

溶瘤腺病毒作为癌症基因治疗载体的研究 进展及安全性评价

何婉婉 周立 刘涛 阮江星 何滨霞 李阿荣 王毅刚*

(浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 腺病毒因具有易感染性、宿主范围广、毒性低、容纳量大、非整合性等特点而成为基因转移中最具前景的基因载体之一, 并且被广泛地改造成各种类型的溶瘤腺病毒应用于癌症基因治疗的研究之中。溶瘤腺病毒是目前基因治疗中最热门的研究途径之一, 其安全性也随之成为另一个焦点问题。由此, 该文将对溶瘤腺病毒作为癌症基因治疗载体的研究进展及生物安全性评价作一综述。

关键词 溶瘤腺病毒; 基因治疗; 安全性评价

Oncolytic Adenovirus as a Vector of Gene Therapy for Cancer Progression and Safety Evaluation

He Wanwan, Zhou Li, Liu Tao, Ruan Jiangxing, He Binxia, Li Arong, Wang Yigang*

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Adenovirus is one of the most promising gene vectors in gene transfer by the reason of susceptibility, wide host ranges, low toxicity, high capacity, non-integrated features and so on. Now it has been widely transformed into various types of oncolytic adenovirus in the study of cancer gene therapy. Oncolytic adenoviruses is one of the most popular avenues in the study of gene therapy, so its safety has become another focus. This review focuses on the overall research progress and biosafety evaluation of oncolytic adenoviruses as cancer gene therapy vectors.

Key words oncolytic adenovirus; gene therapy; safety evaluation

随着生命科学和医学研究的不断深入, 基因治疗已成为癌症靶向治疗的一个重要发展方向, 而溶瘤腺病毒介导的基因治疗则是癌症靶向治疗的一个有效策略^[1]。目前, 有许多病毒可通过分子生物学手段改造成具有溶瘤活性的条件复制型病毒即溶瘤

病毒, 包括腺病毒、反转录病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒和麻疹病毒等^[2-5]。其中, 溶瘤腺病毒由于具有可插入较大外源基因、感染宿主广、容易生产以及非整合性等优点而受到广泛使用。2004年, 重组人p53腺病毒注射液(今又生)在我国获批上市, 成

收稿日期: 2013-01-03 接受日期: 2013-05-13

国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省自然科学基金(批准号: Z13H160020)和浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(批准号: 2012R406026)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

Received: January 3, 2013 Accepted: May 13, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Z13H160020) and the Scientific and Technological Innovation Activity Plan of College Students in Zhejiang Province (Xinmiao Talents Scheme) (Grant No.2012R406026)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

网络出版时间: 2013-08-14 09:52 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130814.0952.001.html>

为全球首个获批准上市的基因治疗药品。截止2011年3月^[6], 已进入临床的1 644项癌症基因治疗试验中, 应用腺病毒作为基因载体的试验数量最多, 达23.8%。尽管如此, 腺病毒包括溶瘤腺病毒应用于临床癌症治疗也存在一个不可避免的挑战——安全性问题。特别是1999年美国一名18岁青年曾死于缺陷型腺病毒载体的基因治疗临床实验引发的强烈系统性炎症反应^[7], 尽管死因由于操作失误而非病毒载体本身引起, 但是人们还是对腺病毒的安全提出了质疑。本文拟对腺病毒的生物学特性、溶瘤腺病毒的构建以及安全性做一初步评价。

1 腺病毒作为癌症基因治疗的载体

1.1 腺病毒的生物学特性

腺病毒呈球形, 无囊膜, 直径约70~90 nm, 呈二十面体立体对称。腺病毒含有一个大小为36 Kb左右线形双链DNA分子(Ad-DNA), 可分为编码区和非编码区。编码区含有5个早期转录单位(E1A、E1B、E2、E3和E4), 2个延迟转录单位(IX和Iva2)和1个晚期转录单位(L1~L5)。两端具有末端反向重复序列(inverted terminal repeat, ITR), 长103-162 bp。每一条单链的5'端共价结合一种分子质量为5.5 kDa的蛋白(TP)分子。当Ad-DNA从病毒颗粒中释放出来时, 依赖5'端共价结合蛋白自行环化。此外, 当Ad-DNA变性后, 在复性条件下会产生单链的柄-环结构。病毒衣壳有252个壳粒, 其中240个壳粒各自与周围6个壳粒相邻, 称为六邻体(hexon)。在病毒二十面体的12个顶角上, 各有一个顶角壳粒, 因它与周围的5个壳粒相邻, 被称为五邻体(penton)。从每个顶角壳粒的基底部向外伸出一根纤维蛋白突起(fibre protruding), 其C末端形成的结节(knob)可与细胞表面的病毒受体结合, 介导病毒与细胞的识别与粘附过程。除了上述3种主要蛋白以外, 还有一些辅助性小蛋白如pIV、pVIII、pIX、pIII、pIVa2等起稳定腺病毒二十面体结构的作用。

自上个世纪50年代, Rowe等^[8]从人的扁桃体组织中首次发现并成功分离腺病毒以来, 已陆续发现100多个血清型, 分为A-G七个亚群, 人腺病毒有52种, 其中C亚群的2型和5型在溶瘤腺病毒中研究最为广泛。与其他载体相比, 腺病毒感染的靶细胞种类多, 既可感染分裂期细胞, 又可感染非分裂期细胞, 又可感染增殖静止期细胞, 故在转染原代(肿瘤)

靶细胞及体内基因转染上有很大优势; 腺病毒基因组较少发生重排, 不整合到宿主染色体中, 不会引起插入突变, 外源基因能游离地表达, 因此潜在的致癌危险小; 腺病毒载体容量大、感染性强、导入效率高, 可经不同途径进入不同组织; 体外稳定性好, 滴度高易于制备和纯化等诸多优点^[9]。

1.2 溶瘤腺病毒载体的构建及应用

溶瘤腺病毒能够识别肿瘤细胞并具复制能力, 通过直接溶瘤、诱导肿瘤细胞凋亡、自噬以及抗肿瘤免疫等多种机制发挥抗癌效应, 因而得到了越来越多的关注。但是, 腺病毒在应用方面仍然存在一些弱点, 比如自身免疫原性强、特异性差、静脉注射易在肝脏富集等, 有待进一步改善。目前, 构建溶瘤腺病毒主要有以下几种方式:

(1)剔除腺病毒在正常细胞中复制所必需而在肿瘤细胞中不需要的部分基因。即去除了E1A CR2区24 bp或E1B 55 kDa蛋白基因的溶瘤腺病毒能在Rb和p53细胞信号通路正常的宿主细胞不能完成复制增殖, 只有在该信号通路异常的肿瘤细胞才能增殖达到溶瘤效果。针对该策略, 已经构建了对应的溶瘤腺病毒载体Ad.sp-E1A(Δ 24)和ZD55, 并且利用这两种载体携带抗癌基因进行的体内外治疗肿瘤的实验研究取得了很好的效果^[10-12]。此外, 腺病毒突变株dl1520含有E1B基因缺失, 具有该突变的dl1520只在p53缺陷的肿瘤细胞中复制, 而在正常细胞中病毒不能复制。

(2)利用肿瘤特异性启动子控制病毒复制所必需的基因。例如, 人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子^[1], 它是一个广泛的肿瘤特异性启动子, 用hTERT启动子替换腺病毒原始启动子E1A从而使外源基因的表达限制在肿瘤细胞中, 提高肿瘤基因治疗的靶向性。Zou等^[13]利用hTERT启动子控制腺病毒基因E1A而构建的溶瘤病毒Ad-hTERT发挥了特异性的抗癌作用。Minoru等^[14]利用AFP启动子作前导序列, 构建了定向AFP阳性肝脏肿瘤的腺病毒载体, 大大提高了感染肿瘤细胞的效率。研究表明, 利用肿瘤特异性survivin启动子构建的一系列溶瘤腺病毒载体, 也取得了较好的抗癌效果^[10-13, 15-18]。

(3)对腺病毒衣壳蛋白进行基因修饰。构建可以特异性识别肿瘤细胞表面受体的新配体的外壳基因。改造5型腺病毒纤维蛋白以改变腺病毒进入细胞的机制, 最常用的方法是将RGD(Arg-Gly-Asp)基

序掺入至5型腺病毒纤维蛋白的HI环中,使腺病毒能通过识别细胞表面整合素 $\alpha V\beta 3$ 和 $\alpha V\beta 5$ 进入细胞,从而减少对CAR的依赖,增强腺病毒的感染效率。不仅不改变病毒本身的完整性,还可使其对某些癌细胞的特异性结合能力大幅度地增强。再如改造的Ad $\Delta 24$ 病毒把RGD基序接入纤毛结区,允许病毒直接吸附到细胞表面的整联蛋白上,大大提高了抗癌特性。此外, Douglas等^[19]把抗腺病毒纤维球域的单克隆抗体的Fab片段和叶酸相连,构建一个双特异性分子,成功靶向了表达叶酸受体的细胞。Kwon等^[20]用PEG聚合壳聚糖和叶酸修饰腺病毒外壳,在小鼠实验中明显降低了腺病毒的免疫原性,延长了在体内的半衰期,并且减少了肝脏的聚集。Gotoh等^[21]构建了融合Ad35纤维蛋白的Ad5F35病毒,对于低表达CAR受体的膀胱癌细胞具有显著杀伤效果。

1.3 溶瘤腺病毒靶向Rb和p53信号通路抗癌机理

不同病毒影响细胞周期的机制是不同的,缺失E1A 24 bp和E1B 55 kDa蛋白的溶瘤腺病毒主要通过Rb和p53细胞信号通路^[22](图1)干扰宿主细胞的细胞周期。Rb家族成员对DNA复制的调节是通过对转录因子E2F家族成员的负调节来完成的。E2F家族成员现在包括六种(E2F-1~6)基因和二种DP(DP1, DP2)基因编码的产物组成的多种异源二聚体。除E2F-6,每个E2F编码蛋白的C末端都具有一个功能强大的结构域。同时Rb家族成员能够募集组氨酸乙酰酶(HDAC1)和其它染色质重塑因子,改变E2F应

答启动子的染色质结构,因此Rb与E2F的结合限制了依赖E2F的基因转录,从而抑制了细胞进入S期。

p53蛋白是一类同源四聚体,在正常细胞内含量很低,并且半衰期非常短。当细胞受到损伤时,p53半衰期显著增加使p53累积,引起细胞凋亡。Mdm2蛋白可以抑制p53基因的转录活性,引起p53蛋白向核外运输或被降解。从而阻止由p53蛋白累积引起的细胞周期终止或凋亡。Arf蛋白是由Ink4a基因座编码的另一种抑癌因子,其主要功能是限制Mdm2蛋白的活性。p53蛋白可以诱导Mdm2蛋白的表达,二者构成一个负反馈调节途径,同时p53蛋白缺失可以诱导Arf蛋白的大量表达,表明p53蛋白可能通过负反馈抑制Arf蛋白的表达。

当不与Rb蛋白结合时,E2F家族成员可以诱导Arf蛋白表达,使p53途径和Rb途径联系起来。越来越多研究表明,Rb途径的不完整会影响到p53途径的功能,p53途径缺陷也会使Rb途径受到影响。

此外,腺病毒本身的序列E1B55K和E1B19K能分别抑制p53和Bax的作用,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。由于E1A和E1B是启动腺病毒复制的关键基因,E1A和E1B分别与宿主细胞内抑癌基因Rb或p53的产物p105或p53结合,消除Rb或p53基因抑制病毒增殖的作用。当E1A和E1B突变后,在正常细胞内Rb或p53可抑制腺病毒的复制。由于大多数的肿瘤细胞存在Rb或p53

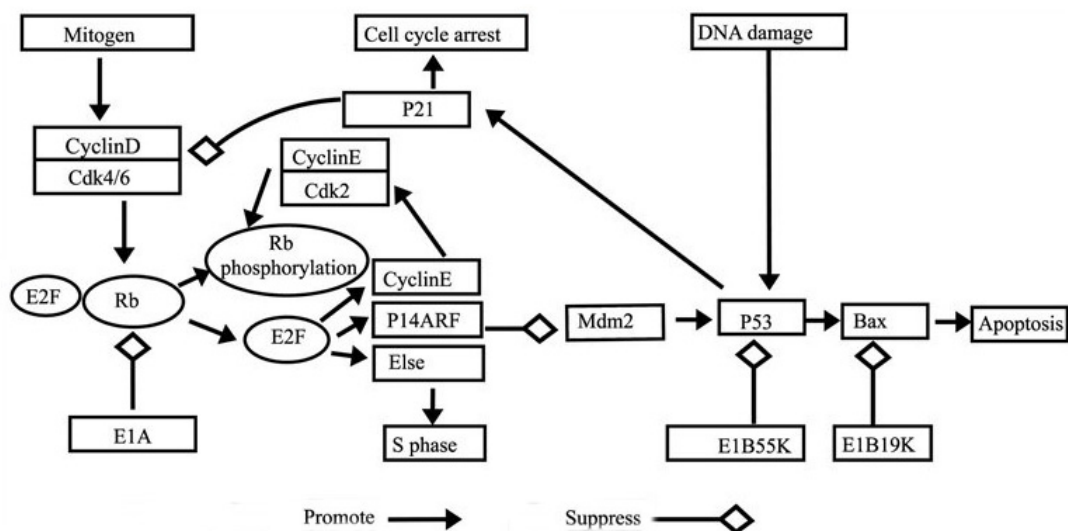


图1 Rb和p53的细胞信号通路

Fig.1 Rb and p53 cell signaling pathways

基因突变, 而突变了 *Rb* 或 *p53* 基因不能抑制腺病毒复制。

2 溶瘤腺病毒用于癌症临床治疗的现状及安全性评价

2.1 溶瘤腺病毒在临床试验上的应用

鉴于上述溶瘤腺病毒的多种优势, 并且体外及动物实验均表明其较好的抗肿瘤疗效, 因此溶瘤腺病毒已在实际临床上逐渐得到了应用。2005年, 国家食品药品监督管理局(SFDA)首次批准溶瘤腺病毒产品H101(安柯瑞)为基因治疗的药物, 与化疗联用治疗晚期顽固性鼻咽癌有效率得到大幅提高^[23]。这也是全球第一个批准上市的溶瘤病毒产品。然而, 目前溶瘤腺病毒或携带抗癌基因的溶瘤腺病毒产品更多的正在进行临床前和临床试验, 其中包括 ONYX-015、SG500、ZD55-TRAIL和ZD55-IL-24等。Nemunaitis等^[24]利用缺失E1B 55 kDa的Ad2/5杂合溶瘤腺病毒ONYX-015作了II期临床试验, 给予复发和顽固性头颈部肿瘤病人瘤内多次注射ONYX-015, 一疗程后瘤体消退明显, 仅出现轻至中度发热, 注射部位轻度疼痛, 病毒血症一现即过。美国FDA已经批准对ONYX-015作III期临床试验。另外, 利用腺病毒作为载体进行的B型血友病、帕金森病、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症等疾病的基因治疗也都已经进入了临床试验^[25]。

传统给药途径是瘤内注射, 局部药物浓度很高, 但扩散受限, 对于较大肿瘤需要多部位注射, 增加操作次数, 且分布不均。而大多数肿瘤手术或放疗后复发都是多中心的, 所以瘤体内直接注射病毒并不适宜。对于这些晚期肿瘤患者, 如期望从溶瘤腺病毒治疗中获得良好的效果, 应考虑局部或血管内注射病毒至肿瘤部位。李玉等^[26]采用介入手段将微导管插入肿瘤供血动脉, 即超-超选择肿瘤供血动脉, 随后将Ad5腺病毒注射液注入肿瘤, 可使药物均匀、高浓度地分布于肿瘤组织发挥治疗效果。国内外有关学者经肝动脉注入溶瘤病毒的实验研究表明, 溶瘤病毒可明显抑制大鼠移植性肝癌的生长, 延长载瘤大鼠的生存期^[27]。相关临床试验数据也表明, 动脉灌注选择性复制腺病毒进行肿瘤治疗是可行的, 并且与化疗联合使用产生的不良反应也是可以耐受的。

另外, 静脉注射溶瘤腺病毒目前也是研究肿瘤

治疗的一种策略。治疗性腺病毒制剂的全身给药目前还未被广泛接受, 主要由于这种给药方式溶瘤腺病毒能否到达瘤体的原发及播散的各处转移灶, 并在肿瘤内有效的复制再感染尚未定论。周晓曦等^[28]在人胃癌裸鼠原位模型上, 将溶瘤腺病毒M1经静脉输注观察后发现其不仅分布于胃原发瘤, 还存在于转移灶中, 并且可以减缓肿瘤生长速度。

当然, 病毒基因治疗的效果取决于机体与病毒参数间的平衡, 包括初始荷瘤体积, 病毒的复制能力和机体抗病毒免疫反应。一旦发现肿瘤或手术切除后除了尽早使用一个提高病毒效果的可行方案, 同时还应采取与传统肿瘤治疗方法(放化疗等)联用等手段, 帮助病毒克服结构屏障, 在肿瘤组织内扩散。

2.2 溶瘤腺病毒对宿主的免疫原性

尽管溶瘤腺病毒的体外及体内动物实验均取得了较好的抗肿瘤疗效, 但多数未应用于临床。究其原因, 主要在于溶瘤腺病毒本身存在的免疫原性而使其应用研究存在瓶颈。目前, 肿瘤仍然很难达到根治的目标。

溶瘤腺病毒由于仅改造部分病毒基因, 因此其自身免疫原性比较高。静脉注射后病毒因补体蛋白及抗体中和、网状内皮系统过滤后能够达到肿瘤部位的病毒很少, 因此由于宿主的免疫反应而疗效下降。

研究发现, 去除E3区可以降低腺病毒免疫原性, 保护腺病毒感染的细胞不被T细胞损伤。同时, 缺失E1和E3的腺病毒载体会使C57BL/6鼠中转导的肝细胞免疫耐受, 全身给予这种载体可以使T细胞毒性反应降低。研究表明, 使用抗CD4药物和免疫抑制剂如环孢霉素、FK506和环磷酰胺等能抑制中和抗体的产生^[29], 降低腺病毒对宿主的免疫反应。

2.3 溶瘤腺病毒可能引起的毒副作用

溶瘤腺病毒癌症基因治疗除了引起一些免疫反应外, 还可能引发一些其他的副作用, 这也是癌症治疗中人们最为担忧的隐患之一。研究发现, 用携带自杀基因(*TK*)的溶瘤腺病毒(Ad-ETK)治疗实体肿瘤, Ad-ETK治疗后患者最常出现的毒副作用为流感样症状, 包括寒颤、发热、乏力、肌肉酸痛, 但这些副作用在试验中基本都能被患者所耐受。大量研究和实验证明, 在有效剂量范围内, 会出现不同程度的、可控的炎症反应, 但无明显的急性症状。这个从侧面上反应, 溶瘤腺病毒对癌症的治疗仍具有一

定的安全性,具有令人期待的前景。

另外,溶瘤腺病毒治疗也会对宿主器官产生一定的影响,主要表现为一些炎症反应和毒性反应。腺病毒对宿主的损伤与注射途径有关,包括瘤内注射、胸腔内注射、气管内滴注、脉管途径以及子宫内注射等多种方式^[30]。子宫内注射可能会引发宫内炎和纤维化反应。经脉管途径给药,腺病毒具嗜肝性,由静脉进入体内后多积聚在肝脏,有肝硬化病变时更易聚集,而肝炎病变时不是很明显^[31]。因此,说明副作用也是有针对性的,在癌症治疗的同时需要考虑其他器官的病变,选择合适的注射途径也就成为了另一个治疗的关键。更有人认为,在瘤内发生炎症反应,对癌症的治疗具有积极的影响。

3 展望

大量的动物实验和临床试验都证明溶瘤腺病毒在癌症基因治疗领域的有效性和相对安全性,但有明确客观抗肿瘤反应的临床病例较少见,因此在实际临床应用上仍存在一些风险和限制。比如,如何有效消除溶瘤腺病毒引起的相关机体免疫反应及毒副作用,提高临床治疗的安全性;如何延长目的基因的表达时间等;如何针对溶瘤腺病毒设计更高效的策略以便在临床试验中能将肿瘤完全消灭,达到根治的效果以及利用溶瘤腺病毒与化疗联合达到减少两者使用剂量、降低毒副作用的同时提高抗癌疗效。未来的研究方向应强化溶瘤腺病毒免疫学相关机制的研究,突破妨碍溶瘤腺病毒研究的一些技术性瓶颈,优化载体提高溶瘤腺病毒远程传递的靶向性,以及寻找更具潜能的肿瘤干细胞作为靶点^[32]。随着对溶瘤腺病毒载体研究的不断深入,治疗方案及策略也都在逐步完善。相信在不久的将来,人类必定能实现将溶瘤腺病毒更广泛地应用于癌症的基因治疗之中。

参考文献 (References)

- Bauzon M, Hermiston TW. Exploiting diversity: Genetic approaches to creating highly potent and efficacious oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10(4): 350-5.
- Gil Z, Rein A, Brader P, Li S, Shah JP, Fong Y, Wong RJ. Nerve-sparing therapy with oncolytic herpes virus for cancers with neural invasion. *Clin Cancer Res* 2007; 13(21): 6479-85.
- Jounaidi Y, Doloff JC, Waxman DJ. Conditionally replicating adenoviruses for cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(3): 285.
- Tai C K, Kasahara N. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Front Biosci* 2008; 13: 3083-95.
- Zhang Q, Yong A Y, Wang E, Chen N, Robert LD, Peter JM, *et al.* Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 2007; 67(20): 10038-46.
- 陈霜凝, 沈园园, 黄文林, 郭冬薇, 周建平, 郭圣荣. 抗肿瘤腺病毒纳米复合物的研究进展. *中国新药杂志*(Chen Shuangning, Shen Yuanyuan, Huang Wenlin, Guo Dongwei, Zhou Jianping, Guo Shengrong. *Advances in research on adenovirus nanocomplexes for tumor therapy. Chinese Journal of New Drugs*) 2012; 21(4): 378-83.
- Edwards SJ, Kirchin S, Huxtable R. Research ethics committees and paternalism. *J Med Ethics* 2004; 30(1): 88-91.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Robert PH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Biol Med* 1953; 84(3): 570-3.
- Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7(1): 46-59.
- Zhang ZL, Zou WG, Luo CX, Li BH, Wang JH, Sun LY, *et al.* An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Res* 2003; 13(6): 481-9.
- Zhang Y, Gu J, Zhao L, He L, Qian W, Wang J, *et al.* Complete Elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy. *Cancer Res* 2006; 66(8): 4291-8.
- Zhang KJ, Wang YG, Cao X, Zhong SY, Wei RC, Wu YM, *et al.* Potent antitumor effect of interleukin-24 gene in the survivin promoter and retinoblastoma double-regulated oncolytic adenovirus. *Human Gene Ther* 2009; 20(8): 818-30.
- Zou WG, Luo CX, Zhang ZL, Liu J, Gu JF, Pei ZF, *et al.* A novel oncolytic adenovirus targeting to telomerase activity in tumor cells with potent. *Oncogene* 2004; 23(2): 457-64.
- Takahashi M, Sato T, Sagawa T, Lu Y, Sato Y, Iyama S, *et al.* E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1A-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor. *Mol Ther* 2002; 5(5): 627-34.
- Zou L, Zhang PH, Luo CL, Tu Z. shRNA-targeted hTERT suppress cell proliferation of bladder cancer by inhibiting telomerase activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(3): 328-34.
- Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity. *Cell Res* 2006; 16(11): 879-86.
- He G, Lei W, Wang S, Xiao R, Guo K, Xia Y, *et al.* Overexpression of tumor suppressor TSLC1 by a survivin-regulated oncolytic adenovirus significantly inhibits hepatocellular carcinoma growth. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(4): 657-70.
- Xiao LL, Wu YM, Qian J, Tan Y, Xie GL, Zhang KJ, *et al.* The antitumor efficacy of IL-24 mediated by E1A and E1B triple regulated oncolytic adenovirus. *Cancer Biol & Ther* 2010; 10(3): 242-50.
- Douglas JT, Rogers BE, Rosenfeld ME, Michael SI, Feng MZ, Curiel DT. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* 1996; 14(11): 1574-8.
- Kwon OJ, Kang E, Choi JW, Kim SW, Yun CO. Therapeutic targeting of chitosan-PEG-folate-complexed oncolytic adenovirus

- for active and systemic cancer gene therapy. *J Control Release* 2013; 169(3): 257-65.
- 21 Gotoh A, Nagaya H, Kanno T, Tagawa M, Nishizaki T. Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus Ad5F35 induces oncolysis of human bladder cancer cells in *in vitro* analysis. *Urology* 2013; 81(4): 920.e7-11.
- 22 陈建发, 黄宗海. 溶瘤腺病毒的研究进展. 肿瘤防治研究(Chen Jianfa, Huang Zonghai. Research Progress of oncolytic adenovirus, *Cancer Research on Prevention and Treatment*) 2004; 31(4): 243-5.
- 23 Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(2): 141-8.
- 24 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Wokes E, *et al.* Phase II intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(2): 289-98.
- 25 Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; 101(8): 2963-72.
- 26 李玉, 李文刚, 张静素. 重组人5型腺病毒注射液介入途径给药治疗恶性肿瘤的安全性研究. 上海医药(Li Yu, Li Wengang, Zhang Jingsu. Recombinant Ad5 interventional treatment of malignant tumors of route safety study. *Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal*) 2013; 34(1): 24-6.
- 27 熊 壮, 王建华. 溶瘤病毒在肝癌介入治疗中的应用. 介入放射学杂志(Xiong Zhuang, Wang Jianhua. The value of oncolysis virus in treating liver cancer. *J Interv Radiol*) 2007; 16(3): 206-8.
- 28 周晓曦, 李钦璐, 黄 闪, 姜利军, 周剑峰, 曹 阳. 静脉输注新型溶瘤腺病毒在体内复制活性与抑瘤的关系. 现代生物医学进展(Zhou Xiaoxi, Li Qinlu, Huang Shan, Jiang Lijun, Zhou Jianfeng, Cao Yang. The Relationship of replication and inhibiting tumor of new oncolytic adenovirus by intravenous infusion *in vivo*. *Progress in Modern Biomedicine*) 2012; 19(12): 3624-7.
- 29 Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000; 81(11): 2573-604.
- 30 张 燕, 金先庆. 腺病毒载体介导肿瘤基因治疗的安全性分析. 国际病毒学杂志(Zhang Yan, Jin Xianqing. Safety analysis of adenovirus-mediated cancer gene therapy. *Int J Virol*) 2007; 14(2): 59-62.
- 31 Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M, *et al.* Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000; 47(4): 563-70.
- 32 谭晓华. 溶瘤腺病毒肿瘤靶向治疗: 从实验室到临床. 中国肿瘤生物治疗杂志(Tan Xiaohua. Oncolytic adenoviruses for targeted cancer therapy: From the laboratory to the clinic. *Chin J Cancer*) 2012; 19(6): 569-72.