

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.019

· 综 述 ·

溶瘤病毒靶向肿瘤微环境的研究进展

Progress of oncolytic virus targeting tumor microenvironment

郭靖¹综述;张建琼²审阅(1. 东南大学医学院生物工程学系,江苏南京210000;2. 东南大学医学院免疫学系,江苏南京210000)

[摘要] 溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)能够特异性地在肿瘤细胞内复制、扩增并杀死肿瘤细胞,而其正常体细胞中不能复制,以此为基础的OV抗肿瘤治疗方法近年受到广泛关注。肿瘤微环境是肿瘤生长的生态位,在肿瘤的生长发展中具有极其重要的作用,利用溶瘤病毒靶向肿瘤微环境可以从多方面抑制肿瘤的发展。肿瘤微环境中含有的大量生长因子、细胞因子、免疫细胞、肿瘤浸润细胞及其胞外基质等均会抑制溶瘤病毒在肿瘤细胞中的复制增殖,通过靶向这些影响因素,有可能开发出多种改造肿瘤微环境的手段,进而提高OV的溶瘤效率。

[关键词] 溶瘤病毒;肿瘤微环境;靶向;改造

[中图分类号] R730.54; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0703-04

1904年有报道^[1]称,1例白血病患者在一次流感病毒感染后病情意外好转。1911年,意大利的一位医生为颈部肿瘤患者接种狂犬病毒活疫苗后,肿瘤缩小,由此开启了人类利用病毒与肿瘤抗争的序幕^[2]。1991年, Martuza等^[3]在Science报道,转基因单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)在恶性胶质瘤治疗中有一定的效果,使溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)抗癌的治疗方法日益受到关注。OV是一类具有肿瘤杀伤效应的条件复制型病毒,能够通过病毒在肿瘤细胞中的扩增来裂解、杀伤肿瘤细胞,产生的子代病毒又能感染周围的肿瘤细胞,产生级联效应,而其在正常细胞中不能复制^[4]。目前,腺病毒(adenovirus, Ad)、HSV-1等十多种病毒已被开发为OV。同时,肿瘤微环境作为肿瘤细胞的生态位,在肿瘤的发生发展中具有极其重要的作用,本文就如何靶向肿瘤微环境、提高溶瘤效果做一介绍。

1 OV靶向肿瘤微环境的机制

肿瘤微环境就像肿瘤的“土壤”一样,是肿瘤细胞为了自身的生长所创造出来的一个复杂独特的环境,由非肿瘤细胞和胞外基质组成,是一个低氧、低pH、高压并含有大量的生长因子和蛋白水解酶的细胞生态环境。

肿瘤细胞有着许多区别于正常细胞的特征,如生长信号的自给自足、对生长抑制信号的不敏感、程序性细胞死亡的逃避、无限的复制潜能、持续的血管新生、组织侵袭和迁移等。利用肿瘤细胞和病毒的生物学特征,可以开发出多种OV。开发策略一般

分为两种,其一是将病毒在正常细胞中复制的关键基因敲除,而这些基因对于病毒在肿瘤细胞中的复制可有可无;其二是利用肿瘤或组织特异性的启动子将病毒复制的关键基因限制在肿瘤中表达^[9]。

1.1 靶向肿瘤组织的低氧环境

目前已知的癌症大都是实体瘤,当肿瘤细胞快速增殖时,由于氧气的大量消耗,其周围的微环境会处于一种低氧状态。氧气和营养物质只能扩散到实体瘤表面以下150 μm左右,处于内部的肿瘤细胞为了避免死亡会启动低氧相关的细胞反应,如代谢控制、血管舒张、血管新生等^[5]。因此,肿瘤微环境的低氧状态为OV治疗癌症提供了良好的靶标。

G-207是已进入临床试验的一种重组HSV-1。由于HSV-1的γ34.5基因产物ICP34.5具有神经毒性^[6],所以G207敲除了γ34.5。Manish等^[7]发现,G207在低氧条件下感染人脑胶质瘤细胞48h后的拷贝量是常氧条件下的3.6倍。在这种低氧条件下,肿瘤细胞会产生低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF),HIF能与靶基因上的低氧反应元件(hypoxia response elements, HER)或低氧响应启动

[基金项目] 东南大学教学改革研究项目资助(No. 2010-079);东南大学大学生科研训练项目资助(No. 13412022)。Project supported by the Southeast University Teaching Reform Project (No. 2010-079), and the Southeast University Students Research Training Project (SRTP) (No. 13412022)

[作者简介] 郭靖(1994-),男,甘肃天水人,本科生,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究,E-mail: uhre@163.com

[通信作者] 张建琼(Zhang Jianqiong, corresponding author), E-mail: zhjq@seu.edu.cn

子(hypoxia response promoter, HRP)结合,进而促进相应基因的转录。这些基因的转录往往与肿瘤转移、放疗化疗耐受相关^[8]。通过基因工程重组的手段,可以将OV的基因置于HER或HRP的调控之下^[9]。这样肿瘤细胞中富含的HIF就能促使OV的基因转录表达,而正常细胞中由于缺乏HIF而不被感染。Post等^[10]重组构建了低氧/HIF依赖的复制型腺病毒(hypoxia/HIF-dependent replicative adenovirus, HYPR-Ad)来靶向肿瘤的低氧环境。HYPR-Ad在低氧环境下表达E1A, E1A通过阻止细胞凋亡来提高OV在瘤内的复制,而在正常细胞中不会感染扩增。在前列腺癌中,哺乳动物正呼肠弧病毒(mammalian orthoreovirus, MRV)可以特异性感染低氧状态的肿瘤细胞使HIF-1 α 蛋白的表达下调,进而解除HIF诱导的抗凋亡反应,这为MRV靶向低氧环境治疗前列腺癌提供了力的依据^[11]。

1.2 靶向肿瘤组织的糖类代谢过程及酸性环境

为了适应低氧环境,大量的糖酵解在实体瘤内进行,使得肿瘤微环境中pH值呈现出明显的酸性条件,这对肿瘤细胞的侵染转移都有一定的促进^[12]。葡萄糖作为细胞最主要的碳源,是通过膜结合蛋白葡萄糖转运蛋白(glucose transporters, GLUT)以易化扩散的方式进入细胞的。GLUT1和GLUT3在许多肿瘤细胞中的上调是肿瘤发展中非常关键的一步,这使得其成为一个非常有前景的治疗靶点^[12]。针对肿瘤微环境中的酸性环境和葡萄糖代谢已有相应靶向治疗的研究^[13-14],但是OV在这方面的报道目前仍然较少,需要进一步探索。

1.3 靶向激活的表皮生长因子受体

在肿瘤微环境中存在的大量生长因子可以通过肿瘤细胞表面过表达的EGFR来激活Ras信号通路,产生一种磷脂酶拮抗PKR,进而促进OV复制。呼肠弧病毒能够天然靶向EGFR过表达的肿瘤细胞,进而在其中有效增殖^[15-16]。Uchida等^[17]通过基因工程修饰gB、gD两种病毒糖蛋白,使得HSV特异性靶向EGFR,并在小鼠脑胶质瘤模型中取得了良好的治疗效果。

2 改变肿瘤微环境提高OV的疗效

OV治疗肿瘤的关键取决于两个因素,一是病毒杀伤肿瘤的效果,二是病毒的靶向性。就靶向性而言,有些病毒具有天然的肿瘤细胞趋向性,其它OV则通过基因修饰方式获得。但是肿瘤微环境中中和抗体的生成、肿瘤浸润细胞以及胞外基质等都会阻碍OV的扩散复制^[18]。因此改变肿瘤微环境

成为提高OV溶瘤效果的一个新途径。

2.1 改变细胞外基质(extracellular matrix, ECM)

ECM通过与肿瘤细胞的对话来调整组织行为,从而在肿瘤细胞生长繁殖、血管新生和转移过程中发挥重要作用。Yaacov等^[19]在黑素瘤、肺癌等实体瘤中证实ECM尤其是其中的胶原、硫酸肝素对OV在瘤内的复制有着很大的阻碍。因此使用一些基质降解酶不仅可以影响肿瘤的血管新生、迁移,还可以促使病毒在肿瘤中发挥更好的溶瘤效果。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1和-8能够降解ECM中的硫酸化糖胺聚糖,使得肿瘤细胞的渗透系数升高,进而促进HSV在肿瘤中的传播扩散,所以表达MMP的肿瘤细胞在HSV溶瘤处理中表现出更好的疗效^[20]。此外,MMP还可以通过调节细胞生长、炎症、血管再生相关的信号通路甚至以非蛋白裂解的方式在整个肿瘤微环境中发挥重要的调节作用^[21]。松弛素则能够促使肿瘤的基质细胞发生重排,进而促进OV扩散,提高OV在肿瘤中的浓度,而且不会引起肿瘤细胞的转移^[22]。Dmitrieva等^[23]利用OV表达的软骨素酶ABC降解神经胶质瘤的ECM,提高了OV的传播和抗肿瘤效果。

2.2 抑制肿瘤血管新生

在没有血管提供氧气和营养的情况下,肿瘤的生长不会超过2 mm³。肿瘤细胞数超过10⁷以上时,就需要新生血管支持其进一步的生长和代谢,伴随着血管新生的启动,肿瘤组织周围的微环境发生改变,进一步促进血管新生,血管新生反过来又促进了肿瘤的生长和转移。

给荷瘤小鼠预先注射血管生成抑制剂cRGD能够明显提高OV的抗肿瘤效果^[24]。Alajez等^[25]在头颈鳞状细胞癌模型中将水疱性口炎病毒VSV Δ 51和血管干扰剂ZD6126结合使用,对照组出现了明显的肿瘤抑制,模型小鼠的存活率提高。CXCL12/CXCR4是肿瘤细胞和肿瘤微环境对话的一个重要信号通路,利用重组后表达CXCR4拮抗剂的OV感染小鼠乳腺癌细胞可以破坏肿瘤血管并且阻止乳腺癌细胞的转移^[26]。血小板反应蛋白(thrombospondin, TSP)-1可以通过抗肿瘤血管新生来抑制肿瘤的发展。重组表达人源性TSP-1的溶瘤HSV在人胃癌细胞中表现出明显的血管抑制和良好的溶瘤效果^[27]。研究^[28]发现用溶瘤牛痘病毒感染小鼠模型后,瘤内VEGF表达水平明显降低,抗肿瘤效果得到提高。在小鼠模型中将舒尼替尼与溶瘤牛痘病毒结合使用,疗效明显提高。

Collet等^[29]构建了表达可溶性VEGF受体-2

(sVEGFR2)的载体,并由 HRP 调节启动。将其感染人胚肾细胞和小鼠黑素瘤细胞发现,sVEGFR2 能够特定地在低氧条件下表达,与 VEGFA 发生特异性结合,减缓血管新生及肿瘤的生长。小鼠模型中,sVEGFR2 的表达随着 VEGFA 增加而提高,瘤内氧分压也随之增高。sVEGFR2 作为调节子使肿瘤微环境中血管新生趋于正常化而非阻断血管新生,这为 OV 在肿瘤治疗中应用提供了更多可能。

2.3 免疫抑制

OV 进入机体后,常会被血液中的抗病毒抗体中和,使其活性和溶瘤效果大大降低^[30]。机体主要通过两个天然免疫途径来抑制 OV 的效果:蛋白激酶 PKR 和 2',5'-寡腺苷酸(OAS)/RNase L 体系^[31]。OV 感染进入细胞后 IFN I 就会诱导 OAS 基因的转录,随后病毒双链 RNA 会激活 OAS-1, OAS-2, OAS-3, 进一步产生 2-5A [pppA(2' p5' A) n]。2-5A 使 RNase L 二聚化,进而剪切病毒和胞内 ssRNA 起到抑制病毒的效果;IFN I 也会诱导细胞表达丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PKR, PKR 被病毒双链 RNA 活化以后使得真核起始因子 eIF2 α 发生磷酸化,抑制鸟苷酸交换因子 eIF2B,使得 eIF2 α 处于活性抑制状态,进而抑制病毒蛋白质的合成。舒尼替尼能够通过抑制 RNase L 和 PKR 的活性来减弱抗病毒的固有免疫反应^[32]。Babal 等^[33]将 OV 疗法同舒尼替尼结合起来,发现能够抑制 eIF2 α 的磷酸化并提高病毒扩增效率和荷瘤小鼠存活率。

目前已有许多利用免疫抑制提高病毒在肿瘤中浓度和溶瘤效果的报道。环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)是一种抗肿瘤药物,同时也是一种免疫抑制剂。CPA 在体内的代谢产物可以干扰损伤 DNA,进而抑制肿瘤细胞的发展。已有研究^[34]证明,CPA 和 OV 联合使用能够促进抗肿瘤的效果。虽然免疫抑制剂能够提高 OV 的效果,但是需要严格限制用量,一旦使用不当,则会造成病毒发生全身性的蔓延。因此,营造一个仅在肿瘤局部免疫抑制的微环境具有重要意义。将 CY2B1(CPA-activating cytochrome P4502B1)和 CPT11-活化分泌型人体肠道羧酸酯酶(shiCE)克隆表达在溶瘤腺病毒中,两者可以将相应的药物前体活化,在肿瘤局部营造免疫抑制的微环境,大大提高溶瘤治疗的安全性^[35]。

事实上,由于肿瘤对免疫的“颠覆”机制,肿瘤微环境处于一种免疫抑制状态,属于前炎症状态或慢性炎症的微环境,允许 OV 在其中复制,但也利于肿瘤细胞的生存、发展以及转移和浸润;从肿瘤治疗

的方面来讲,需要将肿瘤微环境转变为不利于肿瘤的适度急性炎症状态,但这又会抑制 OV 的扩增复制^[36-38]。因此,在 OV 治疗中如何恰当地平衡肿瘤微环境的免疫状态是一个很重要的课题。

2.4 OV 结合其他手段治疗

单一的 OV 在治疗上具有很大的局限性,结合其他手段例如基因治疗往往能带来更好的效果。癌症靶向基因病毒治疗(cancer targeting gene-viro-therapy, CTGVT)是将某些抗肿瘤基因插入到 OV 中,从而将 OV 与基因治疗结合起来,取得更好的疗效。STI3 是一种结直肠癌特异性抑制基因, Liu 等^[39]利用 CEA 启动子驱动 E1A(Δ 24)表达进而促使病毒在肿瘤中的选择性复制,并将 STI3 插入到结直肠癌特异性的 OV: Ad·CEA·E1A(Δ 24)中,表现出比单独 OV 治疗或基因治疗更高的特异性和更强的抗肿瘤效果。

3 小结

尽管在最近十几年 OV 治疗肿瘤取得了许多进展,但是目前进入临床试验的 OV 非常少。如果能够通过分子生物学的手段改造病毒使其可以特异性靶向肿瘤微环境中的多个靶点,不仅提高了 OV 的靶向性和安全性,而且溶瘤效果也会有更大的提高。此外,也可以采用多种 OV 互相配合,同时结合其他各种治疗手段,实行多手段综合治疗。

[参考文献]

- [1] Dock G. The Influence of complicating diseases upon leukaemia [J]. Am J Med Sci, 1904, 127(4): 563-592.
- [2] DePace N. Sulla Scomparsa di un enorme cancro begetante del collo dell'utero senza cura chirurgica [J]. Ginecologia, 1912(9): 82.
- [3] Martuza RL, Malick A, Markert JM, et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant [J]. Science, 1991, 252(5007): 854-856.
- [4] Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(7): 658-670.
- [5] Rhim T, Lee DY, Lee M. Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy [J]. J Control Release, 2013, 172(2): 484-494.
- [6] Chou J, Kern ER, Whitley RJ, et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture [J]. Science, 1990, 250(4985): 1262-1266.
- [7] Aghi MK, Liu TC, Rabkin S, et al. Hypoxia enhances the replication of oncolytic herpes simplex virus [J]. Mol Ther, 2009, 17(1): 51-56.
- [8] Ch'Ng WC, Stanbridge EJ, Yusoff K, et al. The oncolytic activity of Newcastle disease virus in clear cell renal carcinoma cells in normoxic and hypoxic conditions: The interplay between von Hippel-Lindau and interferon-beta signaling [J]. J Interferon Cyto-

- kine Res, 2013, 33(7): 346-354.
- [9] Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL. Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1785(2): 217-231.
- [10] Post DE, Van Meir EG. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2003, 22(14): 2065-2072.
- [11] Gupta-Saraf P, Miller CL. HIF-1 α downregulation and apoptosis in hypoxic prostate tumor cells infected with oncolytic mammalian orthoreovirus [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(2): 561-574.
- [12] Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, et al. Targeting the metabolic microenvironment of tumors [J]. *Adv Pharmacol*, 2012, 65: 63-107.
- [13] Rastogi S, Banerjee S, Chellappan S, et al. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2007, 257(2): 244-251.
- [14] Ibrahim-Hashim A, Wojtkowiak JW, de Lourdes CRM, et al. Free base lysine increases survival and reduces metastasis in prostate cancer model [J]. *J Cancer Sci Ther*, 2011, Suppl 1(4): 1-12.
- [15] Strong J E, Coffey MC, Tang D, et al. The molecular basis of viral oncolysis: Usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus [J]. *EMBO J*, 1998, 17(12): 3351-3362.
- [16] Shmulevitz M, Marcato P, Lee PW. Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(52): 7720-7728.
- [17] Uchida H, Marzulli M, Nakano K, et al. Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(3): 561-569.
- [18] De Silva N, Atkins H, Kirn DH, et al. Double trouble for tumours: Exploiting the tumour microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(2/3): 135-141.
- [19] Yaacov B, Lazar I, Tayeb S, et al. Extracellular matrix constituents interfere with Newcastle disease virus spread in solid tissue and diminish its potential oncolytic activity [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 8): 1664-1672.
- [20] Mok W, Boucher Y, Jain RK. Matrix metalloproteinases-1 and -8 improve the distribution and efficacy of an oncolytic virus [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10664-10668.
- [21] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [22] Ganesh S, Gonzalez EM, Idamakanti N, et al. Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4399-4407.
- [23] Dmitrieva N, Yu L, Viapiano M, et al. Chondroitinase ABC I-mediated enhancement of oncolytic virus spread and antitumor efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1362-1372.
- [24] Kurozumi K, Hardeastle J, Thakur R, et al. Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(23): 1768-1781.
- [25] Alajez NM, Mocanu JD, Krushel T, et al. Enhanced vesicular stomatitis virus (VSV Δ 51) targeting of head and neck cancer in combination with radiation therapy or ZD6126 vascular disrupting agent [J]. *Cancer Cell Int*, 2012, 12(1): 27.
- [26] Gil M, Seshadri M, Komorowski MP, et al. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(14): E1291-E1300.
- [27] Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, et al. An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(2): 485-494.
- [28] Hou W, Chen H, Rojas J, et al. Oncolytic vaccinia virus demonstrates antiangiogenic effects mediated by targeting of VEGF [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(5): 1238-1246.
- [29] Collet G, Lamerant-Fayel N, Tertilt M, et al. Hypoxia-regulated overexpression of soluble VEGFR2 controls angiogenesis and inhibits tumor growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(1): 165-178.
- [30] Peng KW, Myers R, Greenslade A, et al. Using clinically approved cyclophosphamide regimens to control the humoral immune response to oncolytic viruses [J]. *Gene Ther*, 2013, 20(3): 255-261.
- [31] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(7): 559-568.
- [32] Jha BK, Polyakova I, Kessler P, et al. Inhibition of RNase L and RNA-dependent protein kinase (PKR) by sunitinib impairs antiviral innate immunity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 26319-26326.
- [33] Jha BK, Dong B, Nguyen CT, et al. Suppression of antiviral innate immunity by sunitinib enhances oncolytic virotherapy [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(9): 1749-1757.
- [34] Young BA, Spencer JF, Ying B, et al. The role of cyclophosphamide in enhancing antitumor efficacy of an adenovirus oncolytic vector in subcutaneous Syrian hamster tumors [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(9): 521-530.
- [35] Kasai K, Nakashima H, Liu F, et al. Toxicology and biodistribution studies for MGH2. 1, an oncolytic virus that expresses two prodrug-activating genes, in combination with prodrugs [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2:e113.
- [36] Wakimoto H, Ikeda K, Abe T, et al. The complement response against an oncolytic virus is species-specific in its activation pathways [J]. *Mol Ther*, 2002, 5(3): 275-282.
- [37] 施桂兰, 张叔人, 刘滨磊. 肿瘤微环境与炎症反应及溶瘤病毒治疗的关系 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(1): 87-92.
- [38] 吴克复. 肿瘤微环境与细胞生态学导论 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 251.
- [39] Zhou X, Xie G, Wang S, et al. Potent and specific antitumor effect for colorectal cancer by CEA and Rb double regulated oncolytic adenovirus harboring ST13 gene [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47566.

[收稿日期] 2014 - 05 - 06

[修回日期] 2014 - 11 - 03

[本文编辑] 黄静怡