溶瘤痘苗病毒对肿瘤细胞作用机制的研究进展

贾晓渊^{1*}, 郭彦孜²

1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018;

2. 陕西中医药大学第二附属医院, 咸阳 712000

* 联系人, E-mail: xyjia@zstu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-30; 接受日期: 2017-02-22; 网络版发表日期: 2017-03-15

国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省高校生物学重中之重(一级)学科优秀青年人才培养基金(批准号: 2014C07)资助

摘要 溶瘤病毒治疗,是指利用具有复制能力的病毒选择性地感染和摧毁癌细胞,而对正常细胞或组织影响很少甚至没有影响的一种癌症治疗方法。痘苗病毒在肿瘤的基因治疗应用研究中以其独特的优势而备受关注。痘苗病毒感染细胞后具有产生病毒颗粒快、宿主范围广、基因组容量大、安全性高、传播高效等优点。尤为重要的是,基于溶瘤痘苗病毒的天然特性或遗传工程的改造,溶瘤痘苗病毒可以选择性地在肿瘤细胞中复制并对其产生杀伤效果。痘苗溶瘤病毒引起肿瘤细胞裂解和死亡是由多种不同的机制引起的。本文就近年来溶瘤痘苗病毒对细胞作用机制和相关信号通路的影响作一简要综述。

关键词 溶瘤痘苗病毒, 肿瘤细胞, 细胞信号途径

溶瘤病毒治疗,是指利用具有复制能力的病毒选择性地感染和摧毁癌细胞,而对正常细胞或组织影响很少甚至没有影响的一种癌症治疗方法。当前,对癌症的标准治疗方法包括外科手术(如果肿瘤可以切除)、放疗、化疗、温热疗法,以及生物/免疫治疗。尽管现有的治疗手段可以延长癌症患者的生存率,一定的小儿癌症也被视为可以治愈的,但是对于许多常见的成人癌症,仍然基本上极难治愈。因此,对于多种癌症的治疗,需要更有效的靶向性治疗方法。溶瘤病毒由于其选择性地靶向癌细胞而不会对癌症病人引起严重的不良反应,因而成为临床治疗研究的一大热点^[1]。

目前,现有的已被测试的溶瘤病毒包括弹状病毒科(如水疱性口炎病毒、马拉巴病毒)、痘病毒科(如痘苗病毒、黏液瘤病毒)、腺病毒科(如5型腺病毒)、疱

疹病毒科(如单纯疱疹病毒)、小核糖核酸病毒科(如柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒)、呼肠孤病毒科(如呼肠孤病毒)以及副黏液病毒科(如麻疹病毒、新城疫病毒)。在这些候选病毒中,最理想的病毒最好具有明确的癌症特异性的细胞毒作用,能够和化疗、放疗、小分子细胞周期抑制剂等传统的治疗方法结合使用。在众多溶瘤病毒载体中,痘苗病毒具有其独特优势,如果利用溶瘤痘苗病毒表达外源基因,将提高这些病毒的肿瘤特异性和抗肿瘤效果^[1],因而得到了科学工作者的广泛关注。

1 痘苗病毒的生物学特性

痘苗病毒(vaccinia virus, VV)是痘病毒科(Poxviri-

引用格式: 贾晓渊, 郭彦孜. 溶瘤痘苗病毒对肿瘤细胞作用机制的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 414-422

Jia X Y, Guo Y Z. Advance on research of oncolytic vaccinia virus inhibits tumor cells. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 414-422, doi: 10.1360/N052016-00370

dae)正痘病毒属(*Orthopoxvirus*)的一类成员. 痘苗病毒有着非常久远的应用历史, 在人类消灭天花, 抗天花接种疫苗的过程中, 痘苗病毒起到了关键的作用. 虽然由于历史久远, 痘苗病毒的确切起源不是十分明确^[2], 作为被学者研究得最多的痘病毒家族中的成员, 痘苗病毒被广泛地研究和应用于制备疫苗及各种肿瘤的治疗中. 根据致病性、宿主范围等特点, 可以将痘苗病毒分为WR(Western reserve)株, Wyeth株, Copenhagen株, Lister株, Tian Tan株, IHD-W株, IHD-J株等^[2,3]. 作为双链DNA病毒, 痘苗病毒具有独特的生物学特点. (i) 与其他病毒相比, 痘苗病毒能够在细胞中快速复制并裂解细胞. 第一代病毒颗粒在感染细胞8 h后就能从细胞中释放出来, 在感染细胞48~72 h后就可摧毁细胞^[4]. (ii) 与其他DNA病毒不同的是, 在病毒进入细胞到子代病毒形成整个感染周期中, 痘苗病毒始终存在于细胞质中^[2], 因而, 病毒的DNA不会整合到宿主的基因组中^[4], 绝对不会诱发肿瘤. (iii) 与腺病毒不同的是, 痘苗病毒进入靶细胞不需要通过特定的细胞表面受体, 而是通过若干膜融合途径^[4], 因而, 几乎可以感染进入所有的细胞系^[2]. 而且, 相对于感染处于非分裂期/静息期的体细胞, 痘苗病毒更容易感染具有活跃细胞周期的癌细胞^[1], 对癌细胞有一定靶向性. (iv) 在病毒产生的几种病毒粒子中, 有胞外包膜病毒(extracellular enveloped virus, EEV)粒子, 因为将宿主细胞来源的补体调节蛋白整合到自身的包膜中, 从而能够抵制补体的作用, 远距离的传播并得以通过血流屏障^[5,6], 因此在肿瘤中病毒的传播是高效的^[4]. 可以利用静脉注射将病毒通过血流稳定有效地输送到转移瘤中^[7]. (v) 痘苗病毒具有较大的基因组, 可以容纳至少25 kb的外源基因, 而腺病毒、腺相关病毒或逆转录病毒外源基因的容纳量相对较小^[2,8]. 此外, 痘苗病毒颗粒比较稳定, 可以冻干, 以干粉形式储存, 因而易于运输和临床应用^[2]. 即使在特定的病人中如有因过度的病毒复制引起的不良事件或罕见的情况, 也可以通过几种已批准的或正进行后期临床实验的抗病毒制剂来控制^[4,9], 如利福平、甲红硫腺(isatin- β -thiosemicarbazone, IBT)、干扰素.

需要指出的是, 一些曾经接收过天花疫苗免疫的老年患者会对痘苗病毒产生免疫, 因而限制了痘苗病毒在这些病人中的复制和传播, 降低痘苗病毒的治疗

效果, 而那些未接收痘苗病毒免疫的年轻患者则不会出现该情况^[2].

2 痘苗病毒对肿瘤细胞的作用机制

哺乳动物细胞已经进化出了一定的机制来对抗病毒的感染. 在正常细胞中, 溶瘤病毒能够促发细胞的抗病毒反应, 该抗病毒反应包括产生抗病毒蛋白直接抵抗病毒, 与邻近细胞交流或启动凋亡程序, 进而延缓或终止了病毒的复制和子代病毒的产生. 在这一抗病毒反应过程中, 干扰素及其受体起到了关键性的作用, 对感染的细胞和周围的细胞生理特性进行重新编程, 例如, 进行细胞周期停滞, 提供抗血管生成信号, 促进凋亡, 抑制蛋白合成以及激活免疫系统^[10]. 与正常细胞不同的是, 肿瘤细胞通常会消除或失活某些关键的基因产物, 些基因产物一方面在控制细胞生长/死亡程序中起着决定性作用, 一方面起着帮助细胞抵制病毒感染的双重作用^[10]. 因而, 几乎所有的癌细胞通常不会产生正常的先天性抗病毒反应. 癌细胞在痘病毒黏附和进入后, 对痘病毒的感染和复制倾向于完全宽容的态度. 在肿瘤中这种对痘病毒复制的宽容性优惠扩张, 进一步提高了细胞的免疫反应, 不仅能够清除病毒, 还能够产生获得性抗肿瘤免疫反应, 调节未感染痘病毒的癌细胞消退^[1].

2.1 痘苗病毒对肿瘤细胞的趋向性

许多溶瘤病毒之所以对癌细胞具有趋向性, 是因为在这些细胞表面过度表达了病毒进入细胞所需的特定的细胞表面受体. 例如, Edmonston麻疹病毒和一些腺病毒能够以依赖受体密度的方式感染表达CD46的细胞. 溶瘤病毒对细胞的趋向性是受癌细胞内部异常的信号环境所调节^[1], 例如, 肿瘤细胞中凋亡途径被阻滞, 细胞周期调控异常, 免疫逃避等, 从而为痘苗病毒的复制提供有利条件. 在大部分的癌细胞中, EGFR(epidermal growth factor receptor)-Ras信号通路是激活的, 由于痘苗病毒的生长因子(vaccinia growth factor, VGF)基因能激活EGFR-Ras信号通路, 因而痘苗病毒在癌症的治疗中可以被广泛应用^[4].

目前, 为了进一步对减少病毒的毒力或提高病毒在肿瘤中的选择性复制能力, 许多科研工作者们已对痘苗病毒进行了多种改造. 在溶瘤病毒治疗的临床实

验中所使用的痘苗病毒, 多数是缺失了病毒胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的痘苗病毒(表1)^[1]。早在1985年Buller等人^[33]就发现, TK缺失的痘苗病毒在不分裂的细胞中高度弱化而在转化的细胞中却能够复制。TK是嘧啶合成途径中的关键酶, 在肿瘤细胞中TK的水平要高于正常细胞(包括处于正常细胞周期中的细胞)。TK缺失的痘苗病毒DNA的合成需要从具有高水平核苷酸池的肿瘤细胞中获取胸苷三磷酸(thymidine triphosphate, TTP), 因此, TK缺失的痘苗病毒能够选择性地快速分裂的肿瘤细胞中复制^[34]。目前, 临床上研究的最早及最广泛的痘苗病毒是JX-594, 该痘苗病毒属于Wyeth株, 缺失了TK区, 同时能够表达人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 即Onco^{Pox}-GM-CSF。Parato等人^[7]通过实验证明JX-594的复制与细胞的TK水平呈现明显的相关性, 用携带shRNA的慢病毒特异性地靶向TK区, 降低HeLa细胞的TK水平后, 能够有效地降低细胞中痘苗病毒的产生。vvDD是指经过改造同时缺失了TK和VGF的一类痘苗病毒。作为EGFR的配体, VGF在痘苗病毒感染的早期被表达和分泌, 能够激活EGFR途径, 刺激周围的静止期细胞的增殖, 因而能够明显地影响痘苗病毒在正常组织的传播。在删除TK区的基础上删除病毒的VGF区, 能进一步削弱病毒的毒力并减少痘苗病毒在静止期细胞中的复制^[19,35,36]。为了进一步降低痘苗病毒在正常细胞中的致病性, 发挥其选择性地在肿瘤细胞中的溶瘤作用, Hikichi等人^[32]构建了利用microRNA调节的痘苗病毒MRVV(miRNA-regulated vaccinia virus), 在病毒的B5R的3'非翻译区加入了let-7a miRNA的互补靶向序列。其作用原理是: 痘苗病毒的糖蛋白B5R参与病毒的形态发生, 运输和传播等过程, 删除了病毒糖蛋白B5R不仅会降低病毒的致病性还会削弱痘苗病毒的溶瘤活性。let-7a是一种miRNA, 与正常细胞相比, 许多癌细胞中let-7a的表达水平较低, 因而, 含有let-7a miRNA的互补靶向序列的MRVV能够在肿瘤中特异性复制而起到明显的肿瘤抑制作用, 而在正常细胞中不会产生毒性。此外, 痘苗病毒产生的B18R是一种免疫抑制蛋白, 可以与I型干扰素(interferons- I, IFN- I)结合, 阻滞IFN- I介导的抗病毒反应, 许多肿瘤细胞能够抵制I型干扰素的抗病毒影响, 而正常细胞由于有完整的依赖于IFN的抗病毒防御体系, 因而构建的TK⁻/B18R⁻/IFN⁺痘苗

病毒显示出在肿瘤细胞中具有高度的选择性复制能力^[4,22,25]。

2.2 痘苗病毒对肿瘤细胞信号通路的影响

痘苗病毒由于其天然的生物学特性或经遗传工程改造后, 可以选择性地在肿瘤细胞中复制并对其产生杀伤作用。痘苗病毒引起肿瘤细胞裂解和死亡是由多种不同的机制引起的。痘苗病毒感染后, 在肿瘤感染部位释放多种细胞危险信号(danger-associated molecular pattern molecules, DAMPs)、病毒危险信号(pathogen-associated molecular pattern molecules, PAMPs)以及与病毒和肿瘤相关的抗原, 从而引起免疫反应介导的细胞死亡。此外, 溶瘤痘苗病毒还能够引起肿瘤内血管萎陷(vascular collapse)摧毁非感染的肿瘤细胞。肿瘤细胞死亡的机制很可能因病毒的毒株不同和靶向的肿瘤细胞不同而不同, 但是又同时具有坏死和凋亡的特征^[4]。

(1) 细胞凋亡抑制途径能增加痘苗病毒的存活。许多病毒能够编码蛋白抑制凋亡从而延长被病毒感染细胞的存活, 以最大化地产生子代病毒^[37]。痘苗病毒能够编码SPI-2^[38], E3L基因产物^[39]和F1L^[40]蛋白从而抑制凋亡^[2]。痘苗病毒编码的双链RNA结合蛋白E3L能够阻止干扰素诱导产生的蛋白激酶PKR(protein kinase R)的激活, 而激活的PKR能够诱导HeLa细胞的凋亡^[39,41]。在细胞凋亡途径中, Bcl-2家族的蛋白起着非常重要的作用, 它可分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两类。其中, 抗凋亡蛋白包括Bcl-2和Bcl-xL, 促凋亡蛋白又可分为多功能域促凋亡蛋白(包括Bak和Bax)和促发Bak和Bax激活的BH3-only蛋白(包括Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa, Puma, Bmf和Hrk)。Taylor等人^[42]利用缺失了F1L蛋白的痘苗病毒Copenhagen株感染HeLa细胞后能够引起细胞凋亡。进一步研究表明, F1L蛋白能够通过BH3-only蛋白Bim相互作用而间接地抑制Bax的激活, 从而抑制细胞凋亡途径, 增加痘苗病毒的存活。

(2) 痘苗病毒的生长需要热休克蛋白的参与。病毒进入宿主细胞后, 病毒劫持宿主细胞的翻译系统选择性地产生大量的病毒蛋白。然而, 病毒缺少诸如热休克蛋白之类的分子伴侣来帮助自身蛋白质的折叠, 因而, 基本都需要依赖宿主细胞的分子伴侣来加工病毒蛋白。

在细胞受到环境压力, 生理条件改变或病毒感染

表 1 已发表文章中的痘苗病毒及其特征^{a)}

痘苗病毒backbone strain	痘苗病毒名称	特征
Wyeth 株	Pexa-Vec (JX-594)	TK 缺失, 插入 <i>GM-CSF</i> 和 <i>lacZ</i> 基因 ^[1]
	GL-ONC1 (GLV-1h68)	<i>F14.5L</i> 缺失 (插入 <i>Renilla luciferase-GFP</i> 基因), TK 缺失 (插入 <i>lac-Z</i> 基因), <i>A56R</i> 缺失 (插入 <i>gusA</i> 基因) ^[1,11]
	GLV-1h99	利用 GLV-1h68 表达 human norepinephrine transporter ^[1]
	GLV-1h108	利用 GLV-1h68 表达 anti-VEGF scAb (GLAF-1) ^[1]
	GLV-1h153	利用 GLV-1h68 表达 hNIS ^[1]
	GLV-1h210	利用 GLV-1h68 表达 hEPO ^[1]
	GLV-1h237	利用 GLV-1h68 表达 Cdc6 的 Walker A motif 突变体 ^[1]
	GLV-1h255	利用 GLV-1h68 表达 MMP-9 ^[1]
	GLV-1h285	<i>F14.5L</i> 缺失, TK 缺失, <i>A56R</i> 缺失; 插入 <i>Renilla luciferase-GFP</i> , <i>BMP-4</i> 和 <i>turboRFP</i> 基因 ^[1]
	GLV-1h324	利用 GLV-1h68 表达 melanin ^[1]
	GLV-5b451	利用 GLV-1h68 表达 anti-VEGF scAb (GLAF-2) ^[12,13]
Lister 株	GLV-1h282	将 GLV-1h68 的 <i>TK</i> 区中的 <i>lacZ</i> 基因替换为 PSE 启动子和 <i>anti-FAP scAb</i> (GLAF-5) ^[11]
	GLV-1h442	将 GLV-1h68 的 <i>TK</i> 区中的 <i>lacZ</i> 基因替换为 PSE 启动子和 <i>anti-EGFRVHHFLAG</i> ^[11]
	GLV-1h164	将 GLV-1h68 的 <i>TK</i> 区中的 <i>lacZ</i> 基因替换为 PSE 启动子和 <i>hNET</i> , 将 GLV-1h68 的 <i>A56R</i> 区中的 <i>gusA</i> 基因替换为 PSL 启动子和 <i>GLAF-2</i> ^[11]
	GLV-1h444	将 GLV-1h164 的 <i>TK</i> 区中的 <i>hNET</i> 替换为 <i>anti-EGFRVHHFLAG</i> ^[11]
	GLV-1h446	将 GLV-1h164 的 <i>TK</i> 区中的 <i>hNET</i> 替换为 <i>GLAF-5</i> ^[11]
	VV-mIL2	Attenuated strain, TK 缺失插入 <i>lacZ</i> 和 <i>mIL2</i> 基因 ^[14]
	VV-mIL12	Attenuated strain, TK 缺失插入 <i>lacZ</i> 和 <i>mIL12</i> 基因 ^[14]
	VVhEA	插入 <i>hEA</i> 基因 ^[15]
	VV-hup53	<i>MIL</i> 缺失, 插入 <i>lacZ</i> 和 human wt <i>p53</i> 基因 ^[16]
	VV-CTB::INS	插入 <i>CTB</i> 和 <i>INS</i> 基因 ^[17]
	VV-CTB::GAD	TK 缺失, 插入 <i>lacZ</i> , <i>CTB</i> 和 <i>GAD55</i> 基因 ^[17]
	VV-IL10	TK 缺失, 插入 <i>lacZ</i> , <i>IL10</i> 基因 ^[17,18]
	vvDD(vvDD-GFP)	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 <i>lacZ</i> , <i>EGFP</i> 基因 ^[1,19,20]
	vvDD-CD	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 <i>lacZ</i> , <i>cytosine deaminase</i> 基因 ^[20]
	vvDD-CDSR(JX-929)	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 <i>lacZ</i> , <i>cytosine deaminase</i> 和 <i>SR</i> 基因 ^[1,21]
	vvDD-A34R	利用 vvDD 表达 A34R K151E 突变体 ^[1]
	vvDD-SR-RFP	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 <i>RFP</i> 基因 ^[1]
Western Reserve 株	OVV-CXCR4-A-Fc	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 CXCR4 拮抗剂基因 ^[1]
	VV.mIFN β	TK 缺失, <i>B18R</i> 缺失; 插入 <i>firefly luciferase</i> 和 鼠 <i>IFNβ</i> ^[22]
	VV-SMAC	TK 缺失, 插入 <i>SMAC/DIABLO</i> 基因 ^[23]
	VV-TRAIL	TK 缺失, 插入 <i>TRAIL</i> 基因 ^[24]
	JX-795	TK 缺失, <i>B18R</i> 缺失, 插入 <i>IFN-β</i> 基因 ^[25]
	JX-963	TK 缺失, <i>VGF</i> 缺失; 插入 <i>GM-CSF</i> 基因 ^[26]
Copenhagen 株	VV(Cop) Δ FIL	<i>FIL</i> 缺失; 插入 <i>EGFP</i> ^[27]
	VV-FCU1	TK 缺失, 插入融合自杀基因 <i>FCU1</i> ^[28]
Tian Tan 株	VG9-GMCSF	TK 缺失, 插入 <i>GM-CSF</i> 基因 ^[29]
Modified Vaccinia virus ANKARA	MVA-5T4	插入 human oncofetal antigen 5T4 基因 ^[30,31]
LC16M 系列	MRVV	miRNA let-7a 调节的靶向 B5R 的 3' 非翻译区 ^[30,32]

a) A56R: the hemagglutinin gene, 血细胞凝集素基因; Renilla luciferase-GFP: 海肾萤光素酶-绿色荧光蛋白; hNET: human norepinephrine transporter, 人肾上腺素转运蛋白; hNIS: human sodium iodide symporter, 人钠碘转运体; hEPO: human erythropoietin, 人促红细胞生成素; Cdc6: 细胞分裂周期蛋白6; MMP-9: matrix metalloprotein-9, 基质金属蛋白酶9; BMP-4: bone morphogenetic protein-4, 骨形态发生蛋白4; CTB: cholera toxin B subunit, HYPERLINK "http://www.baidu.com/link?url=aoVko4TV6iTBTzshV23jvm6vCyaqyl_Lyf53WQHinf3sRGGIUp-PoIgDMi3CQnsd-bm9oDD6-8O4ssYB5k3n4q" "t" "_blank" 霍乱毒素B亚基; INS: pancreatic islet autoantigens proinsulin, 胰岛自身抗原胰岛素原; GAD55: 55-kD C-terminal peptide from glutamate decarboxylase, 来自于谷氨酸脱羧酶C末端的55KD肽; IL10: interleukin 10, 白细胞介素10; RFP: 红色荧光蛋白; SR: somatostatin receptor, 生长抑素受体; VEGF: vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子; FAP: fibroblast activation protein, 成纤维细胞激活蛋白; scAb: single-chain antibody, 单链抗体; GLAF-1: scAb targeting human and murine VEGF with FLAG tag cDNA; GLAF-2: scAb targeting human and murine VEGF without FLAG tag cDNA; GLAF-5: scAb targeting FAP; mIL2: mouse interleukin 2, 鼠白细胞介素2; mIL12: mouse interleukin 12, 鼠白细胞介素12; TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体; IFN-beta: interferon-beta, 干扰素 β ; hEA: human endostatin and angiostatin, 人血管抑素和内皮抑素; MVA: modified vaccinia Ankara, 改造的痘苗病毒 Ankara

染等压力条件下, 往往会产生诸如热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)之类的压力反应蛋白^[18]. Jindal和Young^[43]曾报道痘苗病毒感染后能够引起HSP90和HSP60 mRNA含量的少量增加, 以及HSP70 mRNA水平的大幅度增长. 随后研究表明, 在痘苗病毒感染后, HSP70主要的诱导形式, 72 kD的HSP, 有着显著增加^[44], 但是有研究表明, 痘苗病毒的复制并不依赖于72 kD的HSP的表达^[45]. 另一种细胞内重要的热休克蛋白HSP90, 其许多底物蛋白都参与了细胞信号传导, 细胞周期以及转录调节过程. 病毒的4a核心蛋白能够直接和HSP90作用, 利用HSP90的抑制剂GA(geldanamycin)作用后, 延迟了痘苗病毒DNA的复制, 干扰了病毒中期和晚期的基因转录, 因而, HSP90对于细胞内痘苗病毒的生长有着重要的作用^[46]. 此外, Filone等人^[47]的研究表明, 在痘苗病毒感染的过程中, 热休克反应的主要调节因子HSF1对痘苗病毒的感染起到了非常关键的作用. 激活HSF1有助于痘苗病毒感染, 而用RNAi的方法敲除HSF1或使用HSF1的小分子抑制剂能阻断痘苗病毒的感染. 这些都说明痘苗病毒的生长需要热休克蛋白.

(3) 痘苗病毒的成熟需要内质网相关信号的参与. 内质网是细胞质内最大的细胞器, 作为蛋白质折叠和转录后修饰的工厂, 内质网在病毒复制和成熟的过程中起到了重要的作用, 内质网也参与了痘苗病毒的组装^[48], 未成熟的痘苗病毒粒子膜(imature virion membranes)来源于内质网的修饰^[49]. 近年来研究表明, 病毒感染宿主细胞后, 大量病毒蛋白的产生能够引起宿主细胞的内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ER stress), 继而激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)以恢复细胞内环境的稳定. 如果内质网应激反应持续, UPR会引起细胞凋亡^[50]. UPR有3条信号通路分支, 分别由3种内质网驻膜蛋白所介导, 即IRE1(inositol-requiring protein 1), ATF6(activating transcription factor 6)和PERK(protein kinase RNA-like ER kinase). 在正常细胞中, 这3种重要的信号分子都能够与内质网主要分子伴侣BiP(binding immunoglobulin protein, 也被称为 glucose-regulated protein78, GRP78)的结合而处于非激活状态, 在细胞压力条件下, BiP与未折叠或错误折叠的蛋白质结合, 释放并激活IRE1, ATF6和PERK. 因而, BiP是UPR的主要调节因子. 在PERK分支通路中, 一旦PERK被激

活, 会进一步磷酸化(激活) eIF2 α . eIF2 α 为mRNA翻译起始的重要调节因子, 激活的eIF2 α 会抑制蛋白质的合成^[51,52].

细胞被病毒感染后, 往往会下调蛋白质的合成从而阻止病毒的复制. 例如, 病毒感染后, 病毒的dsRNA与PKR结合从而诱导PKR磷酸化(激活), 进一步磷酸化(激活)eIF2 α . 激活的eIF2 α 使得病毒或宿主的mRNA进入核糖体的过程受阻, 因而终止了翻译过程, 抑制了宿主和病毒蛋白质的合成^[53,54]. 痘苗病毒的K3L蛋白由于与eIF2 α 序列具有约28%的一致性, 因此会被eIF2 α 的激酶PKR(pancreatic eIF2 α kinase)当做底物从而抑制了PKR的活性, 阻止了eIF2 α 的磷酸化. 进一步研究显示, K3L也能抑制PERK(PKR-like ER kinase)的活性^[51,55]. 此外, 在RK13和HeLa细胞中, 痘苗病毒K1蛋白能够抑制病毒诱导的eIF2 α 的磷酸化和PKR的磷酸化^[56], 这些有利于蛋白质的重新合成.

鉴于eIF2 α 和PERK也参与了内质网应激过程, 以及内质网在蛋白质加工和细胞应激信号传递中的重要作用, 痘苗病毒对肿瘤细胞的作用很有可能与内质网应激及UPR所引起的细胞信号通路的改变相关. 本文作者利用TK缺失的溶瘤痘苗病毒, 研究了该病毒对肝癌细胞的作用, 确实发现溶瘤痘苗病毒VV-Onco对肝癌细胞有杀伤作用, 且该杀伤作用是通过引起内质网应激反应、诱导自噬产生和激活Wnt信号通路^[57].

(4) 痘苗病毒的复制与其他信号通路. Katsafanas和Moss^[58]的研究表明, 在人宫颈癌细胞HeLa中, 痘苗病毒基因组转录的过程中需要G3BP(ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein)和p137(cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1)的参与. 在人结肠癌细胞SW620和HCT116中, 加入细胞外信号调节激酶特异性抑制剂U0126后, 痘苗病毒JX-594的复制被抑制, 表明JX-594的复制依赖于EGFR/Ras/MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路^[7]. PI3K/Akt信号通路是细胞内重要的信号通路. 因对细胞生长、增殖和蛋白质翻译的调控, 故而对病毒的复制和繁殖起到了重要作用. 在使用PI3K/Akt通路抑制剂后, 导致感染了痘苗病毒的细胞凋亡增多, 病毒的产量下降. 因而, 痘苗病毒在宿主细胞中的复制需要激活PI3K/Akt信号通路^[59]. 此外, Silva等人^[60]发现, 痘苗病毒感染后能够通过MEK(mitogen-activated protein kinase/ERK(extracellular-signal-regulated kinase)

kinase)/ERK 信号途径刺激细胞产生表达 *egr-1* (early growth response 1) 基因, 对 MEK/ERK 信号途径抑制后, 痘苗病毒的产量明显下降.

综上所述, 痘苗病毒在感染肿瘤细胞后, 由于自身编码蛋白以及对宿主细胞的劫持, 对细胞内多个信号通路的相关分子产生了影响. 随着科技和实验方法的进步, 已有学者通过 RNA 测序和核糖体图谱的方法对痘病毒感染细胞后基因表达进行了测定, 使得对病毒中后期和晚期基因的表达有了前所未有的清晰和定量的了解^[61]. 鉴于痘苗病毒对肿瘤细胞的靶向作用, 很多学者构建了携带多种不同基因的痘苗病毒, 以期更好地靶向杀灭肿瘤细胞或调节机体免疫系统, 其中

一些已进入临床实验. 中国科学院上海生命科学研究生物化学与细胞生物研究所的刘新垣院士课题组, 开展了携带双基因的痘苗病毒抗肿瘤相关研究(也是全球唯一或极少的携带双基因的研究者). 尽管一些研究表明痘苗病毒具有较好的安全性, 但是一些毒力较强的菌株, 如 WR 株, 仍然可能会具有一定的致病性, 因而需要更为广泛的临床研究来确定其治疗的安全性. 对于一些携带外源基因的重组痘苗病毒, 还需要考虑这些基因产物的影响^[2]. 期待有更多的研究能够更系统地阐明痘苗病毒对肿瘤细胞的作用机制和细胞信号通路的影响, 为痘苗病毒的临床应用以及其他治疗方法的联合应用提供有利帮助.

参考文献

- 1 Chan W M, McFadden G. Oncolytic poxviruses. *Annu Rev Virol*, 2014, 1: 191–214
- 2 Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther*, 2005, 11: 180–195
- 3 王世兵, 陈侃, 孔祥东. 基于痘苗病毒载体的恶性肿瘤基因治疗研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36: 135–142
- 4 Kim D H, Thorne S H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 64–71
- 5 Vanderplasschen A, Mathew E, Hollinshead M, et al. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7544–7549
- 6 Smith G L, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2915–2931
- 7 Parato K A, Breitbach C J, Le Boeuf F, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*, 2012, 20: 749–758
- 8 Merchlinsky M, Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, 190: 522–526
- 9 De Clercq E. Historical perspectives in the development of antiviral agents against poxviruses. *Viruses*, 2010, 2: 1322–1339
- 10 Russell S J, Peng K W, Bell J C. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 658–670
- 11 Huang T, Wang H, Chen N G, et al. Expression of anti-VEGF antibody together with anti-EGFR or anti-FAP enhances tumor regression as a result of vaccinia virotherapy. *Mol Ther Oncolytics*, 2015, 2: 15003
- 12 Adelfinger M, Bessler S, Frentzen A, et al. Preclinical testing oncolytic vaccinia virus strain GLV-5b451 expressing an anti-VEGF single-chain antibody for canine cancer therapy. *Viruses*, 2015, 7: 4075–4092
- 13 Adelfinger M, Gentshev I, Grimm de Guibert J, et al. Evaluation of a new recombinant oncolytic vaccinia virus strain GLV-5b451 for feline mammary carcinoma therapy. *PLoS ONE*, 2014, 9: e104337
- 14 Chen B, Timiryasova T M, Haghighat P, et al. Low-dose vaccinia virus-mediated cytokine gene therapy of glioma. *J Immunother*, 2001, 24: 46–57
- 15 Tysome J R, Wang P, Alusi G, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to *dl* 1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 1101–1108
- 16 Timiryasova T M, Li J, Chen B, et al. Antitumor effect of vaccinia virus in glioma model. *Oncol Res*, 1999, 11: 133–144
- 17 Dénes B, Yu J, Fodor N, et al. Suppression of hyperglycemia in NOD mice after inoculation with recombinant vaccinia viruses. *Mol Biotechnol*, 2006, 34: 317–328
- 18 Chard L S, Maniati E, Wang P, et al. A vaccinia virus armed with interleukin-10 is a promising therapeutic agent for treatment of murine pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 405–416
- 19 McCart J A, Ward J M, Lee J, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res*, 2001, 61: 8751–8757

- 20 Chalikonda S, Kivlen M H, O'Malley M E, et al. Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15: 115–125
- 21 Zeh H J, Downs-Canner S, McCart J A, et al. First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: safety, systemic spread, and antitumor activity. *Mol Ther*, 2015, 23: 202–214
- 22 Wang L C S, Lynn R C, Cheng G, et al. Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFN β illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity. *Mol Ther*, 2012, 20: 736–748
- 23 Pan Q, Huang Y, Chen L, et al. SMAC-armed vaccinia virus induces both apoptosis and necroptosis and synergizes the efficiency of vinblastine in HCC. *Hum Cell*, 2014, 27: 162–171
- 24 Ziauddin M F, Guo Z S, O'Malley M E, et al. TRAIL gene-armed oncolytic poxvirus and oxaliplatin can work synergistically against colorectal cancer. *Gene Ther*, 2010, 17: 550–559
- 25 Kim D H, Wang Y, Le Boeuf F, et al. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med*, 2007, 4: e353
- 26 Thorne S H, Hwang T H H, O'Gorman W E, et al. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3350–3358
- 27 Wasilenko S T, Banadyga L, Bond D, et al. The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol*, 2005, 79: 14031–14043
- 28 Foloppe J, Kintz J, Futin N, et al. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther*, 2008, 15: 1361–1371
- 29 Deng L, Fan J, Guo M, et al. Oncolytic and immunologic cancer therapy with GM-CSF-armed vaccinia virus of Tian Tan strain Guang9. *Cancer Lett*, 2016, 372: 251–257
- 30 Kim M. Replicating poxviruses for human cancer therapy. *J Microbiol*, 2015, 53: 209–218
- 31 Mulryan K, Ryan M G, Myers K A, et al. Attenuated recombinant vaccinia virus expressing oncofetal antigen (tumor-associated antigen) 5T4 induces active therapy of established tumors. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1: 1129–1137
- 32 Hikichi M, Kidokoro M, Haraguchi T, et al. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Mol Ther*, 2011, 19: 1107–1115
- 33 Buller R M L, Smith G L, Cremer K, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, 1985, 317: 813–815
- 34 Puhlmann M, Brown C K, Gnant M, et al. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7: 66–73
- 35 Buller R M L, Chakrabarti S, Moss B, et al. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology*, 1988, 164: 182–192
- 36 Buller R M, Chakrabarti S, Cooper J A, et al. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol*, 1988, 62: 866–874
- 37 Young L S, Dawson C W, Eliopoulos A G. *Viruses and Apoptosis*. Berlin: Springer-Verlag, 2004. 577–628
- 38 Kettle S, Alcamí A, Khanna A, et al. Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1 β -converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 β -induced fever. *J Gen Virol*, 1997, 78: 677–685
- 39 Kibler K V, Shors T, Perkins K B, et al. Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in vaccinia virus-infected cells. *J Virol*, 1997, 71: 1992–2003
- 40 Wasilenko S T, Stewart T L, Meyers A F A, et al. Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14345–14350
- 41 Davies M V, Chang H W, Jacobs B L, et al. The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J Virol*, 1993, 67: 1688–1692
- 42 Taylor J M, Quilty D, Banadyga L, et al. The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Biol Chem*, 2006, 281: 39728–39739
- 43 Jindal S, Young R A. Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins. *J Virol*, 1992, 66: 5357–5362
- 44 Sedger L, Ruby J. Heat shock response to vaccinia virus infection. *J Virol*, 1994, 68: 4685
- 45 Sedger L, Ramshaw I, Condie A, et al. Vaccinia virus replication is independent of cellular HSP72 expression which is induced during virus infection. *Virology*, 1996, 225: 423–427
- 46 Mastrangelo M J, Maguire H C, Eisenlohr L C, et al. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther*, 1999, 6: 409–422

- 47 Filone C M, Caballero I S, Dower K, et al. The master regulator of the cellular stress response (HSF1) is critical for orthopoxvirus infection. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1003904
- 48 Risco C, Rodriguez J R, Lopez-Iglesias C, et al. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol*, 2002, 76: 1839–1855
- 49 Maruri-Avidal L, Weisberg A S, Bisht H, et al. Analysis of viral membranes formed in cells infected by a vaccinia virus L2-deletion mutant suggests their origin from the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 2013, 87: 1861–1871
- 50 Lu M, Lawrence D A, Marsters S, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*, 2014, 345: 98–101
- 51 Sen D, Balakrishnan B, Jayandharan G R. Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy. *Front Microbiol*, 2014, 5: 250
- 52 He B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 393–403
- 53 Rubartelli A, Lotze M T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 2007, 28: 429–436
- 54 Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 331–342
- 55 Sood R, Porter A C, Ma K, et al. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J*, 2000, 346: 281–293
- 56 Kass E, Schlom J, Thompson J, et al. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res*, 1999, 59: 676–683
- 57 Jia X, Chen Y, Zhao X, et al. Oncolytic vaccinia virus inhibits human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cell proliferation via endoplasmic reticulum stress, autophagy and Wnt pathways. *J Gene Med*, 2016, 18: 211–219
- 58 Katsafanas G C, Moss B. Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *J Biol Chem*, 2004, 279: 52210–52217
- 59 Soares J A P, Leite F G G, Andrade L G, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol*, 2009, 83: 6883–6899
- 60 Silva P N G, Soares J A P, Brasil B S A F, et al. Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J*, 2006, 398: 83–95
- 61 Yang Z, Cao S, Martens C A, et al. Deciphering poxvirus gene expression by RNA sequencing and ribosome profiling. *J Virol*, 2015, 89: 6874–6886

Advance on research of oncolytic vaccinia virus inhibits tumor cells

JIA XiaoYuan¹ & GUO YanZi²

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

2 The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xian'yang 712000, China

Oncolytic viruses are therapeutically useful anticancer viruses that will selectively infect and damage cancerous tissues with less (or without) causing harm to normal tissues. Several unique features of vaccinia virus make it an excellent choice as a gene delivery vehicle *in vivo*. Advantages of vaccinia virus include rapidly production of viral particles, widely host range, large capacity for foreign DNA accommodation, safety in human and highly efficient at spreading after infection. Oncolytic vaccine virus can selectively replicate within and lyse cancer cells, both based on their natural biology and through genetic engineering. Oncolytic virus therapies have the ability to target and destroy cancer cells by multiple complementary mechanisms. We write a brief review about the underlying mechanisms of vaccinia virus effect.

oncolytic vaccinia virus, tumor cells, cell signaling pathway

doi: [10.1360/N052016-00370](https://doi.org/10.1360/N052016-00370)