第 21 卷 2 期　　中 国 病 毒 学　　21（2）：106-110
2006 年 3 月　　VIROLOGICA SINICA　　March 2006

一种高效感染血液细胞的新型靶向性腺病毒载体的构建*

倪　芳[1,2]，鲁茁壮[2]，王立生[2**]，瞿成奎[1]，汪思应[1**]

(1.安徽医科大学病理生理学教研室，安徽合肥 230032；2.军事医学科学院放射医学研究所，北京 100850)

Construction of a Novel Retargeted Adenoviral Vector with High Gene Transfer Efficiency into Hematopoietic Cells

NI Fang[1,2], LU Zhuo-zhuang[2], WANG Li-sheng [2**], QU Cheng-kui[1], WANG Si-ying[1**]

(1. Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: The adenovirus subgenus C serotypes 5 (Ad5) vectors which have been used to transduce epithelial cells have very limited ability to infect hematopoietic cells. For feasible generation of fiber-retargeted adenoviral vectors, we have modified the versatile AdEasy system with a chimeric fiber gene encoding the Ad5 fiber tail domain and Ad11p fiber shaft and knob domains. An Ad5-based vector encoding the green fluorescent protein (GFP) gene under the control of the CMV promoter with Ad11p fiber receptor specificity was generated (Ad5F11p-GFP). The Ad5F11p-GFP vector-mediated gene transfer efficiency for some committed hematopoietic cell lines such as myeloblasts (K562) and monocytes (U937) was evaluated using flow cytometry and compared to that of Ad5-GFP, which also encodes the GFP gene under the control of the CMV promoter. The results showed that these cell lines were superiorly transduced by the Ad5F11p-GFP vector at the same MOI (multiplicity of infection, MOI) compared with the Ad5-GFP vector，more than 90% tested cells were infected by Ad5F11p-GFP adenovirus while less than 30% cells were infected by Ad5-GFP at 10 MOI.

Key words: Hematopoietic cells; Retargeting; Adenoviral vector

摘要：人C组5型腺病毒（Ad5）载体能够有效感染上皮来源的细胞，但对造血细胞的感染效率很低，限制了其在造血调控基础研究以及血液病基因治疗中的应用。为了建立高效感染血液细胞的新型靶向性腺病毒载体系统，对5型腺病毒载体的纤维顶球进行了改造，以AdEasy系统为基础，应用递归PCR的方法人工合成人B组11p型腺病毒的部分纤维（fiber）基因，采用一系列分子生物学方法将其替换AdEasy骨架质粒中的人5型腺病毒的fiber基因，得到新的腺病毒骨架质粒命名为pAdEasy-1/F11p，应用带有GFP报告基因的穿梭质粒pShuttle-GFP与AdEasy-1/F11p腺病毒DNA在BJ5183细菌内重组得到重组腺病毒质粒，将其转染293细胞获得重组腺病毒，命名为Ad5F11p-GFP。以Ad5-GFP作对照，同时感染K562、U937等白血病细胞系，流式细胞仪检测GFP的表达。初步检测结果显示：在10MOI时，Ad5F11p-GFP能够有效感染K562、U937等白血病细胞系，感染细胞效率＞90%，对照Ad5-GFP感染细胞效率＜30%，这表明改建后的腺病毒AdEasy-1/F11p可以高效介导基因转移到血液细胞，是一种很好的血液细胞靶向性腺病毒载体。

关键词：血液细胞；靶向；腺病毒载体

中图分类号：Q7　　文献标识码：A　　文章编号：1003-5125(2006)02-0106-05

腺病毒载体广泛应用于肿瘤基因治疗，因为它具有多方面的优势：感染细胞类型广，感染效率高；

收稿日期：2005-08-22, 修回日期：2005-09-12

* 基金项目：国家 973 课题（2004CB518801）；国家自然科学基金资助 （30470735）；安徽省人才开发基金资助（2002Z035）

作者简介：倪芳（1981－），女，安徽泗县籍，硕士研究生。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0551-5167706, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn；Tel: 010-66932245, E-mail: Wangls@nic.bmi.ac.cn

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

理化性质稳定，容易制备高滴度病毒；不整合入细胞基因组，遗传毒性较低，安全性好；既能感染分裂期也能感染非分裂期细胞[1]。

造血干细胞的增殖分化和自我更新的调节机制是造血干细胞应用基础研究的核心问题。研究重要的造血相关基因对造血干细胞增殖分化的作用及机制具有重要意义。然而，腺病毒载体应用于血液细胞的基因转移却受到很大限制，这主要源于造血细胞表面缺乏 5 型腺病毒进入细胞的主要受体[2]，目前常用的腺病毒载体是基于人血清 5 型腺病毒（Ad5）发展起来的复制缺陷型载体，它们在感染靶细胞时，首先由病毒衣壳纤维蛋白中的突起结构域（knob domain）识别并结合细胞表面的柯萨奇腺病毒受体（the coxsackie-adenovirus receptor, CAR）[3]，然后，腺病毒五邻体基底的五个多肽分子中的 Arg-Gly-Asp(RGD)基序与靶细胞表面整合素家族分子相互作用而介导腺病毒内化[4]。因此，CAR 和/或整合素的缺乏将会限制 Ad5 的基因转移能力。不同腺病毒亚型可能会具有不同的组织或细胞趋向性，因为它们的纤维蛋白会识别不同的细胞表面受体。血液细胞表面具有 B 组腺病毒 Ad11p 的高效结合受体[5]，通过改变 Ad5 的纤维蛋白基因或者其中的 knob 结构域改建的靶向腺病毒载体能显著提高其对血液细胞的基因转移效率[6,7]，我们采用 AdEasy 系统，在 Ad5 的基础上成功建立了具有 B 组 Ad11p 靶向性的新型腺病毒载体，并且能够高效感染血液细胞。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞、病毒与质粒

E.coli.BJ5183, DH5α 为本室保存。人胚肾 293 细胞购自 American Type Cell Collection(ATCC)，DMEM 培养基加 10%胎牛血清常规培养。人髓系红白血病细胞系 K562、人单核细胞白血病细胞系 U937 由本室保存，RPMI 1640 培养基加 10%胎牛血清常规培养。携带绿色荧光蛋白(Geen fluorescent protein，GFP) 基因的重组腺病毒（Ad5-GFP）由本室保存。穿梭质粒 pShuttle-GFP 由本室构建，E1 及 E3 区缺失腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 购自 Stratagene 公司。

1.2 酶和化学试剂

限制性内切酶购自 TaKaRa 公司、T4 DNA 连接酶购自纽英伦 Biolab 公司，Kod-plus 酶购自 TOYOBO 公司，转染试剂 LipofectAMINE2000 购自 Invitrogen 公司，胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究所，RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基购自 GIBCO 公司，一般化学试剂均为国产分析纯。

1.3 Ad5/F11p fiber 基因的克隆

根据 Ad11p fiber 基因序列(GI:24711762，nt129－977) 及 Ad5 fiber 基因序列(GI: 33465830, nt1-132)自行设计 22 条引物，相邻两条引物有 14nt 双向互补，第 1 条和第 22 条引物 5’端分别设有 *Age*I, *Mfe*I 酶切位点。应用设计的 22 条引物，采用递归 PCR 方法，总共三轮，第一轮反应条件为 94℃30s，25℃1min，68℃30s，68℃延伸 10min ，后面两轮反应条件均为 94℃30s， 68℃2min，68℃延伸 10min, PCR 产物回收后经过一系列酶切、连接等分子生物学常规程序将其替换掉 AdEasy 中的 fiber 基因，获得嵌合型腺病毒载体质粒 pAdEasy－1/F11p。

1.4 重组腺病毒 Ad5F11p-GFP 的获得

将线性化的 pShuttle-GFP 和 pAdEasy-1/F11p 共转化 E.coli.BJ5183，获得重组腺病毒质粒，通过限制性酶切消化鉴定筛选阳性重组体。用脂质体转染 293 细胞获得重组腺病毒。

1.5 重组腺病毒 Ad5F11p-GFP PCR 鉴定

根据Ad5/F11p fiber 基因序列，使用primer premier 5.0设计鉴定引物，上游引物5’-GAAAGAAAAC ATAAGTGCCA3’，下游引物5’-TCTGTGTGTAGT TAGCATA3’，扩增片段长度为374bp；循环参数为 94℃30s, 68℃30s, 72℃30s，30个循环后72℃延伸 5min，根据Ad5 fiber 基因序列设计鉴定引物，上游引物5'-ATCACTGCCTCACCCCC TCT-3’，下游引物5'-CCAAATTCAAGCCCATCT CC3’，扩增片段长度为518bp，循环参数为94℃30s，52℃30s, 72℃40s，30个循环后72℃延伸5min，提Ad5F11p-GFP病毒基因组，分别以Ad5F11p-GFP病毒基因组、Ad5-GFP 基因组（本室保存）DNA 1μL为模板用于Ad5/F11p fiber基因的PCR鉴定。

1.6 重组腺病毒的扩增与纯化

用已获得的重组腺病毒感染293细胞，得到扩增的病毒粗提液，按照BD•Adeno-X^{TM} virus purification kit(BD biosciences clontech)纯化柱说明书的流程纯化病毒。

1.7 重组腺病毒滴度测定-噬斑分析（plaque assay）

将纯化好的病毒用DMEM稀释为10^6~10^{11}不同病毒浓度，感染80%汇合度的293细胞2h，吸出病毒液，用含0.5%低熔点琼脂的新鲜培养基覆盖细胞单层，培养数日出现病毒空斑，计算病毒感染滴度。

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.8 Ad5-GFP、Ad5F11p-GFP 感染血液细胞系效率实验

将K562、U937细胞分别接种于24孔板，2×10^5细胞/孔，Ad5F11p－GFP、Ad5-GFP各以不同梯度的 MOI量感染细胞，感染体积为200μL/孔，2h后补加完全培养基，48h后荧光显微镜观察，流式细胞仪检测荧光表达。

2 结果

2.1 带有Ad5F11p fiber 基因的载体质粒的构建

将AdEasy-1质粒用*Eco*RI酶切，酶切产物经电泳回收9625、23825bp片段，9625bp片段含Amp抗性基因及Ad5 fiber基因，此片段自身环化连接成AdEasy-*Eco*RI质粒，*Age*I、*Mfe*I双酶切此质粒，回收7902bp片段；递归PCR的方法人工合成Ad5/F11p fiber基因，包含Ad5 fiber尾部(tail)和AdF11p fiber大部分基因（shaft、knob），5'端带有*Age*I、*Mfe*I酶切位点，经双酶切后连入7902bp片段，得到质粒Ad8872/11pF，经测序和限制性酶切分析证实与设计相符，Ad8872/11pF质粒用*Eco*RI酶切线性化，去磷酸化后与AdEasy的23825bp片段连接转化得到新的含有Ad5/F11p fiber基因的腺病毒骨架质粒AdEasy-1/F11p，*Sac*I、*Eco*RV分别酶切鉴定插入片段的正反向和质粒大小。具体构建过程如图1所示，酶切鉴定如图2所示。

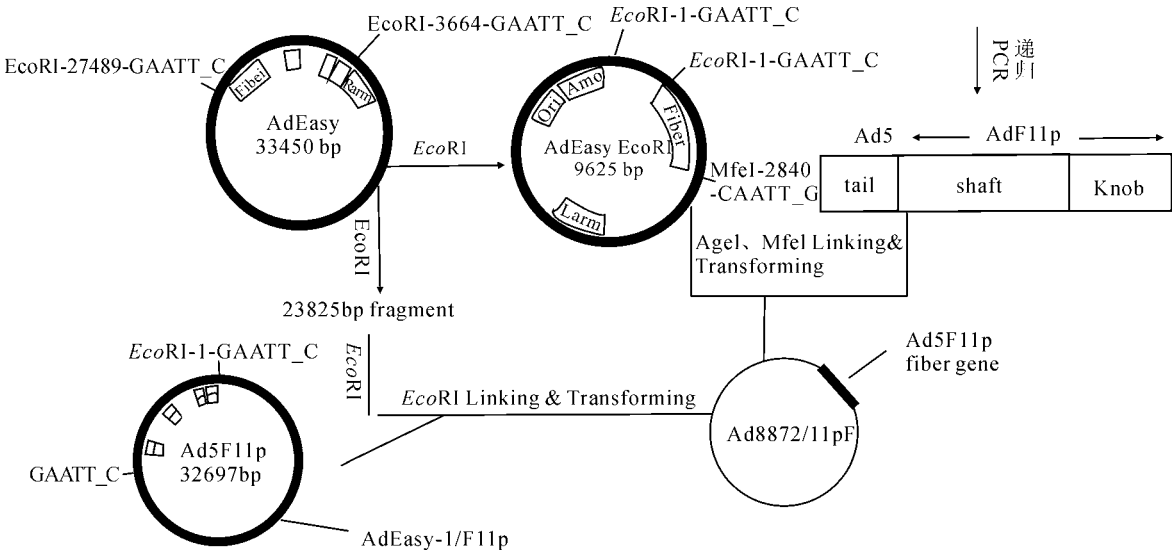

图1 带有Ad5F11p fiber基因的载体质粒AdEasy-1/F11p的构建

Fig.1 Construction of plasmid AdEasy-1/F11p with chimeric Ad5F11p fiber gene

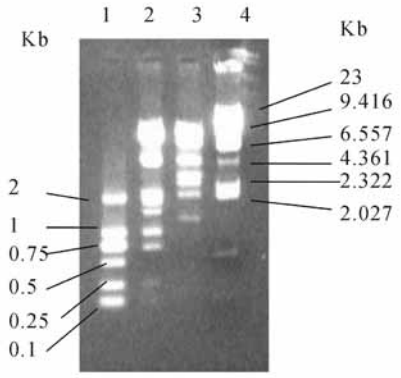

图2 AdEasy-1/F 11p骨架质粒的酶切鉴定

Fig.2 Restriction identification of plasmid AdEasy-1/F11p

1/4 Marker; 2, Adeasy 1/F11p/*Sac* 1; 3, Adeasy1/F11p *Eco*RV.

2.2 重组腺病毒病毒 Ad5F11p-GFP 获得与鉴定

将线性化的 pShuttle-GFP 和 pAdEasy-1/F11p 共转化 *E.coli* BJ5183，获得重组腺病毒质粒，限制性酶切消化鉴定筛选阳性重组体。用脂质体转染 293 细胞获得重组腺病毒，命名为 Ad5F11p-GFP。重组腺病毒病毒 Ad5F11p-GFP 质粒的酶切鉴定结果如图 3 所示。以 AdF11p fiber 基因序列设计 PCR 鉴定引物，以重组腺病毒 Ad5F11p-GFP 基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增 AdF11p fiber 基因的部分片段，结果与所设计的片段大小一致(374bp)，而以 Ad5-GFP 为模板不能扩增出相应片段（图 4A），同样原理，以 Ad5 fiber 基因序列设计 PCR 鉴定引物，以 Ad5-GFP 基因组 DNA 为模板扩增 Ad5 fiber 基因的部分片段，结果与所设计的片段大小一致(518bp)，而以

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Ad5F11p-GFP 为模板不能扩增出相应片段（图4B），表明已获得含有 Ad5/F11p fiber 基因的新型重组腺病毒。

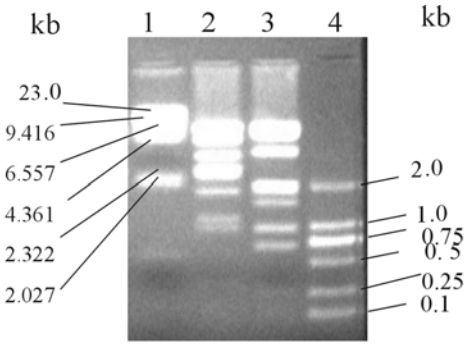

图3 Ad5F11p-GFP 重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Restriction identification of plasmid Ad5F11p-GFP

1/4 marker; 2, Ad5F11p-GFP/Apal 3, Ad511p-GFP/Sacl.

2.3 重组腺病毒 Ad5F11p-GFP 的扩增、纯化及滴度测定

在 293 细胞中大量扩增重组腺病毒，收集细胞，反复冻融释放病毒，BD 纯化柱纯化病毒，获得高度浓缩的腺病毒。噬斑分析法确定病毒的感染滴度为 2×10^{10}pfu/mL。

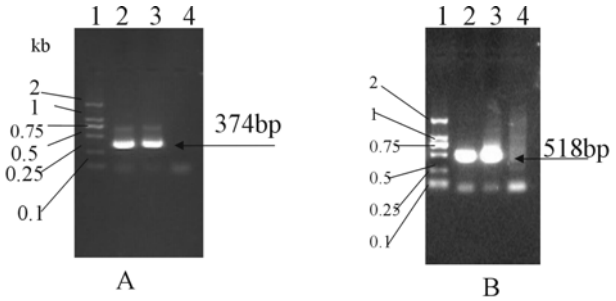

图4 重组腺病毒Ad5F11p-GFP PCR鉴定

Fig.4 Identification of recombinant Adenovirus d5F11p-GFP by PCR

A:1, DL2000 Marker; 2, Positive control; 3, PCr PRODUCT OF Ad5F11p-GFP; 4, PCR product of AD5-GFP B:1DL2000 Marker; 2, Positive control; 3, PCR product of Ad5-GFP; 4, PCR product of Ad5F11p-GFP

2.4 Ad5F11p-GFP 感染血液细胞系效率实验

在保证感染条件都相同的情况下，Ad-GFP、Ad5F11p-GFP 均以不同的 MOI 值感染 U937 和 K562 细胞, 48h 后收集细胞进行流式检测，Ad5F11p-GFP 在 10MOI 下感染率均达到了 90%以上，在 80MOI 时，达到 98%以上，而 Ad-GFP 在 80MOI 感染率却不到 30%。图 5 为 Ad5F11p-GFP、Ad5-GFP 在 10MOI 时分别感染 U937 和 K562 细胞流式检测结果。

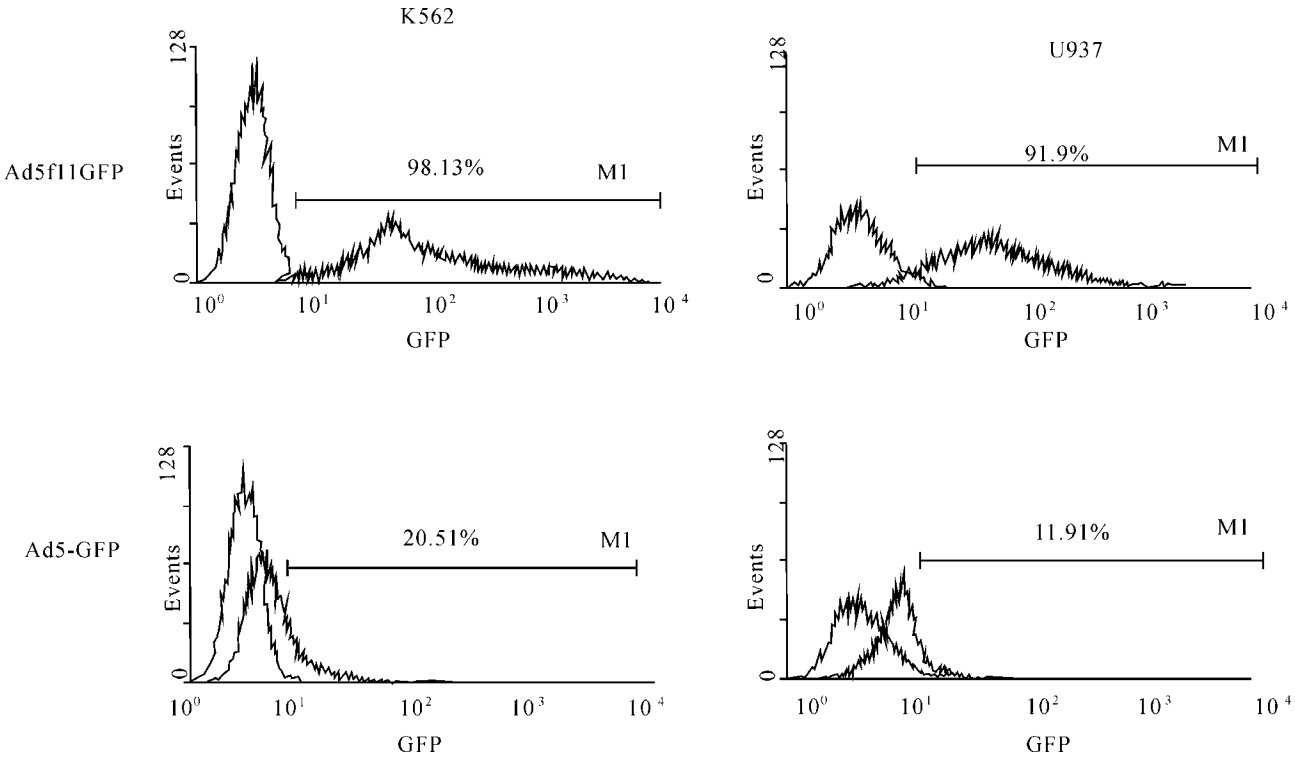

图 5 流式检测重组腺病毒 Ad5F11p-GFP 对受测细胞的感染率

Fig. 5 Transduction of K562、U937 cells with Ad5-GFP and chimeric Ad5F11p-GFP virus vectors.

The K562 and U937 cells were cultured and transduced with the Ad5-GFP and the Ad5F11p-GFP vectors at an MOI of 10, the GFP expression was assessed 48h post-transduction by flow cytometry.

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

腺病毒载体作为造血细胞的基因转移载体具有很大的优势，但很多造血细胞表面缺乏 5 型腺病毒的受体 CAR 和/或整合素[8]，因而限制了腺病毒载体在造血调控和血液病基因治疗等研究领域的应用。虽然有研究报道 Ad5 在很高的剂量下能够感染造血细胞（MOI>500）[9]， 但是，很显然高剂量的腺病毒感染在体内应用时势必会导致很高的细胞毒性和免疫源性，因此 Ad5 不适合作为造血细胞基因转移载体。B 组腺病毒 Ad35 能够高效感染造血细胞，而且 Ad5F35 也已被构建并对血液细胞系和原代白血病细胞具有很高的靶向性[10]，最新研究报道，B 组 F11p 型腺病毒（AdF11p）对 CD34+造血干细胞的感染效率比 Ad35 更高[5]，因此，采用纤维替代改建方法直接对骨架质粒 AdEasy 进行改造，构建血液细胞靶向性腺病毒载体系统 AdEasy-1/F11p，保存了 AdEasy 系统在细菌内重组制备腺病毒质粒的能力，病毒的制备方便快捷，因而以 AdEasy-1/F11p 为基础，可以构建带有不同功能基因的靶向腺病毒载体，为造血调控的基础研究以及血液肿瘤的基因治疗奠定基础，本实验利用带有 GFP 对照基因的腺病毒载体 Ad5F11p-GFP，初步检测了其对两种白血病细胞系的感染效率，在保证很低的细胞毒性的情况下，其感染效率均在 90%以上，体现了很好的造血细胞靶向性。因此，AdEasy-1/F11p 可能会作为造血调控及血液病基因治疗研究领域的一个非常有用的腺病毒载体。

References

[1] Neering S J, Hardy S F, Minamoto D, *et al*. Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors [J]. Blood, 1996; 88，(4): 1147–1155.

[2] Rebel V I, Hartnett S, Denham J, *et al*. Maturation and lineagespecific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells [J]. Stem Cells, 2000, 18 (3): 176-182.

[3] Bergelson J M, Cunningham J A, Droguett G, *et al*. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5[J]. Science, 1997, 275, (5304): 1320-1323.

[4] Wickham T J, Mathias P, Cheresh D A, *et al*. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment [J]. Cell ,1993, 73 (2):309-319.

[5] Mei Y F, Segerman A, Lindman K, *et al*. Human hematopoietic (CD34+) stem cells possess high-affinity receptors for adenovirus type 11p [J] .Virology, 2004, 328 (2): 198-207.

[6] Havenga M J, Lemckert A A, Ophorst O J, *et al*. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease [J]. J Virol , 2002,76 (9): 4612-4620.

[7] Knaan-Shanzer S, Van Der Velde I, Havenga M J, *et al*. Highly efficient targeted transduction of undifferentiated human hematopoietic cells by adenoviral vectors displaying fiber knobs of subgroup B [J]. Hum Gene Ther. 2001, 12 (16): 1989-2005.

[8] Chen L, Pulsipher M, Chen D, *et al*. Selective transgene expression for detection and elimination of contaminating carcinoma cells in hematopoietic stem cell sources [J]. J Clin Invest 1996, 8 (11): 2539-2548.

[9] Marini III F C, Yu Q, Wickham T, *et al*. Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells [J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7 (6): 816-825.

[10] Nilsson M, Ljungberg J, Richter J, *et al*. Development of an adenoviral vector system with addenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells [J]. J Gene Med , 2004, 6 (6): 631-64

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net