

成人 T 细胞白血病细胞靶向型水泡性口炎病毒的构建及应用 *

方心葵^{1, 2)} 王欣¹⁾ 孙涛^{1, 2)**}

(¹⁾上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; (²⁾上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要 目前肿瘤治疗主要使用放疗、药物化疗, 具有很大的毒、副作用, 研发肿瘤靶向性药物是未来发展趋势。成人 T 细胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)是一种由 HTLV-1 病毒引起的人恶性 CD4 T 淋巴细胞白血病, 目前尚无有效治疗方法。溶瘤性水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)是一种肿瘤治疗病毒载体, 利用 HIV-1 囊膜蛋白 gp160 对野生型 VSV 病毒进行假型化改造, 研制了具备人 CD4 受体靶向性的重组 VSV 病毒(VSV-ΔG-gp160G), 在对 ATL 病人肿瘤细胞进行的体外杀伤实验(*ex vivo*)中, 显示出良好的应用前景。

关键词 水泡性口炎病毒, 成人 T 细胞白血病, 病毒治疗
学科分类号 Q939.47

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00512

成人 T 淋巴细胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)是一种恶性 CD4 T 淋巴细胞肿瘤, 其细胞表面标志为 CD4+, CD25+, CD8-。1976年, 日本高月清首先报道成人 T 细胞白血病, 以后的流行病学调查发现, 日本西南部、加勒比海区域及中部非洲为高发流行区。ATL 已经证实由 HTLV-1 病毒感染引起。HTLV-1 具有传染性, 可通过乳汁母婴、性交和输血传播。在中国, 曾毅等^[1]对 28 个省、市、自治区进行人群血清流行病学调查, 发现 8 例 HTLV-1 抗体阳性者大都系日本人或与其有密切接触者, 1989 年, 吕联煌等^[2]在福建沿海地区发现了 HTLV-1 小流行区。

ATL 患者表现独特的临床病理学特征, 如皮肤损害, 高钙血症, 溶骨破坏, 肝、脾、淋巴结肿大, 乳酸脱氢酶(LDH)升高及出现特异的花瓣状核淋巴细胞等, 且血清 HTLV- I 抗体呈阳性。ATL 分为 4 种类型: 白血病样的急性型、淋巴细胞增生的淋巴瘤型、预后较好的慢性型和冒烟状态(隐袭型)。我国 ATL 的发病率占白血病患者比例不高, 但近年来也有一些报道^[3-4]。

目前治疗 ATL 的方法主要包括各种化疗和干扰素治疗, 但是效果均不明显, 迫切需要研制新的

治疗药物和方法。近年来, 一些具有选择性杀瘤能力的病毒, 如腺病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、水泡性口炎病毒、麻疹病毒等正成为一类有前途的肿瘤药物(virotherapy)。

水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)属弹状病毒科, 主要感染猪、牛和马等动物, 对人无致病性。基因工程改造的 VSV 病毒是疫苗和肿瘤治疗的良好载体^[5-9], 水泡性口炎病毒可感染各种类型的细胞, 具有非常广泛的细胞嗜性, 开发可识别专一受体的重组 VSV 对于病毒在靶器官/细胞的富集, 提高治疗效果乃至使用安全性均有重要意义。

由于 ATL 是 CD4 T 淋巴细胞转化后形成的肿瘤, I 型 HIV 感染宿主细胞时可特异性识别 CD4 受体, 然后引起病毒 gp120 蛋白构象发生改变, 继而与共受体如 CCR5、CXCR4 等结合, 并通过 gp41 亚基使病毒囊膜与宿主细胞膜融合, 从而完

* 上海市兽医生物技术重点实验室开放课题(KLAB201003)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-34207240, E-mail: tao.sun@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2010-09-30, 接受日期: 2010-12-28

成病毒侵入宿主细胞的过程^[7]。基于此, 我们设想敲除 VSV 的囊膜蛋白 G, 代之以 I 型 HIV 病毒囊膜蛋白 gp160, 构建特异杀伤 ATL 肿瘤细胞的重组 VSV。利用病毒挽救(Rescue)技术, 我们成功地制备了人 CD4 受体靶向型的重组 VSV 病毒(VSV-ΔG-gp160G), 在 ATL 和非 ATL 肿瘤细胞系进行的溶瘤实验结果表明, 该病毒可特异性地杀死 ATL 细胞。此外, VSV-ΔG-gp160G 对来自临床 ATL 病人的肿瘤细胞杀伤效果(*ex vivo*)大大超过改造前的野生型 VSV 病毒, 显示出一定的应用前景, 目前国内、外还无相关研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

HTLV-1 转化的 CD4+人 ATL 细胞系(SupT1、MT2 和 MT4)细胞均来自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC); CD4-的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、宫颈癌细胞 HeLa 和 293 细胞均由中国科学院上海细胞库提供; BHK-21 细胞和稳定表达人 CD4 蛋白的 HeLa 细胞(HeLa-CD4)由上海交通大学农业与生物学院保存。两例临床确诊为急性成人 T 淋巴细胞白血病患者的 CD4+细胞分离自病人外周血单个核细胞, 来自美国迈阿密大学肿瘤中心, 正常人 CD4T 淋巴细胞也来自迈阿密大学肿瘤中心。

1.2 方法

1.2.1 pVSV-ΔG-gp160G 质粒构建。VSV 病毒挽救所需质粒: pBS-G、pBS-N、pBS-P、pBS-L 和克隆 VSV Indiana 株全长序列的质粒 pVSV-XN2 由上海交通大学农业与生物学院保存; HIV-1 gp160 基因以 pNL4-3 质粒为模板, 用高保真 PCR 扩增(Invitrogen 公司), 该基因表达的蛋白质可识别 CD4 和共受体 CCR5, 由于 gp160 蛋白整合入 VSV 病毒需要保留 VSV 的胞内区段, 因此利用 overlapping PCR 方法, 我们构建了包含 gp160 基因的胞外区段和跨膜区段(750 个氨基酸)以及 VSV G 基因的胞内区段(29 个氨基酸)的融合基因, 引物设计如表 1 所示, 首先用 P1 与 P2 引物扩增 gp160 1~750 氨基酸区段, 并用胶回收试剂盒回收, P3 和 P4 引物扩增 VSV G 胞内段并回收; 按比例混合以上 2 片段作为模板, 再用 P1 和 P4 引物进行第二轮 PCR, 从而得到所需的融合基因——gp160G, 其 5'和 3'端分别含有 *Mlu* I 和 *Xho* I 酶切位点, 经双酶切后克隆到 pVSV-XN2 质粒, 替换掉 VSV G

基因, 得到质粒为 pVSV-ΔG-gp160G, 如图 1 所示。P1, P2 分别为扩增 gp160 的胞外区段和跨膜区段(750 个氨基酸)上、下游引物; P3, P4 分别为扩增 VSV G 的羧基端 29 个氨基酸区段的上、下游引物。

Table 1 Primers for construction of HIV-1 gp160 and VSV G fusion gene (HIV gp160G)

Primer	Sequence
P1	5' ccgacgcgtatgagagtgaaggagaagta 3' (Underlined was the <i>Mlu</i> I digestion site)
P2	5' atggataccaactcgggatccgttcactaa 3'
P3	5' ttagtgaacggatcccagtggtatccat 3'
P4	5' ccggcctagggttactttccaagtcgggtc 3' (Underlined was the <i>Xho</i> I digestion site)

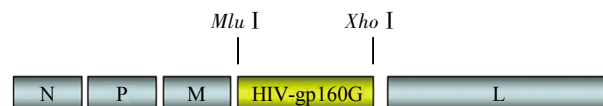


Fig. 1 Genomic structure of pVSV-ΔG-gp160G

gp160G gene was cloned into restriction sites between *Mlu* I and *Xho* I of pVSV-XN2 plasmid, with original VSV glycoprotein gene (G) deleted. All the start/stop signals for viral gene transcription were still kept. N: Nucleoprotein, P: Phosphoprotein, M: Matrix protein, L: RNA polymerase.

1.2.2 重组病毒的构建及鉴定。

a. VSV-ΔG-gp160G 病毒的构建。VSV-ΔG-gp160G 的挽救按文献[8]所述方法进行。表达 T7 RNA 聚合酶的痘病毒 vTF 7-3 感染 BHK21 细胞, 接种剂量为 MOI=5, 感染 1 h, 细胞用 PBS 缓冲液漂洗 1 次, 制备质粒转染混合液: pBS-N, P, L, G 以及 pVSV-ΔG-gp160G, 按 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)所述的方法进行质粒转染, 4 h 后更换新鲜的含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 48 h 后, 吸取上清, 用 0.2 μm 的滤膜滤去残存的痘病毒, 并将滤过液转到瞬时表达 VSV G 蛋白的 BHK21 细胞(称为 BHK-G 细胞), 观察细胞病变, 如无明显病变, 则吸取上清, 再于 BHK-G 细胞上盲传一代, 48 h 后如仍无病变则弃去, 如出现病变(细胞皱缩, 大量浮起), 则回收上清, 冻于 -70℃, 准备进行鉴定。此时的病毒仍保留了 BHK-G 细胞反式(*in trans*)提供的 VSV G 蛋白, 因此仍非真正假型化病毒, 称为 G-VSV-ΔG-gp160G, 我们用该病毒感染常规 BHK21 细胞后, 得到所需假型化病毒 VSV-ΔG-gp160G。

b. Western blotting 鉴定重组病毒. BHK21 细胞感染 G-VSV- Δ G-gp160G 病毒 24 h 后, 细胞用 RIPA 缓冲液(含有 1 mmol/L PMSF 和蛋白酶抑制剂)裂解, 收集裂解液后 10 000 r/min 离心 10 min, 去沉淀后收集上清, 并经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜, 转移后的膜用含 5%脱脂奶的 PBS 缓冲液封闭 1 h, 经 PBS 缓冲液洗 3 遍后用 1:1 000 稀释的驴抗 HIV-1 gp120 抗体(Cat# sc-17459, Santa Cruz Biotechnology) 4℃ 下孵育过夜, 二抗为羊抗驴 HRP 标记抗体; 为进一步验证 gp160G 蛋白表达的正确性, 我们还用识别 VSV G 羧基端表位的小鼠单克隆抗体(Sigma, product number V5507)进行检测, 一抗工作液浓度为 1:50 000, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 工作液浓度为 1:3 000, 目的蛋白的检测均用 ECL 试剂盒进行.

c. VSV- Δ G-gp160G 特异性识别 CD4 受体检测. 为了验证 VSV- Δ G-gp160G 病毒是否具备 CD4 受体靶向性, 我们用稳定表达 CD4 的 HeLa-CD4 细胞进行验证, 以 HeLa 细胞为对照, HeLa 细胞自身表达 CCR5 受体, 具体步骤: 分别用 VSV- Δ G-gp160G 病毒接种以上细胞, MOI 为 0.1, 48 h 后在倒置显微镜下观察细胞病变(CPE).

d. VSV- Δ G-gp160G 病毒生长特性鉴定. 我们采用一步生长曲线鉴定 VSV- Δ G-gp160G 在 ATL 细胞中生长特性, 以野生型病毒 VSV-GFP 为对照, 简述如下: SupT1 细胞分别用 VSV- Δ G-gp160G 或 VSV-GFP 接种, MOI 为 3, 感染 2 h 后用 PBS 离心, 洗涤各 3 次, 培养于 RPMI1640 完全培养基, 分种于 12 孔板, 分别在感染后 12、24、36 和 48 h 收集细胞离心上清, 病毒滴度用空斑实验进行定量.

1.2.3 VSV- Δ G-gp160G 病毒特异性溶瘤效果.

a. 我们以 CD4⁺ ATL 细胞系 SupT1、MT2 和 MT4 及 CD4⁻肿瘤细胞 MDA-MB-231、HeLa 以及 293 细胞为实验对象, 用 VSV- Δ G-gp160G 感染, 以 VSV-GFP 作为对照, 感染剂量为 MOI 0.1, 感染 24 h 后观察细胞是否存在特征性病变, 并用台盼蓝染色法检测细胞死亡率.

b. VSV- Δ G-gp160G 病毒对急性 ATL 患者外周血肿瘤细胞的杀伤实验. VSV- Δ G-gp160G 病毒体外杀伤 ATL 患者肿瘤细胞实验以 VSV-GFP 为对照病毒, 分别接种 ATL 患者和正常人 CD4 细胞, 接种浓度为 MOI=0.5, 按 2×10^5 个/孔分种到 24 孔培养板, 48 h 后相差显微镜下观察 CPE, 并用台

盼蓝染色法检测细胞死亡率, 从而确定病毒杀伤肿瘤细胞的效果以及对正常细胞的安全性, 收集上清, 空斑实验测定病毒滴度.

2 实验结果

2.1 VSV- Δ G-gp160G 病毒的构建和生物学活性鉴定

VSV- Δ G-gp160G 病毒挽救较之常规方法略有改进, 重要的是须将表达 VSV G 蛋白的表达质粒 pBS-G 与其他的辅助质粒(pBS-N, P, L)和 pVSV-XN2 一起共转染宿主细胞 BHK21, 包装出的病毒首先通过表达 G 蛋白的 BHK-G 细胞扩增, 以提高病毒的包装效率. 但病毒囊膜中含有 VSV G 蛋白, 不是我们所需的假型化病毒, 将该病毒再去感染 BHK-21 细胞, 收取上清, 这样, 病毒粒子将只含有 gp160G 蛋白, 被完全假型化. 病毒感染细胞后的 Western-blotting 实验表明, 用 HIV-1 gp120 特异性抗体鉴定时, 可检测到 2 条带, 分别是 gp160G (~150 ku) 和 gp120 蛋白(~120 ku) (图 2a), 而用识别 VSV G 抗体则可检测到 gp160G 和 gp41G 2 条条带(图 2b). 综上所述, HIV-1 gp160G 蛋白进行了正确的表达和加工.

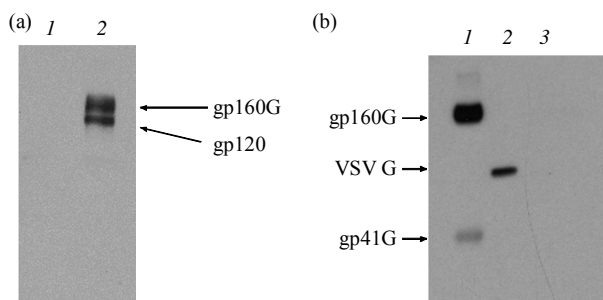


Fig. 2 Western blotting identification of gp160G

(a) Expression of gp160G was detected with donkey anti-gp120 HIV-1 antibody. In line 1(PBS treated cells), no signal was detected in infected cells; whereas in line 2, two bands (150 ku and 120 ku) were found which represented gp160G and gp120. (b) Expression of gp160G was also approved by anti VSV G tail antibody, in line 1, two bands (~150 ku, ~35 ku) were identified, which represented gp160G and gp41G; whereas in line 2, ~60 ku band for VSV G could be found in VSV-GFP infected cells. No band found in mock control.

为了鉴定 VSV- Δ G-gp160G 病毒的生物学特性, 我们利用稳定表达人 CD4 的 HeLa-CD4 细胞, 并以 HeLa 细胞为对照进行验证. 实验结果表明, VSV- Δ G-gp160G 感染 HeLa-CD4 细胞中出现了典

型的合胞体病变(图 3 a), 而 HeLa 细胞无类似病变(图 3b), 表明 VSV-ΔG-gp160G 感染细胞特异性依赖 CD4 受体. 一步生长曲线比较则表明, 假型化改造影响了 VSV 的复制效率, 感染 SupT1 细胞 12 h 后, VSV-GFP 滴度就可达到最高峰约 10^7 PFU/ml, 而 VSV-ΔG-gp160G 需要 24 h 方可达到最高滴度, 且只有约 10^3 PFU/ml, 如图 4 所示.

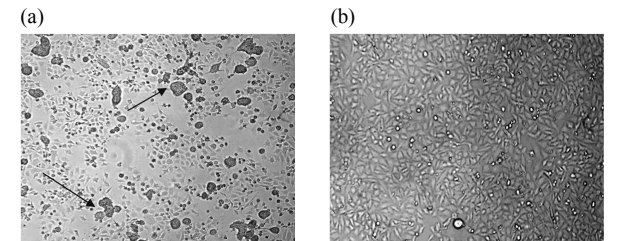


Fig. 3 Infection specificity of VSV-ΔG-gp160G in HeLa-CD4 cells
HeLa-CD4 cells were infected with VSV-ΔG-gp160G at MOI of 0.1, typical big syncytium was definite caused by gp160G (Figure 3a, Showed by tick). No syncytium was found in HeLa cells(Figure b), which clearly indicated that VSV-gp160G specifically infected host cells through CD4 receptor.

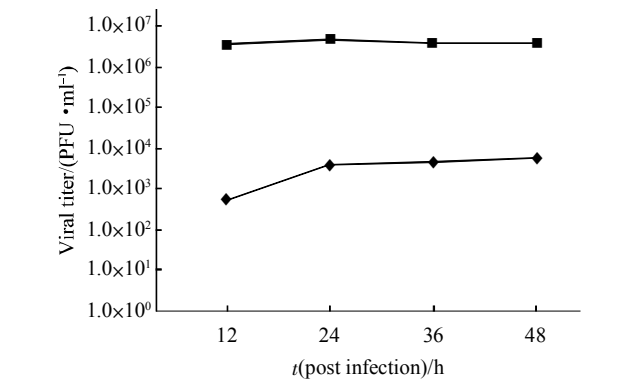


Fig. 4 Replication character of VSV-ΔG-gp160G
In the one step growth curve, VSV-ΔG-gp160G could arrive at the highest titer at around 24 h post inoculation of SupT1, whereas VSV-GFP titer could arrive at the highest at around 12 h post infection. The highest titer of VSV-GFP was around 3 logs higher than that of VSV-ΔG-gp160G. ◆—◆: VSV-ΔG-gp160G; ■—■: VSV-GFP.

2.2 VSV-ΔG-gp160G 病毒具有靶向性溶瘤效力
我们以 HTLV-1 转化的 CD4+ ATL 细胞系 (SupT1、MT2 和 MT4) 以及 CD4- 肿瘤细胞系 (MDA-MB-231、HeLa 和 293 细胞) 进行实验, 结果表明, VSV-ΔG-gp160G 病毒只感染 ATL 细胞, 并形成大的合胞体(图 5a 中箭头所示), 而不感染 CD4- 的肿瘤细胞(图 5b), 存在感染特异性. 与之

对应的是, VSV-GFP 既可感染 ATL 细胞也可感染非 ATL 瘤细胞, 无感染特异性(图 6a, b).

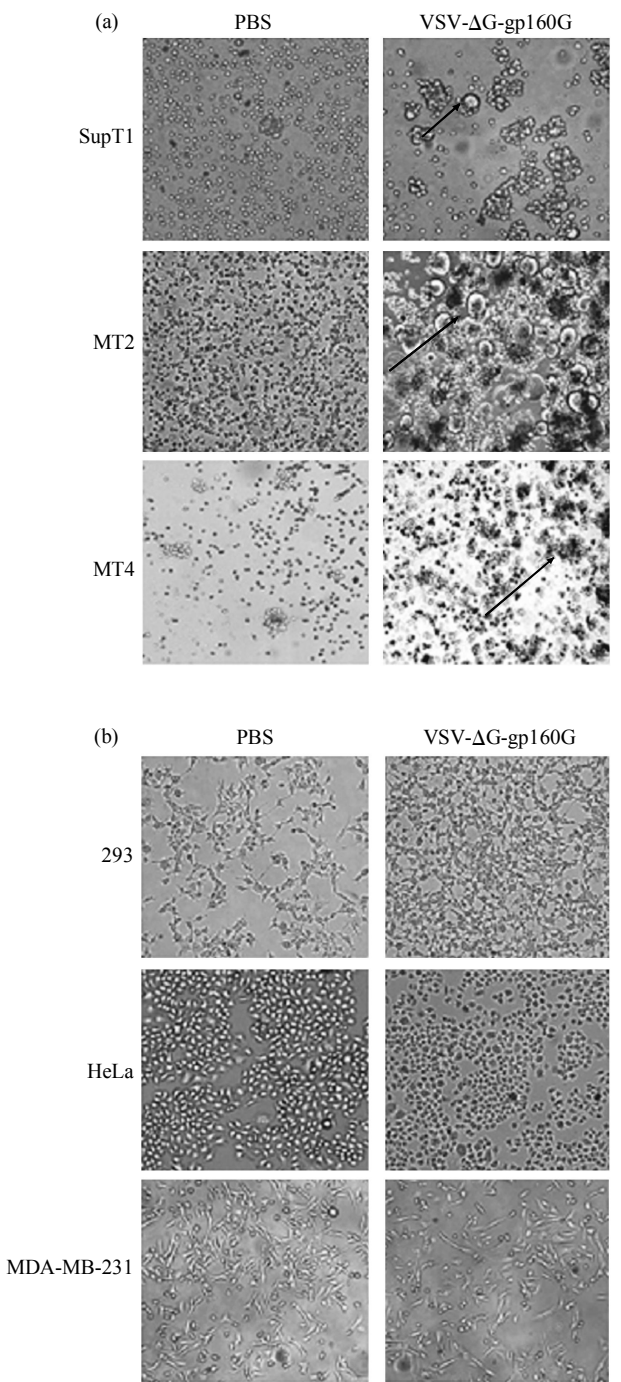


Fig. 5 Infection of VSV-ΔG-gp160G in ATL or non-ATL cell lines
(a) SupT1, MT2, MT4 were infected or mock infected with virus at MOI of 0.5. 24 h post inoculation, big syncytia could be found in all of the ATL cells which are CD4 and CCR5 positive. However, in mock infected ATL cells, no CPE can be detected. (b) In non ATL cells, no CPE could be found with or without VSV-ΔG-gp160G infection.

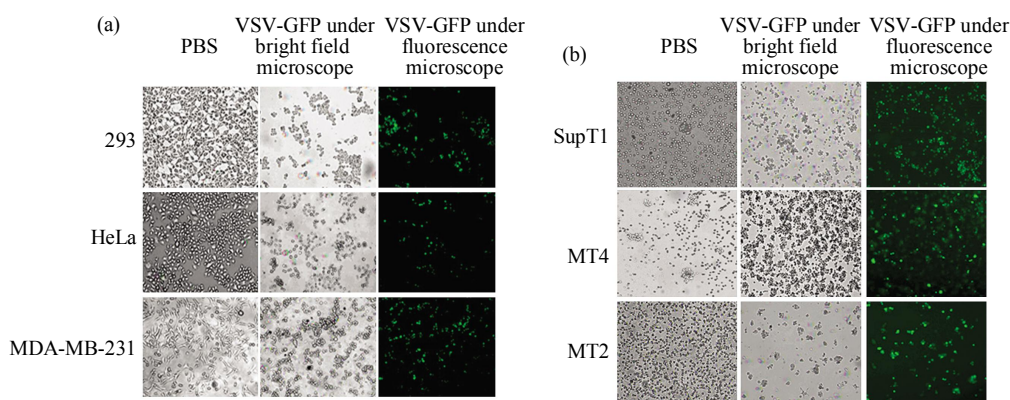


Fig. 6 Infection of VSV-GFP in ATL cells and non-ATL cells

(a) Non-ATL cells were infected with VSV-GFP at MOI of 0.5, 24 h post infection, CPE were found with GFP fluorescence detected, no CPE was detected in mock infection cells. (b) ATL cells were infected or mock infected with VSV-GFP at MOI of 0.5. 24 h post inoculation, CPE could also be found in all of the ATL cells with GFP fluorescence also detected.

细胞毒性结果表明, VSV- Δ G-gp160G 接种 ATL 细胞死亡率为 60%~80%, 与 VSV-GFP 接近 (图 7a). 对非 ATL 细胞, VSV- Δ G-gp160G 杀伤率小于 5%, 与 PBS 实验组无显著区别, 而 VSV-GFP

仍然达到 70%(图 7b), 进一步显示 VSV- Δ G-gp160G 病毒具备了特异针对 CD4+肿瘤细胞的良好溶瘤效果.

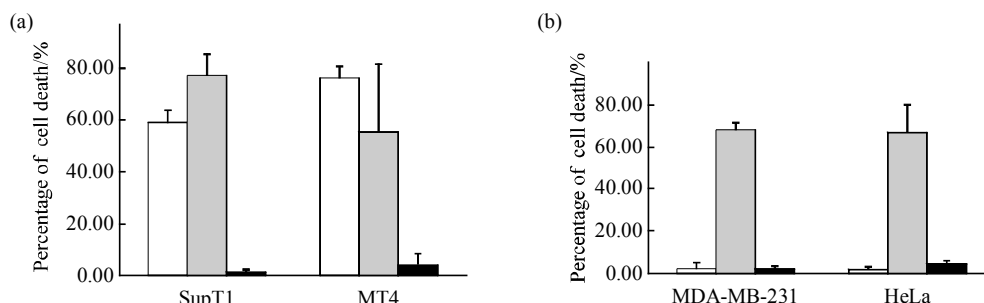


Fig. 7 Cytotoxicity studies of VSV- Δ G-gp160G or VSV-GFP against ATL cells or non-ATL cells

(a) ATL cells. □: VSV- Δ G-gp160G; ▒: VSV-GFP; ■: PBS. (b) Non ATL cells. □: VSV- Δ G-gp160G; ▒: VSV-GFP; ■: Mock infection.

2.3 Ex Vivo 实验表明 VSV- Δ G-gp160G 可有效杀伤 ATL 临床肿瘤细胞

来自急性 ATL 患者和正常人外周血细胞经磁珠分选后得到的 CD4 阳性细胞, 分别用 VSV- Δ G-gp160G 和 VSV-GFP 感染, 48 h 后, VSV- Δ G-gp160G 感染的 ATL 细胞大量聚团、死亡, 形成巨大的合胞体(图 8a 箭头所示), 而正常人 T 细胞无明显病变(图 8a). ATL 患者的肿瘤细胞亦可被 VSV-GFP 感染, 在荧光显微镜下可观察到 ATL 细胞中的 GFP 蛋白表达, 而正常人 CD4 T 细胞则无病变(图 8b). PBS 处理细胞无病变.

细胞毒性试验表明, VSV- Δ G-gp160G 可致

ATL 患者细胞死亡率超过 70%(图 9a), 远高于 VSV-GFP 的约 35%(图 9b). 在正常 CD4 T 细胞组中, VSV- Δ G-gp160G 可致约 10%细胞死亡, 略大于 VSV-GFP(5%). 细胞上清病毒滴度检测显示, ATL 患者细胞中, VSV- Δ G-gp160G 和 VSV-GFP 的滴度分别可达 10^3 PFU/ml 和 10^5 PFU/ml, 表明 2 种病毒均可在其中复制. 但在正常 T 细胞中, VSV- Δ G-gp160G 感染孔中无法检测到病毒的滴度, 而 VSV-GFP 的滴度也很低, 约 10 PFU/ml, 如图 9c. 综上 *ex vivo* 实验结果, VSV- Δ G-gp160 具有较好的治疗效果和安全性.

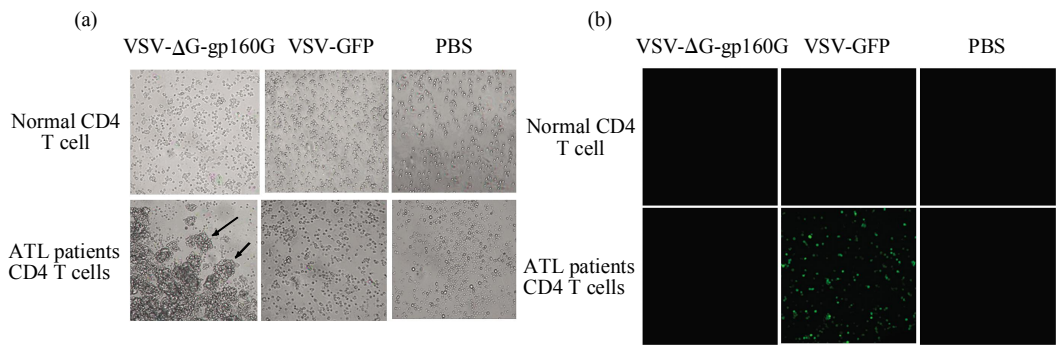


Fig. 8 Infection of VSV within cells from acute ATL patients or normal CD4 T cells

(a) Under bright field microscope, typical CPE with big syncytia could be seen in VSV-ΔG-gp160G infected cells from ATL patients, whereas no CPE could be identified in normal CD4 T cells. PBS mock infected cells indicated no CPE in both the ATL or normal cells. (b) Under fluorescence microscope, the GFP expression could be detected in VSV-GFP infected ATL cells, and no GFP expression detected in normal T cells.

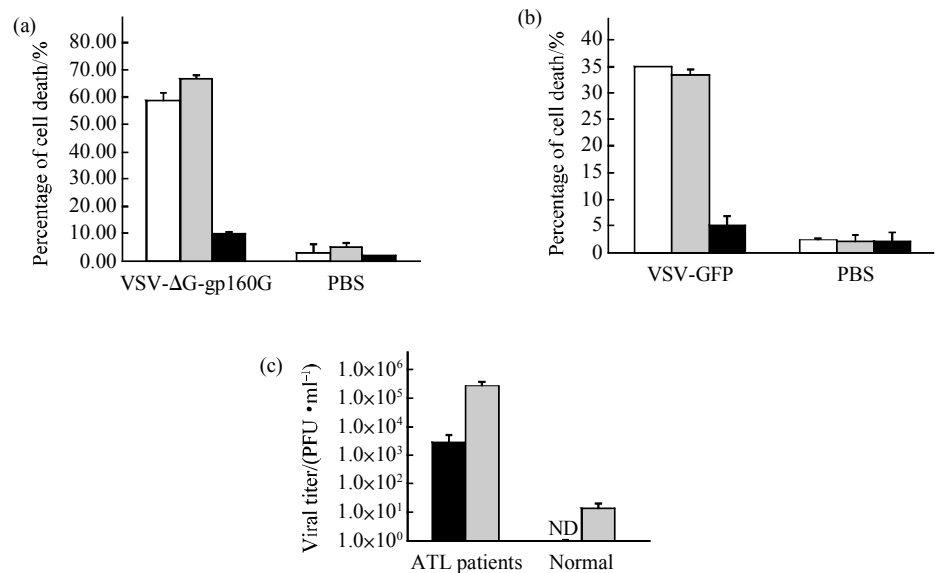


Fig. 9 Cytotoxicity of VSVs against ATL cells from acute patients or normal CD4 T cells

(a) Cytotoxicity of VSV-ΔG-gp160G against cells. (b) Cytotoxicity of VSV-GFP against cells. □: 1# ATL patients; ▨: 2# ATL patients; ■: Normal. (c) Viral titer of VSVs in infected ATL or normal CD4 T cells. ■: VSV-ΔG-gp160G; ▨: VSV-GFP; ND: Not detected.

3 讨 论

传统的肿瘤治疗方法如放疗、化疗由于缺乏特异性，具有很大的毒、副作用，后期甚至病人不是死于癌症而是死于药物治疗，因此开发特异性强、低副作用的新一代抗癌药物是一个十分急迫的任务。

溶瘤病毒，如腺病毒、单纯疱疹病毒以及 VSV 等，天然具有或经基因工程改造后可具备选择性杀瘤能力，是一类有前途的抗肿瘤药物，近年

来逐步受到广泛重视。VSV 病毒载体的优势在于：

a. 对人无致病性，比较安全；b. 作为一种 RNA 病毒，不会引起宿主细胞的转化；c. 具有天然选择性杀瘤特性，这是由于 VSV 对 I 型干扰素抗病毒作用很敏感，所以无法在具有完全干扰素功能的正常组织细胞中复制，而肿瘤细胞通常缺失 I 型干扰素产生或应答能力，不能有效抑制 VSV 在其中的复制，因而可被 VSV 杀死。近期的一些结果还表明，许多肿瘤细胞缺失正常细胞 PKR 途径，无法有效抑制病毒 mRNA 的翻译也是病毒得以在肿

瘤细胞中复制的原因之一。总之, 几种机制综合作用的结果使得 VSV 具备了选择性杀伤肿瘤细胞的特性, 成为一个有应用前景的溶瘤病毒。1996 年, John Rose 课题组建立了 VSV 的挽救(Rescue)技术, 成功利用基因工程方法人工构建重组 VSV 病毒^[9]。目前, VSV 病毒基因组中已可插入多个外源基因同时进行有效表达, 为研制基于不同生物学机理的抗肿瘤病毒载体提供了可能。

VSV 是一种囊膜病毒, 其基因组是一条单链负义 RNA 分子, 长度约为 11 kb, 由 5 个基因组成, 分别编码病毒的核衣壳蛋白(N)、磷酸化蛋白(P)、基质蛋白(M)、囊膜蛋白(G)和病毒 RNA 复制酶(L), 其中 VSV G 蛋白负责识别病毒受体并介导病毒入侵宿主细胞, 它决定了病毒的嗜性, 目前病毒的受体并不明确, 推测是细胞膜上的一些磷脂类分子, 存在于各类细胞表面^[10], 这使得 VSV 具有广泛的宿主。作为一种溶瘤病毒, 理想治疗模式是通过静脉给药后, 病毒可以富集在肿瘤部位, 专一杀死肿瘤细胞而不对正常细胞产生毒性。鉴于 VSV 具有广泛细胞嗜性, 这可能会对病毒的安全性、抗癌有效性产生影响。有报道表明, 当静脉注射大剂量的 VSV 后, 部分小鼠和灵长动物会出现神经症状, 如后肢麻痹等^[11]。因此提高病毒针对肿瘤细胞的靶向性, 对于提高其疗效以及安全性都将有很大帮助。

目前, 提高病毒载体安全性、有效性主要有以下策略: a. 假型化改造(pseudotyping), 通过改变病毒天然嗜性, 使之专一地识别某个肿瘤抗原, 如 CD38、CD20、CEA 等^[12-13]。采用这种方法, 能有效地提高病毒治疗肿瘤的疗效, 减低其毒性。b. 利用特定细胞中活化的启动子, 如在肿瘤细胞中具有高活性的端粒酶基因启动子(telomerase promoter)去控制病毒复制必需基因, 使得病毒只能在肿瘤细胞中复制, 而在正常细胞中不复制, 从而达到减毒目的^[14], 此即所谓条件复制型病毒(conditional replication virus)。c. 利用组织特异性表达的 microRNA 分子为减低病毒的毒性提供了新途径。MicroRNA 是一类具有组织表达特异性的转录后调控分子, 不同的 microRNA 在不同组织中的分布存在差异, 基于此, Russell 等^[15]利用肌肉组织特异性 miR133a 识别序列开发的柯萨奇病毒载体, 去除野生型病毒对肌肉组织的毒性。

本实验采取对 VSV 进行假型化改造的策略, 将 VSV 的 G 蛋白剔除, 代之以 HIV 的囊膜蛋

白 -gp160, 使 VSV 丧失其所具有的广泛细胞嗜性, 转而专一性识别 CD4 受体。此外, 由于 VSV 对 I 型干扰素作用的敏感性, 理论上该病毒将无法在正常 CD4 T 细胞内复制, 而只能选择性杀死 ATL 肿瘤细胞。

为了验证这一设想, 我们构建了 CD4 受体靶向型 VSV 病毒, 在各种肿瘤细胞系进行的实验中, 该病毒显示了高度的受体专一性: 即通过 CD4 受体感染细胞。虽然相比野生型 VSV 病毒, 新病毒的毒复制能力弱化了, 但仍可非常有效地杀死各类 ATL 肿瘤细胞, 而对 CD4-肿瘤细胞, 如乳腺癌、宫颈癌细胞等则不表现出毒性。在此基础上, 我们进一步评估了病毒对临床成人 T 细胞白血病细胞的治疗效果及对正常细胞的安全性, 这是因为 ATL 细胞系是经人工筛选、驯化的肿瘤细胞, 其恶性程度高而且均一, 这与直接来自患者的细胞样品存在很大不同, 如: 临床肿瘤细胞恶性程度并不均一, 有些细胞 I 型干扰素途径、PKR 途径缺失可能并不完全, 这都会影响到病毒的杀瘤效果。我们对来自两例临床病人的细胞进行初步实验表明: VSV-ΔG-gp160G 病毒显示出强大的溶瘤能力, 远高于 VSV-GFP, 这可能部分与 HIV 囊膜蛋白具有的融合作用有关。安全性方面, VSV-ΔG-gp160G 未表现出明显毒性, 这是因为正常细胞所具备的 I 型干扰素、PKR 信号传导途径可以行使有效抑制病毒作用。

综上, VSV-ΔG-gp160G 显示了较好的安全性以及对 ATL 肿瘤细胞的选择性杀伤效力, 具有进一步应用的前景, 我们将在免疫缺陷鼠如 SCID 鼠中建立 ATL 肿瘤动物模型, 进行体内实验, 以进一步检验病毒治疗效果。

参 考 文 献

- [1] 曾 毅, 蓝祥英. 中国 28 省市自治区 T 细胞白血病病毒抗体 (HTLV- I)血清流行病学调查. 中华血液学杂志, 1986, 7(8): 471
Zeng Y, Lan X Y. Chin J Hematology, 1986, 7(8): 471
- [2] 吕联煌, 叶榆生. 福建省沿海地区人类 T 淋巴细胞白血病病毒小流行区的发现. 中华血液学杂志, 1989, 10(5): 225-228
Lü L H, Ye Y S. Chin J Hematology, 1989, 10(5): 225-228
- [3] 沈晓梅, 杨晓红, 王云娟, 等. 云南 HTLV-1 成人 T 细胞白血病 1 例. 白血病, 1999, 8(2): 81-81
Shen X M, Yang X H, Wang Y J, et al. J Leukemia Lymphoma, 1999, 8(2): 81-81
- [4] 董彭春, 蒋玉玲. HTLV- I 相关的成人 T 细胞白血病 / 淋巴瘤 3 例. 白血病, 1997, 6(2): 98-100
Dong P C, Jiang Y L. J Leukemia Lymphoma, 1997, 6(2): 98-100

- [5] Majid A M, Ezelle H, Shah S, *et al.* Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J Virol*, 2006, **80**(14): 6993–7008
- [6] Shinozaki K, Ebert O, Suriawinata A, *et al.* Prophylactic alpha interferon treatment increases the therapeutic index of oncolytic vesicular stomatitis virus virotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *J Virol*, 2005, **79** (21): 13705–13713
- [7] Paul R C, Áine M. HIV-1 receptors and cell tropism. *Bri Med Bull*, 2001, **58**: 43–59
- [8] Schnell M J, Johnson J E, Buonocore L, *et al.* Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell*, 1997, **90**(5): 849–857
- [9] Schnell M J, Buonocore L, Kretzschmar E, *et al.* Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, **15**, **93**(21): 11359–11365
- [10] Schlegel R T, Ralka S T, Willingham M C, *et al.* Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV binding site?. *Cell*, 1983, **32**(2): 639–646
- [11] Bi Z, Barna M, Komatsu T, *et al.* Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol*, 1995, **69**(10): 6466–6472
- [12] Nakamura T, Peng K W, Harvey M, *et al.* Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(2): 209–214
- [13] Peng K W, Donovan K A, Schneider U, *et al.* Oncolytic measles viruses displaying a single-chain antibody against CD38, a myeloma cell marker. *Blood*, 2003, **101**(7): 2557–2562
- [14] Huang T G, Savontaus M J, Shinozaki K, *et al.* Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther*, 2003, **10**(15): 1241–1247
- [15] Greiner S, Russell S J. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med*, 2008, **14**(11): 1278–1283

Construction and Application of Vesicular Stomatitis Virus Retargeting at Adult T Cell Leukemia*

FANG Xin-Kui^{1,2)}, WANG Xin¹⁾, SUN Tao^{1,2)**}

⁽¹⁾*School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;*

⁽²⁾*Shanghai Municipal Veterinary Key Laboratory, Shanghai 200240, China)*

Abstract Oncolytic viruses like measles virus, reovirus, adenovirus are promising alternatives in tumor treatment. Vesicular stomatitis virus(VSV) is a potent reagent for tumor virotherapy and has been tried in many types of tumor models. The selectivity of VSV replication in tumor cells has been regarded due to the defective of IFN signaling in tumor cells compared with normal cells. It has been reported that 80% of the tumor cells are type I IFN signaling defective, which makes oncolytic VSV a promising method for tumor therapy. Recent analysis has demonstrated that defective control of mRNA translation initiation also plays a crucial role in cell permissiveness to VSV. Translation control downstream of PKR activation, frequently dysregulated in many transformed cells, can cooperate with attenuated IFN antiviral activity to facilitated VSV oncolysis. The problem with VSV oncolysis included that cleaning of viruses by host immune system, so the virus can not replicate effectively in tumors, the other is that the viruses can not spread effectively in the tumor tissue because of the tumor microenvironment, but one of the biggest problem is its safety. It was reported that when animals were injected with high dose of wild type VSV, neurotoxicity like hind limb paralysis occurred. There are kinds of strategies to improve safety for oncolytic viruses. Development of tumor antigen targeting VSV is an ideal alternative to improve safety and efficacy of the vector. Adult T cell leukemia (ATL) is a kind of human CD4 T cell tumor caused by HTLV-1, with phenotype of CD4+, CD3+, CD25+ and also CCR5+, CXCR4+. All of the present treatments only arrive partial success, which is underlying the urgency for new therapeutic drugs. Based on these rationales, it was hypothesized that the HIV gp160 pseudotyped VSV (VSV-ΔG-gp160G) could be targeted at ATL cells, because entry of HIV-1 into human CD4 T cell depends on recognition of human CD4 and some co-receptors like CCR5 or CXCR4 and cause fusion between viral and cellular membranes. In the studies, with gp160 cytoplasmic tail replaced with that of VSV G, the

HIV-1 envelope protein could be successfully incorporated into VSV. In one step replication curve, VSV-ΔG-gp160G can arrive at the highest titer at around 24 h post infection and the VSV-GFP titer did that at around 12 h post infection, and the titer of VSV-GFP was higher than that of VSV-gp160G, all these indicated that VSV-ΔG-gp160G has been attenuated after pseudotyping. To testify if VSV-ΔG-gp160G could kill ATL tumor cells efficiently, in particular, specifically. HTLV-1 transformed ATL tumor cells and non-ATL cells were infected with VSV-ΔG-gp160G or VSV-GFP for control respectively. The data indicated that the novel VSV could kill CD4 positive ATL cells selectively and potently, but not replicated in CD4 negative non ATL cells. This virus will be promising in treating adult T cell leukemia and lymphoma as well.

Key words vesicular stomatitis virus, adult T cell leukemia, virotherapy

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00512

*This work was supported by a grant from Opening grant of Shanghai Municipal Key Laboratory of Veterinary Biotechnology(KLAB 201003).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-34207240, E-mail: tao.sun@sjtu.edu.cn

Received: September 30, 2010 Accepted: December 28, 2010