

携带 CXCL9 和 IL-7 双基因的新型重组溶瘤痘苗病毒制备及体外 抑瘤作用验证

张林，侯艳红¹，李湘辉，侯慧，张静，吴凯

中国人民解放军总医院第八医学中心，北京 100091

摘要：目的：通过分子生物学方法制备携带CXCL9和IL-7双基因的新型重组溶瘤痘苗病毒并通过体外细胞学实验初验证该重组溶瘤病毒感染、杀伤胃癌细胞的作用。方法：首先分步构建携带CXCL9和IL-7双基因的重组痘苗病毒真核表达质粒pSC65-CXCL9-IL7，继而以该载体真核细胞内重组痘苗病毒株，经过有限稀释法反复筛选纯化后，获得纯化的重组溶瘤痘苗病毒VV- CXCL9-IL7，而后经感染HeLa细胞扩大培养并采用氯化铯梯度离心法浓缩纯化后获得高滴度的重组溶瘤痘病毒。以此重组溶瘤痘病毒体外感染人胃癌细胞系SGC7901细胞，通过半数细胞培养物感染量TCID50法检测重组病毒感染能力，用ELISA 法检测细胞培养上清液中CXCL9和IL-7的浓度。采用MTT法检测VV-CXCL9-IL7对SGC7901细胞的杀伤力。采用细胞生长曲线法检测重组溶瘤痘病毒感染对细胞生长的影响，采用流式细胞仪法检测被感染SGC7901细胞的细胞周期及凋亡情况变化。结果：成功构建了重组溶瘤痘病毒VV-CXCL9-IL7，通过上清液浓度检测初步验证了IL-7和CXCL9趋化因子产生及释放作用。细胞感染干预结果显示VV-CXCL9-IL7重组溶瘤痘病毒干预组肿瘤细胞杀伤作用明显强于各对照组且肿瘤生长明显减缓，显著慢于其它各对照组，溶瘤痘病毒干预组细胞G0/G1期比率显著高于各对照组其凋亡率明显增加。结论：在体外细胞学干预实验中采用VV-CXCL9-IL7重组溶瘤病毒感染干预胃癌细胞具有较强的抑瘤作用，对于胃癌这种可局部内镜下直接局部给药形成感染的肿瘤具有潜在的临床应用价值。

关键词：胃癌；溶瘤痘苗病毒；CXCL9；IL-7；生物免疫治疗

中图分类号：R573.3

文献标识码：A

作者简介：张林，男，博士，副主任医师。解放军总医院第八医学中心消化内科副主任，主要从事消化道疾病内镜下诊断与治疗技术研究。Email: stepinghuns2@sohu.com

¹为本文通讯作者。通讯作者简介：侯艳红，女，博士，副主任医师。解放军总医院第八医学中心门诊副主任医师，主要从事功能性消化病心理及分子机制研究。Email: houyan211@sina.com

本研究为以下基金支持：首都卫生发展科研专项基金，编号：2011-5007-01

Preparation of a novel recombinant vaccinia virus carrying CXCL9 and IL-7 genes and its anti-tumor effect in vitro

Lin Zhang, Yanhong Hou, Xianghui Li, Hui Hou, Jing Zhang, Kai Wu

(1. Department of gastroenterology, The eighth medical center, PLA general hospital, Beijing 100091, China.)

Corresponding author: Yanhong Hou. Tel: 86-010-55473145; Fax: _86-010-66775010. E-mail:
stepinghuns2@aliyun.com

Abstract: Objective: To prepare a novel recombinant vaccinia virus carrying CXCL9 and IL-7 double genes by molecular biological method, and to preliminarily verify the effect of the recombinant vaccinia virus in infecting and killing gastric cancer cells by in vitro cytological experiments. Methods: The recombinant vaccinia virus eukaryotic expression plasmid pSC65-CXCL9-IL7 carrying CXCL9 and IL-7 double genes was constructed step by step, and then the vaccinia virus strain was recombined in eukaryotic cells with this vector. After repeated screening and purification with limited dilution method, purified recombinant oncolytic poxvirus VV- CXCL9-IL7 was obtained. Then, the recombinant oncolytic poxvirus with high titer was obtained by infecting HeLa cells to expand the culture and using cesium chloride gradient centrifugation to concentrate and purify it. The recombinant oncolytic poxvirus was used to infect human gastric cancer cell line SGC7901 in vitro. The infectivity of recombinant virus was detected by TCID50 method, and the concentration of CXCL9 and IL-7 in cell culture supernatant was detected by ELISA. The cytotoxicity of VV-CXCL9-IL7 to SGC7901 cells was detected by MTT method. The effect of recombinant oncolytic poxvirus infection on cell growth was detected by cell growth curve method, and the changes of cell cycle and apoptosis of infected SGC7901 cells were detected by flow cytometry. Results: The recombinant oncolytic poxvirus VV-CXCL9-IL7 was successfully constructed, and the production and release of chemokines IL-7 and CXCL9 were preliminarily verified by the detection of the concentration of supernatant. The results of cell infection intervention showed that the killing effect of tumor cells in the VV-CXCL9-IL7 recombinant oncolytic poxvirus intervention group was significantly stronger than that in each control group, and the tumor growth was significantly slower than that in other control groups. The G0/G1 phase ratio of cells in the oncolytic poxvirus intervention group was significantly higher than that in each control group, and its apoptosis rate was significantly increased. Conclusion: In vitro cytological intervention experiment, VV-CXCL9-IL7 recombinant infection has a strong anti-tumor effect on gastric cancer cells, and has potential clinical application value for gastric cancer, which can be infected by local direct drug administration.

Key words: gastric cancer; Oncolytic poxvirus; CXCL9; IL-7; Bioimmunotherapy

胃癌在东亚地区是发病率及死亡率均较高的恶性肿瘤，由于内镜检查普及率较低，中国的胃癌患者通常为进展期，目前治疗效果极差，临床五年生存率低于30%^[1-3]。由于中国胃癌的具体情况，临床急需针对晚期胃癌治疗效果更好且毒副作用更小的治疗方法。生物免疫治疗是本世纪快速发展的新治疗方法，目前对于胃癌的生物免疫治疗也是研究热点^[4-6]，CAR-T免疫效应细胞治疗和以PD-1/PD-L1单抗为代表的免疫检查点阻断治疗被认为是最具潜力的治疗策略。另外近来研究报道^[7,8]溶瘤痘苗病毒对于肿瘤免疫微环境具有显著地重塑作用，而且其在抗肿瘤治疗中表现出了巨大的潜力。目前研究的溶瘤痘苗病毒均为基因重组病毒，这类病毒的基因组中插入了目的基因的DNA，因而在病毒感染肿瘤细胞时可以表达出治疗所需的基因，而这些目的分子可以促进局部炎症反应及抗肿瘤免疫激活，达到肿瘤免疫微环境重塑效果。现有的研究^[9,10]提示采用携带抗肿瘤目的基因的重组溶瘤痘苗对各类恶性肿瘤具有较好的抑瘤效果，因此，我们在本研究中构建了携带主要的T淋巴细胞趋化因子CXCL9基因和强力调节T细胞免疫功能抑瘤因子IL-7基因的重组溶瘤痘苗病毒，并进一步验证了其体外对于胃癌细胞的杀伤作用，为进一步进入临床打下基础。本研究的技术路线如图1所示，通过分阶段构建、重组、筛选和验证，最终获得具有高效抑瘤作用的重组溶瘤痘苗病毒VV-CXCL9-IL7。

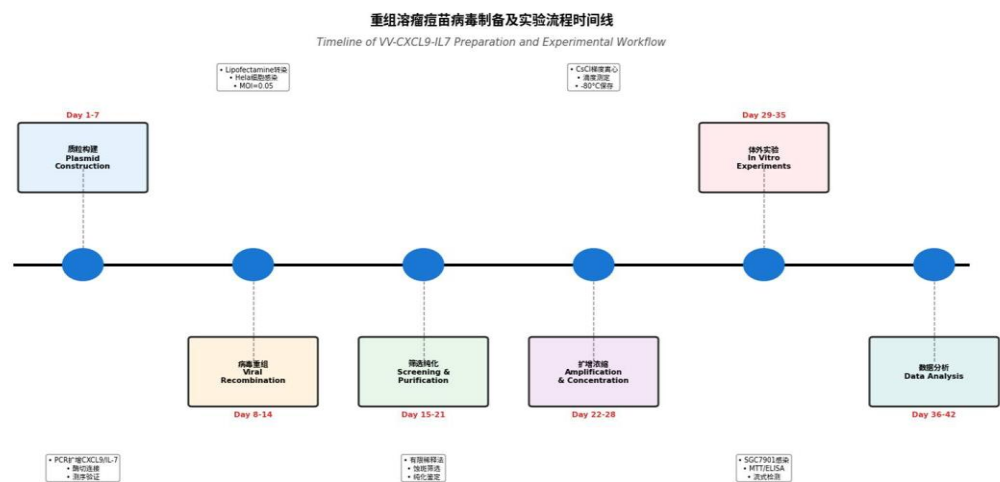


图1 携带CXCL9和IL-7双基因的重组溶瘤痘苗病毒制备及实验流程

Fig. 1 Preparation and experimental workflow of recombinant oncolytic vaccinia virus carrying CXCL9 and IL-7 genes.

图1 VV-CXCL9-IL7重组溶瘤痘病毒制备及实验流程时间线。(A)质粒构建阶段：通过PCR扩增从pDONR223模板中获取CXCL9和IL-7基因，依次插入pSC65载体，经酶切鉴定和测序验证获得pSC65-CXCL9-IL7重组质粒；(B)病毒重组阶段：采用Lipofectamine2000将重组质粒转染已感染野生痘病毒的HeLa细胞，实现同源重组；(C)筛选纯化阶段：通过有限稀释法和蚀斑筛选获得纯化重组病毒；(D)扩增浓缩阶段：感染HeLa细胞扩增后，经氯化铯密度梯度离心纯化；(E)体外实验阶段：以SGC7901胃癌细胞为模型，通过TCID50、ELISA、MTT和流式细胞术检测病毒感染能力、细胞因子表达、细胞杀伤率、细胞周期及凋亡情况。

1 材料和方法

1.1 材料：CXCL9 ELISA检测试剂盒(Abcam公司)；IL-7 ELISA检测试剂盒(Abcam公司)，pSC65痘病毒转移载体质粒(BioVector 质粒载体菌株细胞蛋白抗体基因保藏中心)，痘病毒vr-3125株 (BioVector 质粒载体菌株细胞蛋白抗体基因保藏中心)，含人 CXCL9 cDNA克隆pDONR223质粒，含人IL7 (NM_000880) cDNA克隆pDONR223质粒(湖南优宝生物公司)；ipofectamineTM2000脂质体转染试剂盒(Invitrogen 公司)；各类限制性内切酶均购自大连宝生物公司。人外周血淋巴细胞分离液(北京Solarbio 公司)；人胃腺癌细胞株SGC7901(北京富众科技发展有限公司)，人宫颈癌细胞系HeLa及感受态大肠杆菌DH5 α 菌株均由中国人民解放军总医院第八医学中心消化科保存。所有细胞培养于含胎牛血清、青霉素、链霉素的DMEM培养液中。细胞实验于由中国人民解放军总医院第八医学中心实验室进行。

1.2 方法：

1.2.1 痘病毒真核表达质粒 pSC65-CXCL9-IL7 的构建：按照李丹洋^[11]等的方法以 pSC65 痘病毒转移载体为基础克隆入 CXCL9 和 IL-7 双基因形成重组痘病毒真核表达质粒 pSC65-CXCL9-IL7，以含 CXCL9 和 IL-7 基因 cDNA 克隆 pDONR223 质粒为模板，利用引物和高保真酶进行多轮 PCR 反应扩增相应目的序列，通过两步法先后将 CXCL9 和 IL-7 序列插入 pSC65 载体，经酶切、连接及筛选后获得目的质粒，具体构建步骤为：首先以 pDONR223 质粒(含 CXCL9 CCDS 目的基因序列)为模板，用引物 5'ATGAAGAAAAGTGGTGTCTTTTCC 和 3'GGAAAAGAACACCACTTTTCTTCAT 扩增 CXCL9 CCDS 序列。PCR 反应体系 50 μ L:10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, MgSO₄2 μ L, dNTPs 5 μ L, 上游/ 下游引物 1 μ L, KOD plus1 μ L, 质粒模板 0.5 μ L, ddH₂O 34 μ L;PCR 反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 20s, 55 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 25 个循

环;最后 72℃ 延伸 5 min。双酶切 pSC65 载体, 然后分别将连接克隆入载体中, 构建 pSC65-CXCL9 重组载体, 连接后产物经感受态 DH5α 大肠杆菌转化, 经含 100μg/mL 氨苄抗生素的 LB 平板筛选;应用 PCR 鉴定阳性菌落;对阳性菌落 PCR 产物进行测序鉴定。继而用引物 5' ATGTTCCATGTTTCTTTTAGGTATA 和 3'TATACCTAAAAGAAACATGGAACAT 以 pDONR223 质粒(含 IL-7 CCDS 目的基因序列)为模板, 扩增 IL-7 目的基因序列, PCR 反应体系及条件同上。单酶切 pSC65-CXCL9 重组载体, 插入 IL-7 目的基因序列, 连接后产物经 DH5α 感受态大肠杆菌转化, 经含 100μg/mL 氨苄抗生素的 LB 平板筛选, 应用 PCR 鉴定阳性菌落, 采用质粒提取试剂盒提取质粒随后对 pSC65-CXCL9-IL7 质粒分别行两次双酶切鉴定, 酶切位点选定为 CXCL9 和 IL7 插入载体时的连接位点。对双酶切鉴定吻合的阳性菌落提取质粒后 PCR 产物进行测序鉴定。即而完成 pSC65-CXCL9 -IL7 重组载体的构建。重组痘苗病毒真核表达质粒 pSC65-CXCL9-IL7 的构建流程如图 2 所示。

10.12201/bmr.202607.00010V1

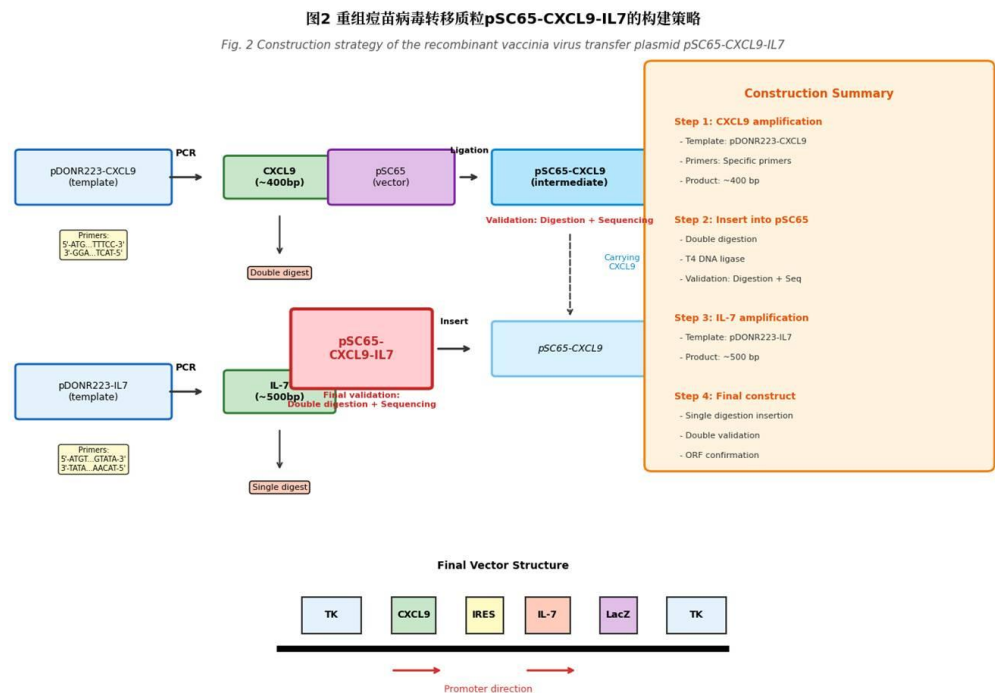


图 2 重组痘苗病毒转移质粒 pSC65-CXCL9-IL7 的构建策略

Fig. 2 Construction strategy of the recombinant vaccinia virus transfer plasmid pSC65-CXCL9-IL7.

图 2 pSC65-CXCL9-IL7 重组质粒的分步构建策略。(A)CXCL9 基因扩增: 以 pDONR223-CXCL9 为模板, 使用特异性引物 (5'-ATGAAGAAAAGTGGTGTCTTTTCC-3'和 3'-GGAAAAGAACACCACTTTTCTTCAT-5') PCR 扩增 CXCL9 编码序列 (~400 bp), 经双酶切后定向克隆; (B)中间载体构建: CXCL9 片段插入 pSC65 载体 TK 基因座, 构建 pSC65-CXCL9 中间载体, 经酶切鉴定和测序验证; (C)IL-7 基因扩增: 以 pDONR223-IL7 为模板, 使用引物 (5'-ATGTTCCATGTTTCTTTTAGGTATA-3'

和 3'-TATACCTAAAAGAAACATGGAACAT-5') 扩增 IL-7 序列 (~500 bp)，单酶切处理；(D)双基因载体构建：IL-7 片段插入 pSC65-CXCL9，经两次双酶切鉴定（分别验证 CXCL9 和 IL-7 插入方向）和测序验证，获得最终载体 pSC65-CXCL9-IL7。右侧为构建流程总结，底部显示最终载体的基因排列结构（TK-CXCL9-IRES-IL-7-LacZ-TK）及启动子方向。

1.2.2 构建 VV-CXCL9-IL7 重组痘苗病毒：以 6 孔板接种 HeLa 细胞，培养至 70% 汇合度，继而以调整培养液病毒滴度为 MOI=0.05PFU/细胞感染细胞 2h，而后以 Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒将质粒 pSC65-CXCL9-IL7 转染细胞，具体操作按照 Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒说明书进行。37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 4-6 h 更换完全培养基继续培养 48h。于倒置显微镜下观察细胞状态，直至大部分细胞出现被感染的病理现象，采用氯化铯密度梯度离心法收集并纯化重组病毒具体过程如下：消化并重悬浮细胞并离心收集于离心管中，收集细胞沉淀，用缓冲液冲重悬所述细胞沉淀，得到重悬液，依次置于-80 °C 和 37 °C 反复冻融 3 次处理破碎所述重悬液中的细胞，将所述重悬液进行第二次离心，收集上清液，将所得上清液加入至氯化铯密度梯度介质溶液中，进行密度梯度离心，吸取完整病毒颗粒带溶液。而后将所述完整病毒颗粒带溶液进行浓缩、换液以及过滤，得到含有 VV-CXCL9-IL7 重组痘苗病毒的溶液保存于-80 °C 冰箱中备用。

1.2.3 VV-CXCL9-IL7 体外感染胃癌细胞能力检测 采取 TCID₅₀ 法测定重组病毒感染能力具体如下：在离心管中用 MEM 将病毒液作连续 10 倍的稀释。将稀释好的病毒接种到 96 孔培养板中，每一稀释度接种一纵排，共 8 孔，每孔接种 100 μl。在每孔加入细胞悬液 100 μl，调整细胞量达到 3×10^5 个/ml。设正常细胞对照，正常细胞对照作两纵排（100 μl MEM 培养液+100 μl 细胞悬液）。连续观察并记录结果，观察 7 日计数细胞蚀斑形成单位。结果的计算，按 Reed-Muench 两氏法计算。

1.2.4 VV-CXCL9-IL7 体外感染胃癌细胞产生 CXCL9 及 IL7 能力检测 以纯化的重组痘病毒 VV-CXCL9-IL7、野生 VV 感染人胃癌 SCG7901 细胞系 60h 后离心分离分别收集细胞培养上清和细胞沉淀。沉淀物以生理盐水冲洗 3 次后以 50 mg/ml 比例加生理盐水，4 °C 环境下充分研磨，研磨均匀成为匀浆后移入 EP 管中，在 4 °C (3000r/min) 离心 20 min，收集上清液-80 °C 保存以备检测。ELISA 检测细胞培养上清和细胞匀浆中 CXCL9 和 IL7 的表达水平，并以正常培养的未感染 SCG7901 细胞为空白对照。

1.2.5 VV-CXCL9-IL7 体外对胃癌细胞杀伤率检测 采用 MTT 比色法，将靶细胞接种于 96 孔板中，每孔约 1×10^4 个细胞，培养 24h 后，设置靶细胞空白对照，按

下述实验分组加入不同组分，每组设置 5 个重复对照。A 组：VV-CXCL9-IL7（100MOI）+SCG7901 细胞（ $2 \times 10^5/\text{ml}$ ）；B 组：野生 VV（100MOI）+ SCG7901 细胞（ $2 \times 10^5/\text{ml}$ ）；C 组：等量生理盐水(NS)+ SCG7901 细胞（ $2 \times 10^5/\text{ml}$ ）。细胞培养 72h 后，每孔各加入 30 μ l MTT(5mg/ml)孵育 4h，吸去上清后每孔加入 DMSO 100 μ l 并振摇 30min，用酶标仪测定，检测波长为 590nm。按公式计算出杀伤率。

$$\text{杀伤率} = \left[1 - \frac{\text{实验孔 A 值}}{\text{空白对照孔 A 值}} \right] \times 100\%$$

1.2.6 细胞生长曲线检测 将 SGC7901 细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 96 孔板，培养 24 h 后按实验分组处理：A 组加入 VV-CXCL9-IL7（100 MOI），B 组加入野生 VV（100 MOI），C 组加入等量生理盐水。分别于 0、1、2、3、4、5、6 天使用细胞计数仪计数各组活细胞数，绘制细胞生长曲线，计算相对细胞数。”

1.2.7 流式细胞仪法检测细胞周期与凋亡情况 在普通细胞培养瓶中将上述各组处理后的细胞培养至 70%铺满后换用无血清培养基培养并完成同步化，继续培养 24 小时后将细胞消化以无水乙醇固定过夜后 PI 染色 30 分钟后上流式细胞仪检测细胞周期。同样完成同步化后继续培养 24 小时后将细胞消化后以 PI、AnexinV-FITC 双染法染色后上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。每组设立 5 个重复实验组计算平均值进行比较

1.2.7 统计学处理

利用双因素及单一因素方差分析等方法进行统计学分析。所有数据均采用 SPSS 17.0（SPSS Inc.，芝加哥，伊利诺伊州，美国）统计软件包进行分析。P<0.05 表示有统计学意义的差异。

2 结果

2.1 重组质粒 pSC65-CXCL9-IL7 的鉴定 对构建的 pSC65-CXCL9-IL7 进行两次双酶切鉴定，分别获得线性 pSC65-CXCL9 和 IL7 条带及线性 pSC65-IL7 和 CXCL9 条带，各条带出现于电泳相应位置（图 3A）。质粒相应测序结果与插入目的基因 CCDS 完全吻合。

2.2 VV-CXCL9-IL7 体外感染胃癌细胞能力检测结果 倒置显微镜连续观察观察 7 日并记录结果，在感染第 30 小时左右可见形成明显蚀斑，观察 7 日计数每孔细

胞蚀斑形成数并计算平均值,通过 Reed-Muench 两氏法公式计算得 VV-CXCL9-IL7 感染胃癌 SCG7901 细胞的 $TCID_{50}=1.34\times 10^7/100\mu l$,野生型 VV 感染胃癌 SCG7901 细胞的 $TCID_{50}=1.27\times 10^7/100\mu l$ (图 3B)。

2.3 VV-CXCL9-IL7体外感染胃癌细胞产生CXCL9及IL7能力检测 各组细胞培养上清中IL-7和CXCL9浓度差异均明显,其中,感染VV-CXCL9-IL7组显著高于其它各组 ($P<0.05$),另外两组之间无显著差异,其余各组间亦无显著差异。各组细胞匀浆中IL-7和CXCL9浓度差异均明显,结果与血清中浓度差异一致 (表1,图 3C)。

表 1 各组细胞培养上清及细胞匀浆中因子水平比较

Tab. 1 Comparison of target cytokine levels in cell culture supernatant and cell homogenate of each group ($\bar{x}\pm s$, Pg / mL)

检测指标/组别	上清 IL-7	上清 CXCL9	细胞匀浆 IL-7	细胞匀浆 CXCL9
VV-CXCL9-IL7 组	43.66 $\pm$ 7.27*	77.68 $\pm$ 13.11*	127.45 $\pm$ 31.32*	179.54 $\pm$ 42.66*
野生 VV 组	6.68 $\pm$ 1.55	3.42 $\pm$ 0.54	16.22 $\pm$ 3.17	18.57 $\pm$ 1.47
未感染 SCG7901 细胞组	5.36 $\pm$ 1.04	5.59 $\pm$ 0.42	12.87 $\pm$ 2.46	13.39 $\pm$ 2.79

(*表示与其它各组两两比较均有显著差异, $P<0.05$ 。)

2.4 VV-CXCL9-IL7 体外对胃癌细胞杀伤率检测结果 A 组 VV-CXCL9-IL7 杀伤组对 SCG7901 细胞株杀伤率为 $43.47\pm 5.51\%$ 显著高于其余各对照组 ($P<0.05$),且 B 组又显著高于 C 组 ($P<0.05$) 具体结果见图 3D。

2.5 流式细胞仪法检测细胞周期与凋亡结果 A 组 VV-CXCL9-IL7 杀伤组细胞处于 G0-G1 期的细胞比例显著高于其余各组,处于 G2-M 期及 S 期的细胞比例显著低于其它各组 ($P<0.05$)。B 组处于 G0-G1 期的细胞比例显著高于 C 组,处于 S 期的细胞比例显著低于 C 组 ($P<0.05$)。A 组 VV-CXCL9-IL7 杀伤组细胞的凋亡比例显著高于其它各组,B 组凋亡比例又显著高于 C 组 ($P<0.05$) (表 2、表 3,图 3E、图 3F)。

表 2 各组细胞周期检测结果

	例数	G0—G1 (%)	G2—M (%)	S (%)
A 组	5	46.22 $\pm$ 5.17**	15.17 $\pm$ 3.44**	38.61 $\pm$ 4.66**

B 组	5	25.65±4.26*	26.24±3.11	48.11±2.43*
C 组	5	15.54±3.24	25.37±4.16	59.09±6.54

(**表示与 B、C 各组两两比较有显著差异，P<0.05； *表示与 C 组两两比较有显著差异，P<0.05)

表 3 各组细胞凋亡检测结果

	A 组	D 组	G 组
例数	5	5	5
平均凋亡率 (%)	13.56±3.41**	5.26±1.54*	0.84±0.14

(**表示与其它各组两两比较有显著差异，P<0.05。*表示与 C 组两两比较有显著差异，P<0.05。)

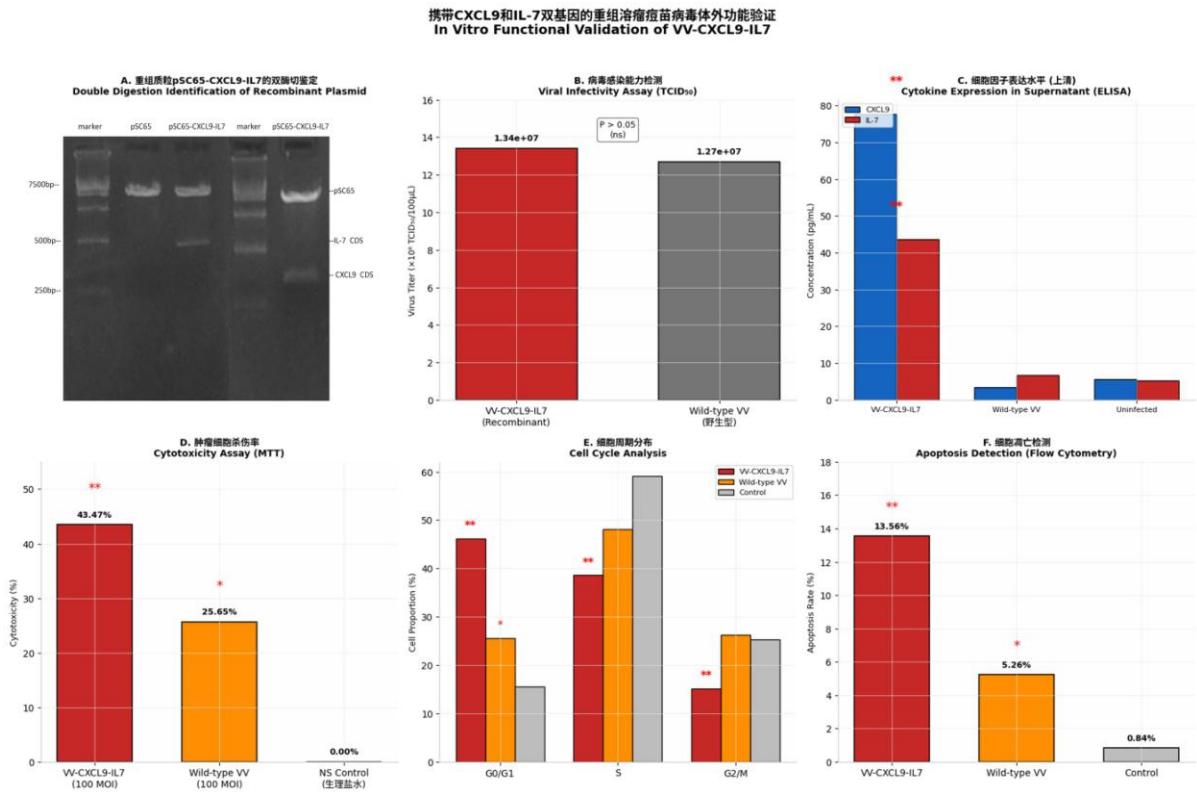


图 3 携带 CXCL9 和 IL-7 双基因的重组溶瘤痘苗病毒体外功能验证

Fig. 3 In vitro functional validation of recombinant oncolytic vaccinia virus carrying CXCL9 and IL-7 genes

图3 VV-CXCL9-IL7 重组病毒的构建鉴定及体外功能验证。(A)重组质粒 pSC65-CXCL9-IL7 的双酶切鉴定：分别获得线性 pSC65-CXCL9 和 IL7 条带（酶切1）以及线性 pSC65-IL7 和 CXCL9 条带（酶切2），证实双基因正确插入；(B)病毒感染能力：TCID₅₀法测定显示重组病毒与野生型病毒感染滴度无显著差异（ 1.34×10^7 vs 1.27×10^7 TCID₅₀/100 μ L, $P>0.05$ ）；(C)细胞因子表达：ELISA 检测显示 VV-CXCL9-IL7 组培养上清中 CXCL9（ 77.68 ± 13.11 pg/mL）和 IL-7（ 43.66 ± 7.27 pg/mL）浓度显著高于野生 VV 组和对照组（ $P<0.01$ ）；(D)细胞杀伤率：MTT 法检测显示 VV-CXCL9-IL7 组杀伤率为 $43.47\pm5.51\%$ ，显著高于野生 VV 组（ $25.65\pm4.26\%$ ）和对照组（ $P<0.01$ ）；(E)细胞周期分布：流式细胞术显示 VV-CXCL9-IL7 组 G0/G1 期比例（ $46.22\pm5.17\%$ ）显著高于其他组，S 期和 G2/M 期比例降低（ $P<0.01$ ）；(F)细胞凋亡率：Annexin V-FITC/PI 检测显示 VV-CXCL9-IL7 组凋亡率为 $13.56\pm3.41\%$ ，显著高于野生 VV 组（ $5.26\pm1.54\%$ ）和对照组（ $P<0.01$ ）。* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

2.6 VV-CXCL9-IL7 对胃癌细胞生长的持续抑制及剂量效应分析

为评估 VV-CXCL9-IL7 对胃癌细胞生长的持续抑制作用，进行了细胞生长曲线检测。如图 4A 所示，VV-CXCL9-IL7 组细胞增殖受到显著抑制，第 6 天相对细胞数仅为 2.5 倍，而野生 VV 组为 9 倍，对照组达 16 倍（ $P<0.01$ ），表明重组病毒不仅能杀伤细胞，还能持续抑制存活细胞的增殖。进一步进行剂量效应分析（图 4B），结果显示 VV-CXCL9-IL7 的细胞杀伤作用呈明显的剂量依赖性，半数抑制浓度（IC₅₀）约为 25 MOI，而野生 VV 组在 100 MOI 时杀伤率仅为 26%，未能达到 IC₅₀，表明双基因插入显著增强了病毒的抑瘤效力。

代表性流式细胞术散点图（图 4C）显示，VV-CXCL9-IL7 组晚期凋亡细胞占 13.5%，早期凋亡 2.1%，存活细胞 82.1%，与凋亡检测结果一致。

综合效果雷达图（图 4D）从感染能力、CXCL9 表达、IL-7 表达、细胞杀伤、凋亡诱导和周期阻滞六个维度全面比较了三组实验效果，显示 VV-CXCL9-IL7 在各项功能指标上均显著优于野生 VV 和对照组。”

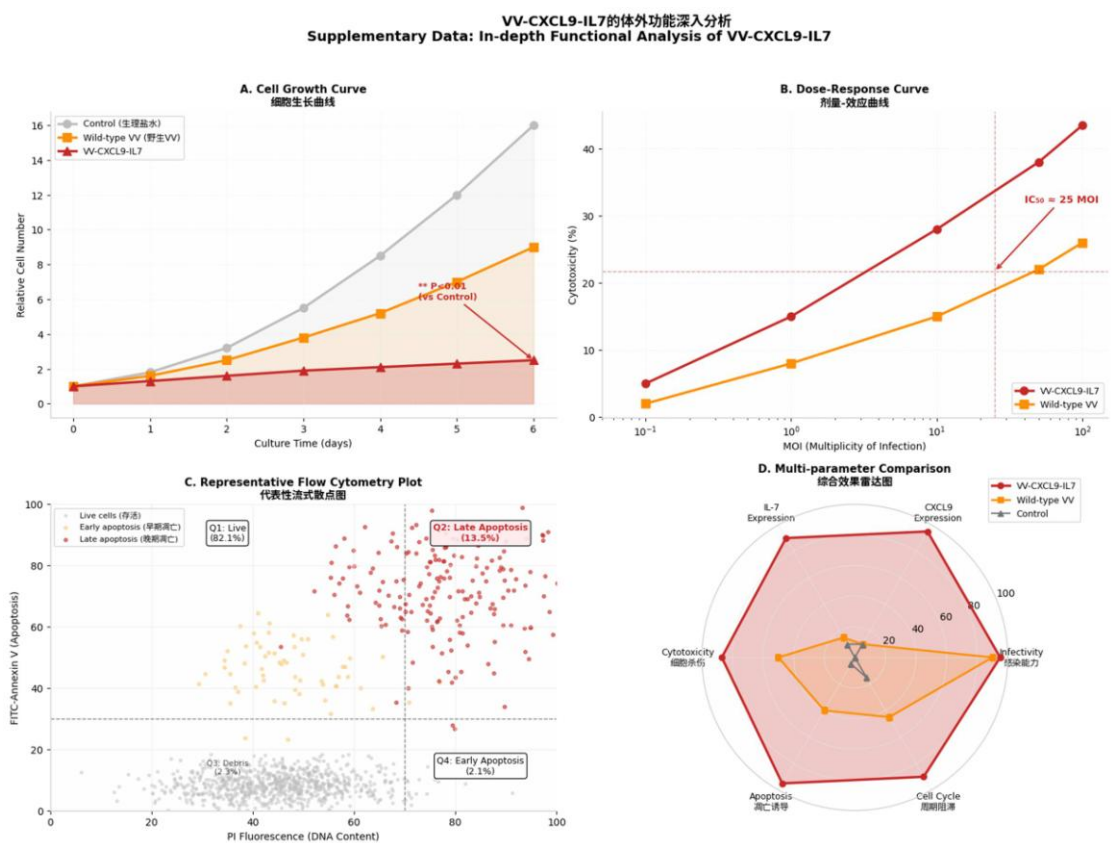


图 5 VV-CXCL9-IL7 对胃癌细胞的持续抑制及综合效应分析
Fig. 5 Sustained inhibition and comprehensive effects of VV-CXCL9-IL7 on gastric cancer cells
图 5 VV-CXCL9-IL7 对 SGC7901 细胞的持续抑制及多维度效应分析。(A)细胞生长曲线：连续 6 天监测显示 VV-CXCL9-IL7 组细胞增殖持续受抑（第 6 天 2.5 倍），显著低于野生 VV 组（9 倍）和对照组（16 倍）（**P<0.01**）；(B)剂量-效应曲线：VV-CXCL9-IL7 杀伤率呈剂量依赖性增加，IC₅₀约为 25 MOI，而野生 VV 组在 100 MOI 时杀伤率仅 26%；(C)代表性流式散点图：Annexin V-FITC/PI 双染显示 VV-CXCL9-IL7 组晚期凋亡细胞占 13.5%，早期凋亡 2.1%，存活细胞 82.1%；(D)综合效果雷达图：六维度比较显示 VV-CXCL9-IL7（红色）在感染能力、细胞因子表达、细胞杀伤、凋亡诱导和周期阻滞方面全面优于野生 VV（橙色）和对照组（灰色）。

3 讨 论

胃癌是起源于胃粘膜腺上皮细胞的恶性肿瘤，目前世界范围内发病率居所有恶性肿瘤第七位，我国居于发病率第三位，死亡率第四位，恶性程度极高，疾病负担沉重，是人类医学的重大难题⁽¹²⁾。因此针对晚期胃癌有效而低副反应的治疗方法是当前研究的热点。生物免疫治疗作为最为接近人体自然抵抗肿瘤方式的治疗方法近年来成为肿瘤治疗一个主要的方向，许多生物免疫治疗方案在结肠癌、恶性淋巴瘤等多种恶性肿瘤中都取得了令人鼓舞的成果，但国内外针对胃癌的生物免疫治疗研究与临床实践相对滞后^(13,14)。本研究组前期分别采用 MUC1 单克隆抗体偶联的载吉西他滨纳米粒进行了治疗胰腺癌和胃癌的体外细胞和模型

10.12201/bmr.202607.00010V1

动物体内实验，结果提示这抗体偶联的载药纳米粒体内均能够起到良好的抗肿瘤作用^(15,16)。但是该治疗策略也存在几个主要的问题：1、单独使用抗体偶联的载药纳米粒对肿瘤局部的杀伤作用仍不足。2、抗体偶联的载药纳米粒对肿瘤局部免疫激活和调动全身抗肿瘤免疫反应作用偏弱。近年来，随着对于肿瘤生物免疫治疗技术研究的深入，溶瘤病毒逐渐成为了研究的热点，并且在基础与临床研究中取得了巨大进展。溶瘤病毒是天然或基因工程病毒，可以选择性地在肿瘤细胞中复制并杀死肿瘤细胞。目前，单纯疱疹病毒（HSV）、腺病毒（ADV）和痘苗病毒（VV 或 VACV）是三种最常用于癌症治疗的溶瘤病毒。其中痘苗病毒的具有以下作为溶瘤病毒的特定优势⁽¹⁷⁻¹⁹⁾：1、痘苗病毒基因组大，使其能够插入并表达较大的目的基因 DNA 片段，从而感染肿瘤组织产生所需的治疗目的分子；2、痘苗病毒在细胞质中完成整个复制周期，不需要进入细胞核，对于生物细胞基因组整合性小，潜在致癌致畸作用小安全性高；（3）痘苗病毒为常用的免疫预防用病毒，临床应用广泛，数据积累两大；（4）痘苗病毒刺激系统免疫作用，产生全身性抗肿瘤免疫反应，有利于远处和转移性肿瘤的治疗。因此该病毒成为目前治疗性溶瘤病毒的一个主要方向，也是本研究选择作为治疗手段的重要原因。针对前期研究存在的问题，在本研究中我们采用了以痘苗病毒为基础构建重组溶瘤病毒。在治疗性目的基因选择方面，我们采用了插入能够具有更好激发局部产生溶瘤作用并且能够产生重要抗肿瘤免疫的炎症促进细胞因子 IL-7 和主要 T 淋巴细胞趋化因子 CXCL9 作为肿瘤免疫微环境重塑的推动目的分子，本研究中采用的重组溶瘤病毒本身具有较强的溶瘤能力而且感染肿瘤细胞后可产生重要的细胞因子 IL-7 和 CXCL9，目前的研究认为 IL-7 在肿瘤中具有很强的炎症反应促进能力、协同免疫检查点阻断治疗能力及免疫微环境重塑能力^(20,21)。而 CXCL9 具有强大的 T 淋巴细胞趋化能力和一定的抑瘤能力，能够从循环中募集具有抗瘤能力的 T 淋巴细胞向肿瘤组织聚集^(22,23)。本研究希望通过综合上述的重组痘苗病毒设计而构建的治疗性溶瘤病毒形成强大的肿瘤局部杀伤及免疫微环境重塑而激发全身系统免疫反应达到肿瘤清除作用（图 5）。

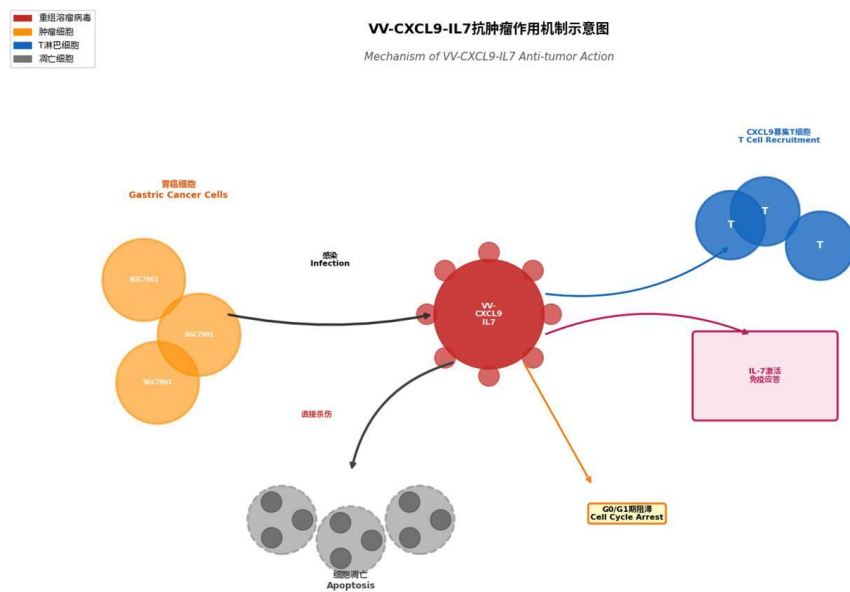


图 5 VV-CXCL9-IL7 抗肿瘤作用机制示意图

Fig. 5 Schematic diagram of anti-tumor mechanism of VV-CXCL9-IL7

图 5 VV-CXCL9-IL7 重组溶瘤痘苗病毒抗肿瘤作用机制。病毒通过感染胃癌细胞 SGC7901，在细胞内复制并表达 CXCL9 和 IL-7 双基因。CXCL9 作为 T 淋巴细胞趋化因子，可募集外周 T 细胞向肿瘤部位聚集；IL-7 促进 T 细胞存活、增殖和活化，重塑肿瘤免疫微环境。同时，病毒复制直接导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期，并诱导细胞凋亡，发挥直接溶瘤作用。该“直接杀伤+免疫激活”的双重机制为胃癌治疗提供了新的策略。

研究结果显示通过基因工程的方法成功制备了携带 IL-7 和 CXCL9 基因的重组 VV-IL-7-CXCL9 溶瘤痘苗病毒。在体外细胞实验中采用了 MTT 肿瘤细胞杀伤实验法、流式细胞仪检测细胞周期及凋亡对重组溶瘤病毒抑瘤效果进行评估，各方法总体结果基本一致也反应了 VV-IL-7-CXCL9 溶瘤痘苗病毒体外对于胃癌细胞具有一定的抑瘤作用。但是其抑瘤率在百分之四十左右，与其他治疗措施相比相对较低，这种情况可能由于离体培养的肿瘤细胞本身无法模拟体内的肿瘤免疫微环境，而 VV-IL-7-CXCL9 溶瘤痘苗病毒的抑瘤能力需要其他免疫效应细胞共同作用。这一情况提示在使用重组溶瘤病毒进行肿瘤治疗时需要同时给予免疫效应细胞配合^{〔24, 25〕}。在本研究中我们采用了 ELISA 法检测了感染重组溶瘤病毒胃癌细胞培养上清液及细胞匀浆中 IL-7 和 CXCL9 两种目标分子的表达水平。结果提示在上清和细胞匀浆中两种分子浓度均明显升高，这一结果表明 VV-IL-7-CXCL9 溶瘤痘苗病毒感染肿瘤细胞后可以产生并向胞外基质中分泌这两种炎性细胞因子，在体内

可能达到募集免疫效应细胞激活系统免疫的作用。对于胃癌这种发生于消化道的肿瘤可通过内镜下直接瘤内注射实现局部感染而大量分泌细胞因子进入循环募集免疫效应细胞激活系统免疫产生抗肿瘤作用。

尽管本研究在体外验证了 VV-CXCL9-IL7 的抑瘤效果，但要实现临床转化仍需解决若干关键问题（图 6）。首先，需建立胃癌动物模型（如 PDX 模型或转基因小鼠）验证体内疗效，评估病毒的肿瘤靶向性、系统毒性及免疫原性。其次，需要开展药代动力学研究，确定最佳给药剂量、频次和途径。考虑到胃癌的解剖学特点，内镜下局部瘤内注射是一种可行的给药方式，可实现病毒在肿瘤局部的富集，同时减少全身暴露。此外，鉴于 IL-7 和 CXCL9 在免疫检查点阻断治疗中的协同作用[20,22]，VV-CXCL9-IL7 与 PD-1/PD-L1 抑制剂的联合应用值得探索。总之，本研究为胃癌的生物免疫治疗提供了新的候选药物，后续研究将围绕临床转化展开，期待为晚期胃癌患者带来新的治疗选择。

10.12201/bmr.202607.00010V1

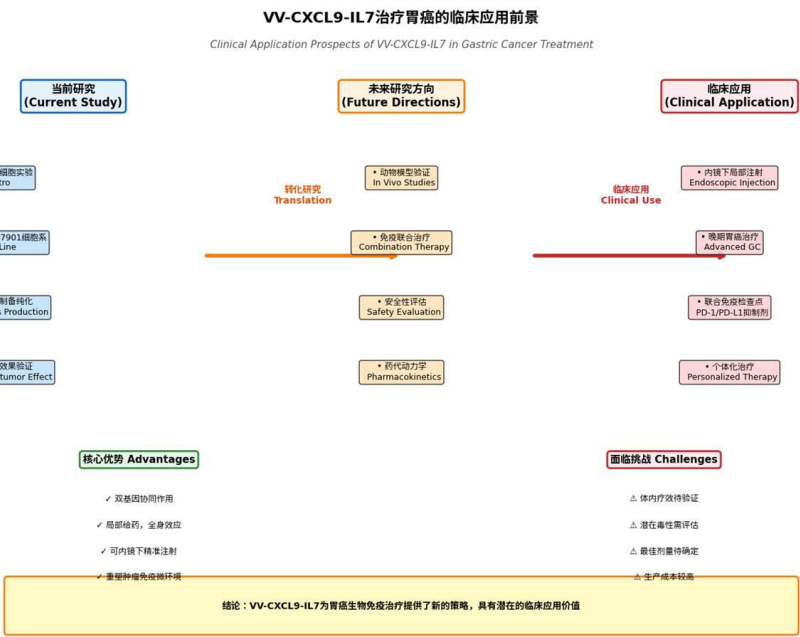


图6 VV-CXCL9-IL7的临床转化研究路径

Fig. 6 Clinical translation roadmap of VV-CXCL9-IL7.

图6 VV-CXCL9-IL7从基础研究到临床应用的转化路径。当前研究已完成体外概念验证（Proof of Concept），下一步需开展动物模型验证（体内疗效和安全性）、药代动力学研究及免疫原性评估。针对胃癌的临床特点，VV-CXCL9-IL7可通过内镜下局部注射实现精准给药，与PD-1/PD-L1抑制剂联合应用可能产生协同效应。未来发展方向包括优化病毒载体、建立GMP生产工艺、开展I/II期临床试验。

参考文献：

1. 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国胃癌筛查与早诊早治指南(2022, 北京) [J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 7: 634-666.
2. 中国抗癌协会胃癌专业委员会, 李凯, 徐惠绵. CACA 胃癌整合诊治指南(精简版) [J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(014):703-710.
3. 邱海波, 曹素梅, 徐瑞华. 基于 2020 年全球流行病学数据分析中国癌症发病率、死亡率和负担的时间趋势及与美国和英国数据的比较[J]. 《癌症》, 2022, 32(4):165-177.
4. 张晨, 苏文. 胃癌免疫治疗研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2021, 33(7): 481-484.
5. 于园园, 孟千皓. 胃癌免疫治疗困境与未来方向[J]. 实用肿瘤学杂志, 2021, 35(6): 552-556.
6. 朱军, 黄美金, 陈宏. 进展期胃癌免疫治疗的研究进展[J]. 癌症进展, 2022, 20(12):1189~1193.
7. Shuguang Zuo, Min Wei, Tiancheng Xu, et al. An engineered oncolytic vaccinia virus encoding a single-chain variable fragment against TIGIT induces effective antitumor immunity and synergizes with PD-1 or LAG-3 blockade[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(12):e002843.
8. Giulia Marelli, Louisa S Chard, Dunmall, Ming Yuan, et al. A systemically deliverable Vaccinia virus with increased capacity for intertumoral and intratumoral spread effectively treats pancreatic cancer[J]. J Immunother Cancer, 2021,9(1):e001624.
9. Johannes P. W. Heidebuechel, Christine E. Engeland. Oncolytic viruses encoding bispecific T cell engagers: a blueprint for emerging immunovirotherapies[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14: 63.
10. Qing Ji, Yuchen Wu, Andreas Albers, et al. Strategies for Advanced oncolytic virotherapy: current technology innovations and clinical approaches[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(9): 1811.
11. 李丹洋, 方敬敬, 唐慧. 重组溶瘤痘病毒 rVV-CCL5-SSTR2-Luc+的构建及其杀瘤活性[J]. 基础医学与临床, 2020, 40(4):460-468.

12. 李国新. 胃癌外科2021年研究进展及学科展望 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2022, 25(1): 15-21.
13. Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalpour S, et al. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer [J]. Cells, 2020, 9(3):618.
14. Li F, Chen Y, Pang M, et al. Immune checkpoint inhibitors and cellular treatment for lymphoma immunotherapy[J]. Clin Exp Immunol, 2021, 205(1):1-11.
15. Zhang L, Hou Y, Li C, et al. Comparative study on the antitumor effects of gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles coupled with anti-human MUC1 and CA199 monoclonal antibodies on pancreatic cancer in vitro and in vivo. Arab J Gastroenterol, 2022, 23(4):263-269.
16. Zhang L, Zhu J, Hou Y, et al. A study on the antitumor effect of gemcitabine polybutylcy- anoacrylate nanoparticles coupled with Mucin 1 monoclonal antibody on pancreatic cancer in vitro and in vivo. J Cancer Res Ther, 2021,17(7):1702-1708.
17. Zong Sheng Guo, Binfeng Lu, Zongbi Guo, et al. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7: 6.
18. Tomoyoshi Inoue, Thomas Byrne, Mitsuko Inoue, et al. Oncolytic vaccinia virus gene modification and cytokine expression effects on tumor infection, immune response, and killing[J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(8): 1481–1494.
19. Dana Haddad. Genetically Engineered Vaccinia Viruses As Agents for Cancer Treatment, Imaging, and Transgene Delivery[J]. Front Oncol, 2017, 7: 96.
20. Tatiana V. Kudling, James H.A. Clubb, Dafne C.A. Quixabeira, et al. Local delivery of interleukin 7 with an oncolytic adenovirus activates tumor-infiltrating lymphocytes and causes tumor regression[J]. Oncoimmunology, 2022; 11(1): 2096572.
21. Xiaojing Xu, Qing Sun, Yu Mei, et al. Newcastle disease virus co-expressing interleukin 7 and interleukin 15 modified tumor cells as a vaccine for cancer immunotherapy[J]. Cancer Sci, 2018,109(2): 279–288.
22. Yasunari Fukuda, Tadafumi Asaoka, Hidetoshi Eguchi, et al. Endogenous CXCL9 affects prognosis by regulating tumor-infiltrating natural killer cells in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Cancer Sci. 2020 Feb; 111(2): 323–333.

23. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 63:40-47.
24. Shi T, Song X, Wang Y, et al. Combining Oncolytic Viruses With Cancer Immunotherapy: Establishing a New Generation of Cancer Treatment[J]. *Front Immunol*, 2020, 28;11:683.
25. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*. 2018 Aug;18(8):498-513.