

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0093-04

新城疫病毒 HN 基因构建的核酸疫苗抗肿瘤作用研究

米志强, 金宁一, 龚伟, 薛立娟, 孙大辉, 葛涛, 连海, 解丽华(解放军军需大学解放军基因工程重点实验室, 长春 130062)

[摘要] 目的: 探讨 HN 基因在 NDV 抗肿瘤上发挥的作用。方法: 以 pVAX1 为表达载体构建了含 NDV HN 基因的 pVHN 核酸疫苗, 以脂质体介导方法在体外转染 OS732 细胞 72 h 后, 用 3,5-二羟基甲苯法测定 OS732 细胞膜唾液酸含量的变化。6 周龄 BALB/c 鼠左后肢皮下接种 2×10^6 个 S180 肿瘤细胞, 分别于肿瘤接种后的第 7 天(肿瘤直径为 2~3 mm)和第 17 天内注射 100 μg 核酸重组体, 同时设 pVAX1 对照组和单纯荷瘤对照组。荷瘤鼠经治疗后眶窦采血, 分离血清, 测定血清唾液酸含量。取脾, 采用 FACS 方法测定淋巴细胞亚群数量的变化。结果: pVHN 体外转染 OS732 细胞后, 能显著降低细胞表面唾液酸含量($P < 0.05$)。pVHN 应用于荷瘤鼠显著降低血清中唾液酸含量($P < 0.05$), 引起 CD8^+ T 淋巴细胞亚群数量的增加($P < 0.05$)。结论: 单独 HN 基因在体外转染能够降低肿瘤细胞表面唾液酸含量, 体内表达后引起 T 淋巴细胞亚群数量改变。

[关键词] 新城疫病毒 HN 基因; 核酸疫苗; 抗肿瘤

[中图分类号] R373.9; R730.5 [文献标识码] A

The Antitumor Effect of the Nucleic Vaccine Constructed with Newcastle Disease Virus HN Gene

MI Zhi-qiang, JIN Ning-yi, GONG Wei, XUE Li-juan, SUN Da-hui, GE Tao, LIAN Hai, XIE Li-hua (The Key Genetic Engineering Lab of PLA, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of HN in NDV antitumor. **Method:** Nucleic recombinant plasmid pVHN was constructed with pVAX1 and NDV HN gene and transfected into OS732 cells *in vitro*. 72 h after transfection, OS732 cells were collected and the content of cell surface sialic acid was measured. 6 weeks old BALB/c mice were implanted with S180 sarcoma through the injection of 2×10^6 S180 cells. On 7th day and 17th day after tumor transplantation, 100 μg pVHN recombinant plasmid was administered intratumorally *in vivo* respectively. Control group was treated with pVAX1 as the same method. Serum of BALB/c mice bearing S180 sarcoma was separated and measured the content of sialic acid. T lymphocyte subsets were detected by FACS combined with rat anti mouse CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ antibodies. **Results:** pVHN was constructed correctly and expressed in OS732 cell. pVHN reduced the surface sialic acid of OS732 cell significantly *in vitro*. Expression of pVHN *in vivo* augmented CD8^+ T lymphocyte subset and decreased serum sialic acid content. **Conclusion:** HN gene plays an important role in the reduction of sialic acid and the augmentation of CD8^+ T lymphocyte subset

[Key words] NDV HN gene; nucleic vaccine; antitumor

* 鸡新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)是副黏病毒科腮腺炎病毒属成员,其基因组约为 15 kb 的单股负链 RNA,主要感染禽类,对人可引起发热,偶尔侵害角膜,一般无须治疗即可自愈^[1]。近年来的实验证明,NDV 弱毒株能选择性杀伤人和动物的肿瘤细胞,具有潜在的治疗多种肿瘤的作用^[2-3]。经研究表明,肿瘤细胞表面的唾液酸含量明显高于正常细胞。

肿瘤细胞可以通过高度唾液酸化的表面有效的抵制免疫防御,从而使肿瘤细胞扩散^[4]。NDV 的 HN(hemag-

[基金项目] 本研究受自然科学基金重大项目(39893290-4-3)和国家“973”项目(G199011902)资助

[作者简介] 米志强(1973-),男,黑龙江 龙江人,博士研究生,主要从事分子病毒学研究

[通讯作者] 金宁一, E-mail: zhiqiangmi@yahoo.com.cn

glutinin-neuraminidase)蛋白具有类似于流感病毒神经氨酸酶(neuraminidase)的活性,HN蛋白的神经氨酸酶活性不仅能水解宿主细胞表面唾液酸,还能水解病毒粒子囊膜表面糖链末端唾液酸,防止病毒粒子在宿主细胞表面的簇集,从而更利于病毒粒子对宿主细胞的黏附、融合及子代病毒粒子从感染细胞中释放出来。NDV感染肿瘤细胞后表达的HN和F蛋白(fusion protein)修饰了肿瘤细胞表面,引入了新的黏附分子和新的免疫原性分子,有利于与淋巴细胞间的相互作用及诱导机体免疫系统的识别,抗HN单抗阻断病毒介导的细胞之间的黏附作用,而抗F蛋白单抗无此作用,感染的肿瘤细胞对红细胞和淋巴细胞的黏附作用增强,并被IL-2活化的淋巴细胞优先杀伤^[5-6]。为了探讨HN基因在NDV抗肿瘤上所发挥的作用,本实验构建了含NDV HN基因的核酸疫苗,初步观察了其对肿瘤细胞的作用效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

NDV HN基因、pKSHN、大肠杆菌DH5 α 、OS732细胞、S180肿瘤细胞等由解放军军需大学解放军基因工程重点实验室保存;纯化的HN蛋白由解放军军需大学丁壮博士惠赠;pVAX1质粒、DoTAP lipofectin购自Invitrogen公司;DNA连接酶及外切酶均购自TaKaRa公司;NDV阳性血清购自中国兽药监察所, Anti-Chicken IgY AP Conjugate购自Promega公司。唾液酸标准品N-ACETYLNEURAMINIC ACID购自SIGMA公司。

1.2 质粒的构建

包括感受态细胞的制备,质粒或连接物的转化,质粒的小量提取及酶切鉴定,质粒的大量提取与纯化等均按常规方法^[7]进行。

1.3 质粒的转染

重组质粒pVHN用脂质体介导法转染OS732细胞,即于60 \times 30 mm培养板中接种OS732细胞 2×10^5 个,在500 μ l RPMI-1640加入10 μ l DoTAP,轻轻混匀,另取500 μ l RPMI-1640加入重组质粒pVHN或空白质粒pVAX1 20 μ g混匀,温育30 min,然后将后者加于前一体液中,混匀,室温下作用30 min。将上述混匀液加入OS732细胞中转染。

1.4 表达产物的血凝试验

按文献[1]的方法进行。

1.5 表达产物的Western-blot检测

按常规方法^[7]进行。

1.6 唾液酸含量测定

收集pVHN转染72 h的OS732细胞,PBS洗2次,

用100 μ l双蒸水重悬细胞,立即在冰浴中用超声波细胞破碎仪将细胞裂解,制备细胞样品;注射质粒25 d后,眶窦采血并分离血清。将2种样品按文献[8]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。

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

1.7 S180瘤株的接种及处理

健康纯系的BALB/c鼠(雌雄各半,体重18~20 g,由卫生部长春生物制品研究所提供)80只。荷瘤方法:胰酶消化指数生长期的S180细胞,调整浓度为 2×10^7 /ml,每只小鼠左后肢皮下注射0.1 ml(2×10^6 /只)。从中取60只荷瘤成功的鼠并随机分为3组,每组20只。1组为荷瘤对照,在第7天(肿瘤直径约2~3 mm)和第17天2次瘤内注射Hanks氏液100 μ l;2组为空质粒对照组,第7天(肿瘤直径约3 mm)和第17天2次瘤内注射pVAX1质粒100 μ g;3组为实验组与2组一样分2次瘤内注射pVHN质粒100 μ g。

1.8 CD4⁺, CD8⁺和CD3⁺淋巴细胞亚群数量的检测

取脾细胞悬液0.1 ml,加5 ml PBS,1 500 r/min,离心10 min,PBS洗细胞2次,在0.5 ml PBS细胞悬浮液中分别加荧光标记大鼠抗小鼠CD3⁺,CD4⁺和CD8⁺单克隆抗体(此抗体用PBS按1:10稀释),室温避光放置30 min,再加5 ml PBS洗1次,1 500 r/min离心10 min,将管底细胞用200 μ l PBS悬浮,流式细胞仪检测10 000个细胞,所得数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 pVHN核酸疫苗的构建及在真核细胞中的表达

HN基因上有2个EcoRI酶切位点,2个位点间序列长度为455 bp。经酶切鉴定,HN基因(1 731 bp)已正确克隆入pVAX1。表达的HN蛋白呈2条带,下面较小的带(67.0 kD)是非糖基化的HN蛋白^[9](见图1~3)。

2.2 表达产物的血凝效价

与pVAX1转染的对照组相比,pVHN核酸疫苗转染OS732细胞后的表达产物具有较高的血凝活性,说明该核酸疫苗表达的HN蛋白与病毒粒子上的HN蛋白一样具有血凝活性(见表1)。

2.3 转染质粒对唾液酸的影响

与对照组(转染pVAX1空质粒)相比,pVHN转染OS732肿瘤细胞72 h后,该肿瘤细胞表面唾液酸含量显著降低(N=4, P<0.05),说明HN基因得到表达且

表达的蛋白同样具有神经氨酸酶活性(见图4)。

图1 pVHN 构建图

Fig. 1 The construction of pVHN

图2 pVHN 酶切鉴定图

Fig. 2 The identification of pVHN

1: Marker (λ DNA/EcoR I + Hind III); 2: pVHN (EcoR I);
3: pVHN (BamH I + Xba I); 4: pVHN

图3 HN 基因在 OS732 细胞内表达后的 Western-blot 检测

Fig. 3 HN gene expression detection in OS732 by Western-blot

1: Purified HN protein; 2: pVHN; 3: pVAX1

表1 pVHN 核酸疫苗表达产物血凝效价测定

Tab. 1 Hemagglutination titer of pVHN expression product

Groups	Dilution						
	10	20	40	80	160	320	640
pVHN	+++	+++	+++	+++	++	+	-
pVAX1	-	-	-	-	-	-	-

+++: 100% agglutination; ++75% agglutination; + 50% agglutination; + 25% agglutination; - no agglutination

图4 pVHN 质粒转染对 OS732 细胞表面唾液酸含量的影响

Fig. 4 The influence of pVHN on OS732 cell surface sialic acid content

2.4 荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠血清唾液酸含量的变化

瘤内注射空质粒 pVAX1 的荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠血清唾液酸含量仍高于正常鼠。瘤内注射 pVHN 降低了荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠血清唾液酸含量 (N = 8, P < 0.05), pVHN 治疗后 BALB/c 鼠血清唾液酸水平已接近正常, 这说明 HN 基因体内应用有仍能发挥神经氨酸酶的作用(见图5)。

图5 荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠血清唾液酸含量

Fig. 5 Serum sialic acid content of BALB/c bearing S180 sarcoma after treatment with pVAX1 and pVHN

2.5 荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠脾 T 淋巴细胞亚群数量的检测

荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠经 pVHN 治疗后, 与 control 组(单纯荷瘤对照组)相比, 其 CD8⁺ T 淋巴细胞数量显著增加 (N = 10, P < 0.05), CD3⁺, CD4⁺ T 淋巴细胞数量变化不明显 (N = 10, P > 0.05), (见图6)。

3 讨论

目前 NDV 抗肿瘤的应用主要集中在两个方面, 一

是把 NDV 作为佐剂用于人体,通过细胞因子等发挥抗肿瘤作用,另外是在体外以 NDV 修饰肿瘤细胞,然后再将细胞输回体内,经放射处理和 NDV 感染的肿瘤细胞没有了致瘤性,但其对免疫系统的作用加强了,使宿主能够排斥该类肿瘤。NDV 在肿瘤细胞内复制使细胞表面产生了大量的病毒蛋白(如 HN 蛋白),被病毒蛋白修饰的肿瘤细胞抗原性提高,与机体内的杀伤性淋巴细胞的相互作用加强^[10]。细胞被新城疫病毒感染后产生多种细胞因子和化学因子^[11],这些物质的生物学意义在于干扰病毒的复制同时诱导细胞进入凋亡程序使感染不能持续。另外,新城疫病毒能够去掉肿瘤细胞表面部分唾液酸,暴露肿瘤抗原加强机体免疫系统对肿瘤细胞的作用^[5]。新城疫病毒能选择性地地在肿瘤细胞内复制而不感染周围正常组织,这是它发挥作用的优势所在,但病毒应用于人体后不可避免要产生抗体,这些抗体对于病毒的反复应用是一个很大的限制,能否解决这个问题对 NDV 进一步应用于抗肿瘤是关键。体外实验已经证实,NDV 弱毒株能选择性杀伤人宫颈癌细胞系(KB8-5-11)、成神经纤维瘤细胞系(IMR32)、Wilm 肿瘤细胞系(G104)、纤维肉瘤细胞系(HT1080)、膀胱癌细胞系(HCV29)和骨肉瘤细胞系(KHOS)的瘤细胞,而对正常人的细胞无明显影响^[10]。国内外研究结果表明,NDV 的 HN 基因不仅在感染禽类起着重要作用,而且有可能是 NDV 抗肿瘤作用的主要分子基础。研究该基因对于揭示 NDV 抗肿瘤确切机制以及开发基因工程抗肿瘤制剂有重要意义。

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。本实验中,我们应用 NDV HN 基因构建的核酸疫苗 pVHN,在体外转染 OS732 细胞,能显著降低该肿瘤细胞表面唾液酸含量;瘤内注射后,发现该核酸疫苗降低了荷瘤鼠血清唾液酸,但在体内是否也降低了肿瘤细胞表面的唾液酸尚待进一步证实。pVHN 核酸疫苗用于荷 S180 肉瘤鼠显著提高了淋巴细胞亚群中 CD8⁺ T 淋巴细胞的数量,由此推测 HN 蛋白可能是 NDV 抗肿瘤作用的分子基础。体内应用 NDV 能产生多种细胞因子,NDV 在体外感染肿瘤细胞后,能够在肿瘤细胞内大量增殖并诱导多种肿瘤细胞直接进入凋亡程序,对这些现象的分子机制尚无全面的认识,分离 NDV 功能基因并构建真核表达载体,观察单个基因体内应用后对肿瘤细胞的作用,对于阐明 NDV 抑瘤的分子机制及筛选有效的病毒抗肿瘤基因具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M],第2版,北京:科学出版社,1997.
- [2] Csatory LK, Moss RW, Beuth J, et al. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H)[J]. *Anticancer Res*, 1999, 19: 635-638.
- [3] Csatory IK, Eckhardt S, Bukoza I. Attenuated veterinary vaccine for the treatment of cancer[J]. *Cancer Detect Prev*, 1993, 17: 619-627.
- [4] Powell LD, Whiteheart SW, Hart GW. Cell surface sialic acid influence tumor cell recognition in the mixed lymphocyte reaction[J]. *J Immunol*, 1987, 139: 262-270.
- [5] Schirrmacher 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: 63-73.
- [6] 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 J Oncol*, 1998, 13: 1105-1115.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [8] 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: 153-154.
- [9] 丁壮, 金宁一, 王兴龙, 等. 应用 Bac to Bac 系统表达 NDV 长春株 HN 蛋白基因[J]. *动物医学进展*, 2001, 22: 101-105.
- [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: 521-530.
- [11] Washburn B, Schirrmacher V. Human tumor cell infection by newcastle disease virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21: 85-93.

图6 荷 S180 肿瘤 BALB/c 鼠脾 T 淋巴细胞亚群

Fig. 6 T lymphocyte subsets of BALB/c mice bearing S180 sarcoma

许多学者研究证实,肿瘤细胞的唾液酸含量明显高于正常细胞,而唾液酸对细胞表面抗原决定簇有掩盖作用,它可阻止受体被相应的配基识别,同时也阻断了抗原部位被免疫系统识别^[10]。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