

- 5 Hukuhara T, Zhu Y, Kuroda Y. Invertebrate and fish tissue culture, Japan; Science Press, 1988; 159~162
- 6 Gallo L G, Corsaro B G, Hughes R R *et al.* J Invertebr Pathol, 1991; **58**: 203
- 7 Goto C. Appl Entomol Zool, 1990; **25**: 135
- 8 Xu J H, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1992; **60**: 259
- 9 Xu J H, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1994; **63**: 14
- 10 Kozuma K, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1992; **59**: 328
- 11 Hara S, Tanada Y, Omi E M. J Invertebr Pathol, 1976; **27**: 115
- 12 Zhu Y, Hukuhara T, Tamura K. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 49
- 13 Yamamoto T, Tanada Y. Virology, 1980; **107**: 434
- 14 Hukuhara T, Zhu Y. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 71
- 15 Uchima K, Egarter D F, Tanada Y. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 156
- 16 Ohba M, Tanada Y. Naturwissenschaften, 1983; **70**: 613
- 17 Nakagaki M, Ohba M, Tanada Y. J Invertebr Pathol, 1987; **50**: 169
- 18 Kozuma K, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1994; **63**: 63
- 19 Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. J Gen Virol, 1991; **72**: 2645

Wei, Li Lulin, Hong Huazhu (*Institute of Entomology, Centre China Normal University, Wuhan 430070, China*).

Abstract Several enhancing proteins (enhancins) were isolated from the inclusion bodies of some insect viruses. The proteins can enhance the infection of NPV both *in vitro* and *in vivo*. There are two hypotheses about the mechanism of enhancement: disrupting the peritrophic membrane (PM) and facilitating the penetration of virions or increasing the attachment and fusion between the virion envelope and the midgut cell membrane. The proteins are encoded by virus. The first enhancin gene has been cloned and sequenced. Since enhancins can shorten the life-span of infected larvae and increased the effectiveness of biopesticides, it will stimulate the widespread application of viral pesticides.

Key words baculovirus, enhancins, synergism

The Enhancing Proteins of Baculovirus. Hu

病毒治癌

张靖溥

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 病毒治疗癌症近来有新进展. 分子生物学技术的发展, 大大促进了病毒在寄主专一性、基因传递的定位性及溶解癌细胞方面的研究: 选择适当的病毒种类, 根据癌细胞特征性表面蛋白的特性修饰病毒的表面蛋白, 使之对癌细胞具有更强的亲和性; 去除病毒中原有的致病基因如癌基因, 并根据靶细胞的特性针对性地改造有关病毒基因如插入适当的抗癌基因, 可能构建成安全有效的工程病毒用于癌症治疗. 病毒治癌除具有较强的特异性外, 和其他基因治疗方法相比, 还具有能利用寄主细胞进行自我复制、级联放大以克服初始剂量不足等特点.

关键词 溶癌作用, 基因改造, 病毒

用病毒攻克癌症的想法, 在本世纪初已产生. 50 年代, 人们注意到在组织培养中, 许多病毒能有效地感染和裂解肿瘤细胞. 在体内, 病

毒感染肿瘤细胞后, 可以增强免疫系统对肿瘤

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-07-11

细胞抗原的识别,或促进抗原表现^[1].已有病毒尝试性治疗癌症的许多报道,如流行性腮腺炎病毒(mumps virus)治疗皮肤癌、淋巴瘤及胃癌等^[2],麻疹病毒(measles virus)可以缓解人的白血病^[3],牛肠道病毒(bovine enterovirus)可使鼠类实体瘤和腹水瘤退化^[4],新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)可治疗恶性黑色素瘤^[5~9],以及单疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)治疗神经胶质瘤^[10~12].最近发表的两篇文章^[13,14]更是令人鼓舞:用减毒的单疱疹病毒-1 (HSV-1)和减毒的新城疫病毒 73-T (NDV 73-T)定位注射,可以分别有选择地杀死神经胶质瘤(neuroglioma)细胞和成神经细胞瘤(neuroblastoma).

由此可见,用病毒作为杀死癌细胞的“药物”是很有希望的.然而,这方面的工作仅仅是初步尝试,而且这种应用也只限于极少数的癌症.阻碍病毒作为抗癌物质的因素有待解决:a.相当一部分天然病毒既可以感染癌细胞,也可以感染正常细胞,即特异性差;b.病毒利用细胞来复制自身基因,其中许多病毒并不杀死细胞,具有潜伏性和致病性.

病毒作为抗癌物质有哪些优越性呢?简言之,a.杀伤性.有些病毒一旦侵染宿主细胞,可以使其迅速裂解.此类病毒一般不具潜伏性.b.特异性.(1)一些病毒的侵染具有组织特异性,如脊髓灰质炎病毒(polioviruses)只感染神经系统,腮腺炎病毒只侵染腮腺,肝炎病毒(hepatitis virus)只侵染肝脏等.(2)病毒基因的保存和复制须依赖于宿主细胞的分裂机制,而肿瘤细胞正具有无限增殖的特性,为病毒作用的细胞特异性奠定了基础.(3)作为抗癌基因的载体,一些研究表明^[15,16],病毒基因在宿主染色体上的整合并非随机的,而是与宿主细胞局部的DNA结构及当时的生理状态相关.整合多发生在转录活化区,如上游调控区,这为准确地传递抗癌信息打下了基础.此外,病毒感染肿瘤细胞后,产生新抗原,可以导致机体对肿瘤细胞的免疫排斥作用.

本文拟从分子生物学角度探讨以“毒”治

癌的可能性.

1 病毒与靶细胞的特异识别

无论病毒作为抗癌基因的载体还是作为癌细胞的“杀手”,都要求其具有特异识别癌细胞的能力而不伤及正常细胞.这方面的工作已有了相当的进展.

病毒与宿主细胞的相互识别,是由病毒表面糖蛋白与作为病毒受体的宿主细胞表面特异蛋白的相互作用来决定的.如何使病毒识别靶细胞呢?Kasahara等^[17]最近报道了他们的工作.他们将一宿主专一的鼠类反转录病毒——莫洛尼氏鼠类白血病病毒(moloney murine leukemia virus, Mo-MuLV)的表面蛋白进行改造:将此蛋白的150个氨基酸用长度大约相同的红细胞生成素(erythropoietin, EPO)序列代替,然后将此病毒感染人细胞和鼠细胞,结果该病毒不仅对具有EPO受体的鼠类靶细胞的感染性增加了数倍,而且对原来不感染的具EPO受体的人的靶细胞也具有了感染性,而对其他类型的人类细胞仍无感染性.这就是说病毒的宿主专一性通过基因工程手段是可以改变的.Valsesia-Wittmann等^[18]的工作也证实了这一途径的可行性:他们对禽类一反转录病毒ALV(avian leukosis virus)的表面蛋白进行了修饰,在A亚型的ALV突变外壳插入一小段RGD[16肽,已知为几种细胞整合素(integrin)受体的配体].该突变体可以特异地感染具有整合素受体的哺乳类细胞并且稳定地整合在宿主DNA上和表达这种多肽.

一般来说,任何一种类型的细胞,均有其特殊的表面结构,癌细胞也不例外,虽然大多数肿瘤特异性抗原是内部抗原^[19],但也必然在其表面结构和膜特性上有所改变,这就为工程病毒的专一性侵染打下了基础,如癌细胞特征性表面蛋白可以作为一种病毒改造的目标.

2 基因整合位点的选择

作为基因载体,不仅要求将外源基因运送到特定靶细胞中,而且有时要将外源基因整合

到宿主 DNA 的适当位置上。

近几年有关整合位点的研究多见于对反转录病毒的研究^[15,16,20~22], 结果趋于一致, 即整合可以发生在许多不同的染色体区域, 但不是随机的, 局部 DNA 的结构可以影响整合的位点。令人感兴趣的是, 发现整合位点多在具有转录活性的基因调控区或附近, 而与基因的整个结构和序列关系不大。Kitamura 等^[20]证明, 在体外整合过程中, 靶序列的甲基化可以促进整合的发生。这可能是甲基化对局部 DNA 结构影响的结果。甲基化是转录调控的一种形式。Withers-Ward 等^[21]用改进的 PCR 方法检测禽类造血细胞组织增生病毒 (ALV) 的特异序列在火鸡胚成纤维细胞 (TEF) DNA 中的整合, 证明大多数或所有的 TEF 基因组均可接受 ALV 的整合, 如同体外整合, 整合的特异性看来在相当大的程度上由局部 DNA 结构特征决定, 而非由特异序列决定。

DNA 病毒的整合, 如 HBV DNA 的整合^[22]则伴随着病毒 DNA 的复制机制, 在肝癌细胞 (HCC) 中, 发现整合位于原癌基因 *c-myc* 或 *n-myc* 的附近。HBV 也常整合在人的重复性基因序列中, 如小卫星 DNA (minisatellite DNA)。而此区的突变可以致病或诱导癌变。

尽管病毒在宿主染色体上的整合是一普遍现象, 但是外源性 DNA 的整合与整合蛋白的性质、局部染色体的修饰及 DNA 结合蛋白等多种因素有关。逆转录病毒载体与其他基因载体如酵母的整合机制也有差别。至今未见报道病毒整合的发生可以打乱宿主的编码序列, 而是多发生在活跃的转录调控区, 即 DNase 1 超敏感位点。多数病毒的整合和复制依赖于宿主 DNA 的转录和宿主细胞提供的酶。而癌细胞具有活跃的代谢和分裂特征, 比正常细胞有更多的调控活化区, 因而也为病毒基因的整合准备了更多的位点。另一方面, 癌细胞的活化基因多为癌基因或者错误表达的基因, 正是抗癌基因的目标。运用恰当的抗癌基因, 如沉默子 (silencers), 通过病毒载体将其整合到靶基因的上游, 就有可能抑制癌基因的表达, 使恶性

细胞逆转。

3 病毒的杀伤性和干扰作用

病毒感染的结果有四种: a. 对细胞具有杀伤性, 使细胞裂解死亡。b. 潜伏性。c. 使细胞转化, 癌变即属此类。d. 复合感染时病毒间的干扰作用。裂解性病毒对正在分裂的细胞的迅速裂解这一特性, 在基因治疗癌症中具有独特而巨大的潜在作用。此类病毒在感染细胞后, 可以全面关闭或破坏细胞的正常生化反应, 迅速大量积累病毒大分子, 使细胞裂解。一些病毒的衣壳 (capsid) 蛋白本身就具有毒性, 可以致死细胞。此类病毒主要有: 新城疫病毒、疱疹病毒、痘病毒 (poxvirus) 和微小 RNA 病毒 (picornavirus)。但须注意, 病毒的这种特性并非一成不变, 随着宿主细胞的不同该特性会有所变化, 比如疱疹病毒在某些细胞内可以使细胞裂解, 如 revo 和鸡胚细胞, 但在另一些细胞如淋巴细胞中就不能裂解细胞。所以须针对具体的细胞类型来选择和利用病毒。

Coen 等^[10]和 Martuza 等^[11]报道, 缺失胸苷激酶 (tk^-) 的 HSV-1 不能有效地在非分裂细胞中复制, 但是仍然能裂解正在分裂的细胞 (包括人肿瘤系)。进一步的动物研究^[11,12]表明, 用 HSV-1 (tk^-) 突变子可以在正常免疫活化 (immunocompetent) 的动物体内特异而有效地杀死神经胶质瘤细胞, 使肿瘤很快退化, 而不伤害正常细胞。说明机体免疫系统对该病毒没有明显的抑制作用。而对照组, 在正常的小鼠颅内同样注射 HSV-1 (tk^-), 未发现神经毒性。另一例子来自 Lorence 等^[13]的报道, 减毒的新城疫病毒 NDV 73-T 可以有选择地在异体移植的无胸腺小鼠的人 IMR-32 神经胚细胞瘤 (neuroblastoma) 中复制, 杀死肿瘤细胞, 使肿瘤完全退化。同样不伤及正常的成纤维细胞。由于此结果是使得免疫缺陷小鼠身上的肿瘤退化, 说明: a. 这种显著的抗肿瘤作用完全来自于 NDV 73-T。b. NDV 73-T 是安全的。它在免疫能力缺陷的小鼠身上并不引起其他副反应。与其他裂解癌细胞的病毒相比, NDV 73-T 不

仅无神经毒性, 而且它显然有不同的机制来诱导肿瘤细胞裂解. 可能 NDV 对肿瘤细胞的感染增强了肿瘤细胞对 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 的细胞裂解作用的敏感性^[7].

病毒复合感染导致的病毒间的干扰作用, 也可作为抑制肿瘤病毒致癌的一条途径, 可用对机体不致病的病毒来干扰肿瘤病毒在宿主细胞中的复制, 如脑炎病毒可以干扰小鼠腹水瘤病毒的致病性.

4 病毒的致癌性

一些病毒对人类是有害的. 除了感染疾病外, 还可能致癌. 主要病毒和所致肿瘤见表 1^[19].

表 1 人类的致癌病毒

病毒		肿瘤
科	种	
逆转录病毒	人 T 细胞白血病病毒	成人 T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤
疱疹病毒	EB 病毒	鼻咽癌, 非洲淋巴瘤
乳多空病毒	人乳头瘤病毒	表皮发育不良疣 宫颈癌
肝 DNA 病毒	乙型肝炎病毒	肝细胞癌

上述病毒除了逆转录病毒外, 均为 DNA 病毒. 它们的致癌性均与潜伏性感染有关, 与其 DNA 在宿主细胞中的复制机制相关. 一般来说, 对细胞具有杀伤性的病毒并不具有潜伏性. 而潜伏性感染的病毒也不裂解细胞, 而是使宿主细胞转化、病变. 致癌性病毒即属此类. 在 RNA 病毒中, 目前只有人 T 细胞白血病病毒 (HTLV-1) 已知为成人 T 淋巴细胞白血病的病因, 其他 RNA 病毒均不能直接使人致癌. 而该逆转录病毒的致癌性则在于病毒的 LTR 序列含有很强的启动子和增强子, 并使其在宿主 DNA 中易于整合, 从而导致了原癌基因的活化, 使细胞代谢异常而致癌. 然而大量的研究结果证明, “癌基因”对病毒 (包括 RNA 病毒和 DNA 病毒) 的复制是非必需的. 所谓癌基

因只不过是某些机体的正常基因在错误的时间和/或错误的场所, 以错误的效率被表达或抑制. 病毒在感染中携带并传递该基因. 所以, 在考虑构建某种工程病毒时, a. 选择适当的病毒种类, 避免或减少其致病性; b. 利用分子生物学手段, 除去病毒的致癌基因和致病基因; c. 根据靶细胞, 针对性地改造有关病毒的基因, 使其只对靶细胞具亲和性. 这三点是工作的重点.

5 有关“基因药物”的几点考虑

5.1 载体

以质粒为载体和以脂质体作为包裹体的基因治疗, 在体外实验中有些已表明有抑制和杀伤癌细胞的作用. 但是如何引入体内特定组织的肿瘤区, 尤其是内脏实体瘤, 确实是一个难题. 即使通过手术和注射将其引入病灶, 也难以保证它有效而专一地进入靶细胞. 在理论上, 脂质体是通过膜磷脂分子与细胞膜脂双层分子相互作用而融合, 将其内容物送入细胞. 就是说正常细胞也可通过膜融合接受基因药物, 而外源基因导入正常细胞, 有可能引起正常基因突变而致病. 那么是否可以构建一种含有靶细胞受体配体的脂质体膜以增强其特异性呢? 理论上是可行的, 但至今未见与此有关的报道.

5.2 剂量与“基因药物”的扩散

众所周知, 任何一种药物的使用都涉及使用剂量的确定. “基因药物”也不例外, 而且更为复杂. 一般药物作用后, 循其药理代谢途径进行降解、稀释、排出体外. 而“基因药物”在体内一定条件下, 可以复制 (增多)、扩散 (转染). 如何掌握和控制此类“药物”的剂量和扩散呢? 工程病毒似乎更具优越性: a. 专一性感染靶细胞, 保证了它不感染周围正常细胞. b. 当使用剂量不足时, 工程病毒在最初宿主细胞复制、裂解细胞后, 可向其他靶细胞感染, 具有级联放大效应, 足以弥补初始剂量的不足, 将全部靶细胞杀死; 剂量过量时, 由于其靶子的专一性, 也不至于累及正常细胞.

5.3 有效的抗病毒药物

在使用工程病毒时, 须针对性地备有抗病

毒药物和措施, 以防病毒意外流行而失控。因为“基因药物”, 尤其是病毒制剂具有复制和转移的能力, 无论工程病毒设计得如何完善, 此举是必要的。另外, 某些病毒在免疫低下的人群中可使疾病发展和引起抗药性, 在选用病毒时, 须考虑对策。

综上所述, 病毒可以危害人类, 也可以为人类所利用。工程病毒在基因治疗领域中, 具有潜在的重要作用和独特的优越性。随着分子生物学技术的完善, 改造病毒基因, 使其去弊存利, 成为有效的抗癌“药物”已成为可能。

参 考 文 献

- 1 Kenney S, Pagano J S. *Journal Natl Cancer Inst*, 1994; **86** (16): 1185
- 2 Asada T. *Cancer*, 1974; **34**: 1907
- 3 Gross S. *Lancet*, 1971; **1**: 397
- 4 Taylor M W, Cordell B, Souhrada M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971; **68**: 836
- 5 Reichard K W, Lorence R M, Cascino C J *et al.* *J Surg Res*, 1992; **52**: 448
- 6 Cassell W, Garrett R E. *Cancer*, 1965; **18**: 863
- 7 Lorence R M, Rood P A, Kelley K W. *Journal Natl Cancer Inst*, 1988; **80**: 1305
- 8 Cassel W A, Murray D R, Phillips H S. *Cancer*, 1983; **52**: 856
- 9 Csatory L K, Eckhardt S, Bukosza I *et al.* *Cancer Detect Prev*, 1993; **17**: 619
- 10 Coen D M, Kosz-Vnenchak M, Jacobson J G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 4736
- 11 Martuza R L, Malick A, Markert J M *et al.* *Science*, 1991; **252**: 854
- 12 Markert J M, Malick A, Coen D M *et al.* *Neurosurgery*, 1993; **32**: 597
- 13 Lorence R M, Reichard K W, Katubig B B *et al.* *Journal Natl Cancer Inst*, 1994; **86** (16): 1228
- 14 Jia W W G, McDermott M, Goldie J *et al.* *Journal Natl Cancer Inst*, 1994; **86** (16): 1209
- 15 Engelman A. *BioEssay*, 1994; **16** (11): 797
- 16 Wang X, Higgins N P. *Molecular Microbiology*, 1994; **12** (4): 665
- 17 Kasahara N, Dozy A M, Kan Y W. *Science*, 1994; **266**: 1373
- 18 Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G *et al.* *Journal of Virology*, 1994; **68** (7): 4609
- 19 White D O, Fenner F J. *Medical Virology*. New York: Academic Press INC, 1986: 218~220
- 20 Kitamura Y, Young M, Lee H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89** (12): 5532
- 21 Withers-Ward E S, Kitamura Y, Barnes J P *et al.* *Genes & Development*, 1994; **8**: 1473
- 22 Robinson W S. *Annu Rev Med*, 1994; **45**: 297

Virus as a Therapeutic Agent for Cancers.

Zhang Jingpu (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract Great progress has been made in therapeutic virus for cancer. The development of molecular biology techniques has greatly enhanced research on some properties of virus in host-specific, in gene site-specific integration and in oncolysis. It is possible to build up an engineering virus which will be safer and more efficient as an anticancer agent by modification of virus surface proteins to get strong affinity to cancer cell, by deletion of oncogene from oncogenic virus or of special pathogenic gene to reduce pathogenicity of virus, and by inserting certain anticancer gene such as a silencer to certain gene site based on specificity of target cell and certain virus species. Besides, compared with other gene therapy, another special advantage is that virus DNA can automultiply replicate itself in host, which has a characteristic of cascade amplification for compensating primary dosage when the dosage is deficient.

Key words oncolysis, gene modification, virus