

## 蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株诱导人肝癌细胞 Hep-3B 的凋亡\*

汪艳<sup>1,2</sup>, 雷森林<sup>2</sup>, 郭淑芳<sup>1</sup>, 高婧<sup>1</sup>, 戴莹<sup>1</sup>, 董长垣<sup>1\*\*</sup>

1. 武汉大学医学院 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071; 2. 武汉大学医学结构生物学研究中心, 湖北武汉 430071)

### Apoptosis of the Human Hepatic Carcinoma 3B Cells

#### Induced by Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub> Strain

WANG Yan<sup>1,2</sup>, LEI Sen-Lin<sup>2</sup>, GUO Shu-Fang<sup>1</sup>, GAO Qian<sup>1</sup>, DAI Ying<sup>1</sup>, DONG Chang-Yuan<sup>1\*\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Virology, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, China; 2. Research Center for Medicine and Structural Biology, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** When investigating the effect of BTV-HbC<sub>3</sub> on the hepatic carcinoma 3B (Hep-3B) cells, we detected a cytopathic effect (CPE) and inhibition activity of Hep-3B cells infected with BTV-HbC<sub>3</sub> by using MTT, the apoptosis indicator using flow cytometry (FCM) and microstructures. The results showed that BTV-HbC<sub>3</sub> could inhibit the Hep-3B cells proliferation moderately, which depended on the concentration of BTV-HbC<sub>3</sub> and time. The human Hepatic carcinoma 3B cells infected by BTV-HbC<sub>3</sub> had all the characteristic of apoptosis. Our finding indicated that oncolytic way of BTV-HbC<sub>3</sub> was selectively replicated in tumor cells and induced apoptosis. It was further shown in our laboratory that normal human cells couldn't be infected by this kind of virus suggesting that this virus possessed the potential function of killing the human hepatic carcinoma.

**Key words:** Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub>; Human Hepatic Carcinoma 3B Cells; Apoptosis; Oncolytic Virus

**摘要:** 采用 MTT 法检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 Hep-3B 细胞的增殖抑制作用, 流式细胞术检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 诱导 Hep-3B 细胞的凋亡情况, 透射电镜观察感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 的 Hep-3B 细胞超微结构变化。结果表明 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 Hep-3B 细胞具有抑制效应, 并呈浓度和时间依赖性; BTV-HbC<sub>3</sub> 作用下 Hep-3B 细胞呈现凋亡特征; BTV-HbC<sub>3</sub> 能有效感染人肝癌细胞株 Hep-3B, 并在其中有限地复制, 同时抑制该细胞增殖, 诱导其进入凋亡。本研究证实了蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株对人肝癌细胞 Hep-3B 的杀伤及其诱导凋亡作用, 结合本室已反复证实该病毒不感染人源正常细胞的事实, 提示了该病毒具有抗人肝癌之潜能。

**关键词:** 蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub>(BTV-HbC<sub>3</sub>); 人肝癌细胞(Hep-3B); 凋亡; 溶癌病毒

中图分类号: R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0556-04

肿瘤细胞的基本生物学特征使增殖失控、分化受阻、基因结构或功能异常。传统的肿瘤细胞毒疗法主要抑制肿瘤细胞的增殖, 但不能清除肿瘤细胞, 且没有靶向性。溶癌病毒是能在肿瘤细胞中复制并特异性杀死癌细胞的天然病毒或重组病毒<sup>[1,2]</sup>。我们在长期病毒与癌的研究过程中发现: 不感染人正常细胞的蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株(Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub> strain, BTV-HbC<sub>3</sub>) 却能有效地在人和动物某些肿瘤细胞中选择性增殖并杀死这些肿瘤细胞。本文以人类原发性肝癌细胞感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 为模型系统, 进一步报导 BTV-HbC<sub>3</sub> 对人肝癌 Hep-3B 细胞的作用及其作用后果。

1 材料和方

### 1 材料和方

收稿日期: 2006-04-16, 修回日期: 2006-09-08

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271471)

作者简介: 汪艳(1970-), 女, 湖北省籍, 医学硕士, 从事分子病毒与癌研究。

\*\* 通讯作者: 董长垣(1949-), 男, 湖北省籍, 教授, 从事分子病毒与癌研究。Corresponding author E-mail: dchangyuan@163.com

### 1.1 病毒与细胞

蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株为本研究室于 1994 年从湖北省分离得病毒株, 人肝癌细胞 Hep-3B 购自中国典型培养物保藏中心。

### 1.2 BTV- HbC<sub>3</sub> 增殖、病毒悬液及感染 Hep-3B 细胞的制备

按本研究室常规方法<sup>[8]</sup>作病毒增殖及病毒 TCID<sub>50</sub> 滴定, 效价为 10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/mL。分别接种 BTV-HbC<sub>3</sub> 于 10 瓶 Hep-3B 细胞。

### 1.3 电镜超薄切片及电镜观察

24h、36h、48h 收获接种 BTV-HbC<sub>3</sub> 的细胞, 用 PBS 洗细胞 2 遍, EDTA 消化细胞, 1500rpm 离心 10min, 加 2.5% 戊二醛室温固定细胞, 作超薄切片, 透射电镜 (日立 H-600) 观察病毒和细胞超微结构变化。

### 1.4 Hep-3B 细胞增殖抑制实验

Hep-3B 细胞浓度调至 1×10<sup>8</sup>/mL, 接种 96 孔培养板, 接种病毒 MOI 为 0.001、0.01、0.1、1 和 10 IU / 细胞。96 孔板培养分别 24h、36h、48h 加入 MTT 测吸光度值, 计算增殖抑制率。

### 1.5 流式细胞仪检测 BTV- HbC<sub>3</sub> 诱导 Hep-3B 细胞凋亡

取未感染和感染了 BTV- HbC<sub>3</sub> 的在 24h、36h、48h 细胞, 经常规 Annexin V/PI 法染色后上流式细胞仪检测。EXPO32 MultiCOMP 软件检测 1 万个细胞中正常细胞、早期凋亡、晚期凋亡、死亡细胞所占比例。

## 2 结果

### 2.1 Hep-3B 感染 BTV- HbC<sub>3</sub> 的超微结构

分别在 24h、36h、48h 收获被感染细胞进行超微结构形态变化的观察。结果表明: 24h 时, 胞浆内可见大量病毒增殖并伴随病毒包涵体形成(图 1-A), 包涵体中含有感染性的子代病毒颗粒及病毒核物质; 36h 时, 病变细胞的胞质内均富含不同发育阶段的病毒颗粒, 完整病毒颗粒、病毒空衣壳和核物质 (图 1-B); 48h, 细胞出现凋亡, 凋亡细胞呈现核膜结构完整, 核内染色质浓缩、成块、边聚, 细胞浆中有增殖的病毒颗粒, 内质网明显扩展并形成空泡, 线粒体肿胀, 是为典型细胞凋亡特征 (图 1-C)。

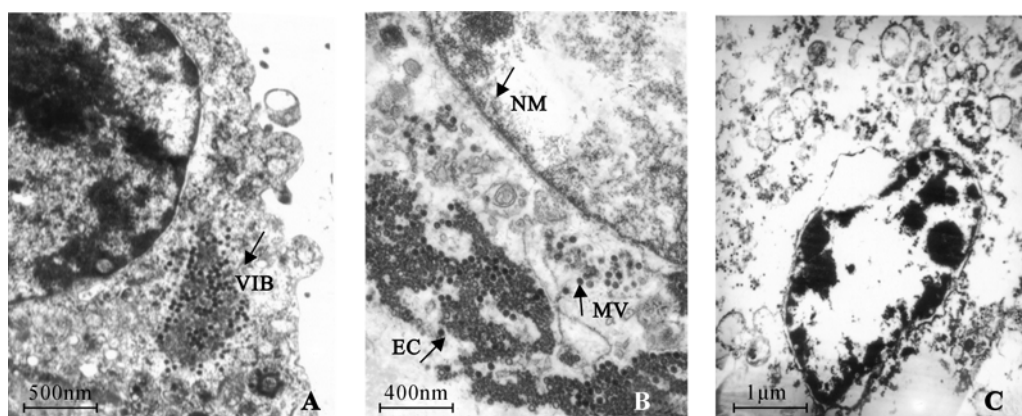


图 1 Hep-3B 感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 24h、36h、48h 超微结构特征

Fig.1 Microstructure Characters of the Human Hepatic Carcinoma 3B Cells Induced by Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub>

A: VIB (the viral inclusions). B: MV (mature viral particles.), EC (empty capsid), NM (nucleus membrane). C: Apoptosis cell.

### 2.2 MTT 检测

BTV-HbC<sub>3</sub> 分别以梯度稀释为 10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和无病毒 pBS (作对照) 接种 Hep-3B 细胞进行 MTT 实验, 结果表明: 该株 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 Hep-3B 细胞有明显的抑制增殖作用, 且呈较明显的浓度和时间依赖性 ( $P < 0.01$ , 表 1)

### 2.3 Annexin V/PI 法检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 诱导 Hep-3B 细胞凋亡

采用流式细胞仪 Annexin V/PI 法分别检测人肝

癌 Hep-3B 按 0.1MOI 细胞感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 在 24h、36h、48h 的凋亡百分率, 结果表明: BTV-HbC<sub>3</sub> 能有效地诱导 Hep-3B 细胞进入凋亡, 并且该细胞感染该病毒后地不同时间凋亡发生率有显著性差异 (表 2,  $P < 0.01$ )。该病毒感染 48h 早期、晚期凋亡细胞显著性高于其它时间, 人肝癌细胞的凋亡率与作用时间呈正相关。Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率, 见双参数散点(图 2A-D)。

表 1 梯度浓度、不同时间 BTV-HbC<sub>3</sub> 株对 Hep-3B 的抑制率(%)Table.1 The Grads Concentration and the Different Times Inhibition Activity of Hep-3B Cells Infected BTV-HbC<sub>3</sub>

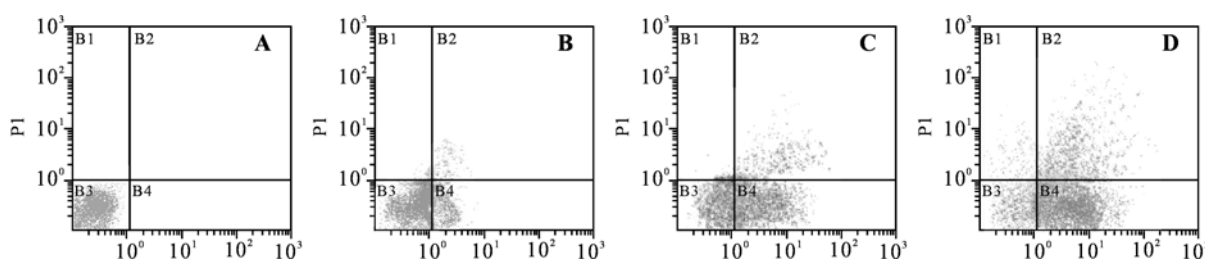
Time	Virus Concentration (MOI)				
	10	1	0.1	0.01	0.001
24h	56.2±7.72	48.91±1.38	32.54±3.18	27.89±3.90	18.43±2.28*
36h	67.37±5.51	64.27±3.23	57.82±6.37	42.38±3.32	24.17±2.56*
48h	79.5±3.86	75.62±2.52	71.68±4.30	55.03±4.21	32.10±5.13*

\*P&lt;0.01

表 2 Annexin V/PI 法检测肝癌细胞凋亡百分率( $\bar{x} \pm s$ )Table.2 Detection of Apoptosis of the Human Hepatic Carcinoma 3B Cells Induced by Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub> with Annexin V/PI Staining Method

Method	Annexin V/PI (%)		
	early apoptosis	secondary necrosis	total aptosis
control	0.12±0.01	0.05±0.03	0.17±0.02*
24h	15.0±4.62	5.42±2.35	20.42±3.70*
36h	36.5±8.36	12.8±3.17	49.3±8.11*
48h	58.2±10.49	21.4±8.6	79.6±11.5*

\* t: P&lt;0.01

图 2 Annexin V/PI 法检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 诱导 Hep-3B 细胞的凋Fig.2 Detection of Apoptosis of the Human Hepatic Carcinoma 3B Cells Induced by Bluetongue Virus HbC<sub>3</sub> with Annexin V/PI Staining Method

A: Hep-3B cells untreated; B-D: Hep-3B cells infected BTV- HbC<sub>3</sub> in the post 24h、36h、48h time, respectively; B1 Area: mechanical damage Annexin V/ PI<sup>+</sup>, B2 Area: secondary necrosis Annexin V<sup>+</sup>/ PI<sup>+</sup>, B3 Area: normal cell Annexin V<sup>-</sup>/ PI<sup>-</sup>, B4 Area: early apoptosis Annexin V<sup>+</sup>/ PI<sup>+</sup>.

### 3 讨论

蓝舌病毒是 dsRNA 病毒, 属于呼肠孤病毒科环状病毒属的代表种, 主要危害绵羊及野生反刍动物, 导致这类被感染动物高死亡率的致病性病毒<sup>[3]</sup>。有关蓝舌病毒的病毒形态、基因结构与功能、病毒鉴定及疫苗等已有许多文献报导, 但有关蓝舌病毒作为靶向性抗肿瘤的研究仅见本室工作报导<sup>[4]</sup>。蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株是本研究室 1994 年分离的一株新病毒, 本实验通过透射电镜观察人肝癌细胞 Hep-3B 感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 株的超微结构动态变化, 采用 MTT 法检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 Hep-3B 细胞的增殖抑制实验, 以及应用流式细胞仪检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 诱导 Hep-3B 细胞凋亡的实验, 证明了蓝舌病毒能在人肝癌细胞中有效地复制增殖、特异溶解人肝癌细胞, 并诱导该细胞进入凋亡, 为发展该病毒成为靶向抗肿瘤提供了实验室依据。

靶向性抗肿瘤疗法已成为攻克肿瘤的新的发展方向。病毒靶向抗肿瘤是利用某些病毒能在肿瘤中复制和裂解肿瘤细胞, 而对正常细胞无杀伤作用的特性, 这种具有抗肿瘤效应的病毒即为肿瘤增殖

病毒(溶癌病毒)<sup>[5]</sup>。溶癌病毒主要分为 RNA 病毒和 DNA 病毒。RNA 病毒是一类宿主范围广泛病毒, 不会出现其核酸与宿主基因组整合现象的病毒, 从这个意义上讲, 比 DNA 病毒靶向治疗肿瘤更安全。天然抗肿瘤病毒如新城疫病毒、呼肠孤病毒和自主复制的细小病毒等。最具有靶向性抗肿瘤潜能 RNA 溶癌病毒是呼肠孤病毒, 它无包膜, 具有双链 RNA, 对人几乎没有致病作用<sup>[6-8]</sup>。蓝舌病毒属呼肠孤病毒科环状病毒, 本实验在体外探讨了 BTV-HbC<sub>3</sub> 的致人肝癌细胞 Hep-3B 死亡的有效性和可能的机制, 揭示了其溶癌方式可能是在肿瘤细胞内有限增殖的同时诱导肿瘤细胞凋亡, 凋亡的肿瘤细胞释出 BTV, BTV 再感染其他肿瘤细胞, 以此链式反应, 直至体内受试的所有的肿瘤细胞死亡、肿瘤消退。该病毒感染某些肿瘤细胞, 激活了肿瘤细胞的凋亡系统, 从而诱导肿瘤细胞进入凋亡。这就是特异性诱导肿瘤细胞可能通过凋亡途径实现抗肿瘤效应的靶向性治疗, 同时该病毒含的 dsRNA 基因序列核酸, 是最好的干扰素诱导剂, 正常细胞中干扰素的信息传导途径抑制了病毒在正常细胞内复制, 不引起人传染性疾, 无肿瘤原性。

本实验室研究人员已经在实验动物体内证实了 BTV-HbC<sub>3</sub> 抗小鼠乳腺癌的靶向性和安全性<sup>[9]</sup>。体外培养系统证实了对人安全的动物 BTV-HbC<sub>3</sub> 却能有效地感染人肺癌 SPC-A1、人宫颈癌 Hela 细胞、人星形胶质瘤 U251 细胞<sup>[10]</sup>等。BTV-HbC<sub>3</sub> 感染这些敏感的肿瘤细胞后, 产生典型的细胞病变效应。BTV-HbC<sub>3</sub> 这种生物学特性展示了其发展为靶向人癌病毒的潜能。

## References

- [1] Peng L M, Wang Z L (彭黎明, 王曾礼). Basic and Clinic study of cell apoptosis [M] (细胞凋亡的基础与临床) [M]. People's Medical Publishing House. 2000.1-15.
- [2] Norman K L, Farassati F, Lee P W K. Oncolytic viruses and cancer therapy [J]. Cytokine & Growth Factor Rev, 2001, 12: 271-282.
- [3] Dong C Y, Chen D E, Chen X, *et al* (董长垣, 陈冬娥, 陈晓). *et al* Biological Study of Bluetongue Virus HbC Strain. Medical Journal of Wuhan University [J]. 武汉大学学报(医学版), 1998, 12: 180-182.
- [4] Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structure [J]. Virus Res, 1989, 13 (3): 179-206.
- [5] Zwiebel J A. Cancer gene and oncolytic virus therapy [J]. Semin Oncol, 2001, 28 (4): 336-343.
- [6] Kara L. Norman and Patrick W.K. Lee. Reovirus as a novel oncolytic agent [J]. Clin Invest, 105 (8): 1035-1038.
- [7] Coffey M C, Strong J E, Lee P W K. Reovirus Therapy of Tumors with Activated Ras Pathway [J]. Science, 1998, 282:1332-1334.
- [8] Hirasawa K, Nishikawa S G, Norman K L, *et al*. Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice [J]. Blood, 2002, 100 (12): 4146-4153.
- [9] Luo Q, Dong C Y, Guo S F (罗翔, 董长垣, 郭淑芳) *et al*. Study of killing targetly tumor of rat MA782 infected Bluetongue virus [J]. Medical J Wuhan Univ. (武汉大学学报-医学版), 2004, 25 (4): 372-379.
- [10] Xiao A T, Dong C Y, Joseph K-K L (肖安涛, 董长垣, Joseph K-K L), *et al*. Studies on the Infectivity of Bluetongue Virus Strain HbC<sub>3</sub> to several Human and Animal Tumor Cells [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2004, 19 (4): 349-352.

## 书 讯

### 《病毒分类学》出版发行

由中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室张忠信、王瑶等编著的《病毒分类学》一书, 已于 2006 年 5 月由高等教育出版社出版。全书共 79 万字, 以病毒宿主类型为基础, 分别介绍了脊椎动物病毒、昆虫和其它无脊椎动物病毒、植物病毒、原核生物病毒、真菌和藻类病毒、类病毒、朊病毒和卫星病毒等部分中 1950 种, 5450 多个病毒的分类地位。同时, 该书对 73 个病毒科, 24 个独立病毒属的分类特征进行了描述, 对其中的一些重要成员, 如天花病毒、人免疫缺陷病毒、埃博拉病毒、乙型肝炎病毒和严重急性呼吸窘迫综合征病毒等进行了较详细的讲述。该书的病毒名称参考了国际病毒分类命名委员会 (ICTV) 2005 年 9 月第八次报告的内容, 反映了病毒分类的最新进展。

该书可供生物学、医药学、农学等领域从事微生物学、病毒学和传染性疾病的科研、教学人员和学生阅读参考。

该书定价 58 元, 书号 7-04-019251, 读者如需订购, 请与高等教育出版社联系。电话 010-58581118 / 1117 / 1116

(张忠信)