



溶瘤病毒载体研究进展*

李平翠 杨帆 欧霞 张继虹 魏大巧**

(昆明理工大学医学院, 昆明 650500)

摘要 溶瘤病毒 (oncolytic virus, OV) 疗法是治疗肿瘤的一种新方法, 它可通过直接杀死肿瘤细胞并引起机体的免疫反应发挥作用. 然而天然溶瘤病毒有一定的局限性, 因此需将各种不同的病毒作为载体, 通过基因修饰的方法增强或减弱病毒毒力并导入新的功能性基因, 以提高其溶瘤作用. 目前可以作为溶瘤病毒载体的有单纯疱疹病毒、腺病毒、牛痘病毒、水泡性口炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒等. 这些病毒载体均可通过不同的基因修饰方法, 靶向性感染并杀死不同的肿瘤细胞, 获得较好的溶瘤作用. 本文综述了几种溶瘤病毒载体的基因修饰方法, 以及修饰后的溶瘤效果.

关键词 溶瘤病毒, 载体, 基因修饰, 肿瘤

中图分类号 R392.11, R730.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0146

随着肿瘤类型和患者数量的日益增多, 肿瘤治疗受到高度关注. 传统疗法存在局限性, 外科手术切除有不能完全切除肿瘤组织的几率, 而化疗和放疗会损伤正常细胞, 因此研究新的肿瘤治疗的方法迫在眉睫. 肿瘤免疫疗法旨在激活机体自身的免疫系统, 以杀灭肿瘤细胞而治疗癌症. 溶瘤病毒疗法是肿瘤免疫治疗中一个新兴的分支, 不仅可直接靶向作用于肿瘤细胞且不伤害正常细胞, 还可激活机体的免疫系统, 是目前治疗肿瘤的一种理想方法^[1]. 然而天然溶瘤病毒有一定的局限性, 存在安全性不一致或刺激机体产生肿瘤免疫能力不强等缺点^[2], 为了克服上述缺点, 溶瘤病毒载体应运而生: 它进行基因修饰后既保留溶瘤病毒杀灭肿瘤细胞的能力又加强其激活免疫反应的疗效. 随着生物工程技术的迅速发展, 溶瘤病毒载体在肿瘤治疗中表现出了良好的效果^[2], 如腺病毒 (adenovirus, Ad)、单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus-I, HSV-I)、麻疹病毒 (measles virus, MV) 等, 这些溶瘤病毒载体经基因修饰后, 可直接杀死肿瘤细胞, 并激活免疫系统, 最终清除肿瘤组织^[3]. 本文将对溶瘤病毒载体研究进展进行综述.

1 溶瘤病毒载体概述

1.1 溶瘤病毒

溶瘤病毒是指可以选择性感染并杀死肿瘤细胞, 而不损害正常细胞的一类病毒, 它们往往具有良好的溶瘤作用和靶向性^[4]. 溶瘤病毒感染肿瘤细胞后可在宿主细胞内复制, 释放的子代病毒可以继续感染周围的肿瘤细胞, 同时激活局部或全身抗肿瘤免疫效应, 改变肿瘤微环境, 进一步提高抗肿瘤效应^[1]. 溶瘤病毒疗法始创于 20 世纪初, 但最初的病毒存在安全性低、有效性不一致等不可控因素, 导致该方法没有受到重视. 直到 20 世纪末, 反向遗传技术出现才使病毒的改造和评价成为可能, 病毒的溶瘤作用再次得到关注.

1.2 溶瘤病毒载体

虽然一些病毒自身能发挥抗肿瘤能力, 但单靠其自身的溶瘤能力一般不能有效清除肿瘤细胞. 如

* 国家自然科学基金(81960555), 云南省教育厅科学研究基金(2018JS017)和云南省科技厅科技计划(2019FB108)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13888114280, E-mail: 602812067@qq.com

收稿日期: 2020-05-15, 接受日期: 2020-09-18

野生型呼肠孤病毒 (Reovirus) 只对 Ras 通路激活的肿瘤具有靶向性, 新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 的自然变异弱毒株只对 IFN 信号通路缺陷的肿瘤细胞有靶向性, 它们的溶瘤作用都有局限性. 因此进一步改造溶瘤病毒尤为重要, 将其作为载体, 通过基因修饰既可增强或减弱病毒毒力, 又可导入新的功能性基因, 从而提高治

疗效率^[3]. 这些病毒载体除了上述提到的 Ad、HSV-I、MV 外, 还有水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)、腮腺炎病毒 (mumps virus, MuV)、甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 等. 根据病毒基因组核苷酸类型的不同, 溶瘤病毒载体可分为 DNA 病毒载体和 RNA 病毒载体^[5], 表 1 列举了部分病毒载体的特点.

Table 1 Comparison of the characteristics of some oncolytic virus vectors

表1 部分溶瘤病毒载体特点对比

	病毒载体种类			
	HSV-I	Ad	MV	VSV
基因组	dsDNA	dsDNA	ssRNA	ssRNA
病毒基因组能否整合到宿主基因组	不能整合, 瞬时表达外源基因	不能整合, 瞬时表达外源基因	不能整合, 可长时间表达外源基因	不能整合, 可长时间表达外源基因
转导效率	低	低	低	低
表达水平	高	高	高	高
表达时间	1 d	1~2 d	>2 d	<1 d
病毒滴度	>10 ⁷ pfu/ml	>10 ¹⁰ pfu/ml	>10 ⁷ pfu/ml	>10 ⁹ pfu/ml
基因组容量	40~50 kb	7~8 kb	可>5 kb	3 kb
免疫原性	低	高	低	低
细胞实验	是	是	是	是
动物实验	是	是	是	是
是否能够通过抗性筛选产生稳定表达插入基因的细胞系	是	是	是	是

dsDNA: 双链DNA; ssRNA: 单链RNA.

2 溶瘤病毒载体的改造和作用

目前溶瘤病毒载体的基因修饰主要集中在选择性提高溶瘤能力、提高免疫刺激能力、提高靶向性以及生物安全性等方面. 围绕这几方面, 溶瘤病毒载体基因修饰的方法可分为以下几种: a. 删除对正常细胞有害的基因. 以甲型流感病毒 (influenza A viruses, IAV) 为例, NS1 是 IAV 的非结构蛋白, 在宿主细胞核中表达, NS1 具有拮抗 I 型干扰素 (IFN-1) 和细胞蛋白质抗病毒能力, 可以帮助 IAV 在表达 IFN-1 的细胞内复制, 而大部分肿瘤细胞 RAS 通路表达异常, 不能正常表达 IFN-1, 因而野生型的 IAV 不能在肿瘤细胞内复制, 利用这一特性, 缺失 NS1 (Δ NS1) 基因后的 IAV 在感染 IFN-1 缺陷的肿瘤细胞中表现出了高度的复制特异性, 即仅在肿瘤细胞中大量复制, 而不在正常细胞中复

制^[6] (图 1), 完成了病毒载体对肿瘤细胞的靶向性改造. b. 插入外源基因以实现生物调控作用. 如在腺病毒中插入白介素 12 (IL-12), 可增强腺病毒的免疫调解能力^[7], 还可插入表达肿瘤特异性抗原的基因, 如腺病毒中插入 p53 基因, 野生型 p53 是人体抑癌基因, 可促进肿瘤细胞凋亡、修复基因缺陷等^[8]. c. 插入与肿瘤表面受体特异性结合的配体基因, 从而使病毒可以特异性感染肿瘤组织, 增强其靶向性.

2.1 DNA 溶瘤病毒载体的改造和作用

2.1.1 单纯疱疹病毒 I

HSV-I 属于疱疹病毒科 α 病毒亚科, 基因组是双链 DNA (dsDNA), 长度为 152 kb^[9]. 其优点包括: 可容纳长度为 40~50 kb 的外源基因, 是目前容量最大的病毒载体; 具有高侵染性和广泛的宿主细胞类型; 具有嗜神经性, 可在神经元中建立终生潜伏

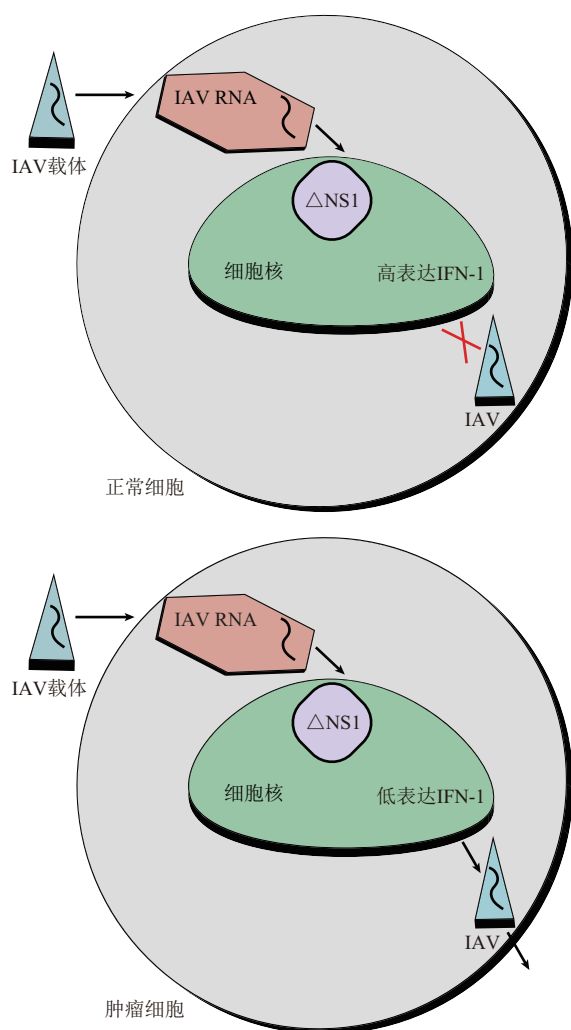


Fig. 1 NS1 truncated influenza A virus replicates in both normal and tumor cells

图1 NS1截短的甲型流感病毒在正常细胞和肿瘤细胞中的复制

改造前后的溶瘤流感病毒载体在不同细胞内具有靶向差异性. IAV: 甲型流感病毒; ΔNS1: NS1截短的甲型流感病毒; IFN: 干扰素.

性感染; 培养时滴度较高, 一般不低于 10^7 pfu/ml^[10]. 这些特点使得 HSV-I 成为溶瘤病毒载体的研究热点, 但也存在易引起人长期感染病毒的风险、有神经毒性等缺点. 针对其缺点可以通过基因工程进行改造, 如删除 HSV-I 的 $\gamma 34.5$ 基因可以消除神经毒性, 引入其他基因可提高杀伤肿瘤效率等.

将 HSV-I 载体改造成溶瘤病毒需要考虑的问题包括安全性、有效性、靶向性等. 由于 HSV-I 有较强的神经毒性, 因此很多对其基因的修饰都要消除神经毒性, 以提高生物安全性. $\gamma 34.5$ 是 HSV-I 的神

经毒性基因之一, 可编码 ICP34.5 蛋白, 此蛋白质与病毒复制有关. GM-CSF 是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 可将抗原提呈细胞募集到肿瘤微环境中, 并促进 T 细胞对肿瘤相关抗原的反应. 以 GM-CSF 取代 $\gamma 34.5$, 既提高了 HSV-I 的安全性又赋予了病毒表达 GM-CSF 的能力. 此重组溶瘤病毒商品名为 T-vec®, 2015 年美国食品和药物管理局 (FDA) 批准 T-vec® 用于治疗晚期黑色素瘤^[11]. 除 GM-CSF 外, $\gamma 34.5$ 也可被其他功能基因取代. 小鼠蛋白磷酸酶 I 调节亚基 15A 又称 MyD116, 其羧基端与 ICP34.5 蛋白的羧基端具有同源性. 以 MyD116 羧基端代替溶瘤单纯疱疹病毒 1 (oncolytic herpes simplex virus-1, oHSV-1) 的 ICP34.5, 编码的融合蛋白可阻止受感染细胞总蛋白质的合成过早停止. 因此可提高 HSV-I 在肿瘤细胞内的复制能力. Cheng 等^[12] 将 MyD116 基因插入删除了 $\gamma 34.5$ 基因的 HSV-I 中, 构建了重组溶瘤病毒 GD116, 其在体外对乳腺癌具有增强的抗肿瘤作用. HSV-I 除了有神经毒性外, 其诱发肿瘤免疫的效果也较差. 由于溶瘤病毒的适应性免疫由肿瘤细胞中释放的肿瘤特异性抗原引起, 因此 Boscheinen 等^[13] 将黑色素瘤相关抗原 MelanA 的基因插入 HSV-1 d106S 中, 构建重组溶瘤病毒 HSV-1-d106-MelanA, 以提高抗原提呈, MelanA 可提高适应性免疫反应, 它将 CD8+T 细胞募集于肿瘤病灶中, 增强了对黑色素瘤细胞的杀伤作用, HSV-1-d106-MelanA 将先天性免疫和增强的适应性免疫有效结合起来, 增强了靶向性和溶瘤能力.

在增强 HSV-I 免疫性的基础上, 还可以结合免疫检查点抑制剂治疗肿瘤. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 和程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 均是体内的免疫检查点, 抗 CTLA-4 和抗 PD-1 抗体可通过免疫逃避机制促进抗肿瘤免疫, 且在部分实体瘤中表现出显著而持久的临床反应. Saha 等^[14] 将 IL-12 插入 HSV-I, 构建重组溶瘤病毒 G47 Δ -mIL12. G47 Δ -mIL12 联合 anti-PD-1 和 anti-CTLA-4 抗体治疗胶质瘤模型小鼠, 可显著延长小鼠的中位生存期和长期存活时间, 且治愈小鼠在 6 个月后, 体内依然表现出免疫记忆, 也无肿瘤复发. 这可能与 IL-12 是一种较强的抗肿瘤免疫和 IFN- γ 诱导剂有关, 而且 anti-PD-1 和 anti-CTLA-4 抗体可通过两种不同的途径促进抗

肿瘤免疫, 两个过程共同作用加强了溶瘤效果. 在增强溶瘤效果方面, 也可以考虑适当提高溶瘤病毒的复制能力. 最新的研究发现, ICP34.5 部分保留可能会提高其在肿瘤组织中的复制能力. Chiocca 等^[15] 构建的重组溶瘤病毒 rQNestin34.5v.2, 并没有删除 ICP34.5, 而是在巢蛋白启动子/增强子元件的控制下, 恢复了 ICP34.5 的一个拷贝, 同时删除了与 ICP6 基因羧基端相连的绿色荧光蛋白 (GFP) 编码序列产生的融合转录子. rQNestin34.5v.2 由于

保留了部分 ICP34.5, 可以改善其复制能力. 由于其在人胶质瘤细胞中去磷酸化, 但在正常细胞中没有, 因此在前者中的细胞毒性和复制能力更高. 综上所述, HSV-I 载体经不同基因修饰后, 可减弱神经毒性、诱导肿瘤细胞凋亡、促进抗肿瘤 T 细胞应答等, 以此提高溶瘤能力和靶向性. 除了以上提到的重组溶瘤 HSV-I 外, 还有多种以 HSV-I 为载体的重组溶瘤病毒正处于不同研究阶段, 被用于治疗不同的肿瘤 (表 2).

Table 2 Introduction to some of the current HSV-I vectors modifications

表2 目前进行的部分单纯疱疹病毒I载体改造简介

HSV-I溶瘤病毒 载体类型	改造方法	适应症	治疗效果	临床 阶段
GD116	插入MyD116基因	乳腺癌	促进宿主细胞内病毒的复制	-
HSV-1-d106-MelanA	插入人MelanA基因	黑色素肿瘤	诱导先天免疫反应和CD8+ T细胞适应性抗肿瘤反应	-
G47 Δ -mIL12	插入IL-12基因	胶质瘤	诱导抗肿瘤免疫反应, 提高生存期	-
T-vec®	插入GM-CSF基因	黑色素瘤	局部或远处转移不可切除黑色素瘤患者的耐久反应率改善	IV期
MB-108® (溶瘤病毒C134)	第二代减毒I型 单纯疱疹病毒	恶性神经胶质瘤	直接抗肿瘤, 诱导可逆转肿瘤的免疫反应	I期
Seprehvir® (HSV1716)	基因修饰的I型 单纯疱疹病毒	胶质母细胞瘤、头颈部鳞状 细胞癌、肝细胞癌、黑色素瘤	抑制肿瘤进展, 无明显毒性	I期
HF10®	基因修饰的I型 单纯疱疹病毒	黑色素瘤、胰腺癌、头颈癌、 乳腺癌	抑制肿瘤生长, 无明显毒性	I期

前3种重组病毒仍处于实验室动物实验阶段; 后4种重组病毒写的是商品名, 处于不同临床实验阶段.

2.1.2 腺病毒

Ad是没有包膜的线状双链DNA病毒, 基因组长约36 kb, 是一种常用溶瘤病毒载体^[16]. 其优点包括: 基因结构和功能研究较清楚; 外源基因容量较大, 为7~8 kb; 感染的宿主细胞类型广泛; 产生的病毒滴度高, 一般不低于 10^{10} pfu/ml; 易于制备和操作; 不整合到靶细胞基因组、无插入突变风险. 这些优点使得Ad成为一种良好的溶瘤病毒载体. 但是Ad也存在免疫原性较强、易引起炎症反应、携带的外源基因不能长期表达、缺乏靶向性等缺点^[17].

为了克服上述缺点, 人们改造了大量的Ad载体以更好地治疗肿瘤. TSLC1编码的蛋白质为跨膜蛋白, 可抑制细胞由G1期进入S期, 造成细胞增殖延搁, 研究证明其有强烈抑制肿瘤进一步进展的作用. Zhang等^[18]将TSLC1基因插入Ad载体中构建重组溶瘤腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ 24bp)-TSLC1,

它通过靶向Wnt和Rb信号通路, 引起肝肿瘤干细胞(CSCs)自噬死亡, 诱导肝肿瘤细胞凋亡, 抑制肝肿瘤细胞转移, 最终消灭肿瘤. 在提高靶向性方面, Wang等^[19]将肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因TRAIL插入Ad载体, 构建重组腺病毒rAd5pz-zTRAIL-RFP. TRAIL可在癌细胞表面高效表达死亡受体, 从而在癌细胞中诱导一种外源性的凋亡信号. rAd5pz-zTRAIL-RFP具有增强溶瘤效果和对肿瘤细胞靶向性的作用, 且对正常细胞无明显毒性. 因此rAd5pz-zTRAIL-RFP是一种靶向性、安全性均较好的重组溶瘤病毒. 然而, 比较理想的情况是, 溶瘤病毒不仅具有良好的抗肿瘤作用, 还能在肿瘤细胞中复制传播来增强病毒裂解肿瘤细胞的能力. Wakabayashi等^[20]的最新研究表明, 将抗CUL4A(shCUL4A)的短发夹RNA(shRNA)表达盒插入溶瘤腺病毒(OAd)基因组中, 可以促进腺病毒感染和抑制肿瘤细胞生长. 这是由于CUL4A

是一种 E3 泛素连接酶, 参与泛素蛋白酶体介导的细胞周期进程、凋亡、发育和 DNA 修复中各种蛋白质的降解, CUL4A 的下调可以促进 c-JUN 蛋白的高表达, 引起腺病毒基因转录的上调. 对于 Ad 载体的基因修饰, 基本都是基于这几个方面. 其他 Ad 载体的基因修饰及作用, 如表 3 所示.

Table 3 Introduction to the transformation of some adenovirus vectors
表3 部分腺病毒载体的改造简介

Ad溶瘤病毒载体类型	改造方法	适应症	治疗效果	临床阶段
Ad.wnt-E1A (△24bp) -TSLC1	插入TSLC1基因	肝癌	诱导肝细胞凋亡, 抑制肝细胞转移	-
rAd5pz-zTRAIL-RFP	插入TRAIL基因	实体瘤	诱导多种肿瘤细胞凋亡	-
RTS-hIL-12+veledimex	插入IL-12基因	复发性胶质母细胞瘤	快速激活免疫系统, 提高患者生存率	-
OBP-301®	插入hTERT基因	胃和胃食管交界腺癌	肿瘤内注射后, 安全有效	II期
ONCOS-102®	插入GM-CSF基因	恶性胸膜间皮瘤、黑色素瘤、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌等	有效控制实体瘤的发展	II期
NG-348®	表达BiTE蛋白	结肠癌、非小细胞肺癌、肾癌、膀胱癌、卵巢癌	杀死肿瘤细胞, 还可表达调节肿瘤微环境的蛋白质	I期

前3种重组病毒仍处于实验室动物实验阶段; 后3种重组病毒写的是商品名, 处于不同临床实验阶段.

2.2 RNA溶瘤病毒载体的改造和作用

2.2.1 麻疹病毒

MV 为副黏病毒属, 单负链 RNA (ssRNA) 病毒, 基因组全长约 16 kb^[21]. MV 的优点包括: 易于改造、可引起广泛的免疫应答、对外源基因插入的耐受性较强, 具有重要的生物安全意义^[22]. 但存在靶向性较差、单独使用溶瘤效果受限等缺点, 因此可以通过基因修饰提高其溶瘤效应. BNiP3 是 Bcl-2 家族成员, 属人源促凋亡蛋白, 可在缺氧条件下诱导细胞程序性死亡, 此外还参与诱导细胞自噬, 因此 BNiP3 是一种诱导肿瘤细胞凋亡的理想因子. Lal 等^[23] 构建了携带 BNiP3 的重组麻疹病毒 (recombinant measles virus, rMV) rMV-BNiP3. rMV-BNiP3 可以诱导乳腺癌细胞凋亡和部分细胞死亡, 此外, 当 rMV-BNiP3 和紫杉醇或腺类衍生物 H2 化合物联合使用时, 显著降低了肿瘤细胞的整体生存能力. 可见 rMV-BNiP3 具有良好的抑制肿瘤的能力, 特别是当其与传统疗法结合时, 效果更为显著, 为减少肿瘤治疗过程中药物毒副作用提供了一种新的方法. MV 还有其他基因修饰的手段, 碘化钠同向转运体 (the sodium iodide symporter, NIS) 是一种调控甲状腺滤泡细胞碘吸收的跨膜糖蛋白, NIS 抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 并诱导细胞凋亡. Dispenzieri 等^[24] 将 NIS 插入到 MV 基因组中, 构建重组病毒 MV-NIS. 在 I 期临床试验中, MV-NIS 给予骨髓瘤患者静脉注射后, 患者的中性

粒细胞、白细胞数、血小板、CD4 淋巴细胞等均下降, 患者血清游离轻链 (FLC) 也下降. 这是由于补体激活的膜调节因子 CD46, 在多种人类恶性肿瘤中过表达, 而 CD46 是 NIS 的细胞受体, 因此 MV-NIS 可以通过 CD46 靶向肿瘤细胞, 进而抑制肿瘤进展. 但是溶瘤麻疹病毒的复制能力较弱, 严重阻碍了其在肿瘤组织中的复制传播. 这是由于在传代过程中, P 基因发生了适应性突变, 而 P 基因产物参与了 MV 的毒力和最初的先天性免疫应答逃逸, 因此导致了病毒的衰减. Bishnoi 等^[25] 在其最新的研究中发现, 将野生型 MV 的 P 基因代替 MVbv 疫苗株的 P 基因, 可以提高病毒的复制能力, 进而提高其在乳腺癌细胞和胃癌细胞中的复制效率和传播率. 但是这种溶瘤病毒的安全性, 还需要进一步的体内研究.

2.2.2 水泡性口炎病毒

VSV 为弹状病毒科, 基因组为不分节段的单负链 RNA, 长约 11 kb^[26]. 其优点包括: 基因组不与宿主整合, 无已知的转化潜能; 基因组易于释放入宿主细胞; 有广泛的组织趋向性, 可作用于几乎所有类型的肿瘤^[27]. 但是 VSV 亦可感染正常组织细胞, 溶瘤作用和免疫反应也较低. 因此需对其进行基因修饰, 提高其选择性溶瘤能力和免疫原性. IFN-β 可通过激活正常细胞的先天性免疫抑制 IFN-I 缺陷的肿瘤细胞复制, 导致 I 型 IFN 应答缺陷的肿瘤细胞选择性扩增. NIS 基因通常在甲状腺滤泡细

胞中表达,负责甲状腺激素合成所需的碘积累,可以使用特异性放射性示踪剂追踪NIS在生物体内的分布,并进行无创成像,减少对受测者的伤害.因此Naik等^[28]将IFN β 和NIS基因插入VSV基因组中,获得重组病毒VSV-IFN β -NIS.在VSV-IFN β -NIS感染骨髓瘤小鼠模型时,发现它可以引起小鼠骨髓瘤肿瘤快速持久缓解.这可能是由于溶瘤病毒可以快速杀死肿瘤细胞,并刺激小鼠产生了抗肿瘤免疫反应,才诱导了持久的肿瘤缓解作用.当VSV-IFN β -NIS静脉注射到自发性恶性肿瘤犬体内,发现溶瘤病毒可以抑制犬体内弥散性外周T淋巴瘤的进展,且肝毒性自行消退.这表明VSV-IFN β -NIS对晚期或转移性肿瘤的犬具有良好的耐受性和安全性.在提高溶瘤VSV的安全性方面,还可以考虑引入直接的抑癌基因提高溶瘤选择性,如功能性人抑癌基因p53,有研究表明其可以成功整合到VSV基因组中.Seegers等^[29]在之前构建的两种重组VSV-p53wt和VSV-p53-CC的基础上,重新进行改造:在VSV-M中,两种病毒均包含一个VSV-M Δ M51突变;病毒VSV-G和VSV-L之间插入的p53wt或p53-CC的N端分别融合RFP的C端.通过研究其对胰腺导管腺癌的作用发现,重组VSV在肿瘤组织中复制能力提高,同时在正常细胞中保持高度衰减.这可能是由于重组溶瘤病毒改善了对肿瘤细胞的附着.

2.2.3 其他病毒载体

除上述两种外, RNA病毒载体还有很多,如腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、呼肠孤病毒等.这些病毒也都是较好的备用溶瘤病毒载体.如与人腮腺炎病毒基因序列类似的蝙蝠病毒的融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN)代替人腮腺炎病毒的相应序列后,可获得重组溶瘤腮腺炎病毒(rMuVs)^[30].将II型人鼻病毒的异种核糖体基因插入脊髓灰质炎病毒,可获得重组溶瘤脊髓灰质炎病毒^[31],它更多地行使类似于疫苗佐剂的功能:可刺激肿瘤抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞大量产生.综合以上情况,基因修饰后可以靶向杀伤肿瘤细胞并对正常细胞影响较小的病毒,几乎都可以作为溶瘤病毒载体.虽然RNA溶瘤病毒载体选择性看似较多,但是其也面临着各种阻碍.首先并非所有的肿瘤都受溶瘤病毒的影响,如胰腺导管腺癌对一些溶瘤VSV有耐药性,限制了oVSV溶瘤水泡性口炎病毒的溶瘤效果.其次RNA病毒的编码依赖RNA聚合酶,这种酶缺乏校对功能,较易引

起基因突变^[32].这种自发的适应性突变,容易引起重组病毒功能的变化.若可以很好地解决这些问题, RNA溶瘤病毒载体必将在肿瘤治疗领域发挥更大的作用.

3 挑战与展望

在过去的几十年里,溶瘤病毒疗法发展迅速,基因工程技术的发展势必促使其进一步完善.在这种疗法中,大多数病毒被作为介导外源基因进入肿瘤细胞的载体,病毒经基因修饰可降低毒副作用,提高溶瘤作用和免疫原性,成为更稳定的表达载体.通过释放肿瘤特异性抗原和诱导局部炎症来刺激免疫反应,进而诱导T细胞浸润肿瘤微环境,克服免疫耐受作用^[33].

随着T-vec®被批准用于治疗黑色素瘤,溶瘤病毒疗法开始成为传统疗法的替代疗法,促进了肿瘤的综合性和个性化治疗,这也是将来肿瘤治疗的趋势.在治疗期间,患者对溶瘤病毒载体的敏感性和耐受性可能不同,这点会是以后研究的重点之一.溶瘤病毒载体自身存在一些问题,有待进一步研究:首先是所选择的外源基因是否会引起有效的免疫应答和抗肿瘤活性,第二为外源基因的整合是否会引起基因的重排,第三是外源基因是否会干扰溶瘤病毒的复制能力^[34].而溶瘤病毒载体经基因修饰后也出现了一些新的问题:第一,重组溶瘤病毒在到达肿瘤组织之前是否会被循环系统清除;第二,重组溶瘤病毒到达肿瘤组织后,其抑制肿瘤进展的作用是否更强;第三,重组溶瘤病毒是否可以产生可持续性的抗肿瘤免疫作用^[35].如今越来越多的重组溶瘤病毒处于临床阶段,其面临的最大问题是如何确定给药剂量和给药途径^[36].虽然在临床前实验中进行了不同给药剂量的比较,基本在一定程度上产生了抗肿瘤的效果,但在临床情况下的实验结果并不理想.

随着技术的不断革新与进步,使用溶瘤病毒载体介导肿瘤治疗有望出现突破性进展.由于肿瘤是一种发病机制复杂的疾病,因此治疗方法也多种多样,将来对溶瘤病毒载体的修饰方法也会越来越多.这些溶瘤病毒载体经基因修饰后或单独发挥作用,或结合一些传统或新型抗肿瘤疗法,可能会更有效地控制肿瘤进展或治愈肿瘤.我们有理由相信这必将极大拓展人类对抗肿瘤的方法,为人类健康发挥积极作用.

参 考 文 献

- [1] Fountzilias C, Patel S, Mahalingam D. Review: oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*, 2017, **8**(60): 102617-102639
- [2] Jhawar S R, Thandoni A, Bommarreddy P K, *et al.* Oncolytic viruses-natural and genetically engineered cancer immunotherapies. *Frontiers in Oncology*, 2017, **7**: 202
- [3] Maroun J, Muñoz-Alía M, Ammayappan A, *et al.* Designing and building oncolytic viruses. *Future Virology*, 2017, **12**(4): 193-213
- [4] Raja J, Ludwig J M, Gettinger S N, *et al.* Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2018, **6**(1): 140
- [5] Kaufman H L, Kohlhapp F J, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, **14**(9): 642-662
- [6] Pizzuto M S, Silic-Benussi M, Ciminale V, *et al.* An engineered avian-origin influenza A virus for pancreatic ductal adenocarcinoma virotherapy. *The Journal of General Virology*, 2016, **97**(9): 2166-2179
- [7] Guo Z, Gao H Y, Zhang T Y, *et al.* Adenovirus co-expressing CD40 ligand and interleukin (IL)-2 contributes to maturation of dendritic cells and production of IL-12. *Biomedical Reports*, 2016, **5**(5): 567-573
- [8] Hermiston T W, Kuhn I. Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Therapy*, 2002, **9**(12): 1022-1035
- [9] Bailer S M, Funk C, Riedl A, *et al.* Herpesviral vectors and their application in oncolytic therapy, vaccination, and gene transfer. *Virus Genes*, 2017, **53**(5): 741-748
- [10] Sokolowski N A, Rizos H, Diefenbach R J. Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come?. *Oncolytic Virotherapy*, 2015, **4**: 207-219
- [11] Perez M C, Miura J T, Naqvi S M H, *et al.* Talimogene laherparepvec (TVEC) for the treatment of advanced melanoma: a single-institution experience. *Annals of Surgical Oncology*, 2018, **25**(13): 3960-3965
- [12] Cheng L, Jiang H, Fan J, *et al.* A novel oncolytic herpes simplex virus armed with the carboxyl-terminus of murine MyD116 has enhanced anti-tumour efficacy against human breast cancer cells. *Oncology Letters*, 2018, **15**(5): 7046-7052
- [13] Boscheinen J B, Thomann S, Knipe D M, *et al.* Generation of an oncolytic herpes simplex virus 1 expressing human melanA. *Frontiers in Immunology*, 2019, **10**: 2
- [14] Saha D, Martuza R L, Rabkin S D. Macrophage polarization contributes to glioblastoma eradication by combination immunovirotherapy and immune checkpoint blockade. *Cancer Cell*, 2017, **32**(2): 253-267.e255
- [15] Chiocia E A, Nakashima H, Kasai K, *et al.* Preclinical toxicology of rQNestin34.5v.2: an oncolytic herpes virus with transcriptional regulation of the ICP34.5 neurovirulence gene. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2020, **17**: 871-893
- [16] Larson C, Oronsky B, Scicinski J, *et al.* Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget*, 2015, **6**(24): 19976-19989
- [17] Zhang M, Zhang X, Han Z, *et al.* Construction of a novel oncolytic adenoviral vector and its biological characteristics. *Oncology Reports*, 2013, **29**(2): 798-804
- [18] Zhang J, Lai W, Li Q, *et al.* A novel oncolytic adenovirus targeting Wnt signaling effectively inhibits cancer-stem like cell growth via metastasis, apoptosis and autophagy in HCC models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, **491**(2): 469-477
- [19] Wang Z, Yu B, Wang B, *et al.* A novel capsid-modified oncolytic recombinant adenovirus type 5 for tumor-targeting gene therapy by intravenous route. *Oncotarget*, 2016, **7**(30): 47287-47301
- [20] Wakabayashi K, Sakurai F, Ono R, *et al.* Development of a novel oncolytic adenovirus expressing a short-hairpin RNA against cullin 4A. *Anticancer Research*, 2020, **40**(1): 161-168
- [21] Amagai Y, Fujiyuki T, Yoneda M, *et al.* Oncolytic activity of a recombinant measles virus, blind to signaling lymphocyte activation molecule, against colorectal cancer cells. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 24572
- [22] Zuniga A, Wang Z, Liniger M, *et al.* Attenuated measles virus as a vaccine vector. *Vaccine*, 2007, **25**(16): 2974-2983
- [23] Lal G, Rajala M S. Combination of oncolytic measles virus armed with BNIP3, a pro-apoptotic gene and paclitaxel induces breast cancer cell death. *Frontiers in Oncology*, 2018, **8**: 676
- [24] Dispenzieri A, Tong C, Laplant B, *et al.* Phase I trial of systemic administration of edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia*, 2017, **31**(12): 2791-2798
- [25] Bishnoi S, Tiwari R, Gupta S, *et al.* Oncotargeting by vesicular stomatitis virus (VSV): advances in cancer therapy. *Viruses*, 2018, **10**(2): 90
- [26] Alizadeh R, Ghanei M, Arashkia A, *et al.* Generation of recombinant measles virus containing the wild-type P gene to improve its oncolytic efficiency. *Microbial Pathogenesis*, 2019, **135**: 103631
- [27] Barber G N. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunology*, 2004, **17**(4): 516-527
- [28] Naik S, Galyon G D, Jenks N J, *et al.* Comparative oncology evaluation of intravenous recombinant oncolytic vesicular stomatitis virus therapy in spontaneous canine cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018, **17**(1): 316-326
- [29] Seegers S L, Frasier C, Greene S, *et al.* Experimental evolution generates novel oncolytic vesicular stomatitis viruses with improved replication in virus-resistant pancreatic cancer cells. *Journal of Virology*, 2020, **94**(3): e01643-19
- [30] Krüger N, Herrler G, Hoffmann M, *et al.* Recombinant mumps viruses expressing the batMuV fusion glycoprotein are highly fusion active and neurovirulent. *The Journal of General Virology*, 2016, **97**(11): 2837-2848

- [31] Brown M C, Holl E K, Boczkowski D, *et al.* Cancer immunotherapy with recombinant poliovirus induces IFN-dominant activation of dendritic cells and tumor antigen-specific CTLs. *Science Translational Medicine*, 2017, **9**(408): ean4220
- [32] Zainutdinov S S, Kochneva G V, Netesov S V, *et al.* Directed evolution as a tool for the selection of oncolytic RNA viruses with desired phenotypes. *Oncolytic Virotherapy*, 2019, (8): 9-26
- [33] Zheng M, Huang J, Tong A, *et al.* Oncolytic viruses for cancer therapy: barriers and recent advances. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2019, **2**(15): 234-247
- [34] Yang X, Huang B, Deng L, *et al.* Progress in gene therapy using oncolytic vaccinia virus as vectors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2018, **144**(12): 2433-2440
- [35] Nguyen T, Avci N G, Shin D H, *et al.* Tune up in situ autovaccination against solid tumors with oncolytic viruses. *Cancers (Basel)*, 2018, **10**(6): 171
- [36] Chaurasiya S, Fong Y, Warner S G. Optimizing oncolytic viral design to enhance antitumor efficacy: progress and challenges. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(6): 1699

Advances of Oncolytic Virus Vectors*

LI Ping-Cui, YANG Fan, OU Xia, ZHANG Ji-Hong, WEI Da-Qiao**

(Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract The new cancer treatment research needs to be accelerated, not only because tumor types and increasing number of patients, but also because traditional therapies, surgical methods, chemotherapy and radiotherapy have certain drawbacks. Oncolytic viruses (OVs) can not only directly kill tumor cells but also activate immune system to exert better effects. However, natural OVs have some defect that limit its further application. In order to overcome its shortcomings, the OVs' vectors was constructed. With advances in molecular biology, OVs could introduced exogenous gene or reduce virulence to improve its function as vectors for treating tumors. At present, OVs such as herpes simplex virus, adenovirus, vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, measles virus, mumps virus, and poliovirus have made certain progress in treating tumors as OVs' vectors. The current modification methods of OVs' vectors can be divided into the following types: delete genes harmful to normal cells; insert foreign genes to achieve biological regulation; insert ligand genes that specifically bind to tumor surface receptors. This article reviews modification methods and effect of the aforementioned OVs vectors.

Key words oncolytic virus, vectors, modifying gene, tumour

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0146

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81960555), Science Research Foundation of Yunnan Provincial Department of Education (2018JS017) and Science and Technology Plan Project of Science&Technology Department of Yunnan Province (2019FB108).

** Corresponding author.

Tel: 86-13888114280, E-mail: 602812067@qq.com

Received: May 15, 2020 Accepted: September 18, 2020