

基于黑猩猩腺病毒6型的新型溶瘤病毒抑瘤研究

王齐, 王一涵, 黎鹰, 邢嫚, 周东明[△]

天津医科大学基础医学院 病原生物学系(天津 300070)

【摘要】目的 以6型黑猩猩腺病毒(AdC6)为载体,构建一组新型溶瘤腺病毒,使之获得瘤内特异性复制能力。在体内外检测其抑瘤效果,并探讨其溶瘤机制。**方法** 以AdC6载体为基础,以人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子驱动该腺病毒的复制相关基因E1A表达,获得重组溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3,同源构建表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF/CSF₂)的AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)、复制缺陷型的腺病毒AdC6-ΔE1-ΔE3。重组腺病毒在HEK293细胞中包装,纯化后进行酶切鉴定。以上述3种腺病毒感染不同种类的肿瘤细胞(RD、SW-620、HeLa、Huh7、RM-1与MC-38),24 h后Western blot检测CSF₂的表达,72 h后CCK8实验检测肿瘤细胞的存活率。以上述3种腺病毒感染HeLa细胞,12 h、24 h、48 h后以Western blot检测凋亡信号通路蛋白表达水平。在C57BL/6小鼠背部皮下注射含有1×10⁶个小鼠结肠癌MC38细胞或小鼠前列腺癌RM-1细胞的细胞悬液,建立2种荷瘤小鼠模型实验,分为4组,每组分别瘤内注射50 μL的PBS、1×10⁸ PFU的AdC6-ΔE1-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)。当PBS组荷瘤小鼠的肿瘤达到2 500 mm³以上时统一处死小鼠,取肿瘤组织进行TUNEL染色,在显微镜下观察凋亡阳性细胞并计数。**结果** 酶切鉴定发现,成功构建了溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)及AdC6-ΔE1-ΔE3。Western blot检测发现,AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)能够感染不同的肿瘤细胞,并稳定表达外源基因CSF₂。CCK8实验结果表明AdC6-htertE1A-ΔE3和AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)对RD、SW-620、HeLa、Huh7、RM-1与MC-38等多种肿瘤细胞具有明显的杀伤效果;相较于复制缺陷的腺病毒AdC6-ΔE1-ΔE3,感染复数为100 MOI时的AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)对肿瘤细胞的杀伤效果极为明显(P<0.05)。Western blot实验证明AdC6-htertE1A-ΔE3和AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)通过激活P53依赖的通路,诱导肿瘤细胞凋亡。在前列腺癌及结肠癌荷瘤小鼠模型中注射溶瘤病毒可显著抑制肿瘤生长,甚至清除肿瘤。**结论** 以AdC6为载体的溶瘤病毒通过促凋亡机制在体内外杀伤肿瘤,具有治疗肿瘤的巨大潜力。

【关键词】 黑猩猩腺病毒6型 溶瘤病毒 端粒酶逆转录酶启动子

Anti-Tumor Effect of a Novel Oncolytic Virus Based on Chimpanzee Adenovirus Type 6 WANG Qi, WANG Yi-han, LI Ying, XING Man, ZHOU Dong-ming[△]. Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhoudongming@tmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct, with chimpanzee adenovirus serotype 6 (AdC6) as the vector, a novel oncolytic adenovirus, enabling it to selectively replicate intratumorally, to test its tumor suppressive effect *in vitro* and *in vivo*, and to study its oncolytic mechanism. **Methods** Based on the AdC6 vector, the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter was used to drive the expression of E1A, the adenovirus replication-related gene, and the recombinant oncolytic virus AdC6-htertE1A-ΔE3 was thus obtained. The oncolytic virus AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂) expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF/CSF₂) and replication-deficient adenovirus AdC6-ΔE1-ΔE3 were constructed by homologous recombination, respectively. The recombinant adenovirus was packaged in HEK293 cells, purified and then identified with restriction enzyme digestion. Different types of tumor cells, including RD, SW-620, HeLa, Huh7, RM-1 and MC-38 were infected with the three adenoviruses. Twenty-four hours after infection, Western blot was used to determine the expression of CSF₂ 24 hours after infection. CCK8 assay was used to determine the survival rate of tumor cells 72 hours after infection. HeLa cells were infected with the three adenoviruses, and the expression levels of apoptosis signaling pathway proteins were examined with Western blot at 12 h, 24 h, and 48 h. C57BL/6 mice were subcutaneously injected with cell suspension containing 1×10⁶ MC38 murine colon cancer cells and RM-1 murine prostate cancer cells to construct two tumor-bearing mice models. The tumor-bearing mice were divided into 4 groups, receiving intratumoral injection of 50 μL of PBS, AdC6-ΔE1-ΔE3 (1×10⁸ PFU), AdC6-htertE1A-ΔE3 (1×10⁸ PFU), and AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂) (1×10⁸ PFU), respectively. When the tumor size of PBS group reached 2 500 mm³, all the mice were sacrificed and the tumor tissue was collected for TUNEL staining. Then, apoptosis-positive cells were observed and counted under a microscope. **Results** Restriction digestion revealed that the oncolytic viruses AdC6-htertE1A-ΔE3, AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂) and AdC6-ΔE1-ΔE3 were successfully constructed. Western blot confirmed

that AdC6-htertE1A- Δ E3 (CSF₂) could infect different tumor cells and stably express CSF₂, the exogenous gene. CCK8 results showed that AdC6-htertE1A- Δ E3 and AdC6-htertE1A- Δ E3 (CSF₂) had obvious killing effects on RD, SW-620, HeLa, Huh7, RM-1 and MC-38. Compared with the replication-deficient adenovirus AdC6- Δ E1- Δ E3, AdC6-htertE1A- Δ E3 and AdC6-htertE1A- Δ E3 (CSF₂) at a multiplicity of infection of 100 MOI had extremely obvious killing effects on tumor cells ($P < 0.05$). Western blot showed that AdC6-htertE1A- Δ E3 and AdC6-htertE1A- Δ E3 (CSF₂) induced tumor cell apoptosis by activating the P53-dependent pathway. Injection of oncolytic virus in tumor-bearing mouse models of prostate cancer and colorectal cancer could significantly inhibit the tumor growth and even clear the tumor.

Conclusion Oncolytic virus based on AdC6 could eliminate tumor *in vivo* and *in vitro* through mechanisms that induced apoptosis, showing great potential for the treatment of tumors.

【Key words】 Chimpanzee adenovirus type 6 Oncolytic virus Human telomerase reverse transcriptase promoter

2020年全球共出现1 930万癌症新发病例和1 000万癌症死亡病例^[1],癌症严重威胁人类的生命健康。目前针对肿瘤的治疗方法主要有手术、放疗、化疗以及分子靶向治疗。但肿瘤的多样性、耐药性、浸润性,加上复杂的肿瘤微环境,使得传统的治疗方法并不能彻底治愈肿瘤。溶瘤病毒的出现为肿瘤治疗提供了一种新的治疗策略,溶瘤病毒能够选择性感染并裂解肿瘤细胞,但不影响正常细胞^[2]。大多数溶瘤病毒都采用基因修饰增强肿瘤的靶向性,避免对非宿主细胞的毒性。腺病毒载体是目前最具应用前景的疫苗载体之一,因其具有高表达、安全性好、易于制备、无需添加佐剂、可同时诱导特异性体液免疫和细胞免疫反应等优点,被广泛应用于各种预防性或治疗性疫苗的研发。在肿瘤基因治疗领域,腺病毒常用作基因治疗及构建溶瘤病毒,溶瘤腺病毒已成为最具发展前景的抗肿瘤免疫疗法之一。

目前常用的溶瘤腺病毒载体为人血清型5型腺病毒(AdHu5),其中以AdHu5为载体的溶瘤病毒H101结合化学治疗已经在中国批准上市,用于治疗头颈部鳞状细胞癌^[3]。但由于人群中普遍存在抗AdHu5的预存中和抗体^[4-5],其治疗效果受到一定的影响;另有研究表明,AdHu5 Hexon蛋白中的高变区与凝血因子X结合,导致腺病毒对肝脏具有亲嗜性,从而影响其作为溶瘤病毒的治疗效果^[6-7]。因此研究人员探索将人稀有血型或来源于其它物种的腺病毒作为溶瘤病毒的载体。目前为止,以6型黑猩猩腺病毒(AdC6)为载体构建溶瘤病毒的研究尚未见报道。在本研究中,我们将AdC6中早期转录单位E1的原有启动子用肿瘤特异性启动子人端粒酶逆转录酶启动子(hTERT)所代替,构建溶瘤病毒AdC6-htertE1A- Δ E3、表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF/CSF₂)的AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)及复制缺陷型的腺病毒AdC6- Δ E1- Δ E3,通过CCK8实验、凋亡信号通路蛋白表达水平检测及荷瘤小鼠模型实验,观察溶瘤病毒体内抑瘤作用,

现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胚肾HEK293细胞、人宫颈癌HeLa细胞、人恶性胚胎横纹肌瘤RD细胞、人肝癌Huh7细胞、人结肠癌SW620细胞、小鼠前列腺癌RM-1细胞、小鼠结肠癌MC38细胞均由本实验室保存。所有细胞均采用含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基,放置于37℃、体积分数5% CO₂的培养箱中进行培养。C57BL/6小鼠(6~8周龄)购自北京斯贝福生物技术有限公司。

CCK8试剂与0.25% Trypsin-EDTA购自新赛美生物科技有限公司,CSF₂抗体购自Sino Biological, Cleaved-PARP (Asp214)、磷酸化P53 (Ser46)、Bax、磷酸化Bad (Ser112) [Ser75]、Bik、P21 Cip1抗体购自Affinity, β -actin抗体购自Proteintech, HRP偶联的山羊抗兔二抗购自Abcam。

1.2 重组腺病毒的构建及鉴定

以人端粒酶启动子驱动腺病毒复制,删除E1B55K与E3区域并用AdHu5的E4 ORF6序列代替原有的E4 ORF6序列,溶瘤腺病毒AdC6-htertE1A- Δ E3由南京金斯瑞公司合成,并利用同源重组的方法构建溶瘤腺病毒AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)与复制缺陷型的腺病毒AdC6- Δ E1- Δ E3。重组腺病毒质粒用Pac I酶切后,转染HEK293细胞,在HEK293细胞中包装,待细胞出现噬斑后,收集细胞,在-80℃和37℃之间反复冻融3次后继续感染HEK293细胞扩增病毒,待收集一定量的病毒后,利用氯化铯密度梯度离心的方式纯化病毒,提取病毒基因组。用Apa I、Bgl II、Xho I酶切纯化后的病毒基因组验证病毒的完整性,其余病毒分装后放置于-80℃冰箱保存。

1.3 Western blot检测CSF₂的表达

以剂量为10¹⁰ vp的AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)感染不

同种类的肿瘤细胞(RD、SW-620、HeLa、Huh7、RM-1与MC-38), 并以同剂量的AdC6- Δ E1- Δ E3与AdC6-htertE1A- Δ E3感染的肿瘤细胞作为对照, 感染24 h后收集细胞上清, 按体积比1:5加入5 \times SDS上样缓冲液混匀, 煮沸5 min使蛋白质变性。样本冷却后进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并在5%脱脂牛奶中封闭2.5 h。1%的TBST洗膜3次, 用稀释后的抗CSF₂抗体(1:5 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 然后用1%的TBST洗膜3次, 在室温下与二抗孵育2 h。加入ECL显影液显影, 检测CSF₂的表达。

1.4 CCK8实验检测肿瘤细胞的存活率

将6种肿瘤细胞接种于96孔板, 密度为1 \times 10⁴个细胞/孔, 放入37 $^{\circ}$ C细胞培养箱过夜培养。24 h后将重组腺病毒AdC6- Δ E1- Δ E3、AdC6-htertE1A- Δ E3、AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)分别以1 MOI、10 MOI、100 MOI感染肿瘤细胞, 每个滴度做5个复孔, 不加病毒的细胞孔作为空白孔, 放置培养箱后继续培养, 72 h后每孔加入10 μ L CCK8试剂, 放置细胞培养箱孵育1~2 h后, 在450 nm和620 nm测其光密度(OD)值。细胞存活率=[OD₄₅₀(实验孔)-OD₆₂₀(实验孔)]/[OD₄₅₀(空白孔)-OD₆₂₀(空白孔)], 每次实验重复3次。

1.5 Western blot检测相关凋亡蛋白的表达

为了探讨重组溶瘤病毒AdC6-htertE1A- Δ E3、AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)是否通过诱导肿瘤细胞凋亡从而发挥溶瘤作用, 我们采用Western blot检测相关凋亡蛋白的表达。以复制缺陷型腺病毒AdC6- Δ E1- Δ E3为对照组, β -actin作为内参, 分别以10 MOI的AdC6- Δ E1- Δ E3、AdC6-htertE1A- Δ E3、AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)感染HeLa细

胞, 在12 h、24 h、48 h时间点收集蛋白, Western blot检测磷酸化的P53以及促凋亡蛋白Bad、Bik和Bax的表达, 以 β -actin为内参进行比较。

1.6 MC38与RM-1荷瘤小鼠模型的构建与溶瘤治疗

在C57BL/6小鼠背部皮下注射含有1 \times 10⁶个MC38与RM-1的细胞悬液, 每天观察并测量肿瘤大小。待肿瘤生长至40~80 mm³, 随机分成4组, 分别为PBS组、AdC6- Δ E1- Δ E3组、AdC6-htertE1A- Δ E3组、AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)组。每组分别瘤内注射50 μ L的PBS、AdC6- Δ E1- Δ E3(1 \times 10⁸ PFU)、AdC6-htertE1A- Δ E3(1 \times 10⁸ PFU)、AdC6-htertE1A- Δ E3(CSF₂)(1 \times 10⁸ PFU), 每隔3 d注射一次, 共注射2次。每隔3 d测量肿瘤大小并记录, 待对照组(PBS组)小鼠肿瘤长至2 500 mm³以上时, 所有实验小鼠在同一时间进行安乐死。取肿瘤组织进行称重, 并用石蜡包埋, 做成组织切片, 进行TUNEL染色, 在显微镜下观察凋亡阳性细胞并计数。

1.7 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 6进行统计学分析。若各组数据服从正态分布组间比较使用ANOVA分析, 若各组不服从正态分布, 组间比较用非参数检验(Kruskal-Wallis), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溶瘤腺病毒基因组酶切鉴定

对病毒基因组进行酶切, 酶切产物与标准图谱比较, 3种重组腺病毒的基因组酶切片段的的大小完全正确(图1), 没有发生片段的缺失, 表明重组腺病毒构建成功。

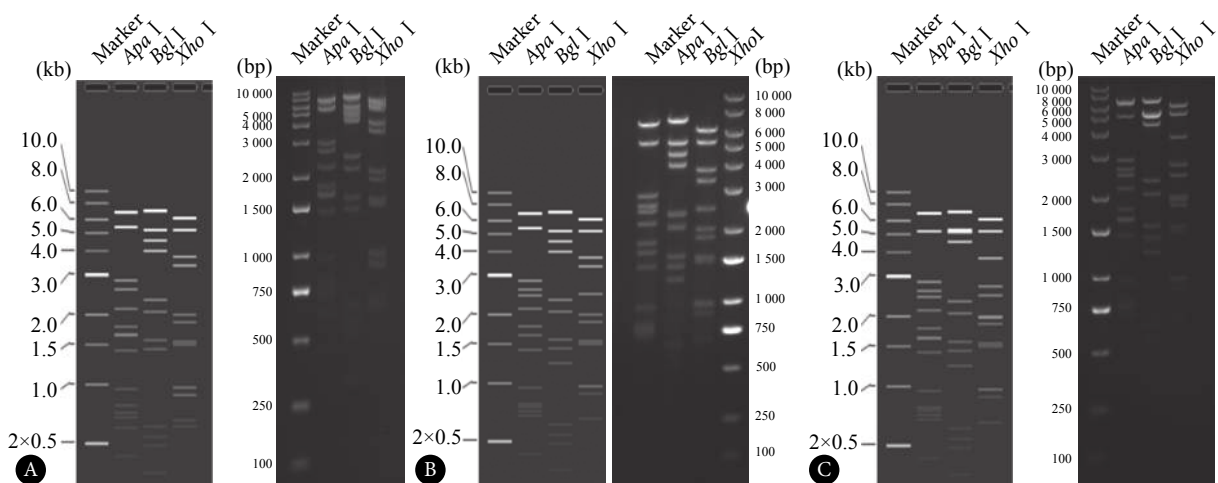


图1 重组腺病毒噬斑形成与基因组的酶切鉴定

Fig 1 Plaque formation of recombinant adenovirus and identification of the genome by restriction enzyme digestion

A: AdC6- Δ E1- Δ E3; B: AdC6-htertE1A- Δ E3; C: AdC6-htertE1A- Δ E3 (CSF₂).

2.2 溶瘤腺病毒表达CSF₂

Western blot检测结果如图2所示, 重组腺病毒AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)能够感染不同的肿瘤细胞, 并稳定表达外源基因CSF₂。

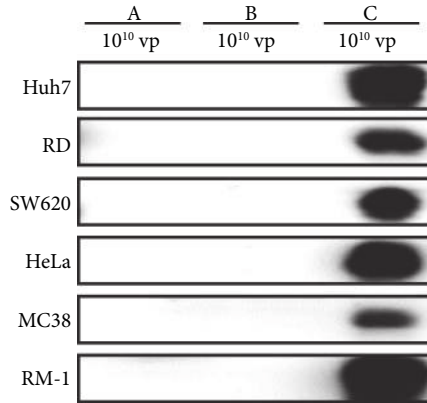


图 2 溶瘤腺病毒携带的CSF₂在多种肿瘤细胞系中均稳定表达

Fig 2 The CSF₂ exogenous gene carried by oncolytic adenovirus was stably expressed in various tumor cell lines

A: AdC6-ΔE1-ΔE3; B: AdC6-htertE1A-ΔE3; C: AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂).

2.3 溶瘤腺病毒体外杀伤肿瘤细胞

如图3所示, 溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)对RD、SW-620、HeLa、Huh7、RM-1与MC-38等多种肿瘤细胞具有明显的杀伤效果。当感染复数为100 MOI时, 溶瘤腺病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)相较于复制缺陷的腺病毒

AdC6-ΔE1-ΔE3, 对肿瘤细胞的杀伤效果极为明显($P < 0.05$)。证明了重组溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)能够有效杀伤以上肿瘤细胞, 表明该溶瘤病毒具有一定的抑瘤广谱性。

2.4 溶瘤腺病毒对肿瘤细胞中凋亡相关蛋白的调节作用

结果如图4所示, 相较于AdC6-ΔE1-ΔE3(对照组), 溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)感染HeLa细胞后, 磷酸化的P53蛋白的表达量明显增加, 其下游基因p21编码的蛋白表达量也相对增加, 促凋亡蛋白磷酸化的Bad、Bik和Bax的表达也显著上升。

2.5 溶瘤腺病毒抑制小鼠移植瘤的增长

如图5所示, 在RM-1荷瘤小鼠中, AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)溶瘤病毒治疗组与PBS组和复制缺陷型腺病毒AdC6-ΔE1-ΔE3处理组相比, 其肿瘤增长速度明显减慢, 显著抑制肿瘤的发展进程。AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)治疗组与PBS组、AdC6-ΔE1-ΔE3处理组之间肿瘤体积差异有统计学意义($P < 0.05$), 但AdC6-htertE1A-ΔE3和AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)治疗组之间肿瘤体积差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外溶瘤病毒治疗组的肿瘤质量也小于对照组($P < 0.05$)。TUNEL染色显示, 溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3和AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)治疗组凋亡细胞数多于对照组($P < 0.05$)。

如图6所示, 在MC38荷瘤小鼠中, AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)能够显著抑制肿瘤的生

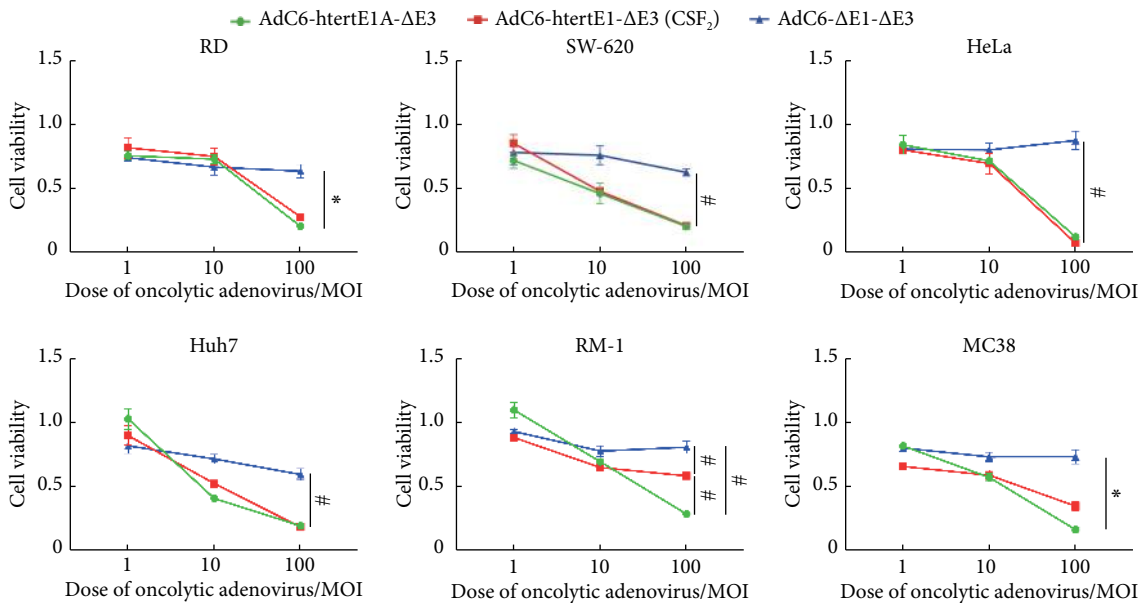


图 3 溶瘤腺病毒作用不同人源及鼠源肿瘤细胞72 h后对细胞活性的影响

Fig 3 Oncolytic adenovirus showed dose-dependent lethality for different human and mouse tumor cell lines

n=5, * $P < 0.01$, # $P < 0.0001$.

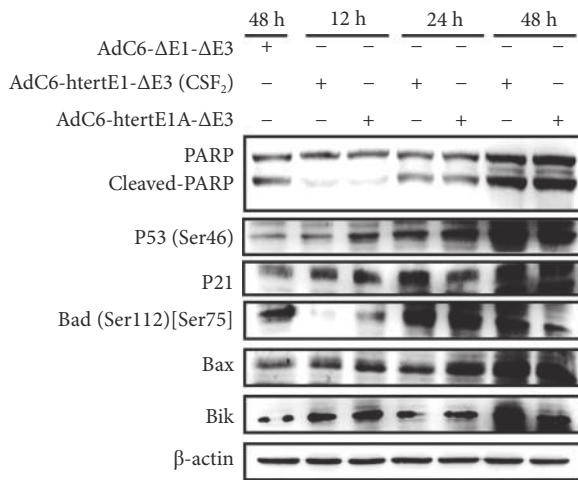


图 4 溶瘤腺病毒在体外诱导凋亡通路相关标志蛋白

Fig 4 The expression of apoptosis pathway related marker proteins was induced to increase in time-dependent manner *in vitro*

长, 诱导肿瘤体积下降。溶瘤腺病毒AdC6-htertE1A-ΔE3治疗组中, 5只老鼠中有3只小鼠的肿瘤完全消失, AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂)治疗组中5只小鼠的肿瘤完全被清除, 无法取瘤体进行后继肿瘤质量测量和TUNEL染色。

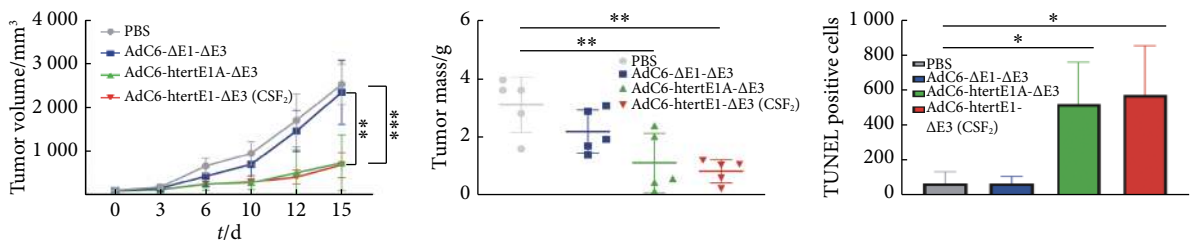


图 5 溶瘤腺病毒在RM-1荷瘤小鼠显著抑制肿瘤进展

Fig 5 Oncolytic adenovirus significantly inhibited tumor progression in RM-1 tumor-bearing mice and induced tumor apoptosis

n=5, *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001.

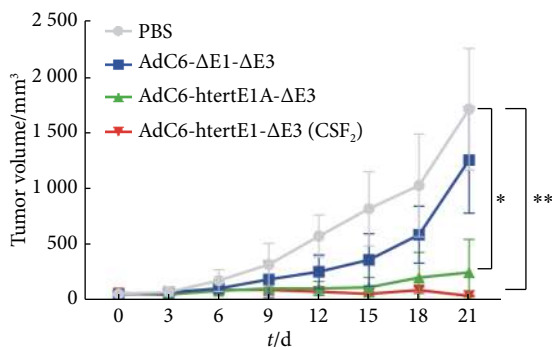


图 6 溶瘤腺病毒在MC38荷瘤小鼠显著抑制肿瘤进展

Fig 6 Oncolytic adenovirus significantly inhibited tumor progression in MC38 tumor-bearing mice

n=5, *P<0.05, **P<0.01.

在本研究中, 我们利用AdC6, 构建了肿瘤特异性启动子端粒酶逆转录酶启动子驱动腺病毒复制的溶瘤病

3 讨论

溶瘤病毒是治疗肿瘤的一种新型手段^[8]。常用的溶瘤病毒有痘苗病毒^[9]、腺病毒^[10-11]、疱疹病毒^[12]、新城疫病毒^[13-14]、脊髓灰质炎病毒^[15-16]。其中, 腺病毒由于自身独特的优势成为了溶瘤病毒研究的热点之一。腺病毒作为溶瘤病毒的优势十分明显: ①对腺病毒研究比较透彻, 充分了解其基因的结构、功能以及与宿主相互作用。腺病毒基因组约为36 kb, 易于进行基因改造; ②腺病毒不会整合到宿主基因组中, 不会产生插入突变, 安全性好; ③腺病毒可以感染多种哺乳动物的细胞。溶瘤腺病毒主要需要解决的问题是进一步提供其肿瘤靶向性与溶瘤效率。第一个进入临床试验的溶瘤腺病毒dl1520 (Onyx-015) 删除了病毒E1B55K基因, 从而使病毒能够在肿瘤细胞中复制, 而不影响正常的细胞, 具有一定靶向性和抗肿瘤效果^[17]。另外, 使用肿瘤特异性启动子驱动腺病毒E1A的表达, 从而使腺病毒可以选择性地在肿瘤细胞复制。常用的肿瘤特异性启动子有端粒酶启动子^[18]、前列腺特异性抗原启动子^[19]、酪氨酸酶启动子^[20]等。

毒。为了加强溶瘤效果, 构建表达CSF₂的溶瘤病毒。在不同肿瘤细胞系中, 我们探讨溶瘤腺病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂)对肿瘤的治疗效果。通过检测CSF₂的表达, 我们证实AdC6表达CSF₂的系统可以在不同肿瘤细胞中正常表达, 在随后的CCK8实验中, 证明溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3 (CSF₂)能够杀伤不同肿瘤细胞。本研究选择了对溶瘤病毒敏感的鼠源肿瘤细胞小鼠前列腺癌RM-1细胞、小鼠结肠癌MC38细胞, 构建了RM-1和MC38荷瘤小鼠模型, 进一步验证了我们构建的溶瘤病毒对以上两种肿瘤都有明显的抑瘤效果。

目前, 所报道的第一种以黑猩猩腺病毒为载体的溶瘤病毒为AdC7-SP/E1A-ΔE3, 该研究以黑猩猩腺病毒7型(AdC7)为载体, E1区启动子被肿瘤特异性启动子生存素启

动子代替,删除了E3区域。该溶瘤腺病毒可以在许多类型的肿瘤细胞系中复制,在NCI-H508和Huh7荷瘤小鼠模型中取得良好的治疗效果^[21]。本研究首次利用黑猩猩6型腺病毒作为溶瘤病毒。相较于源于AdC7不依赖于P53的线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[21]与源于Ad5的溶瘤病毒诱导肿瘤细胞自噬^[22]的溶瘤机制不同,AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)杀伤肿瘤细胞,是通过激活P53通路,调节促凋亡蛋白的表达上调,诱导肿瘤细胞凋亡。

黑猩猩腺病毒在人群中很少流传,因此人群中很少有相应的预存中和抗体,在以往研究中证实AdC6血清阴性率低于AdHu5^[23],黑猩猩腺病毒无论是作为疫苗载体还是溶瘤病毒,其安全性、特异性、有效性都已被证明^[24]。

综上所述,基于AdC6改造而成的溶瘤病毒AdC6-htertE1A-ΔE3、AdC6-htertE1A-ΔE3(CSF₂)在RM-1与MC38荷瘤小鼠中取得了良好的抑瘤效果,证明其对相应的肿瘤治疗具有巨大潜力,可进一步向临床应用推进。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] CAO G D, HE X B, SUN Q, *et al*. The oncolytic virus in cancer diagnosis and treatment. *Front Oncol*, 2020, 10: 1786[2021-12-14]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01786>.
- [3] YAMAMOTO M, CURIEL D T. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 243–250.
- [4] MAST T C, KIERSTEAD L, GUPTA S B, *et al*. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*, 2010, 28(4): 950–957.
- [5] WANG X, XING M, ZHANG C, *et al*. Neutralizing antibody responses to enterovirus and adenovirus in healthy adults in China. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3(5): e30[2021-12-14]. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.30>.
- [6] STEPANENKO A A, CHEKHONIN V P. Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX. *Virus Res*, 2018, 257: 40–51.
- [7] WADDINGTON S N, MCVEY J H, BHELLA D, *et al*. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell*, 2008, 132(3): 397–409.
- [8] PETER M, KUHNEL F. Oncolytic adenovirus in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3354[2021-12-14]. <https://doi.org/10.3390/cancers12113354>.
- [9] RIVADENEIRA D B, DEPEAUX K, WANG Y Y, *et al*. Oncolytic viruses engineered to enforce leptin expression reprogram tumor-infiltrating T cell metabolism and promote tumor clearance. *Immunity*, 2019, 51(3): 548–560.e4[2021-05-21]. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.003>.
- [10] LANG F F, CONRAD C, GOMEZ-MANZANO C, *et al*. Phase I study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: Replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol*, 2018, 36(14): 1419–1427.
- [11] ABUDOUREYIMU M, LAI Y, TIAN C, *et al*. Oncolytic adenovirus—A nova for gene-targeted oncolytic viral therapy in HCC. *Front Oncol*, 2019, 9: 1182[2021-12-14]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01182>.
- [12] THOMAS S, KUNCHERIA L, ROULSTONE V, *et al*. Development of a new fusion-enhanced oncolytic immunotherapy platform based on herpes simplex virus type 1. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 214[2021-12-14]. <https://jitc.bmj.com/content/7/1/214>.
- [13] VIJAYAKUMAR G, MCCROSKERY S, PALESE P. Engineering newcastle disease virus as an oncolytic vector for intratumoral delivery of immune checkpoint inhibitors and immunocytokines. *J Virol*, 2020, 94(3): e01677-19[2021-12-14]. <https://doi.org/10.1128/JVI.01677-19>.
- [14] VIJAYAKUMAR G, PALESE P, GOFF P H. Oncolytic newcastle disease virus expressing a checkpoint inhibitor as a radioenhancing agent for murine melanoma. *EBio Medicine*, 2019, 49: 96–105.
- [15] BROWN M C, HOLL E K, BOCZKOWSKI D, *et al*. Cancer immunotherapy with recombinant poliovirus induces IFN-dominant activation of dendritic cells and tumor antigen-specific CTLs. *Sci Transl Med*, 2017, 9(408): eaan4220[2021-12-14]. <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aan4220>.
- [16] MOSAHEB M M, DOBRIKOVA E Y, BROWN M C, *et al*. Genetically stable poliovirus vectors activate dendritic cells and prime antitumor CD8 T cell immunity. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 524[2021-12-14]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13939-z>.
- [17] BAKER A T, AGUIRRE-HERNANDEZ C, HALLDEN G, *et al*. Designer oncolytic adenovirus: Coming of age. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(6): 201[2021-12-14]. <https://doi.org/10.3390/cancers10060201>.
- [18] HU Z, ROBBINS J S, PISTER A, *et al*. A modified hTERT promoter-directed oncolytic adenovirus replication with concurrent inhibition of TGFβ signaling for breast cancer therapy. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(4): 235–243.
- [19] RODRIGUEZ R, SCHUUR E R, LIM H Y, *et al*. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, 1997, 57(13): 2559–2563.
- [20] ZHANG L, AKBULUT H, TANG Y C, *et al*. Adenoviral vectors with E1A regulated by tumor-specific promoters are selectively cytolytic for breast cancer and melanoma. *Mol Ther*, 2002, 6(3): 386–393.
- [21] CHENG T, SONG Y, ZHANG Y, *et al*. A novel oncolytic adenovirus based on simian adenovirus serotype 24. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26871–26885.
- [22] ITO H, AOKI H, KUHNEL F, *et al*. Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(9): 625–636.
- [23] LI J, ZHAO Q Q, ZHANG S J, *et al*. The prevalence of neutralising antibodies to chimpanzee adenovirus type 6 and type 7 in healthy adult volunteers, patients with chronic hepatitis B and patients with primary hepatocellular carcinoma in China. *Arch Virol*, 2014, 159(3): 465–470.
- [24] GUO J A, MONDAL M, ZHOU D M. Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(7): 1679–1685.

(2021-06-26收稿, 2021-12-15修回)

编辑 汤 洁