

膀胱癌溶瘤腺病毒治疗研究进展

王 华,王宗平

(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘 要:膀胱癌是常见的恶性肿瘤,绝大多数为非肌层浸润性膀胱癌。目前,传统的治疗方法仍不能治愈所有膀胱癌患者,膀胱内灌注化疗药物和免疫制剂治疗后失败的膀胱癌缺乏有效的治疗方法。近年来,溶瘤腺病毒治疗肿瘤的研究大量报道,膀胱癌由于给药方便、局部给药不会引起全身毒副作用而成为溶瘤腺病毒治疗的理想癌种。全文综述溶瘤腺病毒膀胱内灌注治疗膀胱癌的研究进展。

关键词:膀胱癌;溶瘤腺病毒;膀胱灌注

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

文章编号:1004-0242(2014)02-0148-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.02.A014

Research Progress in Oncolytic Adenovirus in the Treatment for Bladder Cancer

WANG Hua, WANG Zong-ping

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Bladder cancer is a common malignancy. Most patients with bladder cancer are non-muscle invasion at initial diagnosis. At present, no therapy can cure all the patients with bladder cancer. Recently, oncolytic adenovirus therapies for tumor have been reported. Bladder cancer is an ideal target for viral therapy because viruses can be directly delivered, thus providing contact with the tumor and minimal dissemination to other sites. The advances of intravesical infusion therapy with oncolytic adenovirus for bladder cancer were reviewed in this article.

Key words: bladder cancer; oncolytic adenovirus; intravesical infusion therapy

1 膀胱癌临床诊治现状

膀胱癌是常见的恶性肿瘤,中国肿瘤统计显示,膀胱癌已经成为第9位常见的恶性肿瘤^[1]。90%以上的膀胱癌为尿路上皮癌。膀胱尿路上皮癌中约80%为非肌层浸润性癌,包括Ta(约70%~80%),T₁(约20%),膀胱上皮内癌(CIS)(约10%)^[2]。Ta期肿瘤大多数为低级别,只有7%为高级别,病理学上癌细胞局限于尿路上皮层,未侵犯固有层。T₁期肿瘤穿过基底膜侵犯固有层而没有到达肌层。CIS虽然癌细胞局限于尿路上皮层,但病理学显示其具有形成高级别、浸润性癌的先兆。低级别非肌层浸润性膀胱癌5年内约有50%~70%复发,10%~15%进展为肌层浸

润性膀胱癌^[3]。CIS如果不治疗,约40%~83%的患者会发展为肌层浸润性膀胱癌^[4]。高级别膀胱癌患者在初诊时约30%为肌层浸润性癌,其中一半的患者在2年内发生远处转移,尽管积极治疗,5年生存率仅为40%^[5]。经尿道膀胱肿瘤电切为治疗非肌层浸润性膀胱尿路上皮癌的金标准,对于有复发高危因素(TaG₃, T₁, CIS)的患者辅助膀胱内灌注化疗制剂或免疫制剂来降低复发率。但是,对于保留膀胱的手段治疗后复发的患者目前缺乏有效的治疗方法,通常采用膀胱全切来预防复发或转移,但膀胱全切手术风险大、并发症发生率高^[6]。因此,需要开发新的保留膀胱的手段来治疗非肌层浸润性膀胱癌。

2 腺病毒治疗肿瘤战略

目前发现的腺病毒至少有40个以上的亚型,但

收稿日期:2013-11-12;修回日期:2013-12-04

基金项目:浙江省钱江人才计划项目(2009R10001)

通讯作者:王华, E-mail:hwangua@aliyun.com

重组的溶瘤腺病毒通常使用腺病毒 2 型和 5 型。腺病毒感染过程是病毒纤维部分与细胞表面的受体如腺病毒受体(CAR)或整合素结合,然后病毒通过胞饮作用进入细胞内。由于大多数的细胞都处于静止期,病毒蛋白必须与宿主细胞的一些蛋白结合激活细胞周期才能使得病毒复制。首先是腺病毒的 *E1A* 基因产物与细胞的 pRb、p107 和 p130 结合,这种结合激活了 E2F,导致了细胞周期进入 S 期,有利于病毒复制,原本宿主细胞的 p53 可阻止细胞周期进入 S 期或诱导细胞凋亡,但腺病毒的 *E1B55kD* 基因产物结合并失活 p53,允许病毒顺利复制。*E1B55kD* 蛋白与 p53 结合并降解 p53,同时,*E1B19kD* 蛋白的功能与抗凋亡因子 Bcl2 相似,阻止受感染的细胞凋亡并允许病毒复制。

基于人们对病毒生物学特性和细胞周期的理解和认识,研究者们对腺病毒的基因进行修饰,使得腺病毒能够选择性地地在肿瘤细胞内复制,而在正常细胞内不复制,从而重组了能够治疗肿瘤的溶瘤腺病毒。溶瘤腺病毒是一类重组腺病毒,它能够特异性地在肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤细胞,而正常细胞即使被感染,也不会复制,被认为是有前景的肿瘤治疗剂,目前,溶瘤腺病毒被广泛用于临床前和临床研究治疗多种肿瘤,也包括膀胱癌^[7-9]。

腺病毒用于肿瘤治疗的优势在于病毒在宿主细胞内成千上万倍的复制导致宿主细胞的破坏,细胞破坏释放出的病毒感染再次感染邻近肿瘤细胞导致病毒在肿瘤内传播从而破坏肿瘤;高滴度的病毒容易制成;腺病毒基因不会整合至宿主细胞基因组内,导致宿主细胞基因突变的可能性小;腺病毒可以作为载体携带目的基因进行基因治疗;腺病毒基因技术上容易操作。

第一个问世的溶瘤腺病毒是 dl1520 (也称为 ONYX-015),该病毒有 *E1B55kD* 基因的缺失,不能结合并失活宿主细胞的 p53,能够在 p53 基因异常的肿瘤内复制,而在正常细胞内不复制,因为正常细胞 p53 功能正常^[10]。ONYX-015 也是第一个进入临床试验的溶瘤腺病毒^[11],随后的临床试验使用 ONYX-015 治疗多种固体肿瘤^[12,13]。与 ONYX-015 相似的 *E1B55kD* 缺失的溶瘤腺病毒 H101 在我国进行了 I~III 期临床期临床试验治疗多种肿瘤^[14],该制剂已获得国家食品药品监督管理局批准。尽管最初的报道指出 ONYX-015 可选择性地在 p53 基因异

常的肿瘤内复制,但后来的研究发现 ONYX-015 抗肿瘤活性并不依赖于肿瘤细胞 p53 基因的状态,因为 ONYX-015 在 p53 野生型肿瘤中同样也显示了良好的复制和溶瘤效果^[15]。随后的研究指出,ONYX-015 在不同肿瘤类型中溶瘤作用的差异性与腺病毒的感染能力^[16]、细胞丧失功能性 p14ARF^[17]和病毒 RNA 晚期出核^[18]有关,而不是简单地由 p53 基因状态本身而决定。

另一类型的溶瘤腺病毒是 $\Delta 24$ ^[19]和 dl922-947^[20],这两个病毒都是在 *E1A* 的 Rb 结合位点有突变,消除了腺病毒与宿主细胞的 pRb 结合,使得病毒可在 Rb 途径异常的肿瘤内复制,而在正常细胞内不能复制。但后来的研究发现 *E1A* 或 *E1B* 单一突变的溶瘤腺病毒在正常细胞内仍有一定程度的复制^[19,21]。为了提高溶瘤腺病毒的安全性,我们的研究组重组了 *E1A*、*E1B* 双突变溶瘤腺病毒 AxdAdB-3,该病毒具有 *E1B55kD* 基因的缺失和 *E1A* 的 Rb 结合位点的突变,消除了腺病毒与 p53 和 Rb 蛋白结合的能力,可在 p53 功能异常和 (或)Rb 传导途径异常的肿瘤细胞内复制并破坏肿瘤细胞,对正常细胞的毒性低于 *E1A* 或 *E1B* 单一突变体^[7,22-24]。

3 膀胱内灌注溶瘤腺病毒治疗膀胱癌

膀胱癌被认为是溶瘤腺病毒治疗的理想靶向。由于溶瘤腺病毒膀胱内灌注治疗膀胱癌给药方便,肿瘤可直接暴露于高滴度病毒中从而达到有效感染;膀胱是一个相对独立的空腔器官,膀胱壁具有多层结构限制了病毒全身播散,克服了全身给药导致的免疫反应和病毒清除;膀胱乳头状肿瘤表面积大,有利于病毒感染;卡介苗(BCG)在膀胱癌中的应用显示了膀胱癌是免疫敏感性肿瘤;且传统的保留膀胱的手段仍不能满足临床需要^[24-26]。由此可见,溶瘤腺病毒膀胱内灌注治疗膀胱癌是有前景的手段。

有研究表明,CG0070^[27]是具有复制能力的溶瘤腺病毒,可以选择性地在膀胱肿瘤细胞内复制并杀伤肿瘤细胞,其肿瘤选择性的特性是基于该病毒的 *E1a* 基因启动子上连接入 E2F-1 启动子,*E3gp19kD* 编码区连接表达人 GM-CSF 的 cDNA。*E2F-1* 启动子受到 Rb 蛋白的调节,Rb 功能异常的肿瘤细胞不能与 *E2F-1* 结合,导致了 *E2F* 的激活,从而使病毒选择性地 Rb 途径异常的肿瘤细胞内复制,而在正

常细胞内的复制受到限制。CG0070 在正常细胞内的复制不到 100 倍,而在 Rb 途径异常的膀胱癌细胞内病毒复制达 1000 倍以上。原位膀胱肿瘤模型内灌注 CG0070 显示了肿瘤生长抑制效果,膀胱内灌注病毒治疗每周 1 次,共 6 次,在治疗后 42d,9 只接受治疗的小鼠有 4 只膀胱内无肿瘤生长,而对照组膀胱肿瘤增大明显^[27]。基于临床前的研究,CG0070 很快进入临床试验用于 BCG 治疗失败的非肌层浸润性膀胱癌,入组的 35 例患者中,多次膀胱内灌注 CG0070,有 64% 的患者达到了完全缓解(CR),尤其是 Rb 高表达的患者完全反应率达到了 82%;不良反应主要包括尿频、排尿不适和流感样症状,大多数患者不良反应轻微^[9]。

我们也报道了 E1A、E1B 双突变溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 治疗膀胱癌的实验研究,AxdAdB-3 具有 E1B55kD 基因的缺失(失去了与 p53 蛋白结合的能力)和 E1A 部分 Rb 结合位点的突变(丧失了与 Rb 结合的能力),可以选择性地在膀胱癌细胞株内复制并破坏肿瘤细胞,而在正常细胞内不复制,我们对比了 AxdAdB-3 与 E1A 单一突变的腺病毒 dl922-947 和 E1B55kD 缺失的腺病毒 dl922-947,结果表明,对于膀胱癌细胞株,AxdAdB-3 比 E1A 或 E1B 单一突变体具有更强的溶瘤效果,而对于正常细胞,AxdAdB-3 比单一突变体具有更加微弱的细胞毒性作用。AxdAdB-3 膀胱内灌注治疗 SCID 小鼠原位膀胱肿瘤模型,显著抑制了膀胱肿瘤生长,同时显著延长了患癌小鼠的生存时间^[24]。

4 增强腺病毒感染能力战略

研究表明,不同的细胞株对腺病毒的易感性截然不同,腺病毒对细胞的感染效率取决于细胞表面的腺病毒受体(coxsackie-adenoviral receptor,CAR)的表达水平^[24]。腺病毒感染需要病毒纤维部分与细胞表面的 CAR 结合并附着在细胞表面,随后 RGD 基序与细胞膜表面的整合素(Integrin)受体 $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 5$ 结合进而病毒进入细胞内。因此,腺病毒受体在病毒感染中起关键性作用,肿瘤细胞缺乏 CAR 的表达将很难被腺病毒感染,因而降低了腺病毒的溶瘤效果^[28]。我们报道了 E1A、E1B 双突变溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 治疗膀胱癌的实验研究,尽管 AxdAdB-3 对小鼠原位膀胱肿瘤显示了显著的治疗效果,但

AxdAdB-3 对一些腺病毒受体低表达的膀胱癌细胞株的细胞杀伤效果相对较弱^[24]。膀胱癌细胞株有相当一部分不表达 CAR^[29],而且,高级别和高分期的膀胱癌大多数缺乏 CAR 的表达^[30],因而限制了溶瘤腺病毒在膀胱癌治疗中的应用。前期的研究表明,在腺病毒的纤维部分插入 RGD 基序的结构,可使 RGD 与细胞表面的整合素受体直接结合^[31],这种非依赖于 CAR 的结合,即使在 CAR 缺乏的细胞株,腺病毒也可达到高效率感染,因为即使部分膀胱癌缺乏 CAR 的表达,但绝大多数膀胱癌细胞都表达整合素^[30]。为了增强 AxdAdB-3 的感染效率,我们在 E1A、E1B 双突变溶瘤腺病毒 AxdAdB-3 的纤维部分插入 RGD 基序结构,重组了 AxdAdB3-F/RGD,并探讨了其对腺病毒受体缺乏的膀胱癌的治疗效果^[32]。结果表明:尽管膀胱癌细胞株 YTS-1 和 T24 缺乏 CAR 的表达,但表达 $\alpha v \beta 3$ 或 $\alpha v \beta 5$ 。AxdAdB-3 对表达 CAR 的膀胱癌细胞株(KK47 和 5637)具有更强的细胞杀伤效果,而对于 CAR 缺乏的膀胱癌细胞株(YTS-1 和 T24)则显示了相对弱的细胞杀伤效果。然而,AxdAdB3-F/RGD 无论是对 CAR 表达的还是不表达的膀胱癌细胞株都显示了相似的细胞杀伤效果。AxdAdB3-F/RGD 对于正常细胞 HCV29 几乎没有细胞毒性作用。我们采用 CAR 缺乏的膀胱癌细胞株 YTS-1 建立了裸鼠原位膀胱肿瘤模型,膀胱内灌注 AxdAdB3-F/RGD 抑制了膀胱肿瘤的生长。平均膀胱肿瘤的重量在 AxdAdB3-F/RGD、AxdAdB-3 和 AxCZ3-F/RGD 治疗组分别为 $19.8 \pm 2.2\text{mg}$ 、 $49.1 \pm 4.3\text{mg}$ 和 $91.4 \pm 11.8\text{mg}$,AxdAdB-3 和 AxdAdB3-F/RGD 都显示了显著的抗肿瘤效果($P < 0.0001$),且 AxdAdB3-F/RGD 显示了比 AxdAdB-3 更强的治疗效果($P < 0.0001$)。小鼠原位膀胱肿瘤模型灌注 AxdAdB-3 和 AxdAdB3-F/RGD 均延长了小鼠的生存($P < 0.0001$),但 AxdAdB3-F/RGD 对生存的延长比 AxdAdB-3 更明显($P < 0.001$)。AxdAdB3-F/RGD 包含 RGD 基序,无论是对 CAR 缺乏还是 CAR 表达的膀胱癌都具有较高的感染效率及溶瘤效果,因而扩大了溶瘤腺病毒的应用范围。

5 溶瘤腺病毒联合化疗药物治疗膀胱癌

由于不存在交叉耐药,而且抗肿瘤机制不同,溶

瘤腺病毒与传统的化疗、放疗联合应用将会产生相加或协同作用。临床前和临床研究表明,溶瘤腺病毒联合传统的放化疗治疗更加有效^[33]。尽管使用多种化疗药物或免疫制剂膀胱内灌注治疗非肌层浸润性膀胱癌,但膀胱癌仍然易于复发。溶瘤腺病毒联合化疗药物被认为是有前景的治疗战略。前期的研究显示,溶瘤腺病毒与化疗药物联合使用可增强抗肿瘤效果且不增加毒副反应^[33],但溶瘤腺病毒增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效果的机制尚未阐明。化疗药物吉西他滨已广泛应用于多种实体肿瘤的治疗,其中也包括膀胱癌的全身化疗。Shelley等^[34]报道了吉西他滨膀胱内灌注治疗卡介苗(BCG)治疗失败的膀胱癌,显示了一定的疗效。吉西他滨是在S期发挥作用的化疗药物,诱导细胞周期进入S期,可提高肿瘤细胞对吉西他滨的敏感性^[35,36]。溶瘤腺病毒的感染可诱导宿主细胞从G₀/G₁期进入S期^[37]。基于这些研究,我们最近报道了E1A、E1B双突变溶瘤腺病毒AxdAdB-3联合化疗药物吉西他滨膀胱内灌注治疗膀胱癌的实验研究^[38],结果表明:AxdAdB-3感染膀胱癌细胞株YTS-1后,S期细胞的比例达到49%±5%,而对照组为39%±3%,溶瘤腺病毒感染显著增加了S期细胞的比例($P<0.05$)。细胞毒性实验结果表明:YTS-1细胞经腺病毒或吉西他滨处理后,对照组、吉西他滨组、AxdAdB-3组和吉西他滨组+AxdAdB-3组的平均细胞生长率分别为100%、54.3%±2.9%、73.7%±4.7%和42.6%±2.2%,AxdAdB-3和吉西他滨都能有效地抑制膀胱癌细胞株的生长($P<0.0001$),两者联合使用比单一使用显示了更加显著的细胞生长抑制作用($P<0.0001$)。裸鼠原位膀胱肿瘤模型进行膀胱内灌注溶瘤腺病毒或/和吉西他滨治疗后,对照组、吉西他滨组、AxdAdB-3组和联合组的平均瘤重分别为400.6、126.4、82.0和40.4mg,AxdAdB-3和吉西他滨单独使用都能有效地抑制小鼠膀胱肿瘤生长($P<0.001$),两者联合使用比单一用药更加有效地抑制了小鼠膀胱肿瘤的生长($P<0.001$)。

6 小结与展望

手术联合膀胱灌注化疗药物或免疫制剂是目前治疗非肌层浸润性膀胱癌的标准方法,但这些方法

仍然不能治愈所有膀胱癌患者,仍需开发新的保留膀胱的手段来治疗传统治疗方法失败的膀胱癌。溶瘤腺病毒膀胱内灌注治疗膀胱癌被认为是一种安全、有效、而且是有开发前景的手段,但是,溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的临床试验非常少,因而缺乏有效的临床数据。尽管临床前和一项临床一期研究显示了满意的抗肿瘤效果,但是溶瘤腺病毒的疗效和安全性还需大量临床试验来证实。溶瘤腺病毒联合传统的治疗方法可增强治疗效果,因此,联合用药有可能在降低放化疗剂量的情况下也能达到理想的治疗效果,从而降低放化疗的副作用。溶瘤腺病毒治疗肿瘤的最大障碍在于病毒到达肿瘤组织的滴度太低达不到理想的治疗效果,特别是全身给药治疗转移性疾病。然而膀胱肿瘤是溶瘤腺病毒治疗的理想靶向,因为病毒可直接进行膀胱灌注,给药途径方便,肿瘤暴露于高滴度的病毒中有利于病毒感染和有效地治疗肿瘤,且由于膀胱是一个相对独立的器官,膀胱内即使灌注高滴度病毒也不易造成全身播散,可大大降低病毒的毒副作用。目前,溶瘤腺病毒治疗头颈部癌、肺癌的研究报道很多,但溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的研究报道很有限,今后仍需大量的临床前和临床研究来证实溶瘤腺病毒膀胱内灌注治疗膀胱癌的安全性和有效性。另外,还需要探讨静脉给药途径治疗肌层浸润或转移性膀胱癌的可行性。

参考文献:

- [1] He J, Chen WQ. 2012 Chinese cancer registry annual report[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2012. 97-100. [赫捷, 陈万青. 2012 中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012. 97-100.]
- [2] Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer [J]. Urol Clin North Am, 1992, 19(3): 435-453.
- [3] Prout GR Jr, Barton BA, Griffin PP, et al. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group [J]. J Urol, 1992, 148(5): 1413-1419.
- [4] Cheng L, Davidson DD, MacLennan GT, et al. The origins of urothelial carcinoma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(6): 865-880.
- [5] Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the bladder cancer research consortium [J]. J Urol, 2006, 176: 2414-2422.
- [6] Fairey AS, Jacobsen NE, Chetner MP, et al. Associations between comorbidity, and overall survival and bladder cancer specific survival after radical cystectomy: results

- from the Alberta Urology Institute Radical Cystectomy database [J]. *J Urol*, 2009, 182(1): 85–92.
- [7] Fukuda K, Abei M, Ugai H et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4434–4440.
 - [8] Pesonen S, Diaconu I, Cerullo V et al. Integrin targeted oncolytic adenoviruses Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GMCSF for treatment of patients with advanced chemotherapy refractory solid tumors [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(8): 1937–1947.
 - [9] Burke JM, Lamm DL, Meng MV, et al. A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer [J]. *J Urol*, 2012, 188(6): 2391–2397.
 - [10] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373–376.
 - [11] Ganly I, Kim D, Eckhardt G, et al. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(3): 798–806.
 - [12] Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies-the clinical experience [J]. *Oncogene*, 2005, 24(52): 7802–7816.
 - [13] Kim D. Clinical research results with dl1520(Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(2): 89–98.
 - [14] Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(2): 141–148.
 - [15] Geoerger B, Grill J, Opolon P, et al. Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus ONYX-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3): 764–772.
 - [16] Steegenga WT, Riteco N, Bos JL. Infectivity and expression of the early adenovirus proteins are important regulators of wild-type and DeltaE1B adenovirus replication in human cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(36): 5032–5043.
 - [17] Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, et al. Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520(ONYX-015) [J]. *Nat Med*, 2000, 6(10): 1128–1133.
 - [18] O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 611–623.
 - [19] 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.
 - [20] 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.
 - [21] 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.
 - [22] Satoh M, Wang H, Ishidoya S, et al. Oncolytic virotherapy for prostate cancer by E1A, E1B mutant adenovirus [J]. *Urology*, 2007, 70(6): 1243–1248.
 - [23] Wakayama M, Abei M, Kawashima R, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus with RGD fiber modification exhibits enhanced oncolysis for CAR-deficient biliary cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 3043–3050.
 - [24] Wang H, Satoh M, Abe H, et al. Oncolytic viral therapy by bladder instillation using an E1A, E1B double-restricted adenovirus in an orthotopic bladder cancer model [J]. *Urology*, 2006, 68(3): 674–681.
 - [25] Burke J. Virus therapy for bladder cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(2–3): 99–102.
 - [26] Potts KG, Hitt MM, Moore RB. Oncolytic viruses in the treatment of bladder cancer [J]. *Adv Urol*, 2012, 2012: 1–11.
 - [27] Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, et al. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1): 305–313.
 - [28] Douglas JT, Kim M, Sumerel LA, et al. Efficient oncolysis by replicating adenovirus (Ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary Ad receptors [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 813–817.
 - [29] Li Y, Pong RC, Bergelson JM, et al. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(2): 325–330.
 - [30] Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, et al. Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer [J]. *Urology*, 2002, 60(3): 531–536.
 - [31] Dehari H, Ito Y, Nakamura T, et al. Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 10(1): 75–85.
 - [32] Wang H, Cai Z, Yang Fei, et al. Enhanced antitumor efficacy of integrin-targeted oncolytic adenovirus AxdAdB3-F/RGD on bladder cancer [J]. *Urology*, 2013, accepted.
 - [33] Chu RL, Post DE, Khuri FR, et al. Use of replication oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16): 5299–5312.
 - [34] Shelley MD, Jones G, Cleves A, et al. Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review [J]. *BJU Int*, 2012, 109(4): 496–505.
 - [35] Plunkett W, Huang P, Searcy CE, et al. Gemcitabine: pre-clinical pharmacology and mechanisms of action [J]. *Semin Oncol*, 1996, 23(5 Suppl 10): 3–15.
 - [36] Tonkinson JL, Worzalla JF, Teng CH, et al. Cell cycle modulation by a multitargeted antifolate, LY231514, increases the cytotoxicity and antitumor activity of gemcitabine in HT29 colon carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(15): 3671–3676.
 - [37] 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.
 - [38] Wang H, Liu Z, Wang ZP, et al. Double-mutated oncolytic adenovirus combined with gemcitabine for treating an orthotopic nude mouse model of bladder cancer [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2013, 35(6): 412–417. [王华, 刘卓, 王宗平, 等. 双突变溶瘤腺病毒联合吉西他滨治疗裸鼠原位膀胱癌的效果[J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(6): 412–417.]