

研究简报

雷帕霉素联合ZD55-TRAIL病毒对肿瘤抑制
及其机制探讨刘锡君¹ 李 新¹ 郑水娣¹ 钟 丹¹ 章康健² 王世兵¹ 周秀梅^{1*}¹浙江理工大学生命科学学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)**关键词** 溶瘤腺病毒; 雷帕霉素; 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体; E4orf1

溶瘤腺病毒的肿瘤靶向性研究一直是一个热点。目前已有商业化的ONYX-015、H101溶瘤腺病毒。在此基础上, 科学家又进一步发展形成基因-病毒治疗方案, 如文中应用的ZD55-TRAIL病毒。本研究利用刘新垣实验室提供的携带TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF相关的凋亡诱导配体)的溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL^[1]联合雷帕霉素杀伤肿瘤细胞。ZD55-TRAIL是删除了腺病毒E1B-55KD, 并携带肿瘤选择性杀伤基因TRAIL的复制性腺病毒。带有E1B-55KD基因突变的腺病毒通过影响晚期腺病毒RNA出核可选择性地在肿瘤细胞中复制^[2,3], 但溶瘤腺病毒载体本身还需要进一步的完善。

雷帕霉素是mTOR蛋白质复合物的抑制剂, 之前也有报道雷帕霉素可以增强TRAIL诱导caspase 8的活性从而增强肿瘤细胞对TRAIL的敏感性^[4,5]。我们可以利用这个抑制剂来抑制mTOR存活通路而加强病毒的杀伤效果^[6]。mTOR信号通路在很多肿瘤细胞中是失调的^[7]。本研究应用ZD55-TRAIL基因一病毒联合雷帕霉素药物来抑制肿瘤细胞。

本实验采用的实验材料: 人鼻咽癌细胞CNE、人大细胞肺癌细胞H460、人子宫颈癌HeLa和人正常肝细胞QSG-7701, 由本实验室保存。ZD55-TRAIL溶瘤病毒由刘新垣实验室提供。ACTIN、EIA和荧光二抗等抗体分别购自Beyotime、Abcam和LI-COR公司。MTT购自Biosharp公司, DMSO购于天津永大化学试剂开发中心, 雷帕霉素(Rapamycin, Rap)等药物购于碧云天生物技术研究所, 96孔板购于Corning公司, BCA蛋白定量试剂盒购于天根生化科技有限公司。

本实验采用的细胞毒性试验(MTT法)具体操作为: 收集对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度, 将细胞以100 μ l/孔接种于96孔板, 使待测细胞密度为10⁴/孔, 5% CO₂, 37 °C孵育24 h后加药, 实验组及对照组分别设5个复孔。孵育24 ~ 72 h, 每孔加入20 μ l MTT溶液(5 mg/ml, 即0.5% MTT), 继续培养4 h。小心地吸去孔内培养液。每孔加入150 μ l二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪于490 nm处测量各孔的吸光值。

蛋白免疫印迹检测病毒EIA基因的表达, 吸除六孔板中的细胞培养液, 加入3 ml 4 °C预冷的PBS(0.01 mol/L, pH7.2~7.3)。平放轻轻摇动1 min洗涤细胞, 然后弃去洗液。重复以上操作两次。按1 ml裂解液加10 μ l PMSF(100 mmol/L)的比例, 将混合液摇匀置于冰上。每盘细胞加400 μ l含PMSF的裂解液, 于冰上裂解30 min后, 用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧, 然后用枪将细胞碎片和裂解液移至1.5 ml离心管中。于4 °C下12 000 r/min离心5 min。测定蛋白浓度, 并取20 μ g总蛋白加入上样缓冲液, 煮沸5 min。然后上样, 100 V电压凝胶电泳。凝胶电泳后立即进行转膜。将膜用TBS从下向上浸湿后, 移至含有封闭液的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭1 h。将一抗用TBST稀释至适当浓度(在1.5 ml离心管中操作); 将抗体溶液加到保鲜膜上; 从封闭液中取出膜, 用滤纸吸去残留液后, 将膜蛋白面朝下放于抗体液面上, 掀动膜四角以赶出残留气泡; 室

收稿日期: 2010-12-24

接受日期: 2011-04-01

浙江理工大学科研启动基金(No.0916819-Y)资助项目

*通讯作者。E-mail: zhouxiumei824@163.com

温下孵育1~2 h后, 用TBST在室温下脱色摇床上洗两次, 每次10 min; 再用TBS洗一次, 10 min。同上方方法准备二抗稀释液并与膜接触, 室温下孵育1~2 h后, 用TBST在室温下脱色摇床上洗两次, 每次10 min; 再用TBS洗一次, 10 min, 进行化学发光反应。

所有的实验数据采用了统计学方法分析, 显著性差异分析采用双尾student *t* 检验, 所有的数据均为 $P < 0.05$ 时具显著性统计学差异。数据统计在SPSS16.0软件上完成。

联合用药对肿瘤细胞的生长抑制作用

采用MTT细胞毒性试验检测雷帕霉素联合ZD55-TRAIL病毒对肿瘤细胞生长的抑制效果。以人正常肝细胞QSG-7701作为对照组, CNE、HeLa、H460肿瘤细胞作为实验组。实验结果如图1所示, 在该实验条件下联合用药对正常细胞的安全性较好。肿瘤细胞组联合用药相对对照组和单独病毒处理组对肿瘤细胞生长抑制的效果非常明显($P < 0.05$)。

检测腺病毒E1A蛋白表征病毒的复制

本研究首先用病毒和药物处理CNE、HeLa和

H460细胞, 48 h后收集细胞, 通过蛋白免疫印迹实验检测病毒E1A蛋白的表达情况。图2所示药物加病毒组E1A表达强于单独病毒组。结果表明雷帕霉素确实增强了病毒的复制。几组肿瘤细胞系病毒E1A蛋白表达比较显著, 药物病毒联合组表现出强的溶瘤能力。

雷帕霉素联合ZD55-TRAIL作用机制概况图

Thomas等^[8]研究发现腺病毒的E4orf1基因可以在感染的细胞G₁期抑制E1B-55KD基因突变的腺病毒的复制, 而大多数的肿瘤细胞是G₁期分布的, 从而使删除E1B-55KD的复制性腺病毒对肿瘤细胞的杀伤效果大打折扣。虽然ZD55病毒携带有肿瘤选择性杀伤基因TRAIL, 但是有些肿瘤细胞对TRAIL有一定的抗性。而且腺病毒E4orf1蛋白的表达抑制了病毒的复制, 也激活了细胞存活通路PI3K-Akt-mTOR。通过加入mTOR的经典抑制剂雷帕霉素联合病毒用药, 可以很好地增强病毒的肿瘤杀伤效果。

mTOR信号通路在细胞存活和各种细胞压力条件下都表现出很重要的功能^[9]。而且在肿瘤细胞

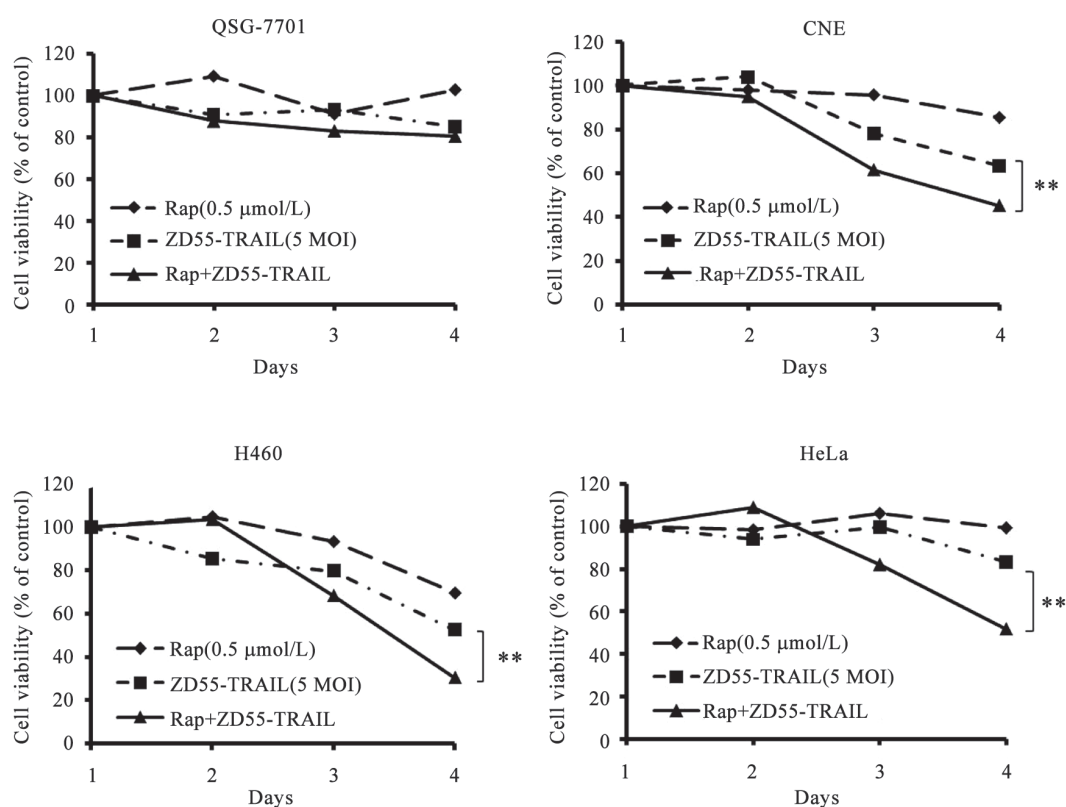


图1 MTT检测雷帕霉素联合ZD55-TRAIL病毒对细胞的毒性

Fig.1 Cytotoxic effect of oncolytic virus ZD55-TRAIL combined with Rapamycin was assayed by MTT test

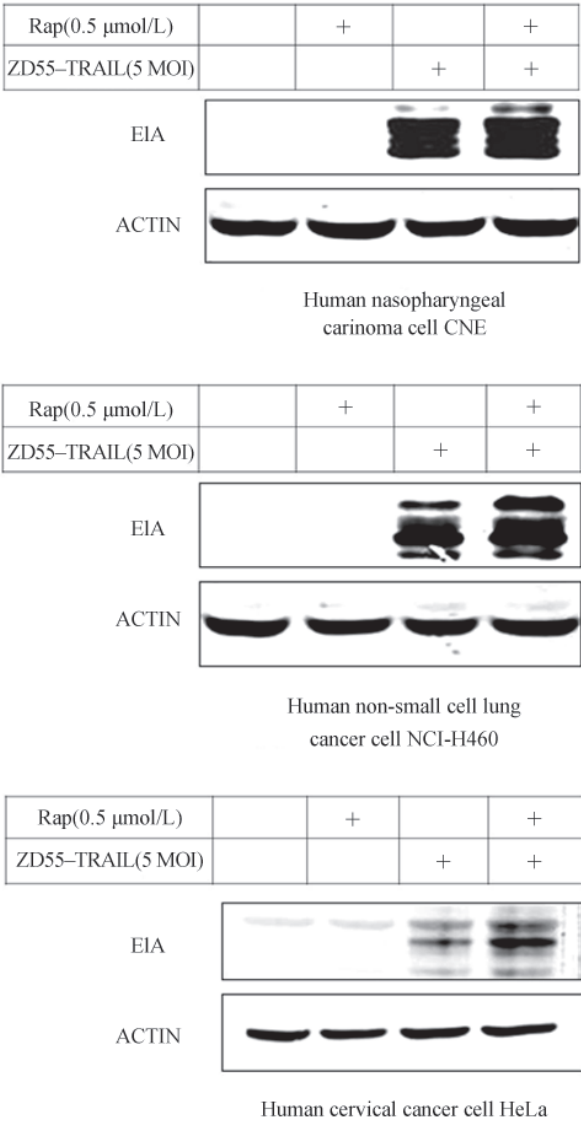


图2 腺病毒的E1A蛋白表达情况
Fig.2 Expression of adenovirus E1A protein was detected by Western blot

里mTOR信号通路往往是失调的。这就提供了一个很好的肿瘤治疗研究方向, 通过联合雷帕霉素与ZD55-TRAIL溶瘤病毒来抑制肿瘤细胞。

本文总结如下: (1)由图1可知, 联合用药比单独病毒组对体外肿瘤细胞的抑制效果有显著增强, 但在人的正常肝细胞QSG-7701中增强抑制效果不明显。(2)本研究通过检测E1A蛋白的表达情况来分析雷帕霉素是否对病毒的复制也有影响。通过几组癌细胞蛋白免疫印迹实验可以看出: 雷帕霉素可以释放E4orf1, 对删除E1B-55KD溶瘤腺病毒的复制起抑制作用(图3)。虽然之前也有顺铂与溶瘤腺病毒-基因联合治疗的报道^[10], 但是本论文的研究也是第一次

报道了雷帕霉素联合删除E1B-55KD溶瘤腺病毒可以产生很好的肿瘤抑制效果。而且, 雷帕霉素作为抑制人体免疫抑制剂已经用于临床, 本研究也为联合用药方案进行临床应用打下了基础。

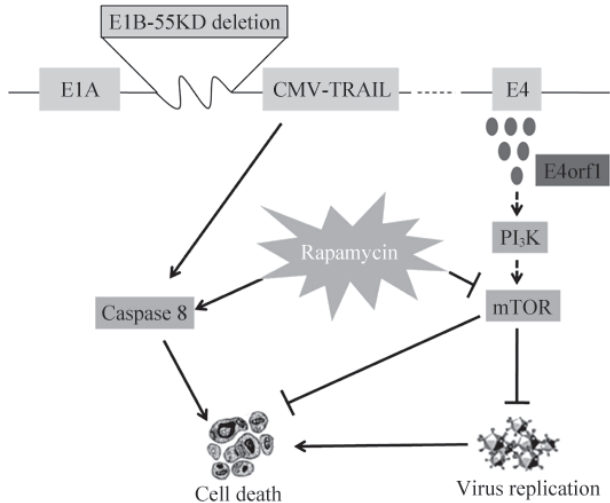


图3 雷帕霉素联合ZD55-TRAIL作用机制概况图
Fig.3 Schematic representation of a potential signaling pathway initiated by combined therapy

参考文献(References)

- 1 Zhao L, Dong A, Gu J, Liu Z, Zhang Y, Zhang W, *et al.* The antitumor activity of TRAIL and IL-24 with replicating oncolytic adenovirus in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(11): 1011-22.
- 2 O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, *et al.* Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* 2004; 6(6): 611-23.
- 3 Opyrchal M, Aderca I, Galanis E. Phase I clinical trial of locoregional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in combination with mitomycin-C, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Methods Mol Biol* 2009; 542: 705-17.
- 4 Yang Z, Lei Z, Li B, Zhou Y, Zhang GM, Feng ZH, *et al.* Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating alphav integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Sci*; 101(2): 494-500.
- 5 Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, *et al.* Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activation leading to Mcl-1 block in translation. *J Agric Food Chem*; 58(18): 10020-6.
- 6 Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009; 2(67): pe24.
- 7 Garrido-Laguna I, Tan AC, Uson M, Angenendt M, Ma WW, Villarreal MC, *et al.* Integrated preclinical and clinical development

- of mTOR inhibitors in pancreatic cancer. *Br J Cancer*; 103(5): 649-55.
- 8 Thomas MA, Broughton RS, Goodrum FD, Ornelles DA. E4orf1 limits the oncolytic potential of the E1B-55K deletion mutant adenovirus. *J Virol* 2009; 83(6): 2406-16.
- 9 Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, Broaddus VC. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem* 2008; 283(19): 13021-30.
- 10 Pan Q, Liu B, Liu J, Cai R, Wang Y, Qian C. Synergistic induction of tumor cell death by combining cisplatin with an oncolytic adenovirus carrying TRAIL. *Mol Cell Biochem* 2007; 304(1-2): 315-23.

The Experimental Study on Cytotoxic Effect of Oncolytic Virus ZD55-TRAIL Combined With Rapamycin against Human Cancer Cells and the Exploration Mechanism

Xi-Jun Liu¹, Xin Li¹, Shui-Di Zheng¹, Dan Zhong¹, Kang-Jian Zhang², Shi-Bing Wang¹, Xiu-Mei Zhou^{1*}

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract This research investigates the effect of combined application of oncolytic virus ZD55-TRAIL and the chemotherapeutic drugs Rapamycin (Rap) in growth inhibition of human cancer cells *in vitro*. The effects of the treatment were measured by MTT assay and the replication of E1B-55KD deletion adenovirus was detected by the expression of E1A protein by Western blot. These observations suggest that Rapamycin could increase the levels of E1A, which may explain its ability to enhance ZD55-TRAIL virus oncolysis. The combination therapy with signaling inhibitors that modulate activity of mTOR pathway will promote the cytotoxicity against human cancer cells.

Key words oncolytic virus; Rapamycin; TRAIL; E4orf1

Received: December 24, 2010 Accepted: April 1, 2011

This work was supported by the Science Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (ZSTU) (No.0916819-Y)

*Corresponding author. E-mail: zhouxiumei824@163.com