

Survivin 介导的条件复制型溶瘤腺病毒表达 IL-24 蛋白对人肝癌细胞 PLC 作用机制探究

蒋海¹ 丁鑫鑫² 刘鸿³ 谢宏霞¹ 章康健^{1*}

(¹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; ²浙江理工大学生命科学院生物化学研究所, 杭州 310018; ³浙江大学医学院病理学与病理生理学系, 杭州 310058)

摘要 条件复制型溶瘤腺病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 对人肝癌细胞株 PLC 的作用机制尚不清楚。采用流式细胞仪检测 PLC 经 PBS、Ad.sp-E1A_(Δ24) 以及 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 处理 48 h 后细胞周期的变化; 利用 Western blot 检测 PLC 经 PBS、Ad.sp-E1A_(Δ24) 以及 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 处理 24 h、48 h 后细胞中凋亡信号相关蛋白表达量的变化。实验结果表明: Ad.sp-E1A_(Δ24) 和 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 能将 PLC 细胞周期阻滞在 S 期, 其值分别为 43.74%±6.61%, 49.48%±7.60%, 两者与未感染病毒的对照组(18.91%±1.83%)进行统计学差异分析, *P* 值均<0.05; 同时, Western blot 检测发现随着处理时间的增加, 病毒处理组中 CHOP 的表达量、caspase 12 的剪切水平及 STAT3、p38 MAPK 的磷酸化水平都有明显提高, 尤其以 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 处理组较为明显。SOCS3 的表达量病毒处理组与对照组没有显著差异。上述结果表明重组腺病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 能有效阻滞 PLC 细胞周期在 S 期, 并可能通过内质网压力、STAT3 与 MAPK 信号通路等多种途径诱发 PLC 细胞凋亡。

关键词 溶瘤腺病毒; 人肝癌细胞; IL-24 基因; 细胞凋亡; 靶向基因 - 病毒治疗

原发性肝细胞癌(HCC)是最常见的致死性恶性肿瘤之一, 发展中国家原发性肝癌的发病率明显多于发达国家, 我国又是个乙型肝炎高发国家, 肝癌发病率明显偏高^[1-3]。

MDA-7/IL-24(melanoma differentiation associated gene-7) 是 Fisher 教授^[4,5]利用亚减法技术从黑色素瘤细胞中经人 IFN-β 和 MEZ (mezerin, PKC 激活剂) 诱生而得, 因此得名 MDA-7, 后来根据其生物学特性和染色体定位被命名为 IL-24。研究发现该基因对肿瘤具有选择性杀伤作用, 能选择性杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无毒副作用, 是一个公认而出色的肿瘤治疗基因^[6]。为此, 我们课题组基于刘新垣院士提出的“靶向基因 - 病毒治疗癌症策略”^[7], 利用 IL-24 构建的 survivin 启动子(survivin promoter, sp)调控 E1 区受限(敲除 E1A CR2 区, 即 Δ24bp)溶瘤腺病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 进行了抗癌的应用研究, 发现 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 对 PLC 肝癌细胞具有较好的肿瘤杀伤能力^[8], 但其作用机制却不清楚, 尤其在诱导凋亡信号方面知之甚少, 由此本文初步探讨其对人肝癌细胞(PLC)的杀伤机制, 为进一步阐明重组基因-病毒对肿瘤 PLC 细胞杀伤作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

重组病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 与 Ad.sp-E1A_(Δ24) 为本实验室保存(结构如图 1); 人肝癌细胞株 PLC 购自中国科学院上海细胞库; Propidium Iodide(PI)购自 Sigma 公司; caspase 12 抗体购自 Abcam 公司; CHOP 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; SOCS3 抗体购自 BioLegeng 公司; STAT3, p-STAT3 抗体购自 Santa Cruz 公司; p-p38 MAPK 抗体购自碧云天生物技术研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司; 胎牛血清、DMEM 购自 Gibco 公司; 预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株 PLC 用含体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基, 置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。实验用细胞为状

收稿日期: 2010-05-27 接受日期: 2010-08-19

浙江理工大学基金 (No.0916819-Y) 资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54921139, Fax: 021-54921126, E-mail: zhang-

kang-jian@126.com

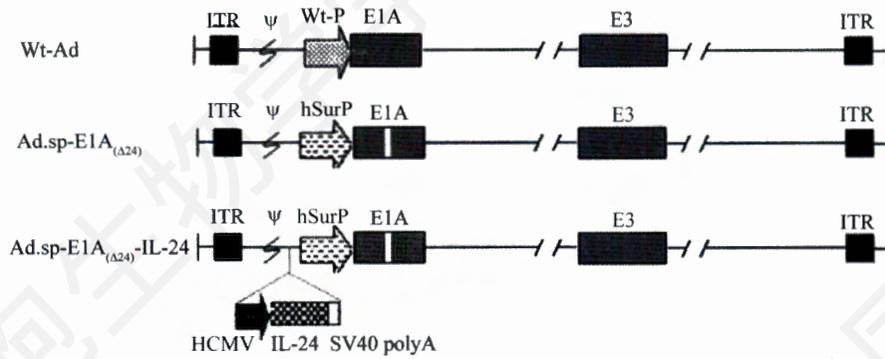


Fig.1 Schematic structure of recombinant oncolytic adenovirus Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24^[8]

况良好的对数生长期细胞。每个检测指标均设未加病毒的对照组。每组实验所加病毒的量和作用于细胞的时间根据预实验结果确定。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的 PLC 细胞, 将 8×10^5 个细胞铺于 6cm dish 中, 另设两个重复, 过夜培养。加入 5 MOI(感染复数)的病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)或 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24, 并设不加病毒的对照组, 5% CO₂、37℃培养箱培养 48 h 后用胰酶收获细胞制成单细胞悬液, PBS 冲洗 3 遍后 70% 酒精 -20℃固定过夜。PBS 液洗 1 遍后重悬在 500 μl 的 PI 溶液中(内含 50 μg/ml PI, 50 μg/ml RNA 酶), 避光染色 30 min 后进行流式细胞分析。应用细胞周期分析软件(WinMDI 2.9 软件) 计算 DNA 组方图 G₀/G₁、S、G₂/M 期百分比。用 SPSS 13.0 分析病毒处理组与对照组 S 期百分比的差异。

1.2.3 Western blot 检测 CHOP 表达与 caspase 剪切水平 取对数生长期的 PLC 细胞, 将 8×10^5 个细胞铺于 6cm dish 中, 过夜培养。加入 10 MOI 的病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)或 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24, 并设不加病毒的对照组, 5% CO₂、37℃培养箱分别培养 24 h、48 h 后, 按标准 Western blot 操作方法用蛋白裂解液预处理细胞并收集细胞及其上清, 12 000 r/min 离心, 收集上清于 1.5 ml 离心管中, 定量后 -80℃保存。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 每孔上样 20 μg, 电泳结束后按湿转法将产物转印到 NC 膜上。5% BSA 室温封闭 2 h, 加一抗(1:1 000 稀释), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min×3 次后, 加荧光二抗(1:15 000 稀释), 室温 1 h, TBST 洗膜 10 min×3 次后, Odyssey Infrared Imaging System 扫描检测 CHOP 表达与 caspase 12 的剪切水平。

1.2.4 Western blot 检测 SCOS3 表达与 STAT3、p38 MAPK 磷酸化水平 取对数生长期的 PLC 细胞, 将

8×10^5 个细胞铺于 6cm dish 中, 过夜培养。分别加入 10 MOI 的病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)或 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24, 并设不加病毒的对照组, 5% CO₂、37℃培养箱分别培养 24 h、48 h 后, 如 1.2.3 方法 Western blot 检测 SOCS3 表达与 STAT3、p38 MAPK 的磷酸化水平。

2 结果

2.1 流式细胞术检测细胞周期增殖活性

细胞周期图经软件分析后提示, Ad.sp-E1A_(Δ24)、Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒能诱导 PLC 细胞 S 期阻滞, 显著提高 S 期的比例, Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒的 S 期阻滞较为明显(图 2)。病毒处理 48 h 后 PLC 肝癌细胞 S 期的比例均明显升高, Ad.sp-E1A_(Δ24)、Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒处理组 S 期比值分别从对照组的 18.91%±1.83% 增加至 43.74%±6.61%、49.48%±7.60%, P 值均 <0.05。

2.2 Western blot 检测 CHOP 表达与 caspase 12 剪切水平

CHOP 与 caspase 12 在内质网应激诱导的细胞凋亡过程中扮演着重要的角色, CHOP 过量表达会导致细胞凋亡和细胞周期阻滞, caspase 12 的激活可以激活 caspase 9, 从而激活 caspase 3, 最终诱发凋亡^[9,10]。通过 Western blot 分别检测病毒处理组与对照组 24 h、48 h 后 CHOP 表达与 caspase 12 剪切水平, 发现处理组 CHOP 表达与 caspase 12 剪切水平均有提高, 48 h 处理后则提高显著。值得注意的是, 处理组中, Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒处理组较 Ad.sp-E1A_(Δ24) 病毒处理组诱导 CHOP 表达与 caspase 12 剪切水平有所提高, 但不显著(图 3)。

2.3 Western blot 检测 SCOS3 表达与 STAT3 磷酸化水平

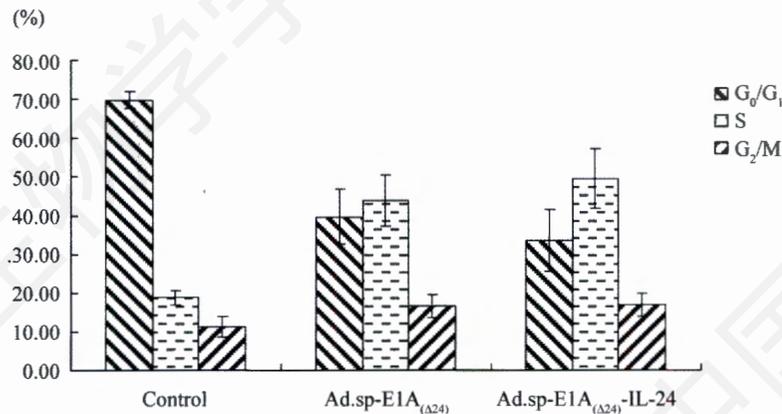


Fig.2 Effects of Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 on PLC cell cycle

Cells were cultured in 6cm dishes overnight in triplicate and infected with Ad.sp-E1A_(Δ24) or Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 at 5 MOI, respectively. Then incubation for 48 h. Cell cycle distribution was determined by propidium iodide staining. Histogram is presented as the percentage of cells distributed at various stages of the cell cycle detected by flow cytometry±SD.

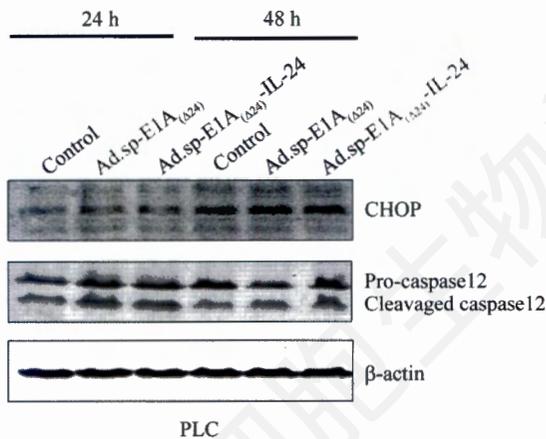


Fig.3 Effects of Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 on expression of CHOP and cleaved caspase 12

PLC cells were treated with PBS, Ad.sp-E1A_(Δ24) or Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 at 10 MOI, respectively. At indicated time points, total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods.

STAT3 的激活对凋亡有调节作用, STAT3 的激活能促进增殖抑制凋亡,但其持续的激活则可以诱发凋亡^[11]。通过 Western blot 分别检测病毒处理组与对照组 24 h、48 h 后 STAT3 的磷酸化水平,发现病毒处理组在 48 h 比 24 h 诱导 STAT3 磷酸化水平均有显著提高,两个处理组中, Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒处理组较 Ad.sp-E1A_(Δ24) 病毒处理组, STAT3 磷酸化水平有所提高,但不显著(图 4)。

socs3 是 JAK-STAT3 信号通路激活后的一个靶基因, SOCS3 的表达会反馈抑制 STAT3 的磷酸化^[12]。

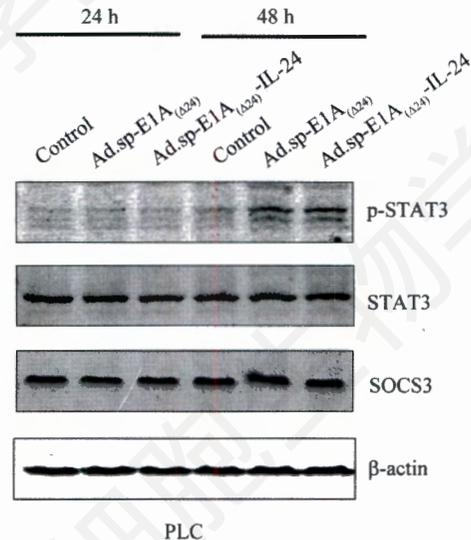


Fig.4 Effects of Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 on expression of p-STAT3 and SOCS3

PLC cells were treated with PBS, Ad.sp-E1A_(Δ24) or Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 at 10 MOI, respectively. At indicated time points, total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods.

Western blot 结果显示,处理组与对照组中 SOCS3 在 24 h、48 h 表达量都没有明显的变化(图 4),说明 STAT3 磷酸化后并未进一步激活 SOCS3 基因的表达,具体机制值得进一步深入研究。

2.4 Western blot 检测 p38 MAPK 磷酸化水平

p38 MAPK 主要被应激刺激和病理性损伤信号所激活,通常在细胞凋亡反应具有明显的介导作用^[13]。

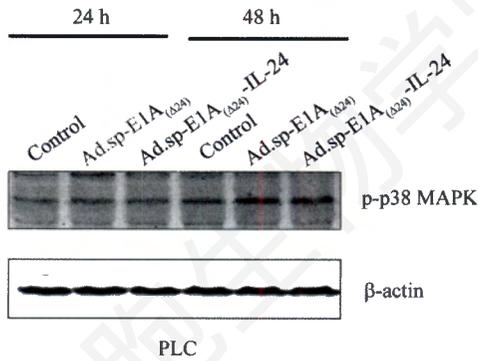


Fig.5 Effects of Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 on phosphorylation of p38 MAPK

PLC cells were treated with PBS, Ad.sp-E1A_(Δ24) or Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 at 10 MOI, respectively. At indicated time points, total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed as described in Materials and Methods.

Western blot 结果显示, 处理 24 h 时, 病毒处理组和对对照组 p38 MAPK 磷酸化水平没有显著差别, 但 48 h 时, 处理组 p38 MAPK 磷酸化水平较 24 h 有明显的提高, 对照组则变化不大(图 5)。表明重组腺病毒能引发 p38 MAPK 的磷酸化。

3 讨论

溶瘤腺病毒又称为肿瘤特异性增殖型病毒, 多用于肿瘤的治疗研究。该载体系统利用肿瘤与正常组织细胞的各种生理与功能差异, 在这个载体基础上再搭载有效的治疗基因, 就构建成我们平台的靶向基因-病毒。该靶向基因-病毒可以特异性地靶向肿瘤细胞, 并在细胞内复制、增殖, 大量表达目的基因并最终杀死肿瘤细胞^[14]。我们已通过体外实验证明 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 能诱导肿瘤细胞死亡, 表现出很强的肿瘤杀伤能力, 并具有靶向多种肿瘤类型的特点, 如鼻咽癌、肝癌、肺癌、宫颈癌等, Western blot 结果表明能很好的诱导 caspase 3 和 PARP 的剪切, 进而导致细胞发生凋亡^[8], 但对其肿瘤杀伤能力的具体机制不甚清楚, 尤其在诱导细胞死亡信号通路方面。

IL-24 为 IL-10 家族中的一种新的细胞因子。IL-24 在不同的肿瘤类型中有着不同的凋亡机制。IL-24 的凋亡介质包括 caspases、p53、BAX、BAK、TRAIL、Fas 和 DR4, 介导的凋亡的信号分子包括 PKR、p38 MAPK、PI3K、JNK、STAT3 和 GSK-3 等^[15,16]。以往研究表明该基因对正常表皮细胞、肺成纤维细胞、乳腺细胞、前列腺和肺上皮细胞等

正常细胞均无任何毒副作用, 却能高效地诱导很多不同类型的肿瘤细胞死亡, 提示其具备肿瘤特异选择性杀伤的特点^[17,18]。因此认为, IL-24 是一种具有杀死肿瘤细胞而对正常细胞无毒性作用的多功能细胞因子, 具有极大的临床抗肿瘤应用价值。

在已构建重组的溶瘤病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 的基础上, 我们主要研究了该病毒对肝癌 PLC 细胞周期的影响及其诱导相关信号进而诱发细胞凋亡的杀伤机制。流式结果显示, 经 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 感染 48 h 后, PLC 的细胞周期明显被阻滞在 S 期, 这一结果跟以往报道^[19,20]的 Ad.mda-7 能阻滞肿瘤细胞周期在 G₂/M 有所不同, 但值得注意的是, 以往携带 IL-24 基因的大多为非复制性腺病毒, 不是溶瘤复制型腺病毒, 故 Ad.mda-7 在周期阻滞中发挥主要作用的是 IL-24, 并且已有相关报道^[21]证明不携带杀伤基因的溶瘤腺病毒能将肿瘤细胞周期阻滞在 S 期, 我们的 Ad.sp-E1A_(Δ24) 病毒实验结果也与这一报道一致, 且相对于载体病毒, 携带 IL-24 基因后重组成的基因病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 能明显地增强这种阻滞, 与载体病毒相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒能提高 PLC 细胞中内质网应激诱导的细胞凋亡相关分子 CHOP 的表达量和 caspase 12 的剪切水平。CHOP 过量表达会导致细胞凋亡和细胞周期阻滞, caspase 12 的激活可以激活 caspase 9, 从而激活 caspase 3^[9,10,22], 最终诱发凋亡, 提示 PLC 细胞中可能发生了内质网应激诱导的细胞凋亡, 同时可以发现基因病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 对 caspase 12 的剪切水平比载体病毒要高, 这可能与携带的 IL-24 有关; 同时 48 h 时 PLC 细胞中 STAT3 的磷酸化水平也显著提高, 以前报道^[23,24]都认为 STAT3 的磷酸化是肿瘤增殖信号之一, 但现在相关报道^[11,25]显示 STAT3 的磷酸化也能促进肿瘤的凋亡, 关键在于 STAT3 磷酸化后所激活的下游靶基因。我们的结果显示 STAT3 磷酸化后的一个下游反馈调节基因 *socs3* 的表达量并没有上调, 已有文献证明^[25], 在 *socs3* 缺陷的鼠胚胎成纤维细胞中, STAT3 激活后的靶基因 *Bcl-2* 和 *cyclin D1* 的表达没有上调反而下调了, 出现了调节异常, 这可能也是 STAT3 持续激活导致其功能从抗凋亡向促凋亡转变的一个原因。我们的基因病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 促细胞死亡机制也可能与此通路相关; 最后我们检测了 MAPK 信号转导通路中一个重要信号分子 p38 MAPK 的磷酸化水平。p38 MAPK 主要介导细胞受应激刺激和病理性损伤信号

后的凋亡反应, 可以增强 c-myc、CHOP 表达, 使 p53 磷酸化, 参与 Fas/FasL 介导的凋亡, 诱导 Bax 转位等^[13, 26], 实验结果显示经我们的重组病毒 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 感染后, PLC 细胞中 p38 MAPK 的磷酸化水平在 48 h 显著提高, 这也说明 Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 对 PLC 杀伤机制与 p38 MAPK 的磷酸化水平正相关。综上所述, 相对于载体病毒, Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 病毒能显著阻滞 PLC 细胞周期在 S 期, 并可能通过上调 CHOP 表达量和 caspase 12 剪切水平引起的内质网压力、STAT3 与 MAPK 信号通路等多种途径诱发 PLC 凋亡。这为进一步研究其体内外抗肿瘤作用及其分子机制提供了重要的参考, 并奠定了良好的认识基础。

参考文献(References)

- Schutte K, Bornschein J, Malferteiner P. Hepatocellular carcinoma—epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27(2): 80-92.
- Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3(4): 353-67.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- Fisher PB. Is mda-7/IL-24 a “magic bullet” for cancer? *Cancer Res* 2005; 65(22): 10128-38.
- Fisher PB, Sarkar D, Lebedeva IV, Emdad L, Gupta P, Sauane M, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): novel gene therapeutic for metastatic melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224(3): 300-7.
- Emdad L, Lebedeva IV, Su ZZ, Gupta P, Sauane M, Dash R, *et al.* Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(5): 391-400.
- Liu XY, Gu JF. Targeting gene-virotherapy of cancer. *Cell Res* 2006; 16(8): 740.
- Zhang KJ, Wang YG, Cao X, Zhong SY, Wei RC, Wu YM, *et al.* Potent antitumor effect of interleukin-24 gene in the survivin promoter and retinoblastoma double-regulated oncolytic adenovirus. *Hum Gene Ther* 2009; 20(8): 818-30.
- Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem* 2005; 138(4): 501-7.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 186-94.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, *et al.* Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 1999; 13(19): 2604-16.
- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, *et al.* CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001; 193(4): 471-81.
- Loesch M, Chen G. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Front Biosci* 2008; 13: 3581-93.
- Alemanly R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000; 18(7): 723-7.
- Gopalkrishnan RV, Sauane M, Fisher PB. Cytokine and tumor cell apoptosis inducing activity of mda-7/IL-24. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(5): 635-47.
- Gupta P, Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, Sauane M, Emdad L, *et al.* mda-7/IL-24: multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine. *Pharmacol Ther* 2006; 111(3): 596-628.
- Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 1995; 11(12): 2477-86.
- Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ, Gupta P, *et al.* mda-7/IL-24: exploiting cancer's Achilles' heel. *Mol Ther* 2005; 11(1): 4-18.
- Wang C, Xue X, Yi J, Wu Z, Chen K, Zheng J, *et al.* Replication-incompetent adenovirus vector-mediated MDA-7/IL-24 selectively induces growth suppression and apoptosis of hepatoma cell Line SMMC-7721. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28(1): 80-3.
- Xue XB, Chen K, Wang CJ, Zheng JW, Yu Y, Peng ZH, *et al.* Adenovirus vector expressing mda-7 selectively kills hepatocellular carcinoma cell line Hep3B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7(5): 509-14.
- Ulasov IV, Tyler MA, Zhu ZB, Han Y, He TC, Lesniak MS. Oncolytic adenoviral vectors which employ the survivin promoter induce glioma oncolysis via a process of beclin-dependent autophagy. *Int J Oncol* 2009; 34(3): 729-42.
- Qu L, Liu Z, Zhang hM, Su Y, Ye X, Sall A. Endoplasmic reticulum stress-induced cell survival and apoptosis. *Chinese Clinical Medicine* 2009; 4.
- Sumita N, Bito T, Nakajima K, Nishigori C. Stat3 activation is required for cell proliferation and tumorigenesis but not for cell viability in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *Exp Dermatol* 2006; 15(4): 291-9.
- Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, *et al.* Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 1996; 5(5): 449-60.
- Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R, Kobayashi T, Saeki K, Shiraishi H, *et al.* Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem* 2006; 281(48): 36683-90.
- Chiu CC, Chen JY, Lin KL, Huang CJ, Lee JC, Chen BH, *et al.* p38 MAPK and NF-kappaB pathways are involved in naphtho [1,2-b] furan-4,5-dione induced anti-proliferation and apoptosis of human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2010; 295(1): 92-9.

Antitumor Mechanism of Survivin Mediated Conditionally Replicative Oncolytic Adenovirus Expressing IL-24 in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line PLC

Hai Jiang¹, Xin-Xin Ding², Hong Liu³, Hong-Xia Xie¹, Kang-Jian Zhang^{1*}

(¹Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ²Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ³Department of Pathology and Pathophysiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract Antitumor mechanism in human hepatocellular carcinoma cell line PLC induced by conditionally replicative oncolytic adenovirus (Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24) is not clear. PLC was treated with PBS, Ad.sp-E1A_(Δ24) or Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 for 48 h, respectively. The cell cycle was detected by flow cytometry (FCM). Western blot detected the changes of apoptosis-related protein expression. FCM confirmed that both Ad.sp-E1A_(Δ24) and Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 can block PLC cells in S phase, of which the percentages were 43.74%±6.61% and 49.48%±7.60% compared with 18.91%±1.83% of control ($P<0.05$). Western blot indicated both Ad.sp-E1A_(Δ24) and Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 can increase the expression of CHOP, cleaved caspase 12, p-STAT3 and p-p38 MAPK. Obviously, the virus Ad.sp-E1A_(Δ24)-IL-24 had the stronger ability of inducing the above proteins, but both of the viruses had no effect on inducing expression of SOCS3. In conclusion, the recombinant oncolytic adenovirus blocked PLC cells in S phase effectively, and induced apoptosis of PLC cells directly related to endoplasmic reticulum stress, STAT3 and MAPK pathways.

Key words oncolytic adenovirus; human hepatocellular carcinoma cell; IL-24 gene; cell apoptosis; targeting gene-viro-therapy

Received: May 27, 2010 Accepted: August 19, 2010

This work was supported by Zhejiang Sci-Tech University Grant(No.0916819-Y)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921139, Fax: 86-21-54921126, E-mail: zhang-kang-jian@126.com