

腺病毒及其研究进展

陈娜娜, 向冬喜, 郑丛龙

(大连大学医学院 病原生物学教研室, 辽宁 大连 116622)

摘要: 本文从腺病毒的分类、结构和受体等方面对腺病毒进行了介绍, 同时对腺病毒的感染和致病性做了综述, 并进一步介绍了抗腺病毒治疗研究进展和腺病毒载体的应用。对腺病毒多方面进行较全面的了解, 有助于促进抗腺病毒药物的研发和加强腺病毒载体在基因治疗中得到更好的应用。

关键词: 腺病毒; 感染性; 致病性; 治疗; 载体

中图分类号: R 373.1 文献标志码: A 文章编号: 1671-7295(2010)05-0586-05

A adenovirus and its research progress

CHEN Na-na XIANG Dong-xi ZHENG Cong-bing

(Department of Pathogen Biology of Medical College Dalian University, Dalian 116622 China)

Abstract The category, structure and receptor of adenovirus are introduced in this article. It also describes the infection and pathogenicity of adenovirus. Furthermore, the research progress of anti-adenovirus therapy and the application of adenovirus vector are reviewed. With the comprehensive understanding of adenovirus, it is helpful to promote the development of anti-adenovirus medicine and the application of adenovirus vector in gene therapy.

Key words adenovirus; infection; pathogenicity; therapy; vector

腺病毒 (Adenovirus) 是从手术切除的扁桃体组织分离培养得到的一种 DNA 病毒, 主要在细胞核内繁殖, 常引起人上呼吸道和眼部上皮细胞感染。腺病毒作为普通的机会性病原体长期存在于人群中, 免疫功能低下的病人感染腺病毒的机率较大, 在居住密集的人群, 如军队人员中可引起急性发热性呼吸道疾病的暴发流行^[1]。随着免疫学、分子生物学、分子病毒学等各个学科的发展和相互渗透, 腺病毒在分子水平上的应用越来越广泛, 特别是有关腺病毒的感染、致病、抗腺病毒的治疗和腺病毒载体的应用已成为研究的热点。因腺病毒结构简单, 宿主范围广, 感染率高, 易于培养和纯化, 使腺病毒作为

载体的基因治疗迅速发展。本文就腺病毒及其相关研究进展做一综述。

1 腺病毒的特征

1.1 腺病毒的分类

根据宿主范围不同, 腺病毒分为哺乳动物腺病毒属 (Mastadenovirus) 和禽类腺病毒属 (Aviadenovirus)。人腺病毒 (Human adenoviruses, HAdV) 属于腺病毒科 (Adenoviridae), 根据免疫学、生物学、生物化学特性不同, 将其分为 A~G 7 个亚种, 共有 52 个血清型^[2], 不同的血清型有不同的器官亲和性并引起相应的临床表现。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870681)

收稿日期: 2010-06-27; 修回日期: 2010-07-12

作者简介: 陈娜娜 (1986-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生。E-mail: chennana20080@163.com

通信作者: 郑丛龙, 教授。E-mail: zc9812@yahoo.com.cn

1.2 腺病毒的结构

腺病毒呈无囊膜的球形结构, 其病毒粒子在感染的细胞核内常呈晶格状排列, 每个病毒颗粒包含一个 36 kb 的线性双链 DNA, 两端各有一个 100~600 bp 的反向末端重复序列 (inverted terminal repeat ITR), ITR 的内侧为病毒包装信号, 是病毒包装所需要的顺式作用元件。基因组包含早期表达的与腺病毒复制相关的 E1~E4 基因和晚期表达的与腺病毒颗粒组装相关的 L1~L5 基因。线状双股 DNA 与核心蛋白形成直径为 60~65 nm 的髓芯, 被包裹于衣壳内。衣壳呈二十面体对称, 由 252 个直径 8~10 nm 的壳粒组成, 壳粒排列在三角形的面上, 每边 6 个, 其中 240 个为六邻体 (非顶点壳粒), 另 12 个为五邻体基底 (顶点壳粒)。每个六邻体是六邻体蛋白的同源三聚体, 三聚体的六邻体分子有一个三角形的塔尖和五面体的基底, 塔区由 4 个环构成即 loop1 loop2 loop3 loop4 基底包含两个区域 P1 P2 区^[3]。六邻体上的表位 (epitope) 是诊断不同血清型的标准, 它包括哺乳动物腺病毒属的抗原成分, 是病毒体对免疫选择压力最敏感的部位。每个五邻体基底上结合着 1 根 (哺乳动物腺病毒) 或 2 根 (禽腺病毒) 长 9~77.5 nm 的纤维突起, 这些纤维以五邻体蛋白为基底由衣壳面伸出, 纤维顶端形成头节区, 纤突有血清特异性, 且含有负责体外血细胞凝集的种属特异性抗原决定位点。

1.3 腺病毒受体

腺病毒除 B 和 D 亚种外, 其它亚种的受体都是柯萨奇-腺病毒受体^[4]。柯萨奇-腺病毒受体 (Coxsackie-adenovirus receptor CAR) 又称为 HeLa 细胞膜结合蛋白, 是柯萨奇病毒与腺病毒的特异性受体, 其本质是一种细胞间黏附分子, 在上皮细胞的紧密连接和细胞间相互连接处表达, CAR 是相对分子量为 46000 的跨膜糖蛋白, 该蛋白贯通细胞膜, 分为胞外区、跨膜区、胞内区。CAR 表达水平在介导腺病毒感染方面起着重要作用, 其表达在体内是可调节的, 具有阶段依赖性, CAR 受体表达越高, 提示组织器官越容易感染。B 亚种中大多数可与胞膜表面免疫调节分子 CD46 相结合, 但 ADV₃ 和 ADV₇ 分别与相关免疫分子 CD80 或 CD86 结合。D 亚种可与细胞表面普遍存在的唾液酸受体结合^[5]。另一

种参与腺病毒感染细胞的介质是细胞表面的第二受体整合素, 包括 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$, 它与五邻体的基底部相结合^[6], 整合素在细胞表面的表达水平高低, 也影响了腺病毒的感染效率。

2 腺病毒的感染与致病性

2.1 腺病毒的感染

2.1.1 腺病毒引起感染的类型: 腺病毒侵入宿主细胞后至少能引起 3 种感染: ①慢性、潜伏性感染: 常在淋巴细胞内发生, 潜伏感染时外放的病毒量极少, 细胞坏死也不明显, 故临床上感染不明显, 潜伏感染的机制尚不清楚。②溶解性感染: 病毒在细胞内如人类上皮细胞中经历复制过程, 通过溶解细胞作用使细胞死亡。③肿瘤样变异: 此时病毒繁殖只进行最初几步, 然后腺病毒 DNA 与细胞 DNA 整合并复制, 但不产生感染性病毒, 腺病毒抗原性较稳定。

2.1.2 腺病毒流行病学: 腺病毒可通过人、水、媒介物和器械传播, 室温条件下, 腺病毒在污物中存在周期可延长至 3 周。腺病毒在儿童和军营人员中更易发生感染和大规模流行, 大多数婴幼儿在出生后的 5 年内至少感染过 1 种腺病毒株^[7]。在过去的几年中, 腺病毒作为主要的病原体在免疫功能低下宿主如艾滋病、免疫遗传缺陷的患者、骨髓接受者、固体器官和造血干细胞移植者常引起高发病率和死亡率; 儿科经受同种型干细胞移植的病人, 其感染腺病毒后死亡率可高达 60%^[8]。一些致命的感染常由腺病毒血清型 1, 2, 3 引起, 在这些病人体内常会出现细菌、真菌等微生物共感染的情况。艾滋病人感染腺病毒会产生肺炎、肝炎、脑膜软化、肾炎、胃肠炎等并发症。

2.2 腺病毒的致病性

2.2.1 腺病毒所致疾病: 腺病毒是无包膜病毒, 在低 pH 值环境下可稳定存在, 有很强的耐物理和化学试剂的作用, 腺病毒可对胃肠分泌物和胆汁产生耐受, 因此腺病毒可在胃肠内复制, 产生很高的病毒载量。腺病毒常在咽、结膜、肠道及淋巴组织内繁殖, 并导致各种各样的临床症状, 比如呼吸系统的感染、结膜炎、胃肠炎、肝炎、出血性膀胱炎、神经系统的紊乱等。不同的腺病毒亚种会引起不同的疾病, 如人腺病毒 C 亚种主要引起小儿科的上呼吸道感

染,人腺病毒 B 亚种常在成年人中引起流行,人腺病毒 B 和 E 亚种是军营人员感染的主要病因,人腺病毒 F 亚种会引起感染性腹泻^[9]。腺病毒在有免疫力的宿主体内感染是温和的,而且具有自限性。

2.2.2 腺病毒致病机理:对腺病毒感染宿主细胞后引起疾病的致病机制尚不清楚,可能通过以下机制来逃避宿主的免疫应答:①通过与 MHC-I 类分子结合形成复合物来抑制末端氨基酸的糖基化或通过阻断 MHC-I 类分子的转录或 mRNA 的转运而阻止细胞表面 MHC-I 类分子受体的表达。④通过与病毒相关的 RNA 和 E1A 来抑制干扰素对腺病毒的作用。④腺病毒 E1B 基因编码的蛋白可能通过与 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白形成异源复合物来抑制感染细胞的内在凋亡。

在腺病毒持续感染过程中,蛋白 14.7 kDa 和 gp19 起重要作用,14.7 kDa 蛋白与控制宿主免疫反应有关,可以阻断肿瘤坏死因子介导的溶细胞作用;gp19 阻止 MHC-I 类分子转运到感染的细胞表面,减少细胞毒性 T 细胞对感染细胞的攻击^[10]。腺病毒通过感染树突状细胞(dendritic cells, DC)产生早期和晚期抗原来改变细胞表面标志,腺病毒还可通过感染单核细胞来抑制其分化为 DC,从而逃避 T 细胞的识别^[11]。在腺病毒急性感染恢复当中,T 细胞介导的细胞免疫是很重要的,T 细胞功能低下的病人感染腺病毒的几率非常高。Mistchenko 等^[12]研究显示,TNF- α 、IL-6、IFN- γ 在致命的腺病毒感染的儿童血清中含量高,而在轻度腺病毒感染患者体内存在水平很低。体液免疫在腺病毒感染的免疫应答中亦起重要作用,有腺病毒血症的 HSCT(造血干细胞移植)接受者,在免疫应答清除病毒的过程中会产生高水平的血清特异性抗体^[13]。

3 腺病毒的检测方法

对腺病毒的检测依赖于疾病的类型和所获取的标本,确诊腺病毒的存在可采用病毒的细胞培养、抗原测定和基因组检测等技术。

3.1 细胞培养

常用 A549 Hep-2 和 HeLa 细胞来培养临床标本中的腺病毒。除血清型 40 和 41 外,其它腺病毒血清型在人上皮细胞系上生长良好,会导致细胞圆

缩,出现核内包涵体聚集成串等病变现象,细胞病变 2~7 d 可见,可持续到 28 d。尽管细胞培养仍然是金标准,但对临床标本仍是不敏感,且比较慢,易受细菌和真菌的污染。

3.2 抗原检测

常用来直接检测腺病毒在呼吸道和胃肠道的感染,较快速且灵敏度较高。免疫荧光(尤其对呼吸道标本、咽拭子和活组织标本)和酶免疫分析(尤其对于粪便标本)是常用的方法,与细胞培养相比,免疫荧光所测腺病毒的灵敏性能提高 40%~60%^[14],其它直接测定抗原的方法包括免疫层析法和乳胶凝集法。研究证实,与细胞培养检测方法相比,使用免疫层析试剂盒所测定的灵敏度可达 90%^[15]。

3.3 电子显微镜

腺病毒的形态学特征决定其可用电子显微镜进行鉴别,但这种方法主要在一些机构使用,依据粪便中存在的病毒颗粒(大约 $10^6 \sim 10^8$ 个/mL),常用来诊断急性胃肠炎。

3.4 组织病理学

依据肺的组织病理学特征可对腺病毒引起的肺炎加以鉴别,肺的组织病理学特征包括弥散性肺炎、支气管上皮细胞的坏死、单核细胞浸润的毛细支气管炎和透明膜的形成等,通过原位杂交、免疫组化和 PCR 可进一步进行鉴定。

3.5 分子生物学

用来检测腺病毒基因组很灵敏,当病人体内病毒载量较低或需要快速的检验结果时更为适用。最近几年分子生物学的方法在临床运用越来越多,常选择与六邻体基因、纤突基因或病毒相关的 RNA I 和 II 作为 PCR 引物,PCR 方法包括常规的 PCR、RealTime-PCR,常规的 PCR 是一种定量分析的方法,需要 1~2 d 的时间,而 RealTime-PCR 可以在数小时内定量分析出结果。Lawrence 等^[16]应用的 PCR 和电喷雾电离质谱法相结合技术可对人腺病毒的血清型进行快速检测和鉴定。

3.6 序列测定

德国 Madischiw 等^[17]结合了普通 PCR 或者定量 PCR 与测序相结合技术,发明了一种两步诊断法。测序是对核酸序列最全面、直观地反映。随着下一代测序技术的发展,测序速度得到了质的提升。

因此, 未来将测序应用于诊断也是一种趋势。

4 抗腺病毒治疗

药物抗腺病毒机制可能有以下几种: ①药物与腺病毒表面特定部位结合, 在病毒吸附细胞的过程中, 药物可能会破坏腺病毒的纤突, 阻止了病毒的吸附, 使病毒不能进入细胞内复制。④药物与细胞表面受体结合, 改变细胞构象, 使对腺病毒敏感的细胞变为非敏感细胞, 从而改变细胞膜上病毒的数量和结构来控制病毒的感染。④药物的某些成分进入细胞内, 对胞内基因的代谢和表达起调节作用, 从而抑制病毒核酸复制或阻止病毒蛋白合成。

目前, 没有正式的药物用于抗腺病毒感染的治疗, 只有几种抗病毒药物如更昔洛韦, 阿糖腺苷, 病毒唑, 西多福韦等用于一些病例和群体的研究^[18]。楚建平等^[19]通过体外试验初步观察到, 更昔洛韦虽然不能直接灭活 AdV3 和阻止 AdV3 吸附至敏感细胞, 但它具有抑制 AdV3 复制的作用, 其作用明显优于病毒唑。病毒唑是一种嘌呤核苷酸类似物, 在体外能抑制 DNA 和 RNA 病毒, 其作用机制可能是抑制 RNA 的加帽活动或直接抑制病毒多聚酶的作用或增加新合成 DNA 的基因突变^[20], 其副作用主要是引起温和可逆的镰状细胞贫血, 利用病毒唑治疗处于传播腺病毒高发期的病人, 效果不明显。西多福韦是新型的胞嘧啶核苷磷酰基甲醚衍生物, 是一种广谱抗病毒药物, 在体外能抑制几种 DNA 病毒的复制, 在感染的细胞内通过形成二磷酸核苷类似物, 与正常的核苷竞争性整合入病毒 DNA, 最终导致核酸链的延伸终止。尽管其有肾毒性、骨髓抑制、眼色素膜炎等副作用, 但西多福韦快速治疗腺病毒感染成功的几率很高^[21]。

5 腺病毒作为载体的应用前景

5.1 腺病毒载体的特性

腺病毒载体是黏膜免疫的理想载体, 经口、鼻、气管等黏膜表面接种, 可获得包括黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫在内的全面免疫。腺病毒载体易于操作构建, 能有效地将外源基因转染到各种靶细胞或组织中, 且能高效表达外源基因, 尤其是以腺病毒为载体构建的重组活疫苗在进行癌症、遗传病和重要

传染病的基因治疗等方面的研究应用最为热门。

5.2 腺病毒载体优缺点及应用

腺病毒载体生产工艺简便、制备纯化相对容易、产毒滴度高、外源基因容量大 (7~8 kb), 腺病毒载体携带的外源基因独立于靶细胞染色体之外表达, 无插入突变激活癌基因的危险, 这使得腺病毒成为表达和传递治疗基因的主要候选者^[22]。由于腺病毒载体可以实现治疗基因短暂的高表达, 因此它在癌症基因治疗中具有无可比拟的优势, 涉及腺病毒基因转移的肿瘤治疗方案有很多, 如利用病毒或非病毒载体向机体导入免疫调节蛋白及肿瘤特异性抗原来诱导抗肿瘤细胞免疫, 以达到限制肿瘤生长, 促使肿瘤消退的目的。腺病毒载体还被用于转移 IL-2 GM-CSF 等细胞因子和 p53 等抑癌基因, 治疗的肿瘤包括神经胶质细胞瘤, 头颈部肿瘤等^[23]。腺病毒载体能诱导机体对转基因产物产生体液和细胞免疫应答的能力, 因此被用作疫苗载体。Susan 等^[24]研究发现, L4-22K 和 L4-33K 作为启动子来控制 HA5V 的晚期阶段的感染, 这为腺病毒载体的应用提供了新的表达模式, 重组的腺病毒载体 HA5V (Human Adenovirus 5) 为激活淋巴细胞抗肿瘤和抗病毒作用提供了一个很好的平台。不足的是, 一些优先暴露感染 HA5V 的受试者, 在接种 HM-HA5V 载体构建的疫苗后, 会增加对 HIV 的易感性^[25], 同时由于对 AdV5 有免疫力人群的普遍存在, 可能会限制腺病毒载体的应用^[26]。Shaoning Jiang 等^[27]研究显示, 重组腺病毒载体会减弱肝脏上胰岛素信号分子的表达, 最终导致体内糖代谢的改变, 因此在应用腺病毒载体进行基因治疗和研究时应予以考虑。针对腺病毒载体存在的表达时间短、免疫原性强, 易引起炎症反应和系统毒性等特点, 最新研究的复制型腺病毒载体、低抗原性腺病毒载体和靶向腺病毒载体具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Kevin LR, Anthony W, Hawksworth, et al Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits 1999-2004 [J]. Vaccine, 2006, 24(15): 2835-2842
- [2] Jones M, Harrach B, Ganac R D, et al New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis [J]. J

- Virology 2007, 81: 5978–5984.
- [3] 谭耀驹, 谢菲. 腺病毒分型诊断研究进展 [J]. 广东医学, 2008, 29(1): 156–157.
- [4] Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, 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]. J Virol 1998, 72: 7909–7915.
- [5] Russell W C. Adenoviruses: update on structure and function [J]. J Gen Virol 2009, 90: 1–20.
- [6] Marček E. Adenoviruses in immunocompromised hosts [J]. Clin Microbiol Rev 2008, 21(4): 704–715.
- [7] Nasreen B, Mary E, Wroblewski A. Adenovirus [J]. Pediatr Rev 2010, 31: 173–174.
- [8] Walls T, Shankar A G, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients [J]. Lancet Infect Dis 2003, 3: 79–86.
- [9] Soumitra R, Luk H, Vandenberghc, et al. Isolation and Characterization of Adenoviruses Persistently Shed from the Gastrointestinal Tract of Non-Human Primates [J]. PLoS Pathog 2009, 5(7): 1–7.
- [10] Lichtenstein D L, Toth K, Donnin K, et al. Wold Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins [J]. Int Rev Immunol 2004, 23: 75–111.
- [11] Tobias K, Klaus H, Tobias F, et al. Dendritic cells are susceptible to infection with wild-type adenovirus, inducing a differentiation arrest in precursor cells and inducing a strong T-cell stimulation [J]. J Gen Virol 2010, 91(5): 1150–1154.
- [12] Mistchenko A, D'èz R A. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome [J]. J Pediatr 1994, 124: 714–720.
- [13] Heensken B, Lankester A C, Vreeswijk T, et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viraemia in pediatric stem-cell recipients [J]. Infect Dis 2005, 191: 520–530.
- [14] Shetty A K, Treynor E, Hill D W, et al. Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children [J]. Pediatr Infect Dis 2003, 22: 789–794.
- [15] Fujimoto T, Okafuji T, Ito S M. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR [J]. Clin Microbiol 2004, 42: 5489–5492.
- [16] Lawrence B B, Thomas A H, Brian L, et al. Rapid Detection and Molecular Serotyping of Adenovirus by Use of PCR Followed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. J Clin Microbiol 2008, 46(2): 644–651.
- [17] Madischiw, LfelR, Heima et al. Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients [J]. J Med Virol 2006, 78(9): 1210–1217.
- [18] Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections [J]. Antivir Res 2006, 71: 172–180.
- [19] 楚建平, 张国成, 许东亮, 等. 更昔洛韦体外抗腺病毒作用的初步观察 [J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(1): 38–39.
- [20] Arav-Boger E, Echavarría M. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient [J]. Infect Dis 2000, 19: 1097–1100.
- [21] Bordignon P, Le Faou A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Clin Infect Dis 2001, 32: 1290–1297.
- [22] Ma H, Liu Y, Liu S, et al. Oral adeno-associated virus-TRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice [J]. Hepatology 2005, 42(6): 1355–1363.
- [23] 黄文林. 分子病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 369–387.
- [24] Susan J M, Gillian E S, Keith N. Leppard. Adenovirus Late-Phase Infection Is Controlled by a Novel L4 Promoter [J]. J Virol 2010, 84(14): 7096–7104.
- [25] Buchbinder SP, Mohntra DV. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept trial [J]. Lancet 2008, 372: 1881–1893.
- [26] Anne K, Hildevaldo B, Herve R, Heischman, et al. The Influence of Innate and Pre-existing Immunity on Adenovirus Therapy [J]. J Cell Biochem, 2009, 1: 108–778.
- [27] Shaoning Jiang, Tatyana A G, Alexander P, et al. Adenovirus infection results in alterations of insulin signaling and glucose homeostasis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298: 1295–1304.