

溶瘤腺病毒在肿瘤靶向治疗中的研究进展

刘旭 张东亮 刘文虎[△]

(首都医科大学附属北京友谊医院肾内科,首都医科大学肾病学系 北京 100050)

摘要 溶瘤腺病毒是一组通过基因工程构建的腺病毒,能够选择性在肿瘤细胞中完成感染-复制周期,从而特异性地杀伤、溶解肿瘤而不伤及其他正常细胞、组织,其作用机制包括通过基因的缺失突变、插入特异性启动子、以及通过病毒结构蛋白的修饰等方面,实现肿瘤靶向治疗作用。本文就相关研究及进展进行综述。

关键词 溶瘤腺病毒 肿瘤 靶向治疗

中图分类号 R730.5, R394.8 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)07-1382-03

Progress of Target Therapy with Oncolytic Adenovirus for Cancer

LIU Xu, ZHANG Dong-liang, LIU Wen-hu[△]

(Department of Nephrology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT: Oncolytic adenovirus is a group of adenovirus, which constructed through genetic engineering. It can execute infection-replication cycle in tumor cells selectively, which specifically kill, dissolve tumors without harming normal cells, tissues. Its mechanisms include: the gene deletion mutants, inserted into specific promoter, and as well as through the modification of viral structural proteins, etc, to achieve targeted cancer therapy. In this review, oncolytic adenovirus for targeted cancer therapy research and progress are introduced.

Key words: Oncolytic adenovirus; Cancer; Target therapy

Chinese Library Classification(CLC): R730.5, R394.8 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)07-1382-03

临床治疗肿瘤的主要方法--手术切除与放、化疗仍存在一定的毒副作用以及复发率高等难题。寻找更加安全、有效的方法进行肿瘤治疗成为人们所关注的问题。上世纪末以来,随着基因治疗与病毒治疗研究的不断深入,可以选择性在肿瘤细胞中复制、并可起到溶瘤治疗效果的溶瘤腺病毒成为肿瘤靶向治疗中人们所关注的焦点。溶瘤腺病毒是能够特异性感染肿瘤细胞并在肿瘤细胞中完成感染-复制周期,从而特异性地杀伤、溶解肿瘤而不伤及其他正常细胞、组织。本文就相关进展进行综述。

1 腺病毒的生物学特征

自上个世纪50年代发现并成功分离腺病毒以来,已陆续发现了100余个血清型,其中人腺病毒有47种血清型,分为A-F六个亚群。其中2型和5型在溶瘤腺病毒的发展研究中应用的最为广泛,它们在血清学分类上均属于C亚群,在DNA序列上有95%的同源性。腺病毒的很多生物学特性让其在溶瘤病毒治疗研究中成为引人注目的焦点:如能有效进行增殖,有高滴度的重组病毒产量(通常>1010pfu/ml),浓缩后还可增加100倍;可在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因(除一些抗腺病毒感染的淋巴瘤细胞);病毒基因组不整合到宿主细胞(除卵细胞)基因组中,减少了重组突变危险;病毒基因组大,可插入大片段外源基因(至多可达35kb)等。

野生型人腺病毒基因组由线性双链DNA分子组成,长度约36kb。腺病毒感染细胞主要有以下几个步骤^[1,2]:①腺病毒的扩散及其纤毛与细胞分子受体黏附、结合;②病毒颗粒与细胞膜特异性受体结合后经内吞作用进入细胞,随即脱衣壳,病毒DNA穿过核孔进入细胞核;③基因转录及病毒DNA复制。腺病毒的转录又可分三个时期:早期(E1A、E1B、E2、E3、E4基因),中期(IX、Iva2基因)和晚期(主要为编码病毒包膜蛋白的基因)。E1A为病毒基因组中最早被转录的基因,它的编码产物E1A蛋白质可与宿主细胞中pRb家族成员如pRb、p107、p130结合,导致E2F转录因子与它们分离,促进DNA的复制及细胞周期的开始。但是由E1A蛋白质同时激活了细胞修复及其自我防御机制--p53依赖/非p53依赖的细胞凋亡途径。此时,腺病毒E1B基因的表达产物E1B-55KD蛋白和/或E4orf6与细胞p53结合并使之失活,同时腺病毒的E1B-19KD蛋白质作为细胞凋亡抑制因子bcl-2的同源物通过灭活和清除Bax家族成员也发挥抑制细胞凋亡的作用,从而阻止了细胞凋亡,保证了腺病毒复制周期的顺利进行。另外在转录早期,E2编码三种蛋白(DNA结合蛋白、末端蛋白前体、病毒DNA聚合酶),为病毒DNA合成所必需;E3的编码产物主要功能是破坏宿主的防御机制及促进细胞溶解;E4区的基因产物通常被称为orf1~6/7,主要与病毒DNA复制、mRNA转运及细胞凋亡的调控有关。转录中晚期的基因产物则主要编码腺病毒的结构蛋白形成病毒衣壳包装基因组,最终完成病毒的生活周期。

2 溶瘤腺病毒对肿瘤进行靶向治疗的作用机制

2.1 通过基因的缺失突变

即利用基因工程重组技术使病毒基因发生缺失突变,以削

作者简介:刘旭(1983-),男,医学硕士,住院医师,研究方向:肾脏疾病的诊治,电话:15210102276, E-mail: liuxu_000@sina.com
[△]通讯作者:刘文虎,博士生导师,电话:010-63139144, E-mail: liuw2002@yahoo.cn
(收稿日期:2010-11-10 接受日期:2010-11-30)

弱病毒在正常细胞中的复制而不影响其在肿瘤细胞的复制。首先应用在此机制上的基因是 E1B。Bischoff 等人于 1996 年构建成功的 dl1520(又称为 ONYX-015),即是删除了腺病毒在正常细胞中复制所需的编码 E1B-55KD 蛋白的关键基因以达到了其靶向溶瘤作用^[3]。由于缺乏 E1B-55KD 蛋白质产物,不能与正常细胞中的 p53 结合使其失活,故使正常细胞通过 p53 介导的凋亡途径走向死亡。而大多肿瘤细胞存在 p53 基因突变或功能缺失,细胞丧失了 p53 依赖的凋亡能力,故重组后的腺病毒在肿瘤细胞中仍可继续复制。之后有研究表明 dl1520 也可以在存在野生型肿瘤蛋白 P53 基因的细胞中复制。对此有很多解释,如腺病毒基因组编码的 E4orf6 也可以与 p53 相结合抑制 p53 介导的细胞凋亡途径,使 E1B-55KD 缺陷的腺病毒可以在含有野生型肿瘤蛋白 p53 的肿瘤中复制。

除此之外,还可以将病毒单一保守区 E1A-CR2 区基因删除从而使病毒失去与 pRb 结合功能以达到靶向溶瘤目的,例如 dl922-947 和 $\Delta 24$ ^[4]。CR2 是腺病毒 E1A 基因中的一段保守区域,编码的蛋白质与细胞中 pRb 家族蛋白质结合,使 E2F 转录因子从 E2F-Rb 复合体中分离释放,促使细胞进入 G1-S 期从而保证病毒的正常复制。故 CR2 区基因突变缺失的 dl922-947 和 $\Delta 24$ 可在 pRb 功能缺陷的肿瘤细胞中复制,而不在正常细胞中复制,从而达到靶向溶瘤的目的。在这之后,又出现了一些联合 E1A 和 E1B 基因改变的腺病毒以增强它们对肿瘤杀伤的选择性。例如溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 同时存在 E1A 和 E1B-55KD 两处突变以限制它只能够在 p53 和 pRb 同时缺乏的细胞中复制^[5]。

2.2 利用特异性启动子

即在病毒基因组中插入肿瘤特异性启动子调控病毒复制基因使它只在肿瘤细胞中转录、表达。某些肿瘤,如前列腺癌、生殖细胞癌等,能够表达胎儿期表达但在出生后不再正常表达的蛋白质,利用此特征一些溶瘤腺病毒被构建。DeWeese 等最早利用此机制研制了 CV706^[6],该病毒在 E1A 基因区上游加入了前列腺癌抗原(PSA)特异性启动子,即用 PSA 编码基因 PSE 作为 E1a 区的启动子并删除 E3 区,从而获得了在前列腺癌细胞中特异性增殖的能力。PSA 是前列腺特异性抗原,其编码基因 PSE(Human prostate-specific gene)在干细胞及前列腺癌细胞中高度表达,故可用此特性构建重组溶瘤腺病毒用于前列腺的治疗。之后 Yu 等人构建了重组腺病毒载体 CV787,分别用 PB 和 PSE 作为 E1A 区、E2B 区启动子,保留完整的 E3 区,可以靶向溶解 PSA 阳性前列腺癌细胞^[7]。且有进一步研究表明它与泰素化疗之间存在着协同杀瘤作用, CV787 以低于单独应用 1000 倍的剂量即可以使肿瘤完全消退。甲胎蛋白(AFP)被广泛用作肝癌标志物,在干细胞、胚肝及原发性肝癌细胞中高度表达, AvE2a04i 即是利用 AFP 基因启动子调控 E1A 区,靶向于表达甲胎蛋白(AFP)的肝癌细胞。Yuanhao Li 等构建了重组腺病毒载体 CV890,用 AFP 基因作为 E1A 区的启动子,用脑心肌炎病毒的 IRES(internal ribosomal entry site)作为 E1B 的启动子,构建成一个由 AFP 控制的 E1A-IRES-E1B 双顺反子盒, IRES 可允许核糖体不从 mRNA 的 5' 到 3' 阅读而直接在此序列处结合 mRNA 并起始翻译,类似的还有 CV732 和 CV840,同时他们的研究表明 CV890 与阿霉素联合应用时在临床前试

验中显示出协同杀瘤作用^[8]。

E2F 是腺病毒细胞周期中起重要转录激活作用的活性蛋白,能激活一系列促使细胞进入 S 期并进行 DNA 复制的蛋白质的表达,促进细胞分裂增殖,去磷酸或低磷酸化的 RB 蛋白可与 E2F 结合,形成复合物,可掩盖 E2F 蛋白的活化转录功能区序列,抑制 E2F 蛋白促进细胞由 G1 期进入 S 期的作用,从而抑制细胞增殖,大多数恶性肿瘤细胞都存在 RB 蛋白缺陷,则抑制 E2F 表达的途径被破坏, E2F-1 转录因子高水平表达。因此可以通过利用 E2F 启动子对溶瘤腺病毒转录进行调控使其达到靶向溶瘤作用,如 Ad6pAE2f 便是通过 E2F-1 基因启动子对 E1A 区进行调控^[9]。ONYX-411 则是应用 2 个 E2F-1 启动子分别调控 E1A 和 E4 基因,同时删去了 E1A 区的 CR2 和 E3B 区,类似的还有 ONYX-410、ONYX-150^[10]。另外,端粒酶的高表达也是恶性肿瘤的特征, hTERT(人端粒酶逆转录酶)是端粒酶的催化亚基,它在 85%左右的肿瘤细胞中活性升高,且其活性与肿瘤恶性程度密切相关。故可根据 hTERT 的特性设计重组溶瘤腺病毒使其选择性的在 hTERT 阳性的肿瘤细胞中复制表达,达到靶向溶瘤效果。重组溶瘤腺病毒 Ad.TERT 即是由 hTERT 基因启动子调控 5 型腺病毒 E1A 基因来实现其在肿瘤细胞内特异性复制,对端粒酶逆转录酶阳性的肿瘤细胞具有广谱的抗肿瘤作用。王娟等人也是通过 hTERT 启动子控制腺病毒复制必需的 E1A 基因,并将 E1B-55KD 基因删除,构建出肿瘤特异性的双靶向腺病毒 TD55,比 ZD55 具有更好的正面效果^[11]。除此之外,其他启动子还有:存活蛋白(survivin)基因启动子、PEG-3 (Progression elevated gene-3) 启动子、癌胚抗原(CEA)基因启动子、左旋丝束蛋白基因启动子、分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI)基因启动子、骨钙素基因启动子、缺氧反应元件(HRE)基因启动子、COX-2 基因启动子等^[12]。

2.3 对病毒包膜蛋白进行修饰

即通过病毒结构蛋白的修饰,在病毒感染细胞阶段进行靶向调控,降低其对正常组织的亲和感染,提高其对肿瘤细胞的特异性感染,从而提高病毒的肿瘤靶向性和溶瘤效应。以 2 型和 5 型为例的溶瘤腺病毒感染细胞要通过其纤毛与细胞表面特异的分子受体如柯萨奇-腺病毒受体(Coxsackie-adenovirus receptor, CAR)、整合素等黏附、结合,然后通过"内化作用"进入细胞。然而不是所有肿瘤细胞都表达这些特殊受体,而一些正常组织(代表性的如肝)却可以强烈表达这些特殊受体,因此,可通过对病毒结构蛋白基因进行修饰来克服肿瘤细胞 CAR 低表达水平及人类细胞广泛存在 CAR 受体带来的限制。由于腺病毒的"内化作用"是通过病毒包膜蛋白表面的一段肽链精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)与细胞细胞表面的"第二受体"整合素 $\alpha\gamma\beta 3$ 和 $\alpha\gamma\beta 5$ 结合介导完成,而整合素 $\alpha\gamma\beta 3$ 和 $\alpha\gamma\beta 5$ 表达于大多数肿瘤细胞,因此 Bibao 等人通过将 RGD 插入到纤毛 knob 的 HI 环上,发现病毒感染效率感染增强并降低了毒性^[13]。由于肿瘤(如肾癌) Ad5CAR 表达水平较低, Ad3CAR 表达呈高水平,则可将 Ad5 的杆状蛋白区和 Ad3 的把柄去组成嵌合纤维蛋白,使修饰后的 Ad5 变为可与 Ad3CAR 结合,进而使其可以更高效的感染肿瘤细胞,从而增强病毒靶向溶瘤作用^[14]。Ad5/3- $\Delta 24$ 是以 Ad3 亚型的纤维把柄区替代原有 Ad5 的相应区域,从而增强了

感染细胞效率。除此之外还可以向纤维蛋白去引入靶向配体,如 Adv-E1BdF-F/K20,它是在溶瘤腺病毒纤维蛋白 C 末端加上 20 个赖氨酸残基对其进行修饰,使其可以与广泛表达的肝磷脂硫酸盐受体(heparin sulfate receptors)相结合,同时删除 E1B 基因,增强了其感染神经胶质瘤细胞并在细胞中复制、溶瘤的能力^[15]。

3 研究现状

至今,dl1520, CV706, CV890 等已进行过临床试验的一些评估,dl1520 更是被广泛试验、评估各种输送途径的安全相关性及其效用,包括瘤体内注射、腹腔内注射、动脉与静脉内注射等。溶瘤腺病毒联合放、化疗的试验结果也让人欣喜, CV890 联合阿霉素, CV787 联合泰素放疗, CV706 联合放疗治疗前列腺癌、Ad5- Δ 24RGD 联合放疗治疗神经胶质瘤等均取得了初步效果^[16]。在双靶向、多靶向方面,刘新恒院士等人在“靶向基因-病毒治疗”的基础上将 hTERT-E1A-AFP-E1B-HCCS1 (或 LFIRE) 与一个杀伤功能很强的 hTERT-E1A-AFP-E1B-IL-24 联合构成癌症的双靶向病毒-双基因治疗,双基因有更好的杀伤性、双靶向有更好的安全性^[17]。有学者提出用放射性核素对溶瘤腺病毒进行标记,利用病毒溶瘤和放射性核素辐射效应协同作用杀死癌细胞可能成为增强溶瘤腺病毒抗癌作用的有效措施^[18]。除此以外,研究发现一些促凋亡基因和细胞因子的表达也可增强腺病毒的溶瘤效应,如 IL-12 和 B7-1、TNF- α 、干扰素等,将它们插入有特异性启动子调控 E1A 基因的溶瘤腺病毒中,可进一步增强其溶瘤效果。可是,也有研究提出在感染溶瘤腺病毒的细胞中,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)扮演了“生存因子”的角色,联合溶瘤腺病毒和 TNF- α 抑制剂可取得更好的治疗效果^[19]。

4 小结与展望

目前对于溶瘤腺病毒的研究与临床应用还存在很多有待解决的问题。如由于溶瘤腺病毒与其他病毒一样,进入血液后很快即被清除,而并不是所有肿瘤都可进行瘤体直接注射,使溶瘤腺病毒的应用范围受到限制。另外,有研究表明野生型 E1A 表达会诱导局部 TNF- α 产物释放,并可介导肝细胞对杀伤的敏感性增强,从而导致肝细胞中毒^[20]。随着研究的进一步深入,问题的逐步解决,溶瘤腺病毒在肿瘤靶向治疗中安全性、扩散效果、特异性、溶瘤效果会得到更好的改善,它在肿瘤治疗中的作用将是未来备受瞩目的焦点。

参考文献(References)

- [1] Fukazawa T, Matsuoka J, Yamatsuji T, et al. Adenovirus-mediated cancer gene therapy and virotherapy [J]. *Int J Mol Med*, 2010,25(1): 3-10
- [2] Ribacka C, Pesonen S, Hemminki A. Cancer, stem cells, and oncolytic viruses[J]. *Ann Med*, 2008,40 (7):496-505
- [3] Yang CT, You L, Uematsu K, et al. p14ARF modulates the cytolytic effect of ONYX-015 in mesothelioma cells with wild-type p53 [J]. *Cancer Res*, 2001,61(16):5959-5963
- [4] Roland L, Chu L, Dawn E, et al. Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer [J]. *Clinical Cancer Res*, 2004,10(16):5299-5312
- [5] Fukuda K, Abei M, Ugai H, et al. E1A, E1B double-restricted replica-

- tive adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer [J]. *Cancer Gene*, 2009, 16(2): 126-136
- [6] Dewese TL, Vanderpoe IH, Li S, et al. A phase I trial of CV706, a replication competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy [J]. *Cancer Res*, 2001,61(20):7474-7472
- [7] Yu DC, Chen Y, Dilley J, et al. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel [J]. *Cancer Res*, 2001,61(2):517-525
- [8] Li Y, Yu DC, Chen Y, et al. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin [J]. *Cancer Res*, 2001,61(17): 6428-6436
- [9] Bristol JA, Zhu MZ, Li H, et al. In vitro and in vivo activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF [J]. *Molecular Therapy*, 2003,7(6):755-764
- [10] Wei N, Fan JK, Gu JF, et al. A double-regulated oncolytic adenovirus with improved safety for adenocarcinoma therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,388(2):234-239
- [11] 张金合,戴平.溶瘤腺病毒的靶向性策略[J].生命的化学,2006,26(1): 17-19
Zhang Jin-he, Dai Ping. Oncolytic adenovirus targeting strategies [J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(1):17-19
- [12] Bilbao G, Contreras I, Mitriev I, et al. Genetically modified adenovirus vector containing an RGD peptide in the HI loop of the fiber knob improves gene transfer to nonhuman primate isolated pancreatic islets [J]. *Am J Transplant*, 2002,2(3):237-243
- [13] Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A, et al. Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors [J]. *Cancer Res*, 2002,62(15):4273-4281
- [14] Shinoura N, Yoshida Y, Tsunoda R, et al. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas [J]. *Cancer Res*, 1999,59(14):3411-3416
- [15] Lee YS, Kim JH, Choi KJ, et al. Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model [J]. *Cancer Ther*, 2006,12(19):5859-5868
- [16] Short JJ, Curiel DT. Oncolytic adenoviruses targeted to cancer stem cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009,8(8):2096-2102
- [17] 刘新恒,顾锦法.癌症的靶向基因-病毒治疗新进展及抗癌策略.癌症,2006,25(10):1320-1322
Liu Xin-heng, Gu Jin-fa. Targeted cancer gene-virus therapy new progress and anti-cancer strategies. *Cancer*, 2006,25(10):1320-1322
- [18] 米彦露,龙亚红,李云春.放射性核素标记溶瘤腺病毒治疗肿瘤的可行性[J].同位素,2009,22(1):43-47
Mi Yan-xia, Long Ya-hong, Li Yun-chun. Radionuclide marker of tumor oncolytic adenovirus therapy feasibility [J]. *Isotope*, 2009,22(1): 43-47
- [19] Salako MA, Kulbe H, Ingemarsdotter CK, et al. Inhibition of the Inflammatory Cytokine TNF- α Increases Adenovirus Activity in Ovarian Cancer via Modulation of cIAP1/2 Expression [J]. *Mol Ther*, 2010, [Epub ahead of print]
- [20] Engler H, Machemer T, Philopena J, et al. Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF- α [J]. *Virology*, 2004, 328(1): 52-61