

# 抑瘤基因 mda-7/ IL-24 研究进展

王长松<sup>1</sup>综述,陈燕平<sup>2</sup>审校

关键词: mda-7/ IL-24; 肿瘤抑制; 机制

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)04-0248-03

## 0 引言

黑色素瘤分化相关基因-7(Melanoma differentiation-associated gene-7, mda-7)是一种肿瘤抑制基因,其定位于染色体的1q32位点,位于一群分泌IL-10, IL-19和IL-20细胞因子的基因群中,基于氨基酸的同源性预测蛋白质的结构、染色体的定位以及细胞因子样特性,mda-7被命名为IL-24<sup>[1]</sup>。mda-7 cDNA 编码一个206个氨基酸的蛋白质,分子质量约为23.8 kDa。通过Prosite数据库分析发现mda-7/IL-24在第85,99和126位点存在N-糖基化,6个磷酸化位点(即位于101,111和161位点的酪蛋白激酶II;88,133和161位点的蛋白激酶C)以及开始于101位点的IL-10信号图形,其与IL-10亚家族密切相关。计算机模拟其三维结构得到了一个与预测一致的紧凑的球形分子,含有4个螺旋区,其中夹杂有环状结构。基因作图显示其包括7个外显子,中间隔有6个内含子。转录调节区位于一个5'促进子内,3' 90%外显子包含有polyadenylation信号和富AU的mRNA不稳定框架(AREs)。

## 1 mda-7/ IL-24 在体内的表达和分布

mda-7/IL-24在人体内的生理水平表达主要限定于一些具有免疫功能的细胞,包括正常的未受刺激的或受LPS刺激的单核细胞,抗CD3抗体刺激的T-细胞和正常人的黑色素细胞。不同恶性程度的人黑色素瘤细胞RNA分析显示随着细胞的恶性程度的增加,mda-7/IL-24表达逐渐减少以至完全消失。受刺激的外周血单核细胞(PBMCs)、CD3<sup>+</sup>细胞和单核细胞亚族可分泌表达mda-7/IL-24。进一步的分类提示大概只有15%~20%的CD19<sup>+</sup>和50%~80%的CD56<sup>+</sup>细胞是阳性表达<sup>[1]</sup>。

实时定量PCR分析发现mda-7/IL-24 mRNA能在造血细胞中表达。LPS或LPS联合IFN- $\gamma$ 刺激的单核细胞可表达mda-7/IL-24 mRNA。在活化过程mda-7/IL-24抗体可促进单核细胞内mda-

7/IL-24 mRNA的表达,说明IL-10可以下调单核细胞内mda-7/IL-24 mRNA的表达,活化的单核细胞内mda-7/IL-24 mRNA水平比活化的T细胞内要多。尽管处于休眠期的PBMC不表达mda-7/IL-24 mRNA,但用抗CD3抗体和抗CD28抗体或LPS刺激可诱导mda-7/IL-24的表达,提示T细胞和单核细胞均能够表达mda-7/IL-24 mRNA。

最初在乳腺癌细胞株MCF-7内发现mda-7/IL-24定位于胞核内,但在正常的黑色素细胞和过表达mda-7/IL-24的黑色素瘤细胞内观察到了胞浆内有弥散的mda-7/IL-24。

## 2 mda-7/ IL-24 在恶性肿瘤细胞中的表达和作用

当超过生理水平表达时,mda-7/IL-24具有抑制多种肿瘤细胞生长的作用,可诱导多种肿瘤细胞株的生长抑制和凋亡,而对正常细胞却无作用<sup>[2]</sup>。Ad-mda7的临床研究显示mda-7/IL-24 mRNA的转基因异位表达导致mda-7/IL-24的高水平表达以及诱导人肿瘤细胞的凋亡<sup>[3]</sup>,mda-7/IL-24的丢失和肿瘤的侵袭性成强相关( $P=0.001$ )。

2.1 黑色素瘤 最初在经过诱导分化后的黑色素瘤细胞内克隆到的mda-7/IL-24,随后的研究表明人黑色素瘤细胞随着恶性程度的增加,mda-7/IL-24表达逐渐减少以至完全消失。

2.2 胰腺癌 引起广泛关注的是Ad-mda7和胰腺癌的关系,胰腺癌中的遗传变异通常涉及到K-ras癌基因(85%~95%)的活化。不考虑K-ras的作用,单独转染Ad-mda7不会杀死胰腺癌细胞。而在静止型(mut K-ras)K-ras胰腺癌细胞株中联合应用Ad-mda7和反义K-ras phosphorothioate寡核苷酸可引起显著的细胞生长抑制和凋亡<sup>[4]</sup>。

2.3 乳腺癌 具有不同基因型的乳腺癌细胞如MCF-7,MDA-MB-231,MDA-MB-453和T47D,MDA-MB-157,均对Ad-mda7诱导的生长抑制敏感,而正常的原代或HBL-100永生化上皮细胞却不受影响。mda-7/IL-24抑制乳腺癌细胞增殖的机制与诱导凋亡和增加凋亡前蛋白bax的表达有关。mda-7/IL-24转染肿瘤细胞后造成肿瘤细胞的增殖

收稿日期:2004-04-27;修回日期:2004-08-03

作者单位:1. 400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所,2. 研究生管理大队

停止,丧失成瘤能力,细胞逐渐凋亡,正常的乳腺细胞却不受影响<sup>[5]</sup>,而且腺病毒转染后在培养上清内检测到了可溶性的 mda-7/IL-24。

2.4 非小细胞肺癌 mda-7/IL-24 蛋白的过表达能显著抑制 A549, H460, H1299 等非小细胞肺癌细胞株(NSCLC)的增殖,而正常的人肺纤维母细胞(NHLF)却不受影响。感染 Ad-mda7 的黑色素瘤细胞和 NSCLC 细胞,处于 G<sub>2</sub>/M 期的细胞明显增加<sup>[6]</sup>,阻止细胞向 S 期发展;改变凋亡诱导蛋白(bax, bak)和抗凋亡蛋白(bcl-2, bcl-xl)的比例。

2.5 其它恶性肿瘤 尽管 mda-7/IL-24 mRNA 仅限于特定的细胞中表达,非黑色素细胞或非造血细胞系在合适的环境下也可表达。用 IFN- $\gamma$  + MEZ 处理 DU-145 (前列腺癌), HBL-100 (正常的乳腺上皮), MDA-MB-157 和 MDA-MB-231 (乳腺癌), NC (正常的小脑星型胶质细胞), GBM-18 (glioblastoma multiforme), Saos-2 (骨肉瘤), HeLa (宫颈癌)和 HONE-1 (鼻咽癌)细胞 24 h 后均出现 mda-7/IL-24 mRNA 的表达。相反,在其他的正常人类细胞和肿瘤来源细胞,如 HuPEC (正常前列腺上皮), PC-3 和 LNCaP (前列腺癌), MCF-7, T47D 和 MDA-MB-453 (乳腺癌), T98G (glioblastoma multiforme)和 SW613 (结肠癌)表达和诱导并不十分明显。这些结果表明 mda-7/IL-24 并不是在大多数正常细胞和某些肿瘤细胞持续表达,但在 mRNA 水平的表达可以由 IFN- $\gamma$  + MEZ 在大多数正常细胞和肿瘤细胞中诱导表达,这种途径是独立于传统的抑癌基因之外的,如视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)和/或 p53。

### 3 mda-7/IL-24 抑制肿瘤的机制探讨

用编码人 mda-7/IL-24 的重组腺病毒载体(Ad-mda7)感染人乳腺癌,肺癌和黑色素瘤细胞可以显著抑制肿瘤细胞的生长并诱导细胞出现凋亡,其机制主要有以下几点:

3.1 UPR 通路的活化 在 Ad-mda7 的作用下应急相关蛋白先于凋亡的出现,Ad-mda7 上调许多热休克相关伴侣,包括 BiP, TRA1 和 HSP70。而主要的热休克蛋白,如 HSP60-1 和 HSP70-1 没有显著改变,HSP90 反而下调,提示 Ad-mda7 并不诱导整体的热休克反应,选择性的引发特异性应急基因。mda-7/IL-24 在 H1299 NSCLC 细胞中的表达导致了多种应激蛋白的活化,包括 BiP, GADD34, PP2A, XBP-1 以及 caspases 7 和 12。推测 mda-7/IL-24 活化 UPR 应急反应以及启动凋亡信号从内分泌通道最终导致线粒体性的细胞死亡<sup>[7]</sup>。也有

证据提示在 H1299 细胞中 mda-7/IL-24 诱导的死亡通路中涉及 ER,是由于 Ad-mda7 调节肌糖 1,4,5-三磷酸受体(IP3R)的结果<sup>[8]</sup>。因为在 H1299 细胞中 mda-7/IL-24 必须进入分泌通路才能具有细胞毒性,而 Ad-mda7 可以活化应急通路 UPR,因此可以推测在肺癌细胞中 Ad-mda7 介导的细胞毒性归功于 UPR 的活化,导致从 ER 到线粒体的死亡通路的活化。

3.2  $\beta$ -catenin 和 PI3K 信号通路 Ad-mda7 处理后促进了肿瘤抑制基因蛋白的表达,如 E-cadherin, APC, GSK-3 和 PTEN,减少涉及  $\beta$ -catenin 和 PI3K 的原癌基因的表达。Ad-mda7 引起细胞内的  $\beta$ -catenin 由核内向胞膜的重新分布,导致 TCF/LEF 转录活性的下降,以肿瘤细胞特异性的方式上调 E-cadherin  $\beta$ -catenin 粘附复合体的形成,PI3K 通路成员(如 p85 PI3K, FAK, ILK-1, Akt 和 PLC $\gamma$ )的表达下调,以及 PI3K 拮抗剂 PTEN 的表达上调。Ad-mda7 杀死乳腺癌细胞需要 MAPK 和 MEK1/2 通路的参与,然而这些通路并不是 Ad-mda7 杀死肺癌细胞所必需的。因此,在肺癌和乳腺癌细胞中 mda-7/IL-24 蛋白通过调节  $\beta$ -catenin 和 PI3K,从而调整细胞与细胞之间的粘附以及细胞内的信号转导<sup>[8]</sup>,引起凋亡诱导的重新活化。

3.3 抗血管生成 裸鼠的肺癌移植模型研究表明 Ad-mda7 具有抗血管生成的特点。Ad-mda7 可抑制内皮细胞管形成,提示 mda-7/IL-24 可能具有抗血管形成的特点<sup>[9]</sup>。Ad-mda7 感染后可抑制人脐静脉内皮细胞(HUVECs)形成微毛细血管的能力。

3.4 mda-7/IL-24 和凋亡相关蛋白的关系 mda-7/IL-24 能够增加 p53, bak 和 bax 的表达;活化 caspases 3, 8 和 9;增加肺癌和乳腺癌细胞株中线粒体细胞色素 C 的释放<sup>[10,11]</sup>。Ad-mda7 能够调节黑色素瘤细胞中 iNOS 和 MAPK<sup>[12]</sup>以及肺癌和乳腺癌细胞株中 JUN 激酶,  $\beta$ -catenin, PI3K 和 PKR 的活性<sup>[8]</sup>。因此,在不同的肿瘤类型中似乎存在不同的凋亡诱导信号通路。

具有 K-ras 突变的胰腺癌细胞,凋亡的出现与增高的 mda-7/IL-24、BAX 蛋白表达以及 BAX/BCL-2 蛋白的比例增加相关联。而且,用反义 K-ras 表达载体转染以及 Ad-mda7 感染 K-ras 突变型的胰腺癌,抑制了裸鼠体内的克隆形成以及肿瘤的发生。

3.5 mda-7/IL-24 抑制肿瘤的特性与其他抑癌基因的关系 多项研究表明,mda-7/IL-24 能够抑制肿瘤细胞的生长,而和其他的肿瘤抑制基因(p53, Rb 或 p16)无关,是一种完全独立的不依赖其它抑

癌基因的行为。有可能 mda-7/ IL-24 蛋白活化了内在的死亡受体通路。

3.6 其它机制 在体外用 Ad-mda7 治疗肿瘤细胞可导致细胞迁移的减少以及同类型细胞粘附的增加。Ad-mda7 还能够抑制肿瘤细胞的侵袭以及调节 MMP 的表达。提示 mda-7/ IL-24 能够保持组织结构的完整性,抑制肿瘤的转移扩散。

总之,mda-7/ IL-24 肿瘤抑制基因能够活化多种肿瘤抑制蛋白,失活多种重要的原癌基因。目前还不十分明了 mda-7/ IL-24 调节信号的瀑级式反应的启动子。

#### 4 展望

综上所述,mda-7/ IL-24 是一种新型的抑癌基因,可通过多种途径阻滞肿瘤细胞的生长。而且它只对肿瘤细胞有作用而对非肿瘤细胞却没有或只有很微弱的效应。mda-7/ IL-24 可能是一种阻止肿瘤细胞迁移和侵袭的看门人(gatekeeper)。

另外,mda-7/ IL-24 也是一种很有前景的癌症基因治疗药物。一种表达 mda-7/ IL-24 基因的腺病毒 INGN 241,瘤内注射后在 70% 的肿瘤中均可检测到 mda-7/ IL-24 表达的增加,以及明显的细胞凋亡。进展期的肿瘤患者手术前瘤体内注射一次剂量约为  $2 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{12}$  病毒颗粒的 INGN 241,注射后 24 小时切除肿瘤,作连续切片分析 mda-7/ IL-24 蛋白的表达以及凋亡的诱导,显示瘤内应用 Ad-mda7 非常安全,只观察到极轻微的毒性反应以及很高比例的肿瘤细胞凋亡。一期临床试验也表明患者极易耐受 Ad-mda7 的瘤内注射<sup>[13]</sup>。而在二期临床试验中,INGN 241 注射联合放疗将应用于局部复发的乳腺癌患者。

mda-7/ IL-24 作为肿瘤的基因治疗有其独特的优势,如高度的肿瘤细胞特异性,抗血管形成特性,能够增加肿瘤的放射敏感性,以及独立于 p53, p16, Rb 和 BAX 之外的生长抑制效应。可以和既有的以 p53 为基础的治疗药物联合应用,还可以在实际应用过程中减少单个药物的剂量。尽管 mda-7/ IL-24 已进入一期临床阶段,但对其独特选择性作用的详细了解将有助于临床上的安全应用,增加疗效,减少副作用,提供重要的关于如何采用基因药物治疗恶性肿瘤的信息。

#### 参考文献:

- [1] 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]. *J Immuno*, 2002, 168 (12): 6041-6046.
- [2] Fisher PB, Gopalkrishnan RV, Chada S, et al. mda-7/ IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic[J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(4 Suppl 1): S23-37.
- [3] Chada S, Nemunitis J, Tong A, et al. A phase I dose-escalation pharmacokinetic and pharmacodynamic study of Ad-mda7 (INGN 241) in patients with advanced carcinoma[J]. *Mol Ther*, 2002, 5 (5): S266.
- [4] Su Z, Lebedeva IV, Gopalkrishnan RV, et al. A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (18): 10332-10337.
- [5] Madireddi MT, Su ZZ, Young CS, et al. Mda-7, a novel melanoma differentiation-associated gene with promise for cancer gene therapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 465 (3): 239-261.
- [6] Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, et al. The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells[J]. *Oncogene*, 2002, 21 (5): 708-718.
- [7] Sieger KA, Mhashilkar AM, Stewart AL, et al. The Tumor Suppressor Activity of MDA-7/ IL-24 Is Mediated by Intracellular Protein Expression in NSCLC Cells[J]. *Mol Ther*, 2004, 9(3): 355-367.
- [8] Mhashilkar AM, Stewart AL, Sieger KA, et al. MDA-7 negatively regulates the  $\beta$ -catenin and PI3 K signaling pathways in breast and lung tumor cells[J]. *Mol Ther*, 2003, 8(2): 207-219.
- [9] Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, et al. Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression in vivo [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (29): 4558-4566.
- [10] Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, et al. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7[J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13 (2): 169-178.
- [11] Pataer A, Chada S, Hunt KK, et al. Adenoviral MDA-7 induces apoptosis in lung cancer cells through mitochondrial permeability transition independent cytochrome c release [J]. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 2003, 126(6): 1325-1328.
- [12] Ekmekcioglu S, Ellerhorst JA, Mumm JB, et al. Negative association of melanoma differentiation associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2 (1): 9-17.
- [13] Chada S, Nemunitis J, Tong A, et al. A phase I dose-escalation study of Ad. mda-7 (INGN 241) in patients with advanced carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8 (Suppl 2): S3.

[编辑校对:贺文]