

腺相关病毒的研究进展及在动脉粥样硬化防治中的作用

程鹏, 王毅, 冯登, 郑江华

(川北医学院附属医院血管外科, 四川 南充 637000)

摘要: 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是导致心血管疾病的主要原因, 其导致的患病率及死亡率的持续上升使得AS成为研究热点。腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 作为基因治疗的载体, 可长效稳定地表达外源基因, 因具有无致病性、低免疫原性、感染范围广及可定点整合至宿主基因组等优点而被广泛应用于基因治疗中。本文就腺相关病毒 (AAV) 的构建、转染、动脉粥样硬化及其高危因素的基因治疗进行综述。

关键词: 基因治疗; 腺相关病毒; 动脉粥样硬化; 防治

中图分类号: R54 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1671-3141.2023.9.001

本文引用格式: 程鹏, 王毅, 冯登, 等. 腺相关病毒的研究进展及在动脉粥样硬化防治中的作用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2023, 23(9): 1-4.

Progress of Adeno-Related Virus and Its Role in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis

CHENG Peng, WANG Yi, FENG Deng, ZHENG Jiang-hua[△]

(Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong Sichuan 637000)

ABSTRACT: Atherosclerosis (AS) is the main cause of cardiovascular disease, and its continuous increase in prevalence and mortality makes AS a research hotspot. Adeno-associated virus (AAV), as the vector of gene therapy, can stably express foreign genes for a long time, it is widely used in gene therapy because of its non pathogenicity, low immunogenicity, wide infection range and site integration into host genome. This article reviews the construction and transfection of adeno-associated virus (AAV), gene therapy of atherosclerosis and its high risk factors.

KEY WORDS: gene therapy; adeno-related virus; atherosclerosis; prevention and cure

0 引言

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 作为基因治疗的载体, 可长效稳定地表达外源基因, 因具有无致病性、低免疫原性、感染范围广及可定点整合至宿主基因组等优点而被广泛应用于基因治疗中。本文对AAV进行了概述并详细总结了AAV的生产及转染, 以及AAV介导的基因疗法治疗动脉粥样硬化及其风险因素。

1 腺相关病毒概述

1.1 腺相关病毒的分子结构

AAV是一种小型的, 由一个单链4680k核苷酸基因组包装成的一个无包膜的二十面体衣壳的单链DNA病毒。它的单链基因组包含三个基因: Rep (复制)、Cap (衣壳) 和Aap (组装)。Rep、Cap两侧是两个145 bp的反向末端重复序列 (ITR), 其中包含复制和包装rAAV

基金项目: 四川省卫生厅基金项目 (10035); 川北医学院附属医院院内基金项目 (2020ZD012)。

作者简介: 程鹏, 硕士研究生, 研究方向: 动脉粥样硬化的基础与临床研究。

△通信作者: 郑江华, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 动脉粥样硬化的基础与临床研究。

载体所需的野生型AAV的唯一元素^[1]。有研究表明,只有145 bp的AAV ITRs是重组AAV (rAAV) 繁殖所必需的,它能诱导转基因表达,并在载体生产和确保细胞持续转导中发挥重要作用。

1.2 腺相关病毒的血清分型

迄今为止,已有13种人类和猿猴起源的AAV血清型被描述并评估用于体内转染(AAV1-13)。尽管AAV血清型在其衣壳中约有60%-99%的同一性,但是它们表现出广泛的组织转染倾向性,并且在转染效率上存在显著差异,并通常表现出低免疫原性和持续的转基因表达,其中AAV12能与体内唾液腺、肌肉高效结合,AAV6、AAV9展现出了对心脏的高效结合。然而,除了这13种衣壳血清型外,还有数百种自然产生的分离株,它们在中和抗体存在时也有自己独特的组织取向性和反应性。

1.3 腺相关病毒载体的生物学功能及特点

AAV属于细小病毒科的依赖细小病毒属,基于其多种功能特点,例如:(1)可作用于广泛的靶细胞/组织类型;(2)所传递基因相关的安全性较高;(3)可选择性的全身与局部使用;(4)组织特异性或组成性活性启动子的使用;(5)可长效稳定地表达外源基因;(6)具有无致病性;(7)低免疫原性和感染多种细胞等,因此选择特定AAV作为基因转移载体,并广泛应用于基因表达载体的构建及基因治疗。

2 腺相关病毒载体的生产及转染

2.1 质粒转染系统

Hermonat 等研究最先发现,AAV可能是一种有用的哺乳动物转染载体,并用二质粒加腺病毒感染的方法制备出了rAAV,即一个质粒包含Rep基因、ITR和外源基因,另一个质粒包含Cap基因,将2个质粒转染用Ad感染过的细胞就能够大量表达外源基因。5年后,Samulski等改进了这种方法,用2个质粒瞬时共转染HeLa 293

细胞,这是一种携带所需基因的表达盒,其两侧带有ITRs,另一个包含病毒的Rep和Cap基因(pTrans),加入Ad之后就能生产rAAV,从而出现了通过二质粒加Ad的方法生产rAAV。与AAV载体生产更相关的转染方法包括以下几种:(1)DNA与磷酸钙共沉淀;(2)聚阳离子,如聚乙烯亚胺(PEI);(3)阳离子脂质。

2.2 稳定细胞系

AAV包装和生产者细胞系非常适合大规模rAAV生产。生产细胞系的基因组中整合了rAAV生产所需的所有成分,即Rep和Cap基因,以及含有所需转基因表达盒的载体基因组。需要感染辅助病毒(通常为野生型Ad5)来诱导rAAV的产生。包装细胞系也含有AAV Rep和Cap基因,它们是由辅助病毒感染诱导的,但载体基因组是在生产单独的重组病毒时引入的。袁等建立了基于人类293细胞的AAV产生细胞系。这些细胞含有高度可诱导的AAV Rep和Cap基因以及腺病毒E1A/E1B基因,能够利用E1A/E1B感染性腺病毒发挥辅助功能。考虑到E1A/E1B缺陷型腺病毒的安全性优于野生型腺病毒,且具有更高或等效的载体产量,所以目前已被广泛用作人类基因治疗载体。

2.3 昆虫细胞杆状病毒表达载体系统(insect baculovirus expression vector system, IC-BEV)

自第一个成功的家蚕连续昆虫细胞系建立以来,昆虫细胞杆状病毒表达载体系统(IC-BEVS)成为了重组蛋白表达在研究和临床应用中的主力,并且因广泛表达重组蛋白的能力而迅速流行,例如酶、糖蛋白、重组病毒和疫苗。从1992年Ruffing等人报告杆状病毒介导的AAV Cap基因传递、VP蛋白表达和昆虫细胞中的衣壳组装,到2002年Urabe等人首次报道的在昆虫细胞中产生功能性rAAV2载体,均证实了昆虫细胞可以腺相关病毒产生的合适宿主。Aslanidi等人报告的由杆状病毒诱导的稳定Sf9包装细胞组成中含有Rep2(AAV2 Rep)和CapX(X:感兴趣的血清型)基因,用携带ITR侧翼转基因盒

的单一杆状病毒载体感染这些细胞，可以导致AAV蛋白的诱导和扩增表达，与三种Bac相比，AAV2载体颗粒的细胞特异性产量高出10倍。

2.4 转染途径

基因治疗正在成为一个可以实现的临床目标，而传统的基因转染方式（小鼠尾静脉或腹腔注射）会同时转染不同器官的相同组织类型（如血管平滑肌，肠管平滑肌），且无法使目标器官的转染均匀分布，从而降低靶器官的转染浓度和效率，导致靶器官外的转染，引起副作用。在心血管疾病的使用中，Remes等^[2]发现海藻酸盐水凝胶能有效递送靶向血管的AAV载体进入目标主动脉壁的血管平滑肌，并且不造成血清和主动脉壁的炎症反应，不转染其他器官和组织。

3 AAV介导的基因疗法治疗动脉粥样硬化及其风险因素

3.1 高脂血症

高胆固醇血症是一种未得到充分诊断和治疗的遗传性疾病，此类患者的循环低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol, LDL-C）水平较高，因此患动脉粥样硬化性心血管疾病的风险较高。患有严重高胆固醇血症[如纯合子家族性高胆固醇血症（familial hypercholesterolemia, FH）]的患者可能在出生后的头十年就出现急性心血管事件，其中FH可分为纯合型FH（HoFH，两个等位基因均发生突变）和杂合型FH（HeFH，一个等位基因发生突变）。虽然治疗性单采术反复物理去除多余的LDL或原位肝移植是确保HoFH患者存活的可行方案。但这些手术费时费力，费用昂贵，且停药率高。因此，为了此类医疗需求得到满足。越来越多学者对此进行了研究，目前遗传学研究已经证实，大多数FH患者在低密度脂蛋白受体（low density lipoprotein receptor, LDLR）、前蛋白转化酶枯草杆菌素/酮新9型（proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9）

和载脂蛋白B（apolipoprotein B, APOB）编码区携带致病性变体。Wang等人^[3]利用源性嵌合肝小鼠模型在原代人肝细胞中证明了类似的靶向核酸酶活性，实现了肝脏中敲除PCSK9的可能性和安全性及PCSK9的长期持续降低，表明靶向体内基因的破坏具有持久的治疗效果。Zhao等人^[4]利用规则间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）/Cas9（使用AAV8血清型在肝脏中实现靶向传递）通过基因编辑寻找FH的新治疗策略，证实了体内AAV-CRISPR/Cas9介导的LDLR基因校正可以挽救LDLR的表达，并有效改善LDLR突变体中的动脉粥样硬化表型，为FH及AS患者的治疗提供了一种潜在的治疗方法。

3.2 AAV与糖尿病

糖尿病是一种常见的代谢性疾病，目前全球患病率超过4亿，到2030年，糖尿病患者数量预计将增加50%以上。其中2型糖尿病是成年人中主要的糖尿病类型。目前的治疗策略主要是通过限制血糖水平的慢性升高来降低心血管风险，除慢性药物治疗外，还可通过改变生活方式来实现。成纤维细胞生长因子21（fibroblast growth factor 21, FGF21）最近也被认为是治疗T2D的一种有前途的药物^[5]，其药代动力学特性较差这一特性使得实现这种蛋白质持续循环水平的基因治疗成为了可能。内皮修复缺陷和血管生成障碍的内皮功能障碍也是糖尿病相关心血管疾病发病机制中的一个重要因素，Niu等^[6]描述了二甲双胍通过以GLI1依赖的方式激活Hh信号通路来下调HGF触发的自噬，在减轻高血糖诱导的内皮功能障碍方面发挥了新的作用，这表明二甲双胍在预防动脉粥样硬化中起作用。

3.3 AAV与心力衰竭

如果一级和二级预防策略失败，动脉粥样硬化斑块会导致动脉狭窄甚至闭塞，导致缺血、缺氧、营养缺乏，甚至是心肌梗死和/或心力衰竭的发生。心力衰竭是一个相当严重的全球公共卫生问题，世界上几乎每个地区的患病

率都在上升。关于从心肌影响心脏功能方面，许多研究揭示了活化T细胞核因子（nuclear factor of activated T cells, NFAT）在心肌肥厚发展中的重要作用，其中钙调神经磷酸酶NFAT途径的心脏特异性激活足以诱导心肌肥大^[7]，例如：Anca Remes等^[8]发现由AAV介导的基于RNA的NFATc1-c4转录因子家族的转录活性。在一次性全身注射基于AAV9的病毒载体后，诱饵寡核苷酸由心肌细胞特异性表达为带有NFATc1-c4共有结合位点的shRNA，该shRNA下调NFAT依赖性促肥大基因的表达，从而预防或抑制TAC诱导的心肌肥大和随后的心力衰竭。在心肌细胞增殖方面，Wu等发现LRP6是心肌细胞增殖的关键调节因子，首次证实了LRP6在控制心肌细胞增殖和损伤后心肌修复中的作用，这有望成为心脏的治疗的新靶点并且为心衰的研究提供了新的方向^[9]。

4 展望与小结

重组AAV（rAAV）是体内基因治疗的领先平台。到2019年FDA批准的基于AAV的用于治疗遗传性视网膜疾病的Spark therapeutics的Luxturna和用于治疗脊髓性肌萎缩症的Avexis的Zolgensma^[10]都表明基于AAV的基因疗法逐渐成为可能，但在动脉粥样硬化疾病的预防及治疗中^[11]，基因治疗还处于起步阶段，要将AAV的使用从实验室应用于临床，还需要进一步优化。通过结构引导合成AAV，并通过融合野生型AAV生成嵌合AAV，这是正在开发的少数技术之一^[12]。因此，更好地理解传递载体和启动子、它们的传递方式以及其分子靶点有助于我们的进一步研究。

参考文献

[1] Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy[J]. Nature reviews Genetics, 2020, 21(4): 255–272.
[2] Remes A, Basha DI, Puehler T, et al. Alginate hydrogel

polymers enable efficient delivery of a vascular-targeted AAV vector into aortic tissue[J]. Molecular therapy Methods & clinical development, 2021, 11(21): 83–93.
[3] Wang L, Breton C, Warzecha CC, et al. Long-term stable reduction of low-density lipoprotein in nonhuman primates following in vivo genome editing of PCSK9[J]. Molecular therapy :the journal of the American Society of Gene Therapy, 2021, 29(6): 2019–2029.
[4] Zhao H, Li Y, He L, et al. In Vivo AAV-CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing Ameliorates Atherosclerosis in Familial Hypercholesterolemia[J]. Circulation, 2020, 141(1): 67–79.
[5] Geng L, Lam KSL, Xu A. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic[J]. Nature reviews Endocrinology, 2020, 16(11): 654–667.
[6] Niu C, Chen Z, Kim KT, et al. Metformin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment by downregulating autophagy via the Hedgehog pathway[J]. Autophagy, 2019, 15(5): 843–870.
[7] Martínez-Martínez S, Lozano-Vidal N, López-Maderuelo MD, et al. Cardiomyocyte calcineurin is required for the onset and progression of cardiac hypertrophy and fibrosis in adult mice[J]. The FEBS journal, 2019, 286(1): 46–65.
[8] Remes A, Wagner AH, Schmiedel N, et al. AAV-mediated expression of NFAT decoy oligonucleotides protects from cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Basic research in cardiology, 2021, 116(1): 38.
[9] Wu Y, Zhou L, Liu H, et al. LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration[J]. Cell research, 2021, 31(4): 450–462.
[10] Urquhart L. FDA new drug approvals in Q2 2019[J]. Nature reviews Drug discovery, 2019, 18(8): 575.
[11] 万志杰, 武小晗, 李蒙蒙, 等. 动脉粥样硬化的发病机制与治疗进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2020, 20(63): 42–44, 48.
[12] Fakhiri J, Schneider MA, Puschhof J, et al. Novel Chimeric Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus and Four Different Mammalian Bocaviruses[J]. Molecular therapy Methods & clinical development, 2019(12): 202–222.