

溶瘤疱疹病毒表达的病毒融膜糖蛋白抗食管癌的实验研究

江跃全 张 智* 谢臣明

(重庆市肿瘤研究所胸外科, 重庆 400030)

摘要 为了探讨溶瘤疱疹病毒表达病毒融膜糖蛋白对食管癌细胞的杀伤效果, 采用基因酶切技术构建携带*GALV.fus*基因的致融性溶瘤疱疹病毒Synco-1和Synco-2以及非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1, 通过体内实验观察三种病毒对食管癌细胞Eca-109的杀伤效果。结果发现, Synco-1和Synco-2能引起食管癌细胞融合, 有效地杀灭食管癌细胞。体外实验Synco-1和Synco-2能分别使Eca-109细胞存活率降低至28%和25%, 体内实验能使实体肿瘤体积明显缩小, 接种4周后, 均能使小鼠70%的癌细胞完全消失, 其杀伤食管癌细胞的效果明显强于非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1。实验结果提示, 溶瘤疱疹病毒通过表达病毒融膜糖蛋白能显著增强其抗肿瘤效果, Synco-1和Synco-2有可能成为治疗食管癌的有效工具。

关键词 溶瘤疱疹病毒; 食管癌; 病毒融膜糖蛋白

食管癌在我国是常见的恶性肿瘤。每年全世界约30万人死于食管癌, 而我国占了约一半^[1]。由于食管癌的早期症状不典型, 而且缺乏有效可行的筛查技术, 因此, 很多病人就诊时已经进入癌症晚期。食管癌手术后5年存活率为25%~30%。对于不能手术或者术后复发的食管癌病人, 还没有发现有效的方法(包括放疗、化疗)来挽救患者或显著延长患者的生命。因此, 针对食管癌的治疗, 寻找有效的治疗方法就显得非常迫切。

人们发现某些溶瘤病毒能有效抑制实体肿瘤的生长。其中, 经过基因改造的1型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus-1, HSV-1)已经被证实对胰腺癌^[2]、肝癌、前列腺癌、神经胶质瘤^[3]、结肠癌^[3]、头颈部肿瘤^[5]有明显效果。但是, 有关溶瘤疱疹病毒抗食管癌的研究则鲜有报道。

本研究通过构建携带长臂猿白血病毒融细胞膜糖蛋白(Gibbon ape leukemia virus membrane fusion glycoprotein, GALV.fus)基因的溶瘤疱疹病毒, 观察其杀伤食管癌细胞的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及主要试剂 非洲绿猴肾细胞Vero、食管癌细胞Eca-109购自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细胞库, 在DMEM完全培养基(含10%胎牛血清FBS及100 µg/mL青霉素、链霉素), 37 °C、5% CO₂条件下置于恒温箱中培养。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自天津TBD公司; 真核细胞转染试剂(Lipofectamine 2000)购自美国Invitrogen公司。

1.1.2 病毒与质粒 实验中各种病毒载体均由本实验室构建、保存。巨细胞病毒启动子(CMVP)、基因晚期表达启动子UL38、*pCR-3.1-GALVenv*质粒、*plox-3H*质粒(HSV扩增子, 含病毒复制起始点及病毒包装信号)、去掉了神经毒性基因 γ 34.5和病毒包装信号的*fHSV-delta-pac*DNA质粒由付新平博士赠送(University of Houston)。

1.2 方法

1.2.1 构建重组HSV-1载体(分别含Synco-1、Synco-2、Baco-1) *UL38*启动子的扩增以HSV-1 DNA为模板。PCR引物为: 5'-GTG GGT TGC GGA CTT TCT GC-3'和5'-ACA CTC ACG CAA GGC GGA AC-3'。PCR产物克隆入*plox-3H*质粒, 命名为*pLox-UL38p*。然后将*GALV.fus*基因(从*pCR-3.1-GALVenv*质粒获得)

收稿日期: 2012-01-27 接受日期: 2012-04-27

国家自然科学基金(No.30471984)和重庆市卫生厅科研项目(No.07-2-116)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-65075660, E-mail: jyq1964@yahoo.com

克隆入 $pLox-UL38p$, 命名为 $UL38p-GALVfus$ 。 $GALVfus$ 融膜糖蛋白基因克隆入含有 CMV 启动子($CMVP$)的 $pSZ-1$ 质粒内作为肿瘤非特异性启动子对照, 命名为 $CMVP-GALVfus$ 。分别将 $UL38p-GALVfus$ 或 $CMVP-GALVfus$ 基因片段通过 Pac I酶切位点克隆入去掉神经毒性基因 $\gamma34.5$ 的 $fHSV-delta-pac$ 载体内。然后通过脂质体转化技术将上述连接质粒转入Vero细胞。获得的病毒株通过在A549细胞内进一步筛选后, 得到具有细胞膜融合效应的病毒载体(fusogenic oncolytic herpesviruses), 分别命名为Synco-1(含 $CMVP$)和Synco-2(含 $UL38p$)。与此同时, 将 $EGFP$ 基因片段(含 $CMVP$ 启动子)插入 $fHSV-delta-pac$ 载体内, 构建不具有 $GALVfus$ 基因的病毒载体作为治疗对照, 将其命名为Baco-1。Baco-1在A549细胞内24 h后, 荧光显微镜下观察有绿色荧光蛋白表达。

1.2.2 溶瘤疱疹病毒的扩增、纯化及滴度测定 用无血清DMEM稀释重组溶瘤疱疹病毒, 感染Vero细胞。加入Vero细胞中培养2 h后, 加入DMEM完全培养液继续培养2~3 d, 待80%左右的细胞出现病变效应时, 离心收集细胞, 反复冻融后收取病毒上清, 反复感染扩增直至获得足够量病毒。扩增后用氯化铯梯度离心纯化, 用微量全CPE法进行滴度测定, 病毒用PBS液稀释, 储存于 -80°C 冰箱内备用。

1.2.3 溶瘤疱疹病毒对食管癌细胞的致融性及体内外杀伤作用鉴定 溶瘤疱疹病毒融细胞表型观察: 将Eca-109食管癌细胞接种于6孔培养板内, 用0.01 pfu/cell致融性溶瘤疱疹病毒载体Synco-1、Synco-2和非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1感染食管癌细胞Eca-109, 感染48 h后, 在倒置显微镜下观察及拍照, 鉴定其对食管癌细胞的致融性。

体外杀伤癌细胞实验: 将Eca-109食管癌细胞接种于24孔培养板内, 分3组, 每组接种5孔。用滴度为0.1, 0.01 pfu/cell的致融性溶瘤疱疹病毒Synco-1、Synco-2及非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1分别感染食管癌细胞Eca-109(对照组加入相同体积的正常培养液), 病毒感染48 h后, 细胞用台盼蓝染色, 在显微镜下计数活细胞以确定病毒载体体外杀伤肿瘤细胞的能力。实验重复3次。细胞存活率计算公式: 细胞存活率=(实验组存活细胞数/对照组存活细胞数) $\times 100\%$ 。

体内杀伤癌细胞实验, 选用4~6周裸鼠, 实验分Synco-1、Synco-2、Baco-1和PBS组, 每组10只。在小鼠右侧背腹部皮下注射 2×10^6 食管癌细胞Eca-109。细胞种植两周后, 待肿瘤长至6~9 mm直径时, 肿瘤内分别注射100 μL 1×10^7 PFU的3种溶瘤疱疹病毒或PBS。病毒注射后, 每周观察肿瘤生长情况一次, 连续观察4周。计算不同时期肿瘤的平均直径代表肿瘤的生长率。肿瘤平均直径=(长+宽+高)/3。

1.2.4 统计检验 平均数用($\bar{x} \pm s$)表示。均数的统计用student t 检验和方差分析, 用SPSS13.0软件处理数据并绘制图形。

2 结果

2.1 溶瘤疱疹病毒载体对食管癌细胞体外致融性观察

两种携带 $GALVfus$ 的溶瘤HSV-1载体(Synco-1、Synco-2)在Eca-109肿瘤细胞内引起强烈的细胞膜融合效应, 数十至数百个细胞融合形成巨大的细胞融合斑(图1)。而非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1仅引起病毒疱疹细胞毒性效应, 倒置显微镜下未见明显细胞融合斑(图1)。

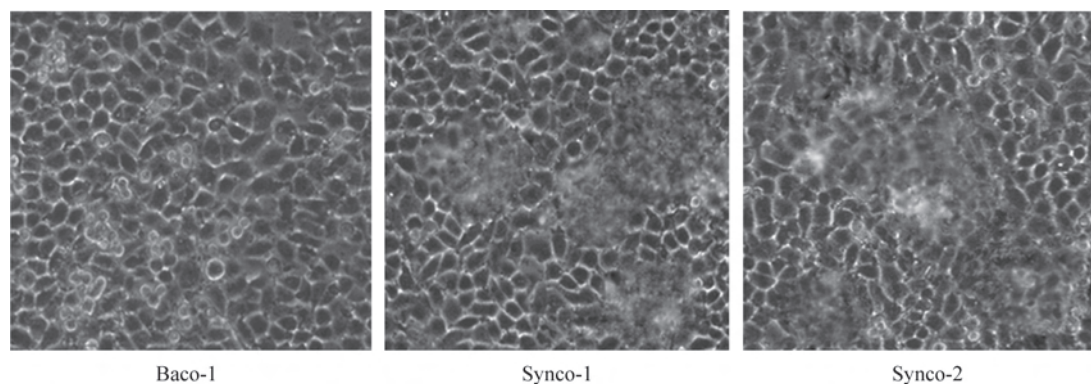


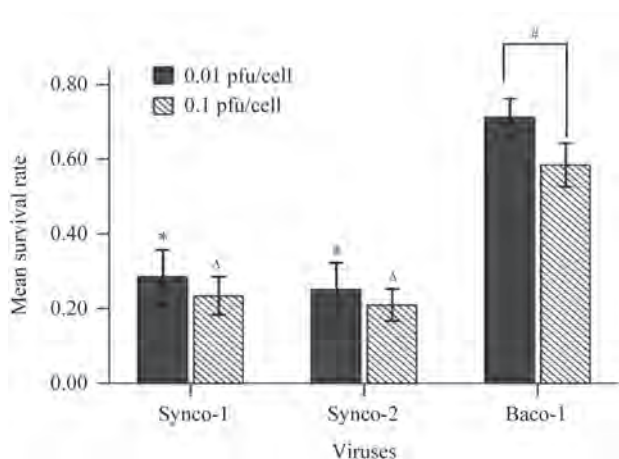
图1 溶瘤疱疹病毒载体对食管癌细胞Eca-109体外致融性观察(200 $\times$)

Fig.1 Phenotypic characterization of oncolytic HSV in esophageal cancer cells Eca-109 *in vitro* (200 $\times$)

2.2 溶瘤疱疹病毒对食管癌细胞Eca-109的体外杀伤力比较

溶瘤疱疹病毒杀死食管癌细胞的能力用细胞存活率表示。细胞存活率越低,说明溶瘤疱疹病毒杀伤力越强。用0.1 pfu/cell的滴度感染Eca-109细胞时,病毒Synco-1和Synco-2杀伤Eca-109细胞的细胞存活率分别为23%和21%,两者比较无显著性差异($P=0.39$,图2),但两组细胞存活率均显著低于非致融性病毒载体Baco-1组(58%)($P<0.001$,图2);用0.01 pfu/cell的滴度感染Eca-109细胞时,病毒Synco-1和Synco-2杀伤Eca-109细胞的细胞存活率分别为28%和25%,两者比较无显著性差异($P=0.58$,图2),但两组细胞存活率均显著低于非致融性病毒载体Baco-1组(71%)($P<0.001$,图2)。

溶瘤疱疹病毒不同滴度间的比较:用0.1 pfu/cell滴度的Synco-1、Synco-2溶瘤疱疹病毒分别感染Eca-109细胞后,其细胞存活率均低于0.01 pfu/cell病毒



Synco-1、Synco-2处理的两组Eca-109细胞存活率无显著性差异;不同病毒滴度处理的致融性溶瘤疱疹病毒组间细胞存活率也无显著性差异;不同病毒滴度处理的两种致融性溶瘤疱疹病毒的细胞存活率均显著低于非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1组(* $P<0.001$,与0.01 pfu/cell Baco-1组比较; $\Delta P<0.001$,与0.1 pfu/cell Baco-1组比较);不同病毒滴度处理的Baco-1组间细胞存活率有显著性差异(# $P<0.001$)。

There was no significant difference on the percentage of Eca-109 cells survival after infection of two fusogenic oncolytic HSV between Synco-1 and Synco-2 groups and between different virus doses. Synco-1 and Synco-2 killed tumor cells more effectively than Baco-1 at both viral doses(* $P<0.01$, compared with 0.01 pfu/cell Baco-1 group; $\Delta P<0.001$, compared with 0.1 pfu/cell Baco-1 group). There was significant difference on the percentage of cells survival after infection of Baco-1 between different virus doses(# $P<0.001$).

图2 溶瘤疱疹病毒对食管癌细胞Eca-109的体外杀伤力比较
Fig.2 Comparing of the effects of fusogenic oncolytic HSV on killing Eca-109 tumor cells *in vitro*

滴度感染组,但统计学处理无显著性差异(图2)。用Baco-1病毒感染Eca-109细胞时,不同病毒滴度组间细胞存活率有显著性差异($P<0.001$,图2)。

2.3 溶瘤疱疹病毒对实体肿瘤的体内治疗效果

携带GALVfus基因的致融性溶瘤疱疹病毒Synco-1和Synco-2治疗实体瘤的效果明显优于非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1。Synco-1和Synco-2处理后的两组肿瘤组织显著缩小,且4周后两组小鼠均有70%的肿瘤细胞完全消失;而无GALVfus基因的非融膜病毒载体Baco-1抑制肿瘤的效果较差,小鼠仅30%的肿瘤细胞完全消失,但与PBS组比较其肿瘤组织缩小显著。Synco-1与Synco-2组间肿瘤组织平均直径比较无显著性差异,而与Baco-1组及PBS组比较均有显著性差异($P<0.001$,图3);Synco-1、Synco-2组肿瘤组织平均直径显著低于Baco-1组($P<0.001$,图3);Baco-1组肿瘤组织平均直径显著低于PBS组($P<0.001$,图3)。

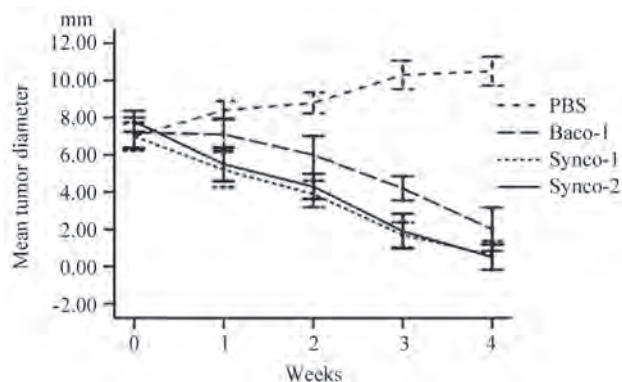


图3 溶瘤疱疹病毒载体对实体肿瘤的体内治疗效果

Fig.3 Comparison of the ability of oncolytic viruses killing Eca-109 tumor cells *in vivo*

3 讨论

食管癌患者手术后的5年生存率约为25%~30%,而对晚期食管癌几乎没有有效的治疗方法。因此,有许多学者在努力研究,试图找到一种治疗食管癌的新方法。本研究发现,经过基因重组的溶瘤疱疹病毒有可能成为一种有效的用于食管癌治疗的工具。

溶瘤疱疹病毒能选择性地在肿瘤细胞内复制,破坏溶解肿瘤细胞。目前研究最多、效果最好的溶瘤疱疹病毒为经过基因改造的I型疱疹病毒变异体,如已经用于临床试验的I型疱疹病毒变异体G207^[6]。

有研究发现, 溶瘤疱疹病毒对某些实体肿瘤有明显的抑制作用^[3]。这些病毒杀死肿瘤细胞的机理主要是通过病毒的直接细胞毒作用。而由于溶瘤疱疹病毒中某些基因的缺失, 不能在正常细胞内复制, 对正常细胞没有杀伤作用^[7]。虽然在实验研究中发现这些溶瘤疱疹病毒能选择性地在肿瘤细胞内复制杀死肿瘤细胞, 然而, 在临床研究中并没有证明这些溶瘤疱疹病毒能明显抑制肿瘤细胞生长而改善患者的预后^[8-9]。因此, 如何增强这些嗜肿瘤特异性溶瘤疱疹病毒杀伤肿瘤细胞的效率是目前急需解决的问题。

有文献报道, 某些病毒能产生融细胞膜糖蛋白, 对肿瘤细胞有很强的杀伤作用。GALV.fus就是一种非常强烈的病毒融细胞膜糖蛋白。GALV.fus能使细胞膜融合形成巨大的多核巨细胞, 最后导致肿瘤细胞坏死。坏死的肿瘤细胞在局部引起炎症反应, 能产生强烈的旁杀伤效应。有研究发现, GALV.fus转染7%的肿瘤细胞, 就可以造成70%的肿瘤细胞坏死^[10]。Bateman等^[11]研究发现, 通过某些病毒表达融膜糖蛋白, 能产生很强的肿瘤细胞毒性。

Synco-1和Synco-2是本实验室构建的携带融细胞膜糖蛋白基因GALV.fus的I型溶瘤疱疹病毒, Baco-1为不携带GALV.fus的I型溶瘤疱疹病毒。以上三种病毒载体的骨架均是由病毒扩增子和HSV病毒的DNA壳构建而成的假性病毒, 基本消除了病毒的免疫源性和对人体的毒性。前期的实验发现, Synco-1和Synco-2能通过病毒在细胞内的复制及融合肿瘤细胞膜有效杀灭多种肿瘤细胞。肿瘤细胞溶解破坏, 释放大量的病毒颗粒。这些病毒颗粒在肿瘤组织间扩散, 进而杀伤更多的肿瘤细胞。Synco-1和Synco-2杀灭肿瘤细胞的效果明显强于不携带GALV.fus基因的Baco-1^[12-13]。有关Synco-1和Synco-2抗食管癌效果的研究还未见报道, 因此, 本实验研究了Synco-1和Synco-2对食管癌的治疗效果。实验发现, 致融性溶瘤疱疹病毒Synco-1和Synco-2对食管癌细胞也有很强的杀伤效果, 其表达的GALV.fus能引起食管癌细胞融合、坏死。其杀伤食管癌细胞的效果显著强于非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1。前期研究发现, Synco-2由于受晚期病毒启动子UL38p的调控, 仅能促进处于增殖期的细胞发生融合; 而Synco-1对静止和抑制状态的细胞都能促进融合, 说明Synco-2对癌细胞具有更好的特异性^[14]。本研究的体外实验发现, 0.01 pfu/cell Synco-1和Synco-2能分别使Eca-109

细胞的存活率降低至28%和25%; 0.1 pfu/cell Synco-1和Synco-2能分别使Eca-109细胞的存活率降低至23%和21%。但病毒不同滴度间比较无显著性差异, 这可能与样本量较少并且细胞抑制已经达到一定阈值有关。而体内实验Synco-1和Synco-2能分别使鼠70%的癌细胞完全消失, Baco-1能使鼠30%的癌细胞完全消失。体外及体内实验均证实致融性溶瘤疱疹病毒Synco-1和Synco-2杀灭食管癌细胞的效果显著强于非致融性溶瘤疱疹病毒Baco-1。

Wong等^[14]构建了同时表达胞嘧啶脱氨酶和融膜糖蛋白的溶瘤疱疹病毒, 并发现其对多种胃食管癌细胞系有强烈的杀伤效果。但其骨架来源于临床上新鲜提取的HSV-1菌株JS-1, 病毒的免疫源性和对机体的毒性可能限制了其临床应用。本实验使用疱疹病毒扩增子与疱疹病毒壳构建了疱疹病毒扩增子载体, 去掉了病毒上的大量糖蛋白, 其优点是基本消除了病毒的免疫源性和对机体的细胞毒性。

本实验结果显示, 致融性溶瘤疱疹病毒能转染食管癌细胞, 并通过表达病毒融膜糖蛋白显著增强杀伤食管癌细胞的效果。Synco-1及Synco-2为携带GALV.fus的嗜肿瘤特异I型疱疹病毒, 体内外实验均发现其对食管癌细胞有强烈的杀灭作用。尤其是肿瘤组织内局部注射致融性溶瘤疱疹病毒能使70%的小鼠肿瘤组织内癌细胞被全部杀灭, 这一现象提示, Synco-1及Synco-2可以通过食管腔内局部注射的方法治疗食管癌。Synco-1及Synco-2极有可能成为食管癌治疗的一种有效的工具。

参考文献 (References)

- 1 Zhiguo Z, Xianshu G, Xueying Q, Ping Z. Literature analysis of radiotherapy for esophageal cancer in China. Chin J Cancer 2010; 29(10): 874-81.
- 2 Kasuya H, Takeda S, Nomoto S, Nakao A. The potential of oncolytic virus therapy for pancreatic cancer. Cancer Gene Ther 2005; 12(9): 725-81.
- 3 Fu X, Tao L, Jin A, Vile R, Brenner MK, Zhang X. Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. Mol Ther 2003; 7(6): 748-54.
- 4 Hoffmann D, Bayer W, Wildner O. Local and distant immune-mediated control of colon cancer growth with fusogenic membrane glycoproteins in combination with viral oncolysis. Hum Gene Ther 2007; 18(5): 435-50.
- 5 Carew JF, Kooby DA, Halterman MW, Federoff HJ, Fong Y. Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic her-

- pes simplex virus type 1 (G207). *Hum Gene Ther* 1999; 10(10): 1599-606.
- 6 徐凯, 诸琦. 溶瘤病毒的临床应用. *生物医学工程与临床* (Xu Kai, Zhu Qi. Clinical application of oncolytic virus. *BME & Clin Med*) 2008; 7(4): 347-50.
 - 7 McKie E, MacLean A, Lewis A, Cruickshank G, Rampling R, Barnett S, *et al.* Selective *in vitro* replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours: Evaluation of a potentially effective clinical therapy. *Br J Cancer* 1996; 74(5): 745-52.
 - 8 Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: Results of a Phase I trial. *Gene Ther* 2000; 7(10): 867-74.
 - 9 Todo T, Martuza R, Rabkin SD, Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(11): 6396-401.
 - 10 Higuchi H, Bronk SF, Bateman A, Harrington K, Vile RG, Gores GJ. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: Implications for gene therapy. *Cancer Res* 2000; 60(22): 6396-402.
 - 11 Bateman A, Bullough F, Murphy S, Milieus L, Lavillette D. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60(6): 1492-7.
 - 12 Nakamori M, Fu X, Meng F, Jin A, Tao L, Bast RC Jr, *et al.* Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2727-33.
 - 13 Fu X, Zhang X. Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype. *Cancer Res* 2002; 62(8): 2306-12.
 - 14 Wong J, Kelly K, Mittra A, Gonzalez SJ, Song KY, Simpson G, *et al.* A third-generation herpesvirus is effective against gastroesophageal cancer. *J Surg Res* 2010; 163(2): 214-20.

Studies on the Therapy of Esophageal Cancer with An Oncolytic Virus Incorporating Fusogenic Membrane Glycoproteins

Jiang Yuequan, Zhang Zhi*, Xie Chenming

(Department of Thoracic Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract This study aims to determine the anti-esophageal cancer effect of oncolytic herpesvirus expressing fusogenic membrane glycoprotein. We constructed Synco-1 and Synco-2 by inserting the gene of gibbon ape leukemia virus envelope fusogenic membrane glycoprotein (*GALV_{fus}*) into an oncolytic herpes simplex virus with an enforced ligation procedure. We also constructed Baco-1 without *GALV_{fus}* gene. The ability of these oncolytic viruses to kill esophageal cancer cells Eca-109 *in vitro* and *in vivo* was assessed. Subsequent *in vitro* and *in vivo* studies showed that expression of *GALV_{fus}* in the context of an oncolytic virus significantly enhances the antitumor effect of the virus. *In vitro*, the syncytial plaques after Synco-1 and Synco-2 infection were founded. Synco-1 and Synco-2 killed Eca-109 tumor cells more effectively than Baco-1 both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the percentages of cells that survived after infection of Synco-1 and Synco-2 were 28% and 25%. *In vivo*, 70% of the animals were tumor free at the 4th week after Synco-1 and Synco-2 administration, respectively. These results suggest that expression of fusogenic membrane glycoprotein by these fusogenic oncolytic herpesviruses can enhance the antitumor effects. Synco-1 and Synco-2 may provide a novel therapy against esophageal cancer.

Key words oncolytic virus; esophageal cancer; HSV-1; fusogenic membrane glycoprotein

Received: January 27, 2012 Accepted: April 27, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471984) and the Science Foundation of Health Bureau of Chongqing (No.07-2-116)

*Corresponding author. Tel: 86-23-65075660, E-mail: jyq1964@yahoo.com