

# Fiber-knob 嵌合型溶瘤腺病毒对胶质瘤细胞的体外感染和杀伤活性分析

刘文茉, 王立正, 于 彬, 于湘晖  
(吉林大学 生命科学学院, 长春 130012)

**摘要:** 针对恶性胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 患者的平均生存时间较短, 传统治疗方法难以实现根治, 而新兴的溶瘤病毒疗法存在扩散能力有限, 治疗效果不理想等问题, 通过基因工程技术对人 5 型腺病毒(Ad5)衣壳蛋白进行修饰, 构建一种纤维蛋白头节区(knob)嵌合替换型溶瘤腺病毒, 以提升其对胶质瘤细胞的感染和靶向能力. 利用来自 B 亚群 Ad37 的 knob 替换 Ad5 的 knob, 证实其可利用唾液酸为受体, 从而增强对胶质瘤等 CAR(coxsackievirus and adenovirus receptor)低表达肿瘤细胞的感染和杀伤能力, 并在体外模型中提升对血脑屏障的穿透效率, 为恶性胶质瘤的治疗提供新的解决方案.

**关键词:** 恶性胶质瘤; 溶瘤腺病毒; 基因工程

**中图分类号:** Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2025)01-0201-06

## Analysis of *in vitro* Infection and Killing Activity of Fiber-knob Chimeric Oncolytic Adenovirus on Glioma Cells

LIU Wenmo, WANG Lizheng, YU Bin, YU Xianghui  
(School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract:** Based on the fact that glioblastoma multiforme is the most common malignant tumor in the brain, an average survival time of patients is relatively short, and traditional treatment methods are difficult to achieve cure. However, emerging oncolytic virotherapy has limited dissemination capability and suboptimal treatment effects. By using genetic engineering technology to modify the capsid protein of human adenovirus type 5 (Ad5), we constructed a chimeric oncolytic adenovirus with a fiber knob replacement to enhance its ability to infect and target glioma cells. By replacing the knob of Ad5 with the knob of Ad37 from subgroup B Ad37, it was confirmed that it could utilize sialic acid as a receptor, thereby improving its ability to infect and kill tumor cells with low expression of CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) such as glioma, and improving its penetration efficiency through the blood-brain barrier in *in vitro* models, providing a new solution for the treatment of glioblastoma multiforme.

**Keywords:** glioblastoma multiforme; oncolytic adenovirus; genetic engineering

恶性胶质瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是发病率最高的颅内恶性肿瘤, 目前患者的平均生存期通常不足 15 个月<sup>[1]</sup>. 由于其发生部位独特, 生物学特征复杂, 传统的治疗手段如手术、化疗和放

收稿日期: 2024-12-04.

**第一作者简介:** 刘文茉(1992—), 女, 汉族, 博士, 助理研究员, 从事溶瘤病毒抗肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: liuwenmo@jlu.edu.cn. **通信作者简介:** 于湘晖(1972—), 女, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事 HIV-1 致病机制和溶瘤病毒肿瘤治疗的研究, E-mail: xianghui@jlu.edu.cn.

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(批准号: 32071466).

疗难以对其实现根治. 近年来, 溶瘤病毒疗法作为一种新兴的恶性肿瘤治疗策略备受关注. 2022 年, 溶瘤单纯疱疹病毒在日本被批准上市用于治疗恶性胶质瘤<sup>[2-3]</sup>, 目前已有多个溶瘤病毒治疗恶性胶质瘤的方案进入临床研究阶段, 所采用的溶瘤病毒包括腺病毒、单纯疱疹病毒、呼肠孤病毒和脊髓灰质炎病毒等, 其中以腺病毒的应用最广泛<sup>[4]</sup>.

目前临床上使用溶瘤病毒治疗胶质瘤一般通过手术在颅内肿瘤处直接注射溶瘤病毒, 虽然原位注射局部药物浓度高, 但其扩散受限<sup>[5]</sup>. 对较大的肿瘤需多部位注射, 增加操作次数; 对易转移、容易多中心复发的恶性胶质瘤, 病毒难以有效扩散至转移灶, 因此治疗效果欠佳, 这也是目前溶瘤病毒治疗胶质瘤普遍面临的问题<sup>[6]</sup>. 若实现溶瘤腺病毒静脉全身给药, 需改变溶瘤腺病毒原本的感染性质, 使其具有血脑屏障及恶性胶质瘤的双重靶向性.

溶瘤腺病毒多由人 5 型腺病毒(Ad5)经改造而成, 称为条件复制型 Ad5(CRA5)<sup>[7]</sup>. Ad5 感染细胞依赖于其纤维蛋白(fiber)和细胞表面柯萨奇-腺病毒受体(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)的结合, 从而实现对细胞的感染<sup>[8]</sup>. 然而, CAR 在胶质瘤细胞中的表达水平通常较低, 正常组织细胞显著高于胶质瘤细胞的 CAR 表达量<sup>[9]</sup>. 这种特性导致溶瘤腺病毒在靶向感染胶质瘤细胞时效果不佳, 严重限制了其在恶性胶质瘤治疗中的应用. 因此, 通过基因工程手段对溶瘤腺病毒衣壳进行遗传修饰, 构建新的衣壳修饰型溶瘤腺病毒, 使其具有更适合应用于恶性胶质瘤治疗的性质, 提升溶瘤腺病毒对恶性胶质瘤的治疗效果.

由于不同亚群的腺病毒纤维蛋白序列和结构具有差异性, 因此来自不同亚群甚至不同型别的腺病毒感染所依赖的受体不同<sup>[10]</sup>. 其中来自 B 亚群的 Ad37 可通过唾液酸作为受体感染细胞. 唾液酸是神经发育过程中发挥重要生物学功能的分子, 在脑内高丰度存在, 而且唾液酸的表达量和肿瘤的恶性程度正相关, 肿瘤恶性程度越高, 唾液酸表达越多<sup>[11-12]</sup>. 基于此, 本文通过使用 Ad37 的 knob 替换 Ad5 的 knob, 构建 fiber-knob 替换型溶瘤腺病毒载体, 以使其具备用唾液酸作为感染受体的性质, 实现增强对胶质瘤细胞的感染性, 并在一定程度上提升溶瘤病毒静脉给药后对血脑屏障的靶向及穿透能力.

## 1 实验

### 1.1 唾液酸表达水平分析

细胞生长至对数生长阶段, 用胰酶消化后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次, 进行细胞计数, 取  $1 \times 10^6$  个细胞进行后续实验. 加入生物素标记的唾液酸抗体, 4 °C 孵育 1 h 后, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的链霉素, 4 °C 孵育 30 min, 再用预冷的 PBS 洗涤 2 次, PBS 重悬细胞, 流式细胞仪上机检测.

### 1.2 病毒感染性检测

用相同剂量感染细胞, 在感染 16 h 后, 用荧光显微镜观察红色荧光蛋白(RFP)的表达, 并在相同拍摄条件(如曝光、曝光时间和激发光强等)下拍照. 成像后, 用不加乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化细胞, 利用流式细胞术分析 RFP 的荧光强度.

### 1.3 细胞活力检测

采用噻唑蓝(MTT)法测定细胞活力. 病毒以不同剂量感染细胞, 37 °C 培养 72 h 后, 加入 MTT, 避光孵育 4 h, 加入二甲基亚砷(DMSO)溶解蓝色颗粒, 在 490 nm 处检测吸收值. 细胞活力计算公式为

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{实验组 OD}_{490} - \text{背景值}}{\text{对照组 OD}_{490} - \text{背景值}} \times 100\%.$$

每种病毒每次感染剂量设置 5 个重复孔.

### 1.4 穿透血脑屏障能力分析

将 hCMEC/D3 细胞在 0.4 mm PTFE Transwell 腔中培养 6~7 d, 用伏特/欧姆计测定细胞的跨膜电阻(TEER), 分析细胞单层膜的完整性和功能. 当  $\text{TEER} > 50 \Omega/\text{cm}^2$  时, 在该模型中评估溶瘤腺病毒跨 hCMEC/D3 细胞层的转运能力. 将病毒加入 Transwell 细胞层上侧培养基中, 37 °C 孵育 4 h

后, 检测细胞层下侧(基侧)培养基中的病毒量。

### 1.5 体内靶向实验

用 18~20 g 雌性 Balb/c 裸鼠建立模型。小鼠先腹腔注射戊巴比妥钠麻醉剂(10 mg/mL 生理盐水), 剂量为每 10 g 体质量给药 100  $\mu$ L。小鼠深度麻醉后, 固定在脑立体镜上, 用手术刀使头顶皮肤露出颅骨。根据小鼠脑图, 将 U87 细胞( $5 \times 10^5$  个细胞, 5  $\mu$ L)注射到所需部位( $x = +2.5$  mm,  $y = +0.5$  mm,  $z = -3.5$  mm)。缝合小鼠的伤口, 并注射青霉素以防止细菌感染。肿瘤接种 7 d 后, 经尾静脉注射  $1 \times 10^{11}$  VPs(病毒颗粒数)溶瘤病毒。5 d 后, 通过小鼠肿瘤组织内溶瘤病毒 RFP 的表达进行活体成像, 分析溶瘤病毒的靶向作用。

### 1.6 数据分析与统计

用 Graphpad 进行数据制图, 使用 SPSS 软件进行统计分析。采用 T-test 检验对两组进行比较。在对两个或多个数据集的显著性进行分析时, 采用单因素方差分析和 Newman-Keuls 检验。当  $P < 0.05$  时, 其组间差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 唾液酸在肿瘤细胞中表达水平分析

为评价唾液酸在不同类型和种属肿瘤细胞中的表达水平, 先分析胶质瘤、肝癌和乳腺癌, 再分别选择人肿瘤细胞和小鼠肿瘤细胞, 对各表面的唾液酸表达水平进行检测, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 人肿瘤细胞均显著高于小鼠细胞中唾液酸的表达水平(\*\*\*,  $P < 0.001$ ), 为 Ad5/K37 溶瘤腺病毒的体内外评价提供了种属提示。

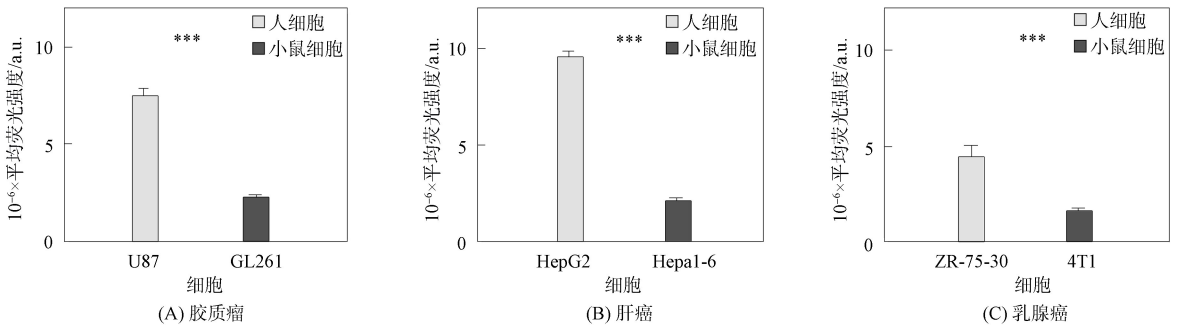


图 1 胶质瘤、肝癌和乳腺癌细胞唾液酸表达

Fig. 1 Sialic acid expression in glioma, liver cancer and breast cancer cells

### 2.2 Ad5/K37 在不同肿瘤细胞中的感染性质分析

与 Ad5 相比, 为探究 Ad5/K37 对不同肿瘤细胞的感染性质是否发生改变, 分别评价 10 个不同的人肿瘤细胞系和 5 个小鼠肿瘤细胞系, 分别利用 Ad5 和 Ad5/K37 在相同感染滴度下感染细胞, 结果如图 2 所示。由图 2 可见, 在 10 个不同人肿瘤细胞系中, 除 A2780 细胞外, Ad5/K37 均能显著提升对肿瘤细胞的感染性(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ), 尤其在胶质瘤细胞中, 对细胞的感染率提升了 12.42 倍。在小鼠肿瘤细胞中, 与 Ad5 相比, Ad5/K37 能显著增加对细胞的感染能力, 最高提升 4.75 倍(图 2)。表明通过 knob37 替换后得到的 Ad5/K37 在人肿瘤细胞和小鼠肿瘤细胞中均能显著增加溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的感染性。

### 2.3 体外杀伤活性评价

选择 6 个不同人肿瘤细胞系, 分别利用 Ad5 和 Ad5/K37 的不同滴度感染细胞, 在感染 72 h 后检测细胞活力, 结果如图 3 和表 1 所示。由图 3 可见, 在不同肿瘤细胞中, Ad5/K37 均具有显著的杀伤活性, 如在胶质瘤 U87 细胞中, Ad5/K37 显著高于 Ad5 的杀伤效果, 通过计算 EC<sub>50</sub> 值(表 1)可见, 达到 EC<sub>50</sub> 的 Ad5/K37 显著低于 Ad5 的 MOI 值, Ad5 组是 Ad5/K37 组 EC<sub>50</sub> 值的 28.5 倍, 进一步证明 Ad5/K37 增强了对肿瘤细胞的杀伤能力。

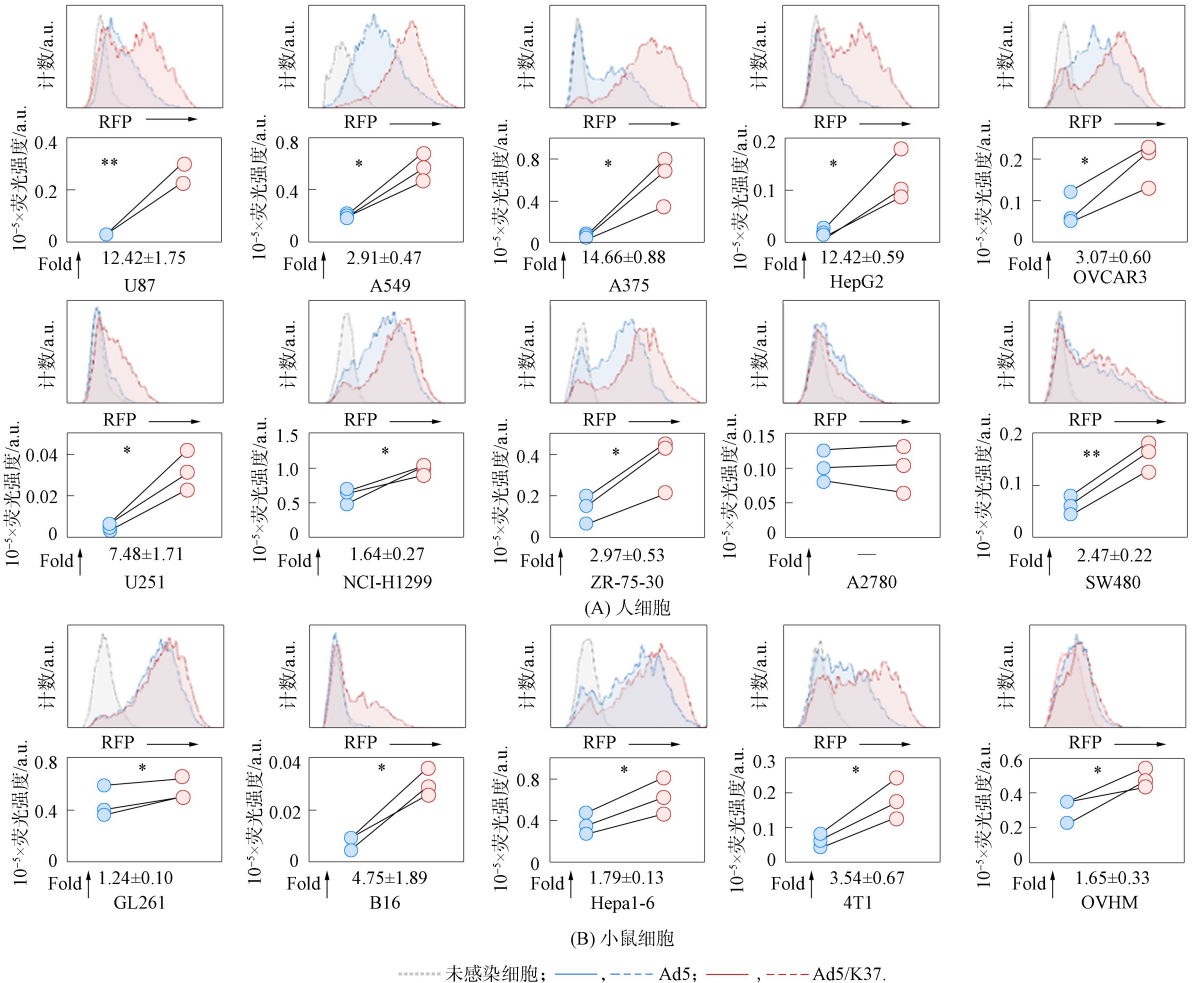


图 2 Ad5 和 Ad5/K37 对不同肿瘤细胞系的感染性分析

Fig. 2 Analysis of infectivity of Ad5 and Ad5/K37 on different tumor cell lines

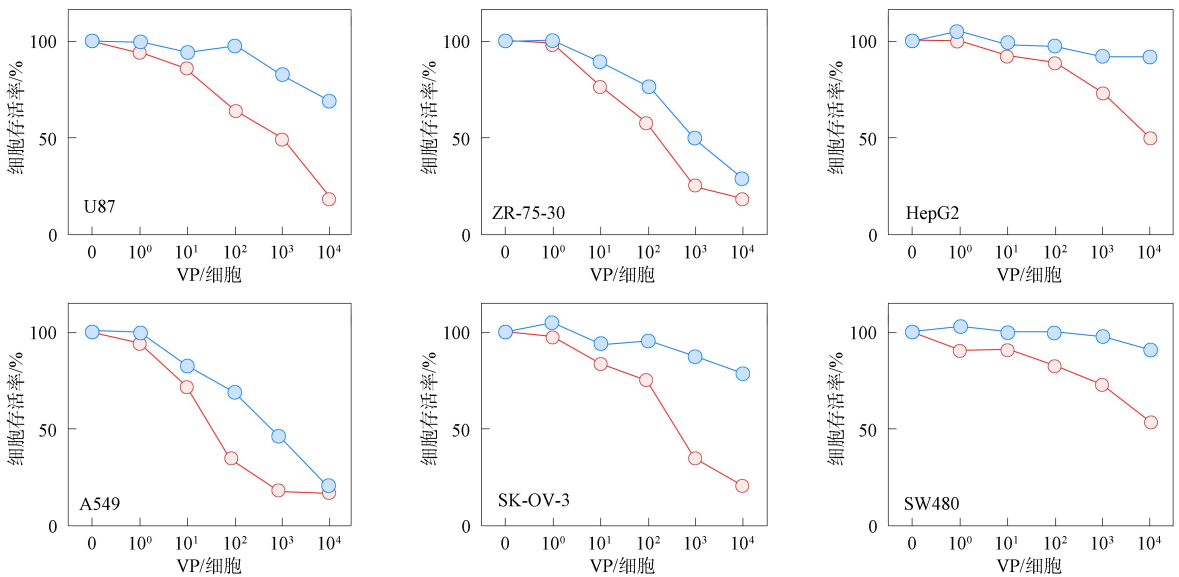


图 3 Ad5 和 Ad5/K37 对不同肿瘤细胞系的细胞杀伤

Fig. 3 Cytotoxicity of Ad5 and Ad5/K37 on different tumor cell lines

2.4 靶向能力评价

为确定 Ad5/K37 增强细胞感染性是否仅针对肿瘤细胞, 是否更有可能具有靶向感染脑部细胞的性

质, 利用 Ad5/K37 在体外以相同的 MOI 感染人肾细胞(HEK293)、人微血管内皮细胞(hCMECD/3)和胶质瘤细胞(U87), 结果如图 4 所示. 由图 4 可见, Ad5/K37 具有明显的脑细胞靶向性, 可较好地感染 hCMECD/3 细胞和 U87 细胞. 此外, 用相同 MOI 的 Ad5 和 Ad5/K37 分别感染 hCMECD/3 细胞, 发现 Ad5/K37 对 hCMECD/3 的感染性显著高于 Ad5, 提高了 21.13 倍, 表明该修饰后的 Ad5/K37 能实现靶向感染脑部细胞的预期.

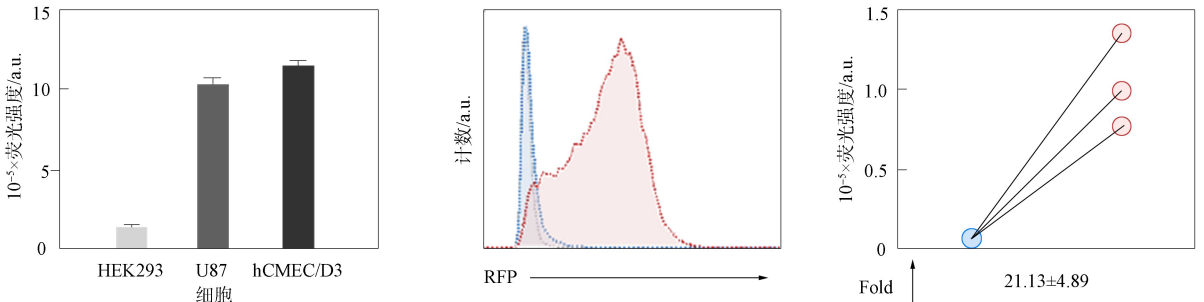


图 4 Ad5 和 Ad5/K37 对人脑部细胞的感染性质分析

Fig. 4 Analysis of infection properties of Ad5 and Ad5/k37 on human brain cells

表 1 Ad5 和 Ad5/K37 对不同肿瘤细胞系的细胞杀伤 EC50 值

Table 1 EC50 values of cytotoxicity of Ad5 and Ad5/K37 on different tumor cell lines

腺病毒	U87		ZR-75-30		HepG2	
	EC50(MOI)	EC50(shift)	EC50(MOI)	EC50(shift)	EC50(MOI)	EC50(shift)
CRA5	19 518	28.5	626.3	12.8	97 022	13.5
CRA5/K37	648.6	28.5	48.91	12.8	7 201	13.5
腺病毒	A549		SK-OV-3		SW480	
	EC50(MOI)	EC50(shift)	EC50(MOI)	EC50(shift)	EC50(MOI)	EC50(shift)
CRA5	650.4	15.7	31 642	68.5	101 030	12.4
CRA5/K37	41.48	15.7	461.9	68.5	8 172	12.4

为进一步验证该脑靶向效应是否可穿过血脑屏障, 利用 hCMEC/D3 细胞在体外建立血脑屏障模型. 当 hCMEC/D3 细胞生长到 TEER > 50 Ω/cm<sup>2</sup> 时, 将病毒加入细胞培养基的上层孵育 4 h. 收集下层培养基, 对下层穿透细胞屏障的病毒进行定量分析, 结果如图 5 所示. 由图 5 可见, 病毒孵育 4 h 后, 血脑屏障细胞的电阻无明显变化, 说明病毒并未破坏血脑屏障. 与 Ad5 相比, Ad5/K37 在下层可检测到更多病毒数, 说明 Ad5/K37 能增强其穿透血脑屏障的能力.

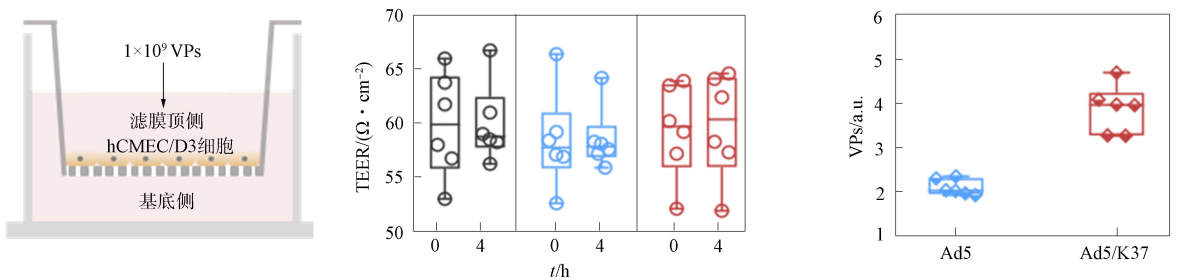


图 5 Ad5 和 Ad5/K37 体外穿透血脑屏障能力

Fig. 5 *In vitro* blood-brain barrier penetration ability of Ad5 and Ad5/K37

为评价 Ad5/K37 在体内对胶质瘤的靶向能力, 利用 U87 细胞系建立 BALB/c 裸鼠颅内荷瘤模型, 通过静脉注射溶瘤腺病毒进行治疗, 5 d 后, 通过检测病毒载量和病毒的 RFP 表达分析 Ad5/K37 穿透血脑屏障的能力和肿瘤靶向能力, 结果如图 6 所示. 由图 6 可见, Ad5/K37 在颅内荷瘤小鼠模型中未提高穿透血脑屏障的能力, 由于 Ad5/K37 在小鼠各组织器官中的分布均少于 Ad5, 因此, 在体内 Ad5/K37 可降低溶瘤腺病毒对正常组织器官的感染, 但未显著提高血脑屏障穿透能力.

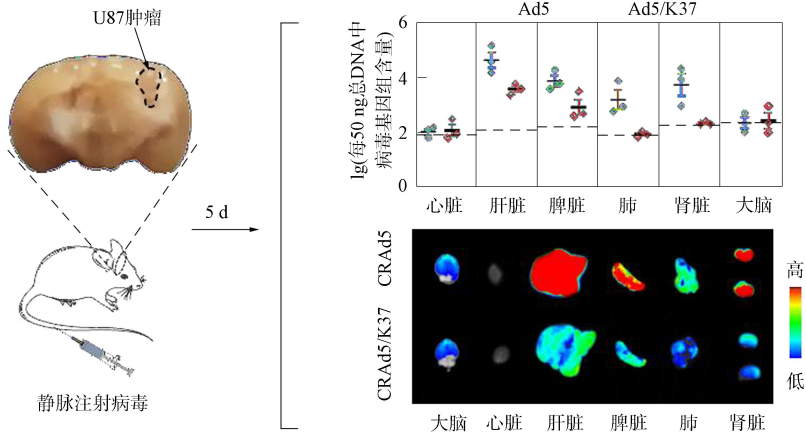


图 6 Ad5 和 Ad5/K37 在小鼠体内脑原位胶质瘤中的靶向性分析

Fig. 6 Analysis of targeting properties of Ad5 and Ad5/K37 in orthotopic gliomas in mice

综上所述,通过对人 5 型溶瘤腺病毒 knob 区域进行嵌合替换,改变溶瘤腺病毒的感染性,显著提升了溶瘤腺病毒对多种 CAR 低表达肿瘤细胞的感染能力,显著增强了对肿瘤细胞的杀伤活性,并增强了对脑部细胞的感染性.在体外血脑屏障模型中,Ad5/K37 病毒可有效穿过血脑屏障.在体内脑原位胶质瘤的靶向实验中并未发现 Ad5/K37 能有效穿过血脑屏障而到达肿瘤部位,这可能与种属差异有关,由于在小鼠模型中人腺病毒不能较好地实现脑组织靶向性,因此将利用其他动物模型进一步分析评价 Ad5/K37 在体内的靶向性.此外,通过体内靶向实验发现,Ad5/K37 可减少病毒在体内其他脏器中的病毒富集量,从而减少病毒的组织毒性,有利于 Ad5/K37 在体内肿瘤治疗的应用.

### 参 考 文 献

- [1] DELGADO-LÓPEZ P D, CORRALES-GARCÍA E M. Survival in Glioblastoma: A Review on the Impact of Treatment Modalities [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(11): 1062-1071.
- [2] LING A L, SOLOMON I H, LANDIVAR A M, et al. Clinical Trial Links Oncolytic Immunoactivation to Survival in Glioblastoma [J]. *Nature*, 2023, 623: 157-166.
- [3] CHRISTIE J D, CHIOCCA E A. Treat and Repeat: Oncolytic Virus Therapy for Brain Cancer [J]. *Nat Med*, 2022, 28(8): 1540-1542.
- [4] BOMMAREDDY P K, SHETTIGAR M, KAUFMAN H L. Integrating Oncolytic Viruses in Combination Cancer Immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(8): 498-513.
- [5] FUDABA H, WAKIMOTO H. Oncolytic Virus Therapy for Malignant Gliomas: Entering the New Era [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2023, 23(3): 269-282.
- [6] RIUS-ROCABERT S, GARCÍA-ROMERO N, GARCÍA A, et al. Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7604-1-7604-30.
- [7] BISCHOFF J R, KIRN D H, WILLIAMS A, et al. An Adenovirus Mutant That Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor Cells [J]. *Science*, 1996, 274: 373-376.
- [8] MATSUNAGA W, GOTOH A. Adenovirus as a Vector and Oncolytic Virus [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(6): 4826-4840.
- [9] NANDI S, LESNIAK M S. Adenoviral Virotherapy for Malignant Brain Tumors [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(6): 737-747.
- [10] CHEN R F, LEE C Y. Adenoviruses Types, Cell Receptors and Local Innate Cytokines in Adenovirus Infection [J]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33(1): 45-53.
- [11] ZHANG H B, WANG H D, AN Y C, et al. Construction and Application of Adenoviral Vectors [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 34: 102027-1-102027-20.
- [12] CHANDRA N, FRÄNGSMYR L, IMHOF S, et al. Sialic Acid-Containing Glycans as Cellular Receptors for Ocular Human Adenoviruses: Implications for Tropism and Treatment [J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 395-1-395-12.