

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.003

· 基础研究 ·

表达 mIL-21 的溶瘤痘苗病毒对小鼠乳腺癌的治疗作用

刘超^{a,b,c}, 王继伟^{b,c}, 王鹏举^{b,c}, 张忠献^{b,c}, 褚永超^{b,c}, 吕鹏威^a, 谷元廷^a, 王尧河^{b,c}(郑州大学 a. 第一附属医院 乳腺外科, b. 中英分子肿瘤学研究中心暨国家细胞与基因治疗国际联合研究中心, c. 医学科学院 细胞与基因治疗中心, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 观察溶瘤痘苗病毒 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 对小鼠乳腺癌细胞系 JC、TUBO 和 4T1 的体内外治疗效果。**方法:** 采用 MTT 法比较 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 两种病毒在不同质量浓度下对乳腺癌 JC、TUBO 和 4T1 细胞的体外杀伤效果, 用 TCID₅₀ 法检测病毒在三株乳腺癌细胞株中的复制能力, 用 ELISA 法检测两种病毒感染细胞后上清液中 mIL-21 的水平。建立三阴性乳腺癌 4T1 和 Her-2 扩增型乳腺癌 TUBO 细胞移植瘤模型, 检测两种病毒的治疗作用。**结果:** VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 两种病毒在乳腺癌 JC、TUBO 和 4T1 细胞中均具有复制能力, 低剂量的病毒就对乳腺癌细胞产生明显的杀伤效应; VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 感染的细胞上清中检测到高表达的 mIL-21 蛋白。在 4T1 乳腺癌细胞移植瘤模型中, 病毒治疗无明显效果 ($P > 0.05$); 在 TUBO 乳腺癌细胞移植瘤模型中, 两种病毒均能显著抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 延长荷瘤小鼠生存期 ($P < 0.01$)。**结论:** VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 两种病毒在乳腺癌细胞中具有特异性增殖并杀伤肿瘤细胞的能力, 在体内两种病毒对 Her-2 扩增型和三阴性乳腺癌具有不同的治疗效果。

[关键词] 痘苗病毒; 乳腺癌; 白细胞介素-21

[中图分类号] R730.51; R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)05-0472-06

Therapeutic effect of the oncolytic vaccinia viruses with expression of mIL-21 on breast cancer of mouse

LIU Chao^{a,b,c}, WANG Jiwei^{b,c}, WANG Pengju^{b,c}, ZHANG Zhongxian^{b,c}, CHU Yongchao^{b,c}, LYU Pengwei^a, GU Yuanting^a, WANG Yaohe^{b,c}(a. Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital; b. Sino-British Research Center for Molecular Oncology & National Center for International Research in Cell and Gene Therapy; c. Center for Cell and Gene Therapy, Academy of Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the *in vitro* and *in vivo* efficacy of tumor-targeted oncolytic vaccinia virus (VV) vectors, VV Δ TK Δ N1L-RFP and VV Δ TK Δ N1L-mIL-21, on murine breast cancer cell lines (JC, TUBO and 4T1). **Methods:** The cytotoxicity of the viruses (VV Δ TK Δ N1L-RFP and VV Δ TK Δ N1L-mIL-21) at different mass concentrations on JC, TUBO and 4T1 cells was compared by MTT assay. The replication ability of the two viruses in the three cell lines was tested by TCID₅₀. ELISA assay was performed to detect mIL-21 expression in the supernatants of the culture medium of three cell lines after virus infection. Orthotopic models of triple negative breast cancer (4T1) and Her-2 amplified breast cancer (TUBO) in the BALB/c mice were established to investigate the antitumor efficacy of the two VVs. **Results:** The two viruses were all able to replicate in breast cancer JC, TUBO and 4T1 cell lines, and low dose of VV caused significant cytotoxicity against breast cancer cell lines. High level of mIL-21 protein was detected in the cell culture supernatants after VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 infection. In the orthotopic 4T1 breast cancer model, the viruses did not show significant anti-tumor

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81272525, No. 81201792)。Project supported by the Nature Sciences Foundation of China(No. 81272525, No. 81201792)

[作者简介] 刘超(1989 -), 男, 硕士生, 主要从事乳腺肿瘤的基础与临床研究, E-mail: lyocharles@foxmail.com

[通信作者] 谷元廷(GU Yuanting, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事乳腺肿瘤的基础与临床研究, E-mail: guyuantingzhu@126.com; 王尧河(WANG Yaohe, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤基因免疫治疗的基础与临床研究, E-mail: yaohe.wang@qmul.ac.uk

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170509.1027.008.html>

effect ($P > 0.05$); however, in the orthotopic TUBO breast cancer model, tumor growth was significantly inhibited by both viruses ($P < 0.05, P < 0.01$), and the survival time ($P < 0.01$) of tumor bearing mouse was prolonged in both VV Δ TK Δ N1L-RFP and VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 treatment group. **Conclusion:** Both VV Δ TK Δ N1L-RFP and VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 viruses could specifically replicate and showed cell killing effect on breast cancer cells. The two viruses have different *in vivo* therapeutic effects on Her-2 gene amplified breast cancer and triple negative breast cancer.

[**Key words**] vaccinia virus (VV); breast cancer; IL-21

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(5): 472-477. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.003]

乳腺癌已成为当前女性发病率最高的肿瘤^[1]。传统的手术、放化疗乃至靶向治疗对于部分 Her-2 扩增型和三阴性乳腺癌的治疗效果仍不尽人意,因此,研究新的治疗手段迫在眉睫。近年来,复制选择性溶瘤病毒已成为肿瘤治疗研究的热点之一,尤其是痘苗病毒(vaccinia virus, VV),因其复制周期短、感染速度快、天然的肿瘤趋向性、强大的裂解细胞能力、外源基因插入容量大和可静脉注射等特点,被人们赋予了更高的期望^[2-5]。IL-21 具有促进 T、B 淋巴细胞增殖,促进 NK 细胞增殖分化等作用^[5-7]。本课题组用基因工程的方法敲除 VV 的胸苷激酶(thymidine kinase, TK)和 NIL 基因,以降低 VV 对正常细胞的感染能力,增加其抗肿瘤细胞的效果,并降低病毒毒性^[8],同时插入红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)或鼠 IL-21 基因成功构建 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 两种病毒^[9-10],通过上述两种溶瘤病毒的体内外实验研究,旨在探讨两种 VV 治疗乳腺癌的临床疗效及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

重组痘苗病毒 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 均由伦敦大学玛丽女王学院巴兹研究所构建、郑州大学中英分子肿瘤学中心鉴定。BALB/c 小鼠乳腺癌细胞系 JC、TUBO(Her-2 扩增型)、4T1(三阴性,类似于人 IV 期乳腺癌)及非洲绿猴肾上皮细胞 CV1 均由中英分子肿瘤学中心保存。胎牛血清(FBS)购自美国 Gemini 公司,DMEM 培养基购自美国 GIBICO 公司,mIL-21 ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司,MTT 购自美国 Promega 公司。雌性、6~8 周、体质量 18~20 g 的 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司[实验动物合格证号:SCXK(京)2012-0001]。

1.2 细胞培养

BALB/c 小鼠乳腺癌 JC、TUBO、4T1 细胞均用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 °C、CO₂ 体积分

数 5% 条件下培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化,1:3 传代,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3 TCID₅₀ 法^[4]测定重组病毒滴度

每 250 ml 2% FBS DMEM 培养基加入 3.75 ml 种子病毒之后,将其加入到处于对数生长期的 CV1 细胞,待所有细胞脱落时(72~96 h),收集感染细胞及其培养基,离心后纯化病毒。用 10% FBS DMEM 培养基将 CV1 细胞制成 2.5×10^4 个/ml 单细胞悬液,铺入 96 孔板(200 μ l/孔),设 3 个复孔,12~16 h 后,按比例(1:10)稀释病毒后将病毒稀释液逐排加入 96 孔板中最后一排作为空白对照。6 d 后计数细胞毒性孔,用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。实验重复 2 次。

1.4 MTT 法检测重组病毒对乳腺癌细胞的杀伤率

将对数生长期的 JC、TUBO 和 4T1 细胞用 2% FBS DMEM 培养基制成单细胞悬液,加入到 96 孔板中(每孔 2.5×10^3 个细胞/90 μ l),37 °C 孵育 14~18 h,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 PFU/cell 分别加入 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 病毒。7 d 后,每孔加入 20 μ l MTT,37 °C 孵育 3 h,测定各孔在 490 nm 处的光密度(D)值,计算细胞存活率。按先前方法计算半数最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀);杀死 50% 肿瘤细胞所需的病毒量值,EC₅₀ 值越大,表明细胞对病毒敏感性越低,反之亦然。

1.5 病毒体外增殖实验检测重组病毒复制能力

取对数生长期的 JC、TUBO 和 4T1 细胞,将 1×10^5 /ml 的悬液接种 2 ml 至 6 孔细胞培养板各孔中。14~18 h 后,以 MOI = 5 PFU/cell 分别加入 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 病毒。2 h 后弃去培养基,加入 2% FBS DMEM 培养基 2 ml 继续培养。在 24、48、72 和 96 h 各取 50 μ l 上清备用,将细胞和上清收集至冻存管中,37 °C 和 -80 °C 交替冻融 3 次,使病毒从细胞中充分释放出来。TCID₅₀ 法检测病毒复制能力。

1.6 ELISA 法检测重组病毒感染对乳腺癌细胞

mIL-21 表达的影响

用前述方法感染 3 种乳腺癌细胞, 在不同时间点收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 mIL-21 表达量。通过酶标仪进行颜色深浅的量化, 绘制标准曲线, 测定蛋白浓度。

1.7 4T1 和 TUBO 小鼠乳腺癌原位移植瘤模型的建立和治疗

取对数生长期的 4T1 细胞, 无菌 PBS 溶液稀释成 2×10^6 细胞/ml, 将 50 μ l 细胞悬液接种至 BALB/c 小鼠左侧腹部第四对乳腺脂肪垫内, 待肿瘤体积长至 50 mm³ 时, 随机分 3 组, 每组 7 只。在第 1、3、5、7、9、11 天, 治疗组 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 注射 1×10^8 PFU (50 μ l)/只, 对照组注入 50 μ l PBS 溶液/只, 每 3 d 测量肿瘤体积, 记录小鼠生存状况。将 TUBO 细胞稀释成 1×10^8 个/ml, 接种 50 μ l 细胞悬液/只 BALB/c 小鼠, 待肿瘤长至 100 mm³ 时, 分组治疗同前。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism version 5.01 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数之间的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 动物生存分析采用 Kaplan-Meier 评估, Log-rank (Mantel-Cox) Test 分析组间差异性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

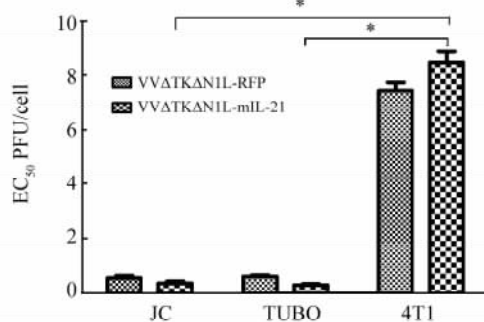
2.1 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 对乳腺癌细胞的杀伤作用

MTT 法实验结果 (图 1) 显示, VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 与其骨架病毒 VV Δ TK Δ N1L-RFP 对乳腺癌 JC、TUBO 和 4T1 细胞的杀伤能力相似 ($t = 0.50, 0.81, 2.62$; 均 $P > 0.05$)。在体外实验中敲除 TK 和 NIL 基因的痘苗病毒是否加入 mIL-21 基因对小鼠乳腺癌 JC、TUBO 和 4T1 的肿瘤杀伤效果没有明显影响; 在体外环境中, mIL-21 在只有肿瘤细胞而无免疫细胞的情况下并不能充分发挥抗肿瘤作用; 但 4T1 三阴性乳腺癌细胞对痘苗病毒的敏感性显著低于 TUBO Her-2 扩增型和 JC 乳腺癌细胞 (均 $P < 0.05$)。

2.2 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 在乳腺癌细胞中的复制能力

将痘苗病毒 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 在 BALB/c 小鼠的乳腺癌 JC、TUBO 和 4T1 细胞中的复制能力进行比较, 可以看出两种病毒在 JC 及 TUBO 细胞中复制能力差异无统计学意义

($t = 0.73, 0.60$, 均 $P > 0.05$; 图 2A、2B); 在 4T1 细胞中 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 的复制能力在 72 h 后低于 VV Δ TK Δ N1L-RFP ($t = 3.72, P < 0.01$; 图 2C)。



* $P < 0.05$ vs JC or TUBO

图 1 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 对小鼠乳腺癌细胞的杀伤作用

Fig. 1 Cytotoxicity of VV Δ TK Δ N1L-RFP and VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 against murine breast cancer cell lines

2.3 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 感染后乳腺癌细胞 mIL-21 蛋白的表达

ELISA 法检测结果 (图 3) 显示, 重组病毒感染后, JC、TUBO 和 4T1 细胞中 mIL-21 蛋白的表达水平在 48 h 最高, 随后逐渐下降; 在 TUBO 细胞中 mIL-21 蛋白在不同时间点的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 mIL-21 蛋白在 TUBO 细胞中降解速度较慢; 在 JC 细胞中 mIL-21 蛋白初始表达水平低, 在 48 h 显著增高 ($t = 5.51, P < 0.01$), 96 h 显著下降 ($t = 4.66, P < 0.01$); 在 4T1 细胞中 mIL-21 蛋白初始表达水平高, 96 h 表达水平显著降低 ($t = 4.64, P < 0.01$)。

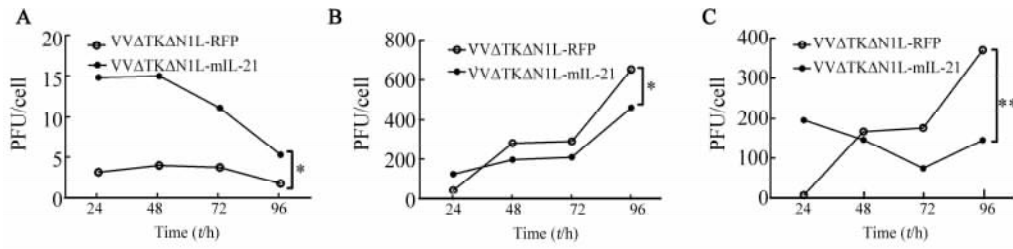
2.4 溶瘤痘苗病毒对小鼠 4T1 及 TUBO 乳腺癌移植瘤的治疗作用

成功建立 BALB/c 小鼠荷 4T1 细胞乳腺移植瘤模型, 瘤内注射 VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 痘苗病毒后, 两种病毒治疗组均有延缓肿瘤生长的作用, 两组之间肿瘤生长体积差异亦无统计学意义 ($t = 0.14, P > 0.05$; 图 4A)。两病毒治疗组与 PBS 对照组相比, 并未延长荷瘤小鼠生存期 ($\chi^2 = 3.53, P > 0.05$; 图 4B)。

对 4T1 三阴性乳腺癌治疗无效后, 通过建立 BALB/c 小鼠荷 TUBO 细胞乳腺原位肿瘤模型, 瘤内注射两种溶瘤痘苗病毒, 观察结果显示, 与 PBS 对照组相比, VV Δ TK Δ N1L-RFP 和 VV Δ TK Δ N1L-mIL-21 均能显著抑制肿瘤生长 ($t = 2.40, P < 0.05$; $t = 4.01, P < 0.01$), 但两病毒治疗组之间差异无统

计学意义(图 4C)。三组荷瘤小鼠生存率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 16.94, P < 0.01$; 图 4D)。体内

抗肿瘤实验中, 对 TUBO 肿瘤效果治疗佳, 而对 4T1 肿瘤效果差, 这一结果与体外杀伤实验相一致。

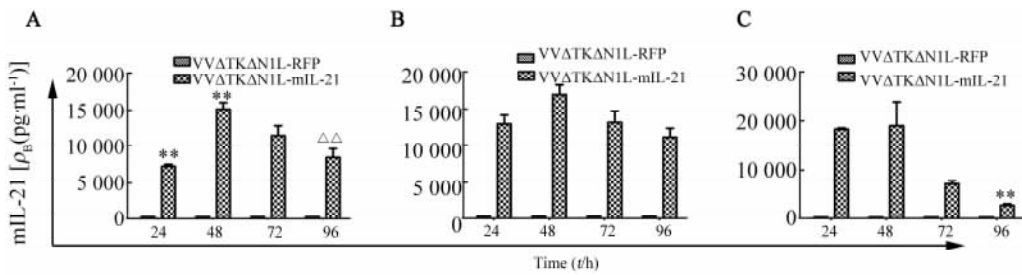


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs VVΔTKΔN1L-RFP group

A: JC cell line; B: TUBO cell line; C: 4T1 cell line

图 2 VVΔTKΔN1L-RFP 和 VVΔTKΔN1L-mIL-21 在小鼠乳腺细胞中的复制能力

Fig. 2 Viral replication of VVΔTKΔN1L-RFP and VVΔTKΔN1L-mIL-21 in murine breast cancer cell lines

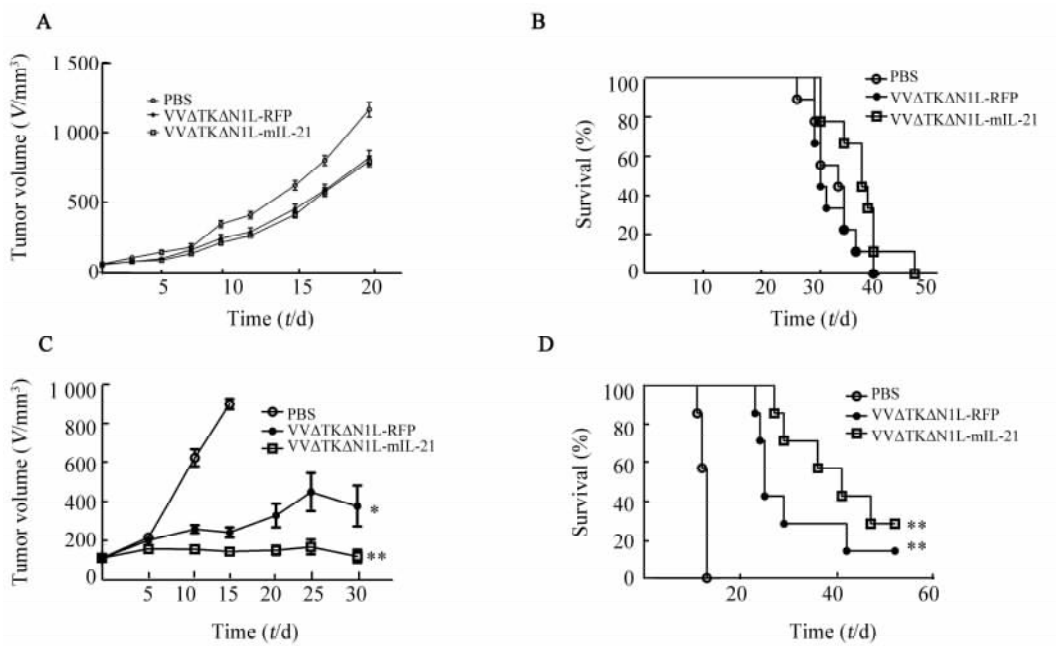


** $P < 0.01$ vs 24 h; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 48 h

A: JC cell line; B: TUBO cell line; C: 4T1 cell line

图 3 VVΔTKΔN1L-RFP 及 VVΔTKΔN1L-mIL-21 感染小鼠乳腺癌细胞后 mIL-21 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of mIL-12 in murine breast cancer cell lines infected with VVΔTKΔN1L-RFP and VVΔTKΔN1L-mIL-21



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS group

A: Growth curve of 4T1 tumor; B: Survival curve of TUBO tumor-burdened mice;

C: Growth curve of TUBO tumor; D: Survival curve of TUBO tumor-burdened mice

图 4 VVΔTKΔN1L-RFP 与 VVΔTKΔN1L-mIL-21 对小鼠乳腺移植瘤的治疗作用

Fig. 4 Therapeutic effect of VVΔTKΔN1L-RFP and VVΔTKΔN1L-mIL-21 on murine breast tumors *in vivo*

3 讨论

目前,溶瘤病毒被认为是在肿瘤治疗领域中一种有前途的治疗方式,有望成为继免疫检查点抑制剂在肿瘤免疫治疗领域成功之后的又一项重大突破^[11]。其对于肿瘤细胞的作用主要包括选择性的感染肿瘤细胞并在其中复制,进而裂解、杀死肿瘤细胞,并释放出子代病毒颗粒进一步感染周围肿瘤细胞。此外,病毒可打破肿瘤局部免疫抑制微环境,在裂解肿瘤细胞过程中,暴露肿瘤相关抗原,吸引抗原递呈细胞,使机体产生多种抗肿瘤抗原的特异性免疫反应。随着基因工程的广泛应用,通过敲除病毒致病基因,加入细胞因子等外源性抗癌基因,可进一步提高病毒治疗和基因治疗的抗肿瘤效果。

本课题组前期研究^[12]发现,敲除 *TK* 基因的痘苗病毒李斯特(*Lister*)株是开发下一代溶瘤 VV 的最好骨架病毒。*TK* 是细胞周期中的一种极为重要的调节蛋白,并在肿瘤细胞中高度表达,其作用的终产物胸苷三磷酸(*deoxythymidine triphosphate*, *dTTP*)是病毒 DNA 合成必不可少的物质。因正常细胞 *TK* 活性很低,将病毒 *TK* 基因敲除,就促使溶瘤病毒必须利用分裂期肿瘤细胞产生的 *dTTP*,从而使溶瘤病毒复制具有选择性。随着对 VV 的深入研究,人们发现 *N1L* 蛋白可增强 VV 感染宿主脑细胞后利用 ATP 的能力,且由于脑细胞高耗能、低储能的生理特性,病毒消耗脑细胞内 ATP 将导致其能量供应不足,引起严重的神经毒性,诱发痘后脑炎^[13]。在 VV 敲除 *N1L* 基因后,可以明显降低病毒的脑毒性。同时,*N1L* 蛋白具有与凋亡蛋白家族 *Bcl-2* 蛋白相似的结构,在正常细胞中 *N1L* 过表达可抑制细胞进入凋亡程序^[14],有利于病毒复制。从理论上推测,敲除 *N1L* 基因后,突变病毒在正常细胞中复制能力将降低。而在肿瘤细胞中可能不受影响,因为肿瘤细胞往往表达抗凋亡基因,*N1L* 功能可得以补偿。更为重要的是,*N1L* 可抑制核因子(*NK*)- κ B 以及干扰素调节因子 *IRF3* 的信号,下调 *TNF* 和 *TLRs* 的表达^[15],因此敲除 *N1L* 基因可增强机体对突变病毒的免疫反应。最近研究^[8]已初步显示,敲除 *N1L* 基因可增强病毒引起的抗肿瘤特异免疫反应,从而影响细胞因子的分泌。

本实验通过对痘苗病毒进行改造,通过敲除 *TK* 和 *N1L* 基因以降低病毒致病能力,插入 *IL-21* 细胞因子以提高其病毒复制选择性和免疫调节作用,从而增加其抗肿瘤作用。体外实验中,两种病毒均表现出对小鼠乳腺癌细胞强大的杀伤和复制能力,但

相对于 TUBO 和 4T1 细胞,两种病毒在 JC 细胞的复制能力均较低(图 2A),结合杀伤实验,推测可能是初始感染病毒 MOI 值过高,且两种病毒对 JC 的杀伤过强(图 1),使得病毒在细胞凋亡前未能完成复制所致。

4T1 动物体内治疗实验表明,两种新型溶瘤 VV 对 4T1 三阴性乳腺癌有轻微的延缓生长的作用($P > 0.05$),且两种病毒的疗效相近,提示:(1)溶瘤 VV 自身抗三阴性乳腺癌能力较差;(2)插入的细胞因子并没有显著提高抗肿瘤效果。在 TUBO 动物模型实验,尽管 VV Δ *TK* Δ *N1L*-RFP 与 VV Δ *TK* Δ *N1L*-*mIL-21* 两组之间无论肿瘤体积还是荷瘤小鼠生存率差异均无统计学意义,但 VV Δ *TK* Δ *N1L*-*mIL-21* 有比对照病毒显示更好抗肿瘤趋势,需进一步扩大实验动物数量或优化病毒注射时间和剂量来探索该病毒治疗乳腺癌的潜在应用价值。

目前对于溶瘤 VV 对 4T1 三阴性乳腺癌细胞株有显著治疗作用的相关报道仅有 1 例,在其动物实验中,骨架病毒组与对照组肿瘤体积并没有差异,而插入外源基因 *CXCR4-A-mFc* 的治疗组与前两者相比则具有显著差异,且该实验所用的 VV 为西储(*Western reserve*)株^[16],尽管 Hughes 等^[12]报道对于小鼠肿瘤细胞,西储株的体外抗肿瘤效果要优于李斯特株,而李斯特株的体内抗肿瘤效果效果优于西储株。从本文结果来看,*TK*、*N1L* 双重基因敲除,即便表达 *IL-21*,也没有对 4T1 肿瘤产生显著的抗肿瘤作用,其机制有待深入研究。首先,可能是 4T1 细胞对 VV 不甚敏感,病毒治疗后,局部微环境变化,特别是不同免疫细胞类型改变,可能是一个重要原因,本课题组正在研究该肿瘤模型治疗后这些变化,期望能寻找新的方法治疗三阴性乳腺癌,如表达其他细胞因子;与其他免疫治疗相结合,如结合 *PD-1/PD-L1*,或敲除 *Treg* 细胞等方法。

现在,称 VV 已成为治疗乳腺癌的一种成熟手段还为时尚早^[11]。随着对 VV 与机体免疫反应及肿瘤之间相互作用的深入研究,将会使得人们可根据癌症的不同类型和分期选择多样化的溶瘤病毒治疗。

[参考文献]

- [1] TAO Z, SHI A, LU C, et al. Breast cancer: epidemiology and etiology[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(2): 333-338. DOI: 10.1007/s12013-014-0459-6.
- [2] PEPLINSKI G R, TSUNG A K, CASEY M J, et al. In vivo murine tumor gene delivery and expression by systemic recombinant vaccinia virus encoding interleukin-1beta[J]. *Cancer J Sci Am*,

- 1996, 2(1): 21-27.
- [3] AL YAGHCHI C, ZHANG Z, ALUSI G, et al. Vaccinia virus, a promising new therapeutic agent for pancreatic cancer[J]. Immunotherapy, 2015, 7(12): 1249-1258. DOI: 10.2217/imt.15.90.
- [4] BADRINATH N, HEO J, YOO S Y. Viruses as nanomedicine for cancer[J/OL]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 4835-4847[2016-12-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5036661/>. DOI: 10.2147/IJN.S116447.
- [5] GUSE K, CERULLO V, HEMMINKI A. Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(5): 595-608. DOI: 10.1517/14712598.2011.558838.
- [6] CROCE M, RIGO V, FERRINI S. IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology[J/OL]. J Immunol Res, 2015, 2015: 696578[2016-12-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413888/>. DOI: 10.1155/2015/696578.
- [7] DAVIS M R, ZHU Z, HANSEN D M, et al. The role of IL-21 in immunity and cancer[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 107-114. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.12.047.
- [8] AHMED J, YUAN M, LI Y, et al. A novel tumor selective oncolytic vaccinia virus lacking the NIL gene enhances the anti-tumour immune response when used as an anticancer therapeutic[J]. MOL THER, 2014, 22(1): S248-S249. DOI: 10.1016/S1525-0016(16)35656-8.
- [9] 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[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(2): 405-416. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0464.
- [10] 王金礼. 新型肿瘤靶向性溶瘤痘苗病毒 VV Δ TK Δ NIL-RFP 对小鼠 4T1 乳腺癌模型的治疗作用[D]. 郑州大学, 2014.
- [11] FUKUHARA H, INO Y, TODO T. Oncolytic virus therapy: a new era of cancer treatment at dawn[J]. Cancer Sci, 2016, 107(10): 1373-1379. DOI: 10.1111/cas.13027.
- [12] HUGHES J, WANG P, ALUSI G, et al. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus[J]. Gene Ther, 2015, 22(6): 476-484. DOI: 10.1038/gt.2015.13.
- [13] ABRAHAMS M R, ZHANG Z, CHIEN S, et al. The vaccinia virus NIL ORF may encode a multifunctional protein possibly targeting different kinases, one of which influences ATP levels in vivo[J/OL]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1056: 87-99[2016-12-08]. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1749-6632](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1749-6632). DOI: 10.1196/annals.1352.006.
- [14] CHELTSOV A V, AOYAGI M, ALESHIN A, et al. Vaccinia virus virulence factor NIL is a novel promising target for antiviral therapeutic intervention[J]. J Med Chem, 2010, 53(10): 3899-3906. DOI: 10.1021/jm901446n.
- [15] KIM M. Replicating poxviruses for human cancer therapy[J]. J Microbiol, 2015, 53(4): 209-218. DOI: 10.1007/s12275-015-5041-4.
- [16] GIL M, SESHADRI M, KOMOROWSKI M P, et al. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(14): E1291-E1300[2016-12-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3619300/>. DOI: 10.1073/pnas.1220580110.
- [收稿日期] 2017-01-10 [修回日期] 2017-03-03
[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH用正体除外),例如*m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的浓度或质量浓度时,一般使用L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成mg/kg/d的形式,应写成mg/(kg·d)或mg·kg⁻¹·d⁻¹的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号A°(埃)已不用,应写作0.1nm;时间单位“小时”符号为h(不是hr)、“秒”符号为s(不是sec);转速单位符号为r/min(不是rpm);量浓度单位符号为mol/L(不是M、N,也不是mol/mm³);力的单位“牛顿”符号为N(不是dyn(达因))、kgf(千克力),换算1dyn=10⁻⁵N;热量单位“焦耳”符号为J(不是cal(卡)、kcal(千卡)),换算1cal=4.187J;放射性活度单位符号为Bq(不是Ci(居里)),换算1Ci=3.7×10¹⁰Bq]。

(本刊编辑部)