

溶瘤II型单纯疱疹病毒在肿瘤中的复制及表达

蔡奇应¹, 张思琪¹, 刘华鹃², 刘滨磊^{1*}

1 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068

2 武汉滨会生物科技股份有限公司, 湖北 武汉 436000

蔡奇应, 张思琪, 刘华鹃, 刘滨磊. 溶瘤II型单纯疱疹病毒在肿瘤中的复制及表达[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 585-595.
CAI Qiying, ZHANG Siqi, LIU Huajuan, LIU Binlei. Replication and expression of oncolytic herpes simplex virus type II in tumors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 585-595.

摘要: 本研究旨在检测 BALB/c 小鼠肿瘤注射部位溶瘤II型单纯疱疹病毒(oncolytic herpes simplex virus type 2, oHSV2)的持续时间和复制水平。同时检测血清中人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony-stimulating factor, hGM-CSF)的表达量和 HSV-2 抗体水平。小鼠经瘤内注射高、低两个剂量 oHSV2-Fluc [萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)], 检测其荧光表达变化及持续时间。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测肿瘤组织中 oHSV2 基因拷贝数。酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 hGM-CSF 表达量以及 HSV-2 抗体水平。结果表明高剂量组肿瘤体积显著小于对照组($P<0.01$)。瘤内注射 oHSV2-Fluc 表明病毒携带的 Fluc 可以在肿瘤中持续表达, 于第 11 天仍能检测到荧光, 直至第 18 天低于检测线。通过提取肿瘤组织 RNA 进行 qPCR, 表明第 9 天高、低剂量组肿瘤组织均存在 oHSV2 的 mRNA。对血清进行 ELISA 检测, 相较于对照组, 高、低剂量组 hGM-CSF 及 HSV2 抗体水平显著提高($P<0.05$)。这些发现表明, oHSV2 能够在瘤内正常复制, 同时所携带的外源因子可持续表达, 对肿瘤产生杀伤作用。瘤内注射 oHSV2 后, 小鼠血清中存在较高水平的 hGM-CSF 和 HSV-2 抗体。

关键词: 溶瘤病毒; 持续时间; 肿瘤; 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子

*Corresponding author. E-mail: liubl@hbut.edu.cn

Received: 2023-09-08; Accepted: 2023-11-16; Published online: 2023-12-02

Replication and expression of oncolytic herpes simplex virus type II in tumors

CAI Qiyang¹, ZHANG Siqu¹, LIU Huajuan², LIU Binlei^{1*}

¹ School of Bioengineering and Food Science, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

² Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 436000, Hubei, China

Abstract: This study aimed to measure the duration and replication level of oncolytic herpes simplex virus type 2 (oHSV2) at the tumor injection site in BALB/c mice. Additionally, the expression level of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) and HSV-2 antibody in the serum was also measured. High and low doses of oHSV2-Fluc (firefly luciferin, Fluc) were injected into the mice's tumors to track the change and duration of fluorescence expression. The copy number of oHSV2 gene in tumor tissues was determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of hGM-CSF and HSV-2 antibody in the serum. The tumor volume in the high-dose group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). Intratumor injection of oHSV2-Fluc showed that the carried Fluc could continue to express in the tumor, with fluorescence still detectable at day 11 and declining to undetectable level by day 18. The mRNA expression of oHSV2 was detected in tumor tissues of both high and low dose groups on day 9 using qPCR. ELISA results showed that the levels of HSV2 antibody and hGM-CSF in both high and low dose groups were significantly increased compared to the control group ($P < 0.05$) after collecting orbital blood. These findings suggest that oHSV2 can replicate in the tumor and sustainably express exogenous factors, thus effectively targeting and killing the tumor. Furthermore, intratumoral injection of oHSV2 resulted in higher levels of hGM-CSF and HSV-2 antibodies found in the mice's serum.

Keywords: oncolytic virus; duration; tumor; human granulocyte macrophage colony-stimulating factor

癌症是世界范围内的主要公共卫生问题。自 2000 年以来,中国癌症病例数和死亡人数逐渐上升^[1]。传统的手术切除^[2]和放化疗技术^[3]可以达到较好的治疗效果,而利用生物技术手段治疗肿瘤的方案被证实对癌症患者的生存时间和生活质量有显著改善,已经成为肿瘤治疗的重要手段之一^[4]。

目前已有较多应用生物技术手段的药物被批准用于临床治疗肿瘤^[5]。如白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)是一种能够活化肿瘤微环境

的细胞因子^[6],它能够通过刺激 T 细胞和自然杀伤细胞的增殖和分化来诱导抗肿瘤免疫反应^[7];程序性死亡蛋白-1 (programmed cell death-1, PD-1)及其配体 PD-L1 属于免疫检查点抑制剂,它通过增强 T 细胞对肿瘤的识别提升机体的抗肿瘤免疫作用^[8];嵌合抗原受体-T 细胞 (chimeric antigen receptor, CAR-T)疗法对于治疗白血病或淋巴瘤具有显著疗效,它通过生物技术手段改造患者自身 T 细胞,达到靶向杀伤肿瘤细胞的目的,但 CAR-T 细胞疗法对治疗

实体瘤具有一定的局限性^[9]；溶瘤病毒是一种能够靶向杀伤肿瘤细胞且对患者没有明显毒副作用的抗肿瘤药物^[10]，通过生物技术手段进行改造后能够增强病毒对肿瘤细胞的杀伤作用，并且降低病毒在正常细胞中的复制能力^[11]。目前研究进展最快的病毒是疱疹病毒，以疱疹病毒为载体的溶瘤病毒 T-VEC^[12]、G47 Δ ^[13]已被批准用于肿瘤治疗。疱疹病毒的优势在于其基因组可以插入较大的外源基因，且感染谱广，能够感染大多数肿瘤细胞^[14]，在临床使用中如果出现感染，可以通过成熟的抗疱疹病毒治疗方案进行控制^[15]。

溶瘤II型单纯疱疹病毒(oncolytic herpes simplex virus type 2, oHSV2)是以野生型II型单纯疱疹病毒为骨架改造而来^[16]，通过敲除 ICP34.5^[17]和 ICP47^[18]以降低神经毒性和增强对肿瘤细胞的选择性。在 oHSV2 中插入外源基因可以辅助肿瘤治疗^[19]，如插入绿色荧光蛋白基因能够使感染的细胞在荧光显微镜中更好地被观察^[20]；插入萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)基因后得到的 oHSV2-Fluc 在 D-荧光素钾盐的作用下发出的荧光能够被仪器检测，可用于观测病毒在机体中的感染状况^[21]；插入人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony-stimulating factor, hGM-CSF)基因后得到的 oHSV2-hGM-CSF (简称 OH2)所分泌的 hGM-CSF 可以增强抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC)的募集，APC 的活化有助于肿瘤抗原呈递给肿瘤特异性 T 细胞，从而提高抗肿瘤效应^[22]。临床前研究表明，oHSV2 能有效治疗鼠结肠癌^[23]，降低脾脏中抑制性免疫细胞的含量，增加抗肿瘤免疫细胞的含量，能够发挥持久的抗肿瘤效果且具有远端效应^[24]。oHSV2 与抗信号调节蛋白 α 抗体联合治疗可以重塑肿瘤微环境，激活先天性和

适应性免疫反应^[25]。经过 oHSV2 治疗的荷瘤小鼠采取外周血进行单细胞 RNA 测序，结果表明 oHSV2 能够激活全身免疫，促进 CCL5 的产生，oHSV2 可提高外周血细胞毒性 T 细胞和成熟自然杀伤细胞的细胞毒性^[26]。oHSV2 安全性良好，其在小鼠和食蟹猴的长期毒性和生物分布实验中的结果证实，oHSV2 多次给药后不会显著改变小鼠和食蟹猴的体重和各项生理指标，在各脏器中均不能检测到病毒拷贝数^[27]。同时，临床数据显示，oHSV2 在实体瘤患者中耐受性良好，表现出持久的抗肿瘤活性且未发生与治疗相关的严重不良事件^[28]。本文通过考察 oHSV2 在肿瘤注射部位的复制水平、持续时间、hGM-CSF 的表达水平以及考察 HSV-2 抗体表达水平，为给药方案的优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

1.1.1 实验动物和细胞

56 只雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠，6-7 周龄，体质量(18 \pm 1) g，购于湖北省实验动物研究中心，许可证号：SCXK (鄂) 2020-0018。CT26 细胞由本实验室前期保存。所有动物实验的进行均遵守湖北工业大学科研伦理与科技安全委员会的相关规定(批准号：HBUT20200021)。

1.1.2 试剂及仪器

胰酶购自 Gibco 公司；D-荧光素钾盐购自上海碧云天生物技术有限公司；胎牛血清购自四季青公司；Premix Ex Taq (Probe)购自东洋纺(上海)生物科技有限公司；RNA simple 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；FastPure Plasmid Mini Kit、反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；

HRP-Goat Anti-Mouse IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司; GM-CSF 单克隆抗体、生物素标记的 GM-CSF 单克隆抗体及 Streptavidin-HRP 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS)、DMEM/F12 培养基由本实验室自配; OH2 及 oHSV2-Fluc 由本实验室构建。

二氧化碳培养箱购自松下电器(中国)有限公司; 小动物活体成像系统购自珀金埃尔默股份有限公司; 生物安全柜购自海尔集团公司; 多功能酶标仪、高速冷冻离心机购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 常温冰箱及 -80 °C 低温冰箱均购自海尔集团公司; 荧光定量 PCR 仪购自鲲鹏基因(北京)科技有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

CT26 细胞由本实验室前期保存, 细胞培养基为 DMEM/F12 (含 10% 胎牛血清), 将细胞培养于含 5% CO₂、37 °C 的二氧化碳培养箱中。在显微镜下观察细胞, 当细胞汇合度达到 80%–90% 时对细胞用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 动物模型建立

将购自湖北省实验动物研究中心的 BALB/c 雌性小鼠饲养于无致病原的动物实验室内。在饲养 1 周后于小鼠背部右侧皮下植瘤: 取生长状态良好的 CT26 细胞, 使用 0.25% 胰酶消化后制成单细胞悬液, 用 DMEM/F12 把细胞密度调整为 1×10⁷/mL, 每只小鼠皮下注射 100 μL。植瘤后观察肿瘤生长状况, 待肿瘤体积达到约

100 mm³ 时将小鼠分笼。

1.2.3 小鼠给药及量瘤

将 56 只小鼠分为 4 组(表 1)。为各组小鼠瘤内注射 100 μL 不同浓度(1×10⁷ CCID₅₀/mL、1×10⁸ CCID₅₀/mL)的 OH2 及 1×10⁷ CCID₅₀/mL 的 oHSV2-Fluc。对照组(Control)瘤内注射 PBS 100 μL。将首次给药时间记为 0 d, 于第 0、3、6 天对小鼠进行瘤内给药。从 0 d 开始量瘤, 每 3 天进行一次, 肿瘤体积(mm³)=长×宽²×0.5。

1.2.4 oHSV2-Fluc 在注射部位持续时间的检测

oHSV2 所携带的外源基因 Fluc 能够在小鼠皮下表达。在第 0、1、5、8、11、18 天对持续时间组及对照组小鼠使用小动物活体成像仪拍照, 每次取 3 只小鼠, 麻醉前对小鼠腹腔注射 D-荧光素钾盐 100 μL, 注射(15±2) min 后对小鼠进行拍照。

1.2.5 OH2 在肿瘤注射部位的复制水平

对首次给药后第 7、9 天的小鼠进行剥瘤, -80 °C 保存。使用分析天平称取 50 mg 样本用于提取总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 进行逆转录反应, 对逆转录产物采用 qPCR 进行定量。根据 OH2 的包膜糖蛋白 gD 设计 qPCR 引物及探针为: 上游引物: 5'-CCGCTTTATCCC CGAAAAC-3'; 下游引物: 5'-TGCCACCCGGC GATT-3'; 探针: 5'-AGCGCACCGTCGCCCT ATACAGC-3'。以 pHG52- d34.5-CMV-gD 质粒作为标准品, 建立标准曲线。qPCR 反应中每个样本进行 3 次技术重复, 依据标准曲线计算出相应样本的拷贝数。

表 1 给药分组方案

Table 1 Dose grouping scheme

Group	Type of administration	Dosage (100 μL/piece)	Number of animals
High-dose group	OH2	1×10 ⁸ CCID ₅₀ /mL	20
Low-dose group	OH2	1×10 ⁷ CCID ₅₀ /mL	20
Duration group	oHSV2-Fluc	1×10 ⁷ CCID ₅₀ /mL	6
Control	PBS	100 μL	10

1.2.6 OH2 注射后小鼠体内 hGM-CSF 水平的检测

对首次给药后第 14、28 天的小鼠进行眼眶采血，血样本离心后取血清，存放于-80 °C 低温冰箱中。检测 hGM-CSF 水平采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)：使用 GM-CSF 单克隆抗体为一抗包被酶标板；封闭液封闭后，将血清样本用稀释液 1:50 稀释；同时用稀释液稀释标准品，标准品初始浓度为 300 pg/mL，通过 2 倍倍比稀释，得到 5 个浓度梯度的标准品；设置阴性对照(稀释液)，将待检样品与标准品加入酶标板中，于 37 °C 孵育 1 h；洗板后，加入生物素标记的 GM-CSF 单克隆抗体，37 °C 孵育 1 h；将 Streptavidin-HRP 以 1:1 000 进行稀释后，加入酶标板中，37 °C 孵育 30 min；洗板后加入显色剂显色，终止显色后用酶标仪于 450 nm 波长下测量吸光度。

1.2.7 OH2 注射后小鼠体内 HSV-2 抗体水平检测

检测 HSV2 抗体水平采用 ELISA 法：对包被了检测 HSV2 抗体的一抗的酶标板使用封闭

液封闭，将血清样本用稀释液以 1:100 进行梯度稀释，共 8 个稀释度，加入酶标板中孵育；洗板后，加入用稀释液 1:20 000 稀释的二抗辣根过氧化物酶-山羊抗小鼠 IgG [HRP(horseradish peroxidase)-goat anti-mouse IgG]；于 37 °C 孵育 30 min，再加入显色剂显色，终止显色后用酶标仪于 450 nm 波长下测量吸光度(图 1)。

1.3 统计学处理

数据统计采用 Graph Pad Prism 9 软件进行处理，数据以平均值±标准差表示。两组组间差异性采用独立样本 *t*-test 分析，以 *P*<0.05 表示差异有显著性，*P*<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 OH2 在荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤效果

在首次给药后的第 15 天，对照组小鼠平均肿瘤体积为(1 986.78±1 081.53) mm³，oHSV2 高剂量组平均肿瘤体积为(184.53±308.27) mm³，oHSV2 低剂量组平均肿瘤体积为(568.53±516.36) mm³，其中对照组与 oHSV2 高剂量组存在极显著性差异(*P*<0.01)，实验结果如图 2 所示。

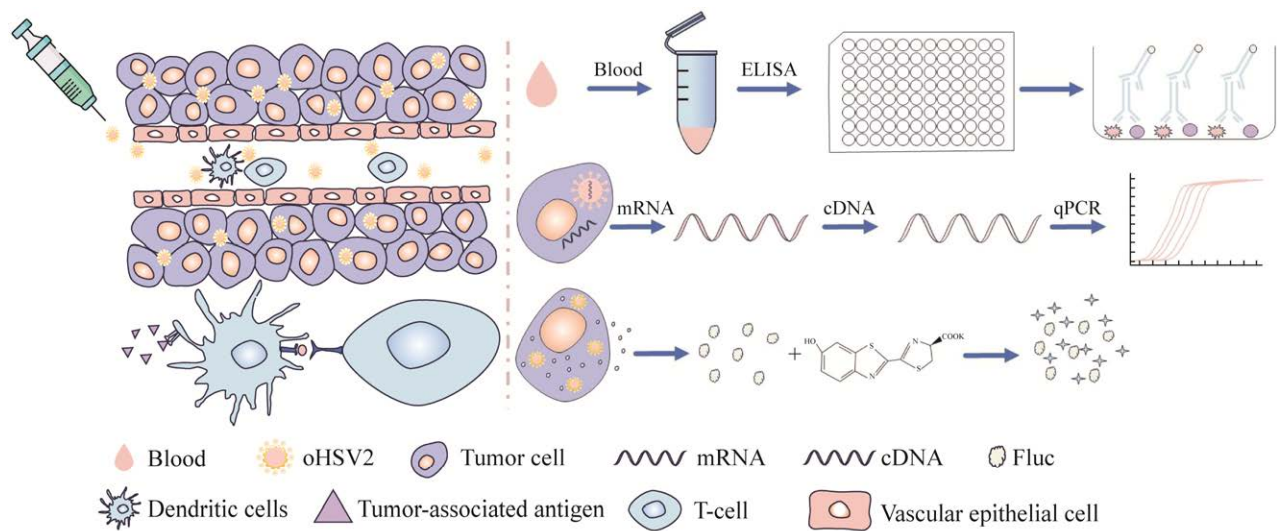


图 1 oHSV2 在肿瘤中复制及表达的检测方法

Figure 1 Detection of oHSV2 replication and expression in tumors.

2.2 oHSV2-Fluc 的瘤内持续时间的检测

通过小动物活体成像仪对不同时间段 oHSV2 携带的 Fluc 在小鼠瘤内的表达进行检测, 结果如图 3 所示。结果表明在进行瘤内注射 oHSV2-Fluc 后, Fluc 基因能够在瘤内表达。检测到的荧光强度随着时间增长而降低,

到第 18 天时荧光强度已低于检测限, 同时对对照组均未检测到荧光。

2.3 OH2 在肿瘤注射部位的复制

qPCR 结果显示, 在给药后第 7 天均能检测到 OH2 的基因, 且对照组未检测出, 其中高、低剂量组 OH2 mRNA 表达水平分别为

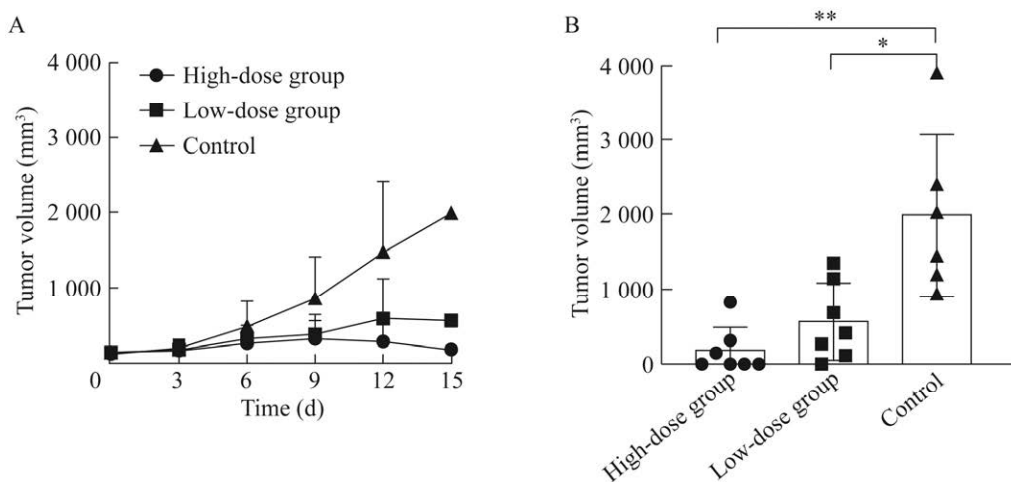


图 2 BALB/c 小鼠肿瘤体积大小 A: 肿瘤体积随时间的变化. B: 第 15 天肿瘤体积

Figure 2 Tumor size in BALB/c mice. A: Changes in tumor volume over time. B: Tumor volume on day 15. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

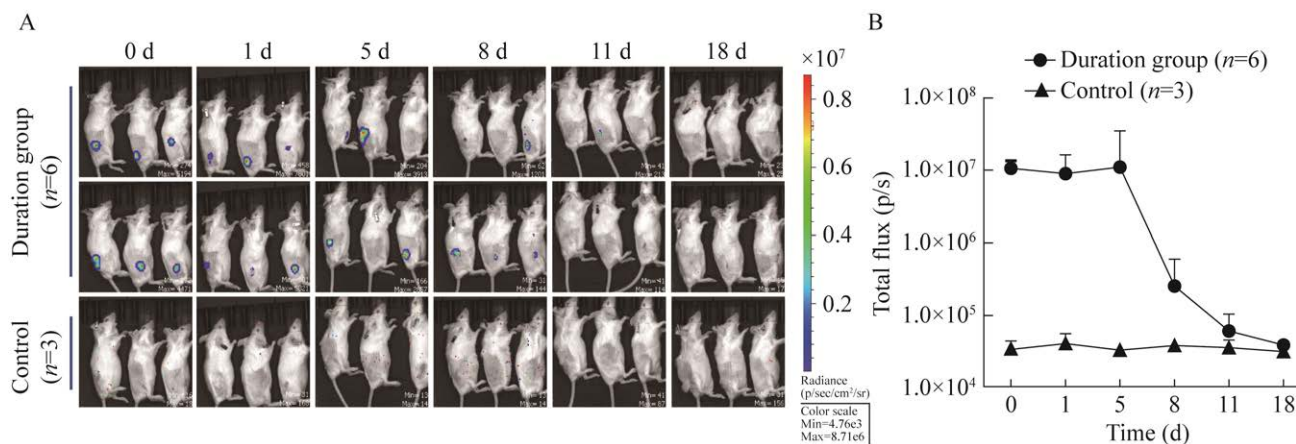


图 3 小鼠瘤内所表达 Fluc 的信号强度 A: 小动物活体成像仪所拍摄的小鼠瘤内 Fluc 表达状况. B: 小鼠瘤内 Fluc 表达荧光信号强度的变化

Figure 3 The signal intensity of Fluc expressed in mouse tumor. A: The expression of Fluc in mouse tumor captured by small animal imaging apparatus. B: The change of Fluc expression intensity in mice tumor.

(779.44±151.75) copies/μg total RNA 、(160.51±56.23) copies/μg total RNA。给药后第 9 天,高剂量组 OH2 仍能检出,其表达水平为(142.03±10.05) copies/μg total RNA,低剂量组与对照组未检测出 OH2 mRNA 的表达(图 4)。

2.4 OH2 瘤内注射后 hGM-CSF 水平的检测

对第 14 天及 28 天小鼠血清中 hGM-CSF 水平进行酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测。实验结果显示,第 14 天时,高、低剂量组小鼠血清中 hGM-CSF 与对照组小鼠血清相比显著提高,且存在极显著性差异($P<0.01$)。第 28 天检测结果表明,高、低剂量组小鼠血清中 hGM-CSF 仍高于对照组,但无显著性差异,结果如图 5 所示。

2.5 OH2 瘤内注射后 HSV-2 抗体水平的检测

对第 14、28 天小鼠血清中 HSV2 抗体水平进行 ELISA 检测。实验结果表明,与对照组相比,低剂量组与高剂量组 HSV2 抗体水平显著提高,且均存在显著性差异($P<0.05$),结果如图 6 所示。

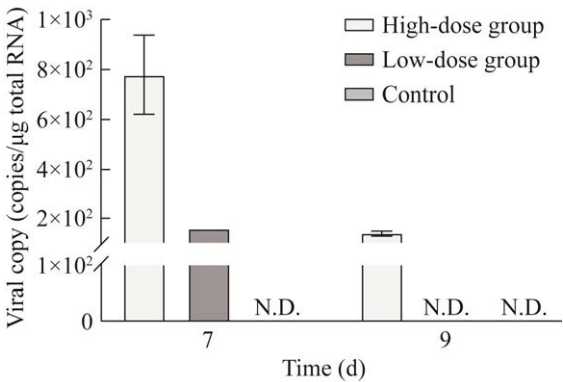


图 4 qPCR 检测肿瘤中 OH2 拷贝数随时间的变化
Figure 4 The number of OH2 copies in tumor over time was detected using qPCR. N.D.: Not detected.

3 讨论与结论

目前,肿瘤的治疗方式仍是集中在手术治疗、化学治疗和放射治疗^[29],由于生物技术手段的不断发展,越来越多新颖的治疗方式出现,如 CAR-T、免疫检查点抑制剂、溶瘤病毒等。而这些新方法还需要更多的临床试验和验证,才能更好地应用于癌症治疗。溶瘤病毒

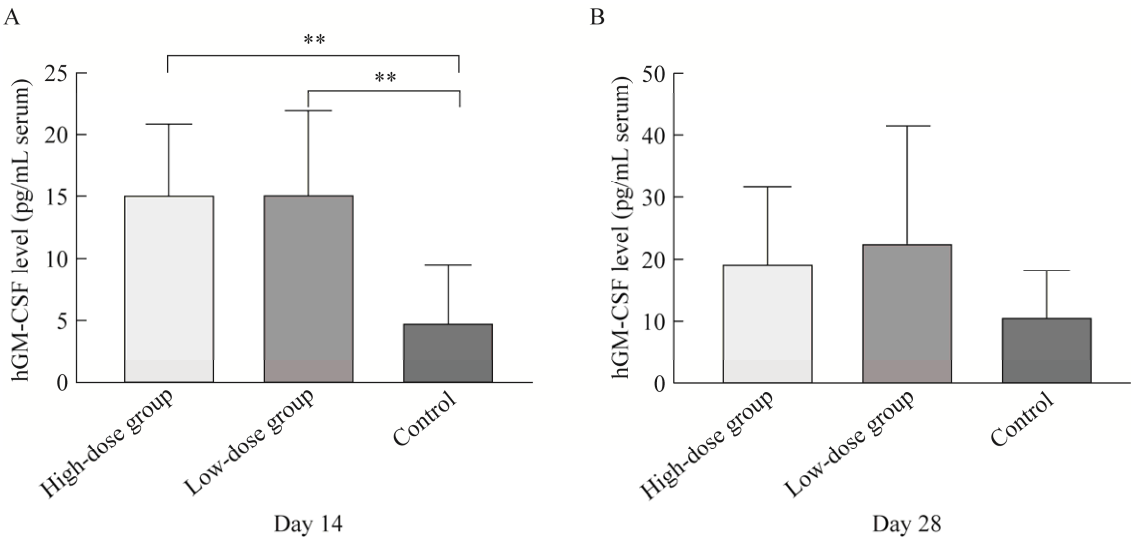


图 5 血清中 hGM-CSF 水平 A: 第 14 天 hGM-CSF 水平. B: 第 28 天 hGM-CSF 水平
Figure 5 The serum levels of hGM-CSF. A: hGM-CSF level on day 14. B: hGM-CSF level on day 28. **: $P<0.01$.

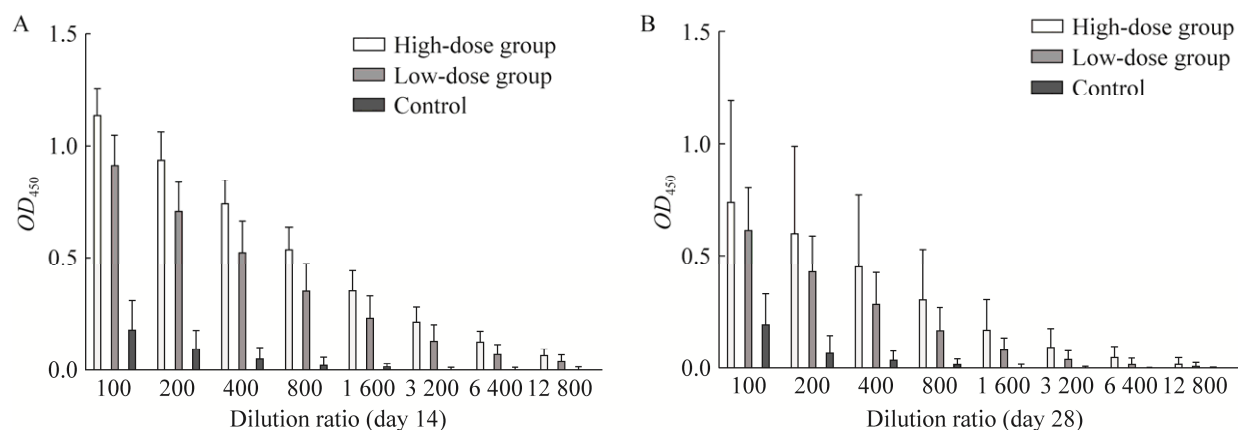


图6 血清中 HSV-2 抗体水平 A: 第 14 天 HSV-2 抗体水平. B: 第 28 天 HSV-2 抗体水平

Figure 6 The serum levels of HSV-2 antibody. A: HSV-2 antibody level on day 14. B: HSV-2 antibody level on day 28.

可以在肿瘤细胞内大量复制并最终摧毁肿瘤细胞, 改变肿瘤微环境, 激发免疫反应, 吸引更多的免疫细胞继续杀死残余的肿瘤细胞^[30]。随着溶瘤病毒被多个国家的监管部门批准用于癌症的治疗, 越来越多的癌症患者也因此受益, 这也加速了溶瘤病毒的研究进程。

随着 oHSV2 在临床治疗中不断展现出的积极效果, 作为一种有前途的溶瘤治疗产品, 目前已有 oHSV2 进入 III 期临床, 用于治疗黑色素瘤。然而, oHSV2 还面临着一些挑战和问题, 需要更多的临床前和临床数据来支持其安全性和有效性。为了深入探讨 oHSV2 给药方法的合理性、可行性, 提高 oHSV2 的临床效果, 本研究对 oHSV2 在肿瘤注射部位的持续时间、复制水平、hGM-CSF 表达水平以及 HSV-2 抗体水平进行考察。实验结果表明: 瘤内注射 OH2 的小鼠肿瘤体积明显小于对照组, 显示出积极的抗肿瘤效果; 对肿瘤注射部位的 OH2 进行 qPCR 检测以及通过活体成像仪对 oHSV2-Fluc 在肿瘤部位的持续时间进行检测, 发现 oHSV2 能够在肿瘤中复制且对肿瘤具有持久的杀伤作用; 对给药后的小鼠进行

眼眶采血, 通过 ELISA 对小鼠血清中 hGM-CSF 检测, 结果显示 OH2 能够持续表达 hGM-CSF, 反映出其能够活化肿瘤微环境, 增强抗肿瘤能力。通过 ELISA 对小鼠血清中 HSV-2 抗体水平进行检测, 结果表明给药后能够激活机体对 oHSV2 的抗体中和作用, 验证了免疫系统对机体具备保护作用, 表明 oHSV2 具备一定的安全保障。

确定溶瘤病毒在肿瘤中的持续作用时间及插入基因的持久性对于指导溶瘤病毒的临床应用是至关重要的。OncoVEX^{GM-CSF} 是一款以 HSV1 为骨架的溶瘤病毒, 其 I 期临床结果发现在单剂量阶段, 2 名患者的肿瘤表面在 3 周后能检测到低水平的病毒存在, 这表明在多剂量应用时, 间隔 2-3 周给药是合理的^[31]。插入外源基因的表达对于肿瘤治疗有着积极的影响^[32], hIL-7/mIL-12-VV 是一种能够表达 hIL-7 和 mIL-12 的溶瘤痘病毒, 除了病毒本身的溶瘤效果外, 还可以通过释放 hIL-7 和 mIL-12 改变肿瘤微环境中的免疫状态, 增强了注射和非注射远端肿瘤的免疫应答, 并使免疫原性差的肿瘤对免疫检查点抑制剂敏感^[33]。使溶瘤病毒只

在肿瘤中复制而不影响其他正常组织,能够显著降低副作用对患者的损害^[34]。肿瘤细胞的一个局限性是它们的抗病毒反应途径存在缺陷^[35],这种缺陷使它们更容易受到溶瘤病毒的影响,实现肿瘤细胞特异性感染, oHSV2 就是通过敲除 ICP34.5 使之能够在干扰素缺陷的肿瘤细胞中正常复制。从生物安全角度来看,当病毒入侵人体后,机体会产生抗病毒免疫反应^[36],所产生的抗体可以降低病毒在正常组织中的复制,确保溶瘤病毒的安全性。在 OH2 临床试验中^[27],26 例血清中 HSV2 抗体阴性的患者经过 OH2 治疗后全部转为阳性,而临床结果表明 HSV 抗体的产生与肿瘤治疗间未发现关联,这表明 OH2 是一款安全且抗肿瘤功能强大的溶瘤病毒。

总之,本研究证明 oHSV2 是一种能够持久表达且安全有效的溶瘤病毒产品。未来,将积极探索溶瘤病毒给药途径和给药方式,降低溶瘤病毒免疫原性^[37],提高溶瘤病毒的肿瘤靶向性^[38],如通过脂质体封装病毒核酸经静脉给药来治疗给药困难的肿瘤,增加患者的治疗选择。

REFERENCES

- [1] XIA CF, DONG XS, LI H, CAO MM, SUN DQ, HE SY, YANG F, YAN XX, ZHANG SL, LI N, CHEN WQ. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chinese Medical Journal, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] VERKUIJL SJ, JONKER JE, TRZPIS M, BURGERHOF JGM, BROENS PMA, FURNÉE EJB. Functional outcomes of surgery for colon cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. European Journal of Surgical Oncology, 2021, 47(5): 960-969.
- [3] RALLIS KS, YAU THL, SIDERIS M. Chemoradiotherapy in cancer treatment: rationale and clinical applications[J]. Anticancer Research, 2021, 41(1): 1-7.
- [4] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18(3): 197-218.
- [5] KRAEHEBUEHL L, WENG CH, EGHBALI S, WOLCHOK JD, MERGHOUB T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2022, 19(1): 37-50.
- [6] SPOLSKI R, LI P, LEONARD WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy[J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(10): 648-659.
- [7] HERNANDEZ R, PÖDER J, LaPORTE KM, MALEK TR. Engineering IL-2 for immunotherapy of autoimmunity and cancer[J]. Nature Reviews Immunology, 2022, 22(10): 614-628.
- [8] KAMADA T, TOGASHI Y, TAY C, HA D, SASAKI A, NAKAMURA Y, SATO E, FUKUOKA S, TADA Y, TANAKA A, MORIKAWA H, KAWAZOE A, KINOSHITA T, SHITARA K, SAKAGUCHI S, NISHIKAWA H. PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(20): 9999-10008.
- [9] SCHUBERT ML, SCHMITT M, WANG L, RAMOS CA, JORDAN K, MÜLLER-TIDOW C, DREGER P. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy[J]. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology, 2021, 32(1): 34-48.
- [10] ŠPANIELOVÁ H, BRDIČKA R. Oncolytic viruses and cancer treatment[J]. Klinická Onkologie, 2023, 36(1): 12-27.
- [11] YE K, LI F, WANG RK, CEN TY, LIU SY, ZHAO ZQ, LI RN, XU LL, ZHANG GM, XU ZY, DENG L, LI LL, WANG W, STEPANOV A, WAN YJ, GUO Y, LI YK, WANG Y, TIAN YJ, GABIBOV AG, et al. An armed oncolytic virus enhances the efficacy of tumor-infiltrating lymphocyte therapy by converting tumors to artificial antigen-presenting cells *in situ*[J]. Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2022, 30(12): 3658-3676.
- [12] MOHR P, HAFERKAMP S, PINTER A, WEISHAUPT C, HUBER MA, DOWNEY G, ÖHRLING K, LOQUAI C, LOUIE KS. Real-world use of talimogene laherparepvec in German patients with stage IIIB to IVM1a melanoma: a retrospective chart review and

- physician survey[J]. *Advances in Therapy*, 2019, 36(1): 101-117.
- [13] FRAMPTON JE. Teserpaturev/G47Δ: first approval[J]. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 2022, 36(5): 667-672.
- [14] NAKATAKE R, KAIBORI M, NAKAMURA Y, TANAKA Y, MATUSHIMA H, OKUMURA T, MURAKAMI T, INO Y, TODO T, KON M. Third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver tumors in mice[J]. *Cancer Science*, 2018, 109(3): 600-610.
- [15] de CLERCQ E. Selective anti-herpesvirus agents[J]. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 2013, 23(3): 93-101.
- [16] 施桂兰, 庄秀芬, 韩香萍, 李洁, 张郁, 张叔人, 刘滨磊. 新型溶瘤病毒 oHSV2hGM-CSF 的构建及其抗肿瘤作用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34(2): 89-95.
- SHI GL, ZHUANG XF, HAN XP, LI J, ZHANG Y, ZHANG SR, LIU BL. Construction of a novel oncolytic virus oHSV2hGM-CSF and its antitumor effect[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2012, 34(2): 89-95 (in Chinese).
- [17] LIU BL, ROBINSON M, HAN ZQ, BRANSTON RH, ENGLISH C, REAY P, McGRATH Y, THOMAS SK, THORNTON M, BULLOCK P, LOVE CA, COFFIN RS. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties[J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(4): 292-303.
- [18] CHENG JT, WANG YY, ZHU LZ, ZHANG Y, CAI WQ, HAN ZW, ZHOU Y, WANG XW, PENG XC, XIANG Y, YANG HY, CUI SZ, MA ZW, LIU BR, XIN HW. Novel transcription regulatory sequences and factors of the immune evasion protein ICP47 (US12) of herpes simplex viruses[J]. *Virology Journal*, 2020, 17: 1-11.
- [19] HU H, ZHANG SQ, CAI LK, DUAN HX, LI YY, YANG JH, WANG Y, LIU B, DONG S, FANG ZZ, LIU BL. A novel cocktail therapy based on quintuplet combination of oncolytic herpes simplex virus-2 vectors armed with interleukin-12, interleukin-15, GM-CSF, PD1v, and IL-7×CCL19 results in enhanced antitumor efficacy[J]. *Virology Journal*, 2022, 19(1): 1-12.
- [20] GHOSE J, DONA A, MURTADHA M, GUNES EG, CASERTA E, YOO JY, RUSSELL L, JAIME-RAMIREZ AC, BARWICK BG, GUPTA VA, SANCHEZ JF, SBOROV DW, ROSEN ST, KRISHNAN A, BOISE LH, KAUR B, HOFMEISTER CC, PICHIORRI F. Oncolytic herpes simplex virus infects myeloma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 2021, 20: 519-531.
- [21] SGUBIN D, WAKIMOTO H, KANAI R, RABKIN SD, MARTUZA RL. Oncolytic herpes simplex virus counteracts the hypoxia-induced modulation of glioblastoma stem-like cells[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012, 1(4): 322-332.
- [22] ZHANG W, HU X, LIANG J, ZHU YJ, ZENG BB, FENG L, ZHAO CY, LIU SM, LIU BL, ZHANG KT. oHSV2 can target murine colon carcinoma by altering the immune status of the tumor microenvironment and inducing antitumor immunity[J]. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 2020, 16: 158-171.
- [23] ZHANG W, WANG FF, HU X, LIANG J, LIU BL, GUAN Q, LIU SM. Inhibition of colorectal cancer liver metastasis in BALB/c mice following intratumoral injection of oncolytic herpes simplex virus type 2 for the induction of specific antitumor immunity[J]. *Oncology Letters*, 2018: 815-822.
- [24] YIN L, ZHAO CH, HAN JX, LI ZJ, ZHEN YN, XIAO RX, XU ZF, SUN YL. Antitumor effects of oncolytic herpes simplex virus type 2 against colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2017, 13: 117-130.
- [25] KONG DF, YANG ZR, LI GL, WU QY, GU ZR, WAN D, ZHANG Q, ZHANG XL, CHENG SJ, LIU BL, ZHANG KT, ZHANG W. SIRPα antibody combined with oncolytic virus OH2 protects against tumours by activating innate immunity and reprogramming the tumour immune microenvironment[J]. *BMC Medicine*, 2022, 20: 376.
- [26] WU QY, HU X, ZHANG XL, KONG DF, YANG ZR, LI GL, GU ZR, ZHANG Q, WAN D, CHENG SJ, LIU BL, ZHANG KT, ZHANG W. Single-cell transcriptomics of peripheral blood reveals anti-tumor systemic immunity induced by oncolytic virotherapy[J]. *Theranostics*, 2022, 12(17): 7371-7389.
- [27] WANG Y, ZHOU XB, WU Z, HU H, JIN J, HU YP, DONG YT, ZOU JW, MAO ZY, SHI XT, HUO Y, LYU JJ, FANG ZZ, ZHANG W, ZHU YJ, LI B, LIU BL. Preclinical safety evaluation of oncolytic herpes simplex virus type 2[J]. *Human Gene Therapy*, 2019, 30(5): 651-660.
- [28] ZHANG B, HUANG J, TANG JL, HU S, LUO SX, LUO ZG, ZHOU FX, TAN SY, YING JE, CHANG Q, ZHANG R, GENG CY, WU DW, GU XY, LIU BL. Intratumoral OH2, an oncolytic herpes simplex virus 2,

- in patients with advanced solid tumors: a multicenter, phase I/II clinical trial[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(4): e002224.
- [29] WATANABE M, OTAKE R, KOZUKI R, TOIHATA T, TAKAHASHI K, OKAMURA A, IMAMURA Y. Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer[J]. *Surgery Today*, 2020, 50(1): 12-20.
- [30] HUANG ZJ, GUO HE, LIN L, LI SX, YANG Y, HAN YY, HUANG WW, YANG JL. Application of oncolytic virus in tumor therapy[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(4): e28729.
- [31] KAUFMAN HL, BINES SD. OPTIM trial: a phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma[J]. *Future Oncology* (London, England), 2010, 6(6): 941-949.
- [32] YANG LD, GU X, YU J, GE SF, FAN XQ. Oncolytic virotherapy: from bench to bedside[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 790150.
- [33] NAKAO S, ARAI Y, TASAKI M, YAMASHITA M, MURAKAMI R, KAWASE T, AMINO N, NAKATAKE M, KUROSAKI H, MORI M, TAKEUCHI M, NAKAMURA T. Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(526): eaax7992.
- [34] KAUFMAN HL, KOHLHAPP FJ, ZLOZA A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(9): 642-662.
- [35] VITIELLO GAF, FERREIRA WAS, CORDEIRO de LIMA VC, da SILVA MEDINA T. Antiviral responses in cancer: boosting antitumor immunity through activation of interferon pathway in the tumor microenvironment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 782852.
- [36] GOMES T, TEICHMANN SA. An antiviral response beyond immune cells[J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 206-207.
- [37] LI LZ, LIU SX, HAN DD, TANG B, MA J. Delivery and biosafety of oncolytic virotherapy[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 475.
- [38] ZHANG B, CHENG P. Improving antitumor efficacy via combinatorial regimens of oncolytic virotherapy[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 1-16.

(本文责编 陈宏宇)