

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.002

· 基础研究 ·

## 纳米载体介导的 PiggyBac 转座子制备 CAR-NK 细胞

岳冉<sup>1,2</sup>, 刘子洋<sup>2</sup>, 郑岩<sup>2</sup>, 陆小丹<sup>2</sup>, 胡珊珊<sup>2</sup>, 张炳勇<sup>2</sup>, 李修岭<sup>2</sup>, 李景果<sup>3</sup>, 韩双印<sup>2</sup> (1. 新乡医学院 研究生院, 河南新乡 453003; 2. 郑州大学 人民医院 消化内科, 河南 郑州 450003; 3. 河南省立眼科医院暨河南省人民医院眼科中心, 河南 郑州 450003)

**[摘要]** **目的:** 探索新型阳离子聚合物纳米载体 mPEG-P(Asp-AED-g-HFB) (PAEF) 和 PiggyBac 转座子介导嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 修饰自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的基因转染方法, 为肿瘤细胞免疫治疗制剂研发提供新策略。**方法:** 制备 PAEF/DNA (转座酶+转座子) 复合物, 通过 Nano-ZSE 动态光散射系统 (Malvern Instruments) 测量 PAEF/DNA 复合物的粒径分布和表面电位; DNA 凝胶电泳验证 PAEF 的 DNA 包封率、释放性和稳定性, 结合粒径电位选择进入细胞合适的 N/P 值; CCK-8 细胞毒性实验分析不同 N/P 值条件下 PAEF/DNA 复合物的细胞毒性; 荧光显微镜及流式细胞术检测细胞转染效率, 评估 PAEF 基因转染载体的可行性。**结果:** PAEF 可包裹 DNA 形成粒径 100~150 nm 的纳米复合物, 后者易于介导 DNA 进入细胞; 当 N/P 值为 20 时, PAEF 即可实现 DNA 的完全包裹; 在还原剂二巯苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 存在下, PAEF 对 DNA 有良好的释放能力; N/P 值为 80 时, PAEF/DNA 复合物转染组的 NK-92 细胞存活率显著高于脂质体转染组 [(72.50±3.9)% vs (64.03±1.8)%,  $P<0.05$ ]; 荧光显微镜下观察发现, PAEF/DNA 组荧光多、荧光强度大; 流式细胞术显示最高转染效率为 83.4%。**结论:** 纳米载体 PAEF 通过静电吸附作用能够很好地包裹 DNA, 且生物相容性好, 基因转导效率较高, 成功制备的 CAR-NK 细胞为过继免疫治疗提供良好的实验基础。

**[关键词]** 纳米载体; PiggyBac 转座子; 嵌合抗原受体; NK 细胞; 肿瘤免疫治疗

**[中图分类号]** R730.51; Q782; Q785 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)02-0109-06

## Nanocarrier-mediated PiggyBac transposon system for preparation of CAR-NK cells

YUE Ran<sup>1,2</sup>, LIU Ziyang<sup>2</sup>, ZHENG Yan<sup>2</sup>, LU Xiaodan<sup>2</sup>, HU Shanshan<sup>2</sup>, ZHANG Bingyong<sup>2</sup>, LI Xiuling<sup>2</sup>, LI Jingguo<sup>3</sup>, HAN Shuangyin<sup>2</sup> (1. Postgraduate Division, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Department of Gastroenterology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China; 3. Henan Provincial Eye Hospital & Eye Center of Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the gene transduction method of chimeric antigen receptor (CAR) mediated by novel cationic polymer nanocarrier mPEG-P(Asp-AED-g-HFB) (PAEF) and PiggyBac transposon system to modify natural killer (NK) cells, providing a new strategy for immunotherapy of cancer cells. **Methods:** PAEF/DNA (transposase+transposon) complex were prepared. The particle size distribution and surface potential of PAEF/DNA complexes were measured with Nano-ZSE Dynamic Light Scattering System (Malvern Instruments). The DNA encapsulation rate, release and stability of PAEF were evaluated by DNA gel electrophoresis, and then by combining with particle size and surface potential to determine the preferential N/P ratio to enter NK cells. The cell cytotoxicity of PAEF/DNA complexes under different N/P ratios was analyzed by CCK-8 cytotoxicity test. Transduction efficiency of NK cells was evaluated by Fluorescence microscopy and Flow cytometry, and the feasibility of PAEF gene transfection vectors was assessed. **Results:** PAEF could encapsulate DNA to form nano-complexes with the diameter of 100-150 nm, which was suitable to mediate DNA entering into cells. PAEF could completely encapsulate DNA with N/P ratio of 20. In the presence of reducing agent dithiothreitol (DTT), PAEF had a good ability to release DNA. NK-92 cells transfected with PAEF/DNA complex, which was formed at the N/P ratio of 80, attained a significantly higher cell viability than cells of lipofectamine transfection group [(72.50±3.9)% vs (64.03±1.8)%,  $P<0.05$ ]; Fluorescence microscopic observation showed more fluorescence and higher fluorescence intensity in cells of PAEF/DNA group; Flow cytometry showed the highest transfection efficiency of 83.4%. **Conclusions:** Nanocarrier PAEF can encapsulate DNA

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No.81772670)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81772670)

**[作者简介]** 岳冉 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗基础研究, E-mail: yueran0225@163.com

**[通信作者]** 韩双印 (HAN Shuangyin, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础和临床研究, E-mail: hansyzzu@163.com

well by electrostatic adsorption, and has good biocompatibility and high efficiency for gene transduction. It provides a good experimental basis for adoptive immunotherapy.

**[Key words]** nanocarrier; PiggyBac transposon; chimeric antigen receptor (CAR); NK cell; tumor immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(2): 109-114. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.02.002]

过继免疫疗法(adoptive immunotherapy, AIT)已成为治疗恶性肿瘤的重要方法,嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰免疫细胞是近年来的主要进展之一,大量临床前研究及临床试验数据均显示出可喜的效果<sup>[1-2]</sup>。2017年美国FDA批准了第一个CAR-T药物tisagenlecleucel(商品名Kymriah)上市<sup>[3]</sup>,然而,CAR-T细胞疗法引发的细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、移植物抗宿主病(graft-versus-host-disease, GVHD)及巨额花费成为临床推广应用的难点<sup>[4]</sup>。NK细胞的非MHC限制性、泛特异性识别和杀伤靶细胞及快速应答等特点,使其在细胞免疫疗法中被寄予更多期待。

细胞免疫治疗中最关键的步骤是将目的基因导入细胞,建立安全高效的基因转导方法。目前常用的方法有慢病毒、逆转录病毒转染及电穿孔等,但其制备复杂性、生物安全性始终困扰着研究者。阳离子聚合物纳米材料作为一种新型基因载体受到广泛关注,具有易于修饰、生物相容性好、转导效率高、操作简单、稳定性好等优点,在免疫检查点阻断、肿瘤疫苗、肿瘤细胞免疫治疗中均取得良好的效果。PiggyBac转座子系统采用“剪切-粘贴”机制,可特异地整合到人类基因组中,具有更高的生物安全性,在基因转导中有很大大潜力<sup>[5]</sup>。本研究利用新型阳离子聚合物纳米载体mPEG-P(Asp-AED-g-HFB)(PAEF)介导PiggyBac转座子系统优化转导NK细胞,实现纳米负载基因高表达,为过继免疫治疗制剂研发打开新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

PiggyBac转座子质粒(PB512B-1)、转座酶质粒(PB210PA.1)购自SBI公司,EGFRvIII-CAR质粒和NK-92细胞系由本实验室保存。限制性内切酶Xba I和BamH I购自BioLabs公司,核酸染料Super GelRed购自US Everbright公司,无内毒素质粒提取试剂盒购自Omega公司,细胞因子白细胞介素2(IL-2)购自Peprotech公司,Nano-ZSE电位及粒度测定仪购自英国Malvern公司,CCK-8细胞毒性试剂盒购自Dojindo公司。

### 1.2 纳米材料的合成及表现特性

mPEG-PBLAsp的合成:由mPEG-NH<sub>2</sub>引发苯氧羰基天冬氨酸酐(BLAsp-NCA)开环、聚合得到

mPEG-PBLAsp,将PEG-NH<sub>2</sub>(2.0 g, 1 mmol)加入50 ml烧瓶内70 °C真空干燥4 h后用20 ml无水氯仿溶解,在氩的保护下将BLAsp-NCA(1.34 g, 5.38 mmol)溶解于10 ml无水DMF中,35 °C反应72 h。随后,将反应混合物加入过量冷冻二乙醚进行沉淀处理,过滤,二乙醚洗涤,真空干燥24 h直至获得恒定重量(Mn=3.0 kD, <sup>1</sup>H核磁共振测定, mPEG-PBLAsp-NH<sub>2</sub>)。收率:93%。

mPEG-PLAsp-AED的合成:于100 ml烧瓶内用80 ml DMSO溶解AED·HCl, mPEG-PBLAsp(2.0 g)溶解于10 ml DMSO,三乙胺(1 ml)加入上述溶液,室温搅拌4 h,反应后用甲醇透析(NWCO:3 500 Da)72 h,旋蒸浓缩,最后真空干燥得到最终产物mPEG-P(Asp-AED)。

mPEG-P(Asp-AED-g-HFB)(PAEF)的合成:mPEG-P(Asp-AED)与HFB以不同摩尔值共溶解于甲醇溶液,在混合物中加入三乙胺,室温搅拌48 h,双蒸馏水透析,所得产物冻干成白色粉末,即为目标产物PAEF。

### 1.3 pDNA的制备

本课题组前期构建的EGFRvIII-CAR通过引物(PB-EGFRvIII-CAR上游引物为5'-GCTCTAGAAC-CATGGGATGGAGCTGTATCAT-3'、下游引物为5'-CGGGATCCTTAGCGAGGGGGCAGGGC CTGCA-3')扩增后克隆入PiggyBac转座子载体PB512B-1的Xba I和BamH I位点(下划线者为限制性内切酶位点),质粒在感受态菌株DH5α中扩增,无内毒素质粒提取试剂盒提取纯化,获得质粒经Xba I和BamH I双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳确认基因连接,核酸测序鉴定。

### 1.4 PAEF/pDNA复合物制备

取pDNA 500 ng/管置于Eppendorf管中,按不同N/P值(N/P值是指纳米材料中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>与pDNA中PO<sub>3</sub><sup>-</sup>的摩尔比例)将相应浓度的PAEF加入新的Eppendorf管,ddH<sub>2</sub>O稀释至相同体积后添加于相应标记的pDNA管内,混匀,室温静置30 min,使纳米材料与pDNA充分结合。

### 1.5 PAEF/pDNA复合物粒径电位测定

取pDNA 1 μg(转座酶与转座子的比例为2:1)于2 ml EP管内,按不同N/P值(0、5、10、20、40、60、80、100、120)将纳米材料用ddH<sub>2</sub>O稀释后加入相应含pDNA的EP管内,使总体积为1 ml,充分混合,室温静置30 min后通过马尔文粒径电位测量仪测定

PAEF/pDNA 复合物的粒径电位。

### 1.6 DNA 琼脂糖凝胶电泳验证 PAEF 对 pDNA 的包裹及释放能力

**包裹实验:** 配制不同 N/P 值 (2.5、5、7.5、10、15、20) 的 PAEF/pDNA 复合物, 充分混匀, 室温静置 30 min。1% 的琼脂糖凝胶加入 3  $\mu$ l Super GelRed 染色剂, 待胶凝固后与 6 $\times$ DNA 凝胶加样缓冲液混合上样。电泳 (120 V, 40 min) 后紫外灯下观察结果。取上述实验中纳米材料完全包裹 DNA 的 N/P 值 (20) 配制 PAEF/DNA 复合物, 加入限制性内切酶 *Xba* I 及 *Bam*H I, 37  $^{\circ}$ C 酶切 1 h 后行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 进一步验证纳米材料对 DNA 的包裹能力。

**释放实验:** 取上述包裹实验中最佳 N/P 值 (20) 配比 PAEF/DNA 复合物, 加入一定量的还原剂 DTT, 使其终浓度为 10 mmol/L, 充分混合, 室温静置 1.5 h 后行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 验证纳米材料的还原降解性及 PAEF/DNA 复合物中 PAEF 对 DNA 的体外释放能力。

### 1.7 CCK-8 细胞毒性试验

NK-92 细胞以  $2 \times 10^4$ /孔 (100  $\mu$ l) 铺 96 孔板, 设置不同 N/P 值梯度 (0、20、40、60、80、100、120), 同时设置实验孔 (含细胞、PAEF/DNA 复合物及 CCK-8)、对照孔 (含细胞、CCK-8, 无 PAEF/DNA 复合物) 及空白孔 (含 CCK-8, 无细胞及 PAEF/DNA 复合物), 每组设 4 个复孔。向实验孔加入 10  $\mu$ l 不同浓度的 PAEF/DNA 复合物, 于培养箱中孵育 6 h 后加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l/孔, 孵育 4 h 后酶标仪测定 450 nm 光密度 ( $D$ ) 值。细胞存活率 =  $(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

### 1.8 体外细胞转染

配置 100  $\mu$ l 不同 N/P 值的 PAEF/DNA 复合物 (DNA 定量 1.5  $\mu$ g, 转座酶与转座子的比例为 2:1), 充分混匀, 室温静置 30 min。NK-92 细胞  $1 \times 10^5$  个/孔铺 24 孔板 (细胞悬液调整为 200  $\mu$ l/孔), 将不同 N/P 值的 PAEF/DNA 复合物滴加于相应孔内, 置于培养箱孵育 4 h 后, 更换 500  $\mu$ l 含 10% FBS 的 1640 培养基, 补充 IL-2 (300 U/ml), 继续培养, 转染后 48 h 荧光显微镜及流式细胞术检测转染效率。

### 1.9 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件分析, 正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数资料采用百分率表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PAEF/pDNA 复合物的粒径和 Zeta 电位

在马尔文粒径电位测量仪上测定 PAEF/pDNA 复合物的粒径和电位 (图 1): N/P 值为 0 时, PAEF 的粒径均值为 61.10 nm, 随着 N/P 值增大其粒径表现出先增后降的趋势, 在 N/P 值 20 时粒径达到高峰, 至 N/P 值为 60 时渐趋稳定在 110 nm 左右, 电位在 N/P 值为 5 时达最低值 ( $-13.8 \pm 0.9$ ) mV, 其后随 N/P 值增大电位值回升, 当 N/P 值  $\geq 20$  时电位波动幅度减小且渐趋稳定,  $\geq 40$  时波动在 24 mV 左右, 可见随着 N/P 值增大, 表面电位大体呈现逐渐增大的趋势, 最后趋于稳定。结果表明随着纳米颗粒含量增多, 其静电吸附能力越强, 当达到一定的比例后, pDNA 含量的增加不会再引起电位的显著变化。

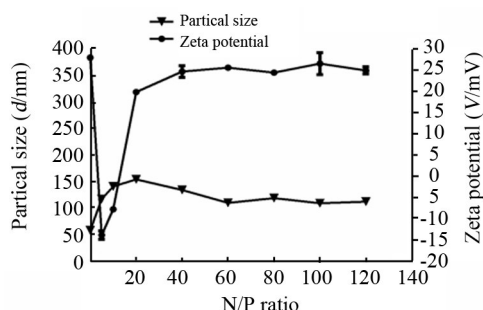


图1 不同N/P值条件下PAEF/DNA复合物的粒径电位示意图  
Fig.1 The particle size and zeta potential of PAEF/DNA complexes at different N/P ratios

### 2.2 PAEF/DNA 复合物可以体外释放 DNA

琼脂糖凝胶电泳结果 (图 2) 显示, 以裸 DNA 为对照, 随着 N/P 值的增大, PAEF 对 DNA 的包裹能力增强, 部分复合物阻滞于加样孔内, DNA 条带逐渐减弱; 至 N/P 值为 10 时, DNA 条带消失 (图 2A)。酶切实验显示 (图 2B), 在未加入限制性内切酶的情况下, N/P 值为 10、15、20 时均未见明显 DNA 条带泳出; 酶切后, 在 N/P 值为 10 时可见微弱条带, 15 时次之, 20 时未能见到 DNA 条带, 说明在 N/P 值为 20 的条件下, 纳米材料即可完全包裹目的 DNA, 这是基因转染成功的重要因素之一。在还原试验中 (图 2C), PAEF/DNA 复合物泳道未见条带泳出, DTT 处理后 PAEF/DNA 复合物泳道可见明显 DNA 条带, 证明 PAEF/DNA 复合物可以体外释放 DNA。

### 2.3 PAEF/DNA 复合物对细胞毒性较小

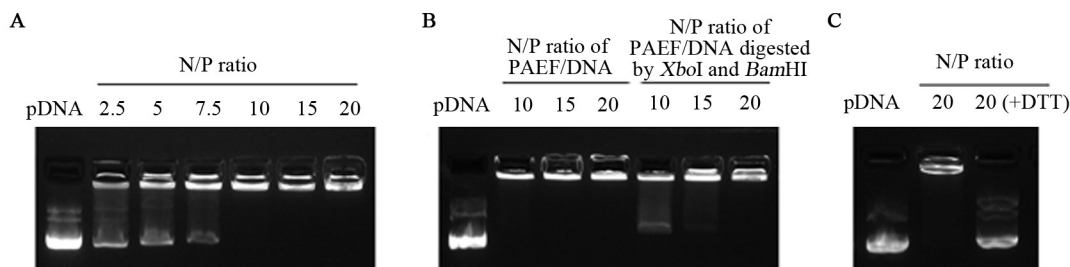
CCK-8 毒性实验结果 (图 3) 显示, PAEF/DNA 复合物对细胞存活率的影响随着 N/P 值增大而增加, 细胞存活率呈下降趋势。在 N/P 比为 100 时, 细胞存活率为  $(69.4 \pm 2.2)\%$ , 明显高于脂质体的  $(64.03 \pm 1.8)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果说明 N/P 值小于 100 时, PAEF/DNA 复合物对细胞毒性小, 生物相容

性好,作为基因转导载体具有很大的优势。

### 2.4 体外细胞转染

倒置荧光显微镜观察结果(图4)显示,PAEF/DNA复合物与NK-92细胞共孵育24 h后,N/P值为80时红色荧光蛋白(RFP)表达较多、荧光强度大,提示在此N/P值条件下,PAEF介导的DNA转导效

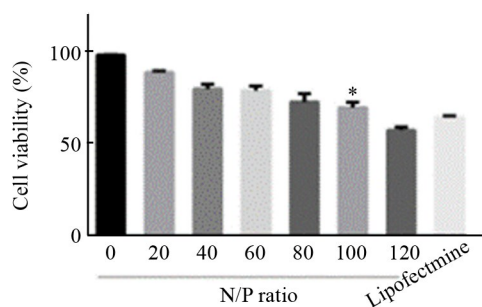
率较高( $P<0.05$ )。流式细胞术检测结果(图5)显示,N/P值为80时可达最高转染效率(83.4%),显著高于N/P值为20、40、60、100时的转染效率(20.3%、31.5%、59.7%、83.4%、78.0%,均 $P<0.05$ )。传代培养10 d,RFP仍能保持稳定的表达。



A: PAEF encloped DNA; B: Under the condition of N/P value of 20, the nano material can completely encapsulate the target DNA, preventing the DNA from being digested by restriction endonuclease *XbaI* and *BamHI*;  
C: Reducing agent DTT treatment releases DNA from PAEF/DNA complex

图2 不同N/P值下PAEF/DNA复合物凝胶电泳结果

Fig.2 Gel electrophoresis results of PAEF/DNA complexes with different N/P ratios



\* $P<0.05$  vs Lipofectamine group

图3 CCK-8毒性试验检测PAEF/DNA复合物在不同N/P值条件下转染NK-92细胞的存活率

Fig.3 Cell viability of NK-92 cells transfected with PAEF/DNA complexes under different N/P ratios detected by CCK-8 assay

### 3 讨论

近年来,肿瘤AIT受到研究者的日益关注,其中,CAR修饰免疫细胞是肿瘤免疫治疗领域的热点,在血液肿瘤的治疗中已取得突破性进展<sup>[6-7]</sup>,在实体瘤中也在积极探索。CAR-T疗法突飞猛进的同时,其不容忽视的不良反应也引起了研究者的广泛关注。相较而言,NK细胞在CAR的改造方面有更大的优势,可通过天然受体分子和CAR双重作用靶向识别杀伤肿瘤细胞,且不会引发GVHD<sup>[8-9]</sup>、CRS<sup>[10]</sup>。所以,CAR-NK疗法在很多临床前及临床试验中有所应用<sup>[11-13]</sup>。

安全高效的基因转导是实现基因治疗的关键。研究<sup>[14]</sup>发现,用携带CAR的纳米载体原位激活T细

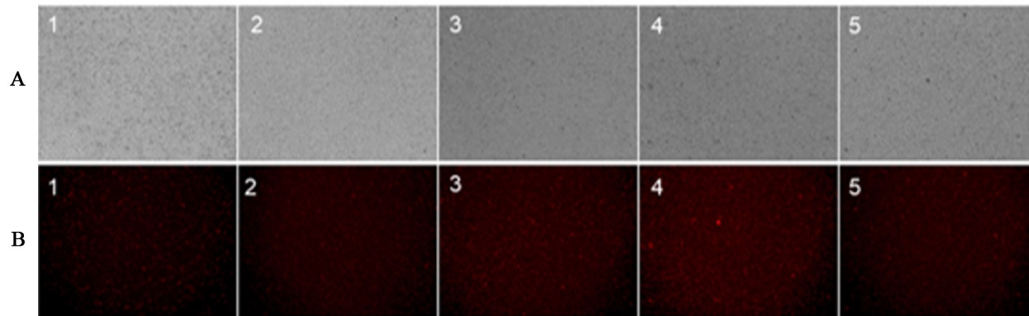
胞,靶向杀伤白血病细胞,可实现疾病的长期缓解。阳离子聚合物纳米载体负载基因的主要机制是静电吸附作用,其本身带正电荷,可与表面带负电荷的DNA结合,使其免受DNA酶降解<sup>[15]</sup>。本研究中PAEF含有还原敏感的二硫键,当复合物进入细胞内,细胞质中的谷胱甘肽等还原性蛋白酶将二硫键还原成巯基,使聚合物发生降解,促进DNA的释放。检测发现PAEF/DNA复合物粒径均在100~200 nm之间,具有中性正电位,适于细胞对复合物的胞吞,PAEF/DNA复合物在N/P值20时可完全包裹DNA,加入还原剂DTT后能明显看到条带泳出,说明PAEF/DNA复合物在还原环境能快速释放DNA,实现基因高效转导,同时,即使PAEF/DNA复合物N/P值高达100时,细胞存活率仍明显高于脂质体,因此该纳米材料细胞毒性弱,具有很好的应用前景。

PiggyBac转座子/转座酶系统是一种非病毒基因转导方法,在多种物种中具有较高的转座活性,其转座形式属“剪切-粘贴”机制,其优势在于:(1)转座效率高;(2)负载容量大(可长达100 kb);(3)插入基因可长期稳定表达;(4)可实现“无缝切除”。相对于病毒基因转导方法,PiggyBac转座子系统具有高生物安全性、高运载能力、高转座效率等优点,在细胞免疫疗法中具有很大潜力。目前,正在开发针对多种人类疾病的相关细胞如hESCs<sup>[16]</sup>、hiPSCs<sup>[17]</sup>、HSCs<sup>[18]</sup>和人T细胞等的修饰。利用PiggyBac转座子修饰T细胞、NK细胞的免疫治疗也在尝试之中<sup>[19-20]</sup>。本研究利用纳米+PiggyBac转座子将EGFRvIII-CAR导入

NK-92 细胞, 传代培养 10 d 后仍能保持与初始检测 (83.4%) 相似的红色荧光表达, 说明转座效率和外源基因的稳定表达。

本研究表明, PAEF/DNA 复合物对 NK 细胞的良

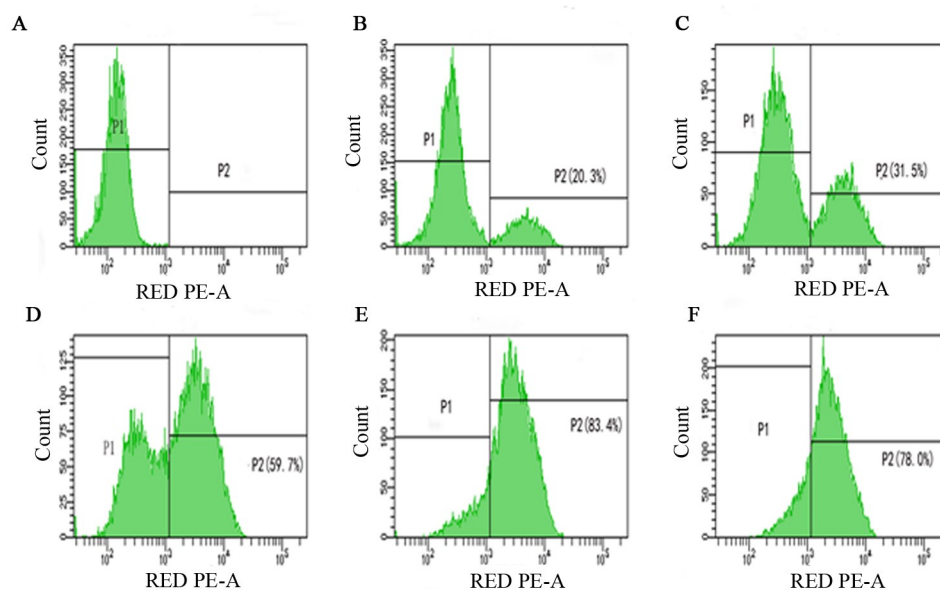
好转染效率, 建立了基于纳米载体的 PiggyBac 转座子介导的 NK 细胞基因转导方法, 实现了较高的基因转导效率, 为肿瘤过继免疫治疗基因转导提供了试验依据。



A: Observation under light microscope; B: Observation under a fluorescence microscope;  
1-5: PAEF/DNA complexes with N/P ratios of 20, 40, 60, 80 and 100 respectively

图4 不同N/P值条件下PAEF/DNA对NK-92细胞的转染效率( $\times 10$ )

Fig.4 Transfection efficiency of PAEF/DNA at various N/P ratios into NK-92 cells ( $\times 10$ )



A: Blank control; B-F: PAEF/DNA complexes with N/P ratios of 20, 40, 60, 80 and 100 respectively

图5 流式细胞术检测不同N/P值条件下PAEF/DNA复合物对NK-92的转染效率

Fig.5 Transfection efficiency of PAEF/DNA at various N/P ratios into NK-92 cells by Flow cytometry

## [参考文献]

- [1] BAIR S M, PORTER D L. Accelerating chimeric antigen receptor therapy in chronic lymphocytic leukemia: the development and challenges of chimeric antigen receptor T-cell therapy for chronic lymphocytic leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(S1): S10-S17. DOI:10.1002/ajh.25457.
- [2] RHODES J M, SCHUSTER S J. Chimeric antigen receptor T cells in chronic lymphocytic leukemia: are we any closer to a cure?[J]. *Cancer J*, 2019, 25(6): 436-441. DOI:10.1097/PPO.0000000000000409.
- [3] BROWER V. First chimeric antigen receptor T-cell therapy approved [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(11): djx251[2019-08-27]. DOI: 10.1093/jnci/djx251.
- [4] 石璐璐, 韩双印. 成胶质细胞瘤 CAR-T 免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(4): 321-328. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.001.
- [5] ZHAO S, JIANG E Z, CHEN S S, et al. PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(1): 120-125. DOI:10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05.
- [6] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(1): 64-73. DOI:10.1056/nejmra1706169.
- [7] YING Z T, HUANG X F, XIANG X Y, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 947-953. DOI: 10.1038/s41591-019-0421-7.
- [8] OLSON J A, LEVESON-GOWER D B, GILL S, et al. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T

- cells while retaining GVT effects[J]. *Blood*, 2010, 115(21): 4293-4301. DOI:10.1182/blood-2009-05-222190.
- [9] SHAFFER B C, HSU K C. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation?[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2016, 29(4): 351-358. DOI:10.1016/j.beha.2016.10.010.
- [10] 姜鑫, 朱双阔, 郑海丽, 等. 抗CD19嵌合受体修饰的NK-92细胞的构建及其对CD19阳性非霍奇金淋巴瘤细胞的杀伤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 767-771. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.003.
- [11] CHU Y Y, YAHR A, HUANG B, et al. Romidepsin alone or in combination with anti-CD20 chimeric antigen receptor expanded natural killer cells targeting Burkitt lymphoma in vitro and in immunodeficient mice[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(9): e1341031[2019-08-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599075/>. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1341031.
- [12] HAN J F, CHU J H, KEUNG CHAN W, et al. Car-engineered NK cells targeting wild-type EGFR and EGFRvIII enhance killing of glioblastoma and patient-derived glioblastoma stem cells[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11483[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496728/>. DOI:10.1038/srep11483.
- [13] WANG W X, JIANG J T, WU C P. Car-NK for tumor immunotherapy: clinical transformation and future prospects[J/OL]. *Cancer Lett*, 2019: S0304-S3835(19)30588-9[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31790761>. DOI:10.1016/j.canlet.2019.11.033.
- [14] SMITH T T, STEPHAN S B, MOFFETT H F, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers[J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(8): 813-820. DOI: 10.1038/nnano.2017.57.
- [15] PANYAM J, ZHOU W Z, PRABHA S, et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery[J]. *FASEB J*, 2002, 16(10): 1217-1226. DOI:10.1096/fj.02-0088com.
- [16] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1[J]. *Science*, 2003, 302(5644): 415-419. DOI:10.1126/science.1088547.
- [17] KAJI K, NORRBY K, PACA A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 771-775. DOI:10.1038/nature07864.
- [18] GRABUNDZIJA I, IRGANG M, MÁTÉS L, et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(6): 1200-1209. DOI:10.1038/mt.2010.47.
- [19] NAKAZAWA Y, HUYE L E, DOTTI G, et al. Optimization of the PiggyBac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes[J]. *J Immunother*, 2009, 32(8): 826-836. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ad762b.
- [20] WANG J, LUPO K B, CHAMBERS A M, et al. Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73<sup>+</sup> solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 136[2019-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6278070/>. DOI:10.1186/s40425-018-0441-8.

[收稿日期] 2019-08-29

[修回日期] 2020-02-10

[本文编辑] 黄静怡