

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0058-03

腺相关病毒及其在肿瘤基因治疗中的研究进展

余晓菲 综述, 李妍涵, 韩忠朝 审阅(中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] 重组腺相关病毒是一种用于基因治疗的安全而有效的病毒载体,近年来在其基础及应用方面的研究均取得了较大的进展,已成为肿瘤治疗领域中很有希望的方法,目前已用于抗肿瘤免疫基因治疗、抗肿瘤血管新生治疗、分子化疗等方面。腺相关病毒自身具有抗肿瘤活性,重组 AAV 作为基因治疗载体联合放疗、化疗可起到协同的抑制肿瘤作用相比,重组腺病毒载体在肿瘤基因治疗中有着很大的优势。

[关键词] 腺相关病毒; 肿瘤; 基因治疗

[中图分类号] R730.59; Q782 **[文献标志码]** A

* 对于身患绝症的病人来说,基因治疗无疑是被寄予厚望的治疗手段之一。如今,已有 20 多种人类疾病的基因治疗正处于临床前期实验阶段,而以动物模型来进行基因治疗研究的也有近百种疾病。然而,最近法国一名接受逆转录病毒载体基因治疗的 X-连锁重症联合免疫缺陷症(X-linked severe combined immune deficiency, X-SCID)男童出现了白血病的症状,专家们考虑可能是由于携带 ADA 酶基因的逆转录病毒载体在染色体上随机整合,启动了癌基因的异常表达所引起。2003 年 1 月 14 日,美国食品和药物管理局(FDA)宣布暂停 27 项类似的基因治疗实验,这项决定给方兴未艾的基因治疗一个沉重的打击。由于动物模型的基因治疗试验有一定的局限性,难以预测其潜在危险。基因治疗的前景忽明忽暗,使人们对于其实施不得不慎重考虑,载体的安全性是基因治疗发展的主要障碍。

将外源基因引入宿主细胞的方式可分为病毒载体和非病毒载体所介导的基因转移。前者因其转染效率高、靶向性好,在肿瘤等多种疾病的基因治疗中被广泛应用。目前常用的病毒载体包括逆转录病毒(retrovirus)、腺病毒(adenovirus, Ad)、腺相关病毒(adeno-associated-virus, AAV)、单纯疱疹病毒(herpes simple virus, HSV)、痘苗病毒(vaccinia virus, VV)等。这些病毒载体各有优势和缺陷,如逆转录病毒虽然基因转移效率高,但只转染分裂期细胞,转基因在染色体组中的随机整合有引起癌基因激活或功能基因插入失活的潜在危险。腺病毒虽然不会整合到细胞染色体上,但其免疫原性强,易受宿主免疫系统中和而灭活,且外源基因的表达时间较短。于其它几种病毒载体相比,AAV 载体具有安全性好、免疫原性低、物理性质稳定、感染细胞谱广,可介导外源基因长期稳定表达等优点,被视为最有前途的基因治疗载体之一。目前已有部分治疗方案进入临床前期实验阶段,用于囊性纤维化、血友病、杜氏肌营养不良、类风湿性关节炎、Canavan 病、高血压、肿瘤等疾病的治疗。本文将着重叙述重组腺相关病毒载体及其在肿瘤基因治疗中所取得的研究进

展。

1 腺相关病毒的结构及特点

AAV 为单链 DNA 微小病毒,它的复制需要辅助病毒(Ad 或 HSV)的参与。野生型腺相关病毒(wt-AAV)是一种复制缺陷型病毒,其基因组在人染色体 19q13.4-ter 处有单一整合位点,受感染的人群并未发现引起任何疾病。与腺病毒相比,AAV 对宿主固有免疫系统的影响小,不会引起严重的急性炎症反应。重组腺相关病毒(rAAV)去掉了 wt-AAV 自身的基因,具有较高安全性,宿主范围广(包括分裂细胞和非分裂细胞)。经门静脉注射或肌肉注射 rAAV 载体后,目的基因可在体内长期表达 6 个月之久,经肌肉注射后外源基因可在体内表达 1 年半之久^[1]。在灵长类动物中,已发现有 5 种不同的血清型,即 AAV1 至 AAV5。其中 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5 主要感染人类,而 AAV4 则感染猴类。最近从受污染的储存腺病毒中分离出来的另一种血清型 AAV6,被认为是 AAV1 的变异株,可能由 AAV1 与 AAV2 之间发生基因重组而产生,因其与抗 AAV2, AAV3 中和性抗体无免疫交叉反应,并具有独特的宿主细胞范围,成为另一种很有发展前途的腺相关病毒载体^[2],适用于需多次重复使用的慢性疾病。

目前广泛应用于基因治疗研究的 AAV2 基因组长 4 680 bp,包含 2 个阅读框架(rep, cap)。其基因组编码 4 个调节蛋白 Rep 及 3 个衣壳蛋白 Cap(VP1-3),调节蛋白 Rep78, Rep68 参与反式调节 DNA 的转录、复制及在人染色体上的定点整合,Rep52, Rep40 则与 ssDNA、病毒颗粒的组装有关。去除 rep 基因的 rAAV 丧失在宿主染色体上特异性位点的整合作用,但 AAV 为单链 DNA,即使引起功能基因的插入失活,杂合子状态的基因表达对表型也无明显影响。AAV 进入宿主细胞后,其衣壳蛋白迅速降解,不易引起免疫反应。DNA 两

[基金项目] 攀登计划造血干细胞工程的基础研究基金资助

端为 145 bp 的末端倒置重复序列 (ITRs), 可形成 T 形发夹样结构, 含有复制起点及 Rep 蛋白的结合位点 (RBS), 可顺式调节病毒染色体的复制、包装、整合、释放及 AAV 自身基因的表达。广泛表达于各种类型细胞表面的硫酸肝素糖蛋白 (heparin sulfate proteoglycan, HSPG) 是 AAV 的受体之一, 使其对多种类型的组织细胞均具有感染性。此外, 成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 作为其辅助受体, 介导 AAV2 的内化。这两种辅助受体在各种类型细胞表面的密度、数量不同, 又使 AAV 对各种不同细胞的感染效率不一。AAV 与受体/辅助受体相接触后, 经网络蛋白介导的内吞作用进入宿主细胞内。无辅助病毒时, AAV 基因组整合入染色体组中, 保持潜伏而稳定的前病毒状态。一旦同时感染辅助病毒, 即可产生完整的病毒颗粒。

2 rAAV 载体在肿瘤治疗中的研究

肿瘤是受遗传因素和环境因素共同决定的多因素疾病, 肿瘤基因治疗的策略包括: 增强抗肿瘤免疫、抗肿瘤血管新生, 引入细胞因子基因、自杀基因、抑癌基因、反义癌基因、肿瘤药物相关基因等。目前大部分实验均以逆转录病毒或腺病毒作为抗肿瘤基因治疗的载体。越来越多的证据表明, 重组腺相关病毒载体在肿瘤的基因治疗中有着不可替代的优势, 载体携带的外源基因 (如抗血管新生基因) 可以长期稳定的表达, 与促肿瘤生长因素持久抗衡, AAV2 可提高肿瘤细胞对化疗的敏感性, 而放疗可促使 AAV 从潜伏感染进入复制状态, 提高抗肿瘤基因的表达, 为基因治疗联合放、化疗创造了条件。

肿瘤基因治疗的给药途径中, 最常见的是肿瘤内直接注射或超声、CT 导向下定位注射, 但使用时很难达到瘤内均匀分布。研究人员在裸鼠实体瘤模型上比较了携带报告基因 GFP 的腺病毒与 AAV 载体对整个瘤块的转染效率, 发现前者 GFP⁺ 细胞局限于注射局部, 转染 AAV 载体者则在整个瘤块中遍布 GFP⁺ 细胞。此实验证明 rAAV 载体更适合于作为肿瘤基因治疗的传递载体^[3]。

2.1 AAV 的自身抗肿瘤活性

微小病毒在多种恶性肿瘤疾病中可以起到抗肿瘤的作用。流行病学研究发现 AAV2 的感染率与 HPV 引起的宫颈癌的发病率呈负相关, AAV2 通过抑制 HPV-16 的 p97 启动子活性而抑制 HPV 的增殖。不仅如此, AAV 还可以抑制牛乳头瘤病毒 1、EBV 等 DNA 病毒对感染细胞的恶性转化作用。Batchu 等^[4]发现 Rep78 蛋白下调细胞周期调节蛋白 E2F-1 的转录以及原癌基因 c-fos, c-myc 的表达, 并通过与 pRB-E2F-1 相互作用而抑制 DNA 肿瘤病毒 SV40 对细胞的恶性转化作用。Rep68 蛋白通过提高 CDKI-p21 的活性并下调细胞周期素 E、A、B1 相关激酶的活性而使细胞周期停滞于 G₁/G₂ 期。这些研究均表明, Rep 蛋白在分子和细胞水平上通过多种不同的机制来抑制肿瘤的生长, 使得 Rep 蛋白有可能成为用于肿瘤治疗的一个候选分子。

2.2 AAV 介导的基因治疗协同放化疗

由于肿瘤的发生机制复杂并具有高度异质性, 传统的放化疗仅能起到治标的作用。研究发现以 AAV 作为基因治疗载体联合放疗或化疗均可起到协同的抑制肿瘤效果。体内外实验证明, AAV2 可通过多种机制增强化疗药物如顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶所诱导的上皮或神经系统来源的肿瘤细胞凋亡^[5-8]。Duverger 等^[5]以 AAV2 转染肿瘤细胞 HeLa, A549 后孵育顺铂 72 h, 行凋亡定量检测发现肿瘤凋亡明显增加。这种凋亡增强效应与肿瘤细胞表面死亡受体的改变无关, 可能是通过降低线粒体跨膜电位引起线粒体膜通透性转换 (permeability transition), 激活 Caspase-9 来发挥作用。同时也发现转染 AAV2 的鳞癌 P693 的细胞周期停止于 G₂/M 期, 对顺铂的作用更为敏感。Schwarzbach 等^[8]利用 AAV2 在体外感染 13 种间叶组织来源的人类肉瘤细胞系, 发现 AAV2 的感染对于横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤也有化疗增敏作用。

转基因在单链 DNA 的 rAAV 载体宿主细胞内的表达效率很大程度上受到其基因组第二链合成的限制, 近期报道 γ -射线的照射可提高 rAAV 载体转基因的表达^[9-12]。 γ -射线激活宿主细胞的 DNA 损伤修复系统, 促进 rAAV 基因组第二链合成并可增强宿主细胞对病毒的内吞作用^[13]。Kanazawa 等^[10]给裸鼠侧腹部移植瘤模型照射 4 Gy 后, 立即在肿瘤内注射携有 HSV-TK 基因的 rAAV 病毒颗粒, 给予 GCV (更昔洛韦) 后发现联合治疗组小鼠的肿瘤比单独基因治疗组缩小近 5 倍。对于头颈部肿瘤患者来说, 这种 rAAV 基因治疗协同放疗的联合治疗方案将会有很大临床应用前景。

2.3 用于基因治疗的 rAAV 改构体

临床研究表明, 多数抗肿瘤基因治疗效果不佳, 主要是因为转染率低、目的基因表达差, 难以发挥其抗癌活性。针对目的基因表达量低、肿瘤组织特异性差, 研究人员将 rAAV 载体与生物特异性靶向结合分子相连接或在载体中插入组织特异性、肿瘤选择性、细胞周期选择性等多种启动子, 据此已设计出多种重组腺相关病毒载体来提高其对肿瘤组织的靶向性。理想的病毒载体应特异性地靶向肿瘤细胞、对正常组织无感染性, 而减少潜在的副作用。但 AAV 的受体 HSPG 及共同受体 FGFR1、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 广泛表达于多种组织和细胞, 使其作用缺乏细胞特异性, 也有部分细胞不表达 AAV 受体而抵抗 AAV 的感染。Shi 等^[14]对 AAV-2 的衣壳蛋白进行了改造, 经插入突变使 AAV-2 可特异性结合并转染表达有促黄体生成素受体 (luteinizing hormone receptor, LH-R) 的卵巢癌细胞系 OVCAR-3, 给予黄体酮诱导 LH-R 表达增加可提高基因转染效率。Grifman 等^[15]在 AAV-2 衣壳蛋白中插入肿瘤靶向性序列 NGRAHA, 此序列上的 NGR 小肽可与表达于某些肿瘤细胞或新生血管上的 CD13 特异性结合, 适用于抗肿瘤血管新生的基因治疗。除了改造 AAV 的衣壳蛋白而改变其亲嗜性外, Su 等^[16]构建的 rAAV 载体含有清蛋白启动子和甲胎蛋白 (AFP) 增强子, 体内外实验证明只有在清蛋白和 AFP 异常高表达的肝癌细胞中, 载体所携带的靶基因

HSV-TK 才可转录。

由于血供不足,实体瘤内部分肿瘤细胞处于缺氧状态,这些肿瘤细胞由于调节细胞周期及凋亡的 p53 基因突变,在缺氧条件下仍可存活,对放疗化疗均不敏感并具有高度异质性易于浸润和转移。Ruan 等^[17]在 AAV 载体中插入 9 个拷贝的人 Epo 的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)及促凋亡基因 Bax。该载体转染肿瘤细胞后,在缺氧条件诱导下 BAX 的表达增加 10~39 倍,可诱导肿瘤细胞的凋亡。

3 小 结

近年来,随着人们对肿瘤病生学、免疫学、肿瘤分子机制的深入研究,肿瘤基因治疗获得了突飞猛进的发展,成为目前攻克癌症最有希望的领域。腺相关病毒载体在肿瘤基因治疗中逐渐显示出其强大的优势,已用于抗肿瘤免疫基因治疗、抗肿瘤血管新生治疗、分子化疗等方面。但它本身也存在一些缺陷,例如重组腺相关病毒基因组第二链的合成易受多种因素的干扰,目的基因的长度有限;有些类型的细胞虽然可有效转染 rAAV 但存在入核障碍,也影响了目的基因的高效持久表达^[18]。难以大规模生产曾一度是阻碍 rAAV 发展的重要原因,据此,我国的科研人员已经开发出了一种通用的高效 rAAV 生产系统,实现了 rAAV 的规模化制备,为 rAAV 用于基因治疗的临床试验打下了基础^[19]。研究人员们也在着力于构建重组的 AAV1, AAV5 载体,由于它们的衣壳蛋白采用不同的受体,可以用于 rAAV2 载体难以转染的脑部肿瘤的基因治疗或者用于已产生抗 AAV2 抗体的患者。虽然基因治疗的发展前途困难重重,随着基因重组技术及医疗技术的发展,通过对腺相关病毒载体的不断改造,相信不久的将来腺相关病毒载体所介导的基因治疗将会进入临床,给予肿瘤患者最后一线生机。

[参 考 文 献]

[1] Davidoff AM, Nathwani AC, Spurbeck WW, *et al.* rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice[J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (11): 3077-83.

[2] Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, *et al.* Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated viral vectors with different serotypes[J]. *J Virol*, 2000, 74(3): 1524-1532.

[3] Enger PO, Thorsen F, Lonning PE, *et al.* Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue *in vivo* more effectively than adenoviral vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(9): 1115-1125.

[4] Batchu RB, Shammam MA, Wang JY, *et al.* Dual level inhibition of E2F-1 activity by adeno-associated virus Rep78[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 24315-24322.

[5] Duverger V, Sartorius U, Klein-Bauernschmitt P, *et al.* Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 706-12.

[6] Hillgenberg M, Schlehof JR, von Knebel Doeberitz M, *et al.*

Enhanced sensitivity of small cell lung cancer lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2[J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35: 106-110.

- [7] Eisold S, Dihlmann S, Linnebacher M, *et al.* Prevention of chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(5): 606-614.
- [8] Schwarzbach MH, Eisold S, Burguete T, *et al.* Sensitization of sarcoma cells to doxorubicin treatment by concomitant wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV-2) infection[J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(6): 1211-1218.
- [9] Shi W, Teschendorf C, Muzyczka N, *et al.* Gene therapy delivery of endostatin enhances the treatment efficacy of radiation[J]. *Radiother Oncol*, 2003, 66(1): 1-9.
- [10] Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, *et al.* Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(1): 51-58.
- [11] Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, *et al.* Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(2): 99-106.
- [12] Peng D, Qian C, Sun Y, *et al.* Transduction of hepatocellular carcinoma (HCC) using recombinant adeno-associated virus (rAAV): *in vitro* and *in vivo* effects of genotoxic agents[J]. *J Hepatol*, 2000, 32(6): 975-985.
- [13] Duan D, Yue Y, Yan Z, *et al.* Polarity influences the efficiency of recombinant adeno-associated virus infection in differentiated airway epithelia[J]. *Human Gene Ther*, 1998, 9: 2761-2776.
- [14] Shi W, Arnold GS, Bartlett JS. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(14): 1697-1711.
- [15] Grifman M, Trepel M, Speece P, *et al.* Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(6): 964-975.
- [16] Su H, Chang JC, Xu SM, *et al.* Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene[J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(4): 463-470.
- [17] Ruan H, Su H, Hu L, *et al.* A hypoxia-regulated adeno-associated virus vector for cancer-specific gene therapy[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(3): 255-263.
- [18] Hansen J, Qing K, Kwon HJ, *et al.* Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts[J]. *J Virol*, 2000, 74(2): 992-996.
- [19] Wu XB, Dong XY, Wu ZJ, *et al.* A novel method for purification of recombinant adeno-associated virus vectors on a large scale[J]. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(6): 485-489.