

[文章编号] 1007-385X(2002)04-289

新城疫病毒抗癌作用及其应用的研究进展

刘开扬, 刘芳 综述; 戴洁, 翟登高 审阅 (1. 张家口医学院微生物学教研室, 河北 张家口 075029; 2. 首都医科大学, 北京 100054)

[摘要] 新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)为反义负链 RNA 病毒, 能选择性的杀伤人类肿瘤细胞。应用 NDV 免疫肿瘤细胞进行各种体内外实验研究, 均有不同程度的抗肿瘤效应。用 NDV 对癌症病人进行临床治疗则可延长肿瘤病人的存活期, 肿瘤复发率较低。作用机制包括其直接对肿瘤细胞产生细胞毒作用; 增强机体的各种细胞及体液免疫; 诱导多种细胞因子的产生。其中 T 细胞的杀肿瘤作用增强及活化巨噬细胞数量增加是主要的抗癌因素。

[关键词] 新城疫病毒; 抗癌; 生物治疗

[中图分类号] R730.54 [文献标识码] A

* 1 NDV 属反义负链 RNA 病毒, 核衣壳内有 L, NP, P 3 种结构蛋白, 基因排列为 3'-Lead-NP-P-M-F-HN-L-5'。NDV 有一系列不同毒力的毒株, 其毒力由 F 和 HN 两糖蛋白结构决定, 不同毒力的 NDV 血清学试验证明其抗原性差异很小。NDV 能选择性的杀伤肿瘤细胞, 对人的正常成纤维细胞没有杀伤作用^[1]。许多种类的人类肿瘤细胞能够高效地被 NDV 感染, 并独立于肿瘤细胞增殖而自主复制, 这种增殖与复制无传染性^[2]。以下将这一研究的进展情况进行综述。

1 NDV 对肿瘤细胞的选择性杀伤作用

Lorence 等^[3]给人类 IMR-32 神经母细胞瘤荷瘤无胸腺小鼠瘤内及肌肉内注射 NDV73-T, 不同时间内处死小鼠后测定瘤内或肌肉内感染的病毒数量发现, 病毒瘤内注射 5 ~ 24 h 之间, 病毒浓度增加 80 倍, 而在 NDV 注射的肌肉内未产生病毒感染现象; 7/18 的肿瘤完全消失, 6 个月后发现仅有 1 只鼠肿瘤复发, 未见明显的急性或慢性副作用, 而所有 18 例接种 PBS 或 UV 灭活 NDV 的对照组小鼠肿瘤生长迅速 ($P < 0.001$)。

2 NDV 抗肿瘤作用及机制的实验研究

2.1 几种不同的免疫途径

用 NDV73-T (5×10^9 PFU) 通过瘤体内及腹膜内感染治疗无胸腺小鼠人纤维肉瘤及 IMR-32 人成纤维细胞瘤移植体, 肿瘤生长抑制率为 77% ~ 96%, 由此推断: 无论瘤体内还是腹膜内感染 NDV 均可有效抑制肿瘤细胞生长, 且 3 ~ 9 个月内无复发; NDV 需多次注射才能起到明显效果; 注射时需要用复制型 NDV, 灭活 NDV 无明显作用^[4]。

Schirmacher 等^[5]用人类黑色素瘤细胞系(CT26)、肾癌细胞系(Renca)、淋巴瘤细胞系(ESb)比较出在荷瘤裸鼠瘤细胞内、瘤体内及其周围浸润性感染 NDV 比全身大剂量感染的抗癌效果明显。在 CT26 癌细胞系内无溶胞作用的 Ulster 株比有溶胞作用的 73T 株 NDV 抗癌活性高。另外他们

还发现在 MeWo 黑色素瘤细胞系体外培养前感染 NDV, 溶胞型 Italien 株 NDV 比非溶胞型 Ulster 株作用强。

魏林等^[6]构建了表达 NDV HN 蛋白的真核表达重组质粒, 通过转染 COS-7 细胞, 证明该质粒能良好地表达, 并具有与鸡红细胞发生凝集的生物特性。将其应用于 B16 黑色素瘤 C57 荷瘤小鼠, 结果表明, pcDNA3-HN 具有增强荷瘤小鼠抗肿瘤细胞免疫的作用。

2.2 机制

NDV 可直接对肿瘤细胞产生细胞毒作用, 同时可降低细胞的成瘤性和转移能力。应用 ESb-NDV(ESb 为 DBA/2 小鼠淋巴瘤模型) 疫苗在术后主动特异性免疫 2 个月便可诱导机体产生肿瘤特异性 CTL 的长期回忆反应^[7]。

Termeer 等^[8]用 NDV- Ulster 株感染原发性自体黑色素瘤细胞研究 NDV 对肿瘤特异性 T 细胞反应的影响。肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和黑色素瘤细胞是从新鲜切除的肿瘤组织中制备, TIL 进行适当稀释。Th 细胞克隆 STS₃(CD4⁺) 增殖试验表明, T 细胞克隆对自身 MHC II⁺ 和 B7-1/B7-2 黑色素瘤 SMS 无反应性, 甚至对 IL-2 继发刺激无应答。与 CD3, CD28 单抗的刺激相比, NDV 感染黑色素瘤 SMS 不仅完全恢复了 STS₃ 对 SMS 刺激的增殖活性, 而且抑制了诱导产生的无致敏反应。STS₃ 细胞裂解产物电泳迁移试验揭示通过与 NDV 感染的黑色素瘤细胞的共同培养, 可诱导 CD28⁻ 反应体系的产生, 由于这个核蛋白复合体的诱导产生是 CD28 途径被激活的特异性反应, 而在任何时相均未检测到黑色素瘤细胞上 B7-1/B7-2 的功能性表达。即得出结论, NDV 病毒蛋白诱导产生共刺激因子不同于 B7 途径。

Schirmacher 等^[9]对 NDV 在体内外激活鼠巨噬细胞抗肿瘤活性的能力进行了研究。用 2 株不同毒力的 NDV、不同来源的巨噬细胞(脾和腹膜)、不同鼠系(DAB/2, C57BL/6, 615) 在不同实验条件下观察对巨噬细胞的直接激活作用。

* [基金项目] 河北省教委基金资助项目(2002104)

上清中,多种巨噬细胞标记酶(ADA, iNOS, 裂解酶、酸性磷酸酶)作用增强,并有抗肿瘤效应物质的产生,如NO和TNF- α 。NDV激活的巨噬细胞在体外亦发挥抗肿瘤作用,如出现抗肿瘤白细胞聚集和抗肿瘤细胞毒性。在所有检测的肿瘤细胞株中(乳腺癌、肺癌、肥大细胞瘤及淋巴瘤)均出现了细胞毒性抗肿瘤作用。用NDV处理巨噬细胞,在动物体内可以增强抑制肿瘤细胞的转移和生长,并且诱导TNF的表达。巨噬细胞可以直接杀伤肿瘤细胞,也可以通过抗原递呈给Th细胞,最终刺激肿瘤特异的CD28相关T细胞。NDV激活的巨噬细胞抗肿瘤活性在体内转递,而未被激活的巨噬细胞的转递不但不能发挥其抗肿瘤作用,反而会加速肿瘤的生长。反复静脉内注射NDV激活的巨噬细胞,在乳腺癌肺转移模型及肺癌模型中出现了明显的抑瘤效应。Umansky等^[10]发现NDV作用人的外周单核细胞后产生NO,释放出的NO与NDV杀伤肿瘤细胞有密切联系,NO可导致巨噬细胞核的NF- κ B因子活化,从而活化巨噬细胞,提示NDV感染的巨噬细胞中产生NO与NF- κ B因子活化的信号是相似的。

NDV感染机体可诱导IFN, TNF, IL, 单核细胞集落刺激因子等细胞因子的产生。Guha等^[11]用RT-PCR检测感染NDV小鼠体内细胞因子的mRNA,发现机体在感染NDV 2 h后迅速出现IFN, TNF, IL-6和IL-1等细胞因子的mRNA。

Haas等人^[12]用NDV感染肿瘤细胞后,经FACS定量流式细胞术检测,孵育10 min后,于肿瘤细胞表面即可表达低抗原密度(low antigen density, LAD), 5~24 h后,则可表达高抗原密度(high antigen density, HAD)。病毒感染的肿瘤细胞表面红细胞及淋巴细胞的黏附因子增加,病毒介导的细胞黏附可被抗HN单抗所抑制。他们还研制了一种NDV肿瘤疫苗^[13],主要成分包括同种异体瘤细胞、感染NDV瘤细胞和与NDV HN蛋白连结的双特异性抗体(bispecific antibodies, BsAb),这种双特异性抗体(BsAb:抗CD3和CD28的抗体)上含有的识别CD3和CD28抗原的结合点,介导细胞毒淋巴细胞,激活机体CTL作用,发挥MHC的限制性杀伤肿瘤细胞作用。

3 NDV抗肿瘤作用及机制的临床研究

NDV作为佐剂,给34个病人用自身或同种异体肿瘤照射疫苗治疗后,通过Western blot分析,33个病人体内产生了对NDV的相应抗体,而不是针对肿瘤相关抗原的抗体,这些抗体的相应抗原为NDV的分子量为53 kDa, 55~56 kD,及66 kD的蛋白质^[14]。Sinkovics等^[15]称NDV的肿瘤裂解物更适合于免疫学治疗,而不是大量的重复接种病毒。Batliwalla等人^[16]用NDV肿瘤裂解物治疗术后AJCC III期恶性黑色素瘤病人,15年随访发现病人的总生存率为55%。

Pecora等人^[17]用NDV PV701经4种方式对79位癌症病人进行静脉注射治疗:单一剂量,每4周1次;1周内重复3次,4周1个疗程;1周内注射3次,首次小剂量,以后2次大剂量,4周1个疗程;2周内注射6次,每周3次,首次小剂量,以后5次大剂量,3周1个疗程。小剂量MTD为 12×10^9

PFU/m²,大剂量MTD为 120×10^9 PFU/m²。病人最常见的副作用为流感样综合征,首次注射后即出现,以后减轻,每次注射后较为严重,与剂量有关,但无累加效应。病人延长存活期4~31个月。并且从NDV治疗11个月的一位患者肿瘤组织中经电镜等方法检查到了经肿瘤细胞膜出芽的PV701病毒颗粒。

Liebrich和Schlag等^[18-19]用NDV修饰自体瘤苗治疗大肠癌病人,进行了系统临床I, II期试验,发现此法可激发机体主动特异性免疫功能(ASI)。对20例手术切除肿瘤的大肠癌病人进行I期临床辅助治疗,在接种后4 h引起最佳DTH反应的剂量是肿瘤细胞为 1×10^7 , NDV浓度为32血凝单位(HU),免疫治疗过程中除4/20患者有轻度发热外,无其它任何副作用。对接种部位的组织学检测可见,有以Th为主的浸润现象。I期临床试验结果显示大多数接受ASI辅助治疗的病人机体产生了特异性抗肿瘤作用。随后他们对23例大肠癌肝转移病人进行体外和II期临床试验,应用由 1×10^7 200 Gy灭活的自体肝转移病灶的肿瘤细胞与32HU NDV共同孵育组成的疫苗。经至少18个月的随访发现,61%的接种疫苗病人出现肿瘤复发,而同一环境只经手术治疗的对照组病人中有85%出现肿瘤复发。

用溶瘤NDV作佐剂与瘤苗联合治疗高危黑色素瘤病人,10年存活率高于60%,15年存活率55%,全面分析存活15年的病人外周血T细胞,结果为,NDV作佐剂与瘤苗联合,能延长恶性黑色素瘤病人存活期,使外周血CD8⁺、CD57⁺ T细胞亚群克隆扩增,CD8⁺ T细胞可能起至关重要的作用^[9]。

4 总 结

NDV抗癌活性显著,总结其抗肿瘤机制有三方面:NDV直接对肿瘤细胞产生细胞毒作用;NDV修饰的肿瘤疫苗激发机体细胞及体液免疫反应;NDV对各种细胞因子的诱导可增强机体的免疫功能,从而杀伤肿瘤细胞。其中T细胞的杀肿瘤作用增强及活化巨噬细胞数量增加是主要的抗癌因素。这些免疫杀伤作用对于消灭机体潜藏的小量癌细胞也有重要意义。随着对其研究的不断深入,很有可能成为未来溶瘤病毒的首选对象。

[参 考 文 献]

- Reichard KW, Lorence RM, Cascino CJ. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells[J]. Surg Res, 1992, 52(5): 448-453.
- Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, et al. Human tumor cell modification by virus infection: An efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus[J]. Gene Ther 1999, 6(1): 63-73
- Lorence RM, Reichard KW, Katubig BB, et al. Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy[J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86(16): 1228-133.
- Phuangsab A, Lorence RM, Reichard KW, et al. Newcastle dis-

- ease virus therapy of human tumor xenografts: Antitumor effects of local or systemic administration[J]. *Cancer Lett*, 2001, 172(1): 27-36.
- [5] Schirmacher V, Griesbach A, Ahlert T. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus *in vivo*: Local versus systemic effects[J]. *Int Oncol*, 2001, 18(5): 945-952.
- [6] 魏林, 戴建新, 孙树汉. 新城疫病毒 HN 基因真核表达质粒的构建及其抗肿瘤作用的初步研究[J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(6): 515-518.
- [7] Schirmacher V. *in situ* analysis of tumor-specific CTL effector and memory responses elicited by tumor vaccination[J]. *Int Oncol*, 1999, 15(2): 217-227 .
- [8] Termeer CC, Schirmacher V, Brocker EB, *et al.* Newcastle disease virus infection induces B7-1/B7-2-independent T-cell costimulatory activity in human melanoma cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(2): 316-323.
- [9] Schirmacher U, Bai L, Umansky V, *et al.* Newcastle virus activates macrophages for anti-tumor activity[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 363-373.
- [10] Umansky V, Shatrov VA, Lehmann V. Induction of NO synthesis in macrophages by newcastle disease virus is associated with activation of nuclear factor kappa B[J]. *Int Immunol*, 1996, 8 (4): 491-498.
- [11] Guha T N, Majde JA. Early induction of proinflammatory cytokine and type I interferon mRNAs following Newcastle disease virus, poly [rl : rC], or low dose LPS challenge of the mouse[J]. *Interferon Cytokine Res*, 1997, 17(4): 197-204.
- [12] Haas C, Ertel C, Gerhards R, *et al.* Introduction of adhesive and costimulatory immune functions into tumor cells by infection with newcastle disease virus[J]. *Int Oncol*, 1998, 13 (6): 1105-1115.
- [13] Haas C, Strauss G, Moldenhauer G, *et al.* Bispecific antibodies increase T-cell stimulatory capacity *in vitro* of human autologous virus-modified tumor vaccine[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(3): 721-730
- [14] Zorn U, Duensing S, Langkopf F, *et al.* Active specific immunotherapy of renal cell carcinoma: Cellular and humoral immune responses[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 1997, 12(3): 157-165.
- [15] Sinkovics JG, Horvath JC. Newcastle disease virus (NDV): Brief history of its oncolytic strains[J]. *Clin Virol*, 2000, 16(1): 1-15.
- [16] Batliwalla FM, Bateman BA, Serrano D, *et al.* A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire[J]. *Mol Med* 1998, 4 (12): 783-794.
- [17] Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, *et al.* Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers[J]. *Clin Oncol*, 2002, 20(9): 2251-2266.
- [18] Liebrich WT, Schlag P, Manasterki M, *et al.* *in vitro* and clinical characterization of a Newcastle-disease-virus-modified autologous tumor cell vaccine for treatment of colorectal cancer patients[J]. *Eur J Cancer*, 1991, 27(6): 703-710.
- [19] Schlag P, Manasterki M, Geneth T, *et al.* Active specific immunotherapy with newcastle-disease-virus-modified autologous tumor cell following resection of liver metastasis in colorectal cancer. First evaluation of clinical response of phase II trial[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, 35(5): 325-330.

[收稿日期] 2002 - 06 - 10

[修回日期] 2002 - 08 - 14