

溶瘤腺病毒的研究进展

陈建发综述，黄宗海审校

关键词：肿瘤/治疗；基因疗法；腺病毒  
中图分类号：R730.54 文献标识码：A 文章编号：1000-8578 (2004) 04-0243-03

0 引言

受某些肿瘤患者在感染病毒后出现自发性肿瘤缓解这一现象的启发,早在上个世纪初便有溶瘤病毒治疗的研究<sup>[1]</sup>。腺病毒发现后不久也曾被用来治疗头颈部恶性肿瘤,注射腺病毒后肿瘤有不同程度缩小,但治疗后肿瘤易复发,效果难以持久;直到1996年,Bischoff等<sup>[2]</sup>首次报道去除部分E1B的重组腺病毒Onyx-015能在p53异常的肿瘤细胞选择性复制引起肿瘤杀伤作用,溶瘤腺病毒研究才再次受到广泛关注并且发展迅速,出现了许多新型溶瘤腺病毒种类,使溶瘤腺病毒成为恶性肿瘤一种新的治疗平台。

1 溶瘤腺病毒的作用机理<sup>[1,3-5]</sup>

许多种DNA病毒,如腺病毒、SV40、HPV-16等都可以改变宿主细胞细胞周期,其原因主要是病毒产生一些蛋白作用于宿主细胞细胞周期调节蛋白,使静止期细胞进入细胞周期以利于病毒DNA的复制。不同病毒影响细胞周期的机制不一,腺病毒主要通过Rb和p53细胞信号通路干扰宿主细胞细胞周期。

1.1 Rb和p53细胞信号通路(见图1):Rb(眼癌蛋白,retinoblastoma protein)的作用是与E2F(使细胞从G<sub>1</sub>期进入S期的一种转录因子)结合,细胞内游离E2F水平下降,细胞由G<sub>1</sub>期进入S期受阻,细胞分裂增殖受抑制。与此同时,E2F也促进p14ARF和cyclinE等物质的产生,其中p14ARF通过Mdm2(泛素连接酶途径)减少p53降解并在核仁周围聚积。p53与细胞周期停止(cell cycle arrest)基因和凋亡诱导基因(如p21<sup>WAF1</sup>和Bax基因等)上游的p53反应子结合从而阻止静止期细胞进入细胞周期或诱

导细胞凋亡。通过Rb和p53细胞信号通路,宿主细胞的分裂增殖处于动态平衡。

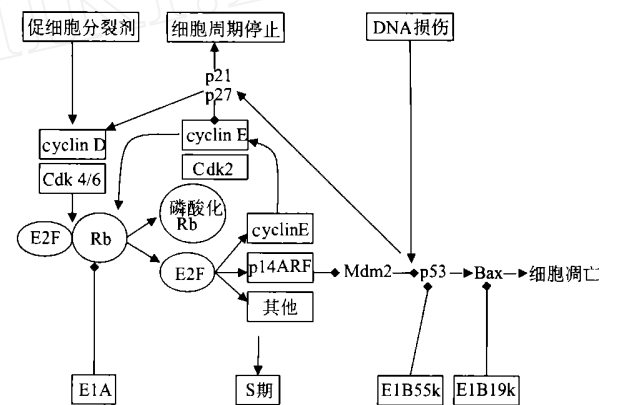


图1 细胞p53和Rb细胞信号通路  
促进：—；抑制：—

1.2 腺病毒对细胞周期的影响 腺病毒的基因组包括4个具有调节功能的早期转录单位(earlytranscriptionunits),即E1、E2、E3和E4,和1个晚期转录单位(latetranscriptionunits)。E1分两部分,E1A和E1B。如上图所示,E1A与Rb结合释放游离E2F,细胞由G<sub>1</sub>期进入S期;腺病毒同时编码产生E1B55k和E1B19k两种蛋白分别抑制p53和Bax,使宿主细胞的分裂增殖不受p53细胞信号通路所抑制,大量宿主细胞由静止期进入分裂期,腺病毒得以大量复制繁殖。而去除E1A基因的腺病毒感染宿主细胞时不能编码产生E1A蛋白使游离E2F释放,G<sub>1</sub>期细胞不能进入S期。同样,去除E1B基因的腺病毒即使可以产生E1A蛋白使宿主细胞由G<sub>1</sub>期进入S期,但进入分裂周期的细胞也会通过p53信号通路发生凋亡或分裂受阻。因此,去除E1A或E1B基因的腺病毒在Rb和p53细胞信号通路正常的宿主细胞无法进行复制增殖,只有在Rb或p53信号通路异常的肿瘤细胞才能增殖使细胞受损。溶瘤腺病毒便是基于此原理产生。目前溶瘤腺病毒的构建主要通过基因工程的方法去除腺病毒基因组上的部分基因(如E1A或E1B等)或将肿瘤特异性启动子

收稿日期:2003-07-23;修回日期:2003-10-21  
基金项目:国家“八六三”计划生物和现代农业技术研究  
基金资助项目(2001AA217171);广东省自然科学基金重点  
项目(013072)  
作者单位:510282 广州,第一军医大学珠江医院普通外  
科

置于主要复制调节单位(如 E1A)前构建而成。

## 2 溶瘤腺病毒的种类及应用

2.1 第一类溶瘤腺病毒,主要包括 Onyx-015 和 Ad5-D24 两种,能选择性杀伤 Rb 或 p53 细胞信号通路异常的肿瘤细胞。

2.1.1 Onyx-015, 早期被称为 dl1520, 是去除腺病毒基因组 E1B 区中 827 个碱基对并通过点突变在编码区产生一个终止密码子构建而成。此病毒感染正常宿主细胞时即使可以编码产生 E1A 蛋白使 Rb-E2F 结合物分离释放游离 E2F, 感染细胞由 G1 期进入 S 期,但由于不能编码产生 p53 抑制蛋白 E1B55K, 进入分裂期的感染细胞通过 p53 信号通路发生分裂受阻或细胞凋亡,细胞内的腺病毒不能得到有效复制。在 p53 信号通路功能异常的细胞中,进入分裂期的感染细胞不会通过 p53 信号通路发生分裂受阻或细胞凋亡,细胞大量增殖,细胞内腺病毒便大量复制从而使细胞溶解<sup>[3]</sup>。1996 年,Bischoff 等<sup>[2]</sup>首次报道 Onyx-015 能在 p53 异常的肿瘤细胞选择性复制引起肿瘤杀伤作用。他们对具有野生型 p53 基因的肿瘤细胞(RKO 或 A2780)进行改建获得 p53 缺陷细胞株。应用 Onyx-015 在相同条件下感染两种细胞株,发现 Onyx-15 不能在 RKO 或 A2780 中复制繁殖,而在 p53 缺陷细胞株中能够大量复制,极少量的 Onyx-15 便可引起受染细胞溶解。此后的体外、体内动物实验均提示 Onyx-015 具有很好的肿瘤选择性杀伤效果<sup>[6,7]</sup>。但后继也有研究发现 Onyx-015 能在 p53 正常细胞中复制产生杀伤作用,而在 p53 异常细胞中也有可能不复制<sup>[8]</sup>。Ries 等<sup>[9]</sup>认为这种异常现象可能与 p14ARF 功能异常有关。因为 p53 的降解主要是 Mdm2 和 p14ARF 两者共同作用的结果。Mdm2(泛素连接酶)使 p53 与蛋白酶体结合进行降解,而 p14ARF 则能与 Mdm2 结合使后者不能与 p53 结合,因此能够稳定 p53。当 p14ARF 功能异常时,即使 p53 基因正常,其编码产生的 p53 蛋白也不能稳定存在,p53 信号通路功能同样失常,此时 Onyx-015 同样可以大量复制破坏细胞。

至 2002 年共有 250 位肿瘤患者接受 Onyx015 治疗(Ⅰ~Ⅲ期临床试验),肿瘤类型包括头颈部恶性肿瘤、胰腺癌、卵巢癌、大肠癌肝转移等。单独应用 Onyx-15 治疗的肿瘤完全缓解率约 14%,约有 40%~80% 患者肿瘤处于稳定状态<sup>[3,10,11]</sup>。令人感兴趣的是 Onyx-015 与化疗药物(如顺铂、5-Fu 等)联合应用时具有明显协同效应。迄今疗效最好的临床试验结果便是同时应用 Onyx-015 和顺铂以

及 5-Fu 治疗晚期头颈部肿瘤,肿瘤缓解率可达 63%,其中 27% 完全缓解,而且其他患者的病情在治疗期间都未进一步恶化<sup>[12]</sup>。

2.1.2 Ad5-D24,E1A 能够结合并使 Rb 失活,释放出游离 E2F,使 G1 期细胞进入 S 期,腺病毒因而可以复制将宿主细胞溶解。E1A 与 Rb 结合的肽链片段主要是 30~60 位和 120~127 位氨基酸,去除其中任何一个片段均会使 E1A 不能与 Rb 结合。Fueyo 等<sup>[13]</sup>将负责编码 120~127 位氨基酸的 24 个碱基对系列(919-943)去除构建一种新的溶瘤腺病毒 Ad5-D24。Ad5-D24 不能结合 Rb 使其失活,宿主细胞不能进入细胞分裂周期,因此 Ad5-D24 仅能在 Rb 异常的肿瘤细胞中复制产生杀伤作用。体内实验提示该腺病毒对人神经胶质瘤有很好的溶瘤效果,单一用药肿瘤抑制率达 66.3%,肿瘤局部多处注射治疗裸鼠种植瘤的肿瘤抑制率可高达 83.8%。与 Onyx-015 相似,肿瘤细胞(特别是恶性肿瘤)表面腺病毒 CAR 受体数目少,限制了 Ad5-D24 进入宿主细胞。Fueyo 等<sup>[14]</sup>在另一项研究中应用基因工程方法将 Arg-Gly-Asp(RGD)编码基因亚克隆至 Ad5-D24 腺病毒基因组上构建 Ad5-D24-RGD,使圆头纤维上的 RGD 含量明显增加,通过与肿瘤细胞上的整合素相互作用提高腺病毒的感染率。体内实验证实此腺病毒的肿瘤杀伤作用比 Ad5-D24 强大,经 Ad5-D24-RGD 治疗的荷瘤裸鼠有 60% 生存期超过 4 个月,而 Ad5-D24 治疗组仅为 15%。E1A 突变型重组腺病毒的肿瘤选择性杀伤作用在其他多项实验中得到进一步证实,而且其抑瘤效果甚至比 Onyx-015 更好<sup>[15,16]</sup>。

2.2 第二类溶瘤腺病毒,是将肿瘤特异性启动子放置于腺病毒某些必需基因(目前主要是 E1A)前面驱动这些基因的转录翻译,使腺病毒仅能在肿瘤细胞中复制起到特异性溶瘤效果。Hernandez-Alcoceba 等<sup>[17]</sup>用含雌激素反应元件(estrogen-responsive elements,EREs)的启动子替代 E1a 和 E4 启动子驱动 E1a 和 E4 构建重组腺病毒 Ad5ERE2。体外实验证实 Ad5ERE2 能够选择性抑制 ER(+)的人乳腺癌细胞株而对 ER(-)的人乳腺癌细胞抑瘤作用明显减弱。绝大多数肿瘤端粒酶活性明显增强,主要与人端粒酶逆转录酶(humantelomerase reverse transcriptase,hTERT)转录水平升高有关。Wirth 等<sup>[18]</sup>构建了含人端粒酶逆转录酶启动子驱动 E1A 基因的重组腺病毒 hTERT-Ad,体外实验证实此腺病毒能在端粒酶(+)的肿瘤细胞中大量复制,而在端粒酶(-)的细胞中则复制能力极低,其肿瘤杀伤能力比 Onyx-015 强,与野生型腺病毒相近。

2.3 第三类溶瘤腺病毒,以溶瘤腺病毒为载体携带自杀基因以期获得协同效应,增强肿瘤杀伤作用。应用溶瘤腺病毒载体,不但可以通过病毒复制不断溶解肿瘤细胞释放更多的病毒感染周围肿瘤细胞,提高转染效率;同时自杀基因在病毒复制过程中编码产生前药转换酶将无毒性前药转化为细胞毒物质杀伤肿瘤细胞,使肿瘤细胞内的溶瘤病毒更多地释放,因此两者联合应用可获得明显的协同效应<sup>[19-20]</sup>。Wildner 等<sup>[20]</sup>将腺病毒 E1 去除,在此区域亚克隆入由人巨细胞病毒启动子驱动的 HSV-tk/Ad5E1aE1bMr19000 融合基因,构建重组腺病毒 AdTK<sup>RC</sup>。单独应用的抑瘤效果与含 TK 基因的复制缺陷型腺病毒(AdTK/GCV)相似,但同时给予 GCV 时,其抑瘤效果明显比 AdTK/GCV 提高,荷瘤动物生存期延长。提示加入自杀基因的溶瘤腺病毒同样具有溶瘤作用,溶瘤病毒的溶瘤作用与自杀基因的肿瘤杀伤作用具有协同效应。

### 3 结语

迄今为止,绝大多数研究均提示溶瘤腺病毒具有确切的肿瘤杀伤作用,而且毒副反应小。随着对腺病毒感染细胞并与机体发生相互作用的分子生物学机制,特别是制约腺病毒感染率的受体问题以及与腺病毒清除相关的机体免疫反应等问题的进一步阐明,溶瘤腺病毒必将更为成熟,成为一种切实可行的肿瘤治疗方法。

### 参考文献:

- [1] Hemminki A, Alvarez RD. Adenoviruses in oncology: a viable option? [J]. *BioDrugs*, 2002, 16 (2): 77-87.
- [2] Bischoff JR, Kim DH, Williams A. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274 (5286): 373-376.
- [3] Ries S, Korn WM. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86 (1): 5-11.
- [4] Caspari T. How to activate p53 [J]. *Curr Biol*, 2000, 10 (8): 315-317.
- [5] Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10 (1): 94-99.
- [6] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by ara-

- diotherapy [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (5): 1193-1196.
- [7] Ganly I, Kim YT, Hann B. Replication and cytotoxicity of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant variant tumor cells associated with reduced apoptosis [J]. *Gene Ther*, 2001, 8 (5): 369-375.
- [8] Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. Therapeutic capacities of E1B-null group A and group C adenoviruses in independent host cell p53 status [J]. *J Virol*, 1999, 73 (3): 2074-2083.
- [9] Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, Lossof P. Inactivation of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015) [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (10): 1128-1133.
- [10] Mulvihill S, Warren R, Venook A. Safety and feasibility of injection with an E1B-55kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial [J]. *Gene Ther*, 2001, 8 (4): 308-315.
- [11] Nemunaitis J, Cunningham C, Tong AW. Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in combination with chemotherapy for inoperable refractory cancer patients [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10 (5): 341-352.
- [12] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selective γ-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (8): 879-885.
- [13] Fueyo J, Gomez-Manzano C, Aleman YR. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (1): 2-12.
- [14] Fueyo J, Aleman YR, Gomez-Manzano C. Preclinical characterization of the anti-glioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95 (9): 652-660.
- [15] Heise C, Hermiston T, Johnson L. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumor efficacy [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (10): 1134-1139.
- [16] Howe JA, Demers GW, Johnson DE. Evaluation of E1A mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy [J]. *Mol Ther*, 2000, 2 (5): 485-495.
- [17] Hernandez-Alcoceba R, Pihlajamäki M, Wicha MS. A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1A-deleted adenoviral vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11 (14): 2009-2024.
- [18] Wirth T, Zender L, Schulte B. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (12): 3181-3188.
- [19] Ringden C. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (3): 491-502.
- [20] Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase [J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (2): 410-413.

[编辑: 周永红; 校对: 贺文]