

应用新城疫病毒治疗肿瘤的研究进展

吴云舟, 郝景波, 李德山

东北农业大学生命科学学院 生物制药教研室, 哈尔滨 150030

摘要: 新城疫病毒可以特异地杀伤肿瘤细胞, 而对正常细胞没有伤害, 目前在临床实验中认为是安全、有效的溶瘤试剂。随着近年来反向遗传操作技术的日趋成熟, 该技术开始应用到新城疫病毒溶瘤效果的优化方面, 通过改造新城疫病毒的 F 基因, 及表达重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, 干扰素- γ , 白细胞介素-2 和肿瘤坏死因子- α 等肿瘤杀伤因子, 使该病毒具备更加优越的肿瘤杀伤能力, 成为肿瘤治疗领域一个新兴的亮点, 为癌症的临床治疗提供了崭新的前景。以下将简要介绍应用反向遗传操作技术重组新城疫病毒优化肿瘤治疗效果的研究进展, 以及本实验室在相关领域的研究情况。

关键词: 溶瘤病毒, 新城疫病毒, 肿瘤杀伤因子

Progress in using Newcastle disease virus for tumor therapy: a review

Yunzhou Wu, Jingbo Hao, and Deshan Li

Pharmaceutical Education and Research Office, School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Naturally existing Newcastle disease virus (NDV) can specifically execute oncolytic ability in clinical studies. Reports from clinical trials using NDV as oncolytic agents showed promise and warrant results in cancer therapy. In recent years, reverse genetics technology has been used widely in the studies of NDV virology. More recently, the technology was applied to optimize the oncolytic efficacy of NDV, for instance, modification of the F gene, and expression of GM-CSF, IFN- γ , IL-2 or TNF- α . NDV is widely investigated in cancer therapy and will definitely offer a prosperous future for clinical cancer therapeutics. We reviewed the developments of cancer therapy by recombinant NDV using reverse genetics technology, as well as our own experience in this domain.

Keywords: oncolytic virus, Newcastle disease virus, tumor necrosis factor

新城疫病毒具有内源性溶瘤能力, 可以特异地杀伤肿瘤细胞, 而对人类正常细胞没有损害, 因此被认为是安全有效的临床溶瘤试剂。随着反向遗传操作技术的成熟, 该技术开始应用到新城疫病毒溶

瘤效果的优化。通过反向遗传操作技术重组的新城疫病毒, 可表达外源性肿瘤杀伤因子, 具备优越的肿瘤杀伤能力, 并在临床实验中取得良好的治疗效果, 成为肿瘤治疗领域新兴热点, 为癌症的治疗提

Received: December 29, 2009; **Accepted:** April 23, 2010

Supported by: Harbin Innovative Talents Fund (No. 2006RFXXS002).

Corresponding author: Deshan Li. Tel: +86-451-55190645; E-mail: deshanli@163.com

哈尔滨市创新人才研究专项资金 (No. 2006RFXXS002) 资助。

供了崭新的前景。本实验室主要从事应用反向遗传操作技术重组 NDV 的研究,工作已取得了一定的进展,目前正在应用已建立的技术平台进行肿瘤治疗的相关研究。以下将结合本实验室的研究工作,对重组 NDV 病毒治疗癌症进行综述。

1 新城疫病毒治疗癌症研究进展

1.1 NDV 病毒的结构

新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 为不分节段的单股负链 RNA 病毒^[1], 隶属副粘病毒科副粘病毒亚科的禽副粘病毒属, 在禽类中有天然的宿主范围。新城疫病毒基因组长约为 15~16 kb, 编码 6 个结构蛋白: 核衣壳蛋白 (NP)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝素神经氨酸酶蛋白 (HN) 和大聚合酶蛋白 (L)。编码这些蛋白的基因按 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' 的顺序依次排列, 每个基因之间包含由非转录的基因序列构成的接合区域, 这些接合区由 3 部分组成: 基因起始序列 (GS)、基因间序列 (IG)、基因终止序列 (GE)。

1.2 NDV 治疗肿瘤的研究

DePace^[2]于 1912 年发现子宫颈癌患者注射狂犬病疫苗后肿瘤发生退化, 从而掀开病毒治疗肿瘤的历史。而后 1971 年匈牙利医生 Csatory^[3]发现患有胃癌的农场主在感染新城疫病毒 (NDV) 后而治愈, 因此发现了 NDV 具有治疗肿瘤的作用。到目前为止 NDV 作为临床实验性溶瘤制剂已超过了 30 年^[4], 随着人们对 NDV 认识的不断加深, 现已证明 NDV 对多种癌症均具有疗效。Csatory 等^[5]报道, 给那些无法实施根治性手术治疗的晚期大肠癌病人注射 NDV(MTH-68/H)疫苗, 取得了令人满意的治疗效果。Liebrich 等^[6]和 Schlag 等^[7]报道了对 23 例大肠癌肝转移的病人进行的体外和 II 期临床试验结果, 其研究表明: 用大肠癌组织制备具有免疫原性的病毒修饰的自体瘤苗可用于癌症的治疗。Cassel 研究小组^[8]用转基因方法治疗 83 例恶性黑色素瘤病人, 60% 以上的肿瘤病人存活无复发, 尤其对那些早期恶性黑色素瘤病人效果明显。随后大量报道证实 NDV 对控制术后 II 期恶性黑色素瘤病人有独特的作用。1994 年 Lorence 等^[9]报道, 局部注射 NDV

73-T 株后, 使无胸腺鼠体内人类神经母细胞瘤种植体完全消失。该研究者认为, NDV 73-T 可选择性地在人类 IMR-32 神经母细胞瘤移植体内复制, 直接诱导较强的抗肿瘤作用。Lorence 等^[10]报道了局部注射 NDV 后使人类纤维肉瘤移植体完全消失的研究结果。

1.3 NDV 治疗肿瘤的机理

2009 年, Schirrmacher 等^[11]研究发现细胞对 NDV 病毒的敏感性与抗病毒基因 *RIG-I*、*IRF3*、*IRF7* 和 *IFN- β* 的基础表达呈负相关。这些基因在正常细胞中表达水平远高于肿瘤细胞, 因此 NDV 可以在肿瘤细胞中进行大量扩增, 特异地杀死肿瘤, 对正常细胞几乎没有影响, 对人类十分安全。此外, 研究表明多数肿瘤细胞大量表达 NDV 的受体——唾液酸, NDV 通过与人或鼠的肿瘤细胞表面所分布的大量唾液酸残基结合而进入细胞, 因此可广泛杀伤各种癌症细胞。

Siba 等^[12]研究发现新城疫病毒介导溶瘤的机制既包括内源通路也包括外源通路。NDV 介导凋亡主要是通过内源性凋亡途径而不依赖干扰素的凋亡信号通路的参与。在 Samal 等的研究中证明 NDV 感染肿瘤细胞后不依赖 p53 激发内源性线粒体途径, 而是通过直接改变线粒体内膜的通透性, 释放细胞色素-c 及其他膜间隙蛋白^[13-14], 激活下游 caspase-9 形成凋亡小体, 进而激活 caspase-3 介导凋亡。在有些肿瘤细胞感染 NDV 的后期发现有 caspase-8 产生, 可以介导外源途径加速肿瘤细胞凋亡过程。NDV 感染肿瘤细胞后, caspase-8 的产生可能通过 2 种途径, 一种是通过 caspase-3 介导激活 caspase-8; 另一种是在一些细胞的感染后期可表达肿瘤坏死因子相关凋亡配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), 并与肿瘤细胞膜上的 TRAIL 受体结合, 从而激活外源性细胞凋亡通路, 但通过抑制外源性细胞凋亡通路发现, 细胞凋亡过程并没有停止, 证明外源途径并不是 NDV 诱导肿瘤细胞凋亡的主要途径。由于病毒诱导凋亡的机制取决于病毒的种类、毒株及细胞类型, 不同的病毒诱导细胞凋亡的方式大不相同, 如呼肠病毒诱导凋亡主要是依赖死亡受体途径, 而包括细胞色素-c 释放以及随后的

caspase-9 活化在内的线粒体通路,并非其诱导凋亡的主要途径^[15]。相反 NDV 主要依赖线粒体凋亡通路而非死亡受体通路,因此 NDV 病毒诱导细胞凋亡的分子机制还有待进一步研究阐明。

2010 年 Beier 等^[16]研究了肿瘤发生与溶瘤病毒 NDV 在肿瘤细胞中复制的关系。应用 siRNA 筛选方法在肿瘤细胞中寻找导致肿瘤细胞对病毒易感的基因,结果发现鸟苷三磷酸酶 Rac1 作为致癌蛋白对 NDV 的复制及肿瘤的锚定非依赖性生长至关重要。Rac1 蛋白的表达可以使 NDV 在非肿瘤细胞复制并发挥溶瘤作用。

1.4 NDV 治疗肿瘤的优势

据报道,NDV 病毒在人类癌细胞内复制是在正常细胞中复制的 10 000 倍,与其他具有内源性溶瘤能力的病毒相比,NDV 没有神经嗜性 (Nonneurotropic),对人类更加安全。有临床实验报道 NDV 感染后,在人群中除有轻微流感症状和轻度结膜炎外,没有其他病理学反应^[17]。同时,NDV 可有选择性地在肿瘤细胞中增殖并起到特异杀伤作用,被认为可作为临床使用的溶瘤试剂。这些研究结果阐明了 NDV 的作用机制,为安全有效地治疗癌症奠定了基础。

随着反向遗传技术的应用,通过对新城疫病毒 F 基因的修饰,及将粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、干扰素- γ 、白细胞介素-2 和肿瘤坏死因子- α 等肿瘤杀伤因子整合到 NDV 基因组,使该病毒具备更加优越的肿瘤杀伤能力,成为当今肿瘤治疗领域一个新兴的热点,为肿瘤的治疗提供了安全有效的手段。

2 反向遗传操作技术研究进展

2.1 反向遗传操作技术的研究及应用

反向遗传操作技术 (Reverse genetics) 与经典遗传学研究路线相反,首先获得生物体基因组全部序列,通过基因工程的手段对靶基因进行必要的加工和修饰,再按生物体组成顺序构建出必需的修饰基因组,从而装配出具有生物活性的重组个体,用以研究生物体基因组与结构和功能的关系,以及人工修饰对生物体的表型、性状产生的影响。目前反向遗传学技术已广泛应用于生命科学研究的各个领

域,尤其在 RNA 病毒的研究方面起到巨大的推动作用。

RNA 病毒的反向遗传操作技术是指由病毒的 cDNA 克隆获得 RNA 病毒的一项技术,该技术通过在体外将病毒基因组 RNA 逆转录成 cDNA,在 DNA 分子水平上对其进行各种体外人工操作 (如定点突变、基因插入或缺失、基因置换等),将病毒基因组 cDNA 和各种辅助元件共转染适当细胞以获得 RNA 病毒,该过程也被称为“病毒拯救”。

2.2 应用反向遗传操作技术拯救 NDV 的研究进展

1999 年 Peeters 等^[18]通过重组禽痘病毒感染 CEF、QM5 细胞,构建可以稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系,首次成功拯救了新城疫病毒 La Sota 株。同年 Oberdoerfer 等^[19]也宣布应用反向遗传操作技术回收新城疫病毒 Clone30 株获得成功。Romer 将 NDV 基因组置于噬菌体 T7 RNA 聚合酶启动子之下,同时为了提高转录后 RNA 的自我切割效率,在 NDV 基因组的下游连接了一段丁肝核酶序列,与表达 NP、P、L 的辅助质粒共转染至稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21 细胞系中,成功从细胞液中收获病毒。Krishnamurthy 等^[20]于 2000 年采用痘苗病毒体系拯救了新城疫病毒 Beaudette C 株。2001 年, Nakaya 等^[21]成功构建并拯救了新城疫病毒 Hitchner B1 株。这些 NDV 毒株拯救的成功,标志着反向遗传操作技术在新城疫病毒研究领域发展成熟。本实验室已应用反向遗传技术将 NDV 基因组全长 cDNA 的克隆质粒,及 L、P、NP 的表达质粒共转染至稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSRT7/5 细胞中,成功拯救了有感染能力的 NDV,建立了病毒拯救的技术平台,为进一步优化重组新城疫病毒成为新一代溶瘤病毒,用于临床癌症治疗奠定了基础^[22]。

3 重组新城疫病毒治疗肿瘤的研究进展

迄今为止国内外临床大多数应用 NDV 治疗肿瘤的实验均为天然毒株。一个不容忽视的问题是:强毒株可感染人,产生如类流感、急性结膜炎等症状,而且一旦强毒株从实验室逃逸,容易感染鸡群,引起新城疫的爆发,造成巨大的经济损失。更重要

的是天然毒株往往为混合群体,是长期增殖和传代过程中变异株的积累,缺少生物制剂所必需的均一性、安全性,无法保证治疗效果。在肿瘤治疗方面,不同毒株新城疫病毒对不同肿瘤细胞的杀伤能力各异,不能保证对所有类型癌症都产生良好的治疗效果。而应用反向遗传操作技术重组病毒治疗肿瘤可有效地解决上述问题,使新城疫病毒在临床癌症治疗中更加安全有效。

近年来,研究者发现很多细胞因子,如白细胞介素(IL)-2、肿瘤坏死因子(TNF)、GM-CSF等可显著增加NDV杀伤肿瘤的效果。2007年García-Sastre等^[23]首次报道了应用重组NDV病毒进行癌症治疗的研究。通过对NDV HitchnerB1株的F基因进行修饰,将具有高融合力的F蛋白与HitchnerB1株的F蛋白进行替换,并对接种CT26细胞的BALB/c小鼠进行注射治疗,研究结果显示与天然NDV相比,重组NDV治疗小鼠效果更为理想。为研究重组NDV表达免疫刺激因子对肿瘤治疗的影响,García-Sastre等^[23]还构建了重组NDV病毒,在P和M基因之间插入外源基因,使之分别能够表达粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),并在荷瘤鼠模型中进行评估,研究发现注射表达IL-2的重组NDV病毒治疗效果最为明显,肿瘤显著减小,多数小鼠肿瘤消失,并且绝大多数小鼠肿瘤没有复发。

同年,Schirmacher等^[24]将粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因分别插入NDV基因组的N基因和L基因之前,使重组NDV病毒可以稳定表达具有生物活性的GM-CSF。用重组病毒感染MCF-7细胞,发现NDV外源基因的插入对NDV病毒的复制和肿瘤特异性没有影响,但是位于N基因之前的GM-CSF表达水平明显高于插入在L基因之前的表达量。与非重组病毒相比,表达GM-CSF的重组病毒可以大幅提高IFN- α 在外周血单核细胞的表达量,在单核细胞和浆细胞样树突细胞引起强烈的IFN- α 反应,增强抗肿瘤效果。

2008年Heng等^[25]在NDV基因组的L蛋白前插入IL-2基因构建重组病毒。研究证明重组IL-2的

NDV病毒在MCF-7、MCF-10、HT29和人Jurkat细胞系中可以持续、稳定地表达具有生物活性的IL-2,并引起肿瘤细胞凋亡。进一步证实了重组IL-2的NDV可以作为溶瘤试剂进行癌症治疗。

同年,Beier等^[26]以NDV MTH68株为骨架,将鼠源抗纤连蛋白ED-BIII重组抗体IgG的25 kDa轻链和50 kDa重链同时插入NDV基因组的F蛋白与HN蛋白之间,使轻链和重链通过NDV在肿瘤细胞表达。用重组病毒感染CHO细胞,检测到有完整的IgG表达。实验证明NDV基因组可以同时容纳2种外源基因,并且对病毒溶瘤特性及繁殖能力没有影响。因此可以推测应用NDV病毒作为载体重组多个肿瘤杀伤因子进行肿瘤治疗,将不会影响病毒本身的特点。为更有效地应用反向遗传操作技术重组NDV治疗肿瘤,还需要进一步确定NDV病毒的有效负载、同时容纳外源基因的数量以及病毒能承受单一外源基因的最大值。该研究开创性地将溶瘤病毒和单克隆抗体融为一体,为开辟新的RNA溶瘤病毒治疗肿瘤奠定了基础。

在研究重组NDV病毒治疗肿瘤的机理方面,García-Sastre等^[27]研究发现NDV病毒的肿瘤治疗效果依赖于T细胞。将外源基因IL-2和肿瘤相关抗原(TAA)插入NDV基因组P基因与M基因之间,研究对肿瘤模型的治疗效果。将重组病毒注射接种CT26肿瘤细胞的BALB/c裸鼠,实验发现裸鼠体内的肿瘤没有消失现象。而对具有免疫能力的BALB/c小鼠接种CT26肿瘤细胞,并进行瘤内注射后发现肿瘤明显消失。裸鼠体内具有正常的巨噬细胞和NK细胞,具有抗原提呈能力,但是Foxn1基因突变导致胸腺退化,T细胞严重缺乏。由此,证明NDV对肿瘤杀伤作用需要T细胞参与。通过对分别接受2种重组病毒治疗的小鼠淋巴细胞进行检测,发现与加入重组GFP的对照组相比均可明显诱导IFN- γ 的表达,证明重组TAA的NDV病毒可以增强T细胞对肿瘤特异性反应,提高对肿瘤的杀伤效果。将表达IL-2与TAA的重组NDV病毒联合治疗肿瘤模型,可使90%的小鼠肿瘤完全消失。

2009年,Fong等^[28]比较了置换较强F蛋白NDV Hitchner B1株与天然NDV Hitchner B1株在人

源黑色素瘤细胞系 SkMel-2、SkMel-119、SkMel-19、DRO90-01 和鼠源黑色素瘤细胞系 B16-F10 中的治疗效果。证明 2 种 NDV 病毒对所有黑色素瘤细胞系都有效果,但重组病毒溶瘤效果明显优于天然病毒。将 2 种病毒中分别插入 IL-2 基因后,重组病毒对 SkMel-2 和 B16-F10 细胞系有明显的杀伤作用。将重组 IL-2 的 2 种病毒注射鼠 B16-F10 黑色素瘤模型,显示出同样的治疗效果,明显提高了模型小鼠的生存率。用 FASC 对接受重组 IL-2 基因的 NDV 治疗的肿瘤分析发现,NDV 在体内对肿瘤的杀伤作用不是由于病毒单独作用的结果,伴随有 CD4 和 CD8 细胞对肿瘤浸润的增加,说明 NDV 病毒在感染的同时还引起了体内针对肿瘤的免疫反应,进一步肯定了重组 NDV 病毒在肿瘤治疗方面的作用。

同年,Zamarin^[29]等以 NDV (F3aa) 株为骨架,将编码流感病毒 NS1 蛋白的基因插入到基因组的 P 蛋白与 M 蛋白之间,使之可以表达 IFN 的拮抗剂 NS1 蛋白。由于一些肿瘤细胞内部存在较强的内源性免疫反应,因此会影响到天然病毒在肿瘤内的复制及传播。表达 NS1 蛋白的病毒可有效地抑制细胞内 IFN 反应,能更彻底地清除动物体内的肿瘤,极大地延长动物存活时间。该研究证明调节肿瘤的内源性免疫反应,可增强 NDV 的溶瘤效果,为研制针对人类肿瘤的溶瘤制剂提供了方向。

本实验室应用拯救获得的 NDV 病毒检测对 A549、HepG2、SMMC-7721、SH-SY5Y 肿瘤细胞系的杀伤效果,实验证明拯救病毒对 4 种细胞系均有杀伤作用,其中对 SH-SY5Y 的杀伤效果尤其明显。本实验室将拯救获得的 NDV 病毒与 IL-2 蛋白协同作用肿瘤细胞,结果表明协同作用的杀伤效果优于拯救的病毒单独作用的效果。

4 技术前景展望

反向遗传操作技术的应用,使人类可以从基因水平对病毒的结构和功能进行研究,在改进溶瘤病毒的溶瘤能力及激活人体自身免疫反应杀伤肿瘤方面取得了突破性进展。至今,通过反向遗传操作技术对 NDV 病毒的改造,已成功构建了多种重组肿瘤杀伤因子的 NDV 病毒,使其可以安全有效地杀伤肿

瘤,更加适应于临床癌症治疗。

目前,NDV 作为肿瘤治疗的手段已经应用于临床治疗研究,随着反向遗传操作技术的应用,使重组 NDV 作为肿瘤治疗制剂进入临床实验成为可能。随着研究的深入,大量的实验数据表明重组 NDV 病毒将作为高效、安全、稳定的溶瘤试剂在癌症治疗领域发挥作用。

REFERENCES

- [1] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol*, 2002, **147**(8): 1655-1663.
- [2] DePace NG. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*, 1912, **9**: 82-88.
- [3] Csatory LK. Viruses in the treatment of cancer. *Lancet*, 1971, **2**(7728): 825.
- [4] Lorence RM, Rood PA, Kelley KW. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1988, **80**(16): 1305-1312.
- [5] Csatory LK, Moss RW, Beuth J, et al. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H). *Anticancer Res*, 1999, **19**(1B): 635-638.
- [6] Liebrich W, Schlag P, Moller P, et al. In vitro and clinical characterisation of a Newcastle disease virus-modified autologous tumor cell vaccine for treatment of colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*, 1991, **27**(6): 703-710.
- [7] Schlag P, Maria Manasterski, Volker Schirmacher, et al. Active specific immunotherapy with NDV modified autologous tumor cells following liver metastases resection in colorectal cancer: first evaluation of clinical response of a phase II trial. *Cancer Immunol Immun*, 1992, **35**(5): 325-330.
- [8] Cassel WA, Murray DR. A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgical with a Newcastle disease virus oncolysate. *Med Oncol*, 1992, **9**(4): 169-171.
- [9] Lorence RM, Reichard KW, Katubig BB, et al. Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1994, **86**(16): 1228-1233.
- [10] Lorence RM, Katubig BB, Reichard KW, et al. Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res*, 1994,

- 54(23): 6017–6021.
- [11] Wilden H, Fournier P, Schirmmacher V, *et al.* Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle disease virus. *Int J Oncol*, 2009, **34**(4): 971–982.
- [12] Subbiah E, Daniel R, Siba KS, *et al.* Newcastle Disease Virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol*, 2006, **80**(15): 7522–7534.
- [13] Boehning D, Patterson RL, Snyder SH, *et al.* Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**(12): 1051–1061.
- [14] Lim ML, Chen B, Beart PM, *et al.* Relative timing of redistribution of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria during apoptosis assessed by double immunocyto-chemistry on mammalian cells. *Exp Cell Res*, 2006, **312**(7): 1174–1184.
- [15] Kominsky DJ, Bickel RJ, Tyler KL, *et al.* Reovirus induced apoptosis requires both death receptor and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. *Cell Death Differ*, 2002, **9**(9): 926–933.
- [16] Puhlmann J, Puehler F, Beier R, *et al.* Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus. *Oncogene*, 2010, **29**(15): 2205–2216.
- [17] Bukreyev A, Huang Z, Yang L, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus expressing a foreign viral antigen is attenuated and highly immunogenic in primates. *J Virol*, 2005, **79**(21): 13275–13284.
- [18] Peeters BP, Leeuw OS, Koch G, *et al.* Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol*, 1999, **73**(6): 5001–5009.
- [19] Oberdoerfer AR, Mundt E, Mebatsion T, *et al.* Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, 1999, **80**(11): 2987–2995.
- [20] Krishnamurthy S, Huang ZH, Samal SK. Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 2000, **278**(1): 168–182.
- [21] Nakaya T, Cros J, Park MS, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Virology*, 2001, **75**(23): 11868–11873.
- [22] Hao JB, Wu YZ, Li DS, *et al.* Rescue of recombinant Newcastle disease virus by reverse genetics. *J Northeast Agric Univ* (Accepted).
郝景波, 吴云舟, 李德山, 等. 利用反向遗传操作技术拯救重组新城疫病毒. 东北农业大学学报 (已接收).
- [23] Vigil A, Park MS, Garcia-Sastre A, *et al.* Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer Res*, 2007, **67**(17): 8285–8292.
- [24] Janke M, Peeters B, Schirmmacher V, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Ther*, 2007, **14**(23): 1639–1649.
- [25] Heng Z, Markus J, Volker S, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. *Virus Res*, 2008, **136**(1/2): 75–80.
- [26] Pühler F, Willuda J, Beier R, *et al.* Generation of a recombinant oncolytic Newcastle disease virus and expression of a full IgG antibody from two transgenes. *Gene Ther*, 2008, **15**(5): 371–383.
- [27] Vigil A, Martinez O, Garcia-Sastre A, *et al.* Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer therapy. *Mol Ther*, 2008, **16**(11): 1883–1890.
- [28] Zamarin D, Vigil A, Fong Y, *et al.* Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy. *Gene Ther*, 2009, **16**(6): 796–804.
- [29] Zamarin D, Martínez-Sobrido L, Fong Y, *et al.* Enhancement of oncolytic properties of recombinant Newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses. *Mol Ther*, 2009, **17**(4): 697–706.