

溶瘤腺病毒治疗前列腺癌研究进展

徐一鹏,王 华

(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘 要:我国前列腺癌发病率呈逐年上升的趋势。早期前列腺癌有治愈可能,但进展期或转移性前列腺癌无法治愈。近年来,具有肿瘤选择性复制并杀伤肿瘤细胞而对正常细胞毒性较低的溶瘤腺病毒治疗前列腺癌的研究有诸多报道,临床前研究已经显示了其强大的溶瘤效果,临床研究也验证了其抗肿瘤效果和安全性,溶瘤腺病毒单独及联合放化疗治疗去势抵抗性前列腺癌的研究显示了一定的疗效。

关键词:前列腺癌;溶瘤腺病毒;基因治疗;雄激素受体;去势抵抗

中图分类号:R737.25 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2015)07-0581-08

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2015.07.A010

Research Progress in Oncolytic Adenoviral Therapy for Prostate Cancer

XU Yi-peng, WANG Hua

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Prostate cancer has increased rapidly in China. Patients with prostate cancer can be curative only in early stage. At present, no curative management for advanced or metastatic disease is available. Recently, oncolytic adenoviruses which can able to replicate in and lysis cancer cells while sparing normal cells, have been reported in the treatment of prostate cancer. Preclinical studies have demonstrated its potent oncolysis efficiency, antitumor effect and its safety. Combination therapy of adenovirus and radio- or chemo- therapy for prostate cancer has also been reported.

Key words: prostate cancer; oncolytic adenovirus; gene therapy; androgen receptor; castration resistant

前列腺癌在欧美为男性发病率最高,死亡率居第2位的恶性肿瘤。近年来我国前列腺癌呈现急剧增加的趋势。由于我国尚未普及以前列腺特异性抗原(PSA)为基础的人群筛查,约70%患者在就诊时已处于进展期或转移性癌^[1]。早期局限性前列腺癌多采用根治性治疗,如根治性手术、放疗、离子植入、高能超声聚焦等。根治性前列腺切除术被认为是治疗局限性前列腺癌最有效的手段,但早期局限性前列腺癌术后仍有约35%患者出现生化复发以及肿瘤转移,局部进展期前列腺癌约50%在治疗后会出发生化复发和肿瘤转移^[2]。转移性前列腺癌5年生存率约28%^[3]。转移性前列腺癌患者大多使用挽救

性治疗如内分泌治疗、化疗等延长生存时间和缓解症状。但内分泌治疗只是在一定时间内有效,所有患者最终会发展为去势抵抗性前列腺癌。多西他赛为基础的化疗药物可改善去势抵抗性前列腺癌患者的生存,但化疗耐药最终导致化疗失败^[4,5]。近年来,随着前列腺癌去势抵抗的机制以及对雄激素受体通路的研究进展,开发了抑制细胞内雄激素合成的药物如阿比特龙^[6]和非甾体抗雄激素新药恩杂鲁胺(enzalutamide)^[7],但这些制剂只能在一定程度上延缓疾病进展,最终会出现耐药导致疾病进展致患者死亡。

为了提高前列腺癌的治疗效果和改善患者的预后,新的治疗手段包括溶瘤腺病毒疗法正在不断探索^[8]。溶瘤腺病毒是一种新型抗癌制剂,腺病毒经过基因改造后可以选择性地在肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤,而对正常细胞伤害较小。溶瘤腺病毒从基础研

收稿日期:2015-01-28;修回日期:2015-03-13

基金项目:浙江省自然科学基金(LY12H16031);

浙江省医药卫生科技计划项目(2012KYA025)

通讯作者:王华, E-mail:hwangua@aliyun.com

究进入临床试验均显示了其安全性,病毒基因不会整合至宿主细胞的基因组,腺病毒基因改造操作容易,肿瘤细胞具有多个基因的突变恰恰是溶瘤腺病毒的理想靶向。另外,对病毒基因进行修饰可以增强病毒感染、复制、传播及宿主的免疫逃逸能力,从而增强溶瘤腺病毒的抗肿瘤效果,溶瘤腺病毒联合其他治疗方法如化疗、放疗、基因治疗和免疫治疗等可提高疗效。因此,溶瘤腺病毒被认为是治疗肿瘤有前途的手段之一。

1 溶瘤腺病毒肿瘤选择性复制机制

腺病毒治疗肿瘤源于20世纪50年代^[9],采用野生型腺病毒治疗肿瘤,虽然显示了一定的疗效,但野生型腺病毒既可以在肿瘤细胞内复制,也可以在正常细胞内复制并伤害正常细胞,病毒对正常细胞的伤害导致了严重的不良反应,因而难以在临床上推广。随着分子生物学的不断发展以及对腺病毒结构和功能的研究,对腺病毒进行基因改造修饰,限制病毒在正常细胞内的复制,提高病毒对肿瘤组织的特异性。理想的治疗肿瘤的腺病毒应该具备肿瘤细胞的选择性或特异性,而正常细胞不受伤害的特点。目前有两种方法可以限制腺病毒在正常细胞内的复制:一种方法是对病毒进行基因修饰改造,消除病毒基因编码的蛋白与正常细胞蛋白的结合,拆除了腺病毒在正常细胞内复制的必要条件从而限制了病毒在正常细胞内的复制;另一种方法是在腺病毒基因内插入编码肿瘤细胞特异性蛋白的基因启动子来驱动病毒基因的表达,使病毒选择性地表达某种特异性蛋白的肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤^[10]。

腺病毒的复制需要细胞周期进入S期,野生型腺病毒感染细胞后,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的环境。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,从而限制了病毒复制。然而腺病毒的E1B55KD蛋白可以结合并使p53蛋白失活,最终使细胞周期进入S期,从而使腺病毒能够在宿主细胞内复制。为了阻止腺病毒在正常细胞内的复制,对腺病毒进行基因修饰改造,消除腺病毒E1B55KD,丧失了其与细胞p53蛋白结合

的能力,p53蛋白可正常发挥作用阻止细胞周期进展,限制了病毒在正常细胞内复制。同样,对腺病毒E1A区与Rb蛋白结合位点基因施行消除或替换突变,消除E1A与Rb蛋白的结合能力,不能激活E2F转录因子,防止了细胞进入S期,限制了病毒复制。经过这样修饰过的E1A或/和E1B突变腺病毒即使感染正常细胞由于不能改变细胞周期,缺乏腺病毒复制的必要条件,因而不能在正常细胞内复制,避免了病毒对正常细胞的伤害,从而提高了腺病毒治疗肿瘤的安全性。但是,对腺病毒的E1A或/和E1B基因进行修饰对肿瘤细胞是不重要的,因为大多数肿瘤包括前列腺癌,具有广泛的细胞周期调控因子的基因突变,包括Rb、p16、Bcl-2、p53、p27等,致使细胞周期失控,有利于腺病毒复制。因此,前列腺癌适于溶瘤腺病毒治疗。

另一种战略是在腺病毒基因上插入组织或肿瘤特异性的启动子来控制病毒的复制^[11]。正常前列腺和前列腺癌组织细胞表达雄激素和雄激素受体调控的前列腺特异性抗原(PSA)、人类腺激肽释放酶2(hK2)和probasin蛋白,以及雄激素受体非依赖的前列腺特异性膜抗原(PSMA)、骨特异性蛋白和骨钙素(OC)。前列腺癌还高表达人端粒酶逆转录酶(hTERT)。在腺病毒基因组(通常是E1A和E1B区)插入前列腺或前列腺癌特异性表达的基因启动子,则病毒只在前列腺或前列腺癌组织内复制,而在正常细胞和非前列腺细胞内不能复制,具有肿瘤高度选择性复制的特点。前列腺特异性启动子研究最多的是PSA基因启动子,PSA具有前列腺高度特异性,无论是正常前列腺组织还是前列腺癌均表达PSA,通常利用PSA的组织特异性将治疗基因直接导入前列腺组织,PSA基因增强子核心区域包含与AR高度亲和力的雄激素应答元件(ARE),ARE促进PSA的基因表达,雄激素和雄激素受体调节PSA启动子的活性。因此,在腺病毒的E1A或/和E1B基因部分插入前列腺特异性启动子/增强子(PSE)来驱动腺病毒的表达和复制,使得腺病毒可以在表达雄激素受体的前列腺细胞内复制,而不表达雄激素受体的非前列腺组织细胞由于前列腺特异性启动子处于沉默状态,不能驱动腺病毒复制,从而使腺病毒的复制限制在前列腺细胞内,提高腺病毒对靶细胞的特异性。

2 溶瘤腺病毒治疗前列腺癌的临床前研究

2.1 细胞周期依赖性复制选择性溶瘤腺病毒 (以 p53, Rb 转导途径异常的肿瘤为靶向)

最早报道的复制选择性溶瘤腺病毒是 dl1520 (又叫做 ONYX-015), 该病毒具有 E1B55KD 缺失, 能选择性地在 p53 基因突变的肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤细胞, 而在正常细胞内不能复制^[12]。另一方面, E1A 区 Rb 结合位点突变的腺病毒 dl922-947^[13]和 $\Delta 24$ ^[13]不能结合并失活 Rb 蛋白, 因而在 Rb 转导途径正常的细胞如正常细胞内不能复制, 然而在 Rb 转导途径异常的细胞如肿瘤细胞内可以复制。由于 E1A 或 E1B 单一突变的腺病毒被报道在正常细胞内仍有一定程度的复制^[14,15], 我们先前报道了 E1A 和 E1B 双突变的溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 治疗前列腺癌的研究^[16], 该病毒既有 E1B55KD 缺失也有 E1A 区 Rb 结合位点的突变, 消除了腺病毒与细胞 p53 和 Rb 蛋白结合的能力, 进一步限制了其在正常细胞内的复制, 研究结果表明 AxdAdB-3 比 E1A 或 E1B 单一突变体 (dl922-947, AxElAdB) 具有更强的肿瘤杀伤效果, 对正常细胞几乎没有毒性。我们采用人前列腺癌细胞株 DU145 成功建立了 SCID 小鼠原位前列腺癌模型, 肿瘤内注射 AxdAdB-3 抑制了小鼠前列腺肿瘤生长, 延长了小鼠生存时间^[16]。另一种限制病毒在正常细胞内复制的方法是删除腺病毒的 E1B19kD (抗凋亡蛋白), 可降低正常细胞对死亡受体诱导的信号转导和凋亡, 从而降低了腺病毒对正常细胞的伤害, Ad $\Delta\Delta$ 是 E1A 的 Rb 结合位点突变的腺病毒而且缺失抗凋亡蛋白 E1B19kD, 而且保留了 E3 区, 用于前列腺癌的临床前研究, 病毒复制能力及溶瘤效果与野生型腺病毒相似, 由于腺病毒保留了完整的 E3 区, E3 可以抑制宿主免疫反应, 减少病毒被清除, 因此其抗肿瘤效果更进一步增强^[17]。腺病毒感染能力与细胞表面腺病毒受体 (CAR) 的表达密切相关, 肿瘤细胞缺乏 CAR 的表达会降低病毒感染效率和溶瘤效果, 为了增强溶瘤腺病毒的感染能力, 在腺病毒的纤维部分链接精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 肽链, 可以特异性地与细胞表面的整合素 $\alpha v\beta 3$ 或 $\alpha v\beta 5$ 结合, 即整合素依赖的感染。Suzuki 等^[18]重组了 Ad5-D24RGD, 包含 E1A

的 Rb 结合位点突变, 同时, 在病毒纤维部分链接了 RGD 肽链, 与不含 RGD 肽链的 Ad5-D24 (等同于 $\Delta 24$) 病毒相比, Ad5-D24RGD 显著性增强了对 LNCaP 细胞的感染能力及杀伤效果。我们的研究结果同样显示了腺病毒介导的细胞杀伤效果与细胞的腺病毒受体 (CAR) 的表达水平呈正相关。前列腺癌细胞株 (DU145) 高表达 CAR, 显示了对腺病毒的易感性和强大的细胞杀伤效果, 而 PC3 低表达 CAR, 显示了相对弱的细胞杀伤效果^[16]。因此, 我们在 Ax-dAdB-3 纤维部分连接 RGD 肽链, 重组了 AxdAdB3/F-RGD, 探讨了其对前列腺癌的治疗效果, 结果表明, AxdAdB3/F-RGD 无论是对 CAR 阳性还是阴性细胞株均显示了强大的细胞杀伤效果, 其抑制 PC3 小鼠皮下肿瘤模型生长的效果显著性高于 AxdAdB-3 组。由于病毒复制致使肿瘤裂解、坏死, 而肿瘤组织坏死不利于病毒向邻近组织进一步扩散, 另外, 病毒注入有机体内激发了宿主细胞的免疫系统, 从而清除病毒, 降低了治疗效果。为了克服这些缺点, 研究者重组了溶瘤腺病毒 ORCA-010 (Ad5-D24RGD-T1), 该病毒包含 E1A 与 Rb 结合位点的突变, 同时在病毒纤维部分插入 RGD 肽链, 还有 E3/19K 基因的突变促进宿主细胞裂解和病毒释放, 体内体外实验显示 ORCA-010 比第一代溶瘤腺病毒 Ad5-D24RGD 或 ONYX-015 具有更强的抑制前列腺癌的效果^[19]。

2.2 组织特异性启动子调控的复制选择性溶瘤腺病毒 (以表达 PSA 和 PSMA 的肿瘤为靶向)

腺病毒感染肿瘤面临的挑战之一是病毒对靶器官的特异性。一种战略是前述的对腺病毒进行基因修饰来完成的。另一种战略是在腺病毒基因上连接肿瘤特异性的启动子来控制病毒的复制。前列腺或前列腺癌细胞特异性表达某种受体, 如 PSA、hK2、probasin、PSMA、OC 和 hTERT。在腺病毒的 E1A 或 E1B 基因插入前列腺特异性的启动子 (PSE) 来调控 E1A 和 E1B 的功能, 使腺病毒的复制限制在前列腺或前列腺癌细胞内, 提高腺病毒对靶细胞特异性复制的能力, 构建高度组织特异性的复制选择性腺病毒。

最早报道的前列腺组织特异性复制的溶瘤腺病毒是 CN706, 该病毒是在腺病毒的 E1A 区插入 PSA 基因的增强子 (PSE), 由 PSA 调控 E1A 基因表达,

使得该病毒只能在产生 PSA 的细胞内复制,具有前列腺特异性靶向性,CN706 在产生 PSA 的前列腺癌细胞株(LNCaP)内的复制能力与 CN702(缺乏 PSE)相似,而在不产生 PSA 的前列腺癌细胞株(DU145)内的复制能力比 CN702 下降了 2000 倍,体内实验同样显示:CN706 显著性抑制了 LNCaP 建立的小鼠皮下肿瘤,10 只荷瘤小鼠中 5 只在治疗后肿瘤消退,而 CN706 对 DU145 皮下肿瘤模型无治疗效果,显示了 CN706 对产生 PSA 的前列腺肿瘤具有高度选择性复制及溶瘤效果,临床上超过 95%前列腺癌都产生 PSA,因而 CN706 适合前列腺癌治疗^[20]。hK2 和 PSA 都是人类激肽释放酶基因家族的相关成员,hK2 基因近侧启动子区域有雄激素应答元件(ARE),hK2 增强子/启动子在 PSA 阳性的 LNCaP 细胞是活化的,但在 PSA 阴性的细胞失活,Yu 等^[21]在腺病毒的 E1A 区插入 PSA 基因增强子(PSE),调控 *E1A* 基因,同时在 E1B 区插入 hK2 增强子/启动子,调控 *E1B* 基因,构建了腺病毒 CV764,该病毒选择性地地在 PSA 阳性的 LNCaP 细胞内复制,其对 LNCaP 的溶瘤效果比 PC3(PSA 阴性)细胞高出 10 000 倍,显示了对表达 PSA 前列腺癌的高度特异性。虽然 CN706 和 CV764 显示了对前列腺癌的特异性复制和溶瘤效果,但对转移性前列腺癌模型的治疗效果不佳。因此,Yu 等^[22]构建了溶瘤腺病毒 CV787,该病毒在 E1A 部分插入大鼠 probasin 启动子,同时在 E1B 区插入 PSE,与 CN706 和 CV764 不同的是,CV787 保留了腺病毒的 E3 区,显示了对转移性前列腺癌的治疗效果(小鼠尾静脉注射治疗 LNCaP 建立的皮下肿瘤模型)。转移性前列腺癌最常见的转移部位为骨转移。骨钙素(OC)是一个非胶原骨基质蛋白,在前列腺癌组织和骨转移灶组织都高表达。有学者重组了复制型腺病毒 Ad-OC-E1a,在 E1A 部分插入 OC 基因的启动子,调控腺病毒的 *E1A* 基因,将腺病毒限制在表达 OC 转录活性的细胞内复制,该病毒无论是对产生 PSA 的前列腺癌细胞株 LNCaP、C4-2、ARCaP,还是对不产生 PSA 的细胞株 PC3 和 DU145 都有杀伤效果,Ad-OC-E1a 还对骨细胞和前列腺间质细胞的生长有抑制作用,静脉注射病毒显著性抑制了前列腺癌骨转移性肿瘤的生长。该作者认为 Ad-OC-E1a 的抗肿瘤效果优于先前报道的 PSE 调控的前列腺癌特异性复制型腺病毒 Ad-PSE-

E1a(CN706)^[23]。另有研究报道在腺病毒的 E1A 和 E4 区插入 PSE 增强子,构建了溶瘤腺病毒 AdE4PSESE1a,可以特异性地在 PSA/PSMA 阳性的细胞内复制,由于 E4 在腺病毒的感染、复制和细胞杀伤效果方面发挥着重要作用,PAE4PSESE1a 显示了与野生型腺病毒相似的复制能力和细胞杀伤效果^[24]。研究报道约 80%人类癌组织端粒酶活性增高,而端粒酶的活性受到人端粒酶逆转录酶(hTERT)的调节,hTERT 的活性在肿瘤组织内显著性升高。因此,在腺病毒的 E1 区插入 hTERT 启动子来驱动病毒 E1 的表达,构建出溶瘤腺病毒(OBP-301)可以选择性地地在高表达 hTERT 的前列腺癌细胞(LNCa,PC3,DU145)内复制并杀伤肿瘤细胞,而在不表达 hTERT 的正常细胞(PrEC,PrSC)内不复制,显示了肿瘤高度选择性复制的特点;同时,OBP-301 肿瘤内注射显著性抑制 LNCaP 细胞建立的小鼠皮下肿瘤模型生长^[25]。

2.3 溶瘤腺病毒增强了复制缺陷性腺病毒载体的基因表达

由于溶瘤腺病毒单独使用治疗肿瘤的效果有限,需要联合其他治疗方法来提高疗效。使用复制型腺病毒增强转基因表达是常用的战略之一。基因治疗采用表达治疗基因的腺病毒载体是常用的手段,但复制缺陷性腺病毒载体由于 E1 缺失而不能复制,基因转染效率低,影响了抗肿瘤效果。溶瘤腺病毒与复制缺陷性腺病毒载体共同感染肿瘤细胞,由于复制型腺病毒提供了 *E1* 基因,使得复制缺陷性腺病毒载体基因表达增强,从而提高了基因治疗效果,联合治疗具有溶瘤和基因治疗的双重效果。

Ad-hOC-E1 是由骨钙素(hOC)启动子基因调控的可以选择性地在前列腺上皮细胞和间质细胞内复制的溶瘤腺病毒,Ad-Flk1-Fc 是复制缺陷性腺病毒载体,包含 VEGFR-2(Flk1)胞外段和 IgG2a Fc 段融合基因,该基因转染肿瘤细胞和血管内皮细胞,使之表达 Flk1-Fc,捕获血液中的 VEGF,阻断细胞自/旁分泌产生的 VEGF 与 VEGFR-2 结合,从而抑制血管新生和肿瘤生长。学者探讨了溶瘤腺病毒 Ad-hOC-E1 联合复制缺陷性腺病毒载体 Ad-Flk1-Fc 治疗前列腺癌,结果表明,溶瘤腺病毒增强了复制缺陷性腺病毒载体的基因表达,联合应用显示了溶瘤效果和抑制血管新生的双重效果,采用雄激素非依赖转移

性前列腺癌细胞株 C4-2 建立了小鼠皮下肿瘤模型, Ad-Flk1-Fc 或 Ad-hOC-E1 单一使用使小鼠皮下肿瘤体积缩小了 40%~60%, 而联合使用使肿瘤体积缩小了 90%^[26]。同样, E1A 的 Rb 结合位点缺失的溶瘤腺病毒 dl922/947, 与 E1 缺失的复制缺陷性腺病毒载体 Ad-Flk1-Fc 共同感染前列腺癌 PC3 细胞, 由于溶瘤腺病毒的感染可向 E1 缺失的腺病毒提供 E1, 从而增强了转基因表达, dl922/947 具有肿瘤选择性复制并杀伤肿瘤细胞的特点, 而 Ad-Flk1-Fc 转染细胞可抑制血管新生和肿瘤生长, 两种病毒单独瘤内注射使用均可抑制 PC3 建立的小鼠皮下肿瘤生长, 两者联合应用显示了更加明显的抗肿瘤效果, 体内体外实验均显示联合使用显著增强了 Flk1-Fc 的表达^[27]。

2.4 溶瘤腺病毒作为载体介导的基因治疗

溶瘤腺病毒具有肿瘤选择性复制的特点, 将溶瘤腺病毒连接治疗基因转染肿瘤细胞, 不仅可以特异性地将治疗基因导入肿瘤细胞, 而且病毒复制可扩增目的基因, 达到溶瘤和基因治疗的双重效果。

转化生长因子 β (TGF- β) 在前列腺癌骨转移中发挥着重要作用, 抑制 TGF- β 转导途径将会抑制前列腺癌骨转移, 学者构建了一个溶瘤腺病毒载体 Ad.sT β RFc, 表达 sTGF β RIIFc, 后者可直接与 TGF- β 结合并抑制 TGF- β 途径, 结果表明, 前列腺癌细胞株被 Ad.sT β RFc 感染后检测到了 sTGF β RIIFc 蛋白的表达, 并且抑制了 TGF- β 转导通路, 同时也显示了病毒在细胞内的复制及细胞杀伤效果, 静脉注射表达 sTGF β RIIFc 的复制缺陷性腺病毒载体和 Ad.sT β RFc 都显著性抑制了 PC-3 建立的小鼠骨转移灶肿瘤的生长, 但 Ad.sT β RFc 的治疗效果更加明显, 显示了溶瘤和基因治疗的双重抗肿瘤效果^[28]。溶瘤腺病毒 Ad5- Δ 24-sOPG-Fc-RGD, 是在先前报道的 E1A 的 Rb 结合位点突变的溶瘤腺病毒 Δ 24 融合了骨保护素 (Osteoprotegerin, 又称破骨细胞抑制因子) 和 Fc 基因, 同时在病毒纤维部分插入 RGD (整合素依赖的感染) 肽链。Ad5- Δ 24-sOPG-Fc-RGD 显著性抑制了小鼠前列腺癌骨转移模型的生长^[29]。前列腺特异性复制的溶瘤腺病毒需要雄激素激活前列腺特异性启动子来驱动腺病毒复制, 但是接受雄激素去除疗法的患者由于雄激素水平低下而影响了前列腺特异性启动子驱动的病毒复制。针对这些问题, 学者重组了前列腺特异性复制型腺病毒 Ad5-PSE/PBN-

E1A-ARC685Y, 其 E1A 区融合了突变的雄激素受体 (AR) 的 cDNA, 雄激素受体的点突变改变了雄激素受体与其配体结合的特异性, 无论是雄激素还是非甾体类抗雄制剂均可以激活病毒复制, 腺病毒联合比卡鲁胺和放疗显著性抑制了 C4-2 建立的小鼠皮下肿瘤模型^[30]。另有学者报道了溶瘤腺病毒载体介导的免疫基因治疗, 构建了携带免疫基因的前列腺癌特异性溶瘤腺病毒载体 Ad-PL-PPT-E1A, 携带 PSA 和 CD40L 融合蛋白基因 (PSA-IZ-CD40L, PL), 由于该病毒载体融合了前列腺癌特异性启动子 PPTp, 包含有 PSA 增强子 PSAe、前列腺特异性膜抗原增强子 PSMAe 和 TARPp (T 细胞受体 γ 链替代阅读框蛋白) 顺序连接而成, 这些结构调控腺病毒 E1A 基因, 使病毒可以选择性地在前列腺癌细胞内复制并杀伤前列腺癌细胞株, CD40L 与肿瘤抗原融合表达, 能通过 CD40L 的靶向作用将肿瘤抗原带到 DC 表面, 进而有效激活机体抗肿瘤免疫反应。Ad-PL-PPT-E1A 显著性抑制了前列腺癌移植瘤的生长^[31]。

2.5 溶瘤腺病毒联合其他疗法治疗前列腺癌

尽管诸多报道显示了溶瘤腺病毒可以抑制肿瘤生长, 但几乎没有报道显示溶瘤腺病毒单独治疗使肿瘤完全消退。因此, 研究者探讨溶瘤腺病毒联合传统的放化疗来提高治疗效果。Yu 等^[32]报道了 CV706 (等同于 CN706) 可增强放疗对前列腺癌的敏感性, 采用 PSA 阳性的 LNCaP 细胞建立小鼠皮下肿瘤模型, CN706 联合放疗与 CN706 单独治疗相比, 肿瘤坏死增加了 180%, 与单独放疗相比, 肿瘤坏死增加了 690%。同样, 溶瘤腺病毒 CG7870 (原先称为 CV787) 联合放疗治疗前列腺癌显示了协同效果, LNCaP 建立的小鼠皮下肿瘤模型, 溶瘤腺病毒和放疗单独治疗 39 天后, 肿瘤体积分别为基线的 121% 和 126%, 但联合治疗组肿瘤体积为基线的 34%, 显示了溶瘤腺病毒联合放疗显著性优于单一疗法^[33]。溶瘤腺病毒联合化疗的研究也显示了良好的效果。CV787 联合化疗药物紫杉醇也包括多西他赛在前列腺癌治疗方面显示了协同效果, LNCaP 细胞分别被病毒感染或多西他赛处理 8 天后, 细胞生存率分别为 80% 和 86%, 而两者联合处理后细胞生存率只有 10%, 联合治疗显著性抑制细胞生长; 采用 LNCaP 细胞建立小鼠皮下肿瘤模型, 尾静脉注射 CV787 或多西他赛治疗, 单独治疗组肿瘤在 5 周内处于稳定,

而联合组肿瘤完全消退。联合治疗疗效显著性优于单一制剂, 尽管联合治疗产生的协同作用其机制尚不清楚^[34]。YB-1 结合蛋白的细胞定位调节与多重耐药相关的基因 *MDR1* 和 *MRP1* 的表达, 研究者构建了溶瘤腺病毒 Xvir03 表达 E1B55K 和 E4orf6, 由于腺病毒的 E1B55K 参与 YB-1 蛋白的细胞定位, Xvir03 感染不但具有溶瘤效果, 也下调了多耐药基因 *MDR1* 和 *MRP1* 的活性, 从而增强了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[35]。前列腺特异性的溶瘤腺病毒 (AdE4PSESE1a) 联合多西他赛治疗前列腺癌的研究表明, 多西他赛可增加 PSA/PSMA 阳性的前列腺癌细胞株 C4-2、CWR22rv 的 CAR 和整合素 $\beta 1$ 的表达, 并且增加腺病毒的转染效率, 多西他赛联合 AdE4PSESE1a 显示了明显的细胞杀伤效果, 显著性抑制 CWR22rv 建立的小鼠皮下肿瘤生长^[36]。第一代溶瘤腺病毒 dl1520 (E1B55kD 缺失) 和 dl922-947 (E1A 区 Rb 结合位点突变) 联合多西他赛治疗前列腺癌, 体内体外实验结果均显示联合治疗显著性优于单一制剂。DU145 建立的小鼠皮下肿瘤模型, 溶瘤腺病毒和多西他赛单独使用, 平均小鼠生存时间分别为 84 天和 68 天 (对照组为 44 天), 而溶瘤腺病毒联合多西他赛治疗组, 显著性延长疾病进展时间至 168 天, 联合治疗显示了明显的治疗效果^[37]。我们最近探讨了 E1A、E1B 双突变溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 联合化疗药物多西他赛, 吉西他滨和 5-Fu 治疗前列腺癌的实验研究, 结果表明, 联合治疗显示了显著性细胞杀伤效果, AxdAdB-3 联合吉西他滨显著性抑制了 PC3 建立的小鼠皮下肿瘤模型, 联合治疗组约 80% 小鼠达到了完全缓解, 而单独治疗组无完全缓解。

3 溶瘤腺病毒治疗前列腺癌的临床研究

前列腺是非必需器官, 而且超声引导下前列腺内注射治疗剂是非常简便而且临床上常用的手段, 因此, 前列腺内注射溶瘤腺病毒作为前列腺癌的辅助治疗或局部复发患者的挽救性治疗是非常有用的, 局部注射高浓度病毒也不易引起全身严重不良反应。最早报道临床上用于前列腺癌患者治疗的溶瘤腺病毒是 CV706 (又称作 CN706), 20 例放疗后复发的前列腺癌, 采用经直肠超声定位下经会阴将病毒直接注入前列腺内, I 期临床显示了其安全性, 并

显示了一定的疗效, 这是溶瘤腺病毒首次在临床上用于治疗前列腺癌的报道^[38]。随后, 前列腺特异性溶瘤腺病毒 CG7870 治疗前列腺癌的 I 期临床研究作了报道, CG7870 保留了腺病毒 E3, 可以抑制宿主免疫反应, 从而增强溶瘤效果, 静脉注射治疗去势抵抗性前列腺癌, 常见不良反应为类似流感的症状 (发热, 疲劳, 寒战, 恶心和/或呕吐)。70% (16/23) 的患者血液中可检测到病毒的复制, 尽管接受治疗的患者未发生严重毒副反应, 但效果不甚理想, 23 例患者中只有 5 例患者血清 PSA 下降 25%~49%^[39]。另一个研究采用表达自杀基因的溶瘤腺病毒载体治疗前列腺癌, 腺病毒载体 Ad5-CD/TKrep 为 E1B55K 和 E3 缺失的腺病毒 (等同于 ONYX-015) 携带双自杀基因, 对 16 例放疗后复发的前列腺癌患者采用挽救性前列腺内注射病毒载体进行治疗, 94% 患者有轻度至中度不良反应, 44% (7/16) 患者血清 PSA 下降超过 25%, 19% (3/19) 患者血清 PSA 超过 50%。治疗后的肿瘤组织学上显示了转基因表达和肿瘤坏死^[40]。继续对这 16 例患者随访 5 年, 88% (14/16) 患者存活, 75% (12/16) 患者接受挽救性内分泌治疗, 接受基因治疗的患者 PSA 双倍时间从 17 个月延长至 31 个月。该作者认为对于放疗后 PSA 复发的患者, 采用表达自杀基因的溶瘤腺病毒 Ad5-CD/TKrep 治疗是一种不错的选择^[41]。Ad5-CD/TKrep 前列腺内注射联合外放疗对 15 个新诊断的中高危前列腺癌患者进行治疗, 平均随访 9 个月, 结果显示了联合治疗显著优于单一放疗结果^[42]。同时表达自杀基因的溶瘤腺病毒联合调强放疗 (IMRT) 治疗前列腺癌的 I 期临床研究也显示了安全性和良好的治疗效果^[43]。最近, 表达自杀基因的溶瘤腺病毒联合 IMRT 治疗中危前列腺癌的前瞻性 II 期临床研究作了报道, 联合治疗与单独治疗组在生活质量方面无显著性差别, 84% 患者在治疗后 2 年内做了穿刺活检, 结果显示, 基因治疗联合 IMRT 治疗组与 IMRT 单独治疗组相比, 活检阳性率下降了 42%, 联合治疗并没有加重患者的不良反应, 并且降低了治疗后的活检阳性率, 具有重要的临床意义^[44]。

4 小结与展望

溶瘤腺病毒作为一种新型抗癌剂在前列腺癌治

疗方面进行了大量研究,病毒无论是前列腺内局部注射还是全身给药都显示安全有效。尽管溶瘤腺病毒单独使用疗效有限,但联合放疗、化疗和基因治疗大大增强了疗效。前列腺癌适于溶瘤腺病毒治疗,因为前列腺是非必需器官,前列腺内注射病毒方便易行。溶瘤腺病毒需基因修饰或用作载体携带治疗基因来增强抗肿瘤效果。溶瘤腺病毒治疗前列腺癌面临的问题是腺病毒激发宿主免疫系统清除病毒致使病毒到达肿瘤细胞的数量少而降低疗效。这些问题的解决需要对病毒纤维和结构蛋白进行改造,同时提高病毒对肿瘤细胞的靶向性。尽管溶瘤腺病毒治疗前列腺癌还没有在临床上推广使用,但近15年来溶瘤腺病毒在前列腺癌治疗方面取得了显著进步,随着研究不断推进,病毒治疗中存在的问题逐渐得以解决,溶瘤腺病毒必将成为治疗前列腺癌一种有前途的方法。

参考文献:

- [1] Zhang L, Wu S, Guo LR, et al. Diagnostic strategies and the incidence of prostate cancer: reasons for the low reported incidence of prostate cancer in China [J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(1): 9-13.
- [2] Djavan B, Moul JW, Zlotta A, et al. PSA progression following radical prostatectomy and radiation therapy: new standards in the new Millennium [J]. *Eur Urol*, 2003, 43(1): 12-27.
- [3] Nandana S, Chung LW. Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting [J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2014, 2(2): 92-101.
- [4] Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, et al. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion [J]. *Nat Clin Pract Urol*, 2009, 6(2): 76-85.
- [5] Cannata DH, Kirschenbaum A, Levine AC. Androgen deprivation therapy as primary treatment for prostate cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(2): 360-365.
- [6] de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(21): 1995-2005.
- [7] Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(13): 1187-1197.
- [8] Ekblad M, Halldén G. Adenovirus-based therapy for prostate cancer [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12(4): 421-431.
- [9] Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, et al. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix [J]. *Cancer*, 1956, 9(6): 1211-1218.
- [10] Nettelbeck DM. Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer [J]. *J Mol Med*, 2008, 86(4): 363-377.
- [11] Figueiredo ML, Kao C, Wu L. Advances in preclinical investigation of prostate cancer gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(6): 1053-1064.
- [12] Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science (Wash DC)*, 1996, 274(5286): 373-376.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Harada JN, Berk AJ. p53-independent and dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication [J]. *J Virol*, 1999, 73(7): 5333-5344.
- [16] Satoh M, Wang H, Ishidoya S, et al. Oncolytic virotherapy for prostate cancer by E1A, E1B mutant adenovirus [J]. *Urology*, 2006, 70(6): 1243-1248.
- [17] Oberg D, Yanover E, Adam V, et al. Improved potency and selectivity of an oncolytic E1ACR2 and E1B19K deleted adenoviral mutant in prostate and pancreatic cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 541-553.
- [18] 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.
- [19] Dong W, van Ginkel JW, Au KY, et al. ORCA-010, a novel potency-enhanced oncolytic adenovirus, exerts strong antitumor activity in preclinical models [J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(10): 897-904.
- [20] 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.
- [21] Yu DC, Sakamoto GT, Henderson DR. Identification of the transcriptional regulatory sequences of humankallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 1498-1504.
- [22] Yu DC, Chen Y, Seng M, et al. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor Xenografts [J]. *Cancer Res*, 1999, 59

- (17):4200–4203.
- [23] Matsubara S, Wada Y, Gardner TA, et al. A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen independent prostate cancer bone metastasis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16):6012–6019.
 - [24] Li X, Zhang YP, Kim HS, et al. Gene therapy for prostate cancer by controlling adenovirus E1a and E4 gene expression with pses enhancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(5): 1941–1951.
 - [25] Huang P, Watanabe M, Kaku H, et al. Direct and distant antitumor effects of a telomerase-selective oncolytic adenoviral agent, OBP-301, in a mouse prostate cancer model [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(5):315–322.
 - [26] Jin F, Xie Z, Kuo CJ, et al. Cotargeting tumor and tumor endothelium effectively inhibits the growth of human prostate cancer in adenovirus-mediated antiangiogenesis and oncolysis combination therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3):257–267.
 - [27] Thorne SH, Tam BY, Kim DH, et al. Selective intratumoral amplification of an antiangiogenic vector by an oncolytic virus produces enhanced antivasculature and antitumor efficacy[J]. *Mol Ther*, 2006, 13(5):938–946.
 - [28] Hu Z, Gupta J, Zhang Z, et al. Systemic delivery of oncolytic adenoviruses targeting transforming growth factor- β inhibits established bone metastasis in a prostate cancer mouse model[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(8):871–882.
 - [29] Cody JJ, Rivera AA, Lyons GR, et al. Expression of osteoprotegerin from a replicating adenovirus inhibits the progression of prostate cancer bone metastases in a murine model[J]. *Lab Invest*, 2013, 93(3):268–278.
 - [30] Johnson TJ, Höti N, Liu C, et al. Bicalutamide activated oncolytic adenovirus for the adjuvant therapy of high risk prostate cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(7):394–402.
 - [31] Yang YF, Xue SY, Lu ZZ, et al. Antitumor effects of oncolytic adenovirus armed with PSA-IZ-CD40L fusion gene against prostate cancer[J]. *Gene Ther*, 2014, 21(8):723–731.
 - [32] Chen Y, DeWeese T, Dilley J, et al. CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14):5453–5460.
 - [33] Dilley J, Reddy S, Ko D, et al. Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(8):715–722.
 - [34] Yu DC, Chen Y, Dilley J, et al. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2):517–525.
 - [35] Mantwill K, Köhler-Vargas N, Bernshausen A, et al. Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus; implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14):7195–7202.
 - [36] Li X, Liu Y, Tang Y, et al. Docetaxel increases antitumor efficacy of oncolytic prostate-restricted replicative adenovirus by enhancing cell killing and virus distribution[J]. *J Gene Med*, 2010, 12(6):516–527.
 - [37] Radhakrishnan S, Miranda E, Ekblad M, et al. Efficacy of oncolytic mutants targeting prb and p53 pathways is synergistically enhanced when combined with cytotoxic drugs in prostate cancer cells and tumor xenografts [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10):1311–1325.
 - [38] DeWeese TL, van der Poel H, Li S, et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PAS selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20):7464–7472.
 - [39] Small EJ, Carducci MA, Burke JM, et al. A phase I trial of intravenous cg7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(1):107–117.
 - [40] Freytag SO, Khil M, Stricker H, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17):4968–4976.
 - [41] Freytag SO, Stricker H, Peabody J, et al. Five-year follow-up of trial of replication competent adenovirus-mediated suicide gene therapy for treatment of prostate cancer[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(3):636–642.
 - [42] Freytag SO, Stricker H, Pegg J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate-to high-risk prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21):7497–7506.
 - [43] Freytag SO, Movsas B, Aref I, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(5):1016–1023.
 - [44] Freytag SO, Stricker H, Lu M, et al. Prospective randomized phase 2 trial of intensity modulated radiation therapy with or without oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy in intermediate-risk prostate cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(2):268–276.