

Ad-ING4-IL-24 双基因共表达对人肺腺癌化疗的增敏效应

朱晔涵¹, 杜贤荣¹, 陈华昕¹, 谢宇锋², 盛伟华², 杨吉成²

1 苏州大学附属第一医院呼吸内科, 苏州 215006

2 苏州大学医学部 细胞与分子生物学教研室, 苏州 215123

摘要: 研究 *ING4* (肿瘤生长抑制因子 4) 和 *IL-24* (人白细胞介素 24) 双基因共表达腺病毒载体 (Ad-ING4-IL-24) 对肺腺癌的化疗增敏效应及分子机制。将 Ad-ING4-IL-24 感染 A549 肺癌细胞及联合顺铂 (DDP) 化疗药物作用, RT-PCR 和 Western blotting 检测 *ING4* 和 *IL-24* 基因在 A549 肺癌细胞中的转录和表达, MTT 法、流式细胞仪 (FCM) 和 Hoechst 染色法检测 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP (联合组) 对 A549 肺癌细胞的生长抑制和凋亡效应。采用 A549 细胞株建立人肺腺癌裸鼠模型, 然后瘤体局部注射干预用药, 动态测量肿瘤体积, 并计算瘤重抑瘤率, 免疫组化检测 *ING4*、*IL-24*、*bax*、*bcl-2*、*VEGF* 等基因的表达。结果表明, Ad-ING4-IL-24 感染 A549 肺癌细胞后可获得成功转录和表达, 体外联合组能明显抑制 A549 肺癌细胞生长和诱导细胞凋亡, 呈现出典型细胞凋亡形态学变化。体内联合组同样能显著抑制肿瘤生长, 瘤重抑瘤率达 52.81%, 免疫组化结果显示联合组能上调 *bax* 基因表达, 同时下调 *bcl-2*、*VEGF* 等基因的表达。以上结果表明 Ad-ING4-IL-24 具有化疗增敏的作用, 该作用机制可能与促进肿瘤细胞凋亡和抑制血管形成有关。

关键词: *ING4*, *IL-24*, 顺铂, 肺腺癌, 化疗增敏

Effect of adenovirus-mediated *ING4* and *IL-24* co-expression on chemosensitivity to human lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*

Yehan Zhu¹, Xianrong Du¹, Huaxin Chen¹, Yufeng Xie², Weihua Sheng², and Jicheng Yang²

1 Department of Respiratory of the First Affiliated Hospital in Soochow University, Suzhou 215006, China

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

Abstract: To study the chemosensitivity and the mechanisms of recombinant adenovirus vector expressing *ING4* and *IL-24* (Ad-ING4-IL-24) on lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*, the expression of *ING4* and *IL-24* in A549 cells was detected by RT-PCR and Western blotting. The growth inhibition, apoptosis rate and apoptosis body were measured by MTT, flow cytometry and

Received: May 27, 2010; **Accepted:** September 20, 2010

Supported by: Health and Science Foundation of Health Department of Jiangsu Province (No. H200914).

Corresponding author: Yehan Zhu. Tel: +86-512-67780353; E-mail: zhuyehansz@sina.com

江苏省卫生厅卫生科技发展项目 (No. H200914) 资助。

Hoechst staining respectively. For *in vivo* study, we first established the A549 tumor model by grafting A549 cells in athymic nude mice; and then injected Ad-ING4-IL-24 into the tumors. Two weeks after injection, we killed the mice, removed the tumors, weighted and calculated the ratios of tumor-suppression. We also detected the expressions of ING4, IL-24, bax, bcl-2, VEGF with immunohistochemistry. The results indicated that ING4 and IL-24 were proved successfully transcription and expression in A549 cells. More interestingly, the joint group inhibited the growth of A549 cells and induced apoptosis. The *in vivo* data showed that the joint group suppressed the tumor growth conspicuously through up-regulating the expression of bax, and down-regulating the expression of bcl-2, VEGF. The study proved that Ad-ING4-IL-24 significantly enhanced the chemosensitivity to anticancer drug DDP in lung adenocarcinoma, which may related with cell apoptosis and antiangiogenesis.

Keywords: *ING4, IL-24*, cisplatin (DDP), adenocarcinoma, chemosensitivity

近年来肺癌的总体发病率呈明显上升趋势, 5 年生存率仍为 15% 左右, 无明显提高, 严重威胁着人类的健康。目前对不适合手术切除的病人, 使用细胞毒性药物的化学治疗就成为大部分肺癌患者的首选治疗方法^[1]。尽管新的抗癌化疗药物不断推出, 但是化疗对肺癌的治疗效果仍无显著提高, 治疗失败的主要原因是肺癌细胞多药耐药性 (MDR) 的产生, 为了克服肺癌细胞多药耐药性, 寻求化疗增敏剂以提高疗效是较为有效的途径, 但不少化疗增敏剂均因毒性太大或效果有限而遭淘汰, 甘氨酸双唑啉 (Sodium glycididazole, CM-Na) 是我国研制的新型硝基咪唑类乏氧细胞增敏剂。前期基础与临床研究证实: CM-Na 能选择性提高肿瘤内乏氧细胞的放射敏感性, 对食管癌、非小细胞肺癌 (Non-Small cell lung cancer, NSCLC) 等实体瘤放射增敏效果明显。其也有一定的化疗增敏作用, 临床数据仍在积累过程中, 但尚不能证明合用该药明显优于现有标准化疗及化放疗方法。因此, 寻求高效低毒并能改善患者预后的化疗增敏剂任重道远。

目前, 将血管内皮生长因子 (VEGF) 的单克隆抗体贝伐单抗 (Bevacizumab, Avastin) 与化疗药物联合应用的生物化疗手段, 在晚期癌症的治疗中显示出良好的疗效。鉴于 *ING4*^[2] 基因是近年来新发现的一种肿瘤抑制因子, 属于生长抑制因子家族 (Inhibitor of growth family, ING 家族) 新成员, 具有提高化疗药物敏感性的作用^[3], *IL-24* 也具有抑制肿瘤细胞生长^[4] 和提高肺癌细胞化疗敏感性的作用^[5], 已有研究表明^[6] 构建的 *IL-24* 和 *E1A* 双基因

共表达腺病毒载体, 作用于肝癌细胞后产生了更为显著的抑瘤作用, 那么将 *IL-24* 和 *ING4* 两基因联合共表达能否对肺癌细胞起化疗增敏的作用? 我们在成功构建 *IL-24* 和 *ING4* 双基因联合共表达载体 (Ad-*ING4-IL-24*) 的基础上, 观察了 Ad-*ING4-IL-24* 及与顺铂联合作用于 A549 细胞及裸鼠移植瘤的化疗增敏效应的影响, 并探讨了其分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株 A549、QBI-293A 细胞及携带 GFP (绿色荧光蛋白) 的腺病毒空载体 Ad、Ad-*ING4-IL-24* 由苏州大学基础医学系细胞与分子生物学教研室提供; RPMI-1640、新生小牛血清购自杭州赛乐生物科技公司; RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物技术有限公司; MMLV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶购自 MBI; *IL-24*、*ING4* 基因引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1; *IL-24*、*ING4* 一抗购自美国 abcam 公司; 二抗均购于碧云天生物技术研究所以; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; Annexin-v-PE/7-AAD 凋亡试剂盒购于 Southern Biothec 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; 顺铂 (DDP) 购自江苏连云港豪森制药有限公司; 3~4 周龄、体重 18~20 g/只雄性 BALB/C 裸鼠购自中国科学院上海斯莱克实验动物中心 [许可证号: SCXK(沪)2007-0005]; bcl-2、bax、VEGF 抗体购自晶美公司。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1: <i>β-actin</i> Forward	TGCGTGACATTAAGGAGAAG
P2: <i>β-actin</i> Reverse	CTGCATCCTGTCGGCAATG
P3: <i>IL-24</i> Forward	GCACTCGAGACCATGAATTTCAA CAGAGGCTGCA
P4: <i>IL-24</i> Reverse	GCTTCTAGATCAGAGCTTGTAGAA TTTCTG
P5: <i>ING4</i> Forward	TAGAGATCTACCATGGCTGCTGGG ATGTATTTGG
P6: <i>ING4</i> Reverse	ACCGTCGACCCTATTTCTTCTCCG TTCTTG

1.2 方法

1.2.1 *IL-24* 和 *ING4* 双基因共表达腺病毒载体的构建

在苏州大学医学部细胞与分子生物学教研室构建的 pAdTrack-IRES 双基因共表达空载体的基础上, 成功构建了 *IL-24* 和 *ING4* 双基因共表达腺病毒载体: 首先在 pAdTrack-CMV 转移载体 *Sal* I、*Not* I 酶切位点间插入 IRES 片段, 构建 pAdTrack-CMV-IRES 改造转移空载体; 然后在 pAdTrack-CMV-IRES 改造转移空载体 *Xho* I、*Xba* I 酶切位点间插入 *IL-24* 片段; *Bgl* II、*Sal* I 酶切位点间插入 *ING4* 片段, 分别构建 pAdTrack-CMV-IRES-*IL-24*、pAdTrack-CMV-*ING4*-IRES 单基因重组转移载体; 最后在 pAdTrack-CMV-IRES-*IL-24* 单基因重组转移载体 *Bgl* II、*Sal* I 酶切位点间插入 *ING4* 片段, 构建 pAdTrack-CMV-*ING4*-IRES-*IL-24* 双基因转移载体 (图 1), 具体操作由苏州大学基础医学和生物科学学院细胞与分子生物学教研室谢宇锋老师完成。

1.2.2 Ad、Ad-*ING4*-*IL-24* 腺病毒的扩增与效价的测定

通过 Ad、Ad-*ING4*-*IL-24* 感染 QBI-293A 细胞

获得重组病毒子扩增, 具体操作步骤及效价测定按本科室常规方法进行^[4]。

1.2.3 细胞培养与分组

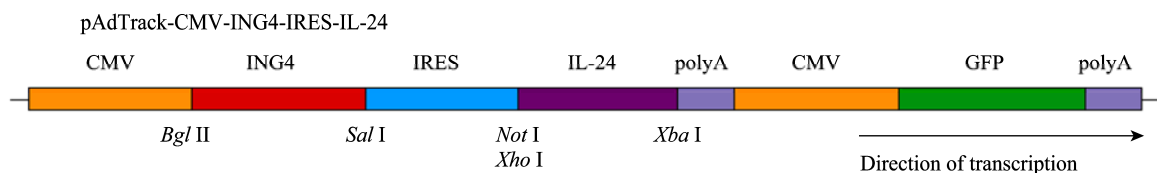
采用常规培养, 培养液为含 10% 小牛血清的 RPMI-1640。在 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 温箱中培养, 每 1~2 天换液传代。分别设以下 5 组: 1) 阴性对照组 (PBS 组): 0.1 mol/L PBS, 2) 空载体对照组 (Ad 组): 50 MOI Ad, 3) 阳性对照组 (DDP 组): 顺铂 DDP (终浓度为 25 μg/mL), 4) Ad-*ING4*-*IL-24* 组: 50 MOI Ad-*ING4*-*IL-24*, 5) Ad-*ING4*-*IL-24* 联合 DDP (联合组): 50 MOI Ad-*ING4*-*IL-24*+DDP (终浓度为 12.5 μg/mL)。

1.2.4 *ING4*、*IL-24* 在 A549 细胞中表达的鉴定

按上述分组处理 A549 细胞后, 于 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 48 h 后在倒置显微镜及荧光显微镜下观察感染情况及细胞形态变化。

1 000 r/min 离心收集上述各组细胞, PBS 洗涤 2~3 次后, 按总 RNA 抽提试剂盒说明书操作提取 RNA, 用 *IL-24* (P3、P4) 和 *ING4* (P5、P6) 的引物进行 RT-PCR。PCR 的反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 50 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

同时收集上述各组细胞按 10⁷ 细胞/mL 比例加细胞裂解液 (含终浓度为 1 mmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂) 进行裂解, 充分裂解后 12 000 r/min 离心 5 min, 取总蛋白上清进行蛋白变性, 然后进行 12% SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h; 先后用羊抗人 *ING4* 抗体、鼠抗人 *IL-24* 抗体和 HRP 标记的驴抗羊和羊抗鼠的二抗孵育 PVDF 膜, DAB 显色检测目的蛋白。

图 1 *ING4* 和 *IL-24* 双基因共表达模式示意图Fig. 1 Co-expression mode of *ING4* and *IL-24*.

1.2.5 MTT法检测Ad-ING4-IL-24联合DDP对A549细胞生长的影响

将指数生长期的A549细胞,按 1×10^5 /mL的细胞浓度,于96孔培养板每孔加100 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养24 h后,弃上清,按1.2.3分组进行实验,每组设3个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育,随后分别于1 d、2 d、3 d、4 d时加入MTT 10 μ g/mL (5 mg/mL),继续孵育4 h后加入10% SDS-HCl终止液(100 μ L/孔),置于37 $^{\circ}$ C,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,以 OD_{570} 值为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线,并计算细胞生长抑制率。

生长抑制率=(对照组 OD_{570} 值-实验组 OD_{570} 值)/对照组 OD_{570} 值 $\times 100\%$ 。

1.2.6 Annexin-V-PE/7-AAD双染FMC检测Ad-ING4-IL-24联合DDP对A549细胞凋亡的影响

取对数生长期的A549细胞,按1.2.3方法进行分组开展细胞凋亡的诱导实验,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养72 h后收集细胞,PBS清洗2次,用1 \times 结合缓冲液调整细胞浓度至 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL,取100 μ L细胞于流式管中,加10 μ L Annexin-V-PE冰上混匀,避光15 min。依次加入380 μ L 1 \times 结合缓冲液和10 μ L 7-AAD,上流式细胞仪检测。

1.2.7 激光共聚焦显微镜(LSCM)观察Ad-ING4-IL-24联合DDP对A549细胞的核形态学改变

在铺有玻片的六孔板中按 5×10^4 个/孔接种A549细胞,24 h后按上述分组处理细胞,再培养48 h后收获细胞悬液,用PBS洗2~3次,经4%多聚甲醛固定,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 肺癌动物模型的建立

取对数生长期的A549肺癌贴壁细胞,PBS洗涤,经0.25%胰酶消化,PBS洗涤2次,2 000 r/min离心5 min收获细胞,重悬于无血清的1640培养液中,调整细胞浓度达 4×10^7 个/mL。取30只2~3周BALB/C雄性裸鼠,用安尔碘在其右前肢腋下消毒

后皮下注射上述制备的A549肺癌细胞悬液100 μ L (4×10^6 个细胞/只),在SPF环境下饲养。隔日观察A549人肺癌细胞在裸鼠体内的生长和成瘤情况。

1.2.9 实验分组和抗肿瘤治疗

皮下接种2周待肿瘤直径长至约5 mm时,将其随机分成5组,每组6只,各组均使用瘤体内多点注射干预用药,PBS组用0.1 mL PBS,Ad组、Ad-ING4-IL-24组分别用0.1 mL (10^9 PFU/mL) Ad和Ad-ING4-IL-24,DDP组按4 mg/kg剂量注射DDP,联合组注射0.1 mL Ad-ING4-IL-24+DDP (2 mg/kg),隔日1次,共6次。

1.2.10 检测指标及方法

用药前和用药后第5、10、15、20天用游标卡尺分别测量皮下移植肿瘤的长径(a)、短径(b),按公式计算瘤体体积($V=ab^2/2$),绘制肿瘤体积-时间变化曲线。治疗结束1周后处死裸鼠,摘取瘤体并称重,计算各组抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组肿瘤平均瘤重-治疗组肿瘤平均瘤重)/对照组肿瘤平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.11 免疫组化检测瘤体中各种因子的表达

肿瘤组织标本用10%中性甲醛固定过夜,常规石蜡包埋,用于进行免疫组化检测。采用抗体免疫组化SP染色后,以细胞质内和(或)细胞膜出现散在或弥漫状分布的棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随机计数5个400倍视野,以每个视野所含阳性细胞数的平均值评价ING4、IL-24、bax、bcl-2、VEGF蛋白的表达情况,取同组所有切片平均数进行统计学处理。

1.2.12 数据处理

联合组的化疗增敏效果判断用金正均法(计算 q 值), q 值= $E(A+B)/(EA+EB-EA \cdot EB)$,式中 EA 、 EB 分别为 A 、 B 单用之效应,分子 $E(A+B)$ 代表实测合并效应,分母是期望合并效应。当 q 值=1 \pm 0.15时,两药间被认为有相加作用, q 值 >1.15 时,两药间被认为有协同作用,当 $q < 0.85$ 时,两药间有

拮抗作用。

应用 SPSS 16.0 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, 组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ING4、IL-24 表达的鉴定

经多轮感染、扩增后, 测定的病毒效价达 10^9 PFU/mL, 用 50 MOI 剂量的病毒感染 A549 细胞, 体外培养 72 h 后 (图 2), Ad-ING4-IL-24 作用的 A549 细胞出现变圆、脱落、皱缩等病变, Ad 作用的 A549 细胞虽有轻度变圆, 但无脱落、皱缩等病

变, PBS 组细胞贴壁生长状态良好, 数量多, 形态正常, DDP 作用后的细胞圆缩脱落, 细胞贴壁数量减少。RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示, Ad-ING4-IL-24 组和联合组在 620 bp 位置可检测到一条 *IL-24* 基因转录特异性条带, 在 750 bp 位置可检测到一条 *ING4* 基因转录特异性条带, 而 PBS、Ad 和 DDP 对照组中未出现预期条带 (图 3)。Western blotting 结果显示, Ad-ING4-IL-24 组和联合组在相应位置产生了与抗 ING4 抗体和抗 IL-24 抗体结合的特异性条带, 而 PBS、Ad 和 DDP 组则在相应位置未出现条带 (图 4)。结果表明腺病毒介导的外源性 *ING4*、*IL-24* 目的基因能在 A549 细胞中成功进行 mRNA 转录和蛋白表达。

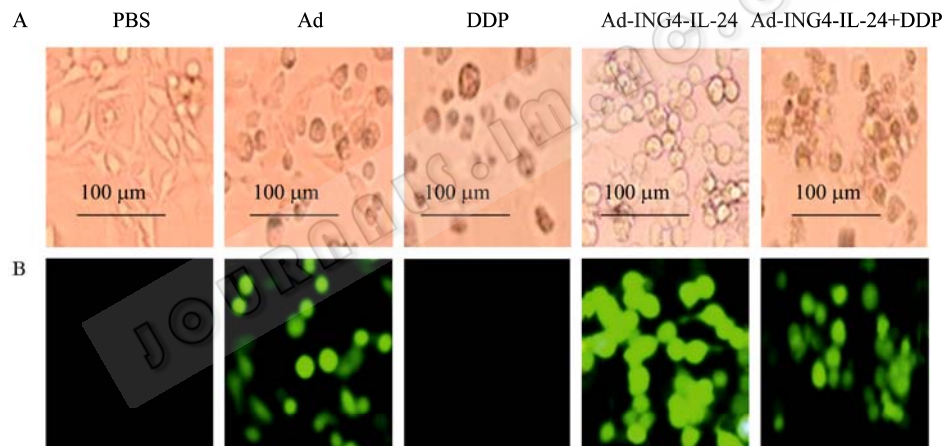


图 2 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 作用 A549 细胞的形态变化

Fig. 2 Morphologic change of A549 cells transduced with Ad-ING4-IL-24 and combined with DDP. (A) Light microscope. (B) Fluorescence microscope.

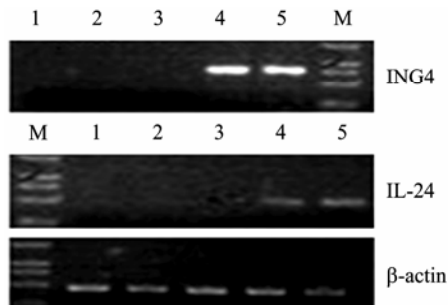


图 3 RT-PCR 鉴定 ING4、IL-24 在 A549 细胞中的表达

Fig. 3 Identification of ING4 and IL-24 in A549 cells by RT-PCR. M: DNA marker; 1: PBS group; 2: Ad group; 3: DDP group; 4: Ad-ING4-IL-24 group; 5: Ad-ING4-IL-24+DDP group.

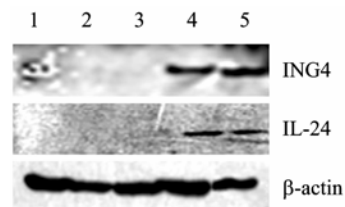


图 4 Western blotting 鉴定 ING4、IL-24 在 A549 肺癌细胞中的表达

Fig. 4 Expression of ING4 and IL-24 in A549 cells by Western blotting. 1: PBS group; 2: Ad group; 3: DDP group; 4: Ad-ING4-IL-24 group; 5: Ad-ING4-IL-24+DDP group.

2.2 MTT 法检测 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 对 A549 细胞生长的抑制

MTT 法检测发现, Ad-ING4-IL-24、DDP、联合组对 A549 细胞的生长有明显的抑制作用并呈时间依赖性 (图 5), 其中第 4 天的生长抑制率 (图 6) 分别为 (56.94±2.14)%、(64.24±0.86)% 和 (75.38±0.95)%, 与细胞对照 PBS 组和 Ad 空载体腺病毒组比较呈显著性差异 ($P<0.05$)。联合组的生长抑制作用明显优于 Ad-ING4-IL-24 组和 DDP 组 ($P<0.05$), 呈现化疗增敏的相加效应 (q 值=0.89), 而 PBS 组和 Ad 组无显著性差异 ($P>0.05$)。

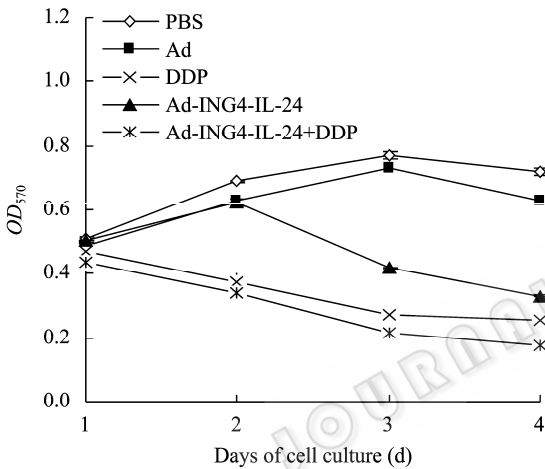


图 5 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 对 A549 细胞生长抑制作用曲线图
Fig. 5 Growth inhibiting curve chart of A549 cells transduced with Ad-ING4-IL-24 and combined with DDP.

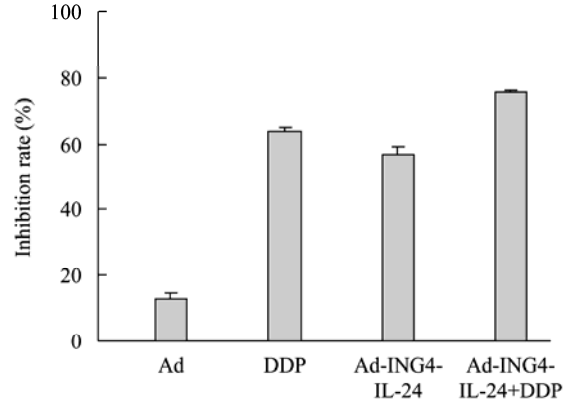


图 6 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 对 A549 细胞的生长抑制率
Fig. 6 Growth inhibiting ratio of A549 cells transduced with Ad-ING4-IL-24 and combined with DDP.

2.3 Annexin-V-PE/7-AAD 双染法 FCM 检测 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 对 A549 细胞凋亡的影响

用 Annexin-V-PE/7-AAD 双染流式细胞仪检测细胞凋亡 (图 7)。由图可见 Ad-ING4-IL-24、DDP 和联合组均能诱导 A549 细胞凋亡, 72 h 早期平均凋亡率分别为 (30.67±2.69)%、(23.56±3.07)% 和 (52.81±3.44)%, 与 Ad 空载体腺病毒组和细胞对照 PBS 组比较呈显著性差异 ($P<0.05$), 其中联合组诱导 A549 细胞凋亡的作用明显优于 Ad-ING4-IL-24 组及 DDP 组 ($P<0.05$), 也呈现化疗增敏的相加效应 (q 值=1.12)。

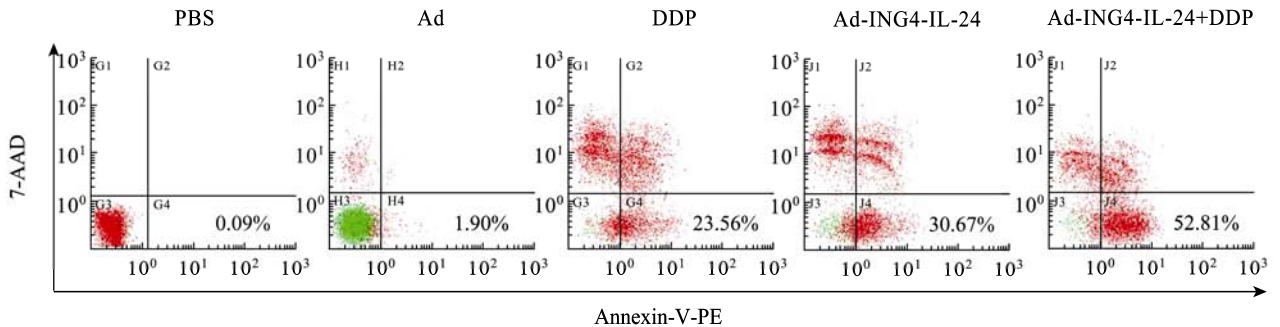


图 7 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡率
Fig. 7 Apoptosis rate of A549 cells detected by flow cytometry.

2.4 Ad-ING4-IL-24 及其联合 DDP 诱导 A549 肺癌细胞凋亡的细胞核形态改变

用激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡的核形态变化 (图 8), 由图可见 Ad-ING4-IL-24 作用的 A549 细胞很多出现胞体固缩, 核断裂, 形成大小不等的块状或颗粒状的荧光碎片, 即典型的凋亡小体, DDP 组及 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 组的 A549 肺癌细胞

核均出现深染、固缩, 甚至断裂, 呈现明显的细胞凋亡的核形态特征, 而 PBS、Ad 空载体腺病毒处理的细胞核形态正常, 未出现上述细胞凋亡的特征。

2.5 体内对人肺癌裸鼠移植瘤的抗肿瘤效应

裸鼠皮下接种 A549 人肺癌细胞后, 2 周左右直径可达 5 mm 左右, 成瘤率达 100%。由图 9A 和图 9B 可见, Ad-ING4-IL-24、DDP 和联合组对 A549

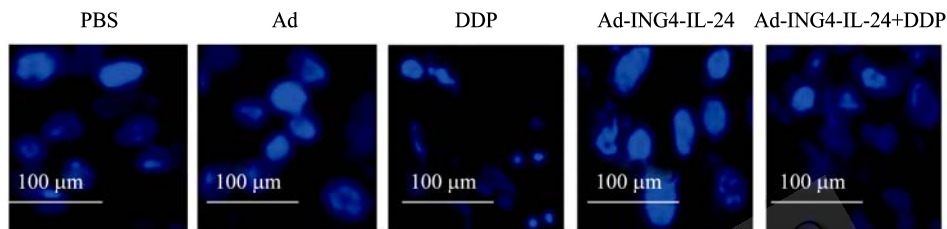


图 8 荧光显微镜观察 A549 细胞凋亡小体的形态学观察
Fig. 8 Apoptotic body of A549 cells observed by LSCM.

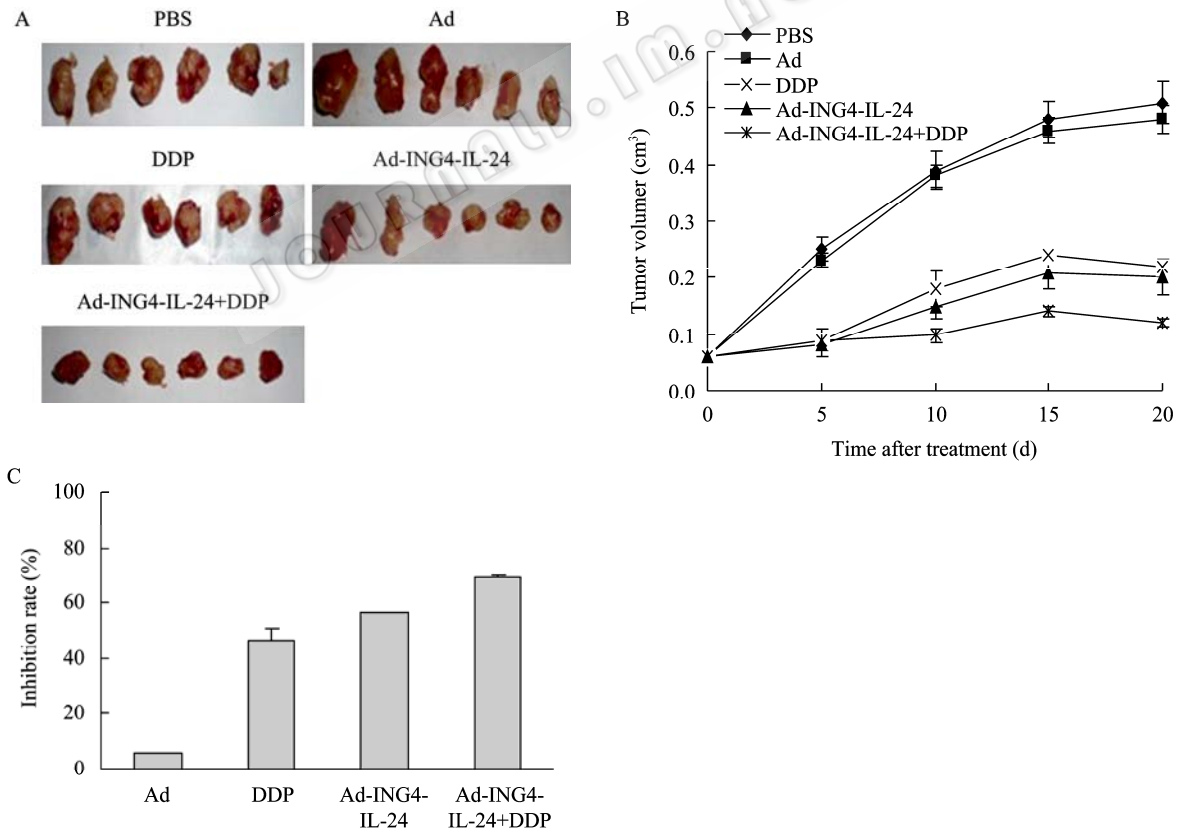


图 9 Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 对肺癌移植瘤的抑瘤效应

Fig. 9 Inhibitory effect of lung cancer treated with Ad-ING4-IL-24 and combined with DDP. (A) The pictures of lung cancer. (B) The curves of tumor volume of lung cancer after treatment. (C) The inhibitory rate of tumor weight after treatment.

裸鼠人肺癌移植瘤均有不同程度的抑制作用,与 Ad 组和 PBS 组比较呈显著性差异 ($P < 0.05$),联合组对裸鼠人肺癌移植瘤的体内抗肿瘤效应明显优于 Ad-ING4-IL-24 组及 DDP 组 ($P < 0.05$)。瘤重抑瘤率比较如图 9C 所示,联合组的瘤重抑瘤率达 $(69.7 \pm 0.34)\%$,与 Ad-ING4-IL-24 组 $(56.58 \pm 0.3)\%$ 和 DDP 组 $(46.47 \pm 4)\%$ 的抑瘤率相比具有统计学差异 ($P < 0.05$),对肺癌移植瘤的生长具有化疗增敏的相加作用 (q 值=0.91)。而 PBS 组 Ad 组相比,无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.6 各组病理切片结果

2.6.1 瘤体切片 *ING4*、*IL-24* 蛋白的表达

免疫组化检测结果显示:Ad-ING4-IL-24 组、联合组的 *ING4*、*IL-24* 阳性细胞数明显高于 PBS 组和 Ad 组,并呈强阳性表达(图 10)。而 PBS 组、Ad 组、DDP 组为阴性或弱阳性表达。表明腺病毒介导的外源性 *ING4*、*IL-24* 目的基因能在肺癌移植瘤中获成功表达,同时也说明 A549 肺癌细胞本身 *ING4*、*IL-24* 基因表达能力很弱或发生了缺陷,这种缺陷也可能与肺癌的发生有关。

2.6.2 瘤体切片 *bax*、*bcl-2*、*VEGF* 基因表达的检测结果

由图 11 可见,Ad-ING4-IL-24 组、DDP 组、联合组的 *bax* 阳性细胞数明显高于 PBS 组和 Ad 组 ($P < 0.05$),*bcl-2*、*VEGF* 阳性细胞数明显低于 PBS 组和 Ad 组 ($P < 0.05$),而联合组明显优于 Ad-ING4-IL-24 组及 DDP 组 ($P < 0.05$),PBS 组和 Ad 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明联合组能通过诱导肿瘤细胞凋亡和抑制血管生长等途径抑制裸鼠人肺癌移植瘤的生长。

3 讨论

长期以来化疗对晚期肺癌,尤其 NSCLC 疗效并不理想,含铂的联合化疗方案是肺癌化疗的主要方案,其效率一般在 20%~48% 之间^[7]。效果仍不甚理想,主要原因在于肿瘤细胞的耐药性。因此,寻求

高效低毒的化疗增敏剂及与细胞毒药物有协同抗肿瘤活性而少有毒副作用的药物是提高化疗有效率的主要研究方向之一。

2004 年在 Nature 杂志上 *ING4* 基因正式被确定为一种重要的肿瘤生长抑制因子^[8]。研究表明,*ING4* 可通过多途径发挥特异性抗肿瘤效应,靶向诱导肿瘤细胞凋亡,是一种潜在的新型抑癌基因,Zhang 等^[3]建立了几个稳定表达 *ING4* 的肝癌细胞系(HepG-2),发现 *ING4* 能明显抑制 HepG-2 细胞生长,提高肝癌细胞对 DNA 损伤试剂(如鬼臼乙叉甙和阿霉素)的化学敏感性。白细胞介素 24(*IL-24*) 作为一种抑癌基因,起初是在人类黑色素瘤细胞^[9]中诱生而获得的。研究表明,*IL-24* 不仅能特异抑制多种肿瘤细胞生长、抑制肿瘤血管形成^[10]和靶向诱导肿瘤细胞凋亡,而且还能提高化疗和放疗对肿瘤的敏感性^[11-13]。

本研究采用 MTT 和 FCM 检测结果表明,Ad-ING4-IL-24 联合 DDP 化疗药物可抑制 A549 肺癌细胞生长和诱导凋亡,明显优于 Ad-ING4-IL-24 组及 DDP 组,体内对肺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用和诱导凋亡作用也明显优于 Ad-ING4-IL-24 组及 DDP 组,具有化疗增敏的相加效应。MDR 产生的机理较复杂,普遍认为肿瘤细胞凋亡抵抗是产生多药耐药性的主要机制之一。大多数肿瘤化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用的。*Bcl-2* 是凋亡抑制基因。有研究发现 *bcl-2* 的过度表达与瘤细胞中的耐药基因的表达相关联,并可通过抑制细胞凋亡而导致耐药性的发生^[14]。*Bax* 是促进细胞凋亡的基因,*bcl-2* 与 *bax* 在体内是通过二聚体而发挥作用的,*bax/bcl-2* 下降,抑制凋亡,*bax/bcl-2* 升高,促进凋亡。本研究结果显示联合组的 *bax* 蛋白表达明显上调,而 *bcl-2* 蛋白表达明显下降,*bax/bcl-2* 升高。因此,Ad-ING4-IL-24 通过上调 *bax* 和下调 *bcl-2* 表达来诱导肿瘤细胞凋亡可能是 Ad-ING4-IL-24 化疗增敏的重要机制之一。

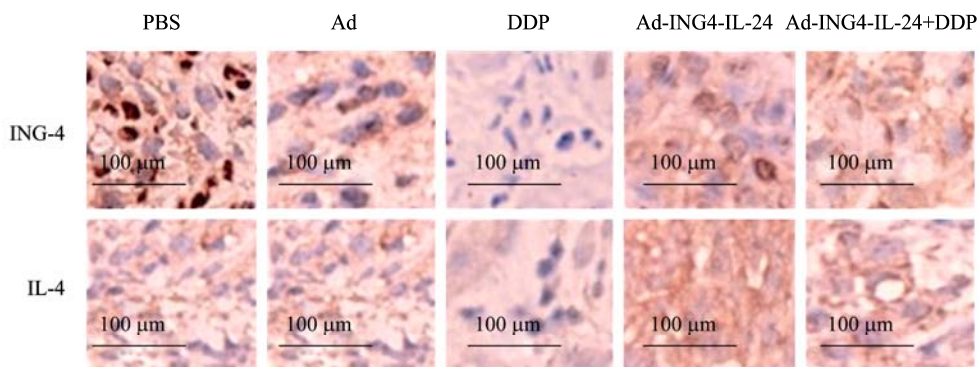


图 10 免疫组化检测瘤体中 ING4、IL-24 蛋白的表达
Fig. 10 Expression of ING4 and IL-24 in lung cancer.

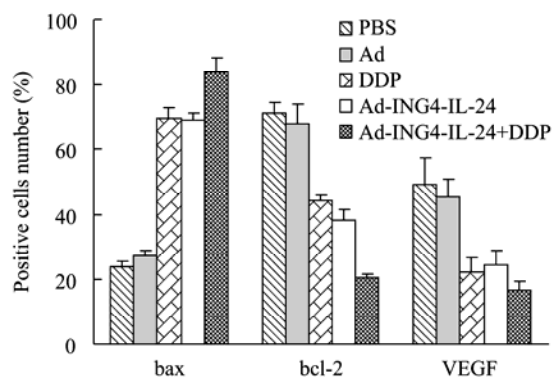
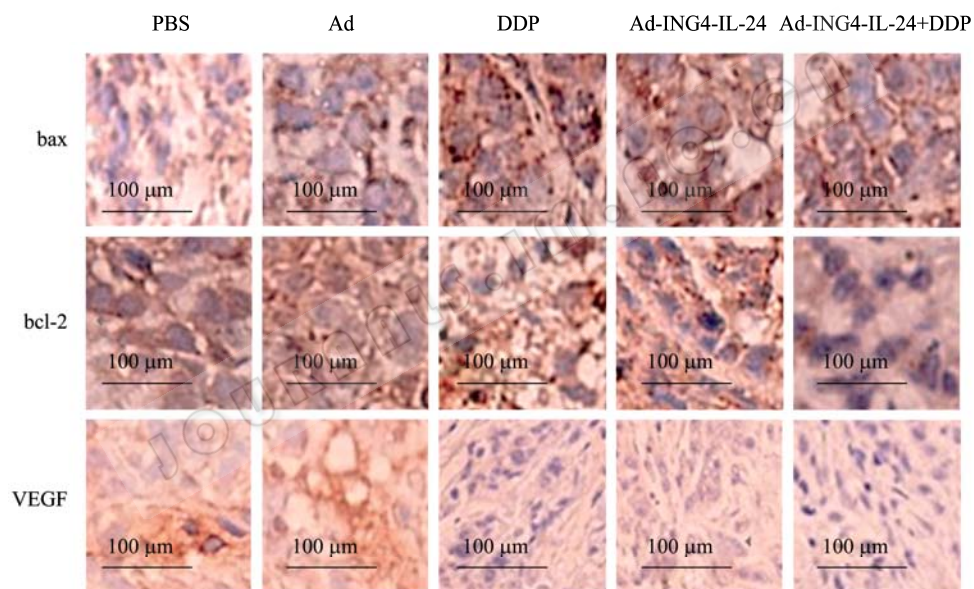


图 11 免疫组化法检测瘤体中各种因子的表达变化
Fig. 11 Expression change of cytokines in lung cancer.

近年来化疗与抗血管生成药的联合应用也越来越多, 抗血管生成疗法已成为癌症化疗增敏的新策略^[15]。贝伐单抗为血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的人源单抗。联合贝伐单抗的化疗方案在美国及许多其他国家已获准作为结直肠癌的一线治疗^[16]。此联合贝伐单抗治疗方法在乳腺癌及非小细胞肺癌的 III 期临床试验也同样显示了较为理想的结果。研究显示联合组的 VEGF 阳性细胞数明显低于 Ad-ING4-IL-24 组与 DDP 组, 提示 Ad-ING4-IL-24 抑制 VEGF 的表达从而抑制肿瘤血管生成, 可能是 Ad-ING4-IL-24 化疗增敏的又一途径。

综上所述, 本研究结果表明 Ad-ING4-IL-24 能提高人肺腺癌细胞及移植瘤对 DDP 的化疗敏感性, 即具有化疗增敏作用。

REFERENCES

- [1] Chu DT. The Evaluation of Current Therapeutic Regimens of Medical Oncology. Beijing: Peking University Medical Press, 2004: 289.
储大同. 当代肿瘤内科治疗方案评价. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 289.
- [2] Kim S, Chin K, Gray JW, et al. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of *ING4* as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(46): 16251–16256.
- [3] Zhang X, Xu LS, Wang ZQ, et al. ING4 induces G2/M cell cycle arrest and enhances the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells. *FEBS Lett*, 2004, 570(1/3): 7–12.
- [4] 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.
- [5] Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 reverses multidrug resistance in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(11): 2985–2994.
- [6] Wang XH, Miao JC, Xie YF, et al. Construction of adenovirus vector expressing IL-24 and E1A and its inhibition of SMMC-7721. *Chin J Biotech*, 2009, 25(7): 1035–1041.
汪小华, 缪竞诚, 谢宇锋, 等. 腺病毒介导 IL-24-E1A 双基因载体的构建及其体外抑制 SMMC-7721 肝癌细胞生长作用初探. *生物工程学报*, 2009, 25(7): 1035–1041.
- [7] Lübke AS, Alexion C, Bergemann C. Clinical application of magnetic drug targeting. *J Surg Res*, 2001, 95(2): 200–206.
- [8] Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature*, 2004, 428(6980): 328–332.
- [9] 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.
- [10] Inoue S, Branch CD, Gallick GE, et al. Inhibition of Src kinase activity by Ad-*mda7* suppresses vascular endothelial growth factor expression in prostate carcinoma cells. *Mol Ther*, 2005, 12(4): 707–715.
- [11] Huang EY, Madireddi MT, Gopalkrishnan RV, 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.
- [12] Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 reverses multidrug resistance in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(11): 2985–2994.
- [13] Yacoub A, Mitchell C, Lister A, et al. Melanoma differentiation-associated 7(interleukin 24) inhibits growth and enhances radiosensitivity of glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(9): 3272–3281.
- [14] Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*, 2008, 68(9): 3421–3428.
- [15] Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science*, 2006, 312(5777): 1171–1175.
- [16] Ma J, Waxman DJ. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12): 3670–3684.