

综述

腺病毒感染及胞内运输途径的研究进展

张文峰^{1,2}, 邵红伟^{1,2}, 贺华^{1,2}, 黄树林^{1,2}

1 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

2 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

张文峰, 邵红伟, 贺华, 等. 腺病毒感染及胞内运输途径的研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(6): 864-874.

Zhang WF, Shao HW, He H, et al. Progress in infection pathway and intracellular trafficking of adenovirus. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 864-874.

摘要: 目前关于腺病毒感染及胞内运输的分子机制研究主要来源于 C 亚群腺病毒在肿瘤细胞系中的研究成果。腺病毒对靶细胞的感染及胞内运输大致分为几步: 病毒与细胞表面受体的特异结合, 胞吞介导的病毒内化, 病毒逃脱胞内体进入细胞质, 病毒沿着微管运输至核孔, 病毒基因组入核。病毒胞内运输效率极高, 感染后 1 h, 80% 以上的病毒基因组被送至核内。但是腺病毒胞内的运输方式会因以下几个因素变化而产生差异: 靶细胞类型, 细胞生理状态, 病毒血清型。文中对腺病毒感染靶细胞及胞内运输的已有分子机制进行综述, 为临床基因治疗用途的病毒载体研发提供思路。

关键词: 腺病毒, 胞吞, 胞内运输, 病毒受体, 细胞生理状态

Progress in infection pathway and intracellular trafficking of adenovirus

Wenfeng Zhang^{1,2}, Hongwei Shao^{1,2}, Hua He^{1,2}, and Shulin Huang^{1,2}

1 School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidate, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: The research on intracellular trafficking of adenovirus has been described mainly through observations of

Received: November 26, 2013; **Accepted:** December 30, 2013

Supported by: National Major Projects of Science and Technology of China (No. 2009ZX09103-708), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31100664, 31300737, 81303292), Science and Technology Research Project of Dongguan City (No. 2011105102027).

Corresponding author: Shulin Huang. Tel/Fax: +86-20-39352201; E-mail: shulhuang@sina.com

科技部“重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划项目 (No. 2009ZX09103-708), 国家自然科学基金 (Nos. 31100664, 31300737, 81303292), 东莞市科技计划项目 (No. 2011105102027) 资助。

subgroup C adenoviruses in transformed cell lines. The basic elements of the trafficking pathway include binding to receptors at the cell surface, internalization by endocytosis, lysis of the endosomal membrane, escape to the cytosol, intracellular trafficking along microtubules, nuclear pore docking, and viral genome translocation into the nucleus. More than 80% of the adenovirus genome is delivered to the nucleus in a highly efficient manner in approximately 1 h. However, exceptions to this trafficking pattern have been noted, including: variations based on target cell type, cell physiology, and adenovirus serotype. This review summarizes mechanism of adenovirus infection pathway and intracellular trafficking, providing a foundation for the development of clinical adenoviral vector.

Keywords: adenoviruses, endocytosis, intracellular trafficking, viral receptors, cell physiology

腺病毒是一种没有包膜包被、直径为70–90 nm的病毒颗粒,线性双链DNA分子被衣壳蛋白(Capsid)包裹,衣壳呈规则的二十面体结构,纤毛(Fiber)从衣壳表面的五联体蛋白基底(Penton base)伸出,中间部分为杆区(Shaft),并在顶端形成头节(Knob),腺病毒颗粒的外观形态示意图见图1。自从上世纪50年代分离发现以来,腺病毒因具有遗传背景清晰,病毒滴度高,低致病性,不整合宿主细胞染色体,体内能转染分裂与非分裂细胞等优点,已成为疾病基因治疗的临床试验中广泛使用的病毒载体。近年来,关于腺病毒针对不同人类靶细胞的感染及胞内运输机制的研究受到广泛关注,因其具有如下几个重要应用:为探讨其他人类

病毒的感染及致病机制提供有益参考;为临床用途的高效、低毒、低免疫反应的腺病毒载体研发奠定基础;为抗病毒药物研发提供有效的药物靶点。

目前已发现100余个血清型,其中人腺病毒有49种,分为A、B、C、D、E和F6个亚群(Subgroup)。2型及5型腺病毒在血清学分类上均属C亚群,目前有关病毒在胞内运输的机制研究主要以2型及5型腺病毒为基础,本文对目前有关腺病毒感染人类靶细胞及胞内运输机制的研究进展进行综述,希望为腺病毒胞内运输的基础研究及临床用途的病毒载体、抗病毒药物的研发提供一定参考。

1 腺病毒感染及胞内运输的经典途径

腺病毒感染及胞内运输的经典途径大体分为结合、进入、逃脱、运输、核内运送等五部分(图2)。

1.1 结合(Binding)

腺病毒与细胞表面受体的结合开启病毒胞内运输的第一步。C亚群腺病毒与细胞表面受体结合分为两步,即腺病毒纤毛头节与柯萨奇受体(Coxsackie and Adenovirus Receptor, CAR)的高亲和力结合,以及随后腺病毒五联体蛋白

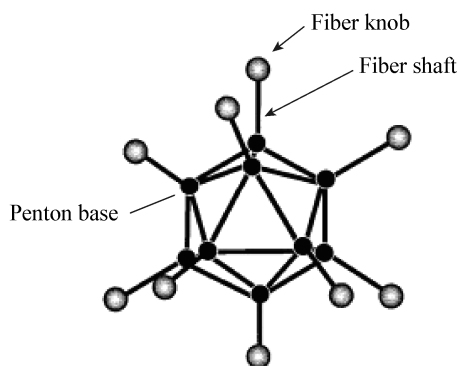


图1 腺病毒结构示意图^[1]

Fig. 1 Schematic diagram of adenoviral virion^[1].

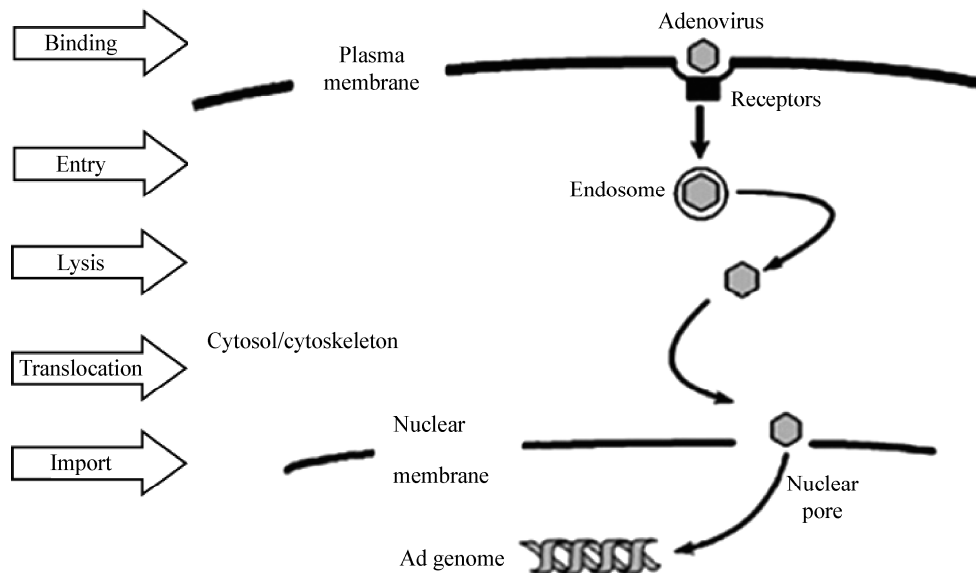


图 2 C 亚群腺病毒感染肿瘤细胞株的经典途径^[2]

Fig. 2 The classical adenovirus infection pathway based on infection of an immortalized tissue culture cell by adenovirus subgroup C^[2].

基底 RGD (Arginine-glycine-aspartate) 结构域与细胞表面诸如 $\alpha V\beta 3\alpha$ 、 $V\beta 5$ 、 $\alpha M\beta 2$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 等整合素的低亲和力结合^[3-6]。有报道发现病毒衣壳蛋白与细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白多糖存在较弱亲和力, 推测这种结合发生在病毒失去与 CAR、整合素等表面受体结合的情况下, 或者在病毒从胞内体逃脱进入胞质的过程中^[7]。

1.2 进入 (Entry)

当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。此时网格蛋白 (Clathrin) 聚集在膜下的一侧, 形成质膜凹陷即网格蛋白包被小窝 (Clathrin coated pit), dynamin 蛋白 (一种小分子 GTP 结合蛋白) 在深陷包被小窝的颈部组装成环, dynamin 蛋白水解 GTP 引起颈部收缩, 最终脱离质膜形成网格蛋白包被小泡。网格蛋白可脱离包被小泡返回质膜附近重复利

用, 脱包被的囊泡与胞内体 (Endosome) 融合, 病毒随即进入胞内体; 此时病毒与细胞受体分离, 细胞受体返回质膜再循环^[8-9]。利用抑制剂阻断网格蛋白介导的胞吞过程, 是目前研究病毒内化 (Internalization) 机制的重要手段。dynamin 蛋白第 44 位的赖氨酸突变为丙氨酸后, 将诱导温度依赖的胞吞抑制, 腺病毒进入细胞受到抑制^[10]。也有研究表明破坏细胞膜的胆固醇后, 网格蛋白介导的病毒胞吞被抑制, 提示胆固醇在病毒胞吞过程中发挥一定作用。胆固醇加强膜脂双层的稳定性, 增加膜脂有序性并降低其流动性, 推测细胞膜的流动性对胞吞有影响, 但其具体机制有待进一步研究^[11]。

1.3 逃脱 (Escape)

腺病毒在胞内体中的停留非常短暂, 以往实验发现腺病毒在胞内体中停留的时间仅为

3–5 min 之间^[12-15]。正常生理情况下,胞内体膜上 ATP 驱动的质子泵将 H^+ 泵进胞内体腔中,维持 pH 值在 6 左右。当腺病毒进入胞内体后,腔内的 pH 值降到 5 以下,从而引起胞内体膜的裂解,病毒逃离胞内体进入到细胞质中^[8-9]。低 pH 值对病毒逃离胞内体的过程非常重要,抑制胞内体质子化的药物将导致病毒滞留胞内体中,并引起腺病毒介导外源基因表达水平下降^[16]。同时胞内体膜的裂解过程也需要病毒粒子自身的参与,例如病毒五联体蛋白基底与胞内体膜的紧密结合,病毒 L3/p23 蛋白酶的活性,以及病毒纤毛蛋白的特性都将影响胞内体膜的裂解^[13,15,17-20]。

1.4 移位 (Translocation)

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向靠近细胞核的微管组织中心移动^[21-24]。目前研究的最清楚的是病毒与一种分子马达 dynein 蛋白的结合,dynein 既能与腺病毒结合又能与微管结合,其利用水解 ATP 产生的能量,携带病毒沿微管正极端向负极端运动,抑制 dynein 蛋白沿微管的移动将会阻碍病毒进入细胞核^[25]。

1.5 核内运送 (Nuclear import)

病毒沿着微管运动到达微管组织中心后将停泊在核孔附近,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^[2]。5 型腺病毒感染经去细胞核处理的 A549 细胞,病毒仍能沿微管向微管组织中心移动,最终停留在微管组织中心处^[26],有关病毒离开微管组织中心到达核孔的具体细节有待进一步研究。目前与病毒衣壳蛋白相互作用的几种核蛋白已经被发现,它们之间存在很强、很稳定的相互结合^[26-28]。

核孔蛋白 CAN/Nup214 是已证实与腺病毒衣壳蛋白结合的一种重要蛋白^[29],另外还有 3 种重要的蛋白被发现: Hsc70^[30]、核转运蛋白 CRM1^[31] 以及组蛋白 (Histone proteins)^[29]。Hsc70 属于分子伴侣蛋白,可能在病毒衣壳蛋白的解聚过程中发挥作用,从而实现包裹在衣壳蛋白内的病毒基因组入核。最让人不解的是组蛋白的参与, Trotman 等发现组蛋白 H1 能够结合 2 型腺病毒衣壳,组蛋白 H1 抗体注射细胞后能明显抑制腺病毒基因组向核内的转运^[29],有关组蛋白参与的具体分子机制并不十分清楚。

2 腺病毒胞内运输途径差异的影响因素

2.1 腺病毒血清型

不同亚群的腺病毒在胞内运输途径存在明显差异^[32]。目前 C 亚群 (血清型 2 和 5) 和 B 亚群 (血清型 3,7,9,35) 腺病毒的胞内运输途径研究的比较清楚。C 亚群病毒识别的细胞受体为柯萨奇受体, B 亚群病毒识别 CD46 分子^[33-40]。相对 C 亚群病毒, B 亚群病毒需要在更低 pH 值条件下才能引起膜的裂解,因此 C 亚群病毒在进入胞内体后即发生胞内体膜裂解而进入胞质,而 B 亚群病毒只有进入 pH 值更低的溶酶体才能发生膜的裂解,这可能是 B 亚群腺病毒胞内运输需经历溶酶体滞留, C 亚群病毒无此过程而直接向核孔转运的原因^[41-43]。此外,相对 C 亚群病毒, B 亚群病毒与核孔的相互作用较弱,这可能与 B 亚群病毒 hexon 衣壳蛋白缺失与组蛋白 H1 相互作用的结构域有关^[29]。

当把 C 亚群病毒纤毛替换为 B 亚群病毒纤毛,此种嵌合病毒 (例如 Ad5F35) 感染细胞后也呈现出溶酶体滞留的现象,此种嵌合病毒胞内运输途径的改变仅取决于纤毛的头节,表明

病毒纤毛在病毒逃脱至细胞质的过程中具有重要作用^[15,17]。后期研究进一步发现,纤毛替换后的部分嵌合腺病毒返回至细胞膜并释放到胞外^[42-43]。这种现象可能与病毒的细胞受体再循环有关,可能是因为病毒与细胞受体无法正常分离,病毒随细胞受体再循环至细胞膜。以上这些现象是从肿瘤细胞中得到的观察结果,至于是否依赖于靶细胞类型还需深入的研究。

2.2 靶细胞类型

目前关于腺病毒在细胞内运输途径的研究主要集中在 HeLa (宫颈癌细胞株)、A549 (肺癌细胞株) 等肿瘤细胞株。体外培养的肿瘤细胞株无法反映细胞在体内生理状态,因此已开展有关腺病毒在几种原代细胞的胞内运输研究。

2.2.1 成纤维细胞与内皮细胞

成纤维细胞与内皮细胞是目前被广泛研究的最常见原代细胞,成纤维细胞表面缺乏 CAR 的表达,内皮细胞表面 CAR 表达较低,因此 C 亚群腺病毒对该两种细胞的转染效率很低。C 亚群腺病毒在此两种细胞中运输途径彼此相似却又不同于在肿瘤细胞株中的运输方式,腺病毒在进入内皮细胞后向微管组织中心移动并聚集在此,大部分病毒未能定位在核孔上,仅有少部分病毒停留在核孔处与核膜相互作用^[44-45]。关于病毒在成纤维细胞与内皮细胞中运输方式的发现,表明病毒从胞质到细胞核的运送过程存在多种可能方式^[24,46]。

2.2.2 巨噬细胞与树突状细胞

巨噬细胞与树突状细胞表面 CAR 低水平表达,整合素分子高水平表达。与 CAR 高水平表达的细胞比较,C 亚群病毒对树突状细胞的转染效率要低 10-100 倍,对巨噬细胞的转染要低

100-1 000 倍,但是巨噬细胞与树突状细胞均可以被识别 CD46 分子的 B 亚群腺病毒感染^[47-51]。即使在巨噬细胞中过表达 CAR,病毒对其转染效率也要低于表达 CAR 的内皮细胞系,并且病毒进入细胞后绝大部分都不能达到细胞核^[47]。有 3 种推断可以解释以上实验结果:1) 病毒未能成功逃脱至细胞质,最终停留在某个细胞器中;2) 病毒成功逃脱至细胞质,但却未能沿着微管运输;3) 病毒逃脱至细胞质与沿着微管运输均顺利进行,但是被运输的目的地既不是微管组织中心也不是核孔。腺病毒衣壳蛋白能诱导机体免疫反应,巨噬细胞与树突状细胞主要功能是参与机体免疫应答,因此推测腺病毒在巨噬细胞与树突状细胞的胞内运输途径可能与免疫反应有关联^[52-54]。

2.2.3 淋巴细胞

将外源基因导入淋巴细胞,此基因修饰的淋巴细胞经体外活化后回输病人体内的细胞治疗在临床上有着重要应用,但是 T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞表面均低表达 CAR,C 亚群病毒很难实现对淋巴细胞转染,C 亚群病毒纤毛替换为 B 亚群病毒纤毛形成的嵌合腺病毒(例如 Ad5F35)对淋巴细胞的转染效率大大提高^[55-57]。目前关于腺病毒在淋巴细胞中的胞内运输研究主要集中在 B 淋巴细胞,Colin 等发现腺病毒进入 B 淋巴细胞中是采用 Caveolae 介导的胞吞,而非经典的网格蛋白介导的胞吞途径^[58]。Caveolae 是细胞表面特异性内陷结构,病毒转移到 Caveolae 后触发一系列信号转导,诱发进一步内陷、内吞小泡的形成和脱离^[59]。与网格蛋白介导的胞吞相比,Caveolae 介导的胞吞具有速度慢、形成的囊泡不发生质子化、需胆固醇存在等特点,

同时其不是组成型表达的过程,只在某种刺激下才能够发生^[60]。Daniel 等进一步发现嵌合腺病毒在 B 淋巴瘤细胞中无溶酶体聚集的现象,仅经历短暂的胞内体停留后直接向核运输;而在原代 B 细胞中,大部分病毒聚集在溶酶体,并有部分病毒进入胞内囊泡被反向运输至细胞膜附近;并且原代 B 细胞经磷酸酶抑制剂处理后,病毒经 Caveolae 介导的胞吞明显增强^[61-62]。由此看来嵌合腺病毒在 B 细胞内的运输可能存在两种以上的方式,运输方式的选择并不完全取决于纤毛头节,也依赖于靶细胞类型,这不同于以往发现的嵌合病毒在肿瘤细胞株的运输方式。我们前期的研究表明,嵌合病毒纤毛杆的长度对病毒感染人 T 淋巴细胞效率存在影响,并且转染效率受细胞新陈代谢能力影响^[63]。目前该机制仍在研究中,结合其他团队在 B 淋巴细胞中已发现的研究结果,我们推测存在以下几种可能解释:1) 嵌合病毒进入 T 淋巴细胞存在由 Caveolae 介导和网格蛋白介导的两种胞吞方式,杆的长度将影响采用何种胞吞方式的病毒比例;2) 在网格蛋白介导的病毒胞吞中,杆的长度将影响病毒裂解胞内体膜进入胞质的能力;3) 靶细胞类型的差异体现为靶细胞新陈代谢能力的差异,其会影响病毒胞吞进入细胞的方式以及病毒胞内运输的方式。

2.3 细胞生理状态

腺病毒对同种细胞的转染也因该细胞生理状态的差异而发生改变,细胞生理状态的改变主要包括细胞分裂、细胞外周微环境、腺病毒转染对细胞自身状态的影响^[64]。

细胞分裂涉及细胞内诸如细胞膜、细胞核等细胞器的重新组织分配,这种改变都会影响

病毒与细胞的相互作用。贴壁细胞分裂时细胞形态会发生变圆,细胞的粘附能力也随之改变。细胞表面 CAR 及整合素分子的表达与细胞粘附能力有关,因此细胞分裂会引起 CAR 及整合素的表达变化。在 A549 细胞中的研究结果表明,细胞处于有丝分裂期(特别是 G1 期)细胞膜上 CAR 及整合素的表达明显增高,因此导致结合细胞的病毒增加以及外源基因表达水平的提高^[65]。

细胞外可溶性蛋白因子可与细胞结合,或直接与病毒结合,都会对细胞生理状态产生显著影响。细胞因子、脂多糖等物质与细胞膜上受体结合,激活胞内某些信号通路而活化细胞,从而影响病毒在胞内运输途径。比如经细胞因子活化后的 T 淋巴细胞, B 亚群腺病毒对其转染效率明显增加^[38]。另一个例子是肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor α , TNF α)对腺病毒转染原代内皮细胞的影响。TNF α 处理细胞会导致 CAR 表达下降,从而引起腺病毒介导的外源基因表达水平下降;有趣的是经 TNF α 处理对腺病毒转染内皮细胞株没有影响^[66]。这些结果表明细胞因子引起细胞生理状态改变对病毒转染效率的影响,还与靶细胞的类型有关系。

除了与细胞受体结合影响细胞生理状态外,某些蛋白因子还可以直接与病毒衣壳蛋白结合影响病毒在胞内的运输。在病毒静脉注射小鼠的体内实验中,血清因子 VII、IX 以及补体 C4 结合蛋白均可以与病毒纤毛头节(Fiber knob)结合形成一个复合物,该复合物通过与肝细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖结合而感染肝细胞^[67-68]。另一个例子是腺病毒中和抗体对腺病毒感染细胞途径的影响。静脉注射腺病毒会引起机体产生抗腺病毒的中和抗体,中和抗体与腺病毒衣壳蛋白结合形成病毒/抗体免疫复合

物,部分复合物可以通过与表达抗体恒定区 Fc 段的细胞结合并通过胞吞进入细胞,从而开启病毒胞内运输^[69]。

病毒对靶细胞的转染会引起靶细胞生理状态的改变,这种生理状态改变会对病毒在胞内的运输产生影响。病毒与细胞受体结合后导致激活胞内 RhoA/Rac1 信号通路,微管组装能力增强,细胞骨架的稳定性增加,更有利于增强病毒沿着微管的运输,达到增强病毒转染的目的^[23,45]。

3 展望

腺病毒可看作一个穿过疏水的细胞膜与混杂黏性的细胞质,并受时间与空间多重调控且经过多层次步骤(例如结合、进入、逃脱、移位及核转运)而成功将病毒基因组投递到细胞核内的纳米级机器。在每个步骤中,腺病毒都能利用衣壳蛋白的某个组分与胞内特异蛋白的相互作用,实现细胞内正常生理过程(如胞吞、依赖于微管的物质运输)为病毒所用,这也许能为解决药物无法有效接近药物靶点的难题,实现靶向药物的高效研发提供一些思路。

腺病毒胞内运输途径的机制研究在临床用途的基因药物研发上有着重要应用。如下几个已有的研究发现可以在药物研发中提供借鉴:

1) 靶细胞特有的生理状态将会影响药物与靶细胞的相互作用,比如巨噬细胞中腺病毒的胞内运输受到抑制。2) 靶细胞生理状态的改变对药物针对靶细胞作用方式的影响,比如细胞所处细胞周期的时相,细胞是否被细胞因子活化,细胞外环境中是否存在某类血清因子均对腺病毒的转染有影响。3) 肿瘤细胞株与原代细胞的

生理差异也会对药物与靶细胞的作用带来改变,比如病毒在肿瘤细胞株中运输直达核孔,而在原代细胞中只到微管组织中心处;细胞因子处理上调原代内皮细胞表面受体的表达,相反却下调内皮细胞株表面受体的表达。

腺病毒胞内运输途径的研究是个引人入胜的复杂课题,目前已取得不少进展,但仍然有许多未知机制有待进一步发现,比如腺病毒从微管组织中心运输至核孔的分子机制是什么?调节腺病毒与微管、腺病毒与核孔之间相互作用的机制是什么?是什么原因导致大部分腺病毒在巨噬细胞与树突状细胞的运输都无法抵达细胞核?腺病毒的主要衣壳蛋白参与病毒胞内运输的具体分子机制?我们及其他研究者^[62-63]均发现嵌合病毒对淋巴细胞的转染效率与靶细胞新陈代谢能力有关,细胞新陈代谢能力是否会影响到病毒胞内运输途径,以及这种影响是否通过改变衣壳蛋白与靶细胞相互作用得以实现(比如改变纤毛与靶细胞受体的结合能力,影响病毒五联体蛋白基底裂解胞内体膜的能力,改变衣壳蛋白与核膜相互作用等)。这些问题的深入研究不仅可以丰富关于病毒感染细胞的基础理论,还可以为临床用途的高效、低毒、靶向性病毒载体研发奠定基础。

REFERENCES

- [1] Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *BBA-Gene Structure and Expression*, 2002, 1575(1/3): 1-14.
- [2] Leopold PL, Crystal RG. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Delivery Rev*, 2007, 59(8): 810-821.
- [3] Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al.

- Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science*, 1997, 275(5304): 1320–1323.
- [4] 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. *J Virol*, 1995, 69(4): 2257–2263.
- [5] Davison E, Diaz RM, Hart IR, et al. Integrin alpha 5 beta 1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin activating antibody TS2/16. *J Virol*, 1997, 71(8): 6204–6207.
- [6] Stewart PL, Chiu CY, Huang S, et al. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J*, 1997, 16(6): 1189–1198.
- [7] Dechecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, et al. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol*, 2001, 75(18): 8772–8780.
- [8] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell*, 2004, 5(2): 121–132.
- [9] Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis, *Physiol Rev*, 1997, 77(3): 759–803.
- [10] Damke H, Baba T, Warnock DE, et al. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*, 1994, 127(4): 915–934.
- [11] Imelli N, Meier O, Boucke K, et al. Cholesterol is required for endocytosis and endosomal escape of adenovirus type 2. *J Virol*, 2004, 78(6): 3089–3098.
- [12] Greber UF, Willetts M, Webster P, et al. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 1993, 75(3): 477–486.
- [13] Greber UF, Webster P, Weber J, et al. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*, 1996, 15(8): 1766–1777.
- [14] Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, et al. Fluorescent virions: dynamic tracking of adenovirus gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(3): 367–378.
- [15] Miyazawa N, Leopold PL, Hackett NR, et al. Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol*, 1999, 73(7): 6056–6065.
- [16] Prchla E, Plank C, Wagner E, et al. Virus-mediated release of endosomal content *in vitro*: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J Cell Biol*, 1995, 131(1): 111–123.
- [17] Miyazawa N, Crystal RG, Leopold PL. Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol*, 2001, 75(3): 1387–1400.
- [18] Wickham TJ, Carrion ME, Kovetski I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*, 1995, 2(10): 750–756.
- [19] Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol*, 2005, 79(4): 1992–2000.
- [20] Shayakhmetov DM, Eberly AM, Li ZY, et al. Deletion of penton RGD motifs affects the efficiency of both the internalization and the endosome escape of viral particles containing adenovirus serotype 5 or 35 fiber knobs. *J Virol*, 2005, 79(2): 1053–1061.
- [21] Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, et al. Dynein-and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(1): 151–165.
- [22] Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, et al. Microtubule-dependent plus-and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol*, 1999, 144(4): 657–672.

- [23] Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, et al. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1310–1319.
- [24] Mabit H, Nakano MY, Prank U, et al. Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol*, 2002, 76(19): 9962–9971.
- [25] Kelkar SA, Pfister KK, Crystal RG, et al. Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules. *J Virol*, 2004, 78(18): 10122–10132.
- [26] Bailey CJ, Crystal RG, Leopold PL. Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J Virol*, 2003, 77(24): 13275–13287.
- [27] Chardonnet Y, Dales S. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells: III. Relationship between an ATPase activity in nuclear envelopes and transfer of core material: a hypothesis. *Virology*, 1972, 48(2): 342–359.
- [28] Chardonnet Y, Dales S. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells: IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology*, 1973, 56(2): 465–483.
- [29] Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, et al. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(12): 1092–1100.
- [30] Saphire AC, Guan T, Schirmer EC, et al. Nuclear import of adenovirus DNA *in vitro* involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 4298–4304.
- [31] Strunze S, Trotman LC, Boucke K, et al. Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(6): 2999–3009.
- [32] Chardonnet Y, Dales S. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells: II. Comparative observations on the penetration of types 1,5,7, and 12. *Virology*, 1970, 40(3): 478–485.
- [33] Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A,C,D,E, and F. *J Virol*, 1998, 72(10): 7909–7915.
- [34] Law LK, Davidson BL. What does it take to bind CAR? *Mol Ther*, 2005, 12(4): 599–609.
- [35] Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, 2003, 9(11): 1408–1412.
- [36] Gaggar A, Shayakhmetov DM, Liszewski MK, et al. Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus. *J Virol*, 2005, 79(12): 7503–7513.
- [37] Marttila M, Persson D, Gustafsson D, et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*, 2005, 79(22): 14429–14436.
- [38] Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, et al. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol*, 2003, 77(17): 9183–9191.
- [39] Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, et al. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol*, 2004, 78(9): 4454–4462.
- [40] Tuve S, Wang H, Ware C, et al. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol*, 2006, 80(24): 12109–12120.
- [41] Defer C, Belin MT, Caillet-Boudin ML, et al. Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J Virol*, 1990, 64(8): 3661–3673.
- [42] Shayakhmetov DM, Li ZY, Ternovoi V, et al. The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J*

- Virology, 2003, 77(6): 3712–3723.
- [43] Shayakhmetov DM, Li ZY, Gaggar A, et al. Genome size and structure determine efficiency of postinternalization steps and gene transfer of capsid-modified adenovirus vectors in a cell-type-specific manner. *J Virol*, 2004, 78(18): 10009–10022.
- [44] Bailey CJ, Crystal RG, Leopold PL. Unlike most cell types, translocation of the adenovirus genome to the nucleus of endothelial cells is not associated with nuclear localization of the adenovirus capsid. *Mol Ther*, 2003, 7: S55.
- [45] Warren JC, Rutkowski A, Cassimeris L, Cassimeris L. Infection with replication-deficient adenovirus induces changes in the dynamic instability of host cell microtubules. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(8): 3557–3568.
- [46] Glotzer JB, Michou AI, Baker A, et al. Microtubule-independent motility and nuclear targeting of adenoviruses with fluorescently labeled genomes. *J Virol*, 2001, 75(5): 2421–2434.
- [47] Kaner RJ, Worgall S, Leopold PL, et al. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors *in vitro* is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20(3): 361–370.
- [48] Worgall S, Singh R, Leopold PL, et al. Selective expansion of alveolar macrophages *in vivo* by adenovirus-mediated transfer of the murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor cDNA. *Blood*, 1999, 93(2): 655–666.
- [49] Worgall S, Busch A, Rivara M, et al. Modification to the capsid of the adenovirus vector that enhances dendritic cell infection and transgene-specific cellular immune responses. *J Virol*, 2004, 78(5): 2572–2580.
- [50] Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, et al. Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol Ther*, 2003, 8(5): 813–821.
- [51] Hsu C, Boysen M, Gritton LD, et al. *In vitro* dendritic cell infection by pseudotyped adenoviral vectors does not correlate with their *in vivo* immunogenicity. *Virology*, 2005, 332(1): 1–7.
- [52] Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(12): 1157–1166.
- [53] Worgall S, Krause A, Rivara M, et al. Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1281–1289.
- [54] Gonzalez R, Vereecque R, Wickham TJ, et al. Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein. *Gene Ther*, 1999, 6(3): 314–320.
- [55] Gonzalez R, Vereecque R, Wickham TJ, et al. Transduction of bone marrow cells by the AdZ.F (pK7) modified adenovirus demonstrates preferential gene transfer in myeloma cells. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(16): 2709–2717.
- [56] Li L, Wickham TJ, Keegan AD. Efficient transduction of murine B lymphocytes and B lymphoma lines by modified adenoviral vectors: enhancement via targeting to FcR and heparan-containing proteins. *Gene Ther*, 2001, 8(12): 938–945.
- [57] Jung D, Néron S, Drouin M, et al. Efficient gene transfer into normal human B lymphocytes with the chimeric adenoviral vector Ad5/F35. *J Immunol Methods*, 2005, 304(1/2): 78–87.
- [58] Colin M, Mailly L, Rogée S, et al. Efficient species C hAdv infectivity in plasmocytic cell lines using a clathrin-independent lipid raft/caveola endocytic route. *Mol Ther*, 2005, 11(2): 225–236.
- [59] Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry

- through epithelial tight junctions. *Cell*, 2006, 124(1): 119–131.
- [60] Ceresa BP, Schmid SL. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(2): 204–210.
- [61] 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.
- [62] Samson M, Jung D. Intracellular trafficking and fate of chimeric adenovirus 5/F35 in human B lymphocytes. *J Gene Med*, 2011, 13(9): 451–461.
- [63] Zhang WF, Wu FL, Shao HW, et al. Chimeric adenoviral vector Ad5F35L containing the Ad5 natural long-shaft exhibits efficient gene transfer into human T lymphocytes. *J Virol Methods*, 2013, 194(1/2): 52–59.
- [64] Leopold PL. Cell physiology as a variable in gene transfer to endothelium. *Curr Atheroscler Rep*, 2003, 5(3): 171–177.
- [65] Seidman MA, Hogan SM, Wendland RL, et al. Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle. *Mol Ther*, 2001, 4(1): 13–21.
- [66] Vincent T, Pettersson RF, Crystal RG, et al. Cytokine-mediated downregulation of coxsackie-adenovirus receptor in endothelial cells. *J Virol*, 2004, 78(15): 8047–8058.
- [67] Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, et al. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol*, 2005, 79(12): 7478–7491.
- [68] Parker AL, Waddington SN, Nicol CG, et al. Multiple vitamin K-dependent coagulation zymo-gens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood*, 2006, 108(8): 2554–2561.
- [69] Leopold PL, Wendland RL, Vincent T, et al. Neutralized adenovirus-immune complexes can mediate effective gene transfer via a Fc receptor-dependent infection pathway. *J Virol*, 2006, 80(20): 10237–10247.

(本文责编 陈宏宇)