

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202201036



氧化应激促进重组腺相关病毒 2 型 体外转导分析

王晓¹, 黄晓平², 黎玲¹, 刘嘉¹, 刁勇¹

(1. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021;
2. 泉州师范学院 化工与材料学院, 福建 泉州 362000)

摘要: 为揭示氧化应激在重组腺相关病毒 2 型(rAAV2)转导中的作用,以过氧化氢(H_2O_2)和铁过载(Fe-NTA)氧化应激为模型,在 293T, LO-2, HeLa, A549 细胞中,从转基因表达量、阳性细胞数、基因组数和病毒衣壳分布等方面研究氧化应激对 rAAV2 转导的影响。实验结果表明: H_2O_2 和 Fe-NTA 能促进 rAAV2 转导,转基因表达量、阳性细胞数、基因组数与对照组相比的差异具有显著的统计学意义;细胞转导 12 h 后,氧化应激组核周围衣壳分布数目显著比对照组多,氧化应激能够促使 rAAV2 长时间聚集在细胞核周围;当氧化应激产生的活性氧(ROS)被 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)消除,则氧化应激促 rAAV2 转导作用消失,说明氧化应激通过 ROS 发挥促进 rAAV2 转导作用。

关键词: 重组腺相关病毒 2 型; 活性氧; 转导; 氧化应激

中图分类号: R 511.8; R 915 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2022)04-0489-09

Analysis of Oxidative Stress Promoting *In Vitro* Transduction of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2

WANG Xiao¹, HUANG Xiaoping², LI Ling¹,
LIU Jia¹, DIAO Yong¹

(1. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. College of Chemical Engineering and Materials Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

Abstract: To reveal the role of oxidative stress in the transduction of recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2), using hydrogen peroxide (H_2O_2) and iron overload (Fe-NTA) oxidative stress as models, the effect of oxidative stress on rAAV2 transduction was studied from the aspects of transgene expression, positive cell number, genome number and viral capsid distribution in 293T, LO-2, HeLa, and A549 cells. The experimental results showed that H_2O_2 and Fe-NTA could promote rAAV2 transduction, and the differences in transgene expression, positive cell number and genome number were statistically significant compared with those in the control group; after 12 h of cell transduction, the number of capsids distributed around the nucleus in the oxidative stress group was significantly higher than that in the control group. Oxidative stress could promote rAAV2 to accumulate around the nucleus for a long time; when the reactive oxygen species (ROS) produced by oxidative stress were eliminated by *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC), the effect of oxidative stress on

promoting rAAV2 transduction disappeared, indicating that oxidative stress promotes rAAV2 transduction through ROS.

Keywords: recombinant adeno-associated virus type 2; reactive oxygen species; transduction; oxidative stress

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种无包膜、单链的 DNA 病毒,需要腺病毒或单纯疱疹病毒辅助才可进行复制,AAV 基因组可以在细胞和组织中长期存在,迄今未发现 AAV 与任何人类疾病相关^[1-2]. 而重组 AAV(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体,因具有免疫原性小、宿主范围广、理化性质稳定、能长期表达外源基因等优点,被公认为是基因治疗的理想载体^[3-4]. 2017 年 12 月,以 rAAV 为载体治疗遗传性视网膜病变的基因药物 Luxturna 在美国上市,这无疑给以 rAAV 为载体的基因治疗带来了前所未有的光明^[5-7].

但在临床实验中, rAAV 也遇到表达效率低的问题,提高 rAAV 的表达效率成为基因治疗领域需解决的一个问题^[8-9]. 血清型筛选、衣壳蛋白突变和修饰、基因组改造等生物技术在提高表达效率方面取得了一定进展^[10-11]. 除了生物技术策略外,现已有多种非生物技术策略可提高 rAAV 载体表达效率,如 DNA 损伤剂(紫外线、 γ -射线、顺铂)、泛素蛋白酶体抑制剂(MG132, LnLL)、DNA 合成酶抑制剂(巴菲敌柯林、羟基脲)、DNA 拓扑异构酶抑制剂(喜树碱、依托泊苷)等^[12-14]. 这些手段可以影响 rAAV 载体在细胞质内的传递,或影响其在核内的行为,在表达效率优化方面表现出了良好的应用前景.

氧化应激会造成生物膜不饱和脂肪酸过氧化、DNA 损伤等,而 DNA 损伤剂已证实可促进 rAAV 转导,但氧化应激促进 rAAV 转导的机制目前尚未研究清楚. 在细胞中,过氧化氢(H_2O_2)的初始产物通常认为是活性氧(ROS)或超氧阴离子, H_2O_2 也被认为是活性氧中间体(ROI)介导的细胞损伤的关键物质. H_2O_2 产物羟基自由基($HO\cdot$)可以氧化 DNA、蛋白质和膜脂质,导致细胞损伤. 本文以重组腺相关病毒 2 型(rAAV2)为材料,研究 H_2O_2 和铁过载(Fe-NTA)处理前、后,细胞中 rAAV2 转基因表达量、阳性细胞数和基因组数目的变化,从 ROS 角度揭示氧化应激促进 rAAV2 转导的分子机制.

1 材料与方法

1.1 材料

聚乙烯亚胺(PEI, 美国 Polysciences 公司);蛋白罗丹明标记试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);超氧化物阴离子荧光探针(Dihydroethidium, 美国 Invitrogen 公司);硝酸铁($Fe(NO_3)_3$)、次氮基三乙酸(NTA)、 H_2O_2 (美国 Amresco 公司);DMEM 培养基、1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);核酸酶 Benzonase(德国 Merk 公司);DNeasy Blood & Tissue 试剂盒(德国 QIAGEN 公司);Sybr Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司).

1.2 rAAV2 载体的制备

参照本实验室的 rAAV 制备方法^[15-16]:待 293T 细胞密度达到 85%时,将三质粒与 PEI 按照质量比为 1 : 3 进行混合后共转染 293T 细胞,转染 72 h 后收获细胞,裂解并用 Benzonase 处理;氯化铯密度梯度离心分离、透析和浓缩制备符合实验要求的 rAAV2 载体;最后,进行实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)分析.

1.3 rAAV2 载体的标记

参考文献[17]的方法,利用蛋白罗丹明标记试剂盒对 rAAV2 进行四甲基罗丹明(TAMRA)的荧光标记,并用于共聚焦成像. 将物质的量比为 1 : 5 000 的 rAAV2 载体和 mono-NHS-TAMRA 分子在室温下孵育 45 min,然后通过 SpinOUT GT-600 型色谱柱去除未结合的染料,再利用 qPCR 对 rAAV2 进行定量分析. H_2O_2 刺激 Hela 细胞 12 h 后, TAMRA-rAAV2 以感染复数(MOI)为 1 : 2 000 转导 Hela 细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次;采用质量浓度为 $0.04\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 次,再用双蒸水洗涤;最后,用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)进行复染,利用 Zeiss LSM 710 型激光共聚焦显微镜分析 TAMRA-rAAV2 病毒载体的亚细胞定位.

1.4 转导实验

按照每孔 1×10^5 个将细胞接种至 24 孔板,根据设置的时间在转导前进行氧化应激,随后用表达荧

光素酶(Gaussia luciferase,Gluc)或绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)转基因的 rAAV2 进行转导,转导后利用 IncuCyte 实时动态细胞成像分析系统检测阳性细胞数、荧光强度或取上清测定 Gluc 的表达量.

1.5 rAAV2 基因组提取和 qPCR 定量

rAAV2 转导细胞 12 h 后,通过胰蛋白酶消化收集细胞,利用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒收集总 DNA,采用 qPCR 方法分析 rAAV2 基因组数目,按照文献[18]的方法进行病毒基因组定量. 以 GFP (正向引物,5'-GAGCGCACCATCTTCTTCAA-3';反向引物,5'-TCCTTGAAGTCGATGCCCTT-3')、Gluc (正向引物,5'-AATGCCCCGAAAGCTGGCTG-3';反向引物,5'-CGATGAACTGCTCCATGGGC-3')、人 β 肌动蛋白 (正向引物,5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3;反向引物,5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3')为引物,以 Sybr Green Master Mix 为染料进行 qPCR 反应,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$,2 min,之后按 95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;60 $^{\circ}\text{C}$,10 s;72 $^{\circ}\text{C}$,10 s 循环 40 次.

1.6 H₂O₂ 应激模型

以每孔 4.0×10^3 个细胞接种于 96 孔板,细胞贴壁后,加入终浓度分别为 25,50,100,200,400,800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H₂O₂,按照设定的时间进行 rAAV2 转导,利用 IncuCyte 实时动态细胞成像分析系统监测细胞中绿色荧光表达情况,统计分析阳性细胞数和荧光强度.

1.7 Fe-NTA 应激模型

参照文献[19]的方法,取 20 mL 100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Fe(NO₃)₃ 溶液与 20 mL 300 mmol L^{-1} NTA 溶液混合,用 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠溶液调节至 pH=7.4,定容至 100 mL,配成 20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fe-NTA 母液. 以每孔 4.0×10^3 个细胞接种于 96 孔板,细胞贴壁后,加入终浓度分别为 12.5,25.0,50.0,100.0,200.0,400.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fe-NTA 溶液,按照设定的时间和 MOI 进行 rAAV2 转导,利用 IncuCyte 实时动态细胞成像分析系统监测细胞中绿色荧光表达情况,统计分析阳性细胞数和荧光强度.

1.8 细胞内 ROS 检测

细胞经过氧化应激和转导处理后,去除培养液,用 PBS 冲洗 2 遍;然后,加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 超氧化物阴离子荧光探针(Dihydroethidium,DHE)工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,用 PBS 清洗 2 遍;荧光显微镜观察拍照,利用 Image-Pro Plus 软件进行荧光强度分析.

1.9 数据统计

所有数据用平均值 \pm 标准偏差($\bar{x}\pm s$)表示,结果采用 SPSS 统计学分析,* $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义,* * $P<0.01$ 表示差异极具统计学意义.

2 实验结果与分析

2.1 H₂O₂ 和 Fe-NTA 对细胞活力的影响

氧化应激对细胞活力的影响,如图 1 所示. 图 1 中: c 为浓度; η 为细胞活力.

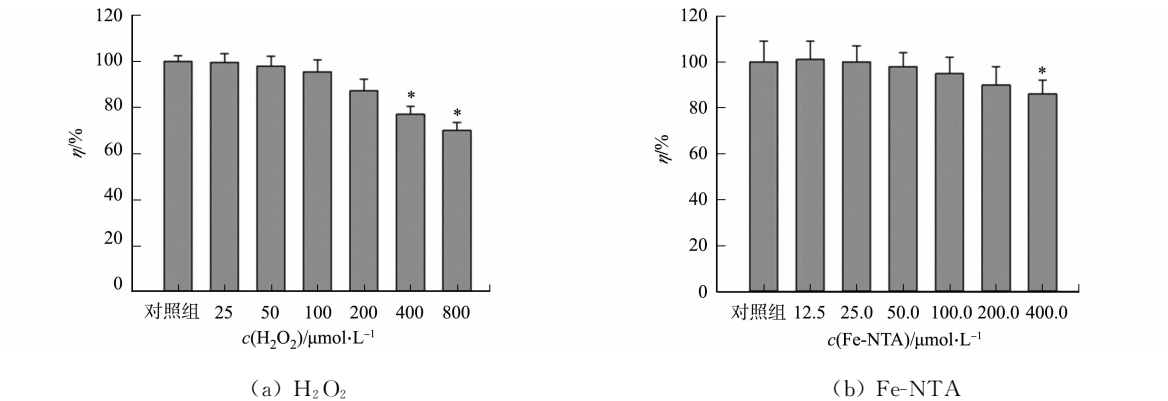


图 1 氧化应激对细胞活力的影响
Fig.1 Effect of oxidative stress on cell viability

由图 1(a)可知:当加入的 H₂O₂ 浓度 $c(\text{H}_2\text{O}_2)=400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力为 $(86.3\pm4.3)\%$,与

对照组相比,差异具有统计学意义;当 $c(\text{H}_2\text{O}_2)=800\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力为 $(65.7\pm3.9)\%$,与对照组相比,差异具有统计学意义;而当 $c(\text{H}_2\text{O}_2)=200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力为 $(93.6\pm3.9)\%$,与对照组相比,差异无统计学意义。

由图 1(b)可知:当 $c(\text{Fe-NTA})=400.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力为 $(84.6\pm4.6)\%$,与对照组相比,差异具有统计学意义;而 $c(\text{Fe-NTA})=200.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力为 $(92.9\pm5.4)\%$,与对照组相比,差异无统计学意义。

2.2 H_2O_2 促进 rAA2 转导

不同细胞中添加 H_2O_2 对 rAAV2 转基因表达的影响,如图 2 所示.图 2 中: N_1 为不同 H_2O_2 浓度处理组 rAAV2 转基因表达量与对照组 rAAV2 转基因表达量的比值.由图 2 可知: H_2O_2 能够促进 rAAV2 转基因在 293T 细胞中表达,随着 H_2O_2 浓度的增高,Gluc 的表达量增大,与对照组相比,差异具有统计学意义. $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Gluc 的表达量是对照组的 1.4 倍; $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Gluc 的表达量是对照组的 2.5 倍; $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Gluc 的表达量是对照组的 3.6 倍(图 2(a)).在 LO-2, Hela, A549 细胞中, H_2O_2 均能促进 rAAV 转基因的表达,与对照组相比,差异具有统计学意义(图 2(b)~(d)).

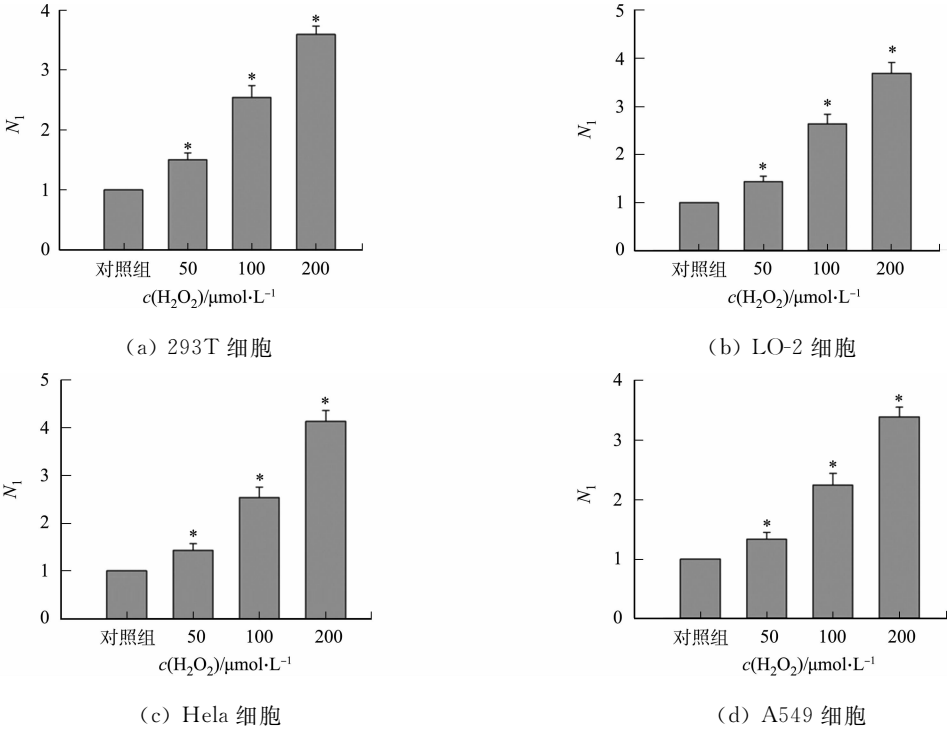
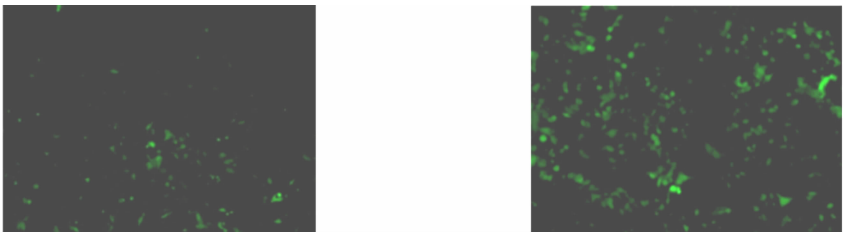


图 2 不同细胞中添加 H_2O_2 对 rAAV2 转基因表达的影响

Fig. 2 Effects of adding H_2O_2 in different cells on rAAV2 transgene expression

不同 H_2O_2 浓度对 rAAV2 转导的影响,如图 3 所示.图 3 中: n 为 GFP 阳性表达细胞数; N_2 为不同 H_2O_2 浓度处理组病毒基因组数与对照组病毒基因组数的比值.图 3(a)~(e)为 GFP 阳性表达细胞及其数量的统计结果.由图 3(e)可知: H_2O_2 处理组阳性表达细胞数与对照组相比差异具有统计学意义;当 H_2O_2 浓度分别为 $50, 100, 200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其阳性表达细胞数分别为 $(183\pm16), (248\pm22), (421\pm25)$ 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$. rAAV 转导细胞 12 h 后提取基因组的结果,如图 3(f)所示.由图 3(f)可知: H_2O_2



(a) 对照组

(b) $c(\text{H}_2\text{O}_2)=50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

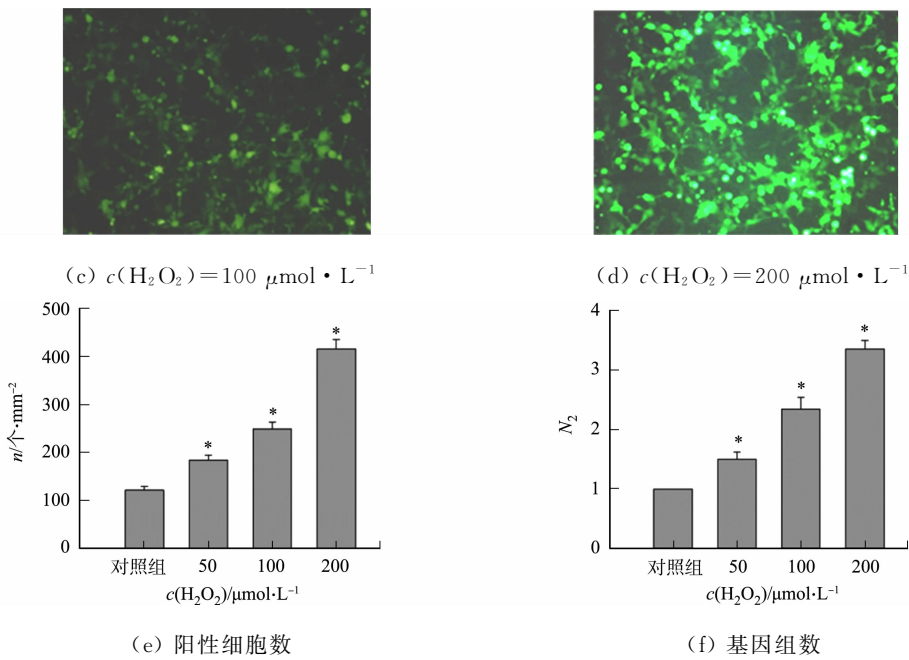


图 3 不同 H_2O_2 浓度对 rAAV2 转导的影响

Fig. 3 Effects of different H_2O_2 concentrations on rAAV2 transduction

氧化应激处理组的基因组数明显比对照组多;浓度为 $50, 100, 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理组的基因组数分别是对照组的 $(1.55 \pm 0.21), (2.33 \pm 0.25), (3.28 \pm 0.25)$ 倍。

2.3 Fe-NTA 氧化应激促进 rAAV2 转导

不同细胞中添加 Fe-NTA 对 rAAV2 转基因表达的影响,如图 4 所示.图 4 中: N_3 为不同 Fe-NTA 浓度处理组 rAAV2 转基因表达量与对照组 rAAV2 转基因表达量的比值。

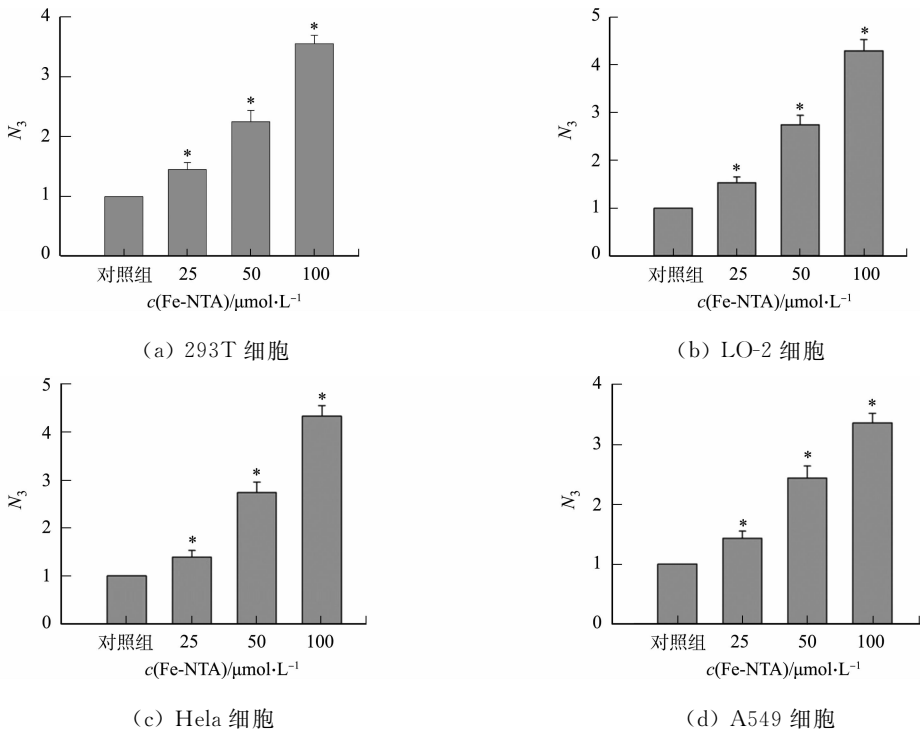


图 4 不同细胞添加 Fe-NTA 对 rAAV2 转基因表达的影响

Fig. 4 Effects of adding Fe-NTA in different cells on rAAV2 transgene expression

由图 4 可知:在 293T 细胞中, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 能促进 Gluc 表达,其表达量是对照组的 1.5 倍, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 促进 Gluc 表达量是对照组的 2.3 倍, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 促进 Gluc 表达量是对照组的 3.6 倍,与对照组相比,差异具有统计学意义;在 LO-2, HeLa, A549 细胞中,Fe-NTA 氧

化应激同样能促进 rAAV2 转基因表达。

不同 Fe-NTA 浓度对 rAAV2 转导的影响,如图 5 所示. 图 5 中: N_4 为不同 Fe-NTA 浓度处理组病毒基因组数与对照组病毒基因组数的比值. 由图 5(a)~(e)可知:在 Fe-NTA 氧化模型中,25,50,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 处理组的 GFP 阳性细胞数分别为 (178 ± 14) , (288 ± 24) , (428 ± 28) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$,与对照组相比,差异均具有统计学意义. 经 Fe-NTA 处理后,提取细胞中 rAAV2 基因组进行定量分析,结果如图 5(f)所示. 由图 5(f)可知:25,50,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 处理组的病毒基因组数目分别是对照组的 (1.45 ± 0.19) , (2.45 ± 0.23) , (3.29 ± 0.31) 倍.

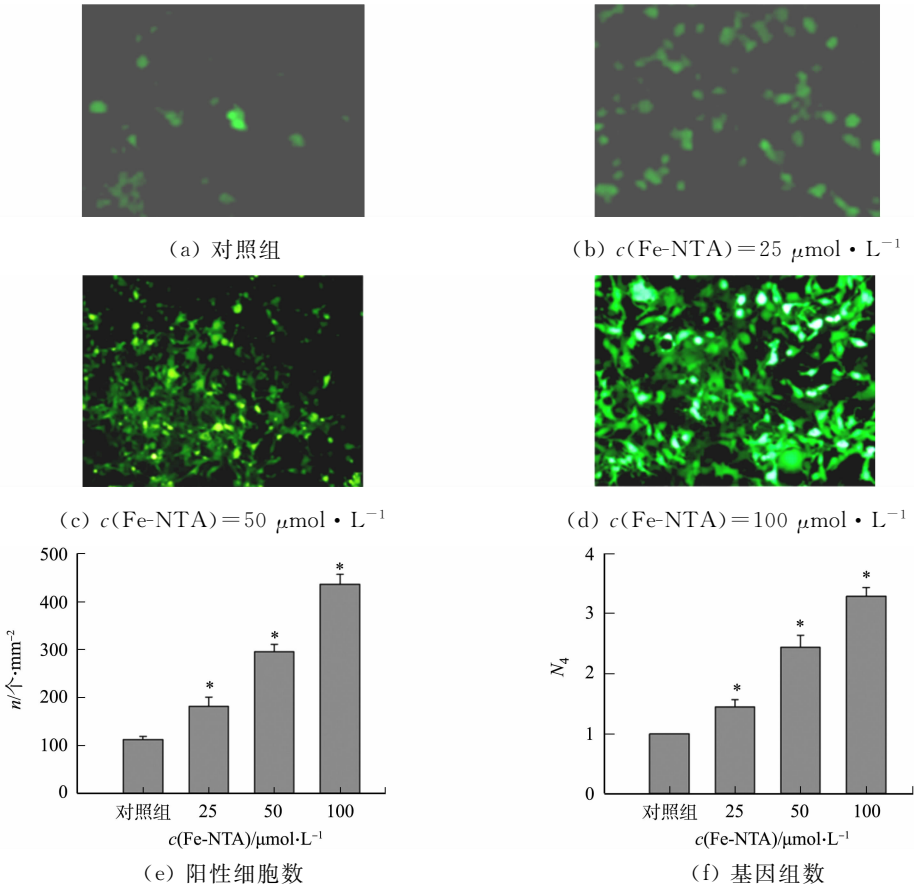


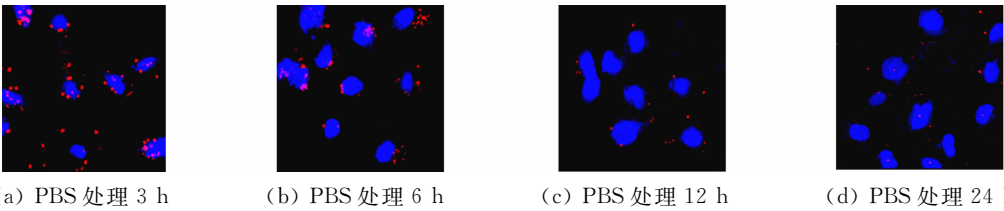
图 5 不同 Fe-NTA 浓度对 rAAV2 转导的影响

Fig. 5 Effects of different Fe-NTA concentrations on rAAV2 transduction

2.4 ROS 促使 rAAV2 在细胞中的积累

有研究表明,rAAV2 首先转运至核周区域的微管上,然后一部分 rAAV2 颗粒进入细胞核,在细胞核内脱壳^[18,20-21]. 利用荧光标记的 rAAV2(TAMRA-rAAV2)结合共聚焦显微镜的方法,对 rAAV2 在氧化应激细胞中的运输及分布进行分析. 不同处理组 TAMRA-rAAV2 的亚细胞定位,如图 6 所示.

由图 6 可知:在转导后 3 h,对照组和 H_2O_2 处理组的 TAMRA-rAAV2 在细胞内的定位差异非常小(图 6(a),(e));然而,转导后 6 h,对照组细胞核周围有一些 TAMRA-rAAV2 载体聚集(图 6(b)),但 H_2O_2 处理的细胞中 TAMRA-rAAV2 载体在核周的积累量更多(图 6(f));转导后 12 h,对照组 TAMRA-rAAV2 载体急剧减少(图 6(c)),而 H_2O_2 处理组 TAMRA-rAAV2 载体聚集在核孔附近(图 6(g));转导后 24 h,这种作用更加明显,对照组的细胞中几乎没有残留 TAMRA-rAAV2 病毒载体(图 6



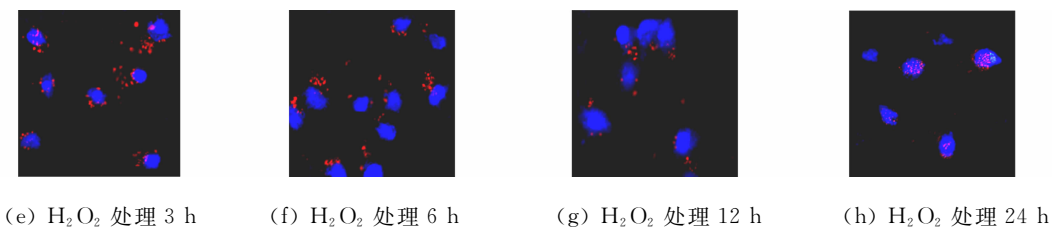


图 6 不同处理组 TAMRA-rAAV2 的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of TAMRA-rAAV2 in different treatment groups

(d)), 而 H_2O_2 处理的细胞中仍然有 TAMRA-rAAV2 载体在核周区域聚集(图 6(h)). 这些数据表明, H_2O_2 可防止转导过程中细胞内 rAAV2 的损失.

氧化应激过程会产生大量的 ROS, ROS 被认为是氧化应激对细胞产生损伤的主要物质, 而 ROS 是否是促进 rAAV2 转导的主要物质还需进一步验证. 不同 Fe-NTA 浓度对 ROS 产生的影响, 如图 7 所示. 图 7 中: RLU 为相对光单位. 由图 7 可知: Fe-NTA 处理后的细胞都会在细胞内形成 ROS, 而且随着 Fe-NTA 浓度的增大, 荧光强度增高, 细胞中 ROS 水平增高.

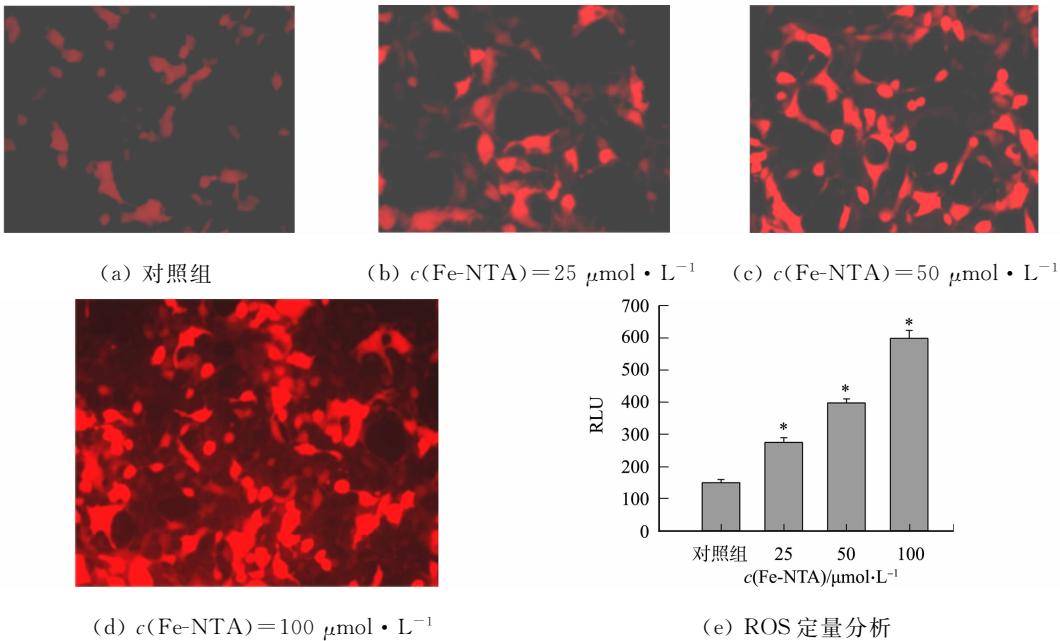
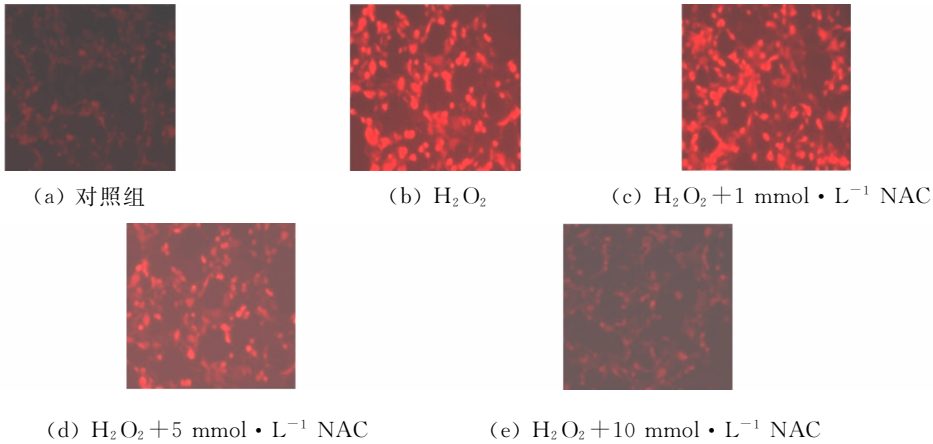


图 7 不同 Fe-NTA 浓度对 ROS 产生的影响

Fig. 7 Effects of different Fe-NTA concentrations on ROS production

用 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)清除细胞内 ROS, 考察 ROS 是否介导 rAAV2 转导, 结果如图 8 所示. 由图 8 可知: H_2O_2 诱导生成的 ROS 随着 NAC 浓度的增大而逐渐减少, 其中, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAC 处理后细胞内的 ROS 水平与对照组相比, 差异无统计学意义; 而阳性细胞数目和 GFP 表达量也随着



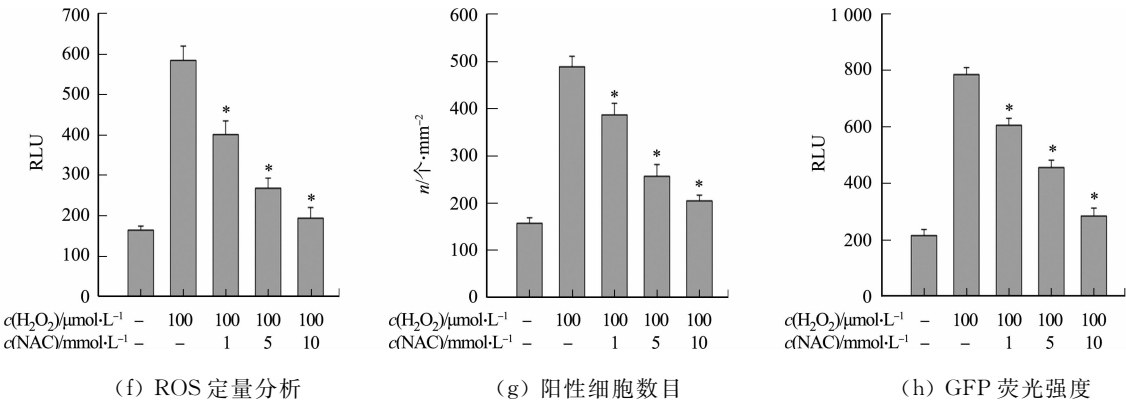


图 8 ROS 对 rAAV2 转导的影响

Fig. 8 Effect of ROS on rAAV2 transduction

NAC 浓度的增大而逐渐减少. 结果表明, H_2O_2 通过 ROS 的形成介导促进 rAAV2 转导, 减少 rAAV2 在细胞运输过程中的损失, 从而促进了 rAAV2 的转导.

3 结论

研究 H_2O_2 和 Fe-NTA 两种氧化应激对 rAAV2 体外转导的影响, 实验结果显示, 氧化应激能够促进 rAAV2 转导, 在 293T, LO-2, Hela 和 A549 细胞中, 其表达 GFP 细胞数、Gluc 表达量、病毒基因组数等与对照组相比, 差异均具有统计学意义; H_2O_2 处理后, rAAV2 在胞质内明显增多, 且长时间聚集在核周围; 当氧化应激产生的 ROS 被 NAC 清除时, H_2O_2 促进 rAAV 转导作用明显减弱, 说明 ROS 是 H_2O_2 促进 rAAV 转导的主要物质.

rAAV2 进入细胞后首先被网格蛋白包裹进入细胞, 形成早期内含体、晚期内含体、蛋白酶体, 最终进入细胞核, 脱壳、单链合成双链^[14]. 氧化应激能够激活细胞中的 p53, NF- κ B, JNK/NF- κ B 等信号通路, 电离辐射、紫外线激活 NF- κ B, 激活的 NF- κ B 能够增强与 DNA 结合力和激活蛋白磷酸酶/激酶途径, 促进 rAAV2 的转导, 而 NAC 在电离辐射和紫外线暴露后能阻止 NF- κ B 的活化, 对 rAAV2 转导无明显作用^[22], 电离辐射产生的 ROS 可能是促进 rAAV2 转导的主要因素. 实验进一步证实, ROS 越多, 则促转导能力越强, ROS 促使 rAAV2 在细胞核周围聚集的时间越长, 说明 ROS 在 rAAV2 转导过程可以防止 rAAV2 被清除.

研究证实, H_2O_2 和 Fe-NTA 氧化应激模型可促进 rAAV2 转导, 促进转基因的表达、增加细胞中病毒基因组数目等, 氧化应激产生的 ROS 可延长 rAAV2 在细胞核周聚集, 延缓 rAAV2 的降解, 揭示了氧化应激促使 rAAV2 转导的机制, 为体外提高 rAAV2 转导提供方法.

参考文献:

[1] APONTE-UBILLUS J J, BARAJAS D, PELTIER J, *et al.* Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 1045-1054. DOI: 10. 1007/ s00253-017-8670-1.

[2] RABINOWITZ J, CHAN Yikai, SAMULSKI R J. Adeno-associated virus (AAV) versus immune response[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 102. DOI: 10. 3390/ v11020102.

[3] BLANC F, MONDAIN M, BEMELMANS A P, *et al.* rAAV-mediated cochlear gene therapy: Prospects and challenges for clinical application[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9: 589. DOI: 10. 3390/ jcm9020589.

[4] 刁勇, 邱飞, 肖卫东. 重组腺相关病毒包装容量研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(1): 97-102. DOI: 10. 13523/ j. cb. 20120114.

[5] PRADO D A, ACOSTA-ACERO M, MALDONADO R S. Gene therapy beyond luxturna: A new horizon of the treatment for inherited retinal disease[J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2020, 31(3): 147-154. DOI: 10. 1097/ ICU. 0000000000000660.

[6] DARROW J J. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy[J]. *Drug Discovery Today*,

- 2019,24(4):949-954. DOI:10.1016/j.drudis.2019.01.019.
- [7] MAGUIRE A M,RUSSELL S,WELLMAN J A,*et al.* Efficacy, safety, and durability of voretigene neparvovec-rzyl in RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophy: Results of phase 1 and 3 trials[J]. *Ophthalmology*, 2019,126(9):1273-1285. DOI:10.1016/j.ophtha.2019.06.017.
- [8] 张国海,曾淑兰,许瑞安. 在降低 rAAV 基因药物免疫反应中减少载体剂量并保持高效表达和药效的实施策略[J]. *药学学报*,2013,48(3):305-314. DOI:10.16438/j.0513-4870.2013.03.010.
- [9] 刁勇,许瑞安. 重组腺相关病毒载体诱导的天然免疫反应及机制[J]. *微生物学报*,2012,52(5):550-557. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2012.05.002.
- [10] MARKUSIC D M,HERZOG R W,ASLANIDI G V,*et al.* High-efficiency transduction and correction of murine hemophilia B using AAV2 vectors devoid of multiple surface-exposed tyrosines[J]. *Molecular Therapy*,2010,18(12):2048-2056. DOI:10.1038/mt.2010.172.
- [11] WANG Jinhui,FAUST S M,RABINOWITZ J E. The next step in gene delivery: Molecular engineering of adeno-associated virus serotypes[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*,2011,50:793-802. DOI:10.1016/j.yjmcc.2010.10.017.
- [12] MITCHELL A M,LI Chengwen,SAMULSKI R J. Arsenic trioxide stabilizes accumulations of adeno-associated virus virions at the perinuclear region, increasing transduction *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Virology*,2013,87(8):4571-4583. DOI:10.1128/JVI.03443-12.
- [13] SCHULTZ B R,CHAMBERLAIN J S. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration[J]. *Molecular Therapy*,2008,16(7):1189-1199. DOI:10.1038/mt.2008.103.
- [14] ZHONG Li,ZHAO Weihong,WU Jianqing,*et al.* A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis[J]. *Molecular Therapy*,2007,15(7):1323-1330. DOI:10.1038/sj.mt.6300170.
- [15] DIAO Yong,MA Jian,XIAO Weidong,*et al.* Inhibition of angiogenesis and HCT-116 xenograft tumor growth in mice by kallistatin[J]. *World Journal of Gastroenterology*,2007,13(34):4615-4619. DOI:10.3748/wjg.v13.i34.4615.
- [16] XU Ruian,HARRISON P M,CHEN Miao,*et al.* Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis[J]. *Molecular Therapy*,2006,13(6):1093-1100. DOI:10.1016/j.ymthe.2005.11.027.
- [17] XIAO Pengjie,LI Chengwen,NEUMANN A,*et al.* Quantitative 3D tracing of gene-delivery viral vectors in human cells and animal tissues[J]. *Molecular Therapy*,2012,20(2):317-328. DOI:10.1038/mt.2011.250.
- [18] JOHNSON J S,SAMULSKI R J. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus[J]. *Journal of Virology*,2009,83(6):2632-2644. DOI:10.1128/JVI.02309-08.
- [19] 黄晓平,王晓,谢晓兰,等. Kallistatin 通过 Akt-eNOS 信号通路对肝星状细胞氧化损伤的保护作用[J]. *药学学报*,2017,52(9):1397-1403. DOI:10.16438/j.0513-4870.2017-0199.
- [20] SANLIOGLU S,BENSON P K,YANG Jusan,*et al.* Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation[J]. *Journal of Virology*,2000,74(19):9184-9196. DOI:10.1128/jvi.74.19.9184-9196.2000.
- [21] XIAO Pingjie,SAMULSKI R J. Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network[J]. *Journal of Virology*,2012,86(19):10462-10473. DOI:10.1128/JVI.00935-12.
- [22] SANLIOGLU S,ENGELHARDT J F. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways[J]. *Gene Therapy*,1999,6(8):1427-1437. DOI:10.1038/sj.gt.3300967.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)