

腺相关病毒载体在眼病基因治疗中的应用及研究进展

丁芝祥¹, 谭 浅²

基金项目: 中国广西自然科学基金资助项目 (No. 0899004)
作者单位: ¹(541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科; ²(410008) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院眼科
作者简介: 丁芝祥, 男, 主治医师, 博士, 研究方向: 白内障的基础与临床。
通讯作者: 谭浅, 女, 教授, 博士, 研究方向: 白内障的基础与临床. tanqian99@yahoo. com. cn
收稿日期: 2009-05-04 修回日期: 2009-05-20

Progress in gene therapy for eye diseases using adeno-associated virus as a vector

Zhi-Xiang Ding¹, Qian Tan²

Foundation item: Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 0899004)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

Correspondence to: Qian Tan. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China. tanqian99@yahoo. com. cn

Received: 2009-05-04 Accepted: 2009-05-20

Abstract

• Adeno-associated virus (AAV) is a member of the parvoviridae, and eleven serotypes have been discovered. AAV as gene transfer vector has become a hot spot in gene therapy for eye diseases because of its safety, broad host range, low immunogenicity and long-term expression of therapeutic gene. The following factors may influence on gene transfer in eye: AAV vector serotypes, the pathways of gene transfer and tissue-specific promoters etc. we reviewed the new progression in gene therapy using AAV as a vector for retinal diseases, glaucoma and corneal diseases.

• KEYWORDS: adeno-associated virus; vector; gene therapy

Ding ZX, Tan Q. Progress in gene therapy for eye diseases using adeno-associated virus as a vector. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1125-1127

摘要

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 属微小病毒科, 目前有 11 种血清型。AAV 作为基因转移载体具有安全性好、宿主范围广、免疫原性低和携带的治疗基因长期表达等优势而成为眼病基因治疗研究的热点。影响 AAV 载体在眼部基因转移的因素包括 AAV 载体的血清型、基因转移途径、组织特异性启动子等。以 AAV 为载体的基因转移在视网膜疾病、青光眼、角膜病的基因治疗研究中取得了新的进展。

关键词: 腺相关病毒; 载体; 基因治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 06. 038

丁芝祥, 谭浅. 腺相关病毒载体在眼病基因治疗中的应用及研究进展. *国际眼科杂志* 2009;9(6):1125-1127

0 引言

二十世纪八十年代以来, 基因治疗已经应用到许多眼部疾病的研究中。腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体作为基因转移载体具有安全性好、宿主范围广、免疫原性低和携带的治疗基因长期表达等优势而成为眼病基因治疗研究的热点, 部分研究已进入临床试验阶段。本文对 AAV 的分子生物学特点、影响 AAV 载体在眼部基因转移的因素、AAV 载体在眼部疾病基因治疗中的应用及进展作一综述。

1 AAV 及其载体的分子生物学特点

1.1 AAV 的生物学特性 AAV 属于微小病毒科 (Parvoviridae)、依赖病毒属 (Dependovirus), 是一种微小、无被膜及具有二十面体结构的病毒。病毒颗粒的直径在 20 ~ 26nm 之间, 含有 4.7kb 大小的线状单链 DNA 基因组。从鸟类到许多哺乳动物 (包括人) 的体内已分离到至少 11 种血清型 AAV (AAV1 ~ AAV11)^[1]。从人体中分离到的 AAV2 是研究最清楚的一种 AAV。人群中 AAV 感染率很高, 85% 人呈血清抗体阳性, 但尚未发现该病毒是任何疾病的致病因素^[2]。AAV2 的生活周期有两种不同的胞内期。在无辅助病毒存在时, AAV2 病毒颗粒进入细胞, 脱衣壳后 AAV2 的调节蛋白发生有限的表达, 并抑制病毒基因的进一步表达和病毒 DNA 的复制。这种负调节作用的结果是促进病毒基因组整合到宿主的基因组中建立潜伏感染。野生型 AAV 能特异地定位整合至人类 19 号染色体 S1 位点上且无插入突变^[3]。AAV2 生活周期的另一种胞内期是产毒性感染, 往往在有辅助病毒 (腺病毒或疱疹病毒) 感染时发生。辅助病毒的感染可以在 AAV 感染之前、同时或之后进行。

1.2 AAV 和重组 AAV 的基因组结构和功能 AAV2 的基因组为 4681 个核苷酸的单链 DNA, 正链和负链 DNA 均可以相同的效率被包装到 AAV2 病毒颗粒中。基因组的两端为 145bp 的末端倒转重复序列 (inverted terminal repeat, ITR)。ITR 序列之间为 AAV 病毒的编码区, 左侧的开放阅读框架 (open reading frames, ORF) 编码 4 种 Rep 蛋白; 右侧的 ORF 编码 3 种 Cap 蛋白。ITR 序列是 AAV 病毒的复制、整合、拯救和包装所必需的顺式作用元件, 研究表明^[4], ITR 具有转录启动子的活性。rep 基因编码至少 4 种非结构蛋白: Rep78, Rep 68, Rep 52, Rep 40。Rep 蛋白的表达对 AAV 病毒从整合状态的拯救、各种 AAV 基因的表达和 AAV DNA 的复制都是必需的, 亦证明 Rep 蛋白的表达与位点特异性整合密切相关。Rep52 和 Rep40 参与了病毒的装配, 它们在病毒双链 DNA 合成中是不需要的, 但在单链 DNA 和病毒颗粒的累积中则是必需的。cap 基因编码 3 种衣壳蛋白 VP1, VP2 和 VP3, 分子量分别为 87, 73 和 61kDa, 在成熟病毒颗粒中的比例约为 1:1:10。

全部3种衣壳蛋白都是产生感染性病毒颗粒所必需的。重组AAV由野生型AAV用报告基因或治疗基因取代病毒编码序列(rep和cap),仅保留两端很短的ITR序列,因此重组AAV包装外源基因的容量<4.7kb。重组AAV不含产生细胞免疫反应的病毒基因,一般不会诱发炎症反应。目前各种血清型AAV载体的通常是“杂合”载体,即使用AAV2的ITR以及全部或部分AAV2的rep蛋白,只是换上其它血清型AAV的cap蛋白,就可以得到具有各血清型的感染特征的杂合AAV载体。比如AAV2/1,具有AAV2的ITR和AAV1的外壳,所以感染特性与AAV1一致。这种方法大大简化了AAV载体“换壳”的过程,同时使用研究较清楚且经过临床检验了安全性的AAV2的ITR,可以避免使用其它血清型的ITR可能带来的风险。

2 影响 AAV 载体在眼部基因转移的因素

2.1 AAV 载体的血清型 目前应用于眼部基因转移的 AAV 至少有 9 种血清型,它们主要区别在衣壳蛋白的不同,并因此导致各种血清型 AAV 对不同的组织和细胞有不同的感染效率。Acland 等^[5]研究证明,无论在大鼠视网膜下或玻璃体内注射 AAV1, AAV2, AAV5 载体均可有效转染光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞,并表达所携带的 GFP 基因。但 AAV2, AAV5 表达部位位于光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞,而 AAV1 则特异集中于视网膜色素上皮细胞层。Yang 等^[6]还发现, AAV5 在视网膜的表达早于 AAV2, 并且感染效率和表达水平要高于 AAV2 约 30 倍左右。Allocca 等^[7]的研究表明, AAV2/9 载体能有效转染 Müller 细胞, AAV2/7 载体和 AAV2/8 载体对小鼠光感受器的转染效率比 AAV2/5 高 6~8 倍。而 Liu 等^[8]证实 AAV1 载体和 AAV8 载体对兔或人角膜上皮的转染效率高于 AAV2, AAV5 和 AAV7。

2.2 AAV 载体的基因转移途径 AAV 载体介导的眼部基因转移途径依治疗目的不同主要有玻璃体腔注射、视网膜下注射、前房注射、结膜下注射等。研究表明^[9,10],在多种动物模型中, AAV 载体玻璃体腔注射主要转染神经节细胞和 Müller 细胞,会产生针对 AAV 衣壳蛋白的体液免疫反应,这种反应可阻碍再次注射时 AAV 的表达;视网膜下注射主要转染视网膜色素上皮细胞和光感受器细胞,不会触发体液免疫反应,对另 1 眼再次视网膜下注射也无影响,说明视网膜下腔对眼球的免疫赦免特性起着重要作用。Tsai 等^[11]发现,前房注入 AAV 载体后,可通过玻璃体腔注射脂多糖诱发炎症反应而激活报告基因在角膜内皮细胞的表达,转染效率 91.3%, 15d 后炎症反应消退,基因表达水平降至 3.4%。AAV 载体可通过再次注射脂多糖而激活。而结膜下注射 AAV 载体,转移基因主要表达于眼外肌的肌纤维,而结膜、角膜、巩膜、脉络膜、视网膜无表达^[12]。

2.3 组织特异性启动子 AAV 载体携带的治疗基因编码系列的表达受上游增强子-启动子调控,因此利用合适的组织特异性转录调控序列可用来提高 AAV 载体的靶向转导能力。目前研究中应用的调控序列包括:人视网膜色素上皮(hRPE65)启动子、小鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子、视蛋白(Opsin)启动子、视紫质(Rhodopsin)启动子等。

3 AAV 载体在眼病基因治疗中的应用

3.1 AAV 载体在视网膜疾病基因治疗中的应用 近年来,以 AAV 为基因转移载体的基因治疗,为遗传性视网膜疾病如视网膜色素变性、Leber 先天性黑矇以及缺血性视网膜疾病等的治疗带来了希望。

3.1.1 AAV 介导的基因替代疗法 某些遗传性视网膜变性是由于某一基因变异、功能缺陷而产生的一组视网膜疾

病。对于这种类型疾病,把正常基因导入视网膜靶细胞,产生正常的基因表现型稳定表达即可。Ali 等^[13]在视网膜色素变性 rds 小鼠模型中首先获得成功,这种动物光感受器细胞不能形成外节,由于渐进性的光感受器细胞死亡而导致早期视网膜功能丢失和变性。AAV 载体转移外周蛋白至视网膜后,功能和形态学研究表明光感受器外节修复,形成了正常的盘结构,然而这项实验没能中止变性过程,早期的改善随着时间而消失^[14]。而 Narfström 等^[15]将 rAAV2-RPE65 注入 RPE65 基因敲除狗的视网膜下腔,3mo 后观察,转基因导致狗的视力改善,眼球震颤明显减轻,ERG 检查显示暗适应 b 波振幅恢复到正常的 28%,明适应恢复到正常的 32%,随访 6~9mo, ERG 振幅无下降,免疫组化检测显示 RPE65 在视网膜色素上皮细胞表达;同时,75% 眼观察到葡萄膜炎,认为这是由于 RPE65 分子导致的免疫原性反应。最近,英国研究者对 3 例 RPE65 基因变异导致的 Leber 先天性黑矇患者进行了一项临床试验,他们将 rAAV2-hRPE65-RPE65 注入一侧患眼视网膜下腔,观察 6~12mo,未见眼部的不良反应,病毒无眼外扩散,3 例均未检测到有临床意义的视力提高和周边视野的改善,但 1 例患者的微视野检查及暗适应视野检查显示视网膜光敏感度提高,障碍试验提示视觉活动能力得到改善^[16]。

3.1.2 AAV 介导的基因阻断疗法 某些常染色体显性视网膜色素变性的原因是某些基因变异在光感受器产生了异常蛋白或者基因产物错位表达,对光感受器产生毒性作用,进而通过凋亡途径诱导细胞死亡。因此,治疗这类疾病可以通过消除或矫正错误基因来挽救视功能。核酶(ribozyme)是一种具有催化活性的 RNA 酶,能够识别特异性基因片段并灭活其表达,从而消除异常基因产物。Gorbatyuk 等^[17]在 P23H 基因突变鼠的视网膜下注射携带独立等位基因核酶 Rz525 的 rAAV2/5 载体,12wk 后检测显示能显著保护实验眼暗适应 ERG 的 a 波和 b 波的振幅,RT-PCR 分析表明 P23H 鼠视紫质 mRNA 减少 46%,视网膜结构分析表明基因转移能阻止视网膜外核层的变性。

3.1.3 AAV 介导的抗新生血管研究 增生性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变、老年性黄斑变性等疾病导致视网膜脉络膜微环境不稳定,诱导视网膜和脉络膜新生血管形成,最终导致视力丧失。Wang 等^[18]将携带 VEGF 的 rAAV 载体注入 SD 大鼠视网膜下间隙,VEGF 在视网膜及视网膜色素上皮细胞表达时间长达 20mo,组织病理学检查显示,有强烈的视网膜下新生血管形成,光感受器变性、色素上皮增殖,95% 发生脉络膜新生血管。该实验成功建立了长时间持续发生脉络膜新生血管的动物模型,为研究抗血管形成抑制剂提供了有利模型。Mori 等^[19]在 C57BL/6 小鼠玻璃体腔或视网膜下注射携带色素上皮衍生因子(PEDF)的 AAV 载体,然后制作脉络膜新生血管模型,4~6wk 后观察发现脉络膜新生血管的面积显著减少,提示 AAV 可介导 PEDF 或其他抗血管因子可抑制眼内新生血管的发生。

3.1.4 AAV 介导抗凋亡因子和其它生长因子 bcl-2 家族是应用广泛的抑制凋亡的基因,已被证实可以通过抑制线粒体释放细胞色素 C 而阻断感光细胞的凋亡。研究者把携带 bcl-xL 的 AAV 载体注射到生后 21d 的 RCS 大鼠的视网膜下,4wk 后发现注射 AAV-bcl-xL 的视网膜的外核层比对照组的外核层明显增加,ERG 的 b 波振幅是 $102 \pm 27 \mu V$, 对照组是 $14 \pm 8 \mu V$, 而 a 波振幅与对照组无差异^[20]。Wu 等^[21]将携带胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的 rAAV 载体行大鼠玻璃体腔注射,3wk 后制作视网膜缺血再灌注

损伤,1wk 后用免疫组化、ELISA 观察到 GDNF 的表达,病理学检查显示视网膜内层厚度和神经节细胞受到显著的保护,再灌注 7d 后,实验组神经节细胞凋亡率显著低于对照组,实验证明 AAV 载体介导 GDNF 转移视网膜有利于保护视网膜缺血性损伤。目前,AAV 载体介导视网膜基因转移的生长因子和抗凋亡因子还有睫状体源性神经营养因子(CNTF)、过氧化氢酶(CATALASE)等。

3.2 AAV 载体在青光眼基因治疗中的应用 青光眼视神经病变中视力损害主要是由于视网膜神经节细胞凋亡丢失所致。近几年来,研究者试图通过基因治疗方法保护青光眼视网膜神经节细胞功能。Martin 等^[22]将脑源性神经营养因子(BDNF)和肝炎病毒转录后调控原件(WPRE)构建到重组 AAV 的载体中,将上述重组病毒注入小鼠玻璃体腔,2wk 后用激光制作实验性高血压模型,4wk 后计算视神经通过筛板的轴突量,轴突丢失率为 32.3%,而对照组轴突丢失率为 52.3%,证明通过 AAV 载体基因转移使视网膜高表达 BDNF 能有效拯救神经节细胞的数量。Zhou 等^[23]的研究表明,在 DBA/2J 小鼠的玻璃体腔注入 AAV-PEDF 病毒,可通过抗炎作用显著减少神经节细胞的丢失和延缓视功能的衰退。最近,Borras 等^[24]用 rAAV-GFP 和 DeltaE1/E3 腺病毒共转染体外培养人小梁网细胞,首次证明 AAV 能有效转导小梁网细胞,其机制可能是通过形成自我互补 AAV(scAAV)。这项研究为利用 AAV 载体介导基因长期表达的特点用于青光眼长期眼压控制提供了新的探索。

3.3 AAV 介导的角膜基因转移 以前角膜基因转移的载体主要集中在腺病毒,但近几年来,研究者开始重视 AAV 载体在角膜病基因治疗中的研究。而 Lai 等^[25]用 ss-rAAV2-CMV-GFP 转染体外培养的角膜组织,在 31℃ 含生长因子的培养基中培养 2wk,研究发现表达 GFP 的角膜内皮细胞达 90% 以上,推测培养环境可以显著提高 rAAV 对角膜内皮细胞的转染效率。汤明芳等^[26]证实 1 型腺相关病毒载体可有效介导增强型绿色荧光蛋白基因在体内、外转染大鼠角膜基质细胞,为 AAV 介导目的基因转染角膜基质细胞治疗角膜病变提供了理论依据。而在治疗性研究中,Cheng 等^[12]利用重组 AAV 介导的血管生成抑制剂 angiostatin 采用结膜下注射的方式成功抑制 SD 大鼠碱烧伤模型角膜新生血管的形成。此外,研究者^[27]利用 AAV2 载体介导报告基因转染体外培养兔晶状体上皮细胞,并证实 AAV 载体可介导自杀基因抑制晶状体上皮细胞的增殖,为后囊膜混浊的基因治疗提供新的基因转移途径。

4 展望

近年来的研究表明,重组 AAV 载体是眼部疾病基因治疗中最有应用前景的基因转移载体。进一步深入研究 AAV 的病毒生物学基础,选择对特定靶细胞有亲嗜性的 AAV 血清型或 AAV 杂合体,设计更多的组织特异性启动子以提高 AAV 载体的转染效率、靶向能力和安全性将为人眼眼部疾病的基因治疗带来新的曙光。

参考文献

- 1 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects; recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Therapy* 2004;11(10):805-810
- 2 Erles K, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies(IgG and IgM) to adeno-associated virus(AAV). *J Med Virol* 1999;59(3):406-411
- 3 Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus(AAV)into human chromosome 19. *EMBO J* 1991;10(12):3941-3950
- 4 Flotte TR, Afione SA, Solow R, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 1993;268(5):3781-3790

- 5 Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005;12(6):1072-1082
- 6 Yang GS, Schmidt M, Yan Z, et al. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus; effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 2002;76(15):7651-7660
- 7 Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, et al. Novel Adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 2007;81(20):11372-11380
- 8 Liu J, Saghizadeh M, Tuli SS, et al. Different tropism of adenoviruses and adeno-associated viruses to corneal cells; implications for corneal gene therapy. *Mol Vis* 2008;14:2087-2096
- 9 Auricchio A. Pseudotyped AAV vectors for constitutive and regulated gene expression in the eye. *Vision Res* 2003;43(8):913-918
- 10 Li QH, Miller R, Han PY, et al. Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol Vis* 2008;14:1760-1769
- 11 Tsai ML, Chen SL, Chou PI, et al. Inducible adeno-associated virus vector-delivered transgene expression in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):751-757
- 12 Cheng HC, Yeh SI, Tsao YP, et al. Subconjunctival injection of recombinant AAV-angiostatin ameliorates alkali burn induced corneal angiogenesis. *Mol Vis* 2007;13:2344-2352
- 13 Ali RR, Sarra GM, Stephens C, et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 2000;5(3):306-310
- 14 Sarra GM, Stephens C, Alwis M, et al. Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet* 2001;10(21):2353-2361
- 15 Narfström K, Katz ML, Bragadottir R, et al. Functional and Structural Recovery of the Retina after Gene Therapy in the RPE65 Null Mutation Dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1663-1672
- 16 Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358(21):2231-2239
- 17 Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, et al. Preservation of Photoreceptor Morphology and Function in P23H Rats Using an Allele Independent Ribozyme. *Exp Eye Res* 2007;84(1):44-52
- 18 Wang F, Rendahl KG, Manning WC, et al. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(2):781-790
- 19 Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):1994-2000
- 20 Surace EM, Auricchio A. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(6):705-719
- 21 Wu WC, Lai CC, Chen SL, et al. GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats. *Mol Vis* 2004;10(1):93-102
- 22 Martin KG, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection; retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4357-4365
- 23 Zhou XH, Li F, Kong L, et al. Anti-inflammatory effect of pigment epithelium-derived factor in DBA/2J mice. *Mol Vis* 2009;15:438-450
- 24 Borras T, Xue W, Choi VW, et al. Mechanisms of AAV transduction in glaucoma-associated human trabecular meshwork cells. *J Gene Med* 2006;8(5):589-602
- 25 Lai L, Lin K, Foulks G, et al. Highly efficient ex vivo gene delivery into human corneal endothelial cells by recombinant adeno-associated virus. *Curr Eye Res* 2005;30(3):213-219
- 26 汤明芳,陆晓和,周瑾,等.腺相关病毒-1 介导增强型绿色荧光蛋白基因在大鼠角膜基质细胞体内、外转染的研究. *国际眼科杂志* 2007;7(6):1551-1554
- 27 丁芝祥,谭浅,刘双珍,等. HSV1-TK 基因重组腺相关病毒载体的构建及表达. *中南大学学报(医学版)* 2008;33(3):210-215