

新城疫病毒 FMW 株体外溶瘤作用及其机制分析

孟松树^{1#}, 白海^{1#}, 胡茂志¹, 刘文博², 王莉², 吴艳涛², 焦新安¹, 范健^{1*}

(扬州大学¹ 生物科学与技术学院; ² 兽医学院 扬州 225009)

摘要 【目的】筛选出能高效抑制多种人肿瘤细胞生长增殖的新城疫(New Castle disease virus, NDV)毒株,为进一步构建重组高效靶向溶瘤毒株奠定基础。【方法】以体外噬斑法测定 NDV 对 A549、SMMC7721 等肿瘤细胞及人胚干细胞 L-O2、人胚肾细胞 HEK293 等的生长抑制率,空斑试验确定病毒滴度及感染复数。利用形态学观察、Hoechst 荧光染色、流式细胞术及免疫印迹等分析了 NDV-FMW 诱导肿瘤细胞凋亡的细胞生物学变化及其机制。【结果】从近 50 株 NDV 中筛选出 NDV-FMW,以 20 MOI 病毒作用 A549、SMMC7721 等肿瘤细胞 48 h,细胞生长抑制率达 60%,NDV-FMW 诱导肿瘤细胞发生凋亡,效应呈时间和剂量的依赖性,凋亡细胞出现核染色质断裂、浓缩及二倍体亚峰,细胞周期阻滞于 G0/G1 期,此外,病毒感染 A549 细胞 16 h 后开始检测到活化的 Caspase-3 裂解片段及 PARP 裂解大片段。【结论】NDV-FMW 株体外能高效抑制肿瘤细胞的增殖,并经 Caspase-3 途径诱导肿瘤细胞凋亡。FMW 株具有自主知识产权,其良好的体外溶瘤能力为进一步探讨体内抗肿瘤及临床试验的进行奠定了基础,并有可能为恶性肿瘤的治疗提供新的生物制剂。

关键词: 新城疫病毒; 溶瘤病毒; 细胞凋亡

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)04-0512-06

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是副黏病毒科腮腺炎病毒属成员,主要感染禽类,对人可引起发热等轻微症状。自 1955 年首次记载 NDV 能在肿瘤细胞中复制并杀伤肿瘤细胞以来,人们一直在尝试将 NDV 用于治疗恶性肿瘤^[1-2],目前国外学者已经筛选出不少可以杀伤肿瘤细胞的 NDV 毒株,如 MTH-68、Italien、Ulster、73-T、Hickman 等,其中 PV701、73-T、MTH68、NDV-HUJ 等作为溶瘤病毒已进入临床试验^[3-5],部分 II、III 期试验结果已显示出 NDV 在临床肿瘤治疗方面的良好前景。

鉴于国内已报道用于溶瘤研究的 NDV 毒株仅 Lasota、F48E9 等^[6-7],作者从扬州大学农业部畜禽传

染病重点开放实验室保存的已鉴定过的近 50 株 NDV 中,经细胞增殖试验初步筛选出几株杀肿瘤细胞率在 40% 以上的毒株,其中 NDV-FMW 株对肺癌 A549 细胞、肝癌 SMMC 7721 细胞等肿瘤细胞杀伤率达 60%,此外 NDV-FMW 株可能经 Caspase-3 途径诱导了肿瘤细胞的凋亡,对 NDV FMW 株的进一步研究为改进该毒株的溶瘤能力及靶向性以构建重组溶瘤 NDV 及临床应用提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞株与实验动物:新城疫病毒毒株

基金项目 江苏省自然科学基金(BK2006071);江苏省卫生厅项目(H200763)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971805; Fax: +86-514-87991747; E-mail: fanjian@yzu.edu.cn

作者简介: # 并列第一作者。孟松树(1965-),男,江苏人,博士,副教授,研究方向为细胞信号转导及肿瘤生物治疗, E-mail: ssmeng@yzu.edu.cn; 白海(1982-),男,江苏人,硕士,研究方向为肿瘤生物治疗, E-mail: sceseabh@gmail.com

收稿日期 2008-10-16; 修回日期 2008-12-29

由扬州大学农业部重点实验室提供,人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 SMMC7721、人乳腺癌细胞 MCF-7、人白血病细胞 K562 由上海复旦张江生物医药公司提供。人结肠癌细胞 SW480、正常人胎肝细胞 L-02、HEK-293 等本室保存,人前列腺癌细胞 LNCap 购自北京博大生物技术公司。A549、MCF-7、SW480、HEK-293 等几株细胞均采用 DMEM 培养基培养(加入 10% 灭能胎牛血清和 1% 青链霉素),K562、SMMC7721、LNCaP、L-02 等几株细胞均采用 RPMI 1640 培养基培养。8 日龄 SPF 鸡胚由扬州大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:抗体:anti-PARP(P85)购自 Promega 公司;anti-caspase 3、anti- β -actin 购自 Sigma 公司,HRP 标记的驴抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司,噻唑蓝(MTT)、Hoechst33258 染色剂、PI 染色剂购自南京大治生物科技有限公司;Annexin V/PI 蛋白酶抑制剂 leupeptin、aprotinin、phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) pepstain 购自 Sigma 公司,化学发光显色底物(ECL)为 Pierce biotech 公司产品。CO₂ 培养箱购自 NuAire 公司,5417R 型冷冻高速离心机购自 Eppendorf 公司。

1.1.3 培养基:含 4.5 g/L D-Glucose 的 Delbecco's Modified Eagle Media(DMEM)培养基(Cat no:11965)购自 Invitrogen 公司。

1.2 病毒滴度的测定

以 8 日龄鸡胚制备成纤维细胞,六孔板每孔 5×10^5 个细胞,细胞长成单层后,吸附不同稀释倍数的病毒,37℃作用 1 h,添加含 1.5% 琼脂糖的 DMEM 培养基(含 4.5 g/L D-Glucose)37℃、5% CO₂ 的饱和湿度环境下培养 72 h,0.3% 中性红染色,计算空斑数目,定量病毒。在病毒作用于靶细胞之前,稀释成不同的感染复数(multiplex of infection,MOI)。

1.3 细胞生长抑制试验

采用体外噻唑蓝(MTT)法检测 NDV FMW 株对 A549、SMMC7721 等肿瘤细胞的杀伤作用,病毒作用肿瘤细胞时间分别为 24 h、48 h、72 h,杀伤率 = $1 - \text{实验孔 OD 值} / \text{对照孔 OD 值} \times 100\%$ 。试验重复 3 次,结果取平均值。

1.4 Hoechst 33258 染色、PI 单染及 Annexin V/PI 双染流式细胞术

主要操作步骤按文献 8 进行。

1.5 免疫转印、ECL 化学发光检测

主要按文献 9 进行。

2 结果

2.1 NDV-FMW 株抑制肿瘤细胞生长增殖

从约 50 株 NDV 中经 MTT 法筛选到的 NDV FMW 株,空斑法测定 NDV FMW 株的病毒滴度为 2×10^7 PFU/ML,以 20 MOI 病毒作用于人肝癌细胞株 SMMC7721 肺癌细胞株 A549 24 h 杀伤率分别为 36.2% 和 27.3% 48 h 分别为 62.7% 和 59.8% 72 h 后略有升高(图 1),而对正常人胚胎肝细胞 L-02 及人胚肾细胞 HEK293 的 48 h 杀伤率均不到 1%。试验中大部分毒株如 lasota 等 24 h 杀伤率低于 20%,48 h 杀伤率低于 25%(试验结果未显示)。

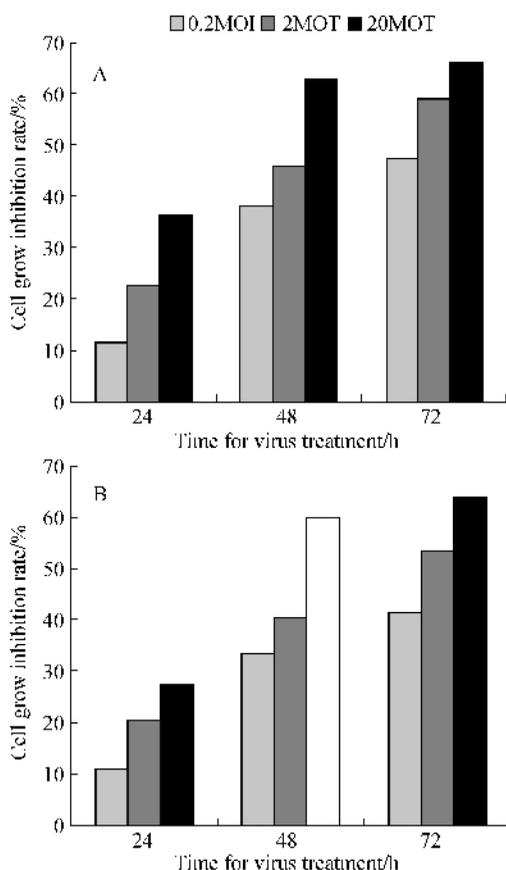


图 1 NDV-FMW 株作用 SMMC7721(A) A549(B) 细胞 24、48、72 h 对细胞的生长抑制率

Fig.1 Inhibitory effects on growth in SMMC7721(A) and A549(B) cells treated with NDV-FMW for 24, 48 and 72 hours.

2.2 细胞形态学变化、细胞凋亡及细胞周期分析

以不同感染复数病毒作用 A549、SMMC7721 后不同时间,经 Hoechst33258 染色分析,24 h 后观察到细胞质浓缩凝集及因细胞凋亡引起的细胞核的形态变化,48 h 后细胞凋亡特征明显,72 h 后凋亡程度加剧,并伴有大量细胞碎片(图 2),并且细胞凋亡程度和病毒的感染复数及作用时间呈正相关。

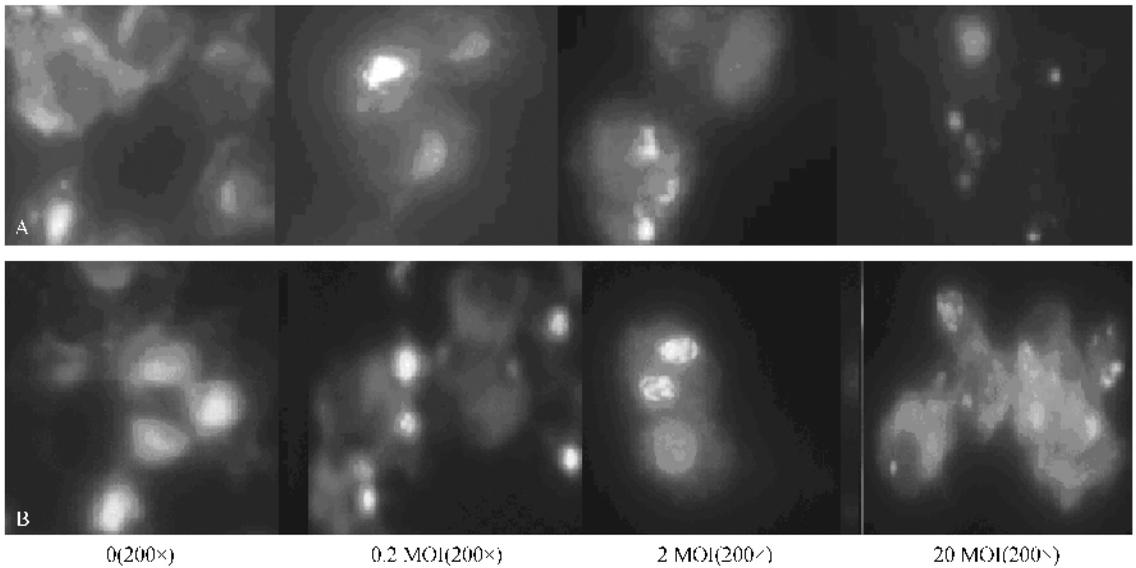


图2 NDV-FMW株处理 A549 细胞 24 h (A)、48 h (B) h Hoechst33258 荧光染色结果

Fig.2 Fluorescence photomicrographs of A549 cells stained with hoechst33258 after treated with NDV-FMW for 24 and 48 hours.

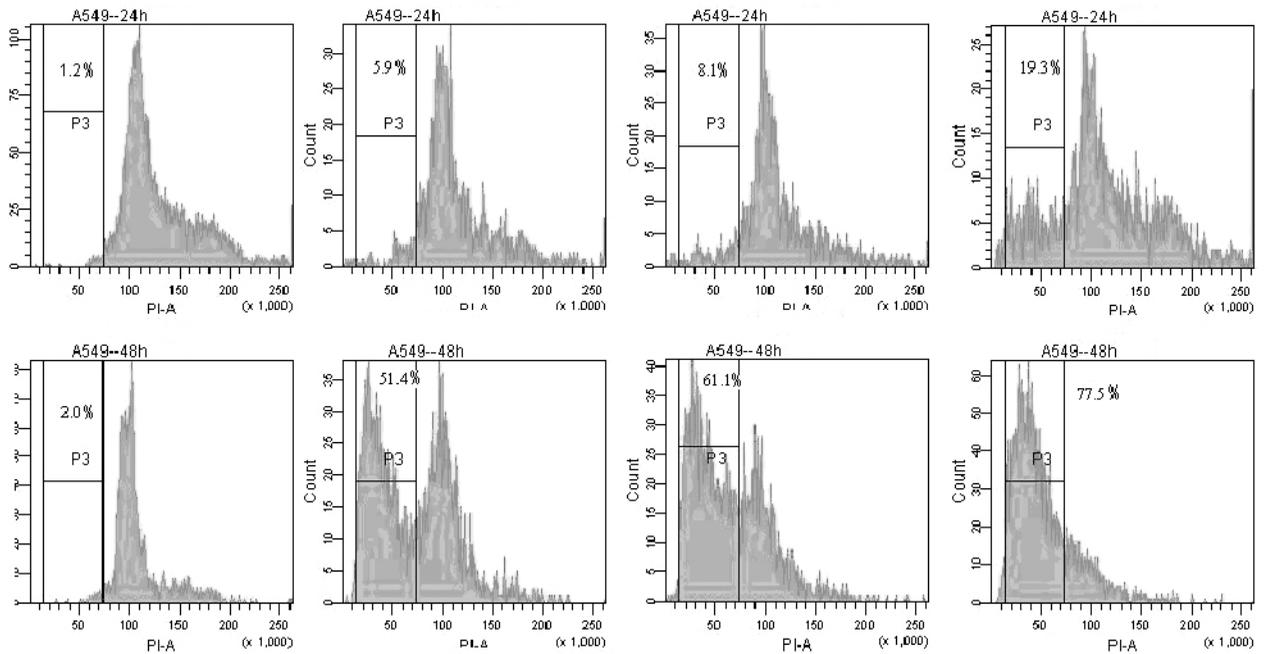


图3 NDV 处理 A549 细胞 24、48 h PI 单染法 FACS 检测细胞凋亡率

Fig.3 Apoptosis of A549 cells treated with NDV-FMW for 24 and 48 hours.

PI 单染的流式细胞术分析结果显示,不同感染复数的病毒作用细胞 24 h 及 48 h 后,出现明显的二倍体亚峰,且细胞凋亡比例与病毒量及作用时间呈正相关,分别以 0.2、2、20 MOI 的病毒作用于 A549 细胞 24 h 后的细胞凋亡率为 5.9%、8.1%、19.3%,48 h 后的凋亡率为 51.4%、61.1%、71.5%(图 3)。20 MOI 病毒作用 SMMC7721 细胞 48 h 凋亡率为 30.4%。细胞周期分析的结果表明,S 期细胞数量

呈现下降趋势,G0/G1 期细胞数量呈现上升趋势,表明细胞增殖被阻滞于 G0/G1 期。

另以 AnnexinV/PI 双染法分析的结果也表明 NDV-FMW 株诱导 SMMC7721 或 A549 细胞凋亡具有剂量效应(图 4)。

2.3 细胞凋亡相关蛋白表达水平检测

细胞凋亡启动后,经不同途径激活 Caspase-3,并进一步降解其底物 PARP,将其裂解为 85 kDa 的大

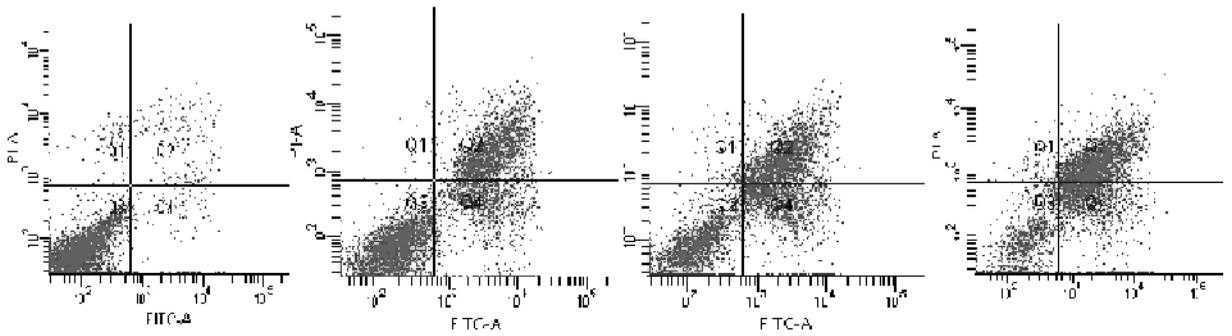


图4 NDV-FMW 株作用 SMMC7721 细胞 48 h Annexin V /PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率

Fig.4 Apoptotic analysis of SMMC7721 cells treated with NDV-FMW for 48 hours by Annexin-V-FITC/PI method.

片段和一小片段。以 10 MOI 病毒感染 A549 细胞 12 h 后就检测到 Caspase-3 的激活,感染 20 h 后 Caspase-3 的活化程度显著降低。类似的 SMMC7721 细胞在感染后 15 到 17 h 期间,Caspase-3 的活化达到高峰(图 5),另分别在 15~17 h (SMMC7721)或 16~19 h (A549)检测到裂解的 85 kDa PARP 大片段(图 6)。

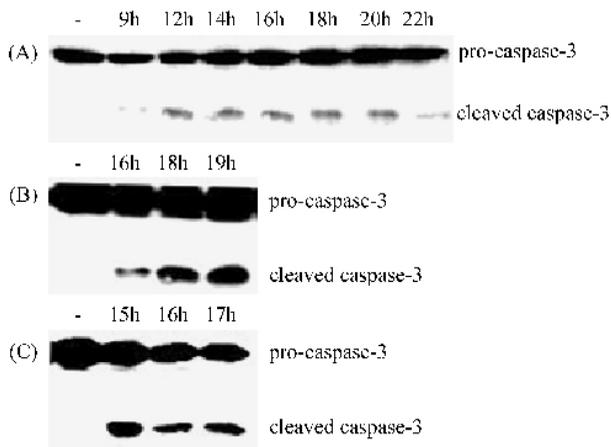


图5 10 MOI 病毒作用 SMMC7721(A,C)、A549(B)细胞不同时间后检测 Caspase-3 的活化

Fig.5 Caspase-3 activation in SMMC7721 (A,C) and A549 (B) cells treated with 10 MOI NDV-FMW.

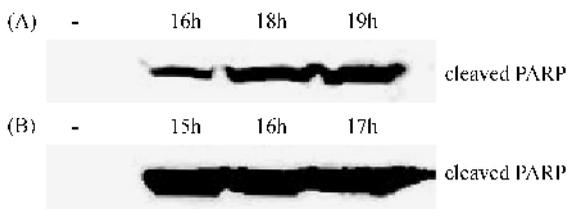


图6 10 MOI 病毒作用 A549(A)、SMMC7721(B)细胞不同时间后检测活化的 PARP 蛋白

Fig.6 PARP activation in A549 (A) and SMMC7721 (B) cells treated with 10 MOI NDV-FMW.

3 分析和讨论

3.1 NDV-FMW 具有较强的体外溶瘤性能

溶瘤病毒是近年来肿瘤生物治疗的热点,其安全性也受到高度关注,由于来源于禽类的新城疫病毒,对人无致病性,临床证实 NDV 溶瘤谱广且毒副作用轻微,因此,新城疫病毒作为溶瘤病毒其研究正不断深入,目前国外学者已筛选不少毒株如 73T、MTH68 等进入临床试验^[3-5],而构建高效溶瘤新城疫重组病毒的研究也在进行之中。

本研究从 50 余株 NDV 中筛选出 NDV FMW 株,其对试验用数种肿瘤细胞均具有较高的杀伤率,对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 SMMC7721 24 h 杀伤率均达 30% 48 h 杀伤率达 60%,且对人正常细胞的生长增殖影响甚微,表明 NDV FMW 是一株高效广谱的溶瘤毒株。鉴于 NDV FMW 是一强毒株,因此,试验中应尽可能设置更多的正常细胞对照,来明确其生物安全性。NDV FMW 感染 A549、SMMC7721 等肿瘤细胞后细胞呈现典型的凋亡相关的形态学变化,FACS 分析出现明显的二倍体亚峰,并且细胞增殖阻滞于 G0/G1 期。这些与已报道的其他 NDV 溶瘤毒株致肿瘤细胞凋亡的细胞生物学效应基本一致^[10]。

3.2 NDV-FMW 经 Caspase-3 途径诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡,目前认为参与细胞凋亡的途径主要有两种:一是死亡受体途径,即外源性途径,主要激活 Caspase-8,二是线粒体途径,即内源性途径,主要激活 Caspase-9,两种凋亡途径最后都通过激活 Caspase-3,并进一步裂解其底物 PARP 等。已报道的 NDV 溶瘤株诱导肿瘤细胞凋亡的机制不尽相同。Subbiah 等(2006)的研究表明,以 NDV lasota 株及一些表达强毒 F 基因的重组 lasota

毒株诱导肿瘤细胞凋亡过程中,线粒体通透性发生变化,释放细胞色素 C,但不释放 Smac/DFBALO,凋亡早期 Caspase-9 和 Caspase-3 即被激活,在病毒感染晚期也检测到 Caspase-8 的激活,作者推断 NDV lasota 株诱导细胞凋亡主要通过线粒体途径,而不依赖于死亡受体途径^[11]。另对 NDV MTH-68/H 溶瘤株的研究(2007)显示,以 10 MOI MTH-68/H 感染 PC12 细胞后 10 h Caspase-3 和 Caspase-12 开始被激活,并一直持续到 24 h,但未检测到 Caspase-8 和 Caspase-9 的激活^[12]。国内学者(2003)也有报道,新城疫病毒 HN 基因在裸小鼠荷人结肠癌细胞表达后能下调胞内 Bcl-2 的表达并诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。这些研究结果表明 NDV 致肿瘤细胞凋亡的机制可能因毒株、细胞株等的不同而存在差异。本研究首次对 NDV-FMW 诱导 SMMC7721、A549 细胞凋亡过程中, Caspase-3 的活化及其底物 PARP 的裂解时相进行了探讨。NDV-FMW 感染 SMMC7721 早期 12 h 即检测到 Caspase-3 的活化,并一直持续到 20 h,相对应的 PARP 蛋白降解也在感染 15~17 h 期间达到高峰,在 A549 细胞中也得到类似的结果。这些研究结果均表明 NDV-FMW 经 Caspase-3 途径诱导了肿瘤细胞凋亡,但究竟是死亡受体途径还是线粒体途径为主,或两种途径都有参与,尚需进一步的研究。

本研究发现,病毒作用 A549 细胞 24~48 h 期间细胞凋亡率显著提高(SMMC7721 细胞并不明显),而 Caspase-3 活化在 20 h 已达高峰,以 A549 细胞培养液上清及细胞裂解物上清检测 NDV 的复制,结果均表明 NDV 无明显的复制(试验结果未显示),这表明 NDV-FMW 作用 A549 细胞 48 h 后凋亡率的显著提高可能不是由于病毒复制增殖的结果。对另一种与凋亡相关的信号蛋白 AKT(又称蛋白激酶 B)的活化检测结果表明,FMW 株作用 A549 细胞 18 h 后 AKT 活化程度开始降低,36 h 至 48 h 显著降低,而 SMMC7721 细胞中 AKT 活化程度降低并不明显(试验结果将另文发表)。这表明 NDV-FMW 株诱导肿瘤细胞凋亡与细胞的类型及病毒对细胞的敏感性选择等相关,病毒致不同肿瘤细胞凋亡的机制也不尽相同,这一结果也为将来 NDV-FMW 株在临床用于肿瘤的个性化治疗提供了理论基础。

3.3 对 NDV-FMW 的进一步研究

目前国外已进入 II 期、III 期临床试验的新城疫溶瘤毒株主要有 73T、PV701、MTH68 和 NDV-HUJ,其中前 3 株均为中等毒力毒株,NDV-HUJ 为弱毒株,国内报道的临床应用的毒株主要有 lasota IV、F48E9

等,而 NDV-FMW 是一种强毒株,其体外溶瘤能力比 lasota 株高 1 倍以上,且不影响正常细胞的生长增殖,这预示着 NDV-FMW 有潜在的应用前景。对 NDV-FMW 进一步的研究将集中在以下几个方面:(1)诱导细胞凋亡的分子细胞机制;(2)体内溶瘤试验;(3)初步的临床试验。目前国际上对溶瘤 NDV 的研究除不断完善原有毒株的临床试验外,构建插入不同治疗基因或抗体基因的重组溶瘤 NDV 以进一步增强 NDV 的溶瘤能力及靶向性,也是溶瘤 NDV 研究的主要发展趋势。

参考文献

- [1] Joseph GS, Joseph CH. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *Journal of Clinical Virology* 2000, 16:1-15.
- [2] Csatory LK. Viruses in the treatment of cancer. *Lancet*, 1971, 2:825.
- [3] Cassel WA, Murray DR. A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus oncolysate. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*, 1992, 9:169-171.
- [4] Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *Journal of Neurooncology*, 2004, 67:83-93.
- [5] Lorence RM, Roberts MS, O'Neil JD, et al. Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2003, 5:618-624.
- [6] 梁伟,孙铁民,梁仲奎,等.新城疫病毒对晚期恶性肿瘤的临床应用.中国综合临床(*Clinical Medicine of China*) 2004, 20(1):37-38.
- [7] 张沛怡,曹殿军,胡立华.新城疫病毒杀伤肝癌细胞的体外研究.中华肝脏病杂志(*Chinese Journal of Hepatology*) 2005, 13(6):467-468.
- [8] 徐坤山,吴建富,白海,等.紫草素诱导乳腺癌细胞凋亡的研究.扬州大学学报(农业与生命科学版)(*Journal of Yangzhou University Agricultural and Life Science edition*) 2008, 29(2):26-29.
- [9] Songshu Meng, Zhengming Chen, Munoz-Antonia T, et al. Participation of both Gab1 and Gab2 are in the activation of the Erk mitogen-activated protein kinase pathway by epidermal growth factor. *The Biochemical Journal*, 2005, 391:143-151.
- [10] Szeberenyi J, Fabian Z, Torocsik B, et al. Newcastle disease virus-induced apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells. *American Journal of Therapeutics*, 2003, 10:282-288.

- [11] Elankumaran S , Rockemann D , Samal SK . Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *Journal of Virology* , 2006 , 80(15) : 7522 - 7534 .
- [12] Fabian Z , Csatory CM , Seberenyi J , et al . p53-Independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *Journal of Virology* 2007 , 81(6) : 2817 - 2830 .
- [13] 连海 , 金宁一 , 米志强 , 等 . 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 . 中国肿瘤生物治疗杂志 (*Chinese Journal of Cancer Biotherapy*) 2003 , 10(2) : 88 - 92 .

Mechanisms of *in vitro* anti-tumor effects of a Newcastle disease virus

Songshu Meng^{1#} , Hai Bai^{1#} , Maozhi Hu¹ , Wenbo Liu² , Li Wang² , Yantao Wu² , Xinan Jiao¹ , Jian Fan^{1*}

(¹ College of Bioscience and Biotechnology , ² College of Veterinary Medicine , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : [**Objective**] To obtain Newcastle disease virus (NDV) strains with high *in vitro* anti-tumor effect for construction of recombinant NDV for clinical therapy . [**Methods**] We used MTT [3-(4 , 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 , 5-diphenyltetrazolium Bromide] assay to examine the anti-tumor effect on A549 and SMMC7721 cells infected by nearly 50 NDV strains . Several assays were used to analyze the apoptosis induced by NDV infection . These assays included (1) Morphological analysis ; (2) Hoechst ? fluorescence dye testing ; (3) Flow cytometric analysis , and (4) Western blot . [**Results**] We obtained an NDV FMW strain that inhibited cell growth up to 60% at 48 h postinfection with an MOI (multiplex of infection) of 20 . NDV- FMW could elicit apoptosis of infected tumor cells in a dose- and time- dependent manner . We observed the infected A549 and SMMC7721 cells with condensed and fragmented chromatin at 48 h postinfection . Apoptosis peak and hypodiploid cells were revealed by proidium iodide (PI) staining and cell cycle was blocked and arrested in G0/G1 phase in tested cells . Furthermore , annexin-V / PI staining showed that the apoptotic rates in SMMC7721 cells were 2.1% , 18.5% , 23.8% and 30.4% after treated with 0 , 0.2 , 2 and 20 MOI NDV-FMW for 48 h respectively . To elucidate the apoptosis pathways induced by NDV-FMW , we detected the expression of active caspase-3 and cleavages of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) . We demonstrated that caspase-3 in A549 cells was activated early at 16 h postinfection and PARP was cleaved subsequently . [**Conclusion**] NDV-FMW had strong *in vitro* anti-tumor effect on A549 and SMMC7721 cells . Apoptosis of tumor cells induced by NDV-FMW via caspase-3 activation and NDV-FMW could be a potential cancer virotherapy agent .

Keywords : Newcastle disease virus ; anti-tumor virus ; cell apoptosis ; caspase-3

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2006071) and the Jiangsu Health Department (H200763)

* Corresponding author . Tel : + 86-514-87971805 ; Fax : + 86-514-87991747 ; E-mail : fanjian@yzu.edu.cn

These authors contributed equally to this work .

Received : 16 October 2008 / Revised : 29 December 2008

《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起 , 本刊采用“稿件远程处理系统” , 全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿 请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn> , 点击“作者投稿” 。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿 , 请先进行“注册” , 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿 , 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码 , 请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 邮寄纸样 所有来稿均需要邮寄 1 份纸稿、介绍信。
- (3) 稿件受理费 投稿时请随寄 100 元受理费 , 务必通过邮局汇款 , 切忌随信邮寄 !
注 : 务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。