

Ad-IL-24 对 SGC-7901 胃癌细胞生长抑制的体外实验

包婉蓉, 缪竞诚, 盛伟华, 单云波, 李正祎, 汪小华, 井莹莹, 韩亚丽, 杨吉成

苏州大学医学部基础医学与生命科学学院 细胞与分子生物学教研室, 苏州 215123

摘要: 旨在研究携带人 *IL-24* 基因的腺病毒表达载体(Ad-*IL-24*)对 SGC-7901 人胃癌细胞的生长抑制作用并分析其分子机制。以不同 MOI(感染复数)的 Ad 空载体腺病毒感染 SGC-7901 人胃癌细胞, 筛选出最佳感染剂量; Ad-*IL-24* 以最佳感染剂量感染 SGC-7901 胃癌细胞, RT-PCR 法和 Western blotting 法检测腺病毒介导的 *IL-24* 基因在 SGC-7901 胃癌细胞中的转录; MTT 法检测 Ad-*IL-24* 对 SGC-7901 胃癌细胞的生长抑制作用, 流式细胞仪检测其诱导 SGC-7901 人胃癌细胞凋亡和细胞周期改变的效应, Hoechst33258 染色荧光显微镜检测其诱导胃癌细胞凋亡的核形态改变; RT-PCR 半定量法进一步检测 SGC-7901 胃癌细胞中凋亡相关基因的转录。结果显示, 100 MOI 为感染 SGC-7901 胃癌细胞的腺病毒最佳感染剂量; Ad-*IL-24* 能成功介导 *IL-24* 基因在 SGC-7901 胃癌细胞中转录性表达; Ad-*IL-24* 感染 SGC-7901 胃癌细胞后, 能明显抑制胃癌细胞生长和诱导凋亡; Ad-*IL-24* 能显著上调 SGC-7901 胃癌细胞中 *bax*, *caspase-3* 和 *p53* 的表达和下调 *bcl-2* 的表达。因此, 腺病毒介导的 *IL-24* 表达具有明显抑制 SGC-7901 人胃癌细胞生长和诱导凋亡的抗肿瘤效应, 其机制可能与上调 *bax/bcl-2*、*caspase-3* 和 *p53* 密切相关。

关键词: 腺病毒, 人白介素-24, 胃癌, 肿瘤基因治疗, 抗肿瘤效应

Adenovirus mediated *IL-24* gene expression suppresses gastric cancer cell growth *in vitro*

Wanrong Bao, Jingcheng Miao, Weihua Sheng, Yunbo Shan, Zhengyi Li, Xiaohua Wang, Yingying Jing, Yali Han, and Jicheng Yang

Department of Cellular and Molecular Biology, Medical School, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: To study the inhibitory effect of a recombinant adenoviral vector carrying human *IL-24* gene on SGC-7901 human gastric cancer cell. We infected the SGC-7901 gastric cancer cells with Ad blank adenovirus at various multiplicity of infection (MOIs) to find the optimal infective dose. The SGC-7901 tumor cells were infected with Ad-*IL-24* at the optimal MOI in the following experiments. Adenovirus-mediated *IL-24* transcription expression in SGC-7901 cells was examined by RT-PCR. The growth-suppressing effect of Ad-*IL-24* on SGC-7901 tumor cells was assessed by MTT assay. Apoptosis and cell cycle of SGC-7901 tumor cells infected with Ad-*IL-24* was evaluated by flow cytometer (FCM), respectively. The karyomorphology of apoptotic SGC-7901 tumor cells was examined using Hoechst33258 staining under fluorescence microscopy. The expression of apoptosis-related genes was further determined by semi-quantification RT-PCR; We demonstrated that the MOI of 100 was the optimal infective dose in the study on adenovirus-mediated *IL-24* gene transfer into SGC-7901 gastric cancer cell; *IL-24* gene mediated by adenovirus could successfully transcribe in SGC-7901 tumor cells; Ad-*IL-24* could significantly inhibit SGC-7901

Received: June 2, 2009; **Accepted:** September 2, 2009

Supported by: National Science Foundation of Jiangsu Provincial Universities (No. 08KJB310011).

Corresponding author: Jicheng Yang. Tel: +86-512-65880107; E-mail: jcyang@suda.edu.cn

江苏省高校自然科学基金研究项目(No. 08KJB310011)资助。

tumor cell growth and induce apoptosis, it also can up-regulate the express of *bax*, *caspase-3* and *p53* whilst down-regulate the *bcl-2* expression. Thus, adenovirus-mediated *IL-24* expression had marked anti-tumor effect in suppressing SGC-7901 human gastric cancer cell growth and inducing apoptosis, which may be closely associated with its up-regulation of *bax/bcl-2*, *caspase-3* and *p53*.

Keywords: adenovirus, interleukin-24, gastric cancer, cancer gene therapy, anti-tumor effect

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,其发病率在不同的国家、地区都存在差异,我国属于胃癌的高发区,且其检出率有逐年上升的趋势^[1]。目前临床对待胃癌的主要治疗手段是手术切除,辅以放疗及化疗^[2],虽然放/化疗在胃癌的治疗中有一些治疗作用,但是在治疗过程中会给病人身体带来不同程度的伤害。随着分子生物学的发展,基因治疗作为一种癌症治疗的新模式,越来越受到人们的重视。*IL-24*,又称黑色素分化相关基因(Melanoma differentiation associated gene-7, *mda-7*),主要由黑素瘤细胞和巨核细胞产生,是 Jiang 等^[3]于 1995 年发现,并发现其染色体定位在 *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^[4]; *IL-24* 具有抑制多种肿瘤细胞生长和肿瘤新血管形成并诱导凋亡功能,但基本不会影响正常细胞。目前的研究提示, *IL-24* 基因是一个既能够抑制肿瘤细胞的生长和血管形成并诱导其凋亡,同时又能刺激免疫细胞表达细胞因子的新型抑癌基因^[5-6]。本实验室的前期研究已经证明 *IL-24* 基因表达在体内外对肝癌、肺癌、胰腺癌、黑色素瘤和胶质瘤等均有明显的生长抑制作用和诱导肿瘤细胞凋亡功能^[7-13]。因此,本研究用腺病毒介导的 *IL-24* 基因感染 SGC-7901 人胃癌细胞,研究 *IL-24* 基因对 SGC-7901 人胃癌细胞的生长抑制和诱导凋亡的作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901、QBI-293A 细胞、腺病毒 Ad-GFP、Ad-*IL-24* 等均为本实验室保存; RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自杭州赛乐生物有限公司; MTT 购自 Sigma 公司; Annexin-v-PE/7-AAD 凋亡试剂盒购于 Southern Biothech 公司; Trizol(Invitrogen 公司); *Taq* 酶(TaKaRa 公司); 逆转录酶 MMLV(Fermentas 公司); Hoechst33258 染色试

剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品; PCR 引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的制备及效价检测

按本实验室常规法进行病毒扩增和效价测定^[13]。

1.2.2 不同 MOI 的重组腺病毒对 SGC-7901 胃癌细胞的生长影响

将处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,经 0.25% 胰酶消化后,分别用 10% FCS 1640 完全培养基悬浮,计数后调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板, 37°C、5% CO_2 培养过夜。次日以 10、25、50、100、200 MOI 不同剂量 Ad-GFP 感染 SGC-7901 细胞。48 h 后在荧光显微镜及普通光镜下观察 SGC-7901 细胞的感染荧光及细胞形态。

1.2.3 腺病毒介导的 *IL-24* 基因在 SGC-7901 细胞中的转录

选用由 1.2.2 筛选出的腺病毒最佳感染剂量分别感染 SGC-7901 细胞(细胞数为 1×10^6), 分为 3 组: 不加病毒的细胞对照组(PBS 组)、加入 Ad-GFP 的空载体对照组(Ad-GFP 组)和加入 Ad-*IL-24* 的实验组(Ad-*IL-24* 组), 72 h 后抽提出细胞总 RNA 和裂解提取蛋白, 进行 RT-PCR 和 Western blotting 鉴定, PCR 体系为 94°C 4 min; 94°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。Western blotting 方法如下: 将上述提取蛋白与 SDS 蛋白上样缓冲液混匀, 进行 SDS-PAGE 电泳, 再将凝胶蛋白转移到 NC 膜(硝酸纤维素膜)上, 经 5% 脱脂奶粉封闭后加入鼠抗人 *IL-24* 抗体, 37°C 1 h, TBST 洗涤 3 次; 再加 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 二抗, 37°C 作用 1 h, TBST 洗涤 3 次; 最后将 NC 膜与发光工作液(A 和 B 溶液等体积混合)充分接触, 室温孵育 3 min, 暗室进行压片曝光、显影和定影。

1.2.4 MTT 法检测腺病毒对 SGC-7901 细胞的生长影响

将处于对数生长期的 SGC-7901 细胞, 0.25% 胰

酶消化后, 用 10% FCS 1640 完全培养基悬浮制成单细胞悬液, 计数后调整细胞浓度按每孔 1×10^4 个/100 μL 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 按 1.2.2 筛选的腺病毒最佳感染剂量感染细胞, 分组同上, 每组均设 3 个平行孔。37°C、5% CO_2 培养箱中培养 0~4 d, 隔天每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 37°C 下继续培养 4 h 后再加入 10% SDS-HCl 终止液 100 μL /孔, 于 37°C 充分溶解后, 在 570 nm 下测定 OD 值, 以 OD 值为纵坐标, 时间(d)为横坐标绘制生长曲线。并按如下公式计算生长抑制率: 生长抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值/阴性对照 OD 值) \times 100%。

1.2.5 Annexin-V-PE/7-AAD 双染法检测细胞凋亡

按 1.2.2 筛选的腺病毒最佳感染剂量分别感染处于对数生长期的 SGC-7901 细胞, 分组同上。37°C、5% CO_2 相同条件下培养 72 h 后收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 并调节细胞浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL, 取 100 μL 细胞于流式管中, 加 10 μL Annexin-V-PE 混匀后冰上避光孵育 15 min, 再加 380 μL 1 \times binding buffer 和 10 μL 7-AAD, 进行流式细胞仪检测。

1.2.6 PI 单染检测细胞周期变化

细胞处理方法同 1.2.5, 感染 48 h 后收集细胞, PBS 清洗 2 次, 以 70%乙醇固定 12 h 后, 以 PBS 洗 2 遍, 以 1 \times buffer 重悬后加入 RNase 后孵育 30 min, 再加入 PI 避光孵育 30 min, 进行流式细胞仪检测。

1.2.7 Hoechst 染色检测细胞凋亡的核形态学改变

将洁净无菌的盖玻片置于 6 孔板内, 分别种入 SGC-7901 胃癌细胞, 在 37°C、5% CO_2 下培养至玻片表面细胞贴壁生长达 50%~80%时, 按 1.2.2 筛选的腺病毒最佳感染剂量, 将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 6 孔板中贴片的 SGC-7901 细胞, 分组同上, 继续培养 72 h 后进行 Hoechst 染色, 在荧光镜下观察细胞核形态变化。

1.2.8 RT-PCR 检测 *bcl-2*、*bax*、*caspase-3* 和 *P53* 基因的转录

按 1.2.2 筛选的腺病毒最佳感染剂量分别感染 SGC-7901 细胞(细胞数为 1×10^6), 分组同上。感染 72 h 后收集细胞提取总 RNA, 采用表 1 相应的引物 (P3~P12), 进行 RT-PCR 分别检测 *bcl-2*、*bax*、*caspase-3* 和 *p53* 基因在 SGC-7901 细胞中的表达水

平。PCR 的体系为 94°C 4 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

1.2.9 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 统计学软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为统计学有差异。

表1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'-3')
P1: <i>IL-24</i> Forward	GCACTCGAGACCATGAATTTTC AACAGAGGCTGCA
P2: <i>IL-24</i> Reverse	GCTTCTAGATCAGAGCTTGTAG AATTTCTG
P3: <i>bcl-2</i> Forward	TGTGGCCTTTCTTTGAGTTCCG
P4: <i>bcl-2</i> Reverse	CTACCCAGCCTCCGTTATCC
P5: <i>bax</i> Forward	GGATGCGTCCACCAAGAA
P6: <i>bax</i> Reverse	GCACTCCCGCCACAAAGA
P7: <i>p53</i> Forward	CCTCCTCAGCATCTTATCCG
P8: <i>p53</i> Reverse	CACAAACACGCACCTCAAA
P9: <i>caspase-3</i> Forward	ACCTCAGAGAGACATTAC
P10: <i>caspase-3</i> Reverse	CCCCACTCCCAGTCATTCTTT
P11: β -actin Forward	TGTTTGAGACCTTCAACACCC
P12: β -actin Reverse	AGGAAGGCTGGAAGAGTGC

2 结果

2.1 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 的扩增及效价的检测

将腺病毒 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 以 100 MOI 的最佳感染剂量感染 QBI-293A 细胞, 48 h 后, 普通光镜下细胞聚集呈现葡萄状和明显的 CPE, 荧光显微镜下细胞出现强绿色荧光(图 1)。收集腺病毒, 经效价检测得 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 的效价均达到 10^9 PFU/mL。

2.2 不同 MOI 重组腺病毒对 SGC-7901 细胞的生长影响

将 Ad-GFP 以 10、25、50、100、200 MOI 不同剂量分别感染 SGC-7901 细胞。48 h 后, 分别在荧光显微镜下和普通光镜视野下观察 Ad-GFP 对 SGC-7901 细胞的感染效率和细胞形态。结果如图 2 所示, 在荧光视野下, 10、25、50、100、200 MOI 不同剂量 Ad-GFP 感染 SGC-7901 细胞均可观察到绿色荧光, 在 50 MOI 剂量时感染效率可达 90%以上; 在普通光镜视野下, 10、25、50、100 MOI 不同剂量 Ad-GFP 感染 SGC-7901 细胞均贴壁生长良好, 无明显脱落、皱缩等病变, 与未感染腺病毒 SGC-7901 细胞对照组几乎无差别, 但在

200 MOI 时, SGC-7901 细胞呈现圆缩、脱落、皱缩等明显的由腺病毒本身引起的细胞毒性(由图 2 可见, 200 MOI 组虽然荧光强度较亮, 但贴壁生长细胞数目较其他组大为减少)结果表明 100 MOI 剂量腺病毒感染 SGC-7901 细胞呈很高的感染效率, 感染率可达 90% 以上, 且对细胞几乎无毒性, 提示 100 MOI 可作为腺病毒感染 SGC-7901 细胞的最佳感染剂量。

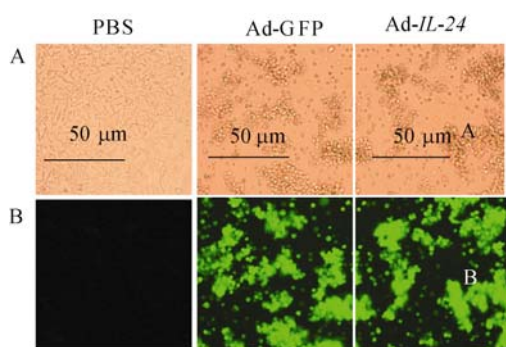


图 1 腺病毒感染后QBI-293A细胞荧光显微镜照片
Fig. 1 Fluorescence photographs of QBI 293A transduced with adenoviruses. (A) Light microscope. (B) Fluorescence microscope.

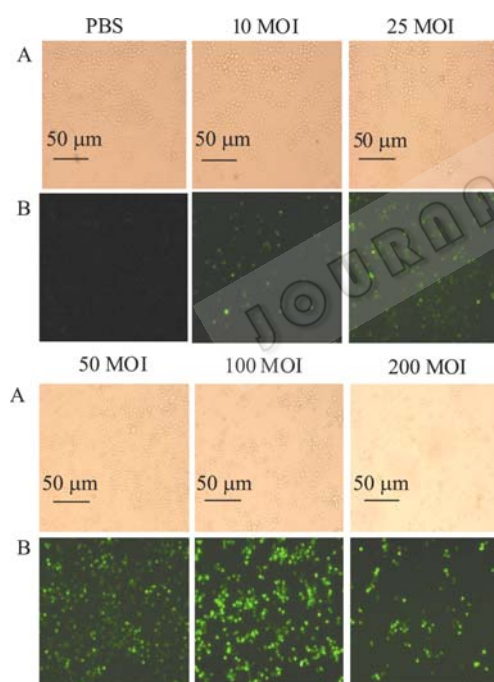


图 2 不同 MOI Ad-GFP 对 SGC-7901 细胞的毒性作用
Fig. 2 The cytotoxic effect of Ad-GFP on SGC-7901. (A) Light microscope. (B) Fluorescence microscope.

2.3 腺病毒介导的 *IL-24* 基因在 SGC-7901 细胞中的表达

用 100 MOI 剂量的 Ad-GFP 和 Ad-*IL-24* 分别感染 SGC-7901 细胞, 48 h 后收集细胞, 抽提总 RNA 和

裂解提取蛋白, 进行 RT-PCR 和 Western blotting 鉴定, 以检测 *IL-24* 基因在 SGC-7901 胃癌细胞中的表达。RT-PCR 结果显示(图 3A), Ad-*IL-24* 组出现 *IL-24* 和 β -actin 阳性电泳条带, 而 Ad-GFP 空载体腺病毒组和 PBS 组均只出现 β -actin 阳性电泳条带; Western blotting 检测结果显示 (图 3B), Ad-*IL-24* 组产生了与抗 *IL-24* 抗体结合的特异性条带, 而 Ad-GFP 组和 PBS 组则均未在相应位置上出现上述条带。结果表明腺病毒介导的外源性目的基因 *IL-24* 在 SGC-7901 细胞中能够成功转录和表达。

2.4 MTT 法检测 Ad-*IL-24* 对 SGC-7901 细胞的生长抑制作用

用 100 MOI 的 Ad-GFP 和 Ad-*IL-24* 感染 SGC-7901 细胞, MTT 检测 0~4 d 的细胞生长活力, 并绘制细胞生长曲线(图 4)。由图 5 可见 Ad-*IL-24* 对 SGC-7901 细胞具有明显的生长抑制作用, 其中第 4 天生长抑制率可达 40%, 与 Ad-GFP 组和 PBS 组相比呈显著性差异, 而 Ad-GFP 组和 PBS 组之间无显著性差异($P < 0.05$)。结果表明: 腺病毒介导的 *IL-24* 基因表达具有显著抑制 SGC-7901 胃癌细胞生长的作用。

2.5 Annexin-V-PE/7-AAD 双染 FCM 检测腺病毒介导 *IL-24* 基因对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

将 Ad-GFP、Ad-*IL-24* 以最佳感染剂量分别感染 SGC-7901 胃癌细胞, 72 h 后经 Annexin-V-PE/7-AAD 双染后流式细胞仪检测。结果显示, Ad-*IL-24* 组诱导 SGC-7901 细胞的凋亡率可达 22.07% 左右, 与 Ad-GFP 空载体腺病毒组和细胞对照组比较呈显著性差异($P < 0.05$)(图 6)。结果表明腺病毒介导的 *IL-24* 表达能明显诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡。

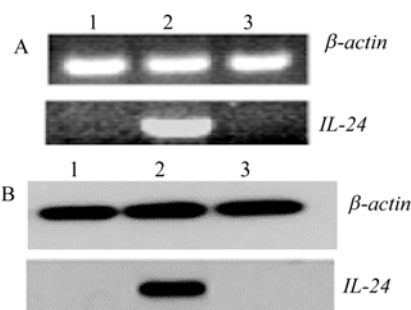


图 3 腺病毒介导 *IL-24* 基因在 SGC-7901 细胞中的表达
Fig. 3 Expression of *IL-24* in SGC-7901 cells infected with Ad-*IL-24*. (A) RT-PCR analysis transcriptional expression of *IL-24* in SGC-7901 cells. (B) Western blotting analysis expression of *IL-24* in SGC-7901 cells. 1: Ad-GFP group; 2: Ad-*IL-24* group; 3: PBS group.

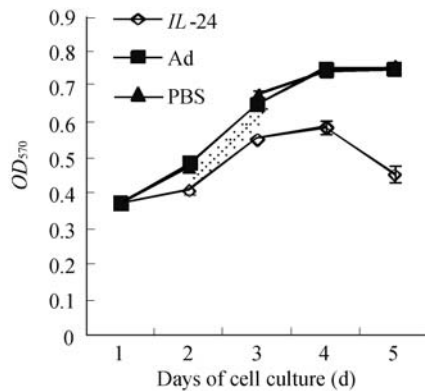


图4 Ad-IL-24 对 SGC-7901 细胞生长抑制作用曲线图

Fig. 4 Growth inhibiting curve chart of SGC-7901 cells transduced with Ad-IL-24.

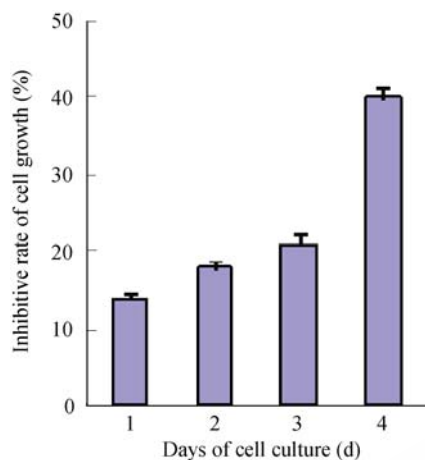


图5 Ad-IL-24 对 SGC-7901 细胞的生长抑制率

Fig. 5 Growth inhibiting ratio of SGC-7901 cells transduced with Ad-IL-24.

2.6 PI 流式细胞术检测 Ad-IL-24 对 SGC-7901 细胞所引起的周期变化

用 100 MOI Ad-IL-24 感染 SGC-7901 胃癌细胞, 并设空载体 Ad-GFP 及正常细胞作为对照, 72 h 经 PI 单染后流式细胞仪检测细胞周期的变化。由图 7 可见, Ad-IL-24 组能诱导 SGC-7901 细胞周期的 G2/M 期比例增加为 24.849%, 与 Ad-GFP 组的 14.504% 和细胞对照组的 12.460% 比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果表明腺病毒介导的 IL-24 基因表达, 能使 SGC-7901 胃癌细胞的生长周期发生改变, 且其周期阻滞主要发生在 G2/M 期。

2.7 Ad-IL-24 引发 SGC-7901 细胞的核形态学变化

SGC-7901 胃癌细胞分别用 100 MOI Ad-GFP 和 Ad-IL-24 感染, 72 h 用 Hoechst 核荧光染色和荧光显

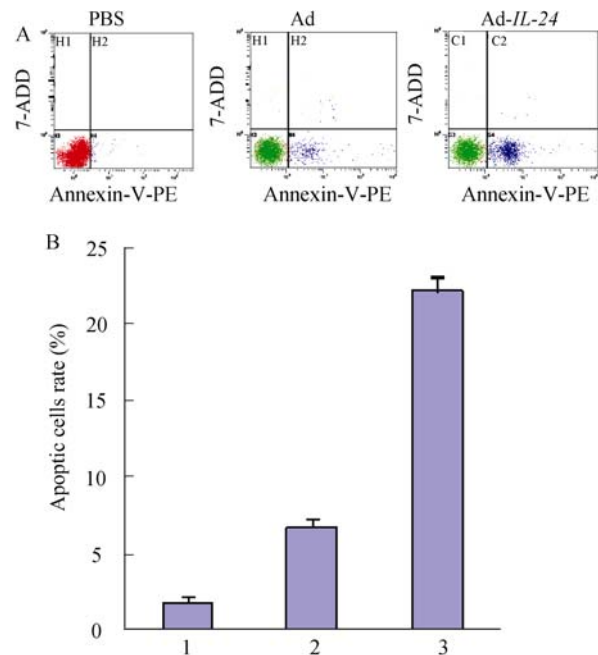


图6 流式细胞术检测 SGC-7901 细胞的凋亡率

Fig. 6 Apoptosis of SGC-7901 cells analysis by flow cytometry. (A) Apoptosis analysis using Annexin-V-PE/7-AAD double staining. (B) The apoptotic rate of SGC-7901 cells. 1: PBS group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-IL-24 group.

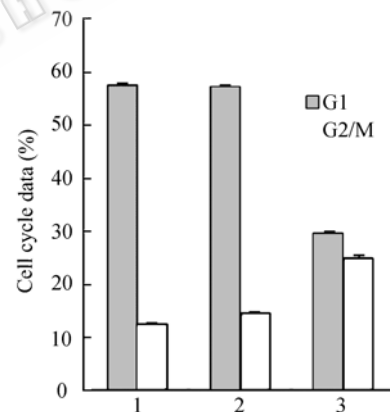


图7 流式细胞术检测 SGC-7901 细胞周期变化

Fig. 7 Cell cycle changes of SGC-7901 cells detected by flow cytometry. 1: PBS group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-IL-24 group.

显微镜检测细胞凋亡的核形态变化。由图 8 可见, Ad-IL-24 组的 SGC-7901 细胞核均出现深染、固缩, 甚至断裂, 呈现明显的细胞凋亡核形态特征, 而 PBS、Ad-GFP 组的细胞核形态正常, 未出现上述细胞凋亡的特征。该结果进一步表明, 腺病毒介导的 IL-24 基因表达具有诱导 SGC-7901 细胞凋亡的效应。

2.8 RT-PCR 检测 bcl-2、bax、caspase-3 和 p53 基因的转录情况

以 100 MOI 剂量的 Ad-GFP 和 Ad-IL-24 感染

SGC-7901 细胞 48 h 后, 收集细胞抽提总 RNA, RT-PCR 检测结果显示, 与 PBS 组和 Ad 组相比, Ad-IL-24 组可引起 SGC-7901 细胞中的 *bax*、*caspase-3* 和 *p53* 基因转录明显上调, 而 *bcl-2* 基因明显下调。结果表明 Ad-IL-24 抑制 SGC-7901 细胞生长并诱导其凋亡的分子机制可能与上调 *bax*、*caspase-3* 和 *p53* 基因表达和下调 *bcl-2* 基因表达有关。

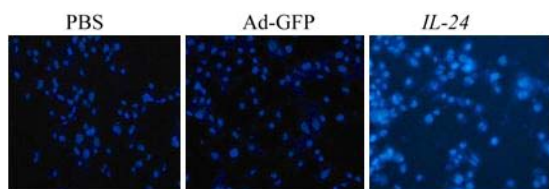


图 8 Hoechst 核荧光染色检测 SGC-7901 细胞凋亡的核形态特征

Fig. 8 Apoptotic body of SGC-7901 cells observed by Hoechst staining.

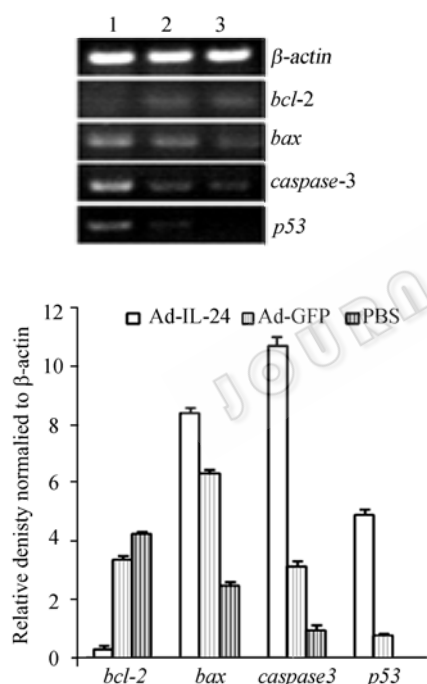


图 9 RT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中相关基因的表达

Fig. 9 Transcription of apoptosis-related genes in SGC-7901 cells detected by RT-PCR. 1: Ad-IL-24 group; 2: Ad-GFP group; 3: PBS group.

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率和病死率均列恶性肿瘤的前 2 位。对于胃癌的治疗, 目前临床常用的手段是手术切除, 手术治疗后

的患者, 1 期患者的 5 年生存率可达 90% 以上, 但对进展期患者的疗效并不理想, 2~3 期的 5 年存活率仅为 11%~40%^[2]。随着医学分子生物学的发展, 人们通过对肿瘤病因及分子机制的研究, 一致认为肿瘤是一种基因病, 治疗肿瘤的唯一出路应从基因着手, 不久的将来肿瘤基因治疗可为恶性肿瘤的有效治疗甚至治愈带来希望。

IL-24 需通过与 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2 结合形成受体复合物后才能转导信号^[14], 并可能通过以下几种机制来发挥抗肿瘤的效果: 1) Seaki 等^[15]研究发现, 经腺病毒介导的 IL-24 可特异增加 *p53* 表达, 后者又可上调 *bax*、*bak* 表达, 最终激活凋亡执行蛋白 Caspase-3; 2) 通过多种途径诱导肿瘤细胞凋亡; 3) IL-24 是一种新型的调节血管生成配体, 可以抑制血管内皮细胞分化进而抑制肿瘤血管形成^[15-16]; 4) IL-24 可通过激活 JAK/STAT 信号途径, 从而起到诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[17]; 5) 诱导细胞分化并干扰细胞周期^[18]。

本实验通过腺病毒介导 IL-24 基因(Ad-IL-24), 对 SGC-7901 胃癌细胞进行体外抑癌效应和分子机制的实验研究。RT-PCR 结果表明, 腺病毒介导的 IL-24 基因在 SGC-7901 细胞中可获得成功表达。MTT 和 FCM 检测结果表明, 腺病毒介导 IL-24 基因表达对 SGC-7901 细胞具有明显生长抑制和诱导细胞凋亡功能, 与 Ad 空载体组和 PBS 组相比有统计学意义。经 Hoechst 染色在荧光显微镜下观察了细胞凋亡典型的核形态改变, 进一步表明腺病毒介导的 IL-24 能诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡并引进核形态学改变。本实验研究了一些与细胞凋亡相关的基因及其调控的分子机制: 1) *bax* 基因, 其表达产物常以 *bax/bax* 同源二聚体形式来诱导细胞凋亡。2) *bcl-2* 基因又称抗凋亡基因, 其表达产物可增加细胞对多种促凋亡因素的抗性而延长细胞的生命, 与凋亡基因 *bax* 的产物形成异源二聚体 *bax/bcl-2* 而竞争抑制导致细胞凋亡的 *bax/bax* 同源二聚体形成。3) *caspase-3* 属于 ICE 家族成员, 具有胱氨酸蛋白酶的活性, 可促使细胞凋亡。现已证实的 *caspase* 激活途径有 2 种, 即死亡受体途径和线粒体途径, 在线粒体途径引起细胞凋亡的物质是线粒体中的细胞色素

C, 在凋亡早期, 细胞产生一种与凋亡有关的细胞因子, 称为细胞色素 C 凋亡交互因子(CIFA), 在此过程中 *bcl-2* 的过表达既可阻断 CIFA 的作用, 又可抑制线粒体中细胞色素 C 的释放及活化, 从而抑制凋亡, 而 *bax* 的过表达可促进线粒体中的细胞色素 C 的释放而导致细胞凋亡的发生。4) *p53* 基因属抑癌基因, 当 DNA 损伤时, *p53* 可阻滞细胞的 G1 期, 抑制细胞增殖, 直到 DNA 损伤完全修复如损伤未被修复则启动凋亡程序, 激活那些诱导凋亡的基因, 如 *bax* 等, 导致细胞凋亡。通过 RT-PCR 检测, Ad-IL-24 感染 SGC-7901 细胞后可使促凋亡基因 *bax*、抑癌基因 *p53* 和 *caspase-3* 的转录水平明显上调, 抗凋亡基因 *bcl-2* 的转录水平明显下调, 进而导致细胞凋亡, 说明 Ad-IL-24 抗肿瘤分子机制可能是通过上调 *bax/Bcl-2* 比值和 *p53* 基因表达水平促使 *Caspase-3* 活化进而诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗肿瘤效应。实验结果提示, Ad-IL-24 具有显著抗 SGC-7901 人胃癌细胞生长并诱导其凋亡的功能, 为 Ad-IL-24 对 SGC-7901 人胃癌细胞基因治疗的有效性及其作用的分子机制提供了可靠的实验依据。

REFERENCES

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, **55**(2): 74–108.
- [2] Yao JC, Mansfield PE, Pistersl PWT, *et al.* Combined modality the therapy for gastric cancer. *Semin Surg Oncol*, 2003, **21**(4): 223–227.
- [3] 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. *Oncogene*, 1995, **11**(12): 2477–2486.
- [4] Chada S, Sutton RB, Ekmekcioglu S, *et al.* Mda-7/IL-24 is a unique cytokine-tumor suppressor in the IL-10 family. *Int Immunopharmacol*, 2004, **4**(5): 649–667.
- [5] Lebedeva IV, emdad L, Su ZZ, *et al.* Mda-7/IL-24, novel anticancer cytokine: focus on bystander antitumor, radio sensitization and antiangiogenic properties and overview of the phase I clinical experience. *Int J Oncol*, 2007, **31**(5): 985–1007.
- [6] Huang EY, Madireddi MT, Fisher PB, *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. *Oncogene*, 2001, **20**(48): 7051–7063.
- [7] Xie YF, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Recombinant human IL-24 suppresses lung carcinoma cell growth via induction of cell apoptosis and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Biother Radio*, 2008, **23**(3): 310–320.
- [8] Ye ZM, Zhang SW, Yang JC, *et al.* The construction and identification of recombinant adenovirus vector of hIL-24. *Suzhou Univ J Med Sci*, 2006, **26**(1): 44–46.
叶震敏, 张颂文, 杨吉成, 等. 人白介素 24 腺病毒载体的构建和鉴定. 苏州大学学报(医学版), 2006, **26**(1): 44–46.
- [9] Wang XH, Wang JZ, Yang JC, *et al.* The study of the growth-suppression and mechanisms of Hepatocellular carcinoma tumor in nude Mice. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(6): 925–930.
汪小华, 王金志, 杨吉成, 等. 腺病毒介导 hIL-24 抑制裸鼠肝癌荷瘤生长及其机制研究. 生物工程学报, 2006, **22**(6): 925–930.
- [10] Zhu YH, Ye ZM, Yang JC, *et al.* Study of effects of rhIL-24 on the growth and angiogenesis of lung cancer A549 cell *in vitro*. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2006, **29**(3): 203–205.
朱晔涵, 叶震敏, 杨吉成, 等. 重组人白细胞介素 24 对肺癌 A549 细胞生长和肿瘤血管生成影响的实验研究. 中华结核和呼吸杂志, 2006, **29**(3): 203–205.
- [11] Pan XT, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Inhibition of pancreatic carcinoma growth by adenovirus-mediated human interleukin-24 expression in animal model. *Cancer Biother Radio*, 2008, **23**(4): 425–434.
- [12] Zhao XY, Sheng WH, Yang JC, *et al.* The tumor suppressing effects of rhIL-24 protein on B16 cells *in vitro* and *in vivo*. *Jiangsu Med J*, 2006, **32**(12): 1125–1128.
赵小瑜, 盛伟华, 杨吉成, 等. rhIL-24 对黑色素瘤 B16 细胞的体内抑瘤作用, 江苏医药, 2006, **32**(12): 1125–1128.
- [13] Shan YB, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Adenovirus mediated IL-24 gene expression inhibits growth of human glioma cell *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(2): 279–286.
单云波, 盛伟华, 杨吉成, 等. Ad-IL-24 对人胶质瘤细胞生长抑制效应的体外实验, 生物工程学报, 2009, **25**(2): 279–286.
- [14] Gupta P, Walter MR, Su ZZ, *et al.* BiP/GRP78 is an intracellular target for *mda-7/IL-24* induction of cancer-specific apoptosis. *Cancer Res*, 2006, **66**(16): 8182–8191.
- [15] Seaki T, Mhashilkar A, Swanson X, *et al.* Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated *mda-7* gene expression *in vivo*. *Oncogene*, 2002, **21**(29): 4558–4566.
- [16] Ramesh R, Mhashilkar AM, Tanaka F, *et al.* Melanoma differentiation associated gene 7/Interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulate angiogenesis via the IL-22 receptor. *Cancer Res*, 2003, **23**(16): 5105–5113.
- [17] Sauane M, Gopalkrishnan RV, Lebedeva I, *et al.* Mda-7/IL-24 induces apoptosis of diverse cancer cell lines through JAK/STAT independent pathways. *J Cell Physiol*, 2003, **196**(2): 334–345.
- [18] Madireddi T, Dent P, Fisher PB, *et al.* Regulation of *mda-7* expression during human melanoma differentiation. *Oncogene*, 2000, **19**(10): 1362–1368.