

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.02

· 研究快报 ·

## *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 诱导急性髓系白血病细胞向单核细胞分化

姚兴荣, 马小彤, 杨宾霞, 段永娟, 林永敏(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院暨血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

**专家点评** 急性髓系白血病是一种分化阻滞性疾病,其特征是异常的髓系前体细胞被完全或部分阻滞在不同的分化阶段,并伴有造血前体细胞增殖失控。目前的治疗方案主要是化疗,但有许多不良反应和毒性作用;另一种方案是诱导分化治疗,其疗效好、毒性作用小。更深入地了解白血病细胞分化机制,寻找在白血病细胞分化中发挥重要作用的基因,将为设计安全和特异的分化治疗方案提供帮助。

本期刊登了马小彤、姚兴荣等人关于 *mda-7/IL-24* 及其剪接体 *IL-24 delE5* 诱导急性髓系白血病细胞分化的论文,作者在 TPA 诱导人急性髓系白血病细胞 U937 和 HL60 向单核细胞分化后检测到 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达,并发现它们在 TPA 介导的向单核细胞分化过程中发挥重要作用。TPA 是经典的诱导分化剂,该项研究为揭示 TPA 诱导分化机制提供了新线索。

尽管一些分化诱导剂对白血病细胞系的诱导分化效果很好,但对原代白血病细胞的作用却很小,论文作者却发现了 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 能够有效诱导急性髓系白血病细胞系及患者原代白血病细胞向单核细胞分化。该研究成果将为找到在诱导白血病细胞分化中起关键作用的基因和揭示白血病单核分化分子机制奠定基础。

中国医学科学院血液学研究所副所长、血液病医院副院长,中华医学会血液学分会副主任委员,中国抗癌协会血液肿瘤委员会常委

**[摘要]** 目的:研究人黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7*; 又称 *IL-24*)及其剪接体 *IL-24 delE5* 与急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞分化的关系。方法:十四烷酰佛波醇-乙酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)处理人急性髓系白血病细胞系 U937、HL-60, real-time PCR 及 Western blotting 检测细胞中 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达, FACS 检测细胞表面 CD11b、CD14 和 CD115 的表达。siRNA 干扰 U937、HL-60 细胞中 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达后,再以 TPA 诱导细胞分化, FACS 检测 CD11b、CD14 和 CD115 的表达。用前期构建的 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 载体转染 U937、HL-60 及 AML-M5 患者的原代白血病细胞,观察异位过表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 能否诱导白血病细胞向单核细胞分化。结果:TPA 在诱导 U937、HL-60 细胞向单核细胞分化过程中显著促进 *mda-7/IL-24* 及其剪接体 *IL-24 delE5* 的表达,用 siRNA 干扰 *mda-7/IL-24* 及 *IL-24 delE5* 的表达后,TPA 诱导 U937、HL-60 细胞向单核细胞分化的作用也被阻断。异位过表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 可诱导 U937、HL-60 以及原代 AML 细胞向单核细胞分化:U937、HL-60 细胞表面 CD11b 和 CD14 表达均显著升高,CD115 表达仅在 U937 细胞有显著升高;3 例 AML-M5 患者的原代 AML 细胞中 CD11b、CD14 及 CD115 表达均有不同程度升高,细胞呈现单核细胞的形态特征。结论:TPA 可通过上调 *mda-7/IL-24* 及其剪接体 *IL-24 delE5* 的表达诱导白血病细胞向单核细胞分化。

**[关键词]** 黑素瘤分化相关基因-7(*mda-7/IL-24*); *IL-24 delE5*; 十四烷酰佛波醇-乙酯; 急性髓系白血病; 单核细胞; 分化

**[中图分类号]** R733.7; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2011)03-0244-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30872983, 81070426);天津市应用基础研究基金重点资助项目(No. 11JCZDJC18000)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30872983, 81070426), and the Key Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin(No. 11JCZDJC18000)

**[作者简介]** 姚兴荣(1985-),女,北京市人,硕士生,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。E-mail: yaohaoren@gmail.net

**[通信作者]** 马小彤 MA Xiao-tong, corresponding author, E-mail: ma\_xt@yahoo.com.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.004.html>

## *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* induce myeloid leukemia cells to differentiate into monocytes

YAO Xing-rong, MA Xiao-tong, YANG Bin-xia, DUAN Yong-juan, LIN Yong-min ( State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the effects of melanoma differentiation associated gene-7 ( *mda-7*, also named *IL-24* ) and *IL-24 delE5*, an *mda-7/IL-24* splice variant, on differentiation of acute myeloid leukemia ( AML ) cells. **Methods:** The AML cell lines U937 and HL-60 were treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ( TPA ); *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* expressions were detected by real-time PCR and Western blotting assays. CD11b, CD14 and CD115 expressions on cell surface were examined by FACS. U937 and HL-60 cells were induced with TPA after siRNA interfering *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* expressions, and then CD11b, CD14 and CD115 expressions were examined by FACS. U937 and HL-60 cell lines and primary leukemia cells from AML-M5 patients were transfected with *mda-7/IL-24* or *IL-24 delE5* plasmids, which were established in our previous study, in order to know whether ectopic overexpressions of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* can induce the monocytic differentiation of leukemia cells. **Results:** The expressions of *mda-7/IL-24* and its splice variant, *IL-24 delE5*, were significantly induced in U937 and HL-60 cells during TPA-mediated monocytic differentiation. Interfering *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* expressions after siRNA treatment inhibited the monocytic differentiation ability of TPA on U937 and HL-60 cells. Ectopic overexpressions of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* induced differentiation of U937, HL-60, and primary AML leukemia cells into monocytes; CD11b, CD14 expressions on U937 and HL-60 cells and CD115 expression on U937 were significantly increased; CD11b, CD14 and CD115 expressions on primary leukemia cells from 3 AML patients were also increased with monocytic features. **Conclusion:** TPA can induce monocytic differentiation of leukemia cells by increasing *mda-7/IL-24* and its splice variant *IL-24 delE5* expressions.

[ **Key words** ] melanoma differentiation associated gene-7 ( *mda-7/IL-24* ); *IL-24 delE5*; 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ( TPA ); acute myeloid leukemia; monocyte; differentiation

[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18( 3 ): 244-250 ]

黑素瘤分化相关基因-7( melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7* ) 又称 *IL-24*, 是 1995 年采用减数杂交技术在诱导终末分化的人黑素瘤细胞 HO-1 中发现的新基因<sup>[1]</sup>。该基因在诱导分化后的黑素瘤细胞和正常人黑素细胞中高表达, 在原发性黑素瘤和转移性黑素瘤组织中低表达。*mda-7/IL-24* 在很多实体肿瘤( 包括黑素瘤、前列腺癌、宫颈癌、小细胞肺癌、恶性神经胶质细胞瘤等 ) 中异位表达时具有特异性抑制肿瘤细胞生长和诱导凋亡作用; 此外, 还可以抑制肿瘤血管新生、具有抗肿瘤“旁观者效应”, 以及能够增强肿瘤细胞对射线的敏感性<sup>[2-11]</sup>。迄今为止, *mda-7/IL-24* 的肿瘤抑制研究多局限于实体瘤, 其对造血系统恶性肿瘤作用的研究尚少。本实验室前期研究<sup>[12]</sup>发现了 *mda-7/IL-24* 的选择性剪接体 *IL-24 delE5*, 并证实 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的异位表达对人慢性粒细胞白血病急性红白血病变细胞系 K562、人 Burkitt 淋巴瘤细胞

系 Namalwa 具有明显的抑制作用<sup>[12-15]</sup>。尽管 *mda-7* 是在黑素瘤细胞诱导分化后表达的, 但目前尚无关于其诱导分化机制的报道。十四烷酰佛波醇-乙酯 ( 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA ) 是分化诱导剂, 能诱导白血病细胞分化, 在黑素瘤细胞及 HeLa 细胞中能够激活 *mda-7/IL-24* 的启动子<sup>[16]</sup>。本研究采用急性髓系白血病 ( acute myeloid leukemia, AML ) 细胞系 U937 和 HL-60 作为分化模型, 探讨 *mda-7/IL-24*、TPA 与白血病细胞分化的关系。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 材料

U937 单核细胞白血病细胞系来源于人组织细胞淋巴瘤, HL-60 属于人急性粒细胞白血病细胞系, 均由本室常规方法传代和培养。培养条件为 RPMI 1640 加 10% 胎牛血清、2 mmol/L 的谷氨酰胺、100 IU/ml 的青霉素和 100 μg/ml 的链霉素, 37 °C 恒温、

5% CO<sub>2</sub> 孵箱。

3例 AML-M5(2例 M5b, 1例 M5a)白血病患者骨髓标本取自我院收住的初治患者,患者骨髓单核细胞占有核细胞的比例均达到60%以上。所有病例均符合 FAB 诊断标准。取材程序获得研究所伦理委员会批准,并取得受试者或其家属的知情同意。

真核表达载体 pIRES 购自 BD 公司。细胞培养基 RPMI 1640、TRIzol、MML-V 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司,胎牛血清(已灭活)购自中国医学科学院血液学研究所科技公司。细菌培养基中的酵母提取物、胰化蛋白胨购自 Oxoid 公司。定量 real-time PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ Kit 购自 TaKaRa 公司,电转试剂盒 Amaxa Nucleofector 和 Cell Line Nucleofector® Kit 为 Amaxa 公司产品。*mda-7/IL-24*、*IL-24 delE5* siRNA SMART-pool 购自 Dharmacon 公司,TPA 购自 Sigma 公司,ECL 化学发光试剂盒购自 Millipore 公司,预染蛋白 Marker(相对分子质量为 6 500 ~ 175 000)购自 Biolabs 公司。小鼠抗人 CD14/FITC 标记单克隆抗体、小鼠抗人 M-CSFR(CD115)/PE 标记单克隆抗体、小鼠抗人 CD 11b/PE 标记单克隆抗体及相应的同型对照抗体购自 eBioscience 公司,羊抗人 MDA-7(C-16)多克隆抗体和 β-actin 小鼠单抗购自 SANTA CRUZ 公司,辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 均购自中杉金桥公司。

## 1.2 Real-time PCR 检测 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达

*mda-7/IL-24* 上游引物为 5'-AAGTAGAACTC-CAGCAGGGTG-3', 下游引物为 5'-TGGGCTGT-GAAAGACACTA-3'; *IL-24 delE5* 上游引物为 5'-CATTTTCTTGGCTCTCAGCATC-3', 下游引物为 5'-TGGGCTGTGAAAGACACTA-3'; *GAPDH* 上游引物为 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3', 下游引物为 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTTC-3'。以上引物均由北京奥科生物合成, PAGE 纯化。按常规提取细胞总 RNA, 将 1 μg 总 RNA 逆转成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 real-time PCR 检测, 以 *GAPDH* 为内参照基因。

## 1.3 TPA 诱导 HL-60、U937 细胞单核系分化

HL-60、U937 细胞按常规条件培养,加入终浓度 20 nmol/L TPA 诱导向单核系分化,在 12、24、48、72 h 分别收集细胞。同时取对应时间点的只加溶剂 DMSO 的细胞作为对照。

## 1.4 FACS 检测细胞 CD11b、CD14 和 CD115 的表达

收集细胞, PBS 洗 3 遍。100 μl PBS 重悬,加入

相应鼠抗人 FITC 或 PE 标记的 CD11b、CD14、CD115 单抗以及鼠抗人的 IgG1-PE 和 IgM-FITC, 4 °C 孵育 30 min, 以含 0.5% BSA 的 PBS 洗细胞 1 次。重悬细胞于 400 μl PBS 中, 流式细胞仪(Becton Deckinson)测定荧光百分率及荧光强度。

## 1.5 患者骨髓单个核细胞的分离

采用 Ficoll-Hypaque 法分离患者的骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMCs)。患者标本中原始及幼稚细胞比例 >60%。

## 1.6 白血病细胞及原代骨髓单个核细胞瑞氏染色

收集细胞,离心涂片后瑞氏-姬姆萨染色,3 滴瑞氏染液,1 min 后 1 滴姬姆萨染液,迅速用缓冲液稀释后吹匀,30 min 后用自来水将染液冲洗掉,晾干后用 1 000 倍的油镜观察细胞形态。

## 1.7 *mda-7/IL-24*、*IL-24 delE5* 质粒载体转染 U937、HL-60 细胞

电穿孔转染法将 1 μg 质粒<sup>[12]</sup>分别转染 U937、HL-60 细胞系,同时做 GFP 阳性对照。方法参照 Amaxa Biosystems 公司的 Cell Line Nucleofector® Kit V Solution Box 产品说明进行。U937 选 U-014 程序,HL-60 选 T-019 程序,M5 型白血病患者 BMMCs 选 X-001 程序。

## 1.8 Western blotting 检测蛋白的表达

取 1 × 10<sup>7</sup> 细胞用预冷的 PBS 洗 2 次,加 400 μl 细胞裂解液于冰上裂解 30 min,超声破碎 3 次,每次 10 s;于 4 °C 下 5 000 × g 离心 20 min,收集上清,经 10% SDS-PAGE 后转硝酸纤维薄膜;用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温下封闭 2 h,将膜与特异性一抗(鼠抗人 IL-24 单克隆抗体)4 °C 孵育过夜,PBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min;将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 37 °C 孵育 1 h,PBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min。按照 ECL 化学发光试剂盒说明书进行胶片显色。

## 1.9 RNA 干扰 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达

通过电穿孔方法将靶向于 *mda-7/IL-24*、*IL-24 delE5* 的 SMART-pool siRNA 瞬时转染到 U937、HL-60 细胞中,并以 Non-targeting siRNA 作阴性对照。

## 1.10 统计学处理

所有实验均重复 3 次。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS11.0 统计学软件进行处理,采用 ANOVA、*t*-test 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TPA 诱导 U937、HL-60 向单核系分化

TPA 诱导 U937、HL-60 细胞 24 h 后,CD11b、

CD14 和 CD115 的表达开始升高,至 72 h 达到最高 ( $P < 0.01$ )。细胞形态学观察发现,72 h 时细胞明显变大、聚团,有些细胞贴壁并伸出伪足。取细胞甩片,同时取培养 72 h 的仅加 DMSO 溶剂的 U937、HL-60 细胞作为对照,瑞氏-姬姆萨染色发现诱导后的细胞胞体变大,核质比  $< 1$ 。在  $TPA \leq 20$  nmol/L 时,其对细胞的诱导分化呈现剂量依赖效应。因此,选择 20 nmol/L TPA 进行后续实验。

## 2.2 TPA 诱导 U937、HL-60 分化的同时诱导 *mda-7/IL-24* 及其剪接体 *IL-24 delE5* 的表达

Real-time PCR 结果显示,在 TPA 诱导后 24 h, *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* mRNA 表达开始升高,72 h 达到最高(图 1A)。*mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* mRNA 表达可持续 7 d。U937 细胞中 *IL-24 delE5* 的表达量是 *mda-7/IL-24* 的 20%,HL-60 细胞中 *IL-24 delE5* 的表达量是 *mda-7/IL-24* 的 30%。

收集 TPA 诱导 0、48、72 h 的 U937 和 HL-60 细胞,提取细胞总蛋白进行 Western blotting 检测。由于 *mda-7/IL-24* 与其剪接体 *IL-24 delE5* 的 C 末端 16 个氨基酸相同,而一抗 *mda-7/IL-24* (C-16) 多克隆抗体特异性地识别 *mda-7/IL-24* 的 C 末端 16 个氨基酸,因此选用该抗体同时检测 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白条带水平的表达情况。结果如图 1B 所示,与推测的相对分子质量相一致,*mda-7/IL-24* 蛋白条带位于相对分子质量 35 000 处,*IL-24 delE5* 蛋白条带位于相对分子质量 24 000 处;并且随着诱导时间延长,*mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白的表达也随之增加,在 72 h 达最高峰。

## 2.3 干扰 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达可阻断 TPA 诱导 U937 和 HL-60 细胞向单核细胞分化

TPA 诱导 U937、HL-60 细胞表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 于 72 h 达最高峰,且 siRNA 干扰预实验证实 72 h 干扰效果最佳(资料未出示),所以选择 72 h 为观察点。结果如图 2A 所示,预先转染 siRNA 的 U937 和 HL-60 细胞中,TPA 诱导产生 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白量仅为对照组的 20%。

如图 2B 所示,与 Non-targeting siRNA 对照组相比,转染 siRNA 能显著抑制诱导分化剂 TPA 对 U937、HL-60 细胞表面分子 CD11b、CD14、CD115 表达的诱导。

瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态,结果发现,与转染 Non-targeting 对照组相比,转染 siRNA 的 U937、HL-60 细胞虽然加了诱导剂 TPA,但仍然处于原始未分化阶段,表现为核质疏松,有的可见核仁,核质比例较高,胞质深染;而 TPA 可显著诱导转

染 Non-targeting siRNA 的对照组细胞向成熟单核细胞分化,表现为核染色质致密,核仁消失,核质比例降低,胞质淡染,有空泡。

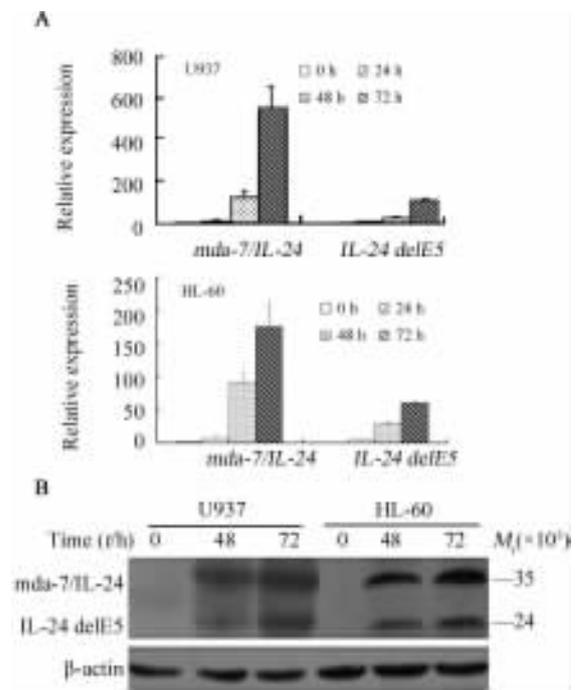


图1 TPA 诱导 U937 和 HL-60 细胞 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达

Fig. 1 TPA induces expressions of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* in U937 and HL-60 cells

A: mRNA level; B: Protein level

## 2.4 电穿孔法转染 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 质粒剂量的确定及转染效率

将前期构建的 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 载体<sup>[11-14]</sup>转染 U937 和 HL-60 细胞,发现在  $\leq 1$   $\mu$ g 的质粒转染时,转染效率及基因表达具有剂量依赖效应,因此选用 1  $\mu$ g 质粒转染量进行后续实验。将 1  $\mu$ g 空 pmax GFP 真核表达载体质粒分别采用电穿孔方法转染到 U937 和 HL-60 细胞中,24 h 后荧光显微镜观察转染效率。结果发现,U937 细胞转染效率约 70%,HL-60 细胞转染效率为 65%。

## 2.5 异位过表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 诱导 U937、HL-60 和原代急性髓系白血病细胞分化

U937 和 HL-60 细胞电穿孔法瞬时转染 *mda-7/IL-24*、*IL-24 delE5* 后 72 h 收集细胞,Western blotting 检测 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白表达情况。如图 3 所示,这两个细胞系中 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白表达量接近。

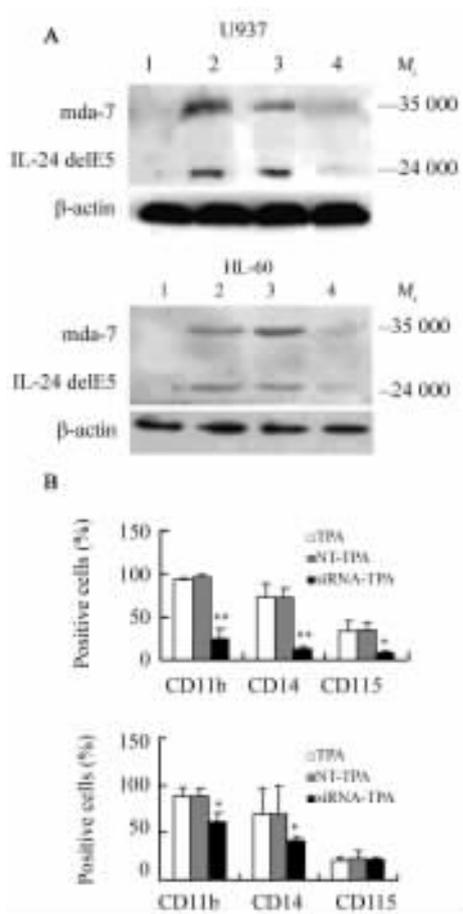


图2 siRNA 干扰 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 表达阻断 TPA 诱导 U937、HL-60 细胞向单核细胞分化  
Fig. 2 siRNA interference of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* expressions blocked TPA-induced monocytic differentiation of U937 and HL-60 cells

A: Expressions of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* protein.  
1: Control; 2: TPA; 3: NT-TPA; 4: siRNA-TPA.  
B: Expressions of monocytic differentiation markers;  
NT: Non-targeting siRNA  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs TPA or NT-TPA

在瞬时转染 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 后 72 h, 采用流式细胞术检测 U937 和 HL-60 细胞的单核细胞表面分子 CD11b、CD14 和 CD115 的表达情况。如图 4 所示, 与转染空载体的细胞相比, 转染 *mda-7/IL-24*、*IL-24 delE5* 细胞表面的 CD11b 和 CD14 的表达显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); U937 细胞表面 CD115 表达也显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但 HL-60 细胞 CD115 表达未见升高。

为进一步研究 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 是否能够同样诱导原代急性髓系白血病患者细胞分化, 从本院选取 3 例 AML-M5 患者分离提取 BMMCs, 结

果如图 5 所示, 转染了 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 质粒的 3 例 AML-M5 患者的原代 BMMCs, 其 CD11b、CD14 和 CD115 的表达均有不同程度的升高。瑞氏-吉姆萨染色显示, 3 例 AML-M5 患者原代 BMMCs 细胞染色质浓缩, 核质比  $< 1$ , 胞核凹陷、偏心, 胞质染色变浅。

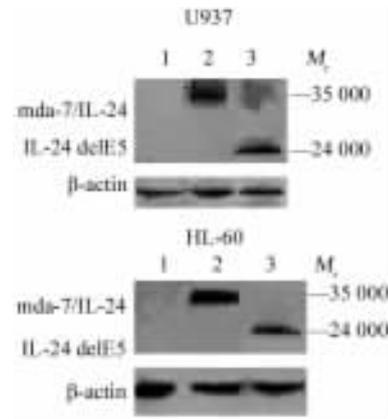


图3 瞬时转染 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 质粒后 U937、HL-60 细胞 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 蛋白的表达  
Fig. 3 *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* protein expressions in U937 and HL-60 cells after *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* plasmids transient transfection  
1: Vector; 2: *mda-7/IL-24*; 3: *IL-24 delE5*

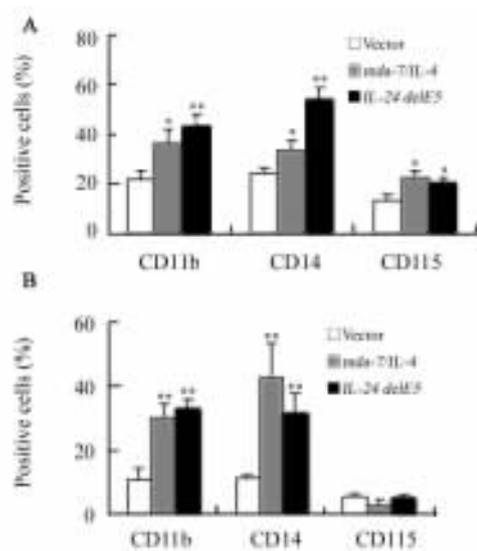


图4 瞬时转染 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 质粒诱导 U937、HL-60 细胞向单核系分化  
Fig. 4 *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* plasmids transient transfection induced monocytic differentiation of U937 and HL-60 cells  
A: U937; B: HL-60  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs vector

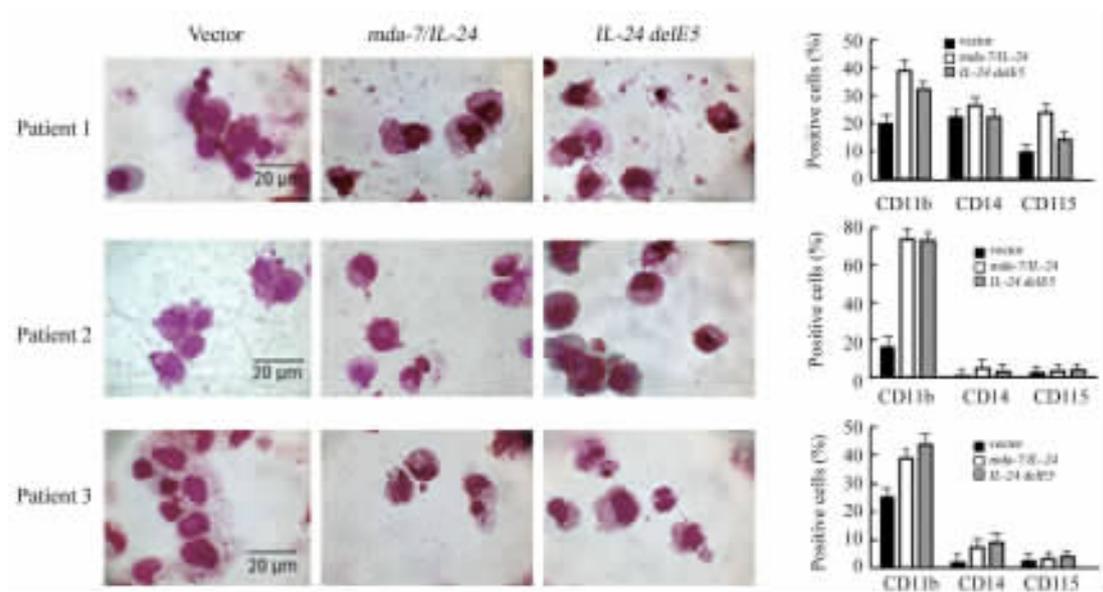


图5 异位过表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 诱导 AML-M5 患者细胞分化  
Fig. 5 Ectopic overexpression of *mda-7/IL-24* and *IL-24 delE5* induced differentiation of leukemia cells from AML-M5 patients

### 3 讨论

鉴定在肿瘤细胞终末分化过程中基因表达的变化,可能从中找到对肿瘤细胞生长和分化起调节作用的基因。在 TPA 诱导 U937 和 HL-60 细胞向单核细胞分化时,检测到 *mda-7/IL-24* 基因及其选择性剪接体 *IL-24 delE5* 的表达。siRNA 干扰 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 基因的表达能显著抑制 TPA 诱导 U937 和 HL-60 向细胞单核细胞分化,表明 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达在 TPA 介导的单核细胞分化过程中发挥重要的作用。TPA 是经典的诱导分化剂,可诱导髓系前体细胞及髓系白血病细胞单核分化,但是其诱导分化的机制目前尚不清楚。本研究结果为揭示 TPA 诱导分化机制提供了线索。但是由于 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 这两个转录本高度同源,无法分别干扰 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* mRNA,故目前尚无法判定 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 在 TPA 诱导分化中各自所起的作用。

为了进一步研究 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 对白血病细胞的作用,用电穿孔转染法使其异位表达于 U937 和 HL-60 细胞,然后观察 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 对 U937 和 HL-60 细胞分化的影响。结果显示,异位过表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 可显著诱导 U937 和 HL-60 细胞分化。此外,*mda-7/*

*IL-24* 和 *IL-24 delE5* 诱导 U937 和 HL-60 分化时,增加了 U937 细胞单核细胞表面分子 CD115 的表达,但 HL-60 细胞表面的 CD115 的表达未见增高,推测这可能是由于细胞系的定向分化依赖于细胞本身所处分化阶段,而不依赖于分化调节因子。

一些分化诱导剂对细胞系的诱导分化效果很好,但对原代白血病细胞的作用却很小<sup>[17]</sup>。本研究证实,*mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 对白血病细胞系 U937 和 HL-60 具有诱导分化作用。为了进一步研究其对原代白血病细胞的作用,选择了 3 例 AML-M5 患者,采用电穿孔转染法将 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 异位表达于这些白血病患者的骨髓单个核细胞。结果显示,异位表达的 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 对 3 例 AML-M5 患者白血病细胞在形态和表面分子水平均有诱导分化效果,提示 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 能够有效诱导 AML-M5 患者白血病细胞分化。

目前已经报道<sup>[18-19]</sup>的 *mda-7/IL-24* 的选择性剪接体有两个,一个缺失外显子 5(命名为 *IL-24 delE5*),一个同时缺失外显子 5 和外显子 3(命名为 *mda-7s*)。 *IL-24 delE5* 与 *mda-7/IL-24* 高度同源,但是缺失了 *IL-10* 家族特征性的基序,在黑素瘤中的表达很低<sup>[20]</sup>,其功能尚无报道。本研究首次发现,在白血病细胞系 U937 和 HL-60 中,TPA 能够诱导

*IL-24 delE5* 以及 *mda-7/IL-24* 全长转录本的表达, 并首次发现 *IL-24 delE5* 具有与 *mda-7/IL-24* 相同的抗白血病作用。本研究没有发现 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 作用之间有显著差异, 提示 *IL-24 delE5* 的功能与 *mda-7/IL-24* 相似。由于 U937 和 HL-60 用 TPA 诱导分化后同时出现 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的表达, 不能排除这两个蛋白同时存在时具有协同作用的可能性。因此, 本课题组还用 pIRES 载体构建了同时表达 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 的质粒, 用不同浓度梯度转染 U937、HL-60 细胞, 发现 *mda-7/IL-24* 和 *IL-24 delE5* 共表达载体较 *mda-7/IL-24* 或 *IL-24 delE5* 质粒诱导白血病细胞分化效果更强, 但没有呈现显著的协同效果(资料未出示)。

总之, TPA 可通过上调表达 *mda-7/IL-24* 及其剪接体 *IL-24 delE5* 诱导白血病细胞向单核细胞分化, 本研究为寻找在诱导白血病分化中起关键作用的基因和揭示白血病单核分化分子机制提供了新线索, 并为设计白血病的分化治疗策略提供实验基础。

#### [ 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 ] Yacoub A, Hamed HA, Allegood J, et al. PERK-dependent regulation of ceramide synthase 6 and thioredoxin play a key role in *mda-7/IL-24*-induced killing of primary human glioblastoma multiforme cells [ J ]. *Cancer Res*, 2010, 70( 3 ): 1120-1129.
- [ 3 ] Germano IM, Emdad L, Qadeer ZA, et al. Embryonic stem cell (ESC)-mediated transgene delivery induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization, and overcomes temozolomide resistance in malignant gliomas [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17( 9 ): 664-674.
- [ 4 ] Dash R, Richards JE, Su ZZ, et al. Mechanism by which Mcl-1 regulates cancer-specific apoptosis triggered by *mda-7/IL-24*, an IL-10-related cytokine [ J ]. *Cancer Res*, 2010, 70( 12 ): 5034-5045.
- [ 5 ] Park MA, Walker T, Martin AP, et al. *mda-7/IL-24*-induced cell killing in malignant renal carcinoma cells occurs by a ceramide/CD95/PERK-dependent mechanism [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8( 5 ): 1280-1291.
- [ 6 ] Sauane M, Su ZZ, Gupta P, et al. Autocrine regulation of *mda-7/IL-24* mediates cancer-specific apoptosis [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105( 28 ): 9763-9768.
- [ 7 ] Zheng M, Bocangel D, Ramesh R, et al. Interleukin-24 overcomes temozolomide resistance and enhances cell death by down-regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma cells [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7( 12 ): 3842-3851.
- [ 8 ] Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, et al. Molecular target-based therapy of pancreatic cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 4 ): 2403-2413.
- [ 9 ] Bhutia SK, Dash R, Das SK, et al. Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24 [ J ]. *Cancer Res*, 2010, 70( 9 ): 3667-3676.
- [ 10 ] Lebedeva IV, Su ZZ, Vozhilla N, et al. Mechanism of *in vitro* pancreatic cancer cell growth inhibition by melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24 and perillyl alcohol [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 18 ): 7439-7447.
- [ 11 ] Gao P, Sun X, Chen X, et al. Secretable chaperone Grp170 enhances therapeutic activity of a novel tumor suppressor, *mda-7/IL-24* [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 10 ): 3890-3898.
- [ 12 ] 王琳, 马小彤, 董成亚, 等. *IL-24 delE5* 对慢性粒细胞白血病细胞系 K562 的抑制作用 [ J ]. *白血病·淋巴瘤*, 2010, 19( 3 ): 129-132.
- [ 13 ] 杨宾霞, 马小彤, 董成亚, 等. 人 *mda-7/IL-24* 对慢性粒细胞白血病细胞系 K562 的抑制作用 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 5 ): 422-427.
- [ 14 ] 段永娟, 马小彤, 董成亚, 等. 人 *mda-7/IL-24* 对淋巴瘤细胞系 Namalwa 的抑制作用 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 5 ): 417-422.
- [ 15 ] 邵伟峰, 马小彤, 张芳, 等. *IL-24/mda-7* 抑制 K562 细胞生长的机制 [ J ]. *白血病·淋巴瘤*, 2010, 19( 3 ): 133-135.
- [ 16 ] Madireddi MT, Dent P, Fisher PB. AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to *mda-7* gene promoter activity during human melanoma differentiation [ J ]. *J Cell Physiol*, 2000, 185( 1 ): 36-46.
- [ 17 ] Scott LM, Civin CI, Rorth P, et al. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells [ J ]. *Blood*, 1992, 80( 7 ): 1725-1735.
- [ 18 ] Allen M, Pratscher B, Roka F, et al. Loss of novel *mda-7* splice variant (*mda-7s*) expression is associated with metastatic melanoma [ J ]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123( 3 ): 583-588.
- [ 19 ] Sahoo A, Jung YM, Kwon HK, et al. A novel splicing variant of mouse interleukin (IL)-24 antagonizes IL-24-induced apoptosis [ J ]. *J Biol Chem*, 2008, 283( 43 ): 28860-28872.
- [ 20 ] Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, et al. *mda-7* (IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99( 15 ): 10054-10059.

[ 收稿日期 ] 2011-04-10

[ 修回日期 ] 2011-05-15

[ 本文编辑 ] 韩丹