

研究论文

溶瘤腺病毒ZD55-IL24联合雷帕霉素协同抑制 Hep3B细胞生长的研究

卓玲燕 马步云 黄盼盼 张蓉 贾晓渊 周秀梅 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 PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活能引发人体细胞发生癌变, 哺乳动物靶标mTOR作为PI3K/AKT信号通路下游的一个效应分子, 被视为针对肿瘤发生和形成的关键治疗靶点, 因此阻断该信号通路的相关靶点可以作为恶性肿瘤治疗的一个策略。白细胞介素24(interleukin 24, *IL24*)是一个选择性诱导肿瘤细胞凋亡的重要抑癌基因。该研究分别利用MTT法和实时无标记细胞功能分析仪检测携带*IL24*基因的溶瘤腺病毒ZD55-IL24与mTOR抑制剂雷帕霉素(rapamycin)单独或联合作用对多种肝癌细胞的体外杀伤效果; 倒置显微镜分别观察ZD55-IL24、雷帕霉素单独作用及两者联合作用引起的细胞形态学变化; Hoechst 33342、流式细胞术和TUNEL染色检测各处理组细胞的凋亡情况; Western blot检测*IL24*、AKT以及凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的蛋白质水平。结果显示, 溶瘤腺病毒ZD55-IL24与雷帕霉素联合作用较两者单独作用更显著地抑制了肝癌细胞Hep3B的生长并诱导了肝癌细胞的凋亡; 此外, 两者联合作用更有效地上调了肝癌细胞Hep3B中的细胞因子*IL24*和促凋亡蛋白Bax的表达, 同时下调了PI3K/AKT/mTOR信号通路关键蛋白AKT和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达。该研究结果表明, 雷帕霉素很可能在一定程度上促进了ZD55-IL24病毒介导的*IL24*表达而增强对肝癌细胞的杀伤作用, 进而为肝癌治疗研究提供了一条新型有效的方案。

关键词 *IL24*; 溶瘤腺病毒; 雷帕霉素; mTOR

Study of Synergistic Suppression on Hep3B Cells by Combining ZD55-IL24 with Rapamycin

Zhuo Lingyan, Ma Buyun, Huang Panpan, Zhang Rong, Jia Xiaoyuan, Zhou Xiumei, Wang Yigang*

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Activation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway can trigger the formation of human solid tumors. mTOR, as a downstream effector of the PI3K/AKT pathway, is a key therapeutic target involved in oncogenesis and progression of cancer. Therefore, blocking relevant targets of this pathway could be a novel treatment strategy for human malignancies. *IL24* (interleukin 24), which is able to selectively induce tumor cell apoptosis, is an important antitumor gene. In this study, we explored the killing effects of either oncolytic adenovirus mediated

收稿日期: 2015-05-04 接受日期: 2015-09-09

国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省自然科学基金(批准号: LZ13H160004)和浙江省公益技术研究计划项目(批准号: 2014C33275)资助的课题

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

Received: May 4, 2015 Accepted: September 9, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LZ13H160004) and Zhejiang Public Welfare Technology Project (Grant No.2014C33275)

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

网络出版时间: 2015-10-23 16:43:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151023.1643.004.html>

IL24 gene (ZD55-*IL24*) alone or in combination with novel immunosuppressor, rapamycin, against hepatoma cells *in vitro* by MTT detecting method and the iCELLigence real time cellular analysis system. The morphological analysis was assessed by inverted microscope in hepatoma cells treated by single ZD55-*IL24* or rapamycin, and their combination. Hoechst 33342 staining, flow cytometry assay and TUNEL were performed to determine the apoptosis effects of single and combinational therapy on hepatoma cells, respectively. The protein levels of *IL24*, AKT, and apoptosis related protein Bax and Bcl-2 were determined by Western blot. The results indicated that the combination treatment of oncolytic adenovirus ZD55-*IL24* and rapamycin remarkably inhibited Hep3B cell proliferation and induced the cell apoptosis compared with ZD55-*IL24* alone or rapamycin alone. Furthermore, the combination treatment significantly up-regulated cytokines *IL24* and apoptosis-induction protein Bax expression, while down-regulated the key protein AKT expression of PI3K/AKT/mTOR signal pathway and anti-apoptosis protein Bcl-2 expression. In conclusion, the results showed that rapamycin could promote the expression mediated by ZD55-*IL24* replication and strengthen its antitumor effects in hepatoma cells *in vitro*, which provides a novel and promising therapeutic approach for targeting treatment of hepatoma cells.

Keywords *IL24*; oncolytic adenovirus; rapamycin; mTOR

目前,全世界范围内肿瘤发病率和死亡率都在急剧增加,而肿瘤患者的存活率却没有发生明显变化,其中肝癌的死亡率位列全世界癌症病例第三位^[1]。当前,恶性肿瘤传统的手术、放疗和化疗都达不到理想的治疗效果,肿瘤的致死率及复发率仍居高不下。切除手术和肝移植是目前治疗肝癌的主要手段,但仅限于对早期肝癌的治疗^[2-3],大多数肝癌病人由于经受不起这种局部治疗,或者因为得不到系统治疗而导致治疗失败。由此,人类迫切需要新型高效的治疗方法来提高肿瘤治疗效果。

在过去的二十年间,越来越多的数据证明,PI3K/AKT/mTOR信号通路是人类癌症的驱动器,在肿瘤发生过程中起重要作用,它影响机体的新陈代谢和肿瘤的生长、存活及转移。因此,阻断该信号通路相关靶点是恶性肿瘤治疗的重要策略。

随着肿瘤基因治疗和病毒治疗的不断发展,结合二者的优势所发展起来的以肿瘤特异性增殖腺病毒(溶瘤腺病毒)为代表的肿瘤生物疗法已经成为肿瘤治疗的研究热点^[4]。联合溶瘤腺病毒和化疗药物有望给肝癌的治疗带来新的方向。有关数学模型显示,肿瘤细胞生长和病毒扩增比例的平衡是决定溶瘤腺病毒感染效果的关键^[5]。化疗药物是直接通过抑制细胞生长及诱导细胞凋亡还是通过间接阻断肿瘤血管生成和抑制宿主的免疫应答来发挥抗肿瘤作用的机制尚不明确,但可以推测的是,肿瘤生长的滞后可能给溶瘤腺病毒针对克服肿瘤生长动力学这一难题提供了一条新的捷径。已有几项临床试验显示,

雷帕霉素可以用微量细胞毒性的剂量达到有效的抗肿瘤效果^[6]。此外,雷帕霉素的免疫抑制和抗肿瘤血管生成效果可减少相关抗体的分泌而使瘤内注射后病毒的扩增得以维持^[7]。

溶瘤病毒载体和化疗药物联合治疗癌症正发挥着越来越重要的作用,联合化疗药物使得用更小剂量的病毒来达到相同抗癌效果成为可能,且减弱了因病毒蛋白引起的细胞毒性。此项研究旨在判定雷帕霉素和ZD55-*IL24*联合是否可以通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路而更好地发挥抗肿瘤的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

溶瘤腺病毒ZD55-*IL24*由本课题组构建;雷帕霉素(rapamycin)购自碧云天生物技术有限公司;肝癌细胞株Hep3B、Huh-7、SMC-7721及肝正常细胞株L02来自本实验室细胞库。

1.2 试剂及仪器

Hoechst 33342购自KeyGen公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司;DMEM培养基、胎牛血清购自Gibco公司;胰蛋白酶购自碧云天生物技术有限公司;AKT、*IL24*、Bax、Bcl-2抗体及二抗购自Cell Signaling Technology公司;GAPDH抗体购自Santa Cruz公司;TUNEL Bright Green Apoptosis Detection Kit购自Biotech公司;Annexin V/FITC APOPTOSIS Detection Kit购自BD公司;其他试剂均为国产分析纯。

使用的仪器有:美国Forma Scientific CO₂细胞

培养箱、美国Costar 6孔细胞培养板、Olympus倒置相差显微镜、Nikon CL-Si激光共聚焦显微镜、Leica荧光显微镜、iCELLigence实时无标记细胞功能分析仪和BD Accuri™ C6流式细胞仪。

1.3 细胞培养

Hep3B、Huh-7、SMMC-7721和L02细胞培养于DMEM高糖培养基中, 内含10%灭活胎牛血清及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素, 置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 MTT检测肝癌细胞体外增殖的抑制效率

将对数生长期的肝癌细胞Hep3B、SMMC-7721、Huh7和肝正常细胞L02以 5×10^3 /孔的密度铺于96孔培养板中, 每孔培养基体积为100 μL, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养过夜。次日每孔分别加入PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、感染复数为5 MOI的ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24。每个处理组分别设置3个复孔, 37 °C分别培养24, 48, 72, 96 h后, 每孔加入20 μL MTT(50 μg/mL, 配置于PBS缓冲液中), 使MTT终浓度为5 μg/mL。继续培养4 h后, 吸去细胞上清, 每孔加入150 μL DMSO, 微量振荡器震荡15 min, 在酶标仪上595 nm处测量各孔的吸光度值(D)。细胞生存率的计算公式为: 生存率= $(D_{\text{给药组}} - D_{\text{调零孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{调零孔}}) \times 100\%$ 。

1.5 细胞生长曲线的监测

利用iCELLigence实时无标记细胞功能分析仪监测细胞增殖曲线。在超净台内吸取180 μL培养液入E-plate L8的孔中, 放入iCELLigence系统, 检测基线。分别消化、计数Hep3B和L02细胞; 取出E-plate L8, 在每块板的各孔分别加入300 μL密度为 5×10^4 /mL的Hep3B和L02细胞悬液, 超净台放置30 min待细胞贴壁, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中的iCELLigence系统, 开始检测细胞增殖曲线。16 h后, 暂停系统, 弃上清, 在每块板的对应孔分别加入300 μL试剂(A: PBS; B: 0.001 μg/mL雷帕霉素; C: 0.01 μg/mL雷帕霉素; D: 0.1 μg/mL雷帕霉素; E: 5 MOI ZD55-IL24; F: 0.001 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24; G: 0.01 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24; H: 0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24)。重置iCELLigence系统并继续检测细胞的增殖曲线, 检测时间为96 h。

1.6 荧光显微镜观察细胞形态学

将对数生长期的肝癌细胞Hep3B以 5×10^3 /孔的密度铺于96孔培养板, 每孔培养基体积100 μL, 于37 °C、

5% CO₂培养箱中培养过夜。次日, 弃上清, 分别补加100 μL的PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24, 每个处理组分别设置3个复孔, 放回培养箱中培养48 h, 荧光显微镜下观察细胞的形态并拍照记录。

1.7 Hoechst 33342检测细胞凋亡

将对数生长期肿瘤细胞Hep3B按 5×10^5 /孔接种至6孔板中, 过夜培养。次日分别以PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理细胞, 于5% CO₂、37 °C培养箱培养48 h后, 加入1 mg/mL Hoechst 33342染料5 μL至每个孔中, 37 °C染色30 min后在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的Hep3B细胞, 以 2×10^5 /孔的密度铺于6孔板, 过夜培养。用PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理Hep3B细胞, 48 h后收集6孔板中的细胞, 参照Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡试剂盒操作说明书, 用预冷的PBS轻轻吹打重悬并离心收集细胞, 1 000 r/min, 每次3 min, 重复2次。然后用500 μL的1×结合缓冲液重悬细胞, 每孔中分别加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI, 室温下避光孵育10 min后, 流式细胞仪分析。

1.9 Western blot检测蛋白质水平

取对数生长期的Hep3B细胞以 4×10^5 /孔的密度铺于6孔板, 过夜培养。加入PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24, 于5% CO₂、37 °C培养箱培养48 h, 检测IL24、AKT、Bax和Bcl-2蛋白质水平(以GAPDH为内参)。

1.10 TUNEL检测染色体断裂

在玻璃底培养皿以 5×10^6 /孔的密度植入Hep3B细胞。再分别加入PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24、0.1 μg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24诱导处理48 h, 用PBS轻轻漂洗2次, 参考TUNEL试剂盒说明书操作步骤进行断裂染色体末端原位标记, 并用PI染色作为背景。

2 结果

2.1 溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独及联合应用对肝癌细胞的杀伤效应

用PBS、0.1 μg/mL雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24

和0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24分别处理肝正常细胞L02以及肝癌细胞Huh7、SMMC-7721、Hep3B。MTT法检测24, 48, 72, 96 h后药物对细胞的体外生长抑制率。结果表明, 病毒和雷帕霉素的联合使用较两者的单独使用具有更好的抑制肝癌细胞生长的作用, 此种抑制作用随着处理时间的增长而增强, 且对Hep3B细胞最为明显。而相比于肝癌细胞, 两者的联合使用对肝正常细胞L02的毒性较小, 具有较好的安全性(图1)。

2.2 溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独或联合对细胞增殖作用的影响

将Hep3B肝癌细胞和L02肝正常细胞分别设置8个处理组。雷帕霉素3个梯度浓度分别为: 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$; 不变量ZD55-IL24感染复数为5 MOI; ZD55-IL24与雷帕霉素的三个浓度的联合处理组: 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24, 实时检测细胞的增殖曲线。低浓度的雷帕霉素(0.001 $\mu\text{g/mL}$)可短暂性增强细胞的生长, 当雷帕霉素(0.1 $\mu\text{g/mL}$)与溶瘤腺病毒ZD55-IL24(5 MOI)联合作用时, 肝癌细胞Hep3B的生长被明显抑制, 而对肝正常细胞L02的生长无

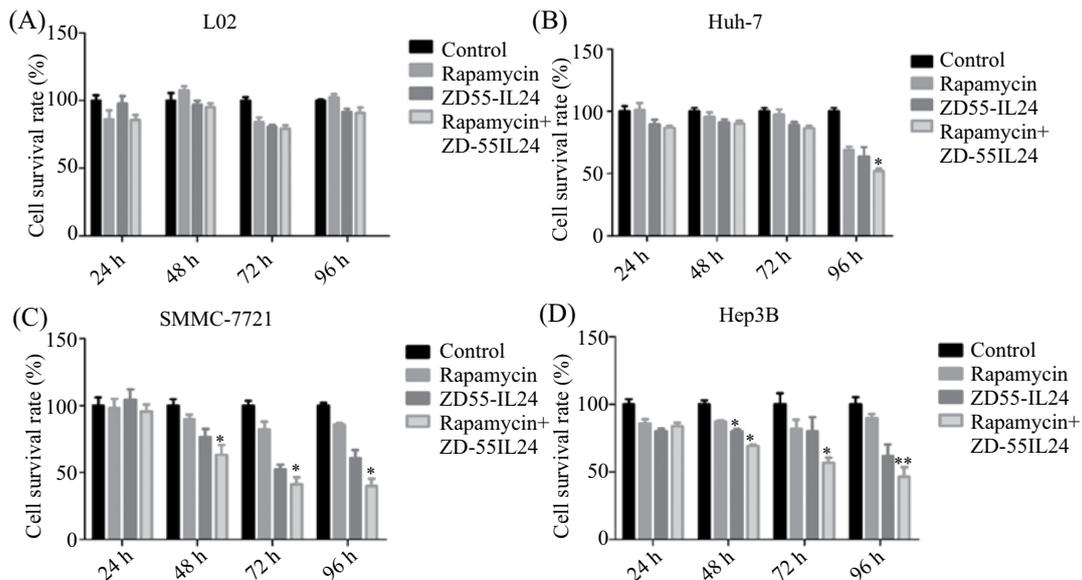
明显影响(图2)。

2.3 溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独及联合对Hep3B细胞形态学影响

用PBS、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24和0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24分别处理Hep3B肝癌细胞48 h, 观察细胞的形态学变化。PBS对照组细胞透亮、轮廓清晰、生长状态良好; 雷帕霉素处理组的细胞生长密集, 部分细胞变圆; ZD55-IL24病毒处理组细胞肿胀变圆; 联合病毒与雷帕霉素组则比单独处理组的细胞病变症状更为明显, 细胞间隙变大, 肿胀变圆且出现脱落的迹象。此结果说明, 联合处理对细胞的增殖抑制效果更显著(图3)。

2.4 Hoechst 33342检测溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独及联合诱导对Hep3B细胞凋亡的作用

以同体积的PBS以及终浓度分别为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素、5 MOI ZD55-IL24和0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24分别处理Hep3B细胞。48 h后, Hoechst 33342染色。结果发现, 用PBS处理的对照组细胞核形态完整, 无细胞凋亡迹象; 而以雷帕霉素和ZD55-IL24溶瘤腺病毒处理组出现染色体皱缩, 隐约可见凋亡小体; 联合处理组出现的凋亡小体明显增

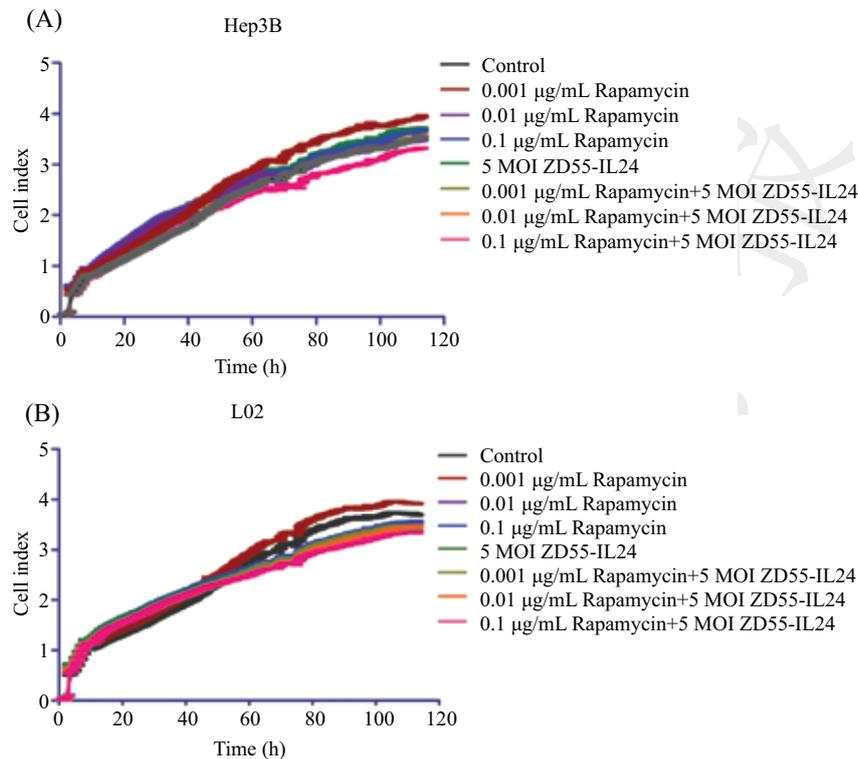


A: L02细胞各处理组存活率; B: Huh-7细胞各处理组存活率; C: SMMC-7721细胞各处理组存活率; D: Hep3B细胞各处理组存活率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与对照组相比。

A: L02 survival rate by different treatments; B: Huh-7 survival rate by different treatments; C: SMMC-7721 survival rate by different treatments; D: L02 survival rate by different treatments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control group.

图1 L02、Huh-7、SMMC-7721及Hep3B各处理组在各时间段的存活率

Fig.1 The survival rates of L02, Huh-7, SMMC-7721 and Hep3B by different treatments in different phases

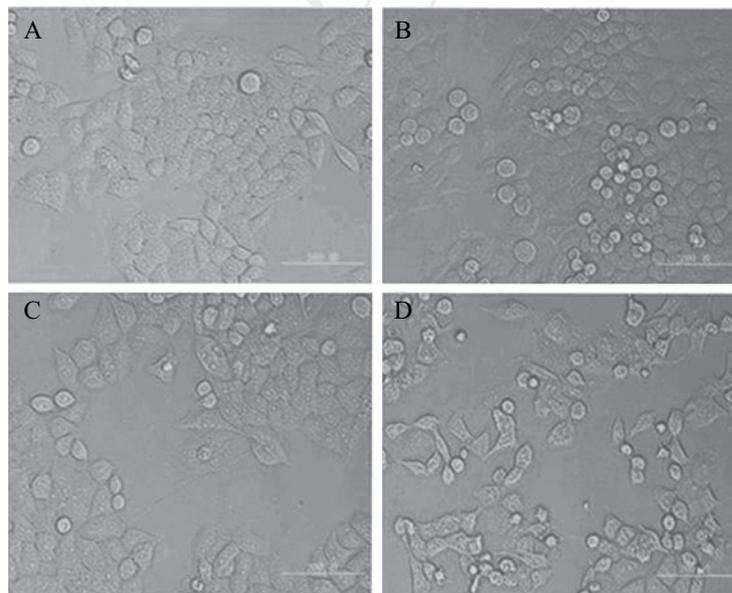


A: 不同处理组对Hep3B细胞生长曲线的影响; B: 不同处理组对L02细胞生长曲线的影响。

A: Hep3B cell growth curve by different treatments; B: L02 cell growth curve of treatments.

图2 不同处理组对Hep3B和L02细胞增殖作用

Fig.2 Hep3B and L02 cell growth effects by different treatments



A: 对照组; B: 0.1 µg/mL雷帕霉素处理组; C: 5 MOI ZD55-IL24处理组; D: 0.1 µg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理组。

A: control; B: 0.1 µg/mL rapamycin treated group; C: 5 MOI ZD55-IL24 treated group; D: 0.1 µg/mL rapamycin+5 MOI ZD55-IL24 treated group.

图3 雷帕霉素和ZD55-IL24作用Hep3B细胞形态学分析(48 h, 200×)

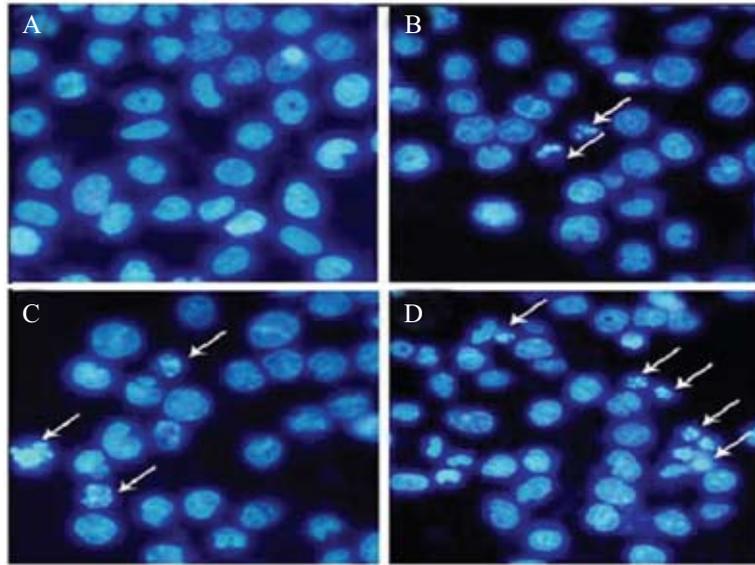
Fig.3 Cell morphological analysis of Hep3B treated with rapamycin and ZD55-IL24 (48 h, 200×)

多。此结果说明, 联合作用引起凋亡最为显著(图4)。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

应用流式细胞术进一步检测溶瘤腺病毒ZD55-

IL24与雷帕霉素单独作用及联合对肝癌细胞凋亡的影响。结果显示, 雷帕霉素的单独使用几乎不能诱导Hep3B发生凋亡, 而与ZD55-IL24的联合使用能促进

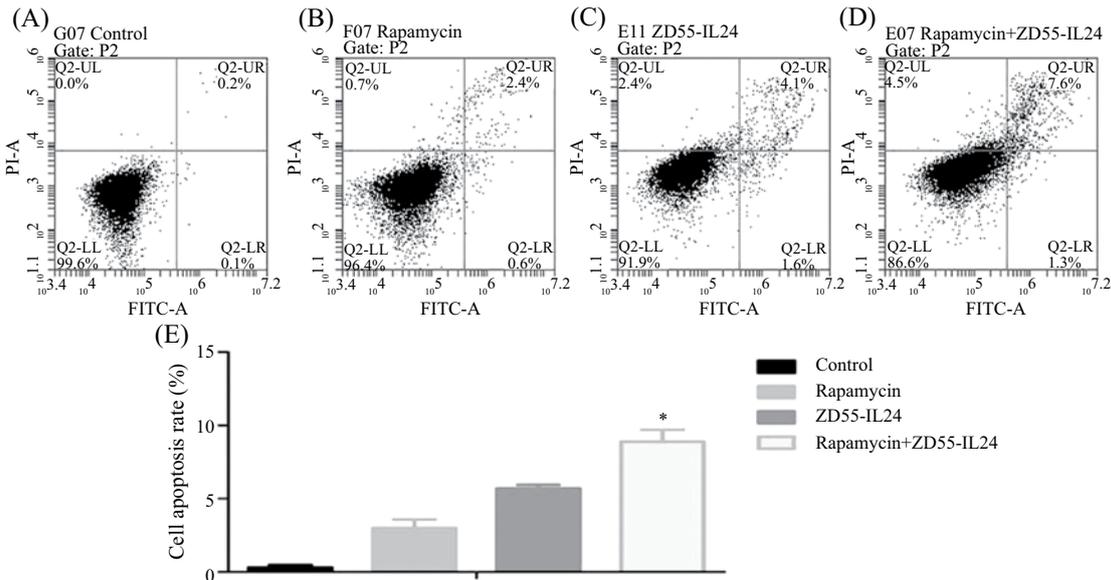


A: 对照组; B: 0.1 µg/mL雷帕霉素处理组; C: 5 MOI ZD55-IL24处理组; D: 0.1 µg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理组。白色箭头指示细胞核中的凋亡小体。

A: control; B: 0.1 µg/mL rapamycin treated group; C: 5 MOI ZD55-IL24 treated group; D: 0.1 µg/mL rapamycin+5 MOI ZD55-IL24 treated group. The white arrows finger the apoptosis bodies.

图4 Hoechst 33342染色法检测细胞凋亡(400×)

Fig.4 Apoptosis detection by Hoechst 33342 staining (400×)



A: 对照组; B: 0.1 µg/mL雷帕霉素处理组; C: 5 MOI ZD55-IL24处理组; D: 0.1 µg/mL雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理组; E: 各组凋亡率分析, * $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: control; B: 0.1 µg/mL rapamycin treated group; C: 5 MOI ZD55-IL24 treated group; D: 0.1 µg/mL rapamycin+5 MOI ZD55-IL24 treated group; E: cell apoptosis rate analysis by different treatments. * $P < 0.05$ compared to control group.

图5 流式细胞术检测细胞凋亡现象

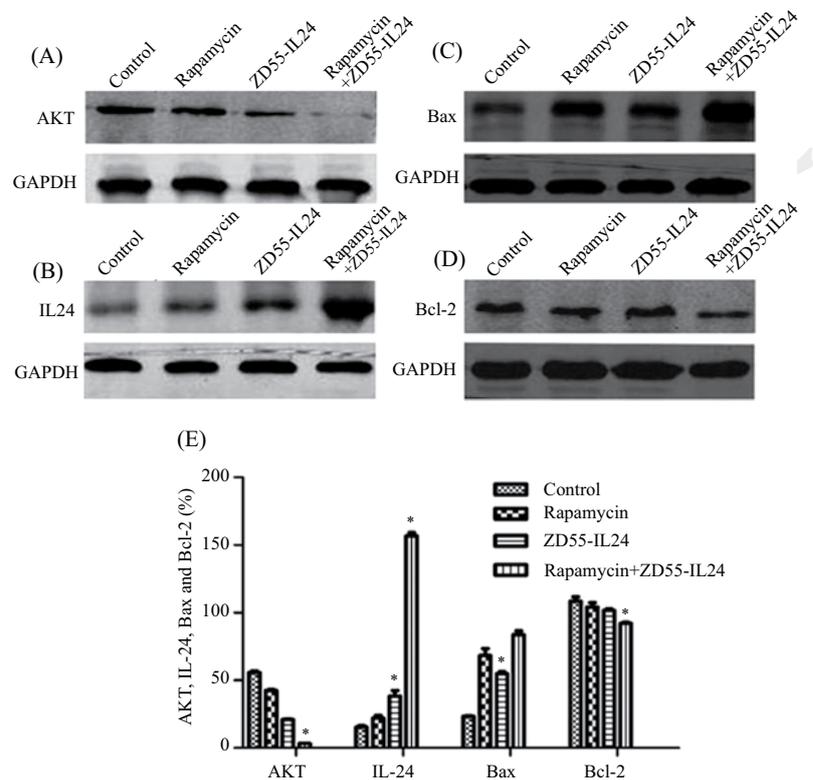
Fig.5 Apoptosis detected by flow cytometry assay

Hep3B细胞发生凋亡,尤其是早期凋亡的发生(图5)。

2.6 溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独及联合对蛋白表达的影响

用Western blot检测溶瘤腺病毒ZD55-IL24与

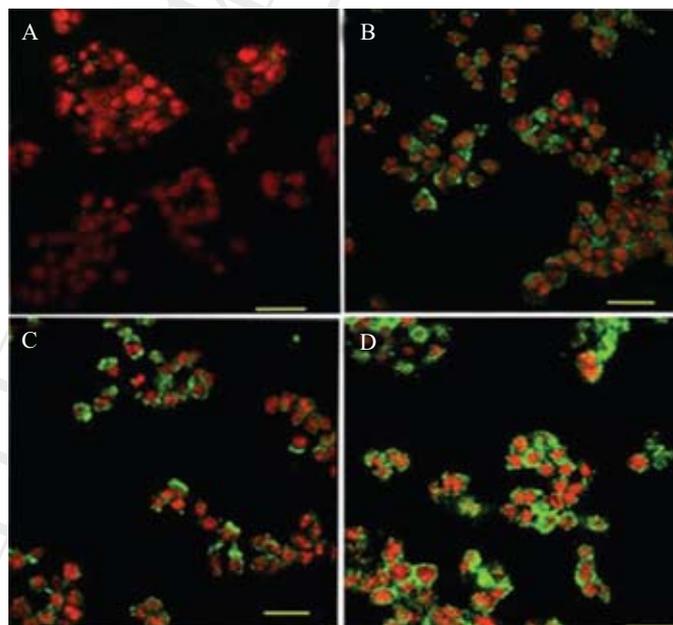
雷帕霉素单独作用及联合作用于Hep3B细胞48 h对AKT、IL24、Bax和Bcl-2蛋白质水平的影响。结果表明, ZD55-IL24与雷帕霉素单独处理组中AKT和Bcl-2均有表达,联合作用后两者的表达明显降低;



A~E: 肝癌细胞Hep3B用雷帕霉素(0.1 $\mu\text{g/mL}$)、ZD55-IL24(5 MOI)单独处理以及用雷帕霉素和ZD55-IL24联合处理(5 MOI ZD55-IL24+0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素)Hep3B 48 h后提取蛋白,对AKT、IL24、Bax和Bcl-2进行Western blot检测以及蛋白灰度半定量分析(* $P < 0.05$, 与对照组相比)。

A~E: HCC cells Hep3B were treated with rapamycin (0.1 $\mu\text{g/mL}$), ZD55-IL24 (5 MOI) and combination (5 MOI ZD55-IL24+0.1 $\mu\text{g/mL}$ rapamycin) for 48 h, then AKT, IL24, Bax and Bcl-2 protein expression levels were detected by Western blot and semi-quantitated by densitometry (* $P < 0.05$ compared to control group).

图6 Western blot检测AKT、IL24、Bax和Bcl-2的蛋白质水平
Fig.6 AKT, IL24, Bax, Bcl-2 protein levels were detected by Western blot



A: 对照组; B: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素处理组; C: 5 MOI ZD55-IL24处理组; D: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素+5 MOI ZD55-IL24处理组。

A: control; B: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ rapamycin treated group; C: 5 MOI ZD55-IL24 treated group; D: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ rapamycin+5 MOI ZD55-IL24 treated group.

图7 TUNEL检测肿瘤细胞的凋亡(200 \times)

Fig.7 Apoptosis of carcinoma cells detected by TUNEL (200 \times)

而IL24和Bax在联合处理组中的含量明显上调。此结果说明,联合处理很可能是通过促进病毒复制而上调IL24和Bax及下调AKT和Bcl-2的表达来促进Hep3B细胞凋亡(图6)。

2.7 TUNEL检测溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素单独及联合诱导的肿瘤细胞凋亡

用雷帕霉素和ZD55-IL24分别进行单独和联合处理Hep3B细胞48 h后,用TUNEL对染色体末端进行原位标记,PI染色作为背景。对照PBS处理组细胞核完整,几乎没有被渗入FITC绿色荧光,说明未出现染色体断裂而凋亡;单独处理组部分被标记上绿色荧光,呈现出一定程度的凋亡;而使用雷帕霉素和ZD55-IL24联合处理组标记上的绿色荧光最为明显。以上说明,联合处理能显著促进染色体断裂,引起细胞凋亡(图7)。

3 讨论

溶瘤腺病毒具有在肿瘤细胞进行特异性增殖的能力,已引起了越来越多的关注,特别是已经上市和正在进行临床试验的溶瘤腺病毒、溶瘤痘苗病毒和溶瘤单纯疱疹病毒等。本研究通过联合使用重组溶瘤腺病毒ZD55-IL24和雷帕霉素作用于肝癌细胞Hep3B来探讨其体外抑癌效果。我们选择该研究方案主要基于以下两点考虑:首先,ZD55-IL24^[8]和雷帕霉素对肝癌的临床前治疗均呈现一定效果。mTOR是营养信号通路中的重要生长因子,而雷帕霉素作为mTOR的抑制剂,在抑制肿瘤方面具有很好的优势^[9-10],若将雷帕霉素与病毒联合,短暂的免疫抑制可能有利于延长病毒复制;已有研究发现,雷帕霉素不会阻断病毒蛋白的表达或DNA复制^[11];其次,PI3K/Akt/mTOR是涉及细胞存活或耐受的至关重要的信号通路之一,而该信号通路在肝癌中通常被激活,而阻断AKT的活化能有效促进肿瘤细胞的凋亡^[12]。因此,雷帕霉素联合携带高效抗癌细胞因子IL24的溶瘤腺病毒ZD55-IL24,可望取得协同抗癌的效果。

本研究发现,较低浓度的雷帕霉素(如0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对正常细胞L02和肝癌细胞Hep3B均有一定的促生长作用(图1和图2)。究其原因,作者认为,可能与低浓度的雷帕霉素更偏向于激活促进生长的信号通路如AKT磷酸化^[13]有关,而参与细胞自噬和抑制细胞生长的信号通路较弱,但还需进一步实验验证。

通过对MTT细胞毒性试验以及不同处理观察细胞增殖曲线发现,雷帕霉素以浓度(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与ZD55-IL24(5 MOI)联合作用时对肝癌细胞的生长抑制作用明显增强,而非明显的凋亡,从细胞形态学上观察和流式细胞术分析可以看出,联合作用更倾向于刺激细胞产生敏感性的表型而后产生一定程度的凋亡;此外,对正常细胞株L02的生长无明显影响,表明两者联合在抑制肝癌细胞生长的同时对正常细胞的毒性较小,这也显示溶瘤腺病毒和雷帕霉素联合应用具有较好的安全性,提示具有较好的临床应用前景。

已有研究表明,雷帕霉素可通过上调前凋亡分子Bid和Bax、下调抗凋亡蛋白Bcl-2而诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。本研究也发现,雷帕霉素和ZD55-IL24单独作用于Hep3B细胞均有一定的凋亡发生,而两者联合处理则更显著地诱导了肝癌细胞Hep3B的凋亡(图3和图5);进一步检测发现,与单独处理组相比,联合处理组显著促进IL24和Bax蛋白质水平,而抑制AKT和Bcl-2的蛋白质水平(图4)。因此,雷帕霉素在一定程度上能够促进溶瘤腺病毒ZD55-IL24的复制,而上调IL24蛋白的表达,同时两者联合能更好地阻断PI3K/AKT/mTOR信号通路关键蛋白AKT的表达,从而更好地发挥抗肿瘤效果。综上,此研究通过联合雷帕霉素和ZD55-IL24,有效抑制了肝癌细胞的生长,为进一步开展肝癌的临床治疗提供了新途径。

参考文献 (References)

- 1 He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, *et al.* Major causes of death among men and women in China. *New Engl J Med* 2005; 353(11): 1124-34.
- 2 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng IO, Liu CL, Lam CM, *et al.* Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma: A prospective study of 377 patients over 10 years. *Ann Surg* 2001; 234(1): 63-70.
- 3 Yao FY, Bass NM, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Lessons from the first year under the model of end-stage liver disease (MELD) organ allocation policy. *Liver Transpl* 2004; 10(5): 621-30.
- 4 Zhu W, Wei L, Zhang H, Chen J, Qin X. Oncolytic adenovirus armed with IL24 inhibits the growth of breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 51.
- 5 Pan Q, Tilanus HW, Metselaar HJ, Janssen HL, van der Laan LJ. Virus-drug interactions—molecular insight into immunosuppression and HCV. *Nat Rev Gastroenterology Hepatol* 2012; 9(6): 355-62.
- 6 Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic

- tumor growth by antiangiogenesis: Involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8(2): 128-35.
- 7 Homicsko K, Lukashev A, Iggo RD. RAD001 (everolimus) improves the efficacy of replicating adenoviruses that target colon cancer. *Cancer Res* 2005; 65(15): 6882-90.
- 8 Xiao CW, Xue XB, Zhang H, Gao W, Yu Y, Chen K, *et al.* Oncolytic adenovirus-mediated MDA-7/IL24 overexpression enhances antitumor activity in hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int* 2010; 9(6): 615-21.
- 9 Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2): 117-26.
- 10 Shamji AF, Nghiem P, Schreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: Implications for cancer biology. *Mol Cell* 2003; 12(2): 271-80.
- 11 Goudar RK, Shi Q, Hjelmeland MD, Keir ST, McLendon RE, Wikstrand CJ, *et al.* Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(1): 101-12.
- 12 Chen KF, Yeh PY, Yeh KH, Lu YS, Huang SY, Cheng AL. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2008; 68(16): 6698-707.
- 13 Wang C, Gao D, Guo K, Kang X, Jiang K, Sun C, *et al.* Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. *BMC Cancer* 2012; 12: 166.
- 14 Yang Z, Lei Z, Li B, Zhou Y, Zhang GM, Feng ZH, *et al.* Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating alpha v integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Sci* 2010; 101(2): 494-500.