

[文章编号] 1007-385X(2006)06-

人35型及11型腺病毒的研究进展

Research progress in human adenovirus type 35 and 11

陈东锋 综述; 石文芳, 钱其军 审阅(浙江理工大学生命科学院新元医学生物技术研究所, 浙江 310018)

[摘要] 人35型(Ad35)和11型(Ad11)腺病毒同属于B₂亚群,病毒受体均为CD46分子,Ad35和Ad11的中和抗体在不同地区不同人种的阳性率都较低,且对肿瘤细胞、造血干细胞、树突状细胞等一些传统的5型和2型腺病毒嗜性较低的细胞有较高的感染效率,而且转移基因的表达水平较高,提示Ad11和Ad35是一类具有良好开发潜力的肿瘤基因治疗载体。目前,开发利用Ad35或Ad11主要有三种形式:嵌合型腺病毒载体、复制缺陷的35型或11型腺病毒载体和嵌合型的35型或11型“gutless”腺病毒载体。这些载体的体外疗效较好,但体内疗效不理想,原因主要是病毒颗粒在从注射部位到达靶组织会被多重屏障所拦截。因此,深入研究Ad35和Ad11感染细胞的过程和机制,将有助于将它们应用于包括肿瘤在内多种重大疾病的基因治疗。

[关键词] 人11型腺病毒; 人35型腺病毒; 肿瘤基因治疗; 载体

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

人腺病毒已发现51种血清型,分为A、B、C、D、E、F六个亚群,其中B亚群又包括B₁和B₂两个小亚群。目前广泛应用于各种重大疾病临床前治疗和临床治疗研究的Ad5和Ad2属于C亚群,但是这类以CAR为受体的腺病毒存在如下问题:(1)对靶细胞感染效率不高;(2)在体内会引起严重毒副作用;(3)人体内广泛存在5型腺病毒的中和抗体(VNAs),导致病毒在体内很快被免疫系统清除;(4)病毒对细胞的感染效率依赖于细胞表面CAR受体的表达水平,而造血系统细胞、骨骼肌细胞、干细胞、树突状细胞、原代肿瘤细胞等重要细胞表面CAR表达量很低。这些问题限制了Ad5和Ad2的广泛应用。

研究^[1-2]发现,Ad35和Ad11对CD34⁺细胞、淋巴细胞、单核细胞、B细胞、T细胞、树突状细胞、骨骼肌细胞、间充质干细胞和原代癌细胞等重要细胞有很高的感染效率,且细胞毒性较低。因此,Ad35和Ad11可被开发成有效的肿瘤基因治疗载体。

1 人11型及35型腺病毒的性质

1.1 人11型及35型腺病毒的基因组

Ad35最初是从肾移植患者的肾脏和肺脏中分离得到的。其基因组全长34 794 bp,共有47个开放阅读框(ORFs),包括早期(E1, 2, 3, 4)和晚期(L1, 2, 3, 4, 5)腺病毒家族的保守区域以及14个编码未知腺病毒基因的ORFs^[3]。根据基因组的细微差别,Ad11分为Ad11a和Ad11p两种。用于基因治疗载体的多是Ad11p。Ad11p基因组全长34 794 bp,包括38个ORFs,GC含量48.9%。Ad11p与Ad35的基因组序列有98%的同源性^[4],与Ad5基因组序列有57%的同源性,并且比Ad5的基因组短1 141 bp。Ad11p与Ad5基因都包括4个早期区,其中E2B和IVa2的氨基酸序列与Ad5有高度的同源性,E1、E2A、E3、E4、蛋白

IX和fiber与Ad5有较大差异^[5]。

1.2 人11型及35型腺病毒的受体

人35型、11型、14型和34型腺病毒同属于B₂亚群,受体均为CD46^[6]。但有实验显示,Ad11和Ad35可能存在另一种感染细胞的受体。Stone等^[7]发现,利用Ad5/11p-CMV-GFP和Ad5/35-CMV-GFP分别感染A549和Hela细胞(均表达CD46),Ad5/11p-CMV-GFP的感染效率均比Ad5/35-CMV-GFP高,而同时用这两种载体去感染CHO-C2细胞(表达CD46),效率几乎一样。另外,抗血清实验显示,Ad11p Fiber的knob区能完全抑制Ad35与A549细胞的结合,而Ad35 Fiber的knob区并不能完全抑制Ad11p与A549细胞的结合^[8]。Yu等^[9]发现分别用Ad5、Ad5/11和Ad5/35感染11种食道癌细胞和6种口腔癌细胞,Ad5/11和Ad5/35对所有肿瘤细胞的感染效率均比Ad5要高很多,而且Ad5/11和Ad5/35的感染效率不依赖于CD46或CD80/86的表达水平。因此推测可能有其他的受体参与调节Ad11和Ad35对细胞的感染。

1.3 人11型及35型腺病毒的中和抗体

Ad35和Ad11中和抗体(VNAs)的阳性率在不同地区普遍较低,而且即使阳性,抗体的含量也很低。Nwanegb等^[10]对5型和35型腺病毒的VNAs在不同地区的阳性率分析发现,在冈比亚、南非、美国,5型腺病毒VNAs的阳性率分别是84.67%、79.87%和37.00%,抗体的含量或高或低;但是35型腺病毒VNAs的阳性率分别是2.66%、16.98%和6.33%,且抗体的含量都很低。Stone等^[7]研究发现Ad5的VNAs在健康人、乳腺癌病人以及宫颈癌病人

[作者简介] 陈东锋(1981-),男,河南南阳人,在读硕士研究生,现从事肿瘤基因治疗肿瘤的研究。

[通讯作者] 钱其军, E-mail:

内的表达量均比 Ad11 VNAs 要高。因此, Ad35 和 Ad11 的免疫原性较低,可在血液内较稳定存在,有利于作为基因转移载体的应用。

2 Ad11 和 Ad35 在基因治疗方面的应用

目前,35 型和 11 型腺病毒主要有三种应用形式:嵌合型腺病毒载体、复制缺陷的 35 型或 11 型腺病毒载体和嵌合型的 35 型或 11 型“gutless”腺病毒载体。

2.1 嵌合型的腺病毒载体

腺病毒的组织嗜向性主要由其 fiber 决定,因此,将 Ad5 Fiber 的 knob 和 shaft 替换为 Ad35 或 Ad11 Fiber 的 knob 和 shaft 构建而成的嵌合型腺病毒载体 Ad5/35 或 Ad5/11 仍具有 Ad35 或 Ad11 的感染特性,能有效感染低表达 CAR 的细胞。嵌合型的腺病毒载体对造血细胞、白血病细胞、间充质干细胞(hMSC)和树突状细胞(DCs)有很高的感染效率,而且基因表达水平也很高。Stecher 等^[1]构建的 E1/E3 剔除的嵌合型载体 Ad5/11-CMV-GFP,在 MOI = 1 000 时,对 CD34⁺ 细胞的感染效率为 70%,即使 MOI = 4 000, Ad5-CMV-GFP 对 CD34⁺ 细胞的感染效率也仅为 20%。Nilsson 等^[11]体外研究发现,在 MOI = 100 时, Ad5/35-GFP 感染原代急性骨髓瘤白血病(CML)细胞和急性 B 淋巴白血病(ALL)细胞的效率为 69%~86%,而 Ad5-GFP 则只有不到 20% 的感染效率。Mizuguchi 等^[12]发现,在 MOI = 300 时, Ad5/35 介导 hMSC 的转基因活性是传统 Ad5 的 130 倍。Delphine 等^[13]报道, Ad5/35 对 DCs 的基因转移和表达效率要比传统的 Ad5 高 100 倍。此外,嵌合型的腺病毒载体对原代肿瘤细胞也有较高的感染效率。Mizuguchi^[14]等深入分析比较 Ad5/35 与传统 Ad5 载体对多种人肿瘤细胞的转染效率,结果发现,对于 CAR(+) 的肿瘤细胞,两种载体转基因表达水平相近,但对于 CAR(-) 的肿瘤细胞, Ad5/35 介导的荧光酶表达水平是后者的 100 倍以上。尽管 Ad5/35 或 Ad5/11 可以高效感染许多重要细胞,但是它并不能逃脱体内针对 Ad5 的免疫反应的攻击,因为病毒的六邻体是 Ad5 中和抗体的主要攻击靶^[15]。

2.2 复制缺陷的 35 型或 11 型腺病毒载体

复制缺陷型的 35 型或 11 型腺病毒载体,即全长 35 型或 11 型腺病毒载体的构建方法与 5 型和 2 型复制缺陷型的腺病毒载体一样,病毒的 E1 区被剔除。复制缺陷型的全长 35 型或 11 型腺病毒载体,体外实验疗效较好,对肿瘤细胞感染效率及转基因表达水平都比较高。Sakurai 等^[16]构建的全长复制缺陷型 35 型腺病毒 Ad35 对许多 CAR 表达阴性的细胞如 LN444、LNZ308、K562 和 U937 等的感染效率比 Ad5 高很多,与 Ad5/35 的感染效率差不多或者更高。Stone 等^[7]用 Ad5-CMV-GFP、Ad5/11-CMV-GFP 和 Ad11-CMV-GFP 分别感染 CD34⁺ 细胞和未成熟的树突状细胞(DCs)。在 MOI = 4 000 时,只有约 20% 的 CD34⁺ 细胞被 Ad5-CMV-GFP 感染,而 Ad5/11-CMV-GFP 和 Ad11-CMV-GFP 对 CD34⁺ 细胞的感染效率分别是 83% 和 51%。当 MOI = 50 000 时, Ad5-CMV-GFP、Ad5/11-CMV-GFP 和 Ad11-CMV-GFP 对未成熟 DCs 的

感染效率分别是 10%、63% 和 78%。这些结果表明在体外, Ad11 比 Ad5 对 CD34⁺ 细胞和 DCs 有更高的感染效率,并且 Ad11 与 Ad5/11 对 CD34⁺ 细胞的感染存在明显的差异。但是复制缺陷的全长 35 型或 11 型腺病毒载体的体内实验疗效较低,病毒在体内很快被清除,转基因表达水平不高。Sakurai 等^[16]尾静脉注射小鼠 48 小时后,发现 Ad35L 和 Ad5/35L 携带的荧光素酶在肝脏、脾脏、肾脏、心脏和肺脏的表达水平均低于 Ad5L。可能是 CD46 在上述组织器官内表达量较低,也可能是 Ad35L 和 Ad5/35L 不能充分到达这些器官。注射 1 h 后,约 57% 的 Ad35L 和几乎 100% 的 Ad5L 聚集到小鼠的肝脏,但 48 h 后,几乎所有的 Ad35L 从肝脏消失,而还有约 45% 的 Ad5L 存在于肝脏。Stone 等^[7]将 Ad5、Ad5/11 和 Ad11 尾静脉注射表达 CD46 的转基因小鼠,30 min 后,在肝脏发现了此三种病毒。72 h 后,还可以在肝脏中观察到微量的 Ad5 和 Ad5/11,但是已完全观察不到 Ad11。出现以上结果可能是病毒在肝内迅速被 Kupffer 细胞吞噬清除或者是 Ad35 和 Ad11 对肝脏的吞噬性较低。Shayakhmetov 等^[17]研究发现,介导 Ad5/35L 通过内吞作用进入靶细胞的受体与 Ad5 作用不同, Ad5/35L 内吞后在细胞内形成晚期内涵体/溶酶体到达核周围,并且其中一部分内涵体会重新返回到细胞表面,而没有脱颗粒进入细胞核。这可以部分解释 Ad35L 和 Ad5/35L 在包括肝脏在内的一些器官中表达量较低的原因,同时表明 Ad35 与受体的作用方式不同于 Ad5。此外, Ad35 与 Ad5/35 感染细胞的过程稍有不同。Sakurai 等^[16]报道静脉注射 Ad5/35L 和 Ad35L 到小鼠体内, Ad5/35L 的荧光素酶在肝脏、脾脏和心脏的表达水平比 Ad35L 要高。但是 Ad35L 对 CD34⁺ 细胞有更高的转染效率。可能是 Fiber 与病毒的其它壳体蛋白如五邻体基座和六邻体共同介导了病毒的感染,而 Ad35L 的五邻体基座可能包含对 CD34⁺ 细胞有更高嗜性的 RGD 序列。他们发现在存在 400 μg/ml 这种与 CD34⁺ 细胞有较高嗜性的 RGD 肽段的情况下, Ad5/35L 和 Ad35L 的荧光素酶的表达水平均会降低 50%~60%,因为 RGD 肽段会与这两种病毒竞争性结合介导病毒进入细胞的整联蛋白。

2.3 嵌合型 35 型或 11 型“gutless”腺病毒载体

嵌合型 35 型(ΔAd5/35)或 11 型(ΔAd5/11)“gutless”腺病毒载体的构建方法与传统“gutless”腺病毒的构建方法一样,区别在于辅助病毒是嵌合的复制缺陷型 Ad5F35 或 Ad5F11。因此,它们与 Ad5/35 或 Ad5/11 具有相同的受体和细胞感染范围,但 ΔAd5/35 或 ΔAd5/11 最大的优点是转基因表达持久,细胞毒性低。Balamotis 等^[18]报道,在 MOI = 10 时,用 ΔAd5/35-GFP 和 Ad5/35-GFP 分别感染 K562 细胞,2 d 后, K562 细胞的 GFP 表达水平接近,分别为 64% 和 62%,但是 ΔAd5/35-GFP 感染的 K562 细胞内病毒粒子数降到 55%,总的病毒粒子数降到 68%,而 Ad5/35-GFP 感染的 K562 细胞内病毒粒子数降到 12%,总的病毒粒子数却升到 276%;4 d 后, ΔAd5/35-GFP 诱导的 GFP 表达降到 40%,细胞内病毒的粒子数低于 10%,总的病毒粒子数降到 5.2%,

然而 Ad5/35-GFP 诱导的 GFP 表达已低于 5%, 细胞内病毒粒子数不到 1%, 总的病毒粒子数却仍然达到 52%。由此可以看出 GFP 的表达水平与 Ad5/35-GFP 病毒粒子在细胞内的数量随时间的变化是不一致的。在高病毒基因拷贝的情况下, Ad5/35-GFP 的基因表达水平却明显下降, 推测是基因沉默导致的。在两种病毒载体中, GFP 都是由 CMV 启动子控制的, 因此可能是 Ad5/35-GFP 携带的病毒基因组中的某些结构参与诱导了 GFP 基因的表达沉默, 导致 Ad5/35-GFP 诱导的基因表达迅速下降。相反 Δ Ad5/35-GFP 在细胞内存活的时间较长, 而且本身不携带病毒基因组, 因此在体外条件下, Δ Ad5/35-GFP 比 Ad5/35-GFP 能更加持久的转基因表达。Stecher 等^[1]发现, 在不同的 MOI 条件下, 腺病毒对 HEL 细胞(人红白血病细胞系)、Mo7e 细胞(婴儿巨核细胞白血病细胞系)和 CD34⁺ 细胞的感染效率及毒性均比 Ad5/11 要低。尽管, 空壳腺病毒感染效率较高, 毒性较低, 但是对 Δ Ad5/35、 Δ Ad5/11、 Δ Ad35 和 Δ Ad11 的研究开发仍比较少。这是因为目前对 Ad35 和 Ad11 与细胞之间的作用机制还不是很清楚, 生产“无肠”腺病毒载体的细胞系也不是很理想, 辅助病毒的污染率还很高。

3 展望

人 35 型和 11 型腺病毒载体与传统的 C 组腺病毒载体相比, 有诸多的优点: 血清中中和抗体的阳性率较低; 与 Ad5 无免疫交叉反应, Ad11 和 Ad35 之间也没有交叉免疫反应^[19]; 感染细胞不依赖 CAR 受体, 对包括造血干细胞和原代肿瘤细胞在内的许多重要细胞都有较高感染效率; 肝脏毒性低, 免疫副作用小。因此, 开发 Ad11 和 Ad35 为肿瘤等重大疾病的疫苗载体将是 Ad11 和 Ad35 的另一研究方向。此外, 由于 Ad35 和 Ad11 可高效转染多数干细胞和肿瘤细胞, 因此开发利用 Ad35 和 Ad11 靶向杀灭肿瘤干细胞, 实现彻底杀灭肿瘤的目的, 也将是研究的热点。但是, Ad35 和 Ad11 载体的体内实验, 尤其是在静脉注射时, 疗效并不令人满意。这主要是因为病毒颗粒在从注射部位到达靶组织的过程中被多重屏障所拦截: (1) 病毒在随血液运动的过程中, 失活或被降解; (2) 一部分病毒与正常细胞及组织(非靶向)发生非特异性黏附并被吸收; (3) 网状内皮系统(如肝脏的 Kupffer 细胞)对病毒有吞噬作用; (4) 激活的抗体和/或补体系统会中和一部分病毒; (5) 病毒不能有效穿透内皮屏障及在实体肿瘤中弥散, 进入肿瘤内部表达。肿瘤组织内部存在“天然屏障”, 如正常纤维或坏死组织都会影响载体在肿瘤细胞间的弥散。相信, 随着对 Ad35 和 Ad11 感染细胞的过程和机制深入研究, 对 Ad35 和 Ad11 的不断开发改进, 最终必将实现从实验研究到临床应用的质的跨越, 为广大患者造福。

[参考文献]

[1] Stecher H, Shayakhmetov DM, Tamatoyannopoulos G, *et al.* A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: Assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells [J] *Mol Ther*, 2001, 4(1): 36-44.

[2] Segerman A, Lindman K, Mei Y F, *et al.* Adenovirus types 11p and 35 attach to and infect primary lymphocytes and monocytes, but hexon expression in T-cells requires prior activation [J]. *Virology*, 2006, 349(1): 96-111.

[3] Gao W, Robbins PD, Gambotto A, *et al.* Human adenovirus type 35: Nucleotide sequence and vector development [J]. *Gene Ther*. 2003, 10(23): 1941-1949.

[4] Stone D, Furthmann A, Sandig V, *et al.* The complete nucleotide sequence, genome organization, and origin of human adenovirus type 11 [J]. *Virology*, 2003, 309(1): 152-165.

[5] Mei YF, Skog J, Lindman K, *et al.* Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(8): 2061-2071.

[6] Gaggari A, Shayakhmetov DM, Lieber A, *et al.* CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses [J]. *Nat Med*, 2003, 9(11): 1408-1412.

[7] Stone D, Ni S, Li ZY, *et al.* Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector [J]. *J Virol*, 2005, 79(8): 5090-5104.

[8] Mei, YF, Lindman K, Wadell G. Human adenoviruses of subgenera B, C, and E with various tropisms differ in both binding to and replication in the epithelial A549 and 293 cells [J]. *Virology*, 2002, 295(1): 30-43.

[9] Ling Y, Takenobu H, Shimozato O, *et al.* Increased infectivity of adenovirus type 5 bearing type 11 or type 35 fibers to human esophageal and oral carcinoma cells [J] *Oncol Rep*, 2005, 14(41): 831-835.

[10] Nwanegb E, Vardas E, Gao W, *et al.* Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of the gambia, South africa, and the united states [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 351-357.

[11] Nilsson M, Ljungberg J, Fan X, *et al.* Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells [J]. *J Gene Med*, 2004, 6(6): 631-641.

[12] Mizuguchi H, Sasaki T, Hayakawa T, *et al.* Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(4): 1101-1106.

[13] Delphine R, Menzo JE, Suttmuller M, *et al.* Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166(8): 5236-5244.

[14] Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes [J]. *Gene*, 2002, 285(1-2): 69-77.

[15] Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, *et al.* Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: Fiber replacement alters receptor tropism without

- affecting primary immune neutralization epitopes [J]. *J Viro*, 1996, 70(4): 2116-2123.
- [16] Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, *et al.* Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector [J]. *Mol Ther*, 2003, 8(5): 813-821.
- [17] Shayakhmetov DM, Li ZY, Ternovoi V, *et al.* The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses [J]. *J. Virol*, 2003, 77(6): 3712-3723.
- [18] Balamotis AM, Huang K, Mitani K. Efficient delivery and stable gene expression in a hematopoietic cell line using a chimeric serotype 35 fiber pseudotyped helper-dependent adenoviral vector [J]. *Virology*, 2004, 324(1): 229-237.
- [19] Lemckert AA, Sumida SM, Holterman L, *et al.* Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity [J] *J Virol*, 2005, 79(15): 9694-9701.
- [收稿日期] 2006 - 08 - 13 [修回日期] 2006 - 11 - 20
- [本文编辑] 王 莹