

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.021

· 综述 ·

腺相关病毒载体与肿瘤免疫治疗的研究进展

Research progress of adeno-associated virus vector in tumor immunotherapy

朱成英¹综述;张俊萍²审阅(1. 山西医科大学第二临床学院,山西太原 030001; 2. 山西医学科学院山西大医院生物治疗科,山西太原 030013)

[摘要] 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一类单链线状DNA缺陷性病毒,属细小病毒科,是基因转移最为理想的载体之一。AAV介导肿瘤相关基因感染树突状细胞(dendritic cell, DC)诱导细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),可以内源性持续表达肿瘤相关抗原,并由MHC I类途径得到充分提呈、放大免疫激发CTL的能力,但不影响DC的成熟度。AAV介导抗肿瘤血管生成基因,有抑制肿瘤生长的作用,并且克服了单克隆抗体生产过程中提纯的困难;AAV介导免疫相关基因具有直接抑制肿瘤细胞增殖或免疫调节的作用;AAV介导抑癌相关基因可以诱导肿瘤细胞凋亡;AAV介导自杀基因可以抑制肿瘤的生长。

[关键词] 肿瘤;免疫疗法;生物疗法;腺相关病毒

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0565-04

治疗肿瘤常用方法有手术、放疗、化疗,但此三种方法不能根本上消灭肿瘤,也不能防止复发^[1],而且肿瘤相关的总死亡率呈逐年上升趋势,因此迫切需要新的方法攻克肿瘤。随着免疫学和肿瘤生物学的迅速发展,肿瘤免疫治疗因其特异性靶向癌细胞,不像传统的化疗对正常组织有杀伤作用^[2],在癌症治疗中发挥了重要的作用,其中应用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为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免疫疗法。AAV具有的独特优势,AAV可以克服非病毒作为载体的低转染率和病毒作为载体可能会使病毒基因插进宿主基因的缺点,其在动物实验研究中显示出很好的效果,这使得AAV成为肿瘤基因治疗最有前景的载体之一。

1 AAV作为载体的基本特点及应用

1.1 AAV的生物学特征

AAV是一类单链线状DNA缺陷性病毒,属细小病毒科,是目前世界上最简单、最小的动物病毒,基因组全长约4700 bp,包含了3个启动子和2个基因(*rep*、*cap*),分别编码病毒复制和装配所必须的蛋白,基因组两端为反向末端重复序列。AAV不能独立存在,只有在辅助病毒存在的条件下才能感染宿主细胞,感染后AAV可以特异地整合到人19号染色体,在宿主细胞中复制、合成、包装蛋白,产生新的病毒粒子。人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的*E1*基因可促进AAV的复制,而宿主

细胞中复制蛋白A、复制因子C、增殖细胞核抗原,以及DNA聚合酶 δ 在AAV复制中均起到重要作用^[4]。

AAV有6个血清型,在人类中AAV-2、AAV-3最常见。AAV可以从咽拭子、粪便标本中分离出来。AAV几乎没有致病性,但有研究^[5]认为,鼠和人类的早期流产可能与AAV感染有关。近年来,在基因治疗领域中AAV被广泛用作载体。

1.2 AAV作为载体的基本特点

AAV成为基因转移最为理想的载体之一^[6]。AAV具备以下特点:第一,AAV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;第二,AAV引起的免疫反应轻微,病原性低;第三,AAV携带的外源基因可长期、稳定的表达;第四,AAV可定点整合,AAV是一种以位点特异性方式整合在人19号染色体上的真核细胞病毒,可避免随机整合导致的宿主细胞突变;第五,AAV宿主范围广。

在各种血清型AAV中,AAV-2是最好的病毒载体,在所有的实体瘤细胞和原发性黑色素瘤细胞中,其

[基金项目] 山西省青年科技研究基金项目资助(No. 2010021035-6)。Project supported by the Science and Technology Foundation for Youth Scholar in Shanxi Province (No. 2010021035-6)

[作者简介] 朱成英(1984-),女,天津市人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: zhuchengying8@163.com

[通信作者] 张俊萍(ZHANG Jun-ping, corresponding author), E-mail: junpingzhang-118@163.com

感染率可达 98% 左右。AAV-1 在子宫颈癌、前列腺癌, AAV-3 在宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌中的感染率都可达 70% 以上, 并且在结肠癌细胞株 HT-29 中使用蛋白酶体抑制剂可提高 AAV-1 ~ AAV-4 的感染率^[7]。另外, 在重组 AAV(recombinant adeno-associated virus, rAAV) 制备过程中, 可用 HPV E1 促进 AAV DNA 的复制, 增加 rAAV 的产量^[8]。

1.3 AAV 作为载体的应用

目前 AAV 作为载体介导基因转移, 已成功地应用在肌肉、眼、脑、肝、肺组织中持续有效地表达外源基因, 并且在治疗恶性肿瘤、B 型血友病、囊性纤维化、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症、卡纳万病等疾病中取得了很好的成效^[9]。AAV 介导 *Her2/neu* 基因感染树突状细胞(dendritic cell, DC) 可显著提高 DC 激活细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的能力^[10]。Dandapat 等^[11] 在缺血再灌注损伤实验中发现, 利用 AAV 介导 *TGF-1* 基因感染心肌细胞, 可以使心肌细胞过度表达 TGF-1, 后者通过抗氧化的机制保护心肌细胞免受缺血再灌注的损害。Liu 等^[12] 研究证明, 在 HepG2 细胞内, AAV 介导 *Rep78* 基因通过调节乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) 核心启动子, 抑制 HBV 病毒的复制和 HBsAg、HBeAg 的分泌。

2 AAV 载体与肿瘤治疗

自 Hermonat 等首次采用 AAV 介导新霉素(*neo*) 抗性基因进入真核细胞以来, 在过去的近 30 年里, rAAV 载体成为目前肿瘤基因治疗最有前景的载体之一, 在肿瘤治疗领域中的应用得到了快速的发展。

2.1 AAV 介导肿瘤相关基因感染 DC 诱导 CTL

DC 是目前发现的功能最强的专职性抗原提呈细胞, 能摄取、加工抗原为抗原多肽, 提呈给 T 细胞; DC 高表达 CD80、CD86 等共刺激分子, 使 T 细胞充分活化、增殖为 CTL, 启动细胞免疫应答, 特异性杀伤肿瘤细胞, 在机体抗肿瘤免疫中处于中心地位^[13]。但肿瘤患者体内 DC 的抗原提呈功能低下, 不能高效激发肿瘤特异性 CTL, 且肿瘤抗原免疫原性低, 使机体的免疫反应处于抑制状态, 肿瘤得以发生、发展。采用 AAV 作为载体介导肿瘤抗原感染 DC 可激活特异性 CTL, 由于肿瘤抗原基因感染 DC 后, 内源性持续表达肿瘤抗原, 并由 MHC I 类途径充分提呈肿瘤抗原, 放大免疫激发 CTL 的能力, 并且不影响 DC 的成熟^[14]。

Liu 等^[15] 分别用 AAV 载体介导 HPV16 型 *E6* 基

因感染 DC 激活 CTL, 以及用细菌分泌的 *E6* 基因蛋白产物致敏 DC 激活 CTL, 发现这种方法能有效快速地激活 CTL, 指出用 AAV 携带基因感染 DC 比传统的利用蛋白产物致敏 DC 能更有效地激活 CTL。Chiriva-Internati 等^[16] 用同样的方法介导 HPV *E7* 基因感染 DC 也证明了此理论。Mahadevan 等^[17] 在 AAV 携带前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA) 基因感染 DC、诱导 CTL 细胞的实验中, 一方面证实感染 DC 高表达 PSA、CD80、CD83、CD86、IL-12, 低表达 IL-4, 另一方面证实用抗原基因感染 DC 比用抗原蛋白致敏的 DC 能更有效地诱导 CTL 生成。

尤长宣等^[18] 以 AAV 为载体介导乳腺癌抗原 *BA46* 基因感染 DC, 诱导特异性细胞免疫, 发现诱导的 CTL 高表达 CD8、CD69 和 IFN- γ , 对 BA46 阳性的靶细胞有较强的杀伤作用, 并且该杀伤具有 BA46 抗原特异性和 MHC 限制性。Xie 等^[19] 用同样的方法携带肿瘤特异抗原基因 *CML28*, 证实了诱导出的 CTL 具有 MHC I 限制性, 只杀伤 CML28 阳性肿瘤细胞, 并且 DC 的成熟没有受到病毒感染的影响, 相反还提高了 CD80 的表达。

2.2 AAV 介导抗肿瘤血管生成基因

至今, AAV 载体已被用于携带不同抗血管生成基因, 进行动物肿瘤模型的治疗, 显示其具有非常好的应用前景。Li 等^[20] 将携带内皮抑素(endostatin) 基因的 AAV 经尾静脉注射入鼻咽癌荷瘤裸鼠, 发现内皮抑素基因产物在裸鼠体内持续地表达, 可明显抑制肿瘤生长和转移。Lin 等^[21] 以 rAAV 做载体介导可溶性血管内皮生长因子 3 受体(soluble vascular endothelial growth factor receptor, sVEGFR3) Fc 段的感染, 发现此方法可以减少肿瘤相关的淋巴管生成, 防止肿瘤转移至淋巴结。Watanabe 等^[22] 用 AAV 介导抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体基因感染到肺肿瘤荷瘤的免疫缺陷的小鼠, 发现抗 VEGF 抗体基因在肿瘤局部持续的表达, 并且可抑制肿瘤的转移。Ho 等^[23] 利用 AAV 介导 anti-EGFR 抗体基因感染肿瘤细胞, 发现该抗体基因可持续表达, 并且有效抑制肿瘤的生长, 克服了单克隆抗体生产过程中提纯的瓶颈。

2.3 AAV 介导免疫相关基因治疗肿瘤

干扰素(interferon, IFN) 是最早用于肿瘤基因治疗的免疫因子, 其抗肿瘤效应可通过直接抑制肿瘤细胞增殖或免疫调节作用。Watanabe 等^[24] 用 AAV 介导乳糜丝氨酸蛋白酶抑制物(*Maspin*) 感染前列腺癌荷瘤小鼠, *Maspin* 基因产物持续表达, 导致肿瘤细胞凋亡, 抑制血管生长。Shih 等^[25] 在视网膜母细胞瘤

前期临床研究中,用 AAV 介导 *IFN- γ* 基因表达,在移植视网膜母细胞瘤的小鼠模型中,肿瘤周围持续分泌 *IFN- γ* 基因产物,并且有很强的抗肿瘤效应,此方法克服了传统的治疗肿瘤使用 *IFN- γ* 时对全身造成的毒性作用的缺点。同样 Meijer 等^[27]用 AAV 介导 *hIFN- γ* 基因表达,在多样性胶质母细胞瘤 U87 荷瘤的小鼠内发现,此方法能显著地提高小鼠的生存时间。在此基础上 Zhang 等^[27]用 AAV 介导 *IFN- γ* 基因感染 T 细胞后,发现 $CD69^+ CD8^+$ T 细胞比例增加, $CD8^+/CD4^+$ 、*IFN- γ* /*IL-4*⁺ T 细胞比值增加, $CD4^+/CD25^+$ T 细胞比值减少。

2.4 AAV 介导抑癌相关基因治疗肿瘤

Streck 等^[28]用 AAV 介导色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, *PEDF*) 基因表达,成功诱导了神经细胞瘤凋亡,明显降低了微血管密度及血管内皮生长因子的表达。Xue 等^[29]在体外发现,通过 AAV 介导生存素突变体 (survivin mutant, *Thr34Ala*) 基因感染可以抑制细胞的增殖,诱导细胞凋亡和有丝分裂突变,增加化疗药物 (奥沙利铂) 的敏感性;在体内诱导细胞凋亡,减少血管生成,抑制直肠癌细胞生长。Nie 等^[30]用 AAV 介导肝细胞生长因子环状结构 1 (hepatocyte growth factor ring structure1, *HGFkl*) 基因表达,用腺病毒介导 *P53* 基因表达,两者单独或联合注射到直肠癌荷瘤的裸鼠和 BALB/c 鼠中,发现单独注射可以诱导肿瘤细胞的坏死和凋亡,抑制肿瘤血管的生成,并且联合注射比单独作用有更明显的作用。周琦等^[31]通过构建 *NT4p53(C22)Ant* 基因,将其亚克隆于 AAV 载体中,查包装、扩增构建具有感染性的 rAAV-*NT4p53(C22)Ant*,注射到 H22 肝癌荷瘤小鼠内,发现 rAAV-*NT4p53(C22)Ant* 可以有效地杀伤小鼠体内的 H22 肝癌细胞,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长,延长荷瘤小鼠生存期。

2.5 AAV 介导自杀基因治疗肿瘤

姚二梅等^[32]用 rAAV 介导单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (herpes simplex virus thymidine kinase, *HSV-TK*) 感染肺癌细胞,发现 *HSV-TK* 可将无毒性的前药环鸟苷 (ganciclovir, *GCV*) 在肿瘤细胞中代谢成有抗肿瘤作用的有效产物,此产物抑制肿瘤细胞 DNA 合成,引起肿瘤细胞的凋亡。同样,潘建刚等^[33]通过用 AAV 分别携带自杀基因 (thymidine kinase, *TK*)、内皮抑素基因和自伤基因与内皮抑素基因的双重基因去感染膀胱肿瘤细胞 T24,观察到 AAV 携带双基因比分别携带单基因更能促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管的生成,并指出通过 AAV

携带双基因治疗膀胱癌是可行的。

2.6 AAV 介导其他基因治疗肿瘤

Shah 等^[34]在前列腺肿瘤荷瘤的裸鼠内和前列腺碱性蛋白基因的转基因小鼠内,以 AAV 为载体介导抗降钙素的核糖酶类基因表达,发现前者的肿瘤不再生长,后者自发产生的肿瘤也明显受到了抑制。同样在前列腺癌的研究中, Sun 等^[35]在前列腺癌的临床前研究中,瘤内注射 AAV 介导沉默雄激素受体 (androgen receptor, *AR*) siRNA 的表达,发现 *AR* 基因被沉默,肿瘤细胞迅速凋亡。

3 结 语

AAV 介导肿瘤基因表达为肿瘤的治疗提供了新的方法,但该种治疗方式尚在探索中,如何为更多种类的肿瘤找到最适合的靶基因是亟待解决的大问题,对于这个问题尚需要更多的前瞻性随机对照研究,包括动物实验及临床研究等,使 AAV 介导肿瘤基因治疗肿瘤取得更多的循证医学依据。

[参 考 文 献]

- [1] Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors [J]. *Semin Immunol*, 2010, 22(3): 173-182.
- [2] Le DT, Pardoll DM, Jaffee EM. Cellular vaccine approaches [J]. *Cancer*, 2010, 16(4): 304-310.
- [3] Bandyopadhyay S, Raney KD, Liu Y, et al. AAV-2 Rep78 and HPV-16 E1 interact *in vitro*, modulating their ATPase activity [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(2): 845-856.
- [4] Kang BY, You H, Bandyopadhyay S, et al. Cervical cancer isolate PT3, super-permissive for adeno-associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 79-90.
- [5] Tobiasch E, Rabreau M, Geletnek K, et al. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in Mterial from spontaneous abortion [J]. *J Med Virol*, 1994, 44(2): 215-222.
- [6] Liu Y, Chiriva-Internati M, You C, et al. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 304-312.
- [7] Hacker UT, Wingenfeld L, Kofler DM, et al. Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(11): 1429-1438.
- [8] You H, Liu Y, Prasad CK, et al. Multiple human papillomavirus genes affect the adeno-associated virus life cycle [J]. *Virology*, 2006, 344(2): 532-540.
- [9] Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 99: 119-145.

- [10] 徐蕾, 罗荣城, 尤长宣, 等. Her2/neu 基因重组腺相关病毒转染人外周血来源树突状细胞的免疫功能 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(9): 1181-1184.
- [11] Dandapat A, Hu CP, Li D, et al. Overexpression of TGFbeta1 by adeno-associated virus type-2 vector protects myocardium from ischemia-reperfusion injury [J]. Gene Ther, 2008, 15(6): 415-423.
- [12] Liu T, Cong M, Wang P, et al. Adeno-associated virus Rep78 protein inhibits hepatitis B virus replication through regulation of the HBV core promoter [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(1): 106-111.
- [13] Gunzer M, Janich S, Varga G. Dendritic cells and tumor immunity [J]. Semin Immunol, 2001, 13(5): 291-302.
- [14] 丛敏, 王萍, 阎钟钰, 等. 含乙型肝炎病毒 C 基因的重组腺相关病毒对树突状细胞的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(1): 17-19.
- [15] Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, et al. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(12): 948-957.
- [16] Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, et al. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papilloma virus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(1): 30-38.
- [17] Mahadevan M, Liu Y, You C, et al. Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(10): 1615-1624.
- [18] 尤长宣, 苏瑾, 廖旺军, 等. rAAV/BA46 转染树突状细胞诱导特异细胞免疫 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(12): 2146-2149.
- [19] Xie LH, Sin FW, Cheng SC, et al. Activation of cytotoxic T lymphocytes against CML28-bearing tumors by dendritic cells transduced with a recombinant adeno-associated virus encoding the CML28 gene [J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57(7): 1029-1038.
- [20] 李晓华, 彭英, 李湘平, 等. 腺相关病毒介导的内皮抑素对鼻咽癌移植瘤生长和转移的抑制作用 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(12): 881-886.
- [21] Lin J, Lalani AS, Harding TC, et al. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor [J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6901-6909.
- [22] Watanabe M, Boyer JL, Crystal RG, et al. AAVrh.10-mediated genetic delivery of bevacizumab to the pleura to provide local anti-VEGF to suppress growth of metastatic lung tumors [J]. Gene Ther, 2010, 17(8): 1042-1051.
- [23] Ho DT, Wykoff-Clary S, Gross CS, et al. Growth inhibition of an established A431 xenograft tumor by a full-length anti-EGFR antibody following gene delivery by AAV [J]. Cancer Gene Ther, 2009, 16(2): 184-194.
- [24] Watanabe M, Nasu Y, Kashiwakura Y, et al. Adeno-associated virus2-mediated intratumoral prostate cancer gene therapy: Long-term Maspin expression efficiently suppresses tumor growth [J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(6): 699-710.
- [25] Shih CS, Laurie N, Holzmacher J, et al. AAV-mediated local delivery of interferon-beta for the treatment of retinoblastoma in pre-clinical models [J]. Neuromolecular Med, 2009, 11(1): 43-52.
- [26] Meijer DH, Maguire CA, LeRoy SG, et al. Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN-beta [J]. Cancer Gene Ther, 2009, 16(8): 664-671.
- [27] Zhang D, Liu Y, Shi M, et al. Autocrine, not paracrine, interferon-gamma gene delivery enhances *ex vivo* antigen-specific cytotoxic T lymphocyte stimulation and killing [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 270985-270996.
- [28] Streck CJ, Zhang Y, Zhou J, et al. Vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived Adeno-associated virus factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(1): 236-243.
- [29] Xue Z, Sun PH, Zhu LM, et al. Adeno-associated virus-mediated survivin mutant Thr34Ala cooperates with oxaliplatin to inhibit tumor growth and angiogenesis in colon cancer [J]. Oncol Rep, 2011, 25(4): 1039-1046.
- [30] Nie B, Shen Z, Wen JB, et al. AAV-HGFK1 and Ad-p53 cocktail therapy prolongs survival of mice with colon cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(9): 2854-2865.
- [31] 周琦, 纪宗正. 重组腺相关病毒-NT4p53(C22)Ant 对肝癌荷瘤小鼠的治疗作用 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(9): 1355-1357.
- [32] 姚二梅, 冯泽华. 腺病毒伴随病毒载体介导的 I 型单纯疱疹病毒胸苷 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998, 12(3): 207-212.
- [33] 潘建刚, 周兴, 韩瑞发. 联合自杀基因及内皮抑素基因双靶点治疗膀胱癌的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(38): 2700-2704.
- [34] Shah GV, Thomas S, Muralidharan A, et al. Calcitonin promotes *in vivo* metastasis of prostate cancer cells by altering cell signaling, adhesion, and inflammatory pathways [J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(4): 953-964.
- [35] Sun A, Tang J, Terranova PF, et al. Adeno-associated virus-delivered short hairpin-structured RNA for androgen receptor gene silencing induces tumor eradication of prostate cancer xenografts in nude mice: A preclinical study [J]. Int J Cancer, 2010, 126(3): 764-774.

[收稿日期] 2012-04-12 [修回日期] 2012-06-18

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳