

流感病毒介导的抗肿瘤研究进展

陈帅帅 沃恩康 王怡婷 郭潮潭

摘要 随着反向遗传技术的不断完善,流感病毒的改造和利用成为可能。流感病毒具有强传染性,将其改造成携带外源基因的流感病毒载体,有利于转染到目的细胞,特别是肿瘤细胞,为肿瘤基因治疗提供新的手段。同时,由于流感病毒对肿瘤细胞具有凋亡作用,有望将其开发成为肿瘤疫苗及具有基因递送作用的病毒载体用于肿瘤基因治疗。本文就流感病毒的溶瘤作用,流感病毒载体的抗肿瘤及其肿瘤靶向性这几方面的研究做一综述。

关键词 流感病毒 载体 肿瘤 治疗

[中图分类号] R73

[文献标识码] A

流感病毒一方面是严重危害人类健康的病原体,但多个研究发现其具有溶瘤能力。肿瘤细胞的病毒裂解物能够作为肿瘤疫苗,在临床研究中证实了流感病毒具有体内抗肿瘤活性,提示其具有潜在的抗肿瘤能力^[1]。同时,流感病毒的 HA、NA 和 NS 基因都可携带外源 DNA,能够引起机体产生强烈的细胞和体液免疫应答,具备作为基因治疗载体和载体疫苗的特性,可利用流感病毒载体作为基因递送载体进行基因治疗以及作为肿瘤疫苗免疫治疗肿瘤。随着反向遗传技术的不断完善,使得流感病毒的定向改造变得更加容易,对流感病毒的改造和利用成为抗肿瘤研究的新途径。

一、流感病毒基因对肿瘤细胞的凋亡/杀伤作用

1. 流感病毒的溶瘤作用及其机制研究:经基因改造的流感病毒具有特异性溶瘤的特性,而对正常的细胞和组织影响较小,有望将其改造为基因治疗载体用于肿瘤的治疗^[2]。流感病毒的 NS1 蛋白是毒力相关因子,能够拮抗干扰素 (IFN) 的产生,抑制双链 RNA 依赖的蛋白激酶 PKR 介导的宿主抗病毒通路,因此,NS1 缺失的流感病毒缺乏在正常细胞中增殖的能力,而能够在 PKR 缺陷的细胞中增殖。肿瘤细胞常伴有 Ras 基因的过度活化,通过 Ras 信号转导途径使 PKR 去磷酸化,抑制该 PKR 的活性,由此推测 NS1 缺失的流感病毒能够选择性地使 Ras 活化的肿瘤细胞中增

殖^[3]。研究证实,NS1 缺失病毒感染移植入高表达 Ras 的黑色素瘤小鼠模型后,显著抑制了肿瘤体积的增长,而该病毒在正常组织中不能复制,显示出其溶瘤特性^[4]。同时,推测该病毒对多种干扰素途径缺陷的肿瘤细胞也都有杀伤作用。Efferson 等^[5]报道重组流感病毒 A/PR8/34 产生非结构蛋白 NS1,感染前列腺癌细胞后,迅速活化细胞外信号调节激酶 (ERK-1),并诱导外周血单核细胞产生 $\text{INF}-\gamma$,活化细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL),诱导 CD8^+ 免疫途径杀伤癌细胞,流感病毒对肿瘤细胞的杀伤作用随着自然杀伤细胞 (NK) 和抗原特异性 CD8^+ 细胞的活化而增强。应用流感病毒这一特征可以插入外源基因序列构建流感病毒载体,在肿瘤的基因治疗和疫苗研发中发挥潜在作用。

2. 流感病毒能诱导细胞免疫反应发挥抗肿瘤效应:复制缺陷型的流感病毒疫苗株 (delNS1 病毒) 已研发成功,它的弱毒力源于能够强有力地刺激固有免疫系统,由于固有免疫系统能够对癌细胞产生杀伤作用,推断 delNS1 毒株诱发的免疫反应可能对癌细胞产生细胞毒效应^[6]。单核细胞亚群能在病毒刺激下产生细胞毒性效应,将固有免疫与适应性免疫系统紧密的联系在一起。delNS1 病毒能特异性裂解干扰素缺陷或表达致癌基因 Ras 的肿瘤细胞,通过活化 CTL 和 NK 细胞诱导免疫应答。NS1 缺陷型流感病毒有一个特殊的免疫刺激表型,能有效诱导固有免疫系统产生 TNF、IL-1 β 和 IFN- α 等细胞因子^[7,8]。为了提高 delNS1 病毒的免疫刺激特性,van Rikxoort 等^[9]构建了一种新的编码 IL-15 的 delNS1 病毒 (delNS1-IL-15),在肿瘤特异性 CTL 和 NK 细胞应答中发挥显著作用。此外,在研究表达 IL-24 的流感病毒

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81071849,81272551);卫生部科学研究基金资助项目 (WKJ2009-2-016);国家中医药管理局基金资助项目 (JDZX2012174);浙江省科技计划基金资助项目 (2011F20012);浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:郭潮潭,电子信箱:gchaotan@163.com

载体的潜在溶瘤作用时发现其促凋亡活性比单独病毒和 IL-24 强,IL-24 介导流感病毒诱导的细胞凋亡作用的增强在很大程度上取决于 Toll 样受体 3 (TLR3)^[10]。根据 NS1 缺陷毒株的免疫刺激特性及弱毒力来源,使它成为免疫治疗癌症患者的一个潜在工具,delNS1 流感病毒能够激发对癌症的细胞毒性免疫应答,这可能是体内通过利用病毒间接刺激外周血细胞引发的^[8]。其次,delNS1 病毒可能作为溶瘤病毒直接注射入肿瘤进行免疫治疗,诱导肿瘤组织中的无活性免疫细胞产生细胞毒作用。

二、流感病毒载体在肿瘤治疗中的作用

目前,流感病毒载体已在恶性肿瘤、艾滋病、肺结核、炭疽、衣原体感染等疾病的基因治疗和新型疫苗研发中开展广泛研究^[11-14]。其中恶性肿瘤的防治主要通过构建带有合适的抗肿瘤外源基因的流感病毒载体,而作为基因递呈载体以及肿瘤疫苗进行肿瘤治疗。肿瘤抗原,需在抗原递呈细胞(APC)内部降解为短肽,然后形成抗原肽-MHC-TCR 复合物才能被 T 细胞识别,并激发 CTL 反应。肿瘤疫苗的作用是应用特异性的具有免疫原性的肿瘤抗原来激活、恢复或加强机体抗肿瘤的免疫反应,清除残存和转移的肿瘤细胞。

1. 作为肿瘤相关抗原的基因递送载体:临床设计癌症治疗方案时应考虑到是否会诱导针对癌细胞的细胞毒性免疫反应,肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)是这种免疫应答诱导的有效靶点,利用 TAA 对肿瘤进行治疗是一个通过刺激人体自身免疫系统来抵抗肿瘤的方法^[15]。利用流感病毒载体表达 TAA,可以有效的诱导 TAA 的特异性免疫反应,从而诱导体内自身的免疫系统靶向攻击肿瘤,达到治疗的目的。流感病毒作为基因递呈载体具有以下几个优势:①能够诱导机体产生强烈的细胞和体液免疫反应^[16];②利用其多亚型的特点,使用不同抗原性的流感病毒作为载体,能够逃避免疫系统原有的特异性中和抗体的追踪,因此具有较好的重复使用性;③不断完善的反向基因操作技术使得对流感病毒的遗传改造变得十分便利,利于获得新型重组病毒载体。重组流感病毒载体表达特定的 TAA,TAA 在癌症的预防和治疗中可能作为治疗因子。TAA 诱导的细胞免疫反应是一个很有前景的抗肿瘤治疗体系,尤其是与其他一些技术如疫苗接种结合时,能够诱导有效的抗癌细胞的 CTL 应答,重组流感病毒表达 TAA 表位是抗肿瘤应答的有

效诱导剂。

2. 基于树突状细胞的抗肿瘤免疫治疗:树突状细胞(DC)是目前所知的机体内功能最强的 APC。近年来,越来越多的证据表明由 DC 激活的细胞免疫特别是 T 细胞介导的 CTL 反应在机体抗肿瘤中起着主导作用^[17]。DC 在抗原摄取和炎症刺激的共同诱导下成熟,与 T 细胞发生相互作用并启动适应性免疫应答^[18]。可识别和杀伤肿瘤细胞的抗原特异性 T 细胞能够被负载肿瘤抗原的 DC 激活,并产生免疫记忆效应。DC 抗肿瘤免疫治疗主要是通过诱导产生大量效应 T 细胞、启动效应 T 细胞迁移至肿瘤部位和抑制肿瘤血管的生成这几方面实现的。流感病毒感染 DC 后能诱发强烈的 CD8⁺T 细胞反应,CD8⁺T 细胞是杀伤肿瘤细胞的主要效应细胞之一。诱导流感病毒特异性 CD8⁺T 细胞应答需要成熟 APC 表面的 MHC 递呈的抗原肽的参与,流感病毒感染的 DC 是强效诱导剂,能在不添加外源性细胞因子的情况下引发显著的 CD8⁺T 细胞应答。由于大多数肿瘤抗原是自身抗原,属于弱免疫原,因此可以通过改变 DC 促进细胞的免疫原性对癌症进行免疫治疗。流感病毒直接感染 DC 导致其成熟,从而诱导病毒特异性 T 细胞应答。此外,DC 也可以通过吞噬死亡或濒临死亡的上皮细胞获得抗原。通过由流感病毒所诱发的炎症的刺激,DC 摄取和递呈凋亡性流感病毒抗原,成熟并启动一个有效的适应性免疫反应。流感病毒不仅可以负载外源基因片段感染 DC,其导致的肿瘤细胞的裂解物还可以致敏 DC,从而诱导细胞免疫反应。

(1)流感病毒载体负载外源基因片段感染 DC、诱导细胞免疫反应:TAA 能诱导机体产生强烈的细胞毒性免疫反应,黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen-encoding genes, MAGE)是最先从黑色素瘤中发现的一组 TAA,于多种恶性肿瘤中表达。利用 DC 诱导 CTL 是肿瘤免疫治疗的有效手段,经过基因修饰而表达 TAA 的 DC,能有效地诱导抗肿瘤免疫反应,具有潜在的癌症治疗能力。基因传递能通过病毒载体实现,流感病毒载体具有易受抗病毒药物控制,不整合到宿主染色体等优势,提供了一个独特的组合功能,有利于体内 DC 的转导,因此,流感病毒载体可以通过负载有效的外源基因片段感染 DC,产生免疫反应,从而杀伤肿瘤细胞。Strobel 等将编码黑色素瘤的 TAA 基因 MAGE-3 插入到流感病毒载体形成重组病毒,单核细胞来源的成熟 DC 细胞被这些重组体感染后产生并表达 MAGE-3,并且这些 DC 能保留其

本身的表型特征,还具有强大的 T 细胞刺激能力,能够激活特异性的 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞。因此,流感病毒载体提供了一种高效的基因传递系统,通过将 TAA 转入 DC,刺激 TAA 特异性免疫反应,从而杀伤肿瘤细胞。人类表皮生长因子受体 2 (HER-2/neu) 为一具有免疫原性的糖蛋白,在卵巢癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤细胞中存在并高表达,具有免疫原性的 HER-2/neu 肽可被 CTL 和 TH 识别,是肿瘤治疗的重要靶点之一。Efferson 等以流感病毒 A/PR8/34 的 NA 基因为装载基因,将 HER-2 中 9 个氨基酸构成的 CTL 表位 E75 插入到 NA 的茎部区域,构建出重组流感病毒,感染该重组病毒的 DC 能产生高水平的 α 干扰素 (INF- α),并激发外周血单核细胞,卵巢癌和乳腺癌患者相关的淋巴细胞对表达 HER-2 的肿瘤细胞产生特异性 CTL 效应,并分泌 γ 干扰素 (INF- γ) 和白介素-2 (IL-2)。因此减毒性流感病毒能够作为肿瘤抗原的递呈载体在肿瘤疫苗的研究中具有独特的应用价值。

(2) 流感病毒裂解肿瘤细胞、裂解物致敏 DC 细胞、诱导细胞免疫反应: NS1 缺陷型流感病毒疫苗株具有促炎性作用,deNS1 病毒感染的单核 DC 和病毒裂解物的共同刺激会导致 CD8⁺ 细胞的增殖,而 CD8⁺ T 细胞增殖与病毒刺激诱导的细胞毒性的增强有关。NS1 缺陷的流感病毒疫苗株感染裂解肿瘤细胞,裂解物致敏 DC,从而增强 DC 的免疫刺激能力。随着 NS1 缺陷型流感病毒被证明具有溶瘤作用,有研究使用 NS1 缺失病毒诱导前列腺细胞产生的裂解物来刺激外周血细胞,而导致 IL-12 存在下的抗肿瘤细胞株的 CD8⁺ 限制性细胞毒作用^[5]。固有免疫系统的刺激作用已成为开发有效佐剂的主要目标,并且被认为对刺激有效的适应性免疫反应非常有益,能诱导强效固有免疫反应的病毒,为今后的临床试验中抗原性 DC 疫苗的研究提供了有效的途径。

三、流感病毒潜在的肿瘤靶向性

流感病毒的受体是末端为唾液酸的寡糖链 (SA α 2-3Gal 和 SA α 2-6Gal),常见的人流感病毒倾向于结合 SA α 2-6Gal 结构,禽流感病毒则倾向于 SA α 2-3Gal 结构,因此流感病毒具有潜在靶向肿瘤细胞的能力。为了充分实现流感病毒载体对肿瘤细胞的靶向性,可以从两个方面进行探索:一方面对肿瘤细胞的糖蛋白进行分离和鉴定,寻找在癌细胞中含量丰富、特异性强、并且能与流感病毒受体蛋白特异

性结合的唾液酸糖链结构,作为一种流感病毒载体靶向癌细胞的分子标志;另一方面,利用反向基因操作系统对流感病毒表面的受体结合蛋白 HA 进行定向改造,增强其与肿瘤细胞表面特异性唾液酸寡糖的结合能力,提高其靶向肿瘤的能力。

研究表明,肿瘤细胞上存在着大量表达异常的唾液酸(高出正常细胞的 10~100 倍),唾液酸在细胞的恶性转化中起着特殊作用,其含量与恶性肿瘤细胞的增殖、转移、浸润、细胞黏附性降低、肿瘤抗原性及逃避宿主细胞的免疫监视等密切相关,是一种广泛有效的肿瘤标志物。研究发现在结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌等多发恶性肿瘤的细胞表面,唾液酸含量及种类显著高于正常细胞。肿瘤细胞唾液酸化的增加常常表现为唾液酸基以特异的 α 2-3、 α 2-6 糖苷键与乳糖胺 Gal β 1-4GluNAc 单位相连。肿瘤中存在的唾液酸修饰异常主要是由唾液酸转移酶表达异常引起的,例如 α 2-6 唾液酸转移酶 (ST6Gal I) 可催化活化的唾液酸以 α 2-6 糖苷键的形式连接到细胞膜表面的 N-乙酰乳糖胺上,成为肿瘤细胞与细胞外基质之间相互识别的重要受体。同时,在许多肿瘤细胞表面存在着特殊的唾液酸分子,有研究报道,Neu5Gc 在人结直肠癌等多种肿瘤组织中异常表达,这是一个值得关注的现象。由于人体中缺乏 CMP-Neu5Ac 羟化酶基因,在成人的正常细胞中没有 Neu5Gc 结构,但从结肠癌患者分离到的肿瘤组织中常常具有 Neu5Gc,可以作为一种肿瘤治疗的特异性靶点。

通过反向基因操作技术将流感病毒定向改造成病毒载体,在临床治疗和疫苗研发上有较好的应用前景。利用流感病毒的溶瘤特性及作为基因递送载体可以应用到肿瘤治疗中,包括肿瘤疫苗及免疫治疗。流感病毒载体具有无整合性和重复使用性较好的特点,使其能够作为有效的基因治疗载体治疗肿瘤。此外,流感病毒载体作为肿瘤疫苗主要是通过插入 TAA,感染 DC,诱发强烈的细胞免疫反应,从而进行抗肿瘤免疫治疗。流感病毒潜在的肿瘤靶向性使其能更好靶向肿瘤细胞,通过反向遗传学技术,对流感病毒表面的蛋白进行改造,增强病毒载体的靶向性,为肿瘤治疗带来更好的效果。流感病毒虽然对人类造成极大的威胁,在其应用中也存在一些问题,但相信通过对其改造的不断完善,能使它更好地为人类服务。

(下转第 3 页)

- Alzheimer's disease: a new lexicon [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9: 1118 - 1127
- 4 Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, *et al.* Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7: 257 - 262
- 5 McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7: 263 - 269
- 6 Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7: 270 - 279
- 7 Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, *et al.* Towards defining the preclinical stage of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7: 280 - 292
- 8 Reisberg B, Gauthier S. Current evidence for subjective cognitive impairment (SCI) as the pre - mild cognitive impairment (MCI) stage of subsequently manifest Alzheimer's disease [J]. *Int Psychogeriatr*, 2008, 20: 1 - 16
- 9 Visser PJ, Verhey F, Knol DL, *et al.* Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 9: 619 - 627
- 10 Argonde C. van Harten, Pieter Jelle, *et al.* Cerebrospinal fluid Aβ42 is the best predictor of clinical progression in patients with subjective complaints [J]. *Alzheimers Dement*, 2013, 9: 481 - 487
- 11 Buckley R, Saling MM, Ames D, *et al.* Factors affecting subjective memory complaints in the AIBL aging study: biomarkers, memory, affect, and age [J]. *International Psychogeriatrics*, 2013, 25(8): 1307 - 1315
- 12 Craft S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged [J]. *Arch Neurol*, 2009, 66: 300 - 305
- 13 Onyike CU, Sheppard JM, Tschanz JT, *et al.* Epidemiology of apathy in older adults: the Cache County Study [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2007, 15: 365 - 375
- 14 Wilson RS, Scherr PA, Schneider JA, *et al.* Relation of cognitive activity to risk of developing Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2007, 69: 1911 - 1920
- 15 Wilson RS, Barnes LL, Aggarwal NT, *et al.* Cognitive activity and the cognitive morbidity of Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2010, 75: 990 - 996 (收稿日期:2014 - 05 - 12)
(修回日期:2014 - 05 - 15)

(上接第 6 页)

参考文献

- 1 Eager RM, Nemunaitis J. Clinical development directions in oncolytic viral therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(5): 305 - 317
- 2 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
- 3 Ogbomo H, Michaelis M, Geiler J, *et al.* Tumor cells infected with oncolytic influenza A virus prime natural killer cells for lysis of resistant tumor cells [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2010, 199(2): 93 - 101
- 4 Hale BG, Randall RE, Ortín J, *et al.* The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(10): 2359 - 2376
- 5 Efferson CL, Tsuda N, Kawano K, *et al.* Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8⁺ cells to recognize noninfected tumor cells [J]. *J Virol*, 2006, 80(1): 383 - 394
- 6 Sturlan S, Sachet M, Baumann S, *et al.* Influenza A virus induces an immediate cytotoxic activity in all major subsets of peripheral blood mononuclear cells [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4122
- 7 Li W, Wang G, Zhang H, *et al.* Effects of NS1 variants of H5N1 influenza virus on interferon induction, TNFα response and p53 activity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(3): 235 - 242
- 8 Kochs G, Martínez - Sobrido L, Lienenklaus S, *et al.* Strong interferon - inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(12): 2990 - 2994
- 9 van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, *et al.* Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin - 15 from the NS reading frame [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36506
- 10 Weiss R, Sachet M, Zinngrebe J, *et al.* IL - 24 sensitizes tumor cells to TLR3 - mediated apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(6): 823 - 833
- 11 de Goede AL, Boers PH, Dekker LJ, *et al.* Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV - 1 p17Gag [J]. *Vaccine*, 2009, 27(42): 5735 - 5739
- 12 Krammer F, Schinko T, Messner P, *et al.* Influenza virus - like particles as an antigen - carrier platform for the ESAT - 6 epitope of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Virol Methods*, 2010, 167(1): 17 - 22
- 13 He Q, Martinez - Sobrido L, Eko FO, *et al.* Live - attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines [J]. *Immunology*, 2007, 122(1): 28 - 37
- 14 Langley WA, Bradley KC, Li ZN, *et al.* Induction of neutralizing antibody responses to anthrax protective antigen by using influenza vectors: Implications for disparate immune system priming pathways [J]. *J Virol*, 2010, 84(16): 8300 - 8307
- 15 Pistoia V, Morandi F, Pezzolo A, *et al.* MYCN: from oncoprotein to tumor - associated antigen [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 174
- 16 Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, *et al.* Recombinant influenza vaccines [J]. *Acta Naturae*, 2012, 4(4): 17 - 27
- 17 Palucka K, Ueno H, Fay J, *et al.* Dendritic cells and immunity against cancer [J]. *J Intern Med*, 2011, 269(1): 64 - 73
- 18 Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, *et al.* Trial watch: Dendritic cell - based interventions for cancer therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(7): 1111 - 1134 (收稿日期:2014 - 01 - 03)
(修回日期:2014 - 01 - 18)