-24* 应用于 Burkitt 淋巴瘤的治疗提供了依据。

[参 考 文 献]

- [1] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, *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(12): 2477-2486.
- [2] Su Z, Lebedeva IV, Gopalkrishnan RV, *et al.* A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(18): 100332-100337.
- [3] Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7/interleukin-24*, induces apoptosis in prostate cancer cells by promoting mitochondrial dysfunction and inducing reactive oxygen species [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8138-8144.
- [4] Sarkar D, Su ZZ, Vozhilla N, *et al.* Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39): 14034-14039.
- [5] Mahasreshthi PJ, Kataram M, Wu H, *et al.* Ovarian cancer targeted adenoviral-mediated *mda-7/IL-24* gene therapy [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(3): 521-532.
- [6] 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.

- [7] 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.
- [8] Gopalan B, Litvak A, Sharma S, *et al.* Activation of the Fas-FasL signaling pathway by *mda-7/IL-24* kills human ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3017-3024.
- [9] Vanhaeseberek B, Maral 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.
- [10] Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, *et al.* The cancer growth suppressing gene *mda-7* induces apoptosis selectively in human melanoma cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(5): 708-718.
- [11] Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, *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.
- [12] Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ, *et al.* The cancer growth suppressor gene *mda-7* selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(24): 14400-14405.
- [13] Saeki T, Mhashilkar A, Chada S, *et al.* Tumor-suppressive effects by adenovirus-mediated *mda-7* gene transfer in non-small cell lung cancer cell *in vitro* [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(23): 2051-2057.
- [14] Yamamoto M, Nishimoto N, Davydova J, *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 expression by infectivity-enhanced adenoviral vector inhibits IL-6-dependent proliferation of multiple myeloma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(2): 194-202.
- [15] Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, *et al.* Molecular target-based therapy of pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 15, 66(4): 2403-2413.
- [16] Jiang H, Su ZZ, Lin JJ, *et al.* The melanoma differentiation associated gene *mda-7* suppresses cancer cell growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(17): 9160-9165.
- [17] Huang EY, Madireddi MT, Gopalkrishnan RV, *et al.* Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (*mda-7*) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties [J]. *Oncogene*, 2001, 20(48): 7051-7063.

[收稿日期] 2007 - 07 - 26

[修回日期] 2007 - 08 - 16

[本文编辑] 王莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅