

基于痘苗病毒载体的恶性肿瘤基因治疗研究进展

王世兵^{1,2} 陈侃² 孔祥东^{2*}

¹浙江理工大学生命科学院, 科研实验中心, 杭州 310018;

²浙江理工大学生命科学院, 生物材料与海洋生物资源研究所, 杭州 310018)

摘要 基因治疗一直是肿瘤生物治疗的重要策略, 而以溶瘤痘苗病毒为载体的肿瘤治疗近年来受到较多关注。该文总结了目前用于恶性肿瘤治疗的痘苗病毒和基于痘苗病毒载体的基因治疗研究进展及其在各个领域的成果。

关键词 痘苗病毒; 恶性肿瘤; 基因治疗; 病毒治疗

Oncolytic Vaccinia Virus Vector for Genetherapy of Cancer

Wang Shibing^{1,2}, Chen Kan², Kong Xiangdong^{2*}

¹Research Center, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Bio-X Center, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Gene therapy has always been an important strategy for the biological treatment of tumor. Vaccinia virus has emerged as an attractive agent especially when used as an oncolytic virus vector. This review describes the use of vaccinia virus in cancer therapy as a oncolytic virus and the progress of vaccinia virus vector-based gene therapy and its achievements in various fields.

Key words vaccinia virus; cancer; gene therapy; viral therapy

随着分子生物学、免疫学及肿瘤生物学等基础研究的进步, 以动物病毒为载体表达外源基因用于恶性肿瘤治疗的研究及技术不断得到发展和完善, 如痘苗病毒、腺病毒、杆状病毒及逆转录病毒等已经成功地用作外源基因表达载体, 这些病毒载体可以使外源抑癌基因在恶性肿瘤细胞内得到不同水平的表达, 从而达到抑制肿瘤增殖的效果。在这些病毒载体治疗方案中, 以痘苗病毒为载体的治疗性肿瘤疫苗以及基于痘苗病毒能特异感染并裂解肿瘤细胞的特性而用作“溶瘤病毒”的方案是新颖的肿瘤生物治疗策略^[1-3]。

1 痘苗病毒的生物学特点

痘苗病毒是痘病毒家族成员, 是迄今为止结构最为复杂的一类DNA病毒。含有一条双链DNA和一个大约300 nm×240 nm×120 nm的外被。根据宿主的不同, 痘苗病毒可以分为两个亚科: 脊椎动物痘病毒亚科和昆虫痘病毒亚科^[4-6]。Baroudy等^[7]分析不同菌株痘苗病毒基因组发现, 其基因组中央区为保守区, 主要编码晚期蛋白, 少数为早期蛋白, 两侧为可变区, 主要编码非必须的早期蛋白。

痘苗病毒颗粒编码一系列的酶和蛋白, 包括DNA依赖的RNA聚合酶、转录因子、加帽和甲基

收稿日期: 2013-07-15 接受日期: 2013-10-10

国家自然科学基金(批准号: 51272236, 51002139)和浙江省自然科学基金(批准号: LY13H080005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843196, E-mail: kongxiangdong@gmail.com

Received: July 15, 2013 Accepted: October 10, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.51272236, 51002139) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY13H080005)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843196, E-mail: kongxiangdong@gmail.com

网络出版时间: 2013-12-23 11:14 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0218.html>

化酶以及polyA聚合酶^[8]。通过这些酶和转录因子,痘苗病毒能够不依赖宿主细胞的基因调控系统转录自身mRNA。痘苗病毒的基因表达过程受到严格的调控^[9],其基因的编码序列是连续的,并发现有拼接现象。根据表达的先后可以分为早、中、晚期基因。早期基因可能与DNA复制起始有关,在病毒DNA开始复制之前就被转录,但不表达蛋白,中晚期基因则在病毒复制时转录并表达蛋白。可见痘苗病毒的基因表达调控是成阶梯性的,后一个阶段基因表达所需的酶和转录因子是由前一个阶段编码的。

痘苗病毒存在两种侵染形式,一种是IMV(intracellular mature virus),这种形式的病毒颗粒常在体外被发现,在纯化过程中释放到细胞碎片中;另一种是EEV(extracellular enveloped virus),这种形式的病毒颗粒只在体内发挥细胞间的传递作用,它的外被比较脆弱不易被纯化^[10]。痘苗病毒的吸附和摄取机制目前还不清楚,可能与侵染形式和细胞表面受体以及病毒蛋白有关^[4,11-12]。激光共聚焦显微镜显示,IMV和EEV通过不同的方式进入细胞^[13],通过不同的蛋白介导病毒与细胞融合。

痘苗病毒作为肿瘤的基因治疗载体相对于其他的生物载体和非生物载体具有很大的优势:(1)只在宿主细胞的胞浆内复制,并不整合进宿主细胞的基因组中,所以其安全性高,无致癌性等问题,副作用的发生率低;(2)表达效率高。痘苗病毒体外培养时可达很高的滴度($>10^9$ pfu/mL);(3)宿主范围广,几乎可感染所有类型的哺乳动物细胞,不受细胞表面相关受体的限制;(4)基因组容量大,接近200 Kb,允许插入25 Kb的外源基因而不影响其遗传稳定性^[14-15];(5)产生有效免疫应答,不仅能产生体液免疫,还能激发细胞免疫;(6)操作简便,成本很低。

2 重组痘苗的构建和筛选

痘苗病毒作为恶性肿瘤的基因治疗载体具有很大的优势,目前有很多痘苗病毒毒株作为载体以表达各种外源基因,所以插入外源基因的策略成为很多研究者感兴趣的问题。Merchinsky等^[16]首次对痘苗病毒进行改造,构建一段含P7.5启动子及两个特殊的酶切位点(*Not I*, *Apa I*)的质粒,通过该质粒与痘苗病毒间的同源重组将这段特殊的序列引入到痘苗病毒的*TK*基因组内,然后将外源基因与痘苗病毒基因直接连接,最终实现将外源基因整合到痘苗

病毒基因组的目的。

但是由于痘苗病毒的核酸序列比较长,对其核酸序列进行酶切并连接外源基因相对来说比较困难。目前,常用的方法是同源重组,即构建一个质粒将外源基因与痘苗病毒的启动子连接起来,再通过病毒基因与质粒上同源臂间的同源重组将要表达的外源基因插入到痘苗病毒的基因组中。通过构建质粒将要插入的目的基因嵌合到痘苗病毒的基因同源序列中,构建好的质粒转染到已经感染痘苗病毒的细胞,通过蚀斑筛选技术得到重组病毒。痘苗病毒在细胞内复制的过程中质粒同源臂与痘苗病毒DNA的同源序列间发生同源重组,这样嵌合的目的基因就从质粒重组进入痘苗病毒的基因组中。外源基因插入的位点即构建质粒时作为同源臂的痘苗病毒的基因片段,因此如果外源基因插入的位置不恰当,会造成痘苗病毒相应基因功能的丧失,所以插入位点必须是病毒增殖的非必需区。常作为外源基因的插入位点的有痘苗病毒WR株的*Hind F*片段、*TK*基因、*HA*基因、哥本哈根株I4L位点^[17],以及Wyeth株的*Hind M*片段^[18]。用常规的实验方法所产生的痘苗病毒产量是比较低的,所以使用特殊的筛选标记将重组成功的痘苗病毒分离出来显得非常有必要。例如,如果外源基因的插入位点选择的是*TK*基因,那么就可以根据病毒的TK表型进行筛选。具体的方法是在TK-细胞中添加筛选药物BudR(5-溴尿嘧啶脱氧核苷),BudR能在*TK*基因表达产物——胸腺嘧啶核苷酸激酶的作用下磷酸化而作为胸腺嘧啶核苷酸的类似物插入复制中的DNA中,从而影响DNA的复制,这样能在细胞中增殖并形成空斑的就是TK-病毒。

另一种常用的筛选方法就是在痘苗病毒基因中插入表达标记蛋白的基因序列,常用的标记蛋白基因有HSK的*TK*基因、 β -半乳糖苷酶(*LacZ*)基因、 β -半乳糖醛酸酶(*GUS*)基因以及*EGFP*基因等。根据不同标记蛋白的特性,选用相应的筛选方法,能高效而准确地鉴别出重组痘苗病毒。

此外,最新的筛选重组痘苗病毒的方法还包括用免疫学检测技术,如原位杂交实验检测病毒基因中是否插入有外源基因,随后经过挑空斑获得重组病毒。获得重组病毒后也可用酶切、Southern blot或DNA杂交技术对病毒DNA进行分析,以确保病毒DNA的稳定性。

3 痘苗病毒治疗恶性肿瘤

目前, 痘苗病毒用于恶性肿瘤治疗主要包括以下三方面: 一是作为基因表达载体通过某种作用机制达到抑制肿瘤增殖的作用; 二是作为具有高度复制潜能的疫苗通过裂解肿瘤细胞来杀死肿瘤细胞; 三是通过激发细胞的免疫系统达到抗癌的作用。

虽然相对于其他的病毒载体和非病毒载体, 痘苗病毒作为基因治疗的载体有很多优势, 但是一开始并没有广泛地应用于肿瘤的基因治疗中, 这可能是由于该病毒的高免疫原性, 导致不能够反复进行注射。然而, 近年来很多动物疫苗试验结果显示, 痘苗病毒肿瘤特异性的蛋白在打过疫苗的动物体内和没有打过疫苗的动物体内表达相当^[19]。另一个临床试验表明, 无论体内是否有相关抗体存在, 痘苗病毒都能够侵染并在肿瘤细胞内复制^[20], 同时也证实了上述的实验研究的结果。以上实验结果说明, 痘苗病毒能克服宿主细胞的免疫原性的障碍, 能够高效地侵染并在宿主细胞内复制。

基于痘苗病毒的高效裂解组织细胞的能力, 通过基因改造构建溶瘤病毒是提高病毒的安全性与高效性的有效方法。在治疗天花病毒的过程中很多 VV 菌株被改造。例如, MVA(modified vaccinia virus ankara)是经鸡的胚胎成纤维母细胞培养, 缺失了大

量的基因组遗传信息, 包括一些介导病毒-细胞连接的基因改造而成的。这种病毒失去了在哺乳动物体内增殖的能力, 但 MVA 感染和合成病毒蛋白的功能并没有受到损害^[8,21]。NYVAC 也是一种来源于 Copenhagen 菌株经改造的痘苗病毒, 缺失了多处基因并失去在人类细胞系中复制增殖的能力^[21-23]。经改造的痘苗病毒及其衍生物在治疗恶性肿瘤中的作用被很多的研究证实。表 1 为包括中国天坛株在内的主要痘苗病毒菌株的简介。

4 痘苗病毒载体介导外源基因治疗恶性肿瘤

由于单独的溶瘤病毒感染和裂解肿瘤细胞的效应达不到 100%, 所以溶瘤病毒携带外源基因以增强抗肿瘤的效果为很多研究者开辟了新的途径。痘苗病毒的基因组容量大, 允许插入 25 Kb 以上的外源基因而不影响其遗传稳定性, 所以痘苗病毒载体介导外源基因治疗恶性肿瘤成为人们首选的手段之一。携带 p53 的重组痘苗病毒(rVV-p53)已经被构建成功^[24], 在病毒感染细胞的同时, p53 得到大量的表达并发挥其肿瘤抑制作用, 即抑制肿瘤细胞的生长与诱导细胞的凋亡。在体内神经胶质瘤动物模型试验中, 该病毒表现出很好的安全性与肿瘤抑制作用^[25]。

表1 痘苗病毒菌株(根据参考文献[3]修改)

Table 1 Vaccinia virus strains (modified from reference [3])

菌株 Strain	来源地 Origin	特点 Characteristics
Tian Tan (temple of heaven)	Chinese vaccine strain	Unknown potential as oncolytic virus Extensive use in humans in China during smallpox eradication
Western Reserve	Laboratory strain derived from Wyeth through passaging in mice	High tumor selectivity Strong oncolytic effect in mouse models Minimal clinical use in humans
Wyeth or New York City Board of Health	North American vaccine strain	Minimal inherent tumor selectivity Slow replication in mouse tissue Commonly used clinical strain
Lister	European vaccine strain	Inherent tumor selectivity Extensive use in humans during smallpox eradication
Modified Vaccinia Ankara	Vaccinia strain derived from Ankara strain through passaging in avian cells	Does not replicate in mammalian cells Highly immunogenic, well suited for vaccination purposes
Copenhagen	Northern European vaccine strain	Inherent tumor selectivity Used as smallpox vaccine but withdrawn
New York Vaccinia	Vaccine strain derived from Copenhagen through deletion of several genes	Relatively high incidence of adverse events Does not replicate in mammalian cells Highly immunogenic, well suited for vaccination purposes

常用来构建肿瘤特异性的溶瘤痘苗病毒的基因有三类, 第一类是那些表达产物能直接或间接杀死肿瘤细胞, 诱导细胞凋亡的基因, 甚至具有“旁观效应”能够导致附近未感染的细胞死亡的基因, 包括扩散性毒素、前药转换酶和一些免疫刺激因子等; 第二类包括那些表达产物有助于病毒感染和复制的基因以及抑制血管发生的基因, 如IL-4或IL-10; 第三类包括那些所谓的“安全价值”的基因, 它们在病毒复制不受控制或者病人有不良反应的时候适当关闭病毒复制系统。

迄今为止, 用于选择复制性的痘苗病毒平台的前药转换酶系统常见的有两类, CD/5-FC(cytosine deaminase/5-fluorocytosine)系统和PNP/6-MPDR(purine nucleoside phosphorylase/6-methylpurine deoxyriboside)系统。研究表明, 溶瘤痘苗病毒溶瘤效应与CD/5-FC和PNP/6-MPDR的细胞病变效应有着密切关系^[26-27]。体内体外实验表明, 虽然5-FC抑制病毒的复制, 但是能大大增加肿瘤细胞的病变效应与肿瘤细胞增殖。Foloppe等^[28]将该基因与尿嘧啶磷酸核糖基转移酶融合并克隆到TK缺失的痘苗病毒系统中, 以加速5-FC转变为有毒代谢产物, 该溶瘤痘苗病毒在结肠癌, 肝癌等模型中表现出很强的抗肿瘤效应。

构建携带免疫刺激因子的溶瘤痘苗病毒来增强抗肿瘤效应也是治疗恶性肿瘤的一种有效方法。免疫刺激因子诱导的抗肿瘤免疫应答能特异性杀死肿瘤细胞, 从而发挥“旁观者效应”。单独的溶瘤痘苗病毒也能启动免疫应答, 但是这种作用是相当微弱的, 而免疫应答因子的表达则能增强这种免疫

反应。然而出于同样的原因, 过强的免疫反应也会抑制病毒的复制。研究表明, FAS-1、IL-2、IL-15、CD40或TNF克隆到痘苗病毒载体上^[27,29-31], 在体内会抑制病毒的复制, 但是整体的抗肿瘤效应却有很大的增强。Thorne等^[32]构建了携带GM-CSF的TK-VGF双缺失的Western Reserve VV(命名为JX-963), 表现出很好的肿瘤特异性。IL-4或IL-10的基因表达产物有助于病毒感染和复制以及抑制血管的发生, IL-4或IL-10基因插入痘苗病毒载体上有利于防止未成熟病毒的清除与协助病毒的复制。虽然该法可增强痘苗病毒所介导的溶瘤效果, 但其安全性尚有待提高。

临床发现, 接种过天花疫苗的老年人对痘苗病毒有一定的免疫排斥, 这将会影响痘苗病毒在这些病人体内的扩增, 从而减弱痘苗病毒介导的病毒疗法的治疗效果。预先存在的抗痘苗病毒免疫力的具体作用目前还不是很清楚, 克服这一问题的方法还有待研究。表2为痘苗病毒载体介导外源基因治疗恶性肿瘤的示例。

5 溶瘤痘苗病毒的临床相关试验进展

5.1 野生型的溶瘤痘苗病毒的相关临床试验数据

野生型的痘苗病毒早在1960年就应用于临床研究, Burdick^[34]将野生型的痘苗病毒注射到黑色素瘤病人体内, 观察病毒治疗与非病毒治疗病人的损伤部位的复原情况以及一些不良反应。Hunter-Craig等^[35]也做了同样的研究, 60%的患者注射痘苗病毒后囊肿消失, 相比之下, 未注射痘苗病毒的患者

表2 用于临床前期研究的溶瘤痘苗病毒(根据参考文献[3]修改)

Table 2 Examples of oncolytic VVs used in preclinical cancer studies (modified from reference [3])

病毒名称 Virus name	菌株 VV strain	基因缺失部位 Genetic deletion for tumor specificity	外源基因 Transgene expressed
JX-594	Wyeth	TK	GM-CSF
JX-963	Western Reserve	TK, VGF	GM-CSF
vCB025	Western Reserve	TK	Luciferase
vvdd-GFP	Western Reserve	TK, VGF	GFP
GLV-1h68	Lister	TK, F14.5L, A65R	Renilla luciferase-GFP fusion protein, β-galactosidase, β-glucuronidase
vvCD	Western Reserve	TK	CD
VV-FCU1	Copenhagen	TK	CD/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene (FCU1)
vvdd-VEGFR-1-Ig	Western Reserve	TK, VGF	Soluble VEGFR receptor 1 construct

CD: 胞嘧啶脱氨酶; GFP: 绿色荧光蛋白; TK: 胸苷激酶; VGF: 痘苗生长因子; VV: 痘苗病毒; vvdd: 双缺失痘苗病毒。

CD: cytosine deaminase; GFP: green fluorescent protein; TK: thymidine kinase; VGF: vaccinia growth factor; VV: vaccinia virus; vvdd: double deleted VV.

无明显效应。Roeningk等^[36]针对20个黑色素瘤患者, 将野生型的痘苗病毒注射到他们的损伤部位, 观察他们的抗肿瘤效果和免疫应答反应, 其中有8例患者出现明显的复原现象。

5.2 溶瘤痘苗病毒的相关临床试验进展

JX-594是迄今为止应用于临床研究最完善的溶瘤痘苗病毒, 两个临床 I 期的研究早已公布, 临床 II 期的研究报告也在一次会议报告中出现。在第一个临床 I 期研究中, Mastrangelo等^[37]直接用JX-594治疗七个经手术治疗无效的皮肤黑色素瘤患者, 每周两次, 连续六周注射 2×10^7 pfu/lesion的JX-594, 这种治疗的效果是可观的, 仅在高剂量的时候出现一些流感样的症状和局部的炎症反应, 偶尔有一些脓疮。7个病人中有5个有相应的治疗效果, 其中1位的病情得到完全消退, 并且还能观察到一些抗肿瘤应答反应。在第二个临床 I 期试验中, Park等^[38]利用CT对JX-594的指示作用, 注射治疗原发性肝癌以及肝癌的转移灶, 在这项剂量递增的研究中, 14位病人每三周注射剂量高达 3×10^9 pfu的JX-594治疗, 所有的病人都有流感样的症状, 其中4个血小板降低, 注射最高剂量的病人还出现高胆红素血症, 病毒已经扩散到血液中, 并且远离肿瘤部位的非注射区也有相当的病毒侵染, 同时中性粒细胞数增加, 这些现象都说明溶瘤病毒JX-594的感染引起了GM-CSF水平的增加。

Heo等^[39]进行了一项剂量探索实验, 以期找到治疗原发性肝癌的最佳剂量。将低浓度和高浓度的JX-549注射到肝癌患者体内, 结果在血管内很快就检测到JX-549基因组, JX-549的复制和GM-CSF的表达优于抗肿瘤免疫诱导剂的诱导效果, 注射组的存活持续时间与注射病毒的剂量有着密切的关系。该研究证明了JX-549既有溶瘤的作用也具有免疫治疗的作用机制, 能很好地激发HCC个体的肿瘤应答, 并且可以通过增加剂量来延长HCC患者存活时间。

第三次临床 I 期研究, 21个试验病人都患有不同程度的难治愈的肿瘤, 包括结肠癌、黑色素瘤、卵巢癌和肝癌等, JX-594静脉注射治疗(James Burke, Joe Stephenson, Laura Chow, Derek Jonker, Andrew Haas, Jorge Nieva, Kara Sabourin, Adina Pelusio, Caroline Breitbach, Taeho Hwang, Anne Moon, Kelley Parato, Manijeh Daneshmand, John C. Bell, David H. Kirn. Demonstration of delivery and antitumoral

activity of JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, following a single intravenous infusion in patients with refractory metastatic cancers. Am Soc Gene Cell Ther (ASGCT) 13th Annual Meeting, 17-22 May 2010, Washington DC, USA. Abstract 33), 实验结果显示注射低浓度时, 33.3%的病人病情得到控制; 当用高浓度病毒治疗时, 75%的患者病情能得到很好地控制。

6 痘苗病毒与其它治疗方法联合治疗恶性肿瘤

尽管溶瘤痘苗病毒目前取得了很好的实验效果, 但是如果要想根除肿瘤的话还需要与其他方法, 如化疗、放疗、免疫治疗以及其他的溶瘤病毒联合治疗。由于肿瘤含有很多不同的致癌细胞, 有些肿瘤细胞群对某种治疗方法会产生抵制作用, 所以唯有和其他的疗法联合治疗才能展现出整体的抗癌效果。

痘苗病毒与化学药物联合治疗恶性肿瘤的策略已经被广泛使用于各种实验研究中, 常见的化疗药物有烷化剂、核苷酸类似物、细胞骨架修饰剂以及细胞生长抑制剂等。在胰腺癌治疗模型中, 溶瘤痘苗病毒GLV-1h68联合顺铂的治疗效果比单用GLV-1h68的好^[40]; 核苷类似物吉西他滨联合GLV-1h68治疗胰腺癌表现出很好的治疗效果^[40]; 紫杉醇联合溶瘤双缺失的Western Reserve痘苗病毒治疗皮下结肠癌模型具有很好的抗肿瘤效果^[41]; 高剂量的环磷酰胺联合溶瘤痘苗病毒有助于增强病毒的感染、转移以及缓解其所受到的抵制作用, 增强其抗肿瘤效应^[42]。

一些临床试验模型结果显示, 放疗能增强病毒的溶瘤效果, 同时溶瘤病毒也能增强肿瘤细胞对放射性治疗的敏感性, 两者能起到相互协同的作用^[42]。其他的溶瘤病毒联合放射性治疗的研究已经有报道, 但是与溶瘤痘苗病毒的联合疗法目前报道的还不多。

携带p53的TK缺陷的痘苗病毒联合放射性治疗方法治疗胶质瘤动物模型试验中显示^[43-44], 相对于溶瘤痘苗病毒或者放射性治疗的单独治疗, 联合治疗中的胶质瘤细胞对放疗-痘苗病毒敏感度要高很多, 并且经治疗死亡的肿瘤细胞都表现出明显的细胞凋亡的现象。McCart等^[45]构建了一种溶瘤痘苗病

毒vvdd, 能够表达生长激素抑制剂受体, 被该病毒感染细胞对生长激素抑制剂类似物^{111In}-喷曲肽具有特别的亲和力, 联合放射性治疗的效果达到更好的抗肿瘤效应。

溶瘤痘苗病毒联合其他溶瘤病毒, 利用各自的优势治疗恶性肿瘤是一种新型的治疗手段。只需要很低剂量的两种或两种以上的病毒, 合理利用他们互补的优势能够达到很好的抗癌效果, 并且细胞毒性较单个病毒低。Le Boeuf等^[46]最近的一项研究表明, 痘苗病毒与溶瘤疱疹性口炎病毒联合具有协同杀伤肿瘤细胞的抗癌作用。在另一项研究中, Zhang等^[47]将痘苗病毒与Semliki Forest病毒联合治疗卵巢癌模型, 结果显示两者的联合能增强大鼠体内T细胞介导的免疫应答, 表现出更强的抗肿瘤效果。此外, 在很多的动物模型试验中, 预先高热处理可以增加肿瘤组织或血管的通透性, 利用这个优势联合溶瘤痘苗病毒治疗恶性肿瘤, 则会大大提高肿瘤细胞对溶瘤痘苗病毒的吸收率, 从而增强其抗肿瘤的效果^[48]。此外高热处理与痘苗病毒的联合运用还有可能提高抗肿瘤的免疫反应^[49], 因而从多方面起到抑制肿瘤的生长和增殖的作用。

7 展望与讨论

痘苗病毒在人们对抗天花的过程中发挥了重要的作用, 虽然天花已在上世纪八十年代宣布全球根除, 但是痘苗病毒则成为人们攻克恶性肿瘤的一种新的治疗手段。随着分子生物学、病毒学、免疫学以及肿瘤学的进步, 痘苗病毒凭借其自身的优势, 如痘苗病毒的宿主范围非常的广泛; 基因组容量大, 允许插入25 Kb的外源基因而不影响其遗传稳定性; 病毒复制只限于细胞质中, 不会引起细胞核内染色质整合; 高效的免疫原性等, 在恶性肿瘤的基因治疗领域里发挥了重要的作用。

基因治疗为攻克癌症发挥着重要的作用, 在所有的基因治疗方案中, 利用基因工程对痘苗病毒基因组进行改造, 构建溶瘤痘苗病毒, 使其只选择性地肿瘤细胞中复制增殖, 降低对正常细胞的毒性, 成为具有很大潜力的研究对象。JX-594就是一种肿瘤特异性的溶瘤痘苗病毒, 同时能表达GM-CSF。它具有独特的性质成为很多研究者进行肿瘤基因病毒治疗的首选对象, 并且它的抗肿瘤效果以及免疫原性因GM-CSF的表达而大大增强, 同时对正常的组

织和器官的安全性很好^[38-39,50]。

痘苗病毒作为基因表达载体介导外源基因的表达已经成为治疗恶性肿瘤的主要方法。它可以介导抗肿瘤基因的过量表达, 也可以介导肿瘤相关抗原和一些免疫调节因子的表达。例如携带p53的重组痘苗病毒(rVV-p53)的成功构建; 携带IL-4或IL-10、FAS-1、IL-2、IL-15、CD40或者TNF的溶瘤痘苗病毒的构建。这些肿瘤特异性的溶瘤痘苗病毒不仅仅可以通过对肿瘤细胞裂解作用达到抑制肿瘤生长、增殖的效果, 同时还通过介导肿瘤细胞的凋亡, 启动细胞内相关信号通路, 激活细胞的免疫应答等方式, 多途径、多方面、多层次地发挥强有力的抗肿瘤的效果。

虽然溶瘤痘苗病毒在肿瘤的基因-病毒治疗中因其独特的优点而发挥很大的潜能, 但是如何进一步的提高它的抗肿瘤效果以及它的安全性问题仍在研究中, 希望随着研究的深入能挖掘它更多的优势, 使其应用范围更加广泛。

参考文献 (References)

- 1 Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: Teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 2005; 11(2): 180-95.
- 2 Breitbach CJ, Thorne SH, Bell JC, Kim DH. Targeted and armed oncolytic poxviruses for cancer: the lead example of JX-594. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(9): 1768-72.
- 3 Kim DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: A novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 64-71.
- 4 Alexander TA. Development of methodology based on commercialized SERS-active substrates for rapid discrimination of Poxviridae virions. *Anal Chem* 2008; 80(8): 2817-25.
- 5 Guo ZS, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(6): 901-17.
- 6 [Smallpox--eradication of a myth]. *Lakartidningen* 1989; 86(14): 1290.
- 7 Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 1982; 28(2): 315-24.
- 8 Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21): 11341-8.
- 9 Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 1998; 244(2): 365-96.
- 10 Smith GL, Vanderplasschen A. Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol* 1998; 440: 395-414.

- 11 Payne LG, Norrby E. Adsorption and penetration of enveloped and naked vaccinia virus particles. *J Virol* 1978; 27(1): 19-27.
- 12 Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith GL. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol* 1998; 79(Pt 4): 877-87.
- 13 Vanderplasschen A, Smith GL. A novel virus binding assay using confocal microscopy: Demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J Virol* 1997; 71(5): 4032-41.
- 14 Merchlinsky M, Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: Recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology* 1992; 190(1): 522-6.
- 15 Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 1983; 25(1): 21-8.
- 16 Merchlinsky M, Eckert D, Smith E, Zauderer M. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology* 1997; 238(2): 444-51.
- 17 Howley PM, Spehner D, Drillien R. A vaccinia virus transfer vector using a GUS reporter gene inserted into the I4L locus. *Gene* 1996; 172(2): 233-7.
- 18 Kim CJ, Cormier J, Roden M, Gritz L, Mazzara GP, Fetsch P, *et al.* Use of recombinant poxviruses to stimulate anti-melanoma T cell reactivity. *Ann Surg Oncol* 1998; 5(1): 64-76.
- 19 Lee SS, Eisenlohr LC, McCue PA, Mastrangelo MJ, Lattime EC. Intravesical gene therapy: *In vivo* gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors. *Cancer Res* 1994; 54(13): 3325-8.
- 20 Mukherjee S, Haenel T, Himbeck R, Scott B, Ramshaw I, Lake RA, *et al.* Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: Persistent transgene expression despite antibody generation. *Cancer Gene Ther* 2000; 7(5): 663-70.
- 21 Belyakov IM, Earl P, Dzutsev A, Kuznetsov VA, Lemon M, Wyatt LS, *et al.* Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(16): 9458-63.
- 22 Kanesa-thasan N, Smucny JJ, Hoke CH, Marks DH, Konishi E, Kurane I, *et al.* Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus—poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 2000; 19(4/5): 483-91.
- 23 Siemens DR, Crist S, Austin JC, Tartaglia J, Ratliff T. Comparison of viral vectors: Gene transfer efficiency and tissue specificity in a bladder cancer model. *J Urol* 2003; 170(3): 979-84.
- 24 Timiryasova TM, Chen B, Fodor I. Replication-deficient vaccinia virus gene therapy vector: Evaluation of exogenous gene expression mediated by PUV-inactivated virus in glioma cells. *J Gene Med* 2001; 3(5): 468-77.
- 25 Timiryasova TM, Li J, Chen B, Chong D, Langridge WH, Gridley DS, *et al.* Antitumor effect of vaccinia virus in glioma model. *Oncol Res* 1999; 11(3): 133-44.
- 26 McCart JA, Puhlmann M, Lee J, Hu Y, Libutti SK, Alexander HR, *et al.* Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther* 2000; 7(14): 1217-23.
- 27 Zeh HJ, Bartlett DL. Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers. *Cancer Gene Ther* 2002; 9(12): 1001-12.
- 28 Foloppe J, Kintz J, Futin N, Findeli A, Cordier P, Schlesinger Y, *et al.* Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther* 2008; 15(20): 1361-71.
- 29 Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. Comparative assessment of virulence of recombinant vaccinia viruses expressing IL-2 and IL-15 in immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(9): 5146-51.
- 30 Ruby J, Bluethmann H, Aguet M, Ramshaw IA. CD40 ligand has potent antiviral activity. *Nat Med* 1995; 1(5): 437-41.
- 31 Sambhi SK, Kohonen-Corish MR, Ramshaw IA. Local production of tumor necrosis factor encoded by recombinant vaccinia virus is effective in controlling viral replication *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(9): 4025-9.
- 32 Vanderplasschen A, Mathew E, Hollinshead M, Sim RB, Smith GL. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(13): 7544-9.
- 33 Guse K, Cerullo V, Hemminki A. Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(5): 595-608.
- 34 Burdick KH. Malignant melanoma treated with vaccinia injections. *Arch Dermat* 1960; 82: 438-9.
- 35 Hunter-Craig I, Newton KA, Westbury G, Lacey BW. Use of vaccinia virus in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Br Med J* 1970; 2(5708): 512-5.
- 36 Roenigk HH Jr, Deodhar S, St Jacques R, Burdick K. Immunotherapy of malignant melanoma with vaccinia virus. *Arch Dermatol* 1974; 109(5): 668-73.
- 37 Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* 1999; 6(5): 409-22.
- 38 Park BH, Hwang T, Liu TC, Sze DY, Kim JS, Kwon HC, *et al.* Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: A phase I trial. *Lancet Oncol* 2008; 9(6): 533-42.
- 39 Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 2013; 19(3): 329-36.
- 40 Yu YA, Galanis C, Woo Y, Chen N, Zhang Q, Fong Y, *et al.* Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(1): 141-51.
- 41 Huang B, Sikorski R, Kirn DH, Thorne SH. Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1. *Gene Ther* 2011; 18(2): 164-72.
- 42 Ottolino-Perry K, Diallo JS, Lichty BD, Bell JC, McCart JA. Intelligent design: Combination therapy with oncolytic viruses. *Mol Ther* 2010; 18(2): 251-63.
- 43 Gridley DS, Andres ML, Li J, Timiryasova T, Chen B, Fodor I. Evaluation of radiation effects against C6 glioma in combination

- with vaccinia virus-p53 gene therapy. *Int J Oncol* 1998; 13(5): 1093-8.
- 44 Timiryasova TM, Gridley DS, Chen B, Andres ML, Dutta-Roy R, Miller G, *et al.* Radiation enhances the anti-tumor effects of vaccinia-p53 gene therapy in glioma. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 2(3): 223-35.
- 45 McCart JA, Mehta N, Scollard D, Reilly RM, Carrasquillo JA, Tang N, *et al.* Oncolytic vaccinia virus expressing the human somatostatin receptor SSTR2: Molecular imaging after systemic delivery using ¹¹¹In-pentetreotide. *Mol Ther* 2004; 10(3): 553-61.
- 46 Le Boeuf F, Diallo JS, McCart JA, Thorne S, Falls T, Stanford M, *et al.* Synergistic interaction between oncolytic viruses augments tumor killing. *Mol Ther* 2010; 18(5): 888-95.
- 47 Zhang YQ, Tsai YC, Monie A, Wu TC, Hung CF. Enhancing the therapeutic effect against ovarian cancer through a combination of viral oncolysis and antigen-specific immunotherapy. *Mol Ther* 2010; 18(4): 692-9.
- 48 Chang E, Chalikonda S, Friedl J, Xu H, Phan GQ, Marincola FM, *et al.* Targeting vaccinia to solid tumors with local hyperthermia. *Hum Gene Ther* 2005; 16(4): 435-44.
- 49 Baronzio G, Gramaglia A, Fiorentini G. Hyperthermia and immunity. A brief overview. *In Vivo* 2006; 20(6A): 689-95.
- 50 Lun X, Chan J, Zhou H, Sun B, Kelly JJ, Stechishin OO, *et al.* Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma. *Mol Ther* 2010; 18(11): 1927-36.