



## 基于pH值敏感的荧光染料分析腺病毒诱导T淋巴细胞胞内体膜的裂解

张文峰<sup>1#\*</sup>, 李壮华<sup>2#</sup>, 陈镜塘<sup>2#</sup>, 邵红伟<sup>1</sup>, 陈业诚<sup>1</sup>, 黄树林<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

<sup>2</sup> 东莞市人民医院, 广东 东莞 523059

**摘要:** 【目的】探索基于pH值敏感的荧光染料分析腺病毒裂解T淋巴细胞胞内体膜的实验方法。【方法】本文以Jurkat细胞(T淋巴瘤细胞)为靶细胞, 将pH值敏感的荧光染料pHrodo dextran与5型腺病毒(Ad5)共同孵育Jurkat细胞, 对pHrodo dextran孵育的浓度与时间进行了优化, 利用激光共聚焦显微镜分析胞内相对平均荧光强度百分比随时间的变化情况, 反映Ad5诱导胞内体膜裂解情况。【结果】研究结果表明, 在pHrodo dextran终浓度为80 μg/mL, 孵育时间为10 min条件下, 在病毒感染后的30 min, 相对平均荧光强度百分比出现显著下降; 利用巴佛洛酶素A<sub>1</sub>抑制胞内体膜质子泵活性后, 相对平均荧光强度百分比出现轻微下降。【结论】建立了基于pHrodo dextran分析腺病毒诱导T细胞胞内体膜裂解的新方法。

**关键词:** 腺病毒, 胞内体, 胞内运输, T淋巴细胞

T细胞的抗原识别特异性是由其表面的抗原识别受体(T cell receptor, TCR)所决定。体外分离并扩增来自病人的T细胞, 利用转基因的方法将具有肿瘤抗原特异性识别的TCR基因转入此T细胞, 将能够赋予T细胞抗肿瘤的能力; 然后将此抗原特异性TCR基因修饰T细胞进行过继性移植/回输的疗法, 已经成为肿瘤生物治疗中的一个热

点<sup>[1]</sup>。目前基因治疗中常用的载体为逆转录病毒载体和腺病毒载体<sup>[2]</sup>。由于逆转录病毒因整合宿主细胞基因组而存在致瘤风险, 而腺病毒载体因具有能感染增殖和非增殖细胞、不整合宿主细胞基因组、能同时表达多个外源基因等优点, 并且在体外感染T细胞后再进行回输, 避免了腺病毒对机体造成一定免疫反应, 腺病毒载体已逐渐在

基金项目: 国家自然科学基金(31400149, 31300737); 广东省科技计划项目(2014A020212462); 广东省自然科学基金(2014A030313586)

\*通信作者。Tel: +86-20-39352201; E-mail: zwfsnowdream@126.com

#共同第一作者。

收稿日期: 2016-03-14; 修回日期: 2016-04-11; 网络出版日期: 2016-04-19

TCR基因疗法中发挥重要的作用<sup>[3]</sup>。

腺病毒对靶细胞的感染过程主要包括如下环节：病毒与细胞表面受体成功结合后，即开始了受体介导的胞吞；病毒被包裹入胞吞小泡中进入细胞，不久胞吞小泡与胞内体(Endosome)融合，病毒随即进入胞内体<sup>[4]</sup>；胞内体膜上ATP驱动的质子泵将H<sup>+</sup>泵进胞内体腔中，维持pH值在6左右。腺病毒进入胞内体后，在酸性环境下诱导部分病毒衣壳的解聚，从而引起胞内体膜的裂解，病毒随之进入细胞质<sup>[5-6]</sup>；病毒逃脱进入细胞质后，病毒通过与胞内分子马达蛋白(Molecular motors)相互作用从而沿着微管靠近细胞核；病毒衣壳蛋白停留在核孔处，基因组被注入核内完成基因的转录。

其中腺病毒诱导胞内体膜的裂解，是腺病毒胞内运输中的一个关键环节，决定了腺病毒感染T淋巴细胞效率的高低，从而也影响着TCR基因疗法的效果，因此分析腺病毒裂解T细胞胞内体膜的能力具有重要意义。sarcin为一种核糖体抑制蛋白，可抑制蛋白合成，目前主要通过sarcin assay来分析病毒裂解胞内体的情况<sup>[7-8]</sup>。该方法的原理为细胞在缺乏甲硫氨酸的培养基中培养后，同时加入sarcin与腺病毒，sarcin经细胞胞吞进入细胞并到达胞内体，当腺病毒诱导胞内体裂解后可进入细胞质中；然后加入<sup>35</sup>S标记的甲硫氨酸继续培养，使用同位素液闪仪测定裂解细胞的放射性读数；通过放射性读数相对百分比的变化，间接反映出病毒裂解胞内体能力的强弱。此方法存在同位素使用的安全性、复杂性，不适合在普通的实验室开展，需要寻找一种简单可行的非同位素分析法。

5型腺病毒(Ad5)因其遗传背景最为清晰而成为目前最常用的腺病毒载体，在疾病的基因治疗中有着广泛的应用<sup>[9-10]</sup>。pHrodo为1种pH值敏感的荧光染料，仅在酸性环境中能被激发出荧光，在中性的细胞质环境中不发荧光。染料pHrodo无法

被细胞胞吞/胞饮进入胞内体，目前将pHrodo耦连在葡聚糖分子上形成的pHrodo dextran可被细胞胞吞/胞饮，其主要用于细胞胞吞过程的研究<sup>[11-12]</sup>。本文欲利用pHrodo dextran分析Ad5裂解T淋巴细胞胞内体膜的强弱。由于外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的高异质性，因此我们选取Jurkat细胞(人T淋巴瘤细胞)为模型，基于使用pHrodo dextran研究Ad5诱导Jurkat细胞胞内体膜的裂解。

我们实验设计的思路是，将Ad5与pHrodo dextran同时加入细胞，pHrodo dextran可被胞吞/胞饮进入细胞并到达胞内体，在胞内体的酸性环境中可被激发出荧光；当病毒裂解胞内体后，pHrodo dextran进入到细胞质中，失去发射荧光的能力；病毒诱导胞内体膜裂解能力越强，荧光强度比值的下降幅度就越大；分析荧光强度比值的变化情况，即可反映病毒裂解胞内体能力的大小。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Jurkat细胞购自上海细胞库；293细胞购自美国菌种保藏中心；穿梭载体pDC315、骨架载体购自Microbix公司；无血清1640培养基、胎牛血清、阳离子脂质体购自Gibco公司；pHrodo Red dextran购自Invitrogen公司；CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自Thermo公司；流式细胞仪Epics-XL购自美国Beckman Coulter；激光共聚焦显微镜购自日本Olympus公司。

### 1.2 细胞培养

37 °C条件下，在5% CO<sub>2</sub>培养箱中用1640完全培养液(含有10%终浓度的胎牛血清)培养Jurkat细胞。

### 1.3 病毒包装

本实验中用到的腺病毒Ad5-GFP为本实验室包装，该病毒的基因组上带有GFP基因的表达

盒，病毒感染细胞后可在细胞内表达GFP蛋白。病毒包装采用Microbix公司细胞内同源重组的AdMax系统，具体步骤可参考Shayakhmetov等发表的文献[13]，大致步骤如下：(1) 将重组载体pDC315-GFP与骨架载体通过阳离子脂质体转染293细胞；(2) 载体转染后12 d通过显微镜观察病斑的出现；(3) 通过TCID<sub>50</sub>法测定病毒滴度。

#### 1.4 病毒感染细胞MOI值的摸索

Jurkat细胞按照 $5 \times 10^5$ /孔密度接种于12孔细胞培养板，以不同感染复数(Multiplicity of infection, MOI)MOI= 5、10、50、100、200、400分别加入腺病毒Ad5-GFP，置于细胞培养箱内培养6 h；以800×g离心5 min，弃上清；加入1640完全培养液，置于细胞培养箱内培养48 h；流式细胞仪检测GFP阳性表达的细胞比例。

#### 1.5 pHrodo dextran工作浓度的摸索

操作手册建议胞内体研究实验中pHrodo Red dextran的摸索浓度为50–100 μg/mL，本文中选取pHrodo Red dextran的浓度分别为50、80、100 μg/mL进行实验。离心收集 $5 \times 10^5$  Jurkat细胞；按MOI值400加入病毒Ad5-GFP，同时分别加入终浓度为50、80、100 μg/mL的pHrodo Red dextran；37 °C孵育15 min；洗涤细胞并重悬细胞于冰冷的PBS溶液；迅速用共聚焦显微镜观察胞内激发红色荧光情况。

#### 1.6 pHrodo dextran孵育时间的摸索

腺病毒在胞内体中停留的时间较短暂，感染细胞后30 min以内即已完成裂解胞内体过程<sup>[14–15]</sup>。因此，在本实验中比较病毒感染后5、10、15 min的荧光强度值。离心收集 $5 \times 10^5$  Jurkat细胞；按MOI值400加入病毒Ad5-GFP，同时加入终浓度为80 μg/mL的pHrodo Red dextran；37 °C孵育不同时间段(5、10、15 min)；洗涤细胞并重悬细胞于冰冷的PBS溶液；迅速用共聚焦显微镜观察胞内激发红色荧光情况。

#### 1.7 激光共聚焦显微镜观察

将细胞置于Olympus FluoView FV1000激光共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM)上，通过相应的通道使用60×油镜观察细胞内激发的红色荧光，每组实验随机选取30个独立的细胞，每个细胞内随机选取10个独立的荧光区域进行分析，利用FV10-ASW1.7软件计算每个实验组的平均荧光强度。

#### 1.8 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件分析。所有数据用均数±标准差表示，两组间分析采用独立t检验，多组间分析采用方差分析。

### 2 结果和分析

#### 2.1 重组腺病毒Ad5-GFP的包装

将GFP基因连入腺病毒穿梭载体pDC-315，构建的重组穿梭载体GFP-pDC-315与骨架载体共同转染293包装细胞，转染后12 d在显微镜下观察到明显病斑(图1-A)；收获细胞经反复冻融后，收集病毒液并提取病毒基因组，经GFP特异性引物PCR扩增，扩增产物经电泳分析，发现与GFP基因大小一致的条带(图1-B)，证实重组病毒Ad5-GFP包装成功；病毒滴度、病毒颗粒数的测定结果如表1所示。

#### 2.2 Ad5感染Jurkat细胞的感染效率分析

Ad5-GFP感染Jurkat细胞后的48 h，通过流式细胞仪检测GFP阳性表达细胞的百分率即感染效率。Ad5-GFP在不同MOI值感染Jurkat细胞效率的结果见图2，在MOI值较小时，Ad5的感染效率较低，当MOI为10时，仅14.3%的细胞表达GFP；随着MOI值的升高，感染效率随之增加，当MOI为200时，感染效率为43.7%；当MOI为400时，大约60.6%的细胞表达GFP。根据以上实验结果，我们选择MOI值400进行接下来的实验。

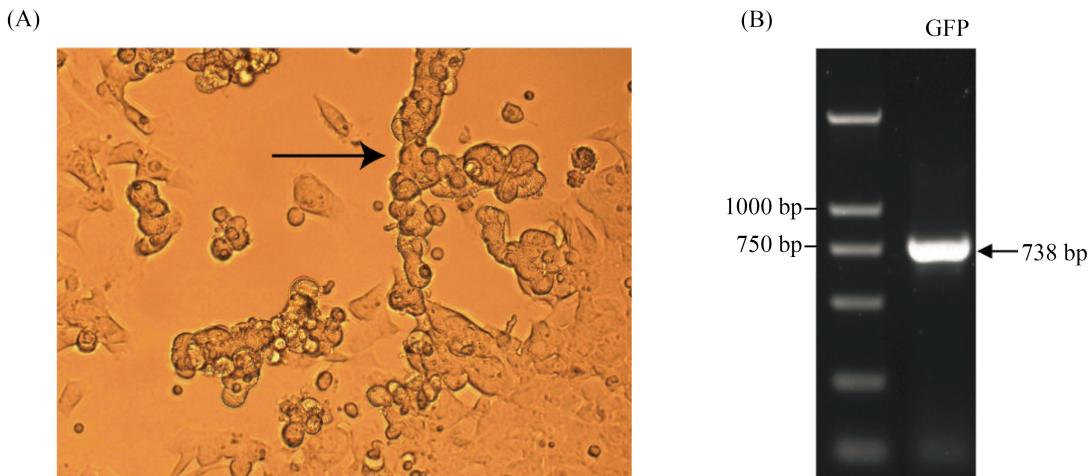


图1. 重组腺病毒Ad5-GFP包装过程中病斑形成(A)和PCR鉴定(B)

Figure 1. The packaging of the recombinant Ad5-GFP. A: The backbone plasmid and plasmid pDC315-GFP were co-transfected into HEK-293 cells and plaques (indicated by an arrow) could be observed approximately 12 days after transfection. B: Genomic DNA of the recombinant adenovirus Ad5-GFP was extracted, and the GFP gene was identified by PCR.

表1. 腺病毒Ad5-GFP的病毒滴度及病毒颗粒数

Table 1. Genome-to-PFU ratios for Ad5-GFP

Virus	Genomes/mL	PFU/mL	Genome/PFU ratio
Ad5-GFP	$4.55 \times 10^{11}$	$7.85 \times 10^9$	58

### 2.3 优化pHrodo dextran的工作浓度

病毒感染时pHrodo dextran的终浓度将直接影响进入胞内体中荧光染料的数量，浓度过低则被激发产生的荧光无法被检测读出。细胞中加入不同浓度pHrodo dextran，同时病毒以MOI值400感染细胞，15 min后激发荧光的结果见图3，当使用50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度时，仅能观察到微弱的红色荧光，其平均荧光强度大小为173；当使用80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度时，均能观察到明显的红色荧光，80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验组的平均荧光强度大小为400，100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验组的平均荧光强度大小为386，两者之间没有显著差异。由此我们采用pHrodo dextran的终浓度为80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行接下来的实验。

### 2.4 摸索pHrodo dextran的孵育时间

另一个影响激发荧光强度的因素即染料pHrodo

dextran的孵育时间，鉴于病毒在感染后的30 min之内即逃脱胞内体进入细胞质，因此我们在实验中选择孵育时间为5、10、15 min。病毒以MOI值400感染细胞，同时加入终浓度为80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的pHrodo dextran，分别孵育5、10、15 min后，共聚焦显微镜观察的荧光情况见图4。孵育10 min的平均荧光强度(641)明显高于孵育5 min的平均荧光强度(165.5)，而孵育15 min的平均荧光强度(388)却低于孵育10 min的平均荧光强度。这表明孵育5 min经胞吞进入胞内体的pHrodo dextran还比较少，孵育15 min已开始有病毒裂解胞内体进入胞质，因此选取10 min的孵育时间进行接下来实验。

### 2.5 分析相对平均荧光强度百分比随时间变化的情况

我们已在前期中摸索了合适的孵育时间及pHrodo dextran工作浓度，接下来在细胞中加入终浓度为80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的pHrodo dextran，同时以MOI值400加入Ad5-GFP(不加入病毒组作为对照)孵育10 min，感染细胞，经冰冷的PBS洗涤后迅速置

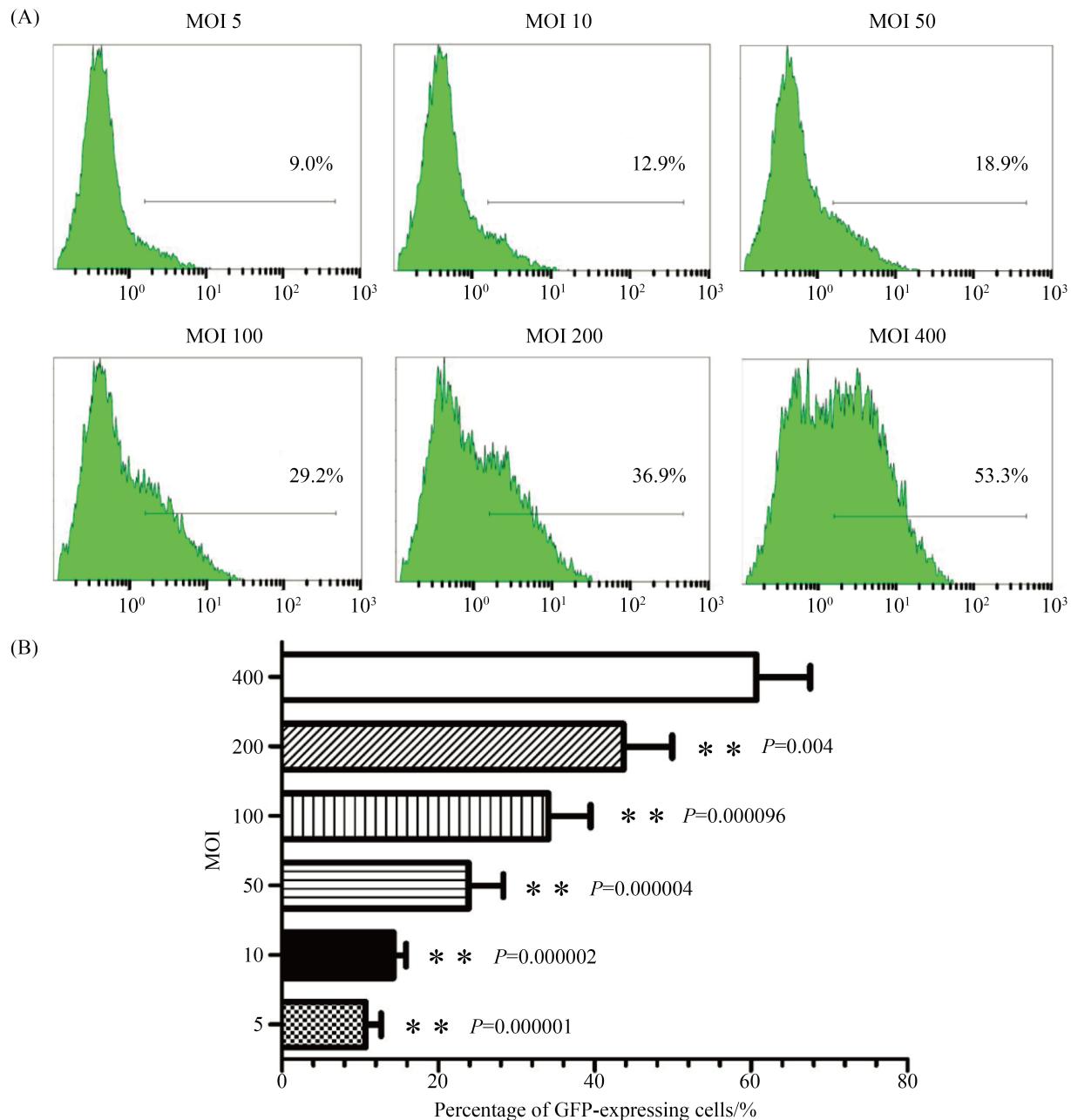


图 2. 腺病毒Ad5-GFP感染Jurkat细胞效率的流式图(A)和统计分析图(B)

Figure 2. The adenoviral infection efficiencies in Jurkat cell. A: Jurkat cells were infected with adenovectors at different MOIs for 6 h. GFP expression was analyzed 48 h post-transduction by flow cytometry. B: Results represent the mean of three independent experiments with errors bars corresponding to standard deviation. \*\*:  $P < 0.01$  vs MOI 400 group.

于细胞培养箱中继续放置不同时间段(0、20、50、110、230 min)，每个实验组(Normal culture+Ad5, Normal culture, Bafilomycin A1 treated+Ad5, Bafilomycin A1 treated)0 min的平均荧光强度设为100%，测定不同时间点胞内体中平均荧光强度与0 min平均荧光强度比值的变化情况。如图5所示，对于Normal culture+Ad5实验组，发现在(10+20) min时出现了明显的下降(仅为51%)，而此

度设为100%，测定不同时间点胞内体中平均荧光强度与0 min平均荧光强度比值的变化情况。如图5所示，对于Normal culture+Ad5实验组，发现在(10+20) min时出现了明显的下降(仅为51%)，而此

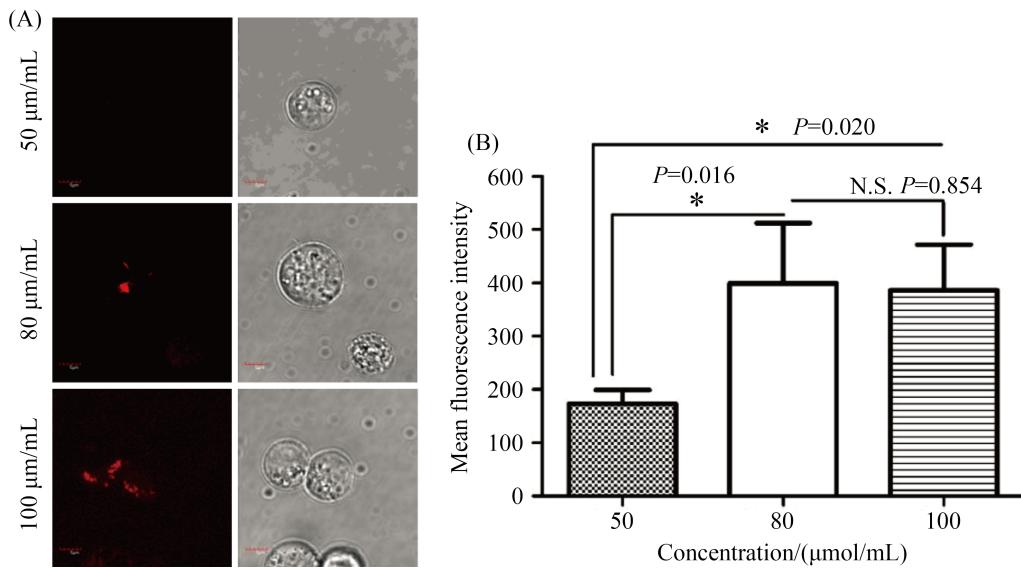


图 3. 激光共聚焦显微镜观察不同 pHrodo dextran 浓度下胞内红色荧光(A)和平均荧光强度值的统计分析(B)

Figure 3. The mean fluorescence intensity value at different pHrodo dextran concentration. A: Jurkat cells were incubated with Ad5-GFP and various concentrations of pHrodo Red dextran for 15 minutes. Cells were washed and resuspended in ice-cold PBS, then analyzed immediately by laser scanning confocal microscopy. B: In each experimental group, 30 cells were randomly selected and ten endosomes were randomly selected from the red fluorescence regions in each cell. The mean fluorescence intensity (MFI) were determined. The data are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments. \*:  $P<0.05$ .

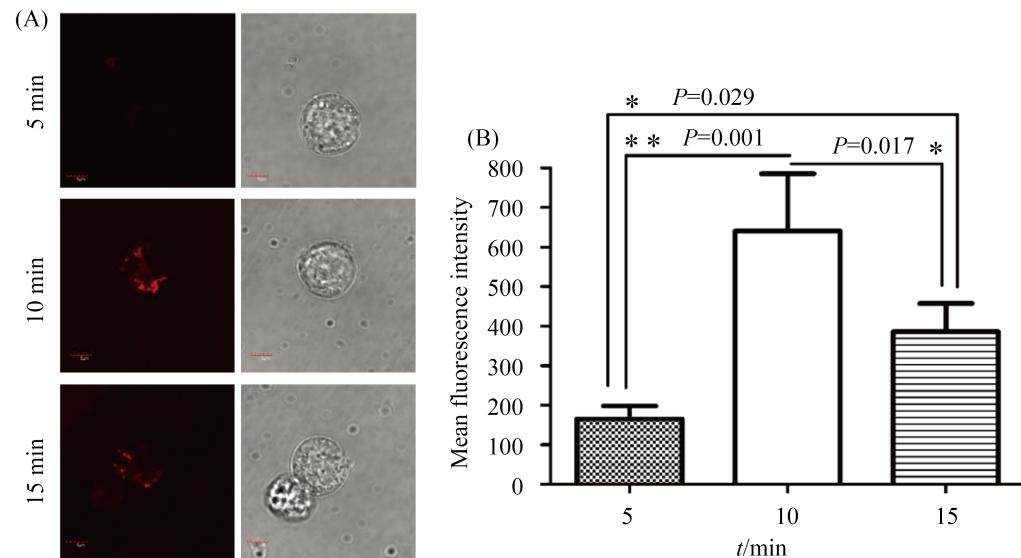


图 4. 激光共聚焦显微镜观察孵育不同时间后胞内的红色荧光(A)和平均荧光强度值的统计分析(B)

Figure 4. The mean fluorescence intensity value with different incubation time. A: Jurkat cells were incubated with Ad5-GFP and 80 μg/mL pHrodo Red dextran for different durations. Cells were washed and resuspended in ice-cold PBS, then analyzed immediately by laser scanning confocal microscopy. B: In each experimental group, 30 cells were randomly selected and ten endosomes were randomly selected from the red fluorescence regions in each cell. The mean fluorescence intensity (MFI) were determined. The data are presented as the mean $\pm$ standard deviation of three experiments. \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ .

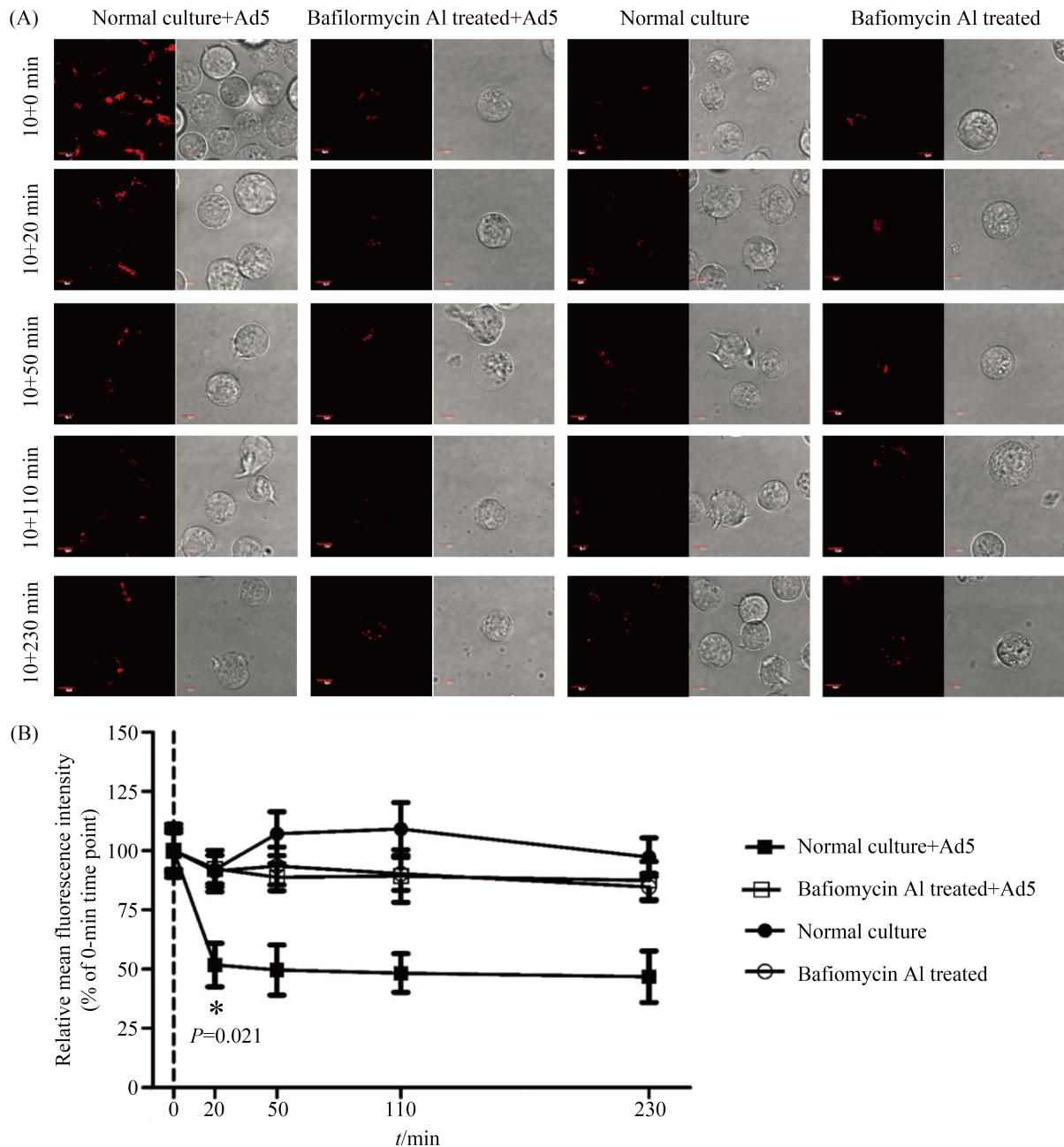


图 5. 共聚焦显微镜观察不同时间点的胞内红色荧光(A)和相对平均荧光强度百分比随时间变化的统计分析图(B)

Figure 5. The changes in the ratio of mean fluorescence intensity as a function of time. A: Jurkat cells were cultured in the absence or presence of 10 nmol/L bafilomycin A1 for 36 h followed by the addition of pHrodo Red dextran. Cells were cultured with or without Ad5-GFP and incubated at 37 °C for 10 min. The cells were washed with ice-cold PBS. Nextly, cells were incubated for different durations (0, 20, 50, 110 and 230 min) and red fluorescence was observed by laser scanning confocal microscopy. B: In each experimental group, 30 cells were randomly selected and ten endosomes were randomly selected from the red fluorescence regions in each cell. The mean fluorescence intensity at 0 min was recorded as 100%, and changes in the relative fluorescence intensity at other time points were examined. The data are presented as the mean±standard deviation of three experiments. \*:  $P<0.05$ .

后随着时间的增加, 荧光强度的比值并未出现显著性变化; 在未加入病毒的对照组中, 荧光强度比值基本较稳定, 没有出现显著性变化。由此推断在病毒感染细胞后的10–30 min之间病毒诱导了胞内体的裂解, 在病毒感染细胞后的30 min时胞内体裂解已基本完成。以往研究表明胞内体中的酸性环境是病毒衣壳蛋白解聚并诱导胞内体裂解的前提, 抑制胞内体中H<sup>+</sup>泵的活性可以显著抑制病毒裂解胞内体<sup>[16]</sup>。在本实验中, 我们采用H<sup>+</sup>泵特异性抑制剂巴佛洛酶素A<sub>1</sub>(Bafilomycin A<sub>1</sub>)预先处理细胞36 h, 然后再用病毒感染, 并测量每个时间点平均荧光强度比值的变化。如图5-B所示, 在(10+20) min时荧光比值仍为92%, 仅出现了轻微下降; 这表明, 经特异性抑制剂抑制H<sup>+</sup>泵活性后, 改变了胞内体中酸性环境, 从而导致病毒裂解胞内体能力下降。

### 3 讨论

当前基于TCR基因修饰的T细胞治疗在人类肿瘤的治疗中有着重要的应用<sup>[17]</sup>。Ad5因其遗传背景清晰、不整合宿主细胞染色体等优点而成为TCR基因治疗中的重要载体。Ad5成功裂解胞内体膜后进入细胞质, 是Ad5胞内运输途径中的一个关键环节, 也是影响Ad5感染T淋巴细胞效率的一个重要因素。另外, Drouin等证实Ad5的胞内运输途径与靶细胞的类型有关, 与HEK293、SupB15和U266细胞不同, Ad5感染B细胞后主要存在于晚期胞内体中<sup>[18]</sup>。B细胞与T细胞同属于具有重要功能的免疫细胞, 有关Ad5诱导T细胞胞内体膜裂解的研究具有重要意义。目前分析Ad5裂解胞内体膜能力的研究手段有限, 主要通过基于同位素标记的sarcin assay。本实验中选取T淋巴瘤细胞为靶细胞, 探索基于pH值敏感性荧光染料pHrodo分析Ad5裂解T细胞胞内体膜的方法。

在sarcin assay中, sarcin作为1种核糖体活性

抑制蛋白, 与病毒同时加入到靶细胞中, 其可被胞吞/胞饮进入胞内体, 最终伴随病毒裂解胞内体膜而进入到细胞质中; 对细胞质中蛋白质合成抑制效果的检测而反映病毒裂解胞内体膜的能力。本文中的实验思路与之有相似之处, 将仅在酸性环境中被激发的荧光染料pHrodo dextran与病毒同时加入到T细胞中, pHrodo dextran经胞吞/胞饮而进入胞内体, 在病毒裂解胞内体膜后进入细胞质(此时失去被激发出荧光的能力), 通过检测不同时间点相对平均荧光强度百分比的变化来反映病毒裂解胞内体膜的能力。两种方法都是间接反映病毒裂解胞内体膜能力, 都属于半定量的检测方法。

目前主要有2个方面是腺病毒裂解T细胞胞内体膜研究的热点: (1)研究T细胞在经不同的处理前后, 对于Ad5裂解T细胞胞内体膜能力的影响。研究发现T细胞经细胞因子、抗体刺激活化后, 可显著提高腺病毒的感染效率<sup>[19–20]</sup>。但是其详细的机制尚不清楚, 分析该活化对腺病毒裂解胞内体膜这一环节的影响, 有助于促进基于基因修饰的T细胞治疗在临床上的应用。此类研究中有个特殊的情况, 处理后能够改变胞内体膜上质子泵的活性, 即能改变胞内体中pH值, 例如本实验中使用的质子泵活性抑制剂Bafilomycin A<sub>1</sub>。因pHrodo被激发出的荧光强度与所处环境中pH值有关, 我们在文中使用了相对平均荧光强度百分比, 即不同实验组在每个时间点的平均荧光强度除以0时间点的平均荧光强度, 这样可以消除不同实验组中因胞内体中pH值差异而带来的影响。(2)研究Ad5衣壳蛋白中部分氨基酸修饰(例如磷酸化、泛素化、乙酰化)对于Ad5裂解T细胞胞内体膜能力的改变<sup>[21–22]</sup>。衣壳蛋白修饰对于病毒胞内运输途径的影响是目前分子病毒学领域的研究热点, 我们在本研究中基于pHrodo dextran分析Ad5裂解胞内体膜的探索, 可以为腺病毒在T细胞中的胞内运输途径研究奠定良好基础。

总之，本文探索了基于pHrodo dextran分析Ad5裂解T细胞胞内体的可行性，避免了同位素标记与检测的分析过程，可为腺病毒感染T淋巴细胞的分子机制研究奠定基础，并有助于推动基于基因修饰T细胞免疫疗法的临床应用。

## 参考文献

- [1] June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(6): 1466–1476.
- [2] Uckert W, Schumacher TNM. TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009, 58(5): 809–822.
- [3] June CH, Blazar BR, Riley JL. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(10): 704–716.
- [4] Leopold PL, Crystal RG. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(8): 810–821.
- [5] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(2): 121–132.
- [6] Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 759–803.
- [7] Martinez R, Schellenberger P, Vasishtan D, Aknin C, Austin S, Dacheux D, Rayne F, Siebert A, Ruzsics Z, Gruenewald K, Wodrich H. The amphipathic helix of adenovirus capsid protein VI contributes to penton release and postentry sorting. *Journal of Virology*, 2015, 89(4): 2121–2135.
- [8] Maier O, Marvin SA, Wodrich H, Campbell EM, Wiethoff CM. Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10821–10828.
- [9] Hall K, Blair Zajdel ME, Blair GE. Unity and diversity in the human adenoviruses exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochemical Journal*, 2010, 431(3): 321–336.
- [10] Nicklin SA, Wu E, Nemerow GR, Baker AH. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Molecular Therapy*, 2005, 12(3): 384–393.
- [11] Evans TA, Barkauskas DS, Myers JT, Hare EG, You JQ, Ransohoff RM, Huang AY, Silver J. High-resolution intravital imaging reveals that blood-derived macrophages but not resident microglia facilitate secondary axonal dieback in traumatic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 2014, 254: 109–120.
- [12] McKnight NC, Zhong Y, Wold MS, Gong SC, Phillips GR, Dou ZX, Zhao YX, Heintz N, Zong WX, Yue ZY. Beclin 1 is required for neuron viability and regulates endosome pathways via the UVRAg-VPS34 complex. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004626.
- [13] Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. Efficient gene transfer into human CD34<sup>+</sup> cells by a retargeted adenovirus vector. *Journal of Virology*, 2000, 74(6): 2567–2583.
- [14] Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 1993, 75(3): 477–486.
- [15] Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *The EMBO Journal*, 1996, 15(8): 1766–1777.
- [16] Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Human Gene Therapy*, 1998, 9(3): 367–378.
- [17] Ngo MC, Rooney CM, Howard JM, Heslop HE. Ex vivo gene transfer for improved adoptive immunotherapy of cancer. *Human Molecular Genetics*, 2011, 20(R1): R93–R99.
- [18] Drouin M, Cayer MP, Jung D. Adenovirus 5 and chimeric adenovirus 5/F35 employ distinct B-lymphocyte intracellular trafficking routes that are independent of their cognate cell surface receptor. *Virology*, 2010, 401(2): 305–313.
- [19] Schroers R, Hildebrandt Y, Hasenkamp J, Glass B, Lieber A, Wulf G, Piesche M. Gene transfer into human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors. *Experimental Hematology*, 2004, 32(6): 536–546.
- [20] Huang S, Endo RI, Nemerow GR. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Virology*, 1995, 69(4): 2257–2263.
- [21] Wodrich H, Henaff D, Jammart B, Segura-Morales C, Seelmeir S, Coux O, Ruzsics Z, Wiethoff CM, Kremer EJ. A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(3): e1000808.
- [22] Marvin SA, Wiethoff CM. Emerging roles for ubiquitin in adenovirus cell entry. *Biology of the Cell*, 2012, 104(3): 188–198.

# A novel assay for analysis of adenovirus-mediated endosome lysis of T lymphocytes

Wenfeng Zhang<sup>1#\*</sup>, Zhuanghua Li<sup>2#</sup>, Jingtang Chen<sup>2#</sup>, Hongwei Shao<sup>1</sup>, Yecheng Chen<sup>1</sup>, Shulin Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

<sup>2</sup> Dongguan People's Hospital, Dongguan 523059, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] To analyze adenovirus-mediated endosome lysis of T cells, we developed a novel approach based on pHrodo dextran (pH-sensitive fluorescent dye). [Methods] After incubating Jurkat cells (T cell leukemia) with serotype 5 adenovirus (Ad5) and pHrodo dextran, we determined the optimal incubation time and concentration of pHrodo dextran. To assess viral lysis of the endosome, we monitored the ratio changes of mean fluorescence intensity in different time points by laser scanning confocal microscopy. [Results] After incubating Jurkat cells with Ad5 and 80 µg/mL pHrodo dextran for 10 minutes, we observed the fluorescence intensity was significantly reduced at 30 minutes compared with that of endosomes at 0 minute. However, we found the mean fluorescence intensity was only slightly reduced by inhibiting V-ATPase with the bafilomycin A<sub>1</sub> treatment. [Conclusion] The method based on pH-sensitive dye can be used to analyze the adenovirus-mediated endosome lysis of T cells.

**Keywords:** adenovirus, endosome, intracellular trafficking, T lymphocytes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400149, 31300737), by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A020212462) and by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313586)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-39352201; E-mail: zwfsnowdream@126.com

#These authors contributed equally to this work.

Received: 14 March 2016; Revised: 11 April 2016; Published online: 19 April 2016