DOI:10.16016/j.2097-0927.202407051

嵌合 IL-21 的重组溶瘤流感病毒构建及其在肝癌中的溶瘤机制

曹 蕊[1],曾桂能[2],田昱莹[1,2],李 聪[1,2],肖瑞雪[1],徐永茹[2],杨鹏辉[2],康毅敏[1] 010110 呼和浩特,内蒙古医科大学基础医学院[1]; 100853 北京,中国人民解放军总医院第一医学中心肝胆胰外科医学部研究所[2]

[**摘要**] **目的** 拯救嵌合白细胞介素-21(interleukin-21,IL-21)的重组溶瘤流感病毒,评价其对肝细胞癌的抑制效果及安全性,并探索其联合程序性死亡受体 1(programmed cell death-protein 1,PD-1)抗体增强抗肿瘤作用的机制。**方法** 将 IL-21 基因片段插入流感病毒 PR8 的非结构蛋白(nonstructural protein,NS)序列,利用反向遗传学(reverse genetics,RG)技术,拯救重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS;采用半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infectious dose,TCID50)和血凝实验测定病毒滴度和毒力;采用反转录定量聚合酶链反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)、凝胶电泳和测序分析验证外源基因是否成功插入 NS 序列;通过透射电镜观察病毒形态特征及大小,采用 CCK-8 检测其对肝癌细胞活力的影响;建立 C57BL/6 小鼠肝细胞癌皮下荷瘤模型,将 45 只 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠(体质量 16~20 g)按简单随机分组法分为 5 组(每组 9 只):PBS 组、PR8 组、PD-1 抗体组、rOV-IL-21-NS 组和 rOV-IL-21-NS 联合 PD-1 抗体治疗组,以评价单药和联合疗法抗肿瘤效果;通过流式细胞术评价单药和联合疗法对肿瘤免疫微环境的调控作用。**结果** 利用 RG 技术成功拯救重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS,经测序验证了 IL-21 成功插入目的序列,其可稳定传代,第 6 代病毒血凝效价达 2^{11},病毒滴度达 10^6 TCID50/mL。rOV-IL-21-NS 选择性降低肝癌细胞活力而对正常肝细胞无明显影响。相对于 PBS 组,rOV-IL-21-NS 联合 PD-1 抗体显著抑制小鼠肿瘤的生长($P<0.001$),增加脾脏组织中 $CD4^+CD69^+$T 及 $CD8^+CD69^+$T 细胞的比例($P<0.05$)。**结论** 嵌合 IL-21 的重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS 可有效、安全地靶向杀伤肝癌细胞,协同 PD-1 抗体进一步增强 T 细胞活化,改善免疫微环境。

[**关键词**] 溶瘤病毒;反向遗传学技术;联合治疗;白细胞介素-21;PD-1 抗体;肝细胞癌
[**中图法分类号**] R392.2; R730.51; R735.7 [**文献标志码**] A

Construction of chimeric IL-21 recombinant oncolytic influenza virus and mechanisms for its antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma

CAO Rui[1], ZENG Guineng[2], TIAN Yuying[1,2], LI Cong[1,2], XIAO Ruixue[1], XU Yongru[2], YANG Penghui[2], KANG Yimin[1] [1]School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, 010110; [2]Faculty of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China

[**Abstract**] **Objective** To rescue a recombinant oncolytic influenza virus chimeric with IL-21 and evaluate its inhibitory effects and safety against hepatocellular carcinoma (HCC) both *in vitro* and *in vivo*, and to explore the mechanism by which this virus enhances antitumor effects when combined with anti-programmed cell death protein 1 (anti-PD-1) antibody. **Methods** The IL-21 gene fragment was inserted into the nonstructural protein (NS) sequence of the influenza virus PR8 using reverse genetics (RG) technology to rescue the recombinant oncolytic influenza virus rOV-IL-21-NS. The virus titer and virulence were determined using the 50% tissue culture infectious dose (TCID50) and hemagglutination assays. The successful insertion of the exogenous gene into the NS sequence was verified using RT-qPCR, gel electrophoresis, and sequencing

[**通信作者**] 康毅敏, E-mail: kangym@immu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

analysis. Viral morphology and size were observed with transmission electron microscopy. The impact of the virus on the viability of hepatocellular carcinoma cells was assessed with CCK-8 assay. A subcutaneous tumor model of HCC was established in 45 female C57BL/6 mice (8 weeks old, weighing 16~20 g), and then the mice were randomly assigned into PBS, PR8, anti-PD-1, rOV-IL-21-NS, and the rOV-IL-21-NS+anti-PD-1 treatment groups, with 9 mice in each group, to evaluate the anti-tumor effects of monotherapy versus combination therapy. Flow cytometry was conducted to assess the regulatory effects of monotherapy and combination therapy on the tumor immune microenvironment. **Results** RG technology successfully rescued the recombinant oncolytic influenza virus rOV-IL-21-NS. Sequencing confirmed the successful insertion of IL-21 into the target sequence, and the obtained virus could be stably propagated, with its sixth passage reaching a hemagglutination titer of 2^{11}, and a viral titer of 6 Log_{10}(TCID50/mL). Oncolytic virus rOV-IL-21-NS, at a multiplicity of infection (MOI) of 3, selectively reduced the viability of HCC cells without significantly affecting normal liver cells. Compared to the control group, the combination of rOV-IL-21-NS and anti-PD-1 antibodies significantly inhibited tumor growth ($P<0.001$) and increased the proportions of $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cells in the spleen tissue of the mouse model of subcutaneous HCC tumor ($P<0.001$). **Conclusion** The recombinant oncolytic influenza virus rOV-IL-21-NS chimeric with IL-21 can effectively and safely exert targeted killing to HCC cells, enhance T cell activation by synergizing with anti-PD-1 antibodies, and improve the immune microenvironment.

[**Key words**] oncolytic virus; reverse genetic technology; combination therapy; IL-21; anti-programmed cell death protein 1 antibody; hepatocellular carcinoma

Corresponding author: KANG Yimin, E-mail: kangym@immu.edu.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是全球癌症相关死亡的三大原因之一,对全球医疗保健构成重大挑战[1]。大部分 HCC 患者在确诊时已为晚期,手术切除、放疗、靶向与免疫联合治疗等是目前主要的治疗方式。随着新的一线药物和二线药物的批准及基于免疫检查点抑制剂疗法的建立,晚期 HCC 的治疗手段向多样化发展[2],但大多数晚期 HCC 患者仍存在耐药性和疾病超进展的问题,临床上亟需新的治疗策略。

溶瘤病毒(oncolytic virus,OVs)因其溶瘤作用高、耐药率低的特点在肿瘤免疫治疗领域受到高度关注。流感病毒主要通过其表面的血凝素(hemagglutinin,HA)结合靶细胞表面的唾液酸受体来介导病毒的入侵。HCC 细胞上的唾液酸受体有唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(Siglec-9 和 Siglec-15)、CD44、整合素 α2β1 和 α3β1 等,这是靶向溶瘤的基础[3]。激活抗肿瘤免疫反应是 OVs 抗肿瘤的关键,OVs 通过杀死肿瘤细胞、释放抗原和将先天效应细胞募集到肿瘤部位,将免疫原性的“冷”肿瘤转化为“热”肿瘤[4]。由于缺乏细胞内抗病毒机制,病毒复制只发生在肿瘤细胞中[5]。此外,OVs 可激活宿主的先天性和适应性免疫反应,从而激活 $CD8^+$和 $CD4^+$T 细胞参与免疫反应[6]。流感病毒作为单链 RNA,因其基因组的易操作性,而成为首选的溶瘤病毒载体。

细胞因子是一种由免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质,通过控制细胞的增殖、分化、存活和效应功能来调节先天性和适应性免疫系统。在临床前研究和临床试验中,携带细胞因子或趋化因子的 OVs 显示出潜在的抗肿瘤特性。白细胞介素-21(interleukin-21,IL-21)属于 I 型细胞因子,是常见细胞因子受体 γ 链(CG-chain)家族的成员,主要由 $CD4^+$ T 细胞亚群和自然杀伤 T(natural killer T,NKT)细胞产生[7-8]。IL-21 在淋巴细胞的发育、分化、存活和功能中起着至关重要的作用,可促进适应性和先天性免疫细胞的抗肿瘤反应。IL-21 可调节多种免疫细胞及血管抑制特性,具有增强抗肿瘤免疫反应的能力。因此,嵌合细胞因子的重组溶瘤病毒是潜在的癌症治疗的候选药物。

OVs 感染肿瘤细胞激活抗肿瘤免疫应答后,其抗肿瘤活性受到程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death protien 1, PD-1)和程序性细胞死亡配体 1(programmed cell death ligand 1,PD-L1)等多种免疫调节因子的抑制,难以获得持续的抗肿瘤免疫反应。许多肿瘤内上调的免疫检查点产生免疫抑制性肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME),导致肿瘤免疫逃逸[9]。免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)抑制肿瘤免疫抑制信号通路,并使肿瘤细胞暴露于宿主免疫系统的识别中。OVs 可产生高度免疫浸润的炎性 TME,并通过募集、启动和激活抗肿

瘤 T 细胞恢复 ICIs 反应性。

OVs 单独抗肿瘤效果有限,与放疗、化疗和免疫治疗等方法联合使用是目前研究热点。因此,本研究基于反向遗传学技术,拯救嵌合 IL-21 的重组溶瘤流感病毒,通过体内外试验评价该病毒及其联合 PD-1 抗体在肝细胞癌治疗中的作用,探索重组溶瘤病毒的联合治疗诱导的细胞免疫反应变化,为肝细胞癌免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系

犬肾细胞 MDCK、非洲绿猴肾细胞 COS1、人肝星状细胞 LX2 和人肝癌细胞 Huh7 购自美国细胞培养物收藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)细胞库,小鼠肝细胞 AML12 和小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 由解放军总医院肝胆研究所提供。

1.2 主要试剂与材料

DMEM 基础培养基、胎牛血清购自美国赛默飞世尔科技公司;DMSO 购自美国 Sigma 公司;AML12 细胞培养基购自中国普诺赛生命科技有限公司;胰酶购自中国华兴博创基因技术有限公司;TRIzol 购自美国英杰生命技术有限公司;兔二步法检测试剂盒、小鼠二步法检测试剂盒、伊红染色液和 DAB 显色试剂盒购自中国中山金桥生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自中国宇峰生物科技有限公司;QIAprep 质粒小提试剂盒购自德国凯杰公司;1%鸡红细胞悬液购自中国鸿宇生物有限公司;IL-21 兔抗体、CD4 兔抗体、CD8A 兔抗体、Ki67 兔抗体购自中国爱博泰克生物技术公司;第一链合成试剂盒购自中国全式金生物;青-链霉素溶液(100×)、中性树胶和 TAE(50×)购自中国索莱宝科技有限公司。

1.3 病毒与质粒

流感病毒 PR8 及其 8 个骨架质粒(pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M、pHW198-NS)及载体(pHW2000-NS)由解放军总医院肝胆研究所提供。

1.4 实验动物

非免鸡胚购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司(许可证号:SCXK 京 2019-0007);45 只 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠(体质量为 16~20 g)购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(许可证号:SCXK 京 2024-001);动物实验的设计、实施已获得内蒙古医科大学医学伦理委员会的批准(YKD202401188),符合实验动物福利伦理原则。

1.5 重组质粒 pOV-IL-21-NS 的构建

通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)查找 IL-21 的基因序列,首先将 IL-21 编码序列(coding sequence, CDs)按照 PR8 流感病毒的密码子进行优化,然后将流感病毒 PR8 骨架质粒非结构蛋白(nonstructural protein, NS)插入 PHW2000 载体中,再通过 IIS 型限制酶(*Bsm*BI)将优化后的 IL-21 序列亚克隆至 PHW2000-NS 载体第 1 298 位点。由上海生物工程技术服务有限公司合成,并通过琼脂糖电泳验证序列。

1.6 拯救重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS

将重组质粒 pOV-IL-21-NS 替换 pHW198-NS,并同其他 7 个骨架质粒分别稀释至 250 ng/μL。将比例为 2∶1的 COS1 细胞、MDCK 细胞铺到 6 孔板共培养,待细胞长至 80%~90%后,PBS 冲洗 3 遍,加入无血清的 DMEM 培养基。将 8 个骨架质粒各取 1 μL 等量混匀,按照转染试剂盒说明书共转染上述所培养细胞,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后在-80 ℃冰箱冻存。将收取的病毒注射至 9 日龄非免鸡胚的尿囊腔,200 μL/枚,在 37 ℃孵箱中孵育 72~96 h。

1.7 重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS 的鉴定及病毒形态学检测

1.7.1 血凝实验 鸡胚孵育 72 h 后放置 4 ℃冰箱 12 h,吸取 100 μL 鸡胚尿囊液于血凝板中,稀释 2^{12} 倍,加入 50 μL 1%鸡红细胞,静置 30 min 测定血凝效价。

1.7.2 RT-qPCR 鉴定 将第 3 代 rOV-IL-21-NS 鸡胚尿囊液以 4 ℃、32 000 r/min 离心 2 h,病毒浓缩后采用 TRIzol 法提取病毒 RNA,并反转录为 cDNA,用甲型流感病毒 NS 前引物(5′-AAGACCAATCCTGTCACCTCTG-3′)和反引物(5′-CAAAACGTCTACGCTGCAGTCC-3′)进行 PCR 扩增,将产物送至上海生物工程技术服务有限公司进行测序比对。

1.7.3 电镜观察 rOV-IL-21-NS 将收集的病毒液以 32 000 r/min 离心 1.5 h,用 1 mL PBS 重悬沉淀,依次加入过滤的 60%和 30%的蔗糖溶液以 4 ℃、32 000 r/min 梯度离心 4 h。吸取白色病毒带,PBS 重悬后 32 000 r/min 离心 2 h 去蔗糖,用 PBS 将白色沉淀悬浮,即为高浓度的 rOV-IL-21-NS。将浓缩的病毒吸附到铜网上 5 min,用滤纸吸去多余的病毒。用 2%磷钨酸(pH 值为 7.0)染色 30 s,用滤纸吸去多余的染液。用 JEOL 1230 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)观察病毒粒子的大小与形态。

1.8 体外评价重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS

1.8.1 rOV-IL-21-NS 滴度测定 将 MDCK 细胞培养至 96 孔板中,待细胞生长到 90%左右,PBS 清洗 2 遍去除残留血清。通过 DMEM 基础培养基将病毒依次倍比稀释 10^{10} 倍,将稀释液依次加入到 96 孔板培

养的 MDCK 细胞中,200 μL/孔,每组设 3 个复孔;空白孔加入等量 PBS,在 37 ℃培养箱放置 5 d,最后吸取 50 μL 细胞上清液,加入 1%鸡红细胞测定血凝效价。

1.8.2 rOV-IL-21-NS 的生长曲线 待 96 孔板的 MDCK 细胞长至 90%时,PBS 清洗 2 遍,通过 DMEM 基础培养基将病毒依次倍比稀释 10^{10} 倍,逐孔加入细胞板,分别在 24、48、72、96 h 吸取 50 μL 细胞上清,加入 1%鸡红细胞测病毒滴度。

1.8.3 CCK-8 实验 将小鼠正常肝细胞 AML12、小鼠肝癌细胞 Hepa1-6、人正常肝星状细胞 LX2 和人肝癌细胞 Huh7 铺至 96 孔细胞板中,待细胞长至单层 90%,用 PBS 清洗 3 遍。通过 DMEM 基础培养基将病毒稀释,MOI 分别为 0.1、1 和 3,每个梯度设 3 个复孔,加入 200 μL 病毒稀释液,空白对照组加入等体积 DMEM 基础培养基。同样方法准备 3 个细胞板用于检测 24、48、72 h 的细胞活性。最后在指定时间内,PBS 清洗 2 遍细胞板,并加入 9∶1混匀的 DMEM 和 CCK-8 试剂,100 μL/孔,避光孵育 1~4 h,在酶标仪检测 450 nm 处光密度值[D(450)]。

1.9 体内实验评价重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS

1.9.1 构建肝细胞癌小鼠皮下荷瘤模型 选择 45 只 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠(体质量为 16~20 g),将培养的 Hepa1-6 细胞消化、以 25 ℃、1 000 r/min 离心 3 min 后用 1 mL PBS 重悬,计数后用 PBS 将细胞稀释至 5×10^6 个/100 μL,放置冰上,每只小鼠皮下注射 100 μL 细胞悬液于右侧腹股沟。每天测量小鼠肿瘤体积,1 周后肿瘤长至 100~130 mm^3。小鼠按简单随机分组法分成 5 组:PBS 组、PR8 组、rOV-IL-21-NS 组、PD-1 抗体组和 rOV-IL-21-NS 联合 PD-1 抗体治疗组(联合治疗组),每组 9 只。PBS 组、病毒组(PR8 组和 rOV-IL-21-NS 组)和联合治疗组间隔 1 d 给药 1 次,每次瘤内注射 100 μL PBS 或病毒(1×10^7PFU/100 μL),共 6 次;PD-1 抗体组和联合治疗组每 3 天腹膜内注射 1 次 PD-1 抗体(10 mg/kg)。每天观察小鼠生命体征与活动状态,2 d 测量 1 次肿瘤大小并记录[肿瘤体积(mm^3)=长径(mm)×短径(mm)^2/2],直到实验终点(动物死亡或肿瘤体积≥1 500 mm^3)。

1.9.2 流式细胞术 用异氟烷将小鼠麻醉后处死,取出脾脏,剪碎并加入含 2%血清的 RPMI-1640 培养基充分研磨,以 25 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃掉上清,用 200 μL 2% RPMI-1640 培养基重悬脾细胞,加入圆底 96 孔板中,25 ℃、2 000 r/min 离心 1 min,弃掉上清,每孔加入 50 μL 刺激剂重悬细胞,在 37 ℃下孵育 5 h 后以 25 ℃、2 000 r/min 离心 1 min,弃去上清。按 1∶400 配制抗体,表面标志抗体用 2%的 RPMI-1640 培养基、胞内标志抗体用破膜剂配制。加入表面染色抗体 CD4、CD8 和 CD69,4 ℃孵育 20 min,加入 180 μL PBS 以 2 000 r/min 离心 1 min,弃上清加入 85 μL FIX 室温孵育 20 min。加入 120 μL perm 离心 1 min 后弃掉上清,加入胞内染色抗体,30 μL/孔,室温孵育 20 min,然后加入 180 μL perm 离心 1 min,用 180 μL FACS 重悬细胞上机分析。采用 FlowJo 软件分析流式细胞结果。

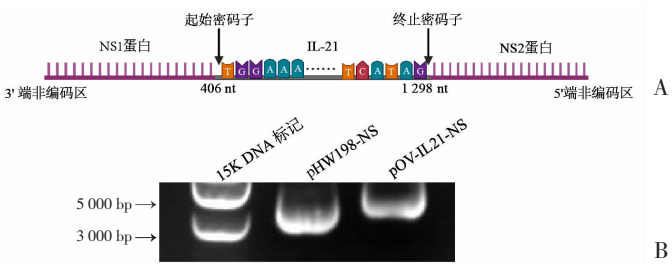
1.10 统计学分析

用 SnapGene 对嵌合 IL-21 的重组溶瘤病毒碱基序列进行比对,采用 GraphPad Prism 8.0 分析数据。数据间比较采用单因素方差分析,P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

将流感病毒 PR8 的 NS 骨架克隆到 pHW2000 载体中,再将优化后的 IL-21 基因序列亚克隆至 pHW2000-NS 上,得到嵌合 IL-21 的重组表达载体 pOV-IL-21-NS(图 1A)。将重组质粒 pOV-IL-21-NS 与空质粒 pHW198-NS 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示,空质粒大小约 3 000 bp,重组质粒大小约 4 500 bp(图 1B),表明重组质粒构建合成成功。



A:重组质粒 pOV-IL-21-NS 的构建;B:重组质粒 pOV-IL-21-NS 的琼脂糖凝胶电泳鉴定

图 1 pOV-IL-21-NS 重组质粒的构建及鉴定

2.2 成功拯救重组溶瘤流感病毒并鉴定

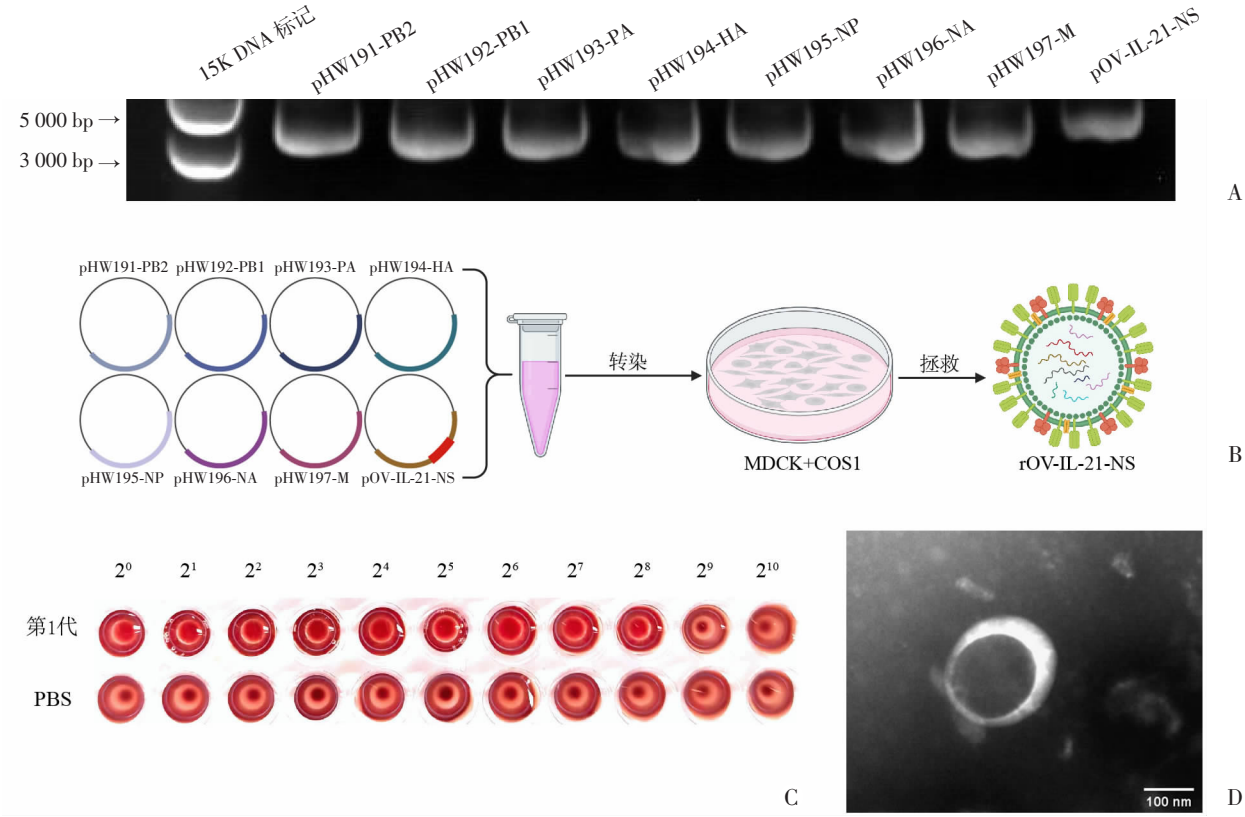
重组质粒 pOV-IL-21-NS 与 PR8 其余 7 个骨架质粒(pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M)(图 2A)共转染 COS1 和 MDCK 细胞,成功拯救重组溶瘤流感病毒 rOV-IL-21-NS(图 2A、B)。rOV-IL-21-NS 的第一代血凝效价为 2^8(图 2C)。将 rOV-IL-21-NS 超离纯化,在磷钨酸负染条件下,通过透射电镜观察,发现病毒形态为圆球状,内部核衣壳包裹一层囊膜,膜外表一圈明亮区为纤毛,病毒粒子直径约 120 nm(图 2D),符合流感病毒的典型特征。

2.3 rOV-IL-21-NS 的毒力及在体外抑制肿瘤细胞的作用

rOV-IL-21-NS 经非免鸡胚稳定传代,第 6 代血凝效价可达 2^{11}(图 3A),病毒滴度为 10^6 TCID50/mL(图 3B)。通过病毒体外生长曲线发现重组流感病毒效价在 24~96 h 逐渐升高,在 96~120 h 逐渐下降($P<0.001$,图 3C)。CCK-8 结果显示,重组溶瘤病毒对小鼠正常肝细胞 AML12 和人正常肝星状细胞 LX2 没有影响(图 3D、E),而在 24 h 时,感染复数为 1 和 3 的重组溶瘤病毒作用下的小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 和人肝癌细胞 Huh7 的细胞活力与感染复数为 0.1 时相比,有明显下降趋势($P<0.01$,图 3F、G)。

2.4 rOV-IL21-NS 联合 PD-1 抗体有效抑制体内肿瘤生长

比较联合治疗组与 PBS 组、rOV-IL-21-NS 组和 PD-1 抗体组在 Hepa1-6 荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤作用(图 4A),结果发现,联合治疗组中的荷瘤小鼠肿瘤生长最为缓慢,其次是 rOV-IL-21-NS 组和 PD-1 抗体组(图 4B)。此外,联合治疗组与 PBS 组平均体积差异具有统计学意义($P<0.001$,图 4C、D)。结果还发现,联合治疗组相比 PBS 组,小鼠生存时间更久($P<0.01$,图 4E)。

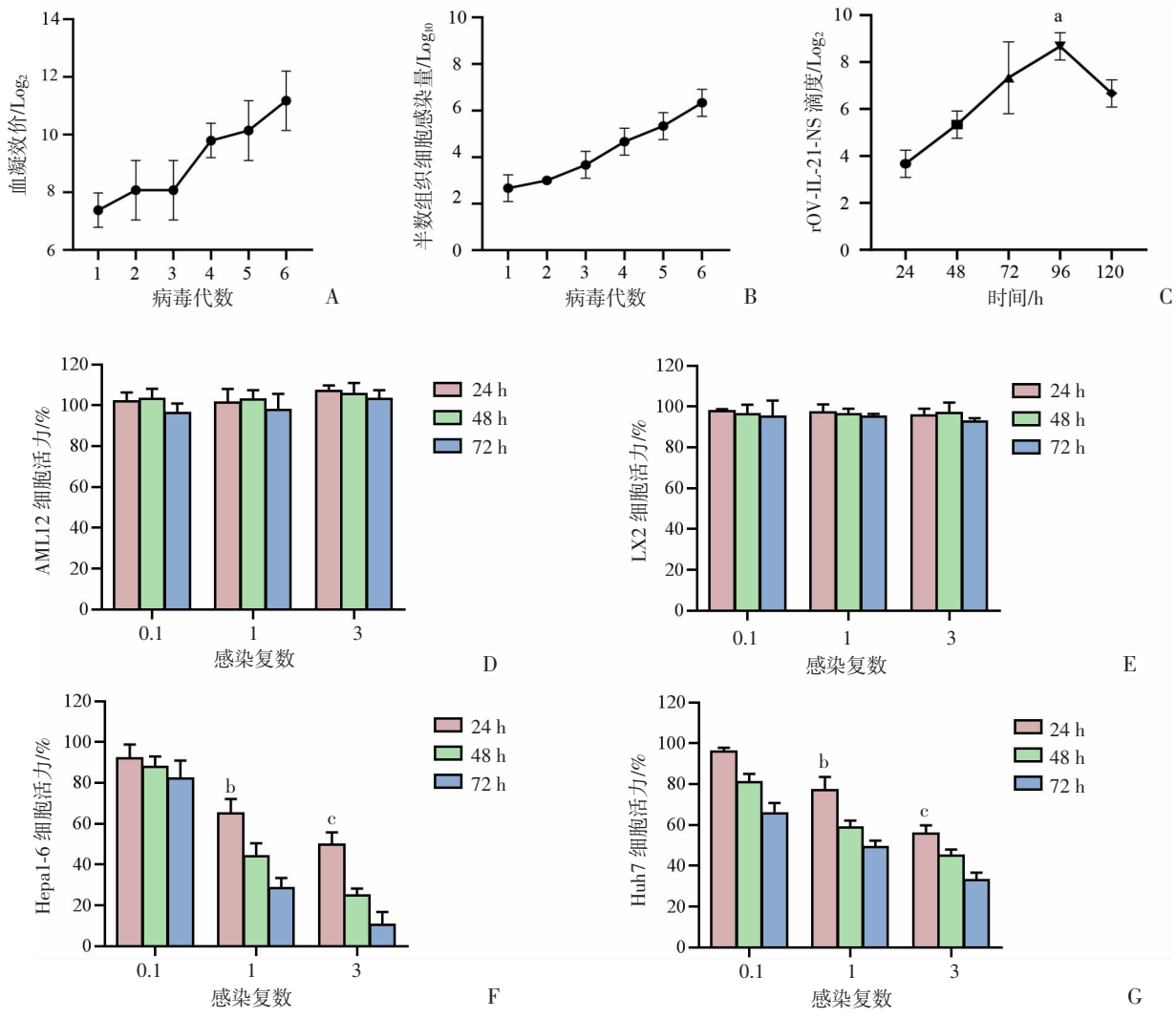


A:质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定;B:反向遗传学技术拯救 rOV-IL-21-NS 的示意图;C:第 1 代 rOV-IL-21-NS 的血凝效价;D:rOV- IL-21-NS 的负染透射电镜图

图 2 rOV-IL-21-NS 的拯救及鉴定

2.5　联合治疗显著增加 T 细胞的数量

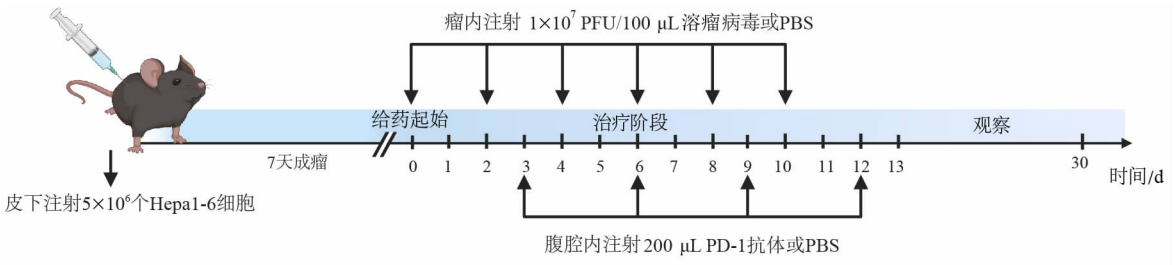
T 细胞在抗肿瘤免疫中起关键作用,通过流式分选,发现接受单药治疗和联合治疗小鼠脾脏中的 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$T 细胞处于早期激活状态(图 5A、B),$CD69^+$T 细胞较 PBS 组均有增加,且联合治疗组增加更为显著($P<0.05$,图 5C、D)。以上数据表明,rOV-IL-21-NS 联合 PD-1 抗体治疗促进了 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞的活化,增强了抗肿瘤的免疫反应。



a: $P<0.001$,与 24 h 比较;b: $P<0.01$, c: $P<0.001$, 与对应时间感染复数 0.1 组比较

A:rOV-IL-21-NS 血凝效价测定;B:rOV-IL-21-NS 的 TCID50 测定;C: rOV-IL-21-NS 生长曲线;D~G:CCK-8 法检测 rOV-IL-21-NS 对 AML12、LX2、Hepa1-6、Huh7 细胞活力的影响

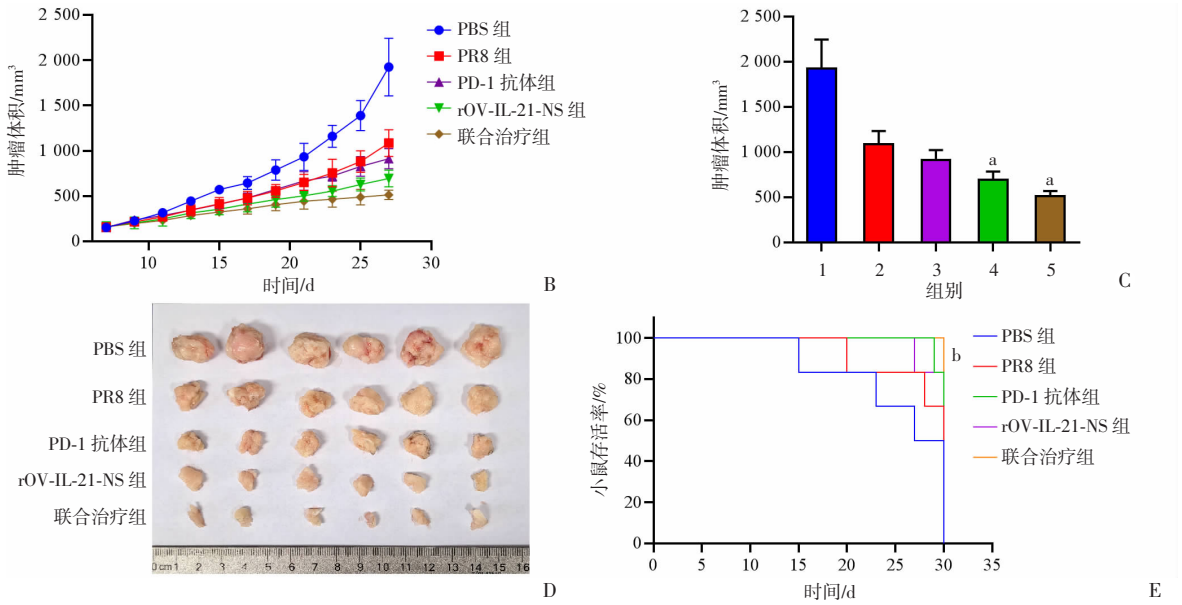
图 3　rOV-IL-21-NS 的毒力及体外抑制肿瘤细胞能力的测定



A:小鼠实验流程图

图 4　体内评价单药和联合治疗组抗肿瘤作用

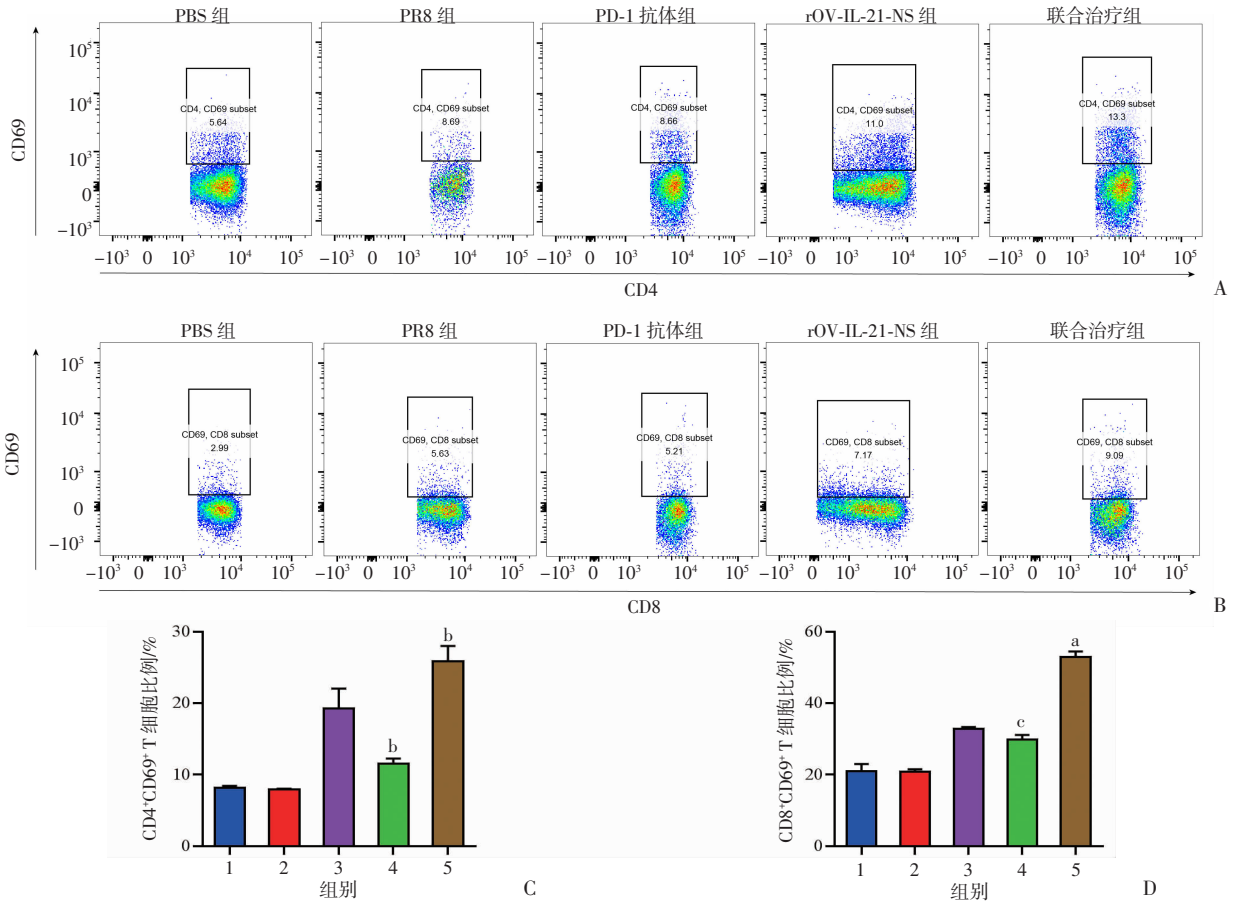
(图 4B~E 续下页)



a:$P<0.001$,与 PBS 组比较; b: $P<0.01$,与 PBS 组比较

B:各组小鼠肿瘤体积变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$);C:第 27 天各组小鼠肿瘤体积统计分析($n=6$, $\bar{x}\pm s$) 1: PBS 组; 2: PR8 组; 3: PD-1 抗体组; 4: rOV-IL-21-NS 组; 5: 联合治疗组; D:各组小鼠肿瘤组织大体观;E:各组小鼠存活率

续图 4 体内评价单药和联合治疗组抗肿瘤作用



1: PBS 组; 2: PR8 组; 3: PD-1 抗体组; 4: rOV-IL-21-NS 组; 5: 联合治疗组; a: $P<0.001$,与 PBS 组比较;b:$P<0.05$,与 PBS 组比较;c:$P<0.01$,与 PBS 组比较

A、C:流式细胞术检测脾脏组织中 $CD4^+CD69^+$ T 细胞比例;B、D:流式细胞术检测脾脏组织中 $CD8^+CD69^+$ T 细胞比例

图 5 流式细胞术检测 T 细胞活化比例 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

溶瘤病毒致使肿瘤细胞死亡的机制是多方面的,很多临床前和临床研究证明了其对肿瘤有直接裂解和诱导免疫原性细胞死亡以及促进先天性和适应性免疫的作用[10]。此外,用细胞因子"武装"OVs是一种行之有效的改善肿瘤治疗效果的方法,即通过基因改造将免疫细胞刺激因子、肿瘤受体基因或相关靶标基因的配体等插入OVs[11]。作为一种基因载体,OVs具有特异性肿瘤趋向性,将细胞因子靶向递送至肿瘤微环境中。

本课题组前期利用具有自主知识产权的RG技术平台成功拯救了嵌合OX40L[12]、PD-L1[13]、CTLA4[14]、GM-CSF[15]、GV1001[16]的多株重组溶瘤流感病毒。本研究通过优化IL-21基因序列并亚克隆至PHW2000-NS载体,利用RG技术成功拯救获得重组溶瘤流感病毒rOV-IL-21-NS;其在非免鸡胚中稳定传代后HA效价可达2^8~2^{11};病毒滴度达10^6TCID50/mL;电镜观察病毒形态为圆球状,病毒粒子直径大小约120 nm,符合流感病毒的典型特征;rOV-IL-21-NS感染MDCK细胞96 h达到病毒复制高峰;CCK-8法检测rOV-IL-21-NS对不同细胞活力的影响,结果显示,rOV-IL-21-NS对AML12和LX2细胞没有明显影响,但对肝癌细胞系Hepa1-6和Huh7细胞具有选择性杀伤作用且具有剂量依赖性。

CHEN等[17]构建了一种溶瘤腺病毒可共表达CCL21和IL-21,该病毒可以在TERTp阳性肿瘤细胞中选择性复制,诱导TERTp阳性肿瘤细胞凋亡。将表达IL-21的重组牛痘病毒应用于3种肿瘤小鼠模型(黑色素瘤、神经胶质瘤、结肠癌)中,可引起肿瘤部位的免疫效应细胞选择性富集、持久的肿瘤消退,提高存活率[17]。IL-21促进$CD8^+$T细胞、NK细胞和B细胞介导的抗肿瘤反应,为肿瘤治疗提供了新的选择[18]。本研究结果表明,与PR8组相比,rOV-IL-21-NS组小鼠肿瘤生长更为缓慢,生存率得到提高。流式细胞分析结果表明,小鼠脾脏中$CD8^+$T细胞的活化比例增加程度更为显著。据此推测嵌合IL-21的重组溶瘤流感病毒能激活$CD8^+$T细胞免疫应答反应,从而发挥抗肿瘤作用。

研究显示,OVs通过与其他癌症疗法联合使用,尤其是与免疫治疗的结合,可以使其潜力扩展[19]。免疫检查点抑制剂,如PD-1蛋白,是一种T细胞共抑制受体,其主要配体PD-L1在肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的能力中起着关键作用。PD-L1在实体瘤中上调,可抑制$PD\text{-}1^+$、肿瘤浸润性$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的细胞因子产生和细胞溶解活性[20-21]。在临床前模型中,阻断PD-1和PD-L1之间的相互作用可增强体外免疫功能并介导抗肿瘤活性[22],是癌症免疫治疗的重要靶点。免疫检查点阻断疗法对免疫"冷"肿瘤的疗效可以通过将检查点抑制剂与溶瘤病毒联合使用来增强[23-25]。在OVs和ICIs或细胞因子的联合治疗中,增强抗肿瘤免疫活性可以消除未经治疗的肿瘤并长期保持[26]。在T-VEC联合帕博利珠单抗的Ib期临床试验中,转移性黑色素瘤患者的总体和完全缓解率分别达到62%和33%[27]。本研究显示,联合PD-1抗体后发现,与rOV-IL-21-NS组相比,rOV-IL-21-NS与PD-1抗体联合治疗进一步抑制了小鼠肿瘤生长,到观察终点,联合治疗组肿瘤体积显著小于对照组及单药组,且无小鼠在治疗过程中死亡;流式细胞术结果表明,联合PD-1抗体不仅促进$CD8^+$T细胞活化,也使$CD4^+$细胞活化程度得到提高。提示溶瘤病毒与PD-1抗体联合可显著增强抗肿瘤效果。为进一步评估溶瘤病毒与PD-抗体联合用药策略应用于肝细胞癌临床治疗的可行性,还需在小鼠原位肝细胞癌模型上评价联合用药的抗肿瘤效果。

综上所述,rOV-IL-21-NS联合PD-1抗体治疗可以克服单药治疗的局限性,在安全的前提下提高杀伤肿瘤细胞能力。PD-1抗体在这种组合中不仅可以直接抑制肿瘤生长,还可通过增加感染率显著增强rOV-IL-21-NS的溶瘤作用。本研究为肝细胞癌治疗提出了一种有前途的联合策略,但仍需更深入的临床前研究和临床试验。

参考文献:

[1] RUMGAY H, FERLAY J, DE MARTEL C, *et al*. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype[J]. Eur J Cancer, 2022, 161: 108-118. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.11.023.

[2] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, *et al*. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362. DOI:10.1016/S0140-6736(22)01200-4.

[3] ZHANG S Z,LOBO A, LI P F, *et al*. Sialylated glycoproteins and sialyltransferases in digestive cancers: Mechanisms, diagnostic biomarkers, and therapeutic targets[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 197: 104330. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104330.

[4] MELCHER A, HARRINGTON K, VILE R. Oncolytic virotherapy asimmunotherapy [J]. Science, 2021, 374(6573): 1325-1326. DOI: 10.1126/science.abk3436.

[5] BAN W Y, GUAN J H, HUANG H W, *et al*. Emerging systemic delivery strategies of oncolytic viruses: a key step

toward cancer immunotherapy[J]. Nano Res, 2022, 15(5): 4137-4153. DOI: 10.1007/s12274-021-4031-6.

[6] LV P, LIU X, CHEN X M, *et al*. Genetically engineered cell membrane nanovesicles for oncolytic adenovirus delivery: a versatile platform for cancer virotherapy[J]. Nano Lett, 2019, 19(5): 2993-3001. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00145.

[7] PARRISH-NOVAK J, DILLON S R, NELSON A, *et al*. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function[J]. Nature, 2000, 408(6808): 57-63. DOI: 10.1038/35040504.

[8] TIAN Y, ZAJAC A J. IL-21 and T cell differentiation: consider the context[J]. Trends Immunol, 2016, 37(8): 557-568. DOI: 10.1016/j.it.2016.06.001.

[9] LEONE P, SOLIMANDO A G, FASANO R, *et al*. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma treatment[J]. Vaccines, 2021, 9(5): 532. DOI: 10.3390/vaccines9050532.

[10] ZHANG B, CHENG P. Improving antitumor efficacy via combinatorial regimens of oncolytic virotherapy[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 158. DOI: 10.1186/s12943-020-01275-6.

[11] DE GRUIJL T D, JANSSEN A B, VAN BEUSECHEM V W. Arming oncolytic viruses to leverage antitumor immunity[J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(7): 959-971. DOI: 10.1517/14712598.2015.1044433.

[12] YANG H, LEI G L, DENG Z Y, *et al*. An engineered influenza a virus expressing the co-stimulator OX40L as an oncolytic agent against hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2024, 11: 1-13. DOI: 10.2147/JHC.S410703.

[13] SUN F, XU Y, DENG Z Y, *et al*. A recombinant oncolytic influenza virus expressing a PD-L1 antibody induces $CD8^+$ T-cell activation via the cGas-STING pathway in mice with hepatocellular carcinoma[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 120: 110323. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110323.

[14] YANG H, LEI G L, SUN F, *et al*. Oncolytic activity of a chimeric influenza A virus carrying a human CTLA4 antibody in hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12: 875525. DOI: 10.3389/fonc.2022.875525.

[15] YANG P H, SUN F, WANG R L, *et al*. Oncolytic activity of a novel influenza A virus carrying granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in hepatocellular carcinoma[J]. Hum Gene Ther, 2019, 30(3): 330-338. DOI: 10.1089/hum.2018.095.

[16] LI C, TIAN Y Y, SUN F, *et al*. A recombinant oncolytic influenza virus carrying GV1001 triggers an antitumor immune response[J]. Hum Gene Ther, 2024, 35(1/2): 48-58. DOI: 10.1089/hum.2022.206.

[17] CHEN T Y, DING X Q, LIAO Q B, *et al*. IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(1): e001647. DOI: 10.1136/jitc-2020-001647.

[18] ISVORANU G, CHIRITOIU-BUTNARU M. Therapeutic potential of interleukin-21 in cancer[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1369743. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1369743.

[19] MARTIN N T, BELL J C. Oncolytic virus combination therapy: killing one bird with two stones[J]. Mol Ther, 2018, 26(6): 1414-1422. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.04.001.

[20] HINO R, KABASHIMA K, KATO Y, *et al*. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma[J]. Cancer, 2010, 116(7): 1757-1766. DOI: 10.1002/cncr.24899.

[21] TAUBE J M, ANDERS R A, YOUNG G D, *et al*. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(127): 127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689.

[22] CURIEL T J, WEI S, DONG H D, *et al*. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 562-567. DOI: 10.1038/nm863.

[23] ZHU Y J, HU X, FENG L, *et al*. Enhanced therapeutic efficacy of a novel oncolytic herpes simplex virus type 2 encoding an antibody against programmed cell death 1[J]. Mol Ther Oncolytics, 2019, 15: 201-213. DOI: 10.1016/j.omto.2019.10.003.

[24] CHEN C Y, HUTZEN B, WEDEKIND M F, *et al*. Oncolytic virus and PD-1/PD-L1 blockade combination therapy[J]. Oncolytic Virother, 2018, 7: 65-77. DOI: 10.2147/OV.S145532.

[25] HADDAD D. Genetically engineered vaccinia viruses as agents for cancer treatment, imaging, and transgene delivery[J]. Front Oncol, 2017, 7: 96. DOI: 10.3389/fonc.2017.00096.

[26] KANAYA N, KURODA S, KAKIUCHI Y, *et al*. Immune modulation by telomerase-specific oncolytic adenovirus synergistically enhances antitumor efficacy with anti-PD1 antibody[J]. Mol Ther, 2020, 28(3): 794-804. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.003.

[27] RIBAS A, DUMMER R, PUZANOV I, *et al*. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy[J]. Cell, 2018, 174(4): 1031-1032. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.035.

(**收稿**:2024-07-12;**修回**:2024-09-12)

(编辑 汪勤俭)