文章编号:1000-5404(2008)03-0229-04

论著

白介素-24 抑制胶质瘤细胞生长的体内外实验研究

王跃红[1],赵文清[1,2],李文玲[2],潘宝根[3],梁传栋[1],赵晓云[4] ([1]河北医科大学神经外科教研室,石家庄 050031;河北省人民医院:[2]功能神经外科,[3]神经外科,[4]临床研究中心,石家庄 050071)

摘 要:**目的** 探讨白介素-24 基因转染对胶质瘤生长的影响。**方法** 将载有人白介素-24 cDNA 的新型重组腺病毒(Ad5F35-IL24)感染人胶质瘤细胞系 U251,体外观察 Ad5F35-IL24 对该细胞系生长的影响;建立人胶质瘤动物模型,瘤内注射 Ad5F35-IL24,观察肿瘤生长情况;用流式细胞仪检测其凋亡和 Bax/Bcl-2 的表达情况。**结果** Ad5F35-IL24 感染 U251 细胞和肿瘤组织后,IL-24 蛋白高表达,U251 细胞和组织的生长受到明显抑制,其凋亡率明显升高,Bax/Bcl-2 也明显升高。**结论** 白介素-24 具有抑制人胶质瘤细胞系 U251 生长和诱导凋亡作用。Ad5F35-IL24 转导白介素-24 基因可能是一种有效的胶质瘤基因治疗途径。

关键词:白介素-24;基因治疗;胶质瘤;腺病毒感染
中图法分类号:R73-362;R730.264;R979.19 **文献标识码**:A

Interleukin 24 suppresses the growth of malignant glioma cells *in vitro* and *in vivo*

WANG Yue-hong[1], ZHAO Wen-qing[1,2], LI Wen-ling[2], PAN Bao-gen[3], LIANG Chuan-dong[1], ZHAO Xiao-yun[4] ([1]Department of Neurosurgery, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, [2]Department of Function Neurosurgery, [3]Department of Neurosurgery, [4]Clinical Research Center, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Objective To explore the potential use and the effect of adenovirus-mediated interleukin 24 gene (Ad5F35-IL24) therapy for malignant glioma. Methods After Ad5F35-IL24 was transfected into human malignant glioma cell line U251, we observed the growth of U251 cells. Ad5F35-IL24 was injected into tumor nodules of BALB/c mouse models of human glioma, and the tumor growth was observed. The apoptosis of tumor cells and their Bax/Bcl-2 expressions were detected with flow cytometer. Results The expression of IL-24 proteins were expressed highly after transfection of Ad5F35-IL24. The growth of U251 cells and xenograft tumors was suppressed obviously, and their apoptosis and Bax/Bcl-2 expression were significantly elevated. Conclusion IL-24 induces growth suppression and apoptosis in human glioma cells U251. Adenovirus-mediated IL-24 gene therapy is a potential effective approach in the treatment of malignant glioma.

Key words: IL-24; gene therapy; glioma; adenovirus infection

恶性胶质瘤是一种最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,常规治疗的效果均不理想,目前还没有有效的治疗方法。近年来,随着分子生物学、分子遗传学的发展,基因治疗的研究发展较快,为恶性胶质瘤的治疗开辟了新的道路。白介素-24(interleukin-24,IL-24)是白介素-10 细胞因子家族中的新成员,最初发现 IL-24 基因在终末分化的人类黑色素瘤中高度表达,因此也被称为黑色素瘤分化相关因子-7(melanoma differentiation-associated gene-7,mda-7)基因[1]。有研究表明,IL-24 对人多种肿瘤细胞(如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等)均有选择性抑制作用[2-9],因此,IL-24 成为基因治疗的候选基因。

本研究应用载有 IL-24 基因的新型重组腺病毒(Ad5F35-IL24)感染人胶质瘤细胞系 U251,观察 IL-24 基因对胶质瘤细胞在裸鼠体外和体内的影响,探讨 IL-24基因对胶质瘤细胞的治疗作用及其可能的作用机制。

基金项目:河北省自然科学基金(C2004000671)
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2004000671)
作者简介:王跃红,男,河南省孟县人,博士研究生,主治医师,主要从事胶质瘤基因治疗方面的研究。电话:(0311)85988007,E-mail:wyh-0518@126.com
通信作者:赵文清,电话:(0311)85989666,E-mail:wenqingzhao@163.com
收稿日期:2007-09-03 修回日期:2007-12-01

1 材料与方法

1.1 材料

载有 IL-24 基因的重组腺病毒(Ad5F35-IL24)及对照病毒 Ad5F35-EGFP 由北京市本元正阳基因技术有限公司提供,Ad5F35-IL24 病毒滴度为 2.8×10^9 PFU/ml,Ad5F35-EGFP 病毒滴度为 5.8×10^9 PFU/ml;人胶质瘤细胞株 U251 购自中国科学院上海细胞生物学研究所,细胞在 DMEM 培养基传代培养。鼠抗人 GFAP 抗体、S-P 免疫组化试剂盒及显色剂购自美国 ZYMED 公司,噻唑蓝(MTT)、DMEM 和 F12-DMEM 培养基购自 Sigma 公司,Bax、Bcl-2 和 IL-24 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

实验动物:BALB/c 裸鼠,共 18 只,雄性,4 周龄,体质量 14~18 g,购于北京大学实验动物学部,许可证编号:SIXK(京)2006-2008。裸鼠饲养于白求恩国际和平医院动物饲养室,动物实验时严格执行无菌操作。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养、纯化、鉴定 人星形胶质细胞原代培养的胎脑取自河北省人民医院妇产科引产的胎儿(胎龄 5 个月),引产后征得产妇同意(已签知情同意书),于胚胎死亡 1 h 内取材。无菌条件下于胚胎前囟对应的大脑皮质内取材,经漂洗、消化、过滤、离心等一系列步骤后,于孵箱中进行培养。24 h 后换液继续培养。培养 8 d 后,以 0.25% 胰酶消化并重新贴壁,2 h 后弃去悬浮细胞;之后每隔 3~4 d 重复上述消化步骤 1 次,约 14 d[10]。

以星形胶质细胞特异性标志胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达与否作为鉴定指标之一。免疫组化采用 S-P 法,按说明书进行操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以细胞质内出现明确棕黄色反应判定为阳性结果。

1.2.2 IL-24 转染 U251 及人脑星形胶质细胞 用 PBS 和 Ad5F35-EGFP 作空白和阴性对照,转染时间都在细胞传代后 6 h,细胞贴壁生长后加入病毒感染液,继续孵育 2 h 后弃去病毒感染液,接着加入新鲜培养基继续培养。在培养的第 2、3、4 天用 Western blot 检测 IL-24 蛋白在细胞中的表达。

1.2.3 MTT 法检测病毒滴度与细胞存活的关系 将常规培养 48 h 呈指数生长期的 U251 胶质瘤细胞制成单细胞悬液,计数并调整细胞数为 $1\times10^5\,ml^{-1}$,以 100 μl/孔接种于 96 孔板,培养 6 h,当细胞贴壁生长后,吸去培养液,分别加入 PBS、含 Ad5F35-IL24 分别为 10^5、5×10^5、10^6、2×10^6、5×10^6、10^7 PFU/ml的 PBS 各 100 μl,继续孵育 2 h 后弃去病毒感染液,加入新鲜培养基,继续培养 72 h 后加入 MTT(5 mg/ml)20 μl,接着再培养 4 h,随后在 560 nm 波长下测定各孔的吸光度值[D(560)],最后以抑制率为纵坐标,以时间(d)为横坐标绘制生长抑制曲线图,并计算抑制率:抑制率(%) = [空白对照组 D(560) - 实验组 D(560)]/空白对照组 D(560) × 100%。实验均重复 3 次。

1.2.4 台盼蓝染色绘制细胞生长曲线 将常规培养 72 h 呈指数生长期的 U251 和人胎脑星形胶质细胞,制成单细胞悬液,计数并调整细胞数分别为 $6\times10^4\,ml^{-1}$ 和 $2\times10^4\,ml^{-1}$,以 500 μl 接种于 24 孔板,培养 6 h。当细胞贴壁生长后,吸去培养液,分别加入 PBS(空白对照)、含 Ad5F35-IL24(10^6 PFU/ml)、Ad5F35-EGFP(10^6 PFU/ml)的 PBS 各 500 μl,继续孵育 2 h 后,弃去病毒感染液,加入新鲜培养基,继续培养 24~96 h,每天计数 1 次,每次每组计数 4 孔,到感染后第 5 天为止,绘制生长曲线。细胞计数用台盼蓝+冰醋酸活细胞计数法。实验均重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 分别取按 1.2.4 方法处理 72 h 的 PBS 组、Ad5F35-IL24 组、Ad5F35-EGFP 组的 U251 细胞和人胎脑星形胶质细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,各加入 1 ml 的 PBS 重新悬浮细胞并计数,制成约 $1\times10^6\,ml^{-1}$ 的单细胞悬液 0.5 ml,迅速加入到 4 ml 70% 的冷乙醇中,充分混匀,4 ℃下固定 24 h,用流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.6 流式细胞仪检测各组 U251 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 同 1.2.5 处理细胞,然后加入鼠抗人 Bcl-2 或 Bax 单克隆抗体工作液 0.1 ml,室温孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次,再加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100 μl,避光室温孵育 30 min,加入 PBS 离心洗涤,然后上机检测。以荧光指数(FI)表示蛋白表达的相对含量,FI = 样品蛋白表达的平均荧光强度/正常对照样品的平均荧光强度。如果 FI > 1.0 为阳性表达,FI ≤ 1.0 为阴性表达。

1.2.7 裸鼠人胶质瘤模型的建立 将处于对数生长期的 U251 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,用无菌 PBS 液重悬制成 $5\times10^7\,ml^{-1}$ 的单细胞悬液,每只裸小鼠于右侧背部皮下接种 0.2 ml 细胞悬液,每天观察各注射点有无红肿、破溃并测量肿瘤大小,约 40 d 肿瘤生长至 200 mm^3 大小。

1.2.8 Ad5F35-IL24 对裸鼠荷瘤的生长抑制作用 荷瘤裸鼠的肿瘤生长至约 200 mm^3 时,分为 3 组,于肿瘤内分别注射 0.02 ml 的 PBS 液、含有 5×10^7 PFU/ml 的 Ad5F35-IL24 或 Ad5F35-EGFPA 的 PBS。每隔 2 d 注射 1 次,共注射 3 次,每天测量肿瘤体积并计算抑瘤率。抑瘤率 = (阴性对照组相对体积 - 实验组相对体积)/阴性对照组相对体积 × 100%。取瘤组织用 Western blot 方法检测各组 IL-24 蛋白表达情况。

1.2.9 流式细胞仪检测各组肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 将组织剪碎后,轻搓组织块,边搓边用生理盐水冲洗,然后过滤,离心制成单细胞悬液,接着同 1.2.6 处理细胞,然后上机检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,对肿瘤体积、细胞数和 Bcl-2/Bax 值进行单因素方差分析;对细胞凋亡率进行 χ^2 检验,对 Bcl-2 和 Bax 的 FI 值进行两独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 人胎脑星形胶质细胞形态学观察

倒置显微镜下观察,细胞于 24 h 开始贴壁并伸出突起,以梭形或多角形细胞为主,有的体积大。反复消化贴壁筛选之后,细胞形态逐渐变得较单一,呈梭形或星形,突起较长,细胞质丰富,核大,境界清楚。染色质浅、均匀,有 1~2 个核仁,居于核中央。

2.2 胶质细胞免疫细胞化学染色

GFAP 是星形胶质细胞的骨架蛋白,为星形胶质细胞所特

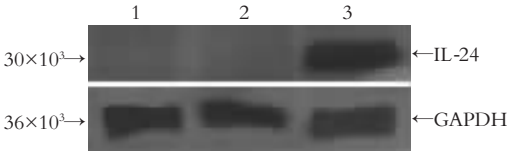
有，可作为成熟星形胶质细胞的标志物。对培养的胶质细胞进行 GFAP 免疫荧光检测显示绝大多数细胞为 GFAP 阳性，说明培养的细胞是星形胶质细胞。见图 1。



图 1　培养的星形胶质细胞 GFAP 免疫组化观察　（S-P ×200）

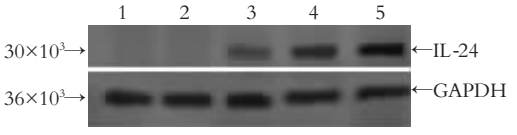
2.3　Western blot 法检测各组细胞 IL-24 蛋白表达情况

在 Ad5F35-IL24 感染的人胎脑星形胶质细胞、U251 细胞中都有 IL-24 蛋白高表达，而用 PBS 液和 Ad5F35-EGFP 感染的各组细胞中都缺乏 IL-24 蛋白的表达。而且，在用 Ad5F35-IL24 感染 U251 细胞的 2、3、4 d 时，IL-24 蛋白的表达逐渐增加，见图 2、3。



1：空白对照组；2：Ad5F35-EGFP 组；3：Ad5F35-IL24 组

图 2　Western blot 法检测人胎脑星形胶质细胞 IL-24 蛋白的表达



1：空白对照组；2：Ad5F35-EGFP 组；3－5：分别为 Ad5F35-IL24 组转染 2、3、4 d

图 3　Western blot 法检测 U251 细胞 IL-24 蛋白的表达

2.4　病毒滴度与细胞存活的关系

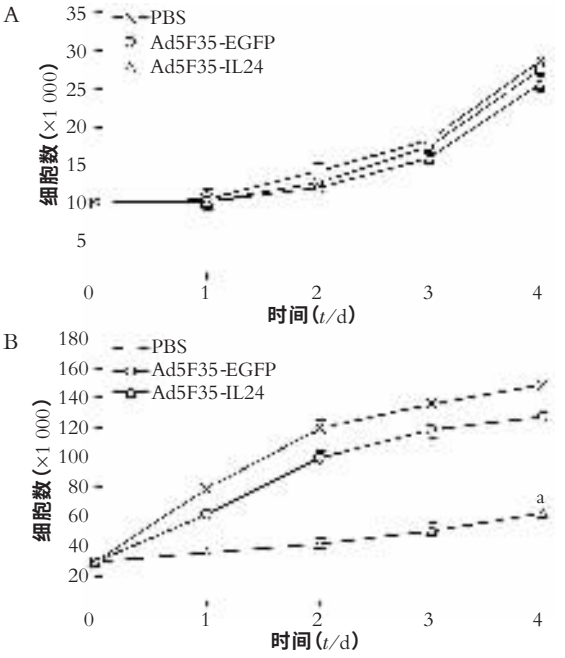
与 PBS 组相比，Ad5F35-IL24 对 U251 细胞有明显抑制作用，且随着病毒滴度的增加，外源性 IL24 蛋白对细胞的抑制作用逐渐增强（当病毒滴度为 10^5、10^6、10^7 PFU/ml 时，其细胞杀伤率为 6.7%、29.3%、72.0%）。

2.5　胶质细胞和 U251 细胞生长曲线

从图 4 我们观察到：Ad5F35-IL24 对人胎脑星形胶质细胞的生长曲线影响不大（$P>0.05$），但在 U251 细胞则有明显的抑制作用（$P<0.01$）。

2.6　流式细胞仪检测细胞凋亡率

人胎脑星形胶质细胞的各组凋亡率（PBS、Ad5F35-EGFP 和 Ad5F35-IL24 分别为 1.71%、1.85% 和 1.27%）间的差别不显著（$P>0.05$），而在 U251 细胞的各组凋亡率中（PBS、Ad5F35-EGFP 和 Ad5F35-IL24 的凋亡率分别为 0.95%、0.70% 和 7.64%），Ad5F35-IL24 组凋亡率明显升高（$P<0.05$）。



a：$P<0.01$，与 Ad5F35-EGFP 组比较

A：原代人胎脑星形胶质细胞；B：U251 细胞

图 4　PBS、Ad5F35-EGFP 和 Ad5F35-IL24 对原代人胶质细胞和人胶质瘤细胞 U251 增殖曲线的影响

2.7　流式细胞仪检测各组 U251 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

Ad5F35-IL24 组的 Bcl-2 的荧光指数（FI）值（0.74）明显低于 Ad5F35-EGFP 组（FI）值（1.04）（$P<0.05$）。而且，Ad5F35-IL24 组的 Bax/Bcl-2 值（1.58）明显高于 Ad5F35-EGFP（1.17）（$P<0.05$）。

2.8　Ad5F35-IL24 对裸鼠荷瘤生长的抑制作用

荷瘤裸鼠的瘤体内注射 PBS 和 Ad5F35-EGFP 后，体积仍持续增大，相反，注射 Ad5F35-IL24 后肿瘤的生长即受到十分明显的抑制（表 1）。

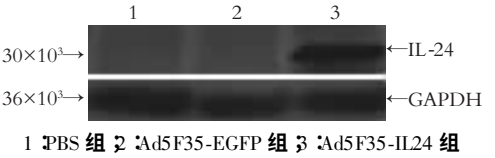
表 1　Ad5F35-IL24 对 U251 裸鼠荷瘤的生长抑制作用

组别	肿瘤数	最终肿瘤体积（V/mm³，$\bar{x}\pm s$）	抑瘤率
PBS	5	630.40 ± 43.35	
Ad5F35-EGFP	5	685.74 ± 38.32	
Ad5F35-IL24	5	236.41 ± 46.24[a]	65.5%

a：$P<0.01$，与 Ad5F35-EGFP 组比较

2.9　Western blot 法检测各组 IL-24 蛋白表达情况

只有 Ad5F35-IL24 组的肿瘤组织有 IL-24 蛋白的表达。见图 5。



1：PBS 组；2：Ad5F35-EGFP 组；3：Ad5F35-IL24 组

图 5　Western blot 法检测 IL-24 蛋白在肿瘤组织中的表达

2.10　流式细胞仪检测各组肿瘤组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

Ad5F35-IL24 组的 Bax 的荧光指数（FI）值（1.22）明显高于

Ad5F35-EGFP 组(0.94)($P<0.05$)。而且,Ad5F35-IL24 组的 Bax/Bcl-2 值(1.35)明显高于 Ad5F35-EGFP 组(0.98)($P<0.05$)。

3 讨论

在成年人中,恶性胶质瘤是最主要的原发脑肿瘤,尽管近几年,手术、放疗和化疗取得了很大的进步,但恶性胶质瘤的预后还是没有很大的改善,迫切需要新的治疗方式来改善它的预后。近几年,基因治疗有了很大的进展,特别是对于恶性胶质瘤,因为它常常是局部复发,而很少转移到其他器官,这使得基因治疗有更大的应用前景。然而,为了使得基因治疗更有效,更有针对性,我们必须选取一种能选择性杀伤癌细胞,而不损伤其他正常细胞的基因。近几年,IL-24 基因脱颖而出,研究者们陆续发现它对许多肿瘤细胞有选择性杀伤作用,同时关于其抗癌机制的探讨也成了研究的热点。IL-24 基因的抗癌机制有的研究认为是通过 p38MAPK 途径激活生长抑制和 DNA 损伤基因家族中基因实现的[11,12] 有的研究则认为是诱导并活化双链 RNA 依赖性蛋白激酶,从而诱导凋亡[13] 还有的研究认为是抑制并减少肿瘤的新生血管[3]。

本实验通过应用增殖能力缺陷的新型重组腺病毒作载体,介导 IL-24 基因,对裸鼠胶质瘤细胞进行了体外和体内的研究,新型重组腺病毒载体不仅出毒快、稳定性好、产率高,而且感染细胞的范围更广、感染效率更高、外源基因表达量更多,包装系统高效且稳定,是目前最方便快捷的腺病毒(Ad5F35)包装系统。通过 Western blot 法检测也证实,Ad5F35-IL24 感染 U251 细胞和肿瘤组织后 IL-24 蛋白可高表达。我们观察到 IL-24 对人胎脑星形胶质细胞的增殖影响较轻,但对 U251 细胞的增殖则在体外和体内的抑制都很明显,经 Ad5F35-IL24 注射的肿瘤结节生长受到了明显的抑制,肿瘤抑制率达 62.5%。通过流式细胞仪的分析,我们看到 IL-24 作用后的 U251 细胞的凋亡率明显高于相应的 Ad5F35-EGFP 组和 PBS 组,而对于人胎脑星形胶质细胞,则其各组凋亡率之间没有明显差别,说明 IL-24 有选择性抑制人胶质瘤细胞系 U251 生长的作用。通过免疫荧光标记 Bax 和 Bcl-2,我们看到:IL-24 作用后的 U251 细胞和肿瘤组织其促凋亡蛋白 Bax 的表达明显上升,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则是明显下降,故其 Bax/Bcl-2 明显升高。考虑其促凋亡作用显然与 Bax/Bcl-2 的升高有关。因此我们有理由认为:IL-24 很可能是通过诱导 Bax/Bcl-2 升高而介导凋亡,从而抑制 U251 细胞的生长。体内实验还显示:Ad5F35-IL24 确实能将 IL-24 基因转染入肿瘤组织内,并能产生明显的治疗效果,说明 Ad5F35-IL24 实体瘤局部注射是可取的治疗方案。

本实验经裸鼠体外和体内实验初步证实:白介素-24具有选择性抑制人胶质瘤细胞系 U251 生长和诱导凋亡作用,其诱导凋亡作用又与促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例升高有关。Ad5F35-IL24 转导白介素-24 基因可能是一种有效的胶质瘤基因治疗途径。

参考文献:

[1] Jiang H, Lin J J, Su Z Z, *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] Lebedeva I V, Su Z Z, 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.

[3] Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, *et al*. Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression *in vivo*[J]. Oncogene, 2002, 21(29):4558-4566.

[4] Gopalan B, Litvak A, Sharma S, *et al*. Activation of the Fas-FasL signaling pathway by MDA-7/IL-24 kills human ovarian cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(8):3017-3024.

[5] Nishikawa T, Munshi A, Story M D, *et al*. Adenoviral-mediated mda-7 expression suppresses DNA repair capacity and radiosensitizes non-small-cell lung cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(42):7125-7131.

[6] Lebedeva I V, Sarkar D, Su Z Z, *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.

[7] Lebedeva I V, Su Z Z, 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.

[8] Saito Y, Miyahara R, Gopalan B, *et al*. Selective induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells through adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated-7(mda-7)/interleukin-24(IL-24) gene[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3):238-247.

[9] Sieger K A, Mhashilkar A M, Stewart A, *et al*. The tumor suppressor activity of MDA-7/IL-24 is mediated by intracellular protein expression in NSCLC cells[J]. Mol Ther, 2004, 9(3):355-367.

[10] 殷育松,卢佳友,王如善,等. 人胎脑星形胶质细胞原代分离培养及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17):1596-1597.

[11] 张 恒,周占松,刘丽梅,等. P 物质刺激下脊髓星形胶质细胞活化中磷酸化 P38 丝裂素活化蛋白激酶和 c-fos 的表达及作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21):2163-2166.

[12] 倪 峰,李红伟,杨 波. 人脑胶质瘤组织中 PTEN 与 VEGF 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(5):945-946.

[13] Pataer A, Vorburger S A, Barber G N, *et al*. Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells *via* up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)[J]. Cancer Res, 2002, 62(8):2239-2243.

(编辑 陈聪连)