

VAI TRÒ CỦA HỆ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT TRONG ĐIỀU TRỊ KHỐI U CỦA VACCINIA VIRUS GLV-1h68

Nguyễn Hoàng Dương^{1,*}, Phạm Việt Cường^{1,2}, Nguyễn Thị Kim Cúc²,
Nanhai G. Chen³, Aladar A. Szalay³

¹Viện Nghiên cứu khoa học Miền Trung - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

³Viện Genelux, Trung tâm khoa học và công nghệ San Diego, California, Mỹ

*Email: nhduong.misr@gmail.com

Đến Tòa soạn: 3/9/2014; Chấp nhận đăng: 30/7/2015

TÓM TẮT

GLV-1h68 là một vaccinia virus tái tổ hợp nhược độc mang ba gen ngoại lai mã hóa cho *Renilla luciferase*-GFP protein dung hợp (*ruc-gfp*), β -galactosidase (*lacZ*), và β -glucuronidase (*gusA*) lần lượt được chèn vào các vị trí *F14.5L*, *J2R* (mã hóa cho thymidine kinase) và *A56R* (mã hóa cho hemagglutinin) của hệ gen vaccinia virus LIVP. GLV-1h68 đã được chứng minh là một tác nhân sinh học có khả năng đặc hiệu định hướng khối u, nhân lên và phá hủy nhiều dòng tế bào ung thư của người. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kết hợp 4 loại kháng sinh để tạm thời loại bỏ hầu hết vi sinh vật đường ruột của những lô chuột được gây u thực nghiệm với dòng tế bào ung thư phổi của người (A549), tiếp đó chuột mang khối u được chữa trị bằng GLV-1h68. Kết quả cho thấy ở khối u của những lô chuột được dùng kháng sinh, kích thước khối u nhỏ hơn, đồng thời số lượng virus nhân lên nhiều hơn so với lô đối chứng không sử dụng kháng sinh. Phát hiện này mở ra một hướng nghiên cứu mới trong việc sử dụng kháng sinh kết hợp với virus để nâng cao hiệu quả điều trị ung thư.

Từ khóa: vi sinh vật đường ruột, Vaccinia virus, hệ miễn dịch.

1. MỞ ĐẦU

Liệu pháp dùng oncolytic virus (virus diệt tế bào ung thư bằng ly giải) là một phương pháp mới, có triển vọng trong việc sử dụng virus để điều trị nhiều loại ung thư. GLV-1h68 là một vaccinia virus tái tổ hợp nhược độc được bắt nguồn từ chủng LIVP [1]. Trên nhiều mô hình ở động vật, GLV-1h68 đã chứng minh có khả năng đặc hiệu hướng đích (khối u), nhân lên và phá hủy nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau có nguồn gốc từ người ở cấp độ *in vitro* và *in vivo* [2] như ung thư vú, ung thư màng phổi, ung thư tụy, ung thư hạch lympho, hay ung thư tuyến tiền liệt ở giai đoạn thứ phát hay di căn. Gần đây việc thử nghiệm GLV-1h68 trên những bệnh nhân ung thư đã hoàn thành giai đoạn 1 (phase 1), bước đầu chứng minh sự nhân lên đặc hiệu của virus trong khối u, đồng thời không phát hiện những phản ứng phụ không mong muốn do virus gây ra [3].

Vi sinh vật (VSV) đường ruột chiếm một vai trò rất quan trọng trong việc điều hòa miễn dịch của cơ thể để chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn hay virus. Ước tính có đến 100 nghìn tỉ VSV tồn tại trong hệ đường ruột của người trưởng thành. Điều đó bắt buộc hệ miễn dịch phải luôn làm việc để duy trì sự cân bằng cho quần thể VSV. Việc tiêu diệt các VSV đường ruột bằng kháng sinh đã ảnh hưởng tới sự trưởng thành và chức năng của các tế bào miễn dịch như tế bào B, tế bào giết tự nhiên (NK, natural killer cells), tế bào tua (Dc, dendritic cells) hay các đại thực bào (Mac, macrophages) [1]. Hơn thế nữa, hệ vi sinh vật đường ruột còn liên quan tới quá trình sinh ra và trưởng thành của tế bào T-CD4 hay T-CD8 khi có sự xâm nhiễm của virus cúm [1]. Một trong những khó khăn của liệu pháp dùng virus để chữa trị ung thư là việc di chuyển của virus tới khối u mà không bị tiêu diệt bởi các tế bào miễn dịch [4]. Số lượng virus trong khối u càng lớn thì hiệu quả tiêu diệt khối u càng cao. Bởi vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng tiếp cận và nhân lên trong khối u của virus khi các vi sinh vật đường ruột bị tiêu diệt bởi tác động tổng hợp của 4 loại kháng sinh khác nhau.

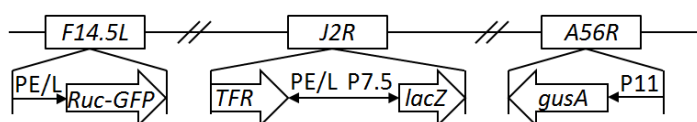
2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Kháng sinh

4 loại kháng sinh gồm ampicillin, neomycin, metronidazole và vancomycin được cung cấp bởi Sigma. Chuột được dùng hỗn hợp của 4 loại kháng sinh bằng hai cách. Cách thứ nhất đưa trực tiếp vào dạ dày trong 5 ngày đầu tiên (10 mg/mỗi loại, được hòa trong 200 μ l 1x PBS). Cách hai bổ sung vào nước uống (1 g/L mỗi loại, trừ vancomycin được dùng với nồng độ 500 mg/L).

2.2. Vaccinia virus

Vaccinia virus chủng GLV-1h68 [1], được bắt nguồn từ chủng dùng làm vaccin để phòng bệnh đậu mùa L1VP. Virus tái tổ hợp này mang ba gen ngoại lai mã hóa cho *Renilla luciferase*-GFP protein dung hợp (*ruc-gfp*), β -galactosidase (*lacZ*), và β -glucuronidase (*gusA*) lần lượt được chèn vào các vị trí *F14.5L*, *J2R* (mã hóa cho thymidine kinase) và *A56R* (mã hóa cho hemagglutinin) của genome vật chủ (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ minh họa cấu trúc genome của vaccinia virus GLV-1h68.

Các gen marker *ruc-GFP*, *lacZ* và *gusA* được chèn vào hệ gen virus chủng L1VP dưới sự điều khiển của lần lượt của 3 promoter khác nhau là vaccinia synthetic early/late promoter (PE/L), vaccinia early promoter (P7.5) và vaccinia late promoter (P11).

2.3. Mô hình chuột và việc cấy ghép khối u

Dòng chuột trần (NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1*tm) được cung cấp bởi hãng Harlan. Đây là dòng chuột được làm yếu tuyến ức, cho phép cấy ghép các dòng tế bào ung thư. 5×10^6 tế bào ung thư vú (A459) được tiêm vào dưới da, chân sau bên phải để tạo khối u thực nghiệm. 100 %

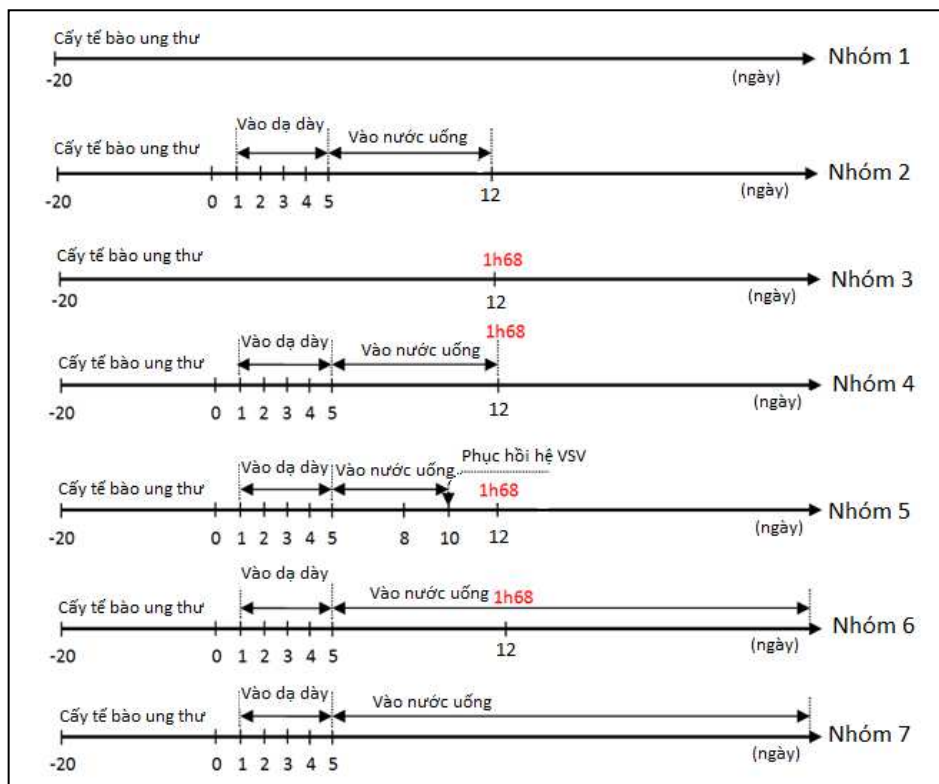
chuột xuất hiện khối u với kích thước khoảng 200 mm³ sau 3 tuần cấy ghép. Thể tích khối u được tính theo công thức sau:

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = [D \times (C-5) \times R]/2$$

D: chiều dài khối u, C: chiều cao khối u, R: chiều rộng khối u.

2.4. Thiết kế thí nghiệm

Các lô chuột thí nghiệm được chia làm 7 nhóm (Hình 2). Nhóm 3, 4, 5, 6 mỗi nhóm có 8 con. Nhóm 1, 2, 7 mỗi nhóm có 4 con. Tất cả chuột thí nghiệm được gây u thực nghiệm bằng việc cấy ghép dòng tế bào ung thư phổi của người. Sau 3 tuần, các nhóm chỉ định được điều trị bằng hỗn hợp 4 loại kháng sinh ampicillin, neomycin, metronidazole và vancomycin, trực tiếp vào dạ dày và thông qua nước uống. Khi hầu hết VSV đường ruột đã bị tiêu diệt bởi kháng sinh, chuột từ các nhóm 3, 4, 5, 6 được tiêm một liều virus GLV-1h68. Kích thước khối u và sự thay đổi trọng lượng chuột được đo hàng tuần.



Hình 2. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật đường ruột bằng kháng sinh và chữa trị khối u với vaccinia virus GLV-1h68. 5×10^6 tế bào ung thư vú (A459) được tiêm vào dưới da, chân phải phía sau của chuột để tạo khối u thực nghiệm. Sau 21 ngày, chuột từ các nhóm 2, 4, 5, 6, 7 được điều trị bằng kháng sinh. 5 ngày đầu, mỗi ngày chuột được dùng một liều kháng sinh trực tiếp vào dạ dày. Tiếp đó kháng sinh được bổ sung vào nước uống, nước có kháng sinh được thay sau mỗi 4 ngày. Ngày thứ 10, chuột ở nhóm 5 được bổ sung VSV đường ruột được phân lập từ phân của chuột ở nhóm khỏe mạnh. Ngày thứ 12, chuột ở các nhóm 3, 4, 5, 6 được tiêm 1 liều 5×10^6 PFU GLV-1h68 vào mạch máu dưới mắt. Chuột được theo dõi hàng ngày và sự thay đổi kích thước khối u được đo hàng tuần bằng thước chuẩn.

2.5. Xác định số lượng vi sinh vật đường ruột

Vi sinh vật (VSV) đường ruột được tính dựa trên số lượng khuẩn lạc hình thành sau nuôi cấy, được phân lập từ phân của chuột thí nghiệm. Phân của chuột được thu nhận trong điều kiện vô trùng, cân và pha loãng trong 1x PBS. Dây pha loãng theo cấp số 10 trong đệm PBS được cấy trải trên môi trường thạch HBI (Heart-brain infusion agar, BD) có bổ sung máu cừu (20 ml máu /100 ml môi trường) trong môi trường kỵ khí ở 37 °C (BBL™ GasPak Anaerobic and CO2 Indicators, BD). Đếm số lượng khuẩn lạc hình thành sau 2 ngày nuôi cấy.

2.6. Xác định số lượng virus trong khối u và các cơ quan

Sau bảy ngày tiêm virus, chuột được mổ để lấy khối u và các cơ quan như gan, tim, thận, phổi và não. Chúng được cân và cho vào các ống MagnaBead (Roche) trong đệm PBS có bổ sung chất ức chế protease (Mini complete protease inhibitor, Roche). Khối u và các cơ quan được đồng nhất bằng máy MagNA lyser (Roche) 6500 rpm trong 30 giây. Mẫu đồng nhất được làm đông/tan 3 lần để phá tế bào. Dịch nội chứa virus được thu lại nhờ ly tâm ở 6000 rpm trong 10 phút. Số lượng virus được xác định bằng phương pháp dung giải tế bào (plaque assay) [1].

2.7. Đo cường độ phát quang (luminescence)

Khả năng nhân lên của virus trong khối u có thể được đo gián tiếp thông qua cường độ biểu hiện của marker sinh học luciferase (*Ruc*) đã được gắn vào hệ gen của vaccinia virus. 6 ngày sau khi virus được tiêm vào chuột có mang khối u, 100 µl cơ chất coelenterazine trong PBS (1 µg/ml) được tiêm vào mạch máu, tiếp đó chuột được gây mê bằng isoflurane và đo cường độ luminescence thông qua hệ thống chụp *in vivo* của hãng Carestream (USA). Kết quả được xử lý bằng phần mềm Carestream MI.

2.8. Xác định số lượng các loại tế bào miễn dịch bằng flow cytometry

Số lượng các loại tế bào miễn dịch (tế bào B, NK, Dc, và monocyte) ở máu của chuột sau 7 ngày tiêm virus ở nhóm 3, 4, 5 (n = 3) được phân tích bằng phương pháp flow cytometry. Theo đó 0,3 ml máu lấy từ mỗi con chuột, các tế bào hồng cầu được loại bỏ bằng đệm ly giải hồng cầu (red blood cell lysis buffer, BD). Các tế bào bạch cầu được tinh sạch và chuyển sang lần lượt 3 ống chuẩn bị trước có chứa hỗn hợp các kháng thể đặc hiệu với các cụm biệt hóa kháng nguyên (Cluster of differentiation) của từng nhóm tế bào miễn dịch (400.000 tế bào / ống) (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần các loại kháng nguyên trong mỗi ống đặc hiệu cho từng loại tế bào miễn dịch.

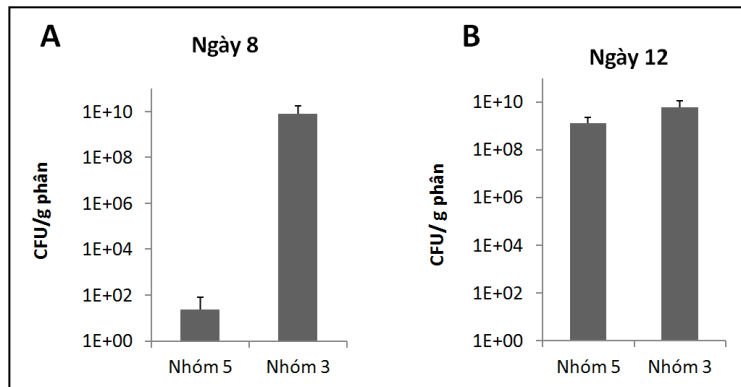
Laser	Cụm biệt hóa kháng nguyên			
	Argon	Argon	HeNE	HeNE
Các loại huỳnh quang được dùng để gắn vào kháng thể	PE	PerCp-Cy5.5	APC	APC-Cy7
Ống#1 (kháng nguyên đặc hiệu Mac, Mon)	IA-IE	F4/80	CXCR4	CD11b
Ống#2 (kháng nguyên đặc hiệu Dc)	IA-IE	CD80	DC205	CD11c
Ống#3 (kháng nguyên đặc hiệu NK, B)	DX5 (CD49b)	NKp46	CD19	

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ưc chế sinh trưởng của hệ VSV đường ruột bằng kháng sinh

Sử dụng hỗn hợp của 4 loại kháng sinh là ampicillin, neomycin, metronidazole và vancomycin. Đây là nhóm chất kháng sinh có khả năng ức chế sinh trưởng của hầu hết các nhóm VSV Gram âm, Gram dương bằng nhiều cơ chế tác động khác nhau trong quá trình hình thành, sinh trưởng và phát triển của VSV. Các nhóm nghiên cứu của Ganai [5] và Lucas [1] cũng đã công bố việc sử dụng tổ hợp kháng sinh này có khả năng ức chế hiệu quả sự sinh trưởng của hầu hết các VSV đường ruột. Sau 5 ngày liên tiếp cho kháng sinh trực tiếp vào dạ dày, và tiếp đó kháng sinh được hòa tan vào nước uống, ở ngày thứ 8 sinh trưởng của VSV đã hầu hết bị ức chế (Hình 3, A). Chỉ có khoảng 25 CFU/g phân lập được ở nhóm sử dụng kháng sinh, trong khi ở nhóm đối chứng có tới $8,5 \times 10^9$ CFU/g. Điều đó chứng tỏ việc sử dụng kháng sinh theo phác đồ trên đã ức chế thành công sự sinh trưởng của hệ VSV đường ruột ở chuột thí nghiệm.

Ở ngày thứ 10, chuột ở nhóm 5 cho ngừng sử dụng kháng sinh, đồng thời VSV phân lập từ phân ở nhóm đối chứng không sử dụng kháng sinh (nhóm 3) được bổ sung trực tiếp vào dạ dày của chuột ở nhóm 5. Sau 2 ngày (ngày thứ 12), số lượng VSV đường ruột ở nhóm này đã được phục hồi gần bằng với nhóm đối chứng (nhóm 3) (Hình 3, B). Mục đích của việc phục hồi hệ VSV đường ruột ở nhóm 5 là tạo ra một nhóm đối chứng cho nhóm 3. Nếu kết quả phân tích các loại tế bào miễn dịch sau này có sự khác biệt giữa nhóm 3 và nhóm 5, thì đây là do tác động của kháng sinh chứ không phải do tác động của hệ VSV, đó là mục đích xem xét chính của nghiên cứu này.

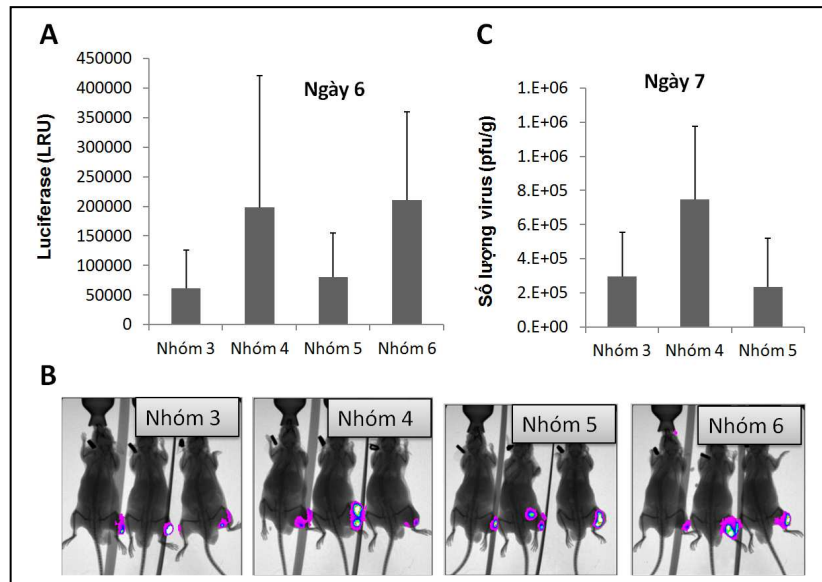


Hình 3. Tác động của việc sử dụng kháng sinh tới sự phát triển của hệ VSV đường ruột. (A) VSV bị ức chế sau 8 ngày dùng kháng sinh (nhóm 5). (B) tái phục hồi sự phát triển của VSV. Ngày thứ 10 ngừng sử dụng kháng sinh ở nhóm 5, đồng thời VSV đường ruột thu từ nhóm 3 (không dùng kháng sinh) được bổ sung trực tiếp vào dạ dày của những con chuột ở nhóm 5. Sau 2 ngày phát triển số lượng VSV thu được đã tương đương với nhóm đối chứng.

3.2. Ảnh hưởng tích cực của việc dùng kháng sinh lên khả năng nhân lên của virus trong khối u

Liệu pháp dùng virus để điều trị ung thư được nghiên cứu mạnh vào những năm 1980 hiện nay có nhiều nhóm nghiên cứu sử dụng nhiều loại virus khác nhau như adenovirus, vaccinia virus, lentivirus, herpes virus v.v. nhưng chủ yếu chỉ dừng lại ở bước thử nghiệm lâm sàng [6],

chỉ duy nhất một sản phẩm có nguồn gốc từ adenovirus đã được chấp thuận ở thị trường Trung Quốc [7]. Một trong những trở ngại lớn nhất cho việc dùng virus để điều trị ung thư là khả năng tiếp cận, nhân lên đặc hiệu trong khối u. Để tiêu diệt khối u, virus dùng tổng hợp nhiều cơ chế khác nhau như trực tiếp nhân lên và phá vỡ tế bào ung thư (oncolysis), kích ứng hệ miễn dịch, thay đổi môi trường bên trong khối u (microenvironment) [8]. Tuy nhiên oncolysis vẫn được cho là một cơ chế quan trọng nhất quyết định hiệu quả tiêu diệt khối u.



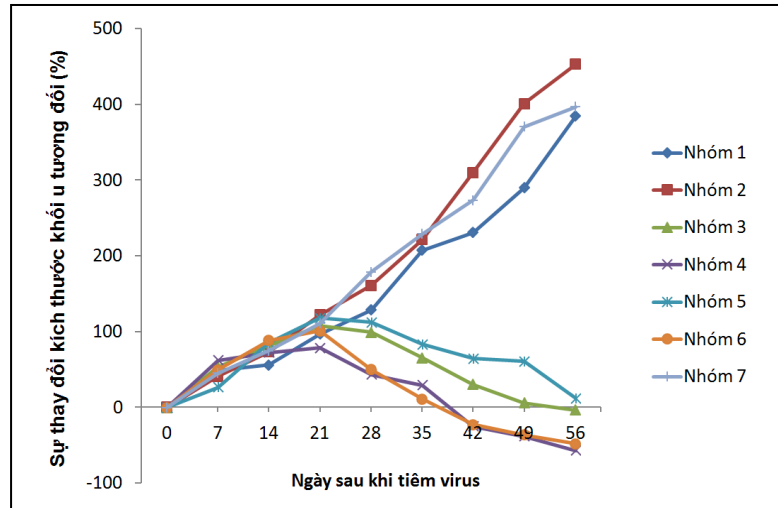
Hình 4. Tăng số lượng virus khu trú trong khối u sau khi sử dụng kháng sinh. (A), 6 ngày sau khi tiêm virus, chuột từ các nhóm 3, 4, 5, và 6 (n = 7-8) được sử dụng để đo cường độ luminescence thông qua sản phẩm của gen marker Ruc-GFP được đưa vào hệ gen virus. (B), hình chụp luminescence đại diện của tăng nhóm. Sau khi tiêm cơ chất coelenterazin, cơ chất sẽ phản ứng với enzyme Ruc và kết quả phản ứng được chụp lại bằng hệ thống soi in vivo (Carestream, USA). (C), ngày thứ 7 chuột từ các nhóm 3, 4, 5 bị giết (n = 4), cắt khối u và xác định số lượng virus bằng phương pháp plaque assay.

Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rằng ở những nhóm có sử dụng kháng sinh, khả năng nhân lên của virus trong khối u thông qua marker gen (Ruc-GFP) (Hình 4, A-B) và số lượng virus thu nhận được sau 7 ngày tiêm (Hình 4, C) cao hơn so với nhóm không sử dụng kháng sinh. Đồng thời tiến hành kiểm tra sự có mặt của virus ở các cơ quan khác như, não, gan, tim, thận, phổi hay trong máu, kết quả giống với nhóm đối chứng, hầu hết các cơ quan trên không phát hiện có virus hoặc với số lượng rất ít (20 PFU/g) (không thể hiện trong bài báo này).

3.3. Tăng hiệu quả chữa trị khối u sau khi sử dụng kháng sinh

Sau khi kích thước khối u đạt khoảng 200 mm³, virus được tiêm vào mạch máu một liều duy nhất. Như kết quả thể hiện ở Hình 5, ở nhóm không được tiêm virus (nhóm 1, 2, và nhóm 7) kích thước khối u liên tục tăng. Và sự tăng kích thước khối u của nhóm được sử dụng kháng sinh (nhóm 2, nhóm 7) là cao hơn so với nhóm đối chứng không sử dụng chất kháng sinh (nhóm 1). Kích thước khối u sau chữa trị bằng virus có liên hệ chặt chẽ với khả năng nhân lên của virus trong khối u. Số lượng virus xâm nhập vào khối u lớn đồng nghĩa với kích thước khối u giảm càng nhanh. Chúng tôi thấy rằng những nhóm được sử dụng kháng sinh (nhóm 4, nhóm 6), có số lượng virus cao, và có sự giảm kích thước khối u nhanh hơn nhóm đối chứng (nhóm 3, 5). Trong

khi đó, ở nhóm sử dụng kháng sinh trong 10 ngày đầu (nhóm 5) và sau đó được phục hồi hệ VSV đường ruột, sự giảm kích thước khối u tương đương với nhóm không được sử dụng kháng sinh. Điều đó cho thấy sự thay đổi hiệu quả chữa trị của virus không phải trực tiếp do kháng sinh gây ra mà bởi tại sự thay đổi quần thể VSV đường ruột. Sau 42 ngày tiêm virus, kích thước khối u của nhóm 2 và nhóm 4 đã nhỏ hơn so với kích thước ban đầu của khối u và ở ngày thứ 56 khối u gần như biến mất.

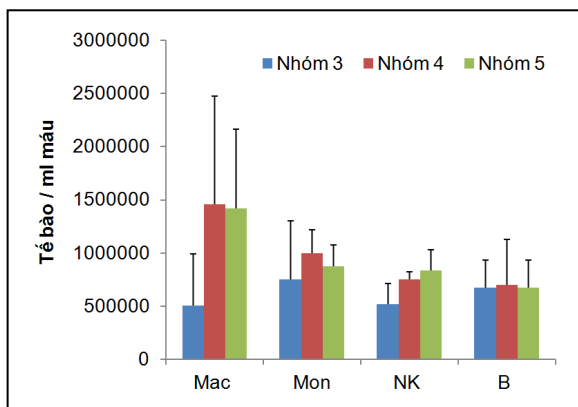


Hình 5. Sự thay đổi kích thước khối u sau khi tiêm virus.

Sau khi cấy ghép tế bào ung thư phổi 21 ngày, 100 % chuột xuất hiện khối u có kích thước khoảng 200 mm^3 . 5×10^6 PFU virus được tiêm vào chuột ở nhóm 4, 5, 6, và 7. Sự thay đổi kích thước khối u được đo hàng tuần. Tại thời điểm tiêm virus (ngày 0) kích thước khối u của tất cả các nhóm được qui về 0 %, các thời điểm sau kích thước khối u được so sánh với thời điểm 0.

3.4. Sự thay đổi số lượng của các nhóm tế bào miễn dịch

Bảy ngày sau khi tiêm virus, lấy mẫu máu từ chuột ở nhóm 3, nhóm 4 và nhóm 5 ($n = 3$) để kiểm tra số lượng các loại tế bào miễn dịch như tế bào B, NK, Mac hay tế bào bạch cầu đơn nhân (monocyte). Kết quả đáng chú ý là số lượng tế bào Mac trong máu của nhóm không dùng kháng sinh (nhóm 3) ít hơn gần 3 lần so với số lượng tế bào trong nhóm dùng kháng sinh (nhóm 4, 5), với số lượng trung bình ở mỗi nhóm lần lượt là 507.168, 1.456.920 và 1.415.952 tế bào/ml máu. Tương tự, số lượng tế bào monocyte và NK của nhóm 3 cũng ít hơn so với nhóm 4 và nhóm 5. Trong khi số lượng tế bào B được tìm thấy tương đối đồng đều ở cả 3 nhóm (Hình 6).



Hình 6. Số lượng các loại tế bào miễn dịch trong máu sau 6 ngày tiêm virus. Mac; macrophages, Mon; monocytes, NK; natural killer cells, B; B cells.

Từ các nghiên cứu trước cho thấy rằng số lượng tế bào miễn dịch trong máu và trong khối u có tỉ lệ thuận với số lượng virus khu trú trong khối u. Khi có nhiều virus khu trú trong khối u sẽ kích ứng hệ miễn dịch đáp ứng mạnh hơn và ngược lại [1]. Một điểm khác cần lưu ý là số lượng các loại tế bào miễn dịch ở nhóm dùng kháng sinh (nhóm 4) và nhóm dùng kháng sinh sau đó phục hồi hệ VSV (nhóm 5) không có sự sai khác đáng kể về mặt số lượng. Kết quả trên có thể được giải thích là sau khi dùng kháng sinh để tiêu diệt VSV đường ruột, hệ miễn dịch bị suy yếu về chức năng (số lượng tế bào miễn dịch vẫn được duy trì trong khi chức năng miễn dịch của các loại tế bào NK, B, Mac hay Dc bị suy giảm [1]), dẫn tới số lượng virus xâm nhập vào khối u cao hơn, do đó kích thích tạo ra nhiều tế bào miễn dịch hơn. Việc sử dụng hệ miễn dịch trong liệu pháp oncolytic virus cũng là một con dao hai lưỡi. Một mặt hệ miễn dịch giúp loại bỏ tế bào ung thư nhưng mặt khác cũng có khả năng loại bỏ virus, làm giảm hiệu quả chữa trị. Quan trọng nhất là giai đoạn đầu, khi virus mới được đưa vào vượt qua được rào cản miễn dịch để có thể tiếp cận khối u với số lượng đủ lớn ở giai đoạn này có tính chất quyết định đến hiệu quả chữa trị của virus. Vì vậy, liều lượng virus đưa vào, thời điểm và phương thức vận chuyển virus sẽ có ý nghĩa quyết định cho thành công của liệu pháp [4].

4. KẾT LUẬN

Hệ VSV đường ruột đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng của hệ miễn dịch. Khi ức chế sự sinh trưởng của hệ VSV, dẫn tới làm yếu chức năng của hệ miễn dịch và tăng khả năng xâm nhập của virus. Trong thực tế đặc biệt đối với những bệnh nhân bị ung thư giai đoạn cuối hoặc được chỉ định dùng hóa, xạ trị, việc đối mặt với sự xâm nhiễm bởi những VSV gây bệnh là thường xuyên xảy ra. Việc điều trị với kháng sinh đối với những bệnh nhân trên là hết sức phổ biến. Do đó, phát hiện này có ý nghĩa tích cực trong việc sử dụng oncolytic virus cho những nhóm điều trị có sử dụng nhiều kháng sinh nhằm nâng cao khả năng xâm nhập, nhân lên và phá hủy tế bào ung thư của virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, Q., Yu, Y. A., Wang, E., Chen, N., Danner, R. L., Munson, P. J., Marincola, F. M. and Szalay, A. A - Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus, *Cancer Res.* **67** (20) 10038-46.
2. Nanhai G Chen, Aladar A Szalay - Oncolytic vaccinia virus: a theranostic agent for cancer, *Future Virol* **5** (6) (2010) 763-784.
3. Biondo A., Pedersen J. V., Karapanagiotou E. M, Tunariu, N., Mansfield D., Sassi S., Corral J., Yap T. A., de Bono J. S. and Harrington - K - 1258 POSTER Phase I Clinical Trial of a Genetically Modified Oncolytic Vaccinia Virus GL-ONC1 With Green Fluorescent Protein Imaging, *Eur. J. Cancer* **47** (2011) s162.
4. Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P. and Diefenbach A - Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15, *Immunity* **26** (4) (2007) 503-17.
5. Ayres J. S., Trinidad N. J. and Vance R. E - Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota, *Nat. Med.* **18** (5) (2012) 799-806.
6. Parato K. A., Senger D., Forsyth P. A. J. and Bell J. C - Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours, *Nature Reviews Cancer* **5** (12) (2005) 965-976.

7. Ganal S. C., Sanos S. L., Kallfass C., Oberle K., Johner C., Kirschning C., Lienenklaus S., Weiss S., Staeheli P., Aichele P. and Diefenbach A - Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota, *Immunity* **37**(1) (2012) 171-86.
8. Wong H. H., Lemoine, N. R. and Wang Y - Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles, *Viruses* **2** (1) (2010) 78-106.
9. Garber K - China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment, *J. Natl. Cancer Inst.* **98**(5) (2006) 298-300.
10. Kirn D. H. and Thorne S. H - Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer, *Nat Rev Cancer* **9** (1) (2009) 64-71.
11. Nguyen D. H., Chen N. G., Zhang Q., Leilar R. J., Yu Y. A. Cappello J. and Szalay A. A - Vaccinia virus-mediated expression of human erythropoietin in tumors enhances virotherapy and alleviates cancer-related anemia in mice, *Mol Ther* **21** (11) (2013) 2054-62.
12. Worschech A., Haddad D., Stroncek D. F., Wang E., Marincola F. M. and Szalay A. A - The immunologic aspects of poxvirus oncolytic therapy, *Cancer Immunol Immunother* **58** (9) (2009) 1355-62.

ABSTRACT

FUNCTIONS OF GUT BACTERIA IN CANCER TREATMENT USING ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS GLV-1h68

Nguyen Hoang Duong^{1,*}, Pham Viet Cuong^{1,2}, Nguyen Thi Kim Cuc², Nanhai G. Chen³, Aladar A. Szalay³

¹*Mien Trung Institute for Scientific Research, VAST, Hue City*

²*Institute of Marine Biochemistry, VAST, 18 Hoang Q. Viet, Cau Giay, Hanoi*

³*Genelux Institute, San Diego Science Center, California, USA*

*Email: nhduong.misr@gmail.com

GLV-1h68 is an attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus derived from L1VP strain. It was constructed by inserting three expression cassettes (encoding *Renilla luciferase*-*Aequorea* green fluorescent protein fusion, β -galactosidase, and β -glucuronidase) into the *F14.5L*, *J2R* (encoding thymidine kinase) and *A56R* (encoding hemagglutinin) loci of the viral genome, respectively. GLV-1h68 is demonstrated the abilities to infect, replicate in, and lyse many human cancer cell lines both *in vitro* and *in vivo*. In this study, it was used a combination of 4 antibiotics to kill almost gut bacteria in mice bearing human lung cancer xenografts (A549), following by treatment with single dose of 5×10^6 PFU of GLV-1h68. The results showed that tumor sizes of antibiotic treated animals were smaller than the non-antibiotic treated animals. Concurrently, the number of viral particles in tumors of antibiotic treated animals were found higher than the controls. This finding opens a new better option for cancer treatment by using combination of antibiotic and oncolytic therapies.

Keywords: Gut bacteria, vaccinia virus, immune cells.