

论著 · 实验研究

新城疫病毒抗人急性单核细胞白血病作用的实验研究

王亚君 宋纯 李晓辉 张剑白

(哈尔滨医科大学第一临床医学院儿科,黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] **目的** 研究显示新城疫病毒(NDV)在对转移的黑色素瘤、高分化肾细胞癌等肿瘤的治疗中已经取得了良好的临床效果。本研究通过体内及体外实验初步探讨 NDV 对人急性单核细胞白血病的作用。**方法** 体外实验观察 NDV 感染组和对照组,即 NDV 感染或未感染急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 形态和密度变化,MTT 法测定 NDV 对细胞增殖的影响。体内实验通过建立裸鼠异种移植瘤模型,瘤内注射 NDV,计算抑瘤率,并评估 NDV 在体内的毒性作用。**结果** 倒置显微镜下,对照组细胞形态规则、分布密集;NDV 感染组细胞形态不规则,聚集、融合现象明显,分布稀疏。MTT 检测结果显示不同浓度 NDV 对 SHI-1 细胞的增殖均有明显抑制作用($P<0.01$),并呈现时间-浓度依赖关系。NDV 对 SHI-1 裸鼠异种移植瘤的抑制率为 84.7%,明显高于对照组($P<0.01$)。实验过程中裸鼠无毒性反应。**结论** NDV 在体内及体外均有抑制白血病细胞增殖的作用,并具有良好的安全性。
[中国当代儿科杂志,2011,13(2):149-152]

[关键词] 新城疫病毒;白血病细胞;裸鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)02-0149-04

Roles of Newcastle disease virus in human acute monocytic leukemia *in vitro* and *in vivo*

WANG Ya-Jun, SONG Chun, LI Xiao-Hui, ZHANG Jian-Bai. Department of Pediatrics, First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, China (Zhang J-B, Email: zjbhmu@126.com)

Abstract: Objective Some research has shown that Newcastle disease virus (NDV) is effective in the treatment of various tumors, including transferred melanoma and well differentiated renal cell carcinoma. This study aimed to evaluate the effect of NDV against human acute monocytic leukemia SHI-1 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods** *In vitro*, the density and morphologic changes between wild SHI-1 cells (control) and NDV-infected SHI-1 cells were observed. MTT assay was utilized to observe the effect of NDV on the proliferation of SHI-1 cells. *In vivo*, the effect of NDV on the tumor inhibition was assessed using SHI-1 xenografts subcutaneously established in CD-1 nude mice. NDV was given by intra-tumor injections, and the tumor inhibition rate and toxic effects were evaluated. **Results** In the control group, the SHI-1 cells were observed using an inverted microscope to be regular in morphology and intensive in distribution. In the NDV-infected group, the SHI-1 cells were irregular and sparsate, and the aggregate and fused cells were common. MTT assay showed that the proliferation of SHI-1 cells were significantly inhibited by NDV at different concentrations ($P<0.01$) and in a time- and concentration-dependent manner. The tumor inhibition rate in the NDV group was 84.7%, which was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). No toxic effects were observed in the nude mice. **Conclusions** NDV can suppress the proliferation of human acute monocytic leukemic cells both *in vitro* and *in vivo*. The safety of NDV is reliable.
[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (2):149-152]

Key words: Newcastle disease virus; Leukemia cell; Nude mice

20 世纪初,人们第一次认识到病毒可以用来治疗肿瘤,在将近一个世纪的研究中,已经发现了数十种病毒具有抗肿瘤的作用,其中新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV) 因其明确的抗肿瘤作用和良好的安全性一直是抗肿瘤病毒的研究热点之一^[1]。目前 NDV 的抗肿瘤作用已经应用于临床实

[收稿日期]2010-06-20;[修回日期]2010-09-29
[基金项目]黑龙江省卫生厅科研基金(No. 2006-015)。
[作者简介]王亚君,女,硕士,住院医师。
[通信作者]张剑白,教授。

验研究^[2],在对转移的黑色素瘤、高分化肾细胞癌等肿瘤的治疗中已经取得良好的临床效果^[3],但对白血病作用的研究较少。本研究通过体内及体外实验初步探讨了 NDV 对人急性单核细胞白血病的作

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 急性单核细胞白血病细胞株 SHI-1 由哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室提供。NDV D90 病毒株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所分离、鉴定、纯化并保存。无胸腺免疫缺陷裸鼠(型号 CD-1)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 IMDM 培养基为美国 HyClone 公司产品,10% 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,γ 胺橙(AO)为美国 Amresco 公司产品,碘化丙啶(PI)为美国 Sigma 公司产品,四甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)为美国 Amresco 公司产品。荧光倒置显微镜为日本 OLYMPUS 公司生产,全自动多功能酶标仪为芬兰 Thermo Labsystems 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SHI-1 按悬浮细胞常规培养方法培养在含 10% 胎牛血清及青、链霉素的 IMDM 培养基中,每 3~4 d 传代一次。

1.2.2 病毒制备 NDV D90 病毒株血凝效价(HA)为 1:2 560,半数鸡胚感染量 EID₅₀ 为 10~10.833/0.2 mL。将保存于鸡胚尿囊液中的 NDV 原液 1 000 r/min 离心 5 min,取上清液用无血清培养基分别稀释 10 倍、100 倍,制备成 3 种浓度即原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 NDV 感染尿囊液待用。

1.2.3 NDV 对 SHI-1 细胞生长的影响 将对数生长期的 SHI-1 细胞分为 4 组:对照组、NDV 原液组、10 倍稀释组及 100 倍稀释组,每组 10 mL,细胞浓度为 1×10^6 /mL,各组分别加入 2 mL 无血清培养液、NDV 原液、NDV 10 倍稀释液和 NDV 100 倍稀释液。于作用 24、48、72 h 时在倒置纤维镜下观察细胞形态及密度变化。并取处理 48 h 后的对照组和 NDV 原液组细胞悬液各 1 mL,加入 AO、PI 各 100 μL,充分混匀、室温下避光染色 15~20 min 后,于荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 NDV 对 SHI-1 细胞增殖的影响 采用

MTT 法,取对数生长状态良好的 SHI-1 细胞以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL,预培养 2 d 后,分别加入 20 μL 无血清培养基、NDV 原液、NDV 10 倍稀释液和 NDV 100 倍稀释液,每组设 5 个复孔,另设空白对照孔。于作用 24、48、72 h 时,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL,37℃ 培养 4 h,离心弃上清。每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min。应用多功能酶标仪测定 490 nm 波长处光吸收值(OD 值),以空白对照孔调零,计算细胞增殖抑制率。抑制率(%)=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.2.5 NDV 对 SHI-1 细胞裸鼠异种移植瘤生长的影响 4~6 周龄裸鼠 15 只,17~22 g,饲养于哈尔滨兽医研究所层流饲养器内。每只裸鼠背部皮下注射对数生长状态 SHI-1 细胞 0.25 mL,含活细胞数约为 10^8 个。皮下异种移植瘤生长 2~3 周后随机分为对照组和实验组,分别给予 0.2 mL 无血清培养基和 NDV 原液瘤内注射,隔日一次,共 4 次。游标卡尺测量注射前皮下移植瘤的长、短径(cm),计算肿瘤质量及肿瘤质量抑制率,绘制肿瘤生长曲线。将肿瘤组织、裸鼠肝脾做常规病理切片、苏木精-伊红染色,光镜下观察病理变化。肿瘤质量=(长×宽²)/2;肿瘤质量抑制率=(1-实验组平均肿瘤质量/对照组平均肿瘤质量)×100%。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件处理。计量资料结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用重复测量数据方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NDV 对 SHI-1 细胞生长的影响

SHI-1 细胞系经不同浓度 NDV 处理后,细胞形态及密度均发生明显变化。低倍镜下观察对照组细胞形态规则,呈圆形、透亮、分布密集,不同浓度 NDV 组细胞形态不规则,聚集、融合现象明显,分布稀疏,可见细胞碎片。高倍镜下对照组核分裂像多见;不同浓度 NDV 组可见细胞坏死,细胞膜不完整、细胞核碎裂、固缩。AO/PI 荧光染色时低倍镜下观察对照组呈均匀明亮的绿色荧光,NDV 原液组呈红、绿两色,以红色荧光为主(图 1);高倍镜下见红染细胞的细胞核碎裂、固缩。倒置显微镜下观察到细胞形态及密度变化的程度随 NDV 作用时间的延长及浓度的增加而更加明显。

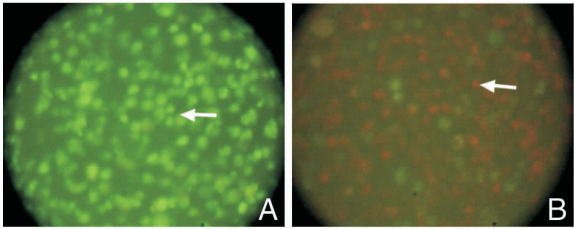


图1 NDV感染48 h后SHI-1细胞AO/PI染色(×100) A:对照组细胞呈均匀明亮的绿色荧光,为活细胞,箭头所示;B:NDV原液组为红、绿两色,以红色为主,说明死亡或正在死亡的SHI-1细胞居多,箭头所示为死亡细胞。

2.2 NDV对SHI-1细胞增殖的影响

本研究发现不同浓度NDV对SHI-1细胞的增殖有明显抑制作用($F = 267.189, P < 0.01$),两两比较发现随着NDV浓度的增加和作用时间的延长,SHI-1细胞的增殖逐渐减少,说明随着NDV浓度的增加、作用时间的延长,抑制率逐渐增加,见图2。

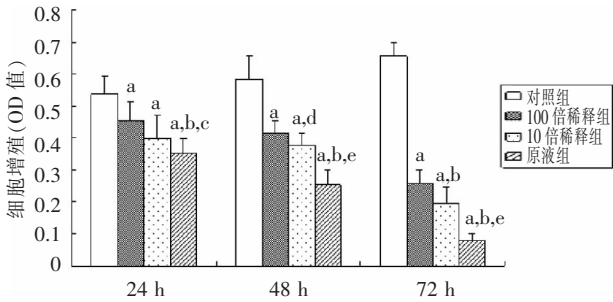


图2 不同浓度NDV在不同时间对SHI-1细胞增殖的影响 a:与同时时间点对照组相比, $P < 0.01$; b:与同时时间点100倍稀释组相比, $P < 0.01$; c:与同时时间点10倍稀释组相比, $P < 0.05$; d:与同时时间点100倍稀释组相比, $P < 0.05$; e:与同时时间点10倍稀释组相比, $P < 0.01$ 。

2.3 NDV对SHI-1细胞裸鼠异种移植瘤生长的影响

在裸鼠背部皮下注射SHI-1细胞约2周后,15只裸鼠全部可见肿瘤生长,成瘤率为100%,3周后肿瘤长至约1.0 cm × 1.0 cm。解剖发现裸鼠皮下异种移植瘤块包膜基本完整、与皮肤无粘连,瘤块呈白色,质中等。两组移植瘤病理切片见图3。

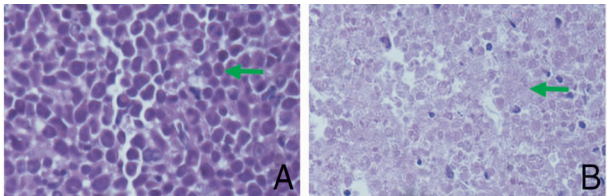


图3 SHI-1细胞裸鼠异种移植瘤病理图片(苏木精-伊红染色,×400) A:对照组细胞增生活跃,分裂相多见;瘤细胞排列密集,细胞为圆形或椭圆形,部分细胞核仁隐约可见,胞浆量中等,灰蓝色(箭头所示);淋巴、单核等炎性细胞浸润少见;瘤块中可见新生血管。B:实验组细胞有大片坏死现象,坏死区呈现均一粉染,细胞结构消失,可见细胞碎片(箭头所示)。

随着时间的延长,对照组皮下移植瘤质量逐渐增大,而实验组在NDV瘤内注射后移植瘤质量逐渐减小,较对照组明显减轻($F = 126.350, P < 0.01$),其抑制率可达84.7%,见图4。

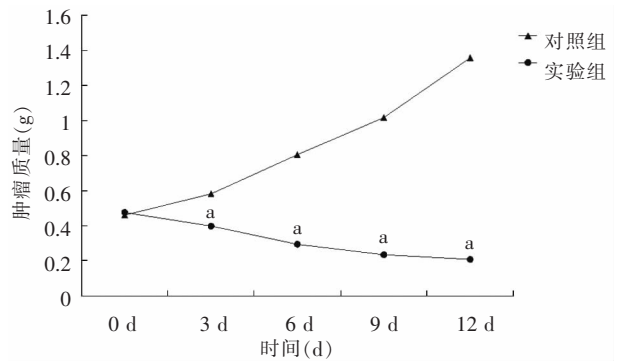


图4 SHI-1裸鼠移植瘤模型肿瘤生长曲线 a:与对照组比较, $P < 0.01$

2.4 NDV对裸鼠的毒性观察

实验过程中无裸鼠死亡。实验组裸鼠一般状态、进食及大小便均正常,对照组裸鼠在实验后期一般状态萎靡、不喜活动、进食少。实验组裸鼠肝、脾病理切片苏木精-伊红染色光镜下未见病理改变。

3 讨论

白血病是儿童时期最常见的恶性肿瘤,化疗是该病主要的治疗方法。即使经过规范化治疗,仍有10%~15%的白血病患者复发。研究表明,更强烈的化疗未必能真正提高治愈率,反而会增加与治疗相关的死亡率和继发第二肿瘤等危险^[4]。靶向免疫疗法是白血病治疗中的一种重要手段和研究热点,将来源于细菌或病毒的特异性毒素与单抗相连靶向杀伤白血病细胞是免疫治疗方法的一种^[5]。Wendtner等^[6]已经观察了腺病毒疫苗对慢性淋巴细胞白血病病人的免疫学及临床反应结果,因此将病毒或病毒修饰的疫苗作为白血病免疫治疗的方法之一是可行的。

NDV对肿瘤的杀伤机制尚不明确,目前认为主要有以下3个方面:NDV能够直接并且特异性地杀伤肿瘤细胞;NDV能够激发机体的细胞及体液免疫反应;NDV能够刺激各种细胞因子的释放从而增强机体的免疫功能^[7]。本实验观察到NDV D90病毒株感染人急性单核细胞白血病细胞后24 h即可导致细胞死亡,在倒置显微镜下可以见到细胞形态发生改变,细胞膜的完整性破坏,聚集现象明显,推

测 NDV 在体外对人急性单核细胞白血病细胞的杀伤作用与改变细胞膜的通透性有关,属于细胞融合型病毒。NDV 对肿瘤细胞的直接杀伤作用推测与 NDV 囊膜表面含有 HN 蛋白和融合蛋白 F 有关^[8]。HN 蛋白具有血凝素神经氨酸酶(HA)活性,可特异性识别细胞表面的唾液酸受体,而细胞一旦癌变,其细胞膜上的唾液酸含量显著增加,结合后的 HN 蛋白激活 F 蛋白,促使病毒囊膜与宿主细胞膜融合,病毒进入细胞复制。因此 NDV 可以特异性识别肿瘤细胞而对正常细胞无杀伤作用^[9-10]。另外本研究观察到 SHI-1 细胞裸鼠皮下移植瘤经 NDV 瘤内注射后明显缩小,病理切片苏木精-伊红染色显示肿瘤组织大片坏死,推测 NDV 在体内有溶瘤作用。Phuangsab 等^[11]的研究也证实了 NDV 瘤内注射对类上皮癌、结肠癌、大细胞肺癌、乳腺癌、前列腺癌的异体移植瘤具有明显的生长抑制作用。其机制除直接杀伤肿瘤细胞外,NDV 还可以使肿瘤特异性细胞毒细胞 CD8⁺ T 细胞反应性增加,可以激活巨噬细胞使其产生抗肿瘤作用的效应物质,还能够刺激机体产生干扰素、肿瘤坏死因子、白介素、单核细胞集落刺激因子等抗肿瘤细胞因子。研究亦证实 NDV 的溶瘤活性能够选择性在肿瘤细胞内复制而对正常细胞无作用,对人体是安全的^[12]。

本实验初步明确了 NDV 对体内、体外的急性单核细胞白血病细胞的增殖都有明显的抑制作用,使其可能成为白血病免疫治疗的新方法,但对其毒性及抗白血病的具体机制尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R, Ertel

C. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus [J]. Gene Ther, 1999, 6(1):63-73.

[2] Vigil A, Park MS, Martinez O, Chua MA, Xiao S, Cros JF, et al. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus [J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8285-8292.

[3] 刘一尘,程相朝,张春杰,程按春,张谦,李银聚,等. 新城疫病毒 HN 抗肿瘤机制研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32):14102,14134.

[4] Winick NJ, Carroll WL, Hunger SP. Childhood leukemia – new advances and challenges[J]. N Engl J Med, 2004, 351(6): 601-603.

[5] 王振义. 白血病和淋巴瘤的靶向免疫治疗[J]. 内科理论与实践, 2008, 3(2):69-75.

[6] Wendtner CM, Kofler DM, Mayr C, Bund D, Hallek M. The potential of gene transfer into primary B-CLL cells using recombinant virus vectors[J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(5): 897-904.

[7] 李银聚,吴庭才. 鸡新城疫病毒抗人肿瘤性疾病的分子机制[J]. 生物学通报, 2009, 44(6):13-14.

[8] 王学理,任林柱,李晓艳,王兴龙. 新城疫病毒 TL1 株 F、HN 蛋白基因共表达对细胞融合的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(10):968-970.

[9] Fabian Z, Csatory CM, Szeberenyi J, Csatory LK. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines[J]. J Virol, 2007, 81(6): 2817-2830.

[10] Estevez C, King D, Seal B, Yu Q. Evaluation of Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin-Neuraminidase protein of velogenic strains in the context of a mesogenic recombinant virus backbone[J]. Virus Res, 2007, 129(2): 182-190.

[11] Phuangsab A, Lorence RM, Reichard KW, Peeples ME, Walter RJ. Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration[J]. Cancer Lett, 2001, 172(1):27-36.

[12] Puhler F, Willuda J, Puhlmann J, Mumberg D, Romer-Oberdorfer A, Beier R. Generation of a recombinant oncolytic Newcastle disease virus and expression of a full IgG antibody from two transgenes [J]. Gene Ther, 2008, 15(5): 371-383.

(本文编辑:王庆红)