

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0211-04

甲型流感病毒治疗小鼠 S180 腹水瘤的研究

曾国宇¹, 辛艳飞³, 李明远², 李虹², 肖丽英², 蒋中华²(1. 成都市温江区人民医院, 成都 611130; 2. 四川大学华西医学中心, 成都 610041; 3. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

[摘要] 目的: 从机体的免疫应答来探讨甲型流感病毒对小鼠 S180 腹水瘤的作用机制。方法: 小鼠 S180 腹水瘤模型建立后, 分别腹腔注射生理盐水或甲型流感病毒治疗 15 d。观察实验小鼠的生存时间; 用 ELISA 法检测小鼠血清 IL-2、IL-6 和 TNF- α 的含量; DNA ladder 法、流式细胞仪(FCM)、荧光显微镜检查和电镜(EM)用以检测腹水瘤细胞凋亡。结果: 用甲型流感病毒治疗的实验组荷瘤小鼠的平均存活时间、生存率均显著高于生理盐水对照组。实验组小鼠血清中 IL-2、IL-6、TNF- α 的含量亦显著高于对照组。实验组小鼠腹水瘤细胞 DNA 发生了特异性降解, 出现典型的 DNA 梯形条带。结论: 甲型流感病毒对于小鼠 S180 腹水瘤具有治疗作用, 在此过程中, 有机体免疫系统的参与和肿瘤细胞凋亡的产生, 而病毒本身通过腹腔注射并不引起小鼠的死亡。

[关键词] 甲型流感病毒; S180 腹水瘤; 细胞因子; 细胞凋亡

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

The Therapeutic Effect of Influenza A Virus on Murine S180 Ascites Tumor

ZENG Guo-yu¹, XIN Yan-fei³, LI Ming-yuan², LI Hong², XIAO Li-ying², JIANG Zhong-hua²(1. Wenjiang People Hospital, Chengdu 611130, China; 2. West China Medical Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunological mechanism of influenza A virus for murine S180 ascites sarcoma. **Methods:** After inoculation with S180 sarcoma cells, mice were i. p. injected with influenza A virus or vehicle 15 days. The average living time and survival rate of the mice were examined. The levels of IL-2, IL-6 and TNF- α were detected. The sarcoma cell's apoptosis was detected by DNA ladder, flow cytometry (FCM), fluorescent microscope and electron microscope (EM). **Results:** The average living time and survival rate of the mice injected with Influenza A virus were significantly longer or higher than that of the controls. The levels of IL-2, IL-6 and TNF- α also had the same differences. The apoptosis cells were detected by EM and fluorescent microscope. Sub-diploid peaks were observed by FCM analysis and DNA ladder was seen after electrophoresis in the ascites cells. **Conclusion:** Our results demonstrated that the feasibility and potential of delivery of influenza A virus as a general means for the treatment of S180 ascites sarcoma.

[Key words] influenza A virus; S180 ascites sarcoma; cytokine; apoptosis

甲型流感病毒为流感病毒的一个型别, 分类学上属正黏病毒科, 为 RNA 病毒, 主要通过呼吸道引起感染。关于甲型流感病毒抗肿瘤的研究较多^[1-6], 主要集中在体外实验和动物实验的初步研究上, 而对于甲型流感病毒抗肿瘤作用机制的研究还较为少见。本实验在考察甲型流感病毒的抗肿瘤作用的基础上, 进一步从机体抗肿瘤免疫和病毒引起的肿瘤细胞凋亡的角度对其作用机制加以探讨。

1 材料与方法

1.1 主要材料

甲型流感病毒为甲₃型, 蜀防 96/100, H₃N₂, 1:40 (+ + + +), 第二代尿囊液(购于四川省卫生防疫站)。RPMI-1640 细胞培养液(Life Tech. Co., USA), 膜链蛋白 V 荧光染色试剂盒, 小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒, 小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)。

1.2 实验动物

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970830)

[作者简介] 曾国宇(1970-), 男, 四川广元人, 讲师, 医学硕士, 主要从事病原学及肿瘤生物治疗研究

E-mail: zguoyu@163.net

荷瘤昆明小鼠(带小鼠肉瘤细胞 S180, 购于华西医大肿瘤研究所), 雄性, 18~22 g。10 d 龄鸡胚(购于成都生物制品研究所)。

1.3 小鼠肿瘤模型的建立及实验

抽取荷瘤小鼠腹腔液, 用 RPMI-1640 细胞培养液洗涤腹腔液 2 次, 离心 3 000 r/min, 5 min, 弃上清。用的 RPMI-1640 稀释肿瘤细胞至 $5 \sim 7 \times 10^6$ /ml。将 30 只昆明系小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。给随机分为 3 组, 病毒治疗组和肿瘤对照组小鼠注射 S180 肿瘤细胞(15 ml/kg), 病毒对照组小鼠注射生理盐水(15 ml/kg)。注射肿瘤细胞 36 h 后, 病毒治疗组小鼠注射高效价甲型流感病毒(15 ml/kg, 血凝效价为 1:1 280, 通过多次鸡胚培养获得), 肿瘤对照组小鼠注射生理盐水(15 ml/kg), 病毒对照组小鼠注射甲型流感病毒(15 ml/kg, 血凝效价为 1:1 280), 每日给药 1 次, 连续 1 周后停 1 d, 再连续注射 1 周, 以上均为腹腔注射^[7]。

1.4 各项指标的检测

1.4.1 流式细胞术(FCM)检测

无菌条件下, 抽取实验小鼠腹腔液, 用无菌生理盐水洗涤, 离心, 弃上清, 用 75% 酒精固定肿瘤细胞, 流式细胞仪检查。

1.4.2 电镜(EM)检查

将从小鼠腹腔抽出的腹腔液, 用灭菌生理盐水洗涤 2 次, 弃上清, 再用 3% 戊二醛洗涤 1 次, 离心 15 min, 8 000 r/min, 弃上清, 用 1 ml 戊二醛固定, 电镜检测。

1.4.3 细胞凋亡的 DNA ladder 法检测

抽取小鼠腹腔液中的 S180 腹水瘤细胞约 1 ml, PBS 洗涤 1 次。3 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。加入 50 μ l 的细胞裂解液混匀, 置 37℃ 水 1 h。后加蛋白酶 K 至 100 μ g/ml, 50℃, 3 h。等体积的苯酚/氯仿(1:1), 苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿各抽提 1 次。上清液中加入 0.2 μ l, 10 mmol/L 醋酸胺和 2 倍体积冷乙醇, 4 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 电泳^[8]。

1.4.4 荧光染色检测凋亡细胞

抽取病毒治疗组小鼠腹水用生理盐水洗涤 2 次。用 PBS 洗涤 1 次, 弃上清。将细胞沉淀悬浮于 100 μ l 的染色液中(20 μ l annexin-V-fluorescein labeling reagent, 1000 μ l HEPES buffer, 200 μ l PI), 15~20℃ 放置 15 min, 在荧光显微镜下观察(激发波长 500 nm, 检测波长 515~565 nm)。

1.4.5 细胞因子(IL-2, IL-6, TNF- α)的检测

小鼠摘眼球取血, 制血清, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测^[9-10]。

1.5 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 双侧 *t* 检验进行组间显著性分析。P < 0.05 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物实验结果

结果表明, 单纯腹腔注射甲型流感病毒并不会引起小鼠(*n* = 10)的死亡。肿瘤对照组小鼠(*n* = 10)则腹水逐渐增多, 最后可能由于压迫心、肺, 而至死亡, 平均生存期为 18.5 d。实验组小鼠(*n* = 10)经腹腔注射甲型流感病毒后, 腹水逐渐吸收, 平均生存期为 31 d。

2.2 流式细胞仪检测结果

与肿瘤对照组样品相比, 病毒治疗组出现 Sub-G₁ 峰, 比例为 7%(图 1)。

图 1 流式细胞仪分析甲型流感病毒对小鼠 S180 腹水瘤的作用

Fig. 1 Flow cytometry analysis of the effect of influenza A virus on S180 ascites sarcoma

A: Control; B: After 7 d treatment;
C: After 14 d treatment

2.3 电镜检查结果

注射病毒 7 d 后的小鼠腹水瘤细胞体积较注射 14 d 后的大, 但均可发现染色质聚集成团。早期凋亡细胞可发现染色质呈新月形, 着边, 染色深, 另有胞浆线粒体肿胀等现象(图 2)。

2.4 小鼠 S180 肿瘤细胞凋亡的 DNA ladder 法检测结果

注射病毒 7 d, 14 d 后小鼠 S180 肉瘤细胞 DNA 经电泳后呈梯状分布, 而注射生理盐水组小鼠 S180 肉瘤细胞 DNA 则无此现象出现(图 3)。

图 2 电镜下观测甲型流感病毒所致小鼠 S180 肿瘤细胞的调亡(×6 000)

Fig. 2 Apoptosis of S180 ascites sarcoma cells detected by electron microscope (×6 000)

图 3 DNA ladder 法检测甲型流感病毒对小鼠 S180 肿瘤细胞的作用

Fig. 3 DNA ladder induced by influenza A virus in S180 ascites sarcoma cell

1: DNA marker; 2: Control cell; 3: The sarcoma cell after 7 d treatment; 4: The sarcoma cell after 14 d treatment

2.5 荧光染色结果

异硫氰酸素荧光(FITC)标记 Annexin V 结合 PI 对调亡细胞进行双染色, 在荧光显微镜下观察, 病毒治疗组发现调亡细胞, 对照组均为发现调亡细胞。

2.6 细胞因子检测结果

注射病毒 1 周后, 病毒治疗组小鼠血清中 IL-6 含量为 1.59 ± 0.03 pg/ml 左右, 并且在试验期间维持该水平, 而肿瘤对照组仅为 1.20 ± 0.02 pg/ml, 其差异具有显著性 ($P < 0.005$)。病毒治疗组小鼠血清中 IL-

2 的含量从注射 1 周时的 9.33 ± 3.84 pg/ml 迅速上升到注射 2 周时的 179.67 ± 2.58 pg/ml; 同时小鼠血清中 TNF- α 的含量从注射 1 周时的 204 ± 3.35 pg/ml 也快速上升到注射 2 周时的 515 ± 20.7 pg/ml。病毒治疗组对肿瘤对照组的 *t* 检验表明: 治疗 1 周后 IL-2, $P < 0.01$; 2 周后, $P < 0.005$ 。而 1, 2 周后小鼠血清 TNF- α , $P < 0.005$ 。

3 讨论

本研究在病毒抗肿瘤的体内实验对体内的细胞免疫和肿瘤细胞调亡方面进行了一些探索, 从研究结果可以看出, 活流感病毒在试验动物体内具有抑制小鼠 S180 腹水瘤细胞生长的作用。

病毒治疗组小鼠的生存时间的显著延长、其肉瘤细胞中调亡小体的出现、流式细胞图上调亡峰的明显出现及荧光显微镜下调亡细胞的发现均表明活甲型流感病毒具有治疗小鼠 S180 腹水瘤作用。同时结果反映出利用甲型流感病毒治疗小鼠 S180 肉瘤时, 病毒能激活机体的调亡机制, 引起肿瘤细胞的调亡, 达到治疗肿瘤的目的。但从流式细胞仪检测结果来看, 由于病毒治疗组小鼠肿瘤细胞调亡的比例并不高, 似乎调亡不是引起肿瘤消退的主要原因。

免疫试验反映出病毒治疗组荷瘤体内 IL-2, IL-6 和 TNF- α 等细胞因子显著高于肿瘤对照组鼠血清说明给 S180 小鼠注射甲型流感病毒后, 体内细胞免疫的参与是积极的、明显的, 也是非常重要的, 可能是机体抗肿瘤的主要机制。体内产生白介素的细胞较多, 如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞等, 其对多种免疫细胞具有激活、趋化细胞因子有加强免疫效应的的作用。而 TNF- α 主要由巨噬细胞产生, 主要作用为杀伤肿瘤细胞, 对免疫细胞有调节、诱生作用。在抗肿瘤免疫中, 细胞免疫比体液免疫起着更为重要的作用, 一般认为 T 细胞主要作用于抗原性较强的肿瘤, 而巨噬细胞与 NK 细胞处于抗肿瘤第一道防线的地位。目前有资料显示, IL-2 可通过诱导 bcl-2 的表达而抑制肿瘤细胞调亡, 而 TNF 可通过与肿瘤细胞表面受体结合而诱导肿瘤细胞发生调亡^[9]。究竟甲型流感病毒作用后, 小鼠体内 IL-2, IL-6 和 TNF- α 的大量产生与肿瘤细胞调亡之间关系如何, 相互之间怎样协同作用导致肿瘤细胞消失而引起治疗作用, 这些需要我们以后的进一步实验加以解决。

[参考文献]

- [1] 陈启新, 李继秋, 李燕, 等. 流感病毒治疗小鼠腹水瘤的实验研究[J]. 承德医学院学报, 1996, 13(4): 270-273.
- [2] Sjolander A, Bengtsson K, Morein, *et al.* Kinetics, localization and cytokine profile of T cell responses to immune stimulating com-

- plexes (iscoms) containing human influenza virus envelope glycoproteins [J]. Vaccine, 1997, 15(9): 1030-1038.
- [3] Rott O, Charrier J, Cash E, *et al.* Influenza a virus hem agglutinin is a B cell super stimulatory lectin [J]. Med Microbiol Immunol Berl, 1996, 184(4): 185-193.
- [4] Dento G, Sekowski M, Price M, *et al.* Induction of antibody response to breas carcinoma associated mucins using synthetic peptide construction as immunogens [J]. Cancer Lett, 1993, 770(3): 143-149.
- [5] Takizawa T, Shiggeru Y, Higguchi S, *et al.* Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells [J]. J Gen Virol, 1993, 74(pt11): 2347-2354.
- [6] Himshaw VS, Olsen CW, Dybdahl N, *et al.* Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and B virus [J]. J Virol, 1994, 68(6): 3667-3673.
- [7] 米志强, 金宁一, 龚伟新, 等. 城疫病毒 HN 基因构建的核酸疫苗抗肿瘤作用研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(2): 93-96.
- [8] 郑从义, 胡国斌, 吴海祥, 等. 乙型流感病毒诱导 Hela 细胞凋亡并伴随 P16 蛋白高效表达 [J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2000, 20(2): 151-253.
- [9] Mantovani G, Maccio A, Pisano M, *et al.* Tumor-associated lymphmonocytes from reoplastic effusions are immunologically defective in comprision with patient autologus PBMNCS but are cap able of releasing high amounts of various cytokines [J]. Int J Cancer, 1997, 71(5): 724-731.
- [10] 袁小林, 程一, 王艳, 等. PHA-LAK 细胞激活过程中多项免疫学指标的动态分析 [J]. 上海免疫学杂志, 1997, 17(4): 204-207.
- [收稿日期] 2004 - 12 - 06 [修回日期] 2005 - 03 - 10
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

IL-4 通过抑制树突状细胞合成 IL-10 以促进 IL-12 的分泌

长久以来, IL-4 被认为是强效诱导 Th2 分化的细胞因子, 近来越来越多的文献报道 IL-4 也能促进树突状细胞(dendritic cells, DCs)合成 IL-12, 进而诱导 Th1 型免疫应答, 但是其中的具体机制有待进一步阐明。

作者首先研究了 IL-4 对 LPS 诱导 DCs 成熟分泌细胞因子的影响。结果发现 IL-4 抑制 LPS 诱导的 DCs 分泌 IL-10, 同时促进 IL-12 p70 的产生。并且, IL-4 是通过下调 IL-10 mRNA 或上调 IL-12 p35 mRNA 转录进而影响相应蛋白的生成。同样条件下 IL-4 并不影响 LPS 活化的 DCs 分泌 IL-6 和 TNF- α 。此外, IL-4 只能抑制 DCs 合成 IL-10, 并不抑制反而促进 LPS 诱导的 B 细胞分泌 IL-10。因此 IL-4 对 IL-10 的抑制作用具有细胞特异性, 也证实 IL-4 可通过促进 B 细胞分泌 IL-10 诱导 Th2 型免疫应答。

利用 IL-10 缺陷小鼠, 作者研究 IL-4 促进 DCs 分泌 IL-12 与其抑制 IL-10 的关系。结果发现, 与正常对照小鼠的 BMDCs 相比, IL-10 缺陷小鼠的 BMDCs 经 LPS 刺激后 IL-12 的 mRNA 及蛋白水平明显增高。更重要的是, 在 IL-10 缺陷小鼠, IL-4 促进 DCs 合成 IL-12 及增强 IL-12p35 mRNA 转录的效应被阻断。以上结果提示 IL-10 为 IL-4 促进 DCs 合成 IL-12 所必需。

分离 DO11.10 转基因小鼠的 CD4⁺T, 经 OVA 肽冲击后, 与不同小鼠来源及处理后的 BMDCs 孵育 5 d, anti-CD3 刺激过夜, 检测上清中 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平。结果显示, 与单独 LPS 处理组相比, 野生型小鼠 BMDCs 经 IL-4 + LPS 处理后诱导 CD4⁺T 分泌 IFN- γ 的水平显著增强, 同时 IL-4 的水平明显降低, 提示 IL-4 可活化 DCs 诱导 Th1 型细胞免疫。但是, IL-4 却不能促进 IL-10 缺陷小鼠来源的 BMDCs 诱导 CD4⁺T 分泌更多的 IFN- γ , 因此, IL-4 通过抑制 DCs 分泌 IL-10 在 Th1 细胞的分化中发挥重要的诱导作用。

IL-4 通过活化 Stat6 分子调控下游基因的表达, 作者利用 Stat6 缺陷小鼠研究了 Stat6 对 IL-4 抑制 DCs 分泌 IL-10 的影响。与对照小鼠来源的 DCs 不同, IL-4 不能抑制 Stat6 缺陷小鼠来源的 DCs 分泌 IL-10, 因此 Stat6 分子为 IL-4 抑制 DCs 产生 IL-10 所必需。

用 actinomycin D 抑制 RNA 新合成, 检测 IL-10 mRNA 的稳定性, 发现 IL-4 不影响 IL-10 mRNA 半衰期长短。IL-10 启动子荧光素酶报告基因转染 DC 细胞株 DC2.4 细胞, 研究 IL-4 对 LPS 诱导 IL-10 启动子转录活化的影响。结果发现 LPS 可诱导 DC2.4 细胞 IL-10 启动子转录, 当 LPS 联合 IL-4 时, IL-10 启动子转录活性明显降低, 提示 IL-4 是通过抑制 IL-10 启动子转录进而抑制 LPS 诱导的 DCs 合成 IL-10。

启动子转录活化与 H4 组蛋白乙酰化密切相关, 染色体免疫沉淀实验测定 H4 组蛋白乙酰化水平, 发现 LPS 可诱导 IL-10 启动子组蛋白乙酰化, 且 IL-4 能明显抑制 LPS 的这种效应, 提示 IL-4 通过降低 H4 组蛋白乙酰化抑制 IL-10 基因转录。并且研究还发现, Stat6 缺陷小鼠中, IL-4 对 IL-10 启动子组蛋白乙酰化活化的抑制作用被阻断。因此 IL-4 通过活化 Stat6 通路抑制 IL-10 基因转录, 但是 IL-4 如何通过 Stat6 抑制 IL-10 基因转录并不清楚。

总之, 本研究证实 IL-4 通过降低 IL-10 启动子 H4 组蛋白乙酰化抑制 IL-10 合成, 进而促进 IL-12 产生, 并诱导 Th1 免疫应答。考虑到 IL-4 可通过增强 B 细胞分泌 IL-10 诱导 Th2 免疫应答, 因此 IL-4 对 Th 细胞的分化具有双向调节作用, 在免疫应答起始阶段, IL-4 与不同种类的 APCs 相互作用, 在诱导 CD4⁺T 分化 Th1 或 Th2 的过程中起关键作用。

[徐红梅 摘 / 英] / Yongxue Yao... // JEM, 2005, 201:1899-1903]