

成都中医药大学

(医学与生命科学学院)

2023 届硕士研究生学位论文

溶瘤病毒 VG161 诱导结肠癌细胞免疫原性死亡的作用及
机制研究

The effect and mechanism of oncolytic virus VG161 in inducing
immunogenic death of colon cancer cells

研究生姓名：王璐

指导教师：殷佩浩 教授

学科专业：肿瘤学

2023 年 6 月

学位论文

溶瘤病毒 VG161 诱导结肠癌细胞免疫原性死亡的作用及 机制研究

The effect and mechanism of oncolytic virus VG161 in inducing
immunogenic death of colon cancer cells

王璐

指导教师姓名： 殷佩浩 教授

申请学位级别： 硕士 专业名称： 肿瘤学

论文提交时间： 2023 年 6 月 论文答辩时间： 2023 年 5 月

2023 年 6 月

项目资助： 国家科技部重点研发计划（编号：2019YFC1316003）

目 录

中英文缩略词表	9
引言	10
第一部分 VG161 对 CT26、HCT116 细胞的体外作用	14
1 实验材料	14
1.1 细胞株	14
1.2 主要试剂	15
1.3 主要仪器	15
1.4 主要试剂配制	16
2 实验方法	17
2.1 细胞培养	17
2.2 CCK-8 实验	18
2.3 细胞凋亡检测	18
2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测	19
3 统计学处理	22
4 实验结果	22
4.1 VG161 对 CT26、HCT116 细胞增殖的影响	22
4.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞凋亡的影响	24
4.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响	27
5 讨论	28
第二部分 VG161 诱导 CT26、HCT116 细胞免疫原性死亡的能力	30
1 实验材料	31
1.1 细胞株	31
1.2 实验动物	31
1.3 主要试剂(同第一部分主要试剂)	31
1.4 主要仪器(同第一部分主要仪器)	31
1.5 主要试剂配制(同第一部分主要试剂配制)	32
2 实验方法	32
2.1 钙网蛋白暴露实验检测	32
2.2 细胞内 ATP 检测	33
2.3 HMGB1 释放检测	34
2.4 小鼠骨髓来源的树突状细胞的提取与检测	35
2.5 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的提取与检测	36
2.6 TNF- α 检测	37

2.7 IFN- γ 检测	38
3 统计学处理.....	39
4 实验结果.....	39
4.1 VG161 对 CT26、HCT116 细胞钙网蛋白暴露的影响.....	39
4.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 ATP 释放的影响.....	42
4.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 HMGB1 释放的影响.....	43
4.4 mVG161 对小鼠髓源性树突状细胞成熟的影响.....	45
4.5 mVG161 作用的髓源性 DCs 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞分化的影响	46
4.6 上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的变化	47
5 讨论.....	49
第三部分 VG161 抗结肠癌的体内作用	50
1 实验材料.....	50
1.1 细胞株.....	50
1.2 实验动物.....	50
1.3 主要试剂(同第一部分主要试剂).....	51
1.4 主要仪器.....	51
2 实验方法.....	51
2.1 人结肠癌 PDX 模型的建造和治疗.....	51
2.2 小鼠结肠癌双边皮下移植瘤模型的建造和治疗	52
2.3 HE 染色	52
2.4 免疫组织化学染色(ki67).....	53
2.5 免疫荧光染色(CD8)	54
2.6 流式细胞术检测 DCs、肿瘤浸润 T 细胞和脾脏记忆 T 细胞指标	54
2.7 TNF- α 检测.....	55
2.8 IFN- γ 检测	55
3 统计学处理.....	55
4 实验结果.....	55
4.1 hVG161 在 PDX 模型中抗肿瘤效果的初步研究.....	55
4.2 hVG161 在 PDX 模型中抗肿瘤效果的进一步研究.....	58
4.3 mVG161 联用 OX40 抗体在双边皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用	60
5 讨论.....	71
结论.....	73
参考文献.....	74
综述 常见溶瘤病毒在结直肠癌动物实验中的研究现状	79
参考文献.....	87

溶瘤病毒 VG161 诱导结肠癌细胞免疫原性死亡的作用及 机制研究

中文摘要

目的

本课题主要从免疫原性细胞死亡的角度研究溶瘤病毒 VG161 抗结肠癌的作用和机制。

方法

1、采用 CCK-8 法检测溶瘤病毒 VG160、VG161 对小鼠结肠癌 CT26 细胞、人结肠癌 HCT116 细胞增殖的影响，并记录溶瘤病毒作用后，细胞形态的变化。采用 Annexin-V/PI 染色流式法检测 CT26、HCT116 细胞的凋亡率。运用 Western blot 检测 VG161 对 CT26、HCT116 细胞凋亡相关蛋白和内质网应激相关蛋白的影响。

2、用激光共聚焦显微镜检测 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 CRT 表面暴露的影响。用 Elisa 测定 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 ATP、HMGB1 释放的影响。采用流式细胞术检测 VG161 对小鼠骨髓来源树突状细胞成熟的影响，以及检测小鼠骨髓来源树突状细胞对脾脏来源的 T 淋巴细胞分化的影响。运用 ELISA 实验检测上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达量。

3、构建结肠癌 PDX 模型，通过观察荷瘤小鼠体重、肿瘤体积，Western blot 检测凋亡蛋白表达情况等实验，探究 VG161 抗结肠癌的疗效。构建 CT26 双边皮下移植瘤模型，通过观察荷瘤小鼠体重、肿瘤体积，流式细胞术检测免疫浸润情况等实验，探究 VG161 抗结肠癌的效果和激活免疫的能力，以及观察联合运用 OX40 抗体是否可以进一步提高抗结肠癌的作用。

结果

1、当 VG160、VG161 分别作用 CT26、HCT116 细胞 24 h、48 h、72 h 后，细胞形态出现不同程度的改变，并且 VG160、VG161 对 CT26、HCT116 细胞具有一定的杀伤作用。当 VG161 MOI=0.5 时，其对 CT26、HCT116 细胞的抑制率约为 50%。当 VG161 作用 CT26、HCT116 细胞 48 h 后，可诱导 CT26、HCT116 细胞发生凋亡以及促进内质网应激相关蛋白的表达。

2、当 VG161 作用 CT26、HCT116 细胞 24 h 后，可诱导 CT26、HCT116 细胞 CRT 的表面暴露和 ATP、HMGB1 的释放。同时，mVG161 作用可诱导 DCs 的成熟，而成熟的 DCs 可以促进脾脏 T 淋巴细胞的分化。

3、结肠癌 PDX 模型实验表明，VG161 能延缓肿瘤生长、减少瘤内 ki67 的表达、促进瘤内凋亡蛋白表达、以及延长荷瘤小鼠存活时间。CT26 双边皮下移植瘤模型实验表明，VG161 能延缓肿瘤生长、减少瘤内 ki67 的表达、促进淋巴结内 DCs 的成熟、瘤内 CD8⁺ T 细胞的浸润和脾脏组织内记忆 T 细胞的表达，以及促进 TNF- α 、IFN- γ 的表达，当与 OX40 抗体联用时，效果更佳。

结论

溶瘤病毒 VG161 通过促进 CT26、HCT116 细胞内质网应激相关蛋白的表达，诱导其发生免疫原性细胞死亡，促进 DCs 成熟，从而诱导脾脏 T 淋巴细胞分化，激活全身抗肿瘤免疫反应，促进免疫浸润和诱导免疫记忆，从而发挥抗结肠癌的作用。

关键词

溶瘤病毒；VG161；结肠癌；免疫原性细胞死亡

The effect and mechanism of oncolytic virus VG161 in inducing immunogenic death of colon cancer cells

Abstract

Objective:

In this study, we mainly studied the effect and mechanism of oncolytic virus VG161 on colon cancer from the point of view of immunogenic cell death.

Method:

1. The effects of oncolytic viruses VG160 and VG161 on the proliferation of mouse colon cancer CT26 cells and human colon cancer HCT116 cells were detected by CCK-8 method, and recorded the morphological changes of cells treated with oncolytic viruses. The apoptosis rate of CT26 and HCT116 cells was detected by Annexin-V/PI staining flow cytometry. Western blot was used to detect the effects of VG161 on CT26, HCT116 cell apoptosis-related proteins and endoplasmic reticulum stress-related proteins.

2. The effect of VG161 on CRT surface exposure of CT26 and HCT116 cells was detected by laser confocal microscope. The effects of VG161 on the release of ATP and HMGB1 from CT26 and HCT116 cells were determined by Elisa. Flow cytometry was used to detect the effect of VG161 on the maturation of bone marrow-derived dendritic cells and the effect of mouse bone marrow-derived dendritic cells on the differentiation of spleen-derived T lymphocytes. ELISA assay was used to detect the expression of TNF- α and IFN- γ in the supernatant.

3. The PDX model of colon cancer was established, and the effect of VG161 on colon cancer was investigated by observing the body weight, tumor volume of tumor-bearing mice and detecting the expression of apoptotic protein by Western blot.

The model of bilateral subcutaneous transplantation of CT26 was established. The body weight, tumor volume and immune infiltration of tumor-bearing mice were observed to explore the effect of VG161 on anti-colon cancer and the ability of activating immunity, and to observe whether the combined use of OX40 antibody can further improve the effect of anti-colon cancer.

Result:

1. When CT26 and HCT116 cells were treated with VG160 and VG161 for 24 h, 48 h and 72 h, the cell morphology changed in different degrees, and VG160 and VG161 had certain killing effects on CT26 and HCT116 cells. When VG161 MOI=0.5 was used, the inhibition rate of CT26 and HCT116 cells was about 50%. When CT26 and HCT116 cells were treated with VG161 for 48 h, apoptosis was induced in CT26 and HCT116 cells and the expression of stress-related proteins in endoplasmic reticulum was promoted.

2. When CT26 and HCT116 cells were treated with VG161 for 24 h, the surface exposure of CRT and the release of ATP and HMGB1 were induced in CT26 and HCT116 cells. At the same time, mVG161 can induce the maturation of DCs, while mature DCs can promote the differentiation of splenic T lymphocytes.

3. The PDX model experiment of colon cancer showed that VG161 could delay tumor growth, reduce the expression of ki67 in tumor, promote the expression of apoptotic protein in tumor, and prolong the survival time of tumor-bearing mice. The experiment of CT26 bilateral subcutaneous transplantation tumor model showed that VG161 could delay tumor growth, reduce the expression of ki67 in tumor, promote the maturation of DCs in lymph nodes, the infiltration of CD8⁺ T cells in tumor and the expression of memory T cells in spleen, and promote the expression of TNF- α and IFN- γ . When combined with OX40 antibody, the effect was better.

Conclusion:

Oncolytic virus VG161 promotes the expression of endoplasmic reticulum

stress-related proteins in CT26 and HCT116 cells, induces immunogenic cell death, promotes DCs maturation, induces splenic T lymphocyte differentiation, activates systemic anti-tumor immune response, promotes immune infiltration and induces immune memory, thus plays an anti-colon cancer role.

Key words:

Oncolytic Virus; VG161; Colon Cancer; Immunogenic cell death

中英文缩略词表

缩写词	英文全称	中文全称
ATP	Adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
APCs	Antigen presentation cells	抗原递呈细胞
CRC	Colorectal cancer	结直肠癌
CCK-8	Cell counting Kit-8	细胞计数试剂盒
CRT	Calreticulin	钙网蛋白
DAMPs	Damage associated molecular patterns	损伤相关分子模式
DCs	Dendritic cells	树突状细胞
ER	Endoplasmic reticulum	内质网
ERS	Endoplasmic reticulum stress	内质网应激
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
HMGB1	High Mobility Group Protein 1	高迁移率族蛋白 B1
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
HSV-1	Herpes simplex virus type 1	1 型单纯疱疹病毒
ICD	Immunogenic cell death	免疫原性细胞死亡
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半数抑制浓度
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
OVs	Oncolytic virus	溶瘤病毒
OD	Optical density	吸光度
oHSV-1	Oncolytic herpes simplex virus type 1	溶瘤性单纯疱疹病毒 1 型
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PDX	Patient-derived xenografts	异种移植模型
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
TBST	Tris-buffered saline with tween-20	加吐温的 Tris 盐缓冲液
Treg	Tregulatory cells	调节性 T 细胞
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll 样受体 4
WB	Western Blot	蛋白质免疫印迹法

引言

结直肠癌（colorectal cancer, CRC）是世界上常见的癌症之一，发病率和死亡率逐年上升^[1]。到 2020 年，除非黑色素瘤皮肤癌外，约有近两千万癌症新发病例和一千万癌症死亡病例，其中，CRC 发病率约占 10%，在全部癌症病例数中占比 9.4%^[2]。预计到 2030 年，CRC 的全球负担将增加 60%，约有两百多万新发病例和一百多万例死亡病例^[3]。早发性 CRC 主要发生在 50 岁以下的人群中，其发病率在世界范围内逐年增加^[4]。根据中国癌症杂志 2019 年的调查研究发现，2015 年上海市恶性肿瘤发病率和死亡率调查中，CRC 位居第二位^[5]。据最新研究调查发现^[6]，我国 CRC 的预后也并不理想。主要表现及原因有：第一，目前我国 CRC 5 年生存率低于 60%；第二，术后 2 年出现复发和转移的患者约占 CRC 患者的 50%；第三，放化疗副作用较大；第四，中晚期患者仍然缺乏有效的治疗措施。目前 CRC 的治疗方式包括以内镜和手术局部切除为主，辅以放疗、化疗和中医药治疗等的综合疗法。近年来随着科技的发展，出现了细胞因子疗法、免疫检查点抑制剂疗法、单抗或小分子药物介导细胞毒性的疗法、免疫疫苗疗法、嵌合抗原受体 T 细胞疗法、抗 OX40 疗法以及放化疗激活免疫原性细胞死亡等免疫治疗方法。其中，以免疫检查点抑制剂为代表的肿瘤免疫疗法为 CRC 的治疗带来了新的希望，但是仍然面临着患者应答率低、单独治疗疗效不佳以及会引起严重的细胞因子风暴等问题。其中治疗应答率低的主要原因是肿瘤细胞本身免疫原性较弱，无法被机体的免疫系统识别。因此，如何提高肿瘤细胞的免疫原性，是改善结直肠癌治疗效果的关键因素。

溶瘤病毒（oncolytic virus, OV）是一种可以杀伤肿瘤细胞，且有一定复制能力的病毒。OVs 可以利用靶细胞抑癌基因的失活或缺陷，选择性感染肿瘤细胞而不影响正常细胞，其在肿瘤细胞内大量复制并最终裂解、杀死肿瘤细胞，同时释放免疫因子，诱导抗肿瘤免疫反应。目前，有多种病毒正在被研究，以作为潜在的肿瘤治疗方法。据报道，截至 2016 年，至少有 8 种溶瘤病毒处于 I 期临床试验，9 种溶瘤病毒处于 II 期临床试验，2 种溶瘤病毒处于 III 期临床试验^[7]。2017

年注册的临床试验中，有 78 个介入试验使用了“溶瘤病毒”，这其中涵盖了几乎所有的实体器官恶性肿瘤^[8]。在所有的临床试验中，以腺病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒为研究重点。目前，溶瘤病毒的研究也取得了阶段性的成果。在 2005 年 11 月，中国监管机构首次批准了转基因溶瘤腺病毒 H101（安柯瑞，一种缺失 E1B 基因的腺病毒^[9]）用于头颈部肿瘤和食道癌的治疗^[10]（仅在中国使用）。在 2015 年 10 月，美国食品药品监督管理局批准了一种携带粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF）的第二代溶瘤性单纯疱疹病毒 1 型（oncolytic herpes simplex virus type 1, oHSV-1）Talimogene Laherparepvec（T-Vec）用于黑色素瘤的治疗^[11]。在 2016 年 1 月，欧洲批准 T-Vec 的使用；在 2016 年 5 月，澳大利亚批准 T-Vec 的使用^[12-13]。在 2021 年 6 月 11 日，日本厚生劳动省批准 Teserpaturev（G47 Δ ）用于恶性胶质瘤的治疗^[14]。

我们研究的溶瘤病毒是来自中生复诺健生物科技有限公司所研发的 VG161。这是一种选择性复制的单纯疱疹 1 型溶瘤病毒，由骨架病毒 VG160 删除 ICP34.5 基因，加载和表达 IL-12、IL-15、IL-15 受体 α 亚基亚型 1（IL-15RA）和一种能够阻断 PD-1/PD-L1 相互作用的融合蛋白（TF-Fc）改造而来^[15]。删除 ICP34.5 基因是一种安全措施，以消除神经毒力。加入的 IL-12 具有激活 T 细胞和 NK 细胞的能力，并具有多种免疫调节作用，在许多肿瘤中表现出了显著的治疗效果，尤其是在瘤内注射时^[17]。而 IL-15 通过诱导 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞活化的作用，在多种肿瘤模型中也显示出了作为单一疗法的前景，当与包括 IL-12 在内的其他细胞因子联合使用时，IL-15 的抗肿瘤作用会协同增强^[18]。IL-15RA 可以与 IL-15 结合，从而延长 IL-15 的半衰期，增强 IL-15 信号的效力^[19]。加入 PD-L1 阻断剂的目的是防止 PD-1/PD-L1 相互作用抑制 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的作用，从而显著提高抗肿瘤免疫作用^[20]。我们研究的这种新型溶瘤性单纯疱疹病毒 VG161，根据细胞种属的不同，可以分为针对鼠源性细胞的 mVG161（murine-VG161）和针对人源性细胞的 hVG161（human-VG161）。mVG161 和 hVG161 均可将携带的四种免疫调节分子导入肿瘤微环境（tumor micro-environment, TME），产生协同性抗肿瘤免疫作用，并且该类病毒采用瘤内注射给药，潜在适应症较广。Chouljenko DV 等人在同基因 CT26 和 A20 肿瘤模型中测试了新型溶瘤性单纯疱疹病毒 VG161 的体内作用，结果发现，与不表达外源基因的骨架病毒 VG160 相

比, VG161 具有更强的疗效。瘤内注射 VG161 后, 不仅能抑制肿瘤增殖, 引起强大的抗肿瘤免疫反应, 而且具有一定的生物安全性^[15]。Ding J 等人在 CT26 小鼠模型和人类白细胞抗原匹配的 CD34⁺人源化肝内胆管癌细胞异种移植模型中试验了溶瘤病毒 VG161 预先免疫和多周期治疗对抗肿瘤效果的影响。研究发现, 预先接种 1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 和瘤内给药可增强 VG161 的抗肿瘤效果, 并且, 在 HSV-1 血清阳性患者中, 基于 HSV-1 的 VG161 治疗和多周期 VG161 长期维持治疗具有潜在的临床益处^[21]。最近, Shen Y 等人关于 VG161 治疗胰腺癌的研究发现, VG161 能够系统地激活胰腺模型中的获得性免疫和先天免疫, 当 VG161 与 PD-1 联用时, 可以通过改变肿瘤免疫和重塑肿瘤微环境代谢而具有长期的抗肿瘤作用^[22]。尽管上述研究实例证明了溶瘤病毒具有优异的抗肿瘤疗效, 但是, 溶瘤病毒目前仅对黑色素瘤、脑胶质瘤等免疫反应比较高的肿瘤疗效较好, 对肠癌、胃癌等肿瘤疗效较差, 且存在单独使用效价比较低等缺陷。因此探索溶瘤病毒的作用机制及更好的联合使用方法仍是当前研究的重点。

研究表明, 改善将死的肿瘤细胞的免疫原性, 可以激活免疫反应的抗癌潜力, 这种受调控的细胞死亡过程被称为免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD), 由于损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 的释放, 构成了一种具有免疫调节潜力的新型抗癌策略^[23]。ICD 能够增加瘤内 CD8⁺ T 细胞的数量、抑制调节性 T 细胞 (regulatory cells, Treg) 产生和作用, 诱导适应性免疫反应^[24,25]。并且将死的细胞可以产生新的抗原表位并释放 DAMPs, 招募树突状细胞 (dendritic cells, DCs), 识别、吞噬肿瘤抗原, 并将其递呈给 T 细胞, 激活适应性免疫应答, 识别并清除肿瘤抗原, 以便诱导持久的抗癌作用^[26]。根据研究发现^[27], 能触发 ICD 的物质主要有感染性病原体 (溶瘤病毒)、免疫原性化疗药 (奥沙利铂、环磷酰胺等)、放射性治疗、光动力疗法、高静水压疗法以及坏死性凋亡等。如 Takasu A 等人研究发现 1 型溶瘤单纯疱疹病毒 RH2 可以诱导小鼠鳞状细胞癌 SCCVII 细胞发生 ICD^[28]。Wang X 等人研究发现溶瘤新城疫病毒 FMw 株能诱导前列腺癌 PC-3 细胞表达和释放多种 ICD 标志物, 即钙网蛋白、热休克蛋白和高迁移率族蛋白 1^[29]。Araki H 等人研究发现表达 P53 的端粒酶特异性溶瘤腺病毒 OBP-702 可以诱导人和小鼠胰腺导管腺

癌细胞发生 ICD，并与抗 PD-1 抗体联用时，可以促进细胞毒性 T 淋巴细胞的浸润，增加免疫疗效，抑制 PAN02 肿瘤的生长，增强 OBP-702 的抗肿瘤效果^[30]。尽管上述研究证明了溶瘤病毒具有诱导恶性肿瘤发生 ICD 的能力，但是，关于 VG161 对结肠癌细胞免疫原性死亡的作用和机制仍不明确。

课题组前期探究溶瘤病毒 VG161 对结肠癌细胞体外作用的预实验发现，溶瘤病毒 VG161 可以抑制结肠癌细胞增殖，诱导结肠癌细胞凋亡，并促进结肠癌细胞的内质网应激相关蛋白表达。在 CT26 单边皮下移植瘤模型中探讨溶瘤病毒 VG161 对结肠癌细胞的体内研究发现，与对照组相比，溶瘤病毒 VG161 可以明显延缓肿瘤生长，延长小鼠生存时间。通过临床研究及文献报道^[24-30]，溶瘤病毒可以诱导免疫原性细胞死亡，而免疫原性细胞死亡可由应激压力所致，其中，内质网应激（endoplasmic reticulum stress, ERS）的激活便是 ICD 发生的中心事件之一。因此，我们设想溶瘤病毒 VG161 是否可以通过激活内质网应激，诱导结肠癌细胞发生免疫原性死亡，进而招募树突状细胞呈递抗原，并刺激 T 淋巴细胞，诱导适应性免疫应答，以改善结肠癌的免疫原性，增强抗结肠癌的治疗效果。Carolina A.C 等人^[31]研究发现抗 OX40 疗法可以促进 T 细胞的增殖、分化，抑制 Tregs 细胞的活性。因此，我们设想联用 OX40 抗体是否可以进一步增强溶瘤病毒 VG161 的作用、激活抗肿瘤免疫反应，达到协同增效抗结肠癌的目的。

正文

第一部分 VG161 对 CT26、HCT116 细胞的体外作用

结直肠癌是临床常见且伴随高致死率的消化道恶性肿瘤之一。据报道,2020 年亚洲结直肠癌发病率位居第 3 位,死亡率位居第 2 位^[1];中国结直肠癌发病率位居第 3 位,死亡率位居第 5 位^[32]。目前我国以手术治疗为主的多学科综合治疗方式作为结直肠癌的主要治疗原则,虽取得一定疗效,但由于不能完全清除中晚期肿瘤、术后复发率较高、放化疗的细胞毒性等问题使得治疗效果有限^[33]。溶瘤病毒是肿瘤治疗的新兴方法,其在选择性复制并杀伤癌细胞的同时,还能调节抑制性肿瘤微环境,激活免疫应答,产生持久的抗癌效果,是一种重要的免疫联合疗法。研究表明,溶瘤病毒治疗可以诱导免疫原性细胞死亡^[34],而免疫原性细胞死亡的中心事件之一就是内质网应激反应的激活。结合前人研究结果,我们研究了溶瘤病毒 VG161 是否对小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 具有杀伤作用,以及是否可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 发生内质网应激反应。

1 实验材料

1.1 细胞株

小鼠结肠癌细胞 CT26、人结肠癌细胞 HCT116 均购自于中国科学院细胞库。细胞株加入 RPMI-1640 完全培养基,培养于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中,细胞长至 80%-90%时可传代。

1.2 主要试剂

试剂名称	生产厂家	货号
RPMI-1640 培养基	美国 Corning 公司	10-040-CVR
胎牛血清	美国 Gibco 公司	10099-141C
青霉素/链霉素双抗溶液	美国 Gibco 公司	15140122
无血清细胞冻存液	日本 ZENOAQ 公司	Cellbanker2
胰蛋白酶	美国 Gibco 公司	25200-072
Cell Counting Kit-8 细胞增殖毒性检测试剂盒 (CCK-8)	日本同仁公司	FK774
细胞凋亡检测试剂盒——Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit	日本同仁公司	SH680
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)	上海碧云天生物技术有限公司	P0010S
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (7.5%)	上海雅酶生物医药科技有限公司	PG111
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%)	上海雅酶生物医药科技有限公司	PG113
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (15%)	上海雅酶生物医药科技有限公司	PG114
蛋白酶抑制剂 Cocktail	美国 Roche 公司	4693116001
预染蛋白分子标准品	美国 Thermo 公司	26616
PVDF 膜	美国 Millipore 公司	ISEQ00010
Immobilon Western 化学发光 HRP 底物	美国 Merck 公司	WBKLS0500
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	10014108
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	40064360
牛血清蛋白 BSA	德国 BioFrox 公司	4240GR100

1.3 主要仪器

仪器名称	生产厂家	货号
双人单向流超净化实验工作台	新加坡 ESCO 公司	SVE-6A1
37°C 恒温细胞培养箱	美国 ThermoFisher Scientific 公司	HERAcell240i
台式低速离心机	德国 Eppendorf 公司	5702R
台式高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司	5804R
电热恒温水浴锅	上海精宏实验设备有限公司	DK-8D
酶标仪	美国 Bio-Rad 公司	BioRad-680
凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司	Gel-DocEQ
摇床	美国 Bio-Rad 公司	166-0719EDU
金属浴	上海希言科学仪器有限公司	2016C

1.4 主要试剂配制

1.4.1 RPMI-1640 完全培养基配制

组成	比例
基础培养基 (RPMI-1640)	89%
胎牛血清	10%
青霉素/链霉素双抗溶液	1%

按照上述比例在超净台内配制好，放于 4℃冰箱备用。

1.4.2 1×PBS 磷酸盐缓冲液配制

组成	含量
去离子水	2 L
1×PBS 粉末	250 g

在搅拌器上混匀，完全溶解后转移至试剂瓶高温灭菌，放于 4℃冰箱备用。

1.4.3 CCK-8 工作液配制

组成	比例
基础培养基 (RPMI-1640)	90%
CCK-8 原液	10%

现配现用。

1.4.4 BCA 工作液配制

组成	比例
A 液	49
B 液	1

现配现用。

1.4.5 PAGE 快速凝胶配制

(1) 上层胶配方：

凝胶厚度	上层胶溶液	上层胶缓冲液	改良型促凝剂
0.75 mm	0.5 mL	0.5 mL	10 μL
1.00 mm	0.75 mL	0.75 mL	15 μL
1.50 mm	1.0 mL	1.0 mL	20 μL

(2) 下层胶配方：

凝胶厚度	下层胶溶液	下层胶缓冲液	改良型促凝剂
0.75 mm	2.0 mL	2.0 mL	40 μL
1.00 mm	2.7 mL	2.7 mL	60 μL
1.50 mm	4.0 mL	4.0 mL	80 μL

配制好的 PAGE 凝胶可立即使用，也可浸泡在 1×电泳液中，放于 4℃备用（放置时间小于一周）。

2 实验方法

2.1 细胞培养

2.1.1 实验前准备工作

进入细胞房之前，穿好工作服，戴好手套、口罩。打开超净台，用酒精棉球叠瓦式擦拭超净台 2-3 遍，放入移液枪、培养液、细胞瓶等试剂耗材，关好超净台，打开紫外灯灭菌 30 min，待紫外灯自动关闭后再进行下一步操作。

2.1.2 细胞复苏

打开 37℃恒温水浴锅，待温度升至 37℃时，从液氮罐中取出冻存的 CT26、HCT116 细胞，镊子夹取冻存管上方，放置水浴锅中，不断摇晃，待冻存液解冻。随后将细胞转移至超净台中，用酒精棉球擦拭冻存管封口膜，用 1 mL 移液枪吸取细胞悬液至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心机离心 5 min，弃上清后添加 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，转移至细胞培养瓶中，补足 5 mL RPMI-1640 完全培养基，混匀。置于 37℃、5% CO₂，饱和湿度的细胞培养箱中进行培养。

2.1.3 细胞传代

待细胞培养瓶中 CT26、HCT116 细胞生长至 80%-90%时，可以传代，传代比例 1:2 或 1:4 等。用 1 mL 移液枪吸走瓶内培养基，加入 2 mL 1×PBS 缓冲液轻轻清洗 2-3 次，吸净 1×PBS 后加入 500 μL 胰蛋白酶，铺满培养面后静置，待细胞消化下来后用 2 mL 的 RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶，混匀后吸至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心机离心 5 min，弃上清，加入 2 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，按比例分瓶，每瓶加入 5 mL RPMI-1640 完全培养基，混匀，放于培养基继续培养。

2.1.4 细胞冻存

待细胞培养瓶中 CT26、HCT116 细胞状况良好，并生长至 90%左右时，对其进行清洗以及消化处理，加入 2 mL RPMI-1640 完全培养基终止消化，转移至离心管中，1000 rpm，5 min 离心。弃上清，留取细胞沉淀，加入 0.5 mL 无血清细胞冻存液，混匀，转移细胞至冻存管，封上封口膜，标记细胞品系和冻存时间，

放入-80℃或者液氮罐中保存。

2.2 CCK-8 实验

2.2.1 细胞接种

准备好超净台，选取对数生长期的 CT26、HCT116 细胞，用 1×PBS 清洗后，加入 500 μL 胰蛋白酶消化细胞，待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落，用 2 mL RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶消化液，吹打混匀后转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min。弃掉上清液，加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，取 10 μL 于细胞计数仪计数。根据计数结果，加入 RPMI-1640 完全培养基，使细胞浓度调整为 5×10^4 个/mL，随后接种于 96 孔细胞培养板中，100 μL/孔，混匀，放于培养箱培养 24 h，待细胞贴壁。

2.2.2 细胞加药

取出 96 孔板，观察细胞贴壁状况并拍照。随后置于超净台，吸净孔内细胞上清，设置 VG160、VG161 不同时间段组和不同浓度组，加入相应浓度的溶瘤病毒 100 μL/孔，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中分别孵育 24 h、48 h、72 h。

2.2.3 检测 OD 值

到培养时间后，取出 96 孔板，观察细胞形态并拍照。随后吸净孔内培养液，每孔加入 100 μL CCK-8 工作液，然后将 96 孔板置于 37℃培养箱中孵育 0.5-4 h，在酶标仪吸光度 450 nm 处测量 OD 值，根据 OD 值，计算 IC₅₀，作为后续实验用药浓度参考依据。

2.3 细胞凋亡检测

2.3.1 细胞接种

在超净台内将对数生长期的 CT26、HCT116 细胞，用 1×PBS 清洗后，加入 500 μL 胰蛋白酶消化细胞，待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落，用 2 mL RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶消化液，吹打混匀后转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min。弃掉上清液，加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，取 10 μL 于细胞计数仪计数。根据计数结果，加入 RPMI-1640 完全培养基，使细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL，随后接种于 6 孔细胞培养板中，1 mL/孔，每孔再补充 1 mL RPMI-1640 完全培养基，混匀，放于培养箱培养 24 h，待细胞贴壁。

2.3.2 细胞加药

取出 6 孔板，查看细胞贴于 6 孔板底部的情况，随后置于超净台内，吸净孔内细胞上清，设置 VG161 感染复数（multiplicity of infection, MOI）为 0, 0.1, 0.25 和 0.5 组，加入相应浓度的溶瘤病毒，并补充 RPMI-1640 完全培养基至 2 mL 体系，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h。

2.3.3 流式细胞术检测

48 h 后，取出 6 孔板，在显微镜下观察细胞形态变化。

(1) 收集 6 孔板中每组的细胞培养液，转移至 15 mL 离心管中。

(2) 用 1×PBS 洗涤细胞 2 次，收集清洗液至于 (1) 的离心管中混匀。

(3) 用不含有 EDTA 的胰蛋白酶消化 6 孔板中的细胞，待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落，用 (1) 的离心管中液体终止消化，轻轻捶打，使细胞完全脱落，并收集至 (1) 的离心管中，使用离心机 2000 rpm，7 min 离心，弃上清，用 1×PBS 重悬后再次 2000 rpm，7 min 离心。

(4) 弃上清，加入 300 μL 1×Binding Buffer 重悬，调整计数 $>1 \times 10^6$ 个/mL。

(5) 将 (4) 中的细胞悬液混匀，取 100 μL 加入流式管中。在含有细胞悬液的流式管中加入 Annexin V-FITC 5 μL，避光孵育 15 min，随后再加入 PI Solution 5 μL，避光孵育 5 min。孵育完成后，再加入 400 μL 1×Binding Buffer 混匀，1 h 内在流式细胞仪检测。

2.4 蛋白免疫印迹法（Western blot）检测

2.4.1 蛋白提取

(1) 取对数生长期的 CT26、HCT116 细胞接种于 6 孔板中，每孔 1×10^5 个细胞，培养体系为每孔 2 mL 培养基，于 37°C，5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。贴壁后，设置 VG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 组，加入相应浓度的 VG161，并补充 RPMI-1640 完全培养基至 2 mL 体系，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中继续孵育 48 h。

(2) 48 h 后，取出 6 孔板，弃上清，用 4°C 预冷的 1×PBS 缓冲液轻轻冲洗 2 次后空干，加入混有 PMSF 的 RIPA 强裂解液，冰上裂解 15 min。待裂解完成后，用细胞刮自上而下、叠瓦式沿着同一方向刮取，并用移液枪吸至写有浓度、细胞种类、作用时间的 1.5 mL EP 管中，置于冰上。打开超声破碎仪，将收集至

1.5 mL EP 管的蛋白于超声破碎仪中超声裂解 3-5 s，随后至于 4°C 离心机内，12000 rpm，离心 15 min。

(3) 离心完成后，上清液即为细胞总蛋白提取液。用 100 μ L 移液枪小心缓慢将上清液移至新的 1.5 mL EP 管中，标记好细胞类型、VG161 浓度和提取时间，冻于 -80°C 冰箱备用或立即定量提取的蛋白。

2.4.2 BCA 法定量蛋白

将 5 mg/mL 的蛋白标准品置于冰上融化，按照 0 μ L、1 μ L、2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L 浓度梯度加到 96 孔板中的标准孔中，用 4°C 预冷的 1×PBS 缓冲液将标准孔中的体积补足到 10 μ L。用移液枪取每个浓度的蛋白 2 μ L，加至 96 孔板中的样本孔中，同样用 4°C 预冷的 1×PBS 缓冲液将样本孔补足到 10 μ L，为减少误差，每个测定浓度的蛋白设置 3 个副孔。随后，在标准孔和样本孔中加入 200 μ L/孔 BCA 工作液，37°C 孵育 30 min，并在酶标仪吸光度 562 nm 处测量 OD 值，根据 OD 值，计算蛋白的浓度。

2.4.3 制备蛋白样品

根据计算的蛋白浓度，加入相应量的 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液和 RIPA 强裂解液，充分混匀后，放入金属浴，100°C 加热 10 min，冷却后上样或者放于 -20°C 保存备用。

2.4.4 电泳

(1) 配胶：在配胶之前，先将所需的长、短玻璃板、齿梳、塑料架和乳胶防漏垫清洗干净，并放于烘箱烘干。随后将长、短玻璃板下端对齐并夹紧，固定于塑料架上，在两玻璃板之间加入去离子水进行验漏。确认装置密闭性良好后，倒掉去离子水，用滤纸吸净剩余的水滴。根据目标蛋白的分子大小，选择配制所需浓度的 PAGE 快速凝胶。用 3 mL 的吸管吸取配制好的下层胶，缓慢加入两玻璃板之间，使液面和短玻璃板上沿之间的距离比梳齿长 0.5 cm 即可，立刻加入适量异丙醇覆盖于下层胶之上，进行液封。待下层胶凝固后（约 15 min），倒去异丙醇，用清水清洗 1-2 遍，再用滤纸吸干，随后使用 1 mL 移液枪吸取配制好的上层胶，加入制胶玻璃板中，插入梳齿。待上层胶成型、固定后（约 15 min），可开始电泳或泡入装有 1×电泳液的小盒，放于 4°C 备用。

(2) 电泳：将 marker 和检测样品置于冰上融化，取出配置好的 PAGE 快速

凝胶，安装于电泳架并夹紧，随后在电泳架之间的内槽中倒入 1×电泳液验漏。确认无外漏后，将电泳架移入电泳槽中，并在电泳架内槽里倒满 1×电泳液，赶走泡沫。垂直向上拔掉齿梳，按照 marker 和目标蛋白浓度顺序加入样品，每孔样品的蛋白总量在 10-20 μg 之间，每次上样要将样本打净，且要更换枪头，以免造成不必要的误差。上样完成后，在电泳架外槽添加适量的 1×电泳液，盖上电泳槽盖子（注意电源正负极，红线对应红接头，黑线对应黑接头），连接装置，接通电源，调整电压参数为 80 V，如观察到气泡自下往上冒出，则表明连接无误。待目标蛋白样品的蓝色的溴酚蓝位于上层胶与下层胶之间时，可以将电压调整为 120 V 继续电泳，等目标蛋白样品的蓝色的溴酚蓝即将跑出下层胶下方时，关闭电源，结束电泳。

2.4.5 转膜

从电泳架上取出配胶玻璃板，用撬板细端轻撬开短玻璃板，将 PAGE 快速凝胶留在长玻璃板上，并用撬板切去上层胶以及多余的下层胶，在第一个 marker 的附近切一个小三角，作为标记。从长玻璃板上轻轻取下凝胶，浸泡于 4℃预冷的 1×转膜液中。根据凝胶的大小裁剪出略大些的 PVDF 膜，将 PVDF 膜放于甲醇中活化 30 s。在转膜夹板的黑色面按一片黑网、三层白棉、PAGE 快速凝胶、PVDF 膜、三层白棉、一片黑网、转膜夹板的白色面顺序组装，制成“三明治”样结构，扣紧，不要留有空隙和弄出气泡。将“三明治”样结构放入转膜槽，空隙的部分放入冰砖，并加入 1×转膜液至转膜槽两刻度线之间，盖上转膜槽盖，接入电源（注意电源正负极，红色对红色，黑色对黑色），调整电流参数为 300 mA，开始转膜。转膜的时间根据目标蛋白分子量而定，一般 1 kDa 分子量需要转膜 1 min 左右。

2.4.6 封闭和抗体孵育

完成转膜后，取出 PVDF 膜，在膜正面左上方剪一小角作为标记，随后置于 5% BSA 封闭液中，室温下摇床慢摇 1-2 h。封闭完成后，将 PVDF 膜放入小盒，加入 1×TBST，置于摇床快洗 3 次，每次 10 min。根据 marker 的位置和所需的目标蛋白裁剪出相应的条带，每个条带置于相应的抗体稀释液稀释的抗体中，4℃摇床慢摇过夜。第二天回收前一天的抗体，在每个条带中加入 1×TBST，置于摇床快洗 3 次，每次 10 min。随后孵育相应的二抗，室温下摇床慢摇 1-2 h。回

收二抗后，同样用 $1 \times \text{TBST}$ 置于摇床快洗 3 次，每次 10 min，洗膜结束后即可进行显影。

2.4.7 显影

将显影试剂盒的 A 液和 B 液以 1:1 的比例配制，混匀后避光放置，即配即用。将吸水纸放于待显影条带的角落，稍微将待显影条带吸干，随后将条带放置于显影板上，均匀滴上配置好的显影液，调节曝光时间，开始显影。

3 统计学处理

运用 Graphpad Prism 8.0 软件分析实验数据和制作图形，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行处理，当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

4 实验结果

4.1 VG161 对 CT26、HCT116 细胞增殖的影响

首先观察了溶瘤病毒 VG160 和 VG161 对小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 的生长抑制作用。实验结果显示，溶瘤病毒 VG160 和 VG161 对小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 具有一定的杀伤作用。VG160 作用 CT26 细胞 48 h 的 IC_{50} 值为 0.44，mVG161 作用 CT26 细胞 48 h 的 IC_{50} 值为 0.49。VG160 作用 HCT116 细胞 48 h 的 IC_{50} 值为 0.46，hVG161 作用 HCT116 细胞 48 h 的 IC_{50} 值为 0.43。溶瘤病毒 VG160 和 VG161 分别作用小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 的 48 h IC_{50} 值并无明显差异（图 1.1）。根据以上实验结果，选取 0，0.1，0.25，0.5 的 MOI 进行后续实验。

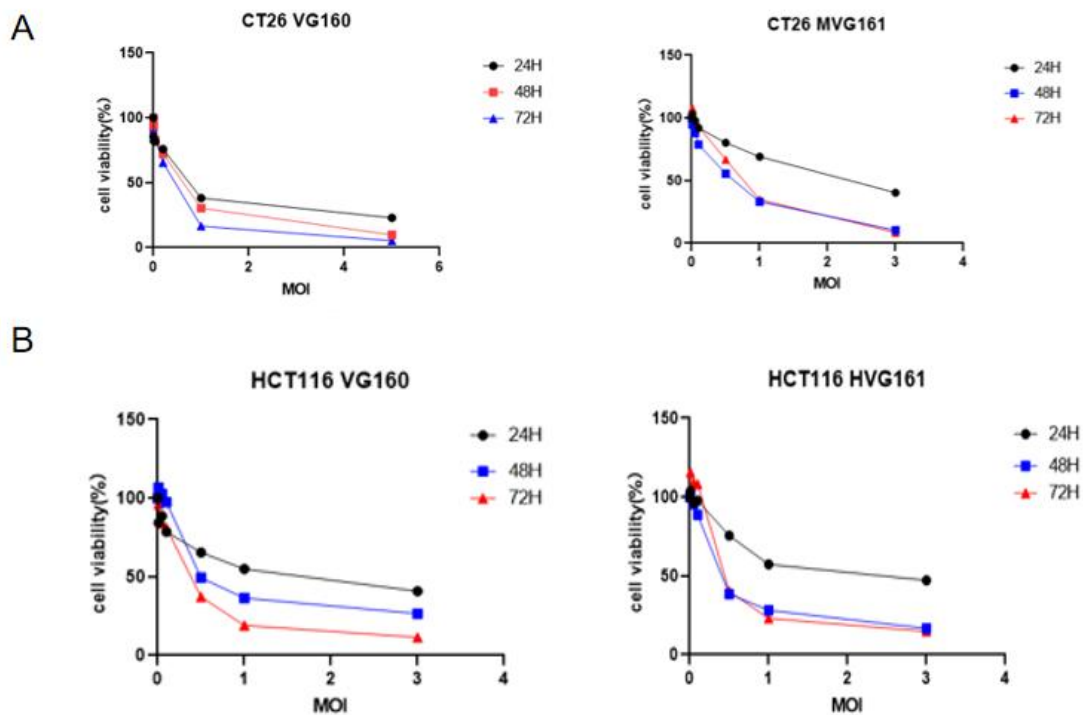


图 1.1 VG160 和 VG161 对 CT26、HCT116 细胞增殖的影响

A. VG160、VG161 分别作用 CT26 24 h、48 h、72 h 的细胞存活率折线图；B. VG160、VG161 分别作用 HCT116 24 h、48 h、72 h 的细胞存活率折线图

选取 MOI=0.5 的 VG160 和 VG161 分别作用小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 24 h、48 h、72 h，观察细胞形态学改变，并与加入 VG160 和 VG161 作用前的细胞形态相比较。实验结果显示，溶瘤病毒 VG160 和 VG161 作用小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 不同时间段后，随着作用时间的增加，细胞生长受到明显抑制，细胞逐渐变小、聚团，可以见到溶解的细胞碎片和病毒复制形成的空斑（图 1.2）。

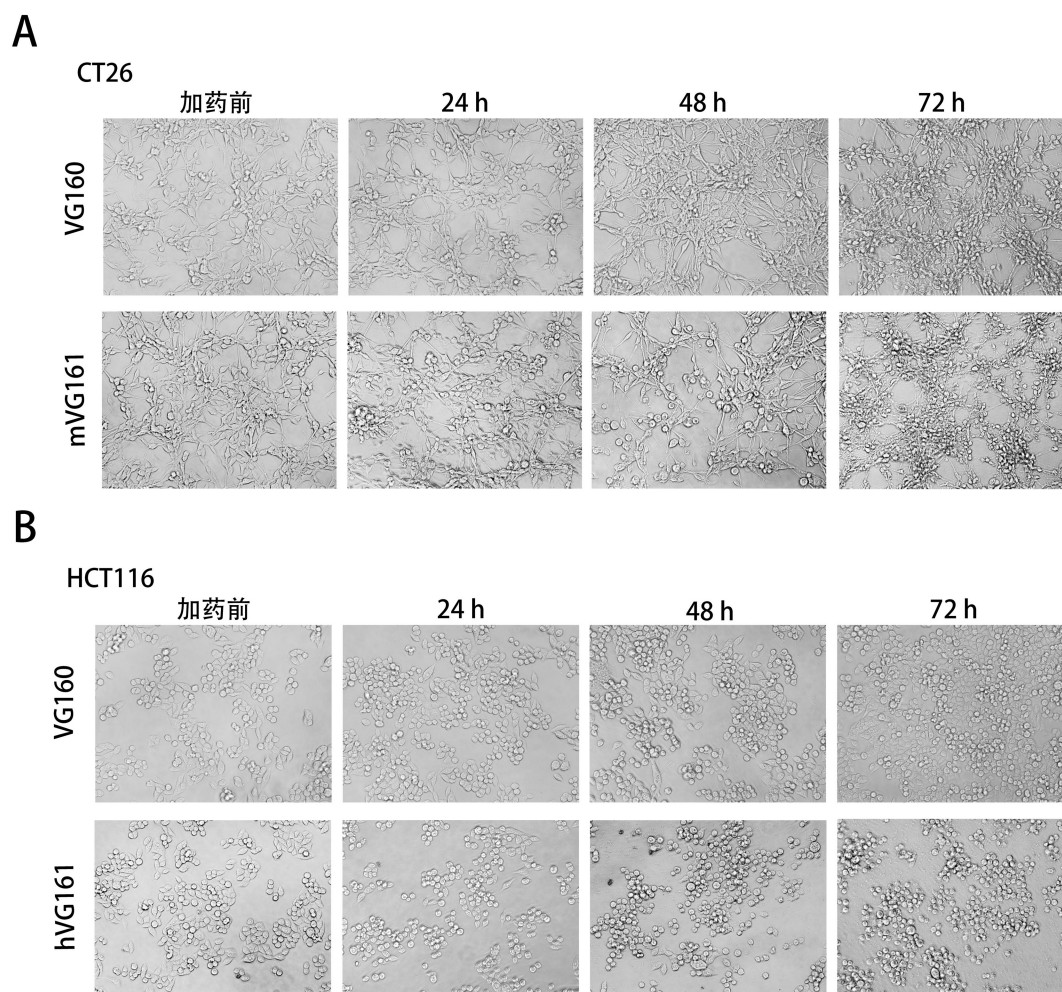


图 1.2 VG160 和 VG161 对 CT26、HCT116 细胞形态的影响 (200×)

A. VG160、VG161 分别作用 CT26 24 h、48 h、72 h 后与作用前细胞形态的对比；B. VG160、VG161 分别作用 HCT116 24 h、48 h、72 h 后与作用前细胞形态的对比

4.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞凋亡的影响

根据 CCK-8 的实验结果，我们选取 VG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 的浓度进行后续实验。mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 48 h 后，通过 Annexin V-FITC/PI 双染色，运用流式细胞术检测细胞凋亡情况。早期凋亡细胞结果在右下象限显示，晚期凋亡细胞结果在右上象限显示，总体凋亡率为早期凋亡与晚期凋亡之和。结果所示，在 CT26 细胞中，mVG161 MOI=0 组凋亡率为 (9.99±1.57) %；mVG161

MOI=0.1 组凋亡率为 (14.21±1.74) %，与 MOI=0 组相比，具有统计学差异 (* $P < 0.05$)；mVG161 MOI=0.25 组凋亡率为 (20.49±1.62) %，与 MOI=0 组相比，差异明显 (** $P < 0.001$)；mVG161 MOI=0.5 组凋亡率为 (26.27±1.42) %，与 MOI=0 组相比，具有显著差异 (** $P < 0.001$) (图 1.3 A)。在 HCT116 细胞中，hVG161 MOI=0 组凋亡率为 (5.03±1.33) %；hVG161 MOI=0.1 组凋亡率为 (14.46±3.27) %，与 MOI=0 组相比，具有统计学差异 (** $P < 0.01$)；hVG161 MOI=0.25 组凋亡率为 (18.86±0.39) %，与 MOI=0 组相比，差异明显 (** $P < 0.001$)；hVG161 MOI=0.5 组凋亡率为 (29.94±1.92) %，与 MOI=0 组相比，具有显著差异 (** $P < 0.001$) (图 1.3 B)。初步说明溶瘤病毒 VG161 可以促进结肠癌细胞 CT26、HCT116 凋亡。

表 1.1 溶瘤病毒 VG161 对 CT26、HCT116 细胞凋亡的影响

Group	<i>n</i>	%Apoptosis Cells
CT26		
0	3	9.99±1.57
0.1	3	14.21±1.74*
0.25	3	20.49±1.62***
0.5	3	26.27±1.42***
HCT116		
0	3	5.03±1.33
0.1	3	14.46±3.27##
0.25	3	18.86±0.39###
0.5	3	29.94±1.92###

*表示与 CT26 MOI=0 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；**表示与 CT26 MOI=0 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.001$ 。##表示与 HCT116 MOI=0 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.01$ ；###表示与 HCT116 MOI=0 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.001$ 。

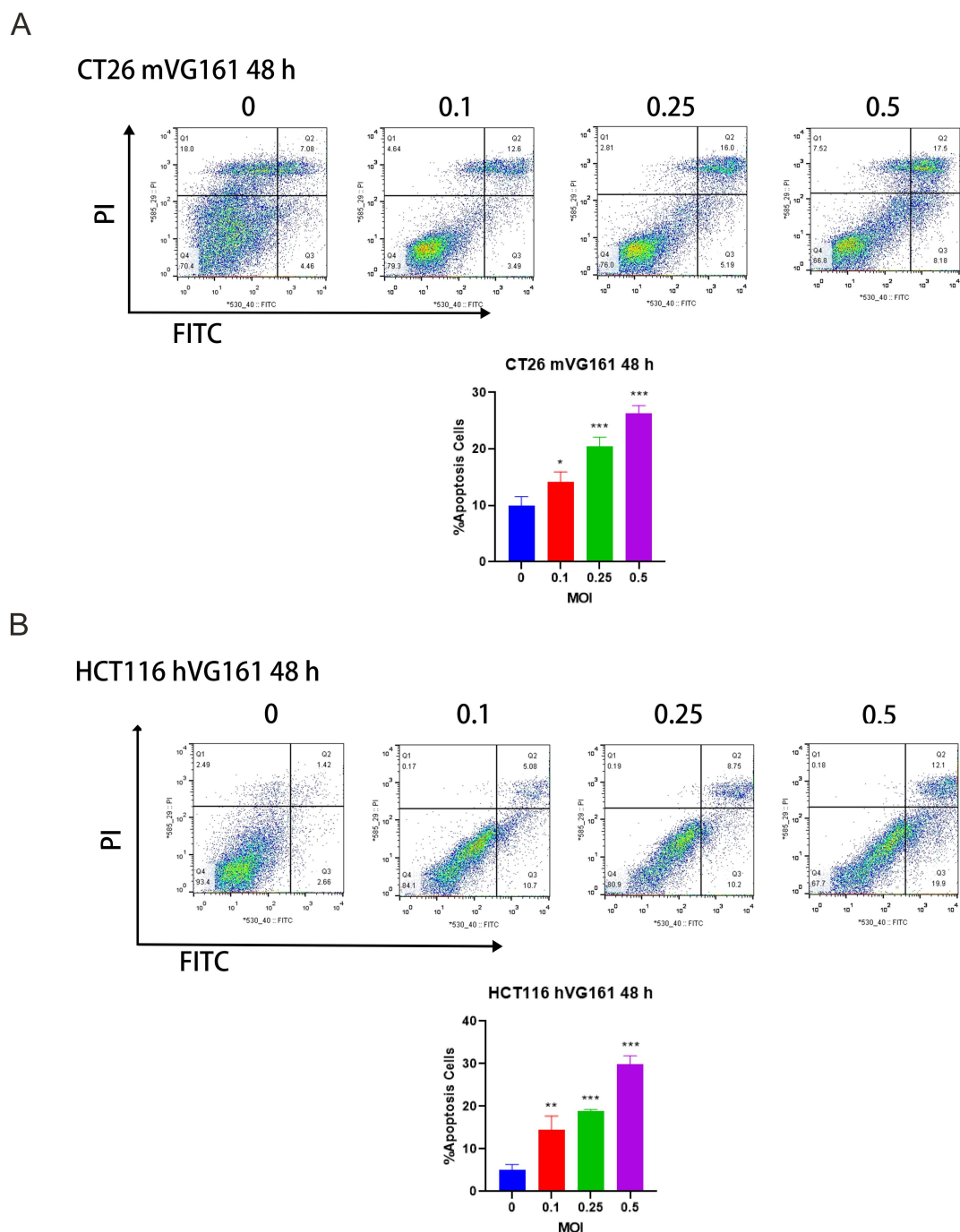


图 1.3 溶瘤病毒 VG161 诱导 CT26、HCT116 细胞凋亡

A. mVG161 作用 CT26 48 h 流式结果图；B. hVG161 作用 HCT116 48 h 流式结果图

随后用 mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 48 h 后, 提取蛋白, 运用 Western Blot 检测凋亡蛋白的变化趋势。结果显示, 在 CT26 细胞中, 随着 mVG161 浓度的升高, CT26 细胞胞内凋亡蛋白 cleaved-caspase3、Bax 呈现上升趋势; 而 caspase3

蛋白和抗凋亡蛋白 Bcl-2 呈现下降趋势（图 1.4 A）。在 HCT116 细胞中，随着 hVG161 浓度的升高，HCT116 细胞胞内凋亡蛋白 cleaved-caspase3、Bax 呈现上升趋势；而 caspase3 蛋白和抗凋亡蛋白 Bcl-2 呈现下降趋势（图 1.4 B）。以上实验结果进一步说明，溶瘤病毒 VG161 可以促进结肠癌细胞 CT26、HCT116 凋亡。

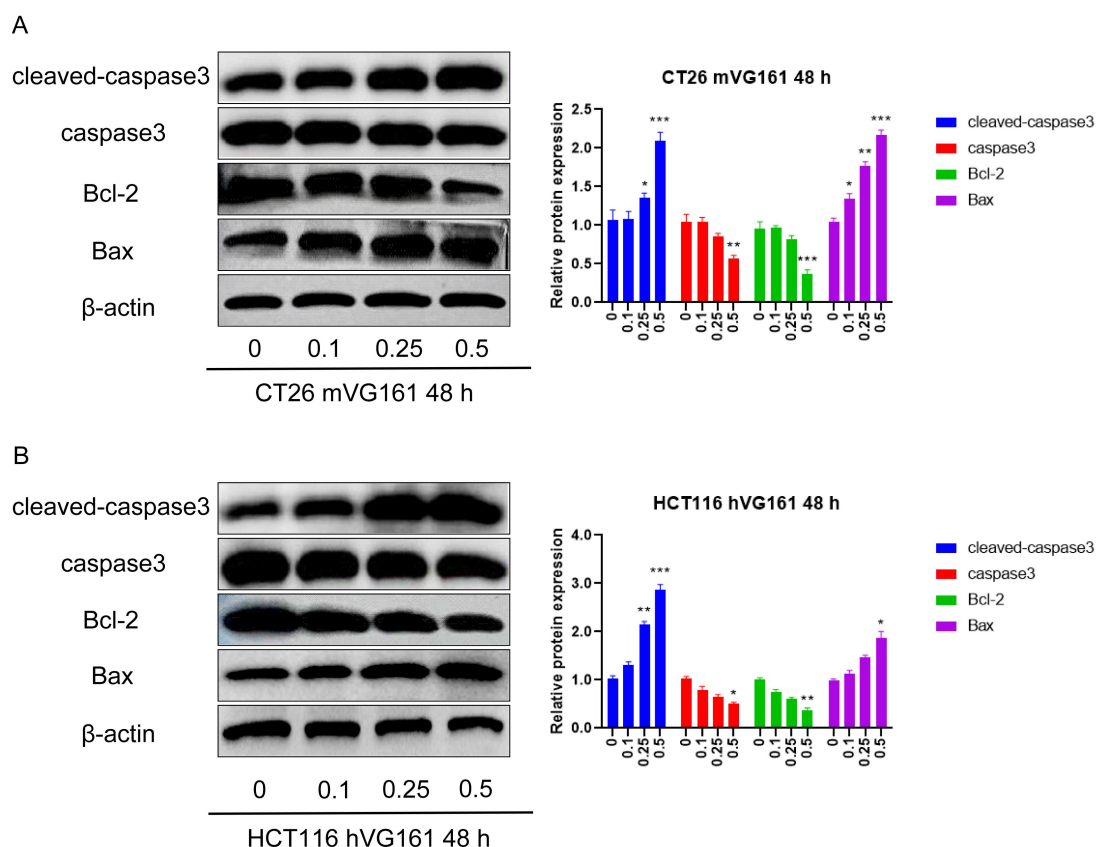


图 1.4 溶瘤病毒 VG161 对 CT26、HCT116 细胞内凋亡相关蛋白表达水平的影响

A. mVG161 对 CT26 细胞凋亡蛋白表达影响；B. hVG161 对 HCT116 细胞凋亡蛋白表达影响

4.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响

选取 mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 48 h 后，提取蛋白，运用 Western Blot 检测内质网应激相关蛋白的变化趋势。结果显示，在 CT26 细胞中，随着 mVG161 浓度的升高，内质网应激相关蛋白 p-PERK、GRP78、p-eIF2 α 呈现上升趋势；而 PERK 蛋白和 eIF2 α 蛋白呈现下降趋势（图 1.5 A）。在 HCT116 细胞中，随着 hVG161 浓度的升高，HCT116 细胞内质网应激相关蛋白 p-PERK、GRP78、p-eIF2 α

呈现上升趋势；而 PERK 蛋白和 eIF2 α 蛋白呈现下降趋势（图 1.5 B）。上述结果表明，溶瘤病毒 VG161 可以诱导结肠癌细胞 CT26、HCT116 发生内质网应激。

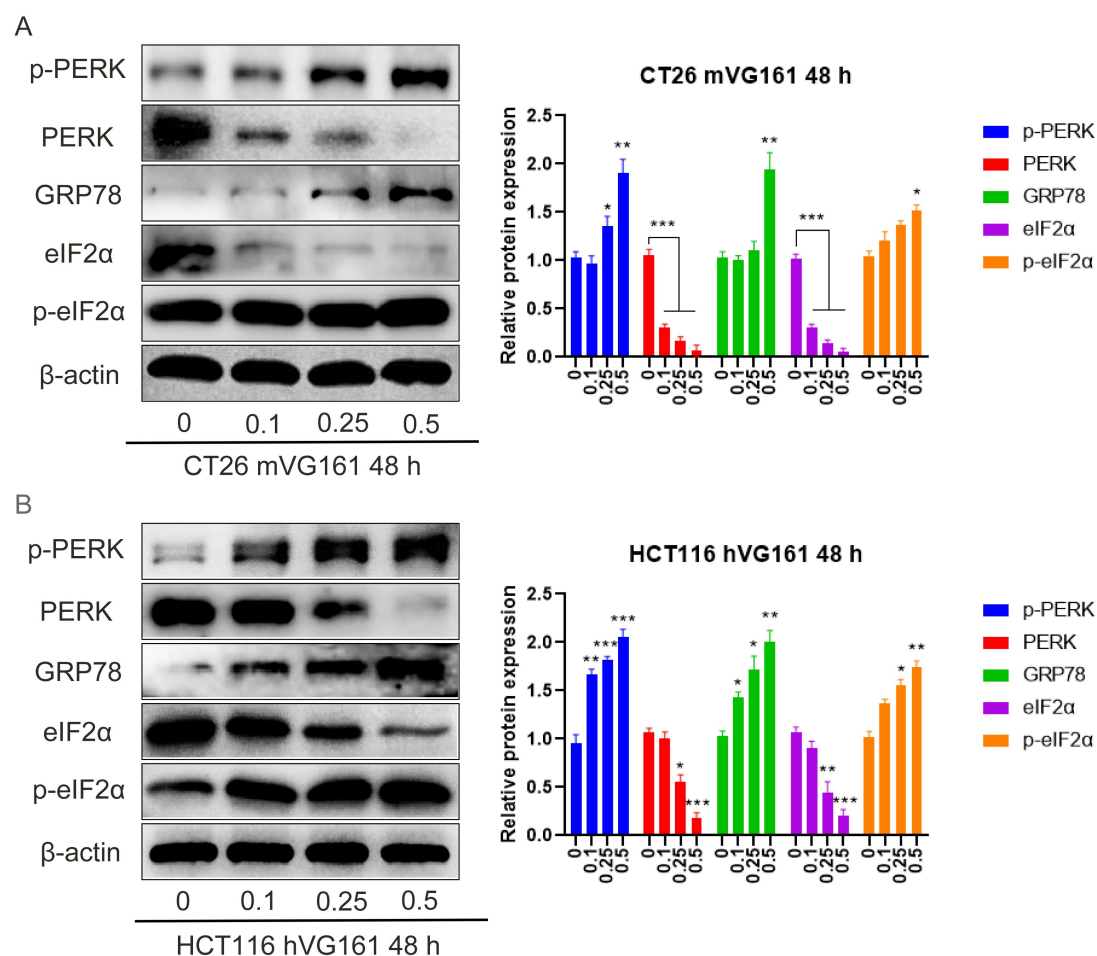


图 1.5 溶瘤病毒 VG161 对 CT26、HCT116 内质网应激相关蛋白表达的影响

A. mVG161 对 CT26 细胞内质网应激蛋白表达影响；B. hVG161 对 HCT116 细胞内质网应激蛋白表达影响

5 讨论

溶瘤病毒通过选择性感染肿瘤细胞，在肿瘤细胞内大量复制并溶解肿瘤、破坏肿瘤血管系统、调节抑制性的免疫微环境来杀伤肿瘤细胞。本研究通过 CCK-8 实验发现，溶瘤病毒 VG160 和 VG161 对小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 具有一定的杀伤作用。细胞凋亡是一种严格调控和进化保守的程序性细胞死亡方式，在胚胎发育和成人组织动态平衡等正常生理过程中发挥关键作用，同时也是一种肿瘤生长抑制机制^[35]。通过 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞术、

蛋白质免疫印迹法实验发现, 溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以促进小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 的调亡, 主要为 mVG161 和 hVG161 可以促进 CT26 和 HCT116 细胞调亡率的增加, 在 MOI=0.5 浓度组时差异显著 (** $P < 0.001$) 以及 mVG161 和 hVG161 可以促进 CT26 和 HCT116 细胞调亡蛋白 cleaved caspase3、Bax 表达上升, 和抑制抗调亡蛋白 Bcl-2 的表达。

溶瘤病毒除了能直接溶解肿瘤, 最重要的是, 溶瘤病毒还能释放免疫因子、诱导免疫反应、调节肿瘤免疫微环境, 将免疫原性差的“冷”肿瘤转变为免疫原性好的“热”肿瘤, 继续杀伤肿瘤细胞。根据溶瘤病毒的免疫特性, 接下来我们从免疫原性细胞死亡角度, 研究了溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 对小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 的免疫作用。内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是真核细胞的重要细胞器, 主要合成、分泌及降解蛋白质, 多种因素均可破坏内质网的稳定状态, 阻碍蛋白质的合成, 而折叠错误和没有折叠的蛋白质在内质网腔内堆聚, 细胞为此将做出一系列的应激反应, 即内质网应激^[36]。免疫原性细胞死亡是细胞调亡的特殊形式, 其中心事件之一是内质网应激反应的激活。具体过程为: 免疫原性细胞死亡的激活需要活性氧诱导的内质网应激, 或者至少是内质网应激和活性氧同时激活。根据内质网应激的参与方式, 免疫原性细胞死亡诱导剂被系统地分为 I 型或 II 型。I 型免疫原性细胞死亡诱导剂通过与内质网无关的靶点, 激活调亡细胞的进一步死亡, 但通过继发性或“间接”内质网应激效应, 刺激 ICD 相关的免疫原性物质的释放。大多数免疫原性细胞死亡诱导剂都属于 I 型, 因为它们针对的是胞浆蛋白、质膜通道蛋白或 DNA 复制蛋白。相反, II 型免疫原性细胞死亡诱导剂选择性地诱导靶向内质网, 通过直接改变内质网的稳定状态, 进而引发内质网应激, 诱导免疫原性调亡^[37]。我们通过蛋白质免疫印迹法实验发现, 溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以促进小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 内质网应激相关蛋白的表达, 主要表现为 p-PERK、GRP78、p-eIF2 α 蛋白呈现上升趋势, 而 PERK 蛋白和 eIF2 α 蛋白呈现下降趋势。以上实验结果表明, 溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 发生内质网应激反应。

第二部分 VG161 诱导 CT26、HCT116 细胞免疫原性死亡的能力

肿瘤细胞的免疫原性死亡是指肿瘤细胞受到外界刺激发生凋亡的同时,由非免疫原性状态转变为免疫原性状态,从而介导机体产生抗肿瘤免疫反应的过程。免疫原性细胞死亡的特征是细胞表面钙网蛋白(calreticulin, CRT)的暴露和免疫调节分子如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和高迁移率族蛋白 1(high mobility group box 1, HMGB1)释放到细胞外环境,而这些也是 ICD 发生的前提^[38]。为了增强抗肿瘤免疫,ICD 需要一个完整的先天性和适应性免疫系统。在 ICD 前期,内质网分子伴侣 CRT 转位至细胞膜表面,作为“吃掉我”信号,被吞噬细胞表面的 CD91 受体识别,并促进树突状细胞成熟,刺激树突状细胞吞噬将死的肿瘤细胞^[39]。在 ICD 前期、早期、中期,将死的肿瘤细胞通过自噬途径分泌 ATP 到胞外。ATP 作为一种“找到我”信号,在细胞外环境中,与抗原递呈细胞(antigen presentation cells, APCs)上的离子型(P2X7)和代谢型(P2Y2)嘌呤受体结合,刺激抗原递呈细胞成熟和趋化诱导^[40]。在 ICD 晚期,将死的肿瘤细胞释放 HMGB1, HMGB1 是一种非组蛋白染色质结合蛋白^[41]。在细胞凋亡晚期, HMGB1 从细胞核中释放出来与树突状细胞表面的 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)结合,激活树突状细胞,并促进树突状细胞向 T 细胞呈递抗原,促进 T 细胞的活化、增殖。TLR4 结合 HMGB1 后,激活了 TLR4/MyD88 信号通路,该信号通路通过抑制吞噬体和溶酶体之间的融合来增强肿瘤抗原的特异性,并加速树突状细胞对抗原成分的吞噬^[42]。因此,本章节主要探讨溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 是否可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 发生免疫原性细胞死亡,以及溶瘤病毒 mVG161 是否可以促进小鼠骨髓来源树突状细胞的成熟,和溶瘤病毒 mVG161 作用后的小鼠骨髓来源树突状细胞对脾脏来源的 T 淋巴细胞分化的影响。

1 实验材料

1.1 细胞株

同第一部分实验材料 1.1。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 6 只，6-8 周龄，体重 18-20 g，购于上海市计划生育科学研究所，饲养于上海市普陀区中心医院动物房。按动物伦理委员会相关规定饲养：相对湿度为 50%-65%，温度为 22°C-24°C，通风，无特定病原体，光照时间 12 h，喂食基础饲料，自由饮水等（伦理批号：DWEC-A-202206021）。

1.3 主要试剂（同第一部分主要试剂）

新增部分如下：

试剂名称	生产厂家	货号
TNF- α 试剂盒	欣博盛生物科技有限公司	EMC102a
IFN- γ 试剂盒	北京博奥龙免疫技术有限公司	BDEL-0054
共聚焦小皿	无锡耐思生命科技股份有限公司	801001
Human HMGB1 ELISA Kit	中国台湾 arigo 公司	ARG81185
Mouse/Rat HMGB1 ELISA Kit	中国台湾 arigo 公司	ARG81310
ATP 检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	S0026
红细胞裂解液	兰杰柯科技有限公司	BL503A
Murine IL-4	美国 PeproTech 公司	96-214-14-20
Murine GM-CSF	美国 PeproTech 公司	96-315-03-5
免疫染色固定液	上海碧云天生物技术有限公司	P0098
免疫染色通透液（Triton X-100）	上海碧云天生物技术有限公司	P0096

1.4 主要仪器（同第一部分主要仪器）

新增部分如下：

仪器名称	生产厂家	货号
激光共聚焦显微镜	日本 Nikon 公司	GDP2002

1.5 主要试剂配制（同第一部分主要试剂配制）

新增部分如下：

1.5.1 DC 完全培养基配制（50 mL 体系）

组成	含量
100 ng/ μ L GM-CSF	5 μ L
100 ng/ μ L IL-4	1 μ L
胎牛血清	5 mL
RPMI-1640 培养基	45 mL
青霉素/链霉素双抗溶液	500 μ L

按照上述比例在超净台内配制好，放于 4℃冰箱备用，储存不超过两周。

1.5.2 ATP 检测工作液配制

组成	比例
ATP 检测试剂	1
ATP 检测试剂稀释液	9

现配现用。

2 实验方法

2.1 钙网蛋白暴露实验检测

2.1.1 细胞接种

在超净台内，选取对数生长期的 CT26、HCT116 细胞，用 1×PBS 清洗后，加入 500 μ L 胰蛋白酶消化，待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落，用 2 mL RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶，吹打混匀后转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min。弃掉上清液，加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，取 10 μ L 于细胞计数仪计数。根据计数结果，加入 RPMI-1640 完全培养基，使细胞浓度调整为 1×10^4 个/mL，随后接种于共聚焦小皿中，1 mL/孔，并补充 1 mL 完全培养基，混匀，放于培养箱培养 24 h，待细胞贴壁。

2.1.2 细胞加药

取出共聚焦小皿，查看细胞状态和贴于共聚焦小皿的情况。随后置于超净台内，用 1 mL 移液枪吸掉共聚焦小皿内的细胞上清，设置 mVG161、hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组，加入相应浓度的溶瘤病毒 2 mL，置于 37℃，5% CO₂

培养箱中孵育 24 h。

2.1.3 钙网蛋白暴露检测

(1) 细胞固定：取出共聚焦小皿，查看细胞状态。用 1 mL 移液枪吸掉共聚焦小皿内的细胞上清，沿着共聚焦小皿壁缓慢加入 1 mL $1\times$ PBS 缓冲液清洗 1-2 次，弃上清，室温下沿着共聚焦小皿壁缓慢加入适量免疫染色固定液，覆盖整个小皿即可，固定 5 min， $1\times$ PBS 浸洗 5 min，共 3 次。

(2) 细胞通透：弃去 PBS 缓冲液，室温下加入免疫染色通透液（Triton X-100），覆盖整个小皿即可，固定 5 min， $1\times$ PBS 浸洗 5 min，共 3 次。

(3) 封闭：弃去 $1\times$ PBS 缓冲液，加入 5% BSA 室温封闭 1-2 h。

(4) 孵育抗体：弃去 5% BSA 封闭液，加入按 1:1000 比例稀释的钙网蛋白抗体， 4°C 过夜孵育。

(5) 复染细胞核：第二天回收稀释的钙网蛋白抗体，加入适量 $1\times$ PBST，摇床慢摇洗涤 3 次，每次 5 min。弃去 $1\times$ PBST 洗涤液，加入适量 DAPI，覆盖整个小皿即可，室温避光孵育 5 min，随后用 $1\times$ PBST 洗涤液浸洗 3 次，每次 5 min。

(6) 激光共聚焦显微镜观察：浸洗结束后，观察 CRT 暴露情况。

2.2 细胞内 ATP 检测

2.2.1 细胞接种

在超净台内，选取对数生长期的 CT26、HCT116 细胞，用 $1\times$ PBS 清洗后，加入 500 μL 胰蛋白酶消化，待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落，用 2 mL RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶，吹打混匀后转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min。弃掉上液清，加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬，取 10 μL 于细胞计数仪计数。根据计数结果，加入 RPMI-1640 完全培养基，使细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL，随后接种于 6 孔板中，1 mL/孔，并补充 1 mL 完全培养基，混匀，放于培养箱培养 24 h，待细胞贴壁。

2.2.2 细胞加药

取出 6 孔板，查看细胞状态和贴于 6 孔板的情况。随后置于超净台内，用 1 mL 移液枪吸掉 6 孔板内的细胞上清，设置 mVG161、hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组，加入相应浓度的溶瘤病毒 2 mL，置于 37°C ，5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。

2.2.3 胞内 ATP 检测

(1) 收集上清: 吸除 6 孔板内的培养液, 每孔加入 200 μL 裂解液冰上裂解细胞 5 min。裂解后, 收集液体于 1.5 mL EP 管内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 5 min, 取上清, 至新的 1.5 mL EP 管内, 做好样品浓度、作用时间等标记, 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于后续的测定。

(2) 测定胞内 ATP 浓度: 从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱拿出 ATP 浓度检测板, 平衡至室温, 加入 ATP 检测工作液 100 μL /孔, 室温放置 3-5 min, 以使 ATP 浓度检测板的 ATP 全部被消耗掉, 从而降低误差。随后每孔加上 20 μL (1) 收集的上清, 迅速用 20 μL 微量移液器混匀, 至少间隔 2 s 后, 用化学发光仪测定 RLU 值, 计算 ATP 浓度。

2.3 HMGB1 释放检测

2.3.1 细胞接种

在超净台内, 选取对数生长期的 CT26、HCT116 细胞, 用 1 \times PBS 清洗后, 加入 500 μL 胰蛋白酶消化, 待细胞变圆变亮或有沙粒样掉落, 用 2 mL RPMI-1640 完全培养基中和胰蛋白酶, 吹打混匀后转移至 15 mL 离心管, 1000 rpm 离心 5 min。弃掉上清液, 加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基重悬, 取 10 μL 于细胞计数仪计数。根据计数结果, 加入 RPMI-1640 完全培养基, 使细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 随后接种于 6 孔板中, 1 mL/孔, 并补充 1 mL 完全培养基, 混匀, 放于培养箱培养 24 h, 待细胞贴壁。

2.3.2 细胞加药

取出 6 孔板, 查看细胞状态和贴于 6 孔板的情况。随后置于超净台内, 用 1 mL 移液枪吸掉 6 孔板内的细胞上清, 设置 mVG161、hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组, 加入相应浓度的溶瘤病毒 2 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。

2.3.3 HMGB1 释放检测

(1) 收集上清: 取出 6 孔板, 在显微镜下观察细胞状态, 用 1 mL 移液枪吸取 6 孔板内的细胞上清至 1.5 mL EP 管内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 2000 rpm 离心 5 min, 取上清, 至新的 1.5 mL EP 管内, 做好样品浓度、作用时间等标记, 保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于后续的测定。

(2) 取板: 从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱拿出 HMGB1 浓度检测板, 平衡至室温, 其余板条

放回装有干燥剂包的锡箔袋中，重新密封。

(3) 加样、孵育：每孔加入样品 100 μL ，随后再加入 200 μL 1 \times HRP-抗体结合物，通过轻轻摇动或轻敲盘子几秒钟来彻底搅拌，盖上封板膜，在 4 $^{\circ}\text{C}$ （不摇动）下孵化一夜（建议约 16 h）。

(4) 洗涤：第二天取出板条，倒掉原有液体，每孔加入洗涤液 350 μL ，浸洗 1 min，总共洗 5 次，每次倒扣甩干，最后一次要完全甩干。

(5) 加入 TMB 和终止液：在完全没有任何液体的板条内加入 TMB 底物 100 μL /孔，在室温下避光孵育 10 min，液体颜色从无色变为蓝色。随后，每孔加入终止液 50 μL ，液体颜色从蓝色变为黄色，轻轻摇动盘子，混匀。

(6) 测 OD 值：立即在酶标仪波长 450 nm 处测定 OD 值。

2.4 小鼠骨髓来源的树突状细胞的提取与检测

2.4.1 超净台准备

用酒精棉球叠瓦式擦拭超净台 2-3 遍，然后将实验所用的手术灭菌剪刀、镊子、15 mL 离心管、50 mL 离心管、培养皿、1 mL 注射器等物品放于超净台内，紫外照射 30 min。

2.4.2 小鼠骨髓来源的树突状细胞的提取与培养

(1) 选取 6-8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠，将小鼠颈椎脱臼处死后，放在 75% 的酒精中浸泡 2 min，移至超净台内的无菌培养皿中。

(2) 用剪刀、镊子取出胫骨和股骨，并去除骨组织周围的肌肉，然后置于盛有 RPMI-1640 培养基的无菌培养皿中。去除骨两端，用 1 mL 注射器抽取 RPMI-1640 培养基，分别从骨的两端插入针头，反复冲洗骨髓腔，直至完全变白。

(3) 用 1 mL 注射器抽取培养皿中含有骨髓的 RPMI-1640 培养基，置于 70 目滤网，滤去肌肉组织和小碎片，1200 rpm，5 min 离心，去掉上清液，再加入 RPMI-1640 培养基混匀，再次 1200 rpm，5 min 离心，如此清洗两遍。

(4) 去掉上清液后，室温下，在细胞沉淀中加入适量的红细胞裂解液，轻吹混匀后，孵育 3-5 min。再加入 10 mL 1 \times PBS 缓冲液中和红细胞裂解液，随后 1200 rpm，5 min 离心，弃上清，加入适量的 RPMI-1640 培养基重悬，取 10 μL 计数，此时已获得小鼠骨髓细胞。

(5) 再次 1200 rpm，5 min 离心，去掉上清后，用 DC 完全培养基重悬，使

细胞浓度调整为 1×10^6 个细胞/mL，接种于 6 孔板内，2 mL/孔，置于 5% CO₂，37°C 的培养箱培养 72 h。

(6) 72 h 后，采用半丢弃式方法为提取的小鼠骨髓来源的树突状细胞换液，即离心后弃掉一半上层旧的培养基，再补足一半新鲜的 DC 完全培养基，继续培养 48 h。

2.4.3 小鼠骨髓来源的树突状细胞的检测

(1) 在提取的髓源性树突状细胞继续培养 2 天的第 1 天里，同时在 6 孔板内接种 CT26 细胞， 1×10^6 个/孔，于 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后，设置 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组，然后加入相应 MOI 的 mVG161 作用 24 h。24 h 后，即提取髓源性树突状细胞的第 5 天，将提取的髓源性树突状细胞分为 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组，然后加入相应 MOI 组的 CT26 细胞的上清液，共同培养 24 h。

(2) 第 6 天，收集每组细胞于 15 mL 离心管内，1000 rpm 离心 5 min，收集上清液于新的 1.5 mL EP 管内，标记好名称、mVG161 浓度等信息，保存于 -80°C 冰箱，用于后续测定上清液对脾脏来源 T 淋巴细胞的分化诱导。然后，用 DC 完全培养基重悬树突状细胞，取 10 μ L 计数，使细胞浓度调整为 1×10^7 /mL，并 1000 rpm 离心 5 min。

(3) 弃上清后，用含 2% Fc block 的 Stain Buffer 重悬，冰上孵育 5 min，并取 100 μ L 转移至流式管内，加入抗体，避光孵育 30 min，1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清，加入 400 μ L Stain Buffer 重悬，1 h 内上流式仪检测。

2.5 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的提取与检测

2.5.1 超净台准备

用酒精棉球叠瓦式擦拭超净台 2-3 遍，然后将实验所用的手术灭菌剪刀、镊子、15 mL 离心管、50 mL 离心管、培养皿、1 mL 注射器等物品放于超净台内，紫外照射 30 min。

2.5.2 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的提取与培养

(1) 选取 6-8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠，将小鼠颈椎脱臼处死后，放在 75% 的酒精中浸泡 2 min，移至超净台内的无菌培养皿中。

(2) 手术剖开腹腔，从小鼠左下腹部找到长梭形的脾脏，取出放置新的盛

有 $1\times$ PBS 缓冲液的无菌培养皿中，剔除脾脏表面的脂肪组织，用 $1\times$ PBS 缓冲液清洗一遍。

(3) 将 70 目尼龙筛网置于 50 mL 离心管上，将脾脏放置于筛网内，用剪刀剪碎，并用 1 mL 无菌注射器顶部进行研磨，一边研磨一边加入 $1\times$ PBS 缓冲液冲洗，直至脾脏完全变白。随后将 50 mL 离心管置于离心机 2000 rpm 离心 3 min，弃上清，加入适量的红细胞裂解液，轻吹混匀后，室温下孵育 3-5 min。随后加入 10 mL $1\times$ PBS 缓冲液中和红细胞裂解液的作用，然后 1200 rpm 离心 5min，弃上清，用 4 mL $1\times$ PBS 缓冲液重悬，轻吹混匀。

(4) 在新的 15 mL 离心管中，加入 4 mL 的 Ficoll-Paque 液，然后将 (3) 的重悬液沿着离心管管壁缓慢均匀加入到盛有 4 mL Ficoll-Paque 液的 15 mL 离心管内，随后将 15 mL 离心管置于离心机 20°C ，400 g，水平离心 30 min。

(5) 离心完成后，15 mL 离心管会出现分层，中间白膜层便是所需的 T 淋巴细胞。取出中间白膜层，加入完全培养基，取 $10\ \mu\text{L}$ 计数，使细胞浓度调整为 1×10^6 个细胞/mL，接种于 6 孔板内，2 mL/孔，置于 37°C ，5% CO_2 的细胞培养箱培养。

2.5.3 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的检测

(1) 将提取的 T 淋巴细胞分为 MOI=0, 0.1, 0.25, 0.5 组，每组分别加入对应 MOI 的 2.4.3 (2) 收集的上清液 2 mL，置于 37°C ，5% CO_2 的细胞培养箱培养 24 h。

(2) 24 h 后，收集细胞，1000 rpm，离心 5 min，收集上清液于 1.5 mL EP 管内，标记好名称、浓度等信息，保存于 -80°C 冰箱，用于后续测定 TNF- α 和 IFN- γ 的含量。细胞沉淀用适量完全培养基重悬，取 $10\ \mu\text{L}$ 计数，调整细胞浓度为 1×10^7 /mL，再次 1000 rpm 离心 5 min。

(3) 弃掉上清液，用含 2% Fc block 的 Stain Buffer 重悬，冰上孵育 5 min，并取 $100\ \mu\text{L}$ 转移至流式管内，加入抗体，避光孵育 30 min，1000 rpm 离心 5 min 后，弃上清，加入 $400\ \mu\text{L}$ Stain Buffer 重悬，1 h 内上流式仪检测。

2.6 TNF- α 检测

2.6.1 准备检测样品

将 2.5.3 (2) 收集的上清液 4°C 2000 rpm 离心 5 min，取上清，至新的 1.5 mL

EP 管内，做好样品浓度、作用时间等标记，保存于-80℃冰箱，用于后续的测定。

2.6.2 TNF- α 检测

(1) 从 4℃冰箱内取出实验需要的板条和试剂，平衡至室温。

(2) 在避光环境下，加入 100 μ L 标准品或稀释液于空白孔中，其余孔加入相应 MOI 的样品 100 μ L/孔，用封板膜密封板孔，放于 37℃恒温箱，孵育 1.5 h。

(3) 每孔加入洗涤液 350 μ L，浸洗 1 min，总共洗 5 次，每次倒扣甩干，最后一次要完全甩干。

(4) 在避光环境下，加入 100 μ L 生物素化抗体稀释液于空白孔内，其余孔加入 100 μ L 生物素化抗体工作液。用新的封板膜密封板孔，放于 37℃恒温箱，孵育 1 h。

(5) 每孔加入洗涤液 350 μ L，浸洗 1 min，总共洗 5 次，每次倒扣甩干，最后一次要完全甩干。

(6) 在避光环境下，加 100 μ L 酶结合物稀释液于空白孔内，其余孔加入 100 μ L 酶结合物工作液。用新的封板膜密封板孔，放于 37℃恒温箱，孵育 0.5 h。

(7) 每孔加入洗涤液 350 μ L，浸洗 1 min，总共洗 5 次，每次倒扣甩干，最后一次要完全甩干。

(8) 在避光环境下，每孔加入 100 μ L 显色底物 TMB，放于 37℃恒温箱，孵育 15 min。随后，每孔再加入 100 μ L 反应终止液，混合均匀后，3 min 内在酶标仪波长 450 nm 处测定 OD 值。

2.7 IFN- γ 检测

2.7.1 准备检测样品

将 2.5.3 (2) 收集的上清液 4℃ 300 g 离心 10 min，取上清，至新的 1.5 mL EP 管内，做好样品浓度、作用时间等标记，保存于-80℃冰箱，用于后续的测定。

2.7.2 IFN- γ 检测

(1) 将所需的板条和试剂从 4℃冰箱内取出，平衡至室温。

(2) 每孔加入 300 μ L 1 \times 洗液浸泡酶标板 30 s，弃掉洗液后，将板孔拍干。

(3) 加入 100 μ L 的培养基于空白孔内和 100 μ L 两倍倍比稀释的标准品于标准品孔内。

(4) 室温环境下，样本孔内每孔加入 100 μ L 需要检测的样本，再加入 50 μ L

的按 1:100 比例稀释好的检测抗体，用封板膜密封板孔，300 rpm 振荡 2 h。

(5) 倒扣弃掉(4)内的液体，加入洗涤液 300 μL /孔，浸洗板孔 1 min，共洗涤 6 次，每次洗涤完成都将板孔倒扣、拍干。

(6) 在室温环境下，加入按 1:100 比例稀释好的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 100 μL /孔，用封板膜密封板孔，300 rpm 振荡 45 min。

(7) 重复步骤(5)浸洗板孔。

(8) 在避光环境下，加入 100 μL /孔的显色底物 TMB，孵育 5-30 min。

(9) 再加入 100 μL /孔终止液，轻轻叩击板框，充分混匀，30 min 内，在波长 450 nm 处和 570 nm 或 630 nm 处检测 OD 值。

3 统计学处理

运用 Graphpad Prism 8.0 软件分析实验数据和制作图形，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行处理，当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

4 实验结果

4.1 VG161 对 CT26、HCT116 细胞钙网蛋白暴露的影响

由于免疫原性细胞死亡发生时间早^[43]，为了获得更好的实验结果，本章节溶瘤病毒作用培养时间为 24 h。选取 mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 24 h 后，通过激光共聚焦显微镜观察钙网蛋白的暴露情况。结果显示，在 CT26 细胞中，随着 MOI 的增加，钙网蛋白的表面暴露显著增加，具体表现为：mVG161 MOI=0 组钙网蛋白荧光值为 (20.18 \pm 5.74) AU；mVG161 MOI=0.1 组钙网蛋白荧光值为 (44.34 \pm 4.11) AU，与 MOI=0 组相比，具有统计学差异 (** $P < 0.01$)；mVG161 MOI=0.25 组钙网蛋白荧光值为 (75.67 \pm 2.64) AU，与 MOI=0 组相比，差异明显 (***) $P < 0.001$)；mVG161 MOI=0.5 组钙网蛋白荧光值为 (127.30 \pm 7.47) AU，与 MOI=0 组相比，具有显著差异 (***) $P < 0.001$) (图 2.1 A)。在 HCT116 细胞中，随着 MOI 的增加，钙网蛋白的表面暴露也在显著增加，具体表现为：

hVG161 MOI=0 组钙网蛋白荧光值为 (37.94±4.43) AU; hVG161 MOI=0.1 组钙网蛋白荧光值为 (48.19±4.08) AU, 与 MOI=0 组相比, 具有统计学差异 (* $P < 0.05$); hVG161 MOI=0.25 组钙网蛋白荧光值为 (76.23±2.21) AU, 与 MOI=0 组相比, 差异明显 (** $P < 0.001$); hVG161 MOI=0.5 组钙网蛋白荧光值为 (119.70±2.57) AU, 与 MOI=0 组相比, 具有显著差异 (** $P < 0.001$) (图 2.1 B)。该实验结果表明, 溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 的钙网蛋白的表面暴露。

表 2.1 VG161 对 CT26、HCT116 细胞钙网蛋白暴露的影响

Group	<i>n</i>	CRT Fluorescence Value(AU)
CT26		
0	3	20.18±5.74
0.1	3	44.34±4.11**
0.25	3	75.67±2.64***
0.5	3	127.30±7.47***
HCT116		
0	3	37.94±4.43
0.1	3	48.19±4.08#
0.25	3	76.23±2.21###
0.5	3	119.70±2.57###

表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.01$; *表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。#表示与 HCT116 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.05$; ###表示与 HCT116 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。

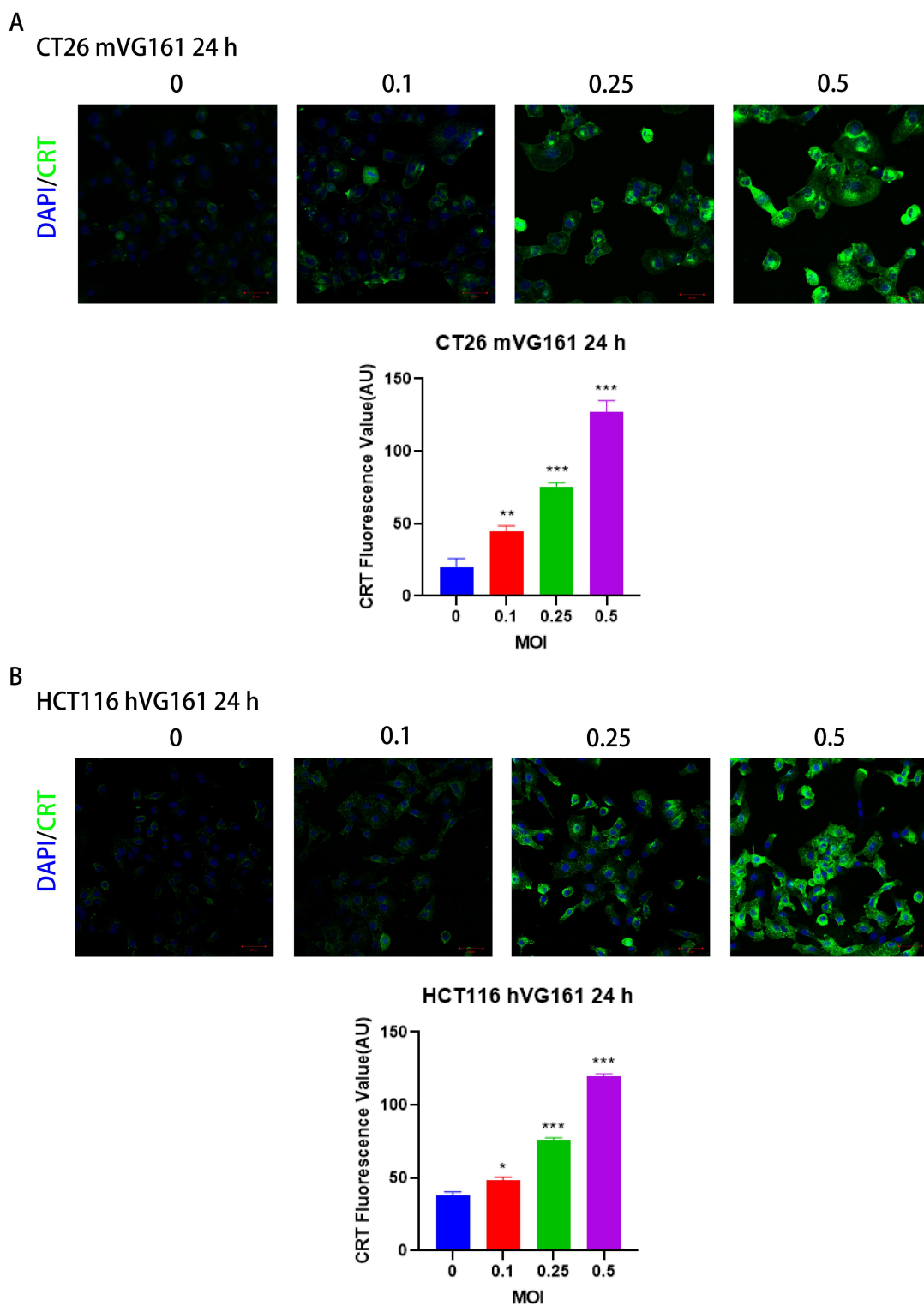


图 2.1 激光共聚焦显微镜检测 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 CRT 暴露的影响 (200×)
A. mVG161 对 CT26 细胞 CRT 暴露的荧光图和统计图；B. hVG161 对 HCT116 细胞 CRT 暴露的荧光图和统计图

4.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 ATP 释放的影响

由于细胞上清液 ATP 含量少且不易检测，为减少实验结果的误差，本节实验选取 mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 24 h 后，通过 ATP 检测试剂盒观察细胞内 ATP 的含量，以推断 ATP 细胞外释放趋势，结果如图 2.2 所示。在 CT26 细胞中，随着 MOI 的增加，细胞内 ATP 的含量逐渐减少，由此推断，随着 MOI 的增加，细胞外 ATP 的释放逐渐增加。具体表现为：mVG161 MOI=0 组细胞内 ATP 含量为 $(18.37 \pm 0.97) \mu\text{M}$ ；mVG161 MOI=0.1 组细胞内 ATP 含量为 $(16.18 \pm 0.40) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，具有统计学差异 (** $P < 0.01$)；mVG161 MOI=0.25 组细胞内 ATP 含量为 $(13.70 \pm 0.49) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，差异明显 (** $P < 0.001$)；mVG161 MOI=0.5 组细胞内 ATP 含量为 $(11.54 \pm 0.32) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，差异具有显著统计学意义 (** $P < 0.001$) (图 2.2 A)。在 HCT116 细胞中，随着 MOI 的增加，细胞内 ATP 的含量也在逐渐减少，由此表明，细胞外 ATP 的释放也在逐渐增加。具体表现为：hVG161 MOI=0 组细胞内 ATP 含量为 $(14.44 \pm 1.42) \mu\text{M}$ ；hVG161 MOI=0.1 组细胞内 ATP 含量为 $(12.32 \pm 0.59) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，细胞内 ATP 含量虽然减少，但差异并无统计学意义；hVG161 MOI=0.25 组细胞内 ATP 含量为 $(9.38 \pm 0.56) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，结果具有统计学差异 (** $P < 0.001$)；hVG161 MOI=0.5 组细胞内 ATP 含量为 $(7.38 \pm 0.55) \mu\text{M}$ ，与 MOI=0 组相比，差异具有显著的统计学意义 (** $P < 0.001$) (图 2.2 B)。该实验结果说明，溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 释放 ATP。

表 2.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞胞内 ATP 含量的影响

Group	<i>n</i>	Intracellular ATP content(μM)
CT26		
0	3	18.37 \pm 0.97
0.1	3	16.18 \pm 0.40**
0.25	3	13.70 \pm 0.49***
0.5	3	11.54 \pm 0.32***
HCT116		
0	3	14.44 \pm 1.42
0.1	3	12.32 \pm 0.59
0.25	3	9.38 \pm 0.56###
0.5	3	7.38 \pm 0.55###

表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.01$; *表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.001$ 。###表示与 HCT116 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.001$ 。

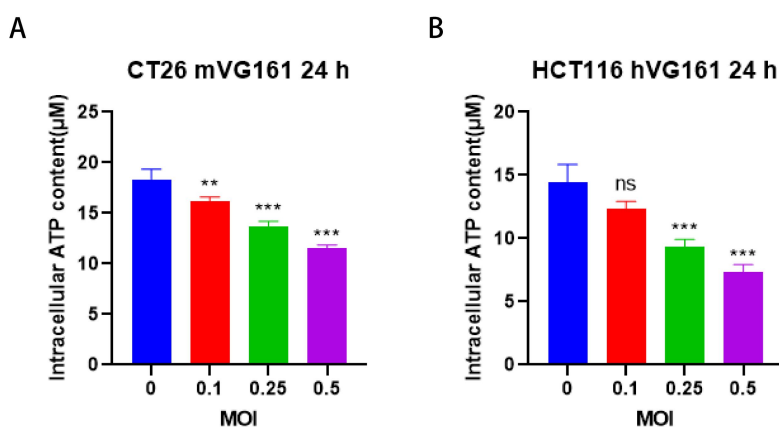


图 2.2 VG161 对 CT26、HCT116 细胞胞内 ATP 含量的统计

A.mVG161 对 CT26 胞内 ATP 含量影响; B.hVG161 对 HCT116 胞内 ATP 含量影响

4.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 HMGB1 释放的影响

选取 mVG161 和 hVG161 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组分别作用于小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 24 h 后, 通过 HMGB1 检测试剂盒观察细胞外 HMGB1 释放情况, 结果如图 2.3 所示。在 CT26 细胞中, 随着 MOI 的增加, HMGB1 的释放显著增加, 具体表现为: mVG161 MOI=0 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.48 \pm 0.04) ng/mL; mVG161 MOI=0.1 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.58 \pm 0.04) ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 细胞外 HMGB1 的释放虽然在

增加, 但差异并无统计学意义; mVG161 MOI=0.25 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.78±0.04)ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 差异明显 (** $P<0.01$); mVG161 MOI=0.5 组细胞外 HMGB1 的含量为 (1.05±0.10) ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 具有显著差异 (** $P<0.001$) (图 2.3 A)。在 HCT116 细胞中, 随着 MOI 的增加, 细胞外 HMGB1 的释放也在逐渐增加。具体表现为: hVG161 MOI=0 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.51±0.06) ng/mL; hVG161 MOI=0.1 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.77±0.01) ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 具有统计学差异 (** $P<0.01$); hVG161 MOI=0.25 组细胞外 HMGB1 的含量为 (0.88±0.03) ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 结果具有显著的统计学差异 (** $P<0.001$); hVG161 MOI=0.5 组细胞外 HMGB1 的含量为 (1.13±0.09) ng/mL, 与 MOI=0 组相比, 差异具有明显的统计学意义 (** $P<0.001$) (图 2.3 B)。该实验结果说明, 溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 可以诱导小鼠结肠癌细胞 CT26 和人结肠癌细胞 HCT116 释放 HMGB1。

表 2.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 HMGB1 释放的影响

Group	<i>n</i>	HMGB1 (ng/mL)
CT26		
0	3	0.48±0.04
0.1	3	0.58±0.04
0.25	3	0.78±0.04**
0.5	3	1.05±0.10***
HCT116		
0	3	0.51±0.06
0.1	3	0.77±0.01##
0.25	3	0.88±0.03###
0.5	3	1.13±0.09###

表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.01$; *表示与 CT26 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.001$ 。##表示与 HCT116 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.01$; ###表示与 HCT116 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.001$ 。

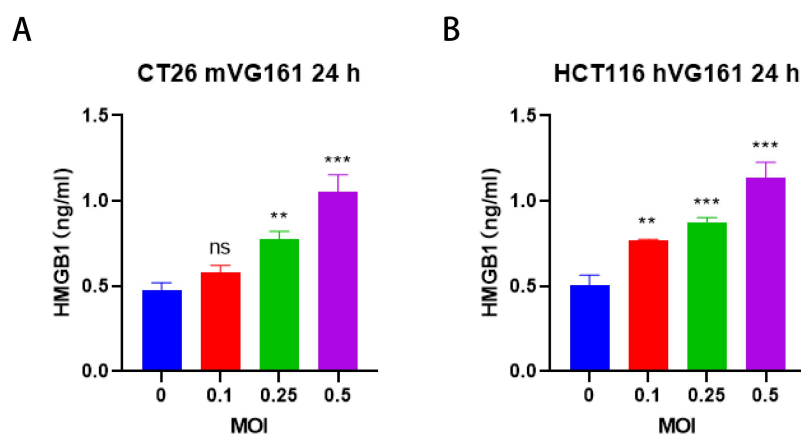


图 2.3 VG161 对 CT26、HCT116 细胞 HMGB1 释放量的统计

A.mVG161 作用 CT26 24 h HMGB1 释放含量统计图；B.hVG161 作用 HCT116 24 h HMGB1 释放含量统计图

4.4 mVG161 对小鼠髓源性树突状细胞成熟的影响

从 BALB/c 小鼠胫骨和股骨中提取髓源性树突状细胞，分为 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组，然后使用 mVG161 作用 CT26 细胞的相应 MOI 组的上清液作用树突状细胞 24 h，运用流式细胞术检测髓源性树突状细胞表面 CD80、CD86 分子的表达，本实验结果为 CD80、CD86 双阳性细胞才是成熟树突状细胞。实验结果所示，随着 MOI 的增加，CD80、CD86 双阳性的细胞比例也在明显增加，具体结果为：MOI=0 组，CD80、CD86 双阳性的细胞比例为 (62.11±0.34)%；MOI=0.1 组，CD80、CD86 双阳性的细胞比例为 (76.73±2.24)%，与 MOI=0 组相比，具有统计学差异 (***) $P<0.001$)；MOI=0.25 组，CD80、CD86 双阳性的细胞比例为 (82.89±1.13)%，与 MOI=0 组相比，差异显著 (***) $P<0.001$)；MOI=0.5 组，CD80、CD86 双阳性的细胞比例为 (86.79±0.86)%，与 MOI=0 组相比，差异具有明显的统计学意义 (***) $P<0.001$) (图 2.4)。本实验说明，溶瘤病毒 mVG161 可以促进髓源性树突状细胞的成熟。

表 2.4 mVG161 对小鼠髓源性树突状细胞成熟的影响

Group	n	DC Maturation(%)
0	3	62.11±0.34
0.1	3	76.73±2.24***
0.25	3	82.89±1.13***
0.5	3	86.79±0.86***

***表示与 MOI=0 组相比, 差异有统计学意义, $P<0.001$ 。

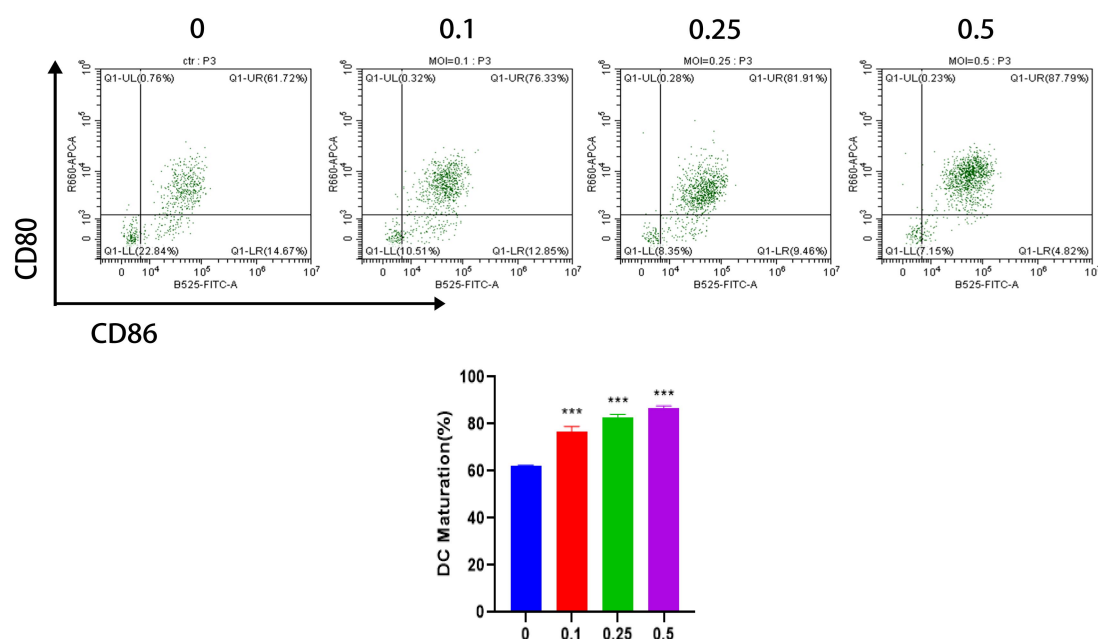


图 2.4 流式细胞术检测 mVG161 对小鼠髓源性树突状细胞成熟的影响

4.5 mVG161 作用的髓源性 DCs 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞分化的影响

从 BALB/c 小鼠脾脏中提取 T 淋巴细胞, 分为 MOI=0, 0.1, 0.25 和 0.5 浓度组, 然后使用 4.4 实验中收集的上清液作用 T 淋巴细胞 24 h, 运用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面 CD3、CD4、CD8 分子的表达, 本实验结果为 CD3⁺CD4⁺双阳性细胞为 CD4⁺ T 淋巴细胞, CD3⁺CD8⁺双阳性细胞为 CD8⁺ T 淋巴细胞。实验结果所示, 随着 MOI 的增加, CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例明显增加, 具体结果为: MOI=0 组, CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例为 (2.72±0.70) %; MOI=0.1 组, CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例为 (4.55±1.30) %, 与 MOI=0 组相比, 虽然 CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例有所增加, 但差异并无统计学差异; MOI=0.25 组, CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例为 (8.08±1.77) %, 与 MOI=0 组相比, 具有统计学差异 (* $P<$

0.05)；MOI=0.5 组，CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例为 (18.86±3.13)%，与 MOI=0 组相比，差异具有明显的统计学意义 (***P*<0.001) (图 2.6)。本实验说明，溶瘤病毒 mVG161 可以促进小鼠脾脏来源的 T 淋巴细胞向 CD4⁺ T 淋巴细胞方向分化。

表 2.5 mVG161 作用的髓源性 DCs 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞分化的影响

Group	<i>n</i>	CD3+CD4+ Cell(%)
0	3	2.72±0.70
0.1	3	4.55±1.30
0.25	3	8.08±1.77*
0.5	3	18.86±3.13***

*表示与 MOI=0 组相比，差异有统计学意义，*P*<0.05；***表示与 MOI=0 组相比，差异有统计学意义，*P*<0.001。

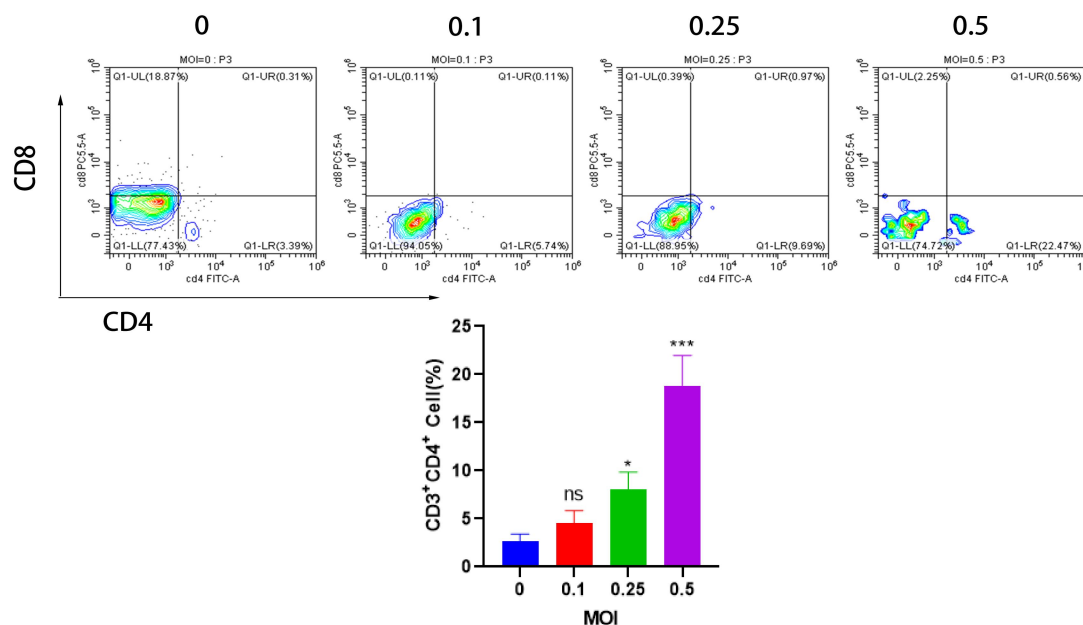


图 2.5 流式细胞术检测 mVG161 作用的髓源性 DCs 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞分化的影响

4.6 上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的变化

运用 ELISA 实验，检测 4.5 实验收集的上清中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达。实验结果显示，随着 MOI 的增加，TNF- α 含量逐渐增加，具体结果为：MOI=0 组，TNF- α 含量为 (89.15±11.05) pg/mL；MOI=0.1 组，TNF- α 含量为 (443.70±78.31)

pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 差异具有统计学意义 (** $P < 0.001$); MOI=0.25 组, TNF- α 含量为 (780.70 \pm 103.90) pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 具有明显的统计学差异 (** $P < 0.001$); MOI=0.5 组, TNF- α 含量为 (1191.00 \pm 7.91) pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 差异具有显著的统计学意义 (** $P < 0.001$) (图 2.5 A)。IFN- γ 表达的实验结果所示, 随着 MOI 的增加, IFN- γ 含量也在逐渐增加, 具体结果为: MOI=0 组, IFN- γ 含量为 (138.00 \pm 7.19) pg/mL; MOI=0.1 组, IFN- γ 含量为 (175.60 \pm 14.29) pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 虽然 IFN- γ 含量在增加, 但差异并无统计学意义; MOI=0.25 组, IFN- γ 含量为 (307.70 \pm 29.57) pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 具有统计学差异 (** $P < 0.01$); MOI=0.5 组, IFN- γ 含量为 (1047.00 \pm 69.34) pg/mL, 与 MOI=0 组相比, 差异具有明显的统计学意义 (** $P < 0.001$) (图 2.5 B)。实验结果表明, 溶瘤病毒 mVG161 作用的髓源性树突状细胞诱导脾脏 T 淋巴细胞分化的同时还能促进 TNF- α 和 IFN- γ 的释放。

表 2.6 上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的变化

Group	n	IFN- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
0	3	89.15 \pm 11.05	138.00 \pm 7.19
0.1	3	443.70 \pm 78.31***	175.60 \pm 14.29
0.25	3	780.70 \pm 103.90***	307.70 \pm 29.57##
0.5	3	1191.00 \pm 7.91***	1047.00 \pm 69.34###

***表示与 MOI=0 组相比, IFN- α 表达差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。##表示与 MOI=0 组相比, IFN- γ 表达差异有统计学意义, $P < 0.01$; ###表示与 MOI=0 组相比, IFN- γ 表达差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。

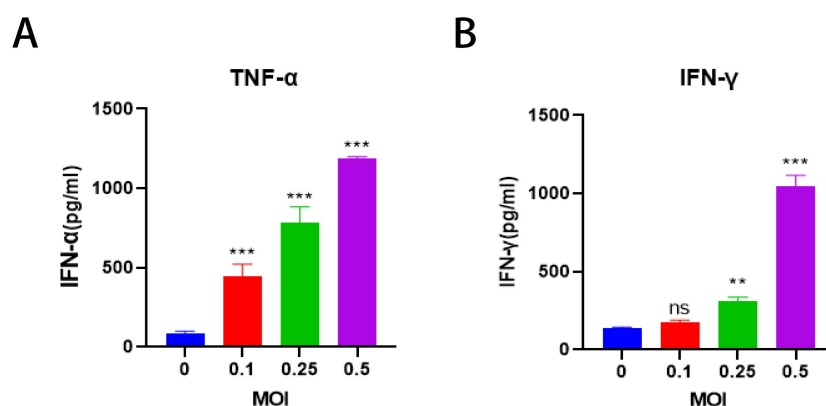


图 2.6 ELISA 检测上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的变化

A. TNF- α 表达统计图; B. IFN- γ 表达统计图。

5 讨论

钙网蛋白的凋亡前表面暴露, 以及 ATP 和 HMGB1 的释放, 被认为是将死肿瘤细胞的最佳 ICD 标志物, 这些物质能够激活树突状细胞的旁分泌, 从而启动细胞毒效应^[44]。最近的研究表明, 包括呼肠孤病毒、新城疫病毒和单纯疱疹病毒等在内的溶瘤病毒可以诱导免疫原性细胞死亡, 并伴随着钙网蛋白表面的暴露、ATP 和 HMGB1 的释放, 这为树突状细胞提供了危险信号和天然的肿瘤相关抗原, 这两者都是启动抗肿瘤适应性免疫所必需的条件^[45-47]。

在本部分, 我们使用激光共聚焦实验观察钙网蛋白在细胞表面暴露情况、通过 ATP 检测试剂盒观察细胞内 ATP 的含量、利用 HMGB1 检测试剂盒观察细胞外 HMGB1 的释放情况。我们通过检测免疫原性细胞死亡的三种特征标志物来验证溶瘤病毒 mVG161、hVG161 是否可以诱导 CT26、HCT116 细胞发生免疫原性细胞死亡。实验结果显示, 溶瘤病毒 mVG161、hVG161 作用 CT26、HCT116 细胞 24 h 后, 细胞表面钙网蛋白暴露增加、ATP 和 HMGB1 释放增加, 这表明溶瘤病毒 mVG161、hVG161 可以诱导 CT26、HCT116 细胞发生免疫原性细胞死亡。随后我们通过流式细胞术和 ELISA 实验验证溶瘤病毒 mVG161 是否对树突状细胞的成熟和 T 细胞的分化有作用。实验结果显示, 加入溶瘤病毒 mVG161 作用后, 树突状细胞表面分子 CD80 和 CD86、小鼠脾脏来源的 T 淋巴细胞中 CD3⁺CD4⁺双阳性细胞比例、以及上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 表达均显著增加, 表明溶瘤病毒 mVG161 作用可以促进髓源性树突状细胞的成熟, 诱导脾脏 T 淋巴细胞分化。

第三部分 VG161 抗结肠癌的体内作用

上述体外实验结果表明，溶瘤病毒 mVG161 和 hVG161 能够抑制小鼠结肠癌 CT26 细胞和人结肠癌 HCT116 细胞的增殖，促进其凋亡，并可以通过促进内质网应激诱导其发生免疫原性细胞死亡。同时，溶瘤病毒 mVG161 可以促进小鼠髓源性树突状细胞的成熟，以及成熟的髓源性树突状细胞可以诱导脾脏来源的 T 淋巴细胞分化。在本章节中，我们建立了人源性结肠癌组织异种移植模型（patient-derived xenografts, PDX）、小鼠结肠癌双边皮下移植瘤模型，来进一步研究溶瘤病毒 VG161 的体内抗肿瘤作用。

OX40（CD134）是肿瘤坏死因子受体超家族成员，是一种有效的免疫共刺激激动剂，其配体为 OX40L。根据 Carolina A.C 等人的研究发现，抗 OX40 疗法可以增加血液和肿瘤中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的活性和增殖能力，增强效应细胞的功能，同还能抑制 Tregs 细胞的免疫抑制作用，从而增强抗肿瘤能力。然而，抗 OX40 疗法的局限性在于其对免疫原性低的肿瘤效果差^[31]。结合前期实验发现，溶瘤病毒 mVG161 具有诱导 CT26 细胞发生免疫原性细胞死亡的能力，在本章节中，我们联合应用了 OX40 抗体，来进一步验证联用抗 OX40 疗法是否可以更好地激活免疫，提高溶瘤病毒 VG161 对结肠癌的体内抗肿瘤效果。

1 实验材料

1.1 细胞株

本章节使用的细胞株仅为小鼠结肠癌细胞株 CT26，来源及培养方法同第一部分实验材料 1.1。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 44 只，雄性，6-8 周龄，体重 18-20 g 和 SPF 级 BALB/c 裸鼠 10 只，雄性，6-8 周龄，体重 18-20 g，均购于上海市计划生育科学研究所，饲养于上海市普陀区中心医院动物房。按动物伦理委员会相关规定饲养：相对湿

度为 50%-65%，温度为 22°C-24°C，通风，无特定病原体，光照时间 12 h，喂食基础饲料，自由饮水等（伦理批号：DWEC-A-202206021）。

1.3 主要试剂（同第一部分主要试剂）

新增部分如下：

试剂名称	生产厂家	货号
即用型 SABC-POD（兔 IgG）	武汉博士德生物工程有限公司	SA1022
抗荧光淬灭封片液	上海碧云天生物技术有限公司	P0126

1.4 主要仪器

同第一部分实验材料 1.3。

2 实验方法

2.1 人结肠癌 PDX 模型的建造和治疗

（1）瘤块标本准备：从病人身上取下结肠癌组织（伦理批号：DWEC-A-202206013），选取质硬、血管少、被膜少的组织块，切成 2 mm³ 大小左右，浸泡于生理盐水（NS），放于 4°C 冰箱备用（储存时间不超过 4 h，以免影响成瘤率）。

（2）造模：在动物手术室内，使用 2.5% 戊巴比妥钠麻醉 BALB/c 裸鼠，置于手术台上。用酒精擦拭小鼠右侧皮肤，消毒 3 次。选取小鼠右侧大腿上方 1 cm 左右的位置，用无菌剪刀剪一 0.5 cm 左右的小孔，使用无菌镊子从小孔进入，分离皮肤和筋膜。用无菌镊子夹取一块准备好的瘤块标本，从小孔植入小鼠体内，植入瘤块的放置位置尽量远离小孔，以防瘤块掉出，影响成瘤率。结束后，将小鼠皮肤缝合，放回笼内，第二日观察小鼠术后状况，并每三天观察一次瘤体生长情况。

（3）治疗：在初步研究 hVG161 抗肿瘤效果的实验中，小鼠瘤体长至约 50-80 mm³ 时，将小鼠随机分为对照组、VG160 组、hVG161 组。对照组：连续 5 天给以生理盐水（NS）瘤内注射治疗；VG160 组：连续 5 天给以 VG160（1×10⁷ PFU）瘤内注射治疗；hVG161 组：连续 5 天给以 hVG161（1×10⁷ PFU）瘤内注射治疗。每 3 天测瘤、称重一次，根据小鼠瘤体大小决定观察期时间。在进一步的观察

hVG161 抗肿瘤效果的实验中, 小鼠瘤体长至约 50-80 mm³ 时, 将小鼠随机分为对照组、hVG161 组。对照组: 连续 5 天给以生理盐水(NS)瘤内注射治疗; hVG161 组: 连续 5 天给以 hVG161 (1×10⁷ PFU) 瘤内注射治疗。每 3 天测瘤、称重一次, 当小鼠瘤体超过 2000 mm³ (将小鼠进行颈椎脱臼处死) 或者小鼠死亡时, 结束观察。

2.2 小鼠结肠癌双边皮下移植瘤模型的建造和治疗

(1) CT26 细胞准备: 将生长状态良好且处于生长对数期的 CT26 细胞, 消化、计数、调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL, 放于 4℃冰箱备用 (储存时间不超过 4 h, 以免影响成瘤率)。

(2) 造模: 先将 BALB/c 小鼠左右腰部的毛发剔除, 随后在动物手术室内, 使用酒精擦拭小鼠剃毛处皮肤, 消毒 3 次。用 1 mL 注射器吸取 200 μL 准备好的细胞悬液, 首先选取小鼠右侧大腿上方 1 cm 左右的位置进针, 左手大拇指和食指将进针处皮肤崩开, 右手持吸有细胞悬液的注射器, 45 度斜角进针, 待针头进入皮下后, 改为近水平位置继续进针至针头几乎完全插入皮下, 注入细胞悬液 200 μL, 待观察到小鼠皮下出现小皮丘时, 缓慢旋转退针, 无菌棉球轻压针孔约 1 min 后将小鼠放回笼, 此处接种的瘤用于给药, 记为用药侧。左侧部位造模方法相同, 该处的瘤不用于给药, 记为非用药侧。造模后的小鼠放回笼内, 继续常规饲养。

(3) 治疗: 小鼠瘤体长至约 50-80 mm³ 时, 将小鼠随机分为对照组、OX40 组、mVG161 组、联合组 (mVG161+OX40 组)。对照组: 连续 5 天给以生理盐水 (NS) 瘤内注射治疗; OX40 组: 第 1 天、第 4 天给以 OX40 抗体 (5 mg/kg) 腹腔注射治疗; mVG161 组: 连续 5 天给以 mVG161 (1×10⁷ PFU) 瘤内注射治疗; 联合组 (mVG161+OX40 组): 连续 5 天给以 mVG161 (1×10⁷ PFU) 瘤内注射治疗, 同时第 1 天、第 4 天给以 OX40 抗体 (5 mg/kg) 腹腔注射治疗。每 3 天测瘤、称重一次, 根据小鼠瘤体大小决定观察期时间。

2.3 HE 染色

(1) 将小鼠颈椎脱臼处死后, 取心、肝、脾、肺、肾、瘤浸泡于福尔马林溶液中。

(2) 将浸泡于福尔马林中的标本取出, 放于包埋盒中, 并标记好模型种类、标本名称、时间等信息, 置于脱水机内脱水。

(3) 将脱好水的标本包埋至石蜡内: 包埋时, 将溶解的石蜡滴至包埋容器内, 然后放入标本, 再滴加石蜡将标本完全包埋, 随后放于低温凝固台上凝固成块。包好的石蜡放于常温保存备用。

(4) 切片: 将石蜡块置于切片机上固定, 修片至组织最大横截面时, 切取平面, 放于温水中展平, 1-2 min 后用载玻片捞出, 标记好模型类型、组织类型和时间等信息, 放于烤片机上烘干。烘好的片子可以立即使用也可以放于玻片盒常温保存备用。

(5) 将烘好的片子进行机器脱蜡处理后, 放于 HE 染色仪器上, 设定程序后自动染色以及封片处理, 随后显微镜下观察拍照即可。

2.4 免疫组织化学染色 (ki67)

(1) 将切好放于玻片盒备用的片子放于烤片机上烘烤 30 min, 随后进行机器脱蜡处理。

(2) 将脱蜡的片子置于装有 1×柠檬酸钠抗原修复液的盒子里, 放于微波炉内高火修复 10 min, 中高火修复 5 min, 然后冷却至室温, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(3) 用纸巾将片子多余的水分吸干, 用免疫组化笔圈出组织, 在标本组织上滴加过氧化氢溶液, 孵育 5-10 min, 然后用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(4) 在标本组织上滴加 5% BSA 封闭液, 37°C 孵育 30 min, 随后, 直接滴加用 5% BSA 封闭液稀释的 ki67 抗体, 于 4°C 过夜孵育。

(5) 第二天, 滴加适量 ki67 对应的二级抗体, 37°C 孵育 30 min, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(6) 在标本组织上滴加 SABC 溶液, 37°C 孵育 30 min, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(7) 在标本组织上滴加 DAB 染液染细胞核, 再用苏木素染液染细胞质, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 随后封片、观察拍照即可。

2.5 免疫荧光染色 (CD8)

(1) 将切好放于玻片盒备用的片子放于烤片机上烘烤 30 min, 随后进行机器脱蜡处理。

(2) 将脱蜡的片子置于装有 1×柠檬酸钠抗原修复液的盒子里, 放于微波炉内高火修复 10 min, 中高火修复 5 min, 然后冷却至室温, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(3) 用纸巾将片子多余的水分吸干, 用免疫组化笔圈出组织, 在标本组织上滴加免疫染色固定液, 常温下固定 20 min, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。再在标本组织上滴加免疫染色通透液, 常温下通透 20 min, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(4) 在标本组织上滴加 5% BSA 封闭液, 37°C 孵育 30 min, 随后直接滴加用 5% BSA 封闭液稀释的 CD8 抗体, 于 4°C 过夜孵育。

(5) 第二天, 滴加适量 CD8 抗体对应的荧光二级抗体, 于 37°C 避光孵育 1 h, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。

(6) 在避光环境中, 在组织上滴加 DAPI 染色液, 染色 5 min, 并用 1×PBS 缓冲液浸洗 3 次, 每次 5 min。随后, 用抗荧光淬灭剂封片, 显微镜观察肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞浸润情况, 并拍照记录。

2.6 流式细胞术检测 DCs、肿瘤浸润 T 细胞和脾脏记忆 T 细胞指标

(1) 样本取材: 将小鼠麻醉, 剪掉小鼠胡须, 摘掉眼球取血, 约 1 mL/只。血液室温静置 30 min 后, 1200 rpm 离心 15 min, 取上层血清, 放于 -80°C 保存, 用于后续的 TNF- α 和 IFN- γ 检测。随后, 将小鼠颈椎脱臼处死后, 取小鼠腹股沟淋巴结、皮下瘤体和脾脏, 泡于生理盐水内, 放冰上备用。

(2) 样本制备: 取适量腹股沟淋巴结、瘤体和脾脏分别剪碎、研磨, 加入 1 mL 1×PBS 缓冲液, 用 70 目滤网过滤至离心管内, 1200 rpm 离心 15 min。脾脏细胞再加入适量红细胞裂解液, 室温裂解 3-5 min, 加入 1 mL 1×PBS 缓冲液中和, 1200 rpm 离心 5 min。弃掉上清后, 加入适量 1×PBS 缓冲液重悬, 使细胞浓度离心为 1×10^7 个/mL, 再次 1200 rpm 离心 5 min。

(3) 抗体染色: 弃上清, 加入含 2% Fc block 的 Stain Buffer 重悬, 冰上孵

育 5 min。随后，取 100 μL 细胞悬液转移至流式管中，加入抗体，室温避光孵育 30 min；离心，弃上清，加入 400 μL Stain Buffer 重悬，1 h 内上流式仪检测。

2.7 TNF- α 检测

同第二部分实验方法 2.6。

2.8 IFN- γ 检测

同第二部分实验方法 2.7。

3 统计学处理

运用 Graphpad Prism 8.0 软件分析实验数据和制作图形，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行处理，当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

4 实验结果

4.1 hVG161 在 PDX 模型中抗肿瘤效果的初步研究

为了研究溶瘤病毒 VG161 的体内治疗效果，我们用人源性的结肠癌组织，构建了 PDX 模型。将小鼠分为对照组、VG160 组和 hVG161 组，分别给以生理盐水（NS）、VG160、hVG161 治疗，具体实验流程如图 3.1.1。

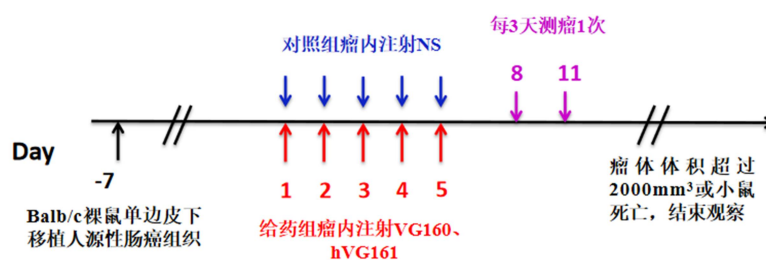


图 3.1.1 实验流程图

4.1.1 hVG161 对 PDX 模型小鼠体重的影响

在观察期结束时，对照组小鼠体重为 (20.24 ± 1.04) g，VG160 组小鼠体重为 (19.99 ± 0.78) g，hVG161 组小鼠体重为 (20.52 ± 0.95) g，三组小鼠的体重变化并无统计学差异（图 3.1.2）。

表 3.1 hVG161 对 PDX 模型小鼠体重的影响

Group	<i>n</i>	Body Weight (g)
Ctrl	5	20.24±1.04
VG160	5	19.99±0.78
hVG161	5	20.52±0.95

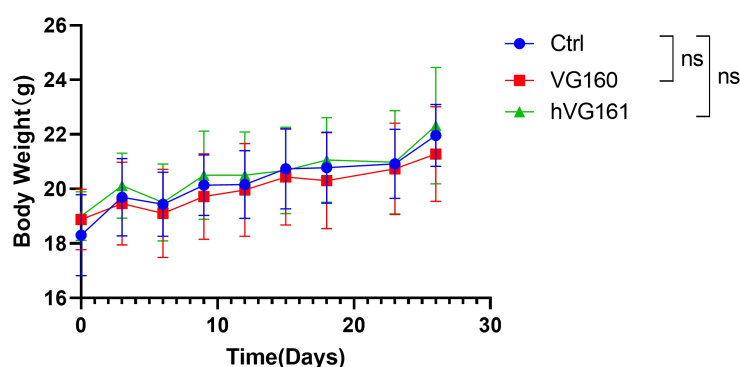


图 3.1.2 小鼠体重变化

4.1.2 hVG161 对 PDX 模型小鼠瘤体体积的影响

小鼠瘤体体积变化显示，在给药 28 天时，对照组小鼠瘤体体积为 $(525.10 \pm 424.50) \text{mm}^3$ ，VG160 组小鼠瘤体体积为 $(167.00 \pm 147.50) \text{mm}^3$ ，hVG161 组小鼠瘤体体积为 $(96.67 \pm 71.34) \text{mm}^3$ 。与对照组相比，VG160 组小鼠瘤体体积稍小于对照组，瘤体大小变化具有统计学差异 ($*P < 0.05$)，hVG161 组小鼠瘤体体积明显小于对照组，瘤体大小变化差异显著 ($**P < 0.01$) (图 3.1.3)。

表 3.2 hVG161 对 PDX 模型小鼠瘤体体积的影响

Group	<i>n</i>	Tumor Volume(mm^3)
Ctrl	5	525.10±424.50
VG160	5	167.00±147.50*
hVG161	5	96.67±71.34**

*表示与 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；**表示与 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.01$ 。

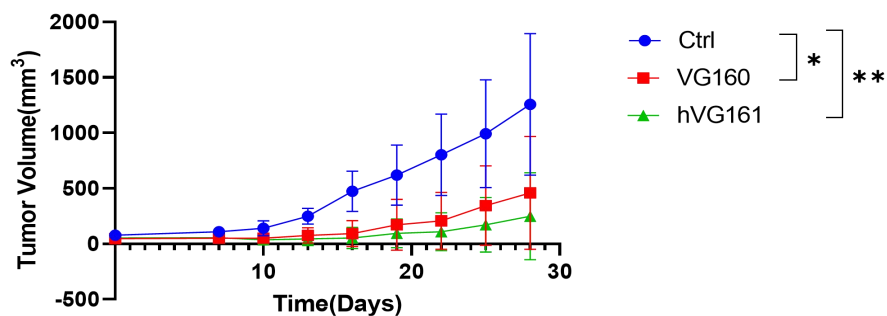


图 3.1.3 小鼠瘤体大小变化

4.1.3 hVG161 对 PDX 模型小鼠肿瘤组织内 ki67 变化的影响

小鼠肿瘤组织 ki67 免疫组织化学染色结果显示，对照组 ki67 阳性率为 (104.00±7.55) %，VG160 组 ki67 阳性率为 (96.41±0.68) %，hVG161 组 ki67 阳性率为 (71.26±5.87) %。与对照组相比，VG160 组 ki67 阳性率虽然有所下降，但并没有统计学差异，而 hVG161 组结果具有显著的统计学差异 (***) ($P < 0.001$) (图 3.1.4)。

表 3.3 hVG161 对 PDX 模型小鼠肿瘤组织内 ki67 的影响

Group	<i>n</i>	% ki67 Positive Cell
Ctrl	3	104.00±7.55
VG160	3	96.41±0.68
hVG161	3	71.26±5.87***

***表示与 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.001$ 。

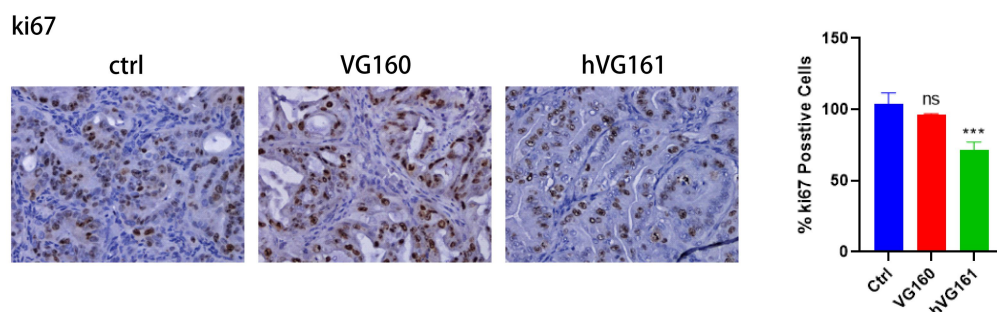


图 3.1.4 肿瘤组织内 ki67 变化 (200×)

4.1.4 hVG161 对 PDX 模型小鼠肿瘤组织内凋亡蛋白变化的影响

Western blot 检测小鼠肿瘤组织凋亡蛋白实验结果显示，与对照组相比，VG160 组和 hVG161 组中，凋亡蛋白 cleaved-caspase3、Bax 呈上升趋势，caspase3 蛋白和抗凋亡蛋白 Bcl-2 呈下降趋势，且 hVG161 组结果更明显（图 3.1.5）。

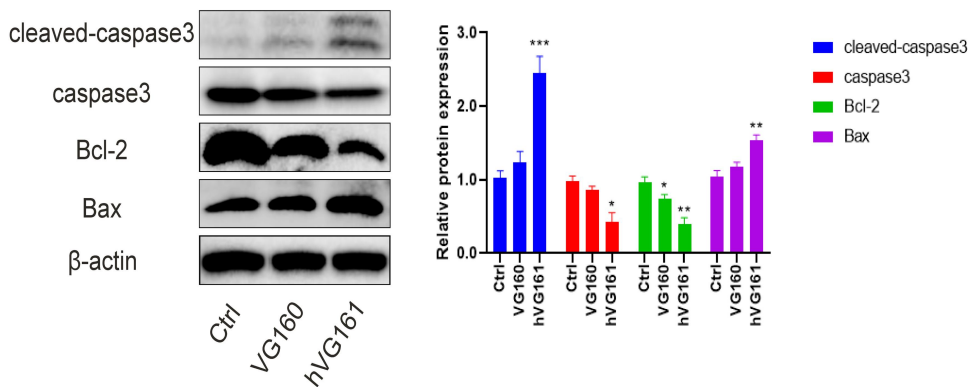


图 3.1.5 肿瘤组织内凋亡蛋白变化

4.2 hVG161 在 PDX 模型中抗肿瘤效果的进一步研究

上述实验结果表明，溶瘤病毒 hVG161 可以延缓 PDX 模型肿瘤的生长，促进其凋亡，效果比骨架病毒 VG160 更好。因此，基于以上实验结果，我们进一步研究了溶瘤病毒 hVG161 在 PDX 模型中的体内治疗效果。将小鼠分为对照组和给药组，分别使用生理盐水（NS）和溶瘤病毒 hVG161 进行治疗，然后观察小鼠的体重、瘤体生长变化和小鼠生存时间，具体实验流程如图 3.2.1。

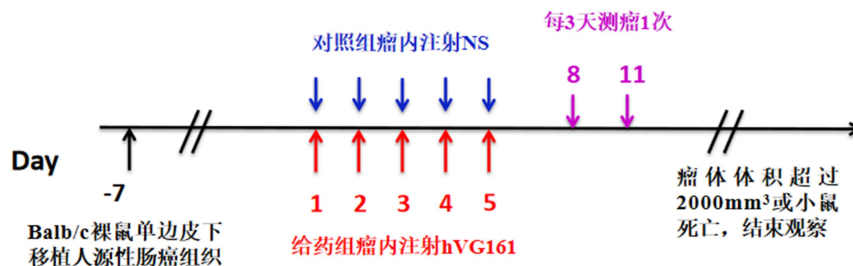


图 3.2.1 实验流程图

4.2.1 hVG161 对 PDX 模型小鼠体重的影响

在 hVG161 对 PDX 模型的进一步体内研究发现，在观察期结束时，对照组

小鼠体重为 (22.99±0.89) g, 给药组小鼠体重为 (23.90±1.23) g, 两组小鼠的体重变化并无统计学差异 (图 3.2.2)。

表 3.4 hVG161 对 PDX 模型小鼠体重的影响

Group	n	Body Weight(g)
Ctrl	5	22.99±0.89
hVG161	5	23.90±1.23

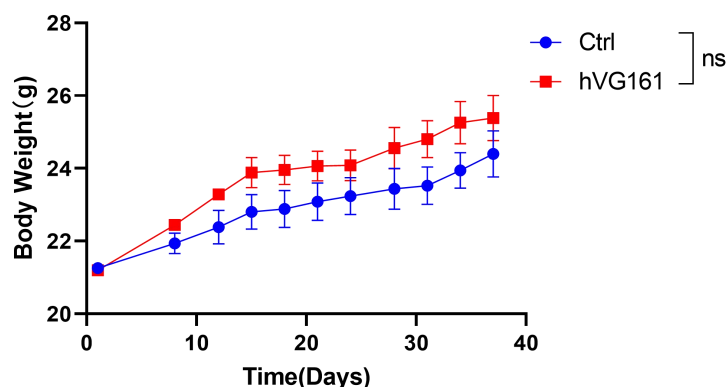


图 3.2.2 小鼠体重变化

4.2.2 hVG161 对 PDX 模型小鼠瘤体体积的影响

小鼠瘤体大小结果显示, 在给药 37 天时, 对照组小鼠瘤体体积为 (845.30±712.60) mm³, 给药组小鼠瘤体体积为 (214.40±172.10) mm³, 给药组瘤体体积明显小于对照组, 具有统计学差异 (**P<0.01) (图 3.2.3)。

表 3.5 hVG161 对 PDX 模型小鼠瘤体体积的影响

Group	n	Tumor Volume(mm ³)
Ctrl	5	845.30±712.60
hVG161	5	214.40±172.10**

**表示与 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, P<0.01。

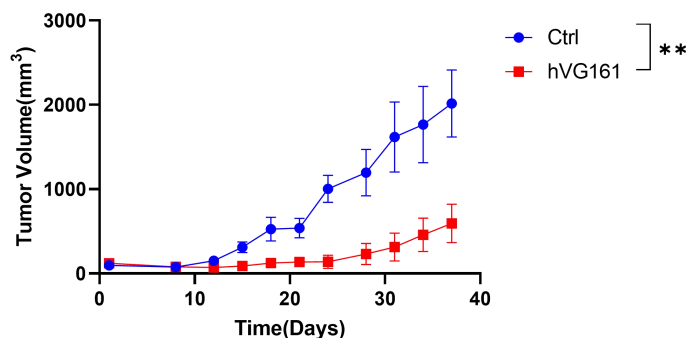


图 3.2.3 小鼠瘤体大小变化

4.2.3 hVG161 对 PDX 模型小鼠生存时间的影响

生存期观察结果显示，对照组小鼠最长存活时间为 40 天，而在第 61 天结束生存期观察时，给药组小鼠仍有一只存活，给药组小鼠最长存活时间明显长于对照组小鼠，两组小鼠存活时间具有统计学差异 (** $P < 0.01$) (图 3.2.4)。

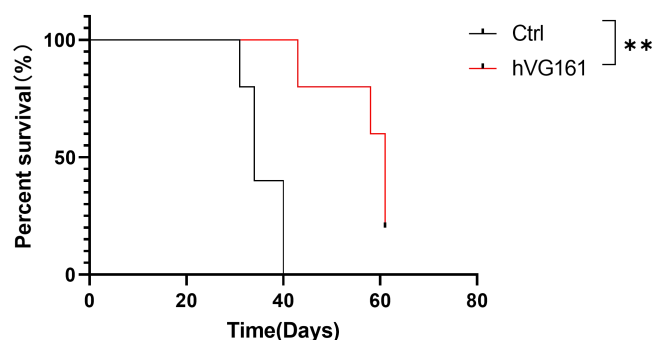


图 3.2.4 小鼠生存时间变化

4.3 mVG161 联用 OX40 抗体在双边皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用

在 PDX 模型中，我们初步验证了溶瘤病毒 VG161 的体内抗肿瘤作用。接下来，在 CT26 双边皮下移植瘤模型中，我们联合应用 OX40 抗体，进一步验证了溶瘤病毒 VG161 的抗肿瘤效果。将小鼠分为对照组、OX40 组、mVG161 组、联合组 (mVG161+ OX40 组)，具体实验流程如图 3.3.1 所示。

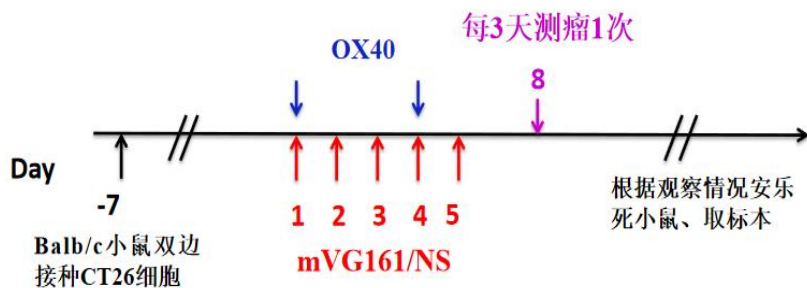


图 3.3.1 实验流程图

4.3.1 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠体重的影响

在观察期结束时，对照组小鼠体重为 (21.83 ± 1.12) g，OX40 组小鼠体重为 (21.73 ± 0.82) g，mVG161 组小鼠体重为 (21.81 ± 0.94) g，联合组 (mVG161+OX40 组) 小鼠体重为 (21.41 ± 0.63) g，四组小鼠的体重没有统计学差异 (图 3.3.2)。

表 3.6 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠体重的影响

Group	<i>n</i>	Body Weight(g)
Ctrl	5	21.83±1.12
OX40	5	21.73±0.82
mVG161	5	21.81±0.94
mVG161+OX40	5	21.41±0.63

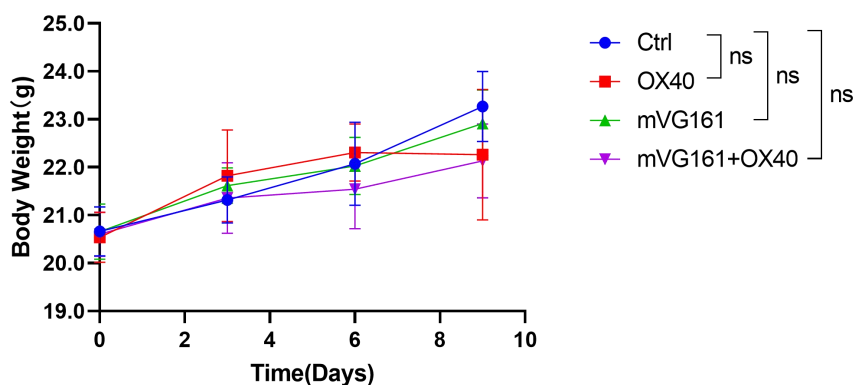


图 3.3.2 小鼠体重变化

4.3.2 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠瘤体体积的影响

小鼠双边瘤体体积变化结果显示, 在给药 9 天时, 用药侧中 mVG161 组和联合组各有 3 只小鼠瘤体自然消退, 其余瘤体体积分别为: 对照组小鼠瘤体体积为 $(942.50\pm 615.20)\text{mm}^3$, OX40 组小鼠瘤体体积为 $(615.40\pm 317.00)\text{mm}^3$, mVG161 组小鼠瘤体体积为 $(281.50\pm 131.00)\text{mm}^3$, 联合组小鼠瘤体体积为 $(224.80\pm 88.69)\text{mm}^3$ 。与对照组相比, mVG161 组和联合组小鼠瘤体体积变化具有统计学意义 ($*P < 0.05$) (图 3.3.3 A)。非用药侧中, 联合组瘤体体积明显变小, 其余瘤体体积分别为: 对照组小鼠瘤体体积为 $(606.40\pm 402.60)\text{mm}^3$, OX40 组小鼠瘤体体积为 $(701.90\pm 374.40)\text{mm}^3$, mVG161 组小鼠瘤体体积为 $(416.40\pm 179.30)\text{mm}^3$, 联合组小鼠瘤体体积为 $(78.50\pm 24.03)\text{mm}^3$ 。与对照组相比, 联合组小鼠瘤体体积变化具有统计学意义 ($*P < 0.05$) (图 3.3.3 B)。

表 3.7 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠瘤体体积的影响

Group	<i>n</i>	Tumor Volume(mm ³)
Medication side		
Ctrl	5	942.50±615.20
OX40	5	615.40±317.00
mVG161	5	281.50±131.00*
mVG161+ OX40	5	224.80±88.69*
Non-medication side		
Ctrl	5	606.40±402.60
OX40	5	701.90±374.40
mVG161	5	416.40±179.30
mVG161+ OX40	5	78.50±24.03#

*表示与用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。#表示与非用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

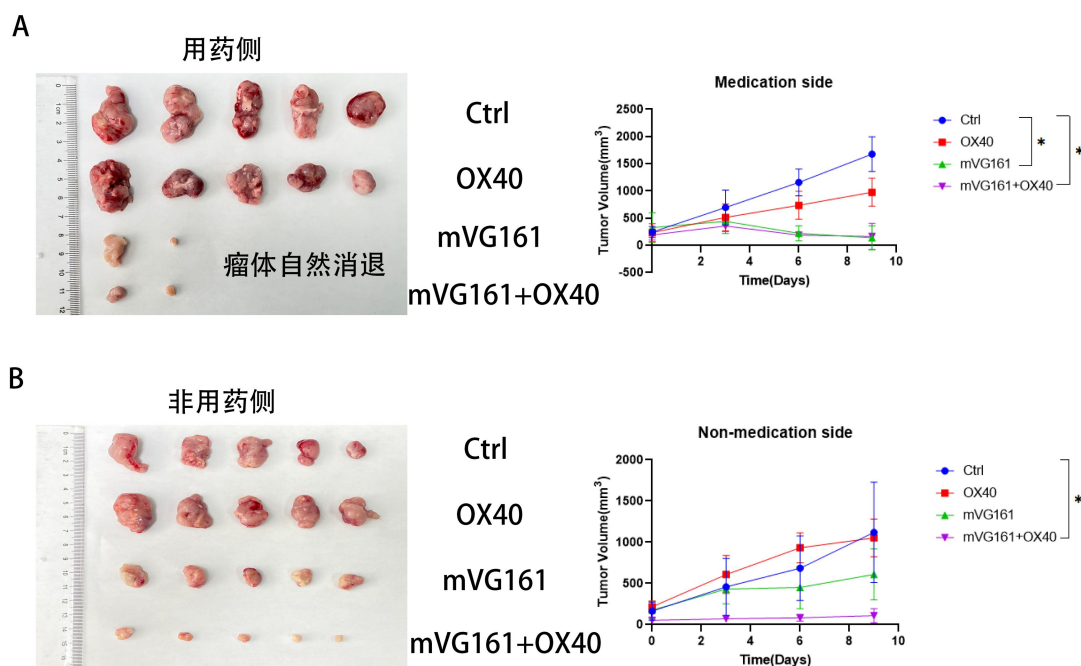


图 3.3.3 小鼠双侧瘤体大小变化

A. 小鼠用药侧体积变化；B. 小鼠非用药侧体积变化

4.3.3 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型肿瘤组织内 ki67 变化的影响

将小鼠取材进行后续实验。免疫组织化学 ki67 染色结果显示，用药侧中，对照组 ki67 阳性率为(106.30±10.69)%，OX40 组 ki67 阳性率为(76.48±12.27)%，mVG161 组 ki67 阳性率为(56.48±4.09)%，联合组 ki67 阳性率为(7.42±2.50)%。与对照组相比，OX40 组、mVG161 组和联合组的 ki67 阳性率下降均有统计学差异，且联合组差异显著 (***P*<0.001) (图 3.3.4 A)。在非用药侧中，对照组 ki67 阳性率为(104.70±7.10)%，OX40 组 ki67 阳性率为(81.14±5.54)%，mVG161 组 ki67 阳性率为(51.50±4.09)%，联合组 ki67 阳性率为(3.85±2.02)%。与对照组相比，OX40 组、mVG161 组和联合组的 ki67 阳性率下降均有统计学差异，且 mVG161 组、联合组差异显著 (***P*<0.001) (图 3.3.4 B)。

表 3.8 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型肿瘤组织内 ki67 变化的影响

Group	<i>n</i>	% ki67 Positive Cells
Medication side		
Ctrl	3	106.30±10.69
OX40	3	76.48±12.27*
mVG161	3	56.48±4.09***
mVG161+ OX40	3	7.42±2.50***
Non-medication side		
Ctrl	3	104.70±7.10
OX40	3	81.14±5.54##
mVG161	3	51.50±4.09###
mVG161+ OX40	3	3.85±2.02###

*表示与用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.05$; ***表示与用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。##表示与非用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.01$; ###表示与用药侧 Ctrl 组相比, 差异有统计学意义, $P < 0.001$ 。

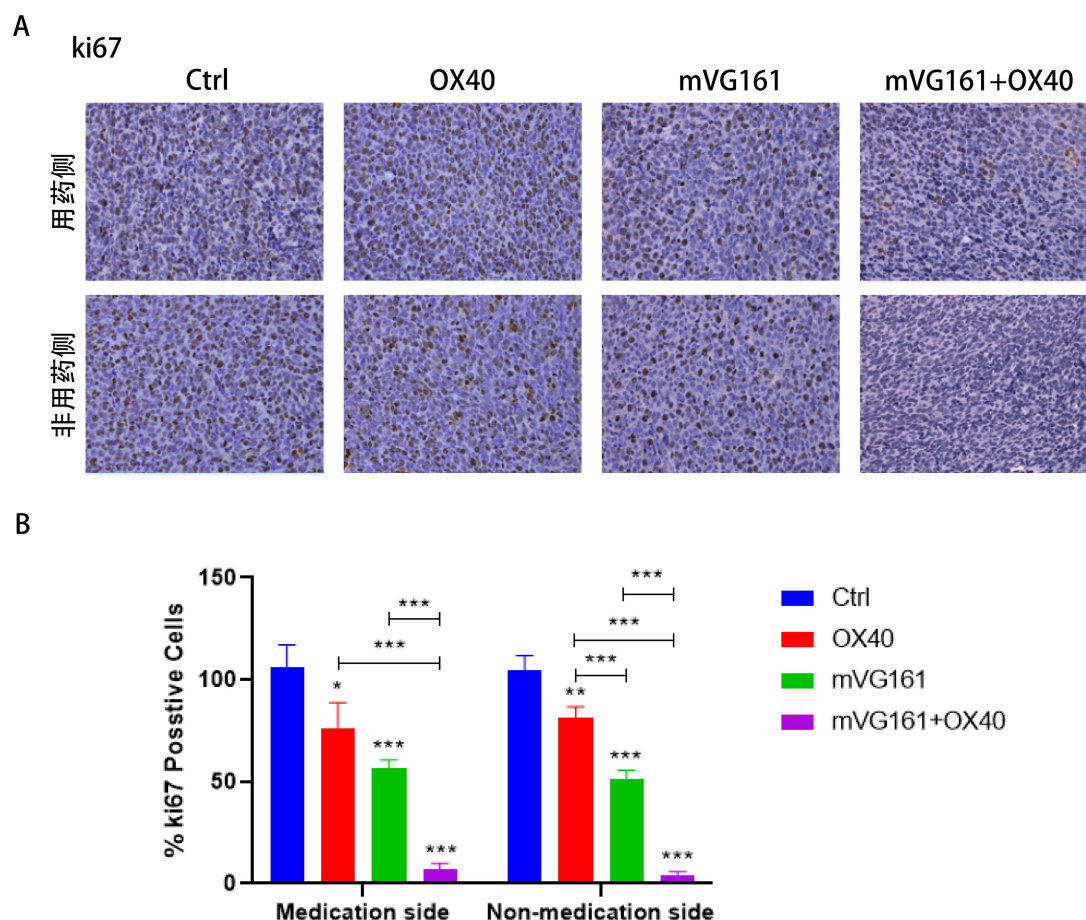


图 3.3.4 肿瘤组织内 ki67 变化 (200×)

A. 肿瘤组织内 ki67 变化图片; B. 肿瘤组织内 ki67 变化统计图

4.3.4 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型肿瘤组织内 CD8⁺T 细胞浸润的影响

随后,对肿瘤组织进行免疫荧光实验,以观察肿瘤内 CD8⁺T 细胞的浸润情况。实验结果显示,在用药侧中,对照组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (1.45±0.59)%, OX40 组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (9.85±2.82)%, mVG161 组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (30.89±3.11)%, 联合组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (43.00±4.13)%, 与对照组相比, OX40 组、mVG161 组和联合组的 CD8⁺T 细胞浸润率均有统计学差异,且 mVG161 组、联合组统计学差异显著 (***) $P < 0.001$) (图 3.3.5 A)。在非用药侧中,对照组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (1.17±0.35)%, OX40 组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (13.35±2.06)%, mVG161 组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (53.70±3.38)%, 联合组 CD8⁺T 细胞浸润率为 (69.88±2.70)%, 与对照组相比, OX40 组、mVG161

组和联合组的 CD8⁺ T 细胞浸润率均有统计学差异，且 mVG161 组、联合组统计学差异显著（*** $P < 0.001$ ）（图 3.3.5 B）。

表 3.9 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型肿瘤组织内 CD8⁺ T 细胞浸润的影响

Group	<i>n</i>	% CD8 Positive Cells
Medication side		
Ctrl	3	1.45±0.59
OX40	3	9.85±2.82*
mVG161	3	30.89±3.11***
mVG161+ OX40	3	43.00±4.13***
Non-medication side		
Ctrl	3	1.17±0.35
OX40	3	13.35±2.06##
mVG161	3	53.70±3.38###
mVG161+ OX40	3	69.88±2.70###

*表示与用药侧 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.05$ ；***表示与用药侧 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.001$ 。##表示与非用药侧 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.01$ ；###表示与用药侧 Ctrl 组相比，差异有统计学意义， $P < 0.001$ 。

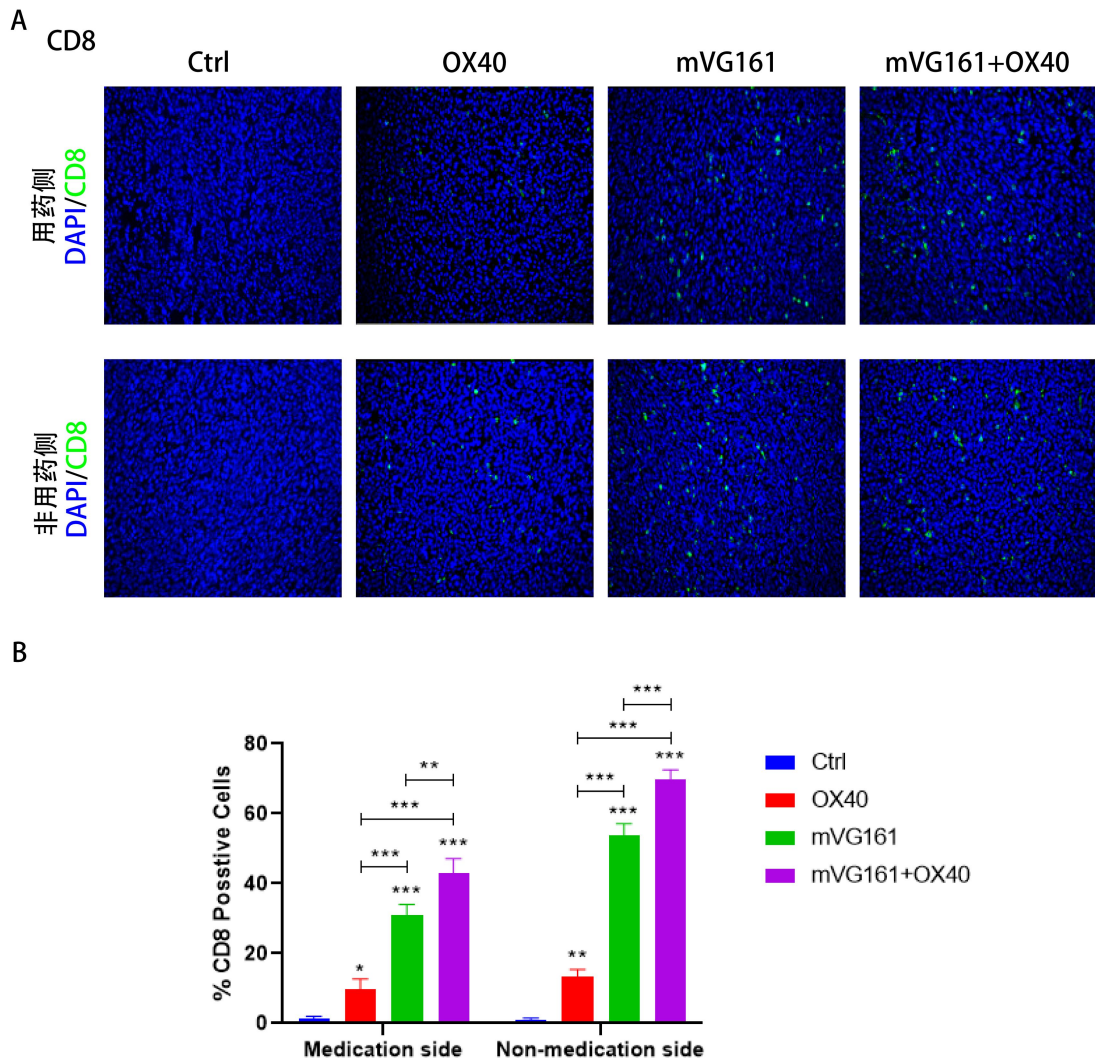


图 3.3.5 肿瘤组织内 CD8⁺ T 浸润情况 (200×)

A. 肿瘤组织内 CD8⁺ T 浸润情况; B. 肿瘤组织内 CD8⁺ T 浸润统计图

4.3.5 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠体内免疫浸润的影响

对小鼠淋巴结、肿瘤组织和脾脏组织的流式细胞术实验检测结果如图 3.3.6 所示。图 3.3.6 A 为淋巴结内树突状细胞的成熟情况，其中 CD80、CD86 双阳性细胞为成熟树突状细胞。在对照组中，CD80、CD86 双阳性细胞比例为 (19.49±1.14) %，OX40 组 CD80、CD86 双阳性细胞比例为 (22.82±0.85) %，mVG161 组 CD80、CD86 双阳性细胞比例为 (32.87±0.65) %，联合组 CD80、CD86 双阳性细胞比例为 (39.89±1.45) %。与对照组相比，OX40 组中 CD80、CD86 双阳性细胞比例虽然有所增加，但结果并没有统计学差异；mVG161 组中

结果有统计学意义 (** $P < 0.001$)；联合组的结果差异具有显著的统计学意义 (** $P < 0.001$)。

图 3.3.6 B 为肿瘤组织中浸润的 CD8⁺T 细胞的情况。在对照组中，肿瘤组织中浸润的 CD8⁺T 细胞的比例为 (7.26±1.41) %，OX40 组中 CD8⁺T 细胞浸润比例为 (11.64±3.21) %，mVG161 组中 CD8⁺T 细胞浸润比例为 (20.20±1.49) %，联合组中 CD8⁺T 细胞浸润比例为 (32.98±2.75) %。与对照组相比，OX40 组中 CD8⁺T 细胞浸润比例虽然有所增加，但结果并没有统计学差异；而 mVG161 组中结果有统计学意义 (** $P < 0.001$)；联合组中结果差异具有显著的统计学意义 (** $P < 0.001$)。

图 3.3.6 C 为脾脏组织中记忆 T 细胞的结果，其中 CD44⁺CD62L⁻的细胞为脾脏记忆 T 细胞。在对照组中，脾脏记忆 T 细胞比例为 (56.47±0.77) %，OX40 组中脾脏记忆 T 细胞比例为 (65.80±4.58) %，mVG161 组中脾脏记忆 T 细胞比例为 (75.11±1.36) %，联合组中脾脏记忆 T 细胞比例为 (87.78±2.96) %。与对照组相比，OX40 组中脾脏记忆 T 细胞的增加有统计学差异 (* $P < 0.05$)；mVG161 组的脾脏记忆 T 细胞的增加也有统计学意义 (** $P < 0.001$)；而联合组中脾脏记忆 T 细胞的增加具有明显的统计学差异 (** $P < 0.001$)。

表 3.10 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠体内免疫浸润的影响

Group	<i>n</i>	DC Maturation(%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells (%)	TEM of CD8(%)
Ctrl	3	19.49±1.14	7.26±1.41	56.47±0.77
OX40	3	22.82±0.85	11.64±3.21	65.80±4.58 ^P
mVG161	3	32.87±0.65 ^{***}	20.20±1.49 ^{###}	75.11±1.36 ^{PPP}
mVG161+ OX40	3	39.89±1.45 ^{***}	32.98±2.75 ^{###}	87.78±2.96 ^{PPP}

***表示与 Ctrl 组相比，小鼠淋巴结内 DCs 成熟有统计学意义， $P < 0.001$ 。###表示与 Ctrl 组相比，小鼠肿瘤组织内 CD8⁺T 细胞浸润有统计学意义， $P < 0.001$ 。^P表示与 Ctrl 组相比，小鼠脾脏组织内记忆 T 细胞含量有统计学意义， $P < 0.05$ ；^{PPP}表示与 Ctrl 组相比，小鼠脾脏组织内记忆 T 细胞含量有统计学意义， $P < 0.001$ 。

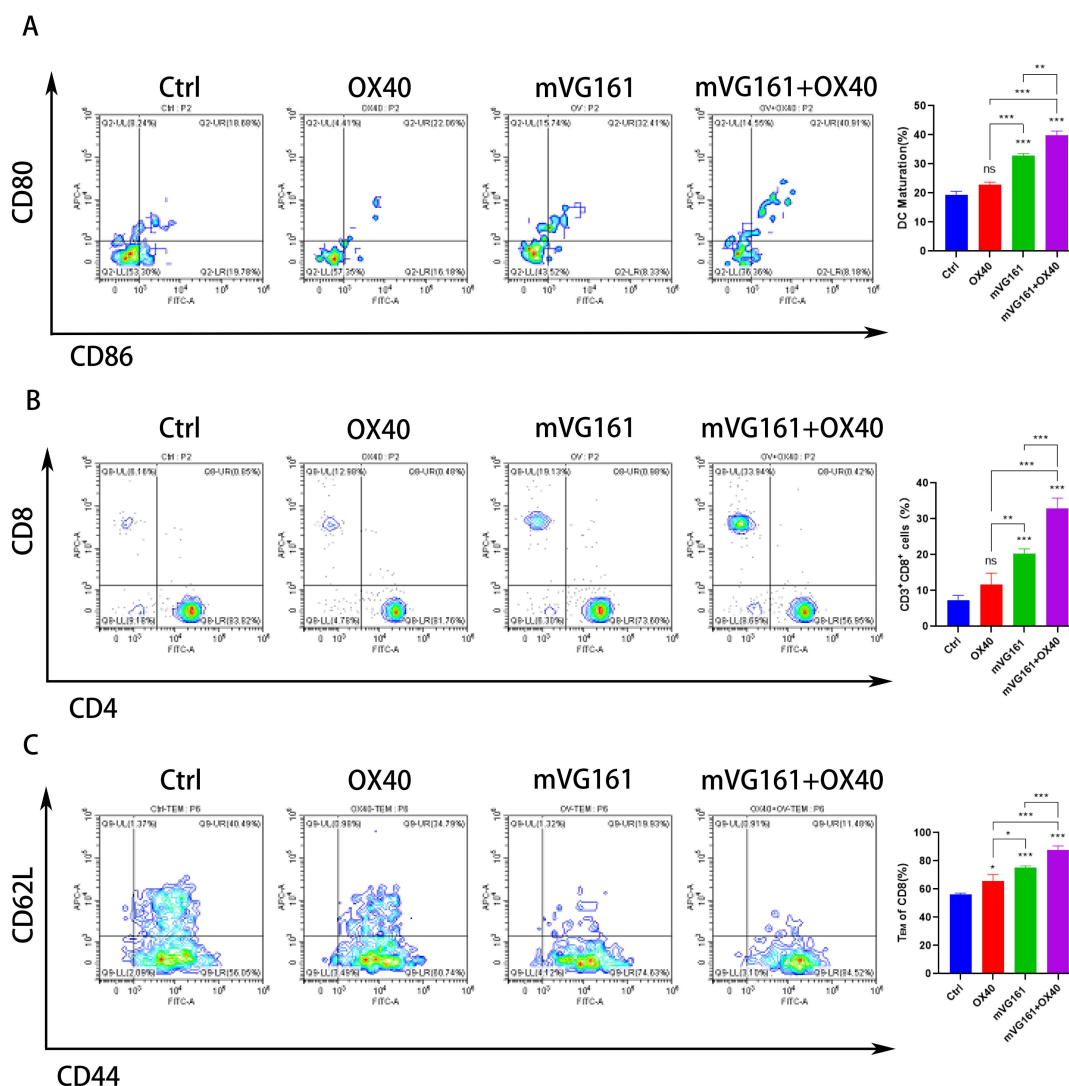


图 3.3.6 流式细胞术检测小鼠体内免疫浸润的情况

A. 小鼠淋巴结内 DCs 成熟情况；B. 小鼠肿瘤组织内 CD8⁺ T 细胞浸润情况；C. 小鼠脾脏组织内记忆 T 细胞含量

4.3.6 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型小鼠主要脏器的影响

任何药物被允许使用的前提是，该药物是安全的。因此，我们将心、肝、脾、肺、肾组织进行 HE 染色，以检测 OX40、mVG161 以及 OX40 与 mVG161 联合使用是否具有毒副作用。实验结果显示，对照组、OX40 组、mVG161 组和联合组中心、肝、脾、肺、肾各脏器排列紧密，没有明显的损伤，表明 OX40、mVG161 以及 OX40 与 mVG161 联合使用没有明显的毒副作用（图 3.3.7）。

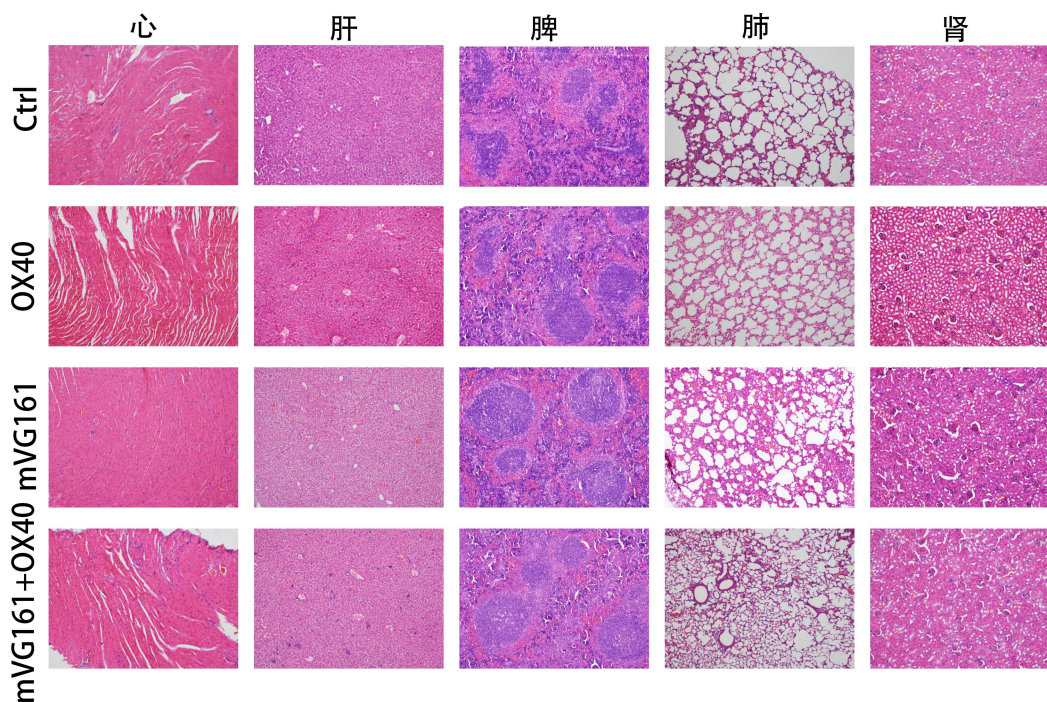


图 3.3.7 小鼠主要脏器 HE 染色图 (200×)

4.3.7 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型 TNF- α 和 IFN- γ 表达的影响

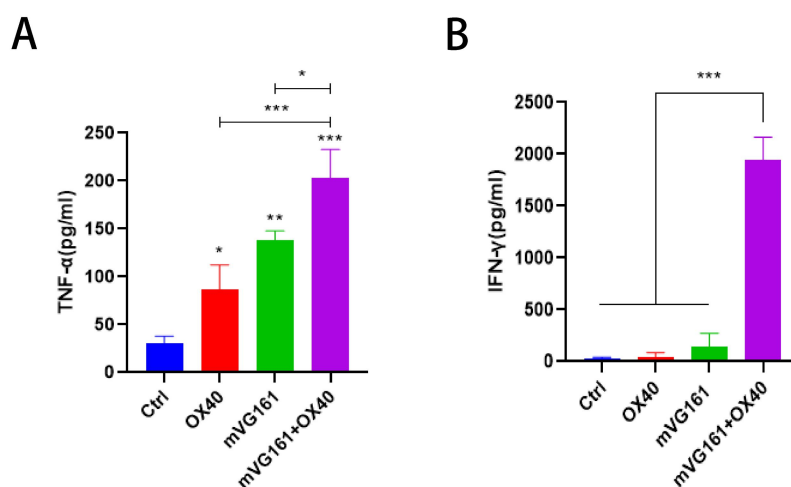
将小鼠的血清进行 ELISA 实验以检测 TNF- α 和 IFN- γ 的表达。血清 TNF- α 表达结果显示,在对照组中 TNF- α 含量为(30.96 \pm 7.12)pg/mL,OX40 组中 TNF- α 含量为(86.71 \pm 25.61)pg/mL,mVG161 组中 TNF- α 含量为(137.70 \pm 10.11)pg/mL,联合组中 TNF- α 含量为(202.70 \pm 30.07)pg/mL。与对照组相比,OX40 组中 TNF- α 含量的增加有统计学差异(* P <0.05);mVG161 组 TNF- α 含量的增加也有统计学意义(** P <0.01);而联合组中 TNF- α 含量的增加具有明显的统计学差异(** P <0.001)(图 3.3.8 A)。

血清 IFN- γ 表达结果显示,在对照组中 IFN- γ 含量为(31.90 \pm 10.87)pg/mL,OX40 组中 IFN- γ 含量为(46.70 \pm 40.77)pg/mL,mVG161 组中 IFN- γ 含量为(142.90 \pm 130.20)pg/mL,联合组中 IFN- γ 含量为(1945.00 \pm 218.10)pg/mL。与对照组相比,联合组中 IFN- γ 含量的增加具有显著的统计学差异(** P <0.001)(图 3.3.8 B)。

表 3.11 mVG161 联用 OX40 抗体对双边皮下移植瘤模型 TNF- α 和 IFN- γ 表达的影响

Group	<i>n</i>	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
Ctrl	3	30.96 \pm 7.12	31.90 \pm 10.87
OX40	3	86.71 \pm 25.61*	46.70 \pm 40.77
mVG161	3	137.70 \pm 10.11**	142.90 \pm 130.20
mVG161+ OX40	3	202.70 \pm 30.07***	1945.00 \pm 218.10###

*表示与 Ctrl 组相比, TNF- α 表达有统计学意义, $P < 0.05$; **表示与 Ctrl 组相比, TNF- α 表达有统计学意义, $P < 0.01$; ***表示与 Ctrl 组相比, TNF- α 表达有统计学意义, $P < 0.001$ 。###表示与 Ctrl、OX40、mVG161 组相比, IFN- γ 表达有统计学意义, $P < 0.001$ 。

图 3.3.8 小鼠血清 TNF- α 和 IFN- γ 的表达

A.小鼠血清 TNF- α 的表达; B.小鼠血清 IFN- γ 的表达。

5 讨论

肿瘤免疫治疗仍然有肿瘤遗传多样性的阻碍、缺乏新抗原和免疫抑制性的肿瘤微环境的问题。免疫“冷”肿瘤的特征是：细胞毒性效应 T 细胞和 NK 细胞的局部缺失，以及骨髓源性抑制细胞和调节性 T 细胞水平的升高^[48]。免疫检查点抑制剂已成为包括淋巴瘤在内的多种癌症的成功靶向治疗药物。OX40 及其配体 OX40L 是肿瘤坏死因子超家族的成员，在促进 T 细胞存活和调节细胞因子受体信号方面起关键作用。OX40 主要表达在 T 细胞上，而 OX40L 表达于活化的抗原提呈细胞，包括 B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞。激活 OX40 的单抗已被用于增强对肿瘤细胞的免疫反应。临床上，人源化 OX40 激动型抗体对晚期实体瘤患者有效且耐受性良好。然而，OX40 抗体疗法对于低免疫原性的肿瘤（肠癌、

胃癌等肿瘤)效果差,因此,需要寻找更广泛使用 OX40 抗体疗法的方法^[49]。OVs 是很有希望的肿瘤治疗新手段,除了直接杀死肿瘤细胞外,局部注射溶瘤病毒还会在肿瘤微环境中产生局部炎症,能够吸引多种免疫效应细胞,将免疫上的“冷”肿瘤转化为“热”免疫原状态。因此,将溶瘤病毒与 OX40 抗体疗法相结合是不错的选择。

为了探究 VG161 的体内抗肿瘤作用和两种肿瘤破坏机制(直接溶瘤与免疫介导的肿瘤清除),我们使用无胸腺裸鼠和免疫能力强的 BALB/c 小鼠进行体内试验。我们构建了人结肠癌 PDX 模型,通过观察荷瘤小鼠体重、肿瘤体积,Western blot 检测凋亡蛋白表达情况等实验,初步发现 VG161 能延缓肿瘤生长、减少瘤内 ki67 的表达、促进瘤内凋亡蛋白表达、以及延长荷瘤小鼠存活时间,并且溶瘤病毒 VG161 的作用效果比骨架病毒 VG160 更好。我们也构建了 CT26 双边皮下移植瘤模型,通过观察荷瘤小鼠体重、肿瘤体积,发现 VG161 能明显延缓小鼠肿瘤的生长。通过对实验标本心、肝、脾、肺、肾重要脏器的 HE 染色发现,溶瘤病毒 mVG161、OX40 抗体以及两药联合使用并无明显的毒副作用。通过 ki67 免疫组化结果和凋亡蛋白 Western blot 实验发现,溶瘤病毒具有抑制肿瘤增殖的作用,且与 OX40 抗体联合使用时效果显著。通过肿瘤浸润 CD8 免疫荧光实验和流式细胞术实验证实,溶瘤病毒 mVG161 具有一定的激活免疫作用、诱导免疫记忆的能力,并且与 OX40 抗体联合使用时效果显著。成熟 DCs 在诱导 T 淋巴细胞分化的时候,会使得体内分泌大量 TNF- α 和 IFN- γ ,这些免疫因子具有抗肿瘤、促进免疫的功能^[50],因此我们也将小鼠血清进行 ELISA 检测。结果发现,溶瘤病毒 mVG161 作用可以诱导 TNF- α 和 IFN- γ 的分泌,并且与 OX40 抗体联合运用是效果更为显著。以上实验结果说明,溶瘤病毒 VG161 具有抑制结肠癌肿瘤生长,促进肿瘤凋亡并激活免疫和诱导免疫记忆的作用,当与 OX40 抗体联用时,可以进一步提高 VG161 抗结肠癌的效果,且无明显的毒副作用。

结论

本课题采用 CCK-8 实验、Western blot、流式细胞术、ELISA 实验等技术，以及构建人结肠癌 PDX 模型和小鼠结肠癌 CT26 双边皮下移植瘤模型，初步探讨溶瘤病毒 VG161 通过内质网应激诱导 ICD 抗结肠癌的作用及机制。

本课题得出以下结论：

1、溶瘤病毒 VG161 能抑制结肠癌细胞 CT26、HCT116 的增殖、并诱导其凋亡。同时，溶瘤病毒 VG161 还能促进 CT26、HCT116 细胞内质网应激相关蛋白的表达。

2、溶瘤病毒 VG161 通过促进 CRT 表面暴露、ATP 和 HMGB1 的释放，诱导结肠癌细胞 CT26、HCT116 发生免疫原性细胞死亡，促进髓源性树突状细胞的成熟，进而诱导脾脏 T 细胞的分化。

3、溶瘤病毒 VG161 具有抑制肿瘤生长，激活机体免疫和诱导免疫记忆的体内作用。与 OX40 抗体联用能进一步提高溶瘤病毒 VG161 的体内抗肿瘤活性，并无明显的毒副作用。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraie Y, *et al.* Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets*. 2021;22(9):998-1009.
- [3] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683-691.
- [4] Akimoto N, Ugai T, Zhong R, *et al.* Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Apr;18(4):230-243.
- [5] 鲍萍萍, 吴春晓, 张敏璐, 等. 2015 年上海市恶性肿瘤流行特征分析[J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(2): 81-99.
- [6] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J]. *The Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [7] Galluzzi L, Buque A, Kepp O, *et al.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(2): 97-111.
- [8] Breitbach C J, Lichty B D, Bell J C. Oncolytic Viruses: Therapeutics With an Identity Crisis[J]. *EBioMedicine*, 2016, 9: 31-36.
- [9] Raja J, Ludwig J M, Gettinger S N, *et al.* Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology[J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 140.
- [10] Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, *et al.* ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents[J]. *Nat Med*, 1997, 3(6): 639-45.
- [11] Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(5): 298-300.

- [12] Hu J C, Coffin R S, Davis C J, *et al.* A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(22): 6737-47.
- [13] Coffin R. Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer[J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(2): 103-6.
- [14] Andtbacka R H I, Kaufman H L, Collichio F, *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(25): 2780-2788.
- [15] Chouljenko DV, Ding J, Lee IF, *et al.* Induction of Durable Antitumor Response by a Novel Oncolytic Herpesvirus Expressing Multiple Immunomodulatory Transgenes. *Biomedicines*. 2020 Nov 9;8(11):484.
- [16] Wigginton JM, Wiltrout RH. IL-12/IL-2 combination cytokine therapy for solid tumours: translation from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther*. 2002 Jun;2(5):513-24.
- [17] Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):237-46.
- [18] Robinson TO, Schluns KS. The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunol Lett*. 2017 Oct;190:159-168.
- [19] Guo Y, Luan L, Patil NK, *et al.* Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017 Dec;38:10-21.
- [20] Xu-Monette ZY, Zhang M, Li J, *et al.* PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Front Immunol*. 2017 Dec 4;8:1597.
- [21] Ding J, Murad YM, Sun Y, *et al.* Pre-Existing HSV-1 Immunity Enhances Anticancer Efficacy of a Novel Immune-Stimulating Oncolytic Virus. *Viruses*. 2022 Oct 23;14(11):2327.
- [22] Shen Y, Song W, Lin D, *et al.* VG161 activates systemic antitumor immunity in pancreatic cancer models as a novel oncolytic herpesvirus expressing multiple immunomodulatory transgenes. *J Med Virol*. 2023 Jan;95(1):e28108.
- [23] Diederich M. Natural compound inducers of immunogenic cell death. *Arch Pharm Res*. 2019 Jul;42(7):629-645.
- [24] Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, *et al.* In situ immune response after neoadjuvant

- chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol.* 2011 Jul;224(3):389-400.
- [25] Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, *et al.* Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J Immunother.* 2010;33(4):435-441.
- [26] Pol J, Vacchelli E, Aranda F, *et al.* Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology.* 2015 Mar 2;4(4):e1008866.
- [27] Fukuhara H, Takeshima Y, Todo T. Triple-mutated oncolytic herpes virus for treating both fast- and slow-growing tumors[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8): 3293-3301.
- [28] Takasu A, Masui A, Hamada M, *et al.* Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2016 Apr;23(4):107-13.
- [29] Wang X, Shao X, Gu L, *et al.* Targeting STAT3 enhances NDV-induced immunogenic cell death in prostate cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2020 Apr;24(7):4286-4297.
- [30] Araki H, Tazawa H, Kanaya N, *et al.* Oncolytic virus-mediated p53 overexpression promotes immunogenic cell death and efficacy of PD-1 blockade in pancreatic cancer. *Mol Ther Oncolytics.* 2022 Sep 13;27:3-13.
- [31] Alves Costa Silva C, Facchinetti F, Routy B, *et al.* New pathways in immune stimulation: targeting OX40. *ESMO Open.* 2020 Feb;5(1):e000573.
- [32] CAO W, CHEN H D, YU Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [33] GONZALEZ-PERERA I, GUTIERREZ-NICOLAS F, NAZCO-CASARIEGO G J, *et al.* 5-fluorouracil toxicity in the treatment of colon cancer associated with the genetic polymorphism 2846 A>G (rs67376798)[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2017, 23(5): 396-398.
- [34] Galluzzi L, Buque A, Kepp O, *et al.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(2): 97-111.
- [35] Morana O, Wood W, Gregory CD. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 25;23(3):1328.
- [36] YADAV R K, CHAE S W, KIM H R, *et al.* Endoplasmic retic-ulum stress and cancer[J]. *J Cancer Prev*, 2014,19(2):75-88.

- [37] Krysko, DV , Garg, *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 860–875.
- [38] Workenhe ST, Mossman KL. Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Mol Ther.* 2014 Feb;22(2):251-256.
- [39] Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* 2012 Mar 7;31(5):1062-79.
- [40] Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009 Sep 10;461(7261):282-6.
- [41] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1050-9.
- [42] Shiratsuchi A, Watanabe I, Takeuchi O, *et al.* Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2039-47.
- [43] Takasu A, Masui A, Hamada M, *et al.* Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2016 Apr;23(4):107-13.
- [44] Angelova AL, Grekova SP, Heller A, *et al.* Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol.* 2014 May;88(10):5263-76.
- [45] Errington F, Steele L, Prestwich R, *et al.* Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):6018-26.
- [46] Koks CA, Garg AD, Ehrhardt M, *et al.* Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E313-25.
- [47] Guo ZS, Liu Z, Bartlett DL. Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Front Oncol.* 2014 Apr 10;4:74.
- [48] Huber V, Camisaschi C, Berzi A, *et al.* Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol.* 2017 Apr;43:74-89.
- [49] Sun R, Zhang PP, Weng XQ, *et al.* Therapeutic targeting miR130b counteracts diffuse large

B-cell lymphoma progression via OX40/OX40L-mediated interaction with Th17 cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):80.

[50] Yuan Z, Fan G, Wu H, *et al.* Photodynamic therapy synergizes with PD-L1 checkpoint blockade for immunotherapy of CRC by multifunctional nanoparticles. *Mol Ther.* 2021 Oct 6;29(10):2931-2948.

综述

常见溶瘤病毒在结直肠癌动物实验中的研究现状

王璐¹, 王杰^{2, 3}, 陈腾^{2, 3}, 殷佩浩^{2, 3}

(1. 成都中医药大学 医学与生命科学学院, 四川 成都 611137; 2. 上海中医药大学 附属普陀医院 普外科, 上海 200062; 3. 安徽医科大学 普陀中心临床学院, 上海 200062)

Research status of common oncolytic viruses in animal experiments of colorectal cancer

WANG Lu¹, WANG Jie^{2, 3}, CHEN Teng^{2, 3}, YIN Pei-hao^{2, 3}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Chengdu University of traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, Sichuan Province, China; 2. Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Putuo Center Clinical College, Anhui Medical University, Shanghai 200062, China)

中图分类号: R97

文献标志码: A

基金项目: 国家科技部重点研发计划基金资助项目(2019YFC1316003); 国家自然科学基金面上基金资助项目(81973625); 上海市普陀区卫生健康系统临床特色专病建设基金资助项目(2019tszb01)

作者简介: 王璐(1995-), 女, 硕士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤发病机制的相关研究

通信作者: 殷佩浩, 主任医师, 博士生导师

MP:

E-mail:

摘要: 结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 手术、化疗和放疗等传统治疗方法虽已取得一定进展, 但效果有限, 且肿瘤复发、耐药和死亡率较高的问题仍然存在, 因此需要开发更有效的治疗方法和药物。溶瘤病毒是肿瘤治疗的新兴方法, 其在选择性复制并杀死肿瘤细胞的同时, 还能改善肿瘤免疫抑制微环境, 诱导抗肿瘤

免疫反应，是一种重要的免疫联合疗法。本文综述了溶瘤病毒的作用机制、常见的几类溶瘤病毒在结直肠癌中动物实验的应用研究以及增强溶瘤病毒疗法效果的手段，以期待将来能更安全更有效更广泛地将 OV_s 应用于结直肠癌的治疗。

关键词：溶瘤病毒；结直肠癌；作用机制；动物研究

Abstract Colorectal carcinoma is one of the most common malignant tumors. Although some progress has been made in traditional treatments such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, the effect is not good, and the problems of high tumor recurrence, drug resistance and mortality still exist, so it is necessary to develop more effective treatments and drugs. Oncolytic virus is a new method of tumor therapy. It can not only selectively replicate and kill tumor cells, but also improve tumor immunosuppressive micro-environment and induce anti-tumor immune response. This article reviews the mechanism of oncolytic virus, the application of several common oncolytic viruses in animal experiments in colorectal cancer, and the methods to enhance the effect of oncolytic virus therapy, in order to expect that OV_s can be used more safely, effectively and widely in the treatment of colorectal cancer in the future.

Key words: oncolytic virus; colorectal cancer; mechanism; animal research

结直肠癌（colorectal cancer, CRC）是发病率和死亡率逐年上升的常见消化道恶性肿瘤之一^[1]。手术治疗是 CRC 的主要治疗方式，尽管辅以放疗、化疗、靶向治疗等手段，但疗效并不理想。溶瘤病毒（oncolytic virus, OV_s）是一类具有复制能力的肿瘤杀伤性病毒，其依靠选择性复制并杀死肿瘤细胞而不损害正常细胞的优势成为肿瘤治疗中最有潜力的治疗方法之一。目前，已被批准使用的 OV_s 有人 5 型腺病毒（安柯瑞，H101）^[2]、Talimogene Laherparepvec（T-VEC）^[3]和 Delytact（G47Δ）^[4]。随着基因工程技术的发展和分子生物学的应用，OV_s 的研究掀起了新的热潮，使其有望成为治疗恶性肿瘤的新方法。本文就 OV_s 的作用机制、常见 OV_s 在 CRC 动物实验中的研究以及增强 OV_s 疗法的措施进行综述。

1 OV_s 疗法的作用机制

OV_s 能利用靶细胞抑癌基因的失活或缺陷, 选择性感感染肿瘤细胞、破坏肿瘤血管系统、在肿瘤细胞内大量复制并最终溶解杀死肿瘤细胞, 同时释放免疫因子、诱导免疫反应、吸引更多免疫细胞继续杀死残余癌细胞。OV_s 的主要作用机制包括①直接溶瘤作用: 用宿主细胞某些特定机制通路 (如 I 型干扰素通路) 或肿瘤驱动基因突变特异性来增加病毒复制, 从而利于病毒的溶瘤作用^[5]; ②破坏肿瘤血管系统: OV_s 可以通过感染或杀死肿瘤微环境 (tumor micro-environment, TME) 中的内皮细胞和基质细胞, 干扰血管生成过程, 破坏肿瘤血管系统^[6]; ③激活免疫, 改善 TME: OV_s 感染肿瘤细胞后, 可引起局部抗病毒炎症, 激活免疫反应, 释放危险相关分子模式和病原体相关分子模式, 使肿瘤细胞表面表达“危险”和“吃我”信号, 以及分泌免疫刺激因子, 触发免疫原性细胞死亡, 募集和激活树突状细胞, 刺激特异性 T 淋巴细胞和释放炎症因子, 改善 TME, 增强抗肿瘤作用^[7]。

2 常见的几类 OV_s 在 CRC 动物实验中的研究

OV_s 疗法的研究始于天然病毒, 研究发现患有血液病或淋巴瘤等疾病的患者在经水痘病毒、麻疹病毒和乙型病毒性肝炎病毒感染后, 临床症状都有所减轻。这些发现引导研究者进行了相关临床试验来探究病毒抗肿瘤功能。小鼠实验证明, 病毒有杀伤肿瘤的功效, 但也产生了极强的病毒毒性作用^[8,9]。同时, 由于天然病毒多为长期增殖传代过程中积累的混合体, 缺乏均一性和安全性, 治疗效果无法保证, 因此天然病毒已很少用于治疗^[10]。目前, 主要用于研究的是经基因工程技术删除、修饰、改造或载有免疫刺激因子的基因工程病毒, 该类病毒经过基因技术, 删除或减弱了病毒的致病性或神经毒力, 增加了病毒对肿瘤细胞的靶向性, 提高了病毒的选择性复制和裂解潜能, 并增强了宿主的抗肿瘤免疫能力。

2.1 新城疫病毒用于 CRC 治疗

新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 是一种副粘病毒, 属单链 RNA 病毒, 对人类无致病性, 因此相对安全。NDV 溶瘤特性源于在干扰素缺陷细胞 (如肿瘤细胞) 中生长的固有能力, 通过血凝素神经氨酸酶糖蛋白的作用, 与肿瘤细胞具有良好的结合能力, 并通过其包膜与宿主膜的非 pH 依赖性直接融合作用, 以及通过受体介导的胞吞作用进入细胞, 以形成合胞体的方式和凋亡形式发

挥溶瘤作用，许多研究已经显示出 NDV 在 CRC 中的治疗潜力。

Li 等^[11]研究了表达共刺激因子肿瘤坏死因子配体超家族成员 4 (tumor necrosis factor ligand superfamily member 4, TNFSF4/OX40L) 的溶瘤 NDV 用于 CRC 治疗的效果。该研究为提高 NDV 的抗肿瘤免疫能力，将编码序列鼠源 OX40L (murine-OX40L, mOX40L) 插入 NDV 基因组 P 和 M 之间，将基因 *GS* (gene-start) 和 *GE* (gene-end) 序列置于 *mOX40L* 基因的开放阅读框之前，构建了表达 mOX40L 的重组 NDV (rNDV-mOX40L)，并在 CT26 肿瘤模型中检测其抗肿瘤作用。结果显示，对照组[磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)]、NDV 组和 rNDV-mOX40L 组的小鼠平均体积分别为 1408.15、355.33 和 163.36 mm³；NDV 组和 rNDV-mOX40L 组的抑瘤率分别为 66.26%和 81.44%，提示 rNDV-mOX40L 在 CT26 模型中显著抑制肿瘤的生长。同时，小鼠脾流式细胞术结果显示，PBS 组、NDV 组和 rNDV-mOX40L 组的 CD4⁺ T 细胞百分率分别为 11.16%、13.16%和 24.16%，CD8⁺ T 细胞百分率分别为 8.30%、8.73%和 16.70%，提示 rNDV-mOX40L 能通过刺激脾 T 细胞反应，改善机体免疫微环境，促进抗肿瘤反应。

Kishan 等^[12]用 SW620 结肠癌细胞研究了 NDV R2B 株 Mukteshwar 的溶瘤作用。该研究将实验动物随机分为对照瘤内注射 (control-IT) 组、NDV 瘤内注射 (NDV-IT) 组、对照静脉注射 (control-IV) 组、NDV 静脉注射 (NDV-IV) 组，并分别给以 0.9% NaCl 和 NDV 治疗。结果显示，control-IT 组小鼠的平均肿瘤体积为 3123.57 mm³，NDV-IT 组为 1823.52 mm³(对照组的 58%)；同样地，control-IV 组小鼠的平均肿瘤体积为 2934.13 mm³，NDV-IV 组为 1753.06 mm³ (对照组的 59.9%)，说明瘤内注射或静脉注射 NDV R2B 株 Mukteshwar 均可以减缓 SW620 结肠癌的生长。

2.2 疱疹病毒用于 CRC 治疗

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于 DNA 病毒，大小为 125-240 kB，其主要通过病毒包膜糖蛋白附着在细胞表面受体进入细胞，其可通过 *lystic* 基因编码蛋白促进病毒复制并引发宿主免疫反应导致肿瘤裂解^[13]。HSV 在肿瘤应用中具有感染大多数肿瘤细胞并对肿瘤细胞产生病毒毒素的能力和具有庞大的基因组，易于基因改造，插入多个治疗靶基因的优势，因此 HSV 是目前在临

床使用最广泛的 OV_s。

David 等^[14]在人 CRC 细胞中研究了第 2 代多突变、复制能力强的 HSV 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) G207 株, 为了减弱神经毒力, 该病毒株删除了毒力蛋白感染细胞多肽 34.5 (infected cell polypeptide 34.5, ICP34.5) 基因。实验采用 3 种人 CRC 细胞系 (C85、C86 和 HCT8) 作为单侧肿瘤模型, 每组细胞系评估 16 例肿瘤, 其中 8 例用活性 G207 治疗 (实验组), 8 例用灭活 G207 治疗 (对照组)。与对照组相比, 活性 G207 治疗可显著抑制 3 种细胞系的异种移植肿瘤生长, 其中, 对 HCT8 的异种移植最敏感, 100% 的治疗肿瘤有应答 (其中, 4 例部分应答和 4 例完全应答); 对 C86 异种移植也有类似的结果 (4 例部分缓解和 2 例完全缓解)。注射活性 G207 后 C85 肿瘤虽未被完全抑制, 但生长速率较对照组明显降低。在生存期观察实验中, 实验组动物体质量增加显著高于对照组 [(100.00±16.00) vs (44.00±9.00) g, $P<0.05$]。这说明 G207 治疗既是肿瘤特异性的, 又能有效地抑制肿瘤的生长。

Nasrin 等^[15]在 SW480 和 HCT116 细胞中研究了表达白细胞介素-12 (interleukin-12, *IL-12*) 的 HSV-1 的作用, 结果发现, *IL-12* 的插入并不影响 HSV-1 在 SW480 和 HCT116 细胞中的复制效率和杀伤效率。与未插入 *IL-12* 的野生型病毒相比, 该病毒可以显著诱导干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的产生和外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的增殖 ($P<0.05$), 改善肿瘤免疫微环境。

2.3 腺病毒用于 CRC 治疗

溶瘤腺病毒 (oncolytic adenoviruse, OADs) 属无包膜的 DNA 病毒, 大小约为 36 kB, 能够编码早期和晚期基因。病毒感染细胞时, OADs 的纤维结构域与细胞表面受体相互作用, 病毒通过其主要蛋白上的精氨酸 (arginine, R)-甘氨酸 (glycine, G)-天冬氨酸 (aspartic acid, D; RGD) 基序与细胞整合素结合而内化进入细胞。在衣壳中, OADs 的早期和晚期基因在宿主细胞核中转录, 促进病毒的装配并从细胞中释放。然而由于腺病毒在人群中广泛存在, 所以, 机体内含有 OADs 相关的抗体, 这是 OADs 的一大缺点^[16]。

Xiao 等^[17]以 OADs 为基础, 构建了癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 控制的溶瘤腺病毒 CD55。基于这一构建, 研究者在 OADs E1B^{55KD} 处插入 *Smad4*

基因，产生了一种新型的溶瘤腺病毒 CD55-Smad4。研究者以 CD55-EGFP、CD55-Smad4 感染 CRC 细胞株 HCT116、HT-29、SW620 和 SW480 48 h，实验表明，CD55-Smad4 对 CRC 细胞的杀伤作用和抑制作用更强 ($P<0.05$)。HCT116 肿瘤模型中，将小鼠随机分组，分别注射 PBS (NC 组)、CD55-EGFP (CE 组) 和 CD55-Smad4 (CS 组) 治疗。结果表明，CS 组更有效地抑制了肿瘤的生长和诱导更严重的细胞病变 (具体数据未展示)。赫斯特染色实验表明，CD55-Smad4 诱导了更高水平的核碎裂、凋亡小体形成、染色质凝集和细胞凋亡。流式细胞术发现，CD55-Smad4 诱导了 HCT116 细胞更显著的凋亡和细胞周期的停滞 ($P<0.05$) (具体数据未展示)。蛋白质免疫印迹实验结果表明，CD55-Smad4 能显著激活 caspase 信号转导通路，增加 caspase3 和 PARP 蛋白的裂解，提示 CD55-Smad4 能有效地诱导细胞凋亡，增强抗肿瘤作用。

Luo 等^[18]研究了一种携带治疗基因微小核糖核酸-143 (microRNA-143, *miR-143*) 的三重调控溶瘤腺病毒 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 的抗结肠癌作用，并与同源腺病毒 Ad-ZD55 和 Ad-RGD-Survivin-ZD55 相比较。在体外验证实验中，将各腺病毒以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 5 的条件感染 HCT116 细胞，以未感染的细胞为对照。噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 结果显示，与对照组相比，所有病毒均能显著抑制 HCT116 细胞的增殖。其中，Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 抑制细胞增殖能力最强，其次是 Ad-RGD-Survivin-ZD55。然而，Ad-ZD55 抑制细胞增殖的能力相对较弱。为了研究各腺病毒对细胞迁移的影响，研究者以 MOI 为 5 的条件感染 HCT116 细胞。划痕实验结果显示，对照组、Ad-ZD55、Ad-RGD-Survivin-ZD55 和 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 组的划痕间隙在 48 h 分别为 46.52、52.38、189.73 和 278.85 μM ，提示 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 可抑制 HCT116 的迁移。在体内实验中，将 HCT116 荷瘤小鼠随机分为 4 组，每组 6 只，分别用 0.9% NaCl (对照组)、Ad-ZD55、Ad-RGD-Survivin-ZD55 和 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 治疗，结果显示，对照组、Ad-ZD55 组、Ad-RGD-Survivin-ZD55 组和 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 组小鼠肿瘤体积分别为 (3813.60 \pm 49.36)、(2618.52 \pm 34.77)、(786.58 \pm 15.73) 和 (272.34 \pm 12.28) mm^3 ，提示 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 可以显著抑制结肠肿瘤增长。

HE 染色显示, Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 组细胞明显坏死, 而对照组细胞生长正常。在脱氧核苷酸末端转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸 (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, dUTP) 缺口末端标记染色中, Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 组较其他 3 组诱导更多的细胞凋亡, 提示 Ad-RGD-Survivin-ZD55-miR-143 可以更好地诱导细胞凋亡。

3 增强 OV_s 疗效的措施

鉴于单一 OV_s 抗肿瘤作用有限, 并且由于复杂的生物特性, OV_s 具有使用范围的局限性、被循环抗体中和的可能性以及耐药性等问题, 因此除了从改造基因结构, 增加 OV_s 复制能力或者搭载更多激活免疫的刺激因子或者靶向结构以外, 也可将 OV_s 与其他治疗手段联用, 以增强其对肿瘤的杀伤作用。

3.1 OV_s 与免疫疗法联合应用

考虑到 OV_s 激活免疫和在 TME 中调节免疫环境的潜力, 以及免疫疗法的有效性, 许多研究者合理地推测 OV_s 与免疫疗法的结合可能会产生协同治疗效果。

研究最为火热的是 OV_s 与免疫检查点抑制剂的联用。Liu 等^[19]将表达 C-X-C 基序趋化因子 11 (C-X-C motif chemokine ligand 11, CXCL11) 的溶瘤痘苗病毒 (vvDD-CXCL11, VV) 联合程序性死亡受体-配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 抑制药用于治疗结肠癌, 结果发现, VV 可吸引效应 T 细胞, 并诱导 PD-L1 高表达, 而二者联合治疗可减少 PD-L1⁺ 细胞, 促进效应 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞的肿瘤浸润, 增加 IFN- γ 、颗粒酶 B 和穿孔素的表达。此外, 该治疗减少了病毒诱导的 PD-L1⁺ DC、髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg), 以及严重耗尽的 PD-1⁺CD8⁺ T 细胞, 从而减少肿瘤负担, 提高生存率。

3.2 OV_s 与化疗联合应用

OV_s 和化疗相结合的方案被认为是多种肿瘤的潜在治疗方案, 尤其是对化疗耐药的恶性肿瘤。Wang 等^[20]研究发现, 用 50 μ M 奥沙利铂预处理耐奥沙利铂的人 CRC 细胞系 WiDr 12 h, 使 WiDr 细胞对随后的柯萨奇病毒 A11 感染敏感 (具体数据未展示)。在动物实验中, 裸鼠皮下注射 WiDr 细胞, 分别不治疗、给予奥沙利铂单独、柯萨奇病毒 A11 单独或奥沙利铂加柯萨奇病毒 A11 联合治疗。

结果显示, 联合治疗小鼠的肿瘤体积明显小于单药治疗小鼠 ($P < 0.05$, 具体数据未展示), 并且联合组小鼠存活时间更长 (具体数据未展示)。Shen 等^[21]构建了重组溶瘤腺病毒 ZD55-Sur-EGFP。在人 CRC 细胞系 SW480 动物模型中, 当肿瘤大小达到 100.00 mm^3 时, 分别或联合给予 ZD55-Sur-EGFP 和 5-氟尿嘧啶治疗。结果显示, 联合给药可显著减少肿瘤体积 (联合组的平均肿瘤体积为 283.60 mm^3 , 显著小于对照组 2184.70 mm^3 、5-氟尿嘧啶组 1836.30 mm^3 和 ZD55-Sur-EGFP 组 1767.60 mm^3), 并且抑制淋巴结转移 (联合组淋巴结转移总数为 3 个, 显著少于对照组 16 个、5-氟尿嘧啶组 15 个和 ZD55-Sur-EGFP 组 16 个)。Maitra 等^[22]用 1 MOI 呼肠呼病毒和 $1 \mu\text{M}$ 伊立替康单独或联合治疗 HCT116 48 h 后, 伊立替康单用、呼肠孤病毒单用和联合用药对细胞生长的抑制作用分别为 $(8.80 \pm 2.78)\%$ 、 $(54.48 \pm 2.73)\%$ 和 $(79.50 \pm 1.44)\%$ 。在凋亡检测实验中, 伊立替康单药、呼肠孤病毒单药和联合用药诱导细胞凋亡分别为 3.05 倍、5.05 倍和 11.05 倍。Ottolino 等^[23]在人 CRC 细胞系 DLD1 动物模型中, 分别或联合给予痘苗病毒和伊立替康治疗后, 与单药治疗相比, 联合治疗显著改善了生存期 (中位生存期: 联合组 87.50 天; 痘苗病毒组 57.00 天; 伊立替康组 48.00 天)。检测免疫细胞浸润情况发现, 联合治疗组巨噬细胞浸润显著增加 [联合组: $(17.10 \pm 1.70)\%$; 单用药组: $(12.10 \pm 0.80)\%$]。

3.3 OV_s 与放疗联合应用

放射治疗是一种主要的抗癌治疗方式, 其利用电离辐射诱导 DNA 损伤, 导致细胞死亡。并且同时应用放射增敏剂可以改善治疗效果。而 OV_s 被认为是潜在的放射增敏剂, 可以提高整体抗肿瘤疗效并降低毒性。Pokrovska 等^[24]使用 6 只重度联合免疫缺陷 (server combined immune-deficiency, SCID) 小鼠模型进行人类 HCT116 异种移植, 当肿瘤达到 50.00 mm^3 体积时, 所有小鼠静脉注射三次转染了荧光蛋白的腺病毒 Enadenotucirev (EnAd), 在最后一次注射病毒后一天, 随机将小鼠分为接受 10 戈瑞的肿瘤照射组 ($n=3$) 或不接受照射组 ($n=3$)。结果显示, 与未辐照的动物相比, 三只辐照小鼠中有两只的病毒荧光峰值总通量在较晚的时间点升高, 表明病毒在肿瘤部位积聚和复制。在验证肿瘤生长的实验中, 小鼠被随机分为 EnAd 治疗组和 PBS 治疗组, 两组在给药完成后都接受 10 戈瑞的肿瘤照射。结果显示, EnAd 组小鼠生存时间 (中位数为 38.00 天 vs PBS 组

30.50 天) 和存活率显著增加 (具体数据未展示), 肿瘤生长明显延迟一致 (具体数据未展示), 表明, EnAd 在体内放射前给药可能具有放射致敏作用。同样, Ras 通路的激活会影响肿瘤的放射敏感性, 呼肠孤病毒只能在具有活化 Ras 信号通路的细胞内复制^[25], 因此可将呼肠孤病毒与放疗联合应用于 CRC 的治疗中。

4 讨论

发病率和死亡率逐年上升使 CRC 变成研究焦点。OVs 疗法依靠选择性复制并杀死肿瘤细胞而不损害正常细胞的优势, 以及诱导强大的抗肿瘤免疫反应的特点, 成为治疗 CRC 的新方法。OVs 疗法可以提高结直肠癌中免疫细胞的浸润、抑制肿瘤生长、延长总体生存时间。除此之外, OVs 疗法与免疫检查点抑制剂、化疗等方法联用时, 效果更加显著。因此, OVs 疗法通过特异性感染肿瘤和诱导肿瘤免疫的方法有望为 CRC 的治疗提供新的方向, 为临床治疗 CRC 提供理论依据。

参考文献:

- [1] 刘伟, 胡送娇, 朱锐秋, 等. 中医药调节免疫应答抗结直肠癌的研究状况[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38 (13): 1539-1543.
- [2] GARBER K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98 (5): 298-300.
- [3] 杜朝阳, 谢铮铮, 孙路路. 溶瘤病毒新药 talimogene laherparepvec 的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (1): 87-89, 94.
- [4] FUKUHARA H, TAKESHIMA Y, TODO T. Triple-mutated oncolytic herpes virus for treating both fast- and slow-growing tumors [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112 (8): 3293-3301.
- [5] AGHI M, VISTED T, DEPINHO R A, *et al.* Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16 [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (30): 4249-4254.
- [6] 马海燕, 王欣. 溶瘤病毒在乳腺癌治疗中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47 (16): 847-850.
- [7] GUO Z S, LIU Z, KOWALSKY S, *et al.* Oncolytic immunotherapy: Conceptual evolution, current strategies, and future perspectives [J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: e555.

2017-05-15 [2023-04-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28555136/>.

[8] Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM, Fleming AF. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet*, 1981, 1(8229) : 1112.

[9] Bluming AZ, Ziegler JL. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*, 1971, 2(7715) : 105-106.

[10] 钱云云, 张荣波, 吴静, 等. 溶瘤病毒的抗肿瘤机制及其在临床应用中的研究进展 [J]. 肿瘤, 2018, 38 (5) : 513-518.

[11] TIAN L, LIU T, JIANG S, *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus expressing the co-stimulator OX40L as immunopotentiator for colorectal cancer therapy [J]. *Gene Ther*, 2023, 30 (1-2) : 64-74.

[12] SHARMA K K, KALYANI I H, MOHAPATRA J, *et al.* Evaluation of the oncolytic potential of R2B Mukteshwar vaccine strain of Newcastle disease virus (NDV) in a colon cancer cell line (SW-620) [J]. *Arch Virol*, 2017, 162 (9) : 2705-2713.

[13] KRUMMENACHER C, CARFI A, EISENBERG R J, *et al.* Entry of herpesviruses into cells: The enigma variations [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 790 : e178-e195. 2013-12-31 [2023-04-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23884592/>.

[14] KOOBY D A, CAREW J F, HALTERMAN M W, *et al.* Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207) [J]. *FASEB J*, 1999, 13 (11) : 1325-1334.

[15] HAGHIGHI-NAJAFABADI N, ROOHVAND F, SHAMS NOSRATI M S, *et al.* Oncolytic herpes simplex virus type-1 expressing IL-12 efficiently replicates and kills human colorectal cancer cells [J/OL]. *Microb Pathog*, 2021, 160: e105164. 2021-09-01 [2023-04-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34478858/>.

[16] 周影, 耿志欣, 孙建, 等. 溶瘤病毒在宫颈癌中抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6 (6) : 16-20.

[17] XIAO B, ZHANG L, LIU H, *et al.* Oncolytic adenovirus CD55-Smad4 suppresses cell proliferation, metastasis, and tumor stemness in colorectal cancer by regulating Wnt/beta-Catenin signaling pathway [J]. *Biomedicines*, 2020, 8 (12) : 593.

[18] LUO Q, SONG H, DENG X, *et al.* A triple-regulated oncolytic adenovirus carrying

microRNA-143 exhibits potent antitumor efficacy in colorectal cancer [J/OL]. *Mol Ther Oncolytics* , 2020 , 16 : e219-e229. 2020-03-27 [2023-04-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32123722/>.

[19] LIU Z , RAVINDRANATHAN R , KALINSKI P , *et al.* Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy [J/OL]. *Nat Commun* , 2017 , 8 : e14754. 2020-03-27 [2017-03-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345650/>.

[20] Wang B , Ogata H , Takishima Y , *et al.* A Novel Combination Therapy for Human Oxaliplatin-resistant Colorectal Cancer Using Oxaliplatin and Coxsackievirus A11. *Anticancer Res* , 2018 , 38(11) : 6121-6126.

[21] SHEN W , TU J K , WANG X H , *et al.* Oncolytic adenovirus mediated Survivin RNA interference and 5-fluorouracil synergistically suppress the lymphatic metastasis of colorectal cancer [J]. *Oncol Rep* , 2010 , 24 (5) : 1285-1290.

[22] Maitra R , Seetharam R , Tesfa L , *et al.* Oncolytic reovirus preferentially induces apoptosis in KRAS mutant colorectal cancer cells, and synergizes with irinotecan. *Oncotarget* , 2014 , 5(9) : 2807-2819.

[23] Ottolino-Perry K , Acuna SA , Angarita FA , *et al.* Oncolytic vaccinia virus synergizes with irinotecan in colorectal cancer. *Mol Oncol* , 2015 , 9(8) : 1539-1552.

[24] POKROVSKA T D , JACOBUS E J , PULIYADI R , *et al.* External beam radiation therapy and enadenotucirev: Inhibition of the DDR and mechanisms of radiation-mediated virus increase [J]. *Cancers (Basel)* , 2020 , 12 (4) : 798.

[25] TWIGGER K , VIDAL L , WHITE C L , *et al.* Enhanced *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity of combined reovirus and radiotherapy. *Clin Cancer Res* , 2008 , 14 (3) : 912-923.