

减毒弓形虫在肿瘤免疫治疗中的应用与机制研究进展

肖梓婷^{1,2}, 吴志轩^{1,2}, 陈斯泽¹, 邵丽娟¹, 张志豪³, 杨兆收^{1,2,4*}

¹广东药科大学附属第一医院肿瘤免疫科, 广东 广州

²广东药科大学第一临床医学院, 广东 广州

³起源先科(北京)生物医药技术有限公司, 北京

⁴广东药科大学附属第一医院检验科, 广东 广州

收稿日期: 2026年4月28日; 录用日期: 2026年5月22日; 发布日期: 2026年5月29日

摘要

肿瘤免疫治疗在血液肿瘤中取得显著进展, 但实体瘤仍面临“冷肿瘤”免疫抑制微环境导致疗效受限的关键瓶颈。近年来, 基于病原微生物的免疫激活策略为肿瘤治疗提供了新的思路, 其中减毒弓形虫因其独特的免疫调控能力成为研究热点。本文系统综述了减毒弓形虫在肿瘤免疫治疗中的生物学基础、构建策略及抗肿瘤作用机制。弓形虫通过其生命周期阶段转换及ROP、GRA等效应蛋白精细调控宿主信号通路, 天然诱导以Th1型为核心的免疫应答, 为其减毒利用提供了理论依据。在减毒策略方面, 基因工程减毒(如尿嘧啶营养缺陷型CPSII、OMPDC突变株及毒力/效应蛋白基因敲除)已成为主流方法, 可在降低毒力的同时保留甚至增强免疫原性; 物理减毒作为补充手段亦展现一定应用潜力。在抗肿瘤机制上, 减毒弓形虫可通过激活Th1型免疫反应、促进树突状细胞抗原递呈、增强CD8⁺ T细胞浸润、重塑免疫抑制性肿瘤微环境, 并通过分泌效应蛋白直接调控肿瘤细胞增殖、迁移及凋亡等多途径发挥作用, 在多种实体瘤模型中表现出广谱抗肿瘤活性。此外, 其与免疫检查点抑制剂等疗法联合应用显示出协同增效潜力。尽管如此, 减毒弓形虫的临床转化仍面临安全性、可控性及长期免疫影响等挑战。未来需进一步优化减毒设计、解析关键分子机制并建立系统性风险评估体系, 以推动其向临床应用发展。

关键词

减毒弓形虫, 肿瘤免疫治疗, Th1型免疫应答

Research Progress on the Application and Mechanism of Attenuated *Toxoplasma gondii* in Tumor Immunotherapy

Ziting Xiao^{1,2}, Zhixuan Wu^{1,2}, Size Chen¹, Lijuan Shao¹, Zhihao Zhang³, Zhaoshou Yang^{1,2,4*}

*通讯作者。

文章引用: 肖梓婷, 吴志轩, 陈斯泽, 邵丽娟, 张志豪, 杨兆收. 减毒弓形虫在肿瘤免疫治疗中的应用与机制研究进展[J]. 临床医学进展, 2026, 16(5): 3462-3471. DOI: 10.12677/acm.2026.1652169

¹Department of Tumor Immunology, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

²First Clinical Medical College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

³Origin Advanced Science Technology Co., Ltd., Beijing

⁴Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

Received: April 28, 2026; accepted: May 22, 2026; published: May 29, 2026

Abstract

Tumor immunotherapy has made significant progress in hematological malignancies, but solid tumors still face the key bottleneck of limited efficacy due to the “cold tumor” immunosuppressive microenvironment. In recent years, the immune activation strategy based on pathogenic microorganisms has provided new ideas for tumor treatment. Among them, attenuated *Toxoplasma gondii* has become a research hotspot due to its unique immune regulation ability. This article systematically reviews the biological basis, construction strategy and anti-tumor mechanism of attenuated *Toxoplasma gondii* in tumor immunotherapy. *Toxoplasma gondii* regulates the host signaling pathway through its life cycle phase transition and effector proteins such as ROP and GRA, and naturally induces an immune response centered on Th1 type, which provides a theoretical basis for its attenuated utilization. In terms of attenuation strategies, genetic engineering attenuation (such as uracil auxotroph CPSII, OMPDC mutants and virulence/effector protein gene knockout) has become the mainstream method, which can reduce virulence while retaining or even enhancing immunogenicity; physical attenuation as a supplementary means also shows certain application potential. In the anti-tumor mechanism, attenuated *T. gondii* can play a role by activating Th1 immune response, promoting dendritic cell antigen presentation, enhancing CD8⁺ T cell infiltration, remodeling immunosuppressive tumor microenvironment, and directly regulating tumor cell proliferation, migration and apoptosis by secreting effector proteins, showing broad-spectrum anti-tumor activity in a variety of solid tumor models. In addition, its combination with therapies such as immune checkpoint inhibitors shows synergistic potential. However, the clinical transformation of attenuated *T. gondii* still faces challenges such as safety, controllability, and long-term immune effects. In the future, it is necessary to further optimize the attenuated design, analyze the key molecular mechanisms and establish a systematic risk assessment system to promote its clinical application.

Keywords

Attenuated *Toxoplasma gondii*, Tumor Immunotherapy, Th1 Type Immune Response

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1.1. 肿瘤免疫治疗现状

近年来,免疫检查点抑制剂和 CAR-T 疗法改善了部分血液肿瘤患者的预后,但在占恶性肿瘤绝大多数的实体瘤中,客观缓解率仍有限。核心瓶颈在于,多数实体瘤呈“冷肿瘤”表型,缺乏 T 细胞浸润,被免疫抑制微环境包裹,对现有免疫疗法响应不佳[1]。因此,探索能将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”的

新型免疫激活策略成为迫切需求。研究表明,某些病原微生物或其衍生物可通过激活固有免疫与适应性免疫通路,重塑肿瘤免疫微环境,从而增强抗肿瘤效应[1][2]。其中,弓形虫因其进化中获得的独特免疫调节能力,正逐渐被关注为潜在的肿瘤免疫治疗新平台。

1.2. 微生物治疗肿瘤的进展及减毒弓形虫与肿瘤的关联性

在微生物介导的肿瘤治疗领域,细菌(如减毒沙门氏菌、李斯特菌)、病毒(如痘苗病毒、伪狂犬病毒)及寄生虫(如弓形虫、疟原虫)均展现出激活抗肿瘤免疫的潜力。然而,现有研究提示不同平台存在固有局限:减毒沙门氏菌在体内易受宿主抗菌肽清除,其保护性 T 细胞应答呈组织特异性且循环中仅短暂存在[3][4];溶瘤病毒如痘苗病毒虽可诱导局部免疫浸润,但常伴随调节性 T 细胞增多及免疫检查点分子如 PD-L1 的上调,可能削弱持续抗肿瘤效应[5];李斯特菌等载体需依赖工程化抗原递送策略以激发特异性 T 细胞反应[6]。相比之下,减毒弓形虫作为顶复门寄生虫平台,展现出独特优势,其天然具有激活 Th1 型免疫应答、重塑免疫抑制性肿瘤微环境的能力,且在动物模型中表现出广谱抗肿瘤活性与良好安全性,如脑内无包囊形成[7][8]。这一特性使其在诱导持久系统性免疫应答方面具备差异化潜力,为微生物肿瘤免疫治疗提供了新的策略方向。

2. 弓形虫的生物学基础与免疫特性

弓形虫的生物学特性决定了其作为肿瘤免疫治疗平台的独特潜力,其生命周期中的阶段转换、效应分子对宿主通路的精密操控,以及天然触发的 Th1 型免疫应答,共同构成了减毒利用的科学基础。

2.1. 生命周期与宿主感染机制

弓形虫的生命周期以速殖子和缓殖子两种形态的相互转换为特征。速殖子是急性感染期的活跃增殖形式,分裂速度快,负责全身播散和急性病理损伤[9]。其侵入宿主细胞后,通过分泌 ROP 和 GRA 家族效应蛋白主动调控宿主凋亡、炎症及信号通路,为自身复制创造有利微环境[10][11]。更为关键的是,速殖子可借助感染的白细胞,通过“特洛伊木马”机制实现向中枢神经系统等靶器官的快速播散[12]。当宿主免疫压力增强,速殖子即转换为缓殖子,包裹于组织包囊中长期潜伏。缓殖子通过阶段特异性效应蛋白(如抑制宿主细胞坏死性凋亡)维持包囊存活,逃避宿主清除[13]。慢性感染期间,宿主 CNS 小胶质细胞内持续的 IFN- γ -STAT1 信号对抑制包囊再激活至关重要[14]。这种从急性激活到慢性潜伏的完整免疫博弈过程,为理解弓形虫与宿主免疫系统的深度互作提供了天然模型。

2.2. 核心毒力因子

弓形虫的细胞内存活依赖于一系列分泌型效应蛋白对宿主信号网络的精准干预。在棒状体蛋白(rhoptry proteins, ROPs)中,ROP18 是最具代表性的毒力因子之一,其被分泌进入宿主细胞后可直接磷酸化并灭活 IFN- γ 诱导的 GTP 酶,包括免疫相关 GTP 酶(immunity-related GTPases, IRGs)和鸟苷酸结合蛋白(guanylate-binding proteins, GBPs),从而颠覆 IFN- γ 依赖的细胞自主免疫[15]。ROP18 对 IRG 蛋白的磷酸化在很大程度上依赖伪激酶 ROP5 的协同作用-ROP5 作为中心支架蛋白,组装多蛋白复合物以失活特定的 IRG 蛋白[15]。值得注意的是,弓形虫进化出针对不同 IRG 家族成员的特异性效应蛋白;例如,ROP39 通过与 ROP5B 形成复合物,特异性靶向 Irgb10 并抑制其同源二聚体形成,从而整体减少 IRG 蛋白在纳虫泡膜(parasitophorous vacuole membrane, PVM)上的装载[16]。此外,弓形虫的毒力调节网络还涉及更上游的调控机制,例如 IWS1 蛋白可通过间接调控 ROP18 mRNA 的表达,来影响虫体在 IFN- γ 激活宿主细胞中的适合度[17]。在致密颗粒蛋白方面,GRA4 被证实可限制宿主 I 型干扰素应答,GRA57/GRA70/GRA71 复合物则增强寄生虫在 IFN- γ 激活环境中存活[18][19]。这些效应分子揭示了弓形

虫的核心生存策略，不是被动躲避免疫攻击，而是主动重塑宿主信号环境。其中，NF- κ B 和 STAT1 通路是弓形虫效应的主要靶点，部分虫株还可通过 PPAR γ 等核受体通路调节宿主脂代谢和炎症反应。从肿瘤治疗角度看，这些被弓形虫天然利用的信号节点，也是重塑肿瘤微环境的关键靶点，为减毒株的设计提供了分子基础。

2.3. 免疫激活特征

弓形虫感染可触发先天与适应性免疫应答。早期感染中，中性粒细胞为主要防御细胞，随后树突状细胞活化并诱导 Th1 型反应，产生大量 IFN- γ ，后者是控制寄生虫复制和促进速殖子向缓殖子转化的关键细胞因子[20]。在人类细胞中，IFN- γ 诱导 E3 连接酶 RNF213 转位至寄生泡，介导 K63 连接泛素化，招募泛素适配蛋白并激活抗菌效应程序，有效限制寄生虫增殖，RNF213 缺失则使 IFN- γ 丧失抑虫作用，表明其为抗弓形虫免疫的核心执行分子[21]。

然而，弓形虫亦通过多种机制拮抗宿主免疫。缓殖子阶段分泌的 IST 蛋白可限制 IFN- γ 信号传导，并保护宿主细胞免于 IFN- γ 诱导的死亡，利于潜伏感染维持[22]。同时，GRA4 通过结合磷酸化 TBK1，促进 TRIM27 介导的 K48-泛素化，诱导 TBK1 自噬降解，从而抑制 I 型干扰素通路激活； Δ gra4 突变株因此诱导 IFN-I 反应，并被开发为减毒肿瘤疫苗，可激活特定树突状细胞亚群增强抗肿瘤 T 细胞应答[18]。

值得注意的是，慢性感染期间免疫反应呈现复杂平衡。一方面，记忆性 CD8⁺ T 细胞出现功能障碍，表现为抑制性受体如 TIGIT 上调，可能导致寄生虫持续存在[23]；另一方面，慢性脑中中性粒细胞不仅参与免疫防御，还通过表达神经保护因子 NRG-1 和 ErbB4 促进神经元修复，在免疫控制与神经保护间维持动态稳态[24]。揭示了弓形虫与宿主长期共存的免疫学基础，也为基于免疫调控的治疗策略提供了理论依据。

3. 减毒弓形虫的构建策略

减毒弓形虫作为潜在的肿瘤免疫治疗载体，其安全性与免疫原性高度依赖于减毒策略的科学设计。目前，构建减毒弓形虫的主要方法包括基因工程减毒株、物理减毒方法以及新兴的合成生物学改造手段。这些策略在保留弓形虫免疫激活能力的同时，降低其致病性，为临床转化奠定基础。

3.1. 物理减毒方法

在基因编辑技术成熟之前，物理减毒曾被用于开发减毒弓形虫株。这两类方法共享同一原理：通过非特异性损伤虫体遗传物质来降低其毒力，而非精确删除某个毒力基因。辐射减毒利用 γ 射线或 X 射线造成 DNA 双链断裂，使速殖子失去持续分裂能力，但理论上可保留部分侵袭活性和免疫原性，这一策略已在寄生虫疟原虫疫苗开发中得到应用[25]。近期研究为弓形虫辐射减毒提供了直接证据。Pourmohammadi 等人发现，RH 株速殖子经 200 Gy γ 射线照射后在小鼠体内完全丧失致病性，并诱导 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 水平升高，对后续野生型虫株攻毒具有明确保护效果[26]。此外，低能电子辐照(LEEI)被证实可生成复制缺陷型弓形虫速殖子，虫体保留侵袭能力但胞内增殖停滞，免疫小鼠后诱导高水平抗体应答并抵御急性感染[27]。这些发现表明，现代物理减毒技术已能在弓形虫中实现可控减毒与保留免疫原性的平衡。但其局限于减毒机制不明确、遗传背景不清，且批间稳定性难以保证，随着 ROP18、GRA17 等关键毒力基因的鉴定和 CRISPR/Cas9 平台的建立，基于靶向基因敲除的精准减毒策略已取代传统方法，成为构建候选减毒株的主流路径[8] [18]。

3.2. 基因工程减毒株

基因工程减毒是当前构建安全有效弓形虫疫苗和治疗载体的核心策略。通过靶向敲除与毒力、慢性感染或免疫逃逸相关的关键基因，可获得稳定减毒且具备良好免疫原性的菌株。

在代谢减毒方面, 尿嘧啶营养缺陷型虫株是该领域研究最深入、应用最广泛的减毒平台。弓形虫依赖合成尿嘧啶维持复制, 其补救途径有限[28]。这一代谢特性奠定了构建安全、不可复制虫株的分子基础: 通过敲除氨甲酰磷酸合成酶 II (CPSII), 虫株在哺乳动物组织中完全丧失复制能力, 单次接种即可诱导长效保护性免疫[28]。在此基础上, 基于乳清苷酸脱羧酶(OMPDC)缺陷的虫株被成功构建, 其毒力较亲本株降低达 8 个对数级, 同时可激发针对致死性攻毒的保护力[29]。更进一步的研究发现, II 型虫株的 OMPDC 缺陷株不仅无法复制, 还完全丧失了形成组织包囊的能力, 从源头上杜绝了慢性感染风险[30]。值得注意的是, 这类营养缺陷株在完全不复制的情况下, 依然能通过 IL-12 与 IFN- γ 通路, 在局部驱动以 CD8⁺ T 细胞为核心的 Th1 型免疫应答[31]。

在毒力基因敲除方面, 弓形虫 WH3 Δ rop18 减毒活疫苗株免疫小鼠后, 可诱导其产生强烈的免疫应答, 表现为 IFN- γ 、IL-12、TNF- α 和 IL-10 等细胞因子水平升高, 并激活 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞及诱导特异性抗体产生, 从而为小鼠提供抵抗多种弓形虫株(如 RH、ME49、WH3 和 WH6)感染的保护力[8]。类似地, ME49 Δ cdpk3 减毒株亦能诱导高水平的促炎细胞因子(IFN- γ 、IL-12、TNF- α)、T 细胞活化及混合型 IgG1/IgG2a 抗体应答, 对多种野生型弓形虫株具有广谱保护作用, 显示出作为免疫激活剂的潜力[32]。

在上述代谢与毒力基因减毒研究的基础上, 针对效应蛋白的基因敲除可进一步增强抗肿瘤免疫。研究表明, 尿嘧啶缺陷株所激发的抗肿瘤免疫, 高度依赖于其分泌的 ROP/GRA 等效应蛋白, 这揭示了减毒虫株毒力因子与免疫激活功能的双重属性[33]。具体而言, GRA4 缺失的 ME49 Δ ompdc/ldh1/gra4 株因无法抑制宿主 I 型干扰素通路, 导致 TBK1 降解受阻, 从而增强 IFN-I 产生, 并诱导特异性 CD64⁺CD11b⁺MAR-1⁺树突状细胞亚群, 强化 T 细胞介导的抗肿瘤反应, 实现对肿瘤的完全免疫防护[18]。另一研究显示, srs14a 基因敲除株(Δ srs14a)可增强肿瘤微环境中 AIM2 炎症小体活性, 促进 CD8⁺ T 细胞浸润、减少调节性 T 细胞比例并诱导巨噬细胞向 M1 型极化, 从而抑制肿瘤进展, 其机制涉及 SRS14A 对 ASC CARD 结构域 K63 连接泛素化的抑制及其蛋白酶体降解的促进[34]。这些结果表明, 从代谢减毒到毒力基因精准敲除的递进策略, 不仅能实现有效减毒, 还可协同增强抗肿瘤免疫应答。

4. 减毒弓形虫治疗多样肿瘤及其抗肿瘤作用机制

4.1. 激活抗肿瘤免疫

减毒弓形虫通过诱导 Th1 型免疫应答激活抗肿瘤免疫。研究表明, 非复制型尿嘧啶营养缺陷型弓形虫突变体可逆转肿瘤微环境免疫抑制, 促进 IFN- γ 、IL-12 等关键细胞因子分泌, 增强 CD8⁺ T 细胞浸润及自然杀伤细胞活性, 有效抑制黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌及胰腺癌等多种实体瘤生长[2]。在髓母细胞瘤小鼠模型中, 弓形虫感染通过天然诱导脑内 Th1 反应, 促进功能性 T 细胞向肿瘤实质浸润, 并重编程髓系细胞为支持 T 细胞活性的表型, 克服原发性脑肿瘤“冷肿瘤”特性导致的免疫抑制微环境, 且未引发严重炎症反应[35]。此外, 弓形虫感染可系统性激活树突状细胞(依赖 Batf3⁺ cDC1 亚群)、巨噬细胞及 B 细胞, 协同提升抗肿瘤免疫应答强度与持久性; 其分泌的 profilin 等效应蛋白可增强抗原提呈与免疫细胞活化, 并且该效应在既往慢性感染背景下仍保持稳定[36]。在胰腺导管腺癌模型中, 减毒弓形虫单药即可激活树突状细胞并提升肿瘤特异性 IFN- γ 产生[37]。

4.2. 免疫微环境重塑

减毒弓形虫通过调控宿主信号通路重塑免疫抑制性肿瘤微环境。 Δ srs14a 基因敲除株感染可解除 SRS14A 蛋白对 AIM2 炎症小体的抑制, 增强其活化, 导致线粒体功能障碍与细胞损伤, 促进 CD8⁺ T 细胞浸润、减少调节性 T 细胞比例, 并诱导巨噬细胞向抗肿瘤 M1 表型极化, 有效抑制肿瘤进展[34]。在胰腺导管腺癌模型中, 减毒弓形虫 NRTUA 株单用或联合抗 PD-1 抗体治疗, 可改变肿瘤微环境组成: 树突

状细胞分泌 IL-12 促进 CD8⁺ T 细胞浸润与 IFN- γ 产生, 同时减少髓系来源抑制细胞的数量, 产生协同抗肿瘤效应, 为克服 PD-1 抑制剂耐药提供实验依据[37]。同时, 弓形虫感染可抑制 TREM2⁺ 单核细胞等免疫抑制性细胞功能, 并通过调控 NLRP3/NLRP1 炎症小体通路增强巨噬细胞抗肿瘤活性; 在多种实体瘤模型中, 其诱导的 Th1 型细胞因子网络可逆转免疫抑制状态[7]。值得注意的是, 急性感染期发挥抗肿瘤作用, 而慢性感染可能因免疫耗竭促进肿瘤进展, 需关注治疗窗口的重要性[38]。

4.3. 抗原递呈增强

弓形虫分泌效应蛋白精准调控树突状细胞功能, 强化抗原递呈。TgWIP 蛋白通过结合宿主 SHP1/2 磷酸酶并激活 ROCK 通路, 促进感染 DC 的 F-肌动蛋白重组与膜突起形成, 增强其迁移能力, 有利于淋巴结归巢与 T 细胞激活[39]。缺失 GRA4 的减毒株 ME49 Δ ompdc/ldh1/gra4 可解除对 TBK1 通路的抑制, 增强 I 型干扰素产生, 并诱导特异性 CD64⁺MAR-1⁺CD11b⁺ DC 亚群扩增, 提升肿瘤抗原提呈效率与 CD8⁺ T 细胞应答, 早期接种可实现对肿瘤的完全抵抗, 提示 GRA4 为肿瘤免疫治疗潜在靶点[18]。此外, 弓形虫感染激活树突状细胞中 MyD88 依赖的 IRE1 α /XBP1s 通路, 调控促炎因子分泌与 MHC I 类分子抗原提呈, cDC1 亚群特异性缺失该通路将导致 T 细胞应答缺陷[40]; SNX17 蛋白在 DC 中调控整合素回收与吞噬体成熟, 确保对弓形虫相关抗原的高效交叉呈递, 促进 CD8⁺ T 细胞活化[41]。

4.4. 直接抑制肿瘤生长

减毒弓形虫亦可通过直接作用于肿瘤细胞抑制其恶性表型。RH 与 ME49 株减毒弓形虫速殖子以剂量依赖方式抑制人乳腺癌细胞增殖与迁移, 调控 BRCA1、MYC、IL-6 等关键基因表达, 并影响核糖体及 IL-17 信号通路; 致密颗粒蛋白 GRA16 可激活 PTEN 信号通路, 诱导 hTERT 去磷酸化与表达下调, 导致端粒酶活性降低、端粒缩短, 进而触发结肠癌细胞凋亡; 同时, GRA16 亦可干扰核糖体信号通路, 展现多靶点抑瘤潜力[39]。弓形虫裂解抗原及分泌抗原在实体瘤模型中可以诱导肿瘤坏死与凋亡, 抑制血管生成并加剧氧化应激[42]。此外, ROP/GRA 效应蛋白家族, 如 ROP18、GRA24 在寄生泡膜定位释放, 通过非 IFN- γ 依赖机制调控宿主细胞周期与凋亡通路; 在卵巢癌模型中, 该过程依赖 CD8 α ⁺ DC、IL-12/IFN- γ 轴及 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞协同作用[33]。此类直接作用与免疫调节机制协同, 构成弓形虫多维度抗肿瘤效应的基础。

5. 展望

减毒弓形虫作为肿瘤免疫治疗的新兴策略, 近年来展现出多维度的抗肿瘤潜力。其不仅可通过激活 Th1 型免疫应答、增强树突状细胞功能及促进 CD8⁺ T 细胞浸润来重塑肿瘤免疫微环境[35] [37], 还能通过分泌特定效应蛋白, 如 GRA4、GRA16、TgWIP 等调控宿主关键信号通路, 从而直接抑制肿瘤细胞增殖、迁移或诱导其凋亡[7] [18] [43]。这些机制为开发基于减毒弓形虫的新型免疫治疗平台提供了坚实的理论基础。

未来研究可聚焦于优化减毒株的安全性与可控性。当前构建的多种基因工程减毒株, 如 WH3 Δ rop18、ME49 Δ ompdc/ldh1/gra4、 Δ srs14a、ME49 Δ cdpk3 等, 已在动物模型中证实可诱导强效且持久的免疫保护, 同时降低脑组织包囊形成风险[8] [18] [32] [34]。然而, 如何进一步消除潜在返祖毒力、确保在免疫缺陷个体中的安全性, 仍是临床转化的关键挑战。

此外, 弓形虫效应蛋白与宿主免疫系统存在互作关系。如 GRA4 通过促进 TBK1 泛素化降解抑制 I 型干扰素反应, 而其缺失株则可增强 IFN-I 产生并激活特异性树突状细胞亚群, 提升抗肿瘤 T 细胞应答[18]; SRS14A 通过泛素化 ASC 抑制 AIM2 炎症小体, 其缺失可促进 M1 型巨噬细胞极化与 CD8⁺ T 细胞

浸润[34]。这提示,精准编辑特定毒力或免疫调节基因,可定向编程减毒弓形虫的免疫刺激特性,实现对肿瘤微环境的精准干预。

在此基础上,随着基因工程与合成生物学的发展,利用减毒弓形虫作为递送载体表达肿瘤抗原,构建“工程化抗原递呈平台”有望成为重要研究方向。通过在减毒弓形虫基因组中引入肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs)或新抗原(neoantigens),可在其天然诱导的 Th1 型免疫背景下,实现抗原的高效递呈与特异性 T 细胞应答激活,从而将非特异性免疫刺激转化为针对肿瘤的精准免疫反应。该策略有望结合弓形虫对树突状细胞迁移与激活的促进作用,增强 CD8⁺ T 细胞介导的抗肿瘤效应,并提高免疫记忆的持久性。然而,该类工程化改造仍面临抗原表达稳定性、免疫耐受、宿主安全性及潜在脱靶效应等问题,需在严格的生物安全框架下进一步验证其可行性与临床转化价值。此外,弓形虫感染可能引发的肠道屏障损伤、肝损伤及过度炎症等系统性影响亦不可忽视[44]-[46]。综上,减毒弓形虫向临床转化,仍需在减毒策略优化、精准工程化改造、安全性系统评估及联合治疗模式等方面取得持续突破。因此,在推进临床应用前,需建立全面的风险评估体系。

6. 临床转化挑战和策略

减毒弓形虫的临床转化需考虑 CMC、非临床安全性评价、临床试验与监管科学四个维度。在 CMC 层面,其生产依赖活细胞培养体系, Bahreini 等人建立了 II 型 PRU 虫株的体内外联合扩增方案,在小鼠腹腔接种联合 HeLa 细胞培养,速殖子经 92%胎牛血清与 8%二甲基亚砷冻存液超低温保存后复苏活力达 80%,为后续 GMP 级别工艺开发提供了工艺雏形[47]。临床前安全性评价中, Niedelman 等人证实弓形虫关键毒力因子 ROP18 联合 ROP5 介导了对鼠类 IFN- γ 应答的免疫逃逸,但该机制在人类细胞中因缺乏免疫相关 GTP 酶系统而失效,提示小鼠安全性数据向人体外推存在种属间固有不确定性[48]。临床试验设计方面,在 B16F10 黑色素瘤模型中证实非复制型尿嘧啶营养缺陷株经瘤内注射后可通过 CD8⁺ T 细胞依赖性机制激发系统性抗肿瘤免疫应答并建立免疫记忆,且对肺癌和卵巢癌移植模型同样有效,为给药途径选择和适应证拓展提供了直接验证[49];在监管科学层面,减毒弓形虫兼具“活体生物药”与“基因修饰微生物载体”双重属性,FDA 于 2016 年发布的 MVGT 指南已明确微生物载体基因治疗产品的 CMC 表征要求及 IND 申报中的数据提交框架[50],并于 2026 年推行基于风险的分阶段 CMC 灵活性监管策略,允许申办方在 I 期临床试验阶段采用分阶段数据提交路径且不强制要求符合 21 CFR 211 的 cGMP 合规要求,为此类前沿平台的早期转化提供了务实的监管接口[51]。Fox 和 Bzik 在研究中进一步证明,敲除氨甲酰磷酸合成酶 II (CPSII)的尿嘧啶营养缺陷型虫株在免疫健全 BALB/c 小鼠乃至 IFN- γ 缺陷小鼠中均完全丧失毒力,且单次接种即可诱导长效保护性免疫,为减毒平台的 CMC 开发和安全性底线提供了关键的分子毒力基线[28]。

参考文献

- [1] Rui, R., Zhou, L. and He, S. (2023) Cancer Immunotherapies: Advances and Bottlenecks. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1212476. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212476>
- [2] Lotfalizadeh, N., Sadr, S., Morovati, S., Lotfalizadeh, M., Hajjafari, A. and Borji, H. (2024) A Potential Cure for Tumor-associated Immunosuppression by *Toxoplasma gondii*. *Cancer Reports*, **7**, e1963. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1963>
- [3] Chatterjee, R., Chowdhury, A.R., Nair, A.V., Hajra, D., Kar, A., Datey, A., et al. (2023) *Salmonella* Typhimurium PgtE Is an Essential Arsenal to Defend against the Host Resident Antimicrobial Peptides. *Microbiological Research*, **271**, Article ID: 127351. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127351>
- [4] Peres, N.G., Wang, N., Whitney, P., Engel, S., Shreenivas, M.M., Comerford, I., et al. (2021) CD4⁺ T Cell Immunity to *Salmonella* Is Transient in the Circulation. *PLOS Pathogens*, **17**, e1010004. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010004>
- [5] Chintala, N.K., Choe, J.K., McGee, E., Bellis, R., Saini, J.K., Banerjee, S., et al. (2023) Correlative Analysis from a

- Phase I Clinical Trial of Intrapleural Administration of Oncolytic Vaccinia Virus (Olvi-Vec) in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1112960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112960>
- [6] Mayer, R.L., Verbeke, R., Asselman, C., Aernout, I., Gul, A., Eggermont, D., *et al.* (2022) Immunopeptidomics-Based Design of mRNA Vaccine Formulations against *Listeria monocytogenes*. *Nature Communications*, **13**, Article No. 6075. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33721-y>
- [7] Li, J., El Shanawany, E.E., Hassan, S.E., Li, P., Sun, J., Li, H., *et al.* (2026) *Toxoplasma gondii* as a Drug for Anti-Tumor Immunotherapy: Mechanisms, Challenges, and Perspectives. *Parasite*, **33**, Article No. 4. <https://doi.org/10.1051/parasite/2026006>
- [8] Wang, C., Fu, S., Yu, X., Zhou, H., Zhang, F., Song, L., *et al.* (2024) *Toxoplasma* WH3 δ rop18 Acts as a Live Attenuated Vaccine against Acute and Chronic Toxoplasmosis. *npg Vaccines*, **9**, Article No. 197. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00996-9>
- [9] Black, M.W. and Boothroyd, J.C. (2000) Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 607-623. <https://doi.org/10.1128/membr.64.3.607-623.2000>
- [10] Ihara, F. and Nishikawa, Y. (2021) *Toxoplasma gondii* Manipulates Host Cell Signaling Pathways via Its Secreted Effector Molecules. *Parasitology International*, **83**, Article ID: 102368. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102368>
- [11] Seizova, S., Ferrel, A., Boothroyd, J. and Tonkin, C.J. (2024) *Toxoplasma* Protein Export and Effector Function. *Nature Microbiology*, **9**, 17-28. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01563-z>
- [12] Morales, P., Brown, A.J., Sangaré, L.O., Yang, S., Kuihon, S.V.N.P., Chen, B., *et al.* (2024) The *Toxoplasma* Secreted Effector TgWIP Modulates Dendritic Cell Motility by Activating Host Tyrosine Phosphatases Shp1 and Shp2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **81**, Article No. 294. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05283-3>
- [13] Shallberg, L.A. and Hunter, C.A. (2021) Long Live the King: *Toxoplasma gondii* Nucleomodulin Inhibits Necroptotic Cell Death. *Cell Host & Microbe*, **29**, 1165-1166. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.010>
- [14] Cowan, M.N., Kovacs, M.A., Sethi, I., Babcock, I.W., Still, K., Batista, S.J., *et al.* (2022) Microglial STAT1-Sufficiency Is Required for Resistance to Toxoplasmic Encephalitis. *PLOS Pathogens*, **18**, e1010637. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010637>
- [15] Murillo-Léon, M., Bastidas-Quintero, A.M. and Steinfeldt, T. (2024) Decoding *Toxoplasma gondii* Virulence: The Mechanisms of IRG Protein Inactivation. *Trends in Parasitology*, **40**, 805-819. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.07.009>
- [16] Singh, S., Murillo-León, M., Endres, N.S., Arenas Soto, A.F., Gómez-Marín, J.E., Melbert, F., *et al.* (2023) ROP39 Is an Irgb10-Specific Parasite Effector That Modulates Acute *Toxoplasma gondii* Virulence. *PLOS Pathogens*, **19**, e1011003. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011003>
- [17] Hashizaki, E., Sasai, M., Okuzaki, D., Nishi, T., Kobayashi, T., Iwanaga, S., *et al.* (2023) *Toxoplasma* IWS1 Determines Fitness in Interferon- γ -Activated Host Cells and Mice by Indirectly Regulating ROP18 mRNA Expression. *mBio*, **14**, e03256-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03256-22>
- [18] Hu, Z., Zhang, Y., Xie, Y., Yang, J., Tang, H., Fan, B., *et al.* (2024) The *Toxoplasma* Effector GRA4 Hijacks Host TBK1 to Oppositely Regulate Anti-*T. gondii* Immunity and Tumor Immunotherapy. *Advanced Science*, **11**, Article ID: 2400952. <https://doi.org/10.1002/advs.202400952>
- [19] Lockyer, E.J., Torelli, F., Butterworth, S., Song, O., Howell, S., Weston, A., *et al.* (2023) A Heterotrimeric Complex of *Toxoplasma* Proteins Promotes Parasite Survival in Interferon γ -Stimulated Human Cells. *PLOS Biology*, **21**, e3002202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002202>
- [20] Gómez-Chávez, F., Murrieta-Coxca, J.M., Caballero-Ortega, H., Morales-Prieto, D.M. and Markert, U.R. (2023) Host-pathogen Interactions Mediated by Extracellular Vesicles in *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, **158**, Article ID: 103957. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.103957>
- [21] Dulcemaria, H., Stephen, W., Luz, S.S., *et al.* (2022) Interferon-Inducible E3 Ligase RNF213 Facilitates Host-Protective Linear and K63-Linked Ubiquitylation of *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuoles. *mBio*, **13**, e0188822-e0188822. <https://doi.org/10.1128/mbio.01888-22>
- [22] Seizova, S., Ruparel, U., Garnham, A.L., Bader, S.M., Uboldi, A.D., Coffey, M.J., *et al.* (2022) Transcriptional Modification of Host Cells Harboring *Toxoplasma gondii* Bradyzoites Prevents IFN γ -Mediated Cell Death. *Cell Host & Microbe*, **30**, 232-247.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.012>
- [23] Li, H., Zhang, J., Su, C., Yang, Z., Mei, X., Zhang, Z., *et al.* (2023) Dynamic Changes in TIGIT Expression on the T-Cell Surface and TIGIT-Mediated T-Cell Dysfunction in the Brains of Mice with Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *Acta Tropica*, **241**, Article ID: 106871. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106871>
- [24] Bergersen, K.V., Kavvathas, B., Ford, B.D. and Wilson, E.H. (2024) *Toxoplasma* Infection Induces an Aged Neutrophil Population in the CNS That Is Associated with Neuronal Protection. *Journal of Neuroinflammation*, **21**, Article No. 189. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03176-7>
- [25] James, E.R., Matheny, S., Overby, J., Sim, B.K.L., Eappen, A.G., Li, T., *et al.* (2022) A First for Human Vaccinology:

- GMP Compliant Radiation Attenuation of *Plasmodium falciparum* Sporozoites for Production of a Vaccine against Malaria. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 851028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.851028>
- [26] Pourmohammadi, S.F., Bahreini, M.S., Bajelan, S., Shamsaei Sarvestani, A., Shahriari, B., Mohammadianpanah, M., *et al.* (2025) Exploring the Application of Gamma Radiation-Attenuated *Toxoplasma gondii* Tachyzoites: A Promising Vaccine Candidate against Toxoplasmosis. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **18**, e158952. <https://doi.org/10.5812/jjm-158952>
- [27] Finkensieper, J., Mayerle, F., Rentería-Solís, Z., Fertey, J., Makert, G.R., Lange, F., *et al.* (2023) Apicomplexan Parasites Are Attenuated by Low-Energy Electron Irradiation in an Automated Microfluidic System and Protect against Infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, **122**, 1819-1832. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07880-w>
- [28] Fox, B.A. and Bzik, D.J. (2002) De Novo Pyrimidine Biosynthesis Is Required for Virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **415**, 926-929. <https://doi.org/10.1038/415926a>
- [29] Fox, B.A. and Bzik, D.J. (2010) Avirulent Uracil Auxotrophs Based on Disruption of Orotidine-5'-Monophosphate Decarboxylase Elicit Protective Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, **78**, 3744-3752. <https://doi.org/10.1128/iai.00287-10>
- [30] Fox, B.A. and Bzik, D.J. (2015) Nonreplicating, Cyst-Defective Type II *Toxoplasma gondii* Vaccine Strains Stimulate Protective Immunity against Acute and Chronic Infection. *Infection and Immunity*, **83**, 2148-2155. <https://doi.org/10.1128/iai.02756-14>
- [31] Gigley, J.P., Fox, B.A. and Bzik, D.J. (2009) Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii* Develops Primarily by Local Th1 Host Immune Responses in the Absence of Parasite Replication. *The Journal of Immunology*, **182**, 1069-1078. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1069>
- [32] Wu, M., Liu, S., Chen, Y., Liu, D., An, R., Cai, H., *et al.* (2022) Live-Attenuated ME49δcdpk3 Strain of *Toxoplasma gondii* Protects against Acute and Chronic Toxoplasmosis. *npj Vaccines*, **7**, Article No. 98. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00518-5>
- [33] Fox, B.A., Sanders, K.L., Rommereim, L.M., Guevara, R.B. and Bzik, D.J. (2016) Secretion of Rhopty and Dense Granule Effector Proteins by Nonreplicating *Toxoplasma gondii* Uracil Auxotrophs Controls the Development of Antitumor Immunity. *PLOS Genetics*, **12**, e1006189. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006189>
- [34] Yang, K., Song, Y., Yuan, H., Yang, Z., He, H., Nie, L., *et al.* (2025) The *Toxoplasma* Surface SRS14A Promotes ASC Ubiquitination to Suppress AIM2 Inflammasome and Tumor Immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **319**, Article ID: 145343. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145343>
- [35] Nguyen, Y.T.M., Sibley, L., Przanowski, P., Zhao, X., Kovacs, M., Wang, S., *et al.* (2024) *Toxoplasma gondii* Infection Supports the Infiltration of T Cells into Brain Tumors. *Journal of Neuroimmunology*, **393**, Article ID: 578402. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2024.578402>
- [36] Payne, S.N., Emmerich, P.B., Davis, N.M., Deming, D.A. and Knoll, L.J. (2021) Novel Murine Pancreatic Tumor Model Demonstrates Immunotherapeutic Control of Tumor Progression by a *Toxoplasma gondii* Protein. *Infection and Immunity*, **89**, e00508-21. <https://doi.org/10.1128/iai.00508-21>
- [37] Bahwal, S.A., Chen, J.J., E, L., Hao, T., Chen, J., Carruthers, V.B., *et al.* (2022) Attenuated *Toxoplasma gondii* Enhances the Antitumor Efficacy of Anti-PD1 Antibody by Altering the Tumor Microenvironment in a Pancreatic Cancer Mouse Model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **148**, 2743-2757. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04036-8>
- [38] Song, Y., Yuan, H., Yang, X., Yang, Z., Ren, Z., Qi, S., *et al.* (2024) The Opposing Effect of Acute and Chronic *Toxoplasma gondii* Infection on Tumor Development. *Parasites & Vectors*, **17**, Article No. 247. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06240-6>
- [39] Chua, Y.W. and Chow, S.C. (2025) Bug as a Drug: Unveiling Anti-Cancer Properties of *Toxoplasma gondii* and Its Therapeutic Prospects in Cancer Immunotherapy. *Acta Tropica*, **267**, Article ID: 107684. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107684>
- [40] Poncet, A.F., Bosteels, V., Hoffmann, E., Chehade, S., Rennen, S., Huot, L., *et al.* (2021) The UPR Sensor IRE1 α Promotes Dendritic Cell Responses to Control *Toxoplasma gondii* Infection. *The EMBO Reports*, **22**, Article No. EMBR201949617. <https://doi.org/10.15252/embr.201949617>
- [41] Dinamarca, S., Croce, C., Salvioni, A., Garrido, F., Fidalgo, S.E., Bigliani, G., *et al.* (2025) SNX17 Regulates Antigen Internalisation and Phagosomal Maturation by Dendritic Cells. *Immunology*, **174**, 167-185. <https://doi.org/10.1111/imm.13878>
- [42] Younis, S.S., Elmansory, B.M., Elrefaey, H.A., Nasef, N.A., Elakshar, S.H., Awad, R.A., *et al.* (2025) Evaluation of Antitumor Effects of *Toxoplasma gondii* Different Antigens on Ehrlich Solid Carcinoma in Mice. *Parasite Immunology*, **47**, e70036. <https://doi.org/10.1111/pim.70036>
- [43] Seo, S., Shin, J., Ham, D. and Shin, E. (2022) PTEN/AKT Signaling Pathway Related to hTERT Downregulation and

- Telomere Shortening Induced in *Toxoplasma* GRA16-Expressing Colorectal Cancer Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **153**, Article ID: 113366. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113366>
- [44] Liu, S., Zheng, Y., Cui, B., Yang, J., Yuan, B., Cao, Y., *et al.* (2025) Gut Microbiota-Derived Butyrate Alleviates the Impairment of Mice Intestinal Integrity Caused by *Toxoplasma gondii* Infection. *Life Sciences*, **374**, Article ID: 123709. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123709>
- [45] Xu, K., Zheng, Q., Zu, M., Ma, J., Xia, W., Liu, D., *et al.* (2026) Pharmacological Inhibition of the MST2/Hippo Signaling Pathway Mitigates *Toxoplasma gondii*-Induced Apoptosis and Immunopathology in Macrophage and Mice Liver. *Biochemical Pharmacology*, **250**, Article ID: 117944. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2026.117944>
- [46] Qiu, Z., Chen, L., Hou, X., Sheng, J., Xu, J., Xu, J., *et al.* (2023) *Toxoplasma gondii* Infection Triggers Ongoing Inflammation Mediated by Increased Intracellular Cl⁻ Concentration in Airway Epithelium. *Journal of Infection*, **86**, 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.037>
- [47] Bahreini, M.S., Nohtani, M., Salemi, A.M., Mirzaeipour, M., Dastan, N., Bajelan, S., *et al.* (2021) Introduction of Protocols for Mass Production of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites of the Genotype II PRU Strain. *Animal Models and Experimental Medicine*, **4**, 278-282. <https://doi.org/10.1002/ame2.12174>
- [48] Niedelman, W., Gold, D.A., Rosowski, E.E., Sprockholt, J.K., Lim, D., Farid Arenas, A., *et al.* (2012) The Rhoptry Proteins ROP18 and ROP5 Mediate *Toxoplasma gondii* Evasion of the Murine, but Not the Human, Interferon- γ Response. *PLOS Pathogens*, **8**, e1002784. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002784>
- [49] Baird, J.R., Byrne, K.T., Lizotte, P.H., Toraya-Brown, S., Scarlett, U.K., Alexander, M.P., *et al.* (2013) Immune-Mediated Regression of Established B16F10 Melanoma by Intratumoral Injection of Attenuated *Toxoplasma gondii* Protects against Rechallenge. *The Journal of Immunology*, **190**, 469-478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201209>
- [50] FDA (2016) Recommendations for Microbial Vectors Used for Gene Therapy: Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/recommendations-microbial-vectors-used-gene-therapy>
- [51] FDA (2026) Flexible Requirements for Cell and Gene Therapies to Advance Innovation. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/flexible-requirements-cell-and-gene-therapies-advance-innovation>