

双靶向溶瘤腺病毒联合奥沙利铂对肿瘤细胞凋亡的研究

杨耿兵, 何 倩, 黄青红, 胡徐庞, 刘 立, 钱 程, 骆菁菁

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 研究化疗药物奥沙利铂(Oxaliplatin)联合 AdCN205-IL-24 对人结肠癌细胞的体外杀伤作用。实验采用 MTT 法检测肿瘤特异性增殖腺病毒 AdCN205-IL-24 联合奥沙利铂对两种肿瘤细胞以及正常细胞增殖的抑制作用; Hoechst33342 染色, 在荧光显微镜对病毒联合化疗诱导的肿瘤细胞凋亡进行形态学观察。结果表明: AdCN205-IL-24 联合奥沙利铂处理 4 d 后对结肠癌细胞株 HT-29 和 SW620 的增殖抑制率达到 23.17% 和 22.98%, 并且联合化疗并未增加对人正常细胞株 L-02 的毒性。

关键词: 溶瘤腺病毒; 奥沙利铂; 结肠癌; 联合抑癌

中图分类号: R73-362 **文献标识码:** A

0 引 言

结肠癌是全球常见的消化道肿瘤之一, 全世界每年有大约 78 200 人患结肠癌^[1], 其发病率逐年上升。在欧美等西方国家, 结肠癌的死亡率居恶性肿瘤死因的第二位, 在一些曾经的低发区, 如亚洲、拉美等国家, 结肠癌的发病率和死亡率也有迅速升高的趋势^[2]。在我国曾为结肠癌的低发区, 但是随着人们生活水平的提高, 生活方式与饮食习惯的改变, 发病率逐年升高, 其死亡率已位于恶性肿瘤死亡率的第五位, 严重危害人类健康, 已被列入 2004~2010 年我国重点防治的八大癌症之一^[3-4]。

目前, 对于结肠癌的治疗主要以手术治疗、放射治疗和化学治疗为常用的治疗形式, 且以化疗为主^[5]。研究表明, 铂类药物对肿瘤细胞具有抑制细胞增殖并诱发细胞凋亡的能力^[6], 其作用机理是在体内转化为具有生物活性的衍生物, 与 DNA 形成链内和链间的交联, 抑制 DNA 的复制和转录, 从而影响肿瘤的生长。其中奥沙利铂作为第三代铂类药物, 克服了传统铂类药物顺铂、卡铂的不足, 具有高抗癌活性^[7-8]和低毒副作用^[9-10], 因此已被广泛应用到晚期结肠癌的临床治疗中。

肿瘤特异性增殖型腺病毒又称为溶瘤腺病毒, 该载体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在肿瘤细胞内复制、增殖, 大量表达目的基因并最终裂解肿瘤细胞。本课题组已利用肿瘤特异性启动子人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)来替代腺病毒 E1A 的基因启动子, 使外源基因的表达限制在肿瘤细胞中, 同时删去 E1A 上可以与 Rb 基因产物相结合的 24 bp, 从而使病毒能双靶向地在肿瘤细胞中复制, 而在正常细胞中复制的能力极弱^[11]。MDA-7/IL-24 是一个具有抗肿瘤治疗潜能的热点分子^[12]。已有很多研究表明, 高表达 IL-24 能选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡, 如结肠癌、肺癌、肝癌等均有明显的抗癌效果^[13-17], 并且和化疗药物具有互补潜力^[18-19]。本实验利用一种双调控双靶向的携带 MDA-7/IL-24 基因的肿瘤特异性增殖的腺病毒 AdCN205-IL-24 与奥沙利铂联合作用, 讨论它们在癌症中的协同抑制作用。

收稿日期: 2010-11-29

基金项目: 浙江省“生物医学工程”重中之重学科开放基金项目(SWYX0916); 国家自然科学基金项目(30872984)

作者简介: 杨耿兵(1981-), 男, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的靶向基因治疗研究。

通讯作者: 骆菁菁, 电子邮箱: deepstoh@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24(206)由本实验室构建完成,非复制性腺病毒 Adeasy-IL-24(Ad-IL-24)由本实验室保存,奥沙利铂(Oxa)购自 Sigma 公司,DMEM 培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司,二甲基亚砜(DMSO)、3~(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)购自 Sigma 公司,Hoechst33342 细胞凋亡与坏死检测试剂盒购自上海碧云天公司,人正常细胞株 L-02 和人结肠癌细胞株 HT-29、SW620 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物制备

将 HT-29、SW620 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养液中(内含 4 mM 谷氨酰胺、50 U/mL 青霉素和 50 g/mL 链霉素),置 37°C、5%CO₂ 饱和湿度下培养,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。奥沙利铂用 PBS 缓冲液配制成 5 mg/mL 的母液,过滤除菌后分装保存在 4°C 冰箱待用。

1.2.2 细胞毒性实验(MTT 试验测定)

取对数生长期细胞(贴壁长满 80%左右)按每孔 1×10^4 个细胞铺于 96 孔板内,每孔 100 μ L 培养液,培养过夜。培养 12 h 后,通过前期的预实验确定每孔加入终浓度为 20 μ g/mL 的奥沙利铂和/或 5MOI 的 Ad-IL-24 或溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24,即药物(Oxa)组、Ad-IL-24 组、Ad-IL-24+药物(Oxa)组、AdCN205-IL-24(206)组、和 AdCN205-IL-24(206)+药物(Oxa)组,细胞对照组则每孔入 100 μ L 培养液,置 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 24、48、72、96 h 和 120 h 后,加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续温育 4 h 后吸弃上清,加入 150 μ L DMSO,在摇床上摇育 20 min 后在波长 590 nm 处用酶标仪测定各孔吸光度 A 值。按下式计算肿瘤细胞存活率,

$$\text{肿瘤细胞存活率} = \frac{\text{实验组 OD 均值} - \text{空白对照组 OD 均值}}{\text{细胞对照组 OD 均值} - \text{空白对照组 OD 均值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 荧光显微镜观察细胞形态变化(Hoechst33342 荧光检测)

将 5×10^5 HT-29, SW620 细胞接种于 6 孔板,每孔 2 mL 培养液,培养 12 h,加药组加入 20 μ g/mL 的 Oxa 和 5MOI 的病毒,即药物(Oxa)组,Ad-IL-24 组, Ad-IL-24+药物(Oxa)组, AdCN205-IL-24(206)组, AdCN205-IL-24(206)+药物(Oxa)组,对照组加等体积的磷酸缓冲液(PBS),置 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养。培养 48 h 后,分别弃去培养液,加入 PBS 洗细胞 2 次,加入 1 mL 的固定液,固定 10 min 后加入 5 μ L Hoechst33342 染色液,避光冰浴 20 min。用 PBS 洗 2 次,每次 5 min。然后立刻置荧光显微镜下观察并拍照。

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 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 腺病毒与奥沙利铂在抗肿瘤实验中具有协同作用

如图 1 所示,溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24 和复制缺陷型 Ad-IL-24 均可以增强奥沙利铂对肿瘤细胞增殖的抑制作用,但 AdCN205-IL-24 联合奥沙利铂对 HT-29 和 SW620 作用后细胞存活率只有 23.17% 和 22.98%,杀伤效果最为明显。Ad-IL-24 对肿瘤细胞杀伤效果没有溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24 明显,因此说明双靶向溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24 具有很好的杀伤肿瘤细胞的效果。实验结果显示 AdCN205-IL-24 在肿瘤细胞杀伤中比 Ad-IL-24 表现出明显的优势,这一结果印证了双靶向溶瘤腺病毒具有特异的抑制肿瘤细胞生长的能力。在正常细胞 L-02 的实验中,腺病毒并没有表现增强的抑制细胞生长的效应,而在联合的治疗中细胞生长的抑制主要来自于奥沙利铂的作用。

2.2 Hoechst33342 荧光检测

Hoechst 33342 染色后在荧光显微镜下观察发现,对照组细胞没有明显的凋亡,奥沙利铂、AdCN205-IL-24、Ad-IL-24 单独处理结肠癌细胞 HT-29、SW620 后均使其发生不同程度的细胞凋亡,其中双靶向溶瘤腺

病毒 AdCN205-IL-24 引起的肿瘤细胞凋亡要比非复制性腺病毒 Ad-IL-24 多, 并且 AdCN205-IL-24 与奥沙利铂联合使用对肿瘤细胞凋亡现象最为明显(图 2)。

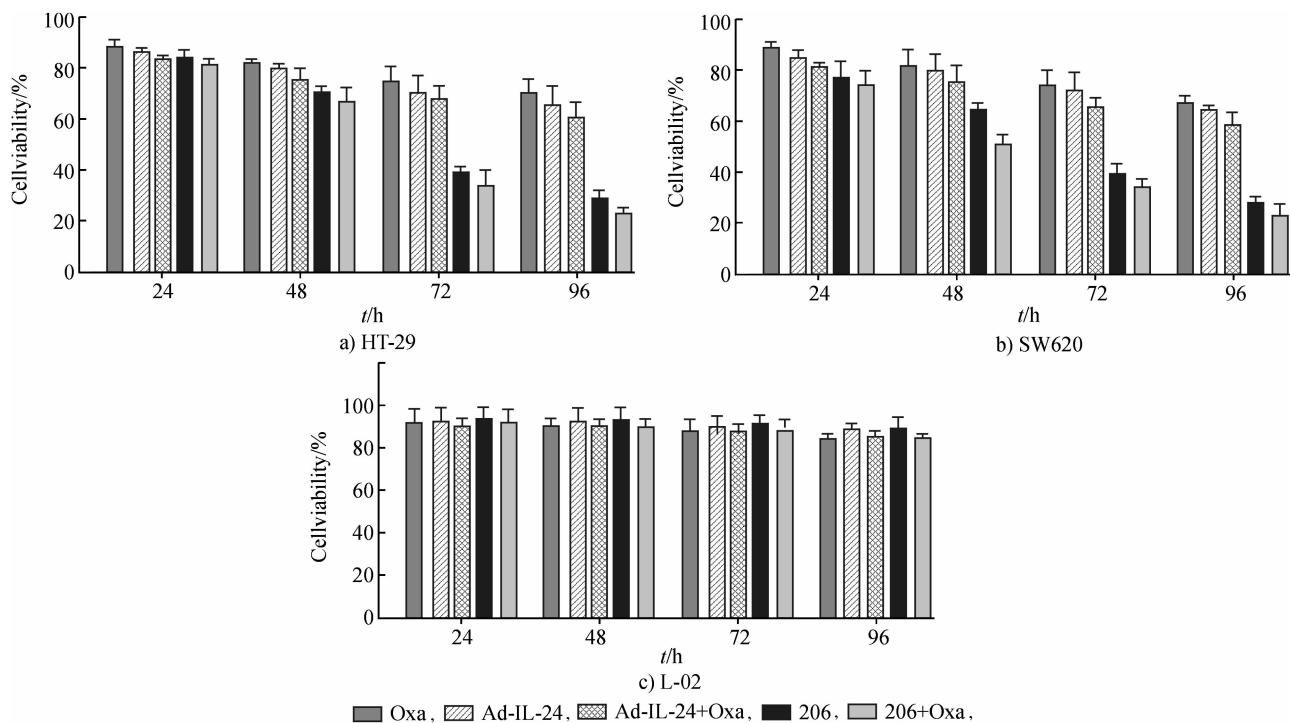


图 1 药物(Oxa)、Ad-IL-24、Ad-IL-24+药物(Oxa)、AdCN205-IL-24(206)、AdCN205-IL-24(206)+药物(Oxa)对肿瘤细胞及正常细胞的 MTT 实验

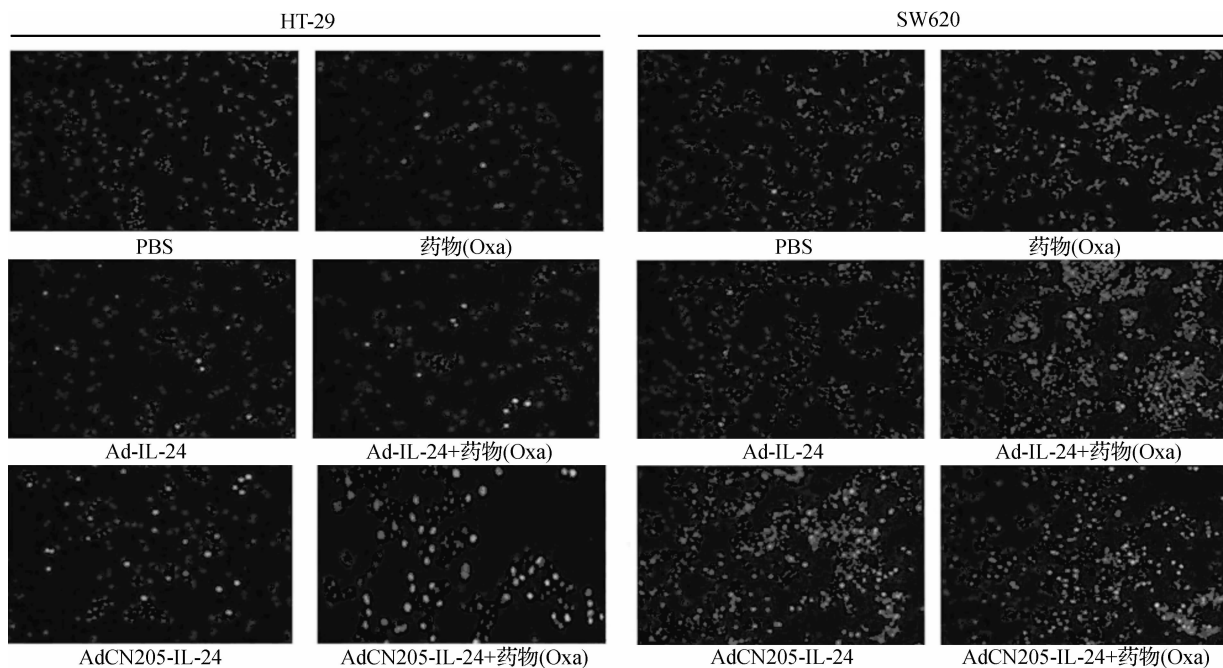


图 2 Hoechst 染色检测 HT-29 细胞和 SW620 细胞的凋亡(100×)

3 讨论

结肠癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 而化疗作为结肠癌综合治疗的重要组成部分, 对人体有一定的毒副作用。因此临床上迫切需要将化疗与其他治疗方式相结合, 以更好地延长患者的生存期和改善患者的生存质量。在诸多治疗方式中, 基因治疗逐渐受到全世界的关注并被广泛研究, 其中溶瘤腺病毒作为近

年来新兴的肿瘤基因治疗载体,因其具有特异性地靶向和高效杀伤肿瘤细胞的能力而备受亲睐。为了增强溶瘤腺病毒的安全性和有效性,构建腺病毒是常用的技术手段,是利用肿瘤特异性或组织特异性启动子来调控病毒的复制所必须的早期基因(如 E1A 基因),或缺失病毒某些在正常细胞内复制所必须而在肿瘤细胞内复制所不需要的基因。而本实验中我们利用具有双靶向的溶瘤腺病毒 AdCN205-IL-24 与化疗药物奥沙利铂相结合来对结肠癌细胞进行研究,从而能更特异性地靶向杀伤肿瘤细胞。

AdCN205-IL-24 所携带的治疗基因 *MDA-7/IL-24* 是一种肿瘤抑制基因,其表达的蛋白 *MDA-7/IL-24* 是细胞因子 IL-10 家族的新成员,其主要作用表现在以下两个方面:a)*MDA-7/IL-24* 的高表达可抑制癌细胞的生长和诱导凋亡,而且此活性与其他肿瘤抑制基因(*p53*,*Rb*,或 *p16*)的状态无关,因此可以与其他基因治疗方法联合应用;同时 *Mda-7/IL-24* 在抑制肿瘤的过程中参与信号转导和分子调节,激活 PKR、p38、STAT3、PI3K、GSK-3、ILK-1 等作用。b)*MDA-7/IL-24* 具有化学治疗的互补潜力,Oida 等联合应用抗炎药舒林酸(sulindac)和 *MDA-7/IL-24* 治疗非小细胞肺癌细胞株,发现舒林酸能呈剂量依赖性地促进 *MDA-7/IL-24* 对癌细胞的生长抑制和诱导凋亡作用,因此联合治疗能更有效地抑制肿瘤生长^[20],同时 *MDA-7/IL-24* 又可以提高放射疗效和增强免疫调节反应,能有效参与细胞因子的免疫活化和选择性诱导肿瘤细胞凋亡,使得 *MDA-7/IL-24* 基因成为肿瘤基因治疗的一个重要基因。

通过实验发现,AdCN205-IL-24 比 Ad-IL-24 能更有效地选择杀伤结肠癌细胞和诱导凋亡,而不影响正常细胞的生长,并且 AdCN205-IL-24 比 Ad-IL-24 能更有效地增强两种肿瘤细胞对奥沙利铂的敏感性,这说明 AdCN205-IL-24 与奥沙利铂之间的协同更有效。

参考文献:

- [1] Milan A, Huerta S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer[J]. Journal of Surgical Research, 2009, 151(1): 163-170.
- [2] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 2001 年中国卫生事业发展情况统计公报[EB/OL]. 2002-04-10. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/zwgkzt/pgb/200805/34844.htm>.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中国癌症预防与控制规划纲要:2004-2010[J]. 中国肿瘤, 2004, 13(2): 65-68.
- [5] Meyerhardt J A, Mayer R J. Systemic therapy for colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 476-487.
- [6] Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(8/9): 1229-1235.
- [7] Mathe G, Kidani Y, Segiguchi M, et al. Oxalato-platinum or L-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 1989, 43(4): 237-250.
- [8] Wang D, Lippard S J. Cellular processing of platinum anticancer drugs[J]. Nat Rev Drug Discovery, 2005, 4(4): 307-320.
- [9] Extra J M, Espie M, Calvo F, et al. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1990, 25(4): 299-303.
- [10] Mathe G, Kidani Y, Triana K, et al. A phase I trial of trans-1~diaminocyclohexane oxalato-platinum(L-OHP)[J]. Biomed Pharmacother, 1986, 40(10): 372-376.
- [11] Luo J J, Xia Q, Zhang R, et al. Treatment of cancer with a novel dual-targeted conditionally replicative adenovirus armed with *mda-7/IL-24* gene[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(8): 2450-2457.
- [12] Inoue S, Shanker M, Miyahara R. *MDA-7/IL-24*-based cancer gene therapy: translation from the laboratory to the clinic [J]. Curr Gene Ther, 2006(1): 73-91.
- [13] Zheng M, Bocangel D, Doneske B. Human interleukin 24 (*MDA-7/IL-24*) protein kills breast cancer cells via the IL-20 receptor and is antagonized by IL-10[J]. Cancer Immunology Immunotherapy, 2007, 56(2): 205-215.
- [14] Gopalan B, Shanker M, Chada S. *MDA-7/IL-24* suppresses human ovarian carcinoma growth in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 11.
- [15] Chada S, Bocangel D, Ramesh R. *MDA-7/IL24* kills pancreatic cancer cells by inhibition of the Wnt/PI3K signaling pathways: identification of IL-20 receptor-mediated bystander activity against pancreatic cancer[J]. Mol Ther, 2005, 11(5):

724-733.

- [16] Yacoub A, Mitchell C, Hong Y. MDA-7 regulates cell growth and radiosensitivity in vitro of primary(non-established) human glioma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(8): 739-751.
- [17] Ishikawa S, Nakagawa T, Miyahara R, et al. Expression of MDA-7/IL-24 and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1198-1202.
- [18] Oida Y, Gopalan B, Miyahara R. Sulindac enhances adenoviral vector expressing mda-7/IL-24-mediated apoptosis in human lung cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2): 291-304.
- [19] Chada S, Mhashilkar A M, Liu Y. MDA-7 gene transfer sensitizes breast carcinoma cells to chemotherapy, biologic therapies and radiotherapy: correlation with expression of bcl-2 family members[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(5): 490-502.
- [20] Oida Y, Gopalan B, Miyahara R, et al. Sulindac enhances adenoviral vector expressing mda-7/IL-24 mediated apoptosis in human lung cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2): 291-304.

Study on Apoptosis of Tumor Cells Treated by Dual-Targeting Replicated Adenovirus Combined with Oxaliplatin

YANG Geng-bing, HE Qian, HUANG Qing-hong, HU Xu-pang, LIU Li, QIAN Cheng, LUO Jing-jing
(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To investigate the effect of chemotherapy drug Oxaliplatin combined with AdCN205-IL-24 on human colon carcinoma cells *in vitro*. MTT method is used to detect inhibition of tumor-specific adenovirus AdCN205-IL-24 with Oxaliplatin on the proliferation of both tumor cells and normal cells. The morphological characteristics of apoptosis tumor cells induced by adenovirus with chemotherapy drug are observed by fluorescence microscopy after Hoechst33342 staining. The results show that the growth inhibitory rate of colon carcinoma cell lines HT-29 and SW620 after 4 days treated with AdCN205-IL-24 and Oxaliplatin are 23.17% and 22.98%, respectively. Besides, the toxicity effect on human normal cell line L-02 is not increased after the co-administration of adenovirus and the chemotherapy drug.

Key words: oncolytic adenovirus; oxaliplatin; colon carcinoma; combined therapy

(责任编辑: 许惠儿)