



携带 OX40L 重组溶瘤病毒的构建及 靶向杀伤肝癌的研究*

杨 豪^{1,2)} 邓卓雅¹⁾ 孙 芳¹⁾ 雷光林¹⁾ 程晋霞¹⁾ 于洪好¹⁾

田崇瑜¹⁾ 张绍庚^{1)**} 杨鹏辉^{1)**}

(¹⁾ 中国人民解放军总医院第五医学中心, 北京 100039; ²⁾ 河北北方学院, 张家口 075000)

摘要 目的 拯救携带 OX40L 的重组溶瘤流感病毒株, 全面鉴定并评价其靶向杀伤肝癌细胞的效果。方法 将编码 OX40L 的基因片段嵌合在 A/PuertoRico/8/34 (PR8) 的 NS 片段特定位置, 利用反向遗传学技术 (reverse genetics, RG), 与 PR8 流感病毒的剩余 7 个骨架质粒 pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M 共转染 COS I /MDCK 细胞, 成功拯救获得重组溶瘤流感病毒, 命名为 rFlu-OX40L。经血凝、TCID₅₀ 方法测定病毒滴度; 重组病毒纯化后电镜观察病毒形态特征及大小分布; 检测 MDCK 细胞病毒生长曲线; MTS 法检测重组病毒对肝癌细胞活力的影响; 流式细胞术检测重组病毒诱导肝癌细胞死亡方式; 利用肝癌荷瘤小鼠模型评价重组病毒 rFlu-OX40L 在动物体内的抗肿瘤效果。**结果** 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 可在鸡胚中稳定传代, HA 效价达 2⁷⁻⁸, 病毒滴度可达 7~8 LgTCID₅₀/ml; 重组病毒 rFlu-OX40L 与流感病毒 PR8 生长曲线相一致, 72 h 达高峰; MTS 结果显示, 3 MOI 重组病毒可显著降低肝癌细胞活力, 且对正常肝细胞无明显影响, 呈时间和剂量依赖性; 流式细胞结果显示, 重组病毒可显著诱导肝癌细胞凋亡, 呈时间和剂量依赖性; 利用肝癌荷瘤小鼠模型, 瘤内注射重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 较 PR8、PBS 对照组, 小鼠脾细胞中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45⁺、CD69⁺ T 细胞数量呈现显著升高趋势。**结论** 携带 OX40L 的重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 在体内外均可选择性杀伤肝癌细胞, 有望为肝癌的临床治疗提供新的免疫治疗策略。

关键词 溶瘤病毒, 流感病毒, RG 技术, OX40L, 肝癌

中图分类号 R392

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0019

免疫疗法旨在改善机体免疫能力, 刺激机体免疫系统, 免疫制剂通过激活或增强机体的免疫系统, 利用机体自身的免疫机制攻击癌细胞, 促进机体对癌细胞的免疫应答, 抑制癌组织生长^[1-2]。免疫疗法是一种通过重塑免疫系统抑制肿瘤生长的治疗手段, 主要分为主动免疫、被动免疫和联合免疫, 包括检查点抑制剂、CAR-T 疗法、溶瘤病毒、非特异性免疫调节剂等^[3-4]。免疫疗法弥补了手术、传统放化疗在肿瘤治疗领域的局限性, 在预防术后复发方面也发挥着积极作用。免疫疗法改变了肿瘤治疗方式, 逐步成为极具潜力的临床治疗手段, 被认为是治疗甚至治愈癌症最有前途的策略^[5]。

溶瘤病毒 (oncolytic viruses, OV) 是一类重要的免疫治疗药物, 可以是天然存在或基因工程技术设计的病毒^[6]。研究表明, OV 可选择性感染肿

瘤细胞, 在肿瘤细胞内大量复制, 最终裂解细胞, 并释放大量的肿瘤抗原和新抗原, 激活机体的免疫反应, 抑制肿瘤生长^[7-9]。溶瘤病毒具有选择性裂解肿瘤细胞、激活免疫系统的组合效应, 使其成为潜在的原位肿瘤疫苗^[10-11]。随着基因工程技术的进步, 越来越多的研究人员将免疫检查点抑制剂嵌合在溶瘤病毒基因组序列上, 构建重组溶瘤病毒, 以优化靶向性, 增强免疫原性。目前已有 4 款溶瘤病毒产品上市, 用于恶性肿瘤的临床治疗^[12-14]。溶瘤病毒疗法效果存在个体差异性, 且治疗范围较为

* 北京市自然科学基金 (7202194) 资助项目。

** 通讯联系人。

杨鹏辉 Tel: 010-66933336, E-mail: ypenghuiamms@hotmail.com

张绍庚 Tel: 010-66933336, E-mail: zhangsg302@hotmail.com

收稿日期: 2022-01-13, 接受日期: 2022-03-31

局限, 尽管如此, 溶瘤病毒疗法作为最有前途的免疫治疗方式, 值得深入研究。

溶瘤病毒免疫治疗的最终目的是刺激机体免疫系统, 激活T细胞, 抑制肿瘤生长。T细胞的活化不仅由抗原刺激T细胞受体介导, 也可由共刺激分子的共刺激信号介导, 抗原与共刺激信号的结合能更好地激活T细胞^[15]。T细胞表面表达的CD28和抗原提呈细胞(APC)表面的CD80/CD86是最著名的共刺激信号; 肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族OX40(CD134)与其同源性配体OX40L(CD134L, CD252)结合参与T细胞与APC细胞的相互作用, 也可为激活T细胞提供重要的共刺激信号^[16-17]。在抗原呈递发生后, 两种分子的表达增加, 同时建立多种促炎因子信号通路, 包括CD28连接, CD40L连接和干扰素 γ 信号传导。它们的相互作用促进T细胞激活, 增加效应细胞因子的产生并增强细胞迁移率^[18]。研究表明, OX40-OX40L相互作用可增强CD4⁺、CD8⁺T细胞功能, 增强T细胞的抗肿瘤活性^[19-20]。调节OX40-OX40L通路可以影响体内肿瘤的发病机制, 可作为治疗人类自身免疫性疾病的潜在靶点^[21-22]。Porciuncula等^[23]研究发现, OX40L能明显改善人非小细胞肺癌预后, Moderna公司基于OX40L的mRNA-2752免疫疗法, 在治疗实体瘤和淋巴瘤患者的临床I期试验显现了良好的抗肿瘤效果(clinicaltrials.gov)。本研究利用课题组前期成熟的流感病毒反向遗传学(reverse genetics, RG)技术, 以A/PuertoRico/8/34(PR8)为骨架, 将编码OX40L的基因片段嵌合在NS片段特定位置, 成功拯救获得重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L, 并通过体内外实验评价重组病毒靶向杀伤肝癌细胞的效果, 有望为肝癌的临床免疫治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

质粒提取试剂盒、转染试剂盒购自德国QIAGEN公司; 反转录试剂盒购自全式金公司; UltraSYBR Mix 购自康为世纪; Trizol 购自Invitrogen公司; MTS 试剂盒购自美国Promega公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术公司; Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4、PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD8a、APC anti-mouse CD45、PE anti-mouse CD69均购自美国Biolegend公司; 小鼠淋巴

细胞分离液购自达科为生物技术有限公司。

1.2 菌种与质粒

PR8流感病毒的8个骨架质粒(pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M、pHW198-NS)均由本实验室保存; 大肠杆菌DH5 α 感受态购自TianGen公司; pHW2000载体质粒由本实验室提供。

1.3 细胞与病毒

非洲绿猴肾细胞COSI细胞、犬肾细胞MDCK均采购自中国科学院上海生命科学研究院; 人正常肝细胞L02、人肝癌细胞HepG2、Huh7均购自ATCC(American Type Culture Collection)细胞库; 小鼠肝癌细胞H22由解放军总医院第五医学中心保存; 流感病毒A/Puerto Rico/8/34(PR8)由本实验室保存。

1.4 实验动物

SPF鸡胚购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司; 4~6周龄雌Balb/c小鼠购自维通利华; 所有动物实验均按照中国人民解放军总医院第五医学中心实验动物伦理委员会的指导方针进行。

1.5 重组质粒pFlu-OX40L-NS构建

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)获得OX40L基因序列, 经文献调研及生物信息学预测分析, 将OX40L基因组开放阅读框序列经优化后插入流感病毒PR8骨架质粒NS基因第406位点。重组序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。克隆入pHW2000载体, 并通过阳性克隆测序验证。

1.6 拯救重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L

将非洲绿猴肾细胞COSI细胞、犬肾细胞MDCK在6孔细胞板按2:1比例共培养, 细胞数 4×10^5 个/孔。细胞长至单层约70%~80%, 弃上清, PBS洗3次, 换无抗无血清DMEM培养基, 按Effectene转染试剂盒(QIAGEN, Hilden, Germany)说明书转染。重组质粒pFlu-OX40L-NS与PR8其余7个骨架质粒(pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M)均稀释至200 μ g/L, 各取1 μ l等量混匀, 共转染COSI/MDCK细胞, 37°C、5% CO₂培养箱放置72 h后, -80°C冰箱冻存。

1.7 鉴定重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L

1.7.1 血凝实验

转染后细胞反复冻融1次后, 接种9~11日龄SPF鸡胚, 200 μ l/枚, 每个转染孔接种2枚鸡胚, 接种后蜡块封口, 置37℃孵育箱孵育, 72 h后4℃冰箱过夜。收取鸡胚尿囊液100 μ l, 倍比稀释后, 用1%鸡红细胞测定血凝效价。

1.7.2 TCID₅₀测定

MDCK细胞铺96孔细胞板, 细胞计数 2×10^4 /孔。细胞密度长至70%~80%, 弃培养基, PBS洗3次。重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L依次按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} 倍比稀释后, 接种MDCK细胞, 5 d后观察细胞状态, 用1%鸡红细胞测定血凝效价。

1.7.3 RT-PCR鉴定

Trizol法提取重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L的RNA, 反转录为cDNA后, 用甲型流感病毒NS通用引物扩增。扩增产物跑琼脂糖凝胶电泳, 用pHW198-NS做对照。琼脂糖凝胶电泳鉴定后PCR产物送生工测序。

1.7.4 电镜观察重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L

重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L按1:5 000倍稀释, 接种9~11日龄鸡胚, 200 μ l/枚。72 h后收取阳性鸡胚尿囊液, 4 000 r/min离心25 min后, 取上清经100 ku膜包超滤, 30%和60%的蔗糖梯度离心, 32 000 r/min离心4 h, PBS脱糖, 32 000 r/min离心2 h, 获得纯化后rFlu-OX40L病毒, 负染透射电镜观察其形态结构与大小分布。

1.8 体外评价重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L生物学活性

1.8.1 重组病毒在MDCK细胞的生长曲线

评价重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L体外复制能力, 用无血清的DMEM按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} 倍比稀释后, 接种MDCK细胞, 置于37℃、5% CO₂培养箱, 分别在12、24、48、72、96 h取上清液, 测病毒滴度。

1.8.2 MTS细胞增殖实验

人正常肝细胞L02、人肝癌细胞HepG2和Huh7分别铺96孔细胞板, 细胞计数 1×10^4 /孔, 细胞长至单层70%~80%后, 分别按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 0.1、1、3接种, 并设置阴性对照, 于37℃、5% CO₂培养24、48、72 h后, 弃上清, PBS洗3次, 加MTS试剂, 37℃

温箱避光孵育30 min后, 酶联免疫检测仪检测490 nm处吸光度值(A_{490})。

1.8.3 流式细胞术检测细胞死亡方式

L02、Huh7分别铺6孔细胞板, 细胞长至单层70%~80%后, 重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L按MOI值为1、3感染细胞, 并设置空白对照。感染48 h后, 根据Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.9 体内实验评价重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L溶瘤效果

1.9.1 肝癌荷瘤小鼠模型的建立

用4~6周龄雌性Balb/c小鼠, 腹腔注射小鼠肝癌细胞H22, 5~7 d后腹水形成, 取腹水, 3 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS重悬, 细胞计数 5×10^6 /只, 于小鼠右侧腹股沟皮下接种。待瘤体长至80~120 mm³, 随机分3组(PBS阴性对照组、PR8阳性对照组、rFlu-OX40L实验组), 6只/组, 每隔1 d瘤内分别接种PBS、PR8、重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L, 连续接种7次, 接种剂量分别为100 μ l、 3×10^5 TCID₅₀/100 μ l、 3×10^6 TCID₅₀/100 μ l, 每隔1 d测量小鼠肿瘤体积并观察小鼠生命体征。

1.9.2 病毒载量测定

MDCK细胞铺96孔细胞板, 细胞计数 2×10^4 /孔。细胞密度长至70%~80%, 弃培养基, PBS洗3次。取小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、肿瘤组织至无血清DMEM后研磨, 12 000 r/min离心1 min后吸取上清, 上清依次按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} 倍比稀释后, 感染MDCK细胞, 5 d后观察细胞状态, 并用1%鸡红细胞测定上清液TCID₅₀。

1.9.3 流式细胞术检测淋巴细胞

取小鼠脾组织研磨过滤, 滤液沿离心管管壁缓慢加入6 ml小鼠淋巴细胞分离液(达优), 分离小鼠淋巴细胞, 用含2%胎牛血清的生理盐水(FACE液)配置抗体, 每管样品分别加CD3、CD4、CD8、CD45、CD69抗体1 μ l、FACE液100 μ l, 充分混匀后4℃避光孵育30 min, FACE洗液洗去多余抗体, 8 000 r/min离心1 min后弃上清, 加入4%多聚甲醛200 μ l/管, 避光20 min后上流式细胞仪检测。

1.10 统计学分析

用统计软件GraphPad Prism 8.0分析数据, 采用单因素 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒pFlu-OX40L-NS的构建与鉴定

将OX40L基因组开放阅读框序列552 bp, 插入PR8骨架质粒NS序列, 构建策略见图1a, 大小

为1 477 bp, 克隆入pHW2000载体; 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 重组质粒pFlu-OX40L-NS与pHW198-NS跑琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示, 重组质粒片段大小与预期一致(图1b), 表明重组质粒构建成功。

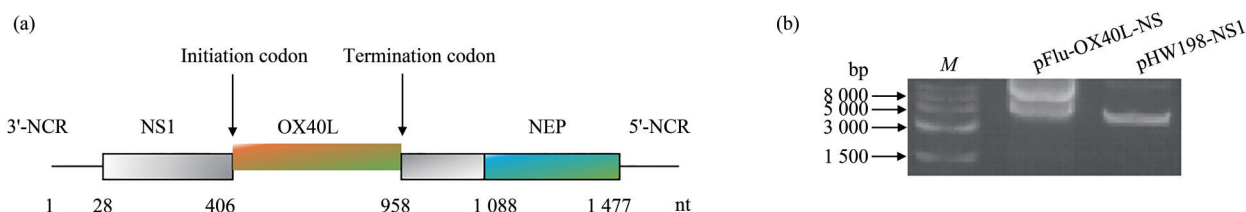


Fig. 1 Construction and identification of recombinant plasmid pFlu-OX40L-NS

(a) Construction strategy of recombinant plasmid pFlu-OX40L-NS; (b) identification of recombinant plasmid pFlu-OX40L-NS.

2.2 重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L的拯救及全面鉴定

重组质粒pFlu-OX40L-NS与PR8其余7个骨架质粒(pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M)等量混匀后, 共转染COSI / MDCK

细胞(图2a), 成功拯救重组溶瘤流感病毒, 命名为rFlu-OX40L。重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L, 第一代血凝效价 $2^5 \sim 2^6$, 经SPF鸡胚稳定传代后, 血凝效价可达 $2^7 \sim 2^8$ (图2b), 病毒滴度达 $7 \sim 8 \text{ Lg(TCID}_{50}/\text{ml})$ (图2c)。

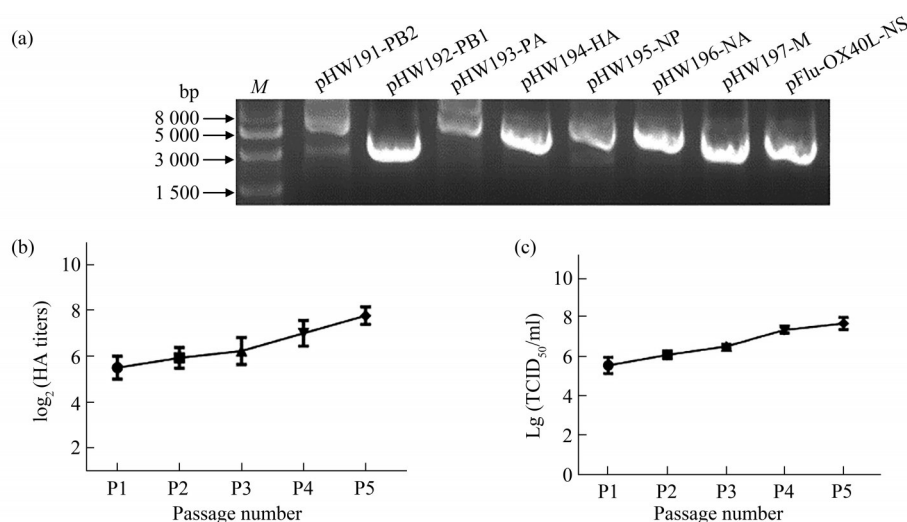


Fig. 2 Stability of recombinant virus rFlu-OX40L

(a) Transfection of 8 plasmid agarose gel electrophoresis; (b) rFlu-OX40L was continuously amplified in eggs for 5 passages, and the hemagglutination titers ranged from 2^7 to 2^8 ; (c) virus titration of rFlu-OX40L was $7 \sim 8 \text{ (LgTCID}_{50}/\text{ml})$.

2.3 RT-PCR鉴定

Trizol法提取重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L的RNA, 反转录为cDNA, 用甲型流感病毒NS通用引物扩增, 扩增产物跑胶结果显示, 重组溶瘤流感

病毒rFlu-OX40L中NS片段大小与重组质粒pFlu-OX40L-NS大小一致(图3), PCR产物送生工测序, 测序结果与预期完全一致。

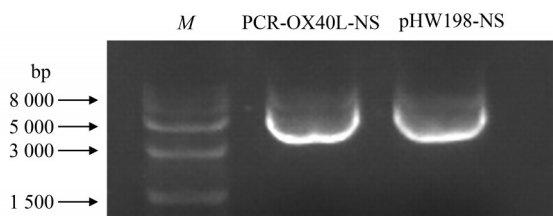


Fig. 3 NS segment of rFlu-OX40L was identified with RT-PCR method

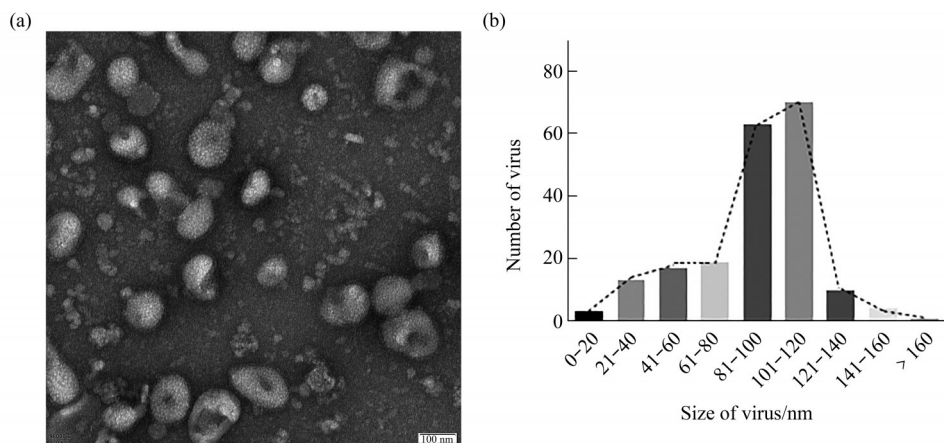


Fig. 4 Morphology of recombinant oncolytic virus rFlu-OX40L under electron microscope (a) and size distribution of rFlu-OX40L virus (b)

2.5 重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L的生长曲线

重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 用无血清 DMEM 按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} 倍比稀释后, 感染 MDCK 细胞, 分别在 24、48、72、96 h 取上清测定血凝效价。结果显示, 重组溶瘤流感病毒效价逐渐升高, 72 h 时 HA 效价达峰值为 2^7 , 到 96 h 呈明显下降趋势 (图 5)。结果表明: 重组溶瘤病毒株 rFlu-OX40L 与 PR8 毒株生长趋势相一致。

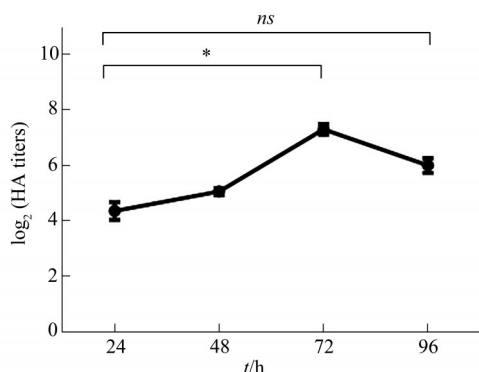


Fig. 5 Growth kinetics of recombinant virus rFlu-OX40L

* $P < 0.05$, ns: no significance.

2.4 电镜观察重组病毒rFlu-OX40L形态

重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 经蔗糖浓度梯度纯化后, 负染透射电镜观察, 其形态呈球形, 核衣壳表面有囊膜包裹, 囊膜表面有纤毛 (图 4a), 病毒颗粒大小分布在 80~120 nm 之间 (图 4b), 具有流感病毒典型的形态特征。

2.6 MTS检测重组病毒rFlu-OX40L对肝癌细胞活力的影响

人正常肝细胞 L02、人肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 分别铺 96 孔板, 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 按 MOI 值为 0.1、1、3 感染细胞, 并设置阴性对照, 培养 24、48、72 h 后加 MTS 试剂, 显色 30 min 后上机检测。结果显示, 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 可显著降低 HepG2 和 Huh7 的细胞活力, 对正常肝细胞 L02 无明显影响, 且随时间延长、剂量增加, 肝癌细胞活力明显降低, 呈现时间和剂量依赖性 (图 6)。

2.7 流式细胞术检测重组溶瘤流感病毒rFlu-OX40L诱导细胞凋亡的效果

重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 按 MOI 值为 1、3 分别感染 L02、HepG2 细胞, 48 h 后按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂说明书操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 (图 7)。结果显示, HepG2 细胞感染重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 凋亡率分别为 10.91%、19.08%, 对照组为 8.46% ($P < 0.001$)。结果表明, 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 可诱导 HepG2 细胞凋亡, 并呈现剂量依赖性。

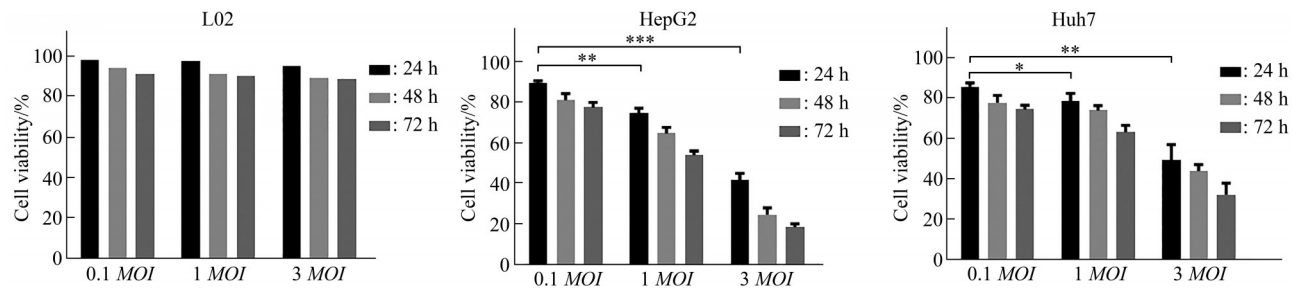


Fig. 6 Cell viability of rFlu-OX40L virus on different hepatocyte cell lines were detected with MTS assay

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

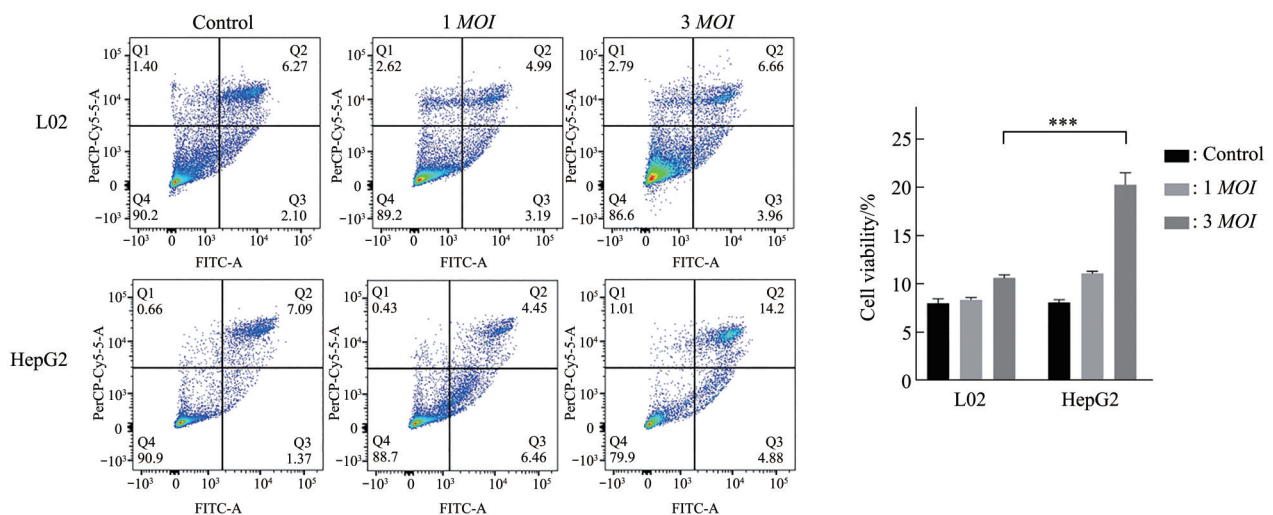


Fig. 7 Cell apoptosis induced by rFlu-OX40L virus were detected with flow cytometry

*** $P < 0.001$.

2.8 重组病毒rFlu-OX40L在动物体内的抑瘤效果

肝癌小鼠瘤体体积达 80~120 mm³时, 分别接种 PBS、PR8 和 rFlu-OX40L, 每隔 1 d 接种 1 次, 连续接种 7 次, 每次接种前测量小鼠体积变化, 最后一次接种 7 d 后, 取小鼠肿瘤组织, 称量肿瘤体积及重量; 取小鼠肝、肺、肿瘤组织做病理切片; 心、肝、脾、肺、肾、脑、肿瘤组织研磨后过滤, 离心取上清, 测量各组织病毒载量; 小鼠脾组织研磨后流式细胞术检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45⁺、CD69⁺变化。结果显示: 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 组与 PBS 和 PR8 组相比, rFlu-OX40L 组小鼠肿瘤体积变化明显比 PBS 和 PR8 组缓慢 (图 8a), 处死小鼠, 分离肿瘤组织, rFlu-OX40L

组体积、重量明显小于 PBS 和 PR8 组 (图 8b~d); PBS 组小鼠各组织未检测到病毒; PR8 组仅在肿瘤组织中检测到病毒, 滴度为 3~4 LgTCID₅₀/ml; 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 实验组仅在肿瘤组织中检测到病毒, 滴度为 7~8 LgTCID₅₀/ml, 且实验组明显高于 PR8 对照组 (图 8e); 实验组小鼠的脾组织经流式细胞术检测可见 CD4⁺CD69⁺T 达 34.4%、CD8⁺CD69⁺T 达 33.5%, 与 PR8、PBS 组相比明显升高 (图 8f)。结果表明, 重组溶瘤流感病毒 rFlu-OX40L 可显著抑制小鼠肿瘤生长, 在肿瘤部位可检测到较高病毒载量, 且小鼠脾脏 T 细胞数量显著增加, 推测重组病毒 rFlu-OX40L 可激活 T 细胞, 从而靶向杀伤肿瘤细胞发挥抑瘤效果。

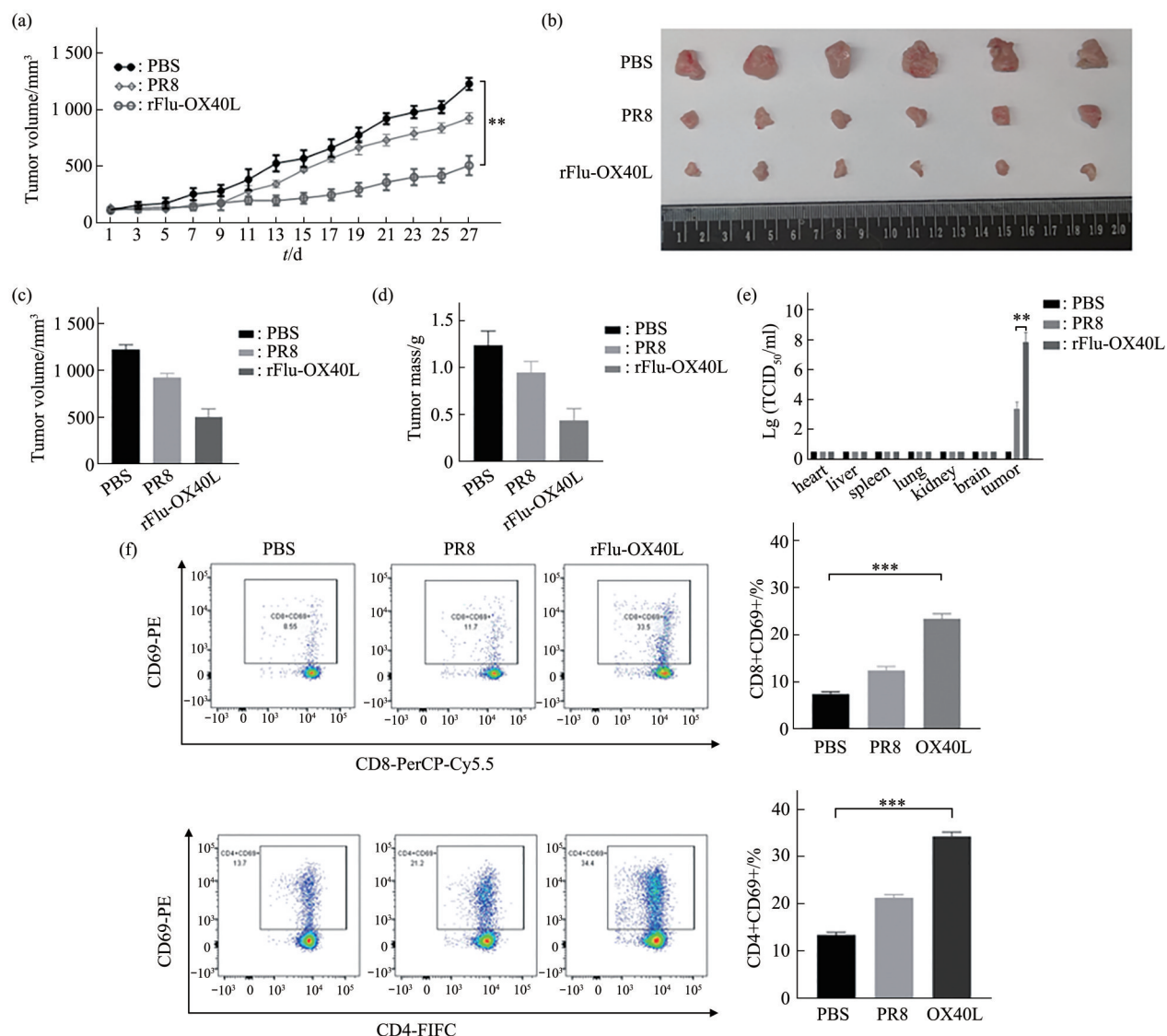


Fig. 8 Oncolytic effect of rflu-OX40L was evaluated *in vivo*

(a) The tumor volumes were measured every 2 days for quantification; (b,c) tumor tissue was isolated and compared for size; (d) the mass of the tumor tissue was compared; (e) the viral titers of tumor, heart, liver, spleen, lung, kidney, and brain tissues of mice in rFlu-huCTLA4, PBS, and PR8 group; (f) flow cytometry showed that rFlu-huCTLA4 could induce T cell activation. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3 讨 论

OX40L是TNF超家族成员,是一种由多种免疫细胞和非免疫细胞表达的共刺激分子,已被证明其参与T细胞活化,增强T细胞的抗肿瘤活性^[24]。OX40L信号对于成熟的CD4⁺T细胞活化和CD4⁺记忆T细胞的产生至关重要^[25]。活化CD4⁺T细胞上OX40L,对建立有效的T细胞免疫具有辅助作用,能有效增强免疫系统对抗癌症^[26]。OX40和OX40配体(OX40L)作为必需的免疫检查点

(IC)调节剂,与癌症免疫调节以及肿瘤微环境(TME)高度相关^[27]。利用OX40L这一特性,研究人员尝试将OX40L作为肿瘤治疗的靶点,与不同的抗癌药物结合,增强机体免疫,抑制肿瘤生长。

本课题组前期构建了成熟的流感病毒8质粒病毒拯救技术平台,成功拯救了嵌合GM-CSF、CTLA4抗体的多株重组溶瘤流感病毒株^[28-29]。利用这一技术平台,将OX40L基因组序列,构建在PR8流感病毒株的NS片段上,克隆入pHW2000载

体,通过阳性克隆验证其片段大小与预期一致。利用RG技术成功拯救的重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L,可在鸡胚连续稳定传代,HA效价达 $2^7 \sim 2^8$,病毒滴度达 $7 \sim 8 \text{ LgTCID}_{50}/\text{ml}$;重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L的NS片段经RT-PCR鉴定,片段大小与预期一致;电镜观察重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L呈球型,大小在 $80 \sim 120 \text{ nm}$ 之间,形态结构与流感病毒典型特征相符;重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L在MDCK细胞上72 h达到病毒复制高峰;MTS法与传统的MTT法相比,具有操作简单、灵敏度高、节省时间的优势,因此选用MTS法检测重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L对细胞活力的影响,结果表明rFlu-OX40L对正常的肝细胞没有影响,但可显著抑制肝癌细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果与MTS法检测一致,表明重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L可选择性杀伤肝癌细胞,而对正常细胞无明显影响,且3 MOI时效果更加显著;肝癌荷瘤小鼠模型瘤内注射重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L后,小鼠肿瘤体积明显比PR8组、PBS组增长缓慢;重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L组中小鼠肿瘤组织病毒载量明显高于其他组织;流式细胞术检测重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L组小鼠脾组织中CD4⁺ CD69⁺ T、CD8⁺ CD69⁺ T细胞明显高于PR8、PBS组,推测重组病毒rFlu-OX40L可通过激活机体T细胞免疫应答反应,靶向杀伤肿瘤细胞实现抗肿瘤作用。

本研究仍存在诸多不足,如重组溶瘤病毒rFlu-OX40L在体内的安全性评价(急性毒性、过敏、热源、长期毒性等),对其他实体肿瘤(肺癌、乳腺癌等)是否具有广谱杀伤效果,以及如何确定最佳给药剂量、给药间隔、给药途径等以达到最佳的抗肿瘤效果等问题,仍需后续深入研究不断完善。

综上所述,本研究基于流感病毒RG技术,成功构建、拯救了携带OX40L外源基因的重组溶瘤流感病毒株rFlu-OX40L,体内外实验验证了其靶向杀伤肝癌细胞的效果,有望为肿瘤的免疫治疗提供理论依据。那么,携带OX40L的重组流感病毒rFlu-OX40L能否与其他免疫治疗药物联合应用发挥协同作用?携带多种靶基因的重组流感病毒能否起到更强的抗肿瘤免疫效果?这些研究工作还有待后续进一步探索。

4 结 论

本研究利用基因工程技术成功构建了嵌合OX40L的重组NS质粒,并成功拯救了表达OX40L的重组溶瘤流感病毒,经体内外实验验证了其靶向杀伤肝癌细胞的能力。

参 考 文 献

- [1] Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*, 2015, **125**(9): 3335-3337
- [2] Saleh R, Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: role of tumor-mediated immunosuppression. *Semin Cancer Biol*, 2020, **65**: 13-27
- [3] Seliger B, Massa C. Immune therapy resistance and immune escape of tumors. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(3): 551
- [4] Watanabe N, McKenna M K, Rosewell Shaw A, *et al.* Clinical CAR-T cell and oncolytic virotherapy for cancer treatment. *Mol Ther*, 2021, **29**(2): 505-520
- [5] Van Elsas M J, Van Hall T, Van Der Burg S H. Future challenges in cancer resistance to immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(4): 935
- [6] Lawler S E, Speranza M C, Cho C F, *et al.* Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol*, 2017, **3**(6): 841-849
- [7] Harrington K, Freeman D J, Kelly B, *et al.* Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(9): 689-706
- [8] Marelli G, Howells A, Lemoine N R, *et al.* Oncolytic viral therapy and the immune system: a double-edged sword against cancer. *Front Immunol*, 2018, **9**: 866
- [9] Fu L Q, Wang S B, Cai M H, *et al.* Recent advances in oncolytic virus-based cancer therapy. *Virus Res*, 2019, **270**: 197675
- [10] Bommarreddy P K, Shettigar M, Kaufman H L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(8): 498-513
- [11] Guo Z S, Lotze M T, Zhu Z, *et al.* Bi- and Tri-specific T cell engager-armed oncolytic viruses: next-generation cancer immunotherapy. *Biomedicines*, 2020, **8**(7): 204
- [12] Bishnoi S, Tiwari R, Gupta S, *et al.* Oncotargeting by vesicular stomatitis virus (VSV): advances in cancer therapy. *Viruses*, 2018, **10**(2): 90
- [13] Hwang J K, Hong J, Yun C O. Oncolytic viruses and immune checkpoint inhibitors: preclinical developments to clinical trials. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(22): 8627
- [14] Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: a new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*, 2016, **107**(10): 1373-1379
- [15] Croft M, So T, Duan W, *et al.* The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev*, 2009, **229**(1): 173-191

- [16] Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, *et al.* OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol*, 2010, **105**: 63-98
- [17] Lu X. OX40 and OX40L interaction in cancer. *Curr Med Chem*, 2021, **28**(28): 5659-5673
- [18] Webb G J, Hirschfield G M, Lane P J. OX40, OX40L and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, **50**(3): 312-332
- [19] Nuebling T, Schumacher C E, Hofmann M, *et al.* The immune checkpoint modulator OX40 and its ligand OX40L in NK-Cell immunosurveillance and acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Res*, 2018, **6**(2): 209-221
- [20] Song Y, Margolles-Clark E, Bayer A, *et al.* Small-molecule modulators of the OX40-OX40 ligand co-stimulatory protein-protein interaction. *Br J Pharmacol*, 2014, **171**(21): 4955-4969
- [21] Fu Y, Lin Q, Zhang Z, *et al.* Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharm Sin B*, 2020, **10**(3): 414-433
- [22] Serebrovskaya E O, Yuzhakova D V, Ryumina A P, *et al.* Soluble OX40L favors tumor rejection in CT26 colon carcinoma model. *Cytokine*, 2016, **84**: 10-16
- [23] Porciuncula A, Morgado M, Gupta R, *et al.* Spatial mapping and immunomodulatory role of the OX40/OX40L pathway in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(22): 6174-6183
- [24] Roszik J, Markovits E, Dobosz P, *et al.* TNFSF4 (OX40L) expression and survival in locally advanced and metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, **68**(9): 1493-1500
- [25] Soroosh P, Ine S, Sugamura K, *et al.* OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol*, 2006, **176**(10): 5975-5987
- [26] Andarini S, Kikuchi T, Nukiwa M, *et al.* Adenovirus vector-mediated *in vivo* gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts. *Cancer Res*, 2004, **64**(9): 3281-3287
- [27] Chen P, Wang H, Zhao L, *et al.* Immune checkpoints OX40 and OX40L in small-cell lung cancer: predict prognosis and modulate immune microenvironment. *Front Oncol*, 2021, **11**: 713853
- [28] Penghui Y, Fang S, Ruilan W, *et al.* Oncolytic activity of a novel influenza A virus carrying granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, 2019, **30**(3): 330-338
- [29] Lei G L, Wang L P, Dong S H, *et al.* A recombinant influenza virus with a CTLA4-specific scFv inhibits tumor growth in a mouse model. *Cell Biol Int*, 2021, **45**(6): 1202-1210

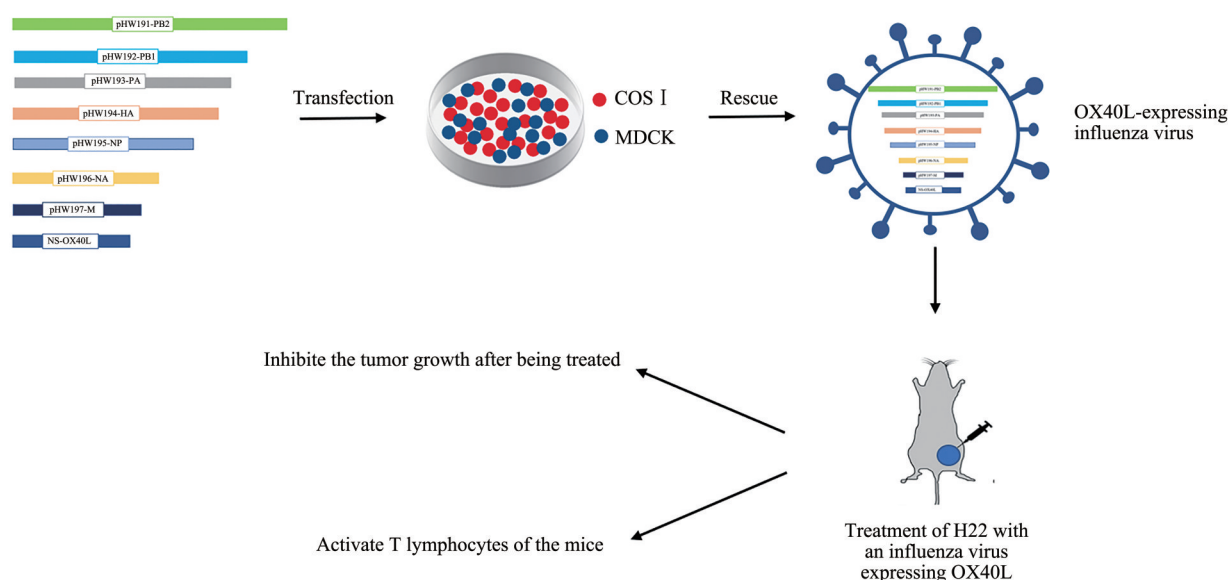
Oncolytic Efficacy of a Recombinant Oncolytic Virus Carrying OX40L in Hepatocellular Carcinoma*

YANG Hao^{1,2)}, DENG Zhuo-Ya¹⁾, SUN Fang¹⁾, LEI Guang-Lin¹⁾, CHENG Jin-Xia¹⁾, YU Hong-Yu¹⁾,
TIAN Chong-Yu¹⁾, ZHANG Shao-Geng^{1)**}, YANG Peng-Hui^{1)**}

¹⁾The Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China;

²⁾Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To rescue a novel recombinant oncolytic influenza virus carrying OX40 ligand and evaluate its oncolytic efficacy in hepatocellular carcinoma. **Methods** The gene of encoding OX40L was optimized and inserted into the NS fragment of influenza virus A/PuertoRico/8/34 (PR8). Then, the recombinant plasmid along with the remaining 7 plasmids pHW191-PB2, pHW192-PB1, pHW193-PA, pHW194-HA, pHW195-NP, pHW196-NA and pHW197-M of influenza virus PR8, were co-transfected into COSI / MDCK cells. A recombinant oncolytic influenza virus, named rFlu-OX40L, was successfully generated using reverse genetics (RG). The titers of rFlu-OX40L were determined with hemagglutination and TCID₅₀ methods. We observed the morphology and size distribution of rFlu-OX40L under electron microscopy. The growth curve of

* This work was supported by a grant from the Beijing Natural Science Foundation of China (7202194).

** Corresponding author.

YANG Peng-Hui. Tel: 86-10-66933336, E-mail: ypenghuiamms@hotmail.com

ZHANG Shao-Geng. Tel: 86-10-66933336, E-mail: zhangsg302@hotmail.com

Received: January 13, 2022 Accepted: March 31, 2022

rFlu-OX40L was detected on MDCK cells. Cell viability of rFlu-OX40L was examined on various hepatoma cells with MTS assay. Cell death patterns induced by the rFlu-OX40L virus was analyzed with flow cytometry. The antitumor effect of rFlu-OX40L was evaluated based on the hepatocellular carcinoma tumor-bearing mice model.

Results The oncolytic influenza virus rFlu-OX40L could be stably at the HA titer of 2^{7-8} after passage in chicken embryos. The viral titers were 7–8 LgTCID₅₀/ml. The growth curve of rFlu-OX40L was consistent with that of wild-type PR8 virus and reached the peak values at 72 h. MTS assays revealed that rFlu-OX40L at dose of 3 MOI could significantly reduce the cell viability on HCC cells, without destroying normal cells in a time and dose-dependent manner. Flow cytometry results displayed rFlu-OX40L at dose of 3 MOI could induce cell apoptosis on HCC cells in a time- and dose-dependent manner. Compared with PR8 and PBS group, the CD3+, CD4+, CD8+, CD45+, CD69+ T cell numbers in spleen cells of mice inoculated with rFlu-OX40L increased significantly. **Conclusion** The recombinant oncolytic influenza virus rFlu-OX40L carrying OX40L could selectively destroy hepatocellular carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*, which will provide a novel immunotherapy strategy for clinical management of hepatocellular carcinoma.

Key words oncolytic virus, influenza virus, RG technology, OX40L, liver cancer

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0019