[文章编号] 1003－4684(2025)02-0073-05

溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒与顺铂序贯给药对肿瘤治疗的影响

蔡奇应[1]，张思琪[1]，方　化[2]，刘华鹃[2]，汪　洋[1]，刘滨磊[1]

(1 湖北工业大学生命科学与健康工程学院，湖北 武汉 430068；
2 武汉滨会生物科技股份有限公司，湖北 武汉 436000)

[摘　要] 为探究顺铂(DDP)对溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒(OH2)的抗病毒效果，验证 OH2 与 DDP 序贯给药对肿瘤的疗效，通过 qPCR 检测 OH2 在生产细胞 Vero 中的拷贝数，并收集病毒上清检测病毒滴度。利用 CCK8 实验验证 OH2 与 DDP 共孵育对肿瘤细胞的杀伤效应。同时，建立荷瘤小鼠模型，记录肿瘤大小及小鼠体重，以评估 OH2 与 DDP 序贯给药的治疗作用。结果显示，DDP 对 OH2 具有抗病毒作用，但 OH2 与 DDP 共孵育仍能降低肿瘤细胞活性，在动物模型中，OH2 与 DDP 序贯给药对肿瘤的治疗效果不劣于单独用药，且延长序贯给药间隔时间可增强抗肿瘤效果。结论表明，尽管 DDP 对 OH2 有抗病毒作用，但两者序贯给药仍展现出积极的抗肿瘤疗效。

[关键词] 溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒；顺铂；抗病毒；肿瘤；序贯给药

[中图分类号] R735.3　　[文献标识码] A

结肠癌[1]和乳腺癌[2]对人类健康构成了巨大威胁，其发病率在全球范围内持续上升。人们的生活方式和饮食习惯发生了显著改变，这进一步加剧了结肠癌的发病风险。而乳腺癌作为全球第二大常见癌症，在女性癌症中的占比是结肠癌的两倍[3]。结肠癌和乳腺癌均具有能量代谢迅速、增殖能力强以及肿瘤易侵袭和转移的特点，已成为医学领域亟待解决的重大问题之一[4]。

顺铂(cisplatin，DDP)是一种广泛应用于多种癌症类型的传统化疗药物[5]，其临床疗效已得到充分验证，能够显著抑制癌症进展[6]。其作用机制在于通过与 DNA 的嘌呤碱基结合，抑制转录和翻译过程，最终诱导细胞凋亡[7]。在临床实践中，DDP 常与其他治疗方法联合使用[9]，如手术切除、放疗、免疫治疗和肿瘤生物疗法，以发挥协同作用。

溶瘤病毒是一种新型的肿瘤生物疗法[10]，具有直接裂解肿瘤细胞而保留正常细胞的特点。在杀伤肿瘤细胞的同时，溶瘤病毒还能释放肿瘤相关抗原，增强宿主的抗肿瘤免疫反应[11]。溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病(oHSV2-hGM-CSF，OH2)是由野生型Ⅱ型单纯疱疹病毒改造而来[12]。通过剔除 ICP34.5 基因，OH2 降低了神经毒性并增强肿瘤杀伤效果[13]，提高了对肿瘤细胞的选择性。同时，敲除 ICP47 基因增强了下游基因 US11 的免疫原性和表达[14]。此外，在 ICP34.5 剔除位点插入了治疗基因人粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)[15]。hGM-CSF 可增强抗原呈递细胞的募集和活化，有助于肿瘤抗原呈递给肿瘤特异性 T 细胞，在先天性和适应性免疫中发挥关键作用[16]。

临床试验证明，OH2 在实体瘤患者中耐受性良好，表现出持久的抗肿瘤活性[17]。然而，有研究表明 HSV2 具有高胞嘧啶和鸟嘌呤含量，而 DDP 的抗肿瘤作用正是通过与 DNA 碱基(尤其是胞嘧啶和鸟嘌呤)结合，引起 DNA 的交联和破坏来实现的[18]。因此，推测 DDP 可能对 OH2 具有抗病毒作用。本文通过荷瘤小鼠模型，比较 OH2 与 DDP 单独给药和序贯给药对肿瘤的治疗效果，旨在为下一步临床给药方案提供参考。

1　材料与方法

1.1　实验材料、试剂

1.1.1　实验动物与细胞　BALB/c 小鼠，湖北省实验动物研究中心；CT26 细胞、4T1 细胞及 Vero 细胞，本实验室。

1.1.2　试剂与仪器　0.25％胰酶，美国 Gibco 公司；PBS、DMEM/F12 培养基，本实验室自配；OH2，本

[收稿日期] 2023－09－08

[第一作者] 蔡奇应(1999－)，男，江西上饶人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为肿瘤生物治疗。
[通信作者] 刘滨磊(1962－)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

实验室构建。

二氧化碳培养箱，日本松下公司；生物安全柜，青岛海尔集团公司；多功能酶标仪及高速冷冻离心机，赛默飞世尔科技公司；常温冰箱及－80℃低温冰箱，青岛海尔集团公司；qPCR仪，鲲鹏基因科技有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 CT26细胞及4T1细胞培养基为DMEM/F12(含10%胎牛血清)；Vero细胞使用含3%新生牛血清的DMEM/F12培养基进行培养。细胞被培养在37 ℃、含5% CO_2的培养箱中。通过显微镜观察细胞生长情况，当细胞汇合度达到80%～90%时，使用0.25%胰酶对细胞进行消化处理，并进行传代培养。

1.2.2 抗病毒活性检测 细胞经过消化和计数后，将Vero细胞悬液2 mL、每孔5×10^5个细胞的密度接种于6孔板中，并置于二氧化碳培养箱中过夜培养。将细胞分为OH2组、高抑制组、低抑制组及对照组。具体处理如下：OH2组以MOI＝1感染细胞；高抑制组在MOI＝1的OH2感染上，加入以终浓度为5.0 μg/mL的DDP处理细胞；低抑制组同样以MOI＝1的OH2感染细胞，但DDP的终浓度为2.5 μg/mL。各组在处理24 h后，使用DNA Zol提取病毒DNA。

针对OH2的包膜糖蛋白gD，设计了qPCR引物和探针。其中：上游引物为CCGCTTTATCCCCGAAAAC；下游引物为TGCCACCCGGCGATT；探针为AGCGCACCGTCGCCCTATACAGC。以pHG52-d34.5-CMV-gD质粒作为标准品，建立标准曲线。在PCR反应中，每个样本进行3次技术重复，依据标准曲线计算出相应样本的病毒DNA拷贝数。同时，各组细胞在处理24 h后，将6孔板置于－80 ℃低温冰箱反复冻融3次，离心后取上清液进行滴度测定。

1.2.3 CCK8检测细胞活性 细胞经过消化并计数后，将CT26、4T1细胞悬液100 μL、每孔2×10^4个细胞的密度接种于96孔板中，并置于二氧化碳培养箱中过夜培养。随后，将细胞分为病毒组、DDP组、共孵育及对照组，每组设置3个复孔。病毒组以MOI＝5的剂量感染将OH2病毒，孵育48 h；DDP组以终浓度为2.5、5.0 μg/mL的DDP处理细胞；共孵育组则同时以MOI＝5的剂量感染OH2病毒，并以终浓度为2.5、5.0 μg/mL的DDP处理细胞。培养结束后，向待测孔中加入10 μL/孔的CCK8试剂，并将96孔板放回二氧化碳培养箱中继续孵育1 h。孵育结束后，用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度。

1.2.4 动物模型建立 备80只、6～8周龄的BALB/c雌性小鼠。饲养一周后，于小鼠背部右侧皮下进行植瘤操作：取生长状态良好的CT26细胞及4T1细胞，使用0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液，用DMEM/F12培养基将细胞密度调整为1×10^7/mL，每只小鼠皮下注射100 μL细胞悬液。植瘤后密切观察肿瘤生长状况，待肿瘤体积达到100 mm^3时，将小鼠分笼饲养。

1.2.5 小鼠给药剂量 将80只小鼠分为A、B两组。A组中OH2与DDP序贯给药间隔时间为1 d，以充分发挥OH2抗肿瘤活性；B组中OH2与DDP序贯给药间隔时间为5 d。对OH2组和序贯组的小鼠进行瘤内注射，剂量为100 μL、浓度为1×10^7 $CCID_{50}$/mL的OH2病毒；对DDP组和序贯组小鼠进行腹腔注射，注射的DDP剂量为2 mg/kg；对照组则瘤内注射100 μL PBS作为对照。将首次给药时间记为0 d，给药时间及给药频次见表1。每周两次测量并记录小鼠肿瘤的体积和体重，肿瘤体积(mm^3)＝长×宽^2×0.5。

表1 荷瘤小鼠给药时间及给药频次

组别	A组给药时间	B组给药时间
4T1-CTRL	D0、D3、D6注射PBS	D0、D3、D6注射PBS
4T1-OH2	D0、D7、D14注射OH2	D0、D3、D6注射OH2
4T1-DDP	D0、D3、D6注射DDP	D0、D3、D6注射DDP
4T1-OH2-DDP	D0、D3、D6注射OH2 D7、D14、D21注射DDP	D0、D3、D6注射OH2 D11、D14、D17注射DDP
CT26-CTRL	D0、D3、D6注射PBS	D0、D3、D6注射PBS
CT26-OH2	D0、D7、D14注射OH2	D0、D3、D6注射OH2
CT26-DDP	D0、D3、D6注射DDP	D0、D3、D6注射DDP
CT26-OH2-DDP	D0、D3、D6注射OH2 D7、D14、D21注射DDP	D0、D3、D6注射OH2 D11、D14、D17注射DDP

1.3 统计学处理

数据统计处理采用Graph Pad Prism 9软件，结果以平均值±标准差的形式表示。为了评估两组之间的差异性，采用独立样本t-test分析。以$P<$

0.05 时，认为差异有显著性；当 $P<0.01$ 时，认为差异具有极显著性。

2　结果

2.1　DDP 对 OH2 复制的影响

先将 OH2 以 MOI＝1 的剂量感染 Vero 细胞，并培养 24 h。随后，通过提取基因组 DNA 来检测 OH2 的拷贝数。qPCR 检测结果显示，相较于对照组，经 DDP 处理的细胞中 OH2 拷贝数有所降低，但差异并未达到显著性水平。取细胞培养上清进行病毒滴度的检测，结果表明 DDP 能够显著地降低病毒的滴度。实验结果见图 1。

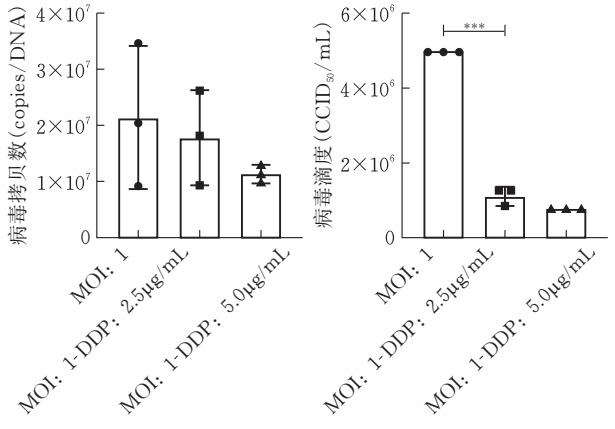


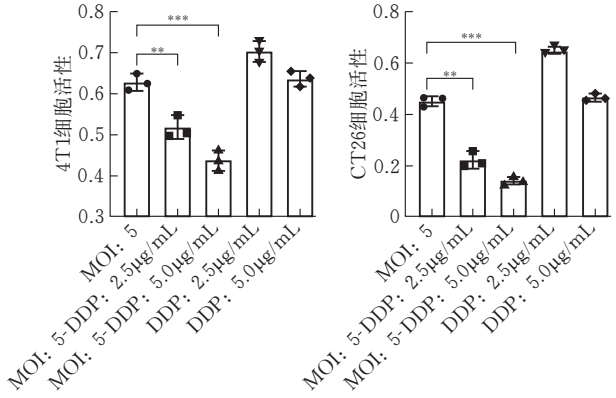
图 1　DDP 对 OH2 复制的影响

2.2　OH2 与 DDP 共孵育降低肿瘤细胞活性

以 MOI＝5 的剂量将 OH2 感染至 4T1 和 CT26 肿瘤细胞中，同时以 2.5、5.0 μg/mL 的浓度用 DDP 处理细胞。通过 CCK8 实验检测，结果表明 OH2 与 DDP 对这两种肿瘤细胞均展现出杀伤活性。进一步地，当 OH2 与不同浓度的 DDP 共孵育后，CCK8 结果显示随着 DDP 浓度的升高，细胞存活率显著降低（$P<0.001$）。实验结果见图 2。

2.3　OH2 及 DDP 在荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤效果

在末次给药一周后，对各组小鼠的肿瘤体积进行了测量。对于 A 组小鼠，4T1-CTRL 组小鼠平均肿瘤体积为 2478.85±617.95 mm^3；4T1-OH2 组小鼠平均肿瘤体积为 1314.99±413.79 mm^3；4T1-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 1042.98±141.91 mm^3；4T1-OH2-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 2116.50±1487.09 mm^3；CT26-CTRL 组小鼠的平均肿瘤体积为 4604.74±1662.58 mm^3；CT26-OH2 组小鼠的平均肿瘤体积为 1464.47±889.04 mm^3；CT26-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 2658.04±1756.84 mm^3；CT26-OH2-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 2312.77±2016.73 mm^3。

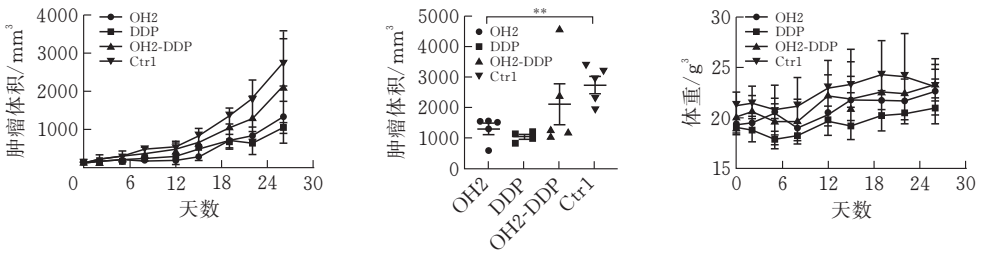


(a) OH2对肿瘤细胞活性的影响　(b) DDP对肿瘤细胞活性的影响

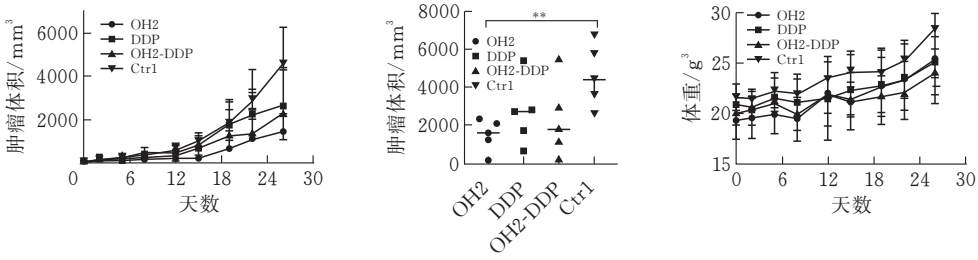
图 2　CCK8 检测 OH2 及 DDP 对肿瘤细胞活性的影响

B 组小鼠也有类似的趋势。4T1-CTRL 组小鼠的平均肿瘤体积为 1727.92±262.51 mm^3；4T1-OH2 组小鼠的平均肿瘤体积为 1165.65±304.39 mm^3；4T1-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 1237.46±257.6 mm^3；而 4T1-OH2-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积进一步降低至 826.36±321.89 mm^3。对于 CT26 肿瘤细胞系，CT26-CTRL 组小鼠平均肿瘤体积为 2823.90±1148.93 mm^3；值得注意的是，CT26-OH2 组和 CT26-OH2-DDP 组小鼠中均出现了显著的肿瘤体积减小，平均肿瘤体积分别为 130.90±208.96 mm^3 和 128.82±288.06 mm^3；而 CT26-DDP 组小鼠的平均肿瘤体积为 513.25±747.10 mm^3。

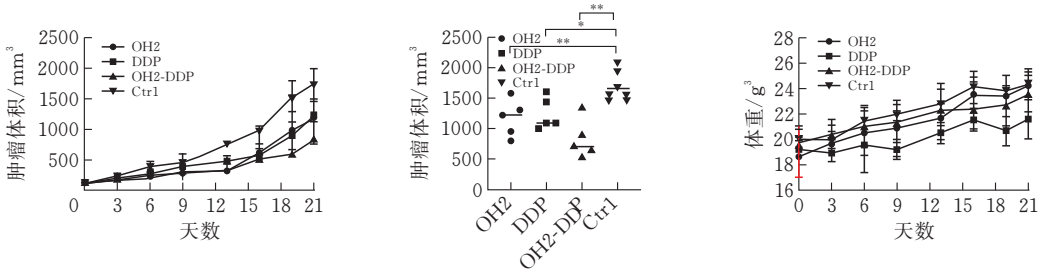
实验结果表明，OH2 与 DDP 对肿瘤具有显著杀伤作用（$P<0.01$），相较于 A 组序贯给药小鼠，B 组序贯给药小鼠中出现了无瘤小鼠。这可能是延长序贯给药间隔时间使得 OH2 能够更充分地发挥抗肿瘤活性，同时降低了 DDP 对 OH2 的抑制作用。此外，所有小鼠体重均呈上升趋势，但相较于注射 DDP 的小鼠，注射 OH2 的小鼠平均体重更高。具体的实验结果如图 3 所示。



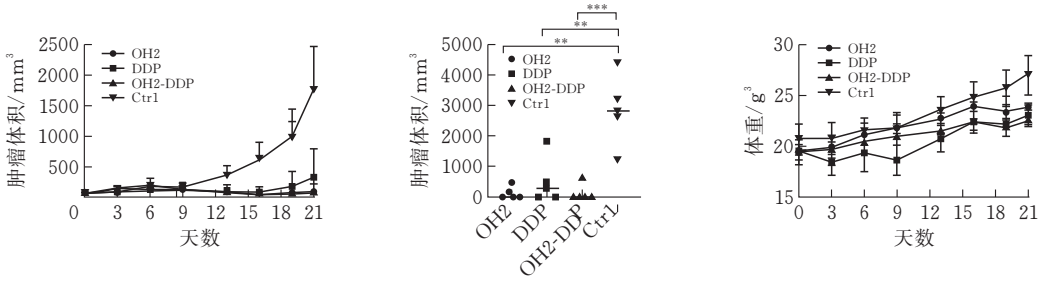
(a) A 组 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积及体重变化



(b)A 组 CT26 荷瘤小鼠肿瘤体积及体重变化



(c)B 组 4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积及体重变化



(d)B 组 CT26 荷瘤小鼠肿瘤体积及体重变化

图 3 OH2 及 DDP 在荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤效果

3 结束语

在 Vero 细胞中,DDP 能够降低 OH2 的拷贝数,但差异无显著性,而对病毒滴度具有显著影响。CCK8 结果显示,与单药相比,OH2 与 DDP 共孵育能显著降低肿瘤细胞活性。体内实验结果表明,与以往结果相似,OH2 单独给药即能发挥较强的抗肿瘤效果,同时序贯给药的疗效与 OH2 单独给药相当,而延长两种药物的序贯给药间隔时间能进一步提高肿瘤治疗效果。这表明在临床中,对于既往使用过 OH2 治疗的患者,再次使用 DDP 治疗时可能获得积极的治疗效果。目前,关于 OH2 与 DDP 序贯给药的剂量、频次等问题尚未深入讨论,未来需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] REZAUL M I,SHOPNIL A,MOMINUR M R, et al. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products[J]. Chemico-biological interactions,2022(368): 110170-110170.

[2] MONDAL M, GUO J, HE P, et al. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2020, 16 (10): 2389-2402.

[3] SAMAIRA M,SHAUKAT A,SHUMAILA M, et al. Advanced treatment strategies in breast cancer: A comprehensive mechanistic review [J]. Science progress,2023,106(02):368504231175331.

[4] HUANG J,YU S,DING L,et al.The Dual Role of Circular RNAs as miRNA sponges in breast cancer and colon cancer[J].Biomedicines,2021,9(11): 1590-1590.

[5] DASARI S, TCHOUNWOU P B.Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action[J].European Journal of Pharmacology, 2014, 740(01):364-378.

[6] GHOSH S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug[J]. Bioorganic Chemistry,2019, 88:102925.

[7] MEGAN E H, HIERONIMUS W K, VINCENT M. Cisplatin Analogues with an Increased Interaction with DNA: Prospects for Therapy[J]. Current pharmaceutical design, 2016,22(44):6645-6664.

[8] LUGONES Y, LOREN P, SALAZAR L A. Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved [J]. Biomolecules, 2022, Sep 24,12(10):1365.

[9] GANESH S, GONZALEZ-EDICK M, GIBBONS D, et al. Combination therapy with radiation or cisplatin

enhances the potency of Ad5/35 chimeric oncolytic adenovirus in a preclinical model of head and neck cancer [J]. Cancer Gene Ther. 2009,16(05):383-392.

[10] FUKUHARA H , INO Y , TODO T .Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn[J]. Cancer Science, 2016,107(10): 1373-1379 .

[11] MA W, HE H, WANG H. Oncolytic herpes simplex virus and immunotherapy [J]. BMC immunology, 2018,19(01): 1-11.

[12] 赵倩，张文，刘尚梅，等. 新Ⅱ型单纯疱疹溶瘤病毒的构建以及其功能研究[M].北京：中国协和医科大学出版社，2014:504-514.

[13] LIU B L, ROBINSON M, HAN Z Q, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties[J]. Gene therapy,2003,10(04): 292-303.

[14] HE B, CHOU J, BRANDIMARTI R, et al. Suppression of the phenotype of gamma(1)34.5- herpes simplex virus 1: failure of activated RNA-dependent protein kinase to shut off protein synthesis is associated with a deletion in the domain of the alpha47 gene[J]. Journal of vir ology,1997,71(08): 6049-6054.

[15] YIN L, ZHAO C, HAN J, et al. Antitumor effects of oncolytic herpes simplex virus type 2 against colorectal cancer in vitro and in vivo[J]. Therapeutics & Clinical Risk Management, 2017,13:117-130.

[16] RONG QX, WANG F, GUO ZX, et al. GM-CSF mediates immune evasion via upregulation of PD-L1 expression in extranodal natural killer/T cell lymphoma [J]. Molecular cancer, 2021,20(01):1-17.

[17] ZHANG B , HUANG J , TANG J ,et al.Intratumoral OH2, an oncolytic herpes simplex virus 2, in patients with advanced solid tumors: a multicenter, phase I/II clinical trial[J].Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2021, 9(04):e002224.

[18] SNYDER M B, SARAVOLATZ L D, MARKOWITZ N, et al. The in-vitro and in-vivo efficacy of cisplatin and analogues in the treatment of herpes simplex virus-II infections[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1987,19(06):815-822.

Effect of Sequential Administration of OH2 and Cisplatin on Tumor Therapy

CAI Qiying[1],ZHANG Siqi[1],FANG Hua[2], LIU Huajuan[2], WANG Yang[1], LIU Binlei[1]

(1 *School of Bioengineering and Food Sci., Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*;
2 *Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd, Wuhan* 436000, *China*)

Abstract: The purpose of this study was to detect the antiviral effect of Cisplatin (DDP) on oncolytic herpes simplex virus type II (oHSV2-hGM-CSF,OH2), and to verify the therapeutic effect of sequential administration of OH2 and DDP on tumor. To this end, the copy number of OH2 in Vero cells was detected by qPCR, and the virus titer was detected by the viral supernatant. CCK8 was used to verify the killing effect of OH2 co-incubated with DDP on tumor cells. A tumor-bearing mouse model was established, tumor size and body weight were recorded, and the effect of sequential administration of OH2 and DDP on tumor therapy was evaluated. Results showed that DDP had antiviral effect on OH2, but the co-incubation of OH2 and DDP still reduced the activity of tumor cells. In animal models, the sequential administration of OH2 and DDP on tumor was no weaker than that of single administration, and prolonged sequential administration interval of the two drugs had better anti-tumor effect. It is concluded that DDP has antiviral effect on OH2, but sequential administration of the two drugs still has positive antitumor effect.

Keywords: OH2; cisplatin; antiviral; tumor; Sequential administration

[责任编校：张　众]