

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.002

· 基础研究 ·

表达LAG-3抗体的溶瘤腺病毒对成胶质细胞瘤的抗肿瘤性

欧阳一彬¹, 何青龙¹, 孙衍昶¹, 莫业和¹, 李渭亮² (1. 海南医学院第二附属医院神经外科一区, 海南海口 570311; 2. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海南海口 571199)

[摘要] **目的:** 探讨共表达淋巴细胞活化基因3(lymphocyte activation gene 3, LAG-3)抗体(LAG-3 antibody, aLAG)的溶瘤腺病毒对成胶质细胞瘤的抗肿瘤活性。**方法:** 在溶瘤腺病毒Ad3的骨架中插入aLAG序列, 获得重组溶瘤腺病毒Ad3-aLAG。应用WB法检测感染成胶质细胞瘤GL261细胞中aLAG的表达水平, MTT法检测重组溶瘤腺病毒对GL261细胞的杀伤能力, 通过小鼠皮下移植瘤模型评估重组溶瘤腺病毒对成胶质细胞瘤的体内肿瘤生长的抑制效果, 免疫组化染色法检测肿瘤浸润T细胞, 并通过流式细胞术检测肿瘤浸润T细胞分泌细胞因子TNF- α 及IFN- γ 的水平。**结果:** 成功构建的重组溶瘤腺病毒可以有效表达aLAG($P<0.01$), 并且可以在体外杀伤GL261细胞($P<0.01$)。小鼠皮下移植瘤模型实验结果显示, 重组溶瘤腺病毒Ad3-aLAG较Ad3溶瘤腺病毒而言肿瘤抑制能力更强($P<0.01$), 并且可以有效增强移植瘤组织中CD3⁺T细胞的浸润($P<0.01$)、增强浸润T细胞分泌IFN- γ 的能力($P<0.01$)。**结论:** Ad3-aLAG重组溶瘤腺病毒在体内外均显著抑制成胶质细胞瘤细胞的生长, 同时增强体内的抗肿瘤免疫反应, 有望为成胶质细胞瘤治疗提供一种新的方案。

[关键词] 溶瘤腺病毒; 淋巴细胞活化基因3抗体; 成胶质细胞瘤; 小鼠移植瘤; 免疫治疗

[中图分类号] R739.41; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)01-0011-06

Anti-tumor activity of oncolytic adenovirus expressing LAG-3 antibody on glioblastoma

OUYANG Yibin¹, HE Qinglong¹, SUN Yanchang¹, MO Yehe¹, LI Weiliang² (1. First District of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, Hainan, China; 2. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-tumor activity of oncolytic adenovirus co-expressing lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody (aLAG) against glioblastoma. **Methods:** aLAG sequence was inserted into the skeleton of oncolytic adenovirus Ad3 to obtain recombinant oncolytic adenovirus (Ad3-aLAG). The expression of aLAG in infected glioblastoma GL261 cells was detected by WB. The cytotoxicity of recombinant oncolytic adenovirus against glioblastoma was detected by MTT method. The tumor inhibitory activity of recombinant oncolytic adenovirus against glioblastoma *in vivo* was evaluated with mice subcutaneous xenograft model. Tumor infiltrating T cells were detected by immunohistochemical staining, and the levels of cytokines TNF- α and IFN- γ secreted by tumor infiltrating T cells were detected by Flow cytometry. **Results:** The recombinant oncolytic adenovirus was successfully constructed, which could effectively express aLAG and kill GL261 cells *in vitro* (all $P<0.01$). Experimental results of mice subcutaneous xenograft model showed that the tumor inhibition ability of recombinant oncolytic adenovirus Ad3-aLAG was stronger than that of Ad3 oncolytic adenovirus ($P<0.01$), and Ad3-aLAG could effectively enhance the infiltration of CD3⁺T cells in tumor tissue ($P<0.01$) and enhance the IFN- γ secretion ability of infiltrating T cells ($P<0.01$). **Conclusion:** Ad3-aLAG recombinant oncolytic adenovirus can significantly inhibit the growth of glioblastoma cells *in vivo* and *in vitro*, and enhance the anti-tumor immune response *in vivo*, which is promising to provide a new scheme for the treatment of glioblastoma.

[Key words] oncolytic adenovirus; LAG-3 antibody (aLAG); glioblastoma; mouse transplanted tumor; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(1): 11-16. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.01.002]

成胶质细胞瘤(glioblastoma)是最常见和最具侵袭性的脑部恶性肿瘤, 目前仍缺乏有效的治疗方案^[1-2]。标准治疗程序为手术切除, 之后采用化疗药物替莫唑胺或放疗进行配合^[3-4]。成胶质细胞瘤的预后极差, 患者中位生存期不到两年^[5]。成胶质细胞瘤对标准治疗的抵抗导致肿瘤复发率很高^[6]。因此, 急需寻找针对成胶质细胞瘤的安全有效的治疗手段。

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(No. 19A200024)。Project supported by the Scientific Research Project of Health Industry in Hainan Province (No. 19A200024)

[作者简介] 欧阳一彬(1982-), 男, 学士, 副主任医师, 主要从事脑胶质瘤及颅脑损伤的研究, E-mail: w387683@163.com

[通信作者] 莫业和(MO Yehe, corresponding author), 主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑胶质瘤及颅脑损伤的研究, E-mail: moye-he2018@163.com

病毒疗法正在成为一种针对肿瘤的新兴疗法^[7]。此前美国食品药品监督管理局(FDA)批准溶瘤疱疹病毒 T-VEC (*Talimogene Laherparepvec*) 用于治疗转移性黑色素瘤, 使得使用其他溶瘤病毒作为肿瘤的标准治疗成为可能^[8]。先前的研究^[9]发现, 共表达 PD-L1 抑制剂的溶瘤病毒能够通过激活抗原特异性 T 细胞反应来发挥协同抗肿瘤功效, 提供了一种新的溶瘤免疫治疗方法。由于单纯的溶瘤病毒疗法并不足以达到完全的肿瘤消除, 为了解决溶瘤病毒的这一缺陷, 同时增强免疫检查点抑制剂在肿瘤部位的富集能力, 本研究基于溶瘤腺病毒 Ad3 的病毒骨架构建了一种工程化的溶瘤腺病毒 Ad3-aLAG, 其共表达针对免疫检查点淋巴细胞活化基因 3 (lymphocyte activation gene 3, LAG-3) 抗体 (LAG-3 antibody, aLAG), 以期实现更强的抗肿瘤免疫反应, 为成胶质细胞瘤的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

人脑胶质瘤细胞系 U87 和 U373 购自美国模式菌种保藏库 (ATCC), 鼠脑胶质瘤细胞株 GL261 和人肾上皮细胞 HEK293A 购自中科院上海细胞库。所有细胞均采用添加 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。

6~8 周龄的雌性 C57 小鼠 (No. 201932776) 购自海南医学院实验动物中心, 在该中心标准无菌室中饲养, 所有方案均征得海南医学院实验动物中心护理和使用委员会批准。

MTT 试剂以及 DMSO 购自上海翌圣生物科技有限公司, 抗 His 抗体购自 Abcam 公司, 抗 IFN- γ -BV421 及抗 TNF- α -PE 流式抗体购自美国 BD 公司, 抗 CD3 免疫组化抗体购自美国 Abclonal 公司, GAPDH 内参抗体购自碧云天生物科技有限公司, Fix/Perm 固定破膜溶液及 Perm/Wash 清洗溶液购自美国 Biolegend 公司, 小鼠 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, HRP 标记的山羊抗兔二抗 (70-GAR007) 购自杭州联科生物科技有限公司。

1.2 重组病毒构建

LAG-3 抗体的 scFv 序列来源于相关专利 (US 9908936), 将轻链可变区与重链可变区通过 G4S Linker 进行连接, 同时在 N 端添加哺乳动物免疫球蛋白信号肽序列, 并且在 C 端添加 5×His 标签用于检测。将 aLAG 片段直接插入 pEnAd2.4 质粒中用于生产重组溶瘤腺病毒 Ad3-aLAG。此外还将绿色荧光

蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 通过 T2A 序列与 aLAG 进行连接, 用于示踪重组溶瘤腺病毒的感染情况。重组质粒 DNA 用 *Asc* I 酶切实现线性化, 之后转染 HEK293A 细胞, 在添加 2% FBS 的 DMEM 中培养、生产病毒。在较多的斑块形成后, 收获细胞, 并通过 3 个冻融周期裂解细胞, 释放病毒。将裂解的上清液添加到 40% 蔗糖溶液上层, 在 4 °C 的温度下 20 000×g 离心 120 min, 病毒颗粒用 PBS 重悬, -80 °C 保存。病毒的滴定: 将 HEK293A 细胞按 10⁵/孔进行接种, 之后加入 10 倍梯度稀释的病毒液, 共孵育 60 min 后, 添加 2 ml 培养基, 继续孵育 48 h, 洗涤细胞, 并将其固定于含有 0.1% 结晶紫的乙醇溶液中, 显微镜下计数阳性空斑数得到病毒滴度。

1.3 WB 法检测胶质瘤细胞中 aLAG 蛋白的表达

用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 5 的 Ad3 或 Ad3-aLAG 对 GL261 细胞进行感染, 孵育 48 h 后收集细胞, 1 000×g 离心 2 min 后, 加入含有 1×RIPA 缓冲液和 1×蛋白酶抑制剂的工作液, 冰上孵育 30 min, 10 000×g 离心 5 min 后获得蛋白。取 50 μ g 蛋白进行 12% SDS-PAGE, 转膜, 用 5% 脱脂牛奶溶液在室温下封闭 2 h, 用抗 His 抗体 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜。次日, TBST 液清洗后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h 后, 加入 ECL 进行曝光。GAPDH 作为内参, 用 Image Pro Plus 6.0 进行蛋白灰度分析。

1.4 MTT 法检测 Ad3-aLAG 对胶质瘤细胞增殖的影响

在病毒感染前 24 h 将各组的胶质瘤细胞分别接种于 96 孔板中 (8×10³ 个/孔), 并以不同 MOI 值 (0.1、0.5、1.0、5.0) 的 Ad3 或 Ad3-aLAG 感染胶质瘤 U87、U373 和 GL261 细胞, 培养 18 h 后, 在每孔内加入 20 μ l MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃上清, 加入 150 μ l DMSO 溶液, 在酶标仪上检测波长 570 nm 和 620 nm 处的光密度 (*D*) 值, 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = (1 - 实验组 D_{570} - D_{620} / 对照组 D_{570} - D_{620}) × 100%。实验重复 3 次。

1.5 GL261 细胞小鼠移植瘤模型的建立及观察

将密度为 3×10⁶ 的 GL261 细胞注射到小鼠右侧腋下, 以建立小鼠皮下 GL261 细胞移植瘤模型。分别在接种后第 7、第 10 和第 15 天通过尾静脉注射 PBS、Ad3、Ad3-aLAG (5×10⁷ pfu/只^[10]) 进行治疗, 并观察移植瘤的生长状况。每 2~3 d 测量一次瘤体积和小鼠质量。对表现出垂死状态的小鼠实施安乐死。至 30 d 时, 处死小鼠、剥离移植瘤, 拍照并称瘤质量, 切取移植瘤组织进行后续研究。

1.6 免疫组化染色法检测小鼠移植瘤组织中 T 细胞浸润程度

使用小鼠抗 CD3 单克隆抗体 (1:150) 对 4% 多聚

甲醛溶液固定的石蜡组织切片进行免疫染色, 4 °C 孵育过夜。次日, PBST 清洗后, 用 HRP 偶联二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次。将载玻片用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染色并用苏木精复染。拍摄照片, 通过计数 CD3 阳性细胞数目实现数据量化。采用 Image Pro Plus 6.0 的 count size 功能对阳性染色 T 细胞个数进行统计。

1.7 流式细胞术检测小鼠移植瘤组织中肿瘤浸润 T 细胞分泌 IFN- γ 和 TNF- α 的能力

用胶原酶 I 消化小鼠移植瘤组织, 以 70 μ m 滤膜过滤获得单细胞悬液, 加入抗 CD3 抗体 (1:50) 室温避光孵育 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 Fix/Perm 固定破膜溶液孵育细胞 20 min, 之后用 Perm/Wash 缓冲液洗涤细胞, 用 IFN- γ (1:100) 和 TNF- α 的抗体 (1:100) 避光孵育 30 min, 再用 Perm/Wash 缓冲液洗涤 3 次后, 在 LSR II 细胞仪 (BD 公司) 上进行操作, 并用 FACS DIVA 软件 v8.0 (BD 公司) 分析分泌 TNF- α 和 IFN- γ 的 T 细胞占比情况。实验重复 3 次。

1.8 ELISA 法检测小鼠移植瘤组织中 IL-2、IFN- γ 及

TNF- α 水平

将小鼠移植瘤组织打碎形成组织匀浆后, 以 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书的方法进行实验, 检测上清中 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α 的含量。实验重复 3 次。

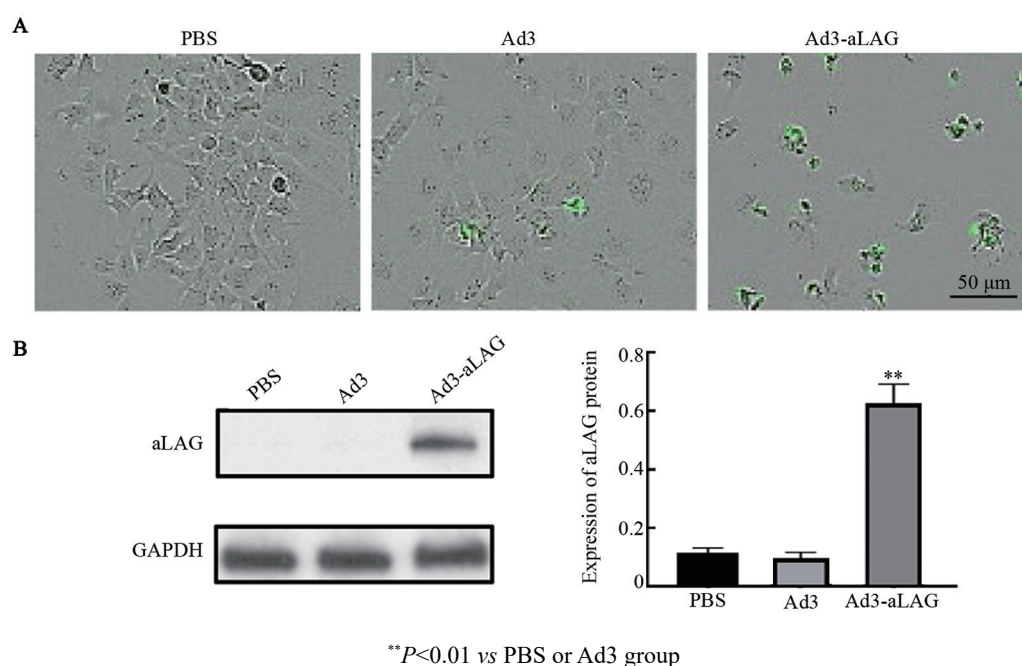
1.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对所有实验数据进行统计学处理。正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立表达 aLAG 的 Ad3-aLAG 细胞株

分别用 Ad3 及 Ad3-aLAG 慢病毒感染 GL261 细胞后, 荧光显微镜下见 Ad3 组和 Ad3-aLAG 组细胞中均有 GFP 的表达, 而 PBS 组细胞中未见 GFP 的表达 (图 1A)。WB 法检测结果 (图 1B) 显示, Ad3-aLAG 组胶质瘤细胞中 aLAG 的表达水平显著高于 Ad3 组 (均 $P<0.01$)。



A: Fluorescence microscopic photos of GL261 cells infected with recombinant oncolytic adenovirus ($\times 200$);

B: The expression of aLAG in infected GL261 cells was detected by WB

图1 重组溶瘤腺病毒感染能力的鉴定

Fig.1 Identification of infection ability of recombinant oncolytic adenovirus

2.2 Ad3-aLAG 显著降低胶质瘤细胞的增殖能力

MTT 法检测结果 (图 2) 显示, 随着感染胶质瘤细胞 MOI 值的增大, Ad3 及 Ad3-aLAG 对肿瘤细胞的细胞毒性作用逐渐增强, 当 MOI=5 时, 靶细胞的增殖率显著低于 PBS 组 ($P<0.01$), 而 Ad3 组与 Ad3-aLAG 组细胞增殖率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果

表明, Ad3 及 Ad3-aLAG 均可以有效抑制胶质瘤细胞的增殖, 但二者的抑制能力无显著性差异。

2.3 Ad3-aLAG 显著抑制小鼠移植瘤的体内生长

通过皮下荷瘤小鼠模型来验证 Ad3-aLAG 的体内抑瘤活性。监测治疗后小鼠胶质瘤体积的结果 (图 3A) 发现, Ad3 和 Ad3-aLAG 组小鼠移植瘤的生

长速度明显低于PBS组(均 $P<0.01$), Ad3-aLAG组的抑瘤作用显著强于Ad3治疗组($P<0.01$)。在第30天时处死小鼠、剥离肿瘤组织, 测量移植瘤质量结果(图3B, C)显示, Ad3和Ad3-aLAG组移植瘤的质量显著低于PBS组(均 $P<0.01$), Ad3-aLAG组移植瘤的质量显著低于Ad3治疗组($P<0.01$)。结果表明, Ad3-aLAG较Ad3具有更强的胶质瘤生长抑制能力。

2.4 Ad3-aLAG治疗显著增加浸润T细胞的数量

免疫组化染色结果(图4)显示, Ad3及Ad3-aLAG组移植瘤组织中 $CD3^+$ T细胞的浸润数量显著多于PBS组(均 $P<0.01$), Ad3-aLAG组较Ad3组的 $CD3^+$ T细胞数目进一步增多($P<0.01$)。结果表明, Ad3-aLAG治疗可以引起更多的肿瘤浸润T细胞的增殖。

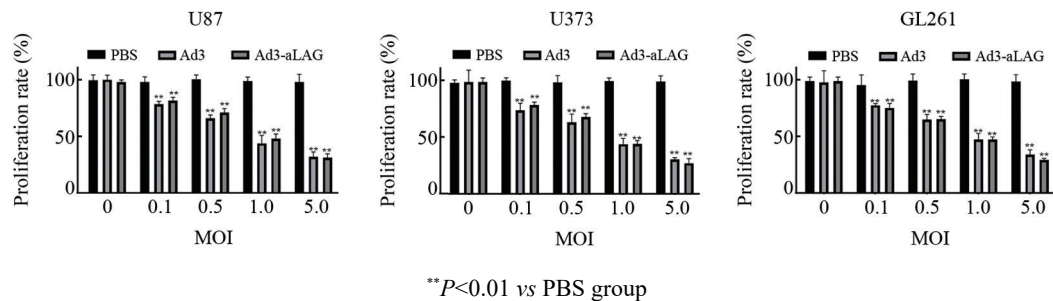
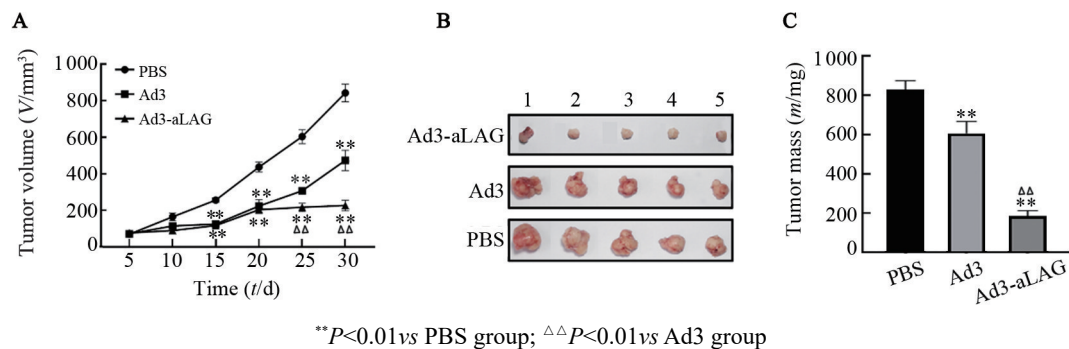


图2 重组溶瘤腺病毒在不同MOI下对胶质瘤细胞的细胞毒性

Fig.2 Cytotoxicity of recombinant oncolytic adenovirus to glioma cells under different MOI



A: Tumor volume; B: Mouse xenograft specimen; C: Tumor mass

图3 重组溶瘤腺病毒对小鼠胶质瘤的体内抗肿瘤效果

Fig.3 Anti-tumor effect of recombinant oncolytic adenovirus on mouse glioma *in vivo*

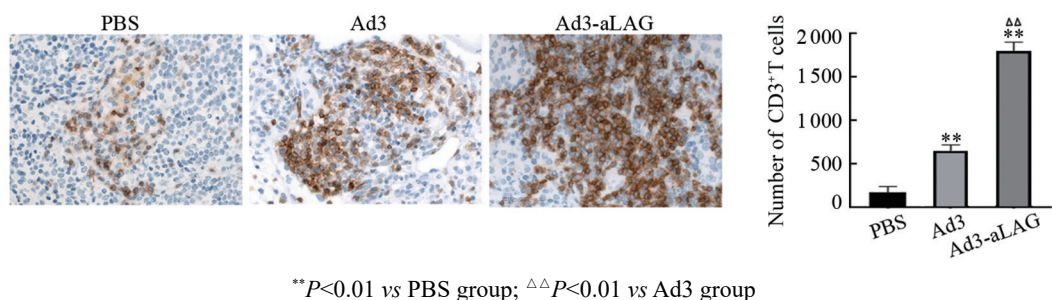


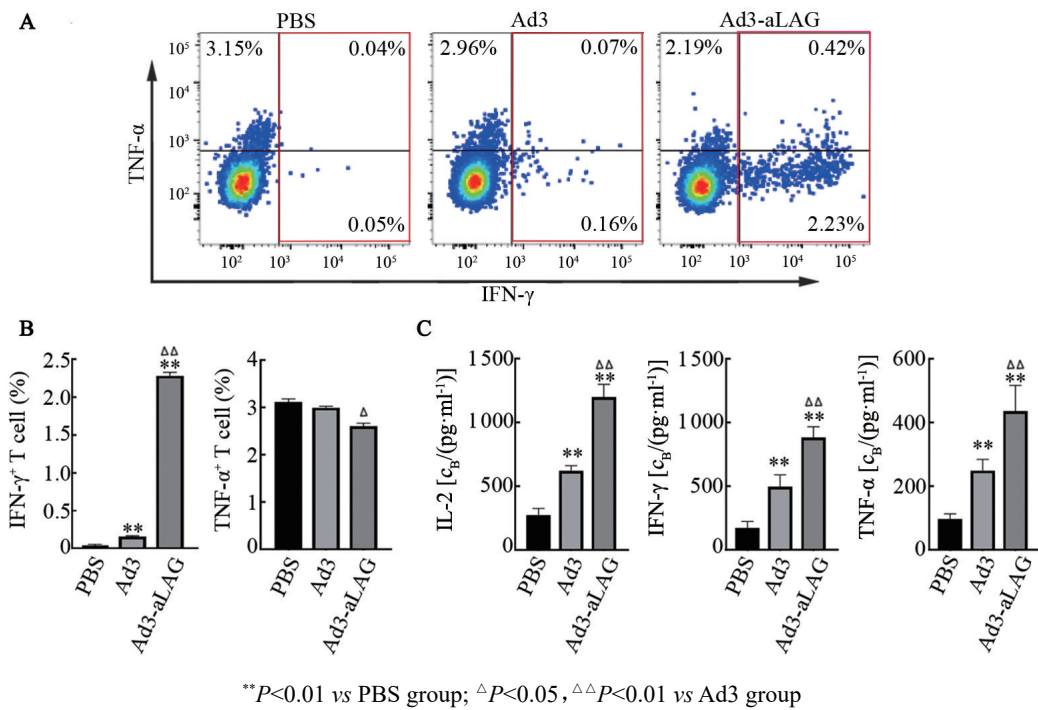
图4 移植瘤组织中 $CD3^+$ T细胞的浸润情况(免疫组化染色, $\times 100$)

Fig.4 Infiltration of $CD3^+$ T cells in xenograft tissue (immunohistochemical staining, $\times 100$)

2.5 Ad3-aLAG增强浸润T细胞的抗肿瘤活性

流式细胞术检测结果(图5A, B)显示, Ad3组移植瘤中肿瘤浸润T细胞分泌 $IFN-\gamma$ 的水平显著高于PBS组($P<0.01$); Ad3-aLAG组移植瘤中浸润T细胞分泌 $IFN-\gamma$ 的能力显著高于Ad3组($P<0.01$)。然而, 反常的是, Ad3-aLAG组移植瘤中浸润T细胞分泌

$TNF-\alpha$ 的能力较Ad3治疗组有所降低($P<0.05$)。ELISA实验结果(图5C)显示, Ad3-aLAG组移植瘤组织中IL-2、 $IFN-\gamma$ 及 $TNF-\alpha$ 的水平显著高于Ad3治疗组(均 $P<0.01$)。结果表明, Ad3-aLAG治疗可以增强肿瘤浸润T细胞分泌细胞因子 $IFN-\gamma$ 的能力, 增强其抗肿瘤活性。



A: IFN-γ⁺ T cells and TNF-α⁺ T cells were detected by flow cytometry; B: Numbers of IFN-γ⁺ T cells and TNF-α⁺ T cells; C: Detection of IL-2, IFN-γ and TNF-α level in tumors by ELISA

图5 肿瘤浸润T细胞的细胞因子分泌水平

Fig.5 Cytokine secretion level of tumor infiltrating T cells

3 讨论

溶瘤病毒在治疗脑肿瘤方面的潜力已被许多研究^[11]证明。已有几个临床试验^[12-13]评估了不同类型的溶瘤病毒在成胶质细胞瘤患者中的适用性,并展现出不错的疗效。溶瘤病毒疗法触发免疫反应的特性,以及开发分泌免疫调节因子的工程化溶瘤病毒的可能性,为肿瘤的治疗开辟了新的领域。

溶瘤病毒具有肿瘤特异性复制、感染不同肿瘤细胞的能力、体内稳定性好、人体安全性好等优点,是一种很有吸引力的肿瘤免疫治疗手段^[13]。在本研究对共表达 aLAG 的血清 III 型腺病毒 Ad3-aLAG 进行了研究,发现其具有以下重要特征:完全的血清型 III 型,可通过静脉途径给药增强肿瘤的转导;由于端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 启动子的存在,具有肿瘤选择性;所分泌的免疫检查点抑制剂可以解除免疫抑制,增强局部抗肿瘤免疫反应。

利用免疫检查点抑制剂有效地增强了内源性 T 细胞的抗肿瘤反应,导致部分晚期恶性肿瘤患者的持久反应,如黑色素瘤、转移性肺癌、肾癌和膀胱癌^[14]。然而,大多数肿瘤患者对免疫检查点抑制剂无响应。治疗失败的一个原因是所谓的“冷”肿瘤,此类肿瘤患者往往具有较低的突变负荷,较差的主要组织相容性复合体提呈,以及较弱的吸引 T 细胞浸润

的能力^[15]。溶瘤病毒则有潜力来克服“冷”肿瘤的这种弊端。通过局部的免疫激活、免疫原性溶瘤作用、释放和提呈突变的新抗原,以及改变免疫抑制的肿瘤微环境来激活 T 细胞反应^[16]。最近的临床试验^[17]证明,溶瘤病毒 T-Vec 可以促进瘤内 T 细胞浸润和增强 PD-1 或 CTLA-4 抗体的疗效。而本研究在体内实验中发现,Ad3-aLAG 治疗后肿瘤浸润的 T 细胞显著增加,且肿瘤浸润 T 细胞分泌细胞因子 IFN-γ 的能力更强,表明其具有更好的抗肿瘤活性。

越来越多的研究^[18-19]表明,LAG-3 是一种十分重要的免疫检查点。本研究通过体内外实验证明了构建的溶瘤腺病毒 Ad3-aLAG 具有显著的肿瘤抑制能力,同时其分泌的 aLAG 可以解除肿瘤微环境中的免疫抑制状态,增强 T 细胞的浸润及抗肿瘤活性。但本研究也存在一些不足,如未能选择原位的肿瘤小鼠模型进行 Ad3-aLAG 的活性评价,后续将继续在该种模型中检测 Ad3-aLAG 的抗肿瘤能力,并初步评价其不良反应水平。总之,这种经过改造的工程化溶瘤腺病毒提供了一种针对成胶质细胞瘤特异性的、有效的肿瘤免疫疗法,该疗法有望为成胶质细胞瘤患者的治疗提供一种新的思路。

[参考文献]

[1] ZHAO B H, WANG Y K, WANG Y N, et al. Systematic identification, development, and validation of prognostic biomarkers involving the

- tumor-immune microenvironment for glioblastoma[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(1): 507-522. DOI:10.1002/jcp.29878.
- [2] BANATI R B, WILCOX P, XU R, et al. Selective, high-contrast detection of syngeneic glioblastoma in vivo[J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 9968[2020-08-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC32561881/>. DOI:10.1038/s41598-020-67036-z.
- [3] CHAGOYA G, KWATRA S G, NANNI C W, et al. Efficacy of osimertinib against EGFRv III⁺ glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2020, 11(22): 2074-2082. DOI:10.18632/oncotarget.27599.
- [4] FRISCH A, KÄLIN S, MONK R, et al. Apelin controls angiogenesis-dependent glioblastoma growth[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): E4179[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312290/>. DOI:10.3390/ijms21114179.
- [5] PORTELA M, CASAS-TINTÓ S. New cellular dimensions on glioblastoma progression[J/OL]. *J Exp Neurosci*, 2020, 15: 263310552092307[2020-08-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC325485821/>. DOI:10.1177/2633105520923076.
- [6] GARCÍA-ROMERO N, PALACÍN-ALIANAI, MADURGAR, et al. Bevacizumab dose adjustment to improve clinical outcomes of glioblastoma[J/OL]. *BMC Med*, 2020, 18(1): 142[2020-08-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC325647741/>. DOI:10.1186/s12916-020-01610-0.
- [7] 李雪, 黄利利, 谢海燕, 等. 溶瘤病毒疗法的研究现状与展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(5): 559-565. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.05.014.
- [8] PARK S H, BREITBACH C J, LEE J, et al. Phase 1b trial of biweekly intravenous Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus in colorectal cancer[J/OL]. *Mol Ther*, 2015, 23(9): 1532-1540[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817877/>. DOI:10.1038/mt.2015.109.
- [9] WANG G, KANG X, CHEN K S, et al. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1395[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7070065/>. DOI:10.1038/s41467-020-15229-5.
- [10] ZAFAR S, SORSA S, SIURALA M, et al. CD40L coding oncolytic adenovirus allows long-term survival of humanized mice receiving dendritic cell therapy[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(10): e1490856[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6207416/>. DOI:10.1080/2162402X.2018.1490856.
- [11] BURTON C, DAS A, MCDONALD D, et al. Oncolytic myxoma virus synergizes with standard of care for treatment of glioblastoma multiforme[J/OL]. *Oncolytic Virother*, 2018, 7: 107-116[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6251439/>. DOI:10.2147/OV.S179335.
- [12] RAMACHANDRAN M, YU D, DYCZYNSKI M, et al. Safe and effective treatment of experimental neuroblastoma and glioblastoma using systemically delivered triple microRNA-detargeted oncolytic semliki forest virus[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(6): 1519-1530. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-0925.
- [13] CHEEMA T A, KANAI R, KIM G W, et al. Enhanced antitumor efficacy of low-dose Etoposide with oncolytic herpes simplex virus in human glioblastoma stem cell xenografts[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(23): 7383-7393[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229640/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1762.
- [14] 陈龙佩, 湛先保. 免疫检查点抑制剂在消化系统恶性肿瘤治疗中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(1): 103-108. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.017.
- [15] YOO S Y, BADRINATH N, JEONG S N, et al. Overcoming tumor resistance to oncolytic vaccinia virus with anti-PD-1-based combination therapy by inducing antitumor immunity in the tumor microenvironment[J/OL]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(2): E321[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7350271/>. DOI:10.3390/vaccines8020321.
- [16] HOU W Z, SAMPATH P, ROJAS J J, et al. Oncolytic virus-mediated targeting of PGE2 in the tumor alters the immune status and sensitizes established and resistant tumors to immunotherapy[J/OL]. *Cancer Cell*, 2016, 30(1): 108-119[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4962335/>. DOI:10.1016/j.ccell.2016.05.012.
- [17] PASSARO C, ALAYO Q, DE LAURA I, et al. Arming an oncolytic herpes simplex virus type 1 with a single-chain fragment variable antibody against PD-1 for experimental glioblastoma therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(1): 290-299. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-18-2311.
- [19] WANG J, SANMAMED M F, DATAR I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3[J/OL]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 334-347. e12[2020-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365968/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.010.

[收稿日期] 2020-08-10

[修回日期] 2020-12-13

[本文编辑] 党瑞山