

# 携带*TSLC1*基因的双靶向溶瘤腺病毒联合阿霉素对 SMMC-7721肝癌细胞的杀伤作用

郭科妮 卓玲燕 刘涛 李晓艳 李阿荣 王毅刚\*

(浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

**摘要** 研究携带*TSLC1*基因的溶瘤腺病毒(Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-*TSLC1*)联合化疗药物阿霉素(adriamycin, ADM)对SMMC-7721肝癌细胞的体外杀伤作用。实时定量PCR检测*TSLC1*在不同肝细胞中的表达情况;用荧光显微镜观察阿霉素、Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-*TSLC1*单独作用和两联合作用的细胞形态学的变化;采用MTT法、结晶紫染色、Hoechst33342染色检测各处理组细胞的存活率和凋亡水平情况;通过Western blot检测*TSLC1*和E1A蛋白水平的表达。结果表明,联合应用Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-*TSLC1*和阿霉素的细胞凋亡现象比单独作用的效果显著,表明阿霉素能够增强携带*TSLC1*基因的溶瘤腺病毒对肝癌细胞SMMC-7721的杀伤作用,为肝癌治疗的临床应用奠定一定基础。

**关键词** *TSLC1*; 溶瘤腺病毒; 阿霉素; SMMC-7721

## Killing Effect to Hepatoma Cell SMMC-7721 by Dual-regulated Oncolytic Adenovirus-Mediated *TSLC1* Combined with Adriamycin

Guo Keni, Zhuo Lingyan, Liu Tao, Li Xiaoyan, Li Arong, Wang Yigang\*

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** The study explores the combinational killing effects of dual-regulated oncolytic adenovirus-mediated *TSLC1* (Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-*TSLC1*) and adriamycin (ADM) against hepatoma cell SMMC-7721 *in vitro*. The method of RT-PCR was performed to test the expression of *TSLC1* at the level of transcription. The morphological change was assessed by fluorescence microscope. MTT assay, crystal violet assay and Hoechst33342 staining were used to determine the growth inhibition effect and cytopathic effect of single or combination therapy on hepatoma cell SMMC-7721. The expression level of *TSLC1*, E1A protein was assayed by Western blot. These results demonstrated that combination therapy of Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-*TSLC1* and ADM induces apoptosis characteristics more significantly than either single treatment, and low doses of ADM enhanced the killing effects of dual-regulated oncolytic adenovirus-mediated *TSLC1*.

**Key words** *TSLC1*; oncolytic adenovirus; adriamycin; SMMC-7721

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,原发性肝癌(primary hepatic

carcinoma, PHC)是我国常见的恶性肿瘤,有“癌中之王”的称号。目前,对于肝癌的治疗主要以手术治疗、

收稿日期: 2012-10-19 接受日期: 2012-12-17

国家自然科学基金(批准号: 81272687)和浙江理工大学科研启动基金(批准号: 1016845-Y、1016834-Y)资助的课题

\*通讯作者。 Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

Received: October 19, 2012 Accepted: December 17, 2012

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687) and Zhejiang Sci-Tech University Study Start-up Grants (Grant No.1016845-Y, 1016834-Y)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

网络出版时间: 2013-03-05 11:22 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130305.1122.001.html

放射治疗和化学治疗为常用的治疗形式, 但肝癌的复发率和致死率仍然居高不下, 肿瘤的传统疗法已经举步维艰, 对肝癌治疗新技术的研究极为重要和迫切。随着肿瘤的基因病毒治疗的不断发展, 目前以肿瘤特异性增殖腺病毒(即溶瘤腺病毒)为代表的生物疗法已经成为癌症治疗领域的研究热点。中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所的刘新垣院士于2001年首次提出了癌症的靶向基因-病毒治疗(targeting gene-virotherapy)的概念<sup>[1-2]</sup>, 其基本理念是利用肿瘤细胞与正常细胞在基因表达谱上的差异, 人为改造病毒, 使病毒能特异性地在肿瘤细胞中复制与增殖, 最终裂解细胞, 而在正常细胞中几乎不复制, 对正常细胞安全。同时以这种肿瘤特异性的病毒为载体, 将外源抑癌基因克隆到病毒基因组中, 随着病毒不断扩增, 使得抗癌基因得到高表达, 病毒与抑癌基因两者协同作用达到抗肿瘤的作用。

基于靶向基因-病毒治疗策略, 本课题组已经构建了溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1。以癌症特异性Survivin启动子(sp)代替E1A本身的启动子, 同时将E1A序列CR2区的24 bp(Δ24)碱基删除, 构建溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub><sup>[3-5]</sup>, 随后将*TSLC1*基因克隆进腺病毒载体, 得到新型重组双靶向溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1。*TSLC1*(tumor suppressor in lung cancer 1)是一种新型的肿瘤抑制因子, 属于黏附分子中免疫球蛋白超家族成员<sup>[6]</sup>, 最早是Gomyo等<sup>[7]</sup>1999年分析人类染色体11q23.2区域时发现的, 其参与了黏附、细胞运动、信号传导以及免疫调节。*TSLC1*表达缺失, 不但破坏细胞黏附, 而且可能转达一种促使肿瘤转移或浸润的信号, 这种信号使肿瘤浸润或转移到周围组织。但关于*TSLC1*抑制肿瘤的机制, 目前还不完全清楚。

阿霉素是一种抗肿瘤的化疗药物, 可抑制RNA和DNA的合成, 抗癌谱较广, 对多种肿瘤均有作用, 常应用于多种癌症的化疗<sup>[8-9]</sup>, 是一种常见而广泛使用的抗肿瘤药物, 广泛应用于肝癌的临床实践。本课题将阿霉素和溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合起来作用于肝癌细胞SMMC-7721, 观察它们对肿瘤细胞的协同杀伤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1由本课题组

构建; 阿霉素(ADM)购自南京凯基生物科技发展有限公司; 肝癌细胞株SMMC-7721购自中国科学院上海生命科学研究院生化与细胞研究所细胞库; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司; Hoechst33342购自KeyGen公司; 培养基为10%血清(Gibco公司)的DMEM(Gibco公司); 细胞裂解液、胰酶购于碧云天生物技术有限公司; *TSLC1*抗体购自Santa Cruz公司; E1A购自Abcam公司; 二抗购自Cell Signaling公司。

### 1.2 方法

1.2.1 实时定量PCR检测*TSLC1*基因在肝正常细胞和肝癌细胞中的表达情况 将对数生长期的肝正常细胞QSG7721、L-02和肝癌细胞SMMC-7721以 $4 \times 10^5$ /孔密度铺于6孔培养板, 24 h后用TRIZOL法提取他们的总RNA, 以提取的总RNA为模板反转录为cDNA, 进行Real-time PCR。结果由Applied Biosystems 7300 Real-time PCR仪软件分析。

1.2.2 细胞形态学观察实验 将对数生长期的肝癌细胞SMMC-7721以 $10^4$ /孔密度铺于96孔培养板, 每孔培养基体积100 μL, 培养过夜。每孔分别加入PBS、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1+0.03 μg/mL阿霉素、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1, 其中每个处理均设3个复孔, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h, 然后荧光显微镜下观察细胞的形态。

1.2.3 MTT法检测药物单独作用和联合作用对肝癌细胞株体外增殖的抑制效率 将对数生长期的肝癌细胞SMMC-7721、肝正常细胞L-02以 $10^4$ /孔密度铺于96孔培养板, 每孔培养基体积100 μL, 培养过夜。先预实验选择合适的阿霉素浓度, 加入含有不同终浓度的阿霉素的培养基(0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1 μg/mL), 其中每个处理均设6个复孔, 37 °C分别培养12, 24, 48, 72 h后, 每孔加入20 mL MTT(50 μg/mL, 配制于PBS缓冲液中), 使MTT终浓度为5 mg/mL, 继续培养4 h后, 每孔再加入150 μL DMSO, 微量振荡器振荡15 min, 在酶标仪上595 nm处测量各孔的吸光值(D)。选择0.03 μg/mL的阿霉素与溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合作用, Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1以0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI的浓度梯度处理细胞, 37 °C培养分别24, 48, 72, 96 h后, 进行MTT检测。按下式计算肿瘤细胞存活率, 细胞生存率=[(D病毒感染孔-D调零孔)/(D对照孔-D调零孔)]×100%。

1.2.4 结晶紫实验验证杀伤作用 将对数生长期的肝癌细胞SMMC-7721以 $5 \times 10^4$ /孔密度铺于24孔培

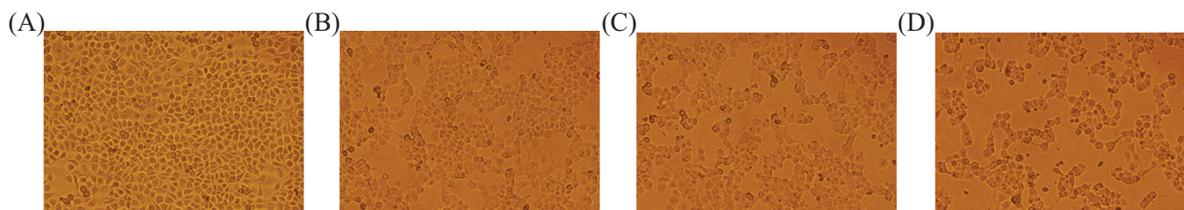
养板, 每孔培养基体积为500  $\mu\text{L}$ , 培养过夜。将病毒以0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI的浓度梯度加入细胞, 作用2 h后每孔加入0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿霉素, 置于5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h, 吸净培养基, 每孔加入500  $\mu\text{L}$ 结晶紫染色液(2%结晶紫溶于20%甲醇溶液)染色30 min, 在清水洗去染液, 进行拍照。

**1.2.5 Hoechst33342染色检测细胞凋亡** 将对数生长期的肝癌细胞SMMC-7721以 $5 \times 10^4$ /孔密度铺于24孔培养板, 每孔培养基体积为500  $\mu\text{L}$ , 培养过夜。5 MOI的病毒和0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿霉素联合或单独作用细胞, 以不加病毒组作为对照。48 h后, 加入1 mg/mL的Hoechst33342, 37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min, 在荧光显微镜下观察细胞核的变化。

**1.2.6 Western blot检测TSLC1和E1A蛋白水平的表达** 将对数生长期的肝癌细胞SMMC-7721以 $4 \times 10^5$ /孔密度铺于6孔培养板, 每孔培养基体积为2 mL, 培养过夜。分别加入PBS、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1+0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿霉素、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1, 置于37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h。然后按照标准Western blot操作方法用蛋白裂解液预处理细胞并收集总蛋白, 将蛋白样品用BCA蛋白定量试剂盒定量后, 每孔加入等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后按湿转法将电泳产物印到NC膜上。5% BSA室温封闭2 h, 一抗(1:1 000稀释)4  $^\circ\text{C}$ 过夜, TBST洗膜3次, 每次10 min, 然后加入荧光二抗(1:10 000稀释), 室温1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min, 红外激光扫描成像仪扫描目的蛋白的表达。

### 1.3 统计分析

统计学软件采用SPSS10.1, 所有定量实验均重复至少三次, 各组数据以“均值 $\pm$ 标准差”表示,

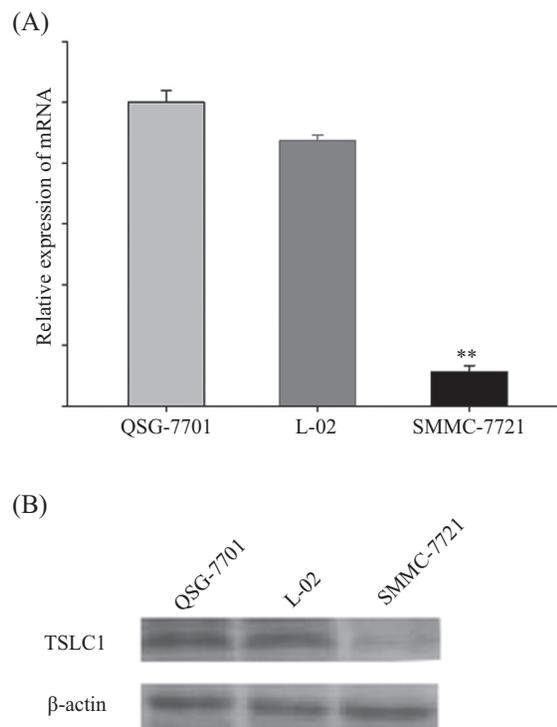


SMMC-7721被阿霉素、Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1单独或者两者联合处理48 h, 阴性对照用PBS处理, 然后用荧光倒置显微镜观察。A: 对照组; B: 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿霉素处理组; C: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1处理组; D: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1+0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿霉素处理组。

SMMC-7721 were treated with ADM, Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1 separately or both for 48 h. Treatment of PBS served as negative control. Then the cells were observed with inverted microscopes. A: control; B: 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ADM treated group; C: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1 treated group; D: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1+0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ADM treated group.

图2 SMMC-7721细胞形态学分析

Fig.2 The cell morphological analysis of SMMC-7721



A,B: Real-time PCR和Western blot方法检测TSLC1在肝癌细胞SMMC-7721和肝正常细胞系QSG-7701、L-02中表达的情况(\*\* $P < 0.01$ )。A,B: the analysis of the TSLC1 expression in HCC cell SMMC-7721 and normal liver cells QSG-7701, L-02 by Real-time PCR and Western blot (\*\* $P < 0.01$ )。

图1 TSLC1转录水平的表达

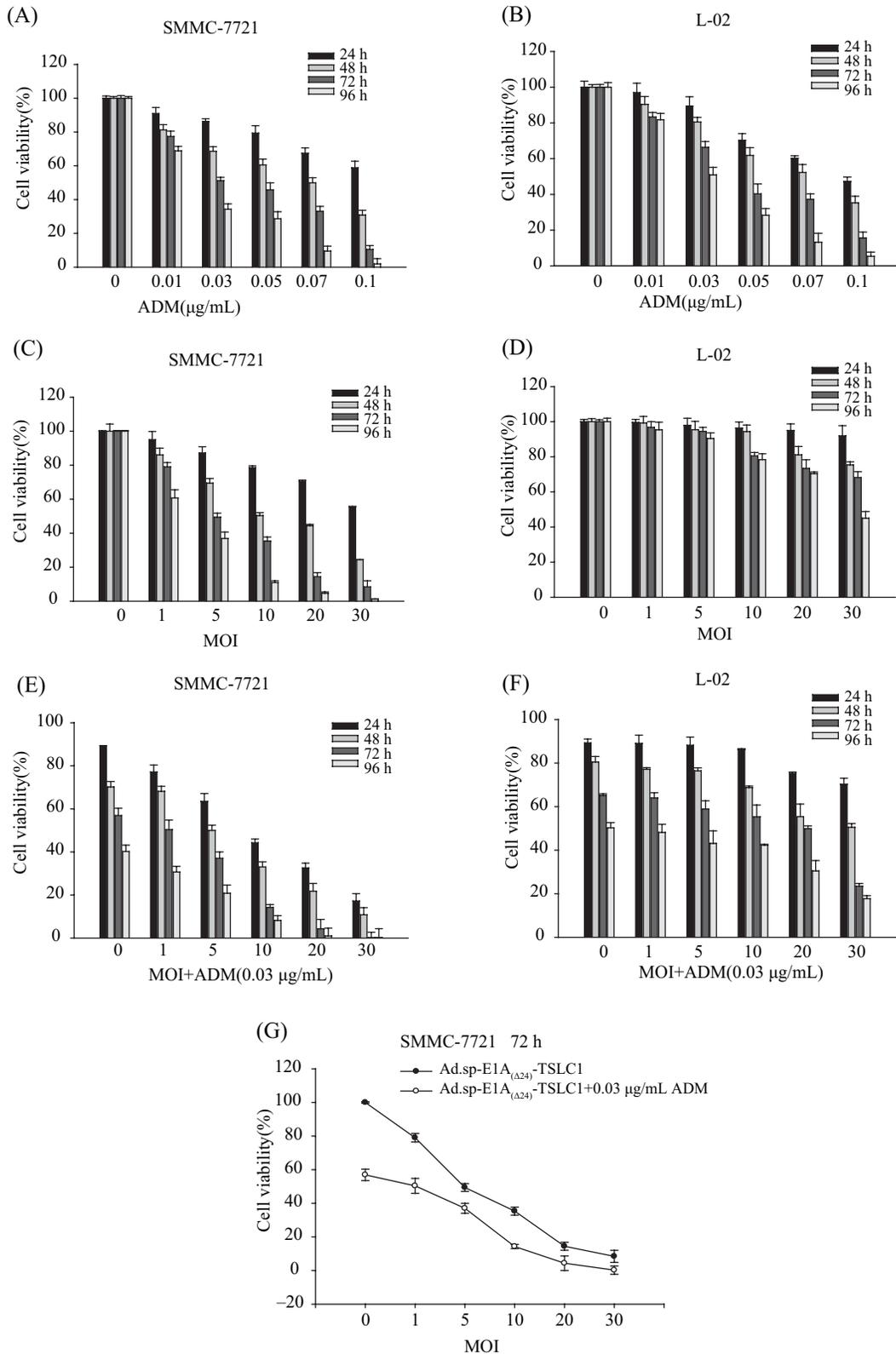
Fig.1 The expression of TSLC1 at the level of transcription

$P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TSLC1在不同肝细胞中的表达情况

Real-time PCR和Western blot检测结果显示, TSLC1在肝癌细胞SMMC-7721中的表达量相对于肝正常细胞系QSG-7701、L-02明显偏低(图1)。



A,B: 分别用终浓度为0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 的阿霉素处理肝癌细胞SMMC-7721、L-02; C,D: 分别用0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI Ad-sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1感染SMMC-7721、L-02; E,F: 0.03  $\mu\text{g/mL}$  ADM和0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI Ad-sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1联合作用于SMMC-7721、L-02; G: SMMC-7721被Ad.sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1、0.03  $\mu\text{g/mL}$  ADM单独或联合处理72 h。

A,B: different concentrations of ADM (0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ); C,D: Ad-sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1 (0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI); E,F: Ad-sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1 (0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI)+0.03  $\mu\text{g/mL}$  ADM; G: SMMC-7721 were treated with Ad.sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1 or both Ad.sp-E1A<sub>(A24)</sub>-TSLC1 and ADM for 72 h.

图3 MTT法细胞活性的检测

Fig.3 MTT viability assay

## 2.2 溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素对肝癌细胞生长的影响

肝癌细胞SMMC-7721分别经PBS、0.03 μg/mL阿霉素、5 MOI Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1和5 MOI Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1+0.03 μg/mL阿霉素处理48 h后细胞的病变情况。加入PBS对照组细胞铺展于培养皿表面、细胞透亮、边界清晰、细胞生长正常(图2A);药物和目的病毒单独处理组细胞间隙变大、细胞失去接触、细胞稀疏和变圆(图2B和图2C);联合溶瘤病毒与药物组则比病毒单独处理组细胞的病变症状更明显(图2D),表明对肝癌细胞的杀伤效果更强。

## 2.3 溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素对肝癌细胞SMMC-7721的杀伤效应

通过MTT法检测溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1、阿霉素以及溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素处理肝癌细胞SMMC-7721、正常肝细胞L-02 24, 48, 72, 96 h后的体外生长抑制效率。结果表明,肝癌细胞SMMC-7721和正常肝细胞L-02生长的抑制作用随着阿霉素浓度的增加而增强,呈时间与剂量依赖性,72 h的IC<sub>50</sub>为0.03 μg/mL(图3A和图3B)。肝癌细胞SMMC-7721生长的抑制作用随着溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1浓度的增加而增强,呈时间与剂量依赖性(图3C),而病毒对正常肝细胞L-02的毒性比较小(图3D)。以浓度0.03 μg/mL的阿霉素与病毒联合作用,可以看出联合作用能显著提高肝癌细胞SMMC-7721的凋亡率,与单独病毒相比,具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3E),阿霉素与病毒联合处理的肝癌细胞72 h后的生存率明显低于单独的病毒作用( $P < 0.05$ )(图3G)。正常肝细胞L-02联合作用没有表现出协同抑制作用(图3F)。

## 2.4 溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素对肝癌细胞SMMC-7721的体外病理学效应

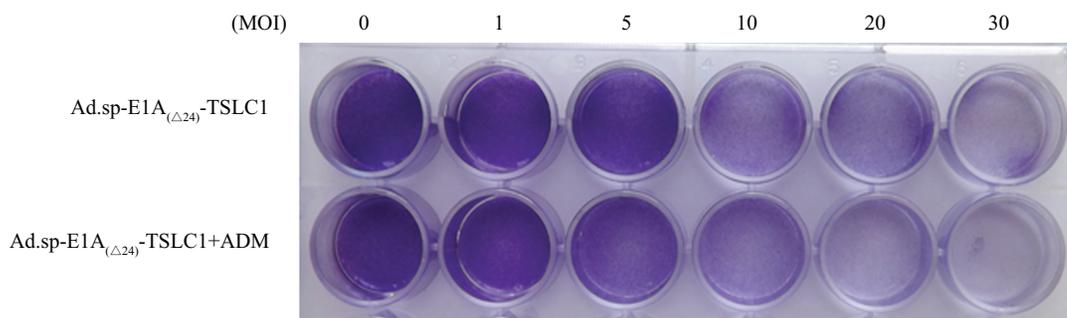
进一步利用结晶紫染色实验观察比较Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1单独和联合阿霉素对SMMC-7721细胞的病理效应。分别用0, 1, 5, 10, 20, 30 MOI的Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1、Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合0.03 μg/mL的阿霉素处理细胞48 h,联合作用对肿瘤细胞的杀伤效果明显强于单独的病毒作用(图4)。

## 2.5 溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素对SMMC-7721细胞的凋亡诱导作用

5 MOI的病毒和0.03 μg/mL的阿霉素联合或单独作用于细胞,以不加病毒组作为对照,48 h后,加入1 mg/mL的Hoechst33342,37 °C孵育30 min。利用Hoechst33342染色在荧光显微镜下检测了Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1及联合阿霉素对SMMC-7721细胞的细胞核形态学变化和凋亡情况。结果表明,PBS处理对照组细胞形态正常,没有凋亡发生(图5A);单独经阿霉素和Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1处理组凋亡细胞明显增多(图5B和图5C);而Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素的处理组细胞凋亡现象最明显,表明两者具有一定的协同效应(图5D)。与单独病毒药物作用相比,联合作用具有统计学意义( $P < 0.01$ )(图5E)。

## 2.6 溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素对TSLC1基因表达的影响

研究发现,TSLC1在肿瘤细胞中表达沉默或降低。用Western blot检测溶瘤病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合阿霉素作用的SMMC-7721细胞中TSLC1基因的表达情况。结果表明,Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1单独感染和两者联合处理组SMMC-7721细胞中TSLC1均能有效表达,而未感染Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-

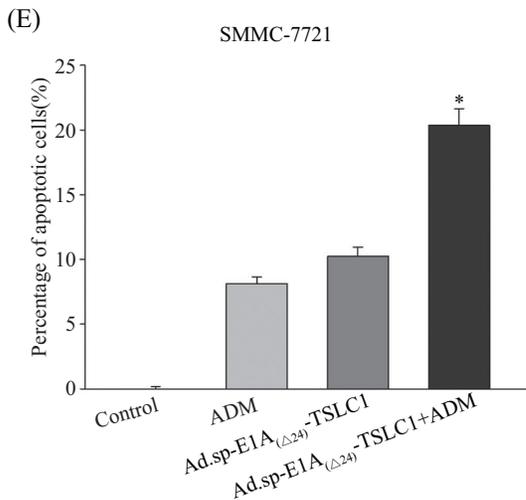
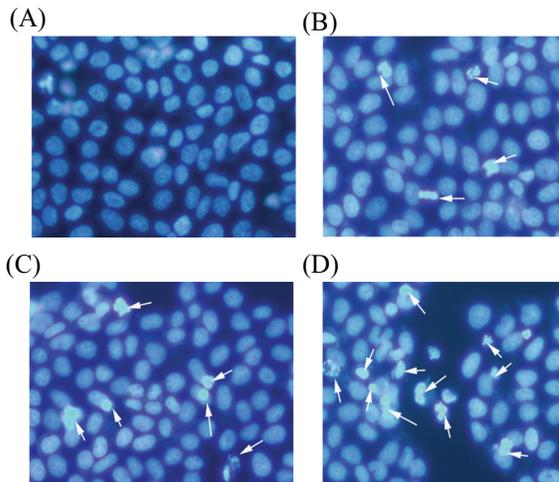


不同MOI的Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1单独使用和联合0.03 μg/mL阿霉素处理SMMC-7721。

SMMC-7721 were infected with different MOIs of Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1 or Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1+0.03 μg/mL ADM.

图4 结晶紫染色实验分析不同的处理方法对SMMC-7721的杀伤效果

Fig.4 Analysis of killing effects of different treatment against SMMC-7721 by crystal violet assay



A: 对照组; B: 0.03  $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素处理组; C: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1处理组; D: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1+0.03  $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素处理组; E: 凋亡细胞百分率。

A: control; B: 0.03  $\mu\text{g/mL}$  ADM treated group; C: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1 treated group; D: 5 MOI Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1+0.03  $\mu\text{g/mL}$  ADM treated group; E: the percentage of apoptotic cells.

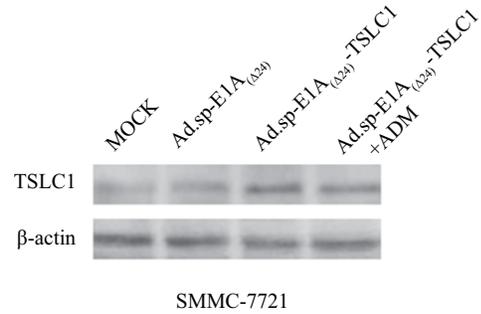
图5 Hoechst33343染色法检测细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis detection by Hoechst33343 staining

TSLC1和感染对照病毒Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>的细胞中TSLC1蛋白的表达较低(图6)。表明Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1能有效感染SMMC-7721细胞并介导TSLC1表达, 并且与阿霉素药物联合处理后并不影响其目的基因的表达。

## 2.7 阿霉素对重组病毒早期E1A蛋白的表达影响

用Western blot检测了SMMC-7721细胞经不同处理后的腺病毒早期复制必需蛋白E1A的表达。结果显示, 单独感染Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>、Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1的细胞均能有效表达E1A蛋白, 而经溶瘤病

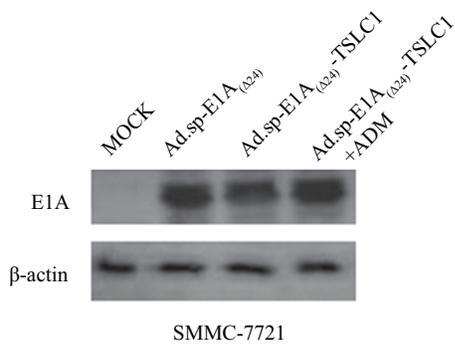


用Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>、Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1单独处理或者Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1与阿霉素联合处理肝癌细胞SMMC-7721, 48 h后提取蛋白, 对TSLC1蛋白进行Western blot检测。

HCC cell SMMC-7721 were treated with Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1/Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub> or Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1 and ADM, and then the TSLC1 protein was detected by Western blot after 48 h.

图6 Western blot检测TSLC1的蛋白水平

Fig.6 TSLC1 protein levels were determined by Western blot analysis



用Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>、Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1单独处理或者Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1与阿霉素联合处理肝癌细胞SMMC-7721, 48 h后提取蛋白, 对E1A蛋白进行Western blot检测。

HCC cell SMMC-7721 were treated with Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1/Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub> or Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1 and ADM, and then the E1A protein was detected by Western blot after 48 h.

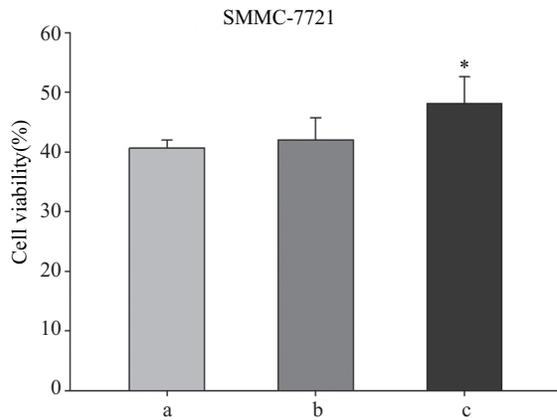
图7 Western blot检测E1A的蛋白水平

Fig.7 E1A protein levels were determined by Western blot analysis

毒Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1和阿霉素联合处理细胞也能有效地表达E1A蛋白(图7), 说明阿霉素不影响E1A蛋白在肿瘤细胞中的表达。

## 2.8 阿霉素与腺病毒Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1不同的处理顺序对肝癌细胞杀伤作用的影响

MTT法检测结果发现, 同时使用或先感染腺病毒Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1后用阿霉素处理的肝癌细胞SMMC-7721的存活率低于先用阿霉素处理、再感染腺病毒的细胞(图8)。先用阿霉素处理的肝癌细胞SMMC-7721中, 阿霉素可能影响腺病毒Ad.sp-E1A<sub>( $\Delta$ 24)</sub>-TSLC1对细胞的感染。



a: 先感染腺病毒再用阿霉素; b: 同时使用病毒与阿霉素; c: 先用阿霉素处理再感染腺病毒, \* $P < 0.05$ 。

a: first infected with adenovirus and then used ADM; b: at the same time used adenovirus and ADM; c: first used ADM and then infected with adenovirus, \* $P < 0.05$ 。

图8 阿霉素与腺病毒Ad-sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1不同的处理方式所引起的差异

Fig.8 Differences caused by the different treatment of ADM and Ad-sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1

### 3 讨论

TSLC1是最近几年新发现的肿瘤抑制因子<sup>[10]</sup>, 在大量肿瘤细胞中表达沉默或缺失, 包括肝癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌等<sup>[11]</sup>, 而正常细胞中正常表达。TSLC1的缺失表达与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移都有密切的关系, 关于其表达缺失的机制, 除了少数基因突变外, 主要的原因是启动子甲基化和杂合子缺失, 而非小细胞肺癌A549细胞株和其他上皮性恶性肿瘤中因11q的失杂合性导致其功能失活, 这是由于TSLC1等位基因中的一个缺失和另一个启动子甲基化引起的<sup>[12]</sup>。TSLC1在细胞黏附、免疫监视、细胞运动及信号转导等方面都起着重要作用<sup>[13]</sup>。TSLC1作为细胞黏附分子可抑制肿瘤细胞的侵袭、转移而抑制肿瘤细胞的发生。TSLC1在体内的具体功能及其抑制肿瘤的分子机制尚不明确, 还需进一步的研究。

有研究表明, TSLC1能诱导细胞凋亡抑制肿瘤细胞发生和发展。Mao等<sup>[14]</sup>将TSLC1整合到腺病毒载体中, 以腺病毒载体注射裸鼠肿瘤细胞, 结果发现, 携带有TSLC1的腺病毒能够抑制肿瘤的细胞增殖并诱导其凋亡, TSLC1还能通过激活凋亡蛋白酶caspase3导致肿瘤细胞凋亡, 并随其底物PARP裂解。覃莉等<sup>[15]</sup>通过研究也发现, TSLC1能抑制肝癌细胞

HepG2的生长并诱导细胞发生凋亡。另外有研究发现, DAL-1与TSLC1结合后能激活caspase8酶原, 形成caspase8蛋白酶, caspase8蛋白酶可以激活细胞凋亡通路, 活化下游的caspase成员, 引起酶的级联反应, 导致细胞凋亡<sup>[16]</sup>。

阿霉素(ADM)为菌环类化合物, 是一种常见而广泛使用的抗肿瘤药物, 常被用来治疗多种实体恶性肿瘤及白血病<sup>[17]</sup>。多数情况下, 大剂量的化疗药物能有效地杀死肿瘤细胞, 但是治疗过程中往往会产生一些毒副作用, 大剂量的阿霉素会引起不可逆的心脏毒性而限制了其临床应用。如何能改进阿霉素化疗的敏感性, 减少其用量而达到最大的效果, 是目前需要解决的重要问题。病毒与阿霉素的联合作用, 可能可以减少阿霉素的药物临床用量, 减轻毒副作用, 促进两者的协同抗癌效应。

本课题将TSLC1基因克隆进溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>载体, 得到重组溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1, 并首次将其与阿霉素联合作用于肝癌细胞SMMC-7721, 观察其体外杀伤细胞的作用。结果显示, Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1具有较强的抗肿瘤活性, Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1与阿霉素联合作用于SMMC-7721细胞时具有很好的协同效应, 能明显提高杀伤作用, 因此, 阿霉素与Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1联合作用时, 可以降低阿霉素的用量, 从而降低了对肝正常细胞的杀伤作用, 减轻化疗的副作用, 改善患者的生存质量, 这为靶向基因-病毒联合化疗药物治疗肝癌开辟了新的途径。而且实验结果还发现, 目的病毒与阿霉素联合作用的不同处理顺序对SMMC-7721细胞的杀伤效果有所不同, 同时使用或先感染Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1后再用阿霉素处理的肝癌细胞SMMC-7721的存活率低于先用阿霉素处理、再感染腺病毒的细胞, 说明阿霉素可能影响了腺病毒Ad.sp-E1A<sub>(Δ24)</sub>-TSLC1对细胞的感染能力, 但其具体的作用原理还不清楚, 还需进一步的研究。

### 参考文献 (References)

- Zhang ZL, Zou WG, Lou CX, Li BH, Wang JH, Sun LY, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. Cell Res 2003; 13(6): 481-9.
- Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity. Cell Res 2006; 16(11): 879-86.
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. Oncogene

- 2000; 19(1): 2-12.
- 4 Heisec HT, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, *et al.* An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000; 6(12): 1134-9.
  - 5 Howe JA, Demers GW, Johnson DE, Neugebauer SE, Perry ST, Vaillancourt MT, *et al.* Evaluation of E1-mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy. *Mol Ther* 2000; 2(5): 485-95.
  - 6 Daisuke Y, Midori Y, Yuko N, Takeshi F, Shinji K, Mari M, *et al.* Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 2006; 26(9): 3610-24.
  - 7 Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, *et al.* A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics* 1999; 62(2): 139-46.
  - 8 Gish RG, Porta C, Lazar L, Ruff P, Feld R, Croitoru A, *et al.* Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007; 25(21): 3069-75.
  - 9 Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: Changing toxicity profiles. *Drug Saf* 2001; 24(12): 903-20.
  - 10 Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K. Localization of tumor suppressor activity important in non-small cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(14): 8153-8.
  - 11 Tsujiuchi T, Suqata E, Masaoka T, Onishi M, Fujii H, Shimizu K, *et al.* Expression and DNA methylation patterns of *Tslc1* and *Dal-1* genes in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Cancer Sci* 2007; 98(7): 943-8.
  - 12 Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isoqai K, Sakamoto M, *et al.* Promoter methylation of the *TSLC1* gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 53-9.
  - 13 Dickinson PJ, Surace EI, Cambell M, Hiqqins RJ, Lenteneqqer CM, Bollen AW, *et al.* Expression of the tumor suppressor genes *NF2*, *4.1B*, and *TSLC1* in canine meningiomas. *Vet Pathol* 2009; 46(5): 884-92.
  - 14 Mao X, Sendlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. Re-expression of *TSLC1* in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene* 2004; 23(33): 5632-42.
  - 15 覃 莉, 张正茂, 郝友华, 王宝菊, 杨新星, 田拥军, 等. 肺癌抑制基因对 HepG2 细胞生长的抑制效应. *中华肝脏病杂志* (Qin Li, Zhang Zhengmao, Hao Youhua, Wang Baoju, Yang Xinxing, Tian Yongjun, *et al.* The growth inhibition effects of *TSLC1* gene on human hepatocyte carcinoma cell line HepG2. *Chinese Journal of Hepatology*) 2007; 15(7): 509-12.
  - 16 Wei Jiang, Newsham IF. The tumor suppressor *DAL-1/4.1B* and protein methylation cooperate in inducing apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 18(5): 4.
  - 17 Hortobagyi GN. Anthracycline in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997; 54(4): 1-7.