

人泡沫病毒介导 IL-24 对肿瘤细胞的抑制作用

陈思翀^{1,4}, 姚辰¹, 陈芳², 刘万红², 陶卫萍³, 李文鑫^{1*} (武汉大学: ¹生命科学学院, ²基础医学院, ³人民医院肿瘤科, 湖北 武汉 430072 ⁴中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223)

Inhibitive effect of human foamy virus induced IL-24 on cancer cells

CHEN Si-chong, YAO Chen, CHEN Fang, LIU Wan-hong, TAO Wei-ping, LI Wen-xin^{*}

College of Life Science, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430072, China

[Abstract] **AM:** To construct replication-defective HFV-IL24 virus vector and to investigate its inhibitive effect on cancer cells after infected or transfected by this vector.

METHODS pΔΦ-IL24 was constructed and was co-transfected with helper-plasmids into HEK 293T cells. Recombinant HFV-IL24 vector was extracted to infect HeLa cells and the inhibitive effect of IL-24 on cancer cells was examined by RT-PCR, MTT, cell counting and FCM methods.

RESULTS pΔΦ-IL24 plasmid and HFV-IL24 particles were successfully constructed. HeLa cells exhibited obvious growth inhibition, cell cycle variation and visible apoptosis (mortality) after infected or transfected by HFV-IL24 or pΔΦ-IL24.

CONCLUSION: The results of the study provide some evidence for human foamy virus used as an effective gene transfer tool and for cancer gene therapy with HFV-IL24.

[Keywords] human foamy virus; interleukin-24; virus vector; gene therapy

[摘要] 目的: 利用重新构建的人逆转录病毒四载体系统共转染人胚肾细胞获得携带 IL-24 的复制缺陷型重组人泡沫病毒 (HFV-IL24) 颗粒, 探讨复制缺陷型人泡沫病毒介导 IL-24 对肿瘤细胞生长分化的抑制作用。方法: 重组构建含 IL-24 的人泡沫病毒载体质粒 (pΔΦ-IL24); 与辅助质粒共转染人胚肾 HEK 293T 细胞后获取重组病毒颗粒 (HFV-IL24); RT-PCR 检测目的基因的表达式; MTT 法检测人宫颈癌 HeLa 细胞的体外增殖水平, 台盼蓝染色计数检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞活性和周期变化。结果: 成功构建含 IL-24 的人泡沫病毒载体 (pΔΦ-IL24); 收获得到复制缺陷型重组人泡沫病毒颗粒 (HFV-IL24); 感染后的 HeLa 细胞显示出明显的生长

抑制现象 ($P < 0.01$) 并呈现周期变化和较高的凋亡 (死亡) 率。结论: 所构建的重组病毒载体 pΔΦ-IL24 及由此而产生的重组人泡沫病毒颗粒 (HFV-IL24) 的功能性检测加深对 HFV 和抗癌基因 IL-24 的了解, 为泡沫病毒载体的应用和 IL-24 抗肿瘤的基因治疗提供了研究方向和理论依据。

[关键词] 人泡沫病毒; 白细胞介素 24; 病毒载体; 基因治疗
[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A

逆转录病毒中的泡沫病毒 (foamy virus, FV), 被认为是基因载体的合适候选病毒。它可以感染多种细胞组织, 但没有明显致病性, 长时间持续感染而不引起任何症状^[1]; 多数人体内不存在 FV 抗体, 因此它不易被血清灭活, 性质稳定, 可以通过超速离心获得^[2]; 此外它是逆转录病毒中基因组最大的, 经过人工改造后, 具有可以装载大分子量基因的能力^[3]。其中人泡沫逆转录病毒 (human foamy virus, HFV) 是最常被改造成基因治疗载体的泡沫病毒, 常被构建成复制缺陷型的病毒载体用于基因治疗研究。IL-24 可以诱导免疫系统产生 TNF-α、IFN-γ 和 IL-1 等细胞因子从而抑制肿瘤细胞的生长^[4]; 同时可以诱导多种癌细胞凋亡, 包括子宫颈癌、卵巢癌及神经胶质瘤等, 而不损伤正常细胞^[5]。此外, IL-24 还能够通过增强癌细胞对辐射的敏感性、抑制血管产生、旁观者效应等达到抑制肿瘤的作用^[6]。因此, IL-24 是目前发现的惟一种既具有细胞因子作用特性又具有抑癌作用的双重功能的蛋白质分子, 这些特性使其成为基因治疗中非常理想的抗癌基因。宫颈癌细胞株 HeLa 被建立的半个世纪以来, 常作为研究癌症的模式细胞, 因此本研究选取 HeLa 细胞作为感染靶细胞。

近几年研究表明, 尝试通过不同载体介导 IL-24 基因研究其抑癌作用。本研究中, 我们构建了携带 IL-24 基因的复制缺陷型 HFV 四载体系统, 旨在研究人泡沫病毒介导 IL-24 对肿瘤细胞的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 pDNA3.1-IL24 质粒由美国哥伦比亚大学 Dr Paul D. Fisher 惠赠^[7], 人逆转录病毒载体质粒 pΔΦ 和辅助质粒 pC.GSΔΨ (G)、pC.PS (P) 和 pC.PS (E) 由美国华盛顿大学 Dr. David W. Russell 惠赠^[8]。转染试剂 Lipofectamine™

收稿日期: 2009-05-22 接受日期: 2009-07-15

基金项目: 国家大学生创新训练项目资助 (2006-061048619)

作者简介: 陈思翀 (1987-), 女, 浙江宁波人, 中国科学院 2009 级硕士生, E-mail: mcs188@163.com

* Corresponding author

2000 Reagent 和 RNA 提取试剂盒 TRIzol[®] Reagent IL-24 引物寡核苷酸链由 Invitrogen 公司提供或合成; DMEM 培养基、新生牛血清为 GIBCO 公司产品。Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Kpn*I、*Bam*HI 均购于 TaKaRa 公司; 噻唑蓝 (MTT)、溴化乙锭 (EB)、地塞米松 (Dex)、碘化丙啶 (PI) 为 Sigma 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 株、人胚肾 HEK 293T 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞由本室保存。流式细胞仪 (Beckman[®] EPICS[®] ALTRA II, USA), PCR 仪 (CW400Q, Leica Germany)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与载体构建 根据 NCBI 网站 GenBank 公布的 IL-24 基因序列 (序列号: NM006850), 设计 IL-24 基因的引物: 正向引物 FP 为 5'-GGCGGTACCATGAATTTTCAA CAG-3' (*Bam*HI), 反向引物 RP 为 5'-GCCGGATCCTCAGAGCTTGTAGAA-3' (*Kpn*I); 以 pDNA3.1-IL24 为模板, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min; 55 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 31 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 扩增片段长度为 621 bp。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将载体 p Δ Phi 和 PCR 产物经 DNA 限制性内切酶消化, 经 T4 连接酶连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α , Amp 抗性筛选, 挑选阳性克隆送 Invitrogen 公司测序, 获得重组载体 p Δ Phi-IL24。

1.2.2 细胞培养与 HFV 病毒收获 HEK 293T 细胞和 HeLa 细胞用含 100 mL/L 新生牛血清、青霉素 10×10^5 U/L 和链霉素 100 mg/L 的 DMEM 培养基, 置 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中培养。将空载体 p Δ Phi 和重组载体 p Δ Phi-IL24 与辅助质粒 pCIS Δ Psi、pCIPs、pCIEs 共转染 HEK 293T 细胞并设立空载体质粒 p Δ Phi 为对照, 48 h 后收集上清并用 0.45 μ m Millipore 滤膜过滤, 19 000 r/min, 离心 2 h, 沉淀即为感染性的复制缺陷型 HFV 或 HFV-IL24 病毒颗粒, 加入终浓度为 50 mL/L 的 DMSO 溶液后冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用, 用于感染 HeLa 细胞, 方法和用量依据 Russell 实验室方案^[8]。

1.2.3 RT-PCR 检测目的基因的表达 收集病毒感染或质粒共转染 48 h 后的细胞, 按照 TRIzol[®] 试剂盒说明提取各细胞克隆总 RNA, 并以其为模板, 以 β -actin 为内参照进行半定量 RT-PCR 循环, 42 $^{\circ}$ C 逆转录 60 min; 85 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min; 55 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 23 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察细胞克隆 IL-24 mRNA 的表达水平。

1.2.4 MTT 法检测细胞的体外增殖水平 96 孔培养板中接种 HeLa 细胞 (1×10^4 /孔) 100 μ L, 将等量病毒颗粒加入细胞孔或将质粒共转染入细胞孔, 以加入终浓度为 0.5 g/L 地塞米松的细胞作为阳性对照。培养 48 h 后, 每孔加入 5 g/L MTT 10 μ L, 孵育 4 h 后弃上清, 每孔加入 100 μ L 二甲亚砜 (DMSO) 终止反应, 用酶标仪 490 nm 测量 A 值。

1.2.6 台盼蓝染色计数检测细胞存活率 24 孔培养板中接种 HeLa 细胞 (1×10^5 /孔), 将等量病毒颗粒加入细胞孔, 分为空载的 HFV 颗粒感染组和 HFV-IL24 颗粒感染组, 以终浓度 0.5 g/L 地塞米松为阳性对照组, 未处理的 HeLa 细胞为阴性对照组, 连续培养 5 d 每隔 24 h 或 48 h 收集各实验组中 1 个孔内的细胞, 台盼蓝染色后用血细胞计数板计数活细胞。

反复进行 4 次, 结果取平均值。以处理时间为横坐标、活细胞数为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.2.7 流式细胞术检测细胞增殖活性 收集病毒感染或质粒转染 72 h 后的 HeLa 细胞, 制成 1×10^6 /L 单细胞悬液, 700 mL/L 预冷酒精 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, PBS 漂洗 1 遍, 加入终浓度为 1 g/L 的 RNAseA, 37 $^{\circ}$ C 水浴消化 1 h, 置冰上终止反应后加入 100 mg/L 的 PI 综合染液, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 1 h 后, 300 目滤网过滤, 转入 FCM 测量管, 应用 Beckman[®] EPICS[®] ALTRA II 流式细胞计数仪采集细胞周期和细胞活性变化数据, 采用 Multi cycle for Windows 软件进行分析。

2 结果

2.1 p Δ Phi-IL24 重组载体的构建 以重组载体 pDNA3.1-IL24 为模板 PCR 扩增得到 IL-24 目的片段, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示该片段在 621 bp 左右并且无非特异条带, 结果正确 (图 1)。将此 PCR 产物与载体质粒 p Δ Phi 双酶切后连接构建得到 p Δ Phi-IL24 重组载体, 阳性克隆测序结果与 GenBank 公布的 IL-24 基因序列完全一致。

2.2 目的基因在 mRNA 水平的表达 感染 HeLa 细胞 48 h 后, 以 β -actin 为内参照, 对导入的重组病毒颗粒进行反转录扩增。结果显示, 经 HFV-IL24 感染的细胞表达出 IL-24 的 mRNA, 单独转染 p Δ Phi-IL24 的细胞表达少量的 IL-24 mRNA, 而转染空载 HFV 的细胞和细胞阴性对照组没有对应的电泳条带 (图 2)。说明 HFV-IL24 感染性病毒颗粒能够在宿主细胞中高效表达 IL-24。

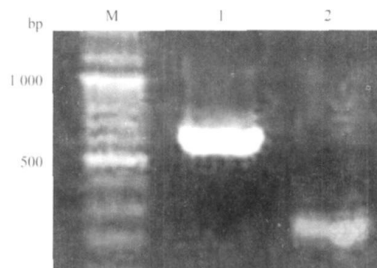


图 1 IL-24 的 PCR 产物电泳检测

M: DNA marker 1: IL-24 基因; 2: 无模板阴性对照。

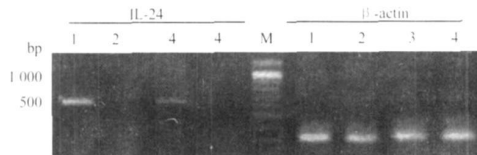


图 2 IL-24 的 RT-PCR 电泳检测

M: DNA marker 1: HFV-IL24 颗粒感染; 2: HFV 颗粒感染; 3: p Δ Phi-IL24 转染; 4: 细胞阴性对照。

2.3 细胞增殖水平的变化 经 MTT 法检测 HeLa 细胞的体外增殖能力, 图 3 显示地塞米松阳性对照组的参照性较好, HFV-IL24 感染的细胞虽然还能够正常增殖, 但与空载 HFV 感染的细胞和细胞阴性对照组相比, 肿瘤细胞的体外增殖能力受到明显抑制 ($P < 0.01$)。单独转染的 p Δ Phi-IL24 也能

对癌细胞增殖起一定的抑制作用,但 HFV 载体的细胞毒性也是不能忽略的。

2.4 细胞存活率的变化 活细胞计数后细胞生长曲线见图 4。处理组细胞与细胞阴性对照组比较均出现了生长减慢的变化,其中地塞米松阳性对照组的参照性较好,感染 HFV-IL24 的细胞生长速率比感染空载 HFV 的细胞生长速率更低,说明重组 HFV-IL24 病毒颗粒对癌细胞的生长具有抑制作用。

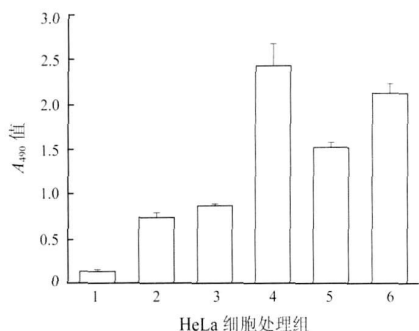


图 3 HFV-IL24 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用

1: 0.5 g/L 地塞米松; 2: HFV-IL24 颗粒感染; 3: HFV 颗粒感染; 4: 细胞阴性对照; 5: G、P、E 质粒共转染; 6: pΔΦ-IL24 质粒转染 (2 vs 4 or 3: $P < 0.01$).

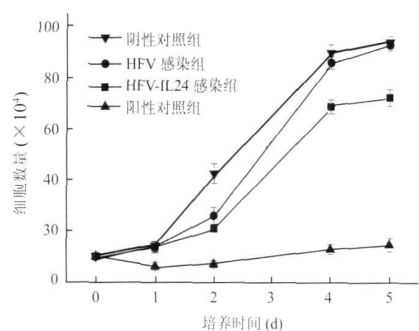


图 4 IL-24 对 HeLa 细胞体外生长的抑制作用

2.5 细胞周期与增殖活性的变化 图 5A 为 HFV-IL24 感染的细胞,出现明显的亚二倍体死亡峰;图 5B 是被空载 HFV 感染的细胞,出现一定的亚二倍体峰值,说明泡沫病毒载体具有一定的细胞毒性,但其峰值明显低于图 5A 的峰值;图 5C 为单独转染 pΔΦ-IL24 载体质粒的细胞,亚二倍体细胞数明显低于 HFV-IL24 感染型细胞,却高于空载 HFV 感染型细胞;图 5D 为细胞阴性对照,凋亡(死亡)细胞数较少。FCM 的检测结果显示,感染或转染携带 IL-24 载体的 HeLa 细胞与阴性对照细胞相比,细胞凋亡(死亡)率增高。

3 讨论

结合 HFV 载体和 IL-24 两者的优点,构建了携带 IL-24 的表达载体 pΔΦ-IL24 (图 1) 与泡沫病毒辅助载体共同转染细胞后获得了携带 IL-24 的复制缺陷型重组人泡沫病毒 (HFV-IL24) 颗粒 (图 2),在细胞水平上对肿瘤细胞生长抑制作用进行了研究。细胞存活率试验证实 HFV-IL24 对癌细胞的生长有明显

的抑制作用 (图 4)。流式细胞术检测显示 HFV 载体介导的 IL-24 可以使细胞凋亡 (死亡) 率增高 (图 5)。

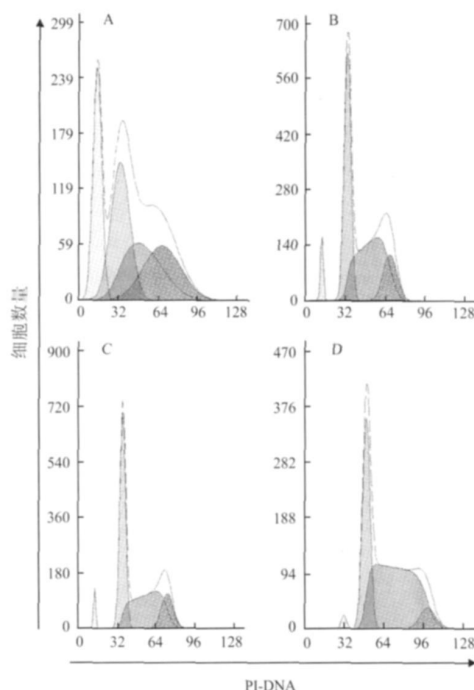


图 5 IL-24 对 HeLa 细胞周期分布的影响

A: HFV-IL24 颗粒感染; B: HFV 颗粒感染; C: pΔΦ-IL24 质粒转染; D: 细胞阴性对照。

2005 年,携带 IL-24 基因的腺病毒载体已进入 I 期临床试验^[9],然而,由于腺病毒载体不能将外源基因稳定整合在宿主基因组中,以这种载体为方案的基因治疗常常需要反复用药,同时,腺病毒的免疫原性又增加了反复用药的风险,因此并不能作为肿瘤基因治疗的理想载体^[10]。而人泡沫病毒在人和动物细胞中有广泛的宿主范围,因为其低致病性和反转录的特点,HFV 被认为是构建安全有效的逆转录病毒载体的合适候选病毒。同时,IL-24 稳定表达于具有免疫功能的组织和细胞,如脾脏、淋巴结和外周血白细胞,对多种肿瘤细胞产生明显的抑制作用甚至致凋亡作用,而对正常细胞无毒副作用,正逐渐成为肿瘤基因治疗中备受关注的新型细胞因子。

相对于传统载体,人泡沫病毒载体有着良好的靶向性和安全性,由它介导的基因转移可通过反转录将引入的外源基因稳定地整合到宿主基因组上,大大提高基因的转导效率,以达到目的基因的高效长期表达,因此在基因治疗中取得了广泛的应用,但其尚存在着病毒滴度有限、生产包装困难、转染效率低等诸多问题。另外,由本实验结果来看,所用的复制缺陷型 HFV 四载体系统还存在着一定的细胞毒性 (图 3)。因此,由于肿瘤基因治疗的特殊性,仍然需

要治疗载体和抗癌基因研究的进一步发展。后期将选取合适可行的动物实验,评估重组的 HFV-IL24 载体的安全性和有效性。

因此,本研究所构建的重组病毒载体 p Δ Φ-IL24 及由此而产生的重组人泡沫病毒颗粒 (HFV-IL24) 的功能性检测加深了对 HFV 和抗癌基因 IL-24 的了解,为泡沫病毒载体的应用和 IL-24 抗肿瘤的基因治疗提供了研究方向和理论依据。

参考文献:

- [1] Switzer WM, Bhullar V, Shanmugam V, *et al*. Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates [J]. *J Virol* 2004, 78(6): 2780-2789.
- [2] Vassilopoulos G, Josephson NC, Trobridge G. Development of foamy virus vectors [J]. *Methods Mol Biol* 2003, 76: 545-564.
- [3] Delelis O, Lehmann-Che J, Saba A. Foamy viruses—a world apart [J]. *Curr Opin Microbiol* 2004, 7(4): 400-406.

(上接 120 页)

活化和功能的影响。亚致死剂量的 ConA 能够诱导耐受,减轻的肝脏免疫损伤,可能不仅与 ConA 诱导 Treg 产生^[7],也可能与 ConA 刺激 Treg 的活化、促进其抑制功能有关。

我们观察到 ConA 能激活 Treg 而抑制 T_{eff} 的增殖,与抗 CD3 抗体一样(系统需要加抗原递呈细胞)。用 CCK-8 法检测抗 CD3 抗体、ConA 激活的 Treg 对 T_{eff} 的抑制作用,与 FCM 检测结果一致(数据未列出)。文献报道,ConA 作用后对两个与 Treg 抑制功能有关的分子 Foxp3 和 CTLA-4 的影响与抗 CD3 抗体有所不同^[8],提示 ConA 对 Treg 的激活作用,可能与抗 CD3 抗体并不完全一致。然而,ConA 对 Treg 和 T_{eff} 早期活化标志 CD69 表达的影响,与抗原肽刺激后的作用类似;ConA 对 Treg 细胞 CD69 表达和对其抑制功能的激活作用,具有关联性,提示 CD69 的表达在 ConA 作用后仍可一定程度地模拟抗原,反映 Treg 的早期激活情况。如果药物能够抑制 ConA 激活的 Treg 细胞 CD69 表达,表明它也极可能对 Treg 的功能具有抑制作用,而这可以通过流式细胞仪检测 CFSE 标记的 T_{eff} 增殖得到一定程度的验证。因此,FCM 检测 ConA 激活的 CD69 表达和 Treg 的抑制功能,可用于初步评价或筛选药物对 Treg 激活的影响。

参考文献:

- [1] Von BH. Mechanisms of suppression by suppressor T cells [J]. *Nat*

- [4] Caudell EG. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol* 2002, 168(12): 6041-6046.
- [5] Fisher PB. Is mdα-7/IL-24 a “Magic Bullet” for Cancer? [J]. *Cancer Res* 2005, 65(22): 10128-10138.
- [6] Sauane M, Su ZZ, Gupta P, *et al*. Autocrine regulation of mdα-7/IL-24 mediates cancer-specific apoptosis [J]. *PNAS* 2008, 105(28): 9763-9768.
- [7] Gupta P, Su ZZ, Lebedeva N, *et al*. mdα-7/IL-24: Multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine [J]. *Pharmacol Ther* 2006, 111(3): 596-628.
- [8] Trobridge G, Josephson N, Vassilopoulos G, *et al*. Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences [J]. *Mol Ther* 2002, 6(3): 321-328.
- [9] Lebedeva N, Sauane M, Gopalkrishnan RV, *et al*. mdα-7/IL-24 exploiting cancer’s Achilles’ heel [J]. *Mol Ther* 2005, 11(1): 4-18.
- [10] Park K, Kim WJ, Cho YH, *et al*. Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors [J]. *Front Biosci* 2008, 13: 2653-2659.

Immunol 2005, 6(4): 338-344.

- [2] Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression [J]. *Trends Mol Med* 2007, 13(3): 108-116.
- [3] 王弘琨, 赵勇. 调节性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 细胞、免疫抑制剂与移植免疫耐受 [J]. *现代免疫学*, 2006, 26(5): 353-356.
- [4] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, *et al*. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state [J]. *Int Immunol* 1998, 10(12): 1969-1980.
- [5] Earle KE, Tang Q, Zhou X, *et al*. *In vitro* expanded human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation [J]. *Clin Immunol* 2005, 115(1): 3-9.
- [6] Bresson D, Togher L, Rodrigo E, *et al*. Anti-CD3 and nasal insulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs [J]. *J Clin Invest* 2006, 116(5): 1371-1381.
- [7] Erhardt A, Bibinger M, Papadopoulos T, *et al*. IL-10 regulatory T cells and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. *Hepatology* 2007, 45(2): 475-485.
- [8] 张莹, 姚咏明, 常青, 等. 不同细胞刺激剂对小鼠调节性 T 细胞功能活化的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(3): 142-145.
- [9] Linkin JR, Picca CC, Caton AJ. Activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell suppressor function by analogs of the selecting peptide [J]. *Eur J Immunol* 2007, 37(1): 139-146.
- [10] 肇静娴, 曾耀英, 刘毅, 等. 联合应用活体染料 CFDA-SE 和 SNARE-1 检测混合淋巴细胞反应 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(3): 382-384.
- [11] Madhany MR, Brown MR, Fleisher TA. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals [J]. *Cytometry* 1996, 26(4): 305-310.