

重组腺病毒 TOA02 在荷瘤裸小鼠体内的生物分布研究[△]

胡卫^{1*}, 张苗旋¹, 郑崛村², 王玲², 沈富兵^{2#}(1. 武汉大学医院, 武汉 430072; 2. 成都医学院检验医学院, 成都 610065)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)37-3475-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.37.06

摘要 目的: 研究重组腺病毒 TOA02 在荷瘤裸小鼠体内的生物分布。方法: 皮下接种人肺癌细胞系 A549 建立荷瘤裸小鼠模型, 分为对照组(生理氯化钠溶液, $n=6$)和实验组(3×10^{10} copies/ml TOA02, $n=18$), 每只小鼠瘤内注射给药 50 μ l, 隔日注射 1 次, 共 3 次。首次给药后第 11、18、36 天取小鼠体内肿瘤和血液、睾丸/子宫、附睾/卵巢、脾、肾、肝、肺、心脏、骨髓、大脑, 每个时间点 6 只, 用定量聚合酶链式反应法检测各肿瘤、血液和组织脏器中 TOA02 的腺病毒壳粒六邻体(Hexon)DNA copies。结果: 对照组荷瘤裸小鼠体内各肿瘤、血液和组织脏器中均未检出 TOA02 的 Hexon DNA copies。实验组荷瘤裸小鼠各时间点睾丸/子宫、附睾/卵巢、骨髓、大脑中均未检出 TOA02 的 Hexon DNA copies; 其中第 11 天肿瘤内 TOA02 的 Hexon DNA copies [(2 240 541 \pm 1 692) copies/100 μ g genome DNA] 均明显高于血液和其他组织脏器; 第 18 天肿瘤的 Hexon DNA copies 最高 [(13 120 285 \pm 88 210) copies/100 μ g genome DNA], 在组织脏器内的分布量依次为肝 > 肾 > 脾 > 肺 > 心脏; 第 36 天时除肿瘤内尚能检出 Hexon DNA copies [(336 453 \pm 23 415) copies/100 μ g genome DNA] 外, 血液和其他脏器均未检出。结论: 瘤内注射 TOA02 可在肿瘤内大量增殖, 并播散入肝、肾、脾、肺、心脏等血流丰富的脏器, 但各脏器组织中的病毒体会逐渐被清除。

关键词 重组腺病毒; TOA02; 荷瘤裸小鼠; 生物分布

Study on the Biodistribution of Recombinant Adenovirus TOA02 in Tumor-bearing Nude Mice

HU Wei¹, ZHANG Miao-xuan¹, ZHENG Jue-cun², WANG Ling², SHEN Fu-bing² (1. Hospital of Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. School of Clinical Laboratory, Chengdu Medical College, Chengdu 610065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the biodistribution of recombinant adenovirus TOA02 in tumor-bearing nude mice. METHODS: The tumor-bearing nude mice model was established by hypodermic inoculation of human lung carcinoma A549 cell line, and then divided into control group (sodium chloride solution, $n=6$) and trial group (3×10^{10} copies/ml TOA02, $n=18$). Each mice was given intratumor injection of drugs 50 μ l every 2 days for 3 times. Tumor, blood, testis/uterus, epididymis/ovarium, spleen, kidney, liver, lung, heart, marrow and brain of mice were collected at 11th, 18th and 36th day after first medication; those were collected from 6 mice at each time point. Hexon DNA copy number of TOA02 in tumor, blood and tissue sample was detected using PCR. RESULTS: Hexon DNA copies number of TOA02 was not found in tumor, blood and tissue sample of control group; that was also not detected in testis/uterus, epididymis/ovarium, marrow and brain of mice in trial group. At 11th day, Hexon DNA copies numbers of TOA02 in tumors [(2 240 541 \pm 1 692) copies/100 μ g genome DNA] were significantly higher than in blood and other organs. At 18th day, Hexon DNA copies number of TOA02 in tumors was the highest [(13 120 285 \pm 88 210) copies/100 μ g genome DNA]. The distribution of Hexon DNA copies number was in descending order as: liver > kidney > spleen > lung > heart. DNA copies number was detected in tumor at 36th day [(336 453 \pm 23 415) copies/100 μ g genome DNA], but not found in blood and other organs. CONCLUSIONS: Intratumoral injection of TOA02 can reproduce to large numbers in tumors and disseminate to the organs with rich blood flowing, such as liver, kidney, spleen, lung and heart, etc. However, the virus would be gradually reduced and lead to disappear.

KEYWORDS Recombinant adenovirus; TOA02; Tumor-bearing nude mice; Biodistribution

溶瘤腺病毒抗肿瘤疗法是一种具有较高临床应用前景的新型抗肿瘤模式^[1], 其原理在于改造腺病毒载体, 使其可以在肿瘤细胞中优先复制, 而大量复制的腺病毒最终将破坏宿主细胞。这种特异性复制能力的获得是靠不同的策略达到的,

[△] 基金项目: 四川省高等学校成果转化重大培育项目资助(No. 14CZ0023)

* 副主任医师, 硕士。研究方向: 肿瘤疾病的诊治。电话: 027-68764427。E-mail: wiwine@sina.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 免疫药理。电话: 028-627395227。E-mail: 13881902257@163.com

如修饰病毒的包膜蛋白使之高效感染肿瘤细胞^[2]; 掺入肿瘤启动子序列以控制病毒基因的表达和清除病毒在正常细胞中复制所必需的基因^[3-4]。到目前为止, 已经有成系列的条件性溶瘤腺病毒在进行临床前和临床试验^[5]。

本课题组构建的重组腺病毒 TOA02 即为条件性复制溶瘤腺病毒^[6], 主要用于肝癌、肺癌、前列腺癌以及头颈部癌等多种肿瘤的抗肿瘤治疗, 对正常细胞没有影响, 是一种新型的抗肿瘤基因治疗制品。笔者将开展 TOA02 的生物分布实验, 以把握 TOA02 在体内各组织脏器的分布情况和代谢动力学特点, 并考察 TOA02 是否扩散到生殖腺和非靶组织中, 以便为预测

毒性靶器官提供直接证据。鉴于TOA02只能在人类肿瘤中高度复制,笔者选择接种人肺癌细胞A549的荷瘤裸小鼠作为实验载体,通过瘤内注射药物,观察TOA02在体内的分布情况。本实验采用定量聚合酶链式反应(PCR)检测法,选用腺病毒壳粒六邻体(Hexon)基因作为检测指标。

1 材料

1.1 仪器

CO₂培养箱[立德泰勃(上海)科学仪器有限公司];倒置显微镜(德国Leica公司);FTC2000实时荧光定量PCR仪(加拿大枫岭公司);超声波组织匀浆器(德国IEKA公司);ABI PRISM 7000型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 病毒与试剂

TOA02(本课题组自制,批号:20100518,滴度:1.8×10¹² copies/ml, -80℃贮藏);新生小牛血清(成都哈里生物工程有限公司);胰蛋白酶(美国Gibco公司);组织DNA提取试剂盒、实时定量PCR反应试剂[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 移植瘤细胞系和病毒株

人肺癌细胞系A549、巨细胞病毒株AD169、I型单纯疱疹病毒株KOS、II型单纯疱疹病毒株HG252和风疹病毒株M33由华西医院移植免疫学实验室提供,均为ATCC来源。

1.4 动物

BALB/c裸小鼠,5周龄,♀♂各半,体质量16~18g,上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号为:SCXK(沪)2010-0004。

2 方法

2.1 肿瘤模型构建

取30只裸小鼠,♀♂各半,头背部皮下接种体外培养的A549细胞,接种量为每鼠2×10⁶个细胞/0.2ml。待肿瘤长至150~300mm³时(约3~4周),选择24只荷瘤裸小鼠,随即分为实验组(18只)和对照组(6只)。

2.2 给药与取样

根据临床拟用剂量设置实验组荷瘤裸小鼠给予TOA02 3×10¹⁰ copies/ml,每只50μl,瘤体内注射,隔日注射1次,共3次;对照组荷瘤裸小鼠给予等体积生理氯化钠溶液。于首次给药后第11、18、36天各取实验组6只荷瘤裸小鼠(♀♂各半),腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,取血并摘取组织脏器,顺序依次为:血液、睾丸/子宫、附睾/卵巢、脾脏、肾脏、肝脏、肺脏、心脏、肿瘤、骨髓、大脑;对照组仅末次取样,均于-80℃下保存。

2.3 样品处理与测定

2.3.1 DNA提取。分别取肿瘤及各脏器组织5~10mg,剪成约1mm的碎块,加入180μl裂解缓冲液,漩涡混匀后,加20μl蛋白酶K漩涡混匀,置于55℃孵育3h,于37℃过夜,然后按试剂盒说明书分别抽提总DNA。

2.3.2 引物的设计与合成。Hexon基因是腺病毒的特异和保守序列,故以其为靶基因。使用Primer Express v 3.0软件,以Hexon基因为模板设计引物及探针。为了避免DNA的污染,上下游引物均设计为跨过内含子。Hexon基因上游引物:5'-CTTCGATGATGCCGAGTG-3';下游引物:5'-GGGCT-CAGGTACTCCGAGG-3';探针:5'-FAM-TTACATGCACATC-TCGGGCCAGGAC-TAMRA-3'。引物(19bp)与TaqMan探针由宝生物工程(大连)有限公司合成,并经基于蛋白质和DNA数据库的相似性检索工具(BLAST)的相似性比较,期望值E值小于0.01。开盖前短暂离心,加入经焦碳酸二乙酯(DEPC)处

理的重蒸水(ddH₂O)稀释至浓度为10⁻² nmol/μl, -20℃储存备用。

2.3.3 定量PCR扩增。总体积为30μl,含10×Buffer缓冲液3μl、0.025 mol/L MgCl₂ 3μl、0.01 mol/L dNTP 0.9μl、0.01 mol/L上游引物1μl、0.01 mol/L下游引物1μl、0.01 mol/L TaqMan探针1μl、Taq DNA Polymerase(5 U/μl) 0.3μl、焦碳酸二乙酯处理过的水14.8μl、DNA模板5μl。扩增条件为:94℃ 1min;94℃ 10s,55℃ 30s,72℃ 1min,45个循环。在PCR反应过程中,设定无DNA样品的空白管为阴性对照。

2.3.4 引物的特异性检查。分别将AD169、KOS、HG252、M33病毒和TOA02进行定量PCR扩增,并使用Primer Express v 3.0软件对上下游引物的退火温度(T_m值)和GC含量、发夹结构、错配现象、引物二聚体等进行分析,评价引物的特异性。

2.3.5 标准曲线绘制。用TOA02标准模板样品(1×10⁸ copies/ml)的DNA模板按10倍梯度进行稀释配制成1×10⁸、1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴、1×10³、1×10² copies/ml 7个浓度梯度,制成标准系列模板,自每个稀释模板中取样5μl,分别加至30μl的反应体系中,进行实时荧光定量PCR。每个稀释模板做5个复孔,根据获得的扩增循环数(c_t值),拟合标准曲线。

2.3.6 精密密度检测。将TOA02标准模板样品(1×10⁸ copies/ml)的DNA模板用生理氯化钠溶液稀释为1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵ copies/ml 3个浓度梯度,每一浓度样品做5个复孔。在样品配制的第1天,对样品进行检测并计算每一浓度样品的RSD,以考察标准曲线试验内精密密度;分别在第1、3、5天检测并计算样品的RSD,以考察试验间精密密度。

2.3.7 待测组织目的Hexon DNA copies的测定。将组织提取的DNA样品各取5μl,加至反应体系中,按“2.3.3”项下条件进行PCR扩增。绘制各样品的动力学曲线并获得相应c_t值,通过标准曲线获取各待测样品中TOA02的Hexon DNA copies。在PCR反应过程中,设定无DNA样品的空白管为阴性对照。

2.4 数据处理

用SPSS 12软件对数据进行直线回归、方差分析和相关性分析,P<0.01表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 引物的特异性

经检测,引物对AD169、KOS、HG252、M33病毒均无扩增作用,而对TOA02具有较高的特异性,依据碱基互补配对原则,Primer Express v 3.0软件显示上游引物、下游引物无非特异性扩增产物和引物二聚体形成,上游引物:T_m为54.5℃、GC占57.8%,下游引物:T_m为59.4℃、GC占68.4%。因此,该引物具有较高的特异性。

3.2 TOA02标准模板的荧光定量PCR标准曲线

经动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值(Threshold)时的c_t值,即1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴、1×10³ copies/ml的TOA02标准模板样品的c_t值分别为16.42、20.71、24.76、27.95、30.82,将其与标准模板初始copies的对数值作图,得到该样品的标准曲线。依据拟合的标准曲线可知,TOA02标准模板的荧光定量PCR的线性范围为1×10³~1×10⁷ copies/ml,最低定量浓度为1×10³ copies/ml,回归系数大于0.96(r²=0.97),拟合满意。c_t值每减少1个循环,对应的模板DNA增加倍数(Y值)的计算公式为:Y=10^{1/Δc_t},Δc_t=靶DNA每稀释10倍时平均增加的c_t值。本检测的Y=1.8。

3.3 精密密度试验结果

TOA02 标准曲线具有良好的试验内和试验间精密性, 试验内 RSD 为 1.88%~3.58% ($n=5$), 试验间 RSD 为 1.98%~4.68% ($n=5$)。

3.4 待测组织目的 Hexon DNA copies 的测定结果

结果显示, 对照组荷瘤裸小鼠体内各肿瘤、血液和组织脏器中均未检出 TOA02 的 Hexon DNA copies。实验组首次给药后第 11 天, 肿瘤内 TOA02 的 Hexon DNA copies 明显高于血液

表 1 2 组荷瘤裸小鼠体内各肿瘤、血液和组织脏器中 Hexon DNA copies (组织: copies/100 μg genome DNA, 血液: copies/ml, $n=6$)
Tab 1 DNA copy numbers of Hexon in tumor, blood and organs of tumor-bearing nude mice in 2 groups (tissue: copies/100 μg genome DNA, blood: copies/ml, $n=6$)

分组	时间, d	肿瘤	血液	肝脏	肾脏	脾脏	肺脏	心脏
对照组	36	-	-	-	-	-	-	-
实验组	11	2 240 541 \pm 1 692	114.47 \pm 81.61 [#]	59 614 \pm 2 204 [#]	446 147 \pm 6 382 [#]	31 108 \pm 28 601 [#]	10 247 \pm 8 643 [#]	1 039 \pm 831 [#]
	18	13 120 285 \pm 88 210 [*]	215.23 \pm 1.08 ^{**}	36 607 \pm 2 620 ^{**}	985 \pm 624 ^{**}	1 814 \pm 843 ^{**}	8 143 \pm 846 ^{**}	612 \pm 385 ^{**}
	36	336 453 \pm 23 415 [*]	-	-	-	-	-	-

与 11 d 比较: ^{*} $P < 0.01$; 与肿瘤比较: [#] $P < 0.01$

vs. 11 d: ^{*} $P < 0.01$; vs. tumor: [#] $P < 0.01$

4 讨论

生物分布研究是载体类转基因药物临床前安全性评价的重要内容, 其目的在于研究载体药物在体内的分布情况及代谢动力学特点, 以考察该载体药物是否扩散到非靶组织中, 特别是生殖腺, 并从而预测药物的毒性靶器官^[7-8]。目前常用的载体类药物的生物分布检测技术是实时定量 PCR, 其能对初始模板序列进行准确定量, 具有较高的灵敏度和特异性, 而且不需要进行 PCR 后续操作^[9]。选择基因组中特异和保守的靶基因作为载体的生物标签是定量 PCR 的重要特征。本研究选用 Hexon 基因作为定量 PCR 的靶基因, 以其 copies 来表示病毒颗粒数。Hexon 蛋白是腺病毒的主要结构蛋白, 其与五邻体蛋白和纤维蛋白一起构成核衣壳, 决定着病毒粒子的大小, 且带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇^[10-11]。

生物分布实验结果显示, TOA02 在肿瘤组织中能良好复制, 病毒载体的浓度由 11 d (第 3 次瘤内给药后) 的 (2 240 541 \pm 1 692) copies/100 μg genome DNA 增加到 18 d 的 (13 120 285 \pm 88 210) copies/100 μg genome DNA, 36 d 后仍有 (336 453 \pm 23 415) copies/100 μg genome DNA 的高含量。由于肿瘤细胞中有大量病毒体增殖, 病毒体随之播散入血并进入全身各组织中。但笔者发现, 这种分布是机会性和一过性的, 因为病毒体是分布在血液循环较为丰富的脏器, 如肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、心脏等, 而骨髓、大脑、生殖腺等并没有分布; 而且, 随着时间推移, 在肿瘤中病毒含量降低时, 滞留在这些脏器中的病毒体也被清除了。由此可见, TOA02 在体内应用, 特别是瘤体给药是安全的。这主要与 TOA02 的作用机制有关, 因为 TOA02 是端粒酶活性和 Rb 途径缺失特异性的, 特别是其启动子上的 E2F-1 结合位点的作用加强了 hTERT 启动子载体在 hTERT (+)、Rb(-) 肿瘤细胞中启动作用, 而在 hTERT (-)、Rb(+) 的正常细胞中表现出启动抑制作用, 因而使得其在正常细胞中几乎不能复制^[6]。

由于只有在端粒酶高活性或 Rb 途径缺失的细胞中才能复制和增殖, TOA02 在非肿瘤模型的正常动物体内的组织细胞中不能增殖, 静脉给予后会很快被机体免疫系统清除, 应该不会有可检测到的生物分布; 但其能否在组织增生活跃的脏器如生殖腺中复制和滞留, 有待进一步通过 TOA02 在恒河猴中

和其他的组织脏器, 其中第 18 天肿瘤的 Hexon DNA copies 最高, 分布量依次为肝脏 > 肾脏 > 脾脏 > 肺脏 > 心脏; 第 18 天后, 肿瘤组织中 TOA02 的 Hexon DNA copies 增高, 而血液及各脏器组织的生物分布却在逐渐减少; 至第 36 天, 除肿瘤组织尚能检出外, 血液和其他脏器均未检出; 在实验过程中骨髓、大脑、睾丸、附睾、卵巢和子宫等组织中均未检出 TOA02 的 Hexon DNA copies, 结果见表 1 (表中“-”表示未检出)。

的生物分布实验来证实。

参考文献

- [1] Jiang H, McCormick F, Lang FF, et al. Oncolytic adenoviruses as antiglioma agents[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(5): 697.
- [2] 扈江伟, 王军, 徐曼, 等. 重组腺病毒载体 Ad5-hTRX-EGFP 的构建及其表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(3): 744.
- [3] Ulasov IV, Rivera AA, Nettelbeck DM, et al. An oncolytic adenoviral vector carrying the tyrosinase promoter for glioma gene therapy[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1 177.
- [4] Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo[J]. *Oncogene*, 2000, 19(1): 2.
- [5] 邓洪新, 田聆, 魏于全. 基因治疗的发展现状、问题和展望[J]. *生命科学*, 2005, 17(3): 196.
- [6] Lei N, Shen FB, Chang JH, et al. An oncolytic adenovirus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor shows improved specificity and efficacy for treating human solid tumors[J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(1): 33.
- [7] 苗玉发, 王欣, 霍艳, 等. 病毒载体疫苗非临床生物分布研究的关键点[J]. *中国药事*, 2010, 24(7): 655.
- [8] Gonin P, Gaillard C. Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(Suppl 1): S98.
- [9] Wilkening S, Bader A. Quantitative real time polymerase chain reaction methodical analysis and mathematical model[J]. *J Biomol Tech*, 2004, 15(2): 107.
- [10] Heise CC, Williams A, Olesch J, et al. Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects[J]. *Cancer Gene Ther*, 1999, 6(6): 499.
- [11] 王鹏, 曲章义, 张鸿彦, 等. 人腺病毒六邻体蛋白保守区抗原性分析[J]. *国际免疫学杂志*, 2007, 30(3): 135.

(收稿日期: 2014-06-06 修回日期: 2014-07-11)