doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.041

腺相关病毒作为基因治疗载体在生殖系统中的分布及影响的研究进展 *

葛圆圆 张 梅 姜 颖 杨 丹 韩松洋 于英君△

（黑龙江中医药大学基础医学院 黑龙江 哈尔滨 150040）

摘要：腺相关病毒(adeno-associated virus，AAV)作为一种基因治疗载体被广泛应用于医学相关的各个领域。大量以 AAV 为载体的基因治疗被应用于药物研究，但目前国内外没有相关的基因药物应用于临床，原因在于其安全性问题有待进一步研究。AAV 具有器官靶向性，易于分布在靶器官，但在非靶器官也会分布。AAV 在生殖系统的短暂分布降低了对其功能的影响，但不排除潜在影响。就目前的研究结果来看，AAV 不会整合在生殖细胞，从而不会对子代产生影响。本文将综述目前以腺相关病毒介导的基因治疗中对生殖系统安全性的研究进展，从载体在生殖系统的分布、对生殖系统功能的影响以及对子代影响的三个方面进行阐述。

关键词：腺相关病毒；生殖系统；分布

中图分类号：R918；R69 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2018)06-1189-04

Progress in the Distribution and Influence of Adeno-associated Virus as a Gene Therapy Vector in the Reproductive System*

GE Yuan-yuan, ZHANG Mei, JIANG Ying, YANG Dan, HAN Song-yang, YU Ying-jun△

(School of Basic Medical Sciences, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT: Adeno associated virus as a vector for gene therapy has been widely used in various fields related to medicine, its biological characteristics have been thoroughly understood. At present a large number of recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy is applied in drug research, no relevant gene drugs in clinical application at home and abroad, reason is the safety problems still need to be further studied. AAV has the target of tissue and organ, easy to distribute in target organs, but also distributes in non target organs. The transient distribution of AAV in the reproductive system reduces its impact on its function, but does not exclude potential effects. As far as the present study is concerned, AAV does not integrate in the germ cells, and does not affect the offspring. This paper will research progress on safety of the reproductive system in the review of current gene therapy mediated by adeno-associated virus, three effect of biodistribution in the reproductive system, impact on reproductive function and offspring effects are discussed.

Key words: Adeno-associated virus; Reproductive system; Biodistribution

Chinese Library Classification(CLC): R918; R69 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1189-04

2014 年 05 月 13 日国家食品药品监督管理总局发布的《药物毒代动力学研究技术指导原则》(http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/101020.html）中指出依据受试物暴露量来评价受试物蓄积引起的靶部位毒性，有助于为后续安全性评价提供量化的安全性信息。通过在毒性剂量下研究受试药物在动物体内的吸收、分布、代谢、排泄等特点，探究药物在机体内的分布及靶器官，指导其他毒性试验以及临床用药[1]。由此可见药物的在机体内的分布是评价药物安全性的重要内容。给药方式、给药剂量、AAV 对组织的亲嗜性[2]以及实验动物的种属、性别、年龄等因素均会影响基因药物在受体内的分布。药物分布部位、基因表达量、药物清除率是评价基因药物安全性的重要指标。

生殖系统在机体中具有产生生殖细胞以繁衍新个体、维系种族延续，同时分泌性激素以维持机体的副性征等作用。性腺主要包括睾丸和卵巢两种生殖腺，所以大多科研工作者把睾丸和卵巢作为研究基因药物在生殖系统分布的主要研究对象。

1 AAV 在生殖系统的分布

1.1 AAV 在雄性生殖系统的分布

人类男性生殖系统由内、外生殖器组成，承担着产生精子以及分泌雄性激素的作用。睾丸中的间质细胞以及支持细胞产生雄激素、抑制素以及睾酮，以刺激雄性生殖器官的生长发育和性征的出现，维持生精，促进代谢。Meadows 等[3]为评价基因药物 rAAV9-CMV-hNAGLU 毒性及安全性，利用野生型 C57BL/6 小鼠构建黏多糖ⅢB 病模型，通过尾静脉全身给药，治疗期间未观察到明显的临床症状以及慢性毒性反应，6 周时在高（2×10^{14} vg/kg）、低（1×10^{14} vg/kg）剂量组的睾丸均能检

* 基金项目：国家自然科学基金面上项目（81573935）；黑龙江省自然科学基金项目（H2016074）；中国博士后科学基金项目（2016M591566）；黑龙江省政府博士后基金项目（LBH-Z15211）；黑龙江省中医药管理局项目（ZHY16-088）；教育部春晖计划项目（2006-1-15014）

作者简介：葛圆圆（1990-），女，硕士研究生，主要从事中药抗肿瘤分子生物学研究，电话：18003617152，E-mail: 1549127718@qq.com

△ 通讯作者：于英君（1953-），男，硕士，教授，博士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤分子生物学研究，

电话：13936246132，E-mail: yuyingjun53@aliyun.com

（收稿日期：2017-10-10 接受日期：2017-11-14）

测到载体的表达,24 周后均未检测到载体的表达。Aalbers 等[4]重组启动子 ART-I02 后,rAAV5 在睾丸中少量但稳定的表达,1 周后,发现性腺中有少于总载体量 0.01 %的重组病毒载体,4 周后载体量低于观察的极限值。Ru 等[5]利用荧光定量 PCR 检测在给药后的 24 h rAAV2-sTRAIL 主要分布在肝、脾、移植瘤、骨髓、血液以及个别小鼠的小肠、淋巴结和肺部,在雄性性腺中未见分布,2 周后 AAV 在血液和骨髓中未见分布,其他组织器官的分布量也显著减少。数据显示 rAAV2-sTRAIL 在生殖系统无分布,且其他器官的载体分布量随着时间的延长逐渐减少直至完全清除,不会在体内蓄积而产生长期的广泛的毒性效应。急毒试验结果显示 rAAV2-sTRAIL 没有明显的毒副作用,综合得出此基因药物对于实验动物是安全的,为临床试验提供了数据支撑。总之,由于 AAV 血清型不同,有些 AAV 在雄性生殖系统有少量分布,随着时间的延长,载体的表达量逐渐减少直至消失。由此可预见,机体代谢能够减少 AAV 在雄性生殖器官中的分布,一定程度上减少 AAV 对机体的直接或潜在影响。

1.2 AAV 在雌性生殖系统的分布

人类女性生殖系统由内外生殖器组成,具有产生卵子和分泌雌性激素的功能。卵巢可产生和排出卵子,同时分泌雌性激素,主要是雌激素和孕激素,以及少量雄激素,以促进雌性生殖器官生长发育,维持正常功能,促进雌性副性器官的发育和副性征的出现,并维持它们于成熟状态,同时调节代谢。Pañeda 等[6] 将携带荧光素酶报告基因的血清型 1,5,6,8 AAV 尾静脉注射入 BALB/c 小鼠体内,发现 AAV1 和 AAV8 在卵巢子宫中转导效率较高,同时单链的 AAV1 和 AAV8 在卵巢子宫中荧光素酶的表达量比双链 AAV1 和 AAV8 多。有趣的是,这正好证明了两者的分子机制不同。为进一步证实荧光素酶的表达,用免疫组化检测卵泡和卵母细胞中没有荧光素酶的表达。同时也得出 AAV5 在卵巢中没有分布的结论。Meadows 等[3]利用实时定量 PCR 技术检测到 rAAV9 在给药后 6 周卵巢内有表达,24 周时未检测到载体表达量。Ye 等[7]评价 rAAV2tYF-PR1.7-hC-NGB3 基因药物在治疗色盲时的安全性及生物分 布时,检测到载体在一只小鼠的卵巢中有较少的表达量(100 vg/lg DNA),综合对其他组织器官的影响初步证实该基因药物可以用于临床。Chen 等 [8] 在治疗大鼠纯合性家族性高胆固醇血症时,用 AAV8 作为载体运送人低密度脂蛋白受体基因,发现 AAV8 在雄性与雌性的性腺中均有表达,但是表达量较少,在实验后期(180 天)卵巢中 AAV8 的表达量骤然减少,低于检测的最小值。AAV 在雌性生殖器官中的分布趋势类似于雄性,表达量低,存在时间短,大大降低了生殖毒性发生的可能性。

2 AAV 对生殖系统功能的影响

腺相关病毒在生殖系统的分布,尤其是在性腺的分布,随着用药时间延长或者机体本身的代谢速率可能会被清除,用药期间对生殖系统功能的影响有待探索。张晓晶等[9]通过比较正常与异常精液中的 AAV DNA,发现异常精液中 AAV DNA 阳性检出率显著高于正常精液,同时在睾丸中标本中检测出 AAV DNA,提示 AAV 可能感染男性睾丸,并干扰精子的产生。朱斌等[10]研究 rAAV2/1 介导的 IGF-1 对糖尿病勃起功能障碍的影响,将 1.0×10^{13} vg 的 rAAV2/1 -IGF -1 注射至阴茎海绵体,25 d 后注射 1 %的 FB 标记神经元,28 d 后取海绵组织检测 IGF-1 和 nNOS,结果显示该基因药物能够增加阴茎海绵体内压,显著修复阴茎勃起功能障碍,同时认可了 rAAV2/1 作为基因药物的载体在治疗 ED 方面的治疗作用,为治疗无效的 ED 病例开辟一条新的道路。孙俊杰等[11]通过携带构建人血管内皮抑素基因与绿色荧光蛋白的重组腺相关病毒载体 rAAV2-endostatin-EGFP 以探究其对子宫内膜异位症的治疗作用,结果证明 endostatin 可抑制裸鼠异位症的血管生成,从而抑制子宫内膜异位症的病灶生长;实验中,给予空白载体 rAAV2-EGFP 的阴性对照组的雌二醇、孕酮水平与治疗组、空白对照组比较,差异无统计学意义,可说明 rAAV2 不影响体内雌性生殖激素水平,对正常卵巢功能没有影响。Ge 等[12]利用 AAV8 做载体探究低密度脂蛋白受体基因对家族性高胆固醇血症的作用时,观察了载体对大鼠肝、肺、脑以及睾丸组织的影响,病理结果未发现 AAV8 载体影响组织的证据。大鼠的瘦素受体(OB)基因突变会导致肥胖、糖尿病和不育,Keen-Rhinehart 等[13]利用 rAAV 作为载体,将人的瘦素受体基因导入到克莱斯奇雌性大鼠的脑部以确认瘦素的作用位点,微量注射到大多数脑部的内侧视前区、室旁核、腹内侧下丘脑、弓状核以及脑干背迷走神经复合体,实验结果显示对照组(注射载有绿色荧光蛋白的 rAAV 载体)发情周期显著长于空白组,而实验组(注射 rAAV-OB-Rb)比空白组的发清周期短 4-5 天。跟空白组相比,对照组的孕酮水平高,实验组的孕酮水平较低,而三组之间雌二醇水平没有差异。从实验结果来看,空白载体大鼠的发情周期、雌激素水平均有影响,但是这不能排除给药方式以及部位对结果产生的影响。通常的给药方式是静脉给药 [14] 或腹腔给药 [15],但 Keen-Rhinehart 等的给药方式是直接注射在大脑的相关部位,这不能排除给药时针刺的操作方式对脑部的刺激,所以不能完全证明空白载体对雌性大鼠生殖功能的影响。Haurigot 等[16]在实验中发现 AAV2 只在精液中短暂存留,最终所有患者的精液中均未检测到 AAV2。

目前,就 AAV 对生殖系统功能的影响争论较多,实验结果也不尽相同。这仍然需要大量实验来论证,多方位多层次的讨论 AAV 对生殖系统功能的影响。但是应用于临床时,没有生育需求的患者在用药时可不考虑 AAV 对生殖的功能的影响,反之则需谨慎。

3 AAV 对子代的影响

基因序列在人体内的生殖传递风险一直是基因治疗的主要安全问题,尤其针对育龄期人群。目前,超过 2000 例的基因治疗应用于临床试验[17]。这引发了一系列的安全问题,比如新的遗传物质是否会转移到性腺中未成熟的配子中,亦或者通过泌尿生殖道转移到性腺中成熟的配子中[18]。毒代动力学数据可以来自生殖毒性试验的全部动物,也可以来自部分动物。毒代动力学数据应包括胎仔 / 幼仔数据,以评价受试物和 / 或代谢产物能否通过胎盘屏障和 / 或乳汁分泌。由于连续的生殖实验受限于实验动物周期、技术手段以及伦理问题,多数科研工作者放弃了对这部分实验的探索,但是探讨对生殖遗传的影响,此类研究是不可避免的话题。Couto 等[19]从小鼠成熟精子注入 AAV2,体外受精后进行胚胎移植,未检测到后代有 AAV 的基

因表达,表明 AAV2 不整合在生殖细胞,导致生殖系转导的可能性极小。Hironori[20]等为确定 rAAV 会影响狨猴的哪一个妊娠阶段,分别在孕期为 41, 43, 49, 50 和 122 天时将 rAAV 经腹壁注射至怀孕的狨猴子宫中，结果发现 50 天孕期的狨猴出现了流产，孕期为 122 天的狨猴顺利产下两个活胎以及一个死胎,同时在胎盘、脐带、死胎样本以及活胎的肝、肾、脑、下肢肌肉、横膈膜、耳部均检测到 rAAV 的基因组。半乳糖唾液酸沉积症(GS)是一种由于组织蛋白酶 A 缺乏形成的溶酶体贮积症,会导致严重的肾病、内脏肿大、不孕以及渐进性共济失调等一系列病症,大大缩短生命,Hu H 等[21]在利用 AAV2/8 作为基因载体将 scAAV2/8lP1-PPcA 静脉注射给实验动物，证明了高剂量组药物在改善病情、组织形态方面优于中、低剂量组,更是意外的发现本来不具备生殖能力的实验动物繁育出了后代,且后代具有半乳糖唾液酸沉积症，这表明 scAAV2/8lP1-PPcA 不仅能够逆转不孕,而且不会整合到亲代的生殖细胞。若应用于临床,scAAV2/8lP1-PPcA 不仅够改观 GS 患者的不孕情况，更能降低对生殖功能的潜在影响的几率。Favaro 等[22]分析 AAV 作为基因治疗载体在种系传递的风险,病毒向精液的播散在一定程度上受到宿主依赖性因素的调控，证明了 AAV8 与 AAV2 载体在男性生殖中传播的风险较低。Mattar 等[23]通过长期的实验观察，证明了 0.9 G 的 AAV 作为载体直接在子宫内进行人凝血因子的基因转移能够达到长期表达的效果,实验组的子一代均未出现致病性和遗传毒性。Schuettrumpf 等[24]确定了 AAV 病毒载体传播精液的风险取决于给药途径,静脉给药后精液中瞬时检测到病毒载体序列，但是以剂量和时间依赖性消失,肌注后未发现病毒载体。Pañeda 等人[6]检测到 rAAV 在性腺中高表达后,将载有荧光素酶的单链 AAV8 注射进 BALB/c 雌鼠体内,6 周后与正常 BALB/c 雄鼠交配,但是在子代中没有检测到荧光素酶的表达。因为在动物的生长发育过程中,启动子的活性受到抑制,AAV 表达与否也受幼崽的染色体影响,但是实验人员也未在幼崽中检测到 rAAV。

基于目前的实验，没有直接的数据表明 AAV 会通过性腺分布在子代,但后续仍需大量实验数据来论证这一观点。这虽然能够减小 AAV 对子代潜在的影响，但是对于基因药物治疗某些遗传性疾病时却是弊大于利,病毒载体不能携带药物进入生殖细胞，因此子代仍然有极大地风险罹患相应的遗传性疾病。同时,就目前的实验现状而言,多数实验只检测了子一代中是否携带亲代 AAV,遗传学中存在隔代遗传的现象,故在不违背伦理的情况下,应研究多代,才更能说明遗传问题,为临床用药提供有力的数据支撑。

4 小结与展望

基因治疗为常规治疗方法难以解决的基因疾病提供了直接的治疗思路,被认为是治疗遗传性疾病最理想的医学干预手段,因为它的目的在于以疾病原因代替疾病症状[25]。由于基因治疗的靶点是某段缺失或变异的基因，而遗传物质在转录、翻译过程中所出现的问题目前不能被完全预测和控制,其中涉及到的安全性及伦理道德问题使得研究人员在基因药物的使用上慎之又慎。在过去的二十年中,人们一直在使用病毒载体进行基因治疗。腺相关病毒作为理想的基因治疗载体已被广泛应用于研究治疗癌症、膝关节疾病、血液疾病、肝靶向疾病、遗传性疾病等[26-28]。对腺相关病毒的安全性也在稳步研究中,其中关键的是 AAV 的免疫反应及定点整合问题[29]。AAV 在组织器官中的分布受到给药方式、剂量以及实验动物种属、所处环境等的影响。AAV 在生殖系统中的分布不能直接说明 AAV 对器官产生了影响,未见分布也有可能存在潜在的影响。药物受到机体自身代谢作用的影响,可能在实验期间已经完全代谢而未被及时的检测。

综合现有的研究结果来看，首先多种 AAV 血清型在生殖器官中有分布,尤其以卵巢、睾丸为主,AAV 载体少量表达,随着时间的延长逐渐被清除；其次,AAV 对生殖系统功能的影响,该结果也提示我们 AAV 可能会影响睾丸及精子,但是也为治疗相关疾病开辟了新的道路;AAV 对于子代的影响,根据目前的研究状况表明 AAV 不会分布在子代中，大大降低了影响子代的可能性。根据目前的研究情况,可初步预测 AAV 对生殖系统的主要方面不会产生较大的影响。在不违背伦理问题的情况下,进行连续的生殖遗传实验,相继研究多代,更能说明安全性问题。AAV 作为理想的基因载体,进一步完善相关的安全性检测以期尽早服务于临床,指导临床用药,为育龄期患者在使用以 AAV 为载体的基因药物时提供用药依据和诊疗指导,同时可初步评估后代的生长生殖情况。随着时代发展以及科技水平的不断进步,相信在不远的将来,腺相关病毒能够作为基因治疗载体以临床药物的姿态展现在世人面前。

参 考 文 献(References)

[1] 于敏,李佐刚.药物毒代动力学的研究现状与展望[J].中国新药杂志, 2017, 26(07): 742-748
Yu Min, Li Zuo-gang. Current status and Prospect of pharmacokinetics of drugs[J]. Chin J New Drugs, 2017, (07): 742-748

[2] Ye G J,Conlon T, Erger K, et al. Safety and Biodistribution Evaluation of rAAV2tYF-CB-hRS1, a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing Retinoschisin, in RS1-Deficient Mice [J]. Human Gene Therapy Clinical Development, 2015, 26(3): 177

[3] Meadows A S, Duncan F J, Camboni M, et al. A GLP-compliant toxicology and biodistribution study: systemic delivery of a rAAV9 vector for the treatment of mucopolysaccharidosis IIIB[J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2015, 26(4): 228-242

[4] Aalbers C J, Bevaart L, Loiler S, et al. Preclinical Potency and Biodistribution Studies of an AAV 5 Vector Expressing Human Interferon-β (ART-I02) for Local Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis[J]. Plos One, 2015, 10(6): e0130612

[5] Ru Q, Li W, Wang X, et al. Preclinical study of rAAV2-sTRAIL: pharmaceutical efficacy, biodistribution and safety in animals [J]. Cancer Gene Therapy, 2017

[6] Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders [J]. Human Gene Therapy, 2009, 20(20): 908-917

[7] Ye G J, Budzynski E, Sonnentag P, et al. Safety and Biodistribution Evaluation in Cynomolgus Macaques of rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3, a Recombinant AAV Vector for Treatment of Achromatopsia [J]. Human Gene Therapy Clinical Development, 2016, 27(1): 37

[8] Chen S J, Sanmiguel J, Lock M, et al. Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia [J]. Human Gene Therapy Clinical Development, 2013, 24(4): 154-160

[9] 张晓晶. 睾丸组织及异常精液样本的腺病毒相关病毒 DNA[J].国际生殖健康 / 计划生育杂志, 2002, 21(3): 189-190
Zhang Xiao-jing. Adeno associated virus DNA in testicular tissues and abnormal semen samples[J]. International Journal of reproductive health / family planning, 2002, 21(3): 189-190

[10] 朱斌, 何朝辉, 潘卫兵,等.应用重组腺相关病毒介导 IGF-1 基因修复糖尿病勃起功能障碍[J].中国性科学, 2016, 25(12): 28-31
Zhu Bin, He Chao-hui, Pan Wei-bing, et al.Recombinant adeno-associated virus mediated IGF-1 gene repair of erectile dysfunction in diabetes mellitus [J]. Chinese Sexology, 2016,25(12): 28-31

[11] 孙俊杰, 尹利荣, 糜若然,等. 重组腺相关病毒介导的人血管内皮抑素基因治疗裸鼠子宫内膜异位症[J].中华妇产科杂志, 2010, 45(1): 45-50
Sun Jun-jie, Yin Li-rong, Mi Ruo-ran, et al. Recombinant adeno-associated virus mediated human endostatin gene therapy for endometriosis in nude mice [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2010, 45(1): 45-50

[12] Ge X, Xi H, Yang F, et al. CRISPR/Cas9-AAV Mediated Knock-in at NRL, Locus in Human Embryonic Stem Cells [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(11): e393

[13] Keen-Rhinehart E, Kalra S P, Kalra P S. AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsky rats [J]. Peptides, 2005, 26 (12): 2567-2578

[14] Saraiva J, Nobre R J, Pereira d A L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9 [J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2016, 241(11): 94

[15] Wei H, Liu X, Queen N J, et al. Targeting Visceral Fat by Intraperitoneal Delivery of Novel AAV Serotype Vector Restricting Off-Target Transduction in Liver [J]. Molecular Therapy Methods & Clinical Development, 2017, 6(9): 68-78

[16] Haurigot V, Mingozzi F, Buchlis G, et al. Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs [J]. Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2010, 18(7): 1318

[17] Santiago-Ortiz J L, Schaffer D V. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy [J]. Journal of Controlled Release, 2016, 240(3): 287-301

[18] Schuettrumpf, J, Liu, JH, Couto, LB, et al.Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial [J]. Mol Ther, 2006, 13 (6): 1064-1073

[19] Couto L, Parker A, Gordon J W. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction[J]. Human Gene Therapy, 2004, 15(3): 287

[20] Hironori O, Hidetoshi I, Hiromi H K, et al. Robust Long-term Transduction of Common Marmoset Neuromuscular Tissue With rAAV1 and rAAV9[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2(5): e95

[21] Hu H, Gomero E, Bonten E, et al. Preclinical dose-finding study with a liver-tropic, recombinant AAV-2/8 vector in the mouse model of galactosialidosis [J]. Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2012, 20(2): 267-74

[22] Favaro P, Downey HDZhou J S. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors [J]. Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2009, 17(6): 1022

[23] Mattar C N Z, Gil-Farina I, Rosales C, et al. In Utero Transfer of Adeno-Associated Viral Vectors Produces Long-Term Factor IX Levels in a Cynomolgus Macaque Model [J]. Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2017

[24] Schuettrumpf J, Liu J H, Couto L B, et al. Inadvertent Germline Transmission of AAV2 Vector: Findings in a Rabbit Model Correlate with Those in a Human Clinical Trial [J]. Molecular Therapy, 2006, 13(6): 1064-1073

[25] Xia E, Munegowda M A, Cao H, et al. Lung gene therapy-How to capture illumination from the light already present in the tunnel [J]. Genes & Diseases, 2014, 1(1): 40

[26] 李帆, 姬静, 史鹏燕,等. 体外诱导的粘蛋白抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞抗乳腺癌的研究[J].实用癌症杂志, 2017, 32(1): 12-15
Li Fan, Ji Jing, Shi Peng-yan, et al. In vitro induced mucin antigen specific cytotoxic T lymphocytes against breast cancer [J]. Journal of practical cancer, 2017, 32(1): 12-15

[27] Bevaart L, Aalbers C J, Vierboom M P, et al. Safety, Biodistribution, and Efficacy of an AAV-5 Vector Encoding Human Interferon-Beta (ART-I02) Delivered via Intra-Articular Injection in Rhesus Monkeys with Collagen-Induced Arthritis [J]. Human Gene Therapy Clinical Development, 2015, 26(2): 103

[28] Nathwani A C, Rosales C, Mcintosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins [J]. Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2011, 19(5): 876

[29] 张梅, 于英君.基因治疗中重组腺相关病毒载体的安全性[J].中国实验诊断学, 2017(4): 751-753
Zhang Mei, Yu Ying-jun. Safety of recombinant adeno-associated virus vector in gene therapy [J]. China Laboratory diagnostics, 2017 (4): 751-753