



溶瘤性流感病毒的研究进展*

梁亮¹⁾ 唐磊¹⁾ 石华冉¹⁾ 方中岳¹⁾ 欧霞¹⁾ 杨帆¹⁾ 张继虹¹⁾ 杨景晖^{2)**}⁽¹⁾ 昆明理工大学医学院, 昆明 650500; ⁽²⁾ 云南省第一人民医院, 昆明 650032)

摘要 溶瘤病毒疗法属于免疫治疗的手段之一。其可通过病毒特异性地感染裂解肿瘤细胞和激活肿瘤免疫两种途径来达到杀伤肿瘤的目的; 同传统疗法比, 具有安全、高效、副作用小等优点。流感病毒自1900年代首次发现其可能作为“有益”的病毒缓解白血病病情以来, 不断有研究证明流感病毒具有杀伤肿瘤细胞的能力; 利用反向遗传操作技术对病毒进行改造, 有望将其发展成为一种更加安全、有效的肿瘤治疗生物制剂。本文将对近年来溶瘤流感病毒利用肿瘤分泌的胰蛋白酶促进病毒感染并在RAS基因突变导致干扰素缺陷的肿瘤中复制来提高肿瘤靶向性, 编码CTLA-4的单链抗体或HER-2增强流感病毒的抗癌特异性及作为外源基因IL-2、IL-15、GM-CSF和抗PD-1单克隆抗体的载体激活机体免疫几个方向进行综述。

关键词 溶瘤病毒, 流感病毒, 溶瘤作用**中图分类号** R392, R730**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0399

恶性肿瘤是目前重大疾病中发病率最高的疾病。世界卫生组织癌症研究机构(IARC)发布的最新数据称, 2020年全球有1930万癌症新发病例, 近1000万患者死于癌症^[1]。研发新型的抗肿瘤药物一直是推动肿瘤针对性治疗的动力。溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)是一类新的治疗药物, 通过选择性杀伤肿瘤细胞和诱导全身抗肿瘤免疫的双重作用机制实现抗肿瘤效果。目前已研究了多种病毒, 其中常用的病毒包括腺病毒、痘苗病毒、疱疹病毒、呼肠孤病毒、细小病毒、新城疫病毒、柯萨奇病毒等用作溶瘤治疗, 且已应用于临床并取得了良好的治疗效果^[2]。随着溶瘤病毒不断发展, 目前已有4种溶瘤病毒获批准上市, 分别是: Rigvir[®]、Oncorine[®]、Imlygic[®]和Delytact[®]。其中最新获批的Delytact[®]是日本第一三共株式会社和东京大学联合开发的一款针对神经胶质瘤的溶瘤病毒, 其是通过基因工程方法敲除 $\gamma 34.5$ 、 $ICP6$ 、 $\alpha 47$ 基因的单纯疱疹病毒^[3], 该病毒分别减弱了病毒的致病性、加强了靶向性、增强了病毒复制率, 于2021年在日本被厚生劳动省批准上市, 成为全球首款针对脑部肿瘤的溶瘤病毒产品^[4]。而自1900年代首次发现流行性感冒病毒(influenza virus)简称流感病毒, 可能作为“有益”的病毒缓解白血病

病情以来, 不断有研究证明其具有杀伤肿瘤细胞的能力。

流感病毒属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae), 是一类有包膜的单股负链RNA病毒, 在世界范围内流行。人类在对抗流感的过程中做了诸多尝试, 分别成功研发出了灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位重组等类型的流感疫苗, 这些经验为进一步以流感病毒为基础构建溶瘤病毒积累了宝贵的经验^[5]。流感病毒是最早一批用于治疗癌症的病毒, 在作为溶瘤病毒方面有着很大的潜力, 经过自然选育或反向遗传学修饰后可形成对人致病能力较弱的减毒株^[6], 并可利用完善的疫苗生产优势在鸡胚中大规模制造, 且流感病毒的基因片段及产物的功能是明确已知的。流感病毒作为RNA病毒其基因不会整合至宿主基因上。随着现代生物学的发展, 针对

* 国家自然科学基金(81860281, 81960555), 云南省科技厅科技计划(2019FB108), 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202105AC160030), 云南省高层次卫生计生技术人才培养经费(D-2017054), 云南省卫生内设研究机构(2017NS213, 2018NS234)和云南省临床病毒学重点实验室开放课题(202005AG070062-015)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13888067280, E-mail: yangjh1029@163.com

收稿日期: 2021-12-24, 接受日期: 2022-02-17

溶瘤流感病毒的机制研究也越发深入, 目前溶瘤流感病毒的作用方式可以总结为以下3点: a. 病毒直接裂解肿瘤细胞; b. 病毒激活机体免疫来杀伤肿瘤细胞; c. 病毒作为载体表达外源基因提高上述两种能力。现将近年来流感病毒溶瘤的进展进行综述。

1 溶瘤流感病毒直接裂解肿瘤细胞

流感病毒对肿瘤细胞的致细胞病变效应是能够观察到的最直接的溶瘤结果, 这与流感病毒感染癌细胞并复制出大量子代病毒使癌细胞裂解的特点有关。和流感病毒感染宿主细胞的过程一致, 当流感病毒感染细胞时, 流感病毒的血凝素通过吸附宿主细胞表面唾液酸受体以胞饮的方式进入细胞, 病毒囊膜与细胞膜融合后释放病毒核酸并进行转录和复制。流感病毒的蛋白质合成后开始进行病毒组装, 最后成熟的子代病毒通过出芽的方式释放, 此过程中使细胞发生裂解死亡。流感病毒感染肿瘤细胞的结果是相同的(图1a)。

1.1 流感病毒感染肿瘤细胞

流感病毒特异性识别肿瘤靶细胞是进行溶瘤治疗的第一步, 流感病毒的血凝素蛋白HA (hemagglutinin, HA) 与病毒识别宿主细胞高度相关^[7]。研究发现, 在结肠直肠癌、宫颈癌、乳腺癌等多发恶性肿瘤的细胞表面, 唾液酸含量及种类显著高于正常细胞, 肿瘤细胞唾液酸化的增加常表现为唾液酸基以特异的 α -2,3、 α -2,6糖苷键与乳糖胺Gal β 1~4GluNAc单位相连。肿瘤中存在的唾液酸修饰异常主要是由唾液酸转移酶表达异常引起的, 由于人体中缺乏CMP-Neu5Ac羟化酶基因, 在成人的正常细胞中没有Neu5Gc结构, 但部分肿瘤包括结肠癌组织中常具有Neu5Gc, 可以作为一种肿瘤治疗的特异性靶点^[8]。流感病毒通过表面血凝素蛋白HA的末端结构为唾液酸受体(SA α -2,3和SA α -2,6)介导病毒与肿瘤细胞膜融合, 故流感病毒对此类肿瘤细胞就具备很好的靶向性^[9]。此外, HA蛋白的构象改变是病毒进入宿主细胞的必要步骤, 胰蛋白酶或类似物(trypsin or trypsin-like serine proteases)通过结合HA蛋白的碱性裂解位点(basic cleavage site)使其形成合适的构象来结合宿主细胞表面的唾液酸受体^[10-11]。Alain等^[12]研究发现, 大部分恶性肿瘤组织中由肿瘤自身或中性粒细胞或巨噬细胞等肿瘤微环境中的固有免疫细胞分泌的胰蛋白酶类似物(trypsin-like serine proteases)高表达。其中弹性蛋白酶在胰腺起源的

肿瘤细胞中表达量又高于其他细胞。将部分非结构蛋白1(NS1)缺失(仅保留NS1前116位氨基酸)的PR8毒株中血凝素蛋白的胰蛋白酶切割位点替换为弹性蛋白酶后接种在异种胰腺导管腺癌移植瘤模型(PANC-1)和鼠黑色素瘤(B16)模型时观察到了良好的疗效^[11]。

1.2 流感病毒在肿瘤细胞中复制

流感病毒感染宿主细胞后的复制需要病毒的NS1支持。NS1可阻断I型干扰素介导的抗病毒反应, 是病毒编码的一种毒力蛋白。干扰素诱导蛋白激酶R(IFN-induced protein kinase R, PKR)是诱导干扰素产生抗病毒作用的一个重要刺激元件, 活化形态的PKR能够使真核细胞的转录因子2(eukaryotic translation factor 2, eIF2 α)磷酸化进而阻断病毒蛋白的合成而抑制病毒的复制^[13]。

NS1蛋白能够抑制宿主细胞基因表达并刺激病毒自身蛋白的转录和转录后调节^[14]。NS1蛋白在细胞中的表达与多种作用有关: 抑制mRNA的核质转运, 抑制mRNA的前剪接和刺激病毒mRNA的翻译, NS1与dsRNA结合并随后阻断dsRNA的激活, 因此NS1蛋白可以作为细胞凋亡的抑制剂或诱导剂。流感病毒早期阶段非结构蛋白NS1通过抑制被dsRNA(double-stranded RNA)激活的PKR细胞凋亡转录因子的连锁激活效应和抑制IRF-3(IFN regulatory factor 3)并减少NF- κ B(nuclear factor- κ B)诱导的TNF- α 释放来拮抗细胞的凋亡。当NS1截短或缺失后, PKR、IRF-3、NF- κ B激活干扰素所诱导的连锁反应使流感病毒不能有效复制^[15](图1)。

流感病毒感染癌细胞且不引起感染性疾病是溶瘤流感病毒的靶向要求。NS1截短的流感病毒可以特异地在RAS信号通路激活导致干扰素缺陷的肿瘤细胞中包装复制且不影响人体正常细胞^[16]。Muster等^[16]已证实缺失NS1(delNS1)基因后的流感病毒在感染干扰素合成受抑制或RAS基因突变的肿瘤细胞后表现出高度的复制特异性, 即仅在黑色素瘤、淋巴瘤细胞中大量复制, 而不在正常细胞中复制。在黑色素瘤细胞中, 与表达野生型NS1蛋白病毒相比, delNS1显示出更强的凋亡诱导作用。这是由于delNS1病毒对PI3K/AKT途径的激活减少所致。并且在包括黑色素瘤细胞在内的恶性细胞中, PI3K/AKT的活化与肿瘤的进展和对抗肿瘤治疗反应的增强有关^[17]。B16-F10黑色素瘤细胞由于RAS基因的过度活化使得PKR去磷酸化抑制了IFN的

产生而使病毒能在 IFN- α 、 β 缺陷的细胞中增殖^[18-19] (图1)。病毒在 Vero 细胞和其他宿主细胞中生长的差异能力是由于 Vero 细胞缺乏功能性干扰素的表达这一事实所致^[20]。超过 30% 的肿瘤细胞由于 RAS 基因的激活而抑制了真核细胞起始激酶 (eukaryotic initiation factor) 并进一步阻止了 PKR 的活化^[21]。研究发现所有癌症亚型中约 1/3 的致癌大鼠肉瘤 RAS 基因突变导致 PKR 抑制^[22]。并且 NS1 缺失的流感病毒可以靶向致癌性 RAS 突变的人 518 黑素瘤细胞的小鼠异种移植肿瘤模型^[23]。验证了以 PKR 依赖性方式将 PR8 流感病毒靶向 RAS 突变的肿瘤。Efferson 等^[24] 研究发现, 在 RAS 基因未激活的前列腺肿瘤细胞 LNCap 模型中, NS1 基因缺失的流感病毒能诱导外周血单核细胞 (PBMC) 产生 IFN- γ , 与活化细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 产生的 IL-12 刺激病毒特异的 CD8+ T 细胞, 与 NK 细胞共同发挥细胞免疫效应来裂解肿瘤细胞 (图1)。

2 溶瘤病毒激活机体免疫来杀伤肿瘤细胞

溶瘤流感病毒不仅能在恶性肿瘤中复制, 并且具有 NS1 缺失的甲型流感病毒比野生型病毒能更有效地刺激先天免疫来杀伤肿瘤。这是因为减毒与先天免疫系统病毒毒力因子缺失有关。NS1 对免疫系统的抑制作用是多方面的。机体细胞存在先天免疫介质, NS1 显示出抑制干扰素调节因子 3 (IRF3) 和 NF- κ B。由于 NS1 缺失的甲型流感病毒能够诱导强烈的 PKR 通路上调, 因此下游信号传导可能导致细胞膜上的钙网蛋白 (CALR) 暴露。CALR 充当 DAMP 的角色, 导致 PKR 敏感癌症中甲型流感病毒感染后凋亡小体的免疫原性增强^[25-26]。在对 NS1 部分截断的病毒增加了促炎基因的上调, 但完整的 NS1 缺失导致表达进一步增加^[27]。溶瘤流感病毒免疫刺激的效力与 NS1 缺失的长度相关, 完全的 NS1 缺失导致病毒流产。因此, 病毒促炎免疫刺激的水平 and 衰减的水平可以通

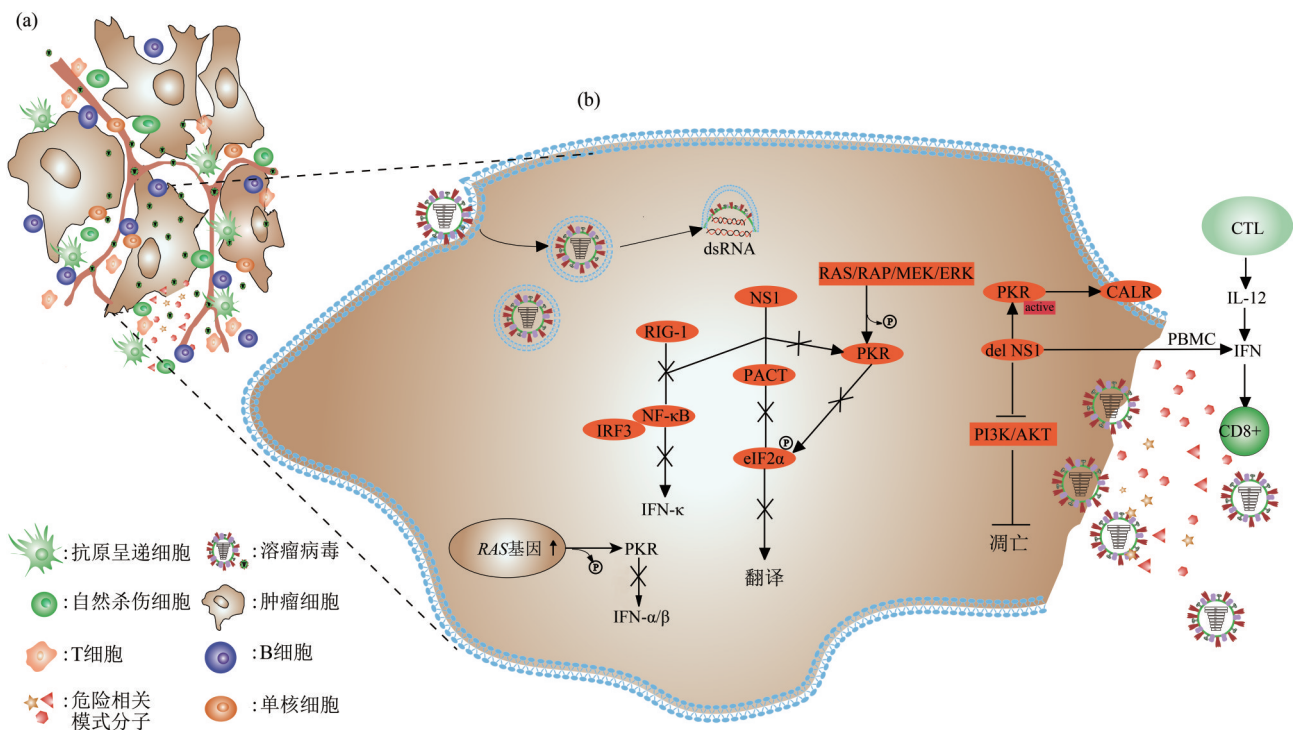


Fig. 1 The anti-tumor effect of oncolytic influenza viruses

图1 溶瘤流感病毒的抗肿瘤作用

(a) 溶瘤流感病毒在肿瘤细胞内复制并裂解肿瘤细胞后激活免疫细胞聚集。(b) 溶瘤流感病毒在 RAS 基因突变的肿瘤细胞内复制并释放子代病毒。流感病毒 NS1 蛋白可以抑制 PKR 和 IRF-3 (IFN regulatory factor 3) 并减少 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 的激活。NS1 基因缺失的流感病毒 (delNS1) 使 PKR 通路上调, 导致细胞膜上的钙网蛋白 (CALR) 暴露, 且能诱导外周血单核细胞 (PBMC) 产生 IFN- γ , 与活化细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 产生的 IL-12 刺激病毒特异的 CD8+ T 细胞。PI3K/AKT 途径的激活抑制, 使 delNS1 显示出更强的凋亡诱导作用。RAS 基因突变促使 PKR 去磷酸化, 进而抑制干扰素 α 、 β 。

过缺失的长度来滴定。实验表明, NS1 缺失到 80 或 116 个剩余氨基酸 (去除效应结构域, 但留下 RNA 结合结构域和一个核定位序列) 诱导衰减和溶瘤效应之间的最佳平衡^[16, 28]。NS1 的截断减少了 PKR 途径的抑制, 同时保留对通过 RIG-I 途径的免疫原性信号传导的抑制。并且 PKR 和 RIG-I 都与 I 型干扰素的产生有关^[29]。溶瘤病毒的主要免疫刺激与肿瘤相关抗原 (TAA) 的适应性 T 细胞反应相关。实验显示, NS1 缺失病毒可用于刺激树突状细胞 (DC), 以通过交叉表达对恶性细胞产生 T 细胞反应^[24, 30]。T 细胞的刺激可以通过暴露于 delNS1 病毒产生的病毒裂解物的 DCs 或通过感染 delNS1 病毒的 DCs 暴露于肿瘤细胞裂解物来诱导。同样, 部分 NS1 缺失病毒比完全缺失 NS1 蛋白更有效。这些离体分析可能在某种程度上模拟溶瘤治疗期间的体内肿瘤微环境。免疫细胞暴露于溶瘤 NS1 缺失病毒也显示出诱导外周血单核细胞 (PMBC), 包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞和自然杀伤 (NK) 细胞对各种癌细胞系的直接 IFN 依赖性细胞毒作用^[31-32] (图 1)。

3 编码抗癌基因的重组溶瘤流感病毒

OVs 可以通过多种机制直接导致肿瘤细胞死亡, 但不足以完全破坏肿瘤组织。与其他外源基因或其他治疗策略的结合是增强治疗效果的必要途径。稳定表达细胞因子的重组病毒的产生并且溶瘤性 delNS1 病毒基因组中外源基因的表达不会干扰其抗肿瘤活性^[33]。

3.1 表达 IL-2、IL-15 的溶瘤流感病毒

目前研究指出, 大部分的实体瘤缺乏 CTL 的浸润, 如何恢复有效的抗肿瘤免疫应答是近年来抗肿瘤治疗的热点之一。人白介素-2 (IL-2) 是一种免疫调节性 T 细胞衍生分子, 是抗原激活 T 细胞的克隆扩增所必需的, 能诱导 T 辅助和 T 杀伤细胞的增殖以及刺激 T 细胞产生其他细胞因子。此外, IL-2 还可以激活 B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞^[34]。Liu 等^[35] 和 Kittel 等^[36] 构建了一种可以在细胞内外源分泌的 IL-2 的重组流感病毒。病毒具有在小鼠肺部高效复制的特性, 在较高剂量 (2×10^5 PFU/只) 接种 6 周龄的小鼠后没有造成小鼠的死亡, 除了注射部位 IL-2 的分泌增高以外研究还发现, 针对该改造病毒特异的 T 细胞免疫应答水平也大幅增高, 这提示表达 IL-2 的重组病毒具有激活肿瘤免疫环境的能力。IL-15 在固有免疫和适应性免疫方面具有多

种功能, 并在 NK 细胞和 T 细胞的分化和增殖中起主要作用^[37]。为了提高溶瘤流感病毒的免疫刺激特性, Hock 等^[38] 在 NS1 缺失的基础上利用反向遗传学技术让病毒内源性表达 IL-15, 体外研究结果显示, 改造后的病毒能刺激 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的分化且促进 STAT5A/B 的磷酸化, 并且在小鼠结肠癌组织处募集了大量的 NK 细胞与效应记忆 T 细胞, 效应记忆 T 细胞产生的 IFN- γ 又能增强 CD8⁺ T 细胞在肿瘤组织中的浸润, 改善肿瘤免疫微环境。无论是内源还是外源表达的人白介素在通过流感病毒表达后都显著延长了该蛋白质在体内的半衰期及局部浓度, 并且大幅刺激机体产生 IFN- γ 、IL-4 等其他细胞因子。

3.2 表达 CTLA-4 单链抗体的溶瘤流感病毒

CTLA-4 是一种下调 T 细胞活化初始阶段的抑制性受体, 是检查点抗体的初始目标。Yervoy[®] 单抗药物的获批显示出 CTLA-4 在肿瘤治疗中的潜力。Hamilton 等^[39] 设计表达该抗体的流感病毒, 并证明编码阻止免疫检查点 CTLA-4 的单链抗体可增强流感病毒的抗癌活性。为了在病毒生命周期中表达抗体的具有复制能力的 IAV, 使用了聚合酶 PB1 和 PA 区段。为了从 IAV 表达 9H10 抗体, 将重链和轻链基因都插入了 IAV 基因组中。重链基因被克隆到 PB1 下游。将猪破伤风病毒 1 (PTV-1) 2A 序列插入 PB1 和重链基因之间, 以便进行 PB1 和重链蛋白的分离。另外, 将 IL-2 信号肽序列克隆在 2A 和重链序列之间, 以靶向新生的重链多肽并分泌。采用相同的策略将抗体的轻链表达在 PA 片段上。通过靶向免疫检查点 CTLA-4 的单链可变片段的表达进一步增强了 IAV 的溶瘤能力。B16-F10 黑色素瘤是一种高度侵袭性和转移性癌症模型, 以其在体内的快速生长而闻名^[40]。瘤内注射 IAV-CTLA-4 可有效抑制 B16-F10 肿瘤的生长。此外, 用 IAV-CTLA-4 进行治疗可介导明显的作用, 从而延迟未经治疗的远端肿瘤生长并延长了总生存期。

3.3 表达 HER-2 的溶瘤流感病毒

人类表皮生长因子受体 2 (HER-2/neu) 为一具有免疫原性的糖蛋白, 在卵巢癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤细胞中存在并高表达, 具有免疫原性的 HER-2/neu 肽可被 CTL 和 TH 识别, 是肿瘤治疗的重要靶点之一。Efferson 等^[41] 以流感病毒 A/PR/8/34 的 NA 基因为装载基因, 将 HER-2 中 9 个氨基酸构成的 CTL 表位 E75 插入到 NA 的茎部区域, 构建出重组流感病毒。感染该重组病毒的 DC 能产生高水

平的 IFN- α 并激发外周血单核细胞, 卵巢癌和乳腺癌患者相关的淋巴细胞对表达 HER-2 的肿瘤细胞产生特异性 CTL 效应, 并分泌 IFN- γ 和 IL-2。因此减毒性流感病毒能够作为肿瘤抗原的递呈载体, 可行使肿瘤疫苗的作用具有独特的应用价值^[42]。

3.4 碱基突变使溶瘤流感病毒溶瘤能力增强

文中已叙述部分恶性肿瘤组织中胰蛋白酶类似物 (elastase) 高表达^[12]。为了进一步将 IAV 靶向肿瘤, 将胰蛋白酶切割位点改为了弹性蛋白酶切割位点。Kuznetsova 等^[11] 将 NSI 基因截短的 A/Puerto Rico/8/34 流感病毒的 HA 碱性裂解位点处的氨基酸序列由 SIQSR343G344LFGA 变为 SIQSPI343G344LFGA, 选择该切割位点是因为在肿瘤微环境中表达了酶。此外, 先前已显示切割位点的交换减弱了肺中病毒的生长。新产生的弹性蛋白酶激活的 (elastase-activated) 流感病毒 AE 病毒在肿瘤细胞中的生长效价与胰蛋白酶激活的 (trypsin-activated) 对应病毒 AT 病毒相似。向 B16f1 黑色素瘤衍生的小鼠体内进行 AE 病毒的颅内注射, 与 AT 病毒相似, 可减少肿瘤的生长, 并且在异源人类 PANC-1 衍生的肿瘤中具有更好的治疗效果。因此, 在病毒 HA 中引入减毒标记“弹性蛋白酶切割位点”可以进行安全有效的溶瘤病毒治疗。

3.5 表达 GM-CSF 的新型甲型流感病毒并在肝癌细胞中具有溶瘤作用

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 是 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞分泌的单体糖蛋白。可以刺激干细胞产生粒细胞和单核细胞, 并在肿瘤治疗中起到很好的治疗效果。Yang 等^[43] 以 A/PR/8/34 为母本, 将 GM-CSF 编码序列插入到流感非结构蛋白基因中, 构建了 delNS1-GM-CSF 溶瘤病毒。delNS1-GM-CSF 病毒通过感染 MDCK、A549、SMCC7721 和 HepG2 肝癌细胞在内的各种细胞具有与野生型 A/PR/8/34 有着相同的病毒生长动力学。在 4 种肝癌细胞中 (SMMC-7721、HepG2、MHCC97L、Huh7.5) 细胞系中观察到了病毒的细胞杀伤作用, 而在正常肝细胞系 LO2 中未显示出细胞毒性。在肿瘤内注射病毒 HepG2 细胞构建的 BALB/c 裸鼠移植瘤模型后, 重配 delNS1-GM-CSF 病毒显著抑制了肿瘤的生长, 在 62 例肝癌临床样品离体实验中同样观察到了 delNS1-GM-CSF 的抑瘤作用^[43]。

3.6 表达抗程序性细胞死亡 1 (PD-1) 单克隆抗体的溶瘤流感病毒

PD-1 是一种重要的免疫抑制分子, 能够下调免疫系统使肿瘤细胞获得免疫逃逸。抗 PD-1 免疫检查点抑制剂的应用成为抗肿瘤的治疗方法^[44]。Lei 等^[45] 以流感病毒株 A/PR/8/34 为载体, 将免疫检查点抑制剂 PD-1 抗体基因插入到 PR8 病毒株 PB1、PA 片段后成功拯救出了溶瘤流感病毒 rFlu-a PD1。用重组溶瘤流感病毒 rFlu-a PD1 感染正常肝细胞 LO2、肝癌细胞系 HepG2、SMCC-7721 后发现显著降低了肝癌细胞的细胞活力而对正常的肝细胞没有明显的杀伤作用。又通过流式细胞的方法检测到 rFlu-a PD1 可诱导 HepG2 细胞凋亡。同时建立的肝癌 PDX 小鼠肿瘤经过 rFlu-a PD1 治疗后比对照组小鼠肿瘤体积有明显缩小。重组溶瘤流感病毒 rFlu-a PD1 选择性的感染肿瘤细胞, 且大量复制并最终杀伤肿瘤细胞, 成为肝癌免疫治疗的新方法^[45]。

4 总结和展望

OVs 是一类新型的抗肿瘤药物, 通过靶向肿瘤细胞和诱导全身抗肿瘤免疫的双重作用达到对肿瘤的杀伤效果。流感病毒具有作为溶瘤病毒的潜力, 其不仅可以直接裂解肿瘤细胞并激活机体免疫来杀伤肿瘤细胞, 也作为载体表达外源基因提高抗肿瘤靶向能力。虽然流感病毒作为危害人类身体健康主要致病原, 但经改造后具有安全递送外源基因的能力, 流感病毒在其复制周期中不包含 DNA 阶段, 因此排除了病毒基因整合到人类染色体的风险。溶瘤病毒的注射方法多为瘤内注射, 其他给药途径还需要进一步研究。不同流感病毒亚型的抗体往往具有较低的交叉保护能力, 因此通过使用属于不同抗原亚型的病毒载体来避免预存免疫也是今后研究的一个方向, 溶瘤流感病毒的多种亚型提供了多重溶瘤提供可能。最后, 以 T-VEC 溶瘤病毒联合检查点抑制剂 Yervoy、Keytruda 等免疫疗法取得的巨大成功提示更加合理地联合溶瘤流感病毒与其他抗肿瘤治疗方式可能会使溶瘤病毒有更加广阔的应用前景^[46]。

参 考 文 献

- [1] Delman K A. Introducing the “Virtual Tumor Board” series in CA: a cancer journal for clinicians. CA Cancer J Clin, 2020, 70(2): 77

- [2] Cook M, Chauhan A. Clinical application of oncolytic viruses: a systematic review. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(20): 7505
- [3] Todo T, Martuza R L, Rabkin S D, *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(11): 6396-6401
- [4] Zeng J, Li X, Sander M, *et al.* Oncolytic viro-immunotherapy: an emerging option in the treatment of gliomas. *Front Immunol*, 2021, **12**:721830
- [5] Finch C, Li W, Perez D R. Design of alternative live attenuated influenza virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, **386**:205-235
- [6] Mori K, Ohniwa R L, Takizawa N, *et al.* Development of a genetically stable live attenuated influenza vaccine strain using an engineered high-fidelity viral polymerase. *J Virol*, 2021, **95**(12): e00493-21
- [7] Wu N C, Wilson I A. Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, **10**(8): a038778
- [8] Ahn S, Lee H, Lim H, *et al.* Comparison of serum levels of Neu5Gc between normal and colorectal cancer patients with HPLC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*, 2019, **493**: S70-S70
- [9] Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S, *et al.* Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2, 6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology*, 2006, **16**(2): 146-154
- [10] Bottcher-Friebertshauer E, Freuer C, Sielaff F, *et al.* Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT Differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol*, 2010, **84**(11): 5605-5614
- [11] Kuznetsova I, Arnold T, Aschacher T, *et al.* Targeting an oncolytic influenza A virus to tumor tissue by elastase. *Mol Ther Oncolytics*, 2017, **7**: 37-44
- [12] Alain T, Kim T S, Lun X, *et al.* Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Mol Ther*, 2007, **15**(8): 1512-1521
- [13] Takizawa T, Ohashi K, Nakanishi Y. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol*, 1996, **70**(11): 8128
- [14] Chen G, Ma L C, Wang S, *et al.* A double-stranded RNA platform is required for the interaction between a host restriction factor and the NS1 protein of influenza A virus. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(1): 304-315
- [15] Zhirnov O P, Konakova T E, Wolff T, *et al.* NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, **76**(4): 1617
- [16] Muster T, Rajtarova J, Sachet M, *et al.* Interferon resistance promotes oncolysis by influenza virus NS1-deletion mutants. *Int J Cancer*, 2004, **110**(1): 15-21
- [17] Mccubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(8): 1263-1284
- [18] Alavi S, Stewart A J, Kefford R F, *et al.* Interferon signaling is frequently downregulated in melanoma. *Front Immunol*, 2018, **9**: 1414
- [19] García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, **252**(2): 324-330
- [20] Egorov A, Brandt S, Sereinig S, *et al.* Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol*, 1998, **72**(8): 6437-6441
- [21] Bos J L. Ras oncogene in human cancer : a review. *Cancer Res* 1989, **49**(17): 4682-4689
- [22] Mundschauf L J, Faller D V. Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem*, 1992, **267**(32): 23092-23098
- [23] Bergmann M, Romirer I, Sachet M, *et al.* A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res*, 2001, **61**(22): 8188
- [24] Efferson C L, Tsuda N, Kawano K, *et al.* Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8+ cells to recognize noninfected tumor cells. *J Virol*, 2006, **80**(1): 383-394
- [25] Nicolodi C, Groiss F, Kiselev O, *et al.* Safety and immunogenicity of a replication-deficient H5N1 influenza virus vaccine lacking NS1. *Vaccine*, 2019, **37**(28): 3722-3729
- [26] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, 2007, **13**(1): 54-61
- [27] Geiss G K, Salvatore M, Tumpey T M. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(16): 10736-10741
- [28] Sturlan S, Stremitzer S, Bauman S, *et al.* Endogenous expression of proteases in colon cancer cells facilitate influenza A viruses mediated oncolysis. *Cancer Biol Ther*, 2010, **10**(6): 592-599
- [29] Mcallister C S, Taghavi N, Samuel C E. Protein kinase PKR amplification of interferon beta induction occurs through initiation factor eIF-2alpha-mediated translational control. *J Biol Chem*, 2012, **287**(43): 36384-36392
- [30] Sachet M, Friedl J, Hassler M, *et al.* Improvement of a dendritic cell-based tumour vaccine by an influenza virus. *Eur J Clin Invest*, 2009, **39**(11): 1000-1009
- [31] Sturlan S, Sachet M, Baumann S, *et al.* Influenza A virus induces an immediate cytotoxic activity in all major subsets of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 2009, **4**(1): e4122
- [32] Masemann D, Kother K, Kuhlencord M, *et al.* Oncolytic influenza virus infection restores immunocompetence of lung tumor-associated alveolar macrophages. *Oncoimmunology*, 2018, **7**(5): e1423171
- [33] Balveen Kaur T P C, Chiocca E A. "Buy One Get One Free": armed viruses for the treatment of cancer cells and their microenvironment. *Curr Gene Ther*, 2009, **9**(5): 341-355
- [34] Dela Cruz J S, Huang T H, Penichet M L, *et al.* Antibody-cytokine

- fusion proteins: innovative weapons in the war against cancer. *Clin Exp Med*, 2004, **4**(2): 57-64
- [35] Liu M, Acres B, Balloul J M, *et al.* Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(Suppl. 2): 14567-14571
- [36] Kittel C, Ferko B, Kurz M, *et al.* Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*, 2005, **79**(16): 10672-10677
- [37] Budagian V, Bulanova E, Paus R, *et al.* IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, **17**(4): 259-280
- [38] Hock K, Laengle J, Kuznetsova I, *et al.* Oncolytic influenza A virus expressing interleukin-15 decreases tumor growth *in vivo*. *Surgery*, 2017, **161**(3): 735-746
- [39] Hamilton J R, Vijayakumar G, Palese P. A recombinant antibody-expressing influenza virus delays tumor growth in a mouse model. *Cell Rep*, 2018, **22**(1): 1-7
- [40] Kuzu O F, Nguyen F D, Noory M A, *et al.* Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research cancer growth metastasis, 2015, **8**(Suppl 1): 81-94
- [41] Efferson C L, Schickli J, Ko B K, *et al.* Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *J Virol*, 2003, **77**(13): 7411-7424
- [42] Gates J D, Benavides L C, Stojadinovic A, *et al.* Monitoring circulating tumor cells in cancer vaccine trials. *Hum Vaccin*, 2008, **4**(5): 389-392
- [43] Yang P, Fang S, Wang R, *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
- [44] Jin T, Zhang Q, Jin Q F, *et al.* Anti-PD1 checkpoint inhibitor with or without chemotherapy for patients with recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Transl Oncol*, 2021, **14**(2): 100989
- [45] Lei G, Li B, Yang H, *et al.* Therapeutic efficacy of an oncolytic influenza virus carrying an antibody against programmed cell death 1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, 2022, **33**(5-6): 309-317
- [46] Haitz K, Khosravi H, Lin J Y, *et al.* Review of talimogene laherparepvec: a first-in-class oncolytic viral treatment of advanced melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 2020, **83**(1): 189-196

Research Progress of Oncolytic Influenza Virus*

LIANG Liang¹⁾, TANG Lei¹⁾, SHI Hua-Ran¹⁾, FANG Zhong-Yue¹⁾, Ou Xia¹⁾, YANG Fan¹⁾,
ZHANG Ji-Hong¹⁾, YANG Jing-Hui^{2)**}

¹⁾Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

²⁾The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

Abstract Oncolytic virus therapy belongs to immunotherapy. It can achieve the purpose of killing tumors by virus-specific infection and activating tumor immunity. Compared with traditional therapies, it has the advantages of safety, efficiency, and less side effects. A variety of viruses have been studied, and commonly used viruses include adenovirus, vaccinia virus, herpes virus, reovirus, parvovirus, Newcastle disease virus, Coxsackie virus, etc. for oncolytic therapy, and have been used in clinical and achieved good therapeutic effect. With the continuous development of oncolytic viruses, there are currently 4 oncolytic viruses approved for marketing: Rigvir®, Oncorine®, Imlygic® and Delytact®. Currently many viruses used in tumor treatment. Since the influenza virus were first discovered in the 1900s as a “beneficial” virus to alleviate leukemia, there have been studies that prove that influenza viruses have the ability to kill tumor cells. Researchers have made many attempts in the process of fighting influenza. The process of developing inactivated vaccines, live attenuated vaccines, and subunit recombinant influenza vaccines accumulated valuable experience for further building oncolytic viruses. Influenza viruses were one of the first viruses to be used in tumor treatment. With the development of molecular biology, it is now possible to artificially intervene in many of the traits of viruses. The mechanism of oncolytic influenza virus become more and more in-depth, and the current mode of action of oncolytic influenza virus can be summarized as the following 3 points: (1) the virus directly lyses tumor cells; (2) viruses activate immunity to kill tumor cells; (3) viruses expressing exogenous genes as vectors improves both of these abilities. In this review, the modified influenza virus has stronger selectivity for pancreatic enzymes secreted by tumor cells with interferon-deficient *RAS* mutations to improve tumor targeting. The single-chain antibody encoding CTLA-4 or HER-2 enhances the anticancer specificity of influenza virus and acts as the carrier of foreign genes IL-2, IL-15, GM-CSF and anti-PD-1 to activate immunity are reviewed.

Key words oncolytic viruses, influenza virus, oncolytic effect

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0399

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81860281, 81960555), Science and Technology Plan Project of Science&Technology Department of Yunnan Province (2019FB108), Top Experts Training Project for the Academy and Technology in Kunming City and Yunnan Province (202105AC160030), Yunnan Health Training Project of High Level Talents (D-2017054), Research Project of Health Commission of Yunnan Province (2017NS213, 2018NS234), and Open Project of Yunnan Provincial Key Laboratory of Clinical Virology Science Research Foundation of Yunnan Provincial (202005AG070062-015).

** Corresponding author.

Tel: 86-13888067280, E-mail: yangjh1029@163.com

Received: December 24, 2021 Accepted: February 17, 2022