

重组腺相关病毒对NK92细胞的转导条件优化

沈晓丽^{1#}, 周群刚^{2#}, 郑然², 沈湘君², 邱香^{2*}, 李泰明^{1**}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; ²苏州市红十字中心血站, 苏州 215005)

摘要 为提高重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)对NK92细胞的转导效率, 对转导细胞密度、培养基中IL-2浓度、rAAV血清型和用量进行优化; 此外, 用不同浓度的促进剂(ZnCl₂、氯喹、聚乙烯醇和金雀异黄酮)溶液处理细胞, 以进一步提高病毒转导效率。结果表明, 在细胞密度为 5×10^5 时, 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达效率相对较高; 当培养基中IL-2的浓度为1 000 IU/mL时, NK92的细胞生长状态最适合病毒转导; 不同血清型rAAV对NK92细胞的转导效率由高到低依次为rAAV6、rAAV2和rAAV9; 用金雀异黄酮预处理NK92细胞, 能够显著提高病毒转导效率, 而其他促进剂的添加对病毒转导效率无显著影响。通过上述条件的优化, 显著提高了rAAV对NK92细胞的转导效率, 为rAAV载体介导工程化NK92细胞奠定基础。

关键词 NK92细胞; 腺相关病毒; 转导效率

中图分类号 Q819 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)01-0115-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20221109001

引用本文 沈晓丽, 周群刚, 郑然, 等. 重组腺相关病毒对NK92细胞的转导条件优化[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 115–121.

Cite this article as: SHEN Xiaoli, ZHOU Qungang, ZHENG Ran, et al. Optimization of transduction conditions of recombinant adeno-associated virus into NK92 cells[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 115–121.

Optimization of transduction conditions of recombinant adeno-associated virus into NK92 cells

SHEN Xiaoli^{1#}, ZHOU Qungang^{2#}, ZHENG Ran², SHEN Xiangjun², QIU Xiang^{2*}, LI Taiming^{1**}

¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²Suzhou Blood Center, Suzhou 215005, China

Abstract To improve the transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus (rAAV) in NK92 cells, the number of cells, concentration of IL-2 in the medium, and serotype and dosage of rAAV were explored to optimize cell state and viral transfection conditions. Then, zinc chloride (ZnCl₂), chloroquine, polyvinyl alcohol (PVA) and genistein with different concentration were added separately during transfection to further improve the viral transduction efficiency. The results showed that, at cell number of 5×10^5 , the expression efficiency of enhanced green fluorescent protein (EGFP) was relatively high. When the IL-2 concentration was 1 000 IU/mL, NK92 cells were most suitable for virus transfection. The transduction efficiency of different serotypes of rAAV in NK92 cells was rAAV6, rAAV2 and rAAV9 in descending order. Pretreatment of NK92 cells with genistein could significantly increase the viral transduction efficiency, while the addition of other reagents had no significant effect. Through the optimization of the above conditions, the transduction efficiency of rAAV to NK92 cells could be significantly improved, which provided evidence for functional genetic modification of NK92 cells by rAAV.

Key words NK92 cells; adeno-associated virus; transduction efficiency

收稿日期 2022-11-09 *通信作者 Tel: 13962647493 E-mail: 751981405@qq.com

**Tel: 13815864379 E-mail: taimingli@163.com。

基金项目 苏州市卫生科技项目(No. GWZX201903)

[#]沈晓丽与周群刚为共同第一作者

This study was supported by Suzhou Municipal Science and Technology Program (No. GWZX201903)

*SHEN Xiaoli and ZHOU Qungang contributed equally to this work

肿瘤是威胁全世界人口生命安全的主要原因之一,通过增强人体免疫系统功能的肿瘤免疫治疗已逐渐成为治疗肿瘤的一种有效手段^[1]。过继免疫治疗将具有杀伤作用的免疫细胞在体外培养并加工修饰后再回输患者体内用以攻击消除肿瘤,在肿瘤免疫疗法中备受瞩目^[2];比如嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的T细胞CAR-T疗法在血液瘤的治疗中已取得显著的成效。CAR-NK相比于CAR-T疗法具有一定的优势,如自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)不依赖主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),可直接快速靶向并杀死肿瘤细胞,NK细胞仅分泌少量γ-干扰素和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,不产生诱发细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)的白细胞介素-1和白细胞介素-6,且NK细胞来源丰富^[3]。NK92作为一种稳定的自然杀伤细胞系,在白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)存在的条件下,能在体外进行大规模的培养,且经过CAR修饰的NK92细胞能够显示出更强的抗肿瘤效应,其异体细胞治疗的安全性和临床活性也在恶性肿瘤患者的早期临床试验中得到证实^[4-5]。

重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体由于其无致病性、低免疫原性、可高效地将基因递送至分裂和非分裂细胞等优势,已成为基因治疗领域中最具前景的基因载体^[6-7]。基于rAAV的治疗产品Glybera、Luxturna和Zolgensma分别于2012年、2017年和2019年获得欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局批准用于治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症、Leber先天性黑蒙和脊髓性肌萎缩症。目前在ClinicalTrials.gov注册的rAAV基因治疗临床试验有290项。然而,rAAV用于工程化NK细胞的研究报道很少,而且通常是用来为基因编辑提供供体DNA。Naeimi Kararoud等^[8]用Cas9核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)联合rAAV供体,将CD33特异性CAR基因插入到原代NK细胞的基因组中。然而,rAAV对免疫细胞的低转导效率限制了其在工程化免疫

细胞中的应用^[9]。本课题组前期的研究发现,通过提高rAAV对原代T细胞的转导效率,利用rAAV瞬时转导制备CAR-T细胞,在体外和体内均有显著的杀肿瘤效应^[10]。本课题以此为依据,通过优化培养基IL-2浓度、细胞密度、病毒血清型和用量,以及添加氯化锌(ZnCl₂)、氯喹、聚乙烯醇(PVA)和金雀异黄酮(genistein)试剂等方式,以提高rAAV对NK92细胞的转导效率,为rAAV载体在CAR-NK细胞治疗中的应用奠定基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

青霉素-链霉素溶液(100×)、金雀异黄酮、α-MEM培养基(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清、马血清、叶酸、肌醇(美国Thermo Fisher公司);β-巯基乙醇、氯喹、PVA(美国Sigma-Aldrich公司);重组IL-2(上海近岸科技有限公司);ZnCl₂(中国国药集团化学试剂有限公司);磷酸盐缓冲液、二甲基亚砜(上海索宝生物科技有限公司)。

1.2 仪器

倒置荧光显微镜、光学显微镜(德国Zeiss公司);流式细胞分析仪(美国BD公司);7500 real time PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 细胞与病毒

NK92细胞株由苏州阿思科力生物科技有限公司赠予;3种血清型携带增强型绿色荧光蛋白基因的重组腺相关病毒(rAAV2-EGFP、rAAV6-EGFP和rAAV2-EGFP)均由苏州吉脉基因药物生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 NK92细胞培养与病毒转导

α-MEM完全培养基(50 mL):在50 mL离心管中加入胎牛血清6.25 mL、马血清6.25 mL、青霉素-链霉素溶液(100×)0.5 mL、α-MEM培养基37 mL,再添加终浓度为0.02 mmol/L的叶酸、0.1 mmol/L的β-巯基乙醇、0.2 mmol/L的肌醇以及1 000 IU/mL的IL-2,充分混匀后使用。

取对数生长期的 NK92 细胞, 离心并计数, 将一定数量的 NK92 细胞接种于 96 孔板中, 将指定用量的 rAAV-EGFP 加入细胞中, 补充 α -MEM 完全培养基至总体积为 200 μL , 轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养。第 2 天, 将转导的细胞转移至 48 孔板中, 补充 α -MEM 完全培养基 800 μL , 继续培养。每组 3 个复孔, 设置阴性对照。72 h 后, 用荧光显微镜观察绿色荧光细胞并成像。将每孔细胞分别移至 1.5 mL 离心管中, 1 300 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 PBS 500 μL 洗涤细胞, 再次离心, 用 PBS 500 μL 重悬细胞, 并移入流式细胞管中, 用流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞比例及平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

2.2 病毒转导条件的优化

2.2.1 细胞密度 将 NK92 细胞按每孔 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 5×10^5 个细胞的密度分别接种于 96 孔板中, rAAV6-EGFP 病毒感染复数 (MOI, 病毒与细胞的数量比) 为 5×10^4 , 病毒转导及流式细胞仪检测方法同“2.1”项。

2.2.2 病毒血清型 将 NK92 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 将 rAAV2-EGFP、rAAV6-EGFP、rAAV9-EGFP 3 种血清型病毒分别转导 NK92 细胞, MOI 为 5×10^4 , 病毒转导及流式细胞仪检测方法同“2.1”项。

2.2.3 病毒用量 NK92 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 将 rAAV2-EGFP、rAAV6-EGFP 和 rAAV9-EGFP 3 种血清型病毒, 分别转导细胞, MOI 分别以 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 , 病毒转导及流式细胞仪检测方法同“2.1”项。

2.2.4 培养基中 IL-2 浓度 分别配制含有 IL-2 终浓度为 0、200、500、1 000、2 000 IU/mL 的 α -MEM 完全培养基, 培养 NK92 细胞 3 d 后, 按每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔板中, rAAV6-EGFP 病毒 MOI 为 5×10^4 , 病毒转导及流式细胞仪检测方法同“2.1”项。此外, 为了分析 IL-2 浓度对 NK92 细胞生长的影响, 分别于培养的第 0、3、9、12 天进行细胞计数, 绘制生长曲线。

2.3 促进剂对转导效率的影响

为进一步提高 rAAV 对 NK92 细胞的转导效率, 本研究尝试使用了已证明可以提高 rAAV 转导细胞效率的 4 种试剂 (ZnCl_2 、氯喹、聚乙烯醇和金

雀异黄酮), 检测不同促进剂对转导效率的影响。基于“2.2”项病毒转导条件的优化结果, 此小节实验条件固定为: NK92 细胞的密度为每孔 5×10^5 个细胞, 选择转导效率最高的 rAAV6-EGFP, 转导 MOI 为 5×10^3 , IL-2 终浓度为 1 000 IU/mL, 病毒转导方法同“2.1”项, 转导 72 h 后用流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞比例及 MFI。促进剂的具体处理方法如下。

2.3.1 氯化锌 按上述条件先进行常规病毒转导, 病毒加入细胞 1 h 后, 分别加入 2.5、10、20、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZnCl_2 溶液, 继续培养。

2.3.2 氯喹 NK92 细胞中分别加入终浓度为 5、20、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的氯喹溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h 后离心重悬细胞, 接种至 96 孔板中, 进行病毒转导。

2.3.3 聚乙烯醇 (PVA) 将终浓度为 5、10、30、60 mg/mL 的 PVA 分别与病毒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 2 h, 再将处理过的病毒加入到细胞中。

2.3.4 金雀异黄酮 将 NK92 细胞置于 1.5 mL 离心管中, 分别加入终浓度为 75、125、175、225 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的金雀异黄酮溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中共孵育 1 h 后离心重悬细胞, 接种至 96 孔板中, 进行病毒转导。

3 结 果

3.1 细胞密度对转导效率的影响

实验采用相同 MOI 的 rAAV6-EGFP 转导不同细胞密度的 NK92 细胞, 在培养 72 h 后通过流式细胞仪检测, 结果如图 1 所示: 平均荧光强度 (MFI) 随着 NK92 细胞密度的增加而提高, 在细胞密度为每孔 5×10^5 个细胞时, EGFP 阳性细胞的比例最高, 且平均荧光强度也最大。为了使病毒悬液和悬浮细胞充分接触, 研究中使用 96 孔板进行病毒感染, 而过高的细胞密度不利于细胞生长, 因此, 没有将细胞密度进一步增加, 选择每孔 5×10^5 个细胞作为后续病毒感染的细胞密度。

3.2 rAAV 血清型对转导效率的影响

3 种血清型的 rAAV-EGFP 以相同剂量转导 NK92 细胞, 72 h 后, 倒置荧光显微镜下观察显示: rAAV2-EGFP 和 rAAV6-EGFP 转导组可以观察到明显的绿色荧光细胞, 而 rAAV9-EGFP 组绿色荧光细胞相对较少 (图 2-A)。流式检测分析结果与荧光显微镜观察结果一致: rAAV6-EGFP 转导 NK92 细胞, 荧光细胞比例最高, 达到 60.2%, 平均荧光

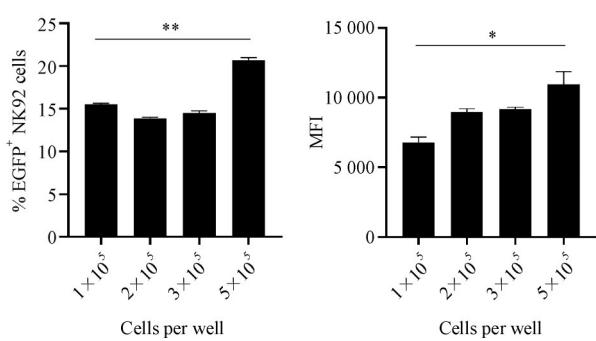
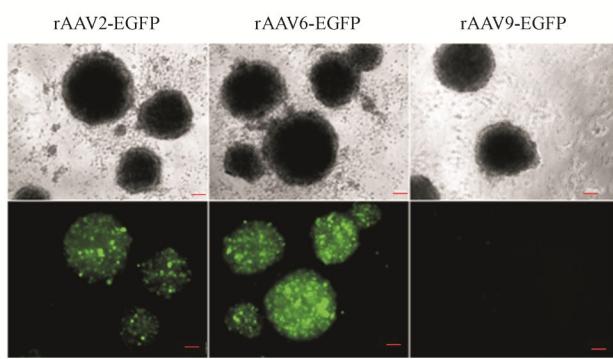


Figure 1 Transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus (rAAV) in NK92 cells at different cell densities detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

MFI: Mean fluorescence intensity

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A



B

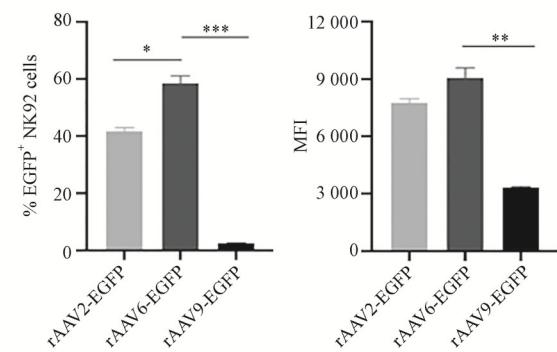


Figure 2 Transduction efficiency of rAAV-EGFP of different serotypes in NK92 cells

A: Observation of rAAV-transduced NK92 cells by inverted fluorescence microscope (100×; bar = 100 μm); B: Proportion of EGFP positive cells and MFI detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.4 IL-2浓度对转导效率的影响

固定细胞密度及病毒接种剂量,仅改变培养基体系中IL-2浓度,在转导72 h后用流式细胞仪检测分析,结果表明随着IL-2浓度的增加,EGFP阳性细胞比例及平均荧光强度也随之增加;但当IL-2浓度过高时(2 000 IU/mL),转导效率及MFI反而会下降(图4)。通过细胞计数及光学显微镜观察研究了不同IL-2浓度对NK92细胞增殖的影响,结果显示当培养基中不添加IL-2时,NK92细胞不会发生聚团和增殖;而当提高IL-2浓度时会提高NK92细胞的增殖速率,IL-2浓度为1 000和2 000 IU/mL时,细胞增殖速率没有显著性差异(图5)。

3.5 促进剂对转导效率的影响

如图6所示,加入ZnCl₂溶液未能提高rAAV6-EGFP对NK92细胞的转导效率,并且随着浓度的

强度也最高;其次为rAAV2-EGFP,荧光细胞比例为42.1%;而rAAV9-EGFP转导NK92细胞后,荧光细胞比例及平均荧光强度明显低于前两种血清型,荧光细胞比例仅为2%(图2-B)。

3.3 病毒用量对转导效率的影响

将rAAV2-EGFP、rAAV6-EGFP、rAAV9-EGFP 3种血清型的rAAV,分别以MOI 1 × 10⁴、5 × 10⁴、1 × 10⁵、3 × 10⁵转导NK92细胞,72 h后,通过倒置荧光显微镜观察和流式细胞仪检测,结果显示,随着病毒用量的增加,EGFP阳性细胞数和平均荧光强度随之增加(图3)。同时,3种血清型的转导效率由高到低依次为rAAV6、rAAV2和rAAV9。

增加,转导效率会有轻微的下降。加入不同浓度的氯喹溶液处理,均使转导效率有微弱的下降,平均荧光强度的变化差异也不显著。用PVA处理病毒,并不能提高病毒对NK92细胞的转导效率,反而在高浓度时会降低转导效率。加入低浓度(75 μmol/L)金雀异黄酮处理后,EGFP阳性细胞比例及平均荧光强度均有所增强,而浓度提高至125 μmol/L时,转导效率没有显著提高,MFI有显著增强,在浓度超过125 μmol/L后,EGFP阳性细胞比例和MFI均会下降。

4 讨论

本研究通过对病毒转导条件的摸索,以及使用已报道的可提高病毒转导效率的化学试剂,来达到提高rAAV对NK92细胞转导效率的目的。实验结果表明,NK92细胞的生长状态对转导效率有

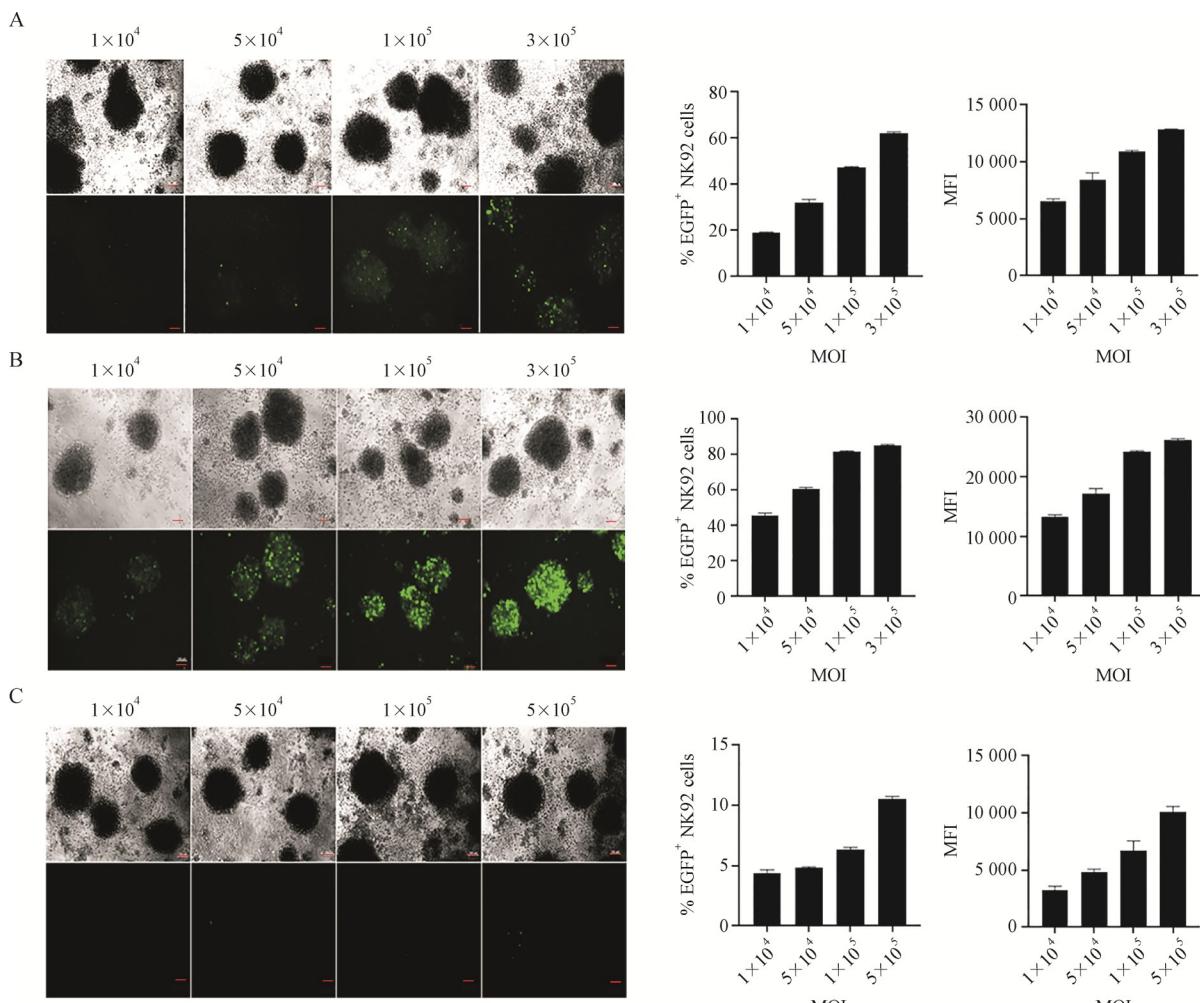


Figure 3 Transduction efficiency of rAAV-EGFP of different serotypes in NK92 cells at different doses ($\bar{x} \pm s, n = 3$; bar = 100 μm)

A: rAAV2-EGFP; B: rAAV6-EGFP; C: rAAV9-EGFP

MOI: Multiplicity of infection

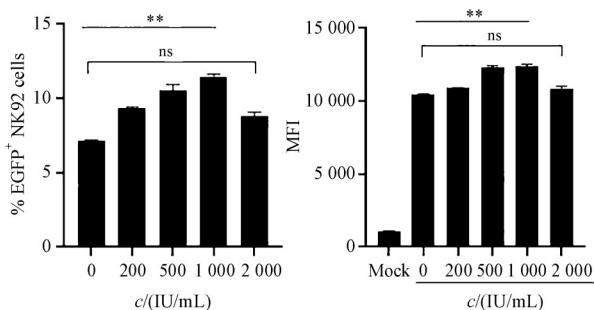


Figure 4 Statistical diagram of the influence of IL-2 concentration on transduction efficiency detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Mock: Untransduced group

** $P < 0.01$

很大的影响,由于 NK92 细胞为 IL-2 依赖型细胞系,当培养基中不添加 IL-2 时,细胞不发生聚团和增殖,导致病毒转导效率显著降低;而随着 IL-2 浓

度的增加,NK92 的增殖速率和活性提高,同时病毒转导效率也有所提高;但当浓度过高时(2 000 IU/mL),转导效率有一定的回落,可能由于细胞快速分裂而导致病毒被稀释,因此本研究确定了培养基中最优的 IL-2 浓度为 1 000 IU/mL。

目前在灵长类动物体内发现了 12 种 AAV 天然亚型,由于编码结构蛋白的不同而导致不同血清型的 AAV 对不同组织和细胞的感染效率不同^[11]。AAV2 是人类发现最早、也是研究最清楚的血清型,它对肌肉、肝脏、眼等组织有相对高的感染性,FDA 批准的首款基因治疗药物 LUXURNA™ 是以 AAV2 为载体。AAV9 更倾向于中枢神经系统的感染,治疗脊髓性肌萎缩症的基因药物 ZOLGENSMA® 是以 AAV9 为载体。Ellis 等^[12]和 West-

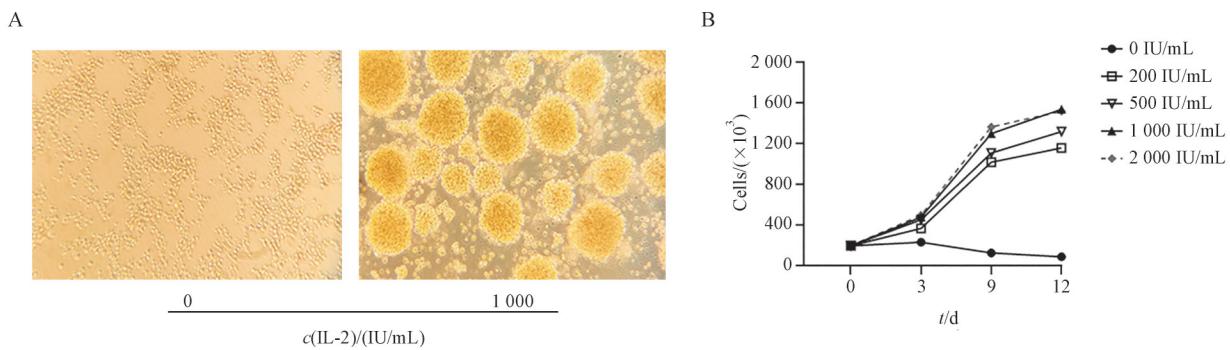


Figure 5 Effect of different IL-2 concentration on proliferation of NK92 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Observation of NK92 cells under light microscope ($100 \times$); B: Statistical results of cell numbers at different IL-2 concentrations

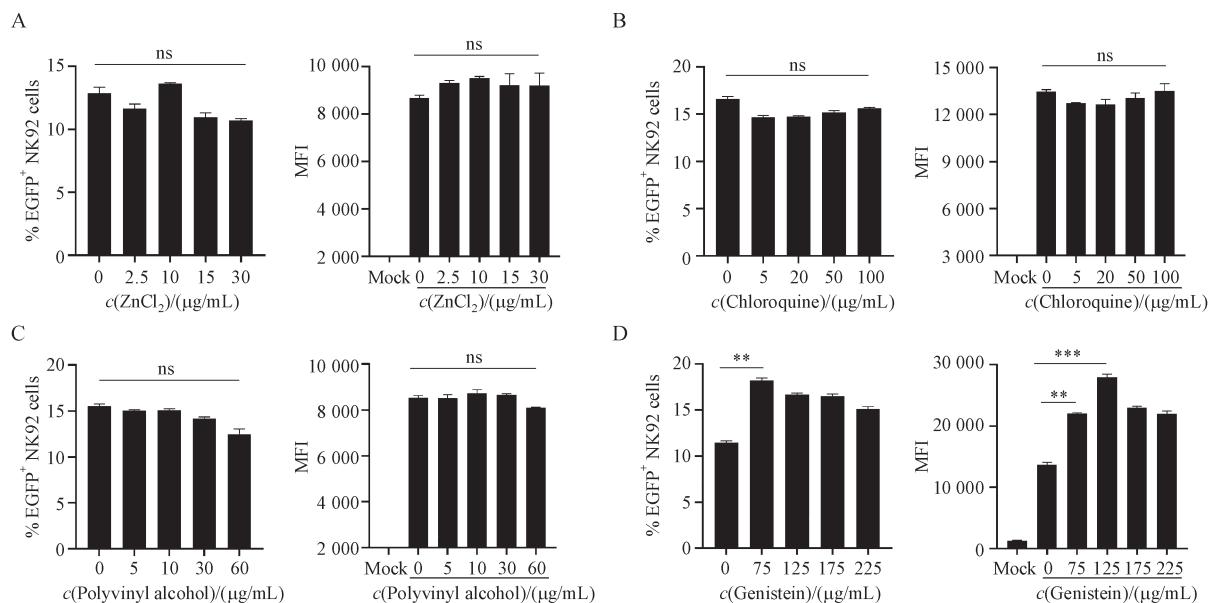


Figure 6 Effects of accelerators (A) ZnCl₂, (B) chloroquine, (C) polyvinyl alcohol, and (D) genistein on transduction efficiency of AAV in NK92 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

haus等^[13]相继证明了AAV6相比于其他血清型,对免疫细胞的转导效率更高。本研究中使用了上述3种血清型rAAV-EGFP转导NK92细胞,结果表明rAAV6-EGFP对NK92细胞的转导效率最高。此外,病毒的用量与转导效率成正相关,但过高的MOI可能会引起不良反应,而且剂量过大也会加大病毒生产的难度与成本^[14],因此应根据实验需求使用尽可能低的MOI来达到实验目的。

据文献报道,一些试剂处理可以增强AAV对细胞的转导效率。金属元素是大多数细胞中蛋白质功能的必要组成成分,大约1/3的已知酶是金属酶。当AAV在进入靶细胞后的转运过程,会受到胞内某些特定蛋白质和酶的影响。Rambhai等^[15]

证明金属离子Zn²⁺可以有效提高AAV1~AAV6在HeLa、HepG2等细胞上的转导效率。当病毒转导细胞时,由于促炎细胞因子的激活可以激活先天免疫反应在靶细胞内创造抗病毒环境,限制AAV转基因的表达,研究证明,氯喹可以通过引起DNA构象变化来拮抗Toll样受体(TLR)家族成员TLR9的作用,阻止它激活,可以抑制抗病毒反应,从而提高AAV的转导效率^[16]。PVA是一种由聚乙酸乙烯酯水解得到的合成聚合物,Yang等^[17]研究证明,经过PVA的处理可以提高AAV进入细胞的能力,改善AAV在细胞内运输的过程,从而提高AAV的转导效率。由于AAV是单链DNA病毒,它在细胞内第二链的复制合成影响着它最终对细胞的转导

效率,研究发现,宿主细胞中的某种蛋白会与 AAV ITR 当中 3' 端 D 序列相互作用,被称为单链 D 序列结合蛋白(ssD-BP)的酪氨酸残基的磷酸化,会阻止 AAV 第二链 DNA 的合成,从而降低 AAV 介导的转基因的表达,金雀异黄酮是一种天然的异黄酮,具有抑制酪氨酸蛋白激酶的作用,该抑制剂的使用可以使 ssD-BP 去磷酸化,促进 AAV 第二链的复制,使 AAV 对细胞的转导效率有所提高^[18-20]。本研究分别分析了上述 4 种试剂对 rAAV6-EGFP 转导 NK92 细胞的影响,结果表明 ZnCl₂、氯喹以及 PVA 都未能有效提高 rAAV6-EGFP 对 NK92 细胞的转导效率,说明这些试剂在使用时针对不同 rAAV 血清型、感染细胞类型,其增强效应可能存在差异。而金雀异黄酮能够对 rAAV6-EGFP 转导 NK92 细胞有明显的促进作用,但浓度过高时可能会对细胞产生毒性作用。

本研究分析了培养基中 IL-2 浓度、转导时细胞密度、rAAV 血清型和用量,以及促进剂对 rAAV 转导 NK92 细胞效率的影响,建立了提高转导效率的优化方案,为 rAAV 介导的基因工程化 NK92 细胞奠定了基础。

References

- [1] Tan SZ, Li DP, Zhu X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **124**: 109821.
- [2] Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG. Adoptive cellular therapies: the current landscape[J]. *Virchows Arch*, 2019, **474** (4): 449-461.
- [3] Xie GZ, Dong H, Liang Y, et al. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer [J]. *eBioMedicine*, 2020, **59**: 102975.
- [4] Oelsner S, Friede ME, Zhang CC, et al. Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma [J]. *Cytotherapy*, 2017, **19** (2) : 235-249.
- [5] Zhang JG, Zheng HF, Diao Y. Natural killer cells and current applications of chimeric antigen receptor-modified NK-92 cells in tumor immunotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(2):317.
- [6] Wang D, Tai PWL, Gao GP. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(5):358-378.
- [7] De Haan P, Van Diemen FR, Toscano MG. Viral gene delivery vectors: the next generation medicines for immune-related diseases[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2021, **17**(1):14-21.
- [8] Naeimi Kararoudi M, Likhite S, Elmas E, et al. Optimization and validation of CAR transduction into human primary NK cells using CRISPR and AAV [J]. *Cell Rep Methods*, 2022, **2** (6):100236.
- [9] Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM, et al. Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells[J]. *J Virol*, 1995, **69**(3):1473-1479.
- [10] Wang DX, Zhou QG, Qiu X, et al. Optimizing rAAV6 transduction of primary T cells for the generation of anti-CD19 AAV-CAR-T cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, **150**: 113027.
- [11] Gao GP, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues [J]. *J Virol*, 2004, **78**(12):6381-6388.
- [12] Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, et al. A survey of *ex vivo/in vitro* transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype [J]. *Virology*, 2013, **10**:74.
- [13] Westhaus A, Cabanes-Creus M, Rybicki A, et al. High-throughput *in vitro*, *Ex vivo*, and *in vivo* screen of adeno-associated virus vectors based on physical and functional transduction[J]. *Hum Gene Ther*, 2020, **31**(9/10):575-589.
- [14] Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials[J]. *Curr Gene Ther*, 2011, **11**(4):321-330.
- [15] Rambhai HK, Ashby FJ III, Qing KY, et al. Role of essential metal ions in AAV vector-mediated transduction[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, **18**: 159-166.
- [16] Chandler LC, Yusuf IH, McClements ME, et al. Immunomodulatory effects of hydroxychloroquine and chloroquine in viral infections and their potential application in retinal gene therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(14):4972.
- [17] Yang H, Qing KY, Keeler GD, et al. Enhanced transduction of human hematopoietic stem cells by AAV6 vectors: implications in gene therapy and genome editing [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, **20**:451-458.
- [18] Qing K, Wang XS, Kube DM, et al. Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94** (20):10879-10884.
- [19] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases[J]. *J Biol Chem*, 1987, **262**(12):5592-5595.
- [20] Mukund V, Mukund D, Sharma V, et al. Genistein: its role in metabolic diseases and cancer[J]. *Crit Rev Oncol*, 2017, **119**: 13-22.