

溶瘤腺病毒治疗膀胱癌研究进展

王 华,李德川 (浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

Research Progress in Oncolytic Adenoviral Therapy for Bladder Cancer

WANG Hua, LI De-chuan

摘 要:全文综述溶瘤腺病毒用于膀胱癌治疗的策略和研究进展。

关键词:膀胱肿瘤;腺病毒;肿瘤溶解;基因

中图分类号:R730.54;R737.14 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2008)07-0596-04

超过 70%的膀胱癌为表浅性膀胱癌,经尿道膀胱肿瘤切除术是表浅性膀胱癌的标准治疗方法。但术后易复发,即使卡介苗(BCG)膀胱内灌注治疗,仍有 20%~30%的患者肿瘤复发,10%~20%的患者发展为浸润性膀胱癌^[1]。浸润性膀胱癌预后不良,5 年生存率仅为 50%~60%^[2]。随着分子生物学的进展和人们对腺病毒生活周期的不断认识,可以通过改变腺病毒基因使病毒选择性地肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤细胞,而保护正常细胞不受影响。溶瘤病毒治疗就是使用基因改变的病毒特异性地破坏肿瘤,肿瘤细胞溶解释放出的病毒又可感染邻近组织,从而达到治疗肿瘤的目的。本文综述溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的研究进展。

1 腺病毒的 E1A 功能与细胞周期

腺病毒的复制需要细胞周期从 G₁ 期进入 S 期。腺病毒感染细胞后,其早期蛋白 E1A 与宿主细胞的 RB 蛋白结合,激活 E2F 转录因子,迫使细胞周期进入 S 期,从而为腺病毒的复制提供了良好环境。但是随着 E2F 的激活,p53 也被激活了。p53 蛋白使细胞周期阻止在 G₁ 期或诱导细胞凋亡,从而限制了病毒的复制。然而腺病毒的 E1B-55kD 蛋白可以结合并使 p53 蛋白失活,最终使细胞周期进入 S 期,从而使

收稿日期:2008-03-03;修回日期:2008-06-08

腺病毒在宿主细胞内复制^[3-5]。腺病毒 E1A 或 E1B-55kD 的功能对于腺病毒在肿瘤细胞(p53 或 RB 功能异常)内的复制并不重要,但对于腺病毒在正常细胞(p53 或 RB 功能正常)内的复制却非常重要。

2 腺病毒治疗肿瘤的策略

改变腺病毒的 E1A 或 E1B-55kD 基因使其相应的功能丧失,从而使腺病毒选择性地肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤细胞,而正常细胞即使被感染,病毒也不会复制。由此而重组了具有肿瘤选择性复制能力而正常细胞不受影响的肿瘤溶解腺病毒,即溶瘤腺病毒。

1996 年,Bischoff 等^[6]首先报道了 E1B-55kD 缺失的溶瘤腺病毒 dl1520(又称 ONYX-015)可以选择性地在 p53 功能异常的癌细胞内复制并破坏癌细胞,却不能在正常细胞内复制。这是因为 dl1520 丧失了 E1B-55kD 的活性而不能结合并失活宿主细胞的 p53 功能,因而在 p53 功能正常的细胞如正常细胞内不能复制,而在 p53 功能异常细胞如癌细胞内则可以大量复制。实验研究显示 ONYX-015 可明显抑制肿瘤的生长。但随后研究表明,dl1520 也能在 p53 野生型细胞内复制^[7]。对这一争论做出的解释是,其它蛋白如 p14ARF 和 mdm2 影响了 p53 的功能,p14ARF 下调 mdm2,而 mdm2 刺激 p53 蛋白的

降解,癌细胞缺失 *p14ARF* 基因也会引起 *p53* 功能丧失从而使 *dl1520* 可以在 *p53* 野生型的癌细胞内复制^[8]。后来研究表明,ONYX-015的复制与 *p53* 基因无关,而与晚期病毒 RNA 的输出有关,ONYX-015不能在正常细胞内复制是因为它感染的正常细胞内缺少晚期病毒 RNA 的输出,而 ONYX-015感染的癌细胞内却可见大量的晚期病毒 RNA 输出^[9]。最新研究表明,细胞周期调节剂 E(cyclin E)的过表达有利于腺病毒的复制,腺病毒的 *E1B* 基因显著影响几个细胞周期调节剂的表达,*E1B55K* 基因可增强肺纤维母细胞 WI38 细胞周期调节剂 E 的表达,而 *E1B55K* 基因突变的腺病毒不能诱导细胞周期调节剂 E 的高表达,从而阻止了病毒 DNA 在 WI38 内的复制。而 *E1B55K* 基因并不影响肿瘤细胞内细胞周期调节剂 E 的表达,因而 *E1B55K* 基因缺失的腺病毒可以在癌细胞内复制,癌细胞过表达细胞周期调节剂 E 与 *E1B55K* 缺失的腺病毒在癌细胞内复制有关^[10]。

另一种策略是使腺病毒 E1A 的 RB 结合位点发生突变,消除 E1A 与宿主细胞 RB 蛋白结合的能力,阻止受感染的细胞周期从 G₁ 期进入 S 期,从而阻止了腺病毒在正常细胞内的复制,而在癌细胞内的复制不受影响。*dl922-947*^[11]和 $\Delta 24$ ^[12]就是这种类型的病毒,这两个病毒具有相同的突变,即在 E1A 的 RB 结合部位有编码 8 个氨基酸的碱基缺失,致使 E1A 丧失了与 Rb 蛋白的结合能力。这类病毒以 RB 传导通路异常的肿瘤为靶向。临床前研究表明这类病毒能在肿瘤内复制并产生抗肿瘤效果,而在正常细胞内不复制。

近年来,为了更进一步提高溶瘤病毒对肿瘤的选择性和对正常细胞的安全性,E1A、E1B 双突变的腺病毒 AxdAdB-3^[13]和 CB1^[14]治疗胆囊癌和脑肿瘤的研究相继作了报道。结果表明,AxdAdB-3和 CB1 对正常细胞更安全,而抗肿瘤作用与单一突变的腺病毒 ONYX-015和 *dl922-947*极其相似。作者最近报道了 AxdAdB-3治疗膀胱癌的实验研究^[15]。

3 膀胱癌溶瘤病毒治疗研究

溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的研究也相继作了报道。E1A 或 E1B 单一突变的溶瘤腺病毒 Ads Ad5-d24、Ad5-d55K、Ad5WS1 显示了对膀胱癌细胞株具有较强的杀伤作用,对鼠的皮下肿瘤生长也有明显

的抑制效果^[16,17]。作者先前报道了 E1A 和 E1B 双突变的溶瘤腺病毒 AxdAdB-3对膀胱癌的治疗效果,结果显示:AxdAdB-3比单一突变体(AxE1AdB 和 *dl922-947*)具有更强的肿瘤溶解作用,对正常细胞几乎没有毒性,我们采用人类膀胱癌细胞株成功建立了鼠的原位膀胱肿瘤模型,膀胱内灌注 AxdAdB-3显著抑制了鼠的膀胱肿瘤生长,显著延长了鼠的生存时间^[15]。后来, Kim 等也报道了 E1A、E1B 双突变溶瘤腺病毒比 E1A 或 E1B 单一突变体具有更加强大的溶瘤效果^[18]。

溶瘤病毒治疗肿瘤必须考虑病毒给药途径。膀胱癌是溶瘤病毒治疗的理想靶向,因为病毒可通过导尿管直接注入膀胱,投药方法方便、简单、无痛苦。膀胱内灌注不会引起病毒全身播散,避免病毒的毒副作用,也没有免疫反应的问题。膀胱内灌注病毒可使肿瘤直接暴露于高滴度病毒中,感染效率会大大提高,溶瘤作用也会相应增强。与传统的复制缺陷性腺病毒载体相比,溶瘤病毒具有很大的优越性,溶瘤病毒感染并在癌细胞内大量复制,致使癌细胞溶解并释放出大量病毒,释放出的病毒可再次感染邻近组织细胞,如此反复循环,每一次循环病毒滴度都会成千上万倍地增加,直至肿瘤完全被破坏。

另一方面,膀胱癌具有多个基因的异常,包括 *p53*、*Rb*、*p16*^[19-21]。约 30%膀胱癌 *p53* 基因异常,高级别和高分期肿瘤约 50%有 *p53* 异常^[19]。*p53* 异常的膀胱癌治疗后易复发、进展,患者生存率也会下降^[22]。*p53* 基因膀胱内灌注治疗膀胱癌的 I 期临床试验显示了具有一定的疗效,但缺乏长期的随访结果^[23]。膀胱癌 *Rb* 基因异常约 20%,高级别和高分期肿瘤则 38%有 *Rb* 基因异常^[19,20]。膀胱癌 *p16* 基因异常发生率^[20],但膀胱癌细胞株导入 *p16* 基因可抑制癌细胞生长^[24]。溶瘤腺病毒以 *p53* 功能异常、*Rb* 传导通路异常的肿瘤为靶向,因此膀胱癌是溶瘤病毒治疗的理想靶向。

溶瘤腺病毒治疗转移性膀胱癌的实验研究也在进行着。Shieh 等建立了鼠的膀胱癌转移模型,采用溶瘤腺病毒治疗转移性膀胱癌显示了良好的治疗效果^[25]。

4 影响溶瘤病毒疗效的因素

腺病毒受体(CAR)对溶瘤病毒疗效的影响:腺

病毒感染细胞首先是通过 CAR 将病毒连接并吸附于细胞表面, 然后病毒纤维蛋白中的 Arg-Gly-Asp (RGD)肽链进一步与细胞结合素结合使病毒进入细胞内。研究表明,膀胱癌细胞株 CAR 的表达与腺病毒的感染效率密切相关,CAR 表达低的细胞株对腺病毒不敏感^[26]。在膀胱肿瘤中,分级、分期越高的肿瘤,CAR 的表达水平则越低^[27]。近年来,为提高腺病毒的感染效率,以 CAR 表达水平低的肿瘤为靶向,重组了纤维修饰腺病毒,即在腺病毒纤维部分插入 RGD,RGD 可直接与结合素结合而进入细胞,大大提高了腺病毒的感染效率^[28],因为大多数肿瘤都表达结合素 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ ^[29]。这类病毒对于膀胱癌的研究尚未报道。

给药途径对溶瘤病毒疗效的影响:溶瘤腺病毒肿瘤内注射^[30]、腹腔内注射^[31]、动脉内注射^[32]、静脉内注射^[33]治疗固体肿瘤的临床试验已有大量报道,肿瘤内注射的疗效明显优于全身给药,全身给药到达靶器官的病毒数量少,而且病毒全身投药会产生免疫反应降低病毒滴度^[34]。溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的临床试验尚未报道,但临床前研究表明,膀胱内灌注溶瘤病毒对膀胱癌具有显著的治疗效果,这些结果有待于临床试验进一步证实。

5 小结与展望

近 15 年来,学者们已认识到了基因治疗是治疗癌症强有力的手段。膀胱癌基因治疗相关的基础研究报道了很多,但临床研究还远远不够,膀胱癌转移的治疗仍然是今后研究的课题。膀胱癌常发生 p53 功能异常、Rb 传导途径异常,是溶瘤腺病毒治疗的理想靶向。病毒膀胱内灌注安全、有效、给药方便,因此,溶瘤病毒治疗膀胱癌是一种有前途的方法。溶瘤腺病毒全身投药治疗转移性膀胱癌,溶瘤病毒作为载体携带目的基因用于膀胱癌的诊断和基因治疗的研究有待于进一步进行。

参考文献:

[1] Herr HW, Wartinger DD, Fair WR, et al. Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: a 10-year followup[J]. J Urol, 1992, 147(4): 1020-1023.
[2] Tsukamoto T, Kitamura H, Takahashi A, et al. Treatment

of invasive bladder cancer: lessons from the past and perspective for the future[J]. Jpn J Clin Oncol, 2004, 34(6): 295-306.

[3] Ries S, Korn WM. ONYX-015:mechanism of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus [J]. Br J Cancer, 2002, 86(1): 5-11.
[4] McCormick F. Interactions between adenovirus proteins and the p53 pathway: the development of ONYX-015 [J]. Semin Cancer Biol, 2000, 10(6): 453-459.
[5] Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW. Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway?[J]. J Virol, 2001, 75 (12): 5443-5447.
[6] Bischoff JR, Kirn 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] Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells[J]. J Virol, 1998, 72(12): 9470-9478.
[8] Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, et al. Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015)[J]. Nat Med, 2000, 6(10): 1128-1133.
[9] O'Shea CC,Johnson L, Bagus B, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity[J]. Cancer Cell, 2004, 6(6): 611-623.
[10] Zheng X, Rao XM, Gomez-Gutierrez JG, et al. Adenovirus E1B55K region is required to enhance cyclin E expression for efficient viral DNA replication[J]. J Virol, 2008, 82(7): 3415-3427.
[11] Heise C, Hermiston T, Johnson L, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy [J]. Nat Med, 2000, 6 (10): 1134-1139.
[12] Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo[J]. Oncogene, 2000,19(1): 2-12.
[13] Fukuda K, Abei M, Ugai H, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63: 4434-4440.
[14] Gomez-Manzano C, Balague C, Alemany R, et al. A novel E1A-E1B mutant adenovirus induces glioma regression in vivo[J]. Oncogene, 2004, 23(10): 1821-1828.
[15] Wang H, Satoh M, Abe H, et al. Oncolytic viral therapy by bladder instillation using an E1A, E1B double-restricted adenovirus in an orthotopic bladder cancer model[J]. Urology, 2006, 68(3): 674-681.

- [16] van der Poel HG, Molenaar B, van Beusechem VW, et al. Epidermal growth factor receptor targeting of replication competent adenovirus enhances cytotoxicity in bladder cancer[J]. *J Urol*, 2002, 168(1): 266–272.
- [17] Hsieh JL, Wu CL, Lai MD, et al. Gene therapy for bladder cancer using E1B-55 kD-deleted adenovirus in combination with adenoviral vector encoding plasminogen kringle 1-5[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(9): 1492–1499.
- [18] Kim J, Kim JH, Choi KJ, et al. E1A-and E1B-Double mutant replicating adenovirus elicits enhanced oncolytic and antitumor effects[J]. *Human Gene Ther*, 2007, 18(9): 773–786.
- [19] Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, et al. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(6): 1393–1398.
- [20] Sourvinos G, Kazanis I, Delakas D, et al. Genetic detection of bladder cancer by microsatellite analysis of p16, RB1 and p53 tumor suppressor genes [J]. *J Urol*, 2001, 165(1): 249–252.
- [21] Xu HJ, Cairns P, Hu SX, et al. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression[J]. *Int J Cancer*, 1993, 53(5): 781–784.
- [22] Werthman PE, Drazan KE, Rosenthal JT, et al. Adenoviral-p53 gene transfer to orthotopic and peritoneal murine bladder cancer[J]. *J Urol*, 1996, 155(2): 753–758.
- [23] Pagliaro LC, Keyhani A, Williams D, et al. Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2247–2253.
- [24] Grim J, D'Amico A, Frizelle S, et al. Adenovirus-mediated delivery of p16-deficient human bladder cancer cells confers chemoresistance to cisplatin and paclitaxel [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(12 Pt 1): 2415–2423.
- [25] Wu CL, Shieh GS, Chang CC, et al. Tumor-selective replication of an oncolytic adenovirus carrying oct-3/4 response elements in murine metastatic bladder cancer models [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(4): 1228–1238.
- [26] Li Y, Pong RC, Bergelson JM, et al. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(2): 325–330.
- [27] Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, et al. Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer[J]. *Urology*, 2002, 60(3): 531–536.
- [28] Wakayama M, Abei M, Kawashima R, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus with RGD-fiber modification exhibits enhanced oncolysis for CAR-deficient biliary cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 3043–3050.
- [29] Dehari H, Ito Y, Nakamura T, et al. Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(1): 75–85.
- [30] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879–885.
- [31] Vasey PA, Shulman LN, Campos S, et al. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(6): 1562–1569.
- [32] Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, et al. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6070–6079.
- [33] Nemunaitis J, Senzer N, Sarmiento S, et al. A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(11): 885–893.
- [34] Demers GW, Johnson DE, Tsai V, et al. Pharmacologic indicators of antitumor efficacy for oncolytic virotherapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 4003–4008.