中国肿瘤生物治疗杂志 Chin J Cancer Biother 2003 Jun; 10(2): 88~92

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0088-05

新城疫病毒 HN 基因与鸡贫血病毒 VP3 基因对裸鼠荷 HCT 肿瘤的治疗

连 海[1], 金宁一[1], 米志强[1], 薛丽娟[1], 李华[2], 解丽华[1], 金洪涛[1], 李 萍[1](1. 解放军军需大学, 解放军基因工程重点实验室, 长春 130062; 2. 中国医科大学实验动物部, 沈阳 110001)

[摘 要] **目的:** 寻求有效的肿瘤基因治疗方法,研究新城疫病毒 HN 基因与鸡贫血病毒 VP3 基因在无胸腺裸鼠体内的抗肿瘤作用。**方法:** 建立 BALB/c 裸小鼠荷人结肠癌模型,瘤内注射脂质体包裹的真核重组子 pVHN 和 pVVP3。观测 pVHN 和 pVVP3 治疗荷 HCT 裸鼠的效果,免疫组化法检测肿瘤细胞 Bcl-2 和 PCNA 的表达。**结果:** 经 HN 基因和 VP3 基因联合治疗组的小鼠与荷瘤对照组小鼠相比,肿瘤体积明显缩小,抑瘤率可达 70%。病理组织切片表明,治疗组裸鼠体内肿瘤细胞大量凋亡,局部地方可见细胞消失。免疫组化表明, Bcl-2 和 PCNA 蛋白在荷 HCT 裸鼠对照组与各治疗组均有表达,其中 Bcl-2 表达在荷瘤对照组与 pVHN 治疗组差异有显著意义($P<0.05$),PCNA 表达在荷瘤对照组与 pVHN + pVVP3 治疗组差异极其显著($P<0.01$)。**结论:** NDV HN 基因与凋亡素 VP3 基因对裸鼠荷 HCT 肿瘤细胞的增殖有一定抑制作用,可诱导其凋亡,其凋亡可能与下调 Bcl-2 表达有关。

[关键词] 血凝素神经氨酸酶基因; 凋亡素基因; 结肠癌; Bcl-2 蛋白; 增殖性细胞核抗原
[中图分类号] R373.9; R730.5 [文献标识码] A

Therapeuti Effects of NDV HN Gene and CAV VP3 Gene on BALB/c Nude Mice Bearing HCT Tumor

LIAN Hai, JIN Ning-yi, MI Zhi-qiang, XUE Li-juan, LI Hua, XIE Li-hua, JIN Hong-tao, LI Ping (Quartermaster University of the PLA, Key Laboratory of Genetic Engeneering of the PLA, ChanChun 130062, China)

[**Abstract**] **Objective**: The Explore the effective method of tumor gene therapy and studying the antitumor effect of NDV HN gene and apoptin VP3 gene. **Methods**: The carcinoma of colon model in BALB/c nude mice was constructed and the pVHN and pVVP3 DNA-liposome complexes were injected into the tumor. The therapeutic effect of NDV HN gene and apoptin VP3 gene to BALB/c nude mice bearing HCT tumor was observed. and the expressions of the Bcl-2 and PCNA of the tumors were detected with immunohistochemistry. **Results**: Compared with the control group, the tumors in the group of combination therapy were decreased obviously, and the rate of suppressing tumor reached 70 percent. The results of pathological tissue section showed that apoptosis was induced greatly in the group of combination therapy, and the tumor cells in some range disappeared. The results of immunohistochemistry showed that the Bcl-2 and PCNA protein were expressed in control group and all of therapy groups, the Bcl-2 expression rates of control group and the therapy group with pVHN were marked difference ($P<0.05$) and the PCNA expression rates of control group and the therapy group with pVHN and pVVP3 were very marked difference ($P<0.01$). **Conclusion**: NDV HN gene and apoptin VP3 gene are able to suppress the proliferation of the tumor cells in BALB/c nude mice bearing HCT tumor and induce apoptosis of the tumor cells. The apoptosis that induced by NDV HN gene and apoptin VP3 gene may correlated with down-regulation of Bcl-2 protein.

[**Key words**] hemagglutinin neuramidinase gene; apoptin gene; carcinoma of colon; Bcl-2 protein; the proliferating cell nuclear antigen

* 新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)是副病毒科腮腺炎病毒属的成员,含有 6 种病毒特异性结构蛋白 L,NP,HN,F,M,P[1],体内外实验研究证明,NDV 能选择性杀伤人肿瘤细胞,而对人正常细胞无明显影

[基金项目] 国家"973"资助项目(G1999011902)
[作者简介] 连海(1975-),男,吉林四平人,硕士研究生,主要从事分子生物学研究

响[2-3]。NDV 用于肿瘤治疗及在分子生物学水平上进一步研究 NDV 的抑瘤机理引起了越来越多学者的关注。到目前为止,国内外用 NDV 抗肿瘤大多是利用 NDV 的完整病毒来进行治疗,而 NDV HN 在体内的抗肿瘤研究鲜有报道。鸡贫血病(chicken anemia virus, CAV)是一种诱导细胞凋亡的新病毒,而触发鸡贫血病毒诱导细胞凋亡的因子是鸡贫血病毒编码的蛋白(VP3 蛋白),即凋亡素(apoptin)。凋亡素能诱导人急性骨髓白血病细胞 RG-1 和 K-562、B 淋巴瘤细胞 DoHH-2、骨肉瘤细胞、肝癌细胞和肾杆状瘤等不同人肿瘤细胞发生凋亡,而对正常人的细胞无影响[4-5]。

为了利用 HN 和 VP3 不同的抑瘤机制,我们构建了含 HN 基因和 VP3 基因的核酸疫苗,应用 HN 基因和 VP3 基因联合治疗荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠以及荷 B16 肿瘤 C57BL/6 鼠,结果表明:其抑瘤作用显著,且联合治疗的效果明显好于单纯的 HN 组或 VP3 组。本实验进一步探索 NDV 的 HN 基因和凋亡素 VP3 基因在无胸腺裸鼠体内的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与动物

BALB/c 裸小鼠 15 只,雄性,4 ~ 5 周龄,体重 18 ~ 20 g,购自中国医科大学实验动物中心。人结肠癌细胞 HCT-116 由本室保存。阳离子脂质体(Lipofection Reagant)购自美国 GIBCO 公司;免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 质粒构建及其提取纯化

将长春株 NDV 的 HN 基因插入到 pVAX1 表达载体的 pCMV 启动子之下的多克隆位点,构建成 pVHN;将鸡贫血病病毒的 VP3 基因插入到 pVAX1 表达载体的 pCMV 启动子之下的 EcoR Ⅰ 位点,构建成 pVVP3。质粒的小量制备及酶切鉴定、质粒的大量提取与纯化等均按常规方法进行。

1.3 BALB/c 裸小鼠荷人结肠癌肿瘤模型的建立

将 BALB/c 裸小鼠 15 只随机分成 5 组,每组 3 只。除第 1 组为正常对照组外,其余 4 组均构建荷瘤模型。荷瘤方法:胰酶消化指数生长期的 HCT 细胞,调整浓度为 2×10^7 ml^{-1},每只小鼠右前肢腋窝皮下注射 0.1 ml(2×10^6/只)。待肿瘤直径长至 5 mm 左右,瘤内注射以下制剂进行治疗。第 2 组荷瘤对照组(注射 pVAX1 空质粒);第 3 组注射 pVHN 100 μg;第 4 组注射 pVVP3 100 μg;第 5 组注射 pVVP3 和 pVHN 各 50 μg。治疗方法:按照质粒与脂质体 3∶1的比例混合,每 3 天注射 1 次,连续注射 3 次。

1.4 动物观察与体重测量

每天观察裸小鼠的精神状态及采食情况,称量其体重。

1.5 标本获取及病理组织切片的制备

观察 5 周后处死小鼠,称量其瘤重,取其肿瘤标本和心、肝、脾,肺等脏器标本。10% 中性福尔马林固定,常规 HE 染色。

1.6 Bcl-2 和 PCNA 蛋白的表达检测

SABC 免疫组化染色程序:切片常规处理至水,3% H_2O_2 10 min,阻断内源性过氧化物酶;0.1% 胰蛋白酶 37℃消化 10 min;10% 羊血清孵育 20 min;滴加第一抗体(即用型)4℃过夜;滴加生物素化羊抗鼠 IgG(即用型)37℃ 10 min;滴加链霉亲合素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)37℃ 10 min。每步抗体孵育后以 PBS 液洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色,苏木素复染,封片,显微镜下观察。以 PBS 代替第一抗体为阴性对照。

1.7 小鼠血清唾液酸含量的检测

荷瘤鼠框窦取血,分离血清,按文献[6]的方法进行唾液酸含量测定。在 721 紫外分光光度计,560 nm 处测定唾液酸的 OD 值,取其平均值,按下式计算唾液酸含量。

$$\text{唾液酸含量} = \frac{\text{测定管 } OD_{560}}{\text{标准管 } OD_{560}} \times 1.94$$

1.8 统计学处理

统计学处理采用 t 检验。

2 结 果

2.1 pVHN 和 pVVP3 核酸表达质粒的构建

图 1 pVVP3 和 pVHN 构建图

Fig. 1 Construction of pVVP3 and pVHN

2.2 荷瘤小鼠临床症状及体重变化

荷瘤对照组小鼠出现食欲下降,消瘦等症状,而 pVVP3 + pVHN 组上述症状均不明显。从图 2 可以看出,正常对照组小鼠体重逐渐上升,荷瘤对照组小鼠体重有下降趋势,而 pVVP3,pVHN 及 pVVP3 + pVHN 组小鼠体重则先下降而后趋于稳定。

2.3 抑瘤率及差异性比较

按下列公式计算抑瘤率:

$$抑瘤率(\%) = (1 - \frac{治疗组肿瘤重量}{对照组肿瘤重量}) \times 100\%。$$

由表 1 可见,pVHN + pVVP3 联合治疗组抑瘤效果最好。

图 2　质粒注射后不同组小鼠体重变化

Fig. 2　The body weight changes of different group mice after injection with plasmid

2.4　肿瘤组织病理学观察

病理组织切片结果表明,荷 HCT 肿瘤对照组:肿瘤细胞形态正常,生长旺盛(图 3A)。pVHN 治疗组:肿瘤细胞大量空泡化,部分细胞发生凋亡(图 3B)。pVVP3 治疗组:部分肿瘤细胞核碎裂,大部分细胞发生凋亡(图 3C)。pVHN + pVVP3 治疗组:大部分细胞发生凋亡,有的地方细胞消失(图 3D)。

2.5 肿瘤细胞 Bcl-2 和 PCNA 蛋白表达

经 SABC 免疫组化染色,肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白产物被染成棕黄色(图 3E 和 F),主要定位在癌细胞胞浆内,每张切片随机观察 200 个细胞,计数阳性细胞。对照组和治疗组均可见阳性细胞,其中对照组和 pVHN 治疗组阳性率分别为(44.0 ± 5.4)% 与(31.5 ± 4.7)%,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。经 SABC 免疫组化染色,肿瘤细胞 PCNA 蛋白产物被染成棕黄色(图 3G,H 和 I),主要定位在癌细胞胞核内,每张切片随机观察 200 个细胞,计数阳性细胞。对照组和各治疗组均可见阳性细胞,其中对照组和 pVHN 治疗组阳性率分别为(73.5 ± 13.1)% 与(40.0 ± 10.6)%,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)对照组和 pVHN + pVVP3 治疗组阳性率分别为(69.5 ± 12.4)% 与(29.5 ± 4.2)%,两组比较差异极其显著($P < 0.01$)。

2.6　小鼠血清唾液酸含量的测定

由表 2 可知,pVHN 组血清唾液酸含量比对照组显著下降($P < 0.05$);从数据上看,pVHN + pVVP3 组血清唾液酸含量最低。这说明 HN 基因在体内发挥了神经氨酸酶的作用,显著降低了血清中唾液酸的含量。

表 1　不同治疗组抑瘤率及差异性比较

Tab. 1　The comparation of suppressing tumor rates and difference in groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Groups	Number	Tumor weight(g)	Suppressing tumor rates(%)
Tumor control	3	0.676 ± 0.172	
pVVP3	3	0.286 ± 0.078△	57.7
pVHN	3	0.320 ± 0.068△	52.7
pVHN + pVVP3	3	0.190 ± 0.057▲	71.9

△Compared with tumor control group, $P < 0.05$; ▲ Compared with tumor control group, $P < 0.01$

3　讨　论

目前进行的联合基因治疗,按基因的种类可分以下几种类型:①抑癌基因与抑癌基因的联合;②自杀基因与自杀基因的联合;③自杀基因与免疫因子基因的联合;④抑癌基因与免疫因子基因的联合。如果将所要联合的治疗基因形成融合基因,统一由一个载体所携,则不但需要另行融合基因(须受到载体的容量和融合的技术难度的制约),还要保证融合的基因均能高效地表达,这样操作起来费时费力,且有相当的难度。因此目前多采用一个载体携带一个基因的联合[7,8]。为了利用 HN 和 VP3 不同的抑瘤机制,我们构建了含 HN 基因和 VP3 基因的真核重组子 pVHN 和 pVVP3,应用 HN 基因和 VP3 基因联合治疗荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠以及荷 B16 肿瘤 C57BL/6 鼠,结果表明其抑瘤作用显著,且联合治疗的效果明显好于单纯的 HN 组或 VP3 组。但考虑到临床上一些肿瘤患者免疫功能缺陷或完全丧失,为了探索 HN 基因与 VP3 基因抗肿瘤作用是否受免疫缺陷的限制,我们进行了裸鼠体内实验。结果表明,即使在免疫 T 淋巴细胞缺陷的机体内,HN 基因与 VP3 基因仍可

发挥其抗肿瘤作用,抑瘤率可达70%。

表2 荷HCT肿瘤BALB/c裸鼠血清唾液酸含量
Tab. 2 Sialic acid contents in the serum of BALB/c nude mice bearing HCT tumor ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Groups	Sialic acid contents in the serum
Tumor control	6.36 ± 0.53
pVHN	5.03 ± 0.52△
pVVP3	5.95 ± 0.40■
pVHN + pVVP3	4.41 ± 0.52▲

■ Compared with tumor control group, $P > 0.05$;
△ Compared with tumor control group, $P < 0.05$;
▲ Compared with tumor control group, $P < 0.01$

唾液酸(SA)是神经氨酸的氨基被乙酰基或羟乙基取代后所产生的衍生物,具有对细胞表面肿瘤抗原决定簇的掩盖作用,它可阻断配体对受体的识别作用,又阻断免疫系统对肿瘤抗原的有效识别[10]。由此降低或逃避了机体对肿瘤细胞的免疫攻击和杀伤。NDV HN基因的表达产物是一种糖蛋白,具有两种相关同时又相拮抗的功能:吸附含有唾液酸(SA)的受体和由神经氨酸酶(NA)催化的唾液酸裂解,NDV HN所具有的神经氨酸酶活性,可以去除肿瘤细胞表面的唾液酸,从而增强了机体的免疫识别能力,提高了免疫细胞杀伤肿瘤细胞作用。本实验分别测定了对照组与各治疗组裸鼠血清唾液酸含量,表明HN基因在体内发挥了神经氨酸酶的作用,显著降低了血清中唾液酸的含量。

图3 BALB/c裸小鼠荷HCT肿瘤组织病理切片及免疫组化分析结果

Fig. 3 The pathological section and immunohistochemistry assay results in BALB/c nude mice bearing HCT tumor

A: Tumor control (HE ×400); B: pvHN (HE ×400); C: pVVP3 (HE ×400); D: pVHN + pVVP3 (HE ×400);
E: Bcl-2 expression in tumor control (SABC ×400); F: Bcl-2 expression in pVHN group (SABC ×400);
G: PCNA expression in tumor control (SABC ×400); H: PCNA expression in pVHN group (SABC ×400);
I: PCNA expression in pVHN + pVVP3 group (SABC ×400)

细胞凋亡(Apoptosis)又称为细胞程序性死亡,是细胞自主死亡的过程,也是凋亡相关基因调控的结果。近年研究发现,病毒感染是调节细胞凋亡的重要因素,病毒感染后不仅可通过自身基因的表达激活或抑制细胞凋亡的发生,也可与细胞凋亡调节基因一起共同参与凋亡的调控。Bc1-2是一种原癌基因,对细胞凋亡具

有明显的抑制作用。本研究表明：Bcl-2 蛋白的表达在对照组和 pVHN 治疗组差异有显著性($P < 0.05$)。说明 HN 基因可能下调 Bcl-2 蛋白的表达从而诱导肿瘤细胞凋亡。PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助因子，主要表达于细胞增殖周期的 S 期，为 DNA 复制和合成所必需，因此它的表达程度可以反映细胞增殖活性，据此可用于判断肿瘤细胞的生长速度[9]。免疫组化结果表明：PCNA 蛋白在荷 HCT 裸鼠对照组与各治疗组均有表达，其中荷瘤对照组与 pVHN + pVVP3 治疗组阳性率分别为(69.5 ± 12.4)% 与(29.5 ± 4.2)%，两组比较差异极其显著($P < 0.01$)，这与观测的结果相符。说明 pVHN 与 pVVP3 联合治疗对裸鼠荷 HCT 肿瘤细胞的增殖有一定的抑制作用。这些结果为进一步探索 HN 基因与 VP3 基因诱导肿瘤细胞凋亡的调控机制以及研制 pVHN 与 pVVP3 联合抗肿瘤生物制剂并将其应用于临床打下了良好的基础。

[参 考 文 献]

[1] 殷 震，刘景华，主编. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1997，736-737.

[2] Reichard KW，Lorence RM，Cascine CJ，*et al*. Newcastle disease virus selectively kill human tumor cells[J]. J Surg Res，1992，52：448-453.

[3] 李小军，赵铁军，田伏洲，等. NDV 对体外培养的肿瘤细胞的杀伤性研究[J]. 西北国防医学杂志，1999，20(2)：103-104.

[4] Noteborn MHM，de Boer GF，von Roozelar DJ，*et al*. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contain all elements for the infectious replication cycle[J]. J Virol，1991，65 (8)：3131-3139.

[5] Noteborn MHM，Todd D，Verschueren CAJ，*et al*. A single chicken anemia virus protein induce apoptosis[J]. J Virol，1994，(68)：346-351.

[6] 曹兴建，王逸民. 3，5-二羟基甲苯测定血清唾液酸[J]. 临床检验杂志，1998；16(3)：53-54

[7] Chen SH，Kosai K，Xu B，*et al*. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma：Sustained antitumor immunity prolongs animal survival[J]. Cancer Res，1996，56：3758-3762.

[8] Putzer BM，Bramson JL，Addison CL，*et al*. Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer [J]. Hum Gene Ther，1998，9：707-718.

[9] Hall PA，Levision DA. Assessment of cell proliferation in histological material[J]. J Clin Pathol，1990，43：184-197.

[10] Reichard KW，Lorence RM，Cassino CJ，*et al*. Selective replication of Newcastle disease virus(NDV) in cancer cells is associated with virus-induced cell fusion[J]. Proc Am Assoc Cancer Res，1992，33：521-525.

[收稿日期] 2002 - 11 - 25　　[修回日期] 2003 - 01 - 25

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿、征订启示

《中国肿瘤生物治疗杂志》由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办，中国科协主管，现为“中国科技论文统计源期刊”、《中国科学引文数据库》来源期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国医学文摘·肿瘤学》医学核心期刊，2002 年被《中国学术期刊文摘》收录为首批源期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、《中文生物医学期刊文献数据库》收录期刊。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用，主要栏目有述评、论著、综述、短篇报道、研究简报和科技信息等。欢迎广大从事肿瘤生物治疗的科研工作者及相关临床医师踊跃投稿，本刊将公平公正、择优录取。

本刊为季刊，每期定价：8.00 元，全年定价：32.00 元，邮发代号：4 - 576。欢迎广大读者到当地邮局订阅。若错过，可从本刊编辑部补订，请将 40.00 元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码。

联系地址：上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联 系 人：厉永建

联系电话：021 - 55620605 × 22；25070316 × 22。