

溶瘤病毒联合丝裂霉素对膀胱癌细胞内外杀伤的实验研究

赵国志, 谭万龙, 郑少斌, 吴远东, 谢毅, 朱文辉 (南方医科大学南方医院泌尿外科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨溶瘤病毒与丝裂霉素联合应用对膀胱癌 T-24 细胞体内外生长的抑制效应和机制。方法 将溶瘤病毒不同的感染复数或与丝裂霉素 (0.1 mg/L) 联合应用, 通过细胞生长抑制实验及裸鼠皮下移植瘤模型, 观察其对膀胱癌 T-24 细胞的作用及其机制。结果 与单独应用相比, 溶瘤病毒与低剂量的 MMC 联合可明显抑制 T-24 细胞体外生长, 诱导 T-24 细胞凋亡, 裸鼠体内肿瘤发生时间延迟, 4 周后肿瘤体积与单独应用时相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。与体外处理结果一致。结论 溶瘤病毒与 MMC 联合应用可显著增强 MMC 对 T-24 细胞的杀伤作用, 进一步提高膀胱癌的疗效。

关键词: 溶瘤病毒; 丝裂霉素; 膀胱肿瘤

中图分类号: R69 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)11-1623-03

Cytotoxic effect of oncolytic virus combined with mitomycin against human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*

ZHAO Guo-zhi, TAN Wan-long, ZHENG SHAO-bin, WU Yuan-dong, XIE Yi, ZHU Wen-hui

Department of Urology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of combined use of oncolytic virus and the chemotherapeutic agents mitomycin (MMC) in growth inhibition of human bladder cancer cell line T-24 *in vitro*. **Methods** Human bladder cancer cell line T-24 was infected with oncolytic virus (ONYX-015) of different multiplicity of infection, or treated with MMC in addition to ONYX-015. The changes in the cell growth, morphology, and apoptosis of cultured T-24 cells were observed by means of cell counting and fluorescence microscopy after the treatments. The effects of the treatment protocols were also tested in nude mouse model of implanted subcutaneous tumor. **Results** Combined use of ONYX-015 and MMC produced substantially stronger cytotoxic effect against T-24 cells than exclusive use of ONYX-015. In *in vivo* experiments, combination of oncolytic virus and MMC resulted in much more significant tumor growth inhibition than either of the agents used alone. Obvious T-24 cell apoptosis could be observed in response to combined ONYX-015 and MMC treatment and exclusive ONYX-015 treatment. **Conclusions** ONYX-015 combined with MMC can produce significant cytotoxicity against T-24 cells and enhance therapeutic efficacy against bladder carcinoma.

Key words: oncolytic virus; mitomycin; bladder neoplasm; carcinoma

近些年随着分子生物学技术的发展, 人类改造病毒的能力进一步增加, 可以将病毒改造成具有选择性地能在肿瘤细胞中复制的功能。一旦肿瘤细胞被这种病毒感染, 病毒就在肿瘤细胞中大量复制, 最终杀死细胞并释放出来以感染更多的肿瘤细胞。这种技术的关键在于要使病毒不能在正常细胞中复制, 以免伤及正常组织。这类病毒称为溶瘤病毒。由于溶瘤病毒转染较低, 我们采用溶瘤病毒 (ONYX-015) 与 Mitomycin (MMC) 联合, 探讨基因治疗与化疗联合应用提高膀胱肿瘤疗效的机制。

1 材料和方法

收稿日期: 2005-10-25

基金项目: 广东省自然科学基金 (020059)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (020059)

作者简介: 赵国志 (1972-), 男, 在读硕士研究生, 主治医师, 电话: 020-61645827, E-mail: zxdcc@sina.com

通讯作者: 谭万龙, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 电话: 020-61641762, E-mail: twl@fimmu.com

1.1 实验材料

1.1.1 病毒株 dl1520/ONYX-015 (E1655kD 蛋白缺失的腺病毒) 为南方医科大学药学院饶进军博士赠送。

1.1.2 细胞株 (1)293 细胞株 (腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系)。(2)用人源化绿色荧光蛋白 (hGFP) 标记的 T-24 膀胱肿瘤细胞 (本科室提供)。

1.1.3 实验动物 BALB/c 裸鼠 (6~8 周, 雌性) 由南方医科大学实验中心提供 (许可证: 2002-009、2004B023、2004A078), 动物实验均在 SPF 级实验室 (许可证: SY×K<军>2002-036) 进行。

1.2 方法

1.2.1 T-24 细胞培养 1640 营养液 (加 15% 小牛血清)。293 细胞培养 DMEM (加 10% 小牛血清, 2 mmol/L 谷氨酸)。

1.2.2 病毒增殖 接种 ONYX-015 悬液 0.5 ml 和 100 ml (培养面积 4.5 cm × 7.5 cm) 于 293 细胞培养瓶, 至细胞出现明显细胞病变效应 (CPE), 即 CPE 达到 90% 时收获病毒, -70 °C 保存备用。

1.2.3 病毒悬液制备及滴定 刮取细胞层,4℃离心,收集沉淀。重复差速离心,收集纯化的 ONYX-015 颗粒。经空斑滴定为 10⁸ PFU/ml,备用。

1.2.4 体外实验 按 1、2、5、10、50 MOI 接种 ONYX-15 及对照组悬液于 6 孔板 T-24 细胞培养皿,每 12 h 观察 1 次。同时行丝裂霉素 0.05、0.1、0.125、0.15、0.175 mg/L 及对照组悬液于 6 孔板 T-24 细胞培养皿,观察肿瘤细胞杀伤情况。

1.2.5 细胞增殖活性的测定 采用荧光显微镜和台盼蓝染色细胞记数法分析,24 孔培养板每孔接种 50 000 个 T-24 细胞,用稀释于 200 μl 腺病毒 ONYX-015, 10, 20, 40 MOI 3 组以及设立对照丝裂霉素 0.1 mg/L、10 MOI ONYX-015+ 丝裂霉素 0.1 mg/L 和空白对照 (T-24 细胞) 3 组共 6 个实验单位。各实验单位设 4 个平行孔,第 1、3、5、7 天分别进行荧光检测及消化和收集各组细胞进行台盼蓝染色细胞记数,可检测细胞杀伤个数。绘制细胞生长抑制曲线。

1.2.6 T-24 实体瘤模型的建立 T-24 细胞悬液调至 1×10⁷/ml,取 0.2 ml 接种至 BALB/c 裸鼠肋缘皮下。10~15 d 后,出现可触及 (0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm) 肿块。至此,膀胱移植瘤动物模型建立,共制备 32 只。

随机区组设计,将 32 只小鼠分为 4 个处理组 (I、II、III、IV),其中 I 组:ONYX-015 10⁸ PFU·ml⁻¹ 瘤体注射;瘤体注射;II 组:丝裂霉素 0.1 mg/L 瘤体注射;III 组:ONYX-015 10⁸ PFU·ml⁻¹+ 丝裂霉素 0.1 mg/L 瘤体注射;IV 组:空白对照,1640 培养液注射。瘤体内多位点注射治疗,周边两点,中间一点,每次每只 0.2 ml,每日注射 1 次 (50 μl),连续 5 次。第 6 天起 II、III 组开始腹腔注射 MMC,每天 1 次,每次 0.1 mg/L (用生理盐水稀释成 200 μl),连续 7 d。I、IV 组同样方式腹腔注射生理盐水 200 μl 做对照。每周观测并测量肿瘤 2 次。3~4 周后处死裸鼠,取肿瘤,称重,量直径,进行病理观察。

观察指标:肿瘤大小,重量,并取实验组小鼠内脏肿瘤组织切片作组织病理学分析 (光镜下和电镜下的

病理改变)。

有关计算公式如:肿瘤体积 (V)=ab²/2 (a 为长径, b 短径)

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件行方差分析,多样本均数间的多重比较用 q 检验,对 ONYX-015、丝裂霉素及联合应用实验组与对照组的肿瘤体积进行统计学分析,以 P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ONYX-015 与 MMC 联合应用对细胞形态学的影响

ONYX-015 感染后第 3 天、MMC 应用后第 2 天,T-24 细胞部分悬浮,变圆、膨胀,胞浆中出现空泡,随后细胞萎缩、坏死、脱落,少数细胞出现凋亡小体。其形态改变表现有时间性。联合应用 ONYX-015 与 MMC 时,所引起的细胞形态学改变与单用时类似,但细胞脱落现象更明显,部分细胞出现大量凋亡小体。

2.2 ONYX-015 单用及 ONYX-015 与 MMC 联合应用对细胞生长的抑制作用
10 MOI ONYX-015 与 MMC 联合应用后第 3 天,T-24 细胞生长抑制率为 84.1%,明显强于单用 ONYX-015 (52.6%) 或 MMC (29%),图 1、2。

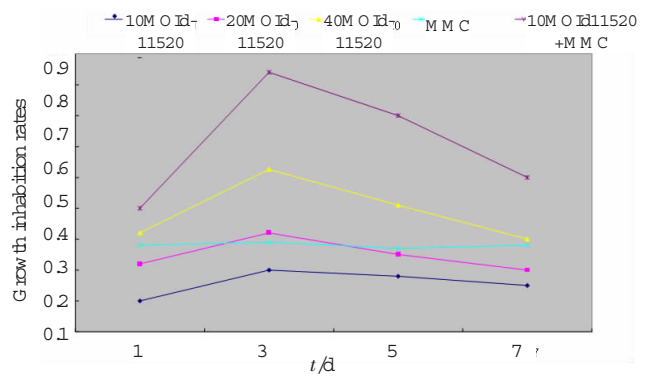


图 1 ONYX-015 与 MMC 单用或联合应用对 T-24 细胞生长的抑制作用

Fig.1 T-24 cell growth inhibition by ONYX-015, MMC, and their combination

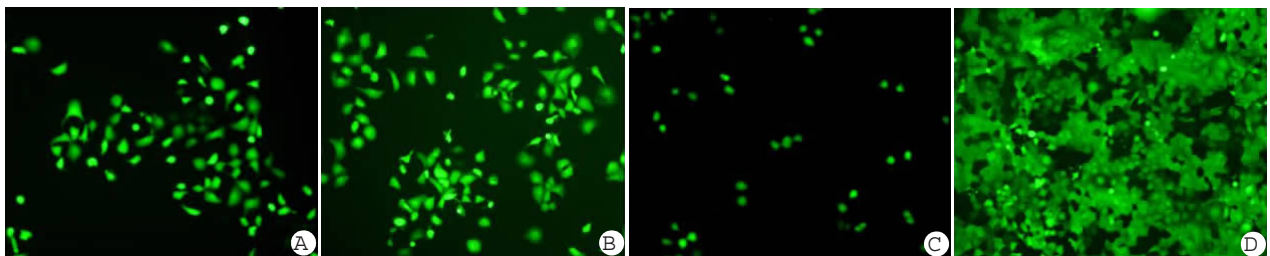


图 2 ONYX-015 与 MMC 单用或联合对 T-24 细胞抑制作用的荧光照片 (第 3 天)

Fig.2 Fluorescence microscopy demonstrating T-24 cell growth inhibition by ONYX-015, MMC, and their combination

A: 20 MOI ONYX-015; B: MMC; C: 10 MOI ONYX-015+MMC; D: Control group

2.3 ONYX-015 与 MMC 联合应用对 T-24 细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响

2.3.1 ONYX-015 + MMC 组肿瘤发生时间分别比对照组延迟 3 d 和 5 d; 4 周后 ONYX-015 + MMC 组、ONYX-015 组、丝裂霉素组平均肿瘤体积分别为 $(10.38 \pm 4.52) \text{ mm}^3$ 、 $(44.11 \pm 5.67) \text{ mm}^3$ 和 $(38.98 \pm 4.46) \text{ mm}^3$, 而对照组平均肿瘤体积为 $(254.92 \pm 32.74) \text{ mm}^3$, 各处理组之间差异有显著性 ($P=0.000$)。

2.3.2 ONYX-015 单用及 ONYX-015 联合 MMC 治疗 BALB/C 裸鼠后光镜下改变 常规 HE 染色后光镜下观察, 其中对照组可见肿瘤细胞轮廓清楚, 胞内细胞器完整, 细胞核结构清晰可见, 细胞间界线分明, 可见毛细血管位于肿瘤细胞团块之中。而 ONYX-015 治疗后可见肿瘤细胞坏死, 细胞轮廓不清, 胞膜破裂, 细胞间界线模糊乃至消失, 细胞核被破坏。联合 MMC 后可见大片坏死灶, 着均一伊红色, 毛细血管中大量炎性细胞浸润。

2.3.3 ONYX-015 单用及 ONYX-015 联合 MMC 治疗 BALB/C 裸鼠后电镜下改变 可见到 ONYX-015 感染 T-24 细胞胞浆内富含不同发育阶段的病毒颗粒。完整病毒粒子直径约 70 nm, 成熟病毒粒子排列成晶格状。除此以外, 尚可见有病毒衣壳和未包装的病毒核物质, 并有病毒粒子的释放。病毒在细胞内引起明显的超微结构变化, 如胞膜溶解、线粒体肿胀、内质网扩张形成巨大空泡、胞浆内包涵体形成; 亦可见到核膜完整但核物质浓缩成团块、边聚等典型的核凋亡现象。胞浆浓缩, 细胞器致密。

3 讨论

E1B-55kDa 缺陷腺病毒 dl1520 作为溶瘤病毒, 是由 Bischoff 等人开发并于 1991 年报道的一种可在 P53 突变肿瘤细胞中选择性复制并裂解细胞的腺病毒基因药物, 又被称 ONYX-015。当腺病毒感染正常细胞后, 细胞内 p53 则上调, 使受染的细胞经历细胞周期停止或凋亡, 从而阻止了病毒的复制。但野生型的腺病毒可通过表达 E1B 基因而逃避细胞的这种“自杀”机制, 即该基因编码一种能与 p53 结合的蛋白质, 使 p53 失活, 从而导致病毒能继续复制。然而, ONYX-015 是缺乏 E1B 基因的, 所以它在正常细胞中不会复制或仅有低水平的复制, 但多数肿瘤细胞又是 p53 基因突变或 p53 蛋白无能的, 因此 ONYX-015 可以专门在这些瘤细胞中复制并溶解这些细胞, 同时释放大量子代病毒再感染其他细胞, 从而发挥连锁杀伤的抗肿瘤作用^[1]。超过 50% 人类恶性肿瘤存在 P53 突变或功能失活, 提示这种具有 p53 选择性的 ONYX-015 病毒是治疗肿瘤的一种很有希望的途径。

所以 ONYX-015 广泛应用于 p53 异常的肿瘤治疗的研究中, 并联合应用传统肿瘤治疗, 已经进入临床试验。但有少数研究证明 ONYX-015 对 p53 缺失也无明显杀伤作用。饶进军等^[2]通过对 p53 缺失的白血病细胞的杀伤性研究表明可能与肿瘤细胞的病毒受体、整合素等因素有关。初步研究表明 ONYX-015 可显著增强化疗、放疗的抗癌作用。Khuri 等^[3]同时应用 ONYX-015 和顺铂以及 5-Fu 治疗晚期头颈部肿瘤, 肿瘤缓解率可达 63%, 其中 27% 完全缓解, 而且其他患者的病情在治疗期间都未进一步恶化。目前对腺病毒的研究热点是以 ONYX-015/dl1520 为代表的溶瘤腺病毒, I/II 期临床研究表明, 安全性和疗效较好, 成为少数进入 III 期的临床研究的基因治疗药物之一^[4-6]。

丝裂霉素的作用机制同烷化剂相同, 能与细胞中的亲核集团发生反应, 造成 DNA 结构功能破坏, 可导致细胞分裂、增殖的停止或死亡。用不同浓度的 MMC 作用于膀胱癌细胞, 证实其对癌细胞杀伤作用与剂量呈正比, 通过促凋亡和坏死机制完成^[7]。

溶瘤病毒介导肿瘤细胞破坏的机制可能主要有以下几种: (1) 由于病毒复制而直接溶解肿瘤细胞。这一过程是由于病毒在肿瘤细胞内不断增殖, 占用了宿主细胞的原料、能量和场所等, 引起肿瘤细胞被抑制或破坏, 而且释放的子代病毒又感染邻近的肿瘤细胞, 从而起到了连续放大的作用。(2) 病毒蛋白的直接细胞毒性作用, 比如腺病毒的 E3 区编码的一种 11.6×10^3 的死亡蛋白, E4ORF4 区表达的晚期蛋白, 都能有效地介导肿瘤细胞溶解, 而且肿瘤细胞溶解后释放的子代病毒又可去感染新的肿瘤细胞^[8], 因而具有明显的放大效应。(3) 增强肿瘤细胞对放疗和化疗的敏感性。腺病毒 E1A 基因的产物就是一种强有力的化学致敏剂, 特别是在具有 p53 功能的细胞中, E1A 的产物可在这些细胞中诱发 p53 的高水平表达, 并以此增加化疗和放疗对 DNA 的损伤作用; 但正常细胞不受 E1A 的影响^[9]。病毒感染后增强化疗敏感性的现象, 已在 11 期临床试验中观察到。受试对象为头部和颈部肿瘤患者, 方法上采用肿瘤内注入 ONYX-015 和 5-FU, 将其结果与单独注射 5-FU 或 ONYX-015 相比较, 发现联合疗法的肿瘤完全消退效应增加了 27%, 且在 6 个月的观察中未见肿瘤进展, 而且这些肿瘤细胞均无 p53 功能。结果表明, ONYX-015 可增加瘤细胞对化疗药物敏感性。

本实验应用 ONYX-015 联合化疗药物抗肿瘤的研究初步表明 ONYX-015 具有一定的抗膀胱癌作用, 而且 ONYX-015 能提高膀胱癌细胞对化疗药物

(下转 1628 页)

增加,有利于无水酒精的杀灭作用。反之,如果在 PRFA 之前进行 PEI 治疗,酒精及肿瘤坏死会降低随后 PRFA 时肿瘤对射频热能的传导性,从而缩小射频消融的覆盖范围。TACE 之后 PRFA 治疗的间隔时间一般为 1~2 周。我们认为,TACE 后只要没有严重副作用应该尽早进行 PRFA 治疗,因为作为微创局部治疗,PRFA 不会明显加重 TACE 的副作用。如果超选肝动脉分支栓塞化疗对肝功能及消化功能影响不大,则可考虑在 TACE 之后 3~5 d 进行 PRFA。

肝细胞癌的复发与原发肝癌的大小、数量、血管浸润、淋巴转移、微转移、病理分期及手术操作等诸多因素有关。从本组资料的治疗结果来看,PRFA 联合 TACE 及 PEI 治疗复发性小肝癌,其 1、2、3、4 年累积生存率是比较理想的。因此我们认为,PRFA 是局部治疗复发性小肝癌的有效方法,对于 3 cm 以下的复发性肝细胞癌,在定位准确的情况下可以完全灭活肿瘤;对于 3~5 cm 的复发性肝细胞癌,联合术前 TACE 及术后 PEI 治疗也可以完全灭活肿瘤。

参考文献:

[1] 吴孟超.原发性肝癌的诊断和治疗进展[J].中华外科杂志,1998,

36(9):515-7.

[2] Lau W Y, Leung TW, Yu SC, et al. Percutaneous local ablative therapy for hepatocellular carcinoma: a review and look into the future [J]. *Ann Surg*, 2003, 237 (2): 171-9.

[3] Buscarini L, Buscarini E, Di Stasi M, et al. Percutaneous radio frequency ablation of small hepatocellular carcinoma: long-term results [J]. *Eur Radiol*, 2001, 11 (6): 914-21.

[4] 王军华, 罗葆明, 潘景升, 等. 射频消融治疗肝肿瘤及其对机体免疫功能的影响 [J]. *中国超声医学杂志*, 2001, 17 (8): 352-5.

[5] Scaife CL, Curley SA, Izzo F, et al. Feasibility of adjuvant hepatic arterial infusion of chemotherapy after radiofrequency ablation with or without resection in patients with hepatic metastases from colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10 (4): 348-54.

[6] 陈敏山, 郭荣平, 郑云, 等. 小肝癌微创治疗的临床研究 - 附 164 例报告 [J]. *中国微创外科杂志*, 2002, 2 (6): 375-6.

[7] Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN, et al. Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients [J]. *Radiology*, 2001, 221 (1): 159-66.

[8] Gasparini D, Sponza M, Marzaro A, et al. Combined treatment, TACE and RF ablation, in HCC: preliminary results [J]. *Radiology*, 2002, 104 (5-6): 412-20.

[9] Rossi S, Buscarini E, Gaibagnati F, et al. Percutaneous treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode [J]. *Am J Roentgenol*, 1998, 170 (4): 1015-22.

(上接 1625 页)

MMC 的敏感性并显著增强化疗药物 MMC 的抗膀胱癌作用,对在临床上进一步开展新的综合治疗 - ONYX-015 联合化疗药物 MMC 治疗膀胱癌提供了一定的实验依据。

Pagliari^[10]对 13 例不宜接受手术的膀胱癌患者进行门诊应用 rAd-p53 膀胱内灌注治疗,以 28 d 为 1 个周期,分为 3 个剂量组,第 1、4 天灌注或连续灌注 4~8 d。患者无不良反应,组织检查 p53 基因表达无明显改变,其中 1 例较表浅的膀胱癌出现消退的迹象。而理想的肿瘤治疗方法应是将传统的放疗或化疗同溶瘤病毒疗法联合应用,并通过调节免疫反应,使抗病毒作用减弱的同时增强抗肿瘤作用。继续深入研究病毒克服细胞排斥作用而在细胞内复制的机制,将有利于研制出对肿瘤特异性更高、毒性更小的溶瘤病毒。溶瘤病毒将有可能在抗肿瘤治疗中成为一种靶向性的新型生物制剂。

参考文献:

[1] Nom an KL, Farassati F, Lee PW. Oncolytic viruses and cancer therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12 (2-3): 271-82.

[2] 饶进军, 朱正光, 徐伟, 等. E1B 缺陷性腺病毒对 P53 缺失性白病细胞的杀伤性研究 [J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21 (11): 819-21.

Rao JJ, Zhu ZG, Xu W, et al. Effect of E1B mutant adenovirus on

p53-deficient leukemic cells [J]. *J First Mil Med Univ D Yi Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21 (11): 819-21.

[3] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (8): 879-85.

[4] Lantieri JP, Nemunaitis J, Kuhn JA, et al. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience) [J]. *Ann Surg Oncol*, 2000, 7 (8): 588-92.

[5] Hecht JR, Bedford R, Abbuzzese JL, et al. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (2): 555-61.

[6] Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, et al. Phase II clinical trial of intravesical administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (2): 693-702.

[8] 梁丽莉, 张强, 李钟, 等. 丝裂霉素对膀胱癌 EJ 细胞作用机制的研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 6 (2): 368-9.

[9] Christopher JA. Cytolytic viruses as potential anticancer agents [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (3): 491-502.

[10] 千新来, 赵清正, 王争, 等. E1A 基因对人肺腺癌细胞化疗敏感性的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7 (2): 124-6.

[11] Pagliaro LC, Keyhani A, Williams D, et al. Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (12): 2247-53.