

蓝舌病毒 HbC₃ 对几株人和动物肿瘤细胞的感染特性研究*肖安涛¹, 董长垣^{1**}, Joseph K.-K.Li², 陈冬娥¹, 刘军¹, 张蔚英¹

(1. 武汉大学医学院病毒学研究所分子病毒与癌研究室, 湖北武汉 430071; 2. Department of Biology, Utah State University, UT84322-5305, USA)

Studies on the Infectivity of Bluetongue Virus Strain HbC₃ to Several Human and Animal Tumor Cells*XIAO An-tao, DONG Chang-yuan, Joseph K. -K.Li², CHEN Dong-e, LIU Jun,
ZHANG Wei-ying

(1. Institute of Virology, Medicine College, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Biology, Utah State University, UT84322-5305, USA)

Abstract: Using BTV-HbC₃ to infect tumor cells including human lung cancer SPC-A-1 cells, human cervical carcinoma HeLa cells, human astrocytoma U251 cells, mouse-derived astrocytoma C6 cells and human embryonic lung cells and observe the cytopathic effects(CPE); then using transmission electron microscope and double immunodiffusing test to compare the infectivity of BTV-HbC₃ to these cells. Reverse transcription-PCR was used to detect the propagations of BTV-HbC₃ in these cells. The results indicated that BTV-HbC₃ does not infect normal human embryonic lung cells, but it can selectively replicate in tumor cells and produces different degree of cytopathic effects and can induce apoptosis. Tumor cells were killed in the end. Among all the cells, human lung cancer SPC-A-1 cells have the highest sensitivity to BTV-HbC₃. BTV-HbC₃ can targetedly kill some kinds of tumor cells. These data provide the laboratory basis for approaching the possibility of BTV-HbC₃ as an oncolytic virus.

Key words: Bluetongue virus-HbC₃; Oncolytic Virus; Cytopathic Effect (CPE); Apoptosis

摘要: 用 BTV-HbC₃ 感染人肺癌 SPC-A-1 细胞, 人宫颈癌 HeLa 细胞, 人星形胶质瘤 U251 细胞, 小鼠星形胶质瘤 C6 细胞及人胚肺 HEL 细胞后, 观察细胞病变效应(CPE); 运用透射电镜技术及琼脂双扩散试验检测 BTV-HbC₃ 对各种不同肿瘤细胞及人胚肺 HEL 细胞的感染性; 并用 RT-PCR 技术检测蓝舌病毒的增殖情况。结果显示, BTV-HbC₃ 对正常 HEL 不感染, 但在不同来源的某些肿瘤细胞中选择性增殖, 产生不同程度的细胞病变效应(CPE)及凋亡现象, 终致肿瘤细胞死亡。其中以人肺癌 SPC-A-1 细胞对其最为敏感。因此, 初步认为 BTV-HbC₃ 株能靶向性杀死某些肿瘤细胞, 从而为深入开展 BTV-HbC₃ 靶向性抗肿瘤的研究提供了第一手实验室依据。

关键词: 蓝舌病毒中国湖北株₃ (BTV-HbC₃); 溶癌病毒; 细胞病变效应 (CPE); 凋亡

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0349-04

蓝舌病毒 (Bluetongue virus, BTV) 是呼肠孤病毒科环状病毒属的原型病毒, 无包膜, 具双层衣壳, 其基因组由 10 个双链 RNA (dsRNA) 分子组成。中国蓝舌病毒湖北株-3 (BTV-HbC₃) 是本实验室 1994 年从湖北襄樊分离到的一株蓝舌病毒, 体外增殖与基因组特征的研究已明确^[1-4]。BTV 感染牛羊

及野生反刍动物, 未见感染人类而引起疾病的报道。然而, 本研究室在对蓝舌病毒长期的研究中却发现 BTV-HbC₃ 能感染人宫颈癌 HeLa 细胞。为了探讨该株 BTV 是否具有潜在的靶向感染其他肿瘤细胞的特性, 本研究选择了几株肿瘤细胞及人胚肺正常细胞以研究 BTV-HbC₃ 与它们相互作用的特

收稿日期: 2003-12-16, 修回日期: 2004-04-07

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271471)

作者简介: 肖安涛 (1977-), 男, 湖北郧县籍, 硕士研究生, 主要从事溶癌病毒研究。

** 通讯作者: 董长垣 (1951-), 男, 湖北省籍, 教授, 主要从事溶癌病毒研究。Corresponding author, E-mail: dchangyuan@163.com, Tel: 87331787.

征, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒的制备

Vero 细胞、人胚肺 HEL 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞及人肺癌 SPC-A-1 细胞为本室保存的常规细胞株; 人星形胶质瘤 U251 细胞、小鼠星形胶质瘤 C6 细胞引自武汉大学中国典型培养物保藏中心。Vero 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养, 并用以增殖 BTV-HbC₃。

1.2 被感培养细胞的 CPE 观察

用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养各种用于病毒感染性测定的细胞。每株细胞分为实验组和对照组, 按 0.5 MOI 接种病毒。每 6h 观察一次, 拍照记录。

1.3 被感培养细胞的电镜观察

不同受试细胞接种于 100mL 培养瓶, 细胞汇合成单层后, 按 0.5MOI 接种 BTV-HbC₃, 24h 后以 2.5% 戊二醛溶液固定, 4℃, 4,000r/min 离心 15min, 作超薄切片, 透射电镜 (TEM) 观察细胞内病毒颗粒和细胞超微结构变化。

1.4 不同细胞增殖子代病毒分析

不同受试细胞分别培养于 5 块 96 孔板上, 接种 BTV-HbC₃, 37℃, 5%CO₂ 培养, 用于测定 TCID₅₀。

1.5 琼脂糖双向扩散试验检测培养物病毒抗原

用 Vero 细胞增殖的 BTV-HbC₃ 悬液作抗原, 免疫家兔, 常规技术制备抗 BTV-HbC₃ 免疫血清。用 pH7.2 的 PBS 配制含双抗的 0.8% 琼脂糖凝胶, 铺于平皿上, 凝固后常规梅花状打孔。中间一孔加兔抗 BTV-HbC₃ 免疫血清, 四周 6 孔分别加感染 BTV-HbC₃ 36h 的 HEL 细胞和 4 种肿瘤细胞裂解后的悬液, 纯化的 BTV-HbC₃ 病毒悬液 1 孔作为阳性对照。

1.6 RT-PCR 检测 BTV 基因序列

自感染病毒的培养细胞中提取 BTV 基因组 ds-RNA^[2]。采用本室常规 BTV RT-PCR 系统检测各实验组病毒核酸。所用引物根据已报道的 BTV-10 基因组 S₇ 片段序列设计。正义引物 P₁: 5' AGC CAT ATG TTG AGT ATA 3', 反义引物 P₂: 5' TAG AGA TGG ACA CTA TCG C 3'。取感染 BTV-HbC₃ 36h 后的细胞裂解液 1mL, 提取 dsRNA 并扩增各受试肿瘤细胞中病毒的特异性核酸序列, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳解析。扩增产物大小预计为 277bp。

2 结果

2.1 BTV-HbC₃ 对各株细胞的致病变效应及半数感

染量 (TCID₅₀)

5 株细胞培养接种 BTV-HbC₃ 株病毒后连续观察, 于 24h 和 36h 拍照, 记录结果。正常人胚肺细胞连续观察直至细胞老化未出现 CPE; 其余 4 株肿瘤细胞却呈现不同程度 CPE, 表现为细胞收缩变圆, 间隔变大, 轮廓增强, 胞内有粗大折光颗粒; 然后细胞逐渐脱落, 漂浮, 直至破碎死亡。观察发现, 4 株肿瘤细胞出现 CPE 的时间和程度是不一样的, 其中 SPC-A-1 细胞最敏感, 接种病毒 36h 死亡细胞即达 90%; 而 C6 细胞的敏感性最差。TCID₅₀ 结果如表 1 示。

表 1 BTV-HbC₃ 对不同肿瘤细胞的半数感染量 (TCID₅₀)

Table 1 TCID₅₀ of BTV-HbC₃ on different tumor cell lines

	SPC-A-1	HeLa	U251	C6	HEL
TCID ₅₀	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	—

2.2 细胞超微结构变化

在透射电镜下可见 4 株肿瘤细胞胞浆内均含不同数量、不同发育阶段的病毒颗粒。细胞核未见明显异常 (黑色箭头示核膜); 细胞浆中可见大量病毒颗粒, 完整的病毒粒子为约 70nm 直径的球状颗粒, 病毒大小一致, 有些排列成晶格状; 除完整病毒粒子外, 尚可见较多的病毒空衣壳和核物质 (图 1-A)。感染 BTV-HbC₃ 的 C6 细胞在电镜下可见到明显的超微结构变化 (图 1-B), 表现为: 细胞密度增大, 核染色质边聚, 高度凝集, 胞浆中出现大量空泡, 是细胞凋亡特征。取染病毒后同一时间 (36h) 的培养细胞作电镜观察可明显发现不同的瘤细胞株含有不同数量的病毒颗粒及发生不同程度的细胞超微结构变化。

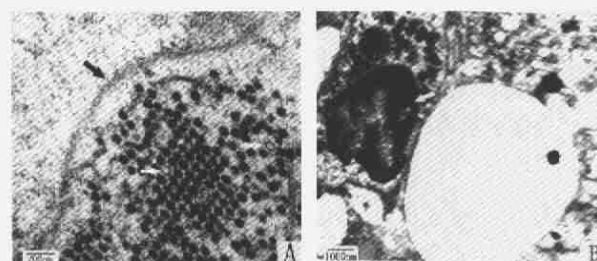


图 1 感染 BTV-HbC₃ 36h 后的细胞超微结构

Fig. 1 Ultrastructures of cells 36hours after infected with BTV-HbC₃

A shows the ultrastructure of SPC-A-1 cell lines. The characters are: intact nuclear and cytoplasm; numerous virus particles arranged like crystals; vacuum virus capsids (white arrow shows vacuum virus, black arrow shows nuclear membrane.). B shows the ultrastructure of C6 cell lines. The characters are: condensed chromatin at the nuclear margin with many large cytoplasmic vacuoles. (White arrow shows nuclear)

2.3 琼脂糖双向免疫扩散实验

结果显示: BTV-HbC₃ 导致 CPE 的各肿瘤细胞株裂解上清和 Vero 细胞制备的 BTV-HbC₃ 悬液均与抗 BTV-HbC₃ 血清之间出现强弱不等的免疫沉淀带, 且这些沉淀带彼此相连, 而接种 BTV-HbC₃ 后观察相同时间的正常人胚肺 HEL 细胞裂解上清与抗 BTV-HbC₃ 血清间未见免疫沉淀带(图 2)。

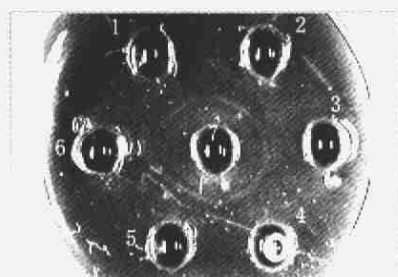


图 2 琼脂糖双向免疫扩散实验结果

Fig.2 Result of double immunodiffusion

1, SPC-A-1; 2, HeLa; 3, U251; 4, C6; 5, Positive control; 6, HEL.

2.4 接种 BTV-HbC₃ 的各细胞株中 BTV-RNA 序列

扩增产物应为 277bp。HEL 细胞核酸提取物中未见特异性扩增的 BTV-HbC₃ 核酸序列; 相形之下, 感染 BTV-HbC₃ 的各受试肿瘤细胞核酸提取物中出现与阳性对照一致的扩增产物。结果如图 3 示。

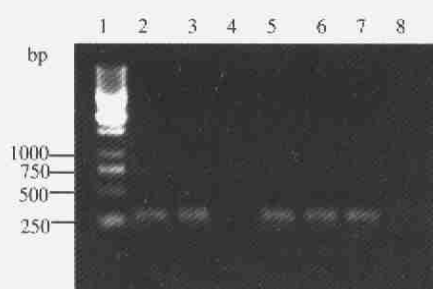


图 3 各细胞株中 BTV-RNA 序列扩增结果

Fig.3 Results of RT-PCR detecting BTV-HbC₃ gene in different cell lines

1, DL1000 Marker; 2, Positive control; 3, SPC-A-1; 4, HEL; 5, C₆; 6, HeLa; 7, U251; 8, Negative control.

3 讨论

近几年研究发现, 某些病毒能够靶向性地在肿瘤细胞中大量增殖进而裂解肿瘤细胞。利用这些病毒治疗恶性肿瘤形成了抗肿瘤领域的一个新研究热点。这是分子病毒学、癌的细胞和分子生物学及基因治疗等迅速发展而产生的全新抗癌思维, 人们

欲借此实现癌的靶向性治疗, 并将这种靶向性抗癌的病毒称为溶癌病毒 (Oncolytic Virus)^[9,10], 包括天然病毒和工程病毒。具靶向性溶癌潜能的天然病毒中, 研究已经较为深入的是呼肠孤病毒(Reovirus)。

本实验以 BTV-HbC₃ 感染不同细胞株, 以研究 BTV-HbC₃ 是否有靶向抗癌之潜能。结果显示, BTV-HbC₃ 可引起 4 株肿瘤细胞出现明显 CPE, 但与之形成对照的是, 人二倍体 HEL 细胞对 BTV-HbC₃ 不敏感, 没有出现 CPE。在进一步的研究中, 琼脂糖双向免疫扩散试验证实除了人二倍体 HEL 细胞外, 所有感染 BTV-HbC₃ 的受试细胞裂解液中都能检出病毒抗原; 随后的 RT-PCR 也证实受试的肿瘤细胞中检出了病毒核酸, 而在 HEL 中不能。透射电镜观察结果则为以上的现象提供了可能的解释: 实验组肿瘤细胞胞浆内均有病毒颗粒, 其中以 SPC-A-1 细胞中最多, C6 细胞最少。由此可以推论, 肿瘤细胞的裂解是由于 BTV-HbC₃ 在细胞内大量增殖而导致肿瘤细胞裂解死亡。

所以, 从我们的工作可以得到两个初步结论:

1. BTV-HbC₃ 可以在肿瘤细胞中大量增殖, 因此导致肿瘤细胞的死亡; 2. BTV-HbC₃ 对正常人二倍体 HEL 细胞不感染。

但是, 研究中观察到的其他现象提示我们事情可能不是如此简单: 首先, BTV-HbC₃ 对不同肿瘤细胞的杀伤力不同。这表明 BTV-HbC₃ 不会是一种“万能”溶癌病毒, 只有满足某种条件的细胞才会导致 BTV-HbC₃ 在其中的大量增殖。也许, 这可以用与 BTV-HbC₃ 同科而不同属的 dsRNA 病毒 Reovirus 靶向性抗癌的分子机理来解释^[5-8]。其次, 虽然可以观察到病毒在宿主细胞中大量增殖, 但部分肿瘤细胞也出现了较典型的凋亡特征, 这还需要进一步验证。以上两方面的问题都很值得继续探讨。

BTV-HbC₃ 对人是安全的, 其不感染人正常细胞而有效地感染某些癌细胞并最终杀死这些癌细胞的基本事实为我们展示了本研究工作不仅具有研究该病毒与细胞相互作用的基础理论意义, 而且继续深入系统地在体内外研究该病毒与人肿瘤细胞相互作用后果和机理, 有可能将 BTV-HbC₃ 发展成为专性杀死某些人类肿瘤细胞的异源溶癌病毒。

参考文献

- [1] 董长垣. 现代分子病毒学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1996, 183.
- [2] 董长垣. 中国蓝舌病毒 HbC₃ 株体外增殖和基因组特征[J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20: 7.
- [3] 董长垣, 陈冬娥, 陈晓, 等. 蓝舌病毒 HbC 株的分离和生物学特

- 征研究[A], 临床医学研究[C]. 北京: 中国人口出版社. 1998, 12: 180.
- [4] Dong Changyuan. Isolation of bluetongue virus and investigation of its epidemiology in China[A]. Abstracts of Third International Symposium on Double-stranded RNA viruses[C]. Hawaii, USA, 1990.
- [5] Lowe P N, Skinner R H. Regulation of Ras signal transduction in normal and transformed cell [J]. *Cell Signaling*, 1994, 6(2): 109.
- [6] Robinson M J, Cobb M H. Mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Current Opinion in Cell biology*, 1997, 9(2): 180-186.
- [7] Guha A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation [J]. *Oncogene*, 1997, 15(23): 2755.
- [8] Fuevo J. Targeting in gene therapy for gliomas [J]. *Arch Neurol*, 1999, 56(4): 445.
- [9] Kim D, Hermiston T, McCormick F. ONYX-015: Clinical data are encouraging [J]. *Nature Medicine*, 1998 Dec, 4(12): 1341-1342.
- [10] Ganly I, Kim D, Eckhardt G, *et al.* A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Clinical cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2000, 6(3): 798-806.