

人腺病毒工程化应用研究进展

赵阳¹, 张其威², 夏雪山¹

1 昆明理工大学 生命科学与技术学院 云南省分子诊断工程技术研究中心, 云南 昆明 650500

2 南方医科大学 公共卫生学院, 广东 广州 510515

赵阳, 张其威, 夏雪山. 人腺病毒工程化应用研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1269-1276.

Zhao Y, Zhang QW, Xia XS. Progress in engineering application of Human Adenovirus. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1269-1276.

摘要: 人腺病毒流行广泛, 感染常诱发呼吸道疾病、流行性结膜炎等疾病。腺病毒是研究较为深入的一类病原体, 并且作为病毒载体已广泛应用, 也是基因治疗最常用的病毒载体, 尤其在肿瘤基因治疗和病毒溶瘤方面具有较大的研究价值和临床应用潜力。文中对腺病毒的生物学特性以及应用范围等方面进行综述, 以期为人腺病毒的工程化与临床应用提供参考。

关键词: 人腺病毒, 载体, 溶瘤, 工程化应用

Progress in engineering application of human adenovirus

Yang Zhao¹, Qiwei Zhang², and Xueshan Xia¹

1 Yunnan Provincial Center for Molecular Diagnosis, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

2 College of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Abstract: Human adenoviruses are widespread causative agent that induces respiratory diseases, epidemic keratoconjunctivitis and other related diseases. Adenoviruses are commonly used in experimental and clinical areas. It is one of the most commonly used virus vectors in gene therapy, and it has attracted a lot of attention and has a high research potential in tumor gene therapy and virus oncolytic. Here, we summarize the biological characteristics, epidemiology and current application of adenovirus, in order to provide reference for engineering application of adenovirus.

Keywords: human adenovirus, vector, oncolytic, engineering application

1953年, Rowe等首次从呼吸道感染的婴儿扁桃体腺中分离培养得到一种新的病毒, 被鉴定命名为腺病毒^[1]。腺病毒可分为A-G七个种, 目

前已鉴定出100多个基因型。人腺病毒(Human adenovirus, HAdV)属于腺病毒科(Adenoviridae)哺乳动物腺病毒属 *Mastadenovirus*。腺病毒感染

Received: November 3, 2019; **Accepted:** February 4, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. U1702282).

Corresponding author: Xueshan Xia. Tel: +86-871-65920756; Fax: +86-871-65920562; E-mail: oliverxia2000@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. U1702282) 资助。

网络出版时间: 2020-04-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200409.1048.001.html>

临床较为常见,感染常发生的器官系统为眼角膜和呼吸道。腺病毒感染具有自限性,但对一些特殊人群如免疫力低下人群、儿童等,其感染会导致较为严重的后果。因为具有外源基因较大的装载容量,腺病毒作为基因表达载体的研究与应用始于20世纪60年代,是研究最深入的病毒载体之一,已广泛地应用于基因治疗和病毒溶瘤等方面。被广泛关注的溶瘤腺病毒(Oncolytic adenovirus)经过基因改造,充分利用了肿瘤细胞与正常细胞在基因组成、功能代谢等方面的差异,使病毒载体在肿瘤细胞中特异增殖,进而裂解肿瘤细胞,而仅对正常细胞产生有限的损伤。尽管具有较好应用前景,腺病毒工程化应用还具有较多待改进之处。

1 腺病毒的生物学特性

自腺病毒首次分离出来,已经确定的腺病毒共有A-G七个种,超过100个血清型^[2]。随着分子生物学技术的不断发展以及对腺病毒的不断探索,对腺病毒的结构及其基因组复制机制研究得比较清楚。人腺病毒感染在世界范围内流行广泛,并诱发人体多种炎症疾病。但由于腺病毒感染宿主具有高度的种属特异性,尚无法在非自然宿主中有效感染和复制。

1.1 腺病毒的结构

腺病毒属线性双链DNA病毒,病毒颗粒直径65-90 nm,为无包膜二十面体结构,由240个六邻体组成,每个顶点处有12个五邻体蛋白,并有从每个五邻体突出的12个纤维蛋白三聚体。人腺病毒基因组全长约36 kb,包括早期转录基因(E1A、E1B、E2、E3、E4)和晚期转录基因(L1-L5)。E1A是基因组中最早被转录的基因,其编码产物与宿主细胞pRb蛋白结合,导致E2F转录因子与pRb蛋白分离,进而激活E2F介导其他早期转录基因(E1B、E2、E3、E4)的转录,启动病毒DNA的复制。随后,E1B编码的E1B-55K

蛋白与细胞的p53蛋白结合并使之失活,同时E1B-19K蛋白作为细胞凋亡因子阻止细胞凋亡。E2则编码病毒基因组复制所必需的3种蛋白:前体末端蛋白(pTP)、聚合酶(Pol)和单链DNA结合蛋白(DNA binding protein, DBP)。E3基因编码可破坏宿主免疫反应的蛋白(10.4K、14.5K、14.7K和19K),其中19K糖蛋白(gp19)下调MHC I介导的抗原呈递给细胞毒性T淋巴细胞,从而阻止细胞毒性T淋巴细胞对病毒的杀伤作用;在病毒复制晚期,E3基因编码的蛋白可促进病毒粒子的释放和加快被感染细胞的死亡^[3]。E4的基因产物主要参与DNA的复制、转录、宿主细胞蛋白质合成的终止和细胞周期的调节^[4-7]。晚期基因的转录起始于主要晚期启动子(Major late promoter, MLP),转录产物参与腺病毒基因组的调控,并编码成熟病毒颗粒装配所必需的衣壳结构蛋白。

1.2 腺病毒复制机制

腺病毒能在人体细胞中高效复制,被感染宿主细胞48 h内能产生约 10^7 拷贝的病毒DNA,较高的复制效率使其成为基因治疗载体的主要选择。腺病毒感染细胞主要分为3个步骤:1)腺病毒的纤维蛋白与宿主细胞膜上的腺病毒-柯萨奇受体(Coxsackievirus-adenovirus receptor, CAR)结合;2)病毒与整合素受体结合,经过内吞作用进入细胞,脱去衣壳,病毒DNA通过核孔进入宿主细胞核;3)基因转录及病毒DNA复制^[8]。腺病毒的DNA复制主要需要5种蛋白质:包括由病毒自身编码产生的3种蛋白pTP、Pol和DBP,以及来自宿主细胞的2种细胞转录因子NFI和Oct-1。pTP、Pol和DBP在一起可以启动DNA复制,但复制效率低,而且链的延伸有限。而细胞转录因子NFI和Oct-1的加入使得病毒DNA的复制效率增强约200倍。HAdV的DNA复制起始发生于模板链的第4个碱基,形成三核苷酸中间体pTP-CAT,然后pTP-CAT中间体回跳3个碱基

与模板链的残基 1-3 配对,在三核苷酸跳跃期间或之后,Pol 与 pTP 解离,延伸继续^[9-11]。

1.3 腺病毒宿主范围

人腺病毒感染宿主具有高度的种属特异性,由于感染受体的差异及宿主范围限制因子的存在,病毒一般只能在自然宿主中有效感染及复制,在非自然宿主中病毒的基因表达和复制受限,无法或只能产生少量的子代病毒。研究发现,非洲绿猴肾细胞 (AGMK) CV-1P 细胞系对腺病毒的宿主范围限制因子为 FAM111A,其存在使得 GMK 不支持人腺病毒的复制^[12];当 FAM111A 被敲除时 HAdV5 可在 CV-1P 细胞系中进行生产性复制并能形成细胞噬斑。因此,宿主范围限制因子的鉴别及敲除是建立人腺病毒异种动物或细胞模型的前提^[13]。另外,细胞膜蛋白 CAR、CD46 和 DSG2 为腺病毒感染的常见受体^[14-15]。B 型腺病毒的感染受体主要为人的 CD46 和 DSG2,但无法与小鼠、仓鼠等啮齿类动物的 CD46 及 DSG2 结合,导致 B 种腺病毒无法感染啮齿类动物^[16-17]。非人灵长类动物与人的亲缘关系最为接近,但至今研究仍未证明人腺病毒可在非人灵长类动物体内发生复制,有必要发现限制性因素并进行基因敲除或基因编辑,以建立非人灵长类人腺病毒动物模型。

1.4 腺病毒的流行感染与致病

腺病毒是急性呼吸系统感染的主要病原体,在全世界范围广泛流行,并呈现季节波动性小、地方散发为主的流行病学特征^[18]。免疫功能低下或缺陷人群最易被 HAdV 感染,可能来自外源新发感染,也可能源于潜伏感染病毒的激活^[19]。全球范围内人群感染腺病毒类型主要为 B 种 (HAdV3、HAdV7、HAdV11、HAdV14、HAdV55) 和 C 种 (HAdV1、HAdV2、HAdV5),中国境内呼吸道感染腺病毒的主要类型为 B3 和 B7 基因型,各基因型病毒的不同流行株具有明显的地域限制性^[20]。

腺病毒感染诱发的疾病包括急性呼吸道疾病和急性支气管炎^[21]、流行性结膜炎、肠胃炎、角膜结膜炎、脑膜脑炎、膀胱炎、心肌炎甚至重症肺炎,并可能导致肥胖等非炎症症状^[22-29]。腺病毒传播的方式主要为空气飞沫、直接接触污染物或是受感染的组织、饮用感染的水源,并可通过粪-口途径传播^[30]。根据病毒类型及感染方式的不同,腺病毒感染后的潜伏期从 2 d 到 2 周不等,尽管腺病毒感染的致病性较弱且具有自限性,但也可能导致严重病症^[31]。如 C 种腺病毒可在 80% 的感染儿童的扁桃体淋巴细胞中建立持续感染。而 B 种腺病毒感染更常见于成年人,且感染症状更为严重^[32-33]。B7 亚型腺病毒感染患者发生重症比例尤其高^[21]。

2 腺病毒载体的类型及优化

自 20 世纪 60 年代腺病毒就被作为基因表达载体,在分子生物学领域得到应用。腺病毒载体具有其他载体不具备的诸多特点,多种类型的腺病毒载体得以成功构建,并获得工程化应用。

目前,用作肿瘤治疗的载体主要有两大类:病毒载体和非病毒载体。腺病毒是研究最深入的病毒载体之一,也是目前基因治疗最常用的病毒载体。与其他病毒载体相比较,腺病毒载体具有病毒载体本身基因突变率低、可同时插入并表达多个基因、外源基因表达效率高且不影响病毒复制、可插入更大的外源基因片段、能使外源基因良好的表达并不影响病毒复制、病毒颗粒稳定不易突变、能同时表达多个基因、重组病毒易于高滴度生产、重组后的腺病毒致病力低或不致病等特点^[6,34-35],因此被广泛用作基因治疗和溶瘤。

腺病毒和腺病毒载体具有一定的免疫原性,在宿主体内可诱导产生先天或获得性的免疫反应^[36],可能影响腺病毒作为基因治疗载体和疫苗开发的应用前景。为消除载体的免疫原性并扩大其基因装载容量,腺病毒载体的研究主要经历了 3 个阶段,并对应开发了 3 种载体类型。最早是

将腺病毒载体去掉 E1/E3 基因区,可允许约 7.5 kb 的外源基因插入,此种腺病毒载体会引起较强的宿主免疫反应且插入基因的表达不稳定。进而,将腺病毒的 E2 区或 E4 区基因部分或全部敲除,该载体最大允许约 14 kb 的外源基因插入,外源基因在宿主细胞中更加稳定表达,载体引起的宿主抗病毒免疫反应大大减弱。最近开发的腺病毒载体又称为空壳载体 (Gutless or gutted adenovirus vectors),仅保留基因组两端的末端倒置重复序列 (Inverted terminal repeat, ITR) 及包装信号约 500 bp 的顺式作用元件,其他部分功能全部由辅助病毒完成。空壳腺病毒在保留了较高转染效率的同时,外源基因装载能力达到 37 kb 左右,外源基因的表达更稳定,同时载体的安全性进一步提高。尽管早期的腺病毒载体相比后两种载体具有明显的缺点,但是其基因转移能力适应于大多数的基因治疗的需求且更易获得高滴度病毒,目前仍被广泛应用^[6]。

腺病毒也是疫苗开发中常采用的载体,以 5 亚型腺病毒载体居多。然而,5 亚型腺病毒因广泛流行,特别是在发展中国家人群中已经存在较高抗体水平,可能引起某些特定免疫反应,使得基于 5 亚型腺病毒载体基因工程疫苗的临床应用受到较大限制^[37]。同时,多种血清型的腺病毒载体也被用于 HIV-1、埃博拉、流感、结核、登革、疟疾等多种传染病的疫苗开发,并取得较大的进展^[38]。虽然腺病毒载体具有很多优点,但在临床应用方面依然存在诸多问题,例如携带的外源基因持续时间较短且缺乏靶向性,尤其是腺病毒载体自身引起的宿主免疫反应使得重组病毒易于被机体清除。因此,有必要提高载体的靶向性,并改造载体提高病毒颗粒的隐蔽性,降低宿主对载体的免疫识别^[39]。基于此,有研究将腺病毒颗粒表面的蛋白质或脂质体与聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 共价连接 (PEG 化),PEG 化可有效掩盖病毒蛋白,使载体免受细胞和体液免疫识

别,从而降低腺病毒载体的免疫原性^[40-41]。也可使用精氨酸连接形成生物降解型阳离子聚合物 (Arginine-grafted bio-reducible polymer, ABP),结合在腺病毒表面的 ABP 聚合物可降低腺病毒蛋白与血清蛋白结合,保护病毒不被免疫识别并清除,提高基因治疗载体的体内稳定性,并提高了外源插入基因的转导效率^[39]。

随着分子生物学技术的不断发展,腺病毒载体的功能及应用方面取得了较大进展。但腺病毒载体从实验室向成熟的临床应用,还需要在其免疫原性及使用安全性等方面展开更为深入的研究。

3 溶瘤腺病毒与肿瘤治疗

在目前的肿瘤治疗中,传统疗法分为手术治疗、化疗和放疗等。这些传统的治疗方法并不能完全地杀死肿瘤细胞并抑制肿瘤细胞的活性,治疗后存活的肿瘤细胞可能发生组织间的转移从而导致肿瘤复发。相较于传统疗法,溶瘤病毒 (Oncolytic viruses, OV) 还能间接地借助宿主的免疫系统攻击肿瘤细胞,从而在一定程度上大大延长患者的生命。

溶瘤病毒具有在恶性肿瘤细胞中选择性复制的能力,引起机体炎症反应和癌细胞裂解,促进宿主对癌细胞的清除,是一种非常有潜力的肿瘤治疗生物药物^[42]。理想的溶瘤病毒应该容易生产、易于操作、对癌细胞溶解的选择性强、并具有较强的递送能力,并且致病性较低。目前,主要有单纯疱疹病毒 (T-VEC)、牛痘病毒 (Pexa-vec)、反转录病毒和腺病毒 (ONCOS-102),可用于溶瘤病毒开发。单纯疱疹病毒和牛痘病毒具有编码数百种蛋白质的较大基因组,为提高其安全性和特异性,需要敲除较多的基因,而反转录病毒则具有其基因组插入到宿主基因组的危险^[5]。腺病毒具有广泛的组织嗜性和感染多种分裂期及非分裂期细胞的能力,是被研究最为深入的病毒载体之一,在基因治疗和病毒溶瘤方面一直具有很高的研究潜力。

用作溶瘤的腺病毒又称条件复制型腺病毒 (Conditionally replicating adenoviruses, CRADs), 载体经过基因改造, 以腺病毒科 C2 和 C5 基因亚型哺乳动物腺病毒为主。溶瘤腺病毒利用肿瘤细胞与正常细胞在基因表达与代谢途径方面的差异, 可在肿瘤细胞中特异性增殖, 进而裂解肿瘤细胞, 但对正常细胞仅产生有限伤害^[43]。腺病毒突变型 ONYX-015 是第一种在肿瘤细胞中选择性复制的溶瘤病毒, 病毒载体的 E1B-55K (P53 灭活剂) 片段缺失, 使其获得在肿瘤细胞特异性增殖的能力, 进而抑制肿瘤细胞生长甚至溶解细胞^[34]。H101 (E1B-55K 与 E3 缺失) 与 ONYX-015 功能相似, 是第一个在中国被批准开展临床试验的溶瘤腺病毒^[44]。Delta-24 溶瘤病毒则是载体 E1A 基因缺失了 Rb 蛋白结合位点, Rb 蛋白与 E2F 转录因子结合, 使得 E2F 转录因子不能进入细胞核发挥作用, 因此该溶瘤病毒只能在具有激活的 E2F 依赖性基因表达的肿瘤细胞中进行复制^[8, 34]。Delta-24 的衍生溶瘤腺病毒 DNX-2401 也处于研究开发中。溶瘤腺病毒通过直接溶瘤作用选择性杀伤肿瘤细胞, 还能引起宿主的抗肿瘤免疫反应^[45]。

腺病毒载体是一种高效的免疫治疗剂, 可以成功地用于免疫增强疗法。在单一溶瘤作用治疗效果不佳的情况下, 可将腺病毒载体与现有的免疫治疗、基因疗法、化学疗法以及放射疗法等多种癌细胞治疗方法相结合, 可能更好地清除恶性肿瘤细胞。同时, 人体免疫系统具有高效性和全身性的特点, 将病毒溶瘤疗法和免疫疗法相结合具有更大的临床应用潜力^[45-46]。与传统的放射疗法、化学疗法及靶向治疗不同, 免疫疗法是通过刺激宿主自身的免疫系统, 引起机体产生抗肿瘤免疫应答。某些细胞因子如 IL-2、IL-6、IL-24、GM-CSF、TNF- α ^[47]等也具有一定的抗肿瘤治疗效果, 将这些细胞因子基因插入到病毒载体基因组中, 细胞因子表达可以增强宿主的免疫反应。

溶瘤腺病毒可以携带更多的肿瘤治疗基因, 与传统治疗方法相比具备更多的抗肿瘤活性, 但

仍然达不到理想的治疗效果。虽然溶瘤腺病毒与传统治疗方法相结合可以产生更好的治疗效果, 但提高溶瘤腺病毒的靶向性和安全性依然是未来的研究方向之一。总的来说, 随着各种问题的不断解决, 溶瘤腺病毒将在肿瘤治疗中发挥出不可或缺的作用。

4 腺病毒载体用于基因治疗

基因治疗是以改变人的遗传基因为基础的医学手段, 是将有确定功能的基因转移到病人的细胞中以纠正致病基因的治疗方法, 是将目的基因导入靶细胞与宿主的基因相整合并成为宿主遗传物质的一部分。

选择合适的载体是基因治疗关键环节。腺病毒是基因治疗最为广泛采用的载体类别。溶瘤腺病毒自身对肿瘤细胞杀伤作用有限的情况下, 在腺病毒基因组上插入肿瘤治疗基因, 可利用腺病毒载体的复制并表达产生抗体蛋白质, 大大提高治疗肿瘤的有效性。早在 1980 年, 腺病毒就被用作基因治疗载体, 此种缺失 E1A 基因的腺病毒载体自身不能复制, 可通过携带肿瘤抑制因子或自杀基因用于癌症的基因治疗。基因治疗还可激活机体免疫反应发挥作用, 如可激发细胞因子 GM-CSF、IL-2^[48]、IL-12^[49]、IL-18^[50]和 IL-24^[51]分泌, 产生提高 T 细胞增殖与细胞毒性、诱导干扰素- γ (IFN- γ) 的产生、抑制肿瘤血管生成^[52]等相关效应, 发挥更大的肿瘤治疗效果。

病毒载体插入自杀基因导致肿瘤细胞死亡, 是另一种常用的靶向肿瘤治疗方法, 将多个自杀基因和条件复制启动子结合应用则更大提高选择性, 降低毒副作用。常用的自杀基因包括果蝇多底物脱氧核苷激酶 (Dm-DNK)、胸腺激酶 (TK)、胞嘧啶脱氨酶 (CD) 及肿瘤坏死因子相关凋亡配体 (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)。其中, TRAIL 与肿瘤细胞表面的受体结合后, 通过死亡结构域激发和传导细胞凋亡信号、激活 caspase 蛋白酶解级联反

应而导致细胞死亡, 已经被广泛证实具有诱导肿瘤细胞凋亡的功能^[53]。

腺病毒载体作为基因治疗应用最为广泛的载体之一, 虽然在应用上仍有一些潜在的问题尚未解决, 但腺病毒载体具有其他载体无法比拟的优点, 将成为基因治疗强有力的工具。

5 讨论与展望

随着对腺病毒分子结构及感染机制研究的逐渐深入, 腺病毒载体、溶瘤腺病毒以及腺病毒基因治疗等方面的开发应用受到更为广泛关注, 也奠定了良好的研究基础。已有研究表明, 由于常见的呼吸道及多种途径的腺病毒感染, 人体对腺病毒感染有一定预先存在的免疫力。若是治疗人体较大器官组织系统或实体瘤以及扩散性的肿瘤细胞则必然通过血液进行输送, 然而机体复杂的免疫机制可阻止病原体侵入人体并施加各种障碍, 甚至引发急性毒性, 严重阻碍了基于腺病毒载体的治疗, 因此全身递送基于腺病毒载体的治疗方案不可行。腺病毒载体的免疫原性在一定范围内是有利的, 能激发人体本身的免疫系统攻击肿瘤细胞使人体组织细胞具备更多的抗肿瘤活性, 但强大的免疫原性会阻碍基于腺病毒载体疫苗的治疗。另外腺病毒载体的基因治疗可在健康的组织中引起免疫反应, 但由腺病毒载体引起的机体先天及适应性免疫对已经肿大和扩散肿瘤的治疗效果并不理想。在腺病毒载体上添加多种治疗基因, 或者在确保患者安全的前提下通过对载体进行修饰使其增强溶瘤活性以刺激机体产生更多的先天及适应性免疫, 都是今后基于腺病毒载体的研究方向。另外尚需要深入探索如何使腺病毒载体携带外源基因持续表达、如何增加病毒颗粒的逃避免疫监控的能力、如何提高载体的器官组织靶向定位, 以期能构建出满足临床需要的腺病毒载体。针对以上腺病毒载体的应用需要克服的障碍, 解决问题的潜在方法之一是选用其他类型的腺病毒。目前研究的腺病毒载体主要以 C 种

腺病毒为主, 尽管已经鉴定出了多种腺病毒类型, 但对其他类型的腺病毒仍然缺乏系统的深入性探索, 因此其他类型的腺病毒可能在未来的载体应用中发挥巨大的作用。经过基因改造后的溶瘤腺病毒具有更强的肿瘤细胞杀伤能力, 其与其他肿瘤治疗方法结合具有更好的治疗效果, 但溶瘤腺病毒用于治疗肿瘤的有效性和安全性需要进一步研究。另外, 目前仍无腺病毒疫苗和特效抗腺病毒药物可用, 主要原因是没有合适的动物模型支持腺病毒感染和致病机制的研究, 构建人腺病毒感染与致病的动物模型也至关重要。

REFERENCES

- [1] Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, et al. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953, 84(3): 570–573.
- [2] Kosulin K. Intestinal HAdV infection: tissue specificity, persistence, and implications for antiviral therapy. *Viruses*, 2019, 11(9): 804.
- [3] Said A, Woldemariam TA, Tikoo SK. Porcine adenovirus type 3 E3 encodes a structural protein essential for capsid stability and production of infectious progeny virions. *J Virol*, 2018, 92(20): e00680–18.
- [4] Halbert DN, Cutt JR, Shenk T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol*, 1985, 56(1): 250–257.
- [5] Larson C, Oronsky B, Scicinski J, et al. Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget*, 2015, 6(24): 19976–19989.
- [6] Sun P, Lu ZJ, Liu ZX. Advance in adenovirus vector and its application in research on foot-and-mouth disease vaccine. *Progr Vet Med*, 2007, 28(8): 59–64 (in Chinese).
孙普, 卢曾军, 刘在新. 腺病毒载体及其在口蹄疫疫苗研究中的应用. *动物医学进展*, 2007, 28(8): 59–64.
- [7] Liu X, Zhang DL, Liu WH. Progress of target therapy with oncolytic adenovirus for cancer. *Progr Mod Biomed*, 2011, 11(7): 1382–1384 (in Chinese).

- 刘旭, 张东亮, 刘文虎. 溶瘤腺病毒在肿瘤靶向治疗中的研究进展. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1382–1384.
- [8] Sun T, He XL. Research progress of preparation strategy of oncolytic adenovirus for targeted cancer. *Chin J Cancer Biother*, 2018, 25(2): 198–205 (in Chinese).
孙婷, 何向蕾. 靶向肿瘤的溶瘤腺病毒制备策略的研究进展. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(2): 198–205.
- [9] de Jong RN, van der Vliet PC. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*, 1999, 236(1): 1–12.
- [10] van Breukelen B, Brenkman AB, Holthuis PE, et al. Adenovirus type 5 DNA binding protein stimulates binding of DNA polymerase to the replication origin. *J Virol*, 2003, 77(2): 915–922.
- [11] Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a013003.
- [12] Henry CJ, Slifkin M, Merkow L. Mechanism of host cell restriction in African green monkey kidney cells abortively infected with human adenovirus type 2. *Nat New Biol*, 1971, 233(36): 39–41.
- [13] Fine DA, Rozenblatt-Rosen O, Padi M, et al. Identification of FAM111A as an SV40 host range restriction and adenovirus helper factor. *PLoS Pathog*, 2012, 8(10): e1002949.
- [14] Roelvink P, Lizonova A, Lee JGM, et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, 1998, 72(10): 7909–7915.
- [15] Annasara L, Liaci AM, Liu Y, et al. Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *PloS Pathog*, 2015, 11(2): e1004657.
- [16] Wang HJ, Beyer I, Persson J, et al. A new human DSG2-transgenic mouse model for studying the tropism and pathology of human adenoviruses. *J Virol*, 2012, 86(11): 6286–6302.
- [17] Trinh HV, Lesage G, Chennampampil V, et al. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J Virol*, 2012, 86(3): 1623–1637.
- [18] Sağlık I, Mutlu D, Ongüt G, et al. Investigation of adenoviruses in children with lower respiratory tract infections. *Mikrobiyol Bul*, 2013, 47(2): 282–294.
- [19] Radke JR, Cook JL. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr Opin Infect Dis*, 2018, 31(3): 251–256.
- [20] Wang HP, Zheng YJ, Zhao HX, et al. Adenovirus detection in 25 602 hospitalized children with respiratory tract infection. *Chongqing Med J*, 2018, 47(12): 1661–1663 (in Chinese).
王和平, 郑跃杰, 赵海霞, 等. 25 602 例住院儿童呼吸道感染腺病毒感染检出分析. 重庆医生, 2018, 47(12): 1661–1663.
- [21] Chehadeh W, Al-Adwani A, John SE, et al. Adenovirus types associated with severe respiratory diseases: A retrospective 4-year study in Kuwait. *J Med Virol*, 2018, 90(6): 1033–1039.
- [22] Shauer A, Gotsman I, Keren A, et al. Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment. *Isr Med Assoc J*, 2013, 15(3): 180–185.
- [23] De Ory F, Avellón A, Echevarría JE, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol*, 2013, 85(3): 554–562.
- [24] Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, et al. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008–2009. *J Infect Dis*, 2013, 208(5): 790–800.
- [25] Quintana EC. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Ann Emerg Med*, 2004, 44(4): 433–434.
- [26] Mameli C, Zuccotti GV. The impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia. *Curr Infect Dis Rep*, 2013, 15(3): 197–202.
- [27] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adenovirus-associated epidemic keratoconjunctivitis outbreaks-four states, 2008–2010. *Mmwr Morb Mortal Wkly Rep*, 2013, 62(32): 637–641.
- [28] Lynch JP, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32(4): 494–511.
- [29] Esposito S, Preti V, Consolo S, et al. Adenovirus 36 infection and obesity. *J Clin Virol*, 2012, 55(2): 95–100.
- [30] Matthes-Martin S, Boztug H, Lion T. Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11(10): 1017–1028.
- [31] Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol*

- Rev, 2014, 27(3): 441–462.
- [32] Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, et al. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis*, 2007, 196(10): 1465–1473.
- [33] Scott MK, Chommanard C, Lu XY, et al. Human adenovirus associated with severe respiratory infection, Oregon, USA, 2013–2014. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(6): 1044–1051.
- [34] Niemann J, Kühnel F. Oncolytic viruses: adenoviruses. *Virus Genes*, 2017, 53(5): 700–706.
- [35] Liu Y, Du LF. Research progress of adenovirus vector. *Med Recapitulate*, 2015, 21(24): 4438–4440 (in Chinese).
刘阳, 杜联芳. 腺病毒载体的研究进展. *医学综述*, 2015, 21(24): 4438–4440.
- [36] Carlin CR. New insights to adenovirus-directed innate immunity in respiratory epithelial cells. *Microorganisms*, 2019, 7(8): 216.
- [37] Baden LR, Walsh SR, Seaman MS, et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env Vaccine (IPCAVD 001). *J Infect Dis*, 2012, 207(2): 240–247.
- [38] Zhang C, Zhou DM. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(8): 2064–2074.
- [39] Uusi-Kerttula H, Hulin-Curtis S, Davies J, et al. Oncolytic adenovirus: strategies and insights for vector design and immuno-oncolytic applications. *Viruses*, 2015, 7(11): 6009–6042.
- [40] Gao JQ, Eto Y, Yoshioka Y, et al. Effective tumor targeted gene transfer using PEGylated adenovirus vector via systemic administration. *J Control Release*, 2007, 122(1): 102–110.
- [41] Reetz J, Herchenröder O, Pützer BM. Peptide-based technologies to alter adenoviral vector tropism: ways and means for systemic treatment of cancer. *Viruses*, 2014, 6(4): 1540–1563.
- [42] Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, et al. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(8): 559–567.
- [43] Shaw AR, Suzuki M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *Curr Opin Virol*, 2016, 21: 9–15.
- [44] Liu TC, Kirn D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, 2008, 15(12): 877–884.
- [45] Guo W, Jin J, Xiao BD, et al. Foregrounds and prospects of anti-tumor immunotherapy based on oncolytic adenovirus. *Chin J Cell Biol*, 2018, 40(6): 1016–1022 (in Chinese).
郭婉, 金槿, 肖伯端, 等. 基于溶瘤腺病毒抗肿瘤免疫治疗的前景与展望. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(6): 1016–1022.
- [46] Zhou XL, Tang WR. Advances in research on oncolytic adenoviruses in tumor therapy. *Chin J Virol*, 2014, 30(3): 318–324 (in Chinese).
周小龙, 唐文如. 溶瘤腺病毒治疗肿瘤的研究进展. *病毒学报*, 2014, 30(3): 318–324.
- [47] LaRocca CJ, Han J, Gavrikova T, et al. Oncolytic adenovirus expressing interferon alpha in a syngeneic Syrian hamster model for the treatment of pancreatic cancer. *Surgery*, 2015, 157(5): 888–898.
- [48] Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 2004, 28(3): 109–123.
- [49] Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 2003, 19(5): 641–644.
- [50] Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, et al. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol*, 1999, 163(2): 583–589.
- [51] Fisher PB, Sarkar D, Lebedeva IV, et al. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (*mda-7/IL-24*): novel gene therapeutic for metastatic melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224(3): 300–307.
- [52] Sarkar D, Lebedeva IV, Gupta P, et al. Melanoma differentiation associated gene-7 (*mda-7*)/IL-24: a ‘magic bullet’ for cancer therapy? *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(5): 577–586.
- [53] Zhang Y. LiCl can enhance TRAIL anticancer effect in oncolytic adenovirus vector or *in vivo*[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2013 (in Chinese).
张媛. LiCl 能在溶瘤腺病毒载体中或体内增强 TRAIL 的抗癌作用[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2013.

(本文责编 郝丽芳)