

组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA联合溶瘤腺病毒 ZD55-IL-24诱导SW480细胞凋亡

谌贺宽子 梁天祥 仇 庆 夏玉龙 吴欣欣 周秀梅*

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA联合溶瘤腺病毒ZD55-IL-24对结肠癌SW480细胞的体外杀伤作用。采用MTT法、结晶紫实验检测SAHA、ZD55-IL-24以及二者联合使用对结肠癌细胞株SW480及人正常肺上皮细胞株Beas-2B的增殖抑制作用; 利用Hoechst33342染色对经各种处理的细胞进行凋亡形态学观察, 采用流式细胞术对凋亡进行量化; 通过Western blot法在蛋白水平上检测SW480细胞中IL-24的表达情况。结果显示SAHA与ZD55-IL-24联合处理对SW480的增殖抑制作用明显优于两者单独使用。10 MOI病毒ZD55-IL-24与0.5 $\mu\text{mol/L}$ SAHA联合作用4天, SW480细胞存活率仅为12%, 明显低于10 MOI病毒单独处理组细胞的存活率(40%, $P<0.05$)。然而, 正常细胞对于联合给药显示出良好的耐受性。Hoechst33342染色和流式细胞术结果也表明联合处理组的SW480细胞凋亡特征更明显。此外, IL-24在ZD55-IL-24病毒单独感染组及病毒与药物联合组的SW480细胞中均能有效表达。

关键词 SAHA; 溶瘤腺病毒; IL-24; 结肠癌; 流式细胞术; 细胞凋亡

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制血管新生、诱导自我吞噬等作用机制产生较强的抗肿瘤活性^[1], 与其他药物联合应用在抗肿瘤方面也展现了很好的应用前景^[2-3]。近年来, HDACis作为非细胞毒性新型肿瘤靶向治疗药物倍受关注, 其中多种药物已进入临床试验阶段。SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)是继HMBA(hexamethylene bisacetamide)之后的第二代羟肟酸类组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 目前, 已在美国进入II期临床试验。它与HMBA相比有更高的活性, 在微摩尔($\mu\text{mol/L}$)水平即对肿瘤细胞有很大的杀伤效果^[4]。继Quang等^[5]报道SAHA联合化疗药物可以提高甲状腺癌的治疗效果后, Nichole等^[6]用SAHA对三种胰腺癌细胞的体外实验表明SAHA通过上调p21使其在细胞质内表达增加, 将胰腺癌细胞阻止于G₁期, 增强了吉西他滨的抗癌作用, 具有治疗胰腺癌的潜力。Francis等^[7]在近期临床实验中发现剂量 $<11.5 \text{ mg/m}^2$ 的LBH589对治疗血液系统的肿瘤展现了较好的疗效和耐受性。SAHA与其他药物联合治疗的研究已取得了很好的进展, 但与病毒联合治疗肿瘤的研究却少有报道。

近年来, 刘新垣提出的肿瘤的靶向基因-病毒

治疗策略(cancer targeting gene-viral therapy)已经成为一个研究热点^[8]。该课题组构建了E1855 kDa区缺失的人5型腺病毒(ZD55), 并引入了肿瘤杀伤基因白细胞介素-24(IL-24)得到了增殖性溶瘤腺病毒ZD55-IL-24^[9]。携带抑癌基因的增殖性溶瘤腺病毒理论上具有很高的抗肿瘤效应和比较低的毒副作用。ZD55系统能够满足肿瘤基因病毒治疗的两个要求: 具有靶向性和具有可插入外源基因的位点, 为我们开展肿瘤的基因病毒治疗提供了又一个理想的平台^[10]。人类白细胞介素-24基因(human interleukin-24, *hIL-24*), 又名黑色素瘤分化相关抗原7(melanoma differentiation associated antigen 7, *MDA7*), 是1995年Jiang等^[11]利用减数杂交技术从干扰素- β (interferon- β)和紫花欧瑞香素(MEZ)诱导分化的人恶性黑色素瘤细胞HO-1中克隆得到的新基因。它是既能抑制肿瘤生长又能调节免疫系统功能的细胞因子类的抑癌基因, 可以特异性地抑制多种肿瘤细胞生长并诱导其凋亡。已有很多研究表明IL-24与其他基因治疗、放疗、化

收稿日期: 2011-07-24 接受日期: 2011-10-17

浙江理工大学科研启动基金(No.1016834-Y)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86843181, Fax: 0571-86843185, E-mail:

zhouxiumei824@163.com

疗、细胞因子治疗等方式联合应用有抗肿瘤协同效应,能显著提高杀伤肿瘤的效果^[12-14]。本课题选用ZD55-IL-24与SAHA药物联合作用于结肠癌SW480细胞进行分析研究,从而为今后SAHA与更多病毒联合治疗提供一定的借鉴,同时也为结肠癌的病毒与药物联合治疗开阔了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst33342凋亡试剂、蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor)(Sigma公司),细胞裂解液(碧云天公司),组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA、IL-24抗体(Santa Cruz Biotechnology公司),GAPDH抗体(Cell Signaling Technology公司),胎牛血清、DMEM(Gibco公司),结晶紫(Ameresco公司),ZD55-IL-24病毒为本实验室所有,HEK293细胞、人结肠癌细胞SW480和正常肺上皮细胞Beas-2B都来自于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

SW-CJ-1FB超净台(苏州净化设备有限公司),DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),XDS-1B倒置生物显微镜(Olympus公司),BCD-277冰箱(博西华家用电器有限公司),FACSCalibur型号的流式细胞仪(BD公司)。

用DMSO在无菌条件下溶解组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA,配制成10 mmol/L母液,分装, -80 °C保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌SW480细胞和人正常肺上皮细胞Beas-2B均用含10%胎牛血清、50 U/L的青霉素和链霉素的高糖DMEM完全培养基于37 °C、5% CO₂培养箱中进行培养,2~3 d传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT毒性实验 收集对数生长期SW480细胞,按10⁴/孔接种到96孔板中。置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱内培养24 h后,分别用不同浓度的SAHA和不同MOI的ZD55-IL-24感染细胞,每组各设6个复孔。对照组只加细胞不做任何处理,调零组加入等体积的10% DMEM。培养4天后,每孔加入20 μL的MTT(5 mg/mL),37 °C孵育4 h,小心吸去上清,每孔加入150 μL DMSO,在摇床上震荡15 min后用酶标

仪检测D₄₉₀值。细胞存活率的计算采用如下公式:

细胞存活率=(处理组D值-调零组D值)/(对照组D值-调零组D值)×100%。

1.2.3 结晶紫染色进行细胞毒性分析 将5×10⁴ SW480、Beas-2B细胞分别接种于24孔板中,每孔加入400 μL培养基,37 °C培养24 h后进行加药处理。继续培养4天后吸干培养液,每孔加入250 μL结晶紫染色液(2%结晶紫溶于20%甲醇)染色15 min,用自来水将多余染液洗净,拍照记录。

1.2.4 Hoechst33342染色观察细胞的凋亡 将5×10⁴ SW480细胞接种于24孔板中进行培养。24 h后,分别在药物组中加入0.5 μmol/L SAHA,病毒组中加入10 MOI ZD55-IL-24病毒,联合组中加入0.5 μmol/L SAHA和10 MOI ZD55-IL-24,并设置PBS处理对照组。继续培养两天后,将Hoechst33342加入培养基中,使得Hoechst终浓度为1 μg/mL,放在37 °C、5% CO₂培养箱中孵育20 min,在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡率 六孔板中接种4×10⁵/mL的SW480细胞,培养12 h后,在加药组中分别加入10 MOI ZD55-IL-24、0.5 μmol/L SAHA、10 MOI ZD55-IL-24+0.5 μmol/L SAHA,对照组中加入等量的PBS,37 °C、5% CO₂培养。48 h后吸去培养基,参照AnnexinV/PI细胞凋亡试剂盒操作说明:收集细胞,用预冷的PBS洗涤细胞两遍,用100 μL的1×Binding Buffer重悬细胞,加入5 μL的AnnexinV和5 μL的PI,室温避光孵育15 min后,加入400 μL 1×Binding Buffer,采用流式细胞仪分析。

1.2.6 Western blot检测细胞内IL-24的表达 将对数生长期的SW480细胞以每孔4×10⁵细胞接种于6孔板中,每孔2 mL培液,分别加入PBS、10 MOI ZD55-IL-24、0.5 μmol/L SAHA、10 MOI ZD55-IL-24+0.5 μmol/L SAHA,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。48 h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,用BCA蛋白定量试剂盒定量,每孔加入25 μg总蛋白进行15%的SDS-PAGE电泳,结束后用湿转法将电泳产物进行转膜到NC膜上,5% BSA室温封闭2 h,一抗(1:200稀释)4 °C过夜,TBST洗膜3次,每次15 min,然后加入荧光二抗(1:10 000稀释),室温孵育1 h,TBST洗膜3次,每次15 min,红外扫描仪检测目的蛋白的表达。

1.2.7 统计学处理 所有数据均采用Excel 2007和Sigma Plot数据统计软件对各样品的相对活性

数据进行 t 检验、方差分析。全部结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

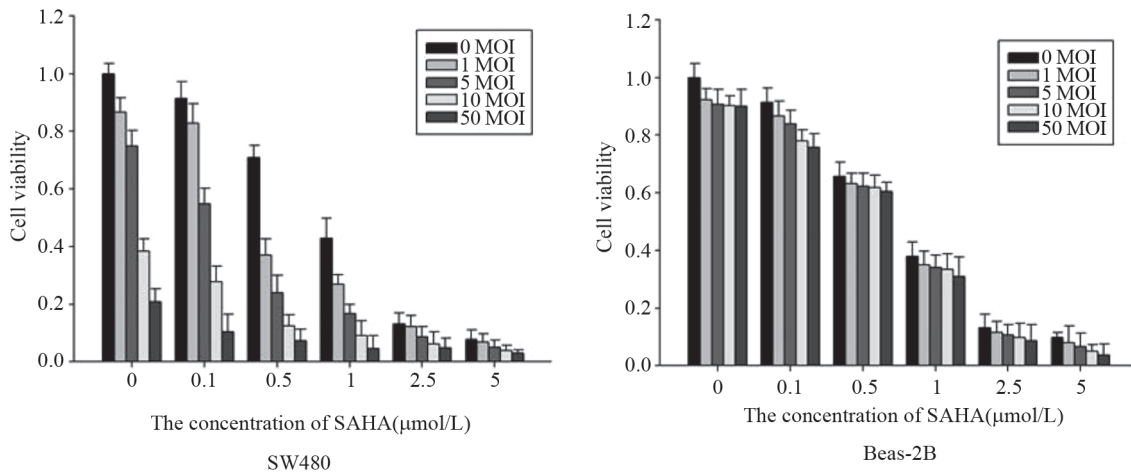
2.1 MTT法进行病毒药物各处理组细胞毒性检测

如图1所示, ZD55-IL-24单独处理对SW480细胞的杀伤效果远不及与SAHA药物联合作用的效果, 同时, SW480对SAHA比Beas-2B更加敏感。尤其在浓度为 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ SAHA与10 MOI ZD55-IL-24联合处理后, 结肠癌SW480细胞的存活率仅为12%, 而单独用10 MOI病毒处理的存活率仍有40%。病毒药物联合处理时正常Beas-2B细胞的存活率 $>60\%$ 。而当

药物浓度高于 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ 后, 无论是对SW480细胞还是对正常Beas-2B细胞, 细胞毒性都明显增大。

2.2 结晶紫实验分析ZD55-IL-24联合SAHA对SW480凋亡的影响

为了观察比较不同MOI的ZD55-IL-24与不同浓度的SAHA联合作用于SW480后的不同效果, 进行了结晶紫实验。结果如图2所示, 10 MOI ZD55-IL-24联合 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ SAHA处理SW480细胞时, 相当于单独使用50 MOI ZD55-IL-24的杀伤效果; 而 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ SAHA和10 MOI病毒无论单独还是联合使用对正常细胞Beas-2B均未有明显的杀伤作用。该实验结果证明病毒与药物联合处理对SW480细胞的杀伤效果

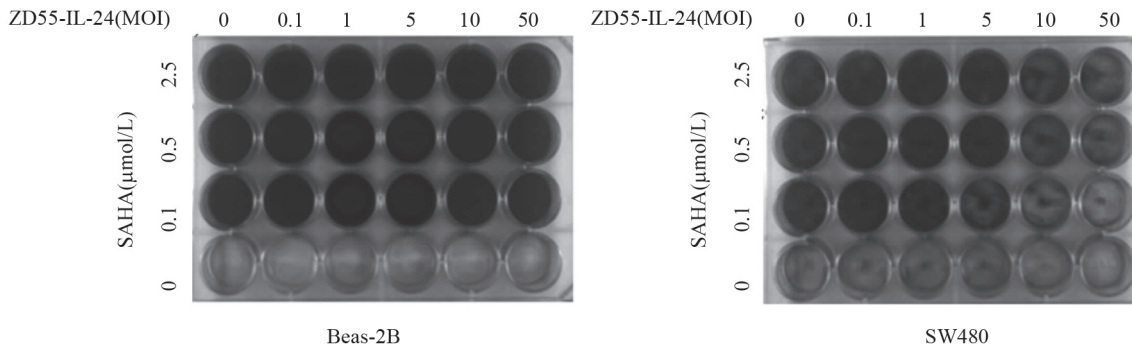


分别用 $0.1, 0.5, 1, 2.5, 5\ \mu\text{mol/L}$ 的SAHA和 $1, 5, 10, 50$ MOI的ZD55-IL-24作用于结肠癌细胞SW480和正常人肺上皮细胞Beas-2B, 作用4 d后, MTT实验检测细胞存活率。

Colorectal cancer cell (SW480) and normal human lung epithelial cell (Beas-2B) were treated with SAHA at concentrations of $0.1, 0.5, 1, 2.5, 5\ \mu\text{mol/L}$ and ZD55-IL-24 at $1, 5, 10, 50$ MOI. Four days later, cells were stained with MTT as described in Materials and Methods.

图1 MTT实验反应细胞中病毒与药物的协同效应

Fig.1 Synergistic effect was shown in cells by MTT viability assay



分别用不同浓度的SAHA和不同MOI的ZD55-IL-24处理SW480和正常细胞Beas-2B。对照组用PBS进行处理。4 d后, 进行结晶紫染色。

SW480 cell line and normal cell line Beas-2B were infected with ZD55-IL-24, SAHA or both at the different MOIs or concentrations. Treatment of PBS served as negative control. Cells were fixed and stained with crystal violet after 4 d.

图2 不同联合组对细胞产生的毒性效果

Fig.2 Cytopathic effect in normal and tumor cells with different agents

明显强于单独使用ZD55-IL-24。

2.3 Hoechst33342染色观察各处理组细胞凋亡现象

Hoechst33342染色后在荧光显微镜下观察发现, 用PBS处理的对照组SW480细胞基本上没有明显的细胞凋亡; 加入病毒ZD55-IL-24或药物SAHA后凋亡现象明显增多, 包括致密浓染或碎块状浓染等凋亡特征; 而ZD55-IL-24联合SAHA处理组中细胞凋亡现象最明显(图3)。

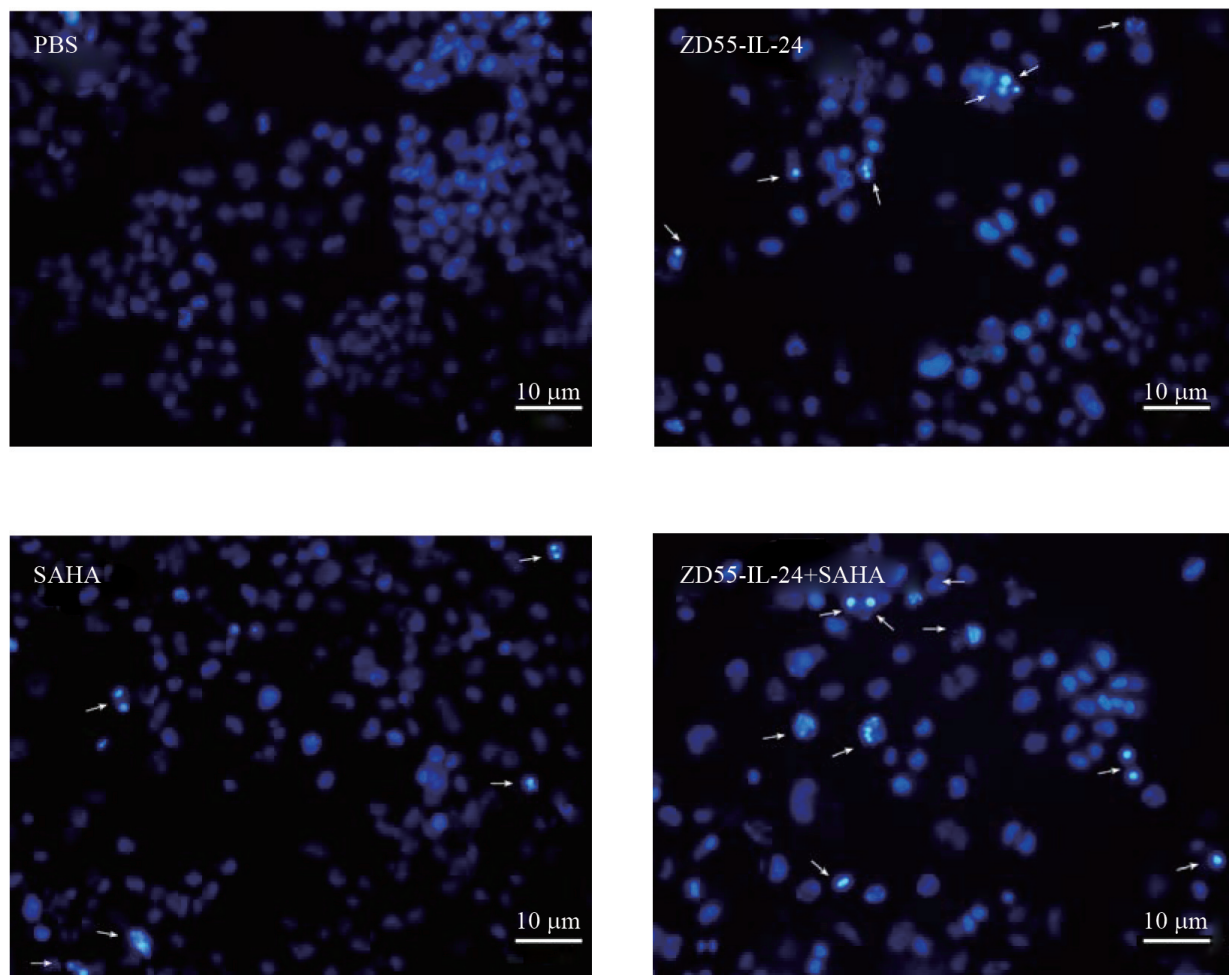
2.4 AnnexinV/PI法检测SW480细胞早晚期凋亡

流式AnnexinV FITC/PI双参数图4可见, 早期凋亡位于右下象限(FITC+, PI-), 晚期凋亡细胞位于右上象限(FITC+, PI+)。结果显示, 对照组细胞凋亡率为1.9%, ZD55-IL-24及SAHA单独处理组凋亡率分

别为5.8%、6.6%, 而二者联合作用48 h后细胞凋亡率明显增高(13.5%)。

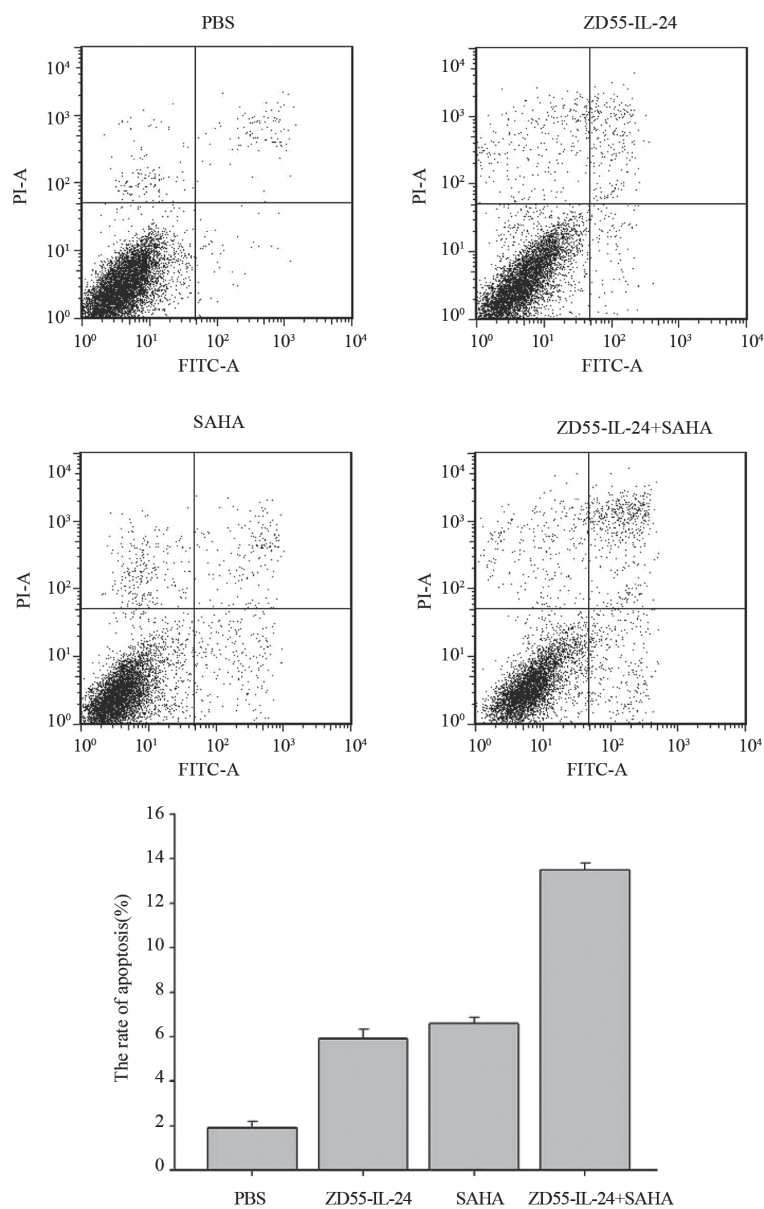
2.5 Western blot检测目的基因蛋白水平的表达

为了表明SW480细胞经处理后IL-24蛋白在细胞凋亡过程中是否发挥了作用, 用Western blot法检测了IL-24基因的表达。结果如图5所示, 在单独感染了ZD55-IL-24和同时感染了病毒和SAHA的细胞中IL-24均能有效表达, 而未感染ZD55-IL-24和单独用SAHA处理的细胞中未有IL-24蛋白的表达。进一步说明ZD55-IL-24能有效感染SW480细胞并在其中有效增殖、转录和翻译, 行使杀伤肿瘤细胞的功能, 并且在其与SAHA药物联合处理后并不影响其目的基因的表达。



箭头表示凋亡细胞, 标尺=10 μm。
Arrows indicate apoptotic cells, bar=10 μm.

图 3 Hoechst染色检测各处理组导致的SW480细胞凋亡
Fig.3 The apoptosis of SW480 cells treated with different groups was disclosed by Hoechst staining



分别用PBS、ZD55-IL-24、SAHA、ZD55-IL-24+SAHA作用于SW480细胞48 h后AnnexinV/PI双染, 流式细胞仪检测细胞凋亡。
SW480 cells were treated for 48 h by PBS, ZD55-IL-24, SAHA or ZD55-IL-24+SAHA.

图4 流式细胞术检测SW480细胞凋亡率

Fig.4 Apoptosis of SW480 detection assay by flow cytometry

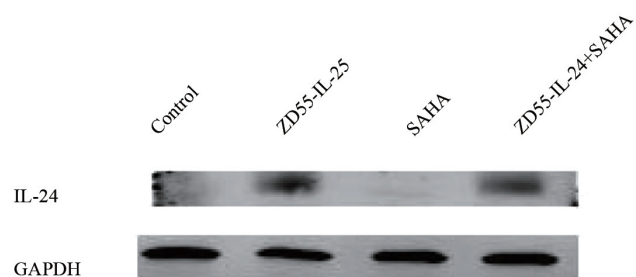


图5 Western blot检测IL-24蛋白水平

Fig.5 IL-24 protein levels were determined by Western blot analysis

3 讨论

随着肿瘤发生、发展及分子机制研究的不断深入, 人们对肿瘤发生的复杂性和单一疗法治疗肿瘤的局限性有了深入的认识, 恶性肿瘤的联合治疗已成为当前肿瘤研究的新热点。在Zhao等^[15]的实验中发现ZD55-IL-24无论在体内还是体外的溶瘤效率都比单一的病毒治疗(ZD55或ONYX-015)高, 但仍然不能完全消除实验裸鼠所有的肿瘤。本研究正是利用溶瘤腺病毒ZD55-IL-24与化疗药物SAHA联合作用于结肠癌细胞株SW480细胞, 进行体外研究。结果显示该携带治疗基因IL-24的溶瘤腺病毒联合SAHA对SW480细胞具有很好的协同效应, 能明显提高杀伤作用。

组蛋白去乙酰化抑制剂(HDACi)和IL-24已被证实具有抗肿瘤治疗中具有抗血管生成效应及诱导细胞凋亡的作用, 其作用机制有相似之处。HDACi抑制肿瘤细胞中HIF-1 α 及VEGF的表达, 诱导HIF-1 α 和VEGF受体的降解, 上调pVHL的表达, 从而抑制肿瘤血管生成。Ramesh等^[16]则发现在含有非小细胞肺癌细胞株A549的小裸鼠体内, Ad-mda-7通过调节血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子- β (TGF- β)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等影响肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的增殖、生长。HDACi作用于肿瘤细胞时能活化Bax和Bak等促凋亡蛋白, 抑制Bcl-2和Bcl-xL等抗凋亡蛋白的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡。而Saito等^[17]在前列腺癌细胞中也发现Bax和Bak蛋白的合成明显增多, Bcl-2和Bcl-xL蛋白的合成则明显减少, 证明了mda-7能通过调节凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比率来诱导靶细胞凋亡。

已有研究表明^[18-20], 药物SAHA能调控凋亡相关蛋白的表达, 活化凋亡信号转导通路; 降解癌蛋白或抗凋亡蛋白, 阻断抗凋亡信号转导通路; 提高细胞内活性氧水平, 诱导氧化损伤, 促进细胞凋亡。此外, IL-24和SAHA都可以抑制肿瘤细胞的浸润生长及转移, 两者其他的抗肿瘤作用机制也表明其均能通过多条信号转导通路和途径产生很强的抗肿瘤活性。本研究发现联合SAHA后ZD55-IL-24对结肠癌细胞SW480的杀伤作用明显增强, MTT结果表明联合用药后SW480细胞的存活率大大降低。在药物SAHA浓度较低(0.5 μ mol/L)的情况下, 与10 MOI病毒ZD55-IL-24联合处理, 对肿瘤细胞能达到很好的杀伤效果(存活率仅为12%)($P < 0.05$), 同时对正常细

胞Beas-2B没有叠加的毒副作用。结晶紫毒性分析实验也显示SAHA与ZD55-IL-24联合处理的凋亡程度要比药物或病毒单独处理时明显加强。凋亡染色实验进一步证明联合用药对SW480细胞的生长抑制作用及杀伤力要强于单独组, 可见到明显的染色体固缩和细胞核凝集。本实验充分证明ZD55-IL-24和SAHA联合作用于结肠癌SW480细胞有很好的协同作用, 从而在某些情况下可减少病毒的用量, 并显示了很好的联合用药安全性。然而, ZD55-IL-24和SAHA对肿瘤细胞具体的协同作用机制还有待于进一步深入研究。SAHA作为一种很有应用前景的新的HDACi有望参与到与更多病毒的联合治疗中。

参考文献 (References)

- Bai J, Liu JY, Zheng L. Advances in the anticancer effect of histone deacetylase inhibitor. *Mod Oncol* 2009; 17(06): 1194-6.
- Lee CK, Shuiliang W, Xiaoping H, Ryder J, Liu B. HDAC inhibition synergistically enhances alkylator-induced DNA damage response and apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Lett* 2010; 296(2): 233-40.
- Zhang QY, Ren W, Li X, Qi ZM. Histone acetylation and multi-drug resistances of tumor cells. *Mod Oncol* 2011; 19(5): 1022-6.
- Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, *et al.* Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(12): 5705-8.
- Luong QT, O'Kelly J, Braunstein GD, Hershman JM, Koeffler HP. Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against thyroid cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5570-7.
- Arnold NB, Arkus N, Gunn J, Korc M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine induced cell death in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 18-26.
- Giles F, Fischer T, Cortes J, Garcia-Manero G, Beck J, Ravandi F, *et al.* A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2006; 12(15): 4628-35.
- Liu XY. An antitumor strategy-targeting gene-virotherapy for cancer. *Chin J Cancer Biother* 2001; 8(1): 1.
- Zhao L, Gu J, Dong A, Zhang Y, Zhong L, He L, *et al.* Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer. *Hum Gene Ther* 2005; 16(7): 845-58.
- Zhang ZL, Zou WG, Luo 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.
- Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB. Subtraction hy-

- bridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 1995; 11(12): 2477-86.
- 12 Suh YJ, Chada S, McKenzie T, Liu Y, Swisher SG, Lucci A, *et al.* Synergistic tumoricidal effect between celecoxib and adenoviral-mediated delivery of mda-7 in human breast cancer cells. *Surgery* 2005; 138(3): 422-30.
 - 13 Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: Focus on p53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(2): 169-78.
 - 14 Gao P, Sun X, Chen X, Wang Y, Foster BA, Subjeck J, *et al.* Secretable chaperone Grp170 enhances therapeutic activity of a novel tumor suppressor, mda-7/IL-24. *Cancer Res* 2008; 68(10): 3890-8.
 - 15 Zhao L, Dong A, Gu J, Liu Z, Zhang W, Wang Y, *et al.* The antitumor activity of TRAIL and IL-24 with replicating oncolytic adenovirus in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(11): 1011-22.
 - 16 Ramesh R, Ito I, Gopalan B, Saito Y, Mhashilkar AM, Chada S. Ectopic production of MDA-7/IL-24 inhibits invasion and migration of human lung cancer cells. *Mol Ther* 2004; 9(4): 510-8.
 - 17 Ssito Y, Miyahara R, Gopalan B, Litvak A, Inoue S, Shanker M, *et al.* Selective induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells through adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated-7(mda-7)/interleukin-24(IL-24) gene. *Cancer Gene Ther* 2005; 12(3): 238-47.
 - 18 Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, *et al.* Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005; 11(1): 71-6.
 - 19 Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, *et al.* Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine and epothilone B. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(10): 971-84.
 - 20 李 庆, 杨志刚. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗血液肿瘤的研究进展. *医学综述* 2009; 15(7): 1022-4.

Apoptosis in SW480 Cells Induced by Combining Oncolytic Adenovirus ZD55-IL-24 with Histone Deacetylase Inhibitor SAHA

Shenhe Kuanzi, Liang Tianxiang, Qiu Qing, Xia Yulong, Wu Xinxin, Zhou Xiumei*

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

Abstract To investigate the anti-tumor effects in colorectal cancer cell line SW480 *in vitro* by combining oncolytic adenovirus ZD55-IL-24 with suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), MTT assay and crystal violet assay were used to determine the growth inhibition effect of single or combination therapy on colorectal cancer cell line SW480 and normal human lung epithelial cell line Beas-2B. After Hoechst33342 staining, the morphological changes of apoptosis in treated cells were observed under fluorescence microscope. And flow cytometry assay was used to quantify apoptosis. The expression level of IL-24 protein was assayed by Western blot. The results of MTT and crystal violet staining showed that the growth inhibition of SW480 cells treated with the combination of ZD55-IL-24 and SAHA were more obvious than that in ZD55-IL-24 group or SAHA group alone. Four days after administration of 10 MOI ZD55-IL-24 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ SAHA, the cell viability rate of SW480 cells was only 12%, which was significantly lower than that of cells treated only by 10 MOI ZD55-IL-24 (40%, $P < 0.05$). In contrast, Beas-2B cells were spared from inhibition of combined treatment ($P < 0.05$). Hoechst33342 staining and flow cytometry also confirmed that there were much more apoptotic SW480 cells in combinational treatment group. In addition, IL-24 protein was effectively expressed in SW480 cells infected with ZD55-IL-24 alone or treated with ZD55-IL-24 plus SAHA.

Key words SAHA; oncolytic adenovirus; IL-24; colorectal cancer; flow cytometry; apoptosis

Received: July 24, 2011 Accepted: October 17, 2011

This work was supported by Science Foundation of Zhejiang Sci-Tech University(ZSTU) Under Grant (No.1016834-Y).

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843181, Fax: 86-571-86843185, E-mail: zhouxiumei824@163.com