

学校编码: 10384
学 号: 21620100153885

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

复制可调控 I 型单纯疱疹溶瘤病毒用于肝癌
治疗的临床前研究

Preclinical study of regulatable oncolytic HSV-1 for liver
cancer therapy

黄承浩

指导教师姓名: 夏宁邵 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014 年 11 月

论文答辩时间: 2014 年 12 月

学位授予日期: 2014 年 月 日

答辩委员会主席: 林旭 教授

评 阅 人: _____

2014 年 12 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(夏宁邵)课题(组)的研究成果,获得(夏宁邵)课题(组)经费或实验室的资助,在(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

目 录.....	I
Table of contents.....	V
摘 要.....	IX
Abstract.....	XIII
缩略词.....	XVII
第一章 前 言	1
1.1 肝癌概述	3
1.1.1 肝癌的流行病学.....	3
1.1.2 肝癌的临床特征.....	8
1.1.3 肝癌的分期.....	12
1.1.4 肝癌的治疗策略.....	13
1.2 溶瘤病毒	26
1.2.1 溶瘤病毒的概述.....	26
1.2.2 溶瘤病毒的发展.....	27
1.2.3 溶瘤病毒的作用机制.....	30
1.2.4 溶瘤病毒的临床试验.....	37
1.2.5 不同溶瘤病毒优缺点.....	44
1.2.6 溶瘤疱疹病毒.....	46
1.3 HSV-1 病毒概述	46
1.3.1 HSV-1 病毒的结构与生物学特性.....	46
1.3.2 疱疹病毒的分类.....	47
1.3.3 HSV-1 病毒的基因组.....	48
1.3.4 HSV-1 病毒基因与功能.....	50
1.3.5 HSV-1 病毒的生活周期.....	53

1.3.6 HSV-1 病毒的流行病学	55
1.3.7 HSV-1 感染及危害	56
1.3.8 HSV-1 的诊断和治疗	57
1.4 新型 HSV-1 型溶瘤病毒	58
1.5 本研究的目的是、意义及思路	61
第二章 材料与方 法	65
2.1 论文中涉及的主要仪器	65
2.2 研究所用的主要耗材	67
2.3 主要试剂及实验动物	67
2.3.1 <i>E. coli</i> 菌株及感受态	67
2.3.2 质粒	67
2.3.3 细胞株	68
2.3.4 实验动物	68
2.3.5 病毒株	69
2.3.6 分子及细胞生物学常规试剂	69
2.3.7 其他常规试剂	70
2.3.8 临床标本	71
2.4 研究所需试剂配制	71
2.4.1 分子生物学常规溶液配制	71
2.4.2 细胞生物学相关溶液配制	72
2.4.3 病毒检测所需溶液配置	74
2.5 研究方法	74
2.5.1 常规分子克隆实验方法	74
2.5.2 常规细胞生物学实验方法	75
2.5.3 病毒培养、滴定及纯化	76
2.5.4 病毒重组、筛选和鉴定	78
2.5.5 哺乳动物细胞的杀伤复制实验	80
2.5.6 动物模型建立及效果评估	81
2.5.7 免疫学相关实验方法	82

2.5.8 本研究中用到的其他实验方法.....	84
2.6 数据处理及统计分析	85
第三章 结果与分析	86
第一部分：复制可调控、膜融合型溶瘤病毒 KTR27F 的探索研究.....	86
3.1 KTR27F 典型生长特征	87
3.2 KTR27F 病毒可调控复制特征	88
3.3 KTR27F 的嗜肿瘤偏好性	90
3.4 KTR27F 病毒纯化及安全性评估	92
3.5 第一部分小结	94
第二部分：KTR27F 对肝癌细胞的选择杀伤能力评价	95
3.6 KTR27F 在不同肝癌细胞系的复制选择性	95
3.7 KTR27F 对不同肝癌细胞系的杀伤能力	102
3.8 第二部分小结	104
第三部分：KTR27F 在肝癌动物模型中的治疗效果评价	104
3.9 KTR27F 在人肝癌裸鼠模型中的治疗效果	104
3.10 KTR27F 在鼠肝癌自体瘤模型中的治疗效果	107
3.11 KTR27F 在鼠肝癌自体瘤模型中的免疫机制探索	110
3.12 抗 HSV 中和抗体对 KTR27F 溶瘤治疗的影响	113
3.13 第三部分小结	115
第四章 讨 论	117
4.1 膜融合型溶瘤病毒能够显著增强病毒杀伤能力	117
4.2 KTR27F 肿瘤治疗潜能	117
4.3 KTR27F 介导的抗肿瘤免疫机制分析	119
4.4 溶瘤病毒面临的问题	120
4.5 溶瘤病毒治疗是肝癌治疗的一个重要发展方向	122
第五章 结论与展望	125
参考文献	129
在校期间的科研成果	160

致 谢.....162

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of contents

Table of contents in Chinese.....	I
Table of contents in English	V
Abstract in Chinese.....	IX
Abstract in English	XIII
Abbreviations	XVII
Chapter 1. Preface.....	1
1.1 Overview of hepatocellular carcinoma	3
1.1.1 Epidemiology of hepatocellular carcinoma	3
1.1.2 Clinical features of hepatocellular carcinoma.....	8
1.1.3 Staging of hepatocellular carcinoma.....	12
1.1.4 Treatment of hepatocellular carcinoma.....	13
1.2 Oncolytic virus	26
1.2.1 Overview of oncolytic virus.....	26
1.2.2 History of oncolytic virus	27
1.2.3 Mechanism of oncolytic virus	30
1.2.4 Clinical trails of oncolytic virus.....	37
1.2.5 Advantage and disadvantage of oncolytic virus	44
1.2.6 HSV-1 based oncolytic virus.....	46
1.3 Overview of HSV-1	46
1.3.1 Structure and features of HSV-1	46
1.3.2 Classification of herpes virus.....	47
1.3.3 Genome of HSV-1	48
1.3.4 Gene and function of HSV-1.....	50
1.3.5 Life cycle of HSV-1	53
1.3.6 Epidemiology of HSV-1.....	55

1.3.7	Infection and Pathogenesis of HSV-1	56
1.3.8	Diagnosis and therapy of HSV-1	57
1.4	Novel HSV-1 based oncolytic virus.....	58
1.5	Purpose and significance of the study	61
Chapter 2.	Materials and Methods	65
2.1	Instruments.....	65
2.2	Materials	67
2.3	Reagents and animals	67
2.3.1	<i>E.coli strains and competent cells</i>	67
2.3.2	Plasmids	67
2.3.3	Cell lines	68
2.3.4	Animals.....	68
2.3.5	Viruses	69
2.3.6	Reagents for molecular and cell biology experiments	69
2.3.7	Other routine reagents.....	70
2.3.8	Samples.....	71
2.4	Preparation of solution and medium.....	71
2.4.1	Solutions for molecular biology experiments	71
2.4.2	Solutions for cell culture and transfection.....	72
2.4.3	Solutions for virus detection.....	74
2.5	Methods.....	74
2.5.1	Methods for routine molecular experiments.....	74
2.5.2	Methods for routine cell biology experiments.....	75
2.5.3	Viral production、titering and purification	76
2.5.4	Viral recombination、selection and verification.....	78
2.5.5	Replication and cell killing experiments in mammalian cells	80
2.5.6	Animal models and evaluation.....	81
2.5.7	Methods for routine immunodetection.....	82
2.5.8	Other methods.....	84

2.6 Statistical analysis	85
Chapter 3. Results and Analysis	86
Part I: Exploring of a regulatable fusogenic KTR27F.....	86
3.1 Typical growth features of KTR27F	87
3.2 Regulatable replication of KTR27F	88
3.3 Oncoselectivity of KTR27F	90
3.4 Purification and safety assessment of KTR27F.....	92
3.5 Summary of Part I	94
Part II: Replication and cell killing ability of KTR27F in hepatoma cells	95
3.6 Replication of KTR27F in hepatoma cells	95
3.7 Cell killing ability of KTR27F in hepatoma cells	102
3.8 Summary of Part II.....	104
Part III: Therapeutic potent of KTR27F in HCC animal models	104
3.9 Evaluation of the therapeutic potential of KTR27F in nude mice bearing human hepatoma cells	104
3.10 Evaluation of the therapeutic potential of KTR27F in C57BL/6 mice bearing autologous mouse hepatoma cells.....	107
3.11 Exploration of the anti-tumor immunity of KTR27F in C57BL/6 mice bearing autologous mouse hepatoma cells.....	110
3.12 Impact of HSV-1 neutralization antibody on KTR27F therapy	113
3.13 Summary of Part III	115
Chapter 4. Discussion	117
4.1 Fusogenic variant can significantly increase the cell killing ability	117
4.2 Therapeutic potential of KTR27F in HCC treatment	117
4.3 Significance of KTR27F induced anti-tumor immunity	119
4.4 Hurdles in oncolytic virotherapy	120
4.5 Future prospectives of OV therapy	122
Chapter 5. Summary and Prospect.....	125

Reference.....129

Publications160

Acknowledge.....162

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一，给人类健康造成了极大的危害。尽管外科手术对早期肝癌取得较好的治疗效果，但由于大部肝癌患者只有到了中晚期才发现，已经发生了远端转移，往往错过了最佳治疗时机，使得肝癌患者的五年生存率急剧降低。目前几乎没有针对中晚期肝癌有效的治疗手段。因此，开发安全、高效的治疗手段对提高中晚期肝癌患者的生存时间有重要的现实意义。溶瘤病毒作为一种新型有效的治疗手段，具有安全、高效和副作用小等特点，在肿瘤治疗的临床开发上极具应用前景。目前溶瘤疱疹病毒 OncoVex^{GMCSF} 已经完成治疗晚期黑色素瘤患者的三期临床试验，取得了不错的临床治疗效果。因此探索开发一种新型溶瘤病毒并应用于肝癌的治疗是十分有必要的。我们首先在已报道的溶瘤病毒 KTR27 基础上开发出一种新型高效、具有促膜融合功能的溶瘤病毒 KTR27F，然后在细胞水平和动物水平探索 KTR27F 治疗肝癌的潜能，以期完成 KTR27F 治疗肝癌的临床前评估，这些结果将为开发以 HSV-1 型溶瘤病毒为基础的肝癌治疗药物奠定坚实的工作基础。

本论文的第一部分旨在探索开发受四环素调控、具有促膜融合功能的溶瘤病毒 KTR27F，初步评价 KTR27F 作为新型溶瘤病毒的分子特征、肿瘤杀伤潜能及安全性。通过在 ICPO 互补细胞株 U2OS 中对 KTR27 病毒进行定向筛选，可获得具有促膜融合特性、可诱导感染细胞形成合胞体的新一代溶瘤病毒 KTR27F。KTR27F 除了继承其母本病毒 KTR27 相同的遗传学特征，如受四环素严整调控及良好的嗜肿瘤特性等，另外还衍生出一些全新的生物学功能。KTR27F 在肿瘤细胞中复制能力与 KTR27 相当，但在肿瘤杀伤能力上要显著优于后者，因而显示出良好的肿瘤杀伤效果。此外，我们还对 KTR27F 病毒进行安全性评估。通过往幼鼠颅内注射高剂量 KTR27F 病毒，结果发现 KTR27F 对小鼠无任何毒副作用，且安全性良好。以上结果提示，KTR27F 治疗肿瘤安全有效，具有扩大肿瘤杀伤效果的功能。

本研究的第二部分为评估 KTR27F 对各种肝癌和肝细胞系的肿瘤选择杀伤性，旨在探索 KTR27F 应用于肝癌治疗的可能性。由于肝癌细胞基因异质性大，为了评估 KTR27F 肝癌杀伤广谱性和特异性，我们建立了由九株肝癌细胞和两株

正常肝细胞组成的细胞评价盘。首先我们证实 KTR27F 在人或鼠源的肝正常细胞系中基本不复制或很低复制，高 MOI 病毒感染对这些细胞的杀伤毒性很低。而 KTR27F 在肝癌细胞系中复制较好，但在不同肝癌细胞株中复制水平有所差别。这些结果表明 KTR27F 对肝癌细胞具有一定的选择偏好性，而对正常肝细胞影响较小。此外，KTR27F 在肝癌细胞株中的复制水平受四环素严整调控。KTR27F 在 BEL7402、SMMC7721、Hep1-6 和 QGY7703 细胞中复制较好，而在 Huh7、GSG7701 和 HepG2 细胞中复制水平一般。由于肝癌遗传异质性较高，溶瘤病毒的嗜肿瘤复制选择性往往也依赖于这种遗传异质性，因此研究肝癌遗传异质性对 KTR27F 肿瘤复制能力乃至杀伤能力的影响是很有必要的。KTR27F 病毒对不同肝癌细胞均有不同程度的杀伤能力，用不同的 MOI 感染复数感染肝癌细胞，结果表明 KTR27F 对不同肝癌细胞的肿瘤杀伤半数致死剂量 (EC_{50}) 介于 0.05 至 1 之间。除了 HepG2 细胞外，KTR27F 对肝癌细胞的杀伤能力与其在肝癌细胞中的复制能力成正相关。综上，此部分研究评价了 KTR27F 病毒对不同肝癌细胞株的复制杀伤能力，这部分结果为 KTR27F 病毒用于肝癌治疗提供了体外研究证据。

本研究的第三部分为在动物水平上评估 KTR27F 治疗肝癌的疗效及安全性，同时还探讨 KTR27F 治疗肝癌所激发的抗肿瘤免疫机制。在本研究中，我们建立了多个小鼠肝癌模型来评估 KTR27F 的治疗效果，其中包括移植人肝癌细胞株的裸鼠荷瘤模型以及鼠肝癌自体瘤模型。我们选择了两株代表性的人肝癌细胞株 Huh7 (KTR27F 复制水平较低) 和 SMMC7721 (KTR27F 复制水平较高)，分别建立了 Huh7 和 SMMC7721 裸鼠肿瘤模型，旨在体内环境中评估 KTR27F 对肝癌的杀伤作用。在 Huh7 肝癌裸鼠模型中， 1×10^8 PFU 治疗剂量的 KTR27F 病毒能够显著抑制接种 Huh7 肝癌的生长，与对照组相比能显著延长荷瘤小鼠的生存时间。强力霉素 (Dox) 给药组的肿瘤治疗效果优于 Dox 不给药组，但是两组之间复制差异并不显著，可能与病毒在体内复制受限有关。在 SMMC7721 肝癌裸鼠模型中，KTR27F 也能显著抑制 SMMC7721 肝癌的生长。值得注意的是，由于裸鼠模型缺乏免疫系统，KTR27F 病毒治疗只能抑制肿瘤生长而不能完全清除肿瘤，一旦停止治疗，肿瘤会开始进展恶化，因而这个模型不能很好评估免疫系统对病毒治疗的影响，以及评估溶瘤病毒治疗有可能诱导的抗肿瘤免疫。因此我们建立了 Hep1-6 鼠肝癌自体瘤模型来评估天然免疫系统对溶瘤病毒治疗的影

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库