

溶瘤病毒靶向肿瘤的分子机制

马正海*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要 溶瘤病毒 (oncolytic virus) 能特异性地感染和裂解肿瘤细胞, 而并不损伤正常细胞。一些病毒, 如呼肠孤病毒, 本身即具有溶瘤特性和肿瘤靶向性。近年来, 随着肿瘤和病毒分子生物学研究的深入以及现代生物技术的成熟, 人们可以利用基因工程手段有目的地改造病毒以使其特异性靶向肿瘤细胞, 其中的一些已开发为治疗肿瘤的药物应用于临床研究。溶瘤病毒作为抗肿瘤药物的关键在于提高其靶向性和溶瘤效应, 本文主要就溶瘤病毒靶向肿瘤的分子机制作一些探讨。由于肿瘤细胞在遗传和生理特性方面显著区别于正常细胞 (尤其是获得或丧失一些功能的突变, 或一些基因功能的上调或下调), 则溶瘤病毒可特异性地靶向肿瘤细胞中变异的分子或信号通路, 如 pRB、p53、干扰素、蛋白激酶 R、表皮生长因子受体、Ras、Wnt、抗凋亡分子、低氧诱导因子和病毒受体等。溶瘤病毒靶向肿瘤的另一策略是通过删除病毒在正常细胞中复制所必需的基因而实现, 而这些基因对于病毒在肿瘤细胞中复制是非必需的。另外, 将病毒复制所必需的基因置于肿瘤特异性或组织特异性启动子控制之下, 也能使溶瘤病毒靶向肿瘤细胞。

关键词 溶瘤病毒; 肿瘤; 分子靶向机制

一百多年以前, 人们已经发现一些病毒能够抑杀肿瘤, 并提出利用病毒治疗肿瘤。之后, 随着肿瘤和病毒分子生物学研究的深入以及基因重组技术的成熟, 人们可以有目的地改造病毒以使其特异性地感染并抑杀肿瘤细胞。上述这些能特异性感染并抑杀肿瘤细胞而不感染正常细胞的病毒即为溶瘤病毒。目前, 腺病毒 (adenovirus, Ad)、1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)、牛痘病毒 (vaccinia virus, VV)、新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV)、呼肠孤病毒 (reoviruses)、水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)、麻疹病毒 (measles virus) 和脊髓灰质炎病毒 (poliomyelitis virus, PV) 等十多种病毒已开发为溶瘤病毒, 其中以 Ad 和 HSV-1 研究的最为广泛, 一些溶瘤病毒已进入临床试验阶段^[1]。溶瘤病毒治疗肿瘤的关键在于提高其肿瘤靶向性和抑杀肿瘤细胞的效果, 就溶瘤病毒靶向性来源而言, 一类病毒具有天然的肿瘤细胞趋向性; 而另一类溶瘤病毒是通过基因重组获得的, 这类病毒的野生型具有致病性, 通过突变或缺失一些病毒基因以及插入一些肿瘤靶向性基因或肿瘤特异性启动子后可使其丧失在正常细胞中复制的能力, 但保持或增强了对肿瘤细胞的感染能力, 从而获得了肿瘤靶向性。而就溶瘤病毒靶向肿瘤细胞的分子机制而言, 两类溶瘤病毒均是利用肿瘤细胞与正常细胞在遗传特性和

生理特性方面的差异 (如癌基因的活化、抑癌基因的失活、细胞防御机制的缺陷、特异性受体的高表达、肿瘤细胞的异常增殖等) 而靶向肿瘤细胞。本文就溶瘤病毒靶向肿瘤的分子机制的近期研究作一综述。

1 靶向缺陷的 p53 或 pRB 信号通路

由于许多人类恶性肿瘤细胞的 p53 和 pRB 信号通路异常, 而正常人类细胞的 p53 和 pRB 均获得高水平的表达且功能正常, 故一些溶瘤病毒可利用肿瘤细胞与正常细胞的这一差异特异性靶向肿瘤细胞。Ad E1B 基因产物可与 p53 蛋白相互作用并使之失活, 故人们推测删除该基因的重组 Ad 感染正常细胞时, p53 将启动细胞凋亡而阻止病毒复制; 而 p53 缺陷的肿瘤细胞未能启动细胞凋亡, 这将有利于病毒完成复制而靶向肿瘤细胞。ONYX-015^[2,3] 和 H101^[4,5] 即是基于以上思路构建的 E1B 缺失的重组 Ad, 目前已广泛应用于肿瘤治疗研究, 并与传统肿瘤治疗方法联合使用进入临床试验, I/II 期临床研究表明其安全性和疗效较好, 已进入 III 期临床研究。其中, 由我国自主研

收稿日期: 2009-02-16 接受日期: 2009-09-03

国家自然科学基金资助项目 (No.30460008)

* 通讯作者。Tel: 0991-8583259, E-mail: mzhxju@xju.edu.cn

发的H101与化疗结合治疗晚期鼻咽癌已于2006年获中国国家食品药品监督管理局批准为溶瘤病毒药物。然而,近期的研究表明p53缺陷并非ONYX-015靶向肿瘤细胞的关键因素,ONYX-015亦能在p53并未发生突变的肿瘤细胞中增殖,并提出p53信号通路中p53之外的其他成员的缺陷也能致使ONYX-015在肿瘤细胞中增殖,如Ries等^[6]的研究表明缺失E1B的Ad亦能感染p14可变读码框(p14 alternative reading frame, p14^{ARF})缺陷的肿瘤细胞。另外,O'Shea等^[7,8]的研究表明E1B的突变阻碍了病毒晚期mRNA从细胞核转运至细胞质,突变病毒不能在正常细胞中复制,而肿瘤细胞能够将mRNA转运至细胞质,且热休克反应促进了mRNA的转运,故突变病毒能够靶向性感染肿瘤细胞,同时,研究者也提出热休克反应可能会提高ONYX-015治疗肿瘤的效率。而胡放等^[4]在研究中发现,注射H101的发热患者与不发热者相比,不仅局部的抑瘤效果较好,而且对转移病灶也呈现抗癌效应,如果结合局部加热治疗,对转移肿瘤病灶的疗效更佳,以上亦说明热休克反应可促进E1B删除Ad发挥抑瘤效应。

溶瘤腺病毒靶向性感染肿瘤细胞的另一策略是突变E1A的保守区2(conserved region 2, CR2),该区能靶向性结合抑癌蛋白pRB,继而导致与pRB结合的E2F转录因子释放并激活细胞分裂。溶瘤腺病毒dl922-947和Ad-Δ24即为E1A-CR2突变株,研究表明dl922-947优先在几种肿瘤细胞系中复制而不能在正常细胞中复制。Fukuda等^[9]的研究表明腺病毒E1A-CR2和E1B均突变的重组Ad能特异性地靶向p53和pRB缺陷的肿瘤细胞。一些VV毒株具有天然的肿瘤趋向性^[10],其机制部分源于VV一旦感染细胞后,通过失活p53和pRB而激活多种细胞信号途径和改变细胞周期的进程,最终使VV能更有效地在迅速生长的肿瘤细胞中复制^[11]。

2 靶向缺陷的IFN/dsRNA依赖性的蛋白激酶R(PKR)信号通路

细胞被病毒感染后会产生IFN和双链RNA(dsRNA)等特殊的应急因子,这些应急因子在细胞抵御病毒感染中发挥着重要的作用。IFN和dsRNA均能激活PKR,PKR有“细胞免疫系统”之称,可使翻译起始因子eIF-2 α 的 α 亚基磷酸化,从而终止蛋白质的合成和病毒的增殖,促使被病毒感染的细胞凋亡,这是细胞抵御病毒感染的一种策略。在肿瘤细

胞中,IFN的产生及作用往往受到限制,这为病毒增殖提供了较为宽松的环境,使病毒能够在其中顺利地完成复制,并最终裂解肿瘤细胞。

VSV为负链RNA病毒,对IFN- α/β 非常敏感,Stojdl等^[12]发现VSV的弱毒株AV1和AV2能专一性地杀伤肿瘤细胞,并使裸鼠体内的肿瘤明显萎缩,Obuchi等^[13]将鼠IFN- β 重组至VSV获得重组病毒rVSV-IFN β ,其感染正常小鼠细胞后,由于IFN- β 的过表达,该重组病毒的感染力明显下降;然而,rVSV-IFN β 仍然能在IFN缺陷的转化细胞系中大量增殖并导致细胞凋亡。溶瘤VSV靶向肿瘤的另一策略是删除病毒B18R基因,该基因编码产物能中和细胞分泌的IFN,以删除B18R基因的重组VSV感染正常细胞时,IFN可充分发挥抗病毒效应并终止病毒增殖;而感染IFN缺陷的肿瘤细胞时,该重组VSV仍能大量增殖并裂解肿瘤细胞^[14]。

HSV-1 ICP34.5(也称 γ 34.5)基因为神经毒基因,其编码产物为HSV-1在神经细胞中增殖所必需的蛋白质;ICP34.5还能通过PKR信号途径促使eIF-2 α 的去磷酸化,抑制细胞凋亡,从而使病毒复制得以完成,这是病毒为了保证自身复制而建立的抗凋亡机制。大量的研究表明缺失 γ 34.5基因的HSV-1重组病毒不能在正常的细胞中完成复制;而在IFN缺陷的肿瘤细胞中不存在eIF-2 α 磷酸化的问题,病毒仍能顺利复制^[15]。另外,一些肿瘤细胞过表达MAPK激酶MEK,MEK可通过抑制PKR支持 γ 34.5缺失HSV-1的复制,从而实现靶向性感染并发挥溶瘤效应^[16,17]。目前,已经进入临床试验的 γ 34.5缺失溶瘤HSV-1有R3616和R1716株,R3616用于治疗神经胶质瘤和卵巢癌等,R1716在小鼠体内与化疗药物联合治疗非小细胞肺癌,直接注射乳腺癌、恶性间皮瘤和神经母细胞瘤也呈现了很好的疗效,神经胶质瘤临床试验的结果说明该病毒有可靠的安全性和良好的疗效。G207和MGH1为缺失 γ 34.5和核糖核苷还原酶(ribonucleotide reductase, RR)基因的重组HSV-1,动物试验表明G207无细胞毒性,在腹腔接种人卵巢癌的荷瘤小鼠中可显著缩小肿块并抑制了肿瘤的扩散,且G207很难在正常细胞中复制,说明G207有很好的肿瘤靶向性。目前,在动物试验中,G207已用于治疗神经胶质瘤、结肠癌、肝转移癌和前列腺癌等多种肿瘤,效果良好。

虽然NDV可导致禽类严重的呼吸系统及中枢神经系统疾病,但一些NDV弱毒株可选择性地在人类

肿瘤细胞中复制, 并导致肿瘤细胞裂解。NDV 的靶向性与肿瘤细胞 IFN 缺陷有关, Krishnamurthy 等^[18]用内源性和外源性的 IFN- β 彻底抑制了 NDV 在正常细胞中的复制, 而 NDV 在 IFN 缺陷的人纤维肉瘤细胞 HT-1080 中的复制和溶瘤效应几乎不受影响, 说明 NDV 靶向肿瘤细胞源于肿瘤细胞中 IFN 的缺陷。Vigil 等^[19]利用反向遗传学 (reverse genetics) 手段将 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子基因重组入 NDV, 显著提高了 NDV 的溶瘤效应。目前, 已有多个溶瘤 NDV 应用于临床研究, 在溶瘤治疗方面显示了极大的潜力。

早在 1904 年就有学者报道一淋巴瘤患者经历流感病毒感染后瘤体明显消退, 然而, 随后的研究表明天然 A 型流感病毒 (influenza virus A, IFV) 特异性较弱, 但通过基因工程改造可增强 IFV 对肿瘤细胞的靶向性。NS1 蛋白是流感病毒的毒力因子, 可抵消宿主细胞 PKR 介导的细胞防御反应。Muster 等^[20]的研究表明, 删除 NS1 的重组 IFV 不能在正常细胞中复制, 但仍能靶向性感染 IFN 和 PKR 缺陷的肿瘤细胞并产生感染性病毒颗粒, 该重组病毒在接种黑色素瘤的荷瘤鼠中能显著地抑制肿瘤生长^[20]。

3 靶向激活的表皮生长因子受体或 Ras 信号通路

由于多数肿瘤细胞表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 过表达, 则 EGF 可通过过表达的 EGFR 激活 Ras 信号通路。在一些肿瘤中, Ras 基因常常发生突变和过表达, Ras 能够激活一种磷脂酶, 从而拮抗具有抗病毒作用的 PKR, 因此, Ras 信号通路激活的肿瘤细胞对病毒感染的防御较弱。一些病毒天然即能靶向性感染 EGFR 过表达或 Ras 激活的肿瘤细胞, 如呼肠孤病毒, 其致病力极弱, 而能在 Ras 激活的肿瘤细胞中有效增殖^[21]。近期的一项研究表明, 呼肠孤病毒不仅能借助激活的 Ras 促使病毒蛋白的合成, 而且还能通过促进病毒脱衣壳以及增强病毒颗粒感染和释放来实现其溶瘤效应^[22]。目前, 呼肠孤病毒的溶瘤特性已在多个动物肿瘤模型中得到验证。

另外, 通过基因工程手段改造病毒亦能使溶瘤病毒靶向性感染 EGFR 过表达和 Ras 激活的肿瘤细胞。如删除病毒相关 RNA (virus-associated RNAs, VA-RNA) 的 Ad 可选择性地在 Ras 信号通路激活的肿瘤细胞中增殖, VA-RNA 可失活 PKR, 从而阻断 PKR 对病毒蛋白合成的抑制作用, 因此, VA-RNA 为 Ad 在

正常细胞中增殖所必需的。而在 Ras 激活的肿瘤细胞中, Ras 亦能失活 PKR, 则 VA-RNA 在这些肿瘤细胞中仅作为 Ras 信号通路的一个旁路, 并非 Ad 增殖所必需。已有研究者将 Ad 的 I 型 VA-RNA (VA I RNA) 和 II 型 VA-RNA (VA II RNA) 删除, 获得的重组病毒在正常细胞中的复制能力降低了 100 倍, 而在 Ras 激活的肿瘤细胞中的增殖能力并未受到影响, 且表现出很强的溶瘤效应^[23]。另有研究者报道 Ras 激活并不能确保 VA-RNA 删除的 Ad 能在肿瘤细胞中增殖, 并提出这类病毒在肿瘤细胞中增殖可能尚需要辅以 Ras 之外的途径^[24]。2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 的 ICP10 基因编码蛋白的 N 端为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase, PK) 功能区, 该区能通过激活 Ras/MEK/MAPK 促细胞分裂通路和抑制细胞凋亡而促进 HSV-2 复制, Fu 等^[25]的研究表明, 突变该区的重组 HSV-2 能够特异性地感染和抑杀 Ras 激活的肿瘤细胞。牛痘病毒生长因子 (vaccinia growth factor, VGF) 是 VV 编码的一个与 EGF 和转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) 同源的蛋白质, 其功能类似于 EGF 和 TGF- α , VGF 可与 EGFR 结合并使其酪氨酸磷酸化, 继而抑制细胞凋亡, 以促使病毒完成复制。故 VGF 是 VV 在正常细胞中复制所需要, 删除 VGF 的重组 VV 不能在正常细胞中复制; 然而, 该重组 VV 可借助过表达的 EGFR 在肿瘤细胞中复制并发挥溶瘤效应, 删除 VGF 的重组 VV 在多种肿瘤模型中均表现出抑杀肿瘤的潜能^[10,26]。

4 靶向 Wnt 信号通路

在消化道等肿瘤细胞中腺瘤性多发性息肉病 (adenomatous polyposis coli, APC) 基因和 β -连环蛋白 (β -catenin) 基因常发生突变, 这些基因突变常常激活 Wnt 信号通路, 其结果是增强 β -连环蛋白的稳定性并导致其在胞质内大量积累和进入核内。进入核内的 β -连环蛋白与核内转录因子 TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) 结合, 激活 Wnt 调控的靶基因 (如 c-myc, c-jun, 细胞周期蛋白 D1 等) 的表达。一些溶瘤病毒可利用激活的 Wnt 信号通路靶向肿瘤细胞。Brunori 等^[27]将 E1B 基因和 E2 基因置于 Tcf 转录因子控制的启动子之下, 该重组病毒靶向性感染 Wnt 信号途径激活的肿瘤细胞。Kuroda 等^[28]将 Tcf 响应元件的串联重复序列置于 HSV-1 ICP4 基因附近以驱动病毒的复制, 该重组病毒能有效地抑制携有 APC 突变基因的结直肠癌。

5 靶向肿瘤组织的低氧环境

肿瘤细胞的快速增殖导致多数实体瘤组织处于低氧状态,含氧量低与肿瘤的转移和对传统放化疗产生抗性相关。然而,一些溶瘤病毒可选择性地感染处于低氧状态的肿瘤组织。Connor等^[29]报道VSV能够在低氧条件下复制,故能够感染并抑杀处于低氧条件下的肿瘤细胞。低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是低氧条件下肿瘤细胞产生的一种核转录因子,能反式激活低氧响应元件(hypoxia responsive elements, HRE)或低氧响应启动子,促进缺氧响应基因的转录。故人们可以将病毒基因置于HRE或低氧响应启动子的调控之下,对肿瘤细胞而言,其富含的HIF能够促使这些病毒基因的表达,从而增强了病毒的复制能力和溶瘤效应;正常细胞由于缺乏HIF而免受感染。Hernandez-Alcoceba等^[30]将E1A基因置于对低氧和雌激素均敏感的双特异性启动子调控之下,获得的溶瘤腺病毒AdEHT2和AdEHE2F能够在处于低氧状态的肿瘤细胞中增殖,并发挥溶瘤效应;之后,该研究组将E1A置于含HRE的启动子调控之下,获得的溶瘤腺病毒Ad9xHREE1A的复制严格依赖于HIF,在低氧或VHL(von Hippel-Lindau)肿瘤抑制基因缺陷的肿瘤细胞中表现出特异性的溶瘤效应^[30]。Zhang等^[31]将*Elb*基因置于低氧响应启动子调控之下,将*E1a*基因置于人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子调控之下,获得的重组病毒CNHK500在体外及体内均表现出广谱溶瘤效应,且对正常细胞的毒副作用很低,在实体瘤治疗方面有很好的应用前景。

6 靶向肿瘤细胞抗凋亡信号通路

一些病毒在与宿主细胞相互作用的过程中逐渐形成了抗凋亡的机制以使其能够在感染细胞中完成复制,这些抗凋亡蛋白是病毒在正常细胞中复制所必需的;由于许多肿瘤细胞亦存在逃避凋亡的机制,故病毒在肿瘤细胞中复制并不需要这些抗凋亡蛋白^[32],缺失抗凋亡基因的重组病毒可特异性地感染和抑杀存在抗凋亡机制的肿瘤细胞,这一点在Ad、HSV和VV等病毒中均得以验证。Ad EIB-19K蛋白与Bcl-2同源,具有抵抗细胞凋亡的功能,能对抗肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)诱导的细胞溶解。研究表明,删除EIB-19K基因的重组Ad能靶向性感染TNF活性增强的肿瘤细胞,且该重组病毒的安全性、传播能力和溶瘤效应均显著优于ONYX-015和

野生型Ad。考虑到EIB-19K和E3B均能拮抗TNF的功能,Liu等^[33]同时删除EIB-19K基因和E3B基因,以期获得溶瘤效应更强的重组病毒,结果表明仅缺失E3B的重组Ad具有很强的溶瘤效应,而缺失两个基因的重组病毒在肿瘤细胞中的复制能力受到影响。VV B22R和B13R分别编码具有抗凋亡作用的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin) SPI-1和SPI-2,Guo等^[34]的研究表明,删除上述两个基因的重组病毒vSP丧失了正常细胞中复制的能力,却保留了在肿瘤细胞中复制的能力,在体外和体内均能发挥很强的溶瘤效应。HSV包含多个抗凋亡基因,故可通过缺失这些基因赋予HSV肿瘤靶向性。HSV Us3区编码的多功能蛋白酶具有抗凋亡的功能,Kasuya等^[35]的研究表明,缺失Us3的重组病毒L1BR1在正常细胞中的复制能力极低,且在体内试验中表现出较其他溶瘤HSV更佳的溶瘤效应。Liu等^[36]通过突变Us3获得了重组病毒R7041,该重组病毒亦能高效地抑杀肿瘤细胞,而在正常细胞中的复制能力显著降低,在免疫缺陷和免疫健全小鼠中均未见明显的毒性,具有显著的抗肿瘤效应。

7 利用肿瘤特异性启动子增强病毒在肿瘤细胞中的复制

即将病毒复制所必需的基因置于肿瘤特异性启动子(或增强子)控制之下,并借助这些基因的表达促使病毒在肿瘤细胞中增殖,以实现靶向性溶瘤。目前用于这类研究的启动子主要有两类,一类启动子在许多肿瘤中均呈现强活性,而在正常细胞中无活性或活性很弱,如hTERT启动子和存活素(survivin)启动子。如前所述,已有研究者将E1A置于hTERT启动子调控之下获得了溶瘤Ad。存活素是一种抗凋亡蛋白,在大多数成熟组织中不表达,但在许多人类肿瘤中过表达,故存活素启动子亦可用于构建溶瘤病毒。Van Houdt等^[37]将E1基因置于存活素启动子调控之下,获得的重组病毒能够在胶质瘤细胞中增殖并呈现细胞毒性,而对正常星形胶质细胞的杀伤力很弱,在神经胶质瘤异种移植动物模型中表现出良好的抗肿瘤效应。另有研究者构建了存活素启动子调控E1A表达的溶瘤腺病毒Ad.SP/E1A,该病毒通过凋亡依赖性通路抑杀肿瘤细胞,Ad.SP/E1A在临床前研究中呈现出良好的肿瘤治疗效果^[38]。另一类启动子为肿瘤或组织特异性的启动子,如前列腺癌特异性的前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)启动子、 α -胎甲蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)启动子和前列

腺特异性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) 启动子。Li 等^[39]将 E4 和 E1A 基因置于 PSA 和 PSMA 的融合增强子调控之下, 获得的重组病毒 AdE4PSESE1a 靶向性感染 PSA/PSMA 阳性的前列腺癌细胞, 在荷瘤鼠中能显著地抑制瘤体生长。在 HSV 溶瘤病毒的研究中, 以脑肿瘤特异性启动子^[40]和胰腺癌特异性启动子^[41]分别控制 γ 34.5 和 ICP4 基因, 获得的重组病毒分别靶向恶性胶质瘤和胰腺癌, 并能显著抑制肿瘤生长。

8 靶向肿瘤细胞特异性表达的受体

病毒通过识别细胞表面特异性的受体而靶向性感染特定的细胞, 而一些肿瘤细胞表面的病毒受体特异性地高表达, 病毒则可以借助这些受体靶向性感染肿瘤细胞。例如, 柯萨奇病毒 A21 通过肿瘤细胞高表达的受体 ICAM-1 和 DAF 靶向性感染人黑色素瘤并发挥溶瘤效应^[42,43]; 艾柯病毒(Echovirus)通过过表达的整联蛋白(integrin) $\alpha_2\beta_1$ I 区靶向卵巢癌细胞并发挥溶瘤效应^[44]; 脊髓灰质炎病毒通过人肿瘤细胞高表达的 CD155 靶向性感染肿瘤并发挥溶瘤效应^[45,46]。另有一些并非病毒特异性的受体在一些肿瘤细胞中亦呈现过表达, 如叶酸受体(folate receptor, FR)、EGFR、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体和红细胞生成素(erythropoietin, EPO)受体等, 人们可以通过修饰病毒衣壳蛋白促使病毒识别这些受体, 从而使病毒靶向性感染肿瘤细胞。目前, 有两种修饰方法可使病毒靶向肿瘤细胞, 一是以一个双特异性配体(同时与病毒和肿瘤细胞特异性受体结合)替代识别正常细胞受体的病毒衣壳蛋白, 以阻断病毒与天然受体的结合, 同时赋予病毒识别肿瘤特异性受体或组织特异性受体的能力, Kleef 等^[47]以成纤维细胞生长因子 2 与 Ad 纤毛结区抗体的嵌合蛋白为双特异性配体, 使重组 Ad 高效地靶向胰腺癌细胞; 二是突变病毒天然的配体基因并插入一个靶向性配体, 如单链抗体、生长因子和外源短肽, 使病毒靶向肿瘤细胞。如突变麻疹病毒的天然配体并插入单链抗体的重组麻疹病毒能高效地识别肿瘤细胞表面抗原^[48]。以嵌合 Fc 结合区的辛德毕斯(Sindbis)病毒包膜糖蛋白置换 VSV 自身的包膜糖蛋白, 获得的重组病毒靶向性感染 Her2/neu 过表达的乳腺癌细胞^[49]。

9 利用肿瘤细胞异常增殖相关的酶及其代谢产物靶向肿瘤

肿瘤细胞是一群异常增殖的细胞, 一些溶瘤病毒可利用肿瘤细胞内富含的一些酶及其代谢产物而增殖, 这也为构建溶瘤病毒提供了一条途径, 即缺失病毒复制必需酶基因的重组病毒在正常细胞中难以增殖, 但一些生长旺盛的肿瘤细胞可为病毒复制反式提供缺失的酶及其代谢产物, 促使病毒增殖并抑杀肿瘤细胞。人们在构建溶瘤 HSV-1 时即可采取这一策略, 即通过缺失 HSV-1 核苷酸代谢所必需的胸苷激酶(thymidine kinase, TK)基因和 / 或核糖核苷还原酶(ribonucleotide reductase, RR)基因使病毒靶向性感染肿瘤细胞。dlspTk 是早期的一株缺失 TK 基因的重组 HSV-1, dlspTk 可借助快速生长的肿瘤细胞富含的 TK 而特异性地在肿瘤细胞中复制, 其接种入裸鼠脑内的神经胶质瘤中可抑制肿瘤生长。但进一步的研究表明 dlspTk 仍然保留了神经毒力, 加之 TK 是抗疱疹病毒药物甘昔洛韦(gancyclovir, GCV)或阿昔洛韦(acyclovir, ACV)作用的靶分子, 使得研究者无法用这两种药控制 dlspTk 的治疗过程; 另外, HSV-TK 与 ACV 和 GCV 联用时可将后者磷酸化为细胞毒性物质并发挥溶瘤效应。基于以上原因, 目前, TK 缺失的溶瘤 HSV-1 已被放弃。HSV-1 ICP6 基因编码的 RR 可使核糖核苷还原为相应的脱氧核糖核苷, 后者是 DNA 合成的底物, 在真核细胞中, 只有 DNA 损伤修复和分裂期时, 该酶才高度表达。野生型 HSV-1 编码自己的 RR, 增殖不依赖细胞的分裂周期, 在非分裂细胞中同样可以复制, 但缺失该基因的病毒无法在不分裂的细胞中复制, 只能在富含该酶、分裂旺盛的肿瘤细胞中增殖, 因为肿瘤细胞可以向病毒提供 DNA 复制所必需的底物, 从而实现了选择性复制和溶瘤的目的。hr3 株既是将 LacZ 基因插入 RR 基因使之失活的 HSV-1 重组病毒, hr3 对大鼠胶质瘤以及转移性结肠癌和胰腺癌均有治疗效果, 且有较高的安全性和理想的靶向性^[15]。在溶瘤 VV 的研究中, Puhmann 等^[50]删除 VV TK 基因获得的重组病毒 WR 亦保留了在肿瘤细胞中的复制能力, 而在正常细胞中的复制能力被削弱。

综上所述, 天然溶瘤病毒和通过基因工程改造获得的溶瘤病毒靶向性感染和裂解肿瘤均是基于肿瘤细胞和正常细胞在遗传和生理特性方面存在的差异, 而其间诸多的分子和信号通路存在着显著的差异, 溶瘤病毒正是利用这些差异靶向性感染肿瘤细胞或在特定的肿瘤细胞中表达病毒基因并完成病毒的复制, 继而发挥溶瘤效应。利用基因工程手段构建溶瘤病

毒既是在病毒原有特性的基础上,利用肿瘤细胞和正常细胞间的这些差异分子设计靶向策略。

另外,溶瘤病毒经改造后亦可作为载体携带多个肿瘤治疗基因,以协同治疗基因的作用与溶瘤效应而达到更佳的治疗效果,这也是溶瘤病毒研究的一个主要方向,在此不做详述。

参考文献 (References)

- [1] Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs, *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(7): 326-333
- [2] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells, *Science*, 1996, 274(5286): 373-376
- [3] Chiocca EA, abbed K M, Tatter S, et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting, *Mol Ther*, 2004, 10(5): 958-966
- [4] 胡放, 胡晓桦, 余萍, 等. 溶瘤病毒 H101 结合局部加热治疗对转移肿瘤病灶的远端效应, *癌症*, 2006, 25(8): 919-924
- [5] 陆巍, 陆维祺, 朱隽, 等. 重组腺病毒人体恶性肿瘤内注射体内外播散性研究, *现代医学研究*, 2007, 34(3): 403-404, 415
- [6] Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, et al. Loss of p14^{ARF} in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015), *Nat Med*, 2000, 6(10): 1128-1133
- [7] O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity, *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 611-623
- [8] O'Shea CC, Soria C, Bagus B, et al. Heat shock phenocopies E1B-55K late functions and selectively sensitizes refractory tumor cells to ONYX-015 oncolytic viral therapy, *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 61-74
- [9] Fukuda K, Abei M, Ugai H, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer, *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4434-4440
- [10] Thorne SH, Hwang TH, O'Gorman BE, et al. Rational strain selection and engineering creates a broad spectrum systemically effective oncolytic poxvirus JX-963, *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3350-3358
- [11] Yoo NK, Pyo CW, Kim Y, et al. Vaccinia virus-mediated cell cycle alteration involves inactivation of tumour suppressors associated with Brf1 and TBP, *Cell Microbiol*, 2008, 10(3): 583-592
- [12] Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents, *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 263-275
- [13] Obuchi M, Fernandez M, Barber GN. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity, *J Virol*, 2003, 77(16): 8843-8856
- [14] Kirn DH, Wang Y, Le Boeuf F, et al. Targeting of interferon- β to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus, *PLoS Med*, 2007, 4(12): e353
- [15] Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses, *Front Biosci*, 2008, 13: 2060-2064
- [16] Smith KD, Mezhir JJ, Bickenbach K, et al. Activated MEK suppresses activation of PKR and enables efficient replication and *in vivo* oncolysis by $\Delta\gamma_134.5$ mutants of herpes simplex virus 1, *J Virol*, 2006, 80(3): 1110-1120
- [17] Veerapong J, Bickenbach KA, Shao MY, et al. Systemic delivery of $\gamma_134.5$ -deleted herpes simplex virus-1 selectively targets and treats distant human xenograft tumors that express high MEK activity, *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8301-8306
- [18] Krishnamurthy S, Takimoto T, Scroggs RA, et al. Differentially regulated interferon response determines the outcome of newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines, *J Virol*, 2006, 80(11): 5145-5155
- [19] Vigil A, Park MS, Martinez O, et al. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus, *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8285-8292
- [20] Muster T, Rajtarova J, Sachet M, et al. Interferon resistance promotes oncolysis by influenza virus NS1-deletion mutants, *Int J Cancer*, 2004, 110(1): 15-21
- [21] Shmulevitz M, Marcato P, Lee PW. Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer, *Oncogene*, 2005, 24(52): 7720-7728
- [22] Marcato P, Shmulevitz M, Pan D, et al. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release, *Mol Ther* 2007, 15(8): 1522-1530
- [23] Cascallo M, Gros A, Bayo N, et al. Deletion of VAI and VAIH RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses, *Hum Gene Ther*, 2006, 17(9): 929-940
- [24] Schumann M, Dobbelsstein M. Activating ras mutations fail to ensure efficient replication of adenovirus mutants lacking VA-RNA, *Cell Cycle*, 2006, 5(3): 315-321
- [25] Fu X, Tao L, Cai R, et al. A mutant type 2 herpes simplex virus deleted for the protein kinase domain of the ICP10 gene is a potent oncolytic virus, *Mol Ther*, 2006, 13(5): 882-890
- [26] Chalikhonda S, Kivlen MA, O'Malley ME, et al. Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a tumor-selective oncolytic vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene, *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(2): 115-125
- [27] Brunori M, Malerba M, Kashiwazaki H, et al. Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway, *J Virol*, 2001, 75(6): 2857-2865
- [28] Kuroda T, Rabkin SD, Martuza RL. Effective treatment of tumors with strong β -catenin/T-cell factor activity by transcriptionally targeted oncolytic herpes simplex virus vector, *Cancer Res*, 2006, 66(20): 10127-10135
- [29] Connor JH, Naczki C, Koumenis C et al. Replication and cytopathic effect of oncolytic vesicular stomatitis virus in hypoxic tumor cells *in vitro* and *in vivo*, *J Virol*, 2004, 78(17): 8960-8970
- [30] Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Qian D, et al. New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication, *Hum Gene Ther*, 2002, 13(14): 1737-1750
- [31] Zhang Q, Chen G, Peng L, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus, *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6523-6531
- [32] White E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis, *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1371-1377
- [33] Liu TC, Wang Y, Hallden G, et al. Functional interactions of antiapoptotic proteins and tumor necrosis factor in the context of a replication-competent adenovirus, *Gene Ther*, 2005, 12(17): 1333-1346
- [34] Guo ZS, Naik A, O'Malley ME, et al. The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and anti-apoptosis genes SPI-1 and SPI-2, *Cancer Res*, 2005, 65

- (21): 9991-9998
- [35] Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S, *et al.* Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic virus for pancreatic cancer therapy, *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(6): 533-542
- [36] Liu TC, Wakimoto H, Martuza RL, *et al.* Herpes simplex virus Us3-mutant as oncolytic strategy and synergizes with phosphatidylinositol 3-kinase targeting molecular therapeutics, *Clin Cancer Res*, 2007, 13(19): 5897-5902
- [37] Van Houdt WJ, Haviv YS, Lu B, *et al.* The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma, *J Neurosurg*, 2006, 104(4): 583-592
- [38] Li BH, Liu X, Fan J, *et al.* A survivin-mediated oncolytic adenovirus induces non-apoptotic cell death in lung cancer cells and shows antitumoral potential *in vivo*, *J Gene Med*, 2006, 8(10): 1232-1242
- [39] Li X, Zhang YP, Kim HS, *et al.* Gene therapy for prostate cancer by controlling adenovirus E1a and E4 gene expression with PSES enhancer, *Cancer Res*, 2005, 65(5):1941-1951
- [40] Kanai R, Tomita H, Hirose Y, *et al.* Augmented therapeutic efficacy of an oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant expressing ICP34.5 under the transcriptional control of musashi1 promoter in the treatment of malignant glioma, *Hum Gene Ther*, 2007, 18(1): 63-73
- [41] Lee CY, Bu LX, Rennie PS, *et al.* An HSV-1 amplicon system for prostate-specific expression of ICP4 to complement oncolytic viral replication for *in vitro* and *in vivo* treatment of prostate cancer cells, *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(7): 652-660
- [42] Au GG, Lindberg AM, Barry RD, *et al.* Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21, *Int J Oncol*, 2005, 26(6): 1471-1476
- [43] Shafren DR, Au GG, Nguyen T, *et al.* Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus A2, *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1): 53-60
- [44] Shafren DR, Sylvester D, Johansson ES, *et al.* Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1, *Int J Cancer*, 2005, 115(2): 320-328
- [45] Ansardi DC, Porter DC, Jackson CA, *et al.* RNA replicons derived from poliovirus are directly oncolytic for human tumor cells of diverse origins, *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8470-8479
- [46] Ochiai H, Campbell SA, Archer GE, *et al.* Targeted therapy for glioblastoma multiforme neoplastic meningitis with intrathecal delivery of an oncolytic recombinant poliovirus, *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1349-1354
- [47] Kleef J, Fukahi K, Lopez ME, *et al.* Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptor, *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(6): 522-532
- [48] Bucheit AD, Kumar S, Grote DM, *et al.* An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen, *Mol Ther*, 2003, 7(1): 62-72
- [49] Bergman I, Whitaker-Dowling P, Gao Y, *et al.* Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells, *Virology*, 2003, 316(2): 337-347
- [50] Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, *et al.* Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant, *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(3): 66-73

The Molecular Targeting Mechanisms of Oncolytic Virus

Zheng-Hai Ma*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, the College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumchi 830046, China)

Abstract An oncolytic virus is able to specifically infect and lyse tumor cells, while without causing damage to normal cells. Some viruses, such as reoviruses, are inherently oncolytic and show high tumor-targeting. In the last few years, with the significant progress in the fields of cancer biology, virology and modern biotechnology, some oncolytic virus have been developed as anticancer drugs by genetic engineering, and these oncolytic virus can specifically target tumor cell. However, the major limitation for oncolytic virus to acting as anticancer drugs is its ability to infecting tumor cell specifically and efficiently, this paper is to focus on the molecular targeting mechanisms of oncolytic virus. Tumor cell possess many genetic and physiological features to distinguish from counterpart normal cells (especial gain-of-function or loss-of-function mutations, and up-regulation or down-regulation of some gene functions), so, oncolytic virus can specifically target these mutation molecules or signal transduction pathways, such as pRB, p53, interferon, protein kinase R, epidermal growth factor receptor, Ras, Wnt, anti-apoptotic protein, hypoxia inducible factor, virus receptors and so on. Another targeting strategy is to delete viral genes that are essential for viral replication in normal cells but are dispensable in tumor cells. Also, oncolytic virus can target tumor cells by control the expression of a viral gene essential for viral replication with tumor-specific promoters or tissue-specific promoters.

Key words oncolytic virus; tumor; molecular targeting mechanisms

Received: February 16, 2009 Accepted: September 3, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30460008)

*Corresponding author Tel: 86-991-8583259, E-mail: mzhxju@xju.edu.cn