

• 实验研究 •

转基因溶瘤性单纯疱疹病毒对人类乳腺癌的治疗作用

王佳妮 刘仁斌 李俊杰 Mohamed Abdalwali • Thabit Samuel D. Rabkin

【摘要】 目的 通过观察溶瘤性单纯疱疹病毒(HSV)载体 G47 Δ 对人类乳腺癌细胞系 SK-BR-3、MDA-MB-453 和 MDA-MB-231 的细胞毒效应,探讨其对人乳腺癌的治疗作用。**方法** 体外培养人乳腺癌细胞 SK-BR-3、MDA-MB-453 和 MDA-MB-231,将 G47 Δ 按不同滴度(MOI)加入培养液中,每天观察细胞的生长状态。G47 Δ 含有 LacZ 基因,其在被感染细胞中的表达可用 X-gal 染色检测。**结果** 较低 MOI(0.01)的 G47 Δ 对 SK-BR-3 和 MDA-MB-453 具有较高的毒性,但对 MDA-MB-231 没有杀伤作用。在 MOI=0.01 的实验组,感染病毒后第 5 天,超过 90% 的 SK-BR-3 和 MDA-MB-453 细胞已被杀灭;但在 MOI=0.01 组及 MOI=0.10 组,MDA-MB-231 感染 G47 Δ 后细胞数量与对照组相比均无差异。采用 X-gal 染色证实了病毒在癌细胞中复制和传播。**结论** 近期构建的 HSV 载体-G47 Δ 可有效杀灭人乳腺癌细胞 SK-BR-3 和 MDA-MB-453,但未显示出对 MDA-MB-231 的影响。G47 Δ 的有效性及缺陷为新型溶瘤性单纯疱疹病毒 G47 Δ 用于乳腺癌治疗的临床试验提供有力依据,但其应用尚需进一步研究。

【关键词】 癌症治疗;单纯疱疹病毒;溶瘤性病毒;基因治疗;乳腺肿瘤

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Oncolytic herpes simplex virus vectors for the treatment of human breast cancer

WANG Jia-ni, LIU Ren-bin, LI Jun-jie, Mohamed Abdalwali • Thabit, Samuel D. Rabkin. Breast Disease Center, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of herpes simplex virus (HSV) vector, G47 Δ for the treatment of the human breast cancer through the observation of its cytotoxicity on three human breast cancer cell lines, SK-BR-3, MDA-MB-453 and MDA-MB-231. **Methods** Human breast cancer SK-BR-3, MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells were cultured and inoculated with G47 Δ of different multiplicities of infection (MOI). The cytotoxicity was observed every day. G47 Δ contained the LacZ gene, whose expression in infected cells was detected with X-gal histochemistry. **Results** G47 Δ was highly cytotoxic for SK-BR-3 and MDA-MB-453 cells in vitro at very low MOI (0.01), but no efficiency was observed in MDA-MB-231 cells. X-gal staining of infected tumor cells in vitro illustrated the replication and spread of the virus. In the MOI=0.01 group, on the fifth day after infection, more than 90% SK-BR-3 and MDA-MB-453 cells were killed, but after MDA-MB-231 was infected, in

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672410);广州市科技局国际合作项目(2007Z3-10021)

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院乳腺疾病诊治中心(王佳妮、刘仁斌、李俊杰、Mohamed Abdalwali • Thabit);02114 波士顿,美国哈佛大学麻省总医院分子外科实验室(Samuel D. Rabkin)

通信作者:刘仁斌, E-mail:liur@vip.163.com

the MOI=0.01 and MOI=0.10 groups, the cell number was similar to the mock.

Conclusions Recently constructed oncolytic HSV vector G47 Δ was effective at killing human breast cancer SK-BR-3 and MDA-MB-453 cells in vitro, but did not influence the growth of MDA-MB-231. The efficiency and deficiency of this novel cancer therapy warrants further investigation and consideration of clinical application.

【Key words】 Cancer therapy; Herpes simplex virus; Oncolytic virus; Gene therapy; Breast neoplasms

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,也是女性常见的死亡原因。随着亚洲国家生活水平的提高,亚洲妇女乳腺癌发病的增长趋势已明显高于欧美国家,成为上升幅度最大的地区之一^[1]。近年来基因治疗给乳腺癌的治疗带来新的希望,美国 Mineta 等^[2]首次研制出转基因溶瘤性单纯疱疹病毒 G207 用于恶性脑胶质瘤的治疗取得满意效果,从而开始单纯疱疹病毒(HSV-1)对恶性肿瘤治疗的一系列研究。之后又通过动物实验及临床 I 期试验证实了 G207 的安全性^[3-4]。用于治疗 HSV-1 基因经过改造,其复制能力及毒性仅限于肿瘤细胞内,而正常细胞不受影响^[5-6]。本研究所用的 G47 Δ ,是在母代即 G207 的基础上改进后研制成的溶瘤性单纯疱疹病毒载体^[7],对恶性肿瘤细胞有很强的感染能力,并能在癌细胞中大量复制、繁殖,然后很快溶解破坏该细胞并释放更多的 G47 Δ 病毒,从而去感染并作用于更多的肿瘤细胞,但正常细胞不受影响,如此达到治疗清除恶性肿瘤的目的^[8-10]。G47 Δ 的作用较其父代更为突出,已经被证实在膀胱癌、结直肠癌、胃癌及前列腺癌中均有明显的治疗作用^[11-14]。为研究 G47 Δ 在乳腺癌治疗中的作用,笔者选择 3 株乳腺癌细胞系,通过体外实验证实该病毒对人乳腺肿瘤细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

G47 Δ 病毒原液由哈佛大学 Samuel D. Rabkin 教授惠赠,其结构在文献^[7]中已有详述。其滴度通过 vero 细胞(非洲绿猴肾细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院)进行噬菌斑测定。人乳腺癌细胞系 SK-BR-3、MDA-MB-453 和 MDA-MB-231 由中山大学附属肿瘤医院实验研究部曾木圣教授提供。

1.2 试剂

RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基及胎牛血清购自 GIBCO 公司, β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒购自碧云天生物技术研究,中性红购自广州威佳科技有限公司。

1.3 细胞培养

人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 及 MDA-MB-453 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,MDA-MB-231 常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-

1640 培养基,置于恒温 37 ℃、饱和湿度、含 5%CO₂ 的孵育箱中培养。收集细胞时,用 0.25 %胰蛋白酶消化,取对数生长期细胞用于实验。

1.4 体外细胞毒实验

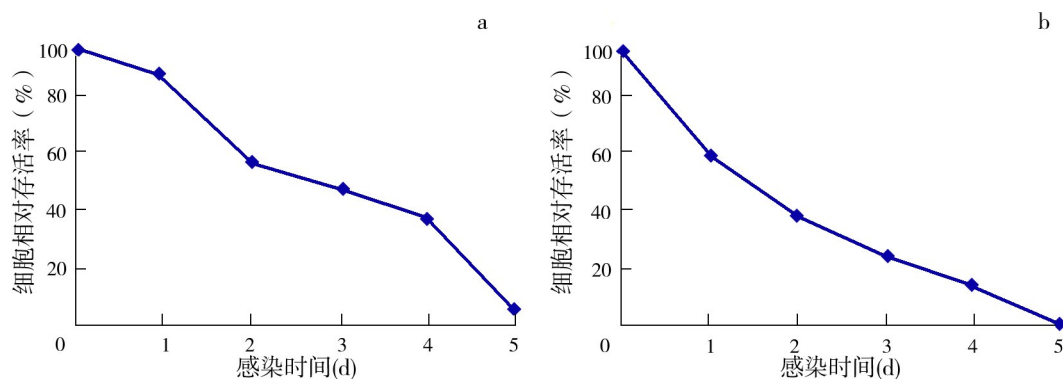
细胞经胰酶消化后,铺于六孔培养板中,37 ℃培养 24 h 后感染病毒,感染复数(multiplicities of infection, MOI)分别为 0.10 和 0.01。37 ℃培养 90 min 后吸除病毒液体,更换为含 1%灭活胎牛血清的培养液继续培养。每天分组收集细胞,用 Coulter 计数板计数存活细胞数量,共 5 d。计数前用 1 ml PBS 洗涤 2 次以去除漂浮的死细胞。每株细胞均重复 2 次。

1.5 X-Gal 细胞染色

感染病毒后每天均进行 β-半乳糖苷酶原位染色以观察被感染的细胞数量变化,共 5 d。吸除细胞培养液,加入 1 ml β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 10 min 后,吸除细胞固定液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min。加入 1 ml 染色工作液,37 ℃孵育 2 h,至部分细胞变成蓝色。PBS 洗涤后中性红复染。

2 结果

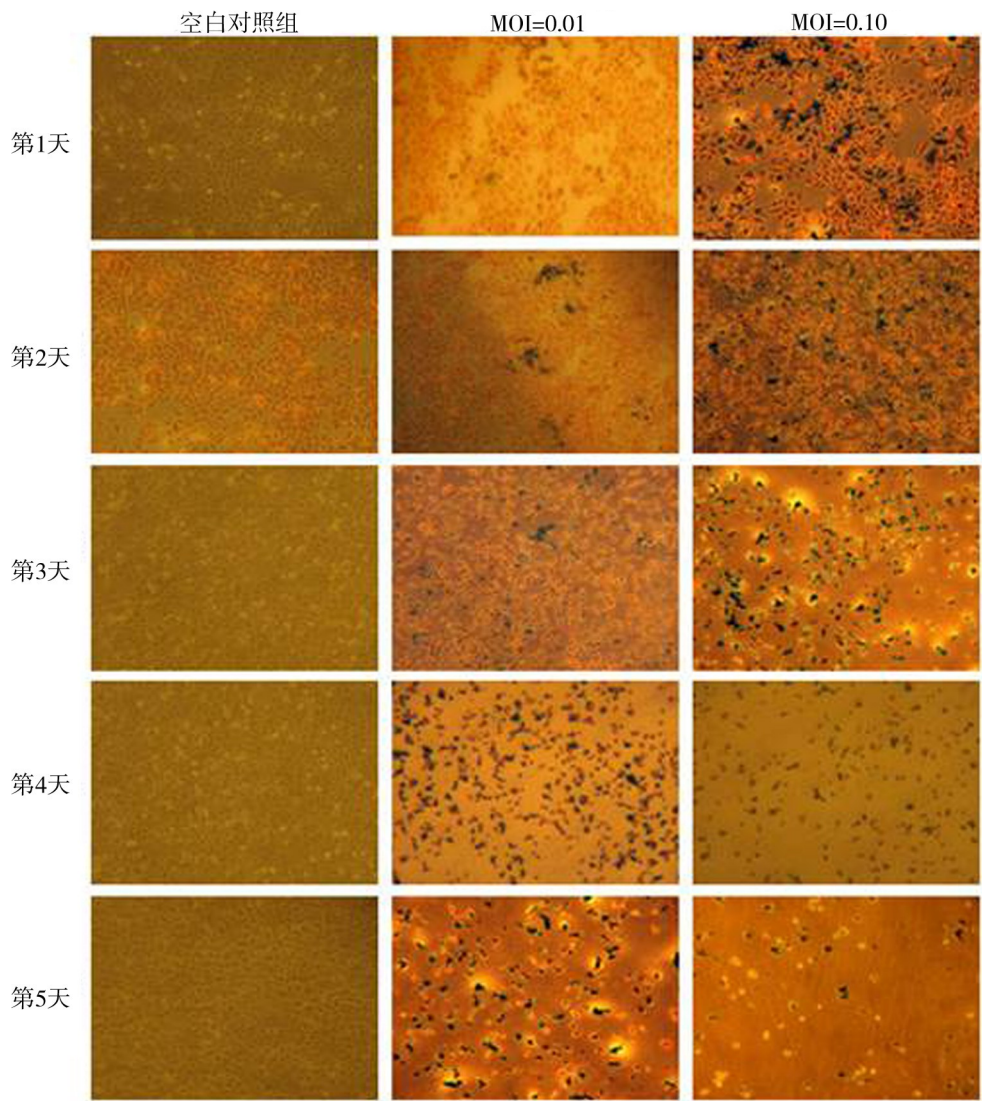
人乳腺癌细胞系 SK-BR-3[ER(-)、PR(-)、HER-2(+)],对 G47Δ 反应较敏感。在 MOI=0.01 的实验组,感染病毒后第 5 天,超过 90%的细胞已被杀灭;在 MOI=0.10 的实验组,感染病毒后第 4 天,超过 85%的细胞已被杀灭,感染病毒后第 5 天,超过 95%的细胞已被杀灭(图 1)。G47Δ 被转入 LacZ 基因,所以被感染的细胞可以被 X-Gal 染成蓝色(图 2)。



a: MOI=0.01; b: MOI=0.10; 细胞培养于 37 ℃, 含 1%灭活胎牛血清的 DMEM, 感染后第 1~5 天计数细胞, 纵轴为感染后细胞所占当日无感染对照组细胞数的百分比。

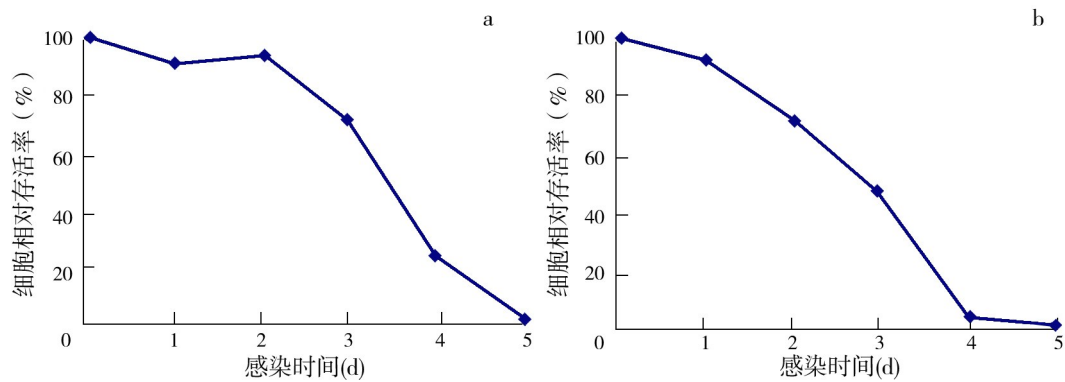
图 1 G47Δ 对 SK-BR-3 细胞的毒性效应

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-453[ER(-)、PR(-)、HER-2(+)]对 G47Δ 的反应同样敏感。在 MOI=0.01 的实验组,感染病毒后第 5 天,超过 90%的细胞已被杀灭;在 MOI=0.10 的实验组,感染病毒后第 3 天,超过 90%的细胞已被杀灭,第 5 天未能见到存活的细胞(图 3、4)。



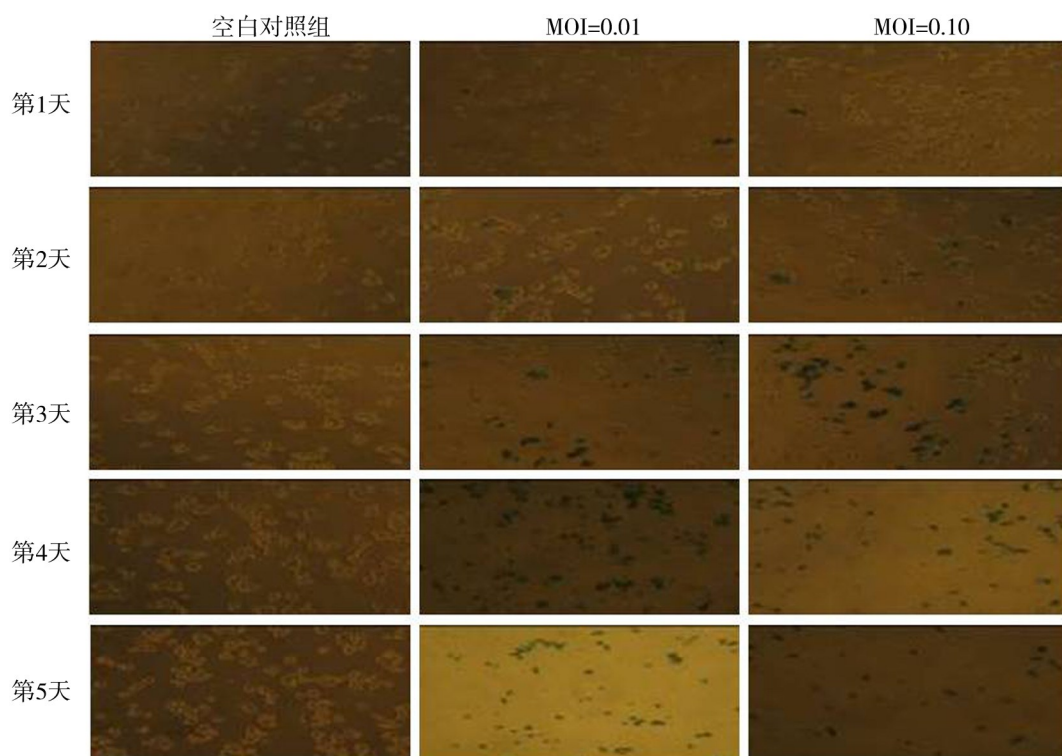
细胞培养于 37℃、含 1% 灭活胎牛血清的 DMEM, 感染后第 1~5 天分别用固定液处理, X-gal 工作液染色, 中性红复染, 感染 G47Δ 病毒的细胞表达 LacZ, 被 X-gal 染成蓝色。

图 2 SK-BR-3 细胞感染 G47Δ 后不同时间的 X-gal 染色结果(×200)



a: MOI=0.01; b: MOI=0.10; 细胞培养于 37℃、含 1% 灭活胎牛血清的 DMEM, 感染后第 1~5 天计数细胞, 纵轴为感染后细胞所占当日无感染对照组细胞数的百分比。

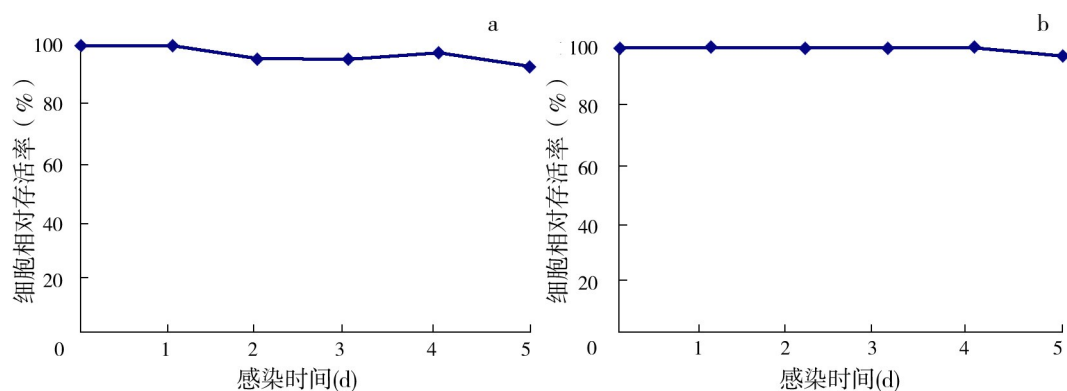
图 3 G47Δ 对 MDA-MB-453 细胞的毒性效应



细胞培养于 37 ℃、含 1% 灭活胎牛血清的 DMEM, 感染后第 1~5 天分别用固定液处理, X-gal 工作液染色, 中性红复染, 感染 G47Δ 病毒的细胞表达 LacZ, 被 X-gal 染成蓝色。

图 4 MDA-MB-453 细胞感染 G47Δ 后不同时间的 X-gal 染色结果(×200)

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231[ER (—)、PR (—)、HER-2 (—)]在感染 G47Δ 后, MOI=0.01 组及 MOI=0.10 组的细胞数量与对照组相比均无差异(图 5、6), 说明 G47Δ 对 MDA-MB-231 细胞无明显的杀伤作用。

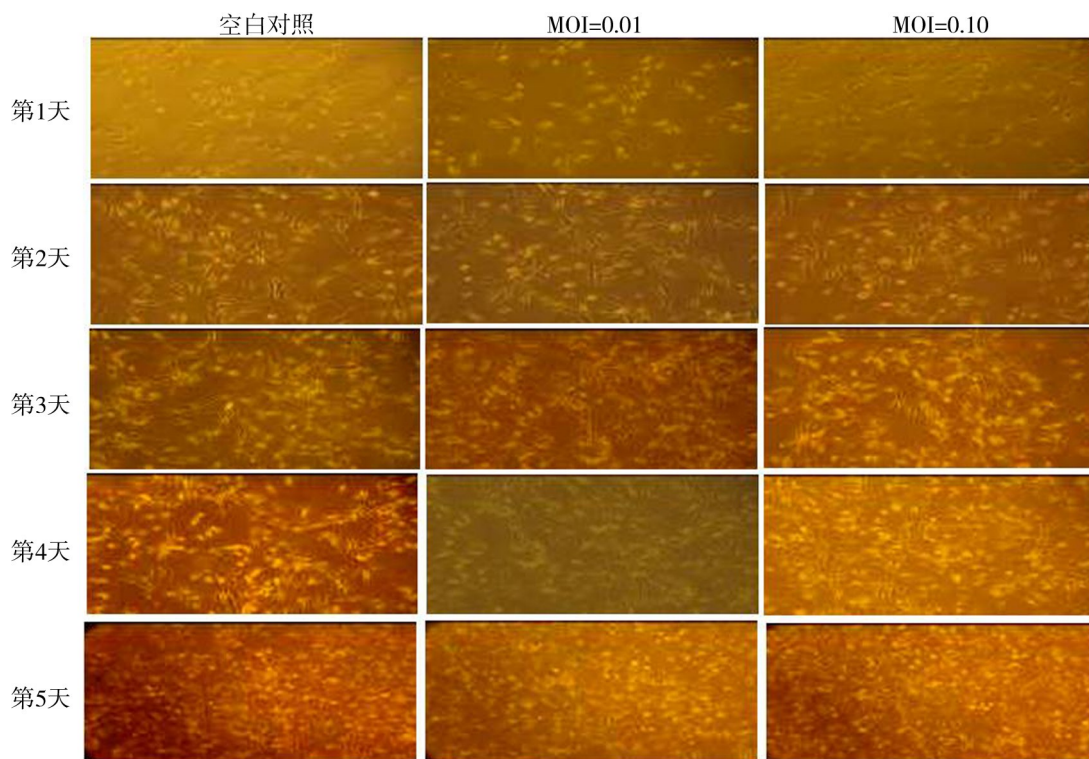


a: MOI=0.01; b: MOI=0.10; 细胞培养于 37 ℃, 含 1% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640, 感染后第 1~5 天计数细胞。纵轴为感染后细胞所占当日对照细胞的百分比。

图 5 G47Δ 对 MDA-MB-231 细胞的毒性效应

3 讨论

癌症治疗中病毒的应用可以追溯到 20 世纪初, 研究者们发现许多患有恶性



细胞培养于 37 ℃、含 1% 灭活胎牛血清的 DMEM, 感染后的第 1~5 天分别用固定液处理, X-gal 工作液染色, 中性红复染, 感染 G47Δ 病毒的细胞表达 LacZ, 被 X-gal 染成蓝色。

图 6 MDA-MB-231 细胞感染 G47Δ 后不同时间的 X-gal 染色结果(×200)

肿瘤的患者接种狂犬病疫苗或者感染病毒性疾病时, 肿瘤会自发性退化^[15-16]。随后动物实验证实新城疫病毒和流感病毒可以感染并溶解鼠肿瘤^[17]。20 世纪 40 年代末学者们开始了溶瘤性病毒在人类肿瘤患者的应用研究。溶瘤性病毒通过以下几种可能的机制介导肿瘤细胞裂解^[18]: (1) 直接通过自身的繁殖裂解肿瘤细胞; (2) 病毒蛋白的细胞毒效应; (3) 介导特异性和非特异性抗肿瘤免疫; (4) 增加对化疗和放射治疗的敏感性; (5) 作为载体导入外源基因。这一领域的研究已取得较大进展, 多种溶瘤性病毒载体如腺病毒、单纯疱疹病毒、新城疫病毒、逆转录病毒和痘苗病毒等已被开发并用于临床试验^[19]。近年来, 病毒在癌症治疗领域的应用不断取得新的进展。Shen 等^[20]将 RNA 干扰技术应用于溶瘤性病毒载体中, 通过构建携带 shRNA 的溶瘤性腺病毒, 敲除结肠癌细胞中的生存素基因, 取得更为强大的溶瘤效果。Wodarz 等^[21]通过大量实验, 建立了预测病毒繁殖与肿瘤增殖之间相互作用的计算机模型以帮助选择最佳治疗剂量。

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤, 其现有的临床治疗手段主要有手术、化疗、放射治疗及内分泌治疗, 其中手术和放射治疗属肿瘤的局部性治疗。近年的肿瘤生物学研究表明乳腺癌是一种全身性疾病, 早期即有转移和扩散的倾向, 癌肿远处或广泛转移是乳腺癌患者死亡的最主要原因, 目前对其治疗仍很不理想, 这迫切需要对其进行广泛深入研究以提高晚期转移性乳腺癌的治疗效果。局部与整体

相结合的综合手段是针对乳腺癌生物学特性的有效方法。溶瘤性病毒的作用机制有别于放射治疗、化疗、手术治疗等传统肿瘤治疗方法,它可与这些治疗方法并用以增强其有效性并减低毒性。

HSV-1 为有包膜的双链 DNA 病毒,其基因组长约 152 kb。它具有多种成为溶瘤性病毒的优越条件:(1)对 HSV-1 的研究比较彻底,其基因序列已知,可以通过基因工程技术改造其基因组^[22],且其基因组中有 30 kb 可被替换,因此它可以比腺病毒携带更多外源基因及异源性启动子^[23];(2)HSV-1 的神经毒性和致病性基因可以失活,极少导致严重的疾病,而病毒的复制能力和杀伤肿瘤的能力不受影响^[22];(3)多种抗病毒药物如阿昔洛维可以安全地抑制病毒繁殖^[23];(4)HSV-1 不会像逆转录病毒一样将其基因组整合到宿主细胞的基因组中,因此不会引起插入诱变。

溶瘤性单纯疱疹病毒 G47 Δ 由 G207 改造而来,现已在美国进行其他肿瘤治疗的临床试验^[5]。G207 应用于脑神经胶质瘤取得疗效^[2],但因为灭活了 γ 34.5 基因,消除了病毒的神经毒性,同时也减弱了病毒的复制能力,因此,其对肿瘤的杀灭能力受到限制。Todo 等^[7]从 G207 的基因中剔除了非重要基因 α 47 中 312 bp 碱基,研制出 G47 Δ ,使迟型 US11 基因直接受控于立早型 α 47 启动子,由此 US11 表达的改变解除了蛋白质合成抑制以增强 γ 34.5 突变的表达^[23],从而增强了 G47 Δ 病毒的复制和繁殖能力。G47 Δ 在 ICP6 基因(UL39)区插入了 Ecoli-LacZ 基因导致核苷酸还原酶(RR)失活。RR 是病毒 DNA 合成的关键酶,在正常细胞中该酶缺乏抑制了病毒 DNA 合成,从而使病毒无法繁殖,但肿瘤细胞中存在的 RR 可以使病毒完成 DNA 合成,进而大量繁殖,产生溶瘤效应。并且,ICP47 基因的产物可以阻滞主要组织相容性复合物 1 (major histocompatibility complex, MHC-1)介导的抗原表达,所以这一突变不会下调感染细胞中 MHC-1 的表达^[7],大大增强了 G47 Δ 病毒复制和繁殖能力,因此其抗瘤作用明显优于 G207。

本研究发现:人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 和 MDA-MB-453 的受体表达情况相同,均为 ER(-)、PR(-)、HER-2(+),它们对 G47 Δ 反应较敏感,在 MOI=0.01 的实验组,感染病毒后第 5 天时 SK-BR-3 有超过 90% 的细胞被杀灭,MDA-MB-453 有超过 95% 的细胞被杀灭;在 MOI=0.01 的实验组,感染病毒后第 4 天时 SK-BR-3 有超过 80% 的细胞被杀灭,MDA-MB-453 有超过 90% 的细胞被杀灭;但人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 在感染 G47 Δ 后,细胞数量与对照组相比并无改变,说明 G47 Δ 对 MDA-MB-231 无杀伤能力。笔者以往的研究发现 G47 Δ 对人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 具有比 SK-BR-3 和 MDA-MB-453 更强的毒性,即使 MOI=0.01,超过 99% 的细胞均在 4 d 内被杀灭^[24]。MDA-MB-231 为 ER(-)、PR(-)、HER-2(-),与 MDA-MB-435 的受体表达情况相同,均为三阴性,恶性程度较

高(笔者推测其受体表达情况是对 G47 Δ 敏感性的影响因素之一),但 G47 Δ 未显示出对其杀伤力,笔者推测可能的原因是 MDA-MB-231 中缺乏 HSV-1 繁殖所必需的核苷酸还原酶,而 G47 Δ 的 ICP6 基因(UL39)区插入了 Ecoli-LacZ 基因导致其核苷酸还原酶失活,如此病毒无法繁殖,但其确切的机制正在进一步研究之中。

研究表明,乳腺癌的预后与临床分期及 ER、PR、HER-2 的表达密切相关^[25], ER、PR 阴性者预后明显较阳性者差,HER-2 高表达亦是预后不良的重要因素。临床上,HER-2 的过度表达说明术后患者肿瘤易早期复发且生存期缩短,是乳腺癌患者预后差的指征^[26]。SK-BR-3 和 MDA-MB-453 均为 ER(-)、PR(-)、HER-2(+),这一类型的乳腺癌对内分泌治疗的反应性较差,预后不佳。本研究证实 G47 Δ 对其有较强的杀灭能力。

由于 G47 Δ 可通过静脉注射及局部瘤内注射,在感染并杀伤乳腺癌细胞的同时不损伤其他正常细胞,因此,可能对一些中晚期乳腺癌及其他治疗方法无效的 HER-2 高表达患者是一种有效的治疗方法,值得进一步进行临床验证。

参考文献

- [1] Simeone A M, Broemeling L D, Rosenblum J, *et al.* HER-2/neu reduces the apoptotic effects of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) in breast cancer cells by decreasing nitric oxide production. *Oncogene*, 2003, 10:6739—6747.
- [2] Mineta T, Rabkin S D, Yazaki T, *et al.* Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med*, 1995, 1:938—943.
- [3] Hunter W D, Martuza R L, Feigmanbaum F, *et al.* Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol*, 1999, 73:6319—6326.
- [4] Markert J M, Medlock M D, Rabkin S D, *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 2000, 7:867—874.
- [5] Varghese S, Rabkin S D. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9:967—978.
- [6] Kim D, Martuza R L, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med*, 2001, 7: 781—787.
- [7] Todo T. "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adhesion & Migration*, 2008, 2:208—213.
- [8] Liu R, Varghese S, Rabkin S D. The treatment of C3(1)/Tag transgenic mouse breast cancer with HSV. *Cancer Research*, 2005, 64:541—549.
- [9] Liu R, Martuza R L, Rabkin S D. Intracarotid delivery of G47 Δ to intracerebral tumors after blood brain barrier disruption. *Gene Therapy*, 2005, 12:280—288.
- [10] Liu R, Rabkin S D. HSV for the treatment of human breast cancer. *Chinese Medical Journal*, 2005, 30:225—229.
- [11] Cozzi P J, Malhotra S, McAuliffe P, *et al.* Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated replication-competent herpes simplex viruses G207 and NV1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. *FASEB J*, 2001, 15: 1306—1308.
- [12] Delman K A, Bennett J J, Zager J S, *et al.* Effects of preexisting immunity on the response to herpes simplex-based oncolytic virus therapy. *Hum Gene Ther*, 2000, 11: 2465—2472.
- [13] Bennett J J, Delman K A, Burt B M, *et al.* Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes simplex virus (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9: 935—945.
- [14] Cozzi P J, Burke P B, Bhargava A, *et al.* Oncolytic viral gene therapy for prostate cancer using two attenuated, replication-

- competent, genetically engineered herpes simplex virus. Prostate, 2002, 53: 95—100.
- [15] Dock G. Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma. Am J Med Sci, 1904, 127:563.
- [16] DePace N. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. Ginecologia, 1912, 9: 82—89.
- [17] Sinkovics J, Horvath J. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. Intervirology, 1993, 36:193—214.
- [18] Kim D H. Replicating oncolytic viruses: an overview. Expert Opin Investig Drugs, 1996, 5:753—762.
- [19] Kim D, Niculescu Duvaz I, Hallden G, *et al.* The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. Trends Mol Med, 2002, 8:S68—S73.
- [20] Shen W, Wang C Y, Wang X H, *et al.* Oncolytic adenovirus mediated Survivin knockdown by RNA interference suppresses human colorectal carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 81.
- [21] Wodarz D, Komarova N. Towards Predictive Computational Models of Oncolytic Virus Therapy: Basis for Experimental Validation and Model Selection. PLoS ONE, 2009, 4: e4271.
- [22] Rabkin S D, Hernaiz Driever P. Replication-competent herpes simplex virus vectors for cancer therapy. Monogr Virol Basel Karger, 2001, 22:1—45.
- [23] Martuza R L. Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. J Clin Invest, 2000, 105:841—846.
- [24] Liu R B, Samuel D. Rabkin. Oncolytic herpes simplex virus vectors for the treatment of human breast cancer. Chinese Medical Journal, 2005, 118: 307—312.
- [25] Cornfield D B, Palazzo J P, Schwartz G F, *et al.* The prognostic significance of multiple morphologic features and biologic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a study of a large cohort of patients treated with surgery alone. Cancer, 2004, 100:2317—2327.
- [26] 邱晓光,李双兰,蒲庆田,等. 端粒酶活性、c-erbB-2 的表达及对乳癌早期癌变的诊断价值. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9 :143.

(收稿日期:2009-06-30)

(本文编辑:罗承丽)

王佳妮,刘仁斌,李俊杰,等. 转基因溶瘤性单纯疱疹病毒对人类乳腺癌的治疗作用[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2009,3(6):642—650.