

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.005

人 *mda-7/IL-24* 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的抑制作用

杨宾霞, 马小彤*, 董成亚, 张芳, 林永敏, 段永娟(中国医学科学院北京协和医学院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: 探索人黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7*; 又称 *IL-24*) 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的抑制作用。方法: 用 RT-PCR 法检测 11 个造血系统恶性肿瘤细胞系 *mda-7* 受体的转录情况。用脂质体转染法将构建的重组真核表达载体 pTarget-IL-24 转染 K562 细胞。以 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测转染的 K562 细胞 *mda-7* 的表达情况; 通过 MTT 法、集落形成实验、流式细胞术、Annexin-V/PI 检测 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞增殖、集落形成、细胞周期和凋亡的影响; 以裸鼠移植瘤模型观察 *mda-7* 对 K562 细胞移植瘤的治疗作用。结果: 在 11 个造血系统恶性肿瘤细胞系(NB4、HL60、CEM、Namalwa、Jurkat、KG1a、U937、K562、Ramos、J6-1、HEL 细胞) 中没有检测到完整 *mda-7* 受体的表达。转染 *mda-7* 的 K562 细胞能显著表达 *mda-7* mRNA 及其蛋白; 其与转染空载体和未转染的 K562 细胞相比, 细胞增殖活力以及集落形成能力明显下降($P < 0.05$), 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期($P < 0.05$), 但细胞凋亡率没有明显变化。裸鼠体内实验证实了 *mda-7/IL-24* 明显抑制 K562 细胞移植瘤生长($P < 0.01$)。结论: *mda-7/IL-24* 对白血病细胞系 K562 具有明显的体内外抑制作用, 该作用与 *mda-7/IL-24* 引起细胞周期 G_0/G_1 期阻滞有关。

[关键词] 黑素瘤分化相关基因(*mda-7/IL-24*); 基因治疗; 慢性粒细胞白血病; 细胞周期

[中图分类号] R733.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0422-06

Inhibitory effect of human melanoma differentiation associated gene-7 on chronic myelocytic leukemia cell line K562

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

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect of human melanoma differentiation associated gene-7 (*mda-7/IL-24*) on chronic myelocytic leukemia cell line K562 *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The expression of *mda-7* receptor was examined in 11 malignant hematopoietic cell lines (NB4, HL60, CEM, Namalwa, Jurkat, KG1a, U937, K562, Ramos, J6-1, and HEL) by RT-PCR. Then the constructed pTarget-IL-24 eukaryotic expression vector was transduced into K562 cells via Lipofectamine reagent. The expression of *mda-7* mRNA and protein was verified by RT-PCR and Western blotting. MTT assay, colony forming assay, flow cytometry, Annexin-V/PI and xenograft tumor models in nude mice were used to assess the effects of *mda-7* on tumor cells proliferation, colony forming, cell cycle, apoptosis, and tumorigenesis, respectively. **Results:** The expression of *mda-7* intact receptor was not detected in the 11 malignant hematopoietic cell lines. Significant expression of *mda-7* mRNA and protein was found in K562 cells stably transfected with *mda-7*. Compared with control cells transfected with plasmid vector or untransfected cells, cells transfected with *mda-7* had decreased tumor cells proliferation ($P < 0.05$), inhibited colony formation ($P < 0.05$), and more cells were arrested in G_0/G_1 stage ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in cells apoptosis between control cells and K562 cells transfected with *mda-7*. Tumor xenograft models in BALB/c nude mice showed that *mda-7/IL-24* significantly inhibited the growth of K562 transplantation tumor ($P < 0.01$). **Conclusion:** Human *mda-7/IL-24* can efficiently inhibit the proliferation of chronic myelocytic leukemia cell line K562 *in vitro* and *in vivo*, possibly by inducing K562 cell arrest

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672364, No. 30872983); 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, No. 30872983); the Key Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin (No. 07JCZDJC07600)

[作者简介] 杨宾霞(1980-), 女, 河北省石家庄市人, 博士生, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: yangbinxia775812@yahoo.com.cn

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

in G₀/G₁ stage.

[**Key words**] melanoma differentiation associated gene-7(*mda-7/IL-24*); gene therapy; chronic myelocytic leukemia; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 422-427]

1995年, Jiang等^[1]发现了一个新基因——黑素瘤分化相关基因-7(melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7*), 又称 IL-24。复制缺陷型腺病毒表达载体 Ad. *mda-7* 使 *mda-7/IL-24* 基因在肿瘤细胞异位表达, 可抑制多种实体瘤如黑素瘤、乳腺癌、子宫颈癌、结直肠癌、肺癌、鼻咽癌、前列腺癌、胰腺癌的生长^[2-14]。研究发现, Ad. *mda-7* 除独立于 *p53*、*Rb* 基因促进肿瘤细胞凋亡外, 还抑制肿瘤血管形成, 增加肿瘤细胞对放射、化疗、抗体治疗的敏感性^[3-6, 13]。此外, 分泌的 *mda-7/IL-24* 还可以通过其受体 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2 诱导强烈的抗肿瘤旁观者效应^[15-17]。*mda-7/IL-24* 对造血系统恶性肿瘤的作用研究尚少。本实验室在前期工作中检测了 *mda-7/IL-24* 在 11 个人造血系统恶性肿瘤细胞系中的表达, 结果发现均无 *mda-7/IL-24* 转录, 符合 *mda-7/IL-24* 的抑癌基因的特点。进一步研究发现 *mda-7/IL-24* 对 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Namalwa 具有明显的肿瘤抑制作用^[12]。但 *mda-7/IL-24* 对白血病细胞的作用尚无报道。本研究首先检测了造血系统恶性肿瘤细胞系中 *mda-7/IL-24* 受体的表达情况, 并将构建好的重组真核表达载体转染慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562, 实现 *mda-7/IL-24* 在白血病细胞中的异位稳定表达; 然后观察肿瘤细胞生长增殖活力、细胞周期、集落形成能力、肿瘤细胞凋亡变化及裸鼠体内抑瘤效应, 评价 *mda-7/IL-24* 在白血病中的抗肿瘤作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

E. coli DH5 α 菌株, 由本室保存。K562 是从国外慢性粒细胞白血病急性变患者的胸水中分离出来的白血病细胞系。NB4 属于人急性早幼粒白血病细胞, HL60 属于人早幼粒急性白血病细胞, CEM 属于人 T 细胞白血病, Namalwa 属于人 Burkitt's 淋巴瘤细胞, Jurkat 属于人 T 淋巴细胞白血病细胞, KG1a 属于人急性骨髓性白血病细胞, U937 属于人组织细胞淋巴瘤细胞(巨噬细胞), Ramos 属于人 B 淋巴细胞, J6-1 属于单核细胞白血病细胞, HEL 属于人红白细胞白血病细胞。以上细胞系均由本室常规方法传代和人造造血系统恶性肿瘤细胞系培养方法培

养: RPMI 1640(含 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 的谷氨酰胺、100 IU/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 的链霉素) 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。BALB/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]。真核表达载体 pTarget 购自 Promega 公司, pTarget-*mda-7/IL-24* 由本室构建^[12]。RPMI 1640 购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所科技公司, EXTaq 酶、限制性内切酶(*Bam*H I、*Sal* I) 购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司, 脂质体(LipofectamineTM 2000)、OPTI-MEM、G418 购自 GIBCO BRL 公司, 小量质粒提取试剂盒购自 TaKaRa 公司, 谷氨酰氨、2-巯基乙醇、甲基纤维素、TRIzol、MML-V 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司, ECL 化学发光试剂盒购自上海普飞生物公司, MTT、DMSO 购自 Sigma 公司, Annexin-V/PI 凋亡试剂盒购自 Invitrogen 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 单抗购自美国 R&D system 生物技术有限公司, 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 引物合成

根据文献报道的 *mda-7/IL-24* 基因序列及 PCR PRIMER 计算机软件辅助设计引物, *mda-7/IL-24* 特异的检测引物序列为: 上游 5'-CGA CAG CCT CTC AAA TGC AG-3', 下游 5'-GCT CTC CGG AAT AGC AGA AAC C-3'; 扩增产物长度为 462 bp。选用人 β -actin 作为内参照, 序列为: 上游 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC-3', 下游 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3'; 扩增片段长度 270 bp。Neo 基因检测引物, 上游引物: 5'-GGT GGA GAG GCT ATT CGG CT-3', 下游引物: 5'-GAT AGA AGG CGA TGC GCT GC-3'; 扩增片段长度 627 bp。*mda-7/IL-24* 受体检测引物: IL-20R1: 上游引物 5'-TCA AAC AGA ACG TGG TCC CAG TG-3', 下游引物 5'-TCC GAG ATA TTG AGG GTG ATA AAG-3'; IL-20R2: 上游引物 5'-GCT GGT GCT CAC TCA CTG AAG GT-3', 下游引物 5'-TCT GTC TGG CTG AAG GCG CTG TA-3'; IL-22R1: 上游引物 5'-CTG ACA

CAG AGT TCC TTG G-3', 下游引物 5'-CCT AAG TAG GTG ATC TCG G-3'。以上引物均由北京奥科生物合成和纯化。

1.3 RT-PCR 检测造血系统恶性肿瘤细胞系中 *mda-7/IL-24* 受体的表达

按常规用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA, 按照 Invitrogen 公司 M-MLV 逆转录酶产品说明书推荐方法逆转录合成 DNA。PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C × 1 min, 57 °C × 1 min, 72 °C × 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 7 min。IL-20R1、IL-20R2 以及 IL-22R1 扩增产物长度分别是 392 bp、406 bp 和 345 bp。

1.4 质粒的小量提取

按照 TaKaRa 公司小量质粒提取试剂盒操作说明进行。取约 4 ml 菌液, 4 500 × g 离心 10 min, 弃上清。加 250 μl 预冷的溶液 I 重悬沉淀, 加入 250 μl 室温放置的溶液 II, 温和颠倒混匀 4 ~ 6 次, 此步骤不超过 5 min。加入 400 μl 冰预冷的溶液 III, 温和颠倒混匀 4 ~ 6 次, 12 000 × g 离心 10 min, 将上清转移至吸附柱中, 12 000 × g 离心 1 min, 弃滤液。将 500 μl RinseA 加入吸附柱, 12 000 × g 离心 1 min, 弃滤液; 再用 700 μl RinseB 洗吸附柱 2 次, 12 000 × g 离心 1 min, 弃滤液。将吸附柱安置于干净的 1.5 ml Ep 管上, 加入 30 μl 双蒸水, 室温下静置 1 min, 12 000 × g 离心 1 min。洗脱的 DNA 用紫外分光光度仪分析定量, 剩余的贮存于 4 °C 备用。

1.5 细胞转染

脂质体转染法将 pTarget、pTarget-*mda-7/IL-24* 分别转染 K562 细胞。参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 产品说明进行。转染当天 24 孔板中接种 K562 细胞, 5 × 10⁵/孔。制备 DNA-脂质体复合物: 溶液 A 为 50 μl 无血清 OPTI-MEM 培养基加入 1 μg 质粒轻轻混匀; 溶液 B 为 50 μl 无血清 OPTI-MEM 培养基加入 2 μl Lipofectamine™ 2000 轻轻混匀, 室温孵育 5 min; 混合溶液 A 和溶液 B, 室温 20 min。将 DNA-脂质体混合物加 24 孔板的细胞悬液中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养。转染后 48 h 加入 G418(800 μg/ml) 筛选阳性细胞。筛选后第 14 天, 极限稀释法筛选单克隆。

1.6 阳性克隆 *mda-7/IL-24* 基因表达的检测

1.6.1 RT-PCR 检测基因的表达 提取细胞总 RNA: 将上述转染目的基因的细胞收集后, 用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA。cDNA 合成: 按照 Invitrogen 公司 M-MLV 逆转录酶产品说明书推荐方法逆转录。PCR 扩增反应条件: Neo 基因: 94 °C 预变性 5

min; 94 °C × 1 min, 57 °C × 1 min, 72 °C × 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 7 min; IL-24: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C × 1 min, 58 °C × 1 min, 72 °C × 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 7 min; 以人 β-actin 为内对照, 扩增片段长度 270 bp。

1.6.2 Western blotting 检测蛋白的表达 取 1 × 10⁷ 细胞 PBS 洗 2 次, 加 400 μl 裂解液, 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, 10% SDS-PAGE 电泳后转硝酸纤维薄膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 将膜与特异性一抗(鼠抗人 IL-24 单克隆抗体) 4 °C 温育过夜, PBS-T 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 温育 1 h, PBS-T 洗膜 15 min, 3 次。按 ECL 化学发光试剂盒说明书显色。

1.7 MTT 法检测肿瘤细胞增殖能力

收集并计数稳定转染 pTarget、pTarget-IL24 的细胞以及未转染细胞, 用 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液将细胞调整为不同的密度[(1.25 ~ 10) × 10⁴ 细胞/ml], 以每孔 180 μl 接种 96 孔培养板, 设 3 复孔。44 h 后加 20 μl MTT(5 mg/ml) 继续培养 4 h, 离心后除去上清, 加入 150 μl DMSO 振荡 10 min, 使用酶标仪检测每孔于 562 nm 波长的 D 值, 结果取 3 孔 D 值的均值。

1.8 集落形成实验检测肿瘤细胞集落形成能力

取对数生长期转染及未转染细胞, 1 000 × g 离心 10 min。弃上清, 用无血清 RPMI 1640 洗涤 1 次, 适量 RPMI 1640 将细胞悬起进行细胞计数; 调整细胞密度为 2 × 10³/ml, 30% FCS 分别将细胞加入集落培养体系(1 ml RPMI 1640 培养液中含 2.3% 甲基纤维素 400 μl, 2-巯基乙醇 10 μl, 谷氨酰胺 10 μl, G418 16 μl)。平底 96 孔板中一式 5 孔, 每孔加入 100 μl 上述液体, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 7 d, 于倒置显微镜下观察, 大于 50 个细胞的细胞丛为一集落, 计数各孔的集落数。

1.9 流式细胞术检测肿瘤细胞周期

取 5 × 10⁵ 个稳定转染及未转染细胞, PBS 洗 1 次, 70% 乙醇 4 °C 固定 24 h, 离心弃上清, 加 RNaseA 5 μl(10 μg/μl), 室温孵育 15 min 后加 200 μl PI, 避光室温孵育 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。

1.10 Annexin-V/PI 染色检测肿瘤细胞的凋亡

按 Invitrogen 公司 Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒操作说明进行。收集细胞, 4 °C PBS 洗细胞 2 次, 用结合缓冲液(去离子水按 1:4 稀释) 250 μl 重新悬浮细胞, 调其密度为 1 × 10⁶/ml。取 100 μl 细胞悬

液于 5 ml 流式管中,加 5 μ l Annexin-V/FITC 和 10 μ l (20 μ l/ml) PI,混匀后室温避光孵育 15 min,反应管中加 400 μ l PBS,FACS 分析。

1.11 *mda-7/IL-24* 对裸鼠 K562 细胞移植瘤治疗效果的观察

6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠严格无菌条件下饲养。接种前 6 ~ 12 h 予以亚致死量(300 cGy)¹³⁷Cs 放射源照射,消灭体内残存的免疫力。随机分为 3 组(每组 6 只)。培养至对数生长期后调细胞密度为 $1 \times 10^7/200 \mu$ l,裸鼠右肩部皮下注射:第 1 组注射稳定转染 pTarget 空载体的 K562-V 细胞,第 2 组注射稳定转染 pTarget-IL-24 的 K562-*mda-7-1* 细胞,第 3 组注射 K562-*mda-7-2*。7 d 后观察成瘤情况,每 3 d 测量 1 次瘤块大小,并按长 \times 宽²/2 计算瘤块体积。第 21 天处死。

1.12 统计学方法

所有实验均重复 3 次,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对资料 *t* 检验,用 SPSS11.0 统计学软件进行处理。

2 结果

2.1 造血系统恶性肿瘤细胞系中 *mda-7/IL-24* 受体的表达

以人表皮细胞 HaCaT 为 *mda-7/IL-24* 受体扩增反应的阳性对照,半定量 RT-PCR 检测 NB4、HL60、CEM、Namalwa、Jurkat、KG1a、U937、K562、Ramos、J6-1、HEL 等 11 种造血系统恶性肿瘤细胞中 *mda-7/IL-24* 受体表达情况。结果显示,只在 NB4、HL60、CEM、Namalwa、Jurkat、KG1a 中检测到 IL-20R2 受体的转录,在这 11 种造血系统恶性肿瘤细胞系中均没有检测到 *mda-7/IL-24* 完整受体的表达(图 1)。

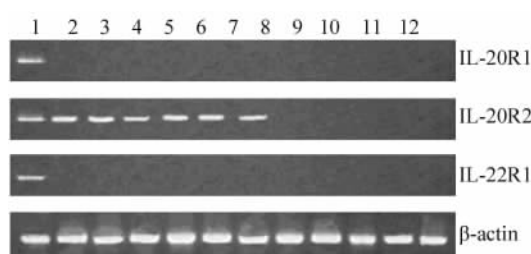


图 1 半定量 RT-PCR 技术检测 *mda-7/IL-24* 受体在造血系统恶性肿瘤细胞系中的表达

Fig. 1 Detection of *mda-7/IL-24* receptor expression in malignant hematopoietic cell lines by RT-PCR

1: KaCaT cells; 2: NB4 cells; 3: HL-60 cells; 4: CEM cells; 5: Namalwa cells; 6: Jurkat cells; 7: KG1a cells; 8: U937 cells; 9: K562 cells; 10: Ramos cells; 11: J6-1 cells; 12: HEL cells

2.2 稳定转染 pTarget、pTarget-IL24 细胞系的建立及 *mda-7* 表达的鉴定

质粒载体 pTarget、pTarget-IL24 转染 K562 细胞后 48 h,G418 加压筛选至第 7 天,未转染细胞全部死亡;筛选后第 14 天,极限稀释细胞克隆化培养,分别获得 3 株表达空载体 pTarget(pTarget-V)、9 株表达 *mda-7/IL-24*(pTarget-IL24)的细胞系,选取 1 株空载体对照和 2 株目的基因细胞进行实验,分别命名为 K562-V、K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2*。

RT-PCR 检测结果显示,RT-PCR 筛选上述稳定转染的肿瘤细胞,转染 *mda-7/IL-24* 的 K562 细胞中均能检测到 *mda-7/IL-24* mRNA 的表达(图 2)。

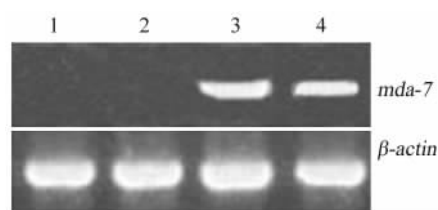


图 2 重组质粒转染后 K562 细胞 *mda-7/IL-24* mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of *mda-7/IL-24* mRNA in K562 cells after transfection with pTarget-IL-24 or pTarget-V

1: K562 cells; 2: K562-V cells; 3: K562-*mda-7-1* cells; 4: K562-*mda-7-2* cells

Western blotting 方法鉴定 *mda-7/IL-24* 蛋白水平:在稳定转染 *mda-7/IL-24* 的 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* 细胞株中分别检测到 *mda-7/IL-24* 蛋白的表达,相对分子质量大约为 30 000,与文献报道分子量大小一致,如图 3 所示。

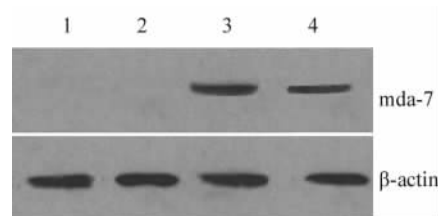


图 3 Western blotting 检测重组质粒转染后 K562 细胞 *mda-7/IL-24* 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of *mda-7/IL-24* protein in K562 cells after transfection with recombinant plasmid by Western blotting

1: K562 cells; 2: K562-V cells; 3: K562-*mda-7-1* cells; 4: K562-*mda-7-2* cells

2.3 *mda-7/IL-24* 对稳定转染细胞 K562 体外增殖的抑制作用

MTT 检测 K562、K562-V、K562-*mda-7-1* 和

K562-*mda-7-24* 4 个细胞株的体外增殖情况, 设 3 复孔, 取平均值。结果显示, K562、K562-V 细胞体外增殖活力差别不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 而 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* 的增殖活性明显低于对照组 K562-V ($P < 0.05$, 图 4)。

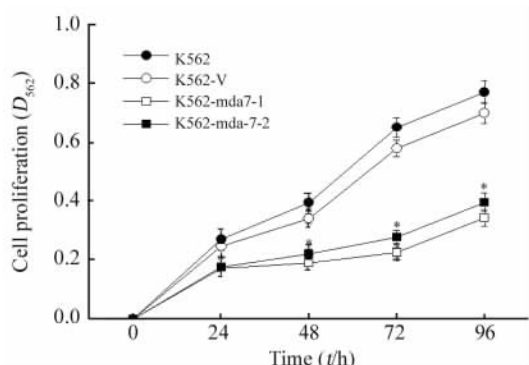


图 4 MTT 法检测 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞体外增殖的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of *mda-7/IL-24* on proliferation of K562 cells *in vitro* by MTT

* $P < 0.05$ vs K562-V

2.4 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞集落形成的抑制

K562、K562-V、K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-24* 细胞株进行集落形成实验。结果显示, K562、K562-V 集落形成能力无显著差异, 但 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* 与 K562-V 相比, 集落形成能力明显降低 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.5 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞周期 G₀/G₁ 期的阻滞

细胞周期实验结果如图 6 所示, K562 和 K562-V 之间各周期比例没有差异, 但 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* 与 K562-V 相比, G₀/G₁ 期细胞比例明显上升, 而 S 期的明显减少 ($P < 0.05$)。结果表明, 转染 *mda-7/IL-24* 可将 K562 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期。

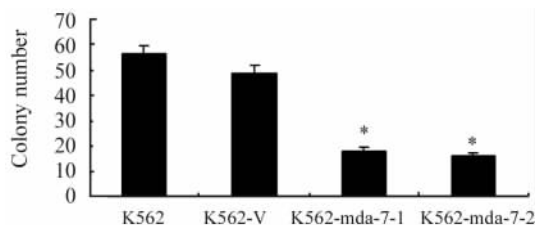


图 5 *mda-7/IL-24* 抑制 K562 细胞集落的形成

Fig. 5 Inhibitory effect of *mda-7/IL-24* on colony formation of K562 cells *in vitro*

* $P < 0.05$ vs K562-V

2.6 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞无促凋亡作用

Annexin-V/PI 方法检测 K562 各组细胞凋亡情况。对照 K562 和 K562-V 的凋亡率分别为 5.04% 和 3.59%, K562-*mda-7-1* 为 5.22%, K562-*mda-7-2* 为 3.56%。经统计学处理, 各组凋亡百分率间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明稳定转染 *mda-7/IL-24* 对 K562 细胞无明显促凋亡作用。

2.7 *mda-7/IL-24* 对裸鼠 K562 细胞移植瘤有明显的抑制作用

裸鼠接种转染 *mda-7/IL-24* 的 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* 细胞及空载体的 K562-V 细胞后, 第 13 天开始测量肿瘤大小, 计算每组瘤块的平均体积, 结果如图 6 所示: K562-V 的肿瘤生长速度明显快于 K562-*mda-7-1* 和 K562-*mda-7-2* ($P < 0.05$), 即在接种时间、接种肿瘤细胞数量相同的条件下, K562-*mda-7-1* 组和 K562-*mda-7-2* 组的肿瘤生长速度与 K562-V 组的相比明显受到抑制。

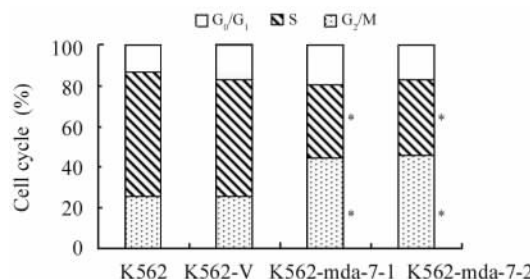


图 6 *mda-7/IL-24* 诱导 K562 细胞 G₀/G₁ 期细胞周期阻滞

Fig. 6 Induction of G₀/G₁ cell cycle arrest in K562 cells by *mda-7/IL-24*

* $P < 0.05$ vs K562-V

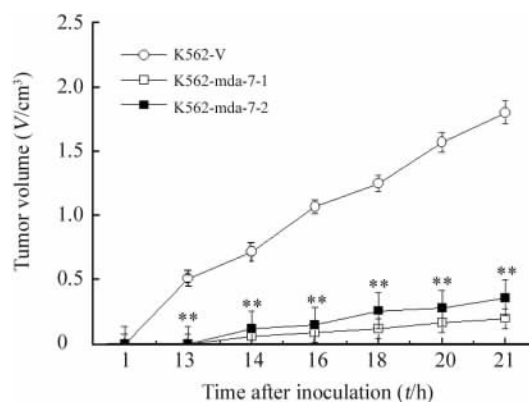


图 7 *mda-7/IL-24* 对裸鼠 K562 移植瘤的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory effect of *mda-7/IL-24* on K562 xenograft models in nude mice

** $P < 0.01$ vs K562-V

3 讨论

mda-7/IL-24 是 1995 年发现的新的肿瘤抑制

基因^[1]。生理情况下 *mda-7/IL-24* 局限表达于黑色素瘤细胞及造血系统细胞如单核、淋巴细胞等。Jiang 等^[5]发现 *mda-7/IL-24* 染色体定位在 IL-10 家族的基因簇,其基因序列以及蛋白结构中具有 IL-10 同源结构域,属于 IL-10 家族。与 IL-10 家族其他成员相似,*mda-7/IL-24* 也是分泌型细胞因子并可通过异二聚体受体发挥作用。*mda-7/IL-24* 受体有 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2 两对异源二聚体^[17]。*mda-7/IL-24* 的分泌形式能够通过激活这两对受体发挥抗肿瘤“旁观者效应”。

为探索 *mda-7/IL-24* 在白血病中是否可以通过受体发挥抗肿瘤作用,本实验首先检测了 11 种造血系统恶性肿瘤细胞系中 *mda-7/IL-24* 受体的表达情况,结果未发现完整受体的表达。由于曾有文献推测造血系统细胞可能表达 *mda-7/IL-24* 未知受体,因此,本研究用 1~250 ng/ml 不同质量浓度梯度的重组 IL-24 培养 K562、HL-60、Namalwa 和 U937,观察 *mda-7/IL-24* 是否对这些细胞的增殖、周期以及凋亡造成影响,结果未发现上述指标明显改变,表明 *mda-7/IL-24* 在白血病中不能通过因子、受体途径发挥抗肿瘤作用。

为探索异位表达 *mda-7/IL-24* 基因在白血病中的作用,本研究将前期工作中构建的 *mda-7/IL-24* 真核表达载体转染人白血病细胞系 K562,筛选稳定表达细胞系。RT-PCR、Western blotting 方法进行 mRNA 水平、蛋白水平鉴定,证实了 *mda-7/IL-24* 的表达。实验表明,与在 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Namalwa 中的作用相似^[12],*mda-7/IL-24* 能够明显地抑制 K562 细胞的生长、集落形成、裸鼠体内的成瘤能力 ($P < 0.05$)。细胞周期检测结果发现,*mda-7/IL-24* 能够使 K562 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,而在 Namalwa 细胞中不能引起周期阻滞。本研究首次证实了 *mda-7/IL-24* 对白血病细胞系 K562 的抑制作用,为白血病的基因治疗提供新的策略。

[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] 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] 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.

- [4] Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, et al. *mda-7/IL-24*: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003, 14(1): 35-51.
- [5] Chada S, Sutton RB, Ekmekcioglu S, et al. *mda-7/IL-24* is a unique cytokine-tumor suppressor in the IL-10 family [J]. *Int Immunopharmacol*. 2004, 4(5): 649-667.
- [6] 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*, 2006, 317(1): 207-218.
- [7] Tong AW, Nemunaitis J, Su D, et al. Intratumoral injection of INGN-241, a non-replicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated antigen-7 (*mda-7/IL-24*): biologic outcome in advanced cancer patients [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(1): 160-172.
- [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] 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.
- [10] 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.
- [11] Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, et al. Bcl-2 and Bcl-x(L) differentially protect human prostate cancer cells from induction of apoptosis by melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7/IL-24* [J]. *Oncogene*, 2003, 22(54): 8758-8773.
- [12] 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(4): 417-422.
- [13] Yacoub A, Hamed H, Emdad L, et al. *mda-7/IL-24* plus radiation enhance survival in animals with intracranial primary human GBM tumors [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(6): 917-933.
- [14] Sarkar D, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5434-5442.
- [15] Mumm JB, Ekmekcioglu S, Poindexter NJ. Soluble human *mda-7/IL-24*: characterization of the molecular form(s) inhibiting tumor growth and stimulating monocytes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2006, 26(12): 877-886.
- [16] 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.
- [17] Gupta P, Walter MR, Su ZZ, et al. BiP/GRP78 is an intracellular target for *mda-7/IL-24* induction of cancer-specific apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 8182-8191.

[收稿日期] 2008-07-19

[修回日期] 2008-08-16

[本文编辑] 韩丹