

灭活仙台病毒体内外诱导顺铂耐药性肺腺癌 A549/DDP 细胞凋亡

陈则东¹, 沈晓鹏¹, 穆洪云¹, 张 泉²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225000)

【摘要】 目的 顺铂(DDP)被广泛应用于肺癌的化疗。然而,顺铂抵抗性代表着临床有效治疗的最主要障碍。本实验室前期工作证明灭活仙台病毒(HVJ-E)具有诱导黑色素瘤细胞(B16)凋亡,与对照组相比明显减小荷瘤小鼠的肿瘤体积的作用。该研究主要用于探讨 HVJ-E 对于顺铂抵抗性肺腺癌 A549/DDP 细胞是否具有诱导凋亡的作用。**方法** 体外实验,将 HVJ-E 与 A549/DDP 细胞体外共培养,通过流式细胞术检测 HVJ-E 对 A549/DDP 细胞凋亡的影响;体内实验,将 HVJ-E 注射到肿瘤内,通过组织切片 TUNEL 法以及测量肿瘤体积大小观察 HVJ-E 的溶瘤效果。**结果** 体外实验流式细胞术检测在 12 h、24 h、36 h, A549/DDP 晚期凋亡率分别为 7.7%、12.6%、18.9%,且 12 h 与 24 h、24 h 与 36 h 的晚期凋亡率差异均有显著性;体内实验 TUNEL 法检测显示实验组与对照组相比有较多的肿瘤细胞凋亡;同时瘤内注射实验显示实验组肿瘤体积远小于对照组。**结论** 实验结果表明灭活的 HVJ-E 在体内外均具有诱导 A549/DDP 细胞凋亡的作用,同时通过瘤内注射能够显著减小肿瘤体积。

【关键词】 顺铂;灭活仙台病毒;顺铂抵抗性 A549 细胞;凋亡;裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0057-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.011

Inactivated Sendai virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*

CHEN Zedong¹, SHEN Xiaopeng¹, MU Hongyun¹, ZHANG Quan²

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China.

2. School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225000)

【Abstract】 Objective Cisplatin (DDP) is widely used in the chemotherapy of lung cancer. However, cisplatin resistance represents a major obstacle in its effective treatment. Our preliminary work has demonstrated that inactivated Sendai virus (HVJ-E) shows that it induces apoptosis in murine melanoma cells (B16) and obviously inhibits the tumor growth in tumor-bearing BALB/c nude mice. This study aims to investigate whether inactivated HVJ-E has an effect of inducing apoptosis in cisplatin-resistant A549/DDP lung adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods** HVJ-E and A549/DDP cells were co-cultured *in vitro*, and the effect of HVJ-E on the apoptosis in A549/DDP cells was detected by flow cytometry. In addition, HVJ-E was injected into the tumor *in vivo*, and its oncolytic effect was observed by TUNEL assay of tissue sections and measurement of tumor size. **Results** After co-cultured with HVJ-E for 12 h, 24 h and 36 h, the apoptosis rate of A549/DDP cells in late stage detected by flow cytometry was 7.7%, 12.6% and 18.9%,

respectively, showing a significant difference between 12 h and 24 h, and between 24 h and 36 h. TUNEL assay showed that there was more apoptosis in tumor cells *in vivo* in the experimental group than in the control group. Meanwhile, intratumoral injection of HVJ-E induced a significantly smaller tumor volume in the experimental group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Our findings indicate that inactivated HVJ-E can induce apoptosis in A549/DDP cells both *in vitro* and *in vivo*, and intratumoral injection of inactivated Sendai virus significantly reduces the tumor growth *in vivo*.

【Key words】 cisplatin; inactivated Sendai virus; cisplatin-resistant A549 cells; apoptosis; nude mice

溶瘤病毒因其杀死肿瘤细胞的能力而被广泛用于肿瘤治疗研究中,一些天然的溶瘤病毒(包括新城疫病毒、腮腺炎病毒、呼肠孤病毒和麻疹病毒)在试验阶段和临床阶段都表现出光明的前景^[1-4]。目前使用的病毒选择性地肿瘤细胞内复制而导致细胞死亡。然而,因为它们仍然存在于正常的组织中,这种活病毒感染对于癌症患者是一个安全威胁,除非它们的基因组不完整^[5]。而且,宿主的抗病毒免疫可能会限制肿瘤细胞内的溶瘤病毒的复制,减弱病毒的杀伤能力。近来,因为能诱发多种抗肿瘤免疫反应而被广泛认可^[6-9]的灭活仙台病毒(HVJ-E)粒子被发现能够通过凋亡途径直接杀死人的肿瘤细胞。灭活的 HVJ-E 先后被报道能够诱导人的前列腺癌细胞系 PC3、DU145^[10-11]及小鼠黑色素瘤细胞(B16F10)的凋亡^[12-13]。

肺癌是目前世界范围内癌症高死亡率的一个主要原因,尽管在过去数十年内各种治疗方法(包括化疗、放疗和手术)长足发展,五年以上生存期的患者仍不足 15%^[14-15]。顺铂辅助化疗极大地延长了肺癌患者的生存期,然而顺铂抵抗性成为限制其使用的主要障碍。文献报道新城疫病毒能够诱导顺铂抵抗性人肺癌细胞的凋亡,然而作为活病毒可能会对宿主产生潜在威胁,因此急需寻找一种新的治疗策略。

本实验拟将 A549/DDP 细胞与灭活的 HVJ-E 共培养,探讨其是否能在体外诱导 A549/DDP 细胞凋亡;将灭活的 HVJ-E 病毒直接注射到肿瘤内,观察其是否能在体内诱导肿瘤细胞凋亡和减缓肿瘤的生长,为进一步研究其诱导凋亡机制提供现象依据。

1 材料和方法

1.1 细胞、病毒与实验动物

人非小细胞肺癌顺铂耐药株 A549/DDP 购自中科院上海细胞库,顺铂耐药性 A549/DDP 细胞培养

在含 2 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂(Sigma)的 10% FBS 1640 完全培养基以维持其抗性,在实验之前 3 d 将其培养在不含顺铂的 1640 完全培养基中;仙台病毒收自 10~14 日龄鸡胚的绒毛膜尿囊液,纯化、浓缩、紫外线辐照灭活(99 mJ/cm^2)(参考之前文献报道,灭活仙台病毒不能正常复制,但仍保留融合能力^[16]);BALB/c 裸鼠由扬州大学比较医学中心提供[SCXK(苏)2017-0007],5 只/笼饲养在 SPF 环境[SYXK(苏)2016-0020],自由饮水与取食,实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

改良型 RPMI-1640 培养基(SH30809.018)与胎牛血清(MZE145)购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;顺铂(P4394)购自 Sigma 公司;TUNEL 凋亡检测试剂盒(MK1020)与 DAB(AR1000)显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;FITC-annexin 凋亡检测试剂盒 I(556547)购自 BD Biosciences 公司。Biosciences FACS Aria 流式细胞仪购自美国 BD 公司;独立通风笼盒(IVC)购自苏州冯氏实验动物设备有限公司;倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司;RM2235 徕卡轮转切片机购自上海欧启电子科技有限公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 流式细胞术分析细胞凋亡

细胞凋亡使用 annexin V 和 PI 双染技术,通过流式细胞仪分析细胞膜表面磷脂酰丝氨酸重排的方法加以检测。 1×10^5 A549/DDP 细胞分别接受对照或者感染复数 400 MOI 的灭活 HVJ-E 处理,每组做三个重复,分别于 12 h、24 h、36 h 后检测凋亡率;右下象限的细胞群(PI 阴性,annexin V 阳性)为早期凋亡细胞,右上象限的细胞群(PI 阳性,annexin V 阳性)为晚期凋亡细胞。

1.3.2 TUNEL 实验

将 2×10^6 A549/DDP 细胞接种到 BALB/c 裸鼠

皮下,当肿瘤直径达到 5 mm 时,分别取 100 μL HVJ-E 溶液(内含 2×10^{10} 病毒粒子)或 100 μL PBS 溶液对实验组与对照组进行肿瘤内注射。注射 3 d 以后,处死小鼠,分离肿瘤,按照石蜡切片制作程序制作切片。石蜡切片分别被用于 HE 染色或者 TUNEL 实验,操作方法如前所述^[17]。TUNEL 阳性细胞(棕染)被认为是凋亡细胞。

1.3.3 体内溶瘤实验

取 20 只 6 周龄 BALB/c 裸鼠随机分成两组,每组 10 只(雌雄各半),分别指定为实验组和对照组。实验组每只小鼠于背部分别接种 A549/DDP 细胞(2×10^6)与 HVJ-E(2×10^{10} 病毒粒子)混合液;对照组则只接种 A549/DDP 细胞(2×10^6)。每日观察肿瘤生长情况,利用游标卡尺测量肿瘤的长和宽,并按下述公式计算肿瘤体积:肿瘤体积 = 长 $\times$ 宽²/2^[12]。同时将 2×10^6 A549/DDP 接种到 BALB/c 裸鼠皮下,当肿瘤直径达到 5 mm 时,分别取 100 μL HVJ-E 溶液(内含 $2 \times$

10^{10} 病毒粒子)或 100 μL PBS 溶液对实验组与对照组进行肿瘤内注射,连续注射三次,每次间隔 2 d,首次注射后每隔 5 d 测量一次肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线。

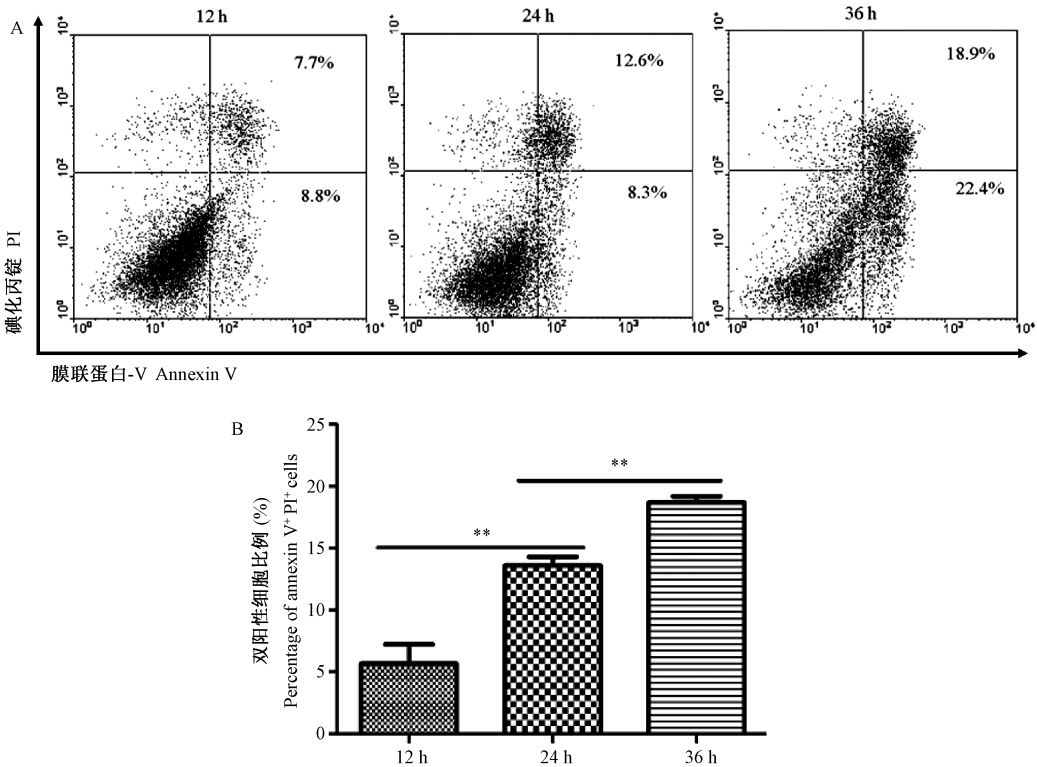
1.4 统计学方法

本实验采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 two-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 灭活的 HVJ-E 在体外能够诱导 A549/DDP 细胞凋亡

为了判断灭活的仙台病毒能否在体外诱导 A549/DDP 细胞凋亡, 1×10^5 A549/DDP 细胞分别接受对照(PBS)或者感染复数 400 MOI 的灭活 HVJ-E 处理,于 12 h、24 h、36 h 后收集细胞,annexin V/PI 双染法分析不同感染时间下的细胞



注:A:A549 细胞凋亡随时间变化的流式细胞术测定结果;B:A549 细胞凋亡随时间变化的统计分析图。感染复数为 400 MOI。与 24 h 相比,** $P < 0.01$ 。

图 1 灭活仙台病毒体外诱导 A549/DDP 细胞凋亡

Note. A: Apoptosis in A549 cells over time detected by flow cytometry. B: Statistics of apoptosis of A549 cells over time. MOI = 400: 1. Compared with 24 h, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Inactivated Sendai virus induces apoptosis of A549/DDP cells *in vitro*

凋亡率。如图 1A、1B 所示,随着感染时间的递增,A549/DDP 的凋亡率逐渐增加,且 12 h 与 24 h、24 h 与 36 h 的晚期凋亡率相比差异均有显著性($P < 0.01$)。

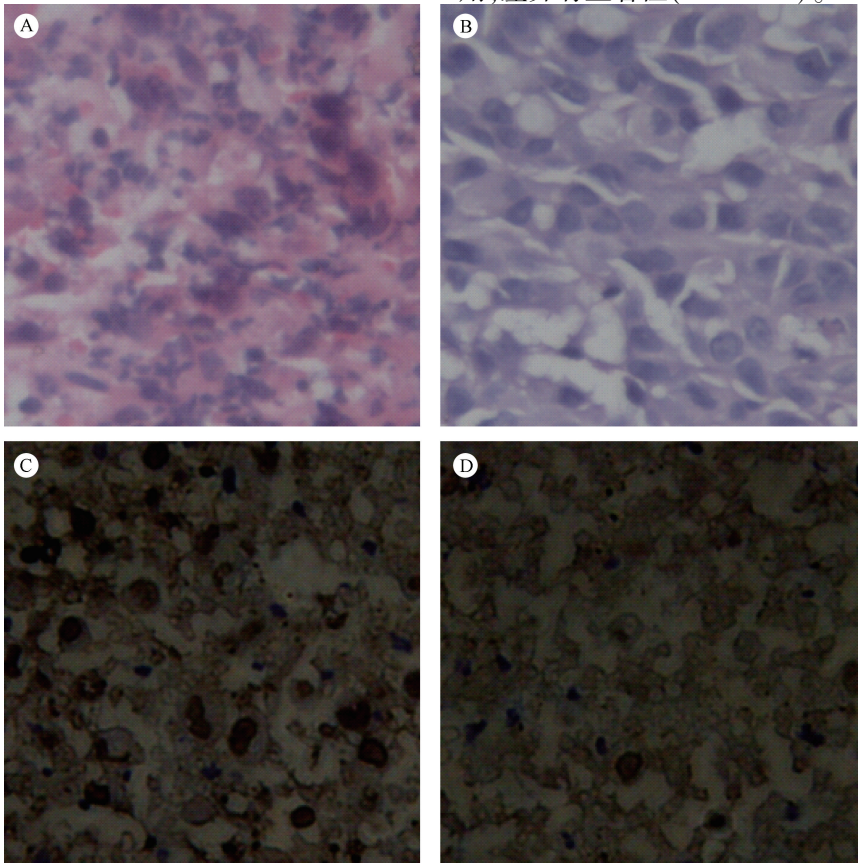
2.2 灭活的 HVJ-E 对 A549/DDP 小鼠肺癌模型表现出良好的溶瘤作用

为了评价灭活的 HVJ-E 在 A549/DDP 小鼠肺癌模型中的溶瘤能力,BALB/c 裸鼠皮下接种 A549/DDP 细胞,然后采用瘤内注射的方式对荷瘤小鼠接种一次灭活的 HVJ-E 或者 PBS。3 d 之后处死小鼠,通过 HE 染色和 TUNEL 实验检查肿瘤切片。HE 染色显示灭活的 HVJ-E 处理组小鼠的肿瘤切片呈现出特征性的凋亡细胞,如染色体深染、凝集,甚至表现出镰刀状染色质固缩(图 2A)。除此之外,TUNEL 实验结果也显示出较多的棕染细胞(图 2C)。相反,在 PBS 对照组中则很少出现自溶或者凋亡的细胞(图 2B、2D)。

2.3 灭活的 HVJ-E 对 A549/DDP 小鼠肺癌模型肿瘤体积-时间变化曲线的作用

将 2×10^6 A549/DDP 细胞与 400 MOI 的灭活 HVJ-E 共培养,24 h 后接种到裸鼠皮下,并测量肿瘤体积变化情况。如图 3A 所示,随着接种时间的延续,对照组肿瘤体积不断增大,在第 16 天时体积达到 400 mm^3 ,而实验组肿瘤体积出现增大-减小-消失的变化,由此也可说明灭活的仙台病毒能够诱导 A549/DDP 细胞的凋亡。

将 2×10^6 A549/DDP 细胞接种到 BALB/c 裸鼠皮下,当肿瘤直径达到 5 mm 时,分别取 100 μL HVJ-E 溶液(内含 2×10^{10} 病毒粒子)或 100 μL PBS 溶液对荷瘤鼠进行肿瘤内注射,连续注射三次,每次间隔 2 d。使用游标卡尺测定肿瘤的长与宽,并通过公式:肿瘤体积(mm^3) = 长 $\times$ 宽²/2 计算肿瘤体积。如图 3B 所示,与 PBS 对照组相比,灭活的 HVJ-E 具有抑制顺铂耐药性的肺腺癌细胞生长的作用,差异有显著性($P < 0.05$)。

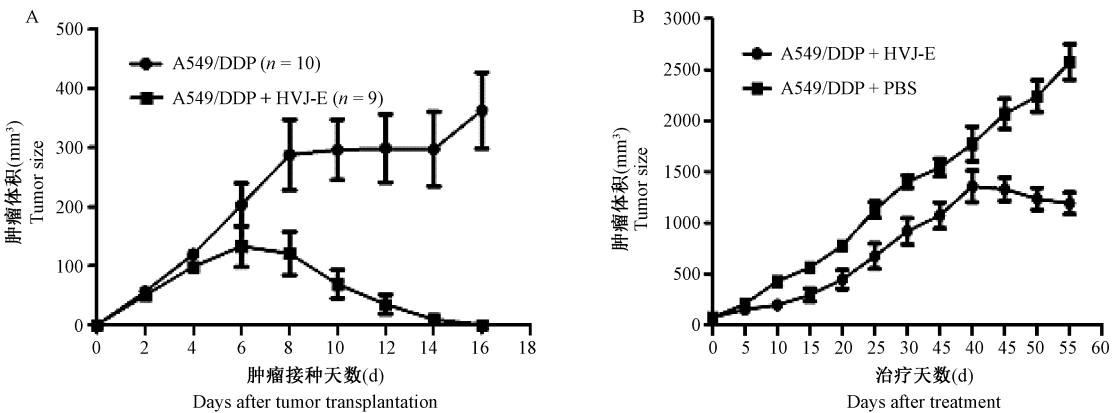


注:A:A549/DDP + HVJ-E 组(HE 染色);B:A549/DDP + PBS 组(HE 染色);C:A549/DDP + HVJ-E 组(TUNEL 染色);D:A549/DDP + PBS 组(TUNEL 染色)。

图 2 灭活仙台病毒体内溶瘤效果($\times 400$)

Note. A: A549/DDP + HVJ-E group, HE staining. B: A549/DDP + PBS group, HE staining. C: A549/DDP + HVJ-E group, TUNEL staining. D: A549/DDP + PBS group, TUNEL staining.

Fig.2 Oncolytic effect of inactivated Sendai virus *in vivo*



注:A:A549/DDP 细胞与灭活 HVJ-E 共培养 24 h 后接种裸鼠的肿瘤体积-时间变化曲线;B:瘤内注射 HVJ-E 后肿瘤体积-时间变化曲线。

图 3 肺腺癌肿瘤体积-时间变化曲线

Note. A: Tumor volume-time curves of A549/DDP cells co-cultured with inactivated HVJ-E for 24 h and then inoculated into nude mice. B: Tumor volume-time curves after intratumoral injection with HVJ-E.

Fig. 3 Tumor volume-time curves of lung adenocarcinoma

3 讨论

细胞凋亡是细胞活动过程中的一种重要改变,细胞凋亡的失调可破坏细胞增殖与细胞死亡之间的平衡进而诱发多种人类疾病,包括神经退行性疾病、自身免疫性疾病和许多类型的癌症等^[18]。因此,细胞凋亡被广泛认为具有巨大的治疗癌症的潜能。靶向细胞凋亡也逐渐成为癌症药物发现的研究热点,通过抗肿瘤药物来诱导凋亡以抑制肿瘤细胞的增殖^[19]。而固有的或获得性的耐药性严重阻碍了癌症的治疗。因此,解决耐药性造成的困扰受到越来越多的关注。

有研究发现,β-榄香烯作为天然化合物就具有广谱抗肿瘤效应,它在 A549/DDP 细胞中通过下调 P-gp 蛋白(P-gp 蛋白能使抗肿瘤药物从细胞内外排,从而减少细胞内药物的累积)发挥强烈的逆转作用,从而提高肿瘤细胞对抗癌药物的化疗敏感性^[20]。近年来,随着溶瘤病毒研究的不断深入,利用病毒治疗癌症已经取得巨大进步。在新城疫病毒(NDV)诱导的 A549/DDP 细胞凋亡的研究中,发现 NDV 主要通过 caspase 途径尤其是 caspase-9 途径来诱导细胞凋亡,且 MAPK 和 AKT 途径对 A549/DDP 的凋亡也具有一定的作用^[17, 21]。然而利用活病毒治疗癌症显然对病人有一定的安全风险。

越来越多的研究表明,灭活的仙台病毒(HVJ-E)具有杀伤肿瘤细胞的潜能。HVJ-E 首次被报道以剂量依赖方式在人的前列腺癌细胞株 PC3 和 DU145 中

直接诱导凋亡^[12-13]。进一步的研究发现,HVJ-E 来源的大约 300 bp 的 RNA 片段与肿瘤细胞的选择性凋亡有关。人的 RIG-I 能够识别 HVJ-E 来源的 300 bp 左右的 RNA 片段并与 IFN-β 启动子相互作用,启动信号级联,促使 I 型 IFN 产生^[22]。这种 I 型 IFN 通过 JAK-STAT 途径诱导肿瘤细胞选择性凋亡^[23]。通过使用 JAK-STAT 抑制剂并不能完全阻止 HVJ-E 诱导 PC3 细胞的凋亡,提示 I 型 IFN 介导的 JAK-STAT 途径并非是 HVJ-E 诱导凋亡的唯一途径^[12]。在小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞中,HVJ-E 还通过 MAPK 途径诱导 B16F10 细胞凋亡。有报道指出,HVJ-E 能够通过诱导免疫反应尤其是 T 细胞介导的细胞毒作用选择性杀死肿瘤细胞^[24],然而 BALB/c 裸鼠缺乏 T 细胞从而排除了 HVJ-E 诱导 T 细胞介导免疫反应。本实验中,BALB/c 裸鼠皮下接种 A549/DDP 细胞,然后采用瘤内注射的方式对荷瘤小鼠接种 HVJ-E,HVJ-E 表现出了良好的溶瘤作用。因此,HVJ-E 所诱导的凋亡效应存在错综复杂的机制。

HVJ-E 不仅可以作为载体递送抗肿瘤药物,激活抗肿瘤免疫,同时还能直接杀伤肿瘤细胞和诱导肿瘤细胞凋亡。研究清楚 HVJ-E 作用肿瘤细胞的机制将加深我们对 HVJ-E 抗肿瘤效应的认识。本次实验通过流式细胞术和组织切片 TUNEL 法分别证明了 HVJ-E 具有在体外和体内诱导顺铂耐药性 A549/DDP 细胞凋亡的作用,通过诱导凋亡减缓肿瘤生长,为进一步研究 HVJ-E 诱导顺铂耐药性 A549/DDP 的凋亡机制提供现象依据。

参考文献:

- [1] Prestwich RJ, Ilett EJ, Errington F, et al. Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(13): 4374–4381.
- [2] Bian J, Wang K, Kong X, et al. Caspase- and p38-MAPK-dependent induction of apoptosis in A549 lung cancer cells by Newcastle disease virus [J]. Arch Virol, 2011, 156(8): 1335–1344.
- [3] Sion-Vardy N, Lasarov I, Delgado B, et al. Measles virus: evidence for association with lung cancer [J]. Exp Lung Res, 2009, 35(8): 701–712.
- [4] Okuno Y, Asada T, Yamanishi K, et al. Studies on the use of mumps virus for treatment of human cancer [J]. Biken J, 1978, 21(2): 37–49.
- [5] Hann B, Balmain A. Replication of an E1B 55-kilodalton protein-deficient adenovirus (ONYX-015) is restored by gain-of-function rather than loss-of-function p53 mutants [J]. J Virol, 2003, 77(21): 11588–11595.
- [6] Li Q, Gao JQ, Qiu LY, et al. Enhanced immune responses induced by vaccine using Sendai virosomes as carrier [J]. Int J Pharm, 2007, 329(1–2): 117–121.
- [7] Kurooka M, Kaneda Y. Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 227–236.
- [8] Zhang Q, Yuan WF, Zhai GQ, et al. Inactivated Sendai virus suppresses murine melanoma growth by inducing host immune responses and down-regulating β -catenin expression [J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(5): 509–516.
- [9] Yoneyama Y, Ueda Y, Akutsu Y, et al. Development of immunostimulatory virotherapy using non-transmissible Sendai virus-activated dendritic cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(1): 129–135.
- [10] Matsushima-Miyagi T, Hatano K, Nomura M, et al. TRAIL and Noxa are selectively upregulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by nonreplicating Sendai virus particles [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(22): 6271–6283.
- [11] Kawaguchi Y, Miyamoto Y, Inoue T, et al. Efficient eradication of hormone-resistant human prostate cancers by inactivated Sendai virus particle [J]. Int J Cancer, 2009, 124(10): 2478–2487.
- [12] Zhang Q, Xu XS, Yuan Y, et al. IPS-1 plays a dual function to directly induce apoptosis in murine melanoma cells by inactivated Sendai virus [J]. Int J Cancer, 2014, 134(1): 224–234.
- [13] Gao H, Xu XS, Chen ZD, et al. Inactivated Sendai virus induces apoptosis in murine melanoma cells by IGF-1R down-regulation [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(12): 998–1002.
- [14] Khuri FR, Herbst RS, Fossella FV. Emerging therapies in non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2001, 12(6): 739–744.
- [15] Vora SA, Daly BD, Blaszkowsky L, et al. High dose radiation therapy and chemotherapy as induction treatment for stage III nonsmall cell lung carcinoma [J]. Cancer, 2000, 89(9): 1946–1952.
- [16] Zhang Q, Wang Z, Yuan Y, et al. Immunoadjuvant effects of hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) on the inactivated H9 subtype avian influenza virus vaccine [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 141(1–2): 116–123.
- [17] Wu Y, Zhang X, Wang X, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of Newcastle disease virus [J]. Intervirology, 2012, 55(4): 276–286.
- [18] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495–516.
- [19] Chen J, Han H, Chen M, et al. Inactivated Sendai virus strain Tianjin induces apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(12): 5023–5028.
- [20] Yao C, Jiang J, Tu Y, et al. β -elemene reverses the drug resistance of A549/DDP lung cancer cells by activating intracellular redox system, decreasing mitochondrial membrane potential and P-glycoprotein expression, and inducing apoptosis [J]. Thorac Cancer, 2014, 5(4): 304–312.
- [21] Meng S, Zhou Z, Chen F, et al. Newcastle disease virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 56–64.
- [22] Liu LW, Nishikawa T, Kaneda Y. An RNA molecule derived from Sendai virus DI particles induces antitumor immunity and cancer cell-selective apoptosis [J]. Mol Ther, 2016, 24(1): 135–145.
- [23] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7): 559–568.
- [24] Kurooka M, Kaneda Y. Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 227–236.

[收稿日期]2017–06–21