

静脉输注新型溶瘤腺病毒在体内复制活性与抑瘤的关系*

周晓曦 李钦璐 黄 闪 姜利军 周剑峰 曹 阳[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 血液内科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:观察新型溶瘤腺病毒 M1 在体内代谢的时间及对肿瘤生长的抑制作用。方法:建立人胃癌裸鼠原位移植瘤动物模型,在指定时间点处死动物,观察瘤体大小,分离原发瘤及转移瘤进行病毒滴度测定,采用免疫组化及原位杂交来检测病毒的分布和活性复制。结果:在人胃癌裸鼠原位模型上,M1 经静脉输注后不仅分布于胃原发瘤,而且存在于转移灶,但用 M1 静脉内给药可以减缓肿瘤生长速度。结论:静脉内输注溶瘤腺病毒可以选择性的作用于肿瘤及转移灶,并发挥溶瘤和靶向灭活 plk1 的双重效应。

关键词 溶瘤腺病毒;静脉输注;分布

中图分类号:R373 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)19-3624-04

The Relationship of Replication and Inhibiting Tumor of New Oncolytic Adenovirus by Intravenous Infusion in Vivo*

ZHOU Xiao-xi, LI Qin-lu, HUANG Shan, JIANG Li-jun, ZHOU Jian-feng, CAO Yang[△]

(Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the metabolism time of new oncolytic adenovirus M1 distributing in body and effects of inhibiting tumor. **Methods:** The stomach transplanting tumour changes the model of nude mouse was constructed, The mouse was killed in time, and the size of tumor was detected. Virus titer of primary tumor and metastasis and distribution of virus were assayed with immunohistochemistry and In situ hybridization. **Results:** In human cancer of the stomach transplanting tumour changes the model of nude mouse, M1 distributes over primary tumor and metastasis by intravenous infusion, but M1 can inhibit growth of tumor by intravenous infusion. **Conclusion:** Oncolytic adenovirus can distribute over tumor and metastasis, kill the tumor and plk1.

Key words: Oncolytic adenovirus; Intravenous infusion; Distribution

Chinese Library Classification(CLC): R373 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)19-3624-04

引言

溶瘤腺病毒利用肿瘤细胞中的抑癌基因的缺陷或失活,选择性地使肿瘤细胞内复制从而达到溶解肿瘤细胞的作用,而在正常细胞中仅有少量存在,因此成为肿瘤治疗的一个具有前景的策略^[1,2]。尽管许多腺病毒载体已进入临床前期试验,其安全性也得到了验证,但在临床应用中采取瘤体内直接注射的给药方式,这种方式限制了溶瘤腺病毒的应用^[3-6],使其在体内无法完全发挥效应,而治疗性腺病毒制剂的全身给药目前还未被广泛接受,主要由于这种给药方式溶瘤腺病毒能否到达瘤体的原发及播散的各处转移灶,并在肿瘤内有效的复制再感染尚未定论。本研究采取原位组织学的方法,检测经静脉首次给药后各时间点的病毒水平,对溶瘤腺病毒的复制效应做出评价,从而为溶瘤腺病毒的给药途径提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 腺病毒 腺病毒 M1 由本实验室构建保存^[7],是将 5 型腺病毒 E1A 区 pRb 的结合位点 121-129 位的氨基酸突变,构建了 Adv5/dE1A;再将其 E36.7K/gp19K 区用反义的 plk1 cDNA 置换,构建了溶瘤腺病毒 M1。复制缺陷型腺病毒 Adv-TK 亦由本实验室构建保存,是将 5 型腺病毒 E1A 区突变缺失后,再将人单纯疱疹病毒-胸腺嘧啶激酶 (HSV-TK) 插入 E1 区 RSV-LTR 启动子下游,本实验中作为阴性对照。

1.1.2 细胞系和主要试剂 人胃癌细胞株 MKN-45 为上海肿瘤研究所李锦新教授惠赠,人胚肾细胞 293 由 ATCC 引进。抗腺病毒鼠单克隆抗体购自 Chemicon 公司,SP 试剂盒、显色剂 DAB 为中杉金桥公司产品,原位杂交试剂盒为罗氏公司产品。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒的扩增及保存 腺病毒感染 293 细胞,大量扩增,48h 收获细胞,液氮-37 度反复冻融三次,离心留取上清进行氯化铯梯度超速离心提纯病毒,纯化后的病毒用含 10%甘油的 PBS 保存于-80℃冰箱。

1.2.2 动物模型的建立及病毒制剂的使用 取人胃癌模型鼠颈

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金(81001049)

作者简介:周晓曦(1984-),博士研究生,主要研究方向:腺病毒基因治疗,Tel:027-83663134,E-mail: xello316@hotmail.com

[△]通讯作者:曹阳,E-mail: caoyangemma@163.com

(收稿日期:2011-11-20 接受日期:2011-12-15)

椎脱臼致死, 无菌分离胃壁瘤体, 在 Hank's 液中剪成直径 1-2 mm 的小块, 将裸鼠麻醉, 开腹, 小心暴露胃壁, 用剪刀划伤浆膜层, 将小块瘤组织缝在划伤处, 关腹。在建模后 14 天, 分为 2 组, 每组 8 只, 分别尾静脉注射 M1 (1×10^{10} pfu/kg) 或 Adv-TK (1×10^{10} pfu/kg)。处理后分别于 3 天, 一周, 2 周, 四周, 六周处死老鼠, 测量肿瘤大小。

1.2.3 病毒定量测定 在注射腺病毒后的各时间点(30min、3 天、1 周、2 周、4 周、6 周)处死模型鼠, 分离胃体原发瘤, 肝脏, 转移灶, 于液氮(-196°C)和水浴(37°C)中反复冻融 3 次, $3000 \text{ rpm} \times 10 \text{ min}$ 离心取上清。同时心内穿刺取血, 室温静置 10 min, $3000 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$ 离心, 取上清采用 TCID₅₀ 法, 倍比稀释感染 293 细胞测量病毒滴度。

1.2.4 免疫组化法检测腺病毒 烤片后二甲苯脱蜡, 再依次经过无水乙醇-95%乙醇-80%乙醇-75%乙醇至水, 3%过氧化氢常温孵育 15 分钟, 柠檬酸抗原修复后常温羊血清封闭, 抗腺病毒鼠单克隆抗体(1:200)4 度孵育过夜, PBS 洗片三次后孵育羊抗鼠二抗, PBS 洗片三次再孵育卵白素, PBS 洗片三次后 DAB 显色, 苏木素复染, 再经盐酸氨水返蓝后梯度乙醇脱水至二甲苯, 晾干封片。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.5 原位杂交法检测病毒的活性复制 所用探针与腺病毒的相应区域(包膜蛋白的纤毛区)的编码序列互补, 序列为 5'-GGAAGCTGGCCTTAGTTTGTACAGCACAGGTGCCATTACAG-3', 5' 端标记地高辛, 由上海英骏生物有限公司合成。切片经蛋白酶 K 消化 10 min ($2.5 \mu\text{g/ml}$, 37°C), 37°C 预杂交 30 min, 然后每片滴加杂交液 $25 \mu\text{L}$ (含 $1 \mu\text{g/ml}$ 地高辛探针), 盖上硅化盖玻片, 变性(100°C , 10 min), 42°C 杂交 16 h。递减 SSC 漂洗切片。碱性磷酸酶偶联抗地高辛抗体(稀释度为 1:1000) 4°C 孵育过夜, BCIP/NBT 显色, 核固红复染。杂交信号呈紫蓝色颗粒。

1.3 统计学处理

本实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS11.5 软件 ANOVA 检验数据间的差异显著性, 各组间的差异比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著性。

2 结果

2.1 静脉输注 M1 后原发瘤和转移瘤中病毒感染的观察

在肿瘤种植后 4 周, 处死模型鼠, 摘取胃壁原发瘤进行免疫组化分析, 以 Adv-TK 作为复制缺陷型腺病毒的对照。与 Adv-TK 处理组相比, M1 处理组肿瘤的原发灶可见更多的病毒颗粒, 由局部播散至整张切片, 这证实静脉内输注腺病毒能够有效感染体内肿瘤灶。

2.2 静脉输注 M1 后原发瘤和转移瘤病毒复制活性的观察

本研究采用原位杂交检测腺病毒纤毛蛋白基因的转录作为病毒活性复制标志。在 M1 处理组的原发瘤, 肝转移灶和淋巴结转移灶上出现明显的阳性信号, 在周围相对正常组织上信号明显减弱, 而 Adv-TK 处理组则几乎观察不到活性病毒复制。

2.3 静脉输注 M1 后不同时间点病毒水平的检测

为了比较静脉输注腺病毒后的动力学分布, 分别在病毒输注后的不同时间点处死模型鼠, 收取血清, 原发瘤和转移瘤

(肝、腹腔), 采用 TCID₅₀ 法检测 M1 和 Adv-TK 的水平。发现病毒很快从循环中清除, 输注 3 天后血清中就检测不到腺病毒。在肿瘤病灶(包括原发瘤和转移瘤), 均在病毒输注后 30 分钟即可在瘤体中检测到病毒, 其滴度波动在 10^4 到 10^6 pfu/g 之间, 这一点 M1 与复制缺陷型的对照 Adv-TK 表现基本一致。但 M1 处理组, 原发瘤和转移瘤的病毒滴度缓慢下降 2 周后又出现回升, 平均滴度达到 10^3 pfu/g, 而 Adv-TK 处理组, 其病毒滴度逐渐下降, 6 周后几乎检测不到。这一结果再度证实, 静脉内输注 M1 能够感染原发肿瘤和远隔的转移肿瘤, 而且 M1 在体内也表现出优先在肿瘤灶复制的选择性特点。

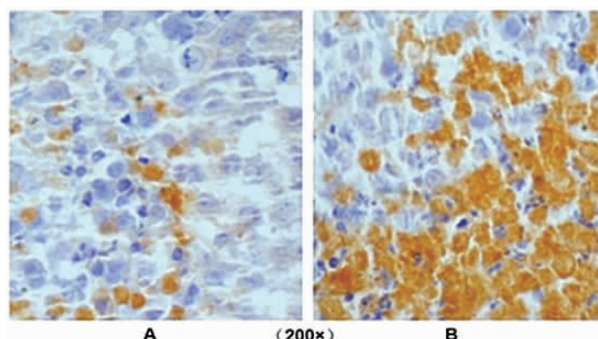


图 1 A 为 Adv-TK 处理组胃原发瘤切片组化结果, B 为 M1 处理组胃原发瘤切片的组化结果

Fig. 1 A, immunohistochemistry results of primary tumor of stomach treated by Adv-TK; B, immunohistochemistry results of primary tumor of stomach treated by M1

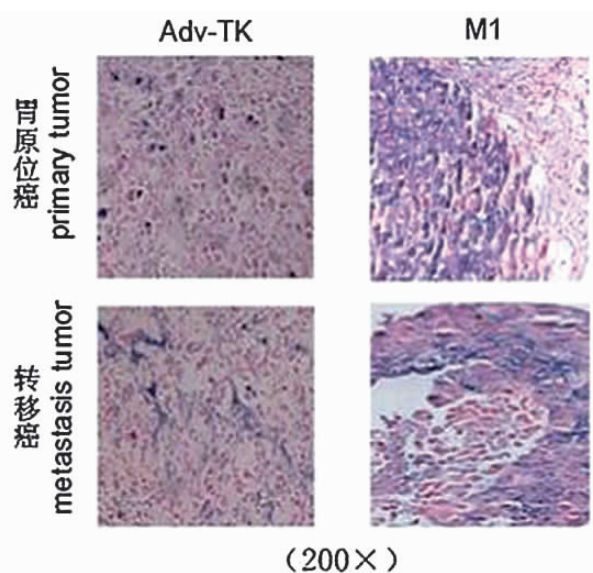


图 2 通过原位杂交手段分别检测经 Adv-TK 和 M1 处理的原位瘤及转移灶中病毒复制活性

Fig. 2 Virus replication of primary tumor and metastasis treated by Adv-TK and M1 with In situ hybridization

2.4 腺病毒 M1 能够延缓肿瘤生长

在肿瘤原位种植后 2 周静脉输注 M1 (此时肿瘤直径约 5 mm)。六周时处死老鼠, 经过测量原位肿瘤大小, 可见 M1 处理组瘤体大小明显比 Adv-TK 处理组小。

3 讨论

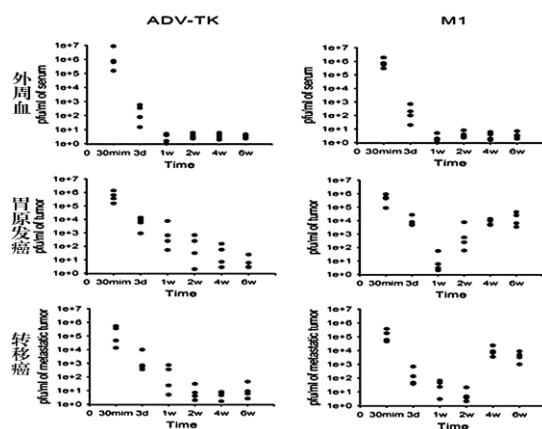


图3 采用 TCID50 法分别检测不同时间点,外周血、胃原发瘤及转移瘤中 M1 和 Adv-TK 的水平

Fig. 3 The expression level of M1 and Adv-TK in peripheral blood, primary tumor of stomach and metastasis assayed by TCID50 in different time

腺病毒(ADV)基因治疗应用于临床肿瘤实践已有十多年历史,例如重组人 P53-ADV 注射液和溶瘤病毒药物重组人

ADV5 注射液(H101)已通过中国国家食品药品监督管理局(SFDA)批准,成为世界上首先获准上市的基因治疗新药,FDA 也已批准 ADV 治疗淋巴瘤残留/转移病变进入三期临床研究^[8]。可见腺病毒在肿瘤治疗中的运用是有广阔前景的。

本文所用的腺病毒 ADV-TK 由于缺失了复制增殖所必须的基因,所以不能在除包装细胞外的细胞中复制。而 M1 是由本实验室对人体普通感冒腺病毒重新加以改造,设计出的新型杂交病毒,较 ADV-TK 具有以下特点:(1)野生型腺病毒感染细胞时,通过 E1A CR2 结构域与细胞中的 Rb 蛋白结合,使得原本与 Rb 蛋白结合的 E2F 游离,促使细胞由 G1 期进入 S 期,从而使静止期细胞进入细胞周期以利于病毒 DNA 复制。而腺病毒 M1 正是缺失了 CR2 结构域,使得腺病毒只能在 Rb 信号通路异常的肿瘤细胞中增殖^[9]。正因如此在肿瘤治疗中,由于 M1 的生存和生产以肿瘤细胞为宿主,故其治疗剂量不依赖初始给药的剂量,M1 在肿瘤内可形成持续性感染直至肿瘤细胞被杀灭。(2)M1 中用反义 plk1 代替 E36.7K/gp19K 区,一方面降低了病毒的免疫原性同时使外源性目的基因选择性地肿瘤细胞中高效复制,沉默肿瘤细胞中过量表达的 plk1,使其分裂停滞甚至凋亡^[10]。

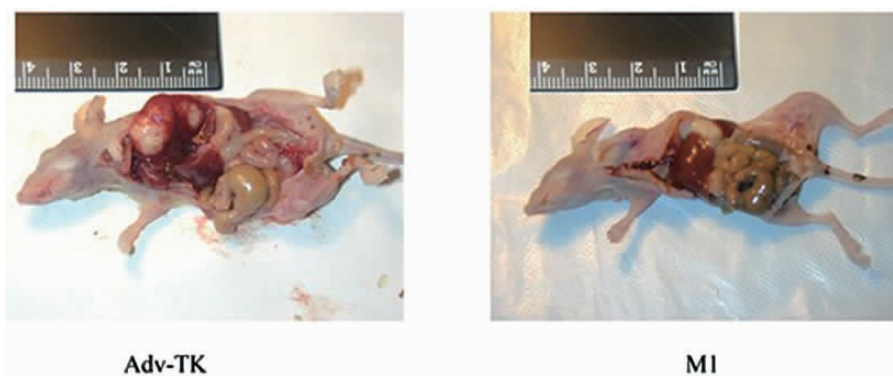


图4 六周时 Adv-TK 及 M1 处理组胃部原位肿瘤大小比较

Fig. 4 In six weeks, the size of primary tumor of stomach treated by Adv-TK and M1

静脉内输注 M1 能够感染原发肿瘤和远隔的转移肿瘤,而且 M1 在体内也表现出优先在肿瘤灶复制的选择性特点。转移的发生代表着肿瘤发展到了终末期,前期研究结果证实,溶瘤腺病毒 M1 与顺铂联用可以有效控制原位肝癌模型鼠的原发瘤和转移瘤生长。但考虑腺病毒具嗜肝性,由静脉进入体内后多积聚在肝脏,本文我们采用一个新的人胃癌原位裸鼠模型,来精准评价 M1 静脉内输注后的抗转移效应。与以前的研究模型相比,人胃癌原位裸鼠移植模型肿瘤生长迅速,高度侵袭,100%发生转移,这些特性为本研究提供了一个良好的肿瘤转移模型^[11-13]。

虽然肿瘤在经过 M1 处理后生长减缓但仍然很难达到根治的目标,分析原因,病毒基因治疗的效果取决于机体与病毒参数间的平衡,包括初始荷瘤体积,病毒的复制能力和机体抗病毒免疫反应^[14]。因此,一旦发现肿瘤或手术切除后尽早使用是提高病毒效果的一个可行方案,同时还应采取与传统肿瘤治疗方法(放化疗等)联用等手段,帮助病毒克服结构屏障,在肿

瘤组织内扩散,如我们前期研究证实,M1 与顺铂联用可降低顺铂耐药肿瘤的转移发生率^[15-17]。其主要协同机制尚不清楚,可能涉及到病毒基因与活化的宿主细胞因子间的相互作用增强病毒对肿瘤细胞的杀伤效应^[18-19]。

本研究证明,静脉内输注溶瘤腺病毒可以选择性的作用于肿瘤及转移灶。这为今后腺病毒在肿瘤中的应用提供了新的方式。

参考文献(References)

- [1] Kirn D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer[J]. Oncogene, 2000, 19: 6660-6669
- [2] Curiel DT. The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy[J]. Clin. Cancer Res, 2000, 6: 3395-3399
- [3] Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies-the clinical experience [J]. Oncogene, 2005, 24: 7802-7816
- [4] Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, et al. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase viral, immunologic, and clinical endpoints[J]. Cancer Res, 2002, 62: 6070-6079

- [5] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. phase trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer [J]. *J.Clin.Oncol*, 2001,19:289-298
- [6] Sauthoff H, Hu J, Maca C, et al. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points [J]. *Hum. Gene Ther*, 2003,14:425-433
- [7] Zhou J, Gao Q, Chen G, et al. Novel oncolytic adenovirus selectively targets tumor-associated polo-like kinase 1 and tumor cell viability[J]. *Clin.Cancer Res*, 2005,11(23):8431-8440
- [8] Post LE. Selectively replicating adenoviruses for cancer therapy: an update on clinical development [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002,3(12):1768-1772
- [9] Hou JG, Ding Q. Oncolytic Adenovirus and Cancer Therapy [J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2009,4(1):35-39,64
- [10] Lens SM, Voest EE, Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(12):825-841
- [11] Tsai V, Johnson DE, Rahman A, et al. Impact of human neutralizing antibodies on antitumor efficacy of an oncolytic adenovirus in a murine model[J]. *Clin.Cancer Res*, 2004,10:7199-7206
- [12] Andarini S, Kikuchi T, Nuliwa M, et al. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts [J]. *Cancer Res*, 2004,64:3281-3287
- [13] Ryan PC, Jakubczak JL, Stewart DA, et al. Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004,11:555-569
- [14] Wodarz D. Viruses as antitumor weapons: defining conditions for tumor remission[J]. *Cancer Res*, 2001,61:3501-3507
- [15] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000,60:1193-1196
- [16] Ganly I, Kim YT, Hann B, et al. Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumor cells is associated with reduced apoptosis[J]. *Gene Ther*, 2001,8:369-375
- [17] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumor ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat.Med*, 2000,6:879-885

(上接第 3634 页)

- [11] Stoep N, Quinten E, Elsen PJ. Transcriptional Regulation of the MHC Class II Trans-Activator (CIITA) Promoter III: Identification of a Novel Regulatory Region in the 5'-Untranslated Region and an Important Role for cAMP-Responsive Element Binding Protein 1 and Activating Transcription Factor-1 in CIITA-Promoter III Transcriptional Activation in B Lymphocytes [J]. *The Journal of Immunology*, 2002,169:5061-5071
- [12] Zhou H, Su HS, Zhang X, et al. C/EBP β -dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant [J]. *J Immunol*, 1997,158(10):4741-4749
- [13] O'Keefe GM, Nguyen VT, Tang LP, et al. IFN- γ Regulation of Class II Transactivator Promoter IV in Macrophages and Microglia: Involvement of the Suppressors of Cytokine Signaling-1 Protein [J]. *The Journal of Immunology*, 2001,166:2260-2269
- [14] Hake SB, Tobin HM, Steimle V, et al. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes [J]. *Eur J Immunol*, 2003,33(9):2361-2371
- [15] Zhou CH, Lu DR, Zhu QQ, et al. Effects of CIITA antisense RNA on the expression of HLA class II molecules [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000,45(22):2068-2071
- [16] Testa U, Riccioni R, Militi S, et al. Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis [J]. *Blood*, 2002,100:2980-2988
- [17] June BW, Felix NJ, Griffiths R, et al. Prolonged survival of class II transactivator-deficient cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2002,74(9):1341-1348
- [18] Lu X, Kallinteris NL, Li J, et al. Tumor immunotherapy by converting tumor cells to MHC class II-positive, IL-2 protein-negative phenotype [J]. *Cancer Immunol [J]. Immunother*, 2003,52(10):592-598
- [19] Meazza R, Comes A, Orengo AM, et al. Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells [J]. *Eur J Immunol*, 2003,33(5):1183-1192
- [20] Riccioni R, Rossini A, Calabro L, et al. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemias overexpressing the interleukin 3 receptor α chain [J]. *Leuk Lymphoma*, 2004,45(8):1511-1517