

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)06-0512-03

## 人白介素 24 基因诱导人宫颈癌 Ca Ski 细胞凋亡的实验研究

石 华, 成海恩, 张 溢, 郭风劲, 易发平, 马永平, 宋方洲

(重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

## Apoptosis induction of human cervical cancer Ca Ski cells by hIL-24 gene

SHI Hua, CHENG Hai-En, ZHANG Yi, GUO Feng-Jin, Yi Fa-Ping, MA Yong-Ping, SONG Fang-Zhou

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing 400016, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the hIL-24 gene inducing apoptosis of human cervical cancer Ca Ski cells and its possible mechanism. **METHODS:** Ca Ski cells were transfected with hIL-24 eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-hIL-24 by lipofectamine2000. The effect of hIL-24 on the transcription of HPV E6 gene was analyzed by RT-PCR. The effect of hIL-24 on P53 protein was analyzed by Western Blot. Apoptosis of Ca Ski cells induced by hIL-24 gene was analyzed by FACS. **RESULTS:** Transcription level of HPV E6 gene decreased significantly, the amount of P53 protein increased significantly and the apoptosis rate of Ca Ski cells increased significantly after hIL-24 transfection. **CONCLUSION:** hIL-24 gene can inhibit the transcription of HPV E6 gene, recover the activity of P53 protein, then induce the apoptosis of Ca Ski cells.

**【Keywords】** human interleukin-24; Ca Ski cells; papillomavirus, human; E6 genes; protein P53; apoptosis

**【摘要】**目的: 研究人白介素 24(hIL-24)在体外诱导宫颈癌 Ca Ski 细胞凋亡及其作用机制。方法: ①以脂质体包裹重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-hIL-24 转染 Ca Ski 细胞; ②利用 RT-PCR 技术检测处理后 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平变化; ③Western Blot 分析处理后 Ca Ski 细胞中抑癌蛋白 P53 水平的变化; ④流式细胞仪分析处理后的 Ca Ski 细胞凋亡情况。结果: 处理后 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平下降, 抑癌蛋白 P53 水平增加, 细胞凋亡率升高。结论: 真核表达载体介导的 hIL-24 基因体外转染宫颈癌 Ca Ski 细胞后, 能抑制 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的表

收稿日期 2006-07-10; 接受日期 2006-12-10

基金项目 国家自然科学基金(30371479), 教育部春晖计划(Z 2004-1-55103), 重庆市教委(渝教[2005]12号)

通讯作者 宋方洲, Tel (023)68485991 Email fzsongcq@163.com

作者简介: 石 华, 博士生(导师宋方洲), Tel (023)68485991

Email: shihua75@163.com

达, 使抑癌蛋白 P53 恢复活性, 促使宫颈癌 Ca Ski 细胞凋亡。

**【关键词】** 人白细胞介素 24; Ca Ski 细胞; 乳头状瘤病毒, 人; E6 基因; 蛋白质 P53; 细胞凋亡

**【中图分类号】** Q78 **【文献标识码】** A

## 0 引言

人白介素 24(hIL-24)是 IL-10 细胞因子家族中的新成员<sup>[1]</sup>。hIL-24 对肿瘤细胞有特异性的抑制和杀伤作用, 如诱导凋亡、抑制生长和抑制肿瘤血管生长, 而对正常细胞没有影响, 其显著的抗肿瘤特性使之成为肿瘤治疗的新热点<sup>[2-3]</sup>。宫颈癌是危害广大妇女健康最常见的恶性肿瘤之一, 仅次于乳腺癌而位居第二。近年来, 年轻妇女中宫颈癌的发病率呈明显上升的趋势<sup>[4]</sup>, 宫颈癌越来越引起人们广泛的关注。本实验我们采用 hIL-24 基因的真核表达载体转染宫颈癌 Ca Ski 细胞, 以探讨 hIL-24 对宫颈癌的治疗效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-hIL-24, 空质粒 pcDNA3.1(+), 表达绿色荧光蛋白(GFP)的质粒 pEGFP-C1 与人宫颈癌 Ca Ski 细胞株均为本室保存。Trizol、逆转录试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京鼎国公司; 所有的抗体购自 Santa cruz 公司; 脂质体 lipofectamine2000 购自 invitrogen 公司; 寡核苷酸引物合成由上海生工完成, 质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司, Annexin-V/FITC 染色试剂盒购自晶美公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人宫颈癌 Ca Ski 细胞于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养。

**1.2.2 质粒抽提与定量** 使用 QIAGEN 公司的质粒抽提试剂盒分别抽提重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-hIL-24, 空质粒 pcDNA3.1(+), 与表达绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP-C1。使用紫外分光光度计测定质粒的浓度。

**1.2.3 转染与转染效率观测** 将 Ca Ski 细胞传代

为3瓶(即分为3组:①未处理组,②对照组,③实验组),使之次日融合率大约为80%。第1瓶不作处理,第2瓶对照组细胞按照 Lipofectamine2000 试剂盒操作规程[质粒/脂质体为1:2(M/L)]转染入 pcDNA3.1(+ )空质粒;第3瓶实验组细胞转染入 pcDNA3.1(+ )-hIL-24 重组质粒。以相同条件转染 pEGFP-C1,48 h 后用荧光倒置显微镜观察表达绿色荧光蛋白的细胞比率以帮助判定转染效率。

1.2.4 细胞总 RNA 的提取 用 Trizol 试剂分别抽提处理 48 h 后的 3 组 Ca Ski 细胞的总 RNA。

1.2.5 E6 癌基因引物设计与合成 上游引物:5'-ACTTTGCTTTTCGGGATTTATGC-3';下游引物:5'-AGGACACAGTGGCTTTTGACAGTT-3';PCR 产物长度 205 bp。

1.2.6 Ca Ski 细胞中人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) E6 癌基因的 mRNA 水平变化 按照常规两步法进行 RT-PCR。第一步 RT:提取的总 RNA 取 2  $\mu$ L 作为 RT 反应模板,反应体系为 20  $\mu$ L:随机引物(25  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, dNTP(各 10 mmol/L)2  $\mu$ L, 逆转录酶 16.67 nkat;反应参数为 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 20 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。第二步 PCR:取 RT 反应产物 5  $\mu$ L 作为 PCR 反应模板,反应体系为 50  $\mu$ L: E6 基因上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, GAPDH 基因(内参)上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, dNTP(各 10 mmol/L)1  $\mu$ L, Taq 酶 16.67 nkat;反应参数为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用 Imagetool 图像分析软件计算 E6 基因条带与内参条带 A 比值,以其表示 E6 mRNA 含量的相对强度。重复 3 次。

1.2.7 Ca Ski 细胞中抑癌蛋白 P53 水平的变化 由于 E6 蛋白的含量极低且降解迅速,所以采用 P53 蛋白水平的变化来间接反映 E6 蛋白水平的变化(P53 是 E6 直接作用的下游靶分子)。分别收集处理 48 h 后的 3 组 Ca Ski 细胞的细胞裂解液,进行 Western Blot,以 actin 为内参。使用 Imagetool 图像分析软件计算 P53 蛋白条带与内参条带 A 比值,以其表示 P53 蛋白表达的相对强度。重复 3 次。

1.2.8 Ca Ski 细胞凋亡情况 采用 Annexin-V/FITC 与 PI 双标进行流式细胞仪分析。重复 3 次。

统计学处理:先对样本进行方差齐性检验,方差齐时组间比较采用方差分析及 LSD-*t* 检验,方差不齐时组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验及 Nemenyi 检验,  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 转染效率判定 转染质粒 48 h 后,荧光显微镜观察表达绿色荧光蛋白的细胞比率大约为 50%。初步判定转染效率为 50%左右(图 1)。

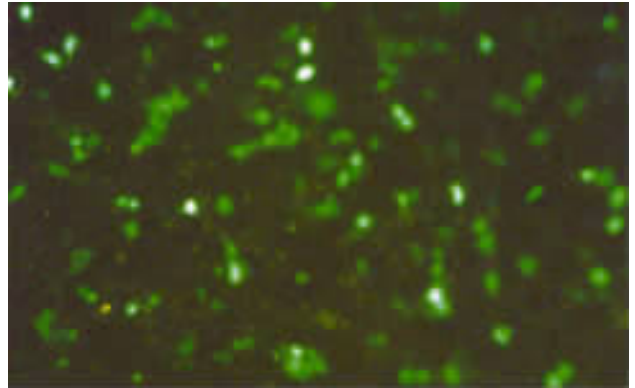


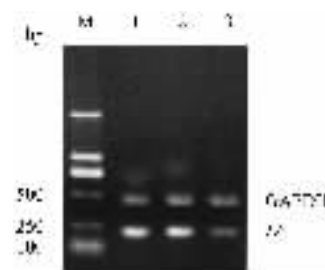
图 1 转染质粒 48 h 后 Ca Ski 细胞表达绿色荧光蛋白的情况( $\times 100$ )

2.2 RT-PCR 检测处理后 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平变化 未处理组和对照组 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平无统计学差异( $P > 0.05$ ),而实验组 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平与前两组比较均下降( $P < 0.05$ ,表 1,图 2)。

表 1 三组 Ca Ski 细胞的 E6 mRNA 水平、P53 蛋白水平和细胞凋亡率 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	E6mRNA 水平	P53 蛋白水平	细胞凋亡率(%)
未处理	1.76 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.05	1.19 $\pm$ 0.05
对照	1.74 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.05
实验 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.04	18.28 $\pm$ 0.43

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 未处理; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 对照。

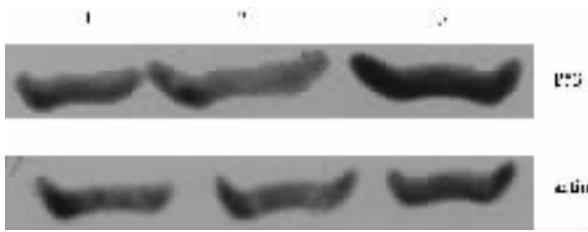


M marker D2000; 1 未处理组; 2 对照组; 3 处理组; GAPDH 内参。

图 2 E6 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖电泳图

2.3 Western Blot 分析处理后 Ca Ski 细胞中抑癌蛋白 P53 水平的变化 未处理组与对照组 Ca Ski 细胞中抑癌蛋白 P53 水平无统计学差异( $P > 0.05$ ),而实验组 Ca Ski 细胞中抑癌蛋白 P53 水平与前两组比

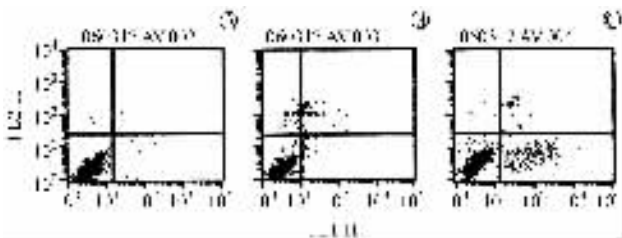
较均增加( $P < 0.05$ , 表 1, 图 3)。



1 未处理组; 2 对照组; 3 处理组。

图 3 蛋白印迹检测 Ca Ski 细胞中 P53 蛋白水平

2.4 流式细胞仪分析处理后的 Ca Ski 细胞凋亡情况 未处理组与对照组 Ca Ski 细胞无明显凋亡发生, 两组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。而实验组 Ca Ski 细胞的凋亡率与前两组比较均升高( $P < 0.05$ , 表 1, 图 4)。



A 未处理组 B 对照组 C 处理组。

图 4 流式细胞仪分析处理后的 Ca Ski 细胞凋亡情况

### 3 讨论

IL-24 是由 Jiang 等于 1995 年用 IFN- $\beta$  和 MEZ 诱导黑素瘤细胞终末分化时, 利用消减杂交克隆得到, 其后鉴定为 IL-10 家族的新成员。一系列研究证实 IL-24 具有广谱抗肿瘤活性, 对多种组织起源的肿瘤细胞如黑素瘤<sup>[5]</sup>、前列腺癌、乳腺癌、鼻咽癌、卵巢癌、结肠癌、皮肤癌、胰腺癌、肺癌、骨肉瘤细胞均有显著的生长抑制效应和诱导凋亡作用, 但对正常细胞无明显毒副作用。而且, 它还能在肿瘤组织内促进血管内皮细胞分化从而抑制血管形成。IL-24 是一个分泌型细胞因子, 可对周围癌细胞行“旁观者杀灭效应”<sup>[6-7]</sup>, 具有刺激免疫系统的功能, 还能使某些癌细胞对射线更加敏感<sup>[8]</sup>。目前的研究显示, IL-24 基因很可能是第一个既抑制肿瘤生长又表达刺激免疫系统的蛋白基因, 是目前发现的唯一一个细胞因子类的抑癌基因。目前有 ad-p53, ad-bax 等应用于肿瘤的基因治疗研究中, 但大多数的应用由于临床治疗潜力差和对正常组织的毒性高且不具有通过刺激免疫应答来杀伤肿瘤细胞的特性而受限。而 IL-24 就以它上述的优点成为目前最理想的肿瘤基因治疗的候选基因。

我国每年子宫颈癌新发病例有 13.5 万。近年来

发现, 年轻妇女中宫颈癌的发病率呈明显上升的趋势, 发病以每年 2% ~ 3% 的速度增长。宫颈癌越来越引起人们广泛的关注。

HPV 被认为是一个强力的人类致肿瘤因子。国内外一系列研究证明, 高危型 HPV 感染是子宫颈癌的主要危害因素<sup>[9]</sup>, 其中以 HPV-16, 18 型与子宫颈癌发病的关系最为密切, 其相关性高达 85% 以上。目前的研究认为, 宫颈癌的发生主要与 HPV 的 E6 和 E7 基因有关。其致癌的关键是: E6 癌基因编码合成的 E6 蛋白可以与细胞内野生型抑癌基因产物 P53 蛋白相结合, 在 E6 相关蛋白的作用下使 P53 经泛素介导的途径降解, 从而使 P53 抑制细胞生长及促进凋亡的作用丧失, 使细胞中 DNA 损伤累积, 从而诱导宫颈组织癌变。

在多种组织起源的肿瘤细胞中, IL-24 的抗肿瘤效应与 p53, RB, p16, ras, bax 和 caspase-3 的突变状态无关, 所以对 P53 失活的子宫颈癌细胞系特别适用。所以我们选择含有高拷贝(约 600 copy) HPV-16 病毒的宫颈癌 Ca Ski 细胞作为研究 IL-24 抑癌效应的对象。

本实验我们采用 hIL-24 基因的真核表达载体转染人宫颈癌 Ca Ski 细胞, 发现实验组 Ca Ski 细胞中 HPV E6 癌基因的 mRNA 水平明显下降, 抑癌蛋白 P53 水平显著增加, 促进宫颈癌 Ca Ski 细胞凋亡。以上结果表明以真核表达载体介导的 hIL-24 基因在体外能显著促进人宫颈癌 Ca Ski 细胞的凋亡, 为将来 hIL-24 应用于临床提供了实验基础。

### 【参考文献】

- [1] Fickenscher H, Hor S, Kupers H, et al. The interleukin-10 family of cytokines[J]. Trends Immunol 2002, 23(2): 89-96.
- [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] 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 USA 2002, 99(15): 10054-10059.
- [4] 韩英, 丁岩. 子宫颈癌病因及发病机制研究进展[J]. 新疆医学 2004, 34(2): 114-117.
- [5] 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.
- [6] Su Z, Emdad L, Sauane M, et al. Unique aspects of mda-7/IL-24 antitumor bystander activity: Establishing a role for secretion of MDA-7/IL-24 protein by normal cells[J]. Oncogene, 2005, 24(51): 7552-7566.
- [7] Sauane M, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 promotes tumor cell-specific apoptosis through both secretory and nonsecretory pathways[J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 2988-2993.
- [8] 韩文玲, 马大龙. 新细胞因子 IL-24 研究进展[J]. 中华免疫学杂志, 2003, 19(3): 211-212.
- [9] Dipaolo JA, Alvarez-Salas LM. Advances in the development of therapeutic nucleic acids against cervical cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(8): 1251-1264.