

病毒感染复数影响腺病毒感染 T 淋巴细胞效率的初步研究

张琼宇^{1*}, 马珊珊², 唐小标¹, 蔡旭¹

(1. 永州职业技术学院, 中国湖南 永州 425100; 2. 郑州大学 生命科学学院, 中国河南 郑州 450001)

摘要: 以往研究发现, 增加感染复数(multiplicity of infection, MOI)可以有效提高 5 型腺病毒(Ad5)感染 T 细胞的效率, 但其具体机制并未十分清楚。选取 T 淋巴瘤细胞为靶细胞, 通过荧光定量 PCR 及透射电镜观察等方法探讨不同 MOI 对重组腺病毒 Ad5-GFP 复制周期中病毒结合及病毒进入两个环节的影响, 发现高 MOI 条件下不会影响 T 细胞结合的腺病毒数量, 却可显著增加经胞吞进入 T 细胞的腺病毒数量。这些结果表明, 增加 MOI 有利于腺病毒经胞吞进入 T 细胞, 从而可提高腺病毒感染效率。这为进一步研究腺病毒感染 T 淋巴细胞的机制提供了理论基础。

关键词: 腺病毒; 感染复数(MOI); 感染效率; 病毒胞吞; T 淋巴细胞

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)04-0312-06

Influence of Multiplicity of Infection on the Efficiency of Adenovirus Infection in T Lymphocytes

ZHANG Qiong-yu^{1*}, MA Shan-shan², TANG Xiao-biao¹, KUI Xu¹

(1. Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425100, Hunan, China; 2. College of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: Previous studies have found that increasing multiplicity of infection (MOI) can effectively improve the efficiency of adenovirus serotype 5 (Ad5) infection in T cells; however, little is known about the underlying mechanism. Here, Jurkat T cells were selected as target cells, and the effects of different MOI on the viral binding and viral entry in the replication cycle of Ad5-GFP were investigated by means of quantitative fluorescence PCR and transmission electron microscopy. It was found that high MOI significantly increased the number of adenovirus into the T cell during the endocytosis process, but not the number of adenovirus adsorbed on T cells. These results indicate that increase of MOI is beneficial to the adenovirus into the T cells by endocytosis, improving the efficiency of adenovirus infection in T lymphocytes, and this provide a theoretical basis for further study of the adenovirus infection mechanism in T lymphocytes.

Key words: adenovirus; multiplicity of infection (MOI); efficiency of infection; endocytosis; T lymphocytes

(*Life Science Research*, 2017, 21(4): 312-317)

T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)决定着 T 淋巴细胞的抗原识别特异性, 在细胞免疫中发挥着重要的靶向性作用。利用转基因的方法将具有抗原识别特异性的 TCR 基因转入普通的 T 细胞中, 可赋予该 T 细胞特异性抗原识别能力, 这个过程称为 T 细胞的重定向。目前, 利用抗原特

异性 TCR 基因修饰 T 细胞进行过继性移植/回输, 已经成为肿瘤生物治疗中的一个热点^[1]。

当前针对 T 淋巴细胞常用的载体为病毒载体, 主要为慢病毒、腺相关病毒和腺病毒^[2]。慢病毒载体可在细胞基因组中随机整合, 因而具有致癌风险。之前认为在细胞基因组中是定点整合的

收稿日期: 2017-01-10; 修回日期: 2017-03-19

基金项目: 2013 年度湖南省教育厅科学研究面上项目(13C970); 永州市 2015 年度第二批指导性科技计划项目(永科发[2015]10 号)

作者简介: 张琼宇(1982-), 男, 湖南永州人, 博士, 讲师, 主要从事生物医学的基础研究, Tel: 0746-6231903, E-mail: qzhang2009@aliyun.com.

腺相关病毒,在最新的研究中发现其也可在人类细胞基因组中随机整合从而导致肝癌^[3]。腺病毒载体无插入致突变性,不仅可以转染分裂期的细胞而且能转染静止期的细胞,能快速、稳定转导并高效率地表达多个外源目的基因,因而已被应用于TCR基因修饰T细胞过继治疗的临床实践中,并逐渐发挥重要作用^[4,5]。

血清型5型腺病毒(adenovirus serotype 5, Ad5)是目前最常用的腺病毒载体,其识别靶细胞的天然受体为柯萨奇-腺病毒受体(coxsackie-adenovirus receptor, CAR)。由于原代T淋巴细胞表面CAR表达水平较低,因此Ad5对原代T细胞感染效率较低^[6]。以往研究发现,增加感染复数(multiplicity of infection, MOI),可以有效提高Ad5感染T细胞的效率^[7],该发现对于基于T细胞基因修饰的治疗有着重要意义,但是其具体机制并不清楚。由于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)具有高异质性,因此选取相对匀质的Jurkat细胞(T淋巴瘤细胞)为靶细胞进行研究,通过分析不同MOI对Ad5感染T细胞过程中病毒结合以及病毒胞吞两个环节的影响,初步探讨了增加MOI提高腺病毒对T细胞感染效率的相关机制,从而为促进基于TCR基因修饰的T细胞治疗在临床上的应用奠定基础。

1 材料与方法

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(美国);无血清1640培养基、胎牛血清、阳离子脂质体购自Thermo公司(美国);细胞总基因组提取试剂盒购自QIAGEN公司(德国);Ex Taq酶、dNTPs、DNA marker购自TaKaRa公司(日本);PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;CAR和整合素(Integrin $\alpha V\beta 3$)荧光标记抗体购自eBioscience公司(美国)。CO₂细胞培养箱、Nano Drop紫外分光光度仪购自Thermo公司(美国);荧光定量PCR仪Thermal Cycler购自TaKaRa公司(日本);流式细胞仪Epics-XL购自Beckman Coulter公司(美国);透射电子显微镜购自PHILIPS公司(荷兰)。

1.2 细胞培养

37℃条件下,在5% CO₂培养箱中用1640完全培养液(含有10%终浓度的胎牛血清)培养Jur-

kat细胞。

1.3 病毒包装

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绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的编码基因,病毒感染细胞后可在细胞内表达GFP。病毒包装采用美国Microbix公司细胞内同源重组的AdMax系统,参照Shayakhmetov等^[8]发表的文献进行,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12d通过显微镜观察病斑的出现;3)通过TCID₅₀法测定病毒滴度。

1.4 流式细胞术检测病毒感染效率和细胞表面受体的表达

对于病毒感染效率的测定, Jurkat细胞按照 5×10^5 孔密度接种于12孔细胞培养板,以MOI为5、10、50、100、200和400分别加入腺病毒Ad5-GFP,置于细胞培养箱内培养6h;以800g离心5min,弃上清;加入1640完全培养液,置于细胞培养箱内继续培养42h;流式细胞仪检测GFP阳性表达的细胞比例及平均荧光强度(median fluorescence intensity, MFI);对于CAR、Integrin $\alpha V\beta 3$ 的表达检测,分别利用CAR、Integrin $\alpha V\beta 3$ 荧光标记的抗体与Jurkat细胞孵育,然后利用流式细胞仪检测阳性表达细胞的百分比。

1.5 与细胞结合的病毒数量测定

细胞结合病毒数量的测定方法参考已有报道^[8,9]进行,大致步骤如下: Jurkat细胞按照 5×10^5 孔密度接种于12孔细胞培养板,以MOI 5和MOI 400分别加入腺病毒Ad5-GFP;冰上孵育1h(低温下病毒能与细胞表面受体结合,但病毒胞吞进入细胞的过程受到抑制),4℃ 1000g离心5min,弃上清液;加入0.5mL预冷的PBS缓冲液洗涤2次;收集细胞并用基因组提取试剂盒提取总基因组DNA;分别以病毒纤毛基因(*fiber*)引物(*fiber*-F: 5'-GC-CTTTTCTTACTCCTCCCTTTGT-3'; *fiber*-R: 5'-ATCCGCCTGTGGTTGTTAGTG-3')和细胞*GAPDH*基因引物(*GAPDH*-F: 5'-CCCTTTTGTAGGAGGGA-CTTAGAGA-3'; *GAPDH*-R: 5'-CATCAAACCTCA-AAGGCAGGA-3')进行荧光定量PCR反应,通过标准曲线计算出平均每个细胞结合的病毒数量。

1.6 进入细胞的病毒数量测定

进入细胞的病毒数量测定参考已有报道^[8,9]进行,大致步骤如下: Jurkat细胞按照 5×10^5 孔密度

接种于 12 孔细胞培养板, 以 MOI 5 和 MOI 400 分别加入腺病毒 Ad5-GFP; 冰上孵育 1 h, 4 °C 1 000 g 离心 5 min, 弃上清液; 重悬细胞于预冷的 PBS 溶液并迅速于 37 °C 放置 50 min; 1 000 g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次; 收集细胞并用基因组提取试剂盒提取总基因组 DNA; 以病毒 *fiber* 基因引物及细胞 *GAPDH* 基因引物进行荧光定量 PCR 反应, 通过标准曲线计算出平均每个细胞中进入的病毒数量。

1.7 电镜观察

Jurkat 细胞按照 5×10^5 /孔密度接种于 12 孔细胞培养板, 以 MOI 5 和 MOI 400 分别加入腺病毒 Ad5-GFP; 37 °C 放置 50 min; 1 000 g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 2% 多聚甲醛-0.25% 戊二醛固定 2 h; PBS 洗涤细胞后再经 1% 锇酸继续固定 1 h; 脱水后用 Epon-812 树脂进行包埋; 烘干后超薄切片, 厚度为 70 nm; 经 1% 醋酸铀染色 20 min; 使用 PHILIPS CM120 透射电子显微镜进行观察。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件分析。所有数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)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

2.1 重组腺病毒 Ad5-GFP 的包装

为便于检测腺病毒对 T 细胞的感染, 我们首先获取含有 *GFP* 报告基因的重组腺病毒 Ad5-GFP。将 *GFP* 基因连入腺病毒穿梭载体 pDC315, 构建的重组穿梭载体 pDC315-GFP 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 1A); 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 扩增后, 对扩增产物进行电泳分析, 发现了与 *GFP* 基因大小一致的条带(图 1B); 病毒滴度、病毒颗粒数的测定结果见表 1。这些结果表明重组病毒 Ad5-GFP 已经被成功包装, 而且包装病毒的滴度高、纯度好。

2.2 Ad5 感染 Jurkat 细胞的效率分析

Ad5-GFP 感染 Jurkat 细胞后的 48 h, 通过流式细胞仪检测阳性表达 *GFP* 的细胞比例即感染效率。Ad5-GFP 在不同 MOI 值感染 Jurkat 细胞效率的结果见图 2A 和图 2B。在 MOI 值较小时, Ad5-GFP 的感染效率较低, 当 MOI 为 5 时, 表达 *GFP* 的细胞比例仅为 $11.00\% \pm 1.65\%$; 当 MOI 为

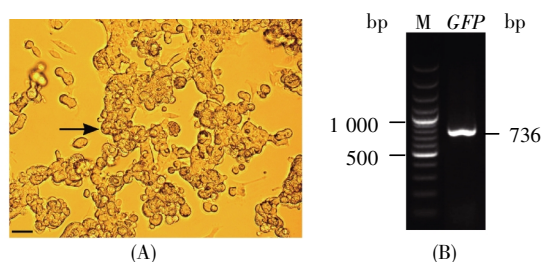


图 1 重组腺病毒 Ad5-GFP 的包装

(A) pDC315-GFP 与骨架载体共同转染 HEK-293, 转染后 12 d 观察到明显病斑(箭头指示, 标尺: 20 μ m); (B) 病毒基因组 DNA 经 *GFP* 特异性引物 PCR 扩增后的电泳图谱。

Fig.1 The packaging of the recombinant Ad5-GFP

(A) Plasmid pDC315-GFP and the backbone plasmid were co-transfected into HEK-293 cells and plaques (indicated by an arrow) could be observed approximately 12 days after transfection (scale bar: 20 μ m); (B) Genomic DNA of the recombinant adenovirus Ad5-GFP was extracted, and the *GFP* gene was identified by PCR.

表 1 重组腺病毒 Ad5-GFP 的滴度测定
Table 1 Genome-to-PFU ratio for Ad5-GFP

Virus	Genomes/mL	PFU/mL	Genome/PFU ratio
Ad5-GFP	4.25×10^{11}	7.08×10^9	60

10 时, 表达 *GFP* 的细胞比例则仅为 $14.40\% \pm 1.73\%$ 。在 MOI 值较大时, Ad5-GFP 的感染效率相对较高, 当 MOI 为 200 时, 表达 *GFP* 的细胞比例达 $43.03\% \pm 6.10\%$; 当 MOI 为 400 时, 表达 *GFP* 的细胞比例高达 $60.00\% \pm 6.03\%$ 。不同 MOI 值感染下胞内 MFI 的结果见图 2C。当 MOI 为 5 时, MFI 仅为 3.80 ± 0.65 ; MOI 为 400 时, MFI 为 10.43 ± 3.23 , 两者间存在显著性差异。Jurkat 细胞表面与腺病毒结合和内化相关的受体 CAR 和 Integrin $\alpha V\beta 3$ 的表达情况见图 2D, 有 $66.34\% \pm 4.16\%$ 的细胞表达 CAR; 而仅有 $8.63\% \pm 1.72\%$ 的细胞表达 Integrin $\alpha V\beta 3$ 。以上结果表明, 随着 MOI 的增加, Ad5-GFP 对 Jurkat 细胞的感染效率也相应提高; 在 Jurkat 细胞表面, 表达 CAR 的比例相对较高, 而表达 Integrin $\alpha V\beta 3$ 的比例相对较低。为了进一步研究 MOI 对感染效率影响的机制, 后续实验我们选取 MOI 400 和 MOI 5 两种感染复数进行比较。

2.3 标准曲线的绘制

本文通过荧光定量 PCR 方法测定细胞结合的病毒颗粒数及进入细胞的病毒颗粒数。在标准曲线的绘制中, 选取 Ad5 腺病毒 *fiber* 基因作为目的基因, 选取 *GAPDH* 基因作为内参基因。首先分别构建含 *fiber* 基因和 *GAPDH* 基因的重组质粒, 构建的质粒经限制酶进行线性化后作为标准品, 标准品的电泳结果见图 3A, 两种质粒的浓度

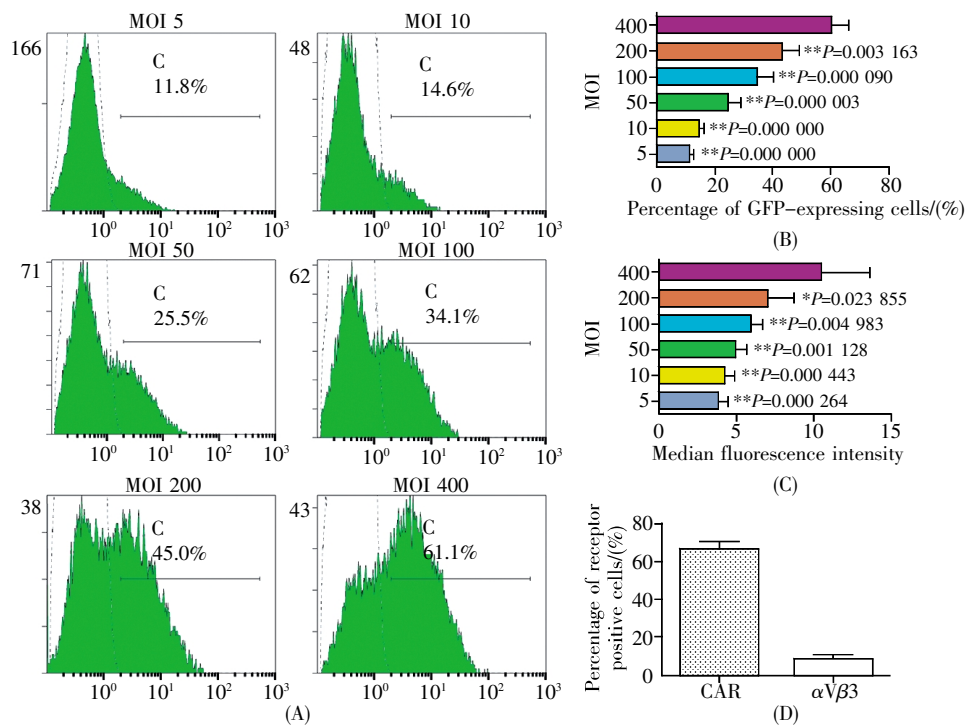


图 2 腺病毒 Ad5-GFP 感染 Jurkat 细胞的效率分析

(A), (B)不同 MOI 值 Ad5-GFP 感染后 48 h, 细胞中 GFP 阳性表达比例(与 MOI 400 组对比, ** $P < 0.01$); (C)不同 MOI 值感染下的胞内 MFI (与 MOI 400 组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); (D)流式细胞仪检测能结合 CAR 和 Integrin $\alpha V\beta 3$ 抗体的 Jurkat 细胞阳性率。

Fig.2 The adenoviral infection efficiencies in Jurkat cells

(A), (B) Jurkat cells were infected with adenovectors at different MOIs and GFP expression was analyzed at 48 h post-transduction by flow cytometry. The data in histogram are presented as the mean of three independent experiments with error bars corresponding to standard deviation. ** $P < 0.01$ vs. MOI 400 group; (C) The MFI was determined and the data are presented as the mean \pm standard deviation of three experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. MOI 400 group; (D) Jurkat cells were incubated with CAR and Integrin $\alpha V\beta 3$ antibodies, and the percentage of receptor positive cells was determined by flow cytometry. The data are presented as the mean \pm standard deviation of three experiments.

见表 2。然后, 将标准品按如下拷贝数进行梯度稀释: 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 , 并作为模板进行 real-time PCR 反应, 绘制标准曲线。Fiber 基因的标准曲线结果见图 3B, GAPDH 基因的标准曲线结果见图 3C, 两条标准曲线均具有良好的线性关系。

2.4 感染复数对病毒结合、病毒胞吞的影响

以往研究表明低温将抑制腺病毒的胞吞^[10], 因此我们以 MOI 400 和 MOI 5 分别感染 Jurkat 细胞, 迅速置于冰上继续放置 1 h, 洗涤未结合的病毒, 4 $^{\circ}C$ 离心收集细胞并提取总基因组(包含病毒基因组), 以总基因组为模板进行荧光定量 PCR 分析。单个细胞结合的病毒数见图 4A, MOI 400 条件下, 单个细胞结合的病毒数为 $1\ 774.5 \pm 89$;

MOI 5 条件下, 单个细胞结合的病毒数为 $1\ 687.9 \pm 89$, 两者之间没有统计学差异。由此可见 MOI 对于病毒结合没有显著影响。

随后, 通过荧光定量 PCR 分析不同 MOI 值对病毒经胞吞进入细胞的影响。进入细胞的病毒数见图 4B, MOI 400 条件下, 进入单个细胞的病毒数为 $1\ 654.5 \pm 111$; MOI 5 条件下, 进入单个细胞的病毒数为 $1\ 179.2 \pm 164$, 两者之间有显著性差异。进一步的电镜观察结果见图 4C, 在 MOI 400 条件下, 细胞内存在明显的胞吞泡。随机选取 15 个细胞, 对细胞内的胞吞泡进行统计分析, 结果见图 4D。在 MOI 400 条件下, 单个细胞内的胞吞泡数目为 4.22 ± 0.37 ; MOI 5 条件下, 胞吞泡数目

表 2 标准品质粒的浓度测定
Table 2 Concentration of reference standards

Standard plasmid/(copies $\cdot \mu L^{-1}$)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Concentration/(ng $\cdot \mu L^{-1}$)
GAPDH 2.6×10^{10}	1.632	0.852	1.91	81.6
Fiber 1.1×10^{10}	0.695	0.355	1.96	34.7

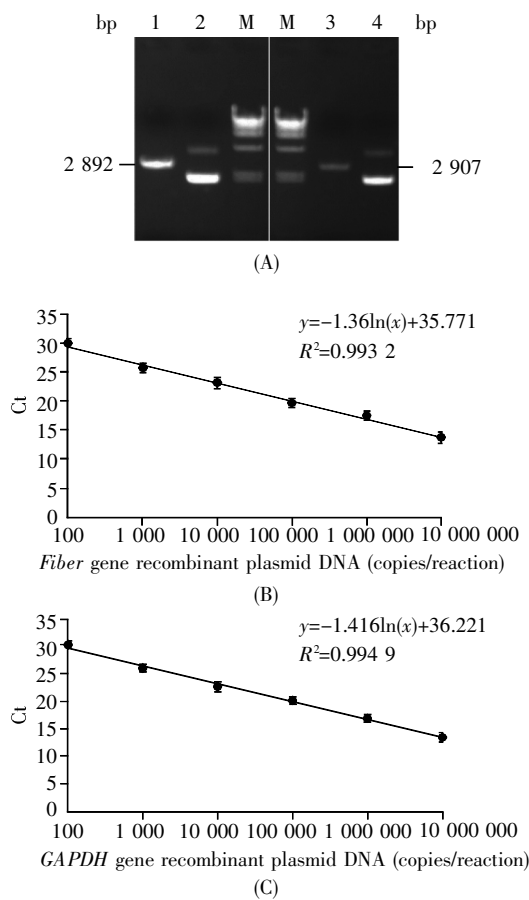


图3 荧光定量 PCR 标准曲线的绘制

(A)质粒 DNA 标准品 *Hind* III 酶切后电泳图谱(1 示含 *GAPDH* 基因的酶切线性质粒; 2 示含 *GAPDH* 基因的环状质粒; 3 示含 *fiber* 基因的酶切线性质粒; 4 示含 *fiber* 基因的环状质粒; M 示 DNA 标准带); (B) *Fiber* 基因的标准曲线; (C) *GAPDH* 基因的标准曲线。

Fig.3 The establishment of real-time PCR amplification standard curves

(A) Standard plasmid DNA templates were digested by restriction endonuclease *Hind* III and then analyzed on a 1% agarose gel (1, linearized plasmid containing *GAPDH* gene; 2, non-linearized plasmid containing *GAPDH* gene; 3, linearized plasmid containing *fiber* gene; 4, non-linearized plasmid containing *fiber* gene; M, DNA marker); (B), (C) Real-time PCR experiments were performed using SYBR Premix Ex Taq II and different concentrations of standard plasmid DNA templates. PCR efficiency plots of *fiber* gene and *GAPDH* gene (Ct values plotted against plasmid copy number) are shown in B and C, respectively. Triplicate data are shown for each experiment.

为 0.90 ± 0.18 , 两者存在显著性差异。以上结果表明, 相比于低 MOI, 高 MOI 感染时, 经胞吞进入细胞的病毒数目明显增加。

3 讨论

Ad5 感染宿主细胞的范围较广, 在低 MOI 值均能实现对大部分细胞的高效感染, 其针对部分

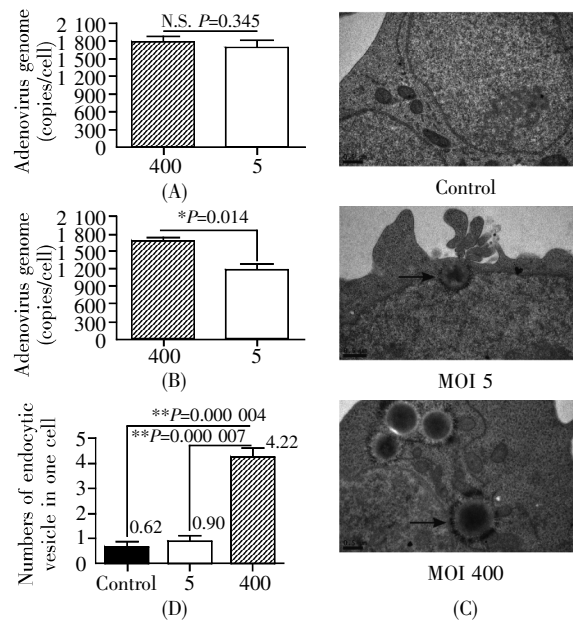


图4 感染复数对于病毒结合与病毒进入的影响

(A)不同 MOI 条件下, 单个细胞结合的病毒数比较(N.S.表示无显著差异, $P > 0.05$); (B)不同 MOI 条件下, 进入单个细胞的病毒数比较($*P < 0.05$); (C)病毒胞吞泡的电镜照片(箭头指示胞吞泡, 标尺: $0.5 \mu\text{m}$); (D)不同 MOI 条件下, 单个细胞内胞吞泡数目统计结果($**P < 0.01$)。

Fig.4 Influence of MOI on the viral binding and entry

(A) The amount of virus absorbed per cell was compared at different MOIs. The data are normalized to genomic DNA. Each data point represents the mean \pm standard deviation of three experiments. N.S. means no statistical significance, $P > 0.05$; (B) The amount of virus entered per cell was compared at different MOIs. The data are normalized to genomic DNA. Each data point represents the mean \pm standard deviation of three experiments. $*P < 0.05$; (C) Adenovirus entry into Jurkat cells through endocytic vesicles at different MOIs were observed using electron microscopy. Arrows indicate endocytic vesicles and the bar represents $0.5 \mu\text{m}$; (D) Quantitative analyses of endocytic vesicles in each group. Fifteen micrographs selected randomly were examined in each group and the number per cell was determined. The data are presented as the mean \pm standard deviation of three experiments. $**P < 0.01$.

靶细胞的感染效率接近 100%, 逐渐在基因治疗中发挥重要的作用^[11-13]。由于 CAR 在原代 T 细胞膜上表达较低, 导致 Ad5 对原代 T 细胞的感染效率较低, 因此限制了 Ad5 在基因修饰的 T 细胞治疗中的应用^[8]。

目前主要有 3 种方法可以提高腺病毒感染 T 细胞的效率。第一种方法为预先刺激活化 T 细胞, 再进行病毒感染^[6]; 第二种方法是对腺病毒进行改造。由于腺病毒与靶细胞受体的结合主要由腺病毒 fiber 蛋白完成^[14], 因此, 可以利用分子生物学的手段改造腺病毒, 使之带有可识别靶细胞表面高表达受体的 fiber 蛋白, 从而提高感染效率。

例如,将 Ad5 的 *fiber* 基因替换为 Ad35 腺病毒的 *fiber* 基因,由此形成的嵌合型腺病毒识别的受体为 T 细胞表面高表达的 CD46 分子,因此,这种新的嵌合型腺病毒对 T 细胞具有较高感染效率^[6]。可是,随着研究的深入,人们发现嵌合型腺病毒感染靶细胞后,大部分病毒停留在晚期胞内体,进入细胞质的病毒也有相当部分返回至细胞膜附近,从而导致进入核内的病毒数目较少^[15-17]。而 Ad5 感染靶细胞后,病毒很快逃脱胞内体进入细胞质,大部分病毒进入细胞核^[16];第三种方法为增加病毒 MOI^[7]。本文也发现增加 MOI 会显著提高 Ad5 感染 T 淋巴瘤细胞的效率(图 2)。与前两种方法相比,增加 MOI 是一种相对简单并能有效提高 Ad5 感染 T 细胞效率的方法。

腺病毒对靶细胞的感染及胞内运输由一系列环节组成,本文对腺病毒结合、腺病毒胞吞两个环节进行了分析。在病毒结合环节,我们没有发现细胞结合病毒的数目发生明显改变(图 4A)。我们的结果表明,影响病毒胞吞并改变进入细胞的病毒颗粒数,是 MOI 影响 Ad5 感染 T 细胞效率的原因之一(图 4B~D)。以往研究发现 Integrin 是介导 Ad5 胞吞发生的关键分子,增加 Integrin 分子的表达可以提高 Ad5 的感染效率^[18-20]。可是,在本实验中,我们发现 Jurkat 细胞表面表达 CAR 的比例较高,而表达 Integrin 的比例较低(图 2D)。由此推断在 MOI 影响病毒胞吞的过程中,可能存在不依赖于 Integrin 分子的其他原因。在不同 MOI 条件下,介导腺病毒胞吞的细胞信号转导机制是否存在差别,还需要进一步的深入研究。

总之,本文对病毒 MOI 影响 Ad5 感染 T 细胞效率的机制进行了初步的探讨,本研究的发现可为深入研究 Ad5 感染 T 细胞的分子机制及基于 TCR 基因修饰的 T 细胞治疗奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Linnemann C, Schumacher T N M, Bendle G M. T-cell receptor gene therapy: critical parameters for clinical success[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011, 131(9): 1806-1816.
- [2] June C H, Blazar B R, Riley J L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(10): 704-716.
- [3] Nault J C, Datta S, Imbeaud S, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(10): 1187-1193.
- [4] 徐思慧, 宋春敬, 潘晔. 腺病毒载体与慢病毒载体感染骨髓间充质干细胞的比较[J]. *生命科学研究*(Xu Si-hui, Song Chun-jing, Pan Ye. Gene transfer into mesenchymal stem cells: a comparison between the adenoviral and lentiviral vector delivery systems[J]. *Life Science Research*), 2013, 17(6): 543-547.
- [5] Uckert W, Schumacher T N M. TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009, 58(5): 809-822.
- [6] Schroers R, Hildebrandt Y, Hasenkamp J, et al. Gene transfer into human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors[J]. *Experimental Hematology*, 2004, 32(6): 536-546.
- [7] Chen Z, Ahonen M, Hämäläinen H, et al. High-efficiency gene transfer to primary T lymphocytes by recombinant adenovirus vectors[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 260(1-2): 79-89.
- [8] Shayakhmetov D M, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, et al. Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by a retargeted adenovirus vector[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(6): 2567-2583.
- [9] Worgall S, Worgall T S, Kostarelou K, et al. Free cholesterol enhances adenoviral vector gene transfer and expression in CAR-deficient cells[J]. *Molecular Therapy*, 2000, 1(1): 39-48.
- [10] Miyazawa N, Crystal R G, Leopold P L. Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(3): 1387-1400.
- [11] Hall K, Blair Zajdel M E, Blair G E. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 431(3): 321-336.
- [12] Moyer C L, Wiethoff C M, Maier O, et al. Functional genetic and biophysical analyses of membrane disruption by human adenovirus[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2631-2641.
- [13] Li C, Guan X, Du T, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(8): 2381-2393.
- [14] Nicklin S A, Wu E, Nemerow G R, et al. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2005, 12(3): 384-393.
- [15] Shayakhmetov D M, Li Z Y, Ternovoi V, et al. The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(6): 3712-3723.
- [16] Drouin M, Cayer M P, 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[J]. *Virology*, 2010, 401(2): 305-313.
- [17] Samson M, Jung D. Intracellular trafficking and fate of chimeric adenovirus 5/F35 in human B lymphocytes[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2011, 13(9): 451-461.
- [18] Huang S, Endo R I, Nemerow G R. Upregulation of integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery[J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(4): 2257-2263.
- [19] Shayakhmetov D M, Eberly A M, Li Z Y, 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]. *Journal of Virology*, 2005, 79(2): 1053-1061.
- [20] Vincent T, Pettersson R F, Crystal R G, et al. Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(15): 8047-8058.