

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.018

条件复制型腺病毒的研究进展

Advance of research in conditionally replicating adenovirus

郭朝平 综述;王慧萍 审阅(上海交通大学附属第一人民医院 实验中心,上海 200080)

[摘要] 条件复制型腺病毒(conditionally replicating adenovirus, CRAd)基因治疗肿瘤的研究主要集中于提高其靶向性、增强肿瘤杀伤特异性,以及降低毒性作用三个方面。在提高 CRAd 靶向性的研究中,早期策略主要集中在腺病毒早期复制必需基因 *E1a/E1b* 突变或缺失的调控以及肿瘤或组织特异性启动子对其转录的调控;近年来利用组织特异性 microRNA 对病毒早期复制必需基因的转录后调控以及病毒外壳蛋白修饰的转导调控已逐渐成为研究的热点。在提高 CRAd 的肿瘤杀伤方面,除删除病毒自身凋亡抑制基因与导入外源性治疗基因两种方法以外,改造外壳纤毛提高病毒对靶细胞的亲嗜性及构建靶向肿瘤干细胞的 CRAd 成为新的关注点。同时,随着对腺病毒结构认识的逐步加深,修饰其外壳六邻体蛋白及其他外壳蛋白以降低 CRAd 的肝嗜性与免疫原性也正成为降低 CRAd 毒性作用的研究热点。

[关键词] 基因治疗;条件性复制腺病毒;肿瘤;靶向性

[中图分类号] R730.59; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0555-06

自 1985 年 Ballay 等^[1]首次报道使用腺病毒作为一种基因载体以来,将腺病毒应用于肿瘤基因治疗的研究在世界范围迅速开展起来。相比于其他基因载体如单纯疱疹病毒载体、慢病毒载体而言,腺病毒载体具有宿主范围广、安全性能好、载体容量相对较大等优点,使得腺病毒已成为目前应用最广泛的载体之一。但由于早先开发的复制缺陷型腺病毒载体在体内无增殖能力,以及容易被机体免疫系统清除等原因,使得治疗基因在体内表达的时间相对较短^[2]。而条件复制型腺病毒载体(conditionally replicating adenovirus, CRAd)能够选择性地肿瘤细胞内进行复制增殖并散播至更多肿瘤细胞,使得 CRAd 不仅具有更强的肿瘤清除能力,还能够以较少的用药量降低肝脏的毒性作用,因而 CRAd 逐渐成为基因治疗中广泛关注的载体。本文就 CRAd 作为肿瘤基因治疗载体的研究进展做一综述。

1 腺病毒基本结构

腺病毒是一种线性无包膜的双链 DNA 病毒,病毒颗粒直径约 60~90 nm,呈 20 面立体对称。病毒衣壳有 252 个壳粒,规则排列成 240 个六邻体和 12 个五邻体,由 4 种黏合蛋白 III a、VI、VIII 和 IX 黏附形成一个稳定的病毒颗粒。大多数用作基因治疗载体的腺病毒为人类血清型 5 型(human adenovirus serotypes 5, Ad5),它的五邻体向外伸出一根纤毛,并在末端形成结节,结节上的受体结合位点与细胞表面的柯萨奇腺病毒受体(Coxsackie virus-adenovirus re-

ceptor, CAR)结合是腺病毒转导的关键环节。五邻体基底含有 Arg-Gly-Asp(RGD)基序,与细胞表面的整合素结合,介导病毒纤毛与细胞 CRA 结合之后的胞吞作用。

腺病毒的基因组约为 36 000 bp,根据病毒 DNA 复制的前后顺序,将基因分为早期和晚期转录单元。早期转录单元包括 *E1*(*E1a* 与 *E1b*)、*E2*(*E2a* 与 *E2b*)、*E3* 和 *E4* 基因,主要编码与病毒复制相关的调节蛋白,诱导被感染的细胞进入细胞周期,以利于病毒的复制。其中病毒复制所必须的基因为 *E1* 基因,*E1* 基因由 *E1a* 和 *E1b* 组成。*E1a* 主要编码的蛋白包括 CR1、CR2、CR3 三个保守区。其中 CR1、CR2 作用于多种细胞转录因子^[3],前者有助于 *P53* 基因的转录激活、表达和稳定,同时诱导 *P53* 依赖的细胞凋亡^[4];后者结合成视网膜细胞瘤抑制蛋白(retinoblastoma tumor suppressor protein family Rb),促使细胞进入细胞周期;而 CR3 结构域与 CtIP、Sur2 和 CtBP 的转录激活有关^[5]。*E1b* 编码 19 000 和 55 000 两种蛋白,分别通过抑制死亡受体信号通路 Bax-Bak 以及与 *P53* 肿瘤抑制蛋白结合,抑制细胞凋亡,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672440, No. 30500553)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672440, No. 30500553)

[作者简介] 郭朝平(1984-),男,湖南省衡阳市人,硕士生,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。E-mail: sanchuan555@live.cn

[通信作者] 王慧萍(Wang Hui-ping, corresponding author), E-mail: tywhp9618@msn.com

为病毒在细胞内复制创造有利条件。晚期基因由 L1 ~ L5 组成, 编码病毒复制所必须的结构蛋白。

2 CRAd 的靶向性调控策略

目前为止, 对于 CRAd 的靶向调控主要有以下几种策略: (1) 早期复制必需基因 *E1a/E1b* 突变或缺失调控; (2) 肿瘤或组织特异性启动子对病毒早期复制必需基因的转录调控; (3) 组织特异性 miRNA (miRNA) 对病毒早期复制必需基因的转录后调控; (4) 对病毒外壳蛋白修饰的转导调控。

2.1 *E1a/E1b* 缺失调控

删除病毒复制关键基因可阻止病毒在正常细胞内复制, 但病毒感染肿瘤细胞后, 能通过肿瘤细胞所特有的因子与病毒所缺失的功能互补, 使病毒能在肿瘤细胞内特异性复制。最早使用此法构建 CRAd 是选择性条件复制病毒 Onyx-015, 它因缺乏 *E1B-55K* 基因而不能编码与 P53 结合的 P105 蛋白, 所以在正常细胞中 P53 可以发挥其正常功能, 促使细胞凋亡而使病毒复制受到抑制; 而在 P53 功能缺陷的肿瘤细胞中, Onyx-015 复制则不受限制^[6]。目前美国生产的 Onyx-015 (现称 CI104) 已经进入临床 III 期试验^[7]。另一种条件复制型腺病毒 Ad- Δ 24E1a 也根据相似原理构建, 其 *E1a* 基因中 CR2 区的 24 bp 碱基突变后, 失去编码 Rb 结合蛋白的功能, 使腺病毒只能在 Rb 基因缺失的肿瘤细胞中选择性复制^[8]。

2.2 肿瘤特异性启动子调控

利用肿瘤特异性启动子替换病毒复制必需基因启动子, 使得肿瘤的早期必需基因只能够在相应的靶细胞中转录, 从而将病毒的复制限制在肿瘤细胞内。条件复制型腺病毒 CN706 利用 PSA 特异性启动子将病毒靶向于表达 PSA 特异性抗原的前列腺肿瘤细胞中^[9]。CNHK300 则是一种以人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 启动子调控 *E1a* 基因的 CRAd^[10]。而导入的多个特异性启动子分别调控腺病毒不同的复制必需基因, 可对腺病毒复制进行多重调控, 使其具有更高的靶向性。如 *E1a* 基因和 *E1b* 基因分别由 hTERT 启动子和含有缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 启动子调控的双靶向条件增殖型腺病毒 CNHK500, 相比于由 hTERT 启动子调控 *E1a* 基因的单靶向条件复制型腺病毒 CNHK300, CNHK500 不仅在肿瘤细胞内的复制能力与溶瘤能力更好, 而且靶向性也更高^[11]。

2.3 组织特异性 miRNA 调控

将 miRNA 的靶序列插入到腺病毒早期必需基

因 3'UTR 与 polyA 之间, 利用 miRNA 与靶序列结合后产生的沉默效应下调早期基因的表达, 从而对病毒复制进行负调控。miR122 是一种具有肝细胞特异性, 并且在肝细胞高表达的 miRNA。Cawood 等^[12]构建的 Ad5-mir122 是一种在野生型 Ad5 的 *E1a* 基因 3'端与 PolyA 之间插入了 miR122 结合序列的新型腺病毒, 其特点是在肝细胞中的复制极低甚至为零, 而在正常细胞的复制与野生型 Ad5 无差别。在 Ad- Δ 24E1a 基因的相同部位插入 miR122 靶序列后所构建的新型重组腺病毒, 在靶细胞内的复制活动不受影响而肝毒性降低^[13]。相类似地, 将多个不同重复次数的 miR122 靶序列插入 *E1a* 基因的 3'端 PolyA 前, 用嗜铬粒蛋白 A (chromogranin-A, CgA) 启动子调控 *E1a* 基因的转录, 构建出条件复制型腺病毒 Ad^[CgA-E1a-miR122], 发现在 CgA 启动子特异性转录调控和转录及 miR122 特异性基因沉默双重调控的作用下, Ad^[CgA-E1a-miR122] 可在神经内分泌瘤细胞内特异性复制, 同时在正常肝细胞内复制能力显著降低, 但插入不同重复次数的 miR122 靶序列对病毒复制抑制的差别不明显^[14]。

2.4 外壳改造

外壳改造是除转录调控外又一靶向 CRAd 的调控策略。通过改造腺病毒外壳基因, 使腺病毒能够与靶细胞特异性结合, 感染靶细胞并复制。

腺病毒外壳纤毛的功能是结合病毒与靶细胞, 为病毒感染细胞的第一步, 因此外壳纤毛成为科学家对外壳进行改造的主要对象。研究^[15]发现, 病毒纤毛有两个部位基因改造后不会影响纤毛的功能——纤毛蛋白中间的 HI-loop 区与纤毛蛋白的 C 末端, 因此利用纤毛改造调控病毒靶向性的实验主要集中在 HI-loop 区域。对腺病毒纤毛 HI-loop 区基因进行修改, 构建出能够表达针对 DC 表面特异性非整合蛋白 (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin, DC-SIGN) 单链抗体 Fc 段蛋白的新型腺病毒, 在抗 DC-SIGN 单克隆抗体的协同下, 该病毒能够在 DC40 靶细胞内特异性复制并散播。与此相似的方法也用于构建在卵巢癌细胞中特异性复制的腺病毒载体^[16]。而利用抗体对于腺病毒纤毛 C 末端的基因改造一直以来效果都不理想。但最近, Glasgow 等^[17]构建出一种新型腺病毒, 该病毒的纤毛 C 末端能够合成亮氨酸拉链肽, 同时病毒自身能够分泌出一种带有亮氨酸拉链肽的单链抗体 Fv 段 (single chain variable fragment, ScFv), 利用亮氨酸拉链结构域, 抗体分泌后能与病毒纤毛紧密结合, 在病毒出胞以及感染细胞的过程中都不至于脱落, 有效

地协助病毒结合靶细胞。

除纤毛外, *pIX* 基因是近年来发现的又一个适合于改造成为表达配体的外壳蛋白。与其他外壳蛋白可改造区域相比,在不影响病毒颗粒的装配和功能的情况下, *pIX* 的 C 末端能插入约 1 000 个氨基酸^[18]。将 *ScFv* 基因插入 *pIX* 基因后,合成的 *pIX-ScFv* 虽然能够成功组装成病毒颗粒,但对病毒的靶向性的影响并不明显——即使将 *pIX-ScFv* 送入细胞内质网内修饰折叠后^[19];然而在随后的实验中,将单区域抗体(single-domain antibody, SdAb)基因插入 *pIX* 基因,编码出的 *pIX-SdAb* 不仅能够很好地装配入病毒颗粒,而且还可以提高病毒对带有相应受体细胞的感染率^[19]。

3 增强 CRAd 肿瘤杀伤性

虽然 CRAd 能够精确地靶向于肿瘤细胞,但对肿瘤细胞的清除还不够彻底,因此,科学家对如何提高 CRAd 对肿瘤细胞的杀伤性进行了大量的研究。

3.1 删除凋亡抑制基因

适当删除病毒抑制凋亡基因,能够增强对肿瘤细胞的溶瘤能力。如对具有抑制细胞凋亡作用的 *E1b-19K* 基因进行缺失突变,能够提高 CRAd 的溶瘤效果^[20]。同样 *E1a* 基因的 CR2、CR3 部分在病毒感染细胞后也具有抑制细胞凋亡的作用。AdDC315-mE1a 的 *E1a* 基因是一种 CR2、CR3 部分被删除、只拥有 720 bp 的新型小 *E1a*(minimal-*E1a*, mE1a)基因,而它的 *E1b* 基因被完全删除,与同样利用 hTERT 调控野生型 *E1a* 基因的 AdDC315-wE1a 相比,AdDC315-mE1a 虽然在肿瘤细胞内复制效率要略低,但能更有效抑制肿瘤细胞的分裂、促进肿瘤细胞的凋亡,其整体抗肿瘤作用反而有所增强^[21]。

3.2 导入外源性治疗基因

采用病毒-基因疗法-将外源性治疗基因导入 CRAd,利用外源治疗基因的肿瘤杀伤能力,结合病毒自身的溶瘤能力,提高 CRAd 抗肿瘤作用。导入的外源治疗基因作用大致可分为 3 大类:(1)直接增强腺病毒的细胞杀伤作用。如含诱导凋亡抗癌基因的 CRAd-Oxyx-411,其对肿瘤细胞的杀伤作用明显高于仅仅依靠自身溶瘤作用杀伤肿瘤细胞的 CRAd^[22]。而携带“自杀基因”的 CRAd 能够在肿瘤细胞内将无毒的“前药”转化为抗肿瘤药物,杀死腺病毒感染和周围未感染的肿瘤细胞^[23]。(2)调节肿瘤细胞微环境。金属蛋白酶组织抑制剂 3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP3)能够抑制肿瘤细胞的扩散与肿瘤内血管再生。带有 *TIMP3* 基因

的 CRAd 不但具有溶瘤作用,还可抑制肿瘤细胞的增殖^[24]。(3)提高机体对肿瘤免疫作用。将细胞因子等免疫分子基因导入 CRAd,可以提高机体对肿瘤的免疫力,不仅对原发肿瘤具有较强而持久的杀伤作用,而且对转移性肿瘤也有一定的清除作用。如将 IL-24 基因导入 CRAd 能够增强病毒的肿瘤杀伤作用^[25]。

3.3 提高病毒与靶细胞亲嗜性

由于肿瘤细胞表面 CAR 的表达易变,且 CAR 的表达与肿瘤恶性程度呈负相关,导致部分肿瘤对 Ad5 构建的 CRAd 抵抗。为克服 CAR 的缺乏,目前主要针对纤毛进行置换或修改,提高病毒与靶细胞的亲嗜性与转导能力。

利用不同亚属的腺病毒纤毛基因进行替代。不同亚属腺病毒纤维结构相似,其纤维尾部区高度同源,一种血清型的纤维尾部能够与另一种病毒外壳的五邻体结合。电子显微镜下观察发现,Ad5 病毒颗粒上五邻体为了能够容纳 Ad35 的纤毛,其基座上纤毛插孔的直径能够扩大 2 倍^[26]。人血清型 B 亚属腺病毒与细胞结合不需要 CRA 受体,而是与细胞表面的 CD46 相结合,因此 Nandi 等^[27]利用 B 亚属 Ad3 的纤毛基因代替 C 亚属 Ad5 的纤毛基因,并用 survivin 启动子调控 *E1* 基因的表达,构建出一种能够在 CD46 阳性恶性神经胶质瘤中特异性复制的条件复制型病毒——CARd-survivin-5/3。相类似的方法也被用于提高 CRAd 对前列腺癌的肿瘤感染能力^[28]。除整个纤毛置换外,仅仅用 Ad3 纤毛结节将 Ad5 的纤毛结节置换,同样也能够改变病毒亲嗜性,提高对神经胶质瘤的感染效率^[27]。

对腺病毒纤毛基因进行人工修改,将病毒五邻体上与整合素结合的 RGD-4C 基序插入纤毛 HI-loop 区,能够显著增加 Ad 对缺乏 CRA 受体细胞的感染率^[29]。Suzuki 等^[30]成功将编码 RGD-4C 的基因插入到 *E1a* 中 24 bp 碱基的突变的病毒纤毛基因中,使其编码的纤毛头部 HI 环中存在 RGD-4C 序列,构建出的条件复制型腺病毒 AdΔ24-RGD,其对低表达 CAR 受体的肿瘤细胞如神经胶质瘤细胞的感染能力明显增强。

3.4 构建靶向肿瘤干细胞的 CRAd

肿瘤干细胞是肿瘤组织中存在的数量很少的癌细胞,在肿瘤形成过程中充当干细胞的角色,具有自我更新、增殖和分化的潜能,虽然数量少,却在肿瘤的发生、发展、复发、耐药和转移中起着重要作用。普通肿瘤细胞需要注射 1×10^6 个以上才能够在动物体内成瘤,而肿瘤干细胞仅仅只需要 10 至 200 个

即能在动物体内成瘤^[31]。鉴于肿瘤干细胞在肿瘤中的重要性, 科学家构建靶向肿瘤干细胞的 CRAd, 通过靶向杀伤肿瘤干细胞提高 CRAd 对于肿瘤的治疗效果。大多数的肿瘤干细胞由于其低分化的特性, 细胞低表达或不表达 CRA 受体, 因此常用的 Ad5 载体需要对其纤毛进行更换或修饰, 或者选择其他类型的腺病毒用于 CRAd 的构建, 提高其对肿瘤干细胞的感染能力。而肿瘤的低分化特性使得肿瘤干细胞 Rb 基因功能缺失, 可以利用肿瘤特异性启动子和 *E1a/E1b* 基因缺失的方法靶向定位肿瘤干细胞。Bauerschmitz 等^[32]将 Ad5 纤毛结节更换为 Ad3 纤毛结节的 Ad5/3, 并分别载入 hTERT、环加氧酶启动子(*cyclo-oxygenase 2, Cox-2*)、多耐药启动子(*multidrug resistance, MDR*)等不同的启动子, 结合 AdE1a Δ 24, 构建多种靶向于乳腺癌干细胞的 CRAd。实验结果表明, Ad5/3-Cox2L-D24 与 Ad5/3-mdr-D24 对 CD44⁺ CD424^{-low} 肿瘤干细胞具有较强的杀伤作用。根据 Rb 功能与 CAR 受体在神经胶质瘤细胞中的广泛缺失这两个特点, Jiang 等^[33]利用 Ad Δ 24-RGD 对普通的神经胶质瘤细胞与神经胶质瘤干细胞进行杀伤, 取得了相对于传统的肿瘤治疗方法更佳的治疗结果。

4 降低 CRAd 毒性作用

肝毒性与免疫原性是 CRAd 在肿瘤的治疗过程两个主要毒性作用, 而理想的 CRAd 不仅有着较强的清除肿瘤细胞的能力, 而且还必须具有较小的毒性作用, 因此, 降低肝毒性与免疫原性成为 CRAd 研究的另一个重要部分。

4.1 降低肝毒性

CRAd 的肝毒性是 CRAd 用药中两大障碍之一。有实验^[34-35]证明, Ad5 进入机体后, 会有超过 90% 的病毒颗粒集中到肝脏, 并被肝脏的 Kupffer 细胞迅速清除, 而未被清除的病毒则感染肝实质细胞, 损害肝脏。而 Ad5 病毒是基因治疗中最常用的一类载体, 因此病毒本身对于肝细胞的嗜亲性不仅很大程度上削弱了基因治疗中 CRAd 的疗效, 并且对肝脏产生毒性作用。近年来有研究^[36]发现, 腺病毒对于肝细胞的亲嗜性依赖于病毒外壳中六邻体蛋白与血液中的凝血因子 FX 的结合, 所以对六邻体进行修饰, 阻止其与凝血因子 FX 的结合, 能够有效降低病毒对肝细胞的亲嗜性。例如在六邻体基因的高变区 5(*hypervariety loop 5, HVR5*)插入一个基因片段, 使得六邻体表面表达一个 75 氨基酸大小的生物素受体肽(*biotin acceptor peptide, BAP*)分子, 从而阻

止 FX 与六邻体分子的结合, 降低病毒载体对肝细胞的感染^[37]。Shashkova 等^[38]以此为基础构建出的 CRAd 在体内系统用药试验中, 既保证了病毒对肿瘤的靶向性, 又降低了对肝脏的毒性作用。同样对腺病毒六邻体基因 HVR5 区的一个密码子突变, 将原来的丙氨酸残基置换为半胱氨酸残基后, 其六邻体蛋白容易被聚乙二醇(*polyethylene glycol, PEG*)分子修饰, 修饰后的 CRAd 不仅能够成功逃避 Kupffer 细胞的捕获及清除, 而且其与肝细胞的亲和力也发生变化, 利用不同分子量的 PEG 修饰甚至可以调节病毒与肝细胞的亲和力^[37]。

4.2 降低免疫原性

机体对于腺病毒的免疫反应是 CRAd 用作肿瘤基因治疗的另一大障碍。绝大多数人在青少年时期都感染过常见的几类腺病毒, 如人血清型 Ad2、4、5 和 7, 因此大多数人存在针对这几类腺病毒的特异性免疫。当以 Ad5 构建 CRAd 进入机体时, 机体免疫反应所产生抗体会中和大部分病毒, T 细胞也会将以感染的细胞清除, 同时引发机体的炎症反应, 对反复用药造成障碍。解决这一问题较简单的方法是使用人类腺病毒其他亚型^[39]或其他种属腺病毒为载体构建 CRAd。有实验^[40]将犬腺病毒改造成带有骨肉瘤启动子的 CRAd, 并在动物模型中取得了较好的疗效。

腺病毒在机体免疫反应中, 不仅结合病毒颗粒的抗体可以激活补体系统, 腺病毒颗粒本身也能被补体分子 C3b、C4b 结合而激活补体系统^[41], 因此补体在腺病毒的免疫反应中起了重要作用, 而抑制补体对腺病毒的识别能够降低机体对腺病毒的免疫反应。Seregin 等^[42]利用能够抑制补体活性的补体调节肽(*complement inhibitor, COMPInh*)对 CRAd 的外壳进行修饰: 将 COMPInh 的 DNA 序列分别插入腺病毒外壳 IX 蛋白基因的 C 末端与纤毛的 HI-loop 区。表达在病毒外壳两个不同部位的 COMPInh 分子, 尤其是 IX 蛋白 C 末端, 能够很好的抑制补体的激活。

由于 CRAd 的诸多优点, 现在已广泛应用于基因治疗的研究。虽然到目前为止对 CRAd 的改进已取得了不小的进步, 一些 CRAd 药物已经进入临床应用, 但它仍然存在许多不足。随着对腺病毒研究的日益深入, 对人体肿瘤发病机制理解得更加全面, 在不久的将来更加高效、低免疫原性、无肝毒性的腺病毒载体必将出现。

[参 考 文 献]

[1] Ballay A, Levrero M, Buendia MA, et al. *In vitro* and *in vivo* syn-

- thesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses [J]. *EMBO J*, 1985, 4(13B): 3861-3865.
- [2] McNeish IA, Bel SJ, Lemoine NR. Gene therapy progress and prospects: Cancer gene therapy using tumour suppressor genes [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(6): 497-503.
- [3] Hale TK, Braithwaite AW. The adenovirus oncoprotein E1a stimulates binding of transcription factor ETF to transcriptionally activate the P53 gene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(34): 23777-23786.
- [4] Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, et al. Adenovirus type 5 E1A gene therapy for ovarian clear cell carcinoma: A potential treatment strategy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(1): 227-235.
- [5] Bruton RK, Pelka P, Mapp KL, et al. Identification of a second CtBP binding site in adenovirus type 5 E1A conserved region 3 [J]. *J Virol*, 2008, 82(17): 8476-8486.
- [6] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in P53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373-376.
- [7] Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, et al. Phase I - II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(5): 437-445.
- [8] Conrad C, Miller CR, Ji Y, et al. Delta24-hyCD adenovirus suppresses glioma growth *in vivo* by combining oncolysis and chemosensitization [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 284-294.
- [9] Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, et al. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(13): 2559-2563.
- [10] Su CQ, Sham J, Xue HB, et al. Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting telomerase-positive cancer cells [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(10): 591-603.
- [11] Zhang Q, Chen G, Peng L, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6523-6531.
- [12] Cawood R, Chen HH, Carroll F, et al. Use of tissue-specific miRNA to control pathology of wild-type adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(5): e1000440.
- [13] Ylösmäki E, Hakkarainen T, Hemminki A, et al. Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific miRNA [J]. *J Virol*, 2008, 82(22): 11009-11015.
- [14] Leja J, Nilsson B, Yu D, et al. Double-detargeted oncolytic adenovirus shows replication arrest in liver cells and retains neuroendocrine cell killing ability [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8916.
- [15] Korokhov N, de Gruijl TD, Aldrich WA, et al. High efficiency transduction of dendritic cells by adenoviral vectors targeted to DC-SIGN [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(3): 289-294.
- [16] Breidenbach M, Rein DT, Everts M, et al. Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy [J]. *Gene Therapy*, 2005, 12(2): 187-193.
- [17] Glasgow JN, Mikheeva G, Krasnykh V, et al. A strategy for adenovirus vector targeting with a secreted single chain antibody [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8355.
- [18] Matthews QL, Sibley DA, Wu H, et al. Genetic incorporation of a herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase fusion into the adenovirus protein IX for functional display on the virion [J]. *Mol Imaging*, 2006, 5(4): 510-519.
- [19] Poulin KL, Lanthier RM, Smith AC, et al. Retargeting of adenovirus vectors through genetic fusion of a single-chain or single-domain antibody to capsid protein IX [J]. *J Virol*, 2010, 84(19): 10074-10086.
- [20] Öberg D, Yanover E, Adam V, et al. Improved potency and selectivity of an oncolytic E1ACR2 and E1B19K deleted adenoviral mutant (Ad $\Delta\Delta$) in prostate and pancreatic cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 541-553.
- [21] Fang L, Huang Y, Hu X, et al. A truncated minimal-E1a gene with potency to support adenoviral replication mediates antitumor activity by down-regulating Neu expression and preserving Rb function [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(1): 1-7.
- [22] Zhang YA, Nemunaitis J, Samuel SK, et al. Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9736-9743.
- [23] Zhang JF, Wei F, Wang HP, et al. Potent anti-tumor activity of telomerase-dependent and HSV-TK armed oncolytic adenovirus for non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 52-59.
- [24] Lamfers ML, Gianni D, Tung CH, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression from an oncolytic adenovirus inhibits matrix metalloproteinase activity *in vivo* without affecting antitumor efficacy in malignant glioma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9398-9405.
- [25] Wei N, Fan JK, Gu JF, et al. Double-regulated oncolytic adenovirus-mediated interleukin-24 overexpression exhibits potent antitumor activity on gastric adenocarcinoma [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(7): 855-864.
- [26] Reddy VS, Natchiar SK, Stewart PL, et al. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution [J]. *Science*, 2010, 329(5995): 1071-1075.
- [27] Nandi S, Ulasov IV, Rolle CE, et al. A chimeric adenovirus with an Ad 3 fiber knob modification augments glioma virotherapy [J]. *J Gene Med*, 2009, 11(11): 1005-1011.
- [28] Murakami M, Ugai H, Belousova N, et al. Chimeric adenoviral vectors incorporating a fiber of human adenovirus 3 efficiently mediate gene transfer into prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2010, 70(4): 362-376.
- [29] Kasono K, Blackwell JL, Douglas JT, et al. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2571-2579.
- [30] Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, et al. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(1): 120-126.
- [31] Skog J, Edlund K, Bergenheim AT, et al. Adenoviruses 16 and

- CV23 efficiently transduce human low-passage brain tumor and cancer stem cells [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(12): 2140-2145.
- [32] Bauerschmitz GJ, Ranki T, Kangasniemi L, et al. Tissue-specific promoters active in CD44⁺ CD424^{low} breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5533-5539.
- [33] Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, et al. Examination of the therapeutic potential of delta-24-rgd in brain tumor stem cells: Role of autophagic cell death [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(18): 1410-1414.
- [34] Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, et al. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following *in vivo* administration [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(1): 37-44.
- [35] Xu Z, Tian J, Smith JS, et al. Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement [J]. *J Virol*, 2008, 82(23): 11705-11713.
- [36] Prill JM, Espenlaub S, Samen U, et al. Modifications of adenovirus hexon allow for either hepatocyte detargeting or targeting with potential evasion from kupffer cells [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(1): 83-92.
- [37] Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, et al. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(14): 5483-5488.
- [38] Shashkova EV, May SM, Doronin K, et al. Expanded anticancer therapeutic window of Hexon-modified oncolytic adenovirus [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(12): 2121-2130.
- [39] Hemminki O, Bauerschmitz G, Hemmi S, et al. Oncolytic adenovirus based on serotype 3 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(4): 288-96.
- [40] Le LP, Li J, Ternovoi VV, et al. Fluorescently tagged canine adenovirus via modification with protein IX-enhanced green fluorescent protein [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt12): 3201-3208.
- [41] Tian J, Xu Z, Smith JS, et al. Adenovirus activates complement by distinctly different mechanisms *in vitro* and *in vivo*: Indirect complement activation by virions *in vivo* [J]. *J Virol*, 2009, 83(11): 5648-5658.
- [42] Seregin SS, Hartman ZC, Appledorn DM, et al. Novel adenovirus vectors 'capsid-displaying' a human complement inhibitor [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(4): 353-359.
- [收稿日期] 2011 - 06 - 15 [修回日期] 2011 - 09 - 20
- [本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

染色质空间构象和 lncRNAs 功能的关系

新一代测序技术的广泛应用使得人们对哺乳动物的转录组有了深入的认识,作为基因组转录的主体,非编码 RNA 的功能研究成为当今生命科学界新兴的研究热点。目前发现越来越多的长链非编码 RNAs(long noncoding RNAs, lncRNAs)发挥着重要的调控功能,然而,相对于数以万计的 lncRNAs 转录本来说这还只是很小的一部分。其功能研究的难点在于 lncRNAs 作用模式的多样性和不确定性,每一种新作用模式的发现都会给人耳目一新的感觉。这篇来自于 Chang 实验室的论文阐述了在个体发育中的 lncRNA:HOTTIP,依据染色质的空间构象,其对邻近基因发挥的调控作用。

HOX 基因家族是脊椎动物中高度保守的转录因子家族,调控个体空间发育。在哺乳动物中,*HOX* 家族聚集分布在基因组的 4 个不同位置上,分别称为 *HOXA*、*HOXB*、*HOXC*、*HOXD* 基因簇。Chang 实验室早先已发现了一个 *HOXC* 位点转录的 lncRNA:HOTAIR,这次他们的工作瞄准了 *HOXA* 位点。研究发现,在肢体远端的细胞中,*HOXA* 位点的 5'端存在更加紧密的空间接触;相反,在肢体近端细胞中 *HOXA* 的 3'端存在更加紧密的空间接触。与此相对应,CHIP 结果显示,在远端细胞 *HOXA* 位点的 5'端基因存在较高水平的 H3K4me3 与 pol II 的结合,这与其基因的表达开放相一致;而在肢体近端细胞中,*HOXA* 的 5'端的 H3K27me3 与 pol II 的结合水平较低,这也与其转录关闭一致。

有意思的是,该研究发现,在 *HOXA* 的 5'端有一个非编码的 RNA 转录本,该研究确定了其全长和转录起始终止位置,并将其命名为 HOTTIP。HOTTIP 的表达模式和 *HOXA* 的 5'端基因完全一致,但其组蛋白修饰却存在 H3K4me3 和 H3K27me3 的双价修饰,提示其功能的独特性。RNA 干扰试验显示,其能距离依赖性的调控 *HOXA* 基因的表达,并且体内鸡胚试验显示其能影响肢芽的发育。进一步研究显示,HOTTIP 不能改变 *HOXA* 的 5'端染色质的空间构象,但却能改变 *HOXA* 5'端的组蛋白修饰状况;并且 HOTTIP 是通过结合 H3K4 甲基化转移酶 MLL 复合体发挥作用,这种结合由复合体中的 WDR5 介导。

于是,该研究提出在肢体远端的细胞中 *HOXA* 位点的 5'端的染色质结构使 *HOXA* 基因与 HOTTIP 有一个较近的空间接触,而 HOTTIP 转录本能够通过 WDR5 招募 MLL 复合体,使邻近基因发生 H3K4me3 修饰,进而促进其转录。该篇论文首次将染色质的空间结构引入到了 lncRNA 的功能研究中,使得 lncRNA 的研究开始涉及基因组的空间结构层面,对基因组转录调控和 lncRNA 的功能研究具有重要的参考价值。