

# Ad-IL-24 对 MG-63 人骨肉瘤细胞抑癌效应的体内外实验

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

苏州大学医学部 细胞与分子生物学教研室, 苏州 215123

**摘要:** 本研究旨在分析腺病毒携带的 *IL-24* 基因在体内外对人骨肉瘤细胞生长抑制效应及其分子机制。将 Ad-*IL-24* 重组腺病毒感染 MG-63 细胞, 用荧光显微镜、RT-PCR 法检测 *IL-24* 在 MG-63 细胞中的转录和表达; MTT 法、流式细胞技术和 Hoechst 染色法检测 *IL-24* 基因的表达对 MG-63 细胞的生长抑制和凋亡效应; 半定量 RT-PCR 法检测 *IL-24* 基因的表达对 MG-63 细胞中的 *bcl-2*、*bax*、*caspase-3* 相关基因表达的影响。用 Ad-*IL-24* 重组腺病毒在 MG-63 骨肉瘤荷瘤裸鼠的瘤体内进行注射治疗, 观察肿瘤生长变化, 15 d 后处死裸鼠, 摘除瘤体, 称瘤重。并通过免疫组化法检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 等与细胞凋亡相关因子的表达。结果表明 Ad-*IL-24* 重组腺病毒感染 MG-63 细胞后, 能明显抑制 MG-63 细胞增殖, 并能通过上调细胞中 *bax*、*caspase-3* 和下调 *bcl-2* 基因表达, 诱导细胞凋亡, 呈现出典型细胞凋亡形态学变化。Ad-*IL-24* 重组腺病毒瘤内注射 MG-63 裸鼠荷瘤骨肉瘤移植瘤后, 能显著抑制肿瘤生长, 瘤重的抑制率可达 52%, 免疫组化结果显示 Ad-*IL-24* 重组腺病毒能明显上调与细胞凋亡相关因子 Bax 和 Caspase-3 的表达和下调 Bcl-2 和 CD34 的表达。本研究结果显示腺病毒介导的 *IL-24* 基因在体内外均可明显抑制 MG-63 人骨肉瘤细胞的生长, 诱导其凋亡, 其机制可能与下调 *bcl-2*, 上调 *bax*、*caspase-3* 的基因表达水平有关, 由此为骨肉瘤的基因治疗提供实验依据。

**关键词:** *IL-24* 基因, 腺病毒载体, MG-63 人骨肉瘤细胞, 肿瘤抑制

## Interleukin 24 inhibits growth and induces apoptosis of osteosarcoma cells MG-63 *in vitro* and *in vivo*

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

Cell and Molecular Biology Institute, College of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China

**Abstract:** To study the inhibitory effect and anti-cancer mechanisms of interleukin 24 (*IL-24*) on human osteosarcoma cell MG-63, we delivered *IL-24* into MG-63 cells *in vitro* and *in vivo* by adenovirus. The expression level of *IL-24* was detected by RT-PCR and fluorescence microscope; the growth inhibition, apoptosis rate and apoptosis body were measured by MTT, Flow cytometry and Hoechst staining respectively. Furthermore, we analyzed the expression of *bcl-2*, *bax*, *caspase3* genes by RT-PCR after overexpression of *IL-24*. For *in vivo* study, we first established the MG-63 tumor model by grafting MG-63 cells in athymic nude mice; and then injected Ad-*IL-24* into the tumors. Two weeks after injection, we sacrificed the mice, removed

**Received:** May 19, 2009; **Accepted:** August 13, 2009

**Supported by:** National Science Foundation of Jiangsu Provincial Universities (No. 08KJB310011), Medical Sciences Developmental Funds of Soochow University (No. EE134517).

**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基础研究项目(No. 08KJB310011), 苏州大学医学发展基金资助项目(No. EE134517)资助。

the tumors, weighed and calculated the ratios of tumor-suppression. We also detected the expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and CD34 with immunohistochemistry. Our *in vitro* results indicated that Ad-IL-24 was transcribed and translated in MG-63 osteosarcoma cells. More interestingly, IL-24 inhibited the growth of MG-63 cells and induced apoptosis by up-regulation of *bax*, *caspase-3* and down-regulation of *bcl-2*. The *in vivo data* showed that IL-24 suppressed the tumor growth conspicuously through down-regulating the expression of *bcl-2*, and up-regulating the expression of *bax*, *caspase-3*. This study would provide evidence for the gene therapy of IL-24 on osteosarcoma.

**Keywords:** IL-24 gene, adenovirus vector, human osteosarcoma cells, tumor-suppression

骨肉瘤是一种临床常见恶性骨肿瘤, 约占所有骨肿瘤的 20%。其恶性程度高, 好发于青少年, 易复发和转移, 预后较差, 目前手术和化疗是主要治疗方法, 随着分子生物学理论和技术的发展, 基因治疗现已成为骨肉瘤治疗的一种新模式, 越来越受到人们的重视, 已成为今后基因治疗研究的重要方向之一。

白细胞介素-24(Interleukin 24, IL-24)基因又称黑色素瘤相关基因-7(Melanoma differentiation associated gene-7, MDA-7), 是 Jiang 等<sup>[1]</sup>运用减数杂交法于 1995 年首次发现, 后从结构、染色体定位、碱基序列同源性及细胞因子样特性等方面综合考虑, 将其归入 IL-10 家族, 并命名为 IL-24<sup>[2]</sup>。研究表明 IL-24 基因表达不仅仅具有免疫调节功能, 而且还能抑制多种肿瘤细胞生长和肿瘤新血管形成并诱导凋亡, 但基本不会影响正常细胞生长。

本研究将本科室构建携带 IL-24 基因的重组腺病毒(Ad-IL-24), 通过体内外实验探讨 Ad-IL-24 对 MG-63 人骨肉瘤细胞抑癌作用的分子机制, 为骨肉瘤细胞的基因治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Ad-poly-A-CMV(简称 Ad-GFP), Ad-poly-A-CMV-hIL-24(简称 Ad-hIL-24)由本实验室改建而成, MG-63 人骨肉瘤细胞均为本室保存, QBI-293A 细胞为复旦大学钟江教授惠赠。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 逆转录酶 MMLV(Fermentas 公司); Taq 酶购自 TaKaRa 公司; MTT 购自 Sigma 公司, Hoechst 染色试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品; Annexin-PE/7-AAD 凋亡试剂盒购于 Southern Biothech 公司; Bcl-2、Bax、Caspase-3 抗

体检测试剂盒购自上海晶美公司, CD34 检测试剂盒购自深圳晶美生物公司; 各上下游引物由上海生物工程技术有限公司合成, 见表 1; 4~6 周龄雄性 BALB/C 裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心; SP 超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1: IL-24 Forward	CGCATGAATTTCAACAGAGGCTG
P2: IL-24 Reverse	CGCTCAGAGCTTGTAATTTCTGCAT
P3: bcl-2 Forward	TGTGGCCTTTCTTTGAGTTCG
P4: bcl-2 Reverse	CTCCCAGCCTCCGTTATCC
P5: bax Forward	GGATGCGTCCACCAAGAA
P6: bax Reverse	GCACTCCCGCCACAAAGA
P7: caspase-3 Forward	ACCTCAGAGAGACATTCAC
P8: caspase-3 Reverse	CCCCACTCCCAGTCATTCCTTT
P9: $\beta$ -actin Forward	TGTTTGAGACCTTCAACACCC
P10: $\beta$ -actin Reverse	AGGAAGGCTGGAAGAGTGC

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Ad-IL-24 病毒子的扩增

按本科室常规法进行<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 Ad-IL-24 病毒子效价测定

按本科室常规法进行<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.3 Ad-IL-24 作用后 MG-63 人骨肉瘤细胞形态学观察

将处于对数生长期的 MG-63 细胞分为 3 组: 实验组(加入 100 MOI 的 Ad-IL-24 组)、阴性对照组(加入 100 MOI 的 Ad-GFP 组)、细胞对照组(PBS 组)。于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h 后在倒置显微镜及倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测 IL-24 基因在 MG-63 人骨肉瘤细胞中的表达

用 100 MOI 的 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 病毒分别感

染 MG-63 细胞 72 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤 2~3 次, 按试剂盒说明书要求提取细胞总 RNA, 用引物 P1、P2 按本科室常规法<sup>[3]</sup>进行 RT-PCR 鉴定。

### 1.2.5 MTT 法检测 Ad-IL-24 对 MG-63 人骨肉瘤细胞生长的影响

将对数生长期的 MG-63 细胞, 按  $1 \times 10^4$  个/孔接种 96 孔板,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后, 分别加 100 MOI ( $10^8$  PFU/mL) Ad-IL-24 为实验组, 100 MOI ( $10^8$  PFU/mL) Ad-GFP 为阴性对照 Ad-GFP 组, 100  $\mu\text{L}$  的 RPMI1640 为细胞对照 PBS 组, 每组设 3 个复孔,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育。随后分别于 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d 时加 MTT (5 mg/mL) 10  $\mu\text{L}$ /孔, 继续孵育 4~6 h 后加入溶解剂 [10% SDS + 1% HCl (1 mol/L)] 100  $\mu\text{L}$ /孔, 至次日待甲臞结晶完全溶解后, 在酶联免疫检测仪上测  $OD_{570}$  值, 并按抑制率 (%) = (对照组  $OD_{570}$  值 - 实验组  $OD_{570}$  值) / 对照组  $OD_{570}$  值, 计算细胞生长抑制率。

### 1.2.6 Annexin-V-PE/7-AAD 双染 FMC 检测重组腺病毒对 MG-63 细胞凋亡的影响

按 100 MOI 腺病毒感染剂量分别感染处于对数生长期的 MG-63 细胞, 同上分为 3 组: PBS 组、Ad-GFP 组、Ad-IL-24 组。  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  相同条件下培养 72 h 后收集细胞, PBS 清洗 2 次, 用  $1 \times$  Binding Buffer 调节细胞至  $10^6 \sim 10^7$  个/mL, 取 100  $\mu\text{L}$  细胞于流式管中, 加 10  $\mu\text{L}$  Annexin-V-PE 冰上混匀, 避光 15 min, 再加  $1 \times$  Binding Buffer 380  $\mu\text{L}$ , 再加 10  $\mu\text{L}$  7-AAD, 上流式检测。

### 1.2.7 Ad-IL-24 对 MG-63 人骨肉瘤细胞的核形态学变化

实验分组及处理方法同上, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 72 h 后收获细胞悬液, 用 PBS 洗 2~3 次, 经 4% 多聚甲醛固定, 进行 Hoechst33258 染色 30 min, 甘油封片后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞凋亡小体。

### 1.2.8 RT-PCR 法检测 bcl-2、bax、caspase-3 基因的转录情况

实验分组及处理方法同上, 病毒感染 72 h 后按试剂盒说明步骤抽提细胞总 RNA, 经逆转录, 获得 cDNA, 将 cDNA 模板加入 bax、bcl-2、caspase-3 上下

游引物(引物序列见表 1), 反应条件为  $94^\circ\text{C}$  4 min;  $94^\circ\text{C}$  50 s,  $56^\circ\text{C}$  50 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 并用 BandScan 软件进行分析。

### 1.2.9 人骨肉瘤动物模型的建立

将 MG-63 人骨肉瘤细胞培养于含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱内培养。取指数生长期的 MG-63 细胞经胰酶消化分散后, PBS 洗涤 2 次, 2000 r/min 离心 5 min, 重悬于 PBS 中, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^7$  /mL, 取 100  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6$  个细胞/只) 分别接种于 15 只裸鼠右肋皮下, SPF 环境下饲养, 待瘤体直径约 5~8 mm 时进行治疗实验。

### 1.2.10 实验分组和抗肿瘤治疗

将上述 15 只荷瘤裸鼠随机化分为 3 组, 每组 5 只。实验组用 Ad-IL-24 ( $10^9$  pfu/mL)、空载体对照组用 Ad-GFP ( $10^9$  pfu/mL)、PBS 阴性对照组用 PBS 各 0.1 mL 注射瘤体, 隔日 1 次, 共 5 次。

### 1.2.11 肿瘤体积、瘤重和抑瘤率的检测

每次治疗时同步测量肿瘤体积, 测量肿瘤长、短径, 计算肿瘤体积  $V = ab^2 \times 0.5$  (a 为长径, b 为短径), 绘制肿瘤体积变化曲线。治疗结束 1 周后处死裸鼠, 摘除瘤体, 称瘤重, 计算治疗组瘤重抑瘤率, 抑瘤率 = (对照组肿瘤 W - 治疗组肿瘤 W) / 对照组肿瘤 W  $\times 100\%$ 。肿瘤组织标本 10% 中性甲醛固定过夜, 常规石蜡包埋, 用于进行组织 HE 染色和免疫组织化学检测。

### 1.2.12 Ad-IL-24 治疗后肿瘤 HE 染色结果判断

HE 染色程序按常规进行。判断标准: 肿瘤细胞如呈现体积变小、细胞质浓缩、细胞核变小、染色质浓缩并凝结成块, 出现染色质沿核膜内侧排列的核边聚, 甚至表现为细胞核裂解形成凋亡小体, 则判断为肿瘤细胞凋亡。

### 1.2.13 免疫组化检测 Ad-IL-24 重组腺病毒的裸鼠体内抗人骨肉瘤效应的分子机制

石蜡切片利用免疫组化 SP 法染色后检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、CD34 因子的表达, 研究潜在的分子机制。以细胞浆或细胞核内出现散在或弥漫状分布的棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片 100 倍光镜

下观察, 共记数 10 个视野进行统计分析。

### 1.2.14 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计软件包进行数据处理, 实验数据以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示, 采用 One-Way ANOVA 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ad-IL-24 病毒感染 MG-63 细胞后的形态学变化

将经 QBI-293A 细胞体外扩增和测定的病毒效价达  $10^9$  PFU/mL 的 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 MG-63 人骨肉瘤细胞, 体外培养 72 h 后, Ad-GFP 组和细胞对照 PBS 组的 MG-63 细胞贴壁生长良好, 形态完整。而 Ad-IL-24 组的 MG-63 细胞出现明显的细胞病变, 细胞变圆且漂浮, 细胞数量明显减少, 荧光显微镜下 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 可见强荧光(图 1)。

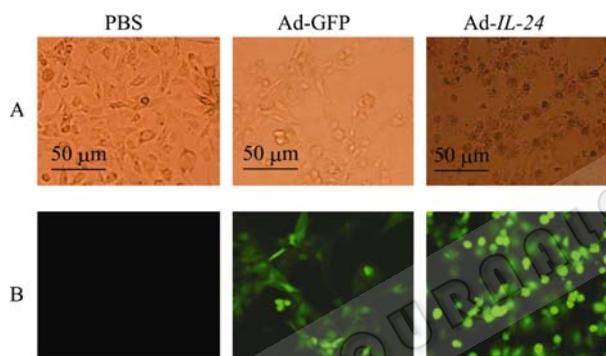


图 1 腺病毒感染后 MG-63 细胞形态变化(100×)  
Fig. 1 Morphologic change of MG-63 cells transduced with adenoviruses (100×). (A) Light microscope. (B) Fluorescence microscope.

### 2.2 IL-24 基因在 MG-63 人骨肉瘤细胞中的表达

将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 感染 MG-63 细胞, 培养 72 h 后, 取细胞总 RNA, RT-PCR 法检测, 结果显示(图 2): Ad-IL-24 组的 IL-24 和  $\beta$ -actin 均出现阳性条带; 而空载体腺病毒 Ad 和 PBS 组均只有  $\beta$ -actin 出现阳性条带。

### 2.3 Ad-IL-24 对 MG-63 人骨肉瘤细胞的生长抑制作用

由图 3 可见, 与 Ad-GFP 组与细胞对照组相比, Ad-IL-24 对 MG-63 细胞有明显的生长抑制作用( $P < 0.05$ ), 感染后第 4 天 MG-63 细胞的生长抑制率可达 36%(图 4), 而 Ad-GFP 组与细胞对照组无明显

差异( $P > 0.05$ )。

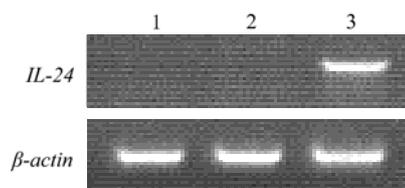


图 2 MG-63 细胞中 IL-24 基因的 RT-PCR 鉴定  
Fig. 2 Identification of IL-24 in MG-63 cells by RT-PCR. 1: PBS group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-IL-24 group.

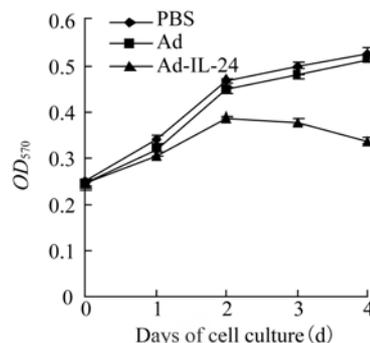


图 3 Ad-IL-24 对 MG-63 细胞生长抑制作用曲线图  
Fig. 3 Growth inhibiting curve chart of MG-63 cells transduced with Ad-IL-24.

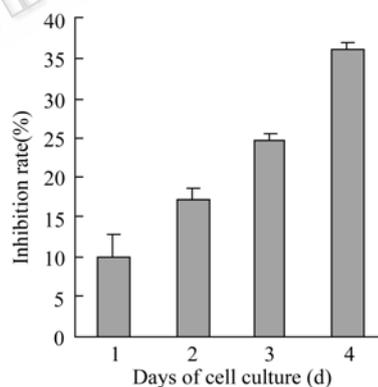


图 4 Ad-IL-24 对 MG-63 细胞的生长抑制率  
Fig. 4 Growth inhibiting ratio of MG-63 cells transduced with Ad-IL-24.

### 2.4 Annexin-V-PE/7-AAD 双染法 FMC 检测重腺病毒对 MG-63 细胞凋亡的影响

人骨肉瘤细胞 MG-63 分别用 100 MOI 最佳感染剂量 Ad-GFP、Ad-IL-24 感染 72 h 后用 Annexin-V-PE/7-AAD 双染法处理细胞, 经流式细胞仪检测细胞凋亡(图 5)。由图 6 可见, Ad-IL-24 能明显诱导 MG-63 细胞凋亡效应, 其中凋亡率可达 15%, 与 Ad 空载体腺病毒组和细胞对照组比较呈显著性差异( $P < 0.05$ )。

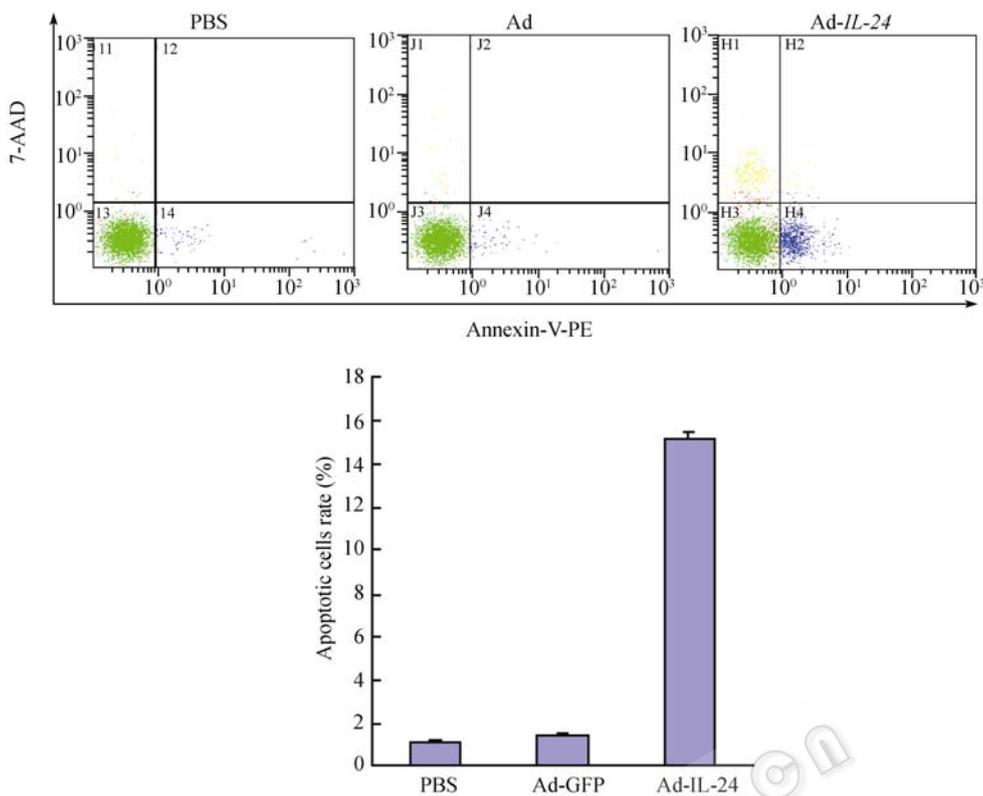


图 5 流式细胞术检测 MG-63 细胞凋亡率  
Fig. 5 MG-63 cells apoptosis rate detected by flow cytometry.

**2.5 Ad-IL-24 感染 MG-63 细胞后核形态学观察 (Hoechst)**

由图 6 可见, Ad-IL-24 组 MG-63 细胞 72 h 后, 在荧光显微镜下观察到细胞核出现深染、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 MG-63 细胞核形态正常, 未出现上述细胞凋亡的特征。

**2.6 Ad-IL-24 感染 MG-63 人骨肉瘤细胞后与凋亡相关的 bcl-2、bax 等基因表达的变化**

Ad-IL-24 感染 MG-63 细胞 72 h 后, 与细胞对照 PBS 组和 Ad-GFP 组相比(图 7), Ad-IL-24 能使 MG-63 细胞 *bax*、*caspase-3* 的 mRNA 的表达水平明显上调( $P < 0.05$ ), *bcl-2* 的 mRNA 的表达水平明显下调( $P < 0.05$ ), 并导致 *bax/bcl-2* 的比值显著增高( $P < 0.05$ )。

**2.7 Ad-IL-24 对人骨肉瘤移植瘤的抑瘤效应**

本实验成功地建立了 MG-63 人骨肉瘤细胞裸鼠移植瘤模型, 成瘤率为 100%(图 8A)。研究结果显示: 与 PBS 对照组相比, 治疗 2 周后 Ad-IL-24 组的肿瘤

体积、肿瘤重量有显著差异( $P < 0.05$ )(图 8B、8C), 瘤重抑制率可达 52%, 有显著性差异( $P < 0.05$ ), 表明 Ad-IL-24 基因治疗对人骨肉瘤具有显著抑瘤效果, 而 PBS 对照组和空载体 Ad 组对照组相比, 无显著性差异( $P > 0.05$ )。在饲养治疗期间未发现裸鼠死亡及其他躯体的毒性反应。

**2.8 组织切片的病理结果**

人骨肉瘤移植瘤移植瘤的组织切片经常规 HE 染色, Ad-IL-24 组治疗组镜下可见凋亡细胞形态学改变, 凋亡细胞表现为细胞浆浓缩, 染色质浓集于

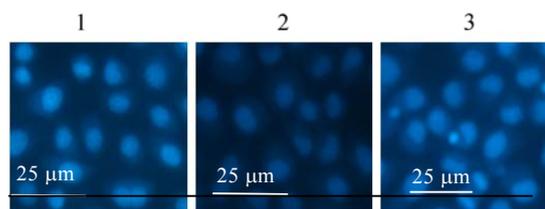


图 6 荧光显微镜观察 MG-63 细胞凋亡小体的形态学观察(400×)

Fig. 6 Apoptotic body of MG-63 cells observed by LSCM (400×). 1: cell control group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-IL-24 group.

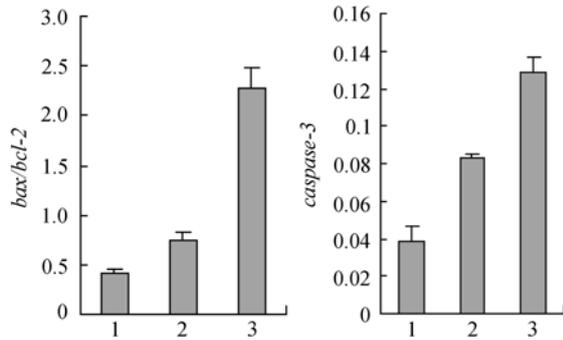
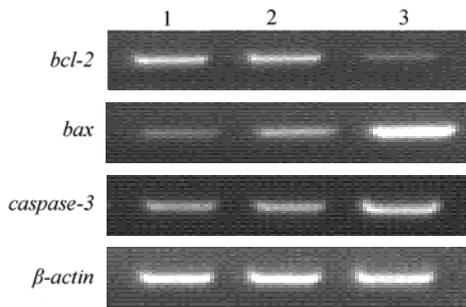


图 7 RT-PCR 法分析 MG-63 细胞 *bax* 和 *bcl-2* 的 mRNA 的表达水平

Fig.7 Analysis of mRNA expression of *bcl-2*, *bax*, *caspase 3* in MG-63 cells by RT-PCR. 1: cell control group; 2: Ad-GFP group; 3: Ad-IL-24 group.

核膜周围, 还可见典型的凋亡小体形成, 而细胞膜完整, 细胞器结构基本正常。而 PBS 组、Ad-GFP 组肿瘤细胞生长旺盛, 结构完整(图 9)。

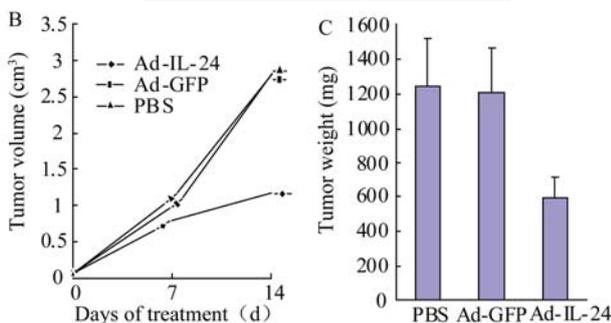


图 8 Ad-IL-24 对人骨肉瘤移植瘤的抑瘤效应

Fig. 8 Inhibitory effect of osteosarcoma Xenografts treated with Ad-IL-24. (A) The pictures of osteosarcoma Xenografts. (B) The curves of volume change of osteosarcoma Xenografts treated with Ad-IL-24. (C) The weight change of osteosarcoma Xenografts treated with Ad-IL-24.

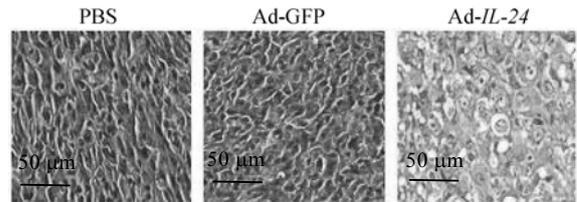


图 9 显微镜下细胞形态学观察结果(100×)

Fig. 9 Cellular morphologic pictures under microscope(100×).

### 2.9 Ad-IL-24 治疗人骨肉瘤移植瘤后 Bcl-2、Bax、Caspase-3、CD34 细胞因子的变化

石蜡切片利用免疫组化 SP 法染色后检测结果显示(图 10), Ad-IL-24 组中可呈现与凋亡相关的 Bax、Caspase-3 基因表达明显上调, 组化切片中可见大量棕黄色颗粒, 尤以 Caspase-3 的上调较为明显 ( $P < 0.05$ ), 同时又可呈现 Bcl-2 及与血管形成相关基因 CD34 明显下调 ( $P < 0.05$ ), 尤以 Bcl-2 下调较为明显。PBS 组、Ad-GFP 组中各相关基因表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤, 好发于

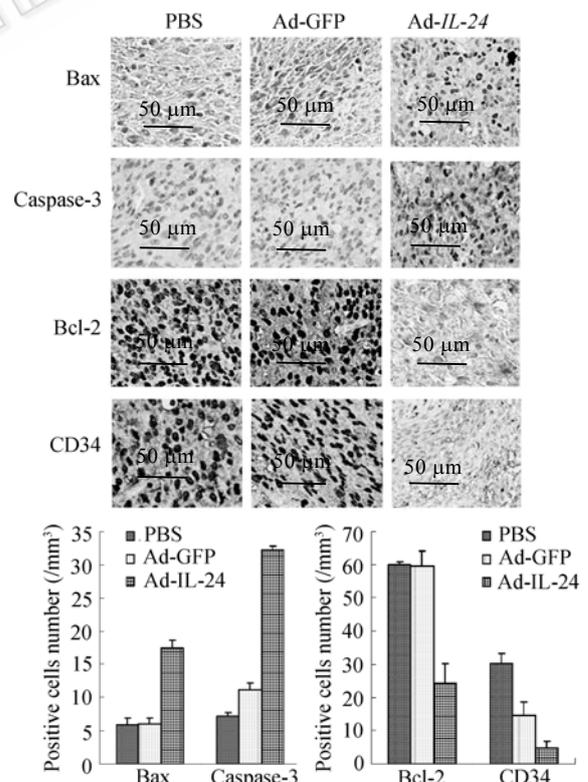


图 10 免疫组化法检测瘤体中各种因子表达变化

Fig. 10 Expression change of cytokines in osteosarcoma Xenografts.

10~20 岁的青少年,在局部呈侵袭性生长并且易发生转移,在骨肉瘤的综合治疗中,外科手术占主导地位,尽管广泛应用新辅助化疗并加以改进、研究,但化疗反应差、术后易局部复发或远处转移,骨肉瘤长期生存率并没有明显提高。

目前,针对骨肉瘤及其肺转移在开展基因治疗时通常采用免疫基因治疗、反义基因治疗、抑癌基因治疗、自杀基因治疗及其联合基因治疗或联合其他方法的治疗等诸多肿瘤基因治疗方法。腺病毒载体因其具有的许多优点被广泛应用于基因治疗,如:繁殖滴度高,制备容易;感染效率高,既能感染正在分裂的细胞,又能感染分化后的细胞;不整合到细胞基因组中,安全性好;表达时间短,不会对机体产生长期影响<sup>[4]</sup>。国内外相关文献报道中腺病毒介导的鼠 *IL-12* 基因、反义 *c-myc* 基因治疗可明显降低骨肉瘤的肺转移<sup>[5-6]</sup>,腺病毒介导的 *As-c-myc*、*B7-1/Fas* 基因等均能不同程度诱导骨肉瘤细胞凋亡,并抑制骨肉瘤细胞的增殖<sup>[7-8]</sup>,且腺病毒介导的 *As-c-myc* 基因治疗能够起到增加顺铂对 MG-63 细胞的促凋亡作用<sup>[9]</sup>。

白细胞介素-24(*IL-24*)为分泌型细胞因子,是一种与黑色素瘤分化和恶性程度呈负相关的细胞因子,能分泌至胞外来发挥抗肿瘤作用。目前的研究显示,*IL-24* 基因是第一个,很可能是唯一既抑制肿瘤细胞生长和血管形成并诱导凋亡,同时又是一种能刺激免疫细胞表达细胞因子的新型抑癌基因<sup>[10-11]</sup>,因而能通过三者联合的作用方式来发挥抗肿瘤效应。近年来,本研究室的系列性研究也均已证明外源性 *IL-24* 基因表达仅特异对肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用,效果显著,而对正常细胞无任何毒副作用,对肿瘤基因治疗是十分安全有效<sup>[3,12-16]</sup>,目前关于 *IL-24* 基因重组腺病毒表达载体对骨肉瘤基因治疗的研究未见报道。

因此,本研究在科室已构建的 Ad-*IL-24* 腺病毒载体基础上,在体外通过腺病毒感染 MG-63 细胞,研究 Ad-*IL-24* 诱导骨肉瘤细胞凋亡的效应及其作用机制。MTT 和 FCM 检测结果表明,腺病毒介导的 *IL-24* 基因表达均能明显抑制人骨肉瘤细胞生长,诱导细胞凋亡可能在于 Ad-*IL-24* 能诱导 MG-63 细胞中

的 *bax* 基因转录明显上调, *bcl-2* 基因则明显下调最后导致活化的 Cleaved Caspase-3 片段大量增加而诱导细胞凋亡。

在体内通过裸鼠人骨肉瘤移植瘤模型的建立,并开展了 Ad-*IL-24* 对骨肉瘤裸鼠的体内基因治疗效果的研究。结果使裸鼠骨肉瘤体积及重量均明显受到生长抑制效应, Ad-*IL-24* 的抑癌分子机制可能与上调肿瘤组织中的 *bax* 基因,下调 *bcl-2* 基因,从而激活 Caspase-3 途径诱导凋亡,及下调 CD34 抑制血管形成途径有关。

本研究为 Ad-*IL-24* 对人骨肉瘤的基因治疗提供了有价值的药效作用及分子机制的实验依据,为今后深入工作和应用研究奠定了基础。因此,将进一步开展腺病毒介导的 *IL-24* 在肿瘤的基因治疗及其分子机制的研究。

## REFERENCES

- [1] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, med-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 1995, **11**(12): 2477-2486.
- [2] Caudell EG, Mumm JB, 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 Immunol*, 2002, **168**(12): 6041-6046.
- [3] 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.
- [4] Wu DL, Wu ZZ, Ha XQ, *et al.* The gene therapy for rat myocardial ischemia using adenovirus mediated hepatocyte growth factor (HGF) gene. *Chin Sci Bull*, 2002, **47**: 1276-1279. 吴丹莉, 吴祖泽, 哈小琴, 等. 腺病毒载体介导肝细胞生长因子基因对大鼠心肌缺血的基因治疗. *科学通报*, 2002, **47**: 1276-1279.
- [5] Worth LL, Jia SF, Zhou Z, *et al.* Intranasal therapy with an adenoviral vector containing the murine interleukin-12 gene eradicates osteosarcoma lung metastases. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(9): 3713-3718.
- [6] Lafleur EA, Jia SF, Worth LL, *et al.* Interleukin(IL)-12 and IL-12 gene transfer up regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells. *Cancer Res*,

- 2001, **61**(10): 4066–4071.
- [7] Xie XK, Yang DS, Ye ZM, *et al.* Construction of antisense C-myc recombinant adenovirus and its anti-tumor effects on osteosarcoma celllines MG-63 and U20S. *Cancer*, 2005, **24**(3): 292–297.
- [8] Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, *et al.* Concurrent induction of T cell activation and apoptosis of osteosarcoma cells by adenovirus-mediated B7-1/Fas chimeric gene transfer. *Cancer Gene Ther*, 2003, **10**(9): 717–725.
- [9] Xie XK, Yang DS, Ye ZM, *et al.* Antisense c-myc sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin-induced apoptosis, *Chin J Pathophysiol*, 2005, **21**(7): 1326–1330.  
解先宽, 杨迪生, 叶招明, 等. 反义 c-myc 对增强顺铂引起骨肉瘤细胞凋亡作用的实验研究. *中国病理生理杂志*, 2005, **21**(7): 1326–1330.
- [10] Caudell EG, Mumm JB, Grimm EA, *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol*, 2002, **168**: 6041–6046.
- [11] 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**: 7051–7063.
- [12] Wang XH, Ye ZM, Yang JC, *et al.* Adenovirus-mediated IL-24 expression suppresses hepatocellular carcinoma growth via induction of cell apoptosis and cycling arrest and reduction of angiogenesis. *Cancer Biother Radio*, 2007, **22**(1): 56–63.
- [13] Wang XH, Ye ZM, 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, 叶震敏, 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.
- [14] Ye ZM, Wang XH, Yang JC, *et al.* The effect of oncolytic adenovirus on human umbilical vein endothelial cell. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(3): 397–402.  
叶震敏, 汪小华, 杨吉成, 等. 裂解型腺病毒 Ad-E1A 对人脐静脉内皮细胞的影响. *生物工程学报*, 2006, **22**(3): 397–402.
- [15] Xie Y, Sheng W, Yang J, *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**: 310–320.
- [16] 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.

—————

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

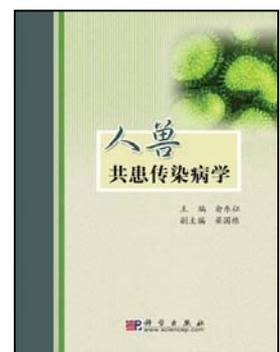
### 人兽共患传染病学

俞东征 主编 梁国栋 副主编

978-7-03-025561-7 ¥200.00 2009年9月出版

全书分3篇,共65章。第一篇阐述了病原、宿主、媒介与疫源地、疫源地调查、监测,以及与人兽共患传染病相关的基础知识。第二篇介绍广义的细菌引起的人兽共患传染病,共26种或类别。第三篇介绍病毒,包括朊病毒引起的人兽共患传染病,共29种或类别。第二和第三篇分别阐述了每种传染病的病原、在自然界存在方式、侵袭人类的方式、诊断、治疗和防治策略等。全书内容系统、丰富,介绍了人兽共患传染病领域中的先进经验和科学成果。

本书可以作为从事疾病预防控制的专业人员的继续教育读物,也可以作为医学院校学生和教师的参考读物。本书也适合作为关心卫生与健康事业人们的业余读物。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>