

靶向肿瘤治疗的腺相关病毒载体

王毅刚* 黄芳

(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 靶向性是肿瘤治疗取得成功的关键因素。病毒载体用于治疗肿瘤的过程中必须要求特异性作用于肿瘤细胞的同时降低对正常细胞的毒性。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)较其他病毒载体具有免疫原性小、宿主范围广和介导基因可长期表达等优点, 因此得到了广泛的应用。然而, AAV 载体针对肿瘤的靶向性一直是近年研究的热点和难点。现就 AAV 载体治疗肿瘤概况和靶向策略以及其安全性等方面作一综述。

关键词 靶向性; 肿瘤治疗; 腺相关病毒; 安全性

目前, 恶性肿瘤的治疗研究处在一种瓶颈状态, 如何攻克它, 是摆在科学家们面前紧迫的任务。近年来, 应用病毒载体介导外源基因进行肿瘤治疗研究成为一种很有希望治愈恶性肿瘤的生物疗法。

在目前被广泛应用的腺病毒(adenovirus, Ad)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、逆转录病毒(retrovirus)和慢病毒(lentivirus)等病毒载体中, AAV 由于具备以下特性而引人注目。第一, AAV 引起的免疫反应轻微, 病源性低, 至今未有报道其引起人类任何疾病; 第二, 作为一种缺陷型病毒, 在无辅助病毒感染时, 只能整合在宿主细胞 DNA 中, 呈“潜伏”感染状态; 第三, 可定点整合, AAV 是唯一一种以位点特异性方式整合在人 19 号染色体上的真核病毒, 从而避免随机整合而导致宿主细胞突变的潜在危险性; 第四, 宿主范围广, 包括分裂期细胞和非分裂期细胞; 第五, 携带的外源基因可长期、稳定表达。因此, AAV 成为目前基因转移最为理想的载体之一。AAV 载体最初被用于人类遗传病的治疗。至今, AAV 被广泛用于包括肿瘤在内的肺、肌肉、肝脏、视网膜以及中枢神经系统等疾病的基因治疗。其中, AAV2 介导的囊性纤维化疾病、B 型血友病、帕金森病及 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症等疾病的治疗已经进入临床试验阶段, 并取得了很好效果。

然而, 由于 AAV2 广泛的宿主范围和组织或细胞特异性的缺乏, 使得其作为载体用于临床前和临床治疗试验时依然存在安全性、靶向性和转染效率低的弊端。因此, 在 AAV 成功用于肿瘤治疗的研究中, 为了达到最大肿瘤杀伤效率和最小的细胞毒性, 必须尽力克服这些问题, 寻求 AAV 载体介导肿瘤治疗的最

佳靶向策略。除了 AAV2, 近年来, 至少 8 种以上来源于灵长类其他血清型 AAV 被鉴定。这些不同血清型 AAV 由于其衣壳蛋白组成和结构的不同, 因而对不同组织或细胞的亲嗜性也不同, 大大扩大了 AAV 载体应用的范围。

1 AAV 的结构特征

AAV 属微小病毒科(Parvoviridae)家族的成员之一, 无被膜、具有二十面体结构、病毒颗粒直径大小约 20~26 nm。作为一种缺陷性病毒, AAV 必须依赖辅助病毒如腺病毒或单纯疱疹病毒才能完成其生命周期。在辅助病毒缺乏时, AAV 通过位点特异性整合, 进入人 19 号染色体 AAVS1 位点建立潜伏感染状态。AAV 含有大小约 4.7 kb 的单链线状 DNA 基因组, 包括 3 个启动子(P5, P19 和 P40)和两个开放阅读框(ORF) rep 和 cap, 分别与两个末端长 145 bp 末端反向重复序列(ITR)相接的 Rep 和 Cap 的转录和翻译有关。5' 端 rep ORF 编码 4 个重叠的具有多种功能的蛋白(Rep78, Rep68, Rep52 和 Rep40), 主要负责病毒的位点特异性整合、复制和转录控制等。3' 端 cap ORF 编码 3 个衣壳蛋白(VP1, 90 kDa; VP2, 72 kDa 和 VP3, 60 kDa), 主要负责病毒颗粒的装配。

AAV 感染宿主细胞是一个多步有序过程, 依次包括结合到细胞表面、病毒入胞、细胞内运输、入

收稿日期: 2007-03-14 接受日期: 2007-06-18

浙江省自然科学基金(No. Y205282)和浙江省科技支撑与引导计划面上项目(No. 2007C33027)资助

* 通讯作者。Tel: 0571-86843186, Fax: 0571-86843185, E-mail: ygwang@sibs.ac.cn

核、脱衣壳和 AAV 基因组从 ssDNA 转变成 dsDNA。首先, AAV 与宿主细胞表面的硫酸肝素糖蛋白 (heparin sulphate protoglycans, HSPG) 初级受体结合, 随后与共受体 $\alpha_v\beta_5$ 整合素、成纤维细胞生长因子 1 (FGFR1)、发动蛋白(dynamin)、Rac1 和磷脂酰肌醇激酶(PI3K)等作用经由网格蛋白包被凹陷内吞, 并形成内含体。进入细胞后, AAV 被释放入胞浆中并定位于核周。最后 AAV 经由核孔复合体进入核内并且整合进宿主染色体或在染色体外以附加体形式介导外源基因的长期表达。

2 AAV作为载体治疗肿瘤的概况

自 Hermonat 等^[1]首次采用 AAV 介导新霉素(neo)抗性基因进入真核细胞以来, 在过去的 20 多年里, 重组 AAV(rAAV)载体在肿瘤治疗领域中的应用得到了快速的发展。AAV 由于本身具有的独特优势, 并且其在动物实验研究中也显示了很好的效果, 这使得 rAAV 成为目前肿瘤基因治疗最有前景的载体之一。

目前, rAAV 载体用于肿瘤的治疗策略主要分为 4 大类: 抗肿瘤血管生成基因治疗, 免疫基因治疗, 自杀基因治疗以及肿瘤细胞修复基因治疗。靶向抑制肿瘤血管新生是治疗依赖于血管生成的实体瘤生长、转移的有效策略。至今, AAV2 载体已被用于携带各种不同抗血管生成基因进行动物肿瘤模型的治疗, 结果显示其具有非常好的应用前景。例如, Xu 等^[2]构建的 AAV2- 血管抑素(angiotatin)载体能显著抑制肝转移 EL-4 淋巴瘤的生长, 并且能延长动物的生存期。除血管抑素外, 内皮抑素(endostatin)、缩短型血管内皮生长因子受体 2(Flk-1)、组织金属蛋白酶抑制子(TIMP)以及反义血管内皮细胞生长因子(VEGF)等基因经 rAAV 载体介导, 在黑色素瘤、结肠癌、肺癌和肝癌等动物模型治疗实验中也显示具有很好地抑制肿瘤血管形成, 抑制肿瘤生长和提高动物生存率等效果^[3]。肿瘤免疫疗法是通过调动人体内各种积极防御因素, 提高机体免疫力, 以消除手术或化疗后残余的肿瘤细胞, 防止肿瘤复发和转移的生物疗法。近年来, 随着肿瘤免疫学的发展, 肿瘤免疫治疗成为热点研究课题, 是肿瘤治疗重要手段之一。目前, 人们通过多种方法和策略采用 AAV 载体介导免疫相关基因靶向转染肿瘤细胞或免疫效应细胞, 以增强机体抗肿瘤的免疫反应, 达到抑制肿瘤增殖甚至消除肿瘤的目的, 为肿瘤免疫治疗提供了新的有效途径和方法。干扰素(IFN)是最早被用于肿

瘤基因治疗的因子, 其抗肿瘤效应通过直接抑制肿瘤细胞增殖或免疫调节作用。Yoshida 等^[4]构建的携带 IFN- β 基因的 rAAV 载体(AAV/IFN- β)以瘤内注射治疗神经胶质瘤, 结果显示能完全抑制肿瘤的生长。此外, TRAIL、IL、TNF- α 和 GM-CSF 等细胞因子的应用也显示出很强的抗肿瘤的免疫反应和促肿瘤细胞凋亡效应。Wendtner 等^[5]应用 rAAV2/CD40 配体转染慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者 B 细胞后, 能上调 CLL 细胞共刺激分子 CD80 表达并诱导 HLA 匹配的异源 T 细胞特异性增殖, 以对抗并清除白血病细胞。因此, 疫苗是一种非常有前景的肿瘤免疫疗法。另一研究证明, AAV 载体转染 HPV-16 E6 或 E7 基因进入树突状细胞(DCs)后, 可以诱导机体产生强大的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)抗肿瘤免疫反应。最近兴起的肿瘤抗体治疗也显示出很好的前景。Fang 等^[6]利用 rAAV8 载体介导小鼠 VEGFR2 抗体 DC101 基因(rAAV8-DC101)在小鼠体内实现了前所未有的高水平长期表达, 达到 1 000 mg/ml, 显示出重要抗癌效果。自杀基因治疗是将药物酶基因转入肿瘤细胞内, 通过该基因表达将无毒性的药物前体转化为有毒的药物, 从而影响 DNA 合成, 导致该肿瘤细胞死亡, 并且可引起明显的旁观者效应。最早 Su 等^[7]利用 albumin 启动子和 AFP 增强子来调控 AAV 介导的 HSV-TK 基因表达, 当加入前药 GCV 后可选择性杀伤 AFP 阳性的肝癌动物模型肿瘤。此后, 研究者还发现辅助放疗、拓朴异构酶抑制子等可以增强肿瘤自杀基因治疗的效果。目前, 人们普遍认为恶性肿瘤的发生发展是由于癌基因被激活和肿瘤抑制基因被抑制而导致它们原有的平衡失调所引起。通常, 肿瘤抑制基因可通过细胞周期检查点调控, 阻止 DNA 损伤的或其他类型损伤的细胞通过细胞周期而诱导其凋亡, 抑制这些损伤细胞包括肿瘤细胞的增殖。因此, rAAV 载体转导肿瘤抑制基因入癌细胞可以在体内和体外抑制肿瘤的生长、逆转肿瘤表型。p53、脆性组氨酸三联体(FHIT)及单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)等肿瘤抑制基因通过 rAAV 载体的介导, 体内外实验均显示能够很好抑制肿瘤增殖、促进肿瘤细胞凋亡和提高动物生存率^[3]。此外, rAAV 载体介导的肿瘤基因治疗协同化疗可以达到明显更强的抗癌效果。

3 AAV自身抗癌特性

用病毒治疗肿瘤由来已久。早期人们发现, 偶有肿瘤病人在某种病毒感染后会出现肿瘤暂时性消

退的现象。这引起了科学家们的极大兴趣和关注,并开始寻找那些具抗肿瘤活性的病毒。目前,至少发现有38种在动物或人体体内具有抗肿瘤活性的病毒,并且对肿瘤病人进行的临床治疗试验显示了很好的前景。例如,美国ONYX生化制药公司研制的E1B区55 kDa缺失的腺病毒制剂ONYX-015由于可特异性在P53功能异常的肿瘤细胞中裂解增殖而具有很强的杀伤作用。此外,经改造的单纯疱疹病毒(HSV)、呼吸道肠道病毒(reovirus)、新城疫病毒(NDV)及自主微小病毒等也被用于肿瘤的有效治疗。AAV的抗肿瘤活性在其被发现后不久就被报道。1975年,Cukor等^[8]证实AAV1感染HSV2转化的鼠肿瘤细胞后能够明显延缓荷瘤小鼠肿瘤的生长及延长小鼠生存期。此后,许多研究者进一步证实AAV能抑制一些DNA病毒引发的肿瘤发生。这些DNA病毒包括牛乳头状瘤病毒(HPV-1)、人乳头状瘤病毒(HPV-16)和艾巴氏病毒(EBV)等。另一些证据也表明AAV感染人体后能够抑制宫颈癌增殖并阻止HPV诱导的肿瘤发生。然而,对于AAV自身抗癌的分子机制,人们知之甚少。直至1994年,Hermonat^[9]才证实AAV的Rep78在抑制肿瘤过程中具有重要作用,并且证明Rep78能下调人原癌基因c-fos和c-myc启动子的活性。因此,与腺病毒等能复制增殖以裂解癌细胞不同,AAV是一种缺陷型病毒,其抑癌主要通过Rep的作用。进一步研究证明,AAV Rep68也具有重要抗癌活性。Sauden等^[10]报道Rep78和Rep68可以抑制原代永生化的转化细胞生长,而Rep52和Rep40则不能。Rep68通过增强细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)抑制子p21的活性,以及降低细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A和细胞周期蛋白B1等相关激酶活性而使细胞周期停滞在G₁或G₂期;Rep78则通过与异常增多的亚磷酸化Rb作用而阻止细胞周期S期的进行。研究显示,Rep78和Rep68不同之处在于前者羧基末端含有锌指结构域。这些研究提示Rep能够在分子和细胞两个水平抑制肿瘤的生长。虽然Rep78和Rep68具有重要的抗癌特性,但Rep对机体具毒性效应,这限制其作为一种肿瘤治疗分子潜在的应用^[11]。因而,采用肿瘤特异性转移载体来调控Rep基因的表达,则Rep作为肿瘤治疗因子会更安全有效。近年来,随着肿瘤组织特异性增强子/启动子调控系列和靶向肿瘤细胞表面受体的相应配体分子的鉴定及应用,将使得编码Rep治疗分子的靶向性rAAV载体在治疗肿瘤过程中具有潜在的发展前景。

4 AAV靶向肿瘤治疗的策略

理想地说,用于治疗疾病的AAV载体应该安全、有效、可靶向特定组织或细胞。虽然AAV载体在肿瘤治疗领域被广泛应用,并取得很好的效果,然而由于其缺乏靶向性,限制了其进一步的发展。因此,发展具有特异靶向肿瘤能力的AAV载体非常必要。

4.1 转录靶向

为提高AAV载体在肿瘤基因治疗中的安全性和疗效,增强对肿瘤细胞转导效率及减少对正常细胞的损害,利用肿瘤特异性增强子/启动子来调控外源基因表达而构建的靶向肿瘤的AAV载体系统,被广泛应用于肿瘤的治疗。

目前,可应用的肿瘤特异性启动子包括人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子、缺氧响应(HRE)启动子、靶向肝癌的AFP启动子、脑细胞特异的NSE启动子、肝细胞的TBG启动子、肌肉特异性的CK启动子以及腺癌细胞特异的CEA启动子等。实验证明,这些肿瘤特异性启动子被广泛应用于AAV载体并取得了令人可喜的靶向抗癌效果。近来,我们实验室构建了一种新型的靶向端粒酶活性的rAAV系统。利用hTERT启动子控制rAAV载体介导的人IFN- β 基因,在体内和体外实验中均显示其有很好的肿瘤特异性基因表达和细胞杀伤性。因此,这种新型rAAV载体具有很好的抗肿瘤效应^[12]。在我们构建的rAAV/hTERT-transgene载体平台的基础上,联合应用人IFN- β 基因和TRAIL基因,在A549肺癌细胞荷瘤裸鼠肿瘤的治疗实验中取得了非常好的效果,甚至部分小鼠的肿瘤能够完全被消除(相关论文已投稿)。这些研究显示AAVs联合hTERT启动子介导的治疗基因对其他类型肿瘤的长久特异性靶向治疗打开了新的思路和可能性。由于肿瘤细胞和正常细胞的氧气供应不同,因此Ruan等^[13]利用HRE启动子成功构建Epo基因表达调控系统:AAV2/HRE-Epo。在组织缺氧和转录复合物HIF-1激活下,AAV2/HRE-Epo介导的Epo基因在人脑肿瘤细胞株U-251MG和U-87MG中表达提高至79~110倍,为其进一步的体内实验研究打下基础。

除应用组织特异性增强子/启动子外,几个可诱导性基因表达系统包括tet-on、tet-off、RU486和Cre-loxP等也被用于rAAV载体的靶向性治疗研究。例如,在Dox的诱导下,rAAV介导的tet系统调控的外源基因在大鼠视网膜细胞和肿瘤细胞实现长久高

效的靶向性表达^[14,15],为 rAAV 载体治疗视网膜肿瘤提供基础。Li 等^[16]使用构建的 Tet-on 系统调控携带 HSV-tk 基因的 rAAV 载体治疗人乳腺癌 MCF-7 细胞荷瘤裸鼠,结果能有效抑制肿瘤生长并且疗效显著。Cre-loxP 重组系统也被用于 rAAV 载体介导的基因表达调控、位点特异性整合以及 rAAV 的高效生产中。例如,应用 Cre-loxP 系统在杂合病毒 Ad/AAV 介导的外源基因位点特异性整合中,能有效调控 AAV 的 Rep 表达。另有研究表明,用突变或非突变的 Cre-loxP 系统分别控制 Rep 和 Cap 的表达使得 rAAV 载体的生产效率大大提高^[17]。RU486 系统也被用于腺病毒和 HSV 载体,通过加入少量的 RU486 来调控治疗基因的表达,提高其安全性和疗效。RU486 作为一种孕酮拮抗物诱导剂,只需少量就可与启动子上游的转录子结合而启动转录的进行,调控治疗基因表达灵敏而有效。因此, RU486 系统在 rAAV 载体中也具有广阔的应用前景。

4.2 受体靶向性

AAV 进入细胞依赖于其衣壳与细胞表面受体的相互作用。由于很多细胞表面都表达与 AAV 结合的肝素受体,因此决定着 AAV 具有广泛的宿主范围,而限制其靶向治疗肿瘤的发展,也带来了不安全因素。

随着 AAV 晶体结构的发现及 AAV 衣壳上肝素受体结合结构域的鉴定,研究者们发现通过受体靶向性修饰 AAV 衣壳进行肿瘤治疗非常可行有效。肿瘤靶向多肽序列 NGRAHA 是一个包含 NGR 结构模体的配体,可以特异性结合血管系统和许多肿瘤细胞表面表达的受体 CD13。Grifman 等^[18]将该多肽序列 NGRAHA 插入至 AAV 衣壳的环状区域,使得融合有该靶向多肽的 rAAV 载体转染 Kaposi 肉瘤细胞(KS1767)和胚胎横纹肉瘤细胞(RD)的能力比野生型 AAV2 高 10~20 倍。此外,研究表明 Arg-Gly-Asp(RGD)三肽修饰衣壳后产生的突变 rAAV 能够转染表达整合素的细胞而不依赖于细胞肝素受体的存在,因此增强了对表达整合素肿瘤细胞株的转导能力^[19]。

通过突变分析,研究者们进一步鉴定了 AAV 衣壳上可以用于遗传修饰的 6 个氨基酸位点,分别位于 261、381、447、534、573 和 587 位点。这些位点允许插入特异结合靶细胞表面受体的配体片段,因而可靶向多种不同类型的肿瘤细胞而不影响 AAV 本身的生理特性,扩大了应用范围。在这些位点中应用最多的是 587,如 White 等^[20]将靶向人内皮细胞多肽插入到 AAV2 衣壳的 587 氨基酸位点后,修饰

AAV2 载体转染内皮细胞的能力大增。目前,研究者致力于寻找 AAV 衣壳上可用以修饰的更多位点,同时需要鉴定可靶向更多种类肿瘤的配体。

近来, Nicklin 等^[21]联合 AAV 载体的衣壳表面修饰和转录靶向调控来进行多种肿瘤细胞的生长抑制研究。通过靶向多肽 SIGYPLP 修饰 AAV 衣壳,使得突变后的 rAAV 能转染 12 种肿瘤细胞株中的 6 种,包括 C8161、PC-3、GCCM、MKN-45、LnCAP 和 A549,而且不受 AAV 本身亲嗜性的影响。此外,6 种细胞株中的 3 种,PC-3、A549 和 MKN-45 肿瘤特异性启动子 FLT-1 的表达活性呈阳性,这提供了 rAAV 载体转录靶向的治疗靶点。上述结果显示, rAAV 载体在受体靶向和转录调控水平上实行的双靶向策略,对于 AAV 载体介导的肿瘤基因治疗研究具有潜在应用价值。

4.3 不同血清型 AAV 的应用

目前大部分基于 AAV 载体的研究集中于 AAV 血清型 2。AAV2 也是被研究的最早、最清楚,应用也最为广泛的载体,已知可转染神经、肌肉、肝脏、肺以及其他组织,并且当前已有一些遗传性疾病患者接受了临床试验。然而,初步的数据表明,对于人体疾病的应用其效率有待于提高。

近年来,研究发现不同血清型 AAVs 对不同组织或细胞有特异亲嗜性。因此,利用血清型不同的 AAV 作为载体可望提高基因转染效率和安全性。例如,许多体内实验表明,AAV1 和 AAV7 对于骨骼肌细胞的转染最为有效,AAV3 转染巨核细胞的效率则更高。AAV5 和 AAV6 能有效感染肺组织细胞。此外,AAV4 和 AAV5 能转导中枢神经系统的各种不同类型细胞和视网膜等。值得一提的是,AAV8 是迄今发现的转导肝脏最为有效的载体。一直以来转导肝脏的载体效率低而不能满足需要,而 AAV8 转导肝脏的效率比 AAV2 高 10~100 倍。因而,这些发现使得人们可以用不同血清型 AAV 作为载体转染特定的组织或细胞,并介导外源基因来进行靶向肿瘤的治疗研究。Thorsen 等^[22]用 AAV2、AAV4 和 AAV5 载体介导 GFP 或 lacZ 基因转染 5 种不同的人神经胶质瘤细胞及注射荷瘤小鼠内,结果 AAV4 和 AAV5 与 AAV2 都能有效转导这些细胞及进入小鼠瘤内。这提示 AAV4 和 AAV5 可以有效穿透人神经胶质瘤屏障而进入瘤内,为这类恶性肿瘤的治疗提供了很好的载体。

不同血清型 AAV 对不同组织或细胞的亲嗜性差异主要在于其衣壳结构,因此,如果将这些不同血清

型 AAV 决定其亲嗜性的结构相互交换, 将设计出更多新的亲嗜性不同的 rAAV 载体, 这些载体可望在肿瘤治疗中具有广阔的前景, 靶向更广泛的肿瘤类型。如 Bowles 等^[23]采用“标记补救”方法生产各种衣壳突变的杂合 AAV 载体, 以靶向转导不同组织或细胞。此外, 由于不同血清型 AAV 衣壳序列具有很高的同源性, 如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV7 和 AAV8 之间具有 80% 的同源性, 而 AAV4、AAV5 和其他型之间也有约 60% 的同源性。这种同源性分布在整个衣壳基因组中, 因而为不同血清型 AAV 间进行同源重组提供广泛重组区域, 产生具有新的亲嗜性的杂合衣壳 rAAV, 为特定系统或组织的肿瘤治疗提供了一个平台。

5 AAV 治疗肿瘤的安全性考虑

1999 年美国先天性鸟氨酸甲酰氨基转移酶 (OTC) 缺乏症患者基因治疗死亡事件, 2002 年法国 X 染色体连锁的严重联合免疫缺陷性疾病 (X-SCID) 患者临床基因治疗试验后导致白血病。这些严重副作用的产生为基因治疗研究敲响了警钟。因此, AAV 载体用于肿瘤治疗的安全性问题仍然是目前研究者们面临的一个重大挑战。

rAAV 用于肿瘤的临床治疗之前, 必须对其安全性进行全面而系统的评价和考查, 主要包括以下几个方面。① rAAV 与宿主的免疫反应。目前使用的 rAAV 载体能引起机体免疫反应的只有衣壳蛋白和外源基因的表达产物。因此, rAAV 载体应用过程中, 必须综合考虑这两方面因素所产生的影响。如在肝脏和肌肉组织中, rAAV 介导的基因治疗不发生细胞免疫反应, 但可引起体液免疫反应, 产生抗体而显著降低 rAAV 的转染效率。在中枢神经系统中, 免疫反应的发生与 rAAV 载体的给药时间间隔有关, 如果间隔时间大于一定值则不会影响其转染效率。② 体内的分布情况。rAAV 进入体内后, 其分布情况影响其安全性, 同时也与其治疗效率密切相关。大量研究资料表明, rAAV 不仅感染特定组织和细胞, 而且还会扩散到血液循环系统。Aliken 等^[24]进行人囊性纤维化病的临床试验发现, 注射 1 天后可在血液中检测到 rAAV2, 1 周后在唾液中也检测到 rAAV2 的存在。其他研究者等用 rAAV 注射不同部位后, 在尿液、唾液、血清及精液中都可检测到 rAAV2 的存在。因此, 在进行 rAAV 介导的肿瘤治疗过程中, 应该限定 rAAV 载体在肿瘤组织内, 尽量避免其对其他

组织的毒性反应。③ 对宿主细胞的影响与肿瘤发生。rAAV 载体对宿主细胞的影响和肿瘤发生的关系是评价载体安全性的一个关键方面。rAAV 进入宿主后对细胞的生理和功能活性等产生一定的影响。Stilwell 等^[25]应用 DNA 芯片技术检测 AAV 载体感染肺原始成纤维细胞后对细胞的影响。结果表明, 36 种 mRNA 丰度呈 4 倍以上的上调或下调, 尤其与细胞周期调控、DNA 复制有关的基因表达明显下调。这可能与 rAAV 进入细胞后抑制细胞的增殖有关, 尤其可以抑制肿瘤细胞的增殖、增强其靶向抗癌特性。AAV 载体还可抑制 cAMP 信号通路中的 PKA 和 PRKX 两种激酶, 从而影响细胞的正常生理活动。此外, AAV 等病毒载体整合进入基因组对细胞的影响与其插入宿主基因组的位置有关。当外源基因插入到一些抑癌基因或原癌基因附近时, 通过失活抑癌基因或激活原癌基因有可能诱发恶性肿瘤。如果外源基因增强某些调控细胞增殖基因 (如 Ras 基因) 的表达, 也很可能会引发肿瘤。因此, 理论上讲 AAV 载体存在诱发肿瘤的可能性。然而, 大量实验资料表明, rAAV 并没有引发恶性肿瘤的发生。例如, Ahn 等^[26]对 92 名宫颈癌患者分组检测了 rAAV 和人 HPV 与宫颈癌发生发展关系的研究, 结果发现重组 AAV 与宫颈癌没有任何相关性, 而 HPV 则否。Bell 等^[27]也证明 rAAV 经门静脉注射入 695 只小鼠后没有观察到肝癌的形成。另有报道, rAAV 可不整合进宿主染色体而以附加体形式存在核周围介导外源基因表达。这些结果表明, rAAV 除了具有免疫原性小, 基因表达持续时间长等优点外, 无致癌性也将引起更多专家们的兴趣。然而, 对 rAAV 长期的安全性监测还是非常必要。

6 小结与展望

目前, AAV 载体介导的肿瘤基因治疗仍处于幼年期, 要实现 AAV 载体广泛用于肿瘤治疗并进入临床试验还有很长的路要走。然而, 在动物实验中 AAV 进行肿瘤治疗显示的良好疗效给人们带来了希望。目前, 针对 rAAV 载体肿瘤靶向治疗的许多策略正在广泛试验中, 还有一些靶向策略也在积极发展中。令人可喜的是 AAVs 已经成为肿瘤基因治疗最有潜力的安全性最好的载体之一。

近来, 许多研究者都致力于构建新型靶向 AAV 载体, 以达到最好的治疗肿瘤的效果和最小的毒副作用。为实现以上目标, 我们认为应该从以下几个方

面作出努力。①深入了解肿瘤起源的分子机制和肿瘤分子生物学特征;②进一步理解 AAV 载体的生物学特征和感染途径的分子机制;③寻找针对个别不同种类肿瘤的最优化和最稳定的配体或靶向受体,用于构建靶向 rAAV 载体;④筛选、鉴定和构建更多种属来源的不同血清型和组织亲嗜性的 AAV 或突变体;⑤尽量减少和避免 AAV 的副反应和细胞毒性,并且建立 AAV 的安全性监测范围。

参考文献(References)

- [1] Hermonat PL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 6466
- [2] Xu R *et al. Hepatology*, 2003, **37**: 1451
- [3] Li CW *et al. Cancer Gene Ther*, 2005, **12**: 913
- [4] Yoshida J *et al. Jpn J Cancer Res*, 2002, **93**: 223
- [5] Wendtner CM *et al. Blood*, 2002, **100**: 1655
- [6] Fang J *et al. Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 584
- [7] Su H *et al. Hum Gene Ther*, 1996, **7**: 463
- [8] Cukor G *et al. J Natl Cancer Inst*, 1975, **55**: 957
- [9] Hermonat PL. *Cancer Lett*, 1994, **81**: 129
- [10] Sauden P *et al. EMBO J*, 2000, **19**: 4351
- [11] Schmidt M *et al. J Virol*, 2000, **74**: 9441
- [12] Wang YG *et al. Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36**: 492
- [13] Ruan H *et al. Neoplasia*, 2001, **3**: 255
- [14] Stieger K *et al. Mol Ther*, 2006, **13**: 967
- [15] Chtarto A *et al. Gene Ther*, 2003, **10**: 84
- [16] Li ZB *et al. BMC Cancer*, 2006, **6**: 66
- [17] Mizukami H *et al. Mol Biotechnol*, 2004, **27**: 7
- [18] Grifman M *et al. Mol Ther*, 2001, **3**: 964
- [19] Shi W *et al. Mol Ther*, 2003, **7**: 515
- [20] White SJ *et al. Circulation*, 2004, **109**: 513
- [21] Nicklin SA *et al. Cancer Lett*, 2003, **201**: 165
- [22] Thorsen F *et al. J Gene Med*, 2006, **8**: 1131
- [23] Bowles DE *et al. J Virol*, 2003, **77**: 423
- [24] Alikan ML *et al. Hum Gene Ther*, 2001, **12**: 1907
- [25] Stilwell J *et al. Mol Ther*, 2001, **3**: s131
- [26] Ahn WS *et al. Gynecol Oncol*, 2003, **89**: 105
- [27] Bell P *et al. Mol Ther*, 2005, **12**: 299

Targeting Cancer Therapy of Adeno-associated Virus Vector

Yi-Gang Wang*, Fang Huang

(Institute of Xinyuan Medicine and Biotechnology, Life Science School of Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Targeting is the key point of success in cancer therapy. Cancer therapy based on virus vector must require specifically act on tumor cells meanwhile reducing the cytotoxicity to the normal cells. Adeno-associated virus (AAV) vectors are widely used in treatment of human disease with the advantage of their low immune response, broad host range, and persistent and stable gene expression compared with other virus vectors. However, targeting cancer therapy mediated by AAV vectors still becomes the recent hot and difficult problem. In this review, we will focus on cancer therapy profile, recent progress in targeting strategies and the safety in the use of AAV vectors.

Key words targeting; cancer therapy; adeno-associated virus; safety

Received: March 14, 2007 Accepted: June 18, 2007

The work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y205282) and Zhejiang Science & Technology Support Plan (No.2007C33027)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843186, Fax: 86-571-86843185, E-mail: ygwang@sibs.ac.cn