

· 综 述 ·

新城疫病毒抗肿瘤研究进展

王贝贝, 宋丽丽, 马德慧, 东彦新, 王学理

内蒙古民族大学 动物科技学院, 内蒙古 通辽 028042

王贝贝, 宋丽丽, 马德慧, 等. 新城疫病毒抗肿瘤研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1432-1441.

Wang BB, Song LL, Ma DH, et al. Progress in Newcastle disease virus against tumor. Chin J Biotech, 2018, 34(9): 1432-1441.

摘 要: 新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 为副黏病毒科, 禽腮腺炎病毒属 (Avulavirus) 的禽副黏病毒 I 型 (APMV-I), 可对 250 多种禽类造成致死性感染, 给世界范围内的家禽养殖造成了巨大损失。目前, 研究发现 NDV 对人肿瘤细胞具有溶瘤作用, 能够选择性地在癌细胞中复制。并且一些研究已经进行了人体临床试验, 取得了良好的效果。因此, 新城疫病毒是肿瘤治疗的潜在治疗剂。文中就 NDV 结构蛋白与毒力的关系、NDV 直接溶瘤作用、NDV 为载体的肿瘤基因治疗、NDV 抗肿瘤与自噬等进行了综述。

关键词: 新城疫病毒, 溶瘤作用, 自噬, 肿瘤基因治疗

Progress in Newcastle disease virus against tumor

Beibei Wang, Lili Song, Dehui Ma, Yanxin Dong, and Xueli Wang

Animal Science and Technology College, Inner Mongolia University For the Nationalities, Tongliao 028042, Inner Mongolia, China

Abstract: Newcastle disease virus is paramyxoviridae, Avian mumps virus genus type I, and infects more than 250 species of birds, causing huge losses on poultry farming worldwide. Numerous experiments have demonstrated that Newcastle disease virus has oncolytic activity on tumor cells and can selectively replicate in cancer cells. Thus, Newcastle disease virus is a potential therapeutic agent for cancer treatment. Some human clinical trials achieved good results. In this review, we summarized research progress of the relationship between the structural protein of Newcastle disease virus and virulence, anti-tumor and autophagy of Newcastle disease.

Keywords: Newcastle disease virus, oncolytic effect, autophagy, tumor gene therapy

恶性肿瘤严重威胁人类健康。目前对肿瘤的治疗主要依赖于手术、放疗和化疗等方法。20 世纪 50 年代, 人们发现 NDV 能抑制胃癌转移, 因此 NDV 可作为一种新兴的肿瘤生物治疗因子,

其本身的高靶向性以及分子生物技术的成熟使其在肿瘤治疗中的应用研究越来越深入。NDV 能够通过直接溶瘤作用杀死肿瘤细胞, 也可通过感染自体肿瘤细胞制成疫苗对患者进行特异性免疫治

Received: April 23, 2018; **Accepted:** June 12, 2018

Supported by: Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (No. 2013MS0404).

Corresponding author: Xueli Wang. E-mail: wangx19577@aliyun.com

内蒙古自然科学基金 (No. 2013MS0404) 资助。

网络出版时间: 2018-07-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180704.1636.004.html>

疗, NDV 的抗肿瘤特性为恶性肿瘤的治疗开辟了崭新的道路。

1 病毒结构蛋白与毒力的关系

NDV 又称亚洲鸡瘟病毒或伪鸡瘟病毒, 属于副黏病毒科 (Paramyxoviridae)、禽腮腺炎病毒属。该病毒主要危害家禽, 且传播迅速。NDV 为单股负链 RNA 病毒, 编码 6 种结构蛋白和至少 2 种非结构蛋白, 其中, F 蛋白和 HN 蛋白是病毒粒子表面的 2 种纤突蛋白, 是 NDV 感染宿主细胞的主要毒力因子。

NDV 的 HN 蛋白可激活自然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK 细胞) 以及 T 细胞^[1], HN 蛋白位于病毒囊膜外表面, 对受体裂解、受体结合和激活 F 蛋白起到至关重要的作用^[2]。新城疫病毒 HN 蛋白在病毒进入和成熟过程中发挥着一定的作用, 包括与唾液酸受体的结合、激活 F 蛋白促进膜融合、在病毒出芽时促进病毒粒子释放。在无毒的 NDV 毒株中, HN 直接影响毒力。诸如 NDV Ulster 株, 除去 C-末端的延伸 HN 蛋白将被酶解激活, 这种情况在其他的 NDV HN 蛋白中未被发现。Ulster 毒株 HN 蛋白有 616 个氨基酸, 在它的前体 HN₀ 有 45 个氨基酸 C-末端延长, HN₀ 切割后 HN 才具有活性。Ulster 毒株 HN 在氨基酸残基 596 的 C-末端延伸处含有 1 个二硫键, 该二硫键调节 HN 活性和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 二聚体结构域。新城疫病毒 HN 蛋白中的二级唾液酸结合位点和 C-末端的延伸也有关联, C-末端延伸位于 NA 结构域的二聚体界面, 最有可能阻碍其依附功能。以上研究阐明 Ulster 毒株 HN 的 C-末端残基导致 HN 的自动抑制状态、是 HN₀ 裂解的必要条件以及导致相关的毒力降低^[3]。

Heiden 等构建了一个重组病毒, 重组病毒主要由新城疫病毒 clone-30 的主要序列和来自于一个副黏病毒的 F 蛋白序列构成, 此副黏病毒

的脑内接种致病指数 (Intracerebral pathogenicity index, ICPI) 为 1.1, F 蛋白裂解位点序列为 R-R-K-K-R*F, 构建的重组病毒 ICPI 为 0.6, 说明重组病毒致病性减弱。相比之下, 弱毒株 clone-30 的裂解位点由 G-R-Q-G-R*L 变为 R-R-K-K-R*F, 裂解位点改变后病毒的 ICPI 为 1.36, 说明新城疫病毒的毒力除了和 F 蛋白的裂解位点有关, 还受多元因素的调控^[4]。目前研究已经证实 F 蛋白基因胞质尾 (Cytoplasmic tail, CT) 氨基酸和病毒复制与致病机理有关, 通过回补缺乏 2 个或 4 个残基 (rΔ2 和 rΔ4) 的病毒突变体, 进一步利用这 4 个末端残基 (rM553A、rK552A、rT551A、rT550A) 中的单个氨基酸替换来回补病毒突变体。新城疫病毒 F 蛋白 CT 有两个保守的酪氨酸残基 (Y524 和 Y527) 和一个双亮氨酸 (LL536-537)。对于其他的副黏病毒, 这些氨基酸被证明影响融合活性, 是基底靶向的核心要素。2 个和 4 个 CT 氨基酸的缺失与单酪氨酸替换导致超膜融合现象并增进了病毒的复制。进一步研究发现, 在有酪氨酸残基 rY524 和 rY527 的病毒中, 干扰靶向信号并没有减少在分化的犬肾传代细胞顶端或基底表面的表达, 而双酪氨酸突变体在分化的犬肾传代细胞顶端或基底表面的表达减少了。有趣的是, 对于 rL536A 和 rL537A 突变体, F 蛋白在顶端的表达高于在基底表面的表达, 这种影响在 rL537A 突变体更为明显。因此说明新城疫病毒 F 蛋白 CT 的这些野生型残基对 F 蛋白生物学功能有一定的调节作用, 从而调节病毒复制和发病机制^[5]。

2 NDV 的直接溶瘤作用

2.1 直接溶瘤效果

不同 NDV 毒株的溶瘤能力也不相同, 强毒力毒株强于中等毒力毒株, 中等毒力毒株强于弱毒株, 同一毒株由于其浓度与作用时间的不同, 溶瘤效果也不相同, 浓度越大, 作用时间越长,

效果越显著。溶瘤病毒感染肿瘤细胞后,活化了病毒的主要毒力因子,子代病毒可继续感染邻近细胞,因而细胞毒性较强。最理想的抗肿瘤效果是依靠对肿瘤抗原产生特异性识别的 T 细胞,如记忆性 T 细胞、CD4 辅助性 T 细胞和 CD8 细胞毒性 T 细胞。

在 NDV 抗肿瘤机制中, T 细胞及巨噬细胞数量的增加以及机体抗肿瘤作用的增强是重要的抗瘤因素。新城疫病毒可增强人类的抗肿瘤免疫,尤其可增强肿瘤特异性 CTL 的反应和活力^[6],其机制可能与新城疫病毒 HN 蛋白能被免疫系统识别并增强免疫系统对肿瘤细胞的细胞毒性有关^[7]。

为了观察腹腔注射 NDV 对小鼠脾脏 NK 细胞的表达、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 及杀伤 Novikoff 小鼠肝癌细胞的影响,并探讨其与 γ 干扰素 (FN- γ) 的关系, Song 等对 BALB/c 小鼠和 IFN- γ R^{-/-} B6.29S7 小鼠腹腔注射 NDV, 12 h 后,用 ELISA、反转录 PCR、Western blotting 以及乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法检测小鼠外周血 IFN- γ 浓度、NK 细胞中 TRAIL mRNA 转录水平、脾脏 NK 细胞中 TRAIL 蛋白水平、NK 细胞对 Novikoff 肝癌细胞的杀伤作用。结果显示以上实验指标均上调,且 TRAIL 中和抗体能抑制 NK 细胞对 Novikoff 肝癌细胞的杀伤作用。IFN- γ R^{-/-} B6.129S7 小鼠经 NDV 注射后脾脏 NK 细胞的 TRAIL 表达无显著增加^[8]。高翠等为了研究 NDV 弱毒株 HBNU/LSRC/F3 对人食管癌 ECA109 细胞凋亡的影响,并与其他两株弱毒株、中等毒力株 NDV 的抗肿瘤作用进行了比较。研究发现,弱毒力 HBNU/LSRC/F3 株可有效诱导 ECA109 细胞早期凋亡,抑制其增殖,虽略低于中等毒力 Mukteswar 株,但远高于弱毒疫苗 LaSota 株^[9]。

张春晓等^[10]通过用免疫荧光染色法、Transwell 法、蛋白印迹法、明胶酶谱法等检测 NDV D90 对细胞微管和微丝形态的改变、对 HN-6 细胞迁

移和侵袭率的抑制作用、对 RECK、SP1、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响以及 MMP-9、MMP-2 活性的改变。结果表明,NDV D90 能够有效地抑制口腔鳞癌细胞系 HN-6 的迁移和侵袭。

2.2 天然免疫在病毒溶瘤中的作用

天然免疫作为防御病毒的第一道防线,限制了病毒的复制和传播,而适应性免疫在再次感染期间对病毒起着主要作用。抗体可能潜在地会中和溶瘤病毒,大大减少肿瘤部位的病毒剂量^[11]。尽管天然免疫力限制了 NDV 在肿瘤中的复制,但并未影响肿瘤细胞清除率、间接抗肿瘤免疫效果和溶瘤病毒的存活率。天然免疫力可通过增强全身性抗肿瘤特性来提高 NDV 的治疗效力^[12],研究发现,NDV 活化的免疫细胞能够抑制肿瘤,在 Panc02 肿瘤中大量活化的 NK 细胞抑制了肿瘤细胞的生长^[13]。在细胞的天然免疫中,自然杀伤 (NK) 细胞具有强效的抗肿瘤以及抗病毒作用。病毒感染癌细胞下调其 I 类主要组织相容性复合物 (MHC),使其成为 NK 细胞的良好靶标。尽管 NK 细胞可能杀死感染的癌细胞并限制溶瘤病毒的复制,但研究发现 NK 细胞通常对溶瘤病毒的治疗效果具有促进作用。此外, NK 细胞还在树突状细胞 (DC) 的成熟过程中发挥作用,它们还可以通过分泌 IFN- γ 和 TNF- α 诱导癌症干细胞以及低分化癌细胞。一些研究表明, NK 细胞与溶瘤病毒的联合可以导致协同抗肿瘤作用。当溶瘤病毒感染的细胞被吞噬时,病毒被抗原递呈细胞直接通过胞吞作用吸收,或者间接地将病毒抗原呈递给 T 细胞,并最终激活免疫系统对病毒的适应性。尽管获得适应性免疫,但大多数研究表明适应性免疫增强了溶瘤病毒的治疗结果^[14]。

2.3 联合治疗

自 2011 年批准抗 CTLA4 (伊匹单抗) 治疗晚期黑色素瘤以来,抗癌免疫治疗药物的开发蓬勃发展。许多免疫检查点抑制剂的成功开发彻底改

变了癌症治疗的格局。对于某些类型的癌症,针对免疫检查点途径的单一疗法已被证明比传统疗法更有效,并且将免疫疗法与当前的治疗策略相结合可能会产生更好的结果。许多临床前研究表明,联合免疫治疗和放疗可能是协同增强治疗效果的有前途的策略。肿瘤部位的放疗会影响肿瘤细胞和周围的基质细胞。放射诱导的癌细胞受到损伤后暴露了肿瘤特异性抗原,使其可被免疫监视,并促进细胞毒性 T 细胞的激活。辐射诱导的肿瘤微环境调节也可以促进免疫细胞的聚集和浸润。增强的肿瘤识别和免疫细胞靶向性可以激活免疫系统以消除癌细胞。然而,挑战仍然有待解决,在未来以期待最大限度地发挥这种组合功效^[15]。

3 NDV 为载体的肿瘤基因治疗

溶瘤病毒 (Oncolytic virus, OV) 之所以可以治疗肿瘤,首先是毒性有限,其次可在肿瘤中选择性地复制。而天然 NDV 就具备以上两个特点,有肿瘤选择性和细胞毒性而在正常细胞中复制将会受到限制。大量临床试验发现 NDV 需要进一步增强其对肿瘤的靶向来提高治疗效果。由于先天性免疫、补体、细胞外基质等影响,NDV 到达肿瘤时无法达到有效的治疗浓度,并且在肿瘤内扩散不良。解决这些问题对于提高 NDV 的溶瘤效果至关重要,为了获得良好的特异性和治疗效果,研究发现重组新城疫病毒可以有效改善溶瘤效果^[16]。

对于病毒反向遗传系统的建立能够进一步增强操纵病毒的溶瘤活性。为了提高重组 NDV 抑制肿瘤的效果,Niu 等构建了 prNDV-IL15 重组质粒,转染 BHK21 细胞后测定了病毒生长曲线。通过 ELISA 法和 MTT 比较法来检测细胞上清液中 IL15 的表达量以及 rNDV-IL15 和 rNDV 在体外抑制 B16F10 细胞的效果,且比较了两者在黑色素肿瘤荷瘤小鼠的疗效。研究结果表明,插入 IL15

对病毒生长无影响,IL15 在细胞上清液中表达量较高,rNDV-IL15 和 rNDV 对 B16F10 细胞的抑制率与时间相关,但两者的抑制率差异并不显著^[17]。为了解决 NDV 溶瘤细胞效率低下的问题,Zamarin 等构建了一个表达流感 NS1 蛋白的重组 NDV,重组病毒形成合胞体的能力显著增强,可溶解多种人类和小鼠的肿瘤细胞系,并抑制细胞诱导的干扰素反应。使用同系的小鼠黑色素瘤模型发现,对于足部的肿瘤,NDV-NS1 重组病毒比 NDV 对肿瘤的溶解更为有效,且使动物寿命更长。此外,用 NDV-NS1 治疗的小鼠没有任何中毒的迹象,并且呈现出 T 淋巴细胞 (CTL) 反应^[18]。He 等验证了一种腺病毒的抗肿瘤溶瘤能力,在人类端粒酶逆转录酶 (hTERT) 启动子上表达新城疫病毒的 HN 基因 (Ad-hTERTp-E1a-HN),来抑制体外培养的食管癌 EC-109 细胞,降低移植瘤 BALB/c 裸鼠的肿瘤负荷。在体外,Ad-hTERT-E1a-HN 的感染可以显著抑制 EC-109 细胞的生长,并保护正常人肝细胞系 L02 免受 3-(4,5-二甲基噻唑-2-羟基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) 损伤。Ad-hTERT-E1a-HN 还有效选择性地降低 EC-109 细胞的唾液酸水平,而不是在 L02 细胞上降低唾液酸水平。此外,通过吖啶橙和溴化乙锭染色 (AO/EB 染色) Ad-hTERT-E1a-HN 显示诱导凋亡途径,增加了活性氧 (ROS),降低了线粒体膜电位并释放细胞色素 c。在体内,对 BALB/c 裸鼠通过肿瘤内或静脉内注射 Ad-hTERT-E1a-HN,尽管两种治疗方式在肿瘤体积方面均显示出明显的抑制作用,但通过肿瘤内注射 Ad-hTERT-E1a-HN 对治疗产生完全反应^[19]。Wei 等用反向遗传学技术产生重组 rNDV-18HL。通过蛋白质印迹、酶联免疫吸附试验、Transwell 侵袭试验和表面等离子体共振技术鉴定了病毒表达 cHAb18 抗体的特征,其生物分布用活体成像和免疫组织化学进行了评定。结果表明,在 rNDV-18HL 感染的细胞中产生

的 cHAb18 通过细胞溶解释放到上清液中。rNDV-18HL 编码的 cHAb18 抗体对 CD147 保持亲和力,并显示抑制 HCC 细胞的迁移和侵袭。通过嵌入 cHAb18 基因,病毒复制和毒力没有减弱,这显著增强了对残存肿瘤细胞迁移的抑制。选择性复制的 rNDV-18HL 原位肝癌移植瘤导致 cHAb18 原位表达,其进一步诱导肿瘤坏死,减少肝内转移并延长小鼠的存活^[20]。

重组 NDV 作为杀死癌细胞疗效显著且可有效避免单一 NDV 溶瘤效果的弊端。Bai 等通过将白细胞介素-2 (IL-2) 和凋亡相关的肿瘤坏死因子插入到 NDV,构建重组 rNDV 诱导配体的产生。结果发现 rNDV 表达的 IL-2 和配体 (rNDV-IL-2-TRAIL) 通过诱导细胞凋亡能够显著提高 rNDV 的抗肿瘤效果^[21]。Castano 等为了增强对黑色素瘤的溶瘤效果,构建了编码人肿瘤坏死因子受体 Fas 的重组新城疫病毒(rNDV-B1/Fas)。rNDV-B1/Fas 复制与到 rNDV-B1 相似的滴度,在受感染的细胞中 Fas 的过度表达导致更快、更高水平的细胞毒性,增加了细胞凋亡反应,内源性和外源性通路都被激活。此外,同系小鼠黑色素瘤模型的体内研究表明 rNDV-B1/Fas 的溶瘤特性增强,在生存和肿瘤缓解方面有重大改善。研究数据表明,上调新城疫病毒的促凋亡作用来增强其抗肿瘤性能是一种可行的方法^[22]。Buijs 等对表达干扰素 (rNDV-hIFN β -F 0) 或 IFN 拮抗蛋白 (rNDV-NS1-F 0) 以及毒力增强的 rNDV-F 3aa 重组新城疫病毒就人胰腺癌细胞发挥溶瘤作用进行了评价。附加蛋白表达不妨碍病毒复制或细胞毒作用。然而,表达的干扰素导致多复制损失。相反地,重组新城疫病毒 rNDV-F 3aa 提升了病毒的复制。给肿瘤细胞注射 rNDV-hIFN β -F0 后产生了高剂量的 I 型干扰素,而给肿瘤细胞注射 rNDV-NS1-F 0 导致大多数细胞干扰素产生阻滞。用 rNDV-F 3aa 接种人胰腺癌细胞较 rNDV-F 0 引

起了更为明显的细胞毒性。小鼠皮下胰腺癌异种移植的体内实验研究表明只有瘤内注射 rNDV-F 3aa 才会导致肿瘤消退^[23]。以上结果揭示尽管弱毒型重组 rNDVs 调节 I 型干扰素通路蛋白有特异性杀伤作用,中强毒株重组 rNDVs 有着更好的溶瘤疗效。Altomonte 等也报道了一种在 F 基因内有 L289A 突变的 NDV,和 rNDV/F3aa 进行对照,增强了体外培养的肝癌细胞的融合和细胞毒性。rNDV/F3aa (L289A) 体内给药,经肝动脉灌注免疫能力强的布法罗大鼠,导致肝肿瘤特异性合胞体形成和坏死,没有对邻近肝实质造成毒性损害。与此同时延长了大鼠的存活时间。实验表明 rNDV/F3aa (L289A) 是安全的,能比野生型 NDV 更有效地治疗肝癌^[24]。Sánchez 等^[25]研究了减毒弱毒株 NDV-MLS 对人 B 细胞淋巴瘤细胞 (SU-DHL-4) 以及犬源性 B 细胞淋巴瘤细胞的溶瘤效果,将其与健康人和犬外周血单核细胞 (PBMC) 进行比较。和未经处理的对照组相比,NDV-MLS 降低了人 (42% \pm 5%) 和犬 (34% \pm 12%) 肿瘤细胞的存活率,对外周血单核细胞无明显影响。通过流式细胞仪检测肿瘤细胞出现凋亡。在犬 T 细胞淋巴瘤静脉注射 1×10^{12} TCID₅₀ NDV-MLS, 24 h 后通过免疫组化或端点 PCR 检测,仅在肾脏、唾液腺、肺和胃发现病毒。以上实验表明 NDV-MLS 用于治疗淋巴瘤是有前景的,未来的研究需要阐明最佳的治疗方案并制定适当的生物安全措施。

尽管对 NDV 进行了 I/II 期临床治疗癌症试验,但仍需进一步改进肿瘤特异性靶向治疗以提高其治疗指数。系统递送新城疫病毒在治疗浓度方面未能到达实体肿瘤,同时也由于补体、先天免疫和细胞外基质等影响病毒在肿瘤内扩散不良。Shobana 等用 NDV 设计了一种重组 NDV (rNDV),其 F 蛋白由前列腺特异性抗原 (PSA) 裂解。rNDV 在前列腺癌 (CaP) 细胞和立体的前列腺癌细胞球中高效、特异地复制,但在没有 PSA 的

情况下无法复制。通过模拟合成雄激素类似物 (R1881) 诱导细胞内 PSA 生成, 提高了在雄激素应答的 CaP 细胞中的细胞融合。更进一步的, rNDV 引起雄激素非依赖性特异性溶解以及一个半数有效浓度 (EC50) 从 0.01 到 0.1 的多重感染, 雄激素应答/无应答 CaP 细胞和前列腺癌细胞球。这种 F 蛋白由 PSA 裂解的重组 NDV 有效地裂解了前列腺癌细胞球肿瘤病变。PSA 裂解的 NDV 在鸡胚内复制失败, 说明对鸡胚无致病性。由于限制肿瘤复制和提升细胞融合, 前列腺特异抗原靶向可能提高 rNDV 治疗指数^[26]。Yan 等将重组 NDV (RL-RVG) 注入到小鼠肺腺癌 A549 细胞肿瘤中, 探讨其对小鼠细胞增殖和免疫应答的影响。随着 RL-RVG 的转染及 RVG 和 NDV 基因表达, 肿瘤生长减少, 皮下肿瘤坏死, 肿瘤细胞凋亡和自然杀伤细胞数量增多^[27]。RL-RVG 转染有效地抑制了肺腺癌 A549 细胞在体内的生长, 说明与诱导肿瘤细胞凋亡和调节细胞免疫反应有关联。

肿瘤微环境的复杂性包括缺氧的区域。在这些区域, 转录因子、缺氧诱导因子 (HIF) 主动调节许多基因的表达, 这些基因有助于侵袭性的恶性肿瘤、放射和化疗耐药。通过使用缺陷型或重组野生型 *VHL* 基因 (Von Hippel-Lindau) 的肾细胞癌 (RCC) 细胞株来研究 HIF-2 α 存在或缺乏情况下高致病性 NDV 的溶瘤效果。研究发现, 这些 RCC 细胞对新城疫病毒有应答作用仅产生干扰素 IFN- β 而不是 IFN- α , 并且与 STAT1 磷酸化增加相关。野生型 *VHL* 基因表达提高了新城疫病毒诱导 IFN- β 的产生, 导致 STAT1 的磷酸化延长和细胞死亡增加。缺氧增强了新城疫病毒的溶瘤活性^[28]。

4 新城疫抗肿瘤与自噬

NDV 感染肿瘤细胞, 可以诱导宿主细胞产生多种细胞因子, 如: 干扰素 (Interferon, IFN)、

白细胞介素 (Interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 等, 这些细胞因子又会激活巨噬细胞, 致敏 T 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞等, 从而增强机体免疫。

自噬是将细胞质蛋白及细胞器进行自我吞噬并使其包被进入囊泡, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 通过在降解包裹物过程中释放能量来满足细胞本身的代谢和某些细胞器更新所需能量。正常情况下, 自噬可通过降解受损细胞器以及长寿命蛋白和蛋白聚合物来调控细胞的稳态。还可通过限制炎症、清除有毒未折叠蛋白、除去生成活性氧簇的损伤线粒体来抑制肿瘤形成; 肿瘤形成后, 自噬将会为癌细胞提供更丰富的营养来支持肿瘤生长。因此, 在肿瘤形成过程中自噬是一把双刃剑。

细胞死亡被细分为细胞凋亡 (I 型)、自噬性细胞死亡 (II 型) 和坏死 (III 型)。I 型和 II 型细胞死亡之间的界限并不完全清楚。目前研究发现, 参与细胞凋亡的信号转导途径包括: 细胞外源性途径, 即细胞膜上死亡受体激活 Caspase8, Caspase8 激活效应 Caspase, 引发蛋白水解级联反应, 促使细胞凋亡; 另一种是内源性途径, 即线粒体内细胞色素 c 释放到胞浆形成凋亡复合小体, 活化的 Caspase9 激活效应 Caspase, 促使细胞凋亡; 内源性通路和外源性通路同时参与凋亡的启动, 除以上两种途径外, 内质网的应激也被认为参与肿瘤细胞的凋亡。

IRE1-JNK 信号通路起到内质网应激自噬开关的重要作用。Bu 等发现重组无毒新城疫病毒 (NDV) LaSota 株表达的狂犬病毒糖蛋白 (RL RVG) 可诱导胃癌细胞凋亡和自噬。并探讨了上游调节因子、内质网应激诱导自噬和凋亡及其相互关系。RL 狂犬病毒糖蛋白从三方面增加了内

质网应激 (ATF6 通路、肌醇需要酶 1 (IRE1)、PKR-like 内质网蛋白激酶 (PERK)) 以及自噬与凋亡的上游调控^[29]。Jiang 等通过观察绿色荧光蛋白微管相关蛋白 1 的轻链 3, 在小鼠耐药肺癌细胞中, 对自噬抑制剂氯喹(CQ)和自噬诱导物雷帕霉素 NDV/FMW 就协调抗肿瘤活性进行了评估。结果表明 NDV/FMW 通过抑制自噬的 I 类 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 通路来触发 A549/PTX 细胞中的自噬。相反, NDV/FMW 感染通过负调节通路的激活减弱了 A549/DDP 细胞中的自噬过程。此外, 与 CQ 组合或敲除 ATG5 可显著增强 NDV/FMW 介导的抗肿瘤作用, 而雷帕霉素可以显著提升 NDV/FMW 在 A549/PTX 细胞中的溶瘤功效。另一方面, 在这些耐药细胞中自噬调节不会增加子代病毒。此外, CQ 或雷帕霉素显著增强 NDV/FMW 对 A549/DDP 及 A549/PTX 细胞的溶瘤活性^[30]。以上研究表明自噬调节剂的联合治疗是增强 NDV/FMW 对耐药性肺癌治疗的有效策略。在电子显微镜下, 新城疫病毒感染和饥饿诱导比模拟感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 细胞具有较高的自噬体形成。NDV 感染 CEF 细胞显示增强微管相关蛋白 1 轻链 3-I (LC3-I) 转换为 LC3-II 和 p62/SQSTM1 的降解。通过紫外线灭活新城疫病毒感染细胞, LC3-I 转化为 LC3-II、Caspase 3 及多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 的减少表明, 自噬体的形成对新城疫病毒的复制是必要的。氯喹对细胞自噬的抑制作用增强了细胞凋亡, 导致 Caspase 3 和 PARP 裂解增加。在新城疫病毒感染的脾和肺组织中, 雷帕霉素诱导的自噬导致除了 Beclin 1、抗凋亡因子和炎症细胞因子外其余所有自噬相关基因上调, NDV 感染脾脏和肺脏比模拟感染器官细胞凋亡减少。泛 caspase 抑制剂 ZVAD-FMK 促进 LC3-I 向 LC3-II 转换、p62/SQSTM1 的降解, 通过抑制凋亡 NDV 进行复制^[31]。研究结果显示, 抑制凋亡可增强自噬, 促

进细胞存活和新城疫病毒的复制。Meng 等发现 NDV 感染 U251 细胞, 不久即可引起该细胞自噬体的形成。通过增加双膜囊泡的数量表明, GFP-LC3 形成并促进 LC3-II 量的提升。此外, 在新城疫病毒诱导的自噬和病毒复制中, III 类磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白通路发挥着重要作用^[32]。NDV/FMW 引发肺癌球体 caspase 依赖的细胞凋亡表明增加了 Caspase 3 的处理和 PARP 裂解。尤其是 NDV/FMW 感染导致 LC3-II 和 P62 的退化, 两个自噬成熟的特征标志 NDV/FMW 在肺癌细胞中促进了自噬。结果表明 NDV/FMW 通过 AKT/mTOR 通路抑制促进自噬降解肺癌细胞^[33]。

5 应用前景

在过去几年防治恶性肿瘤的方法中, NDV 一直是一个有吸引力的靶向药物。通过不同的联合机制治疗效果更佳。溶瘤病毒可用于靶向和溶解癌细胞, 但提高这种治疗方法的疗效和特异性是一个重大的挑战^[34-35]。NDV 天然拥有对肿瘤细胞靶向复制能力^[36], 其次 NDV 可激活机体本身的免疫防御系统, 加强机体抗肿瘤免疫反应; NDV 为负链 RNA 病毒, 不会和宿主基因组发生整合, 保证宿主的遗传稳定性^[37-38]。但另一方面 NDV 抗肿瘤研究并不完善, 其中包括: 实验动物种类和肿瘤模型的局限性; NDV 基因组容量小, 不利于多个溶瘤基因片段的插入; 免疫系统对病毒溶瘤效应的双向调节作用机制有待进一步明确。

溶瘤病毒的研究大多是针对实体肿瘤的治疗, 目前 NDV 对肝癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、食管癌、口腔鳞癌、多发性骨髓瘤、恶性黑色素瘤、血液恶性肿瘤等癌症溶瘤效果明显^[39-50]。随着分子生物学和反向遗传技术的成熟, 新城疫病毒抗肿瘤的治疗手段也将更加完善, 也将拥有越来越广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Jaranian M, Watzl C, Fournier P, et al. Activation of Natural killer cells by Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol*, 2009, 83(16): 8108–8121.
- [2] Porotto M, Salah Z, Devito I, et al. The second receptor binding site of the globular head of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase activates the stalk of multiple paramyxovirus receptor binding proteins to trigger fusion. *J Virol*, 2012, 86(10): 5730–5741.
- [3] Yuan P, Paterson RG, Leser GP, et al. Structure of the Ulster strain Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase reveals auto-inhibitory interactions associated with low virulence. *PLoS Pathog*, 2012, 8(8): e1002855.
- [4] Heiden S, Grund C, Röder A, et al. Different regions of the Newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e113344.
- [5] Samal S, Khattar SK, Paldurai A, et al. Mutations in the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein confer hyperfusogenic phenotypes modulating viral replication and pathogenicity. *J Virol*, 2013, 87(18): 10083–10093.
- [6] Bai FL, Tian H, Yu QZ, et al. Expressing foreign genes by Newcastle disease virus for cancer therapy. *Mol Biol*, 2015, 49(2): 171–178.
- [7] Piao BG, Li X, Sun LL, et al. Activity of T Cells stimulated by hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus *in vivo*. *Chem Res Chi Univ*, 2011, 27(3): 455–460.
- [8] Song DZ, Liang Y, Fan XH, et al. Newcastle disease virus enhances tumoricidal activity of mouse NK cells against mouse Novikoff hepatoma cells *via* up-regulating expression of TRAIL on the NK cells. *Chin J Cellular Molecul Immunol*, 2015, 31(5): 599–604 (in Chinese).
宋德志, 梁莹, 樊晓晖, 等. 新城疫病毒通过上调小鼠NK细胞TRAIL表达杀伤Novikoff小鼠肝癌细胞. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(5): 599–604.
- [9] Gao C, Wang J, Ma YY. Comparison of antitumor effect of Newcastle disease virus HBNU/LSRC/F3 strain to ECA109 cells with Mukeswar and La Sota strains. *Chin J Cancer Biotherapy*, 2013, 20(2): 212–216 (in Chinese).
高翠, 王静, 马媛媛, 等. 新城疫病毒HBNU/LSRC/F3株与Mukeswar、LaSota株抗肿瘤效果的比较. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(2): 212–216.
- [10] Zhang CX, Yuan J, Ye LW, et al. Study on Newcastle disease virus (NDV) D90 inhibited the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Progr Mod Biomed*, 2014, 14(28): 5436–5439 (in Chinese).
张春晓, 袁杰, 叶珑伟, 等. 新城疫病毒(NDV)D90抑制口腔鳞癌细胞系迁移和侵袭的研究. *现代生物医学进展*, 2014, 14(28): 5436–5439.
- [11] Chaurasiya S, Warner S. Viroimmunotherapy for colorectal cancer: clinical studies. *Biomedicines*, 2017, 5(1): 11.
- [12] Ricca JM, Oseledchik A, Walther T, et al. Pre-existing immunity to oncolytic virus potentiates its immunotherapeutic efficacy. *Mol Ther*, 2018, 26(4): 1008–1019.
- [13] Schwaiger T, Knittler MR, Grund C, et al. Newcastle disease virus mediates pancreatic tumor rejection *via* NK cell activation and prevents cancer relapse by prompting adaptive immunity. *Int J Cancer*, 2017, 141(12): 2505–2516.
- [14] Chaurasiya S, Chen NG, Fong YM. Oncolytic viruses and immunity. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51: 83–90.
- [15] Wang YF, Deng WY, Li N, et al. Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: current challenges and future directions. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 185.
- [16] Fournier P, Schirmacher V. Oncolytic newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host. *Biology (Basel)*, 2013, 2(3): 936–975.
- [17] Niu ZS, Bai FL, Sun T, et al. Antitumor efficacy of the recombinant Newcastle disease virus rNDV-IL15 on melanoma models. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(3): 310–315 (in Chinese).
牛泽杉, 白福良, 孙田, 等. 重组新城疫病毒rNDV-IL15在黑色素瘤治疗中的效果. *药学学报*, 2014, 49(3): 310–315.
- [18] Zamarin D, Martínez-Sobrido L, Kelly K, 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.
- [19] He DY, Sun LL, Li C, et al. Anti-tumor effects of an oncolytic adenovirus expressing hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus *in vitro* and *in vivo*. *Viruses*, 2014, 6(2): 856–874.
- [20] Wei D, Li Q, Wang XL, et al. Oncolytic Newcastle disease virus expressing chimeric antibody enhanced anti-tumor efficacy in orthotopic hepatoma-bearing MIC. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 153.
- [21] Bai FL, Yu YH, Tian H, et al. Genetically engineered Newcastle disease virus expressing interleukin-2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(9): 1226–1238.
- [22] Cuadrado-Castano S, Ayllon J, Mansour M, et al. Enhancement of the pro-apoptotic properties of Newcastle disease virus promotes tumor remission in syngeneic murine cancer models. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(5): 1247–1258.
- [23] Buijs P, Van Nieuwkoop S, Vaes V, et al. Recombinant immunomodulating lentogenic or mesogenic oncolytic newcastle disease virus for treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Viruses*, 2015, 7(6): 2980–2998.
- [24] Altomonte J, Marozin S, Schmid RM, et al. Engineered newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 275–284.
- [25] Sánchez D, Pelayo R, Medina LA, et al. Newcastle disease virus: potential therapeutic application for human and canine lymphoma. *Viruses*, 2016, 8(1): 3.
- [26] Shobana R, Samal SK, Elankumaran S. Prostate-specific antigen-retargeted recombinant Newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *J Virol*, 2013, 87(7): 3792–3800.
- [27] Yan YL, Jia LJ, Zhang J, et al. Effect of recombinant Newcastle disease virus transfection on lung adenocarcinoma A549 cells *in vivo*. *Oncol Lett*, 2014, 8(6): 2569–2576.
- [28] Ch'ng WC, Stanbridge EJ, Yusoff K, et al. The oncolytic activity of newcastle disease virus in clear cell renal carcinoma cells in normoxic and hypoxic conditions: the interplay between von Hippel-Lindau and Interferon- β signaling. *J Interferon Cytokine Res*, 2013, 33(7): 346–354.
- [29] Bu XF, Zhao YH, Zhang ZJ, et al. Recombinant Newcastle disease virus (r1-RVG) triggers autophagy and apoptosis in gastric carcinoma cells by inducing ER stress. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(5): 924–936.
- [30] Jiang K, Li YC, Zhu QM, et al. Pharmacological modulation of autophagy enhances Newcastle disease virus-mediated oncolysis in drug-resistant lung cancer cells. *BMC Cancer*, 2014, 14: 551.
- [31] Kang YF, Yuan RY, Xiang B, et al. Newcastle disease virus-induced autophagy mediates antiapoptotic signaling responses *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73981–73993.
- [32] Meng CC, Zhou ZZ, Jiang K, et al. Newcastle disease virus triggers autophagy in U251 glioma cells to enhance virus replication. *Arch Virol*, 2012, 157(6): 1011–1018.
- [33] Hu LL, Sun SL, Wang TP, et al. Oncolytic newcastle disease virus triggers cell death of lung cancer spheroids and is enhanced by pharmacological inhibition of autophagy. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(12): 3612–3623.
- [34] Bai FL, Tian H, Yu QZ, et al. Expressing foreign genes by Newcastle disease virus for cancer therapy. *Mol Biol (Mosk)*, 2015, 49(2): 195–204.
- [35] Lü Z, Zhang TY, Yin JC, et al. Enhancement of anti-tumor activity of Newcastle disease virus by the synergistic effect of cytosine deaminase. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12): 7489–7496.
- [36] Yuan P, Paterson RG, Leser GP, et al. Structure of the Ulster strain Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase reveals auto-inhibitory interactions associated with low virulence. *PLoS Pathog*, 2012, 8(8): e1002855.
- [37] Ravindra PV, Tiwari AK, Sharma B, et al. Newcastle disease virus as an oncolytic agent. *Indian J Med Res*, 2009, 130(5): 507–513.
- [38] Washburn B, Weigand MA, Grosse-Wilde A, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. *J Immunol*, 2003, 170(10): 1814–1821.
- [39] Tayeb S, Zakay-Rones Z, Panet A. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus: a critical review. *Oncolytic Virother*, 2015, 4: 49–62.
- [40] Han YL, Yeap SK, Rasoli M, et al. Safety and

- clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 718710.
- [41] Song KY, Wong J, Gonzalez L, et al. Antitumor efficacy of viral therapy using genetically engineered Newcastle disease virus [NDV(F3aa)-GFP] for peritoneally disseminated gastric cancer. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88(6): 589–596.
- [42] Chai Z, Zhang PY, Fu F, et al. Oncolytic therapy of a recombinant Newcastle disease virus D90 strain for lung cancer. *Virology*, 2014, 11: 84.
- [43] Zamarin D, Palese P. Oncolytic newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol*, 2012, 7(3): 347–367.
- [44] Meng G, Xia M, Wang DC, et al. Mitophagy promotes replication of oncolytic Newcastle disease virus by blocking intrinsic apoptosis in lung cancer cells. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 6365–6374.
- [45] Jurin MA, Siniša I, Mariastefania A, et al. Transplanted tumor growth and the incidence of T-Lymphocyte populations in the spleen of newcastle virus-treated mice. *Cancer Biother Radiopharm*, 2015, 30(4): 182–186.
- [46] Schirmacher V, Fournier P. Multimodal cancer therapy involving oncolytic newcastle disease virus, autologous immune cells, and bi-specific antibodies. *Front Oncol*, 2014, 4: 224.
- [47] Silberhumer GR, Brader P, Wong J, et al. Genetically engineered oncolytic Newcastle disease virus effectively induces sustained remission of malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(10): 2761–2769.
- [48] Al-Shammari AM, Rameez H, Al-Tae MF. Newcastle disease virus, rituximab, and doxorubicin combination as anti-hematological malignancy therapy. *Oncolytic Virother*, 2016, 5: 27–34.
- [49] Liao Y, Wang HX, Mao X, et al. RIP1 is a central signaling protein in regulation of TNF- α /TRAIL mediated apoptosis and necroptosis during Newcastle disease virus infection. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43201–43217.
- [50] An Y, Liu TY, He JJ, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing P53 demonstrates promising antitumor efficiency in hepatoma model. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 55.

(本文责编 陈宏宇)