

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00178

· 研究快报 ·

携带 RGD 多肽的嵌合型腺病毒载体 AD11-RGD-4C-EGFP 的构建及其感染效率的研究

刘 辉^{1,2}, 王春红², 陈亚龙¹, 李林芳², 吴红平², 钱炎珍², 姜梨华², 钱其军^{1,2*}

1. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 在嵌合型腺病毒的 fiber 中插入具有整合素特异性的 RGD 肽, 构建可提高腺病毒感染效率的腺病毒载体, 观察其对人肝癌细胞株 HepG2、BEL-7404 以及成纤维细胞 BJ 的感染效率。**方法** 将 RGD-4C 插入到 AD5/11 嵌合型腺病毒载体 fiber 的 HI 区, 与腺病毒骨架质粒 pPE3 共转染大肠杆菌 BJ5183, 同源重组产生腺病毒重组质粒 (pPE3-F11-RGD-4C), 该重组质粒与 PDC328-EF1-EGFP 共转染人胚肾 293 细胞进行包装, 产生重组腺病毒 (AD11-RGD-4C-EGFP)。用该重组腺病毒感染 HepG2、BEL-7404 以及 BJ 细胞, 通过荧光显微镜观察感染效率。**结果** 所构建的重组腺病毒 PCR 扩增出 1 123 bp 包含目的片段的基因片段。同时, 制备了高滴度的重组病毒, 纯化后病毒滴度为 1.3×10^{10} pfu/ml。当 MOI=10, 48 h 时该重组病毒对 HepG2、BEL-7404 及 BJ 细胞的感染效率明显高于对照组腺病毒 (AD11-EGFP)。**结论** 成功构建了可提高腺病毒感染效率的嵌合型腺病毒 (AD11-RGD-4C-EGFP), 为进一步的研究奠定了基础。

[关键词] RGD-4C; HI 环; 腺病毒载体; 肝细胞癌

[中图分类号] R 730.59 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0178-05

Construction and transfection efficiency analysis of 5/11 chimeric adenovirus harboring RGD-4C

LIU Hui^{1,2}, WANG Chun-hong², CHEN Ya-long¹, LI Lin-fang², WU Hong-ping², QIAN Yan-zhen², JIANG Li-hua², QIAN Qi-jun^{1,2*}

1. XinYuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To construct a 5/11 chimeric adenovirus harboring RGD-4C, and observe its transfection efficiency after transfecting it into hepatocarcinoma cell lines HepG2, BEL-7404 and BJ cells. **Methods** RGD-4C was inserted into the HI loop region of 5/11 chimeric adenovirus fiber gene and the insertion outcome was confirmed by enzyme digestion and PCR analysis. The confirmed plasmid was co-transfected into *E. coli* BJ5183 together with adenoviral backbone plasmid pPE3 to produce recombinant plasmid by homologous recombination. Recombinants were selected and co-transfected into 293 cell line with PDC328-EF1-EGFP to produce recombinant adenovirus. The recombinant adenovirus production was confirmed by PCR analysis and was amplified and purified. The virus titer of recombinant adenovirus was determined. AD11-RGD-4C-EGFP was used to infect HepG2, BEL-7404, and BJ cell lines, and their transduction efficiency was determined by fluorescence microscope. **Results** A 1 123 bp target gene fragments was obtained by PCR from the recombinant adenovirus; meanwhile, we prepared high titer recombinant adenovirus, with the titer being 1.3×10^{10} pfu/ml after purification. At 10 MOI, the infection efficiency of recombinant adenovirus was much higher than control adenovirus (AD11-EGFP) after 48 h infection. **Conclusion** We have successfully constructed a chimeric adenovirus harboring RGD-4C, which paves a way for enhancing the infection efficiency of adenovirus in bio-therapy.

[Key words] RGD-4C; HI loop; adenovirus vectors; hepatocarcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):178-182]

[收稿日期] 2009-06-16 **[接受日期]** 2009-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (30730104), 浙江省自然科学基金重点项目 (Z205618). Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (30730104), and Key Program of Natural Science Foundation of China (Z205618).

[作者简介] 刘 辉, 硕士. E-mail: liuhui110120@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-35030677, E-mail: qianqj@163.com

肿瘤的基因治疗越来越引起人们的重视,已经有大量的临床前研究和临床实验在探索肿瘤基因治疗的潜力。其中腺病毒载体因其具有多方面的优势:感染细胞类型广,感染效率高;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]等,被广泛应用于肿瘤基因治疗。人类腺病毒有 A、B、C、D、E、F 6 个不同亚属,它们对宿主细胞的亲嗜性、致癌性及疾病史各不相同。目前常用的腺病毒载体是基于人 5 型血清型腺病毒发展起来的腺病毒载体^[2-3],它们在感染靶细胞时,首先由病毒纤毛蛋白(fiber)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(coxsackie-adenovirus receptor, CAR),然后腺病毒五邻体基部的 Arg-Gly-Asp(RGD)基序与靶细胞表面整合素相互作用介导腺病毒内化^[4]。因此, fiber knob 与 CAR 受体的结合是病毒进入细胞的关键步骤,修饰腺病毒的 fiber 成为解决腺病毒依赖 CAR 受体进行感染的有效途径。但是一些原发瘤和新鲜分离的肿瘤细胞中 CAR 受体不表达,或表达量很低,这大大限制了基于 C 族腺病毒改造的溶瘤腺病毒的感染能力和抗肿瘤能力。11 型腺病毒属于 B 族腺病毒, B 族腺病毒是通过 fiber 与细胞表面的 CD46 膜蛋白结合、黏附并进入细胞^[5],与传统的 5 型等 C 族腺病毒载体相比有许多优点:血清中的中和抗体阳性率较低;感染细胞不依赖 CAR 受体,能够高效感染多种重要的干细胞及原代肿瘤细胞;肝脏毒性低,免疫副作用小等^[6]。因此,如能用 11 型腺病毒 fiber 的 knob 和 shaft 替换传统 5 型腺病毒载体 fiber 的 knob 和 shaft,构建具有嵌合型 fiber 的 Ad5/11 型腺病毒,此类腺病毒载体将继承 Ad11 的感染特性,有效转导 CAR 表达不足的多种重要靶细胞,尤其是肿瘤细胞、造血干细胞及间充质干细胞等原感染效率较低的靶细胞。

腺病毒的 fiber 是突出于腺病毒颗粒的三聚体蛋白,主要分为 3 个区域: shaft、knob、tail。其中 knob 为腺病毒颗粒结合宿主细胞的必需结构,它由 AB、CD、DE、EG、GH、HI、IJ 等 7 个环组成,其中 HI 环是理想的配体或多肽的插入部位。首先, HI 环含有多个突出于表面的疏水性氨基酸残基,配体与之相连后在空间上的结构会很舒展,利于与受体结合;其次, HI 环很少参与 knob 的三聚体化;再次,在各种血清型腺病毒中, HI 环的氨基酸残基数目和组成不相同,且 HI 环不参与 knob 的细胞结合位点的形成^[7]。

RGD 肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸

(Arg-Gly-Asp)的短肽,广泛存在于生物体内,可用于腺病毒结构的改造,从而提高腺病毒为载体的基因治疗对肿瘤细胞的选择性^[8]。RGD-4C 即 CD-CRGDCFC 是 RGD 多肽家族的一种,可高效结合哺乳动物细胞表面的多种整合素,因此可利用 RGD-4C 与整合素的相互作用来提高病毒对细胞的感染能力,这样病毒将不会仅依赖于细胞膜上 CAR 受体的存在而进入细胞。

基于以上分析和设想,本研究试将 RGD-4C 插入 5/11 嵌合型腺病毒载体的 HI loop,在嵌合型腺病毒载体的基础上,构建 fiber 的 HI 区插入 RGD 多肽的新型腺病毒载体,并用该病毒感染肝癌细胞株和正常细胞株检测感染效率,旨在通过这些探索提高腺病毒载体的感染效率,为提高腺病毒生物治疗效率进行有益的尝试。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 质粒 pClon9-f11、PDC328-EF1-EGFP 和腺病毒骨架质粒 pPE3 均由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室构建; DH5 α 感受态细菌、BJ5183 感受态细菌、人胚肾 293 细胞、人肝癌细胞 HepG2、BEL-7404 以及成纤维细胞 BJ 均由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室保存备用;人胚肾 293 细胞、人肝癌细胞 HepG2、BEL-7404 以及成纤维细胞 BJ 均参照细胞株培养说明,采用贴壁细胞培养法,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 孵箱内培养。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,各种限制性内切酶均购自 NEB 公司,细胞用培养基均购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成 引物序列见表 1,均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 载体 pClon9-f11-RGD-4C 的构建 以 pClon9-f11 为模板,使用引物 P1 和 P3 进行 PCR 得到 1 096 bp 大小的条带;以 pClon9-f11 为模板,使用引物 P4 和 P2 进行 PCR 得到 490 bp 大小的条带;然后以这 2 次 PCR 产物的混合物为底物,使用引物 P1 和 P2 进行 2 次 PCR,得到 1 586 bp 大小的条带,且 5'端引入 *Pac* I 酶切位点,3'端引入 *Afl* II 酶切位点。将该 PCR 片段连接到 pClon9-f11,得到 pClon9-f11-RGD-4C(图 1),酶切并测序鉴定。

1.2.3 细菌内同源重组 pClon9-f11-RGD-4C 经 *Aat* II + *Hind* III 酶切回收大片段(5 957 bp)与 pPE3-F11(经 *Pac* I 酶切线性化)在大肠杆菌 BJ5183 内进行细菌内同源重组,得到质粒 pPE3-F11-RGD-4C,酶切并 PCR 鉴定。

1.2.4 腺病毒重组 利用 Lipofectamine 2000 试剂盒,将质粒 pPE3-F11-RGD-4C 与 pDC328 -EF1-EGFP 共转染至 293 细胞,具体方法按试剂盒说明书操作。转染后 7~14 d 细胞出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化,提取病毒 DNA,利用引物 P1 和 P5 进行 PCR 鉴定,PCR 阳性组以 pClon9-f11-RGD-4C

为模板,阴性对照不加模板,将重组病毒命名为 AD11-RGD-4C-EGFP。重组病毒在人胚肾 293 细胞中反复扩增后通过氯化铯梯度离心法纯化病毒,采用半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infectious dose,TCID₅₀)法测定重组腺病毒滴度。

表 1 合成引物的序列
Tab 1 Sequences of primers

Name	Sequences
P1	5'-CCG TTA ATT AAG ATC TTA TTC CCT TTA ACT AAT A-3'(included <i>Pac</i> I digesting site)
P2	5'-AGC GCC CTT AAG TGA GCT GCC C-3'(included <i>Afl</i> II digesting site)
P3	5'-GAA ACA GTC TCC GCG GCA GTC ACA ATT TAT TGC TCT TCG GTT AAG CAT GAC AG-3'
P4	5'-GAC TGC CGC GGA GAC TGT TTC TGC GAC GAG ACA TCA TAT TG-3'
P5	5'-GCA GAA ACA GTC TCC GCG GCA-3'

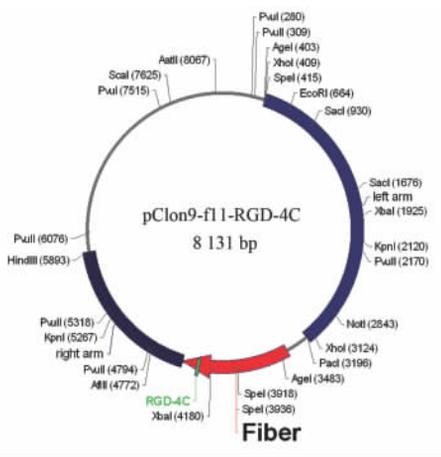


图 1 pClon9-f11-RGD-4C 结构示意图
Fig 1 Illustration of pClon9-f11-RGD-4C

1.2.5 病毒感染能力测定 取对数生长期的人肝癌细胞株 HepG2、BEL-7404 以及正常成纤维细胞 BJ 计数铺 6 孔板, 5×10^5 /孔, 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h; 换无血清培养液, AD11-EGFP 与 AD11-RGD-4C-EGFP 分别感染 HepG2、BEL-7404、BJ 细胞, MOI=10, 十字法摇匀, 2 h 后换 5% 血清培养液, 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养; 分别于感染后 24 h、48 h 观察感染及绿色荧光表达情况。

2 结果

2.1 质粒 pPE3-F11-RGD-4C 的鉴定 酶切电泳结果如图 2 所示, 质粒 pPE3-F11-RGD-4C 经 *Hind* III、*Kpn* I、*Xho* I 酶切之后条带均正确。PCR 电泳鉴定结果如图 3 所示, 以 P1 和 P5 为引物进行 PCR 扩增, 阴性对照扩增不出任何条带, 质粒克隆含有 RGD-4C 因此均产生 1 123 bp 的条带, 而 pPE3-F11

由于不存在 RGD-4C 只产生非特异性扩增, 以上结果说明质粒构建正确。

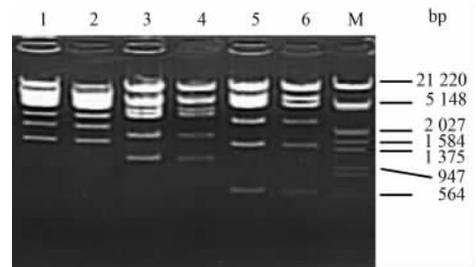


图 2 质粒 pPE3-F11-RGD-4C 的酶切鉴定
Fig 2 Enzymatic digestion analysis of recombinant adenovirus plasmid

M: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; 1, 2: The product digested by *Hind* III; 3, 4: The product digested by *Kpn* I; 5, 6: The product digested by *Xho* I

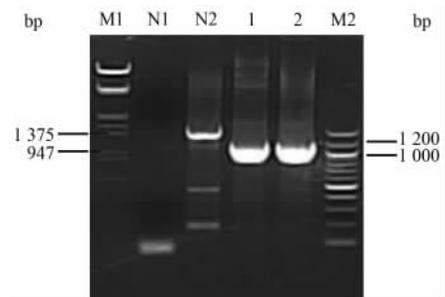


图 3 质粒 pPE3-F11-RGD-4C 的 PCR 鉴定
Fig 3 Identification of recombinant plasmid by PCR

M1: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; M2: 100 bp DNA ladder; N1: Control; N2: pPE3-F11; 1, 2: The PCR product of pPE3-F11b-RGD-4C plasmid

2.2 病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 的 PCR 鉴定 取 200 μ l 细胞悬液用 Qiagen DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取腺病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 的基因组 DNA,

以 P1 和 P5 为引物, 鉴定病毒中的 RGD-4C 序列, 由于病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 中含有 RGD-4C 序列, 因此可扩增产生 1 123 bp 产物, 阴性对照扩增不出任何条带; pPE3-F11 由于不存在 RGD-4C, 因此只产生非特异性扩增, 证实病毒重组成功, 结果见图 4。AD11-RGD-4C-EGFP 在 293 细胞中反复扩增纯化, TCID₅₀ 法测定病毒滴度为 1.3×10^{10} pfu/ml。

2.3 病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 对细胞的感染能力 MOI=10 时, 将病毒 AD11-EGFP 与 AD11-RGD-4C-EGFP 分别感染肝癌细胞 HepG2、BEL-7404 以及人成纤维细胞 BJ, 24 h、48 h 后, 用荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 检测其感染能力。由图 5 可以看出, 24 h 病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 对 BEL-7404 和 BJ 细胞株的感染效率比对照组病毒 AD11-EGFP 明显高; 48 h 病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 对 HepG2、BEL-7404 和 BJ 3 种细胞株的感染效率比

对照组病毒 AD11-EGFP 显著提高; 24 h 时病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 对 HepG2 的感染效率与对照组病毒无明显差别。

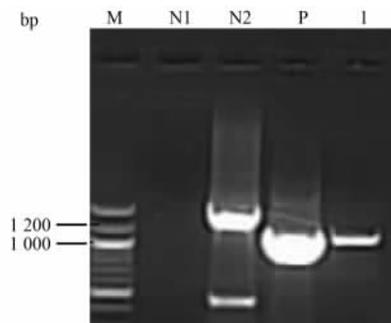


图 4 病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 的 PCR 鉴定

Fig 4 Identification of recombinant adenovirus by PCR

M: 100 bp DNA ladder; N1: Control; N2: pPE3-F11; P: pPE3-F11-RGD-4C plasmid; I: The virus AD11-RGD-4C-EGFP

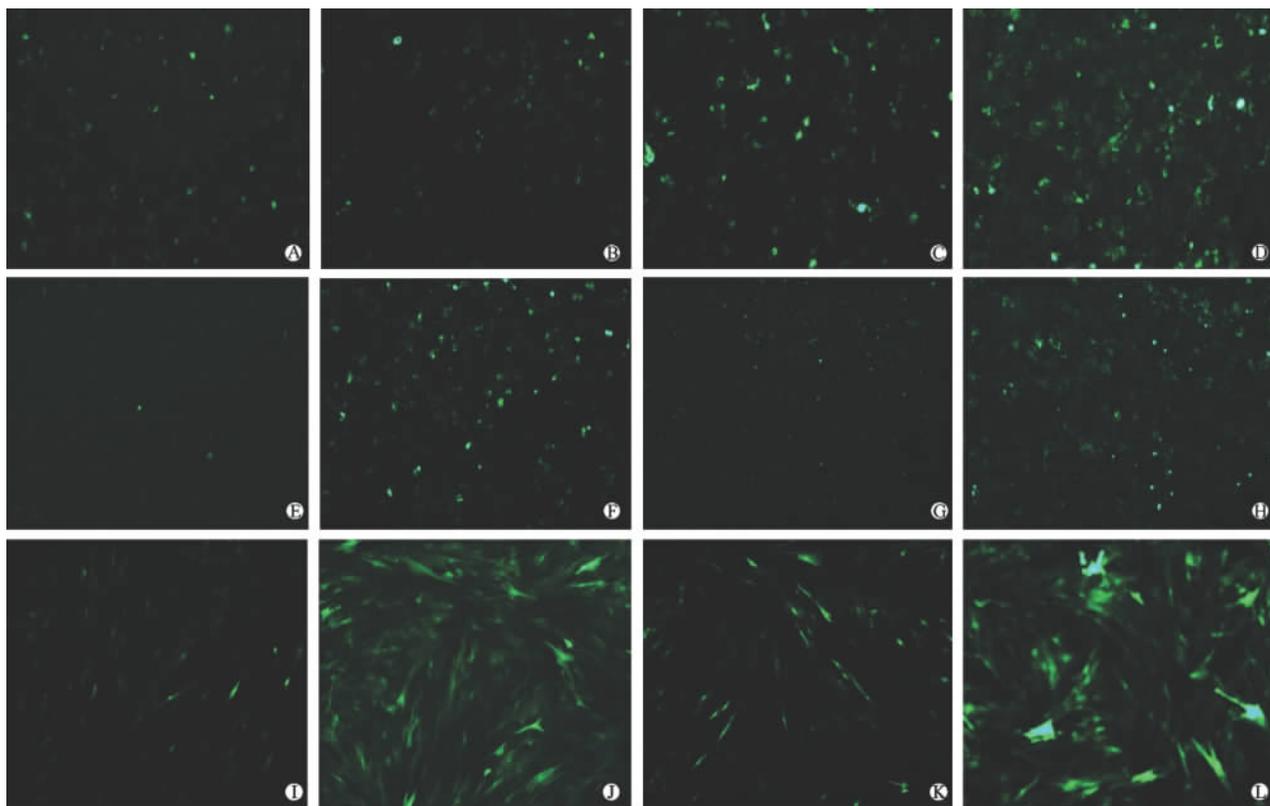


图 5 病毒 AD11-EGFP 与 AD11-RGD-4C-EGFP 荧光表达情况

Fig 5 Comparison of infection efficiencies between AD11-EGFP and AD11-RGD-4C-EGFP

A: HepG2 infected by AD11-EGFP(24 h); B: HepG2 infected by AD11-RGD-4C-EGFP(24 h); C: HepG2 infected by AD11-EGFP(48 h); D: HepG2 infected by AD11-RGD-4C-EGFP(48 h); E: BEL-7404 infected by AD11-EGFP(24 h); F: BEL-7404 infected by AD11-RGD-4C-EGFP(24 h); G: BEL-7404 infected by AD11-EGFP(48 h); H: BEL-7404 infected by AD11-RGD-4C-EGFP(48 h); I: BJ infected by AD11-EGFP(24 h); J: BJ infected by AD11-RGD-4C-EGFP(24 h); K: BJ infected by AD11-EGFP(48 h); L: BJ infected by AD11-RGD-4C-EGFP(48 h). Original magnification: $\times 40$

3 讨论

基因治疗的关键环节之一是提高腺病毒对肿瘤

细胞的感染效率, 由于 5 型腺病毒的基因治疗载体对 CAR 受体表达较低或不表达的细胞感染效率很低, 为提高腺病毒的感染效率和治疗效果研究者们

已经进行了一系列的改造:Witlox 等^[9]构建的 E1A 缺失 24 bp 的 Ad5-Δ24RGD 对骨肉瘤细胞株和原代细胞均有很好的治疗效果。Wakayama 等^[10]构建的 AxdAdB3-F/RGD 在 CAR 阳性和阴性的胆管癌细胞中复制能力和杀伤作用均有所增强(相对于病毒 AxdAdB3),但在正常肝细胞复制能力减弱,细胞毒性也减弱。另外,Tyler 等^[11]构建的 Ad5/3-RGD 经体内外实验证实在恶性胶质瘤细胞株和原代细胞中均有明显的效果。但目前尚未有报道将 RGD-4C 与嵌合型 AD5/11 相结合对肿瘤进行基因治疗的探索。

本研究将 RGD-4C 插入到 AD5/11 嵌合型 fiber 的 HI 区,构建了携带荧光报告基因 EGFP 的非增殖嵌合型腺病毒 AD11-RGD-4C-EGFP,通过观察荧光表达情况发现 RGD-4C 的插入可提高腺病毒对肿瘤细胞和正常细胞的感染效率,可见 RGD-4C 的插入可提高腺病毒感染细胞的效率,这为我们下一步的研究奠定了很好的实验基础。

肿瘤干细胞是近几年来人们非常关注的热点,其在肿瘤的发生、发展和维持中起重要作用。传统的化疗药物虽然杀死了大部分的肿瘤细胞,但由于肿瘤干细胞的存在,其耐药性仍会造成肿瘤的复发。只有杀死肿瘤干细胞,才能彻底治愈肿瘤。因此,越来越多的学者提出肿瘤治疗应该针对肿瘤干细胞,即使肿瘤体积没有缩小,但由于其他细胞增殖能力有限,肿瘤将逐渐退化萎缩。实验结果表明我们构建的病毒 AD11-RGD-4C-EGFP 可提高对细胞的感染效率。但目前尚未有报道 RGD-4C 与细胞表面整合素的结合以及 11 型腺病毒未知受体 X^[12] 的存在是否能提高对肿瘤干细胞的感染效率。我们进一步的实验将探索该构建病毒对肿瘤干细胞的感染能力,找到两者之间的相互关系,进而有效清除肿瘤干细胞,为肿瘤的基因治疗提供一种新的方法。可以大胆设想,通过调控使病毒在肿瘤细胞,特别是在肿瘤干细胞中选择性复制,而在正常细胞内少复制或复制达到安全、有效治疗肿瘤的最终目的。

[参考文献]

- [1] Kanerva A, Heminki A. Adenoviruses for treatment of cancer [J]. *Ann Med*, 2005, 37: 33-43.
- [2] Havenga M J, Lemckert A A, Ophorst O J, van Meijer M, Germeraad W T, Grimbergen J, et al. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease [J]. *J Virol*, 2002, 76: 4612-4620.
- [3] Abbink P, Lemckert A A, Ewald B A, Lynch D M, Denholtz M, Smits S, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D [J]. *J Virol*, 2007, 81: 4654-4663.
- [4] Wickham T J, Mathias P, Cheresh D A, Nemerow G R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment [J]. *Cell*, 1993, 73: 309-319.
- [5] Gaggar A, Shayakhmetov D M, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenovirus [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 1408-1412.
- [6] Verhaagh S, de Jong E, Goudsmit J, Lecollinet S, Gillissen G, de Vries M, et al. Human CD46-transgenic mice in studies involving replication-incompetent adenoviral type 35 vectors [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 2): 255-265.
- [7] Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller C R, Belousova N, Curiel D T. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob [J]. *J Virol*, 1998, 72: 1844-1852.
- [8] Temming K, Schiffelers R M, Molema G, Kok R J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumor vasculature [J]. *Drug Resist Updat*, 2005, 8: 381-402.
- [9] Witlox A M, Beusechem V W, Molenaar B, Bras H, Schaap G R, Alemany R, et al. Conditionally replicative adenovirus with tropism expanded towards integrins inhibits osteosarcoma tumor growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 Pt 1): 61-67.
- [10] Wakayama M, Abei M, Kawashima R, Seo E, Fukuda K, Ugai H, 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: 3043-3050.
- [11] Tyler M A, Ulasov I V, Borovjagin A, Sonabend A M, Khramtsov A, Han Y, et al. Enhanced transduction of malignant glioma with a double targeted Ad5/3-RGD fiber-modified adenovirus [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 2408-2416.
- [12] Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, et al. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells [J]. *J Virol*, 2006, 80: 12109-12120.

[1] Kanerva A, Heminki A. Adenoviruses for treatment of cancer

[本文编辑] 陈波