浙江理工大学学报，第 28 卷，第 2 期，2011 年 3 月
Journal of Zhejiang Sci-Tech University
Vol. 28, No. 2, Mar. 2011

文章编号：1673-3851 (2011) 02-0230-05

增殖型溶瘤腺病毒 SG511-pHSP70-IL24 体外杀伤肝癌细胞的研究

王　芳[1]，刘　辉[2]，周秀梅[1]，钱其军[1,2]

（1. 浙江理工大学生命科学学院，杭州 310018；2. 第二军医大学东方肝胆外科医院，上海 200438）

摘　要：研究溶瘤腺病毒 SG511 携带由热激蛋白 70(*hsp*70)启动子调控 *IL*-24 构成的增殖型溶瘤腺病毒 SG511-pHSP70-IL24 对人肝癌细胞株的体外杀伤效果。实验采用 ELISA 法检测不同 MOI 值感染肝癌细胞 SMMC-7721 和 Hep3B 细胞 3 d 后 IL-24 的表达；MTT 法检测 SG511、Ad11-IL24 以及 SG511-pHSP70-IL24 对肝癌细胞株 SMMC-7721、Hep3B 以及人正常成纤维细胞株 MRC-5 及 BJ 增殖的抑制作用；并通过结晶紫实验检测进一步证明联合用药对肿瘤细胞的杀伤情况。ELISA 检测到 SG511-pHSP70-IL24 感染 SMMC-7721 和 Hep3B 细胞后，IL-24 有明显表达；MTT 实验结果表明 SG511-pHSP70-IL24 对肿瘤细胞的杀伤能力比 SG511 和 Ad-IL24 更强。同时结晶紫实验也证明了 SG511-pHSP70-IL24 对肿瘤细胞的杀伤能力比 SG511 和 Ad-IL24 更强。增殖型溶瘤腺病毒 SG511-pHSP70-IL24 相比腺病毒 Ad11-IL24 以及 SG511，对肝癌细胞有较明显的生长抑制和凋亡诱导作用。

关键词：增殖型腺病毒；肝癌细胞；SG511；*hsp*70；IL-24

中图分类号：Q789　　**文献标识码**：A

0　引　言

在世界范围内，肝癌由于其高发病率、低治愈率和快速转移率而成为目前最严重的癌症之一，且肝癌的发病率有连年增长的趋势。然而，目前对于肝癌还缺乏非常有效的疗法[1]，因此，探寻更有效的肝癌治疗方案显得极为迫切。其中肿瘤的生物疗法尤其是肿瘤的基因病毒治疗由于其无可比拟的优越性，越来越受到研究者的青睐。

癌症的靶向基因——病毒疗法有机地融合了肿瘤的病毒疗法和基因治疗，利用溶瘤病毒携带外源性治疗基因，在溶瘤病毒特异性增殖、裂解肿瘤细胞的同时，病毒所携带的抗癌基因的拷贝数也随病毒的复制增加，从而大大提高抗癌基因的表达量[2]。本实验室构建的 SG511 病毒是分别用端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子和缺氧反应元件(HRE)启动子调控 *E*1*a* 和 *E*1*b* 基因表达，同时含有 Ad11 型 *fiber* 和 *shaft* 的新型腺病毒，它能够在肿瘤细胞中特异性增殖而对正常细胞无影响。肿瘤的靶向基因-病毒治疗成功与否除取决于病毒载体的改造构建外，治疗基因的选择也是另一个关键因素，采用何种功能基因杀伤肿瘤细胞同样十分重要[3]。IL-24 最早发现于 1995 年[4]，具有多种独特的抗肿瘤作用，已有的体内外实验及临床实验均证实了 IL-24 显著的靶向性抗肿瘤效果[5]，相信随着其诱导肿瘤细胞凋亡机制的深入研究，IL-24 的应用前景将会更加广阔。因此，本实验应用 IL-24 作为外源治疗基因，同时采用本课题组构建的双靶向溶瘤腺病毒载体 SG511 携带 IL-24 基因，以增强 IL-24 治疗肿瘤的效果。热休克蛋白可使细胞产生损伤的各种物理和化学因素产生反应导致表达量升高，因此，它们也被称为“应激蛋白”[6]。热激蛋白家族共有 21 种蛋白质，目前按

收稿日期：2010－01－26

基金项目：国家自然科学基金重点项目(30730104)；浙江省自然科学基金重点项目(Z205618)

作者简介：王　芳(1985－)，女，山东济南人，硕士研究生，主要从事肿瘤的靶向基因治疗的研究。

通讯作者：钱其军，电子邮箱：qianqj @163. com

相对分子量以及同源程度可分为 *HSP*90、*HSP*70、小分子 *HSP* 和泛素 4 个家族[7]。研究发现,人的 *hsp*70 基因是一个很好的细胞调节基因,在腺病毒感染后,它能够调控细胞生长,并能够被诱导表达[8]。因此,可以将 *hsp*70 启动子作为调控 *IL*-24 表达的元件插入腺病毒载体 SG511 中。

本研究旨在依据此策略构建出一种双靶向治疗肿瘤的增殖型腺病毒载体 SG511-pHSP70-IL24,通过体外实验评估该病毒选择性杀伤肝癌细胞的能力,并对其抗肿瘤机制进行初步探讨。期望本课题的研究可以提供一种新型的高效治疗肿瘤的药物,以期为人类最终遏制肿瘤带来新的希望。

1　材料与方法

1.1　材料

SG511-pHSP-70-IL24,Ad11-IL24,SG511 为本实验室构建并保存;人肝癌细胞株 Hep3B、SMMC-7721 和人正常成纤维细胞 BJ 和 MRC-5 均由本实验室保存;四氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司;结晶紫购自美国 Ameresco 公司;所有细胞都在 5% CO_2,37℃培养条件下培养,培养液为 Hep3B、BJ、MRC-5 用含 10%FBS 的 MEM,SMMC-7721 用含 10%FBS 的 RPMI1640。

1.2　方法

1.2.1　ELISA 法检测 IL-24 的表达量

对数生长期细胞 SMMC-7721 和 Hep3B,消化,重悬稀释;SMMC-7721 肝癌细胞和 Hep3B 细胞 5×10^5 个/孔,铺六孔板,37℃,5% CO_2 的孵箱内培养 24 h,换用无血清培养液,按 MOI=5,10 加入病毒 SG511-pHSP70-IL24,十字法摇匀;轻摇,2 h 后换 5%血清培养液;37℃,5%CO_2 的孵箱内培养 3 d。按照 ELISA 试剂盒提供的步骤,进行实验,最后的结果计算:以标准品 A 值对标准品浓度做曲线,并以待检品 A 值带入曲线方程计算出相应的含量。

1.2.2　MTT 法分析联合处理对肝癌肿瘤细胞株的体外杀伤效率

根据预试验测定的细胞生长速率(倍增时间),将对数生长期的肝癌细胞 Hep3B、SMMC-7721 和正常细胞 BJ 和 MRC-5 按 1×10^4 个/孔密度种入 96 孔培养板,每孔加 100 μL 培养基。37℃ 5% CO_2 温箱中培养 24 h 后分别对细胞换用无血清培养液,按不同的 MOI 分别加入病毒 SG511、AD11-IL24、SG511-pHSP-70-IL24,十字法摇匀,2 h 后换用 5%血清培养液。实验中设不加病毒组(对照组),同时设置不加细胞的空白孔(调零用)。37℃ 5% CO_2 培养 7 d 之后,每孔加 MTT(5 mg/mL)110 μL,置于 37℃继续培养 4 h。小心吸弃上清液,加入二甲基亚砜(DMSO),水平摇床震荡 10 min 使细胞内蓝紫色结晶充分溶解,在酶标仪上测定 570 m 波长处的吸光值(A_{595})。按公式(1)计算对肿瘤细胞杀伤作用:

$$\text{肿瘤细胞存活率}=\frac{\text{处理组 } A_{595}-\text{空白组 } A_{595}}{\text{对照组 } A_{595}-\text{空白组 } A_{595}}\times100\% \quad (1)$$

1.2.3　结晶紫分析方法进行细胞毒性分析实验(CPE 实验)

将肿瘤细胞 Hep3B,SMMC-7721 和正常细胞 BJ 和 MRC-5 按 5×10^4 个/孔的密度植入 24 孔板中,每孔加入 1 mL 的培养基。24 h 后对细胞换用无血清培养液,按 MOI=0、0.01、0.1、1、10、100 分别加入病毒 SG511、AD11-IL24、SG511-pHSP70-IL24,十字法摇匀,2 h 后换用 5%血清培养液,37℃,5% CO_2 孵箱培养 7 d,每日观察细胞的生长情况,7 d 后吸掉细胞培养液,每孔加入 500 μL 结晶紫染色液(2%结晶紫溶于 20%甲醇),室温染色 15 min,在纯水中充分洗涤掉多余染液后拍照记录。

1.2.4　统计学处理

统计学软件采用 Excel 2003,所有定量实验均重复 3 次,各组数据以"均值±标准差"表示。

2　结　果

2.1　ELISA 法检测 IL-24 的表达量

如表 1 所示,病毒 SG511-pHSP70-IL24 以不同 MOI 值(MOI=5,10)感染 SMMC-7721 和 Hep3B,感染 7 d 后,ELISA 检测了 SMMC-7721 和 Hep3B 细胞中 IL-24

表 1　SG511-pHSP70-IL24 在细胞 SMMC-7721 和 Hep3B 中 IL-24 的表达量　μg/mL

SG511-pHSP70-IL24	MOI=5	MOI=10
SMMC-7721	1.06±0.29	3.35±0.62
Hep3B	1.24±0.37	3.56±0.59

蛋白的表达量。结果显示,IL-24 在 SMMC-7721 和 Hep3B 中表达量均很高,并且在 MOI 为 10 时比 MOI 为 5 时的表达量要高,呈剂量依赖性。

2.2 MTT 法检测 SG511-pHSP70-IL24、SG511、Ad11-IL24 感染后对肿瘤细胞的存活率影响

MTT 法处理 7 d 后,如图 1 所示:与 Ad11-IL24,SG511 相比,增殖型溶瘤腺病毒 SG511-pHSP70-IL24 对肝癌细胞 SMMC-7721 和 Hep3B 的杀伤能力显著提高,在细胞 50%杀伤作用时,SG511-pHSP70-IL24 比 SG511 和 Ad-IL24 的杀伤能力高。而对于正常细胞 BJ 和 MRC-5,SG511-pHSP70-IL24 则没有增加对正常细胞的毒副作用,可见 SG511-pHSP70-IL24 实现了安全性和有效性的统一。

图 1 MTT 法分析 3 种病毒 SG511-pHSP70-IL24、SG511、Ad11-IL24 对 4 种细胞的杀伤

2.3 结晶紫实验评价 SG511-pHSP70-IL24 对肿瘤细胞和正常细胞的毒性

为更进一步检测 SG511-pHSP70-IL24 对肿瘤细胞的杀伤效果以及对正常细胞的毒性,将细胞分别感染不同 MOI 值 SG511-pHSP70-IL24、SG511、Ad11-IL24,7 d 后,用结晶紫染色进行分析。从直接的细胞形态学观察和结晶紫染色测定的 CPE 实验可以检测到病毒对肿瘤细胞的杀伤性。如图 2 所示:正常纤维细胞 BJ 和 MRC-5 对 SG511、Ad11-IL24 及 SG511-pHSP70-IL24 的敏感性均很弱;在被测定的肿瘤细胞中,SG511-pHSP70-IL24 比 SG511、Ad11-IL24 对肝癌细胞株 SMMC-7721 和 Hep3B 的杀伤效果好,展示了其良好的肿瘤治疗应用前景。

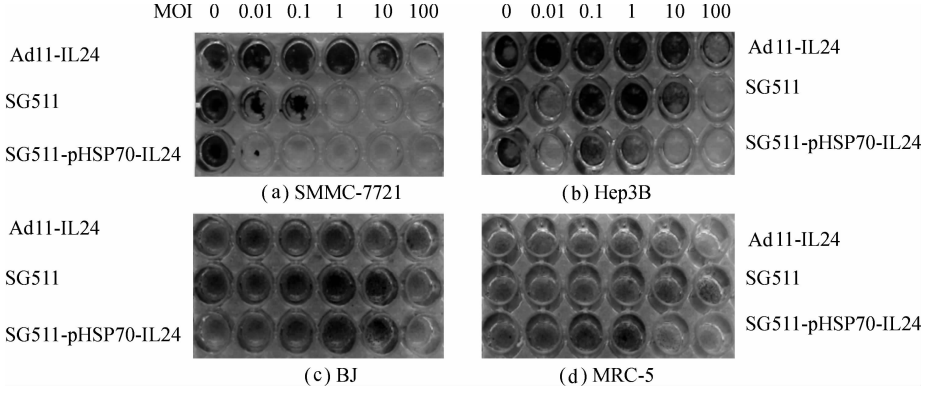

图 2 结晶紫实验检测 3 种病毒 SG511-pHSP70-IL24、SG511、Ad11-IL24 对细胞毒性

3 讨　论

增殖型病毒又称为肿瘤特异性增殖型病毒,多用于肿瘤的治疗,它能利用肿瘤与正常组织及细胞间结构或代谢途径上的差异,使病毒可以特异性地靶向肿瘤细胞内复制、增殖,大量表达目的基因并最终裂解肿瘤细胞。除了自身的溶肿瘤能力,增殖型腺病毒载体在大量复制增殖的同时还可使所携带的外源基因大量表达,通过多种途径杀灭肿瘤细胞[9]。对于增殖型腺病毒载体来说,最重要的是安全性问题,即如何使其识别肿瘤细胞和正常细胞,以达到靶向肿瘤治疗的目的。

先前本课题组构建的肿瘤特异性增殖病毒 SG511,其利用端粒酶逆转录酶启动子来调控腺病毒增殖所必需的 *Ela* 基因,利用缺氧反应元件来调控腺病毒的 *E1b* 基因,同时含有 Ad11 型 *fiber* 和 *shaft* 的新型腺病毒。体内和体外实验均表明 SG511 选择性增殖和抗肿瘤疗效明显。

白介素 24(IL-24)是在 1995 年由美国哥伦比亚大学的 Jiang 等人在把增生活跃与诱导分化的人黑素瘤细胞 cDNA 文库进行减数杂交时发现的一个新的黑素瘤分化相关基因,并命名为 *mda*-7。IL-24 是具有广谱抗肿瘤作用的细胞因子,能抑制多种肿瘤的生长,对肿瘤有明显的治疗作用。IL-24 的功能有:特异性地诱导肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤血管的形成;良好的旁观者效应;增加肿瘤放射敏感性;能独立于 *p*53、*Rb* 基因而抑制肿瘤细胞生长;抗瘤谱广[10]。*IL*-24 基因是目前发现的唯一一个既抑制肿瘤细胞生长和血管形成并诱导肿瘤细胞凋亡,同时又刺激表达细胞因子的基因。

热休克蛋白首次在 1962 年被研究人员发现,即把 25℃培育的果蝇幼虫置于 32℃热环境中 30 min 后发现唾液腺染色体上出现很大的"膨突"提示该区域基因转录增强。1974 年 Tissiereso 利用 SDS-PAGE 分离得到热应激反应产生的一组新蛋白质并命名为"热休克蛋白"。由于这种蛋白是由高温引起的,所以,研究人员就把这种蛋白命名为热休克蛋白。实际上,它是所有原核细胞和真核细胞在高温或应激情况下所产生的一组具有高度保守性的蛋白质,又称应激蛋白。应激刺激包括环境方面的刺激紫外线、热休克、重金属和氨基酸等,病理方面的刺激病毒感染、细菌感染、寄生虫感染、发热、炎症、肿瘤或自身免疫等和生理方面的刺激生长因子、细胞分化、激素刺激或组织发育等均可诱导细胞内合成增加[11]。*hsp*70 属于热激蛋白家族,热激蛋白家族能够在受到外界刺激的情况下表达。研究发现,人的 *hsp*70 基因的表达是由周期调控,并且可以有血清以及 E1a 蛋白来诱导表达[12]。人的 *hsp*70 基因是一个很好的细胞调节基因,在病毒感染后,它能够调控细胞生长,并能够被诱导表达。人的 *hsp*70 基因的表达在 Ad5 感染后能够被激活。研究人员发现,在无血清培养基中,*hsp*70 基因可被诱导表达。同时,在 Ad5 感染后,*hsp*70 基因的表达也可被诱导。另外,Ad5 *E*1*a* 13S 产物诱导 *hsp*70 表达[13],这个调控表达主要是由－70 位置处的 CCAAT 框来控制,这个位置临近于转录起始位点。含有 999 个氨基酸的 CCAAT 结合因子(CBF)最近被克隆并且研究发现它能够与 CCAAT 框结合,且选择性地刺激 *hsp*70 启动子来启动转录[14]。CBF 蛋白对于 *E*1*a* 启功转录是必须的。E1a 和 CBF 在体内形成复合物,这表明这些蛋白能够与 E1a 诱导转录起始 *hsp*70 启动子有关。

本实验通过 ELISA 实验证明 SG511-pHSP70-IL24 能够有效地表达抗癌基因 IL-24;通过体外细胞病理实验和细胞活力检测试验,证实 SG511-pHSP70-IL24 能够杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞的杀伤能力较弱。CPE 实验形象直观地说明了 SG511-pHSP70-IL24 对肿瘤细胞的杀伤能力要强于 SG511 及 Ad11-IL24,而对正常细胞无毒性作用。综上所述,*hsp*70 启动子调控 IL-24 的病毒能够在肿瘤细胞内复制、增殖以及表达 IL-24。同时,肿瘤由 *hsp*70 启动子调控其表达的抗癌基因 IL-24 的插入增强了 SG511 病毒的抗肿瘤疗效。增殖型腺病毒在杀伤肿瘤的同时,表现出良好的生物安全性。SG511 联合 *hsp*70 调控的 IL-24 的联合作用的具体机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Ribourtout E, Raymond J. Gene therapy and endovascular treatment of intracranial aneurysrns[J]. Stroke, 2004, 35(4): 786-793.

[2] Keriel A, Rene C C. Canine adenovirus vectors for lung-directed gene transfer: efficacy, immune response, and duration of transgene expression using helper-dependent vectors[J]. J Vriol, 2006, 80(3): 1487-1496.

[3] Alemany R, Balague C, Curiel D T. Replicative adenoviruses for cancer therapy[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(7): 723-727.

[4] Jiang H, Lin J J, Su Z, et al. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma diferentiaion asociated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression[J]. Oncogene, 1995, 11(12): 2477-2486.

[5] Caudell E G, Mumm J B, Poindexter N, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7 exhibits immunostimulatory activity and is designated Il-24[J]. J Immunol, 2002, 168(12): 6041-6046.

[6] Samali A, Cotter T G. Heat shock proteins increase resistence to apop tosis[J]. Exp Cell Res, 1996, 223(1): 163-170.

[7] Buzzard K A, Giaccia A J, Killender M, et al. Heat shock protein 70 modulates pathways of stress-induced apoptosis[J]. J B iol Chem, 1998, 273(27): 17147-17153.

[8] Jaattela M, Wissing D, KaKholm T, et al. HSP70 exerts its anti-apototic function downstream of caspase-3-like pro-teases [J]. EMBO J, 1998, 17(21): 6124-6134.

[9] Liu X Y. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity[J]. Cell Res, 2006, 16(11): 879-886.

[10] Sauane M, Gopalkrishnan R V, Sarkar D, et al. MDA-7flL-24: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(1): 35-51.

[11] Jiang Y G, Wang Y M, Li Q F. Expression significance of HLA-DR antigen and heat shock p-rotein 70 in hepatocellular carcinoma[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2001, 9: 1139-1142.

[12] Mary Moore, Jerome Schaack, Steven B Baim, et al. Induced heat shock mRNAs escape the nucleocytoplasmic transport block in adenovirus-infected hela cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(12): 4505-4512.

[13] Barbara J Wu, Helen C Hurst, Nicholas C Jones, et al. The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcription of the cellular human HSP70 gene[J]. Morinoto. Molecular and Cellular Biology, 1997, 6(8): 2994-2999.

[14] Lynette S Y Lum, Stephanie Hsu, Michael Vaewhongs. The hsp70 gene CCAAT-binding factor mediates transcriptional activation by the adenovirus E1a protein[J]. Molecular and Cellular Biology, 1992, 12(6): 2599-2605.

Killing Effect of the Replicative Oncolytic Adenovirus SG511-pHSP70-IL24 on Hepatoma Cell *in Vitro*

WANG Fang[1], *LIU Hui*[2], *ZHOU Xiu-mei*[2], *QIAN Qi-jun*[1,2]

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, the Second Militaty Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: The experiment is aimed at studying the anti-tumor effect of SG511-pHSP70-IL24 in hepatoma cells. First, ELISA experiment shows that IL-24 is expressed in Hep3B and SMMC-7721. Second, MTT assay is used to test the growth inhibition effects of single or combination therapy on tumor cell lines SMMC-7721, Hep3B and human normal cell line BJ and MRC-5. Cytopathic effect assay then is conducted to further demonstrate the efficacy of the combination therapy. Results show that the anti-tumor efficacy of SG511-pHSP70-IL24 has greater toxicity in killing Hep3B and SMMC-7721, showing no toxicity against normal cell line BJ and MRC-5.

Key words: conditionally replicative adenovirus; hepatoma cells; SG511; *HSP*70; IL-24

(责任编辑: 许惠儿)