基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1626-03

双融膜嗜肿瘤病毒对肺腺癌细胞的杀伤效果研究

江跃全,朱 冰,付新平
(重庆医科大学附属第二医院胸心外科 400010)

【摘 要】目的:构建双融膜嗜肿瘤病毒,并观察其杀伤肺癌细胞的效果。方法:将长臂猿白血病病毒融膜糖蛋白基因(Fusogenic glycoprotein gene of gibbon ape leukemia virus,GALV.fus)构建入嗜肿瘤Ⅰ型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus 1,HSV-1)中,使其成为具有双重融细胞膜作用的嗜肿瘤病毒(Doubly fusogenic oncolytic herpes simplex virus,Synco-2D)。与单一的重组嗜肿瘤病毒 HSV-1 比较,在显微镜下观察两种嗜肿瘤病毒融细胞现象,并观察其体外杀伤肺腺癌细胞 A549 的效率及体内对肿瘤生长的抑制作用。结果:显微镜下发现,双融膜病毒融细胞作用更明显,大量多核巨细胞形成,细胞结构模糊,细胞溶解。体外实验显示,两种病毒都有明显的杀死肿瘤细胞效果,双融膜嗜肿瘤病毒杀伤肿瘤细胞率较单一的 HSV-1 明显增强。体内动物实验显示双融膜嗜肿瘤病毒对肿瘤组织的生长有显著的抑制作用。结论:将融膜糖蛋白基因 GALV.fus 构建入嗜肿瘤Ⅰ型单纯疱疹病毒中,可以显著增强病毒杀伤肺腺癌细胞效力。

【关键词】肺腺癌细胞;病毒融膜糖蛋白;嗜肿瘤病毒
【中国图书分类法分类号】R73-36 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-04

Evaluation of the antitumor activity of double fusogenic virus against A549 pulmonary adenocarcinoma

JIANG Yue-quan, et al
(*Department of Cardiothoracic sugery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct double fusogenic oncolytic virus and evaluate its antitumor activity against A549. *Methods*: The double fusogenic oncolytic virus was incorporated with both fusion mechanisms into a single oncolytic HSV throug insertion of the hyperfusogenic glycoprotein gene of gibbon ape leukemia virus (GALV.fus) into HSV-1. Syncytial phenotype was observed with microscope. Double fusogenic virus antitumor activity against A549, compared with simple oncolytic HSV, was evaluated in vitro and vivo. *Results*: The A549 cell infected with the two kind of oncolytic virus showed syncytial phenotype respectively. A distinctive syncytial phenotype was observed with the double fusogenic oncolytic HSV (Synco-2D) under microscope. In vitro characterization of Synco-2D showed that this virus produced a distinctive antitumor ability, compared with that of a nonfusogenic virus. When oncolytic virus was injected directly into the abdominal cavity of mice bearing A549 cells, Synco-2D eradicated tumor masses significantly as compared with single oncolytic HSV. *Conclusion*: A double fusogenic oncolytic HSV can significantly increase killing ability against lung adenoca rcinoma cell A549.

【Key words】Lung adenocarcinoma; Fusogenic glycoprotein; Oncolytic virus

目前对肺癌的治疗仍没有一种有效的方法。手术是局部治疗,只适合早期未转移的肺癌,而 80% 肺癌患者就诊时已不能手术切除。放疗和化疗效果很差,对大部分患者可能根本就没有效果。目前研究较多的基因治疗,并不能通过基因转染所有的肿瘤细胞,使其效果受到限制。有研究发现,某些嗜肿瘤病毒又称溶瘤病毒(Oncolytic virus)仅能在肿瘤细胞内复制。如Ⅰ型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus type 1, HSV-1),能在肝癌等肿瘤细胞内复制,使细胞溶解坏死。释放的病毒颗粒可以扩散到其他肿瘤细胞,达到不断杀死肿瘤细胞的效果[1]。另有研究发现某些病毒溶解细胞是通过释放融细胞膜糖蛋白,使细胞融合成多核巨细胞,最后导致溶解坏死[2]。但是这些嗜肿瘤病毒及融膜糖蛋白对肺癌细胞的作用则未见报道。如果将有超强融膜效力的糖蛋白基因构建到嗜肿瘤病毒中,使其具有双融膜效果,有可能极大的提高特异杀伤肿瘤细胞的效果。

作者介绍:江跃全(1964-),男,副教授,博士,
研究方向:肿瘤基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30471984);重庆市卫生局科研项目(编号:07-2-116)。

本课题构建了具有双融膜作用的嗜肿瘤病毒,并对其在体内外杀伤肺癌细胞的效果进行了研究。

1 材料及方法

1.1 细胞、病毒及主要试剂

非洲绿猴肾细胞(Vero)、肺腺癌细胞(A549)均购自中科院上海细胞所。细胞在 DMEM 培养基(含 10 %胎牛血清 FBS 及青、链霉素各 100 μg/ml)、37℃、5%CO_2 条件下置于恒温箱中培养。真核细胞转染试剂 Lipofectamine2000 由美国 Invitrogen 提供。G207 疱疹病毒、fHSV-delta-pacDNA 质粒、长臂猿白血病病毒融膜糖蛋白基因(Gibbon ape leukemia virus envelope glycoprotein gene,GALV.fus)由美国 Baylor 医学院细胞基因治疗中心提供。

1.2 小鼠

SPF 级 BALB/c 雄性裸小鼠,4 ~ 6 周龄,体重 18 ~ 20 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,饲养于重庆医科大学实验动物中心。

1.3 嗜肿瘤疱疹病毒(Fu-10)选取及双融膜嗜肿瘤病毒(Synco-2D)的构建

1.3.1 嗜肿瘤疱疹病毒 Fu-10 选取 按照美国 Baylor 医学院细胞基因治疗中心的方法[3],用 G207 疱疹病毒感染 Vero 细胞,选择引起细胞融合、多核合胞体形成的病毒,分离纯化,反复感染新鲜的 Vero 细胞 5 次,选择能持续形成细胞融合、溶解细胞的一种病毒,即命名为 Fu-10。病毒保存在 -80℃ PBS 液中。

1.3.2 双融膜嗜肿瘤病毒 Synco-2D 构建 嗜肿瘤 HSV-I DNA 质粒载体选用 fHSV-delta-pac DNA 质粒。fHSV-delta-pac 以人工细菌染色体(BAC)构架,含有基因改造的 HSV-I DNA 序列,去掉了神经毒性因子 γ34.5 基因和病毒包装信号(pac)序列。通过插入含 HSV 包装信号的 DNA 序列和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因片段至位于 fHSV-pac 的 BAC 序列的 *Pac* Ⅰ限制酶位点,构建携带嗜肿瘤 HSV-I DNA 基因的病毒质粒,命名为 Baco-1。Baco-1 经 Lipofectamine 脂质体转染技术转染入 Vero 细胞,1 h 后生长出病毒,病毒经反复纯化后,筛选出闭合环状病毒 DNA,命名为 Baco-F_1。通过电穿孔技术将病毒 DNA 转入 Escherichia coli cell DH-10B 内,用 Qiagen 试剂盒纯化提取病毒 DNA。通过强制连接技术,在病毒启动子 UL38P 作用下,将 GALV.fus 取代基因复合体内的 EGFP。采用 Lipofectamine 脂质体转染技术将基因转染入 Vero 细胞内,采用 10%牛血清 DMEM 培养 3 d,然后按收获病毒技术要求收获病毒颗粒,经纯化后得到具有双重融膜作用的携带 GALV.fus 基因Ⅰ型嗜肿瘤单纯疱疹病毒,命名为 Synco-2D。用 0.01 pfu/细胞的 Synco-2D 感染 Vero 细胞,感染后 3 ~ 5 d,在显微镜下挑选具有多细胞融合能力的病毒斑。经反复筛选,纯化后,加肝素 50 μg/ml 于介质中,细胞培养 3 h,让病毒释放于介质中。收集介质,低速离心 1 000 g 10 min。取上清液高速离心 29 000 g 4 h,病毒沉淀物采用 PBS 液稀释,储存于 -80℃冰箱备用。

1.4 Fu-10 及 Synco-2D 溶细胞效果检测

1.4.1 Fu-10 及 Synco-2D 定型试验 通过 Fu-10 及 Synco-2D 在 A549 细胞的直接感染,证明 2 种病毒的细胞融合机制及杀死肺腺癌细胞的能力。在 6 孔培养板内,分别采用 0.01 pfu/ 细胞 Synco-2D 和 Fu-10 感染 A549 细胞,未感染细胞作为对照。感染后,采用 1%牛血清 DMEM 维持 1 ~ 3 d。通过显微镜观察各组肺癌细胞的融合及破坏情况。

1.4.2 Fu-10 及 Synco-2D 体外杀肿瘤细胞试验 在 48 孔培养板内,采用 0.01 pfu 和 0.1 pfu/ 细胞的 2 种不同病毒感染 A549 细胞,并用未感染细胞作为对照。转染后,细胞采用 1%牛血清 DMEM 维持。在 48 h 后收集细胞。用 Trypan blue 染色后,通过计数板在显微镜下计数存活的细胞数,确定和比较 2 种病毒杀伤肿瘤细胞的效率。

1.4.3 Fu-10 及 Synco-2D 体内肿瘤杀伤实验 建立皮下肺癌动物模型:取对数生长期的 A549 细胞,PBS 清洗后制成 1×10^{10} 个/L 细胞悬液,在 4 ~ 6 周大小的裸鼠右侧背部皮下,分别注射 2×10^5A549 肿瘤细胞,待肿瘤生长两周后,直径约至 5 ~ 8 mm 时,随机分 3 组:Fu-10、Synco2D、PBS 组。每组 10 只动物。

病毒性载体杀动物肿瘤实验:随机分组后,肿瘤内注射 50 μl PBS(空白对照)、Fu-10、Synco2D 分别 50 μl,含 2×10^6 pfu。注射从两个不同方向进入,防止外漏。

肿瘤治疗疗效评价:载体注射后,每 3 d 记录肿瘤的大小,测定两呈直角方向的直径,计算肿瘤体积。连续观察 3 周,根据肿瘤的消长来评价各种载体治疗肿瘤的效果。肿瘤体积(mm^3) = [长(mm)] × 宽 (mm)^2 × 0.52。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2 结 果

2.1 Fu-10 及 Synco-2D 的融细胞观察

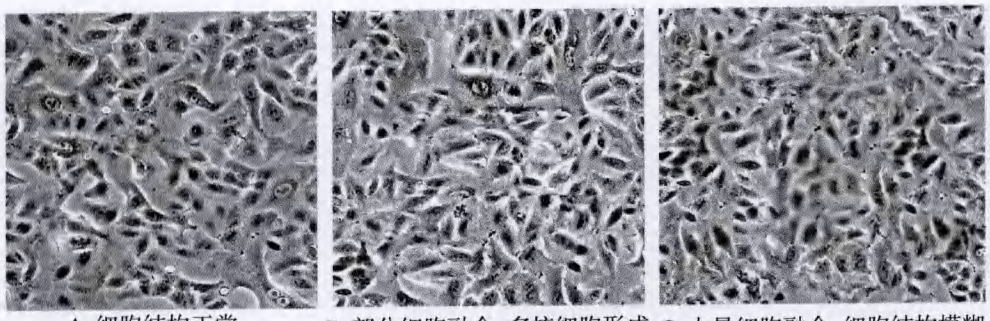
图 1 中为不同病毒融细胞图(放大倍数:倒置显微镜 × 100)。图 1A 为未感染的肿瘤细胞,图 1B 为单纯的嗜肿瘤病毒 Fu-10 感染肿瘤细胞,可见有部分细胞融合,形成多核巨细胞,许多细胞结构模糊不清。图 1C 为感染双融膜嗜肿瘤病毒 Synco-2D 的肿瘤细胞,可见大量的肿瘤细胞融合、细胞溶解、结构模糊。

2.2 Fu-10、Synco-2D 的杀死细胞效率比较

图 2 可见,Fu-10、Synco-2D 均有很强的杀肿瘤细胞效果,且随浓度的增加其杀伤效果增强。而 Synco-2D 引起的肿瘤细胞死亡率均明显高于 Fu-10,且 Synco-2D 在 0.01 pfu/ 细胞低浓度时,其杀肿瘤效率也高于 Fu-10 在 0.1 pfu/ 细胞高浓度时。

2.3 Fu-10、Synco-2D 体内抗肿瘤效果比较

图 3 显示 2 种病毒体内抗肿瘤效果,与对照组比较,Fu-10、Synco-2D 均有明显的抗肿瘤生长作用。而 Synco-2D 抗肿瘤生长效果较 Fu-10 更显著,随观察时间延长,差别越明显。在注射病毒 18 d,Synco-2D 组平均瘤组织体积为 (363 ± 89) mm^3,Fu-10 组平均瘤组织体积为 (508 ± 121) mm^3,两者比较有显著性差异(P<0.01)。



A. 细胞结构正常　B. 部分细胞融合，多核细胞形成　C. 大量细胞融合，细胞结构模糊

图 1　不同组病毒融细胞图（倒置显微镜×100）

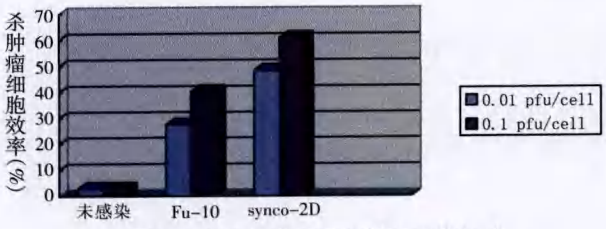


图 2　体外杀肿瘤细胞效率比较（%）

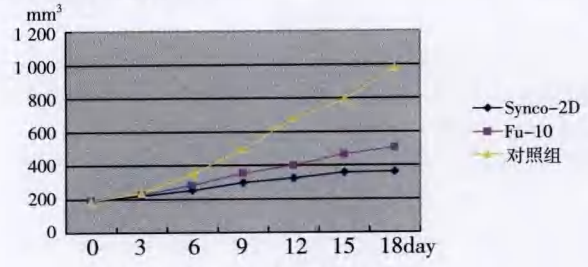


图 3　各组病毒肿瘤生长曲线对比

3　讨　论

嗜肿瘤病毒又称溶瘤病毒，是当前肿瘤治疗的研究热点，是一种更广泛意义上的肿瘤基因治疗技术。与通常意义上的基因治疗不同，嗜肿瘤病毒不依赖于某一个单一的治疗基因，它依靠病毒本身特异性在肿瘤细胞内复制增殖，并造成细胞膜融合，多核巨细胞形成，细胞裂解而杀死肿瘤细胞，裂解细胞后释放出来的病毒又可以进一步感染周围的肿瘤细胞，从而起到级联放大作用[1]。

嗜肿瘤单纯疱疹病毒是目前研究得最多、抗肿瘤作用最好、病毒免疫源性最低的溶瘤病毒。嗜肿瘤单纯疱疹病毒对肝癌细胞、神经源性肿瘤细胞及乳腺癌细胞等的杀伤效果已经在多个实验中被证实，但其对肺癌细胞的作用则鲜有报道。目前在实验中使用较多的重组 HSV-1 有 G207、1716、NV1020 等，它们都去除了 γ34.5 基因。在正常细胞内，与病毒感染相关的蛋白激酶 R（Protein kinase R，PKR）磷酸化被抑制，但是 γ34.5 基因产物能对抗此作用。在正常细胞中，缺少 γ34.5 基因的 HSV-1 不能阻止磷酸化 PKR 的抑制，故无法复制。而在肿瘤细胞中磷酸化 PKR 含量低，因而能进行复制[4]。本研究采用的 G207 对多种实体恶性肿瘤有杀伤作用[5]。通过 G207 传代得到的 Fu-10，与前者比较有更强的杀伤肺腺癌细胞的作用[3]。本研究也证实了 Fu-10 有杀伤肿瘤细胞的效果。

为了增强溶瘤病毒的杀伤效力，我们对 HSV-1 进行重组，成功地加入了一种融膜糖蛋白基因，即长臂猿白血病病毒糖蛋白基因（GALV.fus）。GALV 本身即有超强的溶细胞作用，可直接作用于多种细胞，形成多核巨细胞，最后导致细胞溶解破坏[6,7]。重组的溶瘤病毒 Synco-2D 具有双重的融细胞膜、破坏肿瘤细胞的作用。将 GALV.fus 重组入 HSV-1 后，借助 HSV-1 嗜肿瘤病毒仅在肿瘤细胞内复制的特性，即避免了 GALV 对正常细胞的毒性，又能增强 HSV-1 的抗肿瘤效果。本研究通过体内外不同实验，证实这种双融膜作用的病毒杀伤肿瘤细胞效果明显强于单一的嗜肿瘤病毒。体外杀伤实验显示，将 Synco-2D 稀释 10 倍，其效果仍强于高浓度的 Fu-10，体内实验也证明，双融膜嗜肿瘤病毒对肿瘤生长的抑制明显强于未加入融膜糖蛋白基因的单一嗜肿瘤病毒。

嗜肿瘤病毒 HSV-1 能通过融合肿瘤细胞，使细胞裂解而达到杀死肿瘤细胞的效果。本实验构建的双融膜嗜肿瘤病毒，通过体内外试验发现与单一的嗜肿瘤病毒相比较，其抗肿瘤效力显著增强，能明显抑制肺腺癌的生长。因此这种双融膜嗜肿瘤病毒很可能成为一种临床有效的治疗肿瘤方法。

参　考　文　献

[1] Samir T, Jennifer M, Steven M, et al. Enhanced antitumor efficacy of a herpes simplex virus mutant isolated by genetic selection in cancer cells[J]. PNAS USA, 2001,98(15):8804－8808.

[2] Manservigi R, Spear P, Buchan A, et al. Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins[J]. PNAS USA, 1977,74(9):3913-3917.

[3] Xinping F, Xiaoliu Z. Potent Systemic Antitumor Activity from an Oncolytic Herpes Simplex Virus of Syncytial Phenotype[J]. Cancer Research, 2002,62(15):2306-2312.

[4] Mineta T, Rabkin S D, Yazaki T, et al. Attenuated multimutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas[J]. Nat Med, 1995,1(9):938-943.

[5] Todo T, Martuza R L, Rabkin S D, et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98(11):6396-6401.

[6] Galanis E, Rosa M, James C, et al. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas[J]. Human Gene Therapy, 2001,12(7):811-821.

[7] Hajime H, Steven F, Andrew B, et al. Viral Fusogenic Membrane Glycoprotein Expression Causes Syncytia Formation with Bioenergetic Cell Death: Implications for 9Gene Therapy[J]. Cancer Research, 2000,60(15):6396-6402.

（责任编辑：关蕴良）