

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.007

· 基础研究 ·

## MDA-7/IL-24 基因与化疗药物联合应用对食管癌细胞产生协同抑制作用

吴雅琼<sup>1</sup>, 张明增<sup>2</sup>, 刘北辰<sup>2</sup>, 周凤灵<sup>2</sup>, 高玉环<sup>2Δ</sup>, 马光宇<sup>2</sup>(1. 河北医科大学第四医院 心血管内科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院东院区 血液内科, 河北 石家庄 050035)

**[摘要]** **目的:**探讨人黑素瘤分化相关基因7(melanoma differentiation-associated gene-7, MDA-7)/白介素-24(IL-24)基因对食管癌细胞的抑制作用及其与化疗药物的协同抗癌作用。**方法:**RT-PCR法检测人食管癌细胞株 TE-11 和 YES-5 中 MDA-7/IL-24 受体 IL-20R1、IL-20R2 和 IL-22R1 的表达水平。用携带 MDA-7/IL-24 基因的重组人复制缺陷腺病毒 Ad-MDA-7 感染 TE-11 和 YES-5 细胞, Ad-LacZ 为对照腺病毒, 人成纤维细胞株 OUMS-24 为对照细胞。MTT 法检测感染细胞抑制率, Western blotting 法检测感染前后细胞中的 MDA-7 水平。化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂(CDDP)、丝裂霉素(MMC)和足叶乙甙(VP-16)分别与 Ad-MDA-7 联合作用于食管癌细胞株, MTT 法检测单独或联合应用对食管癌细胞的抑制作用, 流式细胞术检测 Ad-MDA-7 与化疗药单独或联合应用后食管癌细胞周期的变化, Western blotting 检测 Ad-MDA-7 与化疗药联合作用后细胞凋亡和增殖的相关分子的变化。**结果:**TE-11 和 YES-5 细胞均表达 3 种 IL-24 受体。Ad-MDA-7 感染后, 两种食管癌细胞中均有 MDA-7 蛋白表达, 同时细胞均被剂量依赖性地抑制生长, Ad-MDA-7 达  $3 \times 10^4$  VP/细胞时 TE-11 细胞抑制率超过 80%、YES-5 细胞超过 50%; 同剂量 Ad-LacZ 对细胞无抑制作用, 成纤维细胞 OUMS-24 被 Ad-MDA-7 感染后没有发生明显细胞抑制。Ad-MDA-7 分别与 5-FU、CDDP、MMC 和 VP-16 联合应用后, 与单独应用相比产生了更强的抗肿瘤协同效应。Ad-MDA-7 与 5-FU 联合应用诱导细胞更多停滞在 S 和 G<sub>2</sub>/M 期, subG<sub>1</sub> 期细胞比例明显增加。与单用 5-FU 相比, 联合应用时 Ad-MDA-7 诱导了更多的细胞凋亡相关蛋白 cleaved caspase-8、-9、-3 的表达, 增加了 Akt 的磷酸化, 但降低了 IκB-α 的表达水平。**结论:**MDA-7/IL-24 与化疗药联合应用于食管癌细胞, 产生了更强的抗肿瘤协同效应, 为临床化疗和基因治疗的联合应用提供新选择。

**[关键词]** 食管癌; 腺病毒; MDA-7; IL-24; 基因治疗; 化学治疗

**[中图分类号]** R735.1; R730.54; R730.53

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0275-07

## Enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic agents in combination with adenoviruses expressing MDA-7/IL-24 to esophageal carcinoma cells *in vitro*

Wu Yaqiong<sup>1</sup>, Zhang Mingzeng<sup>2</sup>, Liu Beichen<sup>2</sup>, Zhou Fengling<sup>2</sup>, Gao Yuhuan<sup>2Δ</sup>, Ma Guangyu<sup>2</sup>(1. Department of Cardiovascular Medicine, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Hematology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the synergic antitumor effects of chemotherapeutic agents and melanoma differentiation-associated gene-7-expressing adenoviruses (Ad-MDA-7) in esophageal carcinoma cells *in vitro*. **Methods:** Human esophageal carcinoma TE-11 and YES-5 cells and human fibroblasts (control) underwent Ad-MDA-7 infection and chemotherapy, either each alone or in combination. Changes in mRNA levels of the IL-24 receptor complexes before and after treatment were assessed by RT-PCR. Cell viability was determined by MTT assays. Cell cycle progression was analyzed by flow cytometry. **Results:** Transcripts for IL-24 receptor complex components, IL-20R2, IL-20R1 and IL-22R1, were detected in both TE-11 and YES-5 cells but only IL-20R2 mRNA was detected in fibroblasts. TE-11 and YES-5 cells were susceptible to Ad-MDA-7-mediated cytotoxicity in a dose-dependent manner; at  $3 \times 10^4$  VP/cell, cytotoxicity was

**[基金项目]** 河北省医学科学研究重点课题计划(No. 20120125, No. 20120128). Project supported by the Medical Scientific Research Key Plan of Hebei Province(No. 20120125, No. 20120128)

**[作者简介]** 吴雅琼(1979 - ), 女, 四川省宜宾市人, 博士, 主治医师, 主要研究方向为胸部内科疾病的诊治。E-mail: 657567436@qq.com

**[通信作者]** 马光宇(Ma Guangyu, corresponding author), E-mail: guangyuma@foxmail.com; 高玉环(Gao Yuhuan, co-corresponding author), E-mail: ydsygao@sina.com。Δ为共同通信作者。

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.007.html>

>80% and >50%, respectively, in TE-11 and YES 5 cells. In contrast, fibroblasts were resistant to Ad-mad-7. The cytotoxicity of 5-fluorouracil, cisplatin, mitomycin C or etoposide, each in combination with Ad-MDA-7 infection was significantly higher than that of these therapeutic agents and Ad-MDA-7, each alone. Increases in G<sub>2</sub>/M-phase and S-phase arrests were observed in cells, respectively, infected with Ad-MDA-7 and treated with 5-FU. The combination of Ad-mad-7 and 5-FU augmented sub-G1 populations. Compared with 5-FU alone, the combination regimen resulted in increases in caspase-8, -9, -3 expression and Akt phosphorylation and a decrease in I $\kappa$ B- $\alpha$  level. **Conclusion:** These data collectively suggest that adenovirus delivery of melanoma differentiation-associated gene-7 may enhance the sensitivity of esophageal carcinoma cells to chemotherapeutic agents through Akt activation.

[ **Key words** ] esophageal carcinoma; adenovirus; MDA-7; IL-24; gene therapy; chemotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 275-281 ]

食管癌好发于老年人,虽然外科手术仍是一线治疗方案,但往往会降低患者的生活质量。对于不能手术的晚期食管癌患者,化疗和放疗是首选治疗,但预后和生活质量仍有待进一步改善<sup>[1]</sup>。基因疗法是一种新的治疗方法,通过在肿瘤细胞中表达某种基因,产生针对肿瘤的细胞毒性。腺病毒(Ad)介导的基因疗法目前已应用于临床,其诱导食管癌凋亡是一种可能的治疗策略<sup>[2,3]</sup>。

表达人黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation-associated gene-7, MDA-7)能诱导细胞死亡,介导MDA-7基因的腺病毒Ad-MDA-7的抗肿瘤作用已在多种人类肿瘤中被阐明,其抗肿瘤机制包括诱导凋亡、自噬、抗血管生成和刺激免疫应答等<sup>[4-7]</sup>。然而,其抗肿瘤作用在食管癌中尚未得到很好研究。MDA-7与IL-20R1/IL-20R2或IL-22R1/IL-20R2组成的IL-24受体复合体结合并激活下游的信号通路是诱导细胞毒性的重要环节<sup>[8,9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>也发现,Ad-MDA-7对某些类型的肿瘤,如胰腺癌的抗肿瘤效果差强人意,但其机制仍然未知。因此,与化疗药物联合应用可能是克服肿瘤细胞对Ad-MDA-7耐药的方法之一,反之,也可使肿瘤细胞对化疗药物更敏感。本研究探讨了在食管癌细胞中Ad-MDA-7与四种化疗药物联合应用时,产生的协同作用,为其临床应用提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和试剂

人食管癌细胞株TE-11、YES-5和成纤维细胞株OUMS-24均购自美国ATCC细胞库,均使用10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养。抗癌药物5-FU、顺铂(CDDP)、丝裂霉素(MMC)均购自日本Wako公司,足叶乙甙(VP-16)购自美国Sigma公司,以上4种药物均被溶化在二甲基亚砜或磷酸盐缓冲液中使用。Adeno-X表达体系购自日本Takara

公司,Adeno-X病毒纯化试剂盒购自美国BD公司;进行MTT检测的WST试剂盒购自日本Wako公司;Superscript III逆转录试剂购自美国Invitrogen公司;ECL蛋白质印记检测系统购自英国GE公司;半胱氨酸蛋白酶-3、水解的半胱氨酸蛋白酶-3、半胱氨酸蛋白酶-8、水解的半胱氨酸蛋白酶-8、半胱氨酸蛋白酶-9、水解的半胱氨酸蛋白酶-9、Akt、磷酸化的Akt、I $\kappa$ B- $\alpha$ 抗体购自美国Cell Signaling公司;MDA-7抗体购自美国Santa Cruz Biotech公司;3-磷酸甘油醛脱氢酶抗体购自英国abcam公司。FACSCalibur流式细胞仪及其配套试剂和CellQuest软件购自美国BD公司。

### 1.2 重组腺病毒的制备和对食管癌细胞的感染

复制缺陷的Ad-MDA-7和Ad-LacZ使用Adeno-X表达体系制备,并使用Adeno-X病毒纯化试剂盒进行纯化。这些腺病毒使用相同的CMV启动子激活各自的基因。重组腺病毒粒子浓度(VP/ml)定义为:溶解在0.1%十二烷基硫酸钠中纯化后的重组腺病毒,在260 nm下测定的光密度(D)值 $\times 1.1 \times 10^{12}$ 。腺病毒感染食管癌细胞时,按照每孔的细胞数计算腺病毒稀释倍数,并用细胞培养基稀释腺病毒至目的浓度(VP/cell)。使用含有腺病毒的培养基替换细胞原培养基,并置于细胞培养箱中孵育,使腺病毒充分感染食管癌细胞。

### 1.3 RT-PCR检测肿瘤细胞IL-24受体mRNA的表达

使用赛百盛总RNA提纯试剂盒从两种食管癌细胞株TE-11、YES-5和成纤维细胞株OUMS-24中提取总RNA,各取1  $\mu$ g总RNA,使用Superscript III逆转录试剂合成第一链cDNA。等量的cDNA通过PCR扩增目的基因,目的基因特异性引物和扩增条件见表1。按RT-PCR试剂盒说明书操作,检测食管癌细胞中IL-20R1、IL-20R2、IL-22R1 mRNA的表达。

表 1 IL-24 受体 RT-PCR 特异性引物和扩增条件  
Tab. 1 IL-24 receptors specific primers and RT-PCR conditions

Target gene	Primer sequence	Amplification conditions
IL-20R1	F:5'-TCAAACAGAACGTGGTCCCAGTG-3'	94 °C, 30 s
	R:5'-TCCGAGATATTGAGGGTGATAAAG-3'	62 °C, 30 s, 35 cycle
IL-20R2	F:5'-GCTGGTGCTCACTCACTGAAGGT-3'	94 °C, 30 s
	R:5'-TCTGTCTGGCTGAAGGCGCTGTA-3'	64 °C, 30 s, 35 cycle
IL-22R1	F:5'-CCCCAGACACGGTCTACAGCAT-3'	94 °C, 15 s
	R:5'-GGGTCAGGCCGAAGAAGTCTATAT-3'	58 °C, 30 s, 35 cycle
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	94 °C, 15 s
	R:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	60 °C, 15 s, 32 cycle

#### 1.4 MTT 法检测 Ad-MDA-7 和化疗药物对肿瘤细胞的抑制作用

实验共设 5 组,包括未处理组、Ad-LacZ (10 000 VP/cell)处理组、Ad-MDA-7 (10 000 VP/cell)处理组、化疗药(5-FU, 0.625  $\mu\text{mol/L}$ ; CDDP, 3  $\mu\text{mol/L}$ ; MMC, 0.625  $\text{mol/L}$ ; VP-16, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ )处理组、Ad-MDA-7(10 000 VP/cell)联合化疗药(5-FU, 0.625  $\mu\text{mol/L}$ ; CDDP, 3  $\mu\text{mol/L}$ ; MMC, 0.625  $\mu\text{mol/L}$ ; VP-16, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ )处理组。细胞以  $5 \times 10^3$ /孔的浓度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,使用含有腺病毒和/或化疗药的培养基替换原培养基。用不同量的腺病毒(VP/cell)和(或)各种浓度的化疗药物处理 5 d 后,在每个培养孔中加入 10  $\mu\text{l}$  购自日本同仁化学研究所的 WST-8 试剂,4 h 后,使用 Biotec 酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的光密度(D),未经过任何处理组的 D 作为 100% 细胞存活,计算出各组的细胞生存率。

#### 1.5 流式细胞术检测 Ad-MDA-7 联合化疗药对细胞周期的影响

细胞经过 Ad-MDA-7 和/或 5-FU 处理后,被固定在 70% 冰冷的乙醇中,与核糖核酸酶(50  $\mu\text{g/ml}$ )共同孵化,然后用碘化丙啶(50  $\mu\text{g/ml}$ )染色。使用 FACSCalibur 进行检测,结果使用 Cell Quest 软件进行分析,未经任何处理的细胞周期作为对照。

#### 1.6 Western blotting 检测肿瘤细胞中 MDA-7 表达及其下游信号通路

将 Ad-MDA-7 和/或 5-FU 处理过的细胞裂解,裂解物在钠十二烷基硫酸盐聚丙烯酰胺凝胶中电泳。蛋白质被转移到尼龙滤膜上,与 caspase-3、水解的 caspase-3、caspase-8、caspase-8、caspase-9、水解的 caspase-9, Akt、磷酸化的 Akt、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、MDA-7、

3-磷酸甘油醛脱氢酶抗体进行杂交。杂交后的尼龙膜使用 ECL 系统进行显像。

#### 1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 *t* 检验或方差检验进行组间比较,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 食管癌细胞中有 MDA-7/IL-24 受体 mRNA 的表达

RT-PCR 检测 2 种人食管癌细胞和成纤维细胞中的 MDA-7/IL-24 受体 mRNA 的表达情况(图 1),结果显示,所有食管癌细胞中均有 IL-20R1、IL-20R2 和 IL-22R1 mRNA 的表达,成纤维细胞仅表达 IL-20R2 基因。

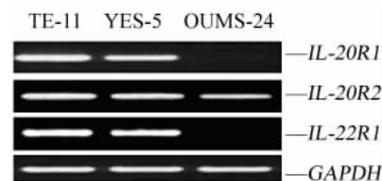


图 1 食管癌细胞表达 MDA-7/IL-24 受体 mRNA  
Fig. 1 Esophageal carcinoma expresses the MDA-7/IL-24R mRNA

#### 2.2 Ad-MDA-7 感染后的食管癌细胞产生 MDA-7 蛋白

Western blotting 法检测两种食管癌细胞被 Ad-MDA-7 感染前后 MDA-7 蛋白的表达,结果(图 2)显示,被 Ad-MDA-7 感染后的食管癌细胞产生了 MDA-7 蛋白,而未被感染的细胞检测不到 MDA-7 的表

达。结果表明,食管癌细胞被 Ad-MDA-7 感染后成功导入 MDA-7 基因,且表达 MDA-7 蛋白。

### 2.3 Ad-MDA-7 对食管癌细胞具有剂量依赖的抑制作用

不同浓度 Ad-MDA-7 对食管癌细胞的细胞毒性检测结果(图 3)显示,Ad-MDA-7 对食管癌细胞产生了剂量依赖的抑制作用,但阴性对照 Ad-LacZ 缺乏对肿瘤细胞的抑制作用。OUMS-24 成纤维细胞由于不表达 MDA-7 受体,因此对 Ad-MDA-7 不敏感。

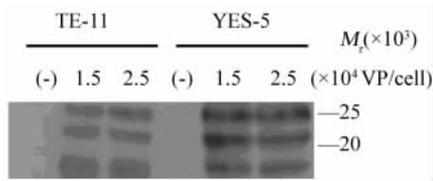


图 2 Ad-MDA-7 感染后的食管癌细胞中表达 MDA-7 蛋白  
Fig. 2 Expression of MDA-7 in Ad-MDA-7-infected esophageal cancer cells

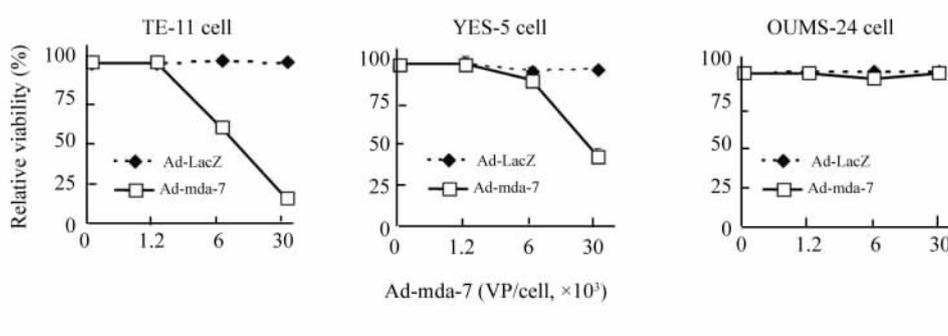


图 3 Ad-MDA-7 对食管癌细胞的细胞毒性  
Fig. 3 Cytotoxic activities of Ad-MDA-7 in esophageal carcinoma cells

### 2.4 Ad-MDA-7 与化疗药物联合应用产生协同抗食管癌细胞的作用

进一步检测由 Ad-MDA-7 和化疗药(5-FU、CDDP、MMC、VP-16)联合处理产生的细胞毒性,结果(图 4)显示,与 Ad-MDA-7、5-FU 单独应用比,联合用药时 TE-11 细胞存活率显著降低[(34.6 ± 0.8)% vs (48.8 ± 2.8)%、(61.8 ± 2.9)% ,  $P < 0.05$ ];联合用药时 YES-5 细胞存活率显著降低[(72.3 ± 3.7)% vs (90.3 ± 2.4)%、(95.1 ± 1.6)% ,  $P < 0.05$ , 图 4A];与 Ad-MDA-7、CDDP 单独应用比,联合用药时 TE-11 细胞存活率显著降低[(51.8 ± 2.6)% vs (59.5 ± 1.8)%、(91.5 ± 2.9)% ,  $P < 0.05$ ];联合用药时 YES-5 细胞存活率显著降低[(62.2 ± 3.2)% vs (84.6 ± 1.4)%、(85.1 ± 3.5)% ,  $P < 0.05$ , (图 4B)];与 Ad-MDA-7、MMC 单独应用比,联合用药时 TE-11 细胞存活率显著降低[(28.7 ± 0.7)% vs (43.0 ± 2.3)%、(36.6 ± 0.4)% ,  $P < 0.05$ ];联合用药时 YES-5 细胞存活率显著降低[(20.0 ± 0.6)% vs (81.8 ± 9.3)%、(59.5 ± 1.5)% ,  $P < 0.05$ , 图 4C];与 Ad-MDA-7、VP-16 单独应用比,联合用药时 TE-11 细胞

存活率为[(32.3 ± 1.6)% vs (59.5 ± 1.8)%、(60.1 ± 2.8)% ,  $P < 0.05$ ];联合用药时 YES-5 细胞存活率显著降低[(54.1 ± 1.5)% vs (90.3 ± 2.4)%、(98.7 ± 2.0)% ,  $P < 0.05$ , 图 4D]。结果显示,联合应用对食管癌细胞均产生了更强的细胞毒性,提示 Ad-MDA-7 增强了化疗药的细胞毒性,产生了比单一疗法更强的抗肿瘤作用。

### 2.5 Ad-MDA-7 和(或)5-FU 处理对食管癌细胞周期和凋亡的影响

观察 Ad-MDA-7 和(或)5-FU 处理对 TE-11 细胞周期变化的影响,结果(图 5)显示,各组处理 2 d 后已有变化,3 d 后的结果变化更为显著。Ad-MDA-7 单独处理 3 d,  $G_2/M$  期、sub  $G_1$  期细胞比例增加[38.6% vs 16.7%、5.6% vs 2.3% , 均  $P < 0.05$ ]。5-FU 单独处理 3 d, S 期、sub  $G_1$  期细胞比例增加[54.9% vs 15.9%、7.6% vs 2.3% , 均  $P < 0.05$ ]。Ad-MDA-7 和 5-FU 联合应用进一步增加 TE-11 细胞的 sub  $G_1$  期比例[11.0% vs 5.6%、7.6% ,  $P < 0.05$ ] , 说明两者联合处理比单独处理增加了食管癌细胞的凋亡,并加强了细胞在  $G_2/M$  期的阻滞。

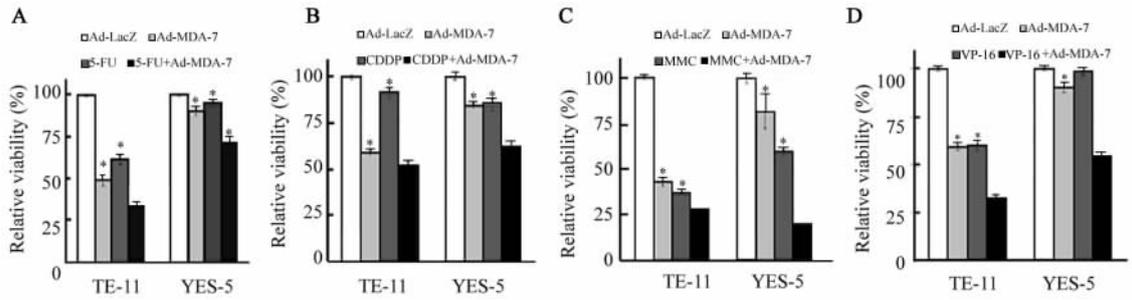


图 4 Ad-MDA-7 与化疗药联合应用产生协同抗食管癌细胞的作用

Fig. 4 Ad-MDA-7 combined with chemotherapeutic drugs produce effective resistance to esophageal cancer cells

A: Ad-MDA-7 or Ad-LacZ 10 000 VP/cell, 5-FU 0.625  $\mu\text{mol/L}$ ; B: Ad-MDA-7 or Ad-LacZ 10 000 VP/cell, CDDP 3  $\mu\text{mol/L}$ ; C: Ad-MDA-7 or Ad-LacZ 10 000 VP/cell, MMC 0.625  $\mu\text{mol/L}$ ; D: Ad-MDA-7 or Ad-LacZ 10 000 VP/cell, VP-16 2.5  $\mu\text{mol/L}$  \*  $P < 0.05$  vs combination

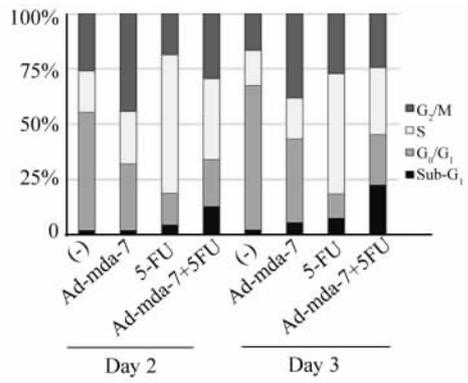


图 5 Ad-MDA-7 和 (或)5-FU 处理后食管癌细胞 TE-11 的细胞周期变化

Fig. 5 Cell cycle changes in Esophageal carcinoma cell TE-11 after treatment with Ad-MDA-7 ( 10 000 VP/cell ) and/or 5-FU ( 0.625  $\mu\text{mol/L}$  )

2.6 Ad-MDA-7 与 5-FU 联合处理后食管癌 TE-11 细胞中相关分子的蛋白水平

Western blotting 检测 TE-11 细胞中与细胞死亡和细胞生存相关分子蛋白的水平,结果显示(图 6)。Ad-MDA-7 单独感染 TE-11 细胞增加了凋亡相关分子 cleaved caspase-8、-9、-3 的表达;诱导了 Akt 的磷酸化,但抑制了 I $\kappa$ B- $\alpha$  的产生。与未处理的细胞相比,TE-11 细胞经过 5-FU 单独处理后凋亡相关蛋白 cleaved caspase-8、-9 均有升高,cleaved caspase-3 轻微升高;Akt 磷酸化略有上升;抑制了 I $\kappa$ B- $\alpha$  的产生。当 Ad-MDA-7 与 5-FU 联合应用于 TE-11 细胞时,凋亡相关蛋白的表达水平较单独应用 5-FU 明显增加,与细胞增殖相关的信号通路中,增加了 AKT

的磷酸化以及 I $\kappa$ B- $\alpha$  的抑制。另一方面,凋亡蛋白的表达与单独应用 Ad-MDA-7 时没有显著差异,Akt 的磷酸化水平比单独应用 Ad-MDA-7 时略有降低,但 I $\kappa$ B- $\alpha$  的抑制没有差异。

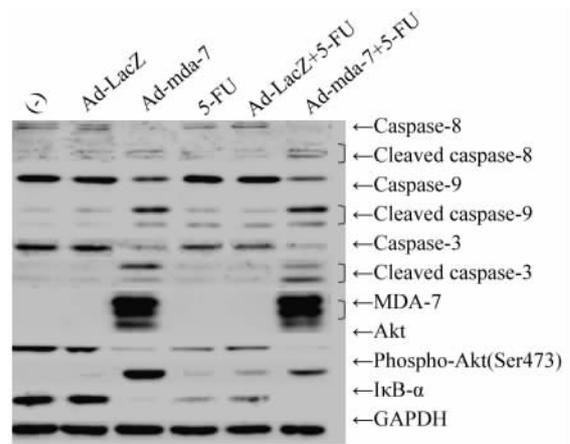


图 6 Ad-MDA-7 和 (或)5-FU 对 TE-11 细胞凋亡信号通路的影响

Fig. 6 Effects of Ad-MDA-7 and/or 5 - FU on TE-11 cell apoptosis signal pathways Ad-MDA-7: 10 000 VP/cell; 5-FU:10  $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

本研究探讨了 Ad-MDA-7 对人食管癌细胞的抗肿瘤作用及与化疗药物联合应用时产生的协同效应。针对 IL-24 受体复合体的 PCR 实验证明食管癌细胞中高表达 IL-24 受体,而在成纤维细胞中却并不表达。Western blotting 实验确认了 Ad-MDA-7 感染肿瘤细胞后,在细胞内成功产生 MDA-7 蛋白。该

蛋白对其他肿瘤细胞的抗肿瘤作用也已经得到证实<sup>[4]</sup>。细胞毒性试验显示 Ad-MDA-7 对所有的食管癌细胞均有细胞毒性, 但却对正常的成纤维细胞没有毒性作用, 这种肿瘤特异性的细胞毒性可能与成纤维细胞不表达 IL-24 受体有关, 但其确切的机制仍然不清。Kreis 等<sup>[11]</sup>阐明了重组 MDA-7 蛋白在黑素瘤细胞中并不能诱导细胞凋亡。本课题组前期实验结果也证实重组 MDA-7 蛋白对在本实验中使用的食管癌细胞不具有细胞毒性(结果未显示)。但也有研究<sup>[12]</sup>认为 MDA-7 蛋白与细胞表面的 IL-24 受体复合体结合后产生抗肿瘤活性。MDA-7 蛋白的生物学作用和具体作用机制仍然没有被完全揭示, 在不同种类的肿瘤中多种因素参与了其抗肿瘤机制。细胞周期分析显示, Ad-MDA-7 感染增加了细胞的 G<sub>2</sub>/M 期和 sub G<sub>1</sub> 期的停滞, 而且本研究观察到 Ad-MDA-7 感染的细胞中 cleaved caspase-8 和-9 升高, 说明 Ad-MDA-7 通过外在和内在的通路诱导细胞凋亡。相对于单独应用 Ad-MDA-7 和化疗药物, 两者的联合应用对食管癌细胞产生了更强的细胞毒性。由于 Ad-MDA-7 并没有化疗药物的全身的血液学毒性, 因此不会增加化疗药物的毒性作用, 但在治疗作用方面两者联合能够得到更好的治疗效果。

Ad-MDA-7 相关的抗肿瘤机制多种多样, 而且与细胞类型紧密相关, 诱导凋亡和细胞自噬作用均被认为是抗肿瘤机制之一<sup>[5]</sup>。本研究结果表明, Ad-MDA-7 诱导了 cleaved caspase-3、-8、-9, 说明食管癌中诱导凋亡是 Ad-MDA-7 介导的细胞死亡的主要途径。与之相反, 促进细胞增殖的信号, 包括 Akt 磷酸化的增加和 I $\kappa$ B- $\alpha$  的抑制也在 Ad-MDA-7 处理后被检测到。Akt 信号激活往往与细胞周期进程相关联, 而 I $\kappa$ B- $\alpha$  的抑制, 则会激活 NF- $\kappa$ B 信号, 并诱导细胞增殖。这种看似矛盾的结果可能是由于食管癌细胞抵御死亡信号而产生的反馈机制。与本研究结果相反, 之前的一些研究认为 Ad-MDA-7 会下调 Akt 信号通路<sup>[13-15]</sup>。不过, Pataer 等研究<sup>[16]</sup>证明 Ad-MDA-7 上调了 Akt 的磷酸化水平, 但是下调了总 Akt 信号, 这与本研究的结果一致。有研究<sup>[17]</sup>显示, 肿瘤细胞对 Ad-MDA-7 的敏感性与其本身的 p53 基因型没有关系, Ad-MDA-7 也不会影响细胞内 p53 蛋白的产生。与之相反, Kawabe 等<sup>[18]</sup>的研究证明 Ad-MDA-7 能够上调肿瘤细胞内 p53 蛋白的产生, 但 Ad-MDA-7 相关的细胞毒性与 p53 基因型无关。这些信号通路方面结果的不一致, 说明在不同的细胞中 Ad-MDA-7 激活了不同的信号通路。

本研究使用了 4 种化疗药物与 Ad-MDA-7 联合应用于食管癌细胞, 虽然 4 种化疗药的作用机制并不相同, 但与 Ad-MDA-7 联合应用时都产生了抗肿瘤的协同作用。一项在晚期实体瘤中应用 Ad-MDA-7 的临床试验<sup>[19]</sup>证明 Ad-MDA-7 的临床应用是安全的。而其他报道<sup>[20-21]</sup>也分别在乳腺癌和肝癌中证明了 Ad-MDA-7 和化疗药物联合应用于体内的恶性肿瘤产生了更强的抗肿瘤协同作用。这些结果与本研究结果一起证明了 Ad-MDA-7 与化疗药物联合应用在临床治疗食管癌的可行性, 为其可能的临床应用提供了理论和实验基础。

## [参考文献]

- [1] Siersema PD, van Hillegersberg R. Treatment of locally advanced esophageal cancer with surgery and chemoradiation [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(4): 535-540.
- [2] Ma G, Kawamura K, Li Q, et al. Cytotoxicity of adenoviruses expressing the wild-type p53 gene to esophageal carcinoma cells is linked with the CAR expression level and indirectly with the endogenous p53 status [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(11): 832-840.
- [3] Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(6): 554-561.
- [4] Dent P, Yacoub A, Hamed HA, et al. MDA-7/IL-24 as a cancer therapeutic: From bench to bedside [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(8): 725-731.
- [5] EMDAd L, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of MDA-7/IL-24 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(5): 391-400.
- [6] 刘新建, 徐萍, 钱其军, 等. MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的制备及其对肿瘤细胞凋亡的诱导作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(4): 386-391.
- [7] 姚兴荣, 马小彤, 杨宾霞, 等. MDA-7/IL-24 和 MDA-7/IL-24 delE5 诱导急性髓系白血病细胞向单核细胞分化 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(3): 244-250.
- [8] 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.
- [9] Pataer A, Hu W, Xiaolin L, et al. Adenoviral endoplasmic reticulum-targeted MDA-7/interleukin-24 vector enhances human cancer cell killing [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(8): 2528-2535.
- [10] 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.
- [11] Kreis S, Philippidou D, Margue C, et al. Recombinant interleukin-24 lacks apoptosis-inducing properties in melanoma cells [J].

- PLoS ONE, 2007, 2( 12 ): e1300.
- [ 12 ] Su Z, EMDAd L, Sauane M, Lebedeva IV et al. Unique aspects of MDA7/IL24 antitumor bystander activity: Establishing a role for secretion of MDA7/IL24 protein by normal cells [ J ]. *Oncogene*, 2005, 24( 51 ): 7552-7566.
- [ 13 ] Valero V 3rd, Wingate H, Chada S, et al. MDA-7 results in downregulation of AKT concomitant with apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18( 7 ): 510-519.
- [ 14 ] Mhashilkar AM, Stewart AL, Sieger K, et al. MDA-7 negatively regulates the beta-catenin and PI3K signaling pathways in breast and lung tumor cells [ J ]. *Mol Ther*, 2003, 8( 2 ): 207-219.
- [ 15 ] Bocangel D, Zheng M, Mhashilkar A et al. Combinatorial synergy induced by adenoviral-mediated MDA-7 and Herceptin in Her-2<sup>+</sup> breast cancer cells [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13( 10 ): 958-968.
- [ 16 ] Pataer A, Bocangel D, Chada S et al. Enhancement of adenoviral MDA-7-mediated cell killing in human lung cancer cells by geldanamycin and its 17-allylamino-17-demethoxy analogue [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14( 1 ): 12-18.
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] Kawabe S, Nishikawa T, Munshi A, et al. Adenovirus-mediated MDA-7 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells via TP53-independent mechanisms [ J ]. *Mol Ther*, 2002, 6( 5 ): 637-644.
- [ 19 ] Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, et al. Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of MDA-7 ( IL24; INGN 241 ) in patients with advanced carcinoma: A phase I study [ J ]. *Mol Ther*, 2005, 11( 1 ): 149-159.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] Wang CJ, Zhang H, Chen K, et al. Ad. MDA-7 ( IL-24 ) selectively induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines, suppresses metastasis, and enhances the effect of doxorubicin on xenograft tumors [ J ]. *Oncol Res*, 2010, 18( 11/12 ): 561-574.
- [ 收稿日期 ] 2014 - 01 - 30      [ 修回日期 ] 2014 - 04 - 15  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 常见参考文献著录格式示例

### 1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 其他责任者( 例如翻译者 ). 版本项( 1 版不著录 ). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [ 1 ] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [ M ]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

### 2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[ 文献类型标志 ]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [ 1 ] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [ M ]//Soderman WA Jr, Sodeman WA. Pathologic physiology: Mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

### 3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 刊名, 出版年, 卷号( 期号 ): 起页-止页.

- [ 1 ] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282( 29 ): 21370-21381.

### 4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[ 文献类型标志 ]. 公告日期或公开日期.

- [ 1 ] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞( PIK )、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [ P ]. 2010-10-14.

### 5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [ 1 ] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [ D ]. 郑州, 郑州大学, 2007.

### 6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志/文献载体标志 ]. 刊名, 出版年, 卷号( 期号 ): 起页-止页( 更新或修改日期 ) [ 引用日期 ]. 获取和访问路径.

- [ 1 ] Christine M. Plant physiology: Plant biology in the genome era [ J/OL ]. *Science*, 1998, 281: 331-332 [ 1998-09-23 ]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [ 2 ] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [ EB/OL ]. [ 1999-12-08 ]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.