研究论文

# 携带TRAIL基因的P28启动子溶瘤腺病毒的 抗肝癌研究

金晓婷<sup>1,2</sup> 刘新垣<sup>1,2,3</sup> 陈若愚<sup>3\*</sup> 李宁<sup>3\*</sup> 章康健<sup>2,3,4\*</sup>
 (<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学与医药学院,杭州 310018;
 <sup>2</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031;
 <sup>3</sup>上海元宋生物技术有限公司奉贤区院士专家工作站,上海 201401;
 <sup>4</sup>浙江理工大学,材料科学与工程学院,智能生物医学材料研究所,杭州 310018)

摘要 P28(也被称为PSMD10、P28<sup>GANK</sup>或gankyrin)在肝癌中高表达(96.9%)而在正常细胞 中不表达,因此利用P28启动子设计了具有肝癌靶向性的新型溶瘤病毒载体并在此基础上设计了 携带肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)基因的溶瘤腺病毒(Onco<sup>Ad</sup>-P28-E1A-ΔE1B-TRAIL)。通过Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL感染肝癌 细胞显示TRAIL蛋白可以在肝癌细胞中高效表达。结晶紫染色显示该病毒可以选择性靶向杀伤肝 癌细胞,且10 MOI对人正常肝细胞没有明显毒性。体外细胞水平杀伤及凋亡研究显示Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对肝癌细胞Huh-7和Hep-3B均有抑制作用,且呈时间和剂量依赖性,可以显著促进肝癌细胞 凋亡。皮下移植瘤CDX药效显示该溶瘤腺病毒可以促进肿瘤细胞的凋亡及免疫细胞的浸润从而显 著抑制肝癌细胞皮下瘤的生长。这些结果提示溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL能有效抑制肝癌的发 展,是一种具有临床应用潜力的肝癌治疗候选药物。

关键词 P28启动子; TRAIL; 溶瘤腺病毒; 肝癌

# Anti-Hepatocarcinoma Effect of P28 Promoter-Driven Oncolytic Adenovirus Carrying TRAIL Gene

JIN Xiaoting<sup>1,2</sup>, LIU Xinyuan<sup>1,2,3</sup>, CHEN Ruoyu<sup>3\*</sup>, LI Ning<sup>3\*</sup>, ZHANG Kangjian<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell

Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

<sup>3</sup>Academician Expert Workstation of Fengxian District, Shanghai Yuansong Biotechnology Company Limited, Shanghai 201401, China;

<sup>4</sup>Institute of Smart Biomedical Materials, School of Materials Science and Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

收稿日期: 2024-12-09 接受日期: 2025-01-13

Received: December 9, 2024 Accepted: January 13, 2025

\*Corresponding authors. Tel: +86-15618790090, E-mail: chenruoyu@yuansongbio.com; Tel: +86-18818210835, E-mail: lining@yuansongbio.com; Tel: +86-13816065478, E-mail: zhangkangjian@yuansongbio.com

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 31701220)、上海市东方英才计划(批准号: CYQN2023030)、上海元宋生物技术有限公司院士专家工作站资助 项目(批准号: 19R1002275468、20R9004076411、21R4007547098、S182023110190129357)和上海市科技创新行动计划生物医药科技支撑项目(批准号: 19431904200)资助的课题

<sup>\*</sup>通信作者。Tel: 15618790090, E-mail: chenruoyu@yuansongbio.com; Tel: 18818210835, E-mail: lining@yuansongbio.com; Tel: 13816065478, E-mail: zhangkangjian@yuansongbio.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation (Grant No.31701220), the Shanghai Oriental Talent Program (Grant No.CYQN2023030), the Academician Expert Workstation Grants in Shanghai Yuansong Biotechnology Co. (Grant No.19R1002275468, 20R9004076411, 21R4007547098, S182023110190129357) and the Shanghai Science and Technology Support Project on Biomedicine in the Action Plan of Science and Technology Innovation (Grant No.19431904200)

**Abstract** P28 (also known as PSMD10, P28<sup>GANK</sup> or gankyrin) is highly expressed (96.9%) in HCC (hepatocarcinoma) but not in normal cells. Therefore, *P28* promoter was used to design a novel oncolytic virus vector with liver cancer targeting. On this basis,  $Onco^{Ad}$ -P28-E1A- $\Delta$ E1B-TRAIL, a novel oncolytic adenovirus carrying *TRAIL* (TNF related apoptosis inducing ligand gene) was designed for HCC therapy. The infection of HCC cells with  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL showed that TRAIL protein could be highly expressed in hepatoma cells. Crystal violet staining showed that the virus could selectively target hepatoma cells and had no obvious toxicity to normal human hepatocytes at 10 MOI. *In vitro* level killing and apoptosis studies showed that  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL inhibited both Huh-7 and Hep-3B hepatoma cells in a time- and dose-dependent manner, and could significantly promote apoptosis of HCC cells. *In vivo*, the nude mice HCC-CDX therapy showed that the oncolytic adenovirus could promote the apoptosis of tumor cells and infiltration of immune cells, thus significantly inhibiting the growth of subcutaneous tumor of HCC cells. These results fully indicate that  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL can effectively inhibit the development of HCC and is a potential candidate drug for the treatment of HCC.

Keywords P28 promoter; TRAIL; oncolytic adenovirus; hepatocarcinoma

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是中国 第四大常见恶性肿瘤,并且是第二位肿瘤致死病 因<sup>[1-2]</sup>, 其中85%~90%是肝细胞癌(hepatocarcinoma, HCC, 以下简称肝癌), 严重威胁人民群众的生命和 健康<sup>[3]</sup>。肝癌发生的已知危险因素是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)或丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的慢性感染,以及食用受黄曲霉毒素污染 的食品、大量饮酒、肥胖、吸烟和Ⅱ型糖尿病[4]。现 阶段肝癌的治疗方式包括手术切除、局部消融、肝 移植、肝动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、放疗、靶向治疗和免疫治疗<sup>[5-6]</sup>。 但是许多肝癌患者在发现时已处于中晚期,错过手 术治疗的最佳时期,治疗方法和疗效受限。因此,阐 明肝癌发病机制,寻找肝癌早期特异性标志物和高 效治疗新方法,将有利于肝癌的早期诊断和及时治 疗。

溶瘤腺病毒的适当改造可以提高抗肿瘤作用, 一般包括剔除腺病毒在正常细胞中复制所必需而在 肿瘤细胞中不需要的部分基因、特异性启动子的替 换和抗癌基因的插入。P28是一种在肝癌中高表达 的新型癌蛋白,1998年由研究者TOMOKO等<sup>(7)</sup>发现, 2000年由JUN等<sup>[8]</sup>应用消减杂交法从人肝细胞癌组 织中筛选出来,经测序证实其与先前发现的P28基因 完全一致,P28基因编码人26S蛋白酶体(26S proteasome)调节亚单位19S/PA700复合物的一种非ATP酶 亚基<sup>[9]</sup>。已发现,P28的致癌作用源于对两种肿瘤抑制 蛋白Rb和P53的抑制,及对多种信号通路的调节,包括 Wnt/β-Catenin、NF-кB、STAT3/Akt、IL-1β/IRAK-1 和 RhoA/ROCK。Rb蛋白能调节肿瘤细胞增殖和调 亡等多种恶性生物学行为,P28可以与 Rb蛋白相互 作用使其磷酸化而降解<sup>[10]</sup>。MDM2-P53通路在肿瘤 发生与发展过程中起重要作用,P28还可以与MDM2 结合并促进P53的泛素化和降解<sup>[11]</sup>。研究结果显示 P28在肝癌细胞中检出率高达96.9%,但是其在正常 肝组织中没有表达,具有较好的肝癌细胞特异性<sup>[12]</sup>, 故可以作为HCC诊断靶标。本实验室克隆了P28蛋 白的启动子序列,利用双荧光素酶报告基因检测系 统(dual-luciferase reporter assay)对其不同片段的启动 子活性进行检测,筛选出活性较高的196 bp的核心序 列,并用其替换腺病毒内源性启动子,构建出P28调 控E1A区并全删E1B区的特异性靶向肝癌的溶瘤腺 病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-E1A-ΔE1B(以下简称Onco<sup>Ad</sup>)载体。

然而溶瘤腺病毒在体内的抗肿瘤作用仅依靠 病毒载体本身是不够的,其临床药效非常局限。在 溶瘤病毒载体中插入协同治疗基因,当病毒特异性 地在肿瘤中大量复制时,其携带的治疗基因也能特 异性在肿瘤中复制与表达,协助溶瘤腺病毒进一步 发挥抗肿瘤作用<sup>[13-14]</sup>。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导 配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 于1995年被Weilay发现并命名,是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)基因超家族的成员之一,人 *TRAIL*基因位于3号染色体长臂2区6带(3q26),编码 由281个氨基酸组成的II型跨膜蛋白<sup>[15]</sup>。TRAIL与其 受体结合可诱导胞质内特异性蛋白募集到受体的死 亡域,形成TRAIL-DR4/DR5-FADD-Pro-Caspase8的 死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC), 促使Pro-Caspase8催化形成有活性的凋 亡起始蛋白半胱天冬酶8(Caspase8)并通过固有线 粒体途径介导凋亡<sup>[16-17]</sup>。TRAIL可以在不杀伤正常 细胞的前提下,选择性诱导肿瘤细胞发生凋亡<sup>[18-20]</sup>。 肝、肺等多种肿瘤细胞株75%以上都对TRAIL敏感, TRAIL在肿瘤基因治疗领域受到了越来越多的重 视<sup>[21]</sup>。鉴于TRAIL蛋白优秀的抗肿瘤作用,本实验 室构建了携带*TRAIL*基因的溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL,该溶瘤腺病毒在特异性靶向并杀伤肝癌细 胞的同时,可以在肝癌细胞中表达TRAIL,以发挥靶 向性和促肝癌细胞凋亡的双重作用,为肝癌的治疗 提供一种新的研究思路。

# 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种和细胞株

pshuttle-P28-E1A-ΔE1B、pCA13-TRAIL、大 肠杆菌菌株DH5α和BJ5183-AdEasy-E3为刘新垣院 士课题组保存; HEK293购自ATCC; Huh-7、Hep-3B、Hep-G2、QSG-7701、A549和HeLa来自中国科 学院上海细胞库。

### 1.2 试剂与仪器

DMEM(cat#11965092)、RPMI-1640(cat#11875093) 培养基和胎牛血清购自Gibco公司;Effectene转染 试剂(cat#301425)购自Qiagen公司;CCK 8试剂盒 (cat#CK04)购自DOJINDO Laboratories公司;Hoechst 33342(cat#C1022)、胰蛋白酶(不含EDTA)(cat#P4201)、 β-actin抗体(cat#AF0003)购自上海碧云天生物技 术有限公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂 盒(cat#A211)购自南京诺唯赞生物科技有限公司; TRIzon试剂(cat#CW0580S)购自康为世纪生物科技 有限公司;TRAIL抗体(cat#3219T)购自Cell Signaling Technology公司;氯仿(cat#HW049401)、乙醇 (cat#XW00641751)、氯化铯(cat#20014213)、结晶紫 (cat#71012314)等购自国药集团化学试剂有限公司。

主要使用仪器如下: 1374型生物安全柜、Multiskan<sup>™</sup> FC型酶标仪(ThermoFisher Scientific公司); CKX53型倒置荧光显微镜(Olympus公司); AVANTI JXM-D183-30型高速冷冻离心机(Beckman Coulter 公司); FAC SAria<sup>™</sup>型流式细胞仪(BD Bioscience公 司); 2720型PCR仪(Applied Biosystems公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 溶瘤腺病毒的构建、包装和鉴定 用P28启

动子替换溶瘤腺病毒的野生型启动子,全删E1B区, 以pCA13-TRAIL为模板,通过PCR方法扩增出带有 TRAIL基因的表达框。PCR条件如下:98°C预变性 2 min; 98 °C变性30 s, 55 °C退火45 s, 68 °C延伸45 s, 36 个循环; 68 °C终延伸5 min; 4 °C冷却。引物序列如 下。上游引物序列TRAIL-F: 5'-ACA TCT GAC CTC AGA TCT AAT TCC CTG GCA TTA T-3'; 下游引物 序列TRAIL-R: 5'-CAG ATC TTC GAT GCT AGA CGA TCC AGA CAT G-3',由上海华津生物科技有限 公司合成。将 TRAIL 抗癌基因表达框以酶切连接的 方式插入到穿梭质粒pshuttle-P28-E1A-ΔE1B的BglII 位点处,构建出携带TRAIL抗癌基因的穿梭质粒 pshuttle-P28-E1A-ΔE1B-TRAIL。由上海杰李生物技 术有限公司测序,测序结果与质粒设计相符。穿梭 质粒与BJ5183-AdEasy-E3同源重组成功后,通过Effectene转染试剂转染状态良好的HEK293细胞,9天 左右出现空斑, 收集病毒, 提取病毒DNA, 应用PCR 进行鉴定,鉴定正确后获得溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL,储存于-80°C。

1.3.2 溶瘤腺病毒的扩增、纯化和滴度测定 HEK293细胞在10 cm细胞培养皿中培养,在细胞生 长至90%左右时,加入感染复数10 MOI(multiplicity of infection)的溶瘤腺病毒,3~4天后,观察到80% 左右空斑后收集细胞,反复冻融3次,通过氯化铯 (CsCl)密度梯度离心进行病毒纯化(梯度:从下往上 依次为2 mL密度为1.4 g/mL CsCl溶液、3 mL密度为 1.3 g/mL CsCl溶液、5 mL密度为1.1 g/mL CsCl溶液,用 1.1 g/mL CsCl溶液重悬病毒沉淀,4°C、20000 r/min离 心2 h)。

1.3.3 细胞培养 HEK293、Huh-7、Hep-3B、 Hep-G2、A549和HeLa细胞使用含10%胎牛血清的 DMEM培养基于37 ℃、5% CO₂培养箱中进行培养; QSG-7701细胞使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培 养基于37 ℃、5% CO₂培养箱中进行培养。3天左右 传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.4 结晶紫染色法检测细胞存活 向24孔板中 按照每孔5×10<sup>5</sup>个细胞分别接种QSG-7701、Huh-7、 Hep-3B、Hep-G2、A549和HeLa细胞,待其贴壁后 分别加入不同MOI(0.1、1、10、100)的病毒,其中 不加病毒组为对照组,按上述条件培养96h后吸去 上层培养液,加入500μL/孔结晶紫染色液,常温染色 40 min,结束后吸去结晶紫染色液,用清水小心清洗 770

剩余残留液体,倒置晾干并拍照。实验重复3次。

1.3.5 CCK 8检测细胞存活率 向96孔板中按照每 孔5×10<sup>3</sup>个细胞分别接种Huh-7和Hep-3B细胞,待其 贴壁后分别加入不同MOI(0、0.1、1、10、20、50) 的病毒,其中不加细胞组为空白组,不加病毒组为 对照组,每组设置6个副孔,按上述培养条件分别培 养24、48、72、96 h。向每孔中加入10 μL CCK 8 溶液,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内放置1 h后,送至 酶标仪下检测在450 nm处的吸光度(*D*)值。细胞 存活率计算公式如下:细胞存活率=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100%(As:实验孔吸光度值; Ac:对照孔吸光度 值; Ab:空白孔吸光度值)。实验重复3次。

1.3.6 Hoechst 33242染色法检测细胞凋亡情况 向6孔板中按照每孔4×10<sup>5</sup>个细胞分别接种Huh-7和 Hep-3B细胞,待其贴壁后分别加入5 MOI Onco<sup>Ad</sup>或 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL,其中不加病毒组为对照组,按照 上述条件培养96 h后,吸去上清,使用PBS溶液温和 清洗2次后加入200 μL Hoechst 33242染料, 37 °C避 光孵育20 min,置于倒置荧光显微镜下观察细胞形 态变化。实验重复3次。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 以每孔4×10<sup>5</sup> 个细胞在6孔板中分别接种Huh-7和Hep-3B细胞,贴 壁后分别加入5 MOI Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL, 对照组为不加病毒组,按照上述条件培养48 h。按 照Vazyme Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡试剂盒 说明书操作,进行FITC和PI双染,然后在1 h内至流 式细胞仪下检测细胞凋亡状态。实验重复3次。

1.3.8 Western blot实验检测蛋白质水平 于6孔板 中加入对数期生长的Huh-7细胞,密度为4×10<sup>5</sup>个/孔,培养24 h后,加入10 MOI Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL, 不加病毒组为对照组,按上述条件培养48 h,检测 TRAIL蛋白的表达水平。

1.3.9 动物饲养及裸鼠体内药效实验 在6周龄的 雌性裸鼠(BALB/c)中建立Huh-7和Hep-3B皮下移植 瘤模型(cell derived xenograft, CDX),裸鼠购自上海 斯莱克实验动物有限公司。所有小鼠均为无特定 病原体(specific pathogen free, SPF)级,保持温度为 20~26°C,湿度为40%~70%,光照/黑暗循环12h。每 个笼子里不超过5只小鼠,它们可以自由获取食物和 水。本研究已通过上海立迪生物技术有限公司动物 伦理委员会审核批准,动物实验伦理编号为LDIA-CUC 006。 取对数期生长的Huh-7及Hep-3B细胞,用胰蛋白 酶在37 °C下消化5 min,用磷酸缓冲盐水(phosphate buffer saline, PBS)调整细胞浓度为5×10<sup>7</sup>个/mL,以 100 μL体积接种在裸鼠右下侧腹部,待肿瘤体积达 到100 mm<sup>3</sup>左右,通过随机分组的方式将裸鼠分为 2组,每组6只,分别注射PBS和Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL。 剂量为:病毒瘤内注射5×10<sup>8</sup> PFU(plaque forming unit)/100 μL,每2天注射1次,共注射5针,每隔3天使 用游标卡尺测量肿瘤体积,在第24天或者肿瘤体积 达到1 000 mm<sup>3</sup>时对裸鼠进行安乐死。对记录的肿 瘤体积进行作图并计算治疗终点的抑瘤率。肿瘤体 积=0.5×a×b<sup>2</sup>, a和b分别代表肿瘤的长径和宽径。抑 瘤率=[1-X/Y]×100%; X表示治疗终点各组瘤子终末 体积均值; Y表示治疗终点溶媒组(PBS)瘤子终末体 积均值。

1.3.10 HE染色 裸鼠体内药效实验结束后, 对裸 鼠进行安乐死, 取肿瘤组织进行石蜡包埋。对于HE 染色, 从石蜡包埋组织中取标准4μm切片, 脱蜡, 梯 度水化, 苏木素染核, 分化, 伊红复染, 梯度脱水, 透 明处理, 封片后使用DM6B显微镜(徕卡显微系统)观 察样品。

1.3.11 Ki67组化染色 对于Ki67染色,从石蜡包 埋组织中取标准4 μm切片,去石蜡,抗原修复,阻断, 4 °C孵育过夜。然后用PBS洗涤样品,并与酶联抗 IgG抗体在37 °C下孵育30 min。再用PBS洗涤3次后, 用3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)染 色5~10 min。反染色和脱水后,使用DM6B显微镜(徕 卡显微系统)观察样品。

1.3.12 统计学分析 本文的相关实验数据以平均值±标准偏差表示,并用GraphPad Prism 6软件进行*t*-test检验分析。\**P*<0.05表示具有统计学差异;</li>
\*\**P*<0.01表示具有统计学显著性差异。</li>

### 2 结果

#### 2.1 溶瘤腺病毒的构建与鉴定

根据癌症的靶向基因-病毒治疗策略,成功构 建出溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL(图1A); Western blot方法检测了Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL携带的*TRAIL*基 因在Huh-7细胞中的表达情况,结果显示TRAIL蛋白 成功表达(图1B)。以上实验结果表明,溶瘤腺病毒 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL在肝癌细胞中可以成功地表达抗 肿瘤TRAIL蛋白。



A: 溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL结构; B: Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理Huh-7细胞48 h后, Western blot检测TRAIL蛋白在Huh-7细胞中的表达。 A: the structure of oncolytic adenovirus Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL; B: Huh-7 cells were treated with the Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL for 48 h, and Western blot was used to detect the expression of TRAIL protein.





用不同MOI(0.1、1、10、100)的病毒感染A549、HeLa、QSG-7701、Hep-G2、Huh-7和Hep-3B细胞96 h 后, 通过结晶紫染色法检测细胞存活率。A549, HeLa, QSG-7701, Hep-G2, Huh-7 and Hep-3B cells were infected with different MOI (0.1, 1, 10, 100) viruses for 96 h, and the cell viability was measured by crystal violet staining.



# 2.2 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL选择性靶向肝癌细胞

结晶紫染色法结果(图2)显示,在该溶瘤腺病 毒在10 MOI时,非小细胞肺癌细胞A549、宫颈癌 细胞HeLa和正常肝细胞QSG-7701中染色较深,而 肝癌细胞Hep-G2、Huh-7和Hep-3B中基本没有染色, 表明溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对Hep-G2、Huh-7 和Hep-3B等肝癌细胞的杀伤作用较强,但对A549及 HeLa等非肝癌细胞系的杀伤作用很弱,特别是对正 常肝细胞QSG-7701几乎没有杀伤(高达100 MOI才有 一定的毒性),因此,溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL 可以特异性地杀伤肝癌细胞,具有高度的肝癌细胞 杀伤选择性和对正常细胞的安全性。

# 2.3 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL显著抑制Huh-7和Hep 3B细胞的增殖

根据图 2结晶紫染色结果显示 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对 Hep-G2细胞杀伤效果也略低于 Huh-7和 Hep-3B细胞,而且文献报道 Hep-G2细胞中 P28蛋白 表达量相对于后两种细胞要低<sup>[12]</sup>,因此在后续实验 中重点选取了 Huh-7和 Hep-3B进行研究。使用不同 MOI(0.1、1、10、20、50)的 Onco<sup>Ad</sup>或 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理正常贴壁的 Huh-7和 Hep-3B细胞48 h, CCK 8法结果(图3)显示,当病毒在10 MOI时, Onco<sup>Ad</sup> 处理组中 Huh-7细胞存活率约是 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL 处理组的 2.5倍, Onco<sup>Ad</sup>处理组中 Hep-3B细胞存活 率约是 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组的 2.7倍。使用 10 MOI Onco<sup>Ad</sup>或 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理正常贴壁的 Huh-7和 Hep-3B细胞24、48、72、96 h,发现病毒对 肝癌细胞的抑制作用随时间依赖性增强。这些结果 表明, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对肝癌细胞Huh-7和Hep-3B均有抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。

# 2.4 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL诱导 Huh-7和 Hep-3B细 胞凋亡

鉴于在图 3A和图 3B中, 10 MOI Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL作用下细胞死亡率达到 80%左右,大部分细胞 可能已经处于晚期凋亡或者细胞已经破裂,不适宜 进行凋亡检测,而1 MOI条件下则仅有 70%左右的死 亡率,细胞的凋亡率可能不是很高,而且根据本课题 组以往的经验来看,5 MOI Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL条件下 凋亡检测比较适合比较不同溶瘤病毒的差异(数据 未展示),所以综合考虑下,采用 5 MOI进行后续凋亡 相关的检测。Hoechst 33342染色检测 5 MOI Onco<sup>Ad</sup> 或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL作用 Huh-7和 Hep-3B细胞48 h后 的凋亡情况(图 3A~图 3F),对照组中细胞核无致密浓 染现象,Onco<sup>Ad</sup>处理组中可以观察到细胞核呈致密浓 染,Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组中可以显著观察到细胞



用不同感染复数的Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理Huh-7(A)和Hep-3B(B)细胞96 h 后, CCK 8法检测其杀伤效果;用10 MOI Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理Huh-7(C)和Hep-3B(D)细胞24、48、72、96 h 后, CCK 8法检测其杀伤效果。\*\*P<0.01。

Huh-7 (A) and Hep-3B (B) cells were infected with  $Onco^{Ad}$  or  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL with different MOI for 96 h, the killing effect was detected by CCK 8 method; Huh-7 (C) and Hep-3B (D) cells were infected with  $Onco^{Ad}$  or  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL with 10 MOI for 24, 48, 72 and 96 h, the killing effect was detected by CCK8 method. \*\*P<0.01.

图3 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL显著抑制肝癌细胞Huh-7和Hep-3B的增殖 Fig.3 Anti-proliferative effects of Huh-7 and Hep-3B cells by Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL TRAIL可以促进Huh-7和Hep-3B细胞凋亡的发生。

根据Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡试剂盒说明,流式细胞术双参数散点图的右上象限与右下象限分别代表晚期凋亡和早期凋亡,该两象限百分比

相加即为发生凋亡的细胞比率。流式细胞术检测结果(图4G和图4H)显示,在Huh-7细胞中,Onco<sup>Ad</sup>处理组的凋亡率约为33%,Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组的凋亡率为53%;在Hep-3B细胞中,Onco<sup>Ad</sup>处理组的凋



A~F:使用5 MOI Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理Huh-7和Hep-3B细胞48 h后的Hoechst 33342染色结果。A:空白对照组; B: 5 MOI Onco<sup>Ad</sup>处理组; C: Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组; D:空白对照组; E: 5 MOI Onco<sup>Ad</sup>处理组; F: Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组; 箭头表示发生碎裂的细胞核; G:使用5 MOI Onco<sup>Ad</sup>或Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理Huh-7和Hep-3B细胞48 h, Annexin V-FITC/PI双染后流式细胞仪检测细胞凋亡。H:各组凋亡率分析,\*\*P<0.01。

A-F: Huh-7 and Hep-3B cells were treated with  $Onco^{Ad}$  or  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL for 48 h and stained by Hoechst 33342. A: control group; B: 5 MOI  $Onco^{Ad}$  treated group; C:  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL treated group; D: control group; E: 5 MOI  $Onco^{Ad}$  treated group; F:  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL treated group; arrows indicated fragmented nucleus; G: Huh-7 and Hep-3B cells were treated with 5 MOI  $Onco^{Ad}$  or  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL for 48 h. Apoptosis was detected by flow cytometry after Annexin V-FITC/PI double staining. H: analysis of apoptosis rate of each group, \*\*P<0.01.

图4 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL促进肝癌细胞的凋亡

Fig.4 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL promotes apoptosis of hepatoma cells

亡率约为27%, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组的凋亡率 为49%, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL比Onco<sup>Ad</sup>能更明显提高 肝癌细胞的凋亡率。

# 2.5 动物实验检测Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对肿瘤细胞 的抑制作用

鉴于溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL在体外细 胞水平表现出了显著优于Onco<sup>Ad</sup>载体的抗肿瘤效果, 为了进一步评估Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL在动物体内的 抗肝癌药效,本实验室构建了Huh-7和Hep-3B肝癌 细胞裸鼠皮下移植瘤CDX模型。结果如图5B和图 5C所示, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对于Huh-7和Hep-3B裸 鼠皮下移植瘤 CDX模型具有显著的抑瘤效果,治疗 终点抑瘤率分别为39.6%和80.8%。在Hep-3B裸鼠 皮下移植瘤 CDX模型中, 该溶瘤病毒具有非常显著 的药效,对其肿瘤组织进行HE染色和Ki67组化染色 分析发现,如图5D和图5E所示,相对于溶媒组(PBS), Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL治疗可以显著促进肿瘤细胞的凋 亡,抑制肿瘤增殖标志物Ki67的表达。基于这些可 以得出结论,溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL具有显 著的抗肝癌效果和免疫调动效果,具有良好的临床 治疗应用前景。

### 3 讨论

在肝癌治疗中,肿瘤免疫治疗发挥了重要的作用<sup>[6]</sup>,而肿瘤免疫疗法依赖于利用患者的免疫系统 来微调特定的抗肿瘤反应并最终根治肿瘤。在多种 治疗方法中,溶瘤病毒疗法已成为一种新型的肿瘤 免疫疗法。溶瘤病毒介导的免疫原性肿瘤细胞死亡 能诱导肿瘤抗原的释放,进而诱导抗肿瘤免疫<sup>[22-23]</sup>。

溶瘤病毒可被改造用于在瘤内递送免疫刺激 分子,如肿瘤抗原或细胞因子,以进一步增强抗肿瘤 反应。实际上,早在2001年,刘新垣院士就已经结合 基因治疗和病毒治疗两种疗法的特点,提出了治疗 恶性肿瘤的有效策略,即癌症的靶向基因-病毒治 疗(cancer targeting gene-viro-therapy, CTGVT)策略。 该策略指通过基因工程改造病毒,并在其载体上插 入抗癌基因,这些抗癌基因随着病毒的复制在肿瘤 细胞内成千上万倍的复制,继而可以数百倍乃至上 万倍地提高其抗癌基因的表达量,极大提高了对肿 瘤细胞的杀伤能力<sup>[13-14]</sup>。至今,ONYX-015、ON-COS-102和CELYVIR等溶瘤腺病毒已进行过临床试 验评估,其有效性和安全性已被多次证明<sup>[24]</sup>,溶瘤腺 病毒也被证明是一个前景十分广阔的治疗载体。腺病毒的E1A和E1B分别与宿主细胞内抑癌基因Rb或 p53的产物p105或p53结合可消除Rb或p53基因抑制 病毒增殖的作用,故当E1A和E1B突变或缺失后,腺 病毒无法在正常细胞内增殖<sup>[25]</sup>。HCC中p53基因突 变是最为频发的事件,本实验室构建的删除E1B基 因的腺病毒可以在p53缺陷的肿瘤中复制,而在正常 细胞中不复制,故加强了腺病毒的安全性。

TRAIL诱导细胞凋亡具有肿瘤特异性,不依赖 p53抑癌基因,并能够通过旁观者效应杀伤肿瘤细 胞<sup>[26]</sup>。TRAIL作为免疫调节成分,在人体免疫监视 和免疫调节上均能发挥作用,且对自身免疫性和病 毒感染性疾病均有一定抵抗作用,从而阻止由免疫 微环境和病毒感染引起的癌症发生[27]。正因为以 上特性,近年来TRAIL在肿瘤治疗领域得到了广泛 研究。然而,研究发现部分肿瘤对TRAIL有耐药性, TRAIL全身应用产生肝毒性,以及无法维持其在靶 细胞的有效浓度等问题,限制了TRAIL在临床中的 应用<sup>[28-30]</sup>。因此,构建含有TRAIL功能基因载体的基 因疗法有望解决TRAIL治疗肿瘤的难题。本文构建 的Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL,用高活性的肝癌特异性启动 子P28替换了腺病毒内源的E1A启动子来调控E1A 区,同时,敲除腺病毒基因组E1B基因区域,并在E1B 缺失区插入了抗癌基因 TRAIL, 以期能克服单独使 用TRAIL和溶瘤腺病毒的不足,提高其靶向肝癌细 胞的能力和对肝癌细胞的杀伤作用。

本文成功构建了P28启动子调控E1A并携带 TRAIL基因的溶瘤腺病毒, Western blot实验结果显 示TRAIL蛋白可以在肝癌细胞中高效表达。结晶 紫染色实验结果显示, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL可以选择 性靶向杀伤肝癌细胞, 且10 MOI对人正常肝细胞 没有明显毒性。CCK 8实验结果显示Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL对肝癌细胞Huh-7和Hep-3B均有抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。Hoechst 33342染色实验 显示Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL能促进Huh-7和Hep-3B的调 亡。流式细胞术检测到Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL处理组中 凋亡率在50%左右, Onco<sup>Ad</sup>处理组中凋亡率在30%左 右,说明前者能更强地促进肝癌细胞凋亡。在裸鼠 皮下移植瘤CDX药效实验中,Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL可 以显著抑制肝癌细胞皮下瘤的生长,并且组织染色 分析显示该溶瘤病毒可以显著促进肿瘤细胞的凋亡 并促进免疫细胞的浸润,这些数据提示溶瘤腺病毒



A:溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL治疗裸鼠肝癌细胞裸鼠皮下移植瘤CDX模型模式图;在Huh-7(B)和Hep-3B(C)裸鼠皮下移植瘤CDX模型中,采用Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL瘤内注射5×10<sup>8</sup> PFU/100 μL,每2天注射1次,共注射5针,每隔3天使用游标卡尺测量肿瘤体积;治疗完成后对裸鼠安乐死并取肿瘤组织,多聚甲醛固定后石蜡包埋,并进行后续HE染色(D)和Ki67染色(E);\*P<0.05。

A: Flow chart of CDX subcutaneous tumor model treated by  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL in nude mouse; in CDX subcutaneous tumor bearing models of Huh-7 (B) and Hep-3B (C) nude mice,  $5 \times 10^8$  PFU/100 µL were injected intratumorally with  $Onco^{Ad}$ -P28-TRAIL, once every two days, with a total of five injections. The tumor volume was measured with vernier calipers every three days. After the treatment, the nude mice were euthanized and the tumor tissues were taken, fixed with paraformaldehyde, embedded in paraffin, and followed by HE staining (D) and Ki67 staining (E). \**P*<0.05.

# 图5 Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL在体内水平显著抑制肝癌裸鼠皮下移植瘤CDX模型

Fig.5 In vivo, Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL significantly suppresses of hepatoma cells in CDX model

Onco<sup>Ad</sup>-P28-TRAIL能有效抑制肝癌的发展,是一种具有临床应用潜力的肝癌治疗候选药物。

# 参考文献 (References)

[1] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and

risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-58.

[2] XIN L, PIERLUIGI R, DOMINIK P, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(9): 541-57.

- [3] ZHOU J, SUN H C, WANG Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2017 edition) [J]. Liver Cancer, 2018, 7(3): 235-60.
- [4] PINATO D J, GUERRA N, FESSAS P, et al. Immune-based therapies for hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2020, 39(18): 3620-37.
- [5] AERTS M, BENTEYN D, VAN VLIERBERGHE H, et al. Current status and perspectives of immune-based therapies for hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 253-61.
- [6] JOSEP M, ROSER P, MARK Y, et al. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21(4): 294-311.
- [7] HORI T, KATO S, SAEKI M, et al. cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome [J]. Gene, 1998, 216(1): 113-22.
- [8] HIGASHITSUJI H, ITOH K, NAGAO T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrinrepeat protein overexpressed in hepatomas [J]. Nat Med, 2000, 6(1): 96-9.
- [9] CHEN Y, SHARP Z D, LEE W H. HEC binds to the seventh regulatory subunit of the 26 S proteasome and modulates the proteolysis of mitotic cyclins [J]. J Biol Chem, 1997, 272(38): 24081-7.
- [10] TAN L, FU X Y, LIU S Q, et al. Expression of p28<sup>GANK</sup> and its correlation with RB in human hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2005, 25(3): 667-76.
- [11] REN Y B, LUO T, LI J, et al. p28<sup>GANK</sup> associates with p300 to attenuate the acetylation of RelA [J]. Mol Carcinog, 2015, 54(12): 1626-35.
- [12] FU X Y, WANG H Y, TAN L, et al. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(4): 638-43.
- [13] LIU X Y, LI H G, ZHANG K J, et al. Strategy of cancer targeting gene-viro-therapy (CTGVT) a trend in both cancer gene therapy and cancer virotherapy [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13(9): 1761-7.
- [14] 刘新垣. 一种抗癌新策略——肿瘤的基因病毒治疗[J]. 中国肿 瘤生物治疗杂志(LIU X Y. A new anticancer strategy: gene-virotherapy of cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy), 2001(1): 1.
- [15] KISCHKEL F C, LAWRENCE D A, CHUNTHARAPAI A, et al. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5 [J]. Immunity, 2000, 12(6): 611-20.
- [16] COLLISON A M, LI J, DE SIQUEIRA A P, et al. TRAIL signals through the ubiquitin ligase MID1 to promote pulmonary fibrosis [J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1): 31.
- [17] CHIARA B, MARKUS R. TRAIL-induced apoptosis and protea-

somal activity: mechanisms, signalling and interplay [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2024, 1871 (4): 119688.

- [18] ZHOU H, WANG Y, BI K, et al. Serum-soluble TRAIL: a potential biomarker for disease activity in myositis patients [J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(5): 1425-31.
- [19] ZHANG R, ZHANG X, MA B, et al. Enhanced antitumor effect of combining TRAIL and MnSOD mediated by CEA-controlled oncolytic adenovirus in lung cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2016, 23(6): 168-77.
- [20] ZHANG Z, LIU X. An oncolytic adenovirus of hSSTr2 enhances TRAIL lethality in pancreatic cancer via death receptor and mitochondria pathways [J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 1379.
- [21] JACOB D, SCHUMACHER G, BAHRA M, et al. Fiber-modified adenoviral vector expressing the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(17): 2552-6.
- [22] DANNI L, YINAN SHEN, TINGBO L. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 11(8): 156.
- [23] LAURA M, ANDREA V. Oncolytic viruses in the era of omics, computational technologies, and modeling: thesis, antithesis, and synthesis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(24): 17378.
- [24] ZHANG Z, XIAO C, YONG T, et al. Cellular microparticles for tumor targeting delivery: from bench to bedside [J]. Chem Commun, 2020, 56(46): 6171-88.
- [25] ABBAS B M, EL-MOGY M A, HAJ-AHMAD Y. Oncolytic E1B 55 kDa-deleted adenovirus replication is independent of p53 levels in cancer cells [J]. Cell Mol Biol, 2017, 63(7): 1-11.
- [26] SEDGER L M, GLACCUM M B, SCHUH J C, et al. Characterization of the *in vivo* function of TNF-alpha-related apoptosisinducing ligan, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L genedeficient mice [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(8): 2246-54.
- [27] WANG L, DING Y, PARK H, et al. Abstract 3493: new, highly potent antibodies to death receptors having Fc mutations to increase antitumor activity [J]. Cancer Res, 2016, 76(14 Supplement): 3493.
- [28] KOSCHNY R, GANTEN T M, SYKORA J, et al. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancerspecific apoptosis within a therapeutic window [J]. Hepatology, 2007, 45(3): 649-58.
- [29] SINGH T R, SHANKAR S, CHEN X, et al. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma *in vivo* [J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5390-400.
- [30] ANTONELLA M, HENNING W. Harnessing TRAIL-induced cell death for cancer therapy: a long walk with thrilling discoveries [J]. Cell Death Differ, 2023, 30(2): 237-49.