

放射性核素标记溶瘤腺病毒治疗肿瘤的可行性

米彦霞, 龙亚红, 李云春

(四川大学 华西医院 核医学科, 四川 成都 610041)

摘要: 目前, 溶瘤腺病毒治疗肿瘤的研究发展非常迅速, 虽然有些溶瘤腺病毒进入临床试验阶段, 并取得一定疗效, 但其有效性和安全性仍是临床医生所担心的问题。本工作就此对溶瘤腺病毒的研究现状及如何更有效提高溶瘤腺病毒的杀伤作用进行分析, 提出了用放射性核素标记溶瘤腺病毒, 以期达到溶瘤治疗和核素治疗相结合, 双重杀伤肿瘤细胞的目的。

关键词: 放射性核素标记; 溶瘤腺病毒; 肿瘤治疗

中图分类号: R817.5 ; R511.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)01-0043-05

Feasibility of Oncolytic Adenovirus Labeled With Radionuclides for Treating Tumors

MI Yan-xia, LONG Ya-hong, LI Yun-chun

(Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The research of oncolytic adenoviruses in tumor therapy is developed rapidly. Although some adenoviruses have been used in clinical trials and bring about therapeutic effect, the killing efficiency and safety have always been worried. So, the recent developments of oncolytic adenoviruses killing tumor cells were summarized and the way for enhancing the killing efficiency of oncolytic adenoviruses were discussed. Based on this discussion and the function of radionuclides, the idea that oncolytic adenoviruses labeled with radionuclides could combine oncolytic therapy and radiotherapy was put forward.

Key words: radionuclides labeling; oncolytic adenovirus; tumor therapy

溶瘤病毒作为治疗肿瘤的一种新型手段, 其临床前研究已经取得了可喜的成就。溶瘤病毒包括腺病毒、单纯疱疹病毒、呼吸道肠道病毒、牛痘病毒、新城疫病毒等 10 种病毒, 这些病毒有些已进入了临床试验, 其中以腺病毒的临床研究最成熟。溶瘤腺病毒, 又称条件复制性腺病毒, 是

一组经过基因改造的腺病毒, 能够选择性地肿瘤细胞中复制, 从而特异性溶解、杀伤肿瘤细胞, 而对正常组织细胞无影响。

1 溶瘤腺病毒治疗肿瘤的机制

溶瘤病毒的作用机制主要体现在 4 个方面。

(1) 增殖病毒在肿瘤细胞内增殖并释出,导致肿瘤细胞溶解。(2) 病毒在肿瘤细胞内复制所产生的毒性蛋白颗粒,如自主微小病毒所产生的非结构蛋白 NS-1,能诱导感染细胞发生凋亡^[1]。(3) 产生抗肿瘤免疫反应,包括非特异免疫反应(如肿瘤坏死因子 TNF)和特异免疫反应(如 CTL 反应)。增殖病毒在肿瘤细胞内的增殖可导致肿瘤细胞表面主要组织相容复合体的增多,从而使抗原特异性细胞毒 T 细胞的杀伤能力增强^[1-2]。肿瘤细胞感染可增殖性病毒后所引起的机体免疫反应,一方面可以直接杀伤肿瘤细胞,另一方面可以增强免疫调节因子对肿瘤的杀伤作用。(4) 增强肿瘤细胞对放疗和化疗的敏感性。

溶瘤病毒疗效的评价一般采用正电子发射断层扫描(PET),PET 能很好地评估肿瘤的活性,CT 和 MRI 只能反映肿瘤的直径或大小,而肿瘤的直径大小与肿瘤的活性没有直接关系。¹⁸F-2-脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)是目前广泛应用于 PET 显像的放射性药物,¹⁸F-FDG PET 能准确反映肿瘤的生长活性等情况。另一方面,¹⁴C-5-碘代阿糖呋喃糖腺嘌呤(FIAU)可用于评价病毒的位置及活性。¹⁴C-5-碘代阿糖呋喃糖腺嘌呤进入病毒后,能被病毒中的胸苷激酶加以修饰和改变。Jacobs 等^[3]研究发现,被单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)感染的细胞中有 FIAU 的浓聚,在肿瘤坏死部分边缘也有 FIAU 的蓄积,因此 FIAU 联合¹⁸F-FDG PET 是评价溶瘤病毒疗效的很好手段。Alauddin 等^[4]合成了 2'-脱氧-2'-¹⁸F-5-氟-1-β-D-阿拉伯糖苷呋喃尿嘧啶(2'-Deoxy-2'-¹⁸F-fluoro-5-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyluracil, ¹⁸F-FFAU), 对接种 HT-29 肿瘤细胞的裸鼠进行 PET 显像,发现¹⁸F-FFAU 在 HSV-tk 阳性肿瘤中的摄取量显著高于对照组,而且其他器官没有显著摄取。

2 几种能特异性杀伤肿瘤的腺病毒

ONYX-015 是最先应用于肿瘤患者的腺病毒,由于敲除了其中的 E1B-55KD 基因段,可以有选择地在 p53 基因突变的肿瘤细胞中复制,进而杀死癌细胞,同时不影响正常细胞^[5-6]。对大部分病人来说,使用 ONYX-15 后最常见的副作用是发烧,出现流感样症状^[7]。临床试验中已证实 ONYX-015 疗效受到限制:单独应用 ONYX-015 治疗的临床有效率小于 20%^[8],与化疗联

合应用可提高疗效;由于腺病毒复制较慢,在实体瘤内病毒感染力不足;经静脉注射后不能有效感染肿瘤转移灶,因此未能在临床推广应用。

国内外的研究结果均显示,端粒酶逆转录酶(Telomerase Reverse Transcriptase)hTERT 启动子可以成功调控腺病毒选择性靶向肿瘤细胞^[9]。CNHK300 为 hTERT 启动子调控的靶向端粒酶阳性肿瘤细胞的腺病毒,该病毒的体内外研究结果已报道的几种依赖端粒酶的条件复制型腺病毒治疗肿瘤的研究结果类似^[10-12]。

CNHK500^[13]是在 CNHK300 的基础上进一步利用缺氧反应元件(Hypoxia Response Element, HRE)启动子,调控另一病毒早期复制所必需的蛋白 E1B 表达,改造后 CNHK500 可以更加特异地靶向肿瘤细胞,从而更加有效地保护正常组织^[14]。

CN706 是美国 Henderson 研究中心研制的一种腺病毒,该病毒的 Ad5E1A 基因由前列腺特异性启动子(PES)启动,因此只有在表达前列腺特异性抗原(PSA)的细胞中增殖并溶解杀死该细胞。CV787 是在 CN706 病毒基因中插入了鼠的腺血管舒缓素启动子,以启动 Ad5E1A 基因,同时插入了人前列腺特异性抗原启动子和增强子以启动 Ad5E1B 基因,并且仍然保留 E3 区^[15]。CV787 对前列腺癌的特异性杀伤力比 CN706 有明显提高,而且还可以杀伤远处转移的前列腺癌细胞。目前已完成了对 CV787 的 I、II 期临床试验,正在进行针对晚期前列腺转移癌患者的临床研究,以期对 CV787 的安全性和抗癌效力进行系统评估^[16]。

基因工程改造腺病毒(H101)是目前研究较热门的 E1B 缺陷型腺病毒 onyx-015 的类似物,该病毒不能在 p53 基因正常的正常细胞内有效复制,但可以在 p53 基因突变的肿瘤细胞中选择性复制并溶解肿瘤细胞,从而达到选择性杀灭肿瘤细胞的作用^[17]。李永强等^[18]进行了 H101 腺病毒联合化疗治疗鼻咽鳞癌的研究,其结果表明,H101 腺病毒对鼻咽鳞癌有一定疗效,其与化疗药物联合使用有协同作用,其疗效明显高于单用化疗,且毒副作用较低,联合化疗中较多见的毒性反应为短暂发热,出现流感样症状,这些症状与给药的剂量、患者的耐受程度、自身免疫力有关,一般无需处理。有关临床试验显示,H101 不但可以消除注射部位的肿瘤,而且对于

远端转移的肿瘤也有一定的疗效。目前, H101 获批的适应症主要是头颈部肿瘤。但据报道, H101 更大的潜在价值在于治疗非小细胞肺癌。由于非小细胞肺癌对化疗药物很不敏感, 所以传统疗法的效果不明显。经过临床试验, H101 对此类肺癌的治疗已经显示出相当好的苗头。

成都康弘生物科技有限公司研发的特异性溶瘤重组腺病毒注射液 KH901 已完成 II 期临床试验。KH901 作为基因改造后的腺病毒, 其 E1a 区受基因工程改造的端粒酶逆转录酶 (Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT) 启动子控制, 改造后的 hTERT 启动子具有转录因子 E2F-1 的结合位点, 在肿瘤细胞中具有活性, 但在正常细胞中的启动活性大大降低, 从而阻断了 hTERT 启动子在正常细胞中的转录活性, 这样即可特异地诱导 KH901 在肿瘤细胞中的复制, 裂解杀伤肿瘤细胞。此外, 在 KH901 的 E3 区插入 GM-CSF 的 cDNA, 可在肿瘤部位表达具有刺激免疫反应的 GM-CSF, 从而增强机体的抗肿瘤作用。因此, KH901 可以通过溶细胞效应和刺激机体免疫反应双重机制产生局部的和系统性的抗肿瘤作用, 可抑制远端肿瘤的生长。沈富兵等^[19]进行了体外细胞杀伤实验, 结果表明, KH901 和野生型 Ad5 既能杀伤肿瘤细胞, 又能杀伤正常细胞, 但 KH901 对肿瘤细胞的杀伤作用强于对正常细胞的杀伤作用, 二者之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)^[19]。KH901 具有的这种选择性复制与杀伤肿瘤细胞的特性将使它成为一种很有前景的临床肿瘤生物治疗药物, 初步试验表示, 其具有明显的抗肿瘤效果。

3 目前增强溶瘤腺病毒治疗肿瘤的措施

溶瘤腺病毒的疗效和毒性受多种因素的影响, 主要有: 肿瘤所在的位置、肿瘤本身的生长力和病毒抗感染力、给予病毒的途径、病毒在肿瘤中的扩散力、靶细胞表面病毒受体的表达量、注射病毒后, 网状上皮细胞和免疫反应对血中病毒清除力的大小。

目前, 单独用溶瘤腺病毒治疗肿瘤还存在不少缺点, 因此需要采取一些措施以增强病毒的抗癌能力。

(1) 基因-病毒治疗策略。该策略的基本思路是在溶瘤病毒上插入两个或多个肿瘤杀伤基

因, 以提高病毒对癌细胞的杀伤力, 这种带有抗癌基因并特异地杀伤肿瘤细胞的病毒称之为基因-病毒系统^[20-21], 这种技术能够更快、更彻底地杀灭肿瘤细胞。

(2) 调控病毒的肿瘤特异性启动子或增强子, 使病毒的表达限制于肿瘤细胞。90% 以上的肿瘤细胞都有端粒酶, 而端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase) hTERT 基因启动子决定着端粒酶的表达水平和酶的活性。采用 hTERT 基因启动子驱动 E1a, 靶向端粒酶阳性的肿瘤细胞, 而对端粒酶阴性的正常细胞则不起作用, 这可能是一项非常有前途的增殖病毒改造策略。肿瘤组织内部大量乏氧细胞的存在是实体肿瘤的另一个重要特征, 肿瘤缺氧的微环境是肿瘤放化疗耐受的重要原因之一。国外有学者曾用缺氧反应启动子的基因治疗策略治疗肿瘤, 其结果显示, HRE 启动子在缺氧肿瘤细胞内的活性较正常肝或脾内的活性高约 1 000 倍, 可以使外源基因主要在肿瘤内表达, 而在正常细胞内表达明显减弱^[22-23]。

(3) 修饰病毒的外壳蛋白使其与特定的肿瘤结合, 并增加病毒对肿瘤的亲合力。

4 放射性核素标记溶瘤腺病毒治疗肿瘤的可行性

用放射性核素对溶瘤腺病毒进行标记, 达到利用病毒溶瘤和放射性核素辐射效应协同作用杀伤、杀死癌细胞, 提高肿瘤治疗的效果, 有可能成为增强溶瘤腺病毒抗癌作用的另一有效的措施。但目前这方面的研究尚未见文献报道。

腺病毒是一种无包膜的双链 DNA 病毒, 基因组长约 36 000, 核心由双股 DNA 链、核蛋白 TP 和 DNA 多聚酶构成, 衣壳呈规则的 20 面体结构, 直径约 80~110 nm。衣壳含有 240 个六联体、12 个五联体及 12 根纤毛, 除此之外还有其他一些小蛋白, 如 VI、VII、IX 等。六联体是形成病毒衣壳 20 个三角形面的主要蛋白, 12 个顶端是 5 个五联体亚单位和 3 个纤毛蛋白构成的复合物, 12 根纤毛以五联体蛋白为基底由衣壳表面伸出, 纤毛顶端形成头节区。五联体和纤毛的头节区可与细胞表面的病毒受体结合, 在病毒感染细胞过程中起着非常重要的作用。由于腺病毒衣壳含有多种蛋白质分子, 可以利用放射性核素标记蛋白质的原理对腺病毒进行标记。

腺病毒感染宿主细胞的过程如下:首先,腺病毒颗粒粘附和进入宿主细胞,将基因组释放到宿主细胞核中,以及有选择性地转录和翻译早期基因。该过程将在 6~8 h 内完成。腺病毒感染细胞的过程是从腺病毒纤毛的头节区粘附到细胞表面的特异性受体开始的。接下来病毒纤毛基底部五邻体表面的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列与细胞表面的 $\alpha\beta$ 整合素结合^[24],通过内吞作用将腺病毒内化到细胞中并进入溶酶体。在溶酶体的酸性环境下,腺病毒衣壳的构象将发生变化,被从溶酶体中释放出来,躲过溶酶体的消化作用。最后,腺病毒颗粒转位到细胞核,通过核孔将病毒 DNA 释放到细胞核内。腺病毒基因组进入细胞核后,将进行一系列复杂而有序的逐级放大的剪切和转录过程。最终,在感染后数小时,病毒结构蛋白被晚期基因编码,在细胞核内聚集形成病毒衣壳,病毒的基因组被包装进去,形成有感染能力的病毒颗粒,并最终裂解宿主细胞被释放出去,完成腺病毒的生活周期。由此可以看出,标记在腺病毒上的放射性核素可随病毒进入细胞的不同结构区域。

Spear 等^[25]证实了电离辐射不改变病毒复制能力而增强病毒 hrR3 的抗瘤活性。Tang 等^[26]的研究结果则提示,采用腺病毒载体感染 γ 射线照射后的小鼠肺癌细胞,细胞内 lu 基因编码产物呈剂量依赖性扩增,肿瘤细胞生长明显受到抑制^[26]。Bradley 等^[27]证实了放疗联合删除 ICP34.5 的 R3616 治疗,可以更好地抑制肿瘤生长,从而提高患者的生存率。由此可知,腺病毒被放射性核素标记后并不会因此而改变生物学特性。

5 结 论

目前,腺病毒被极其广泛地应用于体外基因转导、体内接种疫苗和基因治疗等各个领域。但是,腺病毒作为一种有效的抗病毒剂,有效性和安全性限制了其临床应用^[28]。如何更好地将肿瘤的病毒溶瘤治疗和放射性核素治疗有机结合,利用病毒溶瘤和核素协同杀伤、杀死肿瘤细胞,将会成为肿瘤治疗学的一个新的突破点。

参考文献:

[1] DE BEEK OP, CAILLET A, FAUQUT P. The NS-1 protein of the automous parovirus minute vi-

rus of mice blocks cellular DNA replication; a consequence of lesions to the chromatin[J]. *Virology*, 1997, 71:5 323-5 329.

- [2] GOODLING LR. Replication of TNF-Mediated cell death and inflammation by human adenoviruses[J]. *Infect Agents*, 1994, 3:106.
- [3] JACOBS A, TJUVAJEV JG, DUBROVIN M, et al. Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo[J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (7): 2 983-2 995.
- [4] ALAUDDIN MM, SHAHINIAN A, PARK R, et al. Synthesis and evaluation of 2'-Deoxy-2'-¹⁸F-fluoro-5-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyluracil as a potential PET imaging agent for suicide gene expression[J]. *J Nucl Med*, 2004, 45 (12): 2 063-2 069.
- [5] BISCHOFF JR, KIM DH, WILLIAMS A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. *Science*, 1996, 274: 373-376.
- [6] MCCORMICK F. Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015[J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2: S157-S160.
- [7] NEMUNAITIS J, CUNNINGHAM C, BUCHANAN A, et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients; safety, feasibility and biological activity[J]. *Gene Therapy*, 2001, 8(10):746-759.
- [8] KIRN D. Replication-selective oncolytic adenoviruses; virotherapy aimed at genetic targets in cancer [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (56): 6 660-6 669.
- [9] SU CQ, XUE HB, WANG XH, et al. Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting to the telomerase-positive cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(10): 591-603.
- [10] IRVING J, WANG Z, POWELL S, et al. Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broadspectrum antitumor activity without liver toxicity[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(3):174-185.
- [11] HUANG TG, SAVONTAUS MJ, SHINOZAKI K, et al. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment[J]. *Gene Ther*, 2003, 10 (15): 1 241-1 247.

- [12] WIRTH T, ZENDER L, SCHULTE B, et al. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3 181-3 188.
- [13] 李月敏, 宋三泰, 江泽飞, 等. 选择性增殖腺病毒 CNHK500 治疗乳腺癌的实验研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(2):124-128.
- [14] ZHANG Q, WU MC, LI YM, et al. A novel replication-competent adenovirus CNHK500 in the treatment of hepatocellular carcinoma in vitro[J]. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2004, 3(2):70-74.
- [15] YU DC, CHEN Y, SENG M, et al. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(17):4 200.
- [16] DOEHN C, JOCHAM D. Technology evaluation: CV-787, calydon Inc[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3(2):204-210.
- [17] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000. 59-61,394-395.
- [18] 李永强, 胡晓桦, 谢伟敏, 等. 基因工程改造腺病毒联合化疗治疗鼻咽鳞癌[J]. *现代肿瘤学*, 2007, 15(8):1 084-1 085.
- [19] 沈富兵, 常建华, 杨春, 等. 特异性溶瘤重组腺病毒 KH901 的体外特异性抗肿瘤作用研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2007, 38(1):31-34.
- [20] NEMUNAITIS J, CUNNINGHAM C, BUCHANAN A, et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(10):746-759.
- [21] YU DC, CHEN Y, SENG M, et al. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(17): 4 200-4 203.
- [22] COWEN RL, WILLIAMS KJ, CHINJE EC, et al. Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy: reversing tumor radioresistance and effecting cure[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4):1 396-1 402.
- [23] BINLEY K, ASKHAM Z, MARTIN L, et al. Hypoxia-mediated tumour targeting[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(7):540-549.
- [24] WICKHAM TJ. Targeting Adenovirus[J]. *Gene Ther*, 2000, 7:110-114.
- [25] SPEAR MA, SUN F, ELING DJ, et al. Cytotoxicity, apoptosis, and viral replication in tumor cells treated with oncolytic ribonucleotide reductase-defective herpes simplex type 1 virus (hrR3) combined with ionizing radiation[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7:1 051-1 059.
- [26] TANG DC, JENNELLE RS, SHI ZH, et al. Overexpression of adenovirus-encoded transgenes from the cytomegalovirus immediate early promoter in irradiated tumor cells[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(17):2 117-2 124.
- [27] BRADLEY JD, KATAOKA Y, ADVANI S, et al. Ionizing radiation improves survival in mice bearing intracranial high-grade gliomas injected with genetically modified herpes simplex virus[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 1 517-1 522.
- [28] RUSSELL SJ, PENG KW. Viruses as anticancer drugs[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2007, 28(7):326-333.