

· 实验研究 ·

重组腺相关病毒 2、6、8、9 型玻璃体腔注射 在小鼠视网膜中的趋向性表达

李泰明¹ 魏峥¹ 刘晓玫² 邵嘉红³ 袁运² 曹金晶² 王飞飞² 王东鑫² 李文生⁴ 张春²¹中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009;²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 215163;³苏州吉脉基因药物生物科技有限公司 215002;⁴中南大学爱尔眼科学院,长沙 410006

通信作者:张春,Email:chunzhang@sibet.ac.cn

【摘要】 目的 比较腺相关病毒(AAV)不同血清型对小鼠视网膜层的趋向性。方法 构建 pFastBacDual-inCap 衣壳质粒和 pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 基因组质粒;包装重组腺相关病毒 2 型(rAAV2)、rAAV6、rAAV8、rAAV9;以感染复数(MOI)2000 的比例感染 HEK293T 细胞,24 h 后观察荧光表达;应用随机数字表法将 C57BL/6 小鼠分为 rAAV2、rAAV6、rAAV8、rAAV9 组和对照组,每组 5 只,分别双眼玻璃体腔注射 rAAV2、rAAV6、rAAV8、rAAV9 和磷酸盐缓冲液(PBS)各 1 μ l,注射后 2 周,制作眼球冰冻切片以及视网膜铺片,分别应用倒置荧光显微镜和激光扫描共焦显微镜观察 rAAV 不同血清型增强型绿色荧光蛋白(EGFP)荧光强度和感染部位。应用倒置荧光显微镜观察玻璃体腔注射 rAAV2 后 2 周、1 个月、3 个月 EGFP 荧光强度变化。结果 重组病毒对 HEK293T 的感染效率从高到低依次为 rAAV2、rAAV6、rAAV8 和 rAAV9,转导效率分别为 39.5%、18.4%、8.7% 和 4.6%;在小鼠视网膜中,rAAV2 和 rAAV6 在神经节细胞表达水平较高,rAAV8 和 rAAV9 在视网膜色素上皮(RPE)和光感受器细胞中表达水平较高;rAAV2 介导 EGFP 可于注射后 2 周、1 个月、3 个月内在视网膜稳定表达。结论 rAAV 不同血清型对视网膜 RPE 细胞和神经节细胞具有高趋向性和高效表达,rAAV2 玻璃体腔注射后转导效率较高,且在注射后 3 个月内稳定表达。

【关键词】 腺相关病毒; 基因治疗; 玻璃体腔注射; 视网膜; 视网膜疾病

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570875)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200326-00210

Tropisms of rAAV2,6,8,9 serotypes for intravitreal injection in the mouse retina

Li Taiming¹, Wei Zheng¹, Liu Xiaomei², Shao Jiahong³, Yuan Yun², Cao Jinjing², Wang Feifei², Wang Dongxin², Li Wensheng⁴, Zhang Chun²¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China; ³Suzhou Gene Medicine Co. Ltd, Suzhou 215002, China; ⁴Aier School of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410006, China
Corresponding author: Zhang Chun, Email: chunzhang@sibet.ac.cn

[Abstract] **Objective** To compare the tropism of different adeno-associated virus (AAV) serotypes in retinal cells. **Methods** The plasmids pFastBacDual-inCap and pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP were constructed for AAV packaging with the baculovirus expression system. Recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2), 6, 8 and 9 serotypes were packaged, and the infectivity of rAAV was evaluated by infecting HEK293T cells at multiplicity of infection (MOI) 2000. Twenty-five C57BL/6 mice were divided into five groups, with five mice per group. In the three experimental groups, both eyes of each mouse were injected 1 μ l rAAV intravitreally, and 1 μ l phosphate buffered saline (PBS) for the eyes of the control group. Two weeks after injection, the retinal tissues were collected for preparing flat mounts and cryosections. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene expression was observed via fluorescence microscopy and laser scanning confocal microscopy. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology. **Results** The infection efficiency of the recombinant virus to HEK293T cells was rAAV2 > rAAV6 > rAAV8 > rAAV9, and the transduction efficiency was 39.5%, 18.4%, 8.7% and 4.6%, respectively. In mouse retinal transduction, rAAV2 and rAAV6 were highly expressed in the ganglion cells, and rAAV8 and rAAV9 were highly expressed in the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor cells. rAAV2-mediated EGFP expression in retinas was stable within three months after injection. **Conclusions** Different rAAV serotypes have varying tropism and transduction efficiencies in retinal cells through intravitreal injection, rAAV2 has a high transduction efficiency and it can be stably expressed in retinas within three months after injection.

[Key words] Adeno-associated viruses; Gene therapy; Intravitreal injection; Retina; Retinal diseases

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570875)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200326-00210

视网膜疾病是主要的致盲眼病之一,由先天基因突变或后天疾病引起,常见的有黄斑变性、糖尿病视网膜病变、青光眼、遗传性视网膜病变等。遗传性视网膜疾病(inherited retinal degenerations, IRD)由于视网膜神经层或色素层基因突变,进而视神经细胞或感光细胞功能衰退,视细胞死亡,因此致盲^[1]。遗传性视网膜疾病主要有 Leber 先天性黑矇、视网膜色素变性、先天性静止性夜盲、Stargardt 病、Usher 综合征等^[2],目前临床上尚无法根治。随着生命科学领域的发展和人类基因的深入研究,通过基因治疗有可能使正确基因表达或敲除异常基因,进而起到恢复视功能的作用^[3-5]。病毒载体稳定高效转导外源目的基因,在基因治疗中应用广泛。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是当前最有价值的基因治疗病毒载体之一,具有安全性高、免疫原性低、定点整合、感染范围广等特点^[6-8]。其中,AAV 载体主要给药途径有玻璃体腔注射和视网膜下注射^[9]。目前临床上转导视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和光感受器的手段是视网膜下注射,将针头置于视网膜与 RPE 之间,注入病毒,上方视网膜会形成泡状膜脱离,但该注射可能会引起炎症,并且手术操作困难,安全性低^[10]。玻璃体腔注射是将病毒直接注入玻璃体腔,病毒悬液随玻璃体扩散入视网膜,此方法更安全、容易。研究表明,玻璃体腔注射主要转导神经节细胞,对 RPE、光感受器等视网膜外层细胞转导率低,临床应用有限^[11-12]。提高玻璃体腔注射对视网膜外层细胞的转导效率可增加玻璃体腔注射的临床使用率^[13],降低手术风险和难度。选择合适的具有靶向性的 AAV 有助于增加玻璃体腔注射对外层视网膜的转导效率。AAV 有多种血清型,不同血清型有特异的识别受体,因此会有不同靶向目标^[14]。根据疾病部位和靶向组织选择合适的 AAV 血清型能大大提高转导效率。另有研究证明,将 AAV 的衣壳(Capsid, Cap)基因序列起始端插入含昆虫细胞启动子序列的内含子片段可显著提高昆虫细胞表达系统包装的 AAV 表达^[15-16]。本实验采用的病毒包装为昆虫细胞表达系统,在衣壳序列起始处添加内含子序列,选择重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)2、6、8、9 血清型进行小鼠玻璃体腔注射,比较 rAAV 不同血清型转导视网膜的能力及趋向性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、主要试剂及仪器 pAAV 质粒、pFastBacDual-inCap2 质粒、pFastBacDual-Rep 质粒、pFastBacDual-ITR-CMV 质粒、大肠杆菌 SURE 2 均由中国科学院苏州生物医学工程技术研究所细胞和基因治疗研究中心构建或保存;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(美国 NEB 公司);KOD DNA 聚合酶、DNA marker (日本 TAKARA 公司);质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司);盐酸奥布卡因滴眼液、复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);氧氟沙星滴眼液(江苏汉晨药业有限公司);玻璃酸钠滴眼液(珠海联邦制药股份有限公司中山分公司)。微量注射器(美国 Hamilton 公司)。

1.1.2 实验动物 25 只 SPF 级 4 周龄 C57BL/6 雌性小鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物的使用符合动物福利伦理要求,动物实验经中国科学院苏州生物医学工程技术研究所实验动物伦理委员会审查批准(批文号:2018-B19)。

1.2 方法

1.2.1 pFastBacDual-inCap 质粒和 pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 质粒的构建 载体骨架 pFastBacDual 用 BamH I 和 Xho I 双酶切,AAV6-Cap 序列从 pAAV6 质粒上扩增下来,用 BamH I 和 Xho I 消化,胶回收后 T4 DNA 连接酶连接,转化 SURE 2 感受态,挑单克隆菌于含 100 μg/ml 氨苄的 LB 培养基中,在 37 °C 恒温摇床上 200 r/min 培养 16 h,抽提得到质粒 pFastBacDual-Cap6;从 pFastBacDual-inCap2 中扩增得到内含子序列,插入位在 Cap 序列 25 和 26 碱基之间,质粒 pFastBacDual-Cap6 用 Sph I 和 EcoN I 酶切,得到骨架。内含子序列 PCR 扩增产物用 Sph I 和 EcoN I 消化。将消化后 PCR 扩增产物和骨架连接,胶回收后 T4 DNA 连接酶连接,转化 SURE 2 感受态,挑单克隆菌于含 100 μg/ml 氨苄的 LB 培养基中,在 37 °C 恒温摇床上 200 r/min 培养 16 h,抽提得到质粒 pFastBacDual-inCap6。经酶切鉴定后,由上海生工生物工程技术有限公司测序比对。pFastBacDual-inCap8 和 pFastBacDual-inCap9 同法可得。

载体骨架 pFastBacDual-ITR-CMV 用 BamH I 和 Xho I 酶切,扩增出增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)片段用 BamH I 和 Xho I 消化,胶回收后 T4 DNA 连接酶连接,转化 SURE 2 感受态,挑单克隆菌于含 100 μg/ml 氨苄的 LB 培养基

中,在 37 ℃ 恒温摇床上 200 r/min 培养 16 h,抽提得到质粒 pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP。经酶切鉴定后,由上海生工生物工程技术有限公司测序比对。

1.2.2 rAAV 病毒包装 将 pFastBacDual-inCap 质粒转入 DH10bac 感受态细胞中,制备出相应的 Bacmid; Bacmid 转入 Sf9 细胞中包装产生昆虫杆状病毒 Baculovirus-inCap,将杆状病毒扩增至 P3 代,用荧光定量 PCR 测定杆状病毒滴度。以同样的方法制备 Baculovirus-Rep 以及 Baculovirus-ITR-EGFP。3 种杆状病毒共同感染昆虫细胞 Sf9,包装获得突变体病毒,经过 CsCl 密度梯度离心的方法纯化浓缩出高浓度的 rAAV;荧光定量 PCR 检测 rAAV 的滴度,SDS-PAGE 检测 rAAV 的纯度。

1.2.3 rAAV 不同血清型转导 HEK293T 细胞检测病毒体外感染能力 HEK293T 细胞以 1×10^5 /孔细胞密度接种于 24 孔板,37 ℃ 培养至完全贴壁。rAAV 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)2000 的比例转导贴壁的 HEK293T 细胞,24 h 后在倒置荧光显微镜下检测荧光蛋白的表达,流式细胞仪检测表达效率。

1.2.4 小鼠玻璃体腔注射 应用随机数字表法将实验小鼠分为 rAAV2、rAAV6、rAAV8、rAAV9 组和对照组,每组 5 只,分别双眼玻璃体腔注射 rAAV2、rAAV6、rAAV8、rAAV9 和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)各 1 μ l。质量分数 4% 水合氯醛 0.01 ml/g 腹腔内注射麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点双眼扩瞳,使用玻璃酸钠滴眼液保持眼表湿润,氧氟沙星滴眼液,盐酸奥布卡因滴眼液术前点眼。调整小鼠头位使眼球保持角膜缘水平位。使用 31G 针头在角膜缘后 1 mm 处穿刺,33G 注射器在穿刺处注射病毒 1 μ l,病毒数为 1×10^9 。针尖垂直进入,随后倾斜,缓慢推注,推针以后留针 1 min,迅速出针(图 1)。

1.2.5 激光扫描共焦显微镜检测病毒在视网膜铺片内表达 玻璃体腔注射后 2 周,颈椎脱臼法处死小鼠,取眼球直接放入质量分数 4% 多聚甲醛中 4 ℃ 固定 2 h。固定后将眼球放入 PBS 中冲洗,置于培养皿内,剪去视神经,角膜处开口,将角膜剪除。沿开口处撕开巩膜和脉络膜复合体,露出杯状透明视网膜,去除晶状体,清除残留玻璃体。将视网膜转移到新的 PBS 中,对称剪开 4 瓣。吸去 PBS,用纸吸干。调整好视网膜形状,转移视网膜至载玻片,盖上盖玻片,于激光扫描共焦显微镜下观察。

1.2.6 荧光显微镜下检测 rAAV 在视网膜内的表达 玻璃体腔注射后 2 周,颈椎脱臼法处死小鼠,摘出眼球,浸入 4% 多聚甲醛中 4 ℃ 固定 2 h,角膜处开口,重

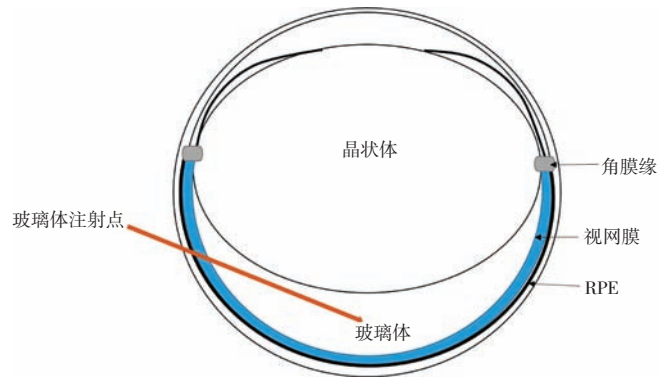


图 1 rAAV 玻璃体腔注射示意图 针尖在角膜缘后约 1 mm 处垂直进针,随后倾斜,进入玻璃体中央,注射病毒后停留 1 min 注: RPE:视网膜色素上皮

Figure 1 Schematic diagram of rAAV vitreous injection The needle tip was inserted vertically about 1 mm behind the limbus, and then tilted into the center of the vitreous. After the virus was injected, it stayed for 1 minute Note: RPE:retinal pigment epithelium

新浸入 4% 多聚甲醛中 4 ℃ 过夜。除尽多聚甲醛,质量分数 20% 蔗糖 4 ℃ 脱水 12 h,30% 蔗糖 4 ℃ 脱水 24 h。取出眼球,夹住角膜部分,去除角膜、晶状体,用纸吸干残余蔗糖溶液。OCT 包埋,14 μ m 厚切片,0.01 mol/L PBS 浸泡载玻片,去除残余 OCT,通风处晾干。将切片架放入盛 0.01 mol/L PBS 的修复盒内,擦干周围,用免疫组织化学笔圈住,0.01 mol/L PBS 清洗。加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (1:1 000 PBS) 孵育 20 min,0.01 mol/L PBS 清洗 3 次。抗荧光猝灭剂封片,保持切片湿润,倒置荧光显微镜下观察荧光表达。

1.2.7 rAAV2 感染视网膜表达的稳定性检测 rAAV2 玻璃体腔注射小鼠后 2 周、1 个月、3 个月,颈椎脱臼法处死小鼠,摘出眼球,4% 多聚甲醛固定过夜,蔗糖脱水,14 μ m 厚冰冻切片,DAPI 染色,抗荧光猝灭剂封片,于倒置荧光显微镜下观察 rAAV2 感染视网膜表达的稳定性。

2 结果

2.1 rAAV 质粒的构建

pFastBacDual-inCap6 经 Sph I 和 EcoN I 酶切鉴定,凝胶电泳得 inCap6 2 440 bp 条带(图 2)。与酶切位点分析一致,结合测序比对结果可见构建正确。同理得到鉴定正确的 pFastBacDual-inCap8、pFastBacDual-inCap9 质粒。

pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 经 BamH I 和 Hind III 酶切鉴定,凝胶电泳得到 EGFP+HGHPA+ITR 片段 1 462 bp,与酶切位点分析一致,结合测序比对结果可见构建正确(图 3)。

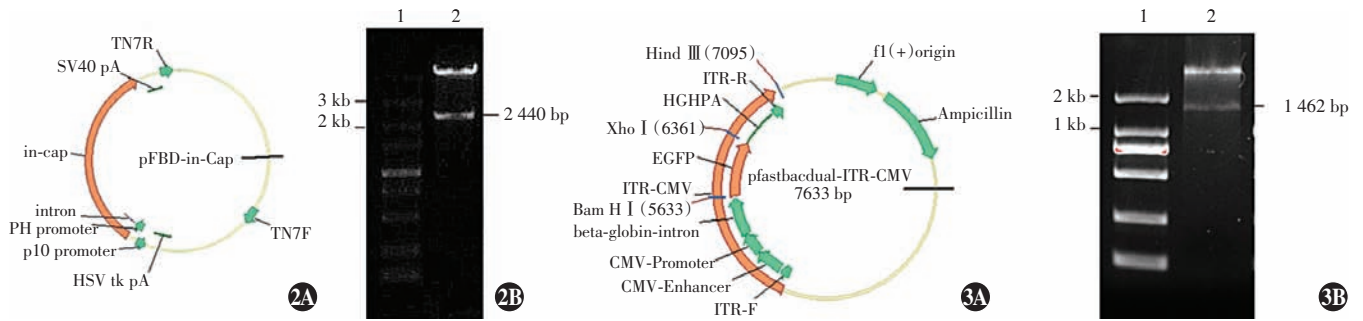


图 2 pFastBacDual-inCap 构建 A:质粒构建图 B:pFastBacDual-inCap 质粒 Sph I 和 EcoN I 酶切鉴定 1:DNA Marker;2:酶切条带;2 440 bp 处为 inCap 条带 **图 3 pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 构建** A:质粒构建图 B:pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 质粒 Bam H I 和 Hind III 酶切鉴定 1:DNA Marker;2:酶切条带;1 462 bp 处为 EGFP+HGHPA+ITR 条带
Figure 2 The construction of recombinant plasmid pFastBacDual-inCap A:The flow diagram of pFastBacDual-inCap B:The enzyme digestion identification of recombinant plasmid pFastBacDual-inCap 1:DNA Marker;2:Digestion band;inCap band at 2 440 bp **Figure 3 The construction of recombinant plasmid pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP** A:The flow diagram of pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP B:The enzyme digestion identification of recombinant plasmid pFastBacDual-ITR-CMV-EGFP 1:DNA Marker;2:Digestion band;EGFP+HGHPA+ITR band at 1 462 bp

rAAV 经荧光定量 PCR 检测滴度为 $4 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ vg/ml, 纯度鉴定合格。rAAV2、rAAV6、rAAV8、rAAV9 分别感染 HEK293T 细胞, 24 h 后倒置荧光显微镜观察, rAAV2 感染 HEK-293T 细胞的效率在所有 AAV 血清型中最高, 其次为 rAAV6, rAAV8 和 rAAV9 感染 HEK-293T 细胞效率相对较低(图 4)。流式细胞仪检测结果显示, 对 HEK293T 的转导效率从高到低依次为 rAAV2、rAAV6、rAAV8 和 rAAV9, 转导效率分别为 39.5%、18.4%、8.7%和 4.6%。

2.2 rAAV 不同血清型靶向视网膜不同部位 EGFP 的表达

激光扫描共焦显微镜荧光成像结果显示, rAAV2 主要靶向内层视网膜, 如神经节细胞, 对于外层视网膜的感染效率较低; rAAV6 在内层和外层视网膜均有明显表达, 对于内层视网膜的表达效率比外层视网膜高; rAAV8、rAAV9 主要靶向外层视网膜, 对于神经节细胞等内层视网膜表达较少(图 5)。

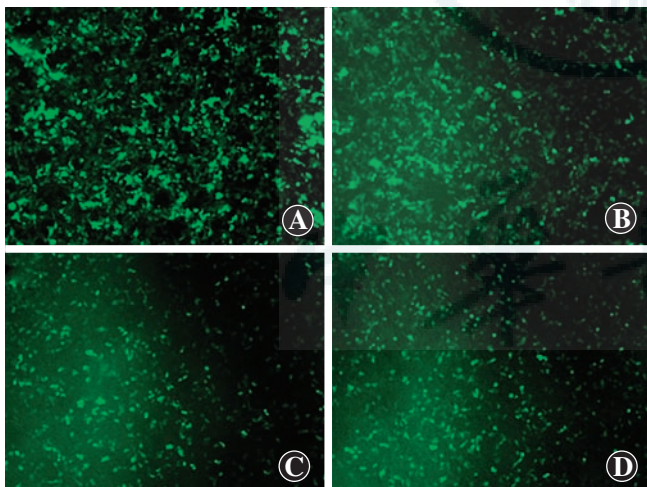


图 4 rAAV 不同血清型感染 HEK293T 细胞荧光观察 (EGFP $\times 100$) EGFP 呈绿色荧光, rAAV2 感染 HEK-293T 细胞荧光强度在所有 AAV 血清型中最高, 其次为 rAAV6, rAAV8 和 rAAV9 感染 HEK-293T 细胞荧光强度相对较低 A: rAAV2 B: rAAV6 C: rAAV8 D: rAAV9

Figure 4 Fluorescent images of HEK293T cells transfected with rAAV (EGFP $\times 100$) EGFP expressed green fluorescence. The fluorescence intensity of rAAV2 infection of HEK-293T cells was the highest among all AAV serotypes, followed by rAAV6, and the fluorescence intensity of rAAV8 and rAAV9 infection of HEK-293T cells was relatively low A: rAAV2 B: rAAV6 C: rAAV8 D: rAAV9

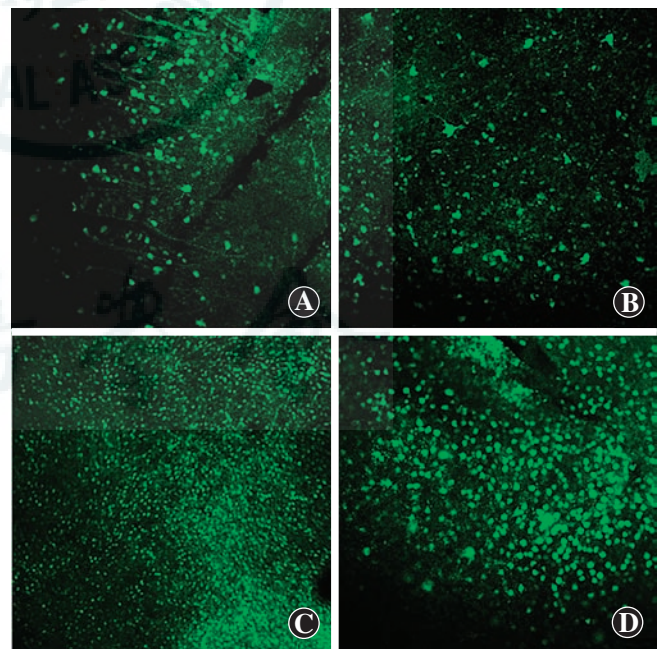


图 5 rAAV 不同血清型玻璃体腔注射后 2 周小鼠视网膜铺片激光扫描共焦显微镜荧光成像 (EGFP $\times 200$) EGFP 呈绿色荧光。rAAV2 和 rAAV6 主要趋向于内层视网膜, rAAV8 和 rAAV9 主要趋向于外层视网膜 A: rAAV2 B: rAAV6 C: rAAV8 D: rAAV9
Figure 5 Fluorescence imaging of mice retinal stretched preparation by laser scanning confocal microscopy at 2 weeks after vitreous cavity injection (EGFP $\times 100$) EGFP expressed green fluorescence. rAAV2 and rAAV6 mainly infected the inner retina, while rAAV8 and rAAV9 mainly infected the outer retina A: rAAV2 B: rAAV6 C: rAAV8 D: rAAV9

2.3 rAAV 不同血清型靶向视网膜不同部位 EGFP 的表达

倒置荧光显微镜下观察显示, rAAV 不同血清型在视网膜不同部位表达不同。rAAV2 和 rAAV6 主要靶向神经节细胞, RPE 层和光感受器表达较少; rAAV8 和 rAAV9 主要靶向 RPE 和光感受器, 在神经节细胞中表达较少, 其中 rAAV9 主要在 RPE 表达, rAAV8 除在 RPE 有强表达外, 在光感受器层表达比 rAAV9 更强(图 6)。

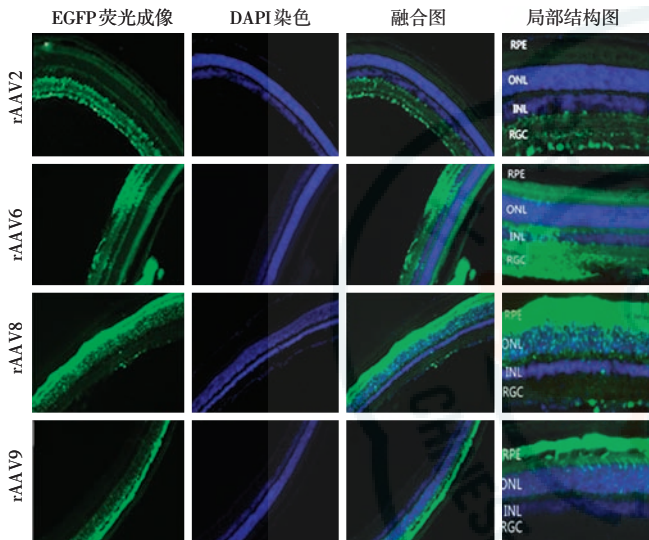


图 6 rAAV 不同血清型玻璃体腔注射后 2 周小鼠视网膜冰冻切片荧光成像(EGFP, DAPI ×100) rAAV2 和 rAAV6 主要靶向神经节细胞, rAAV8 和 rAAV9 主要靶向 RPE 和光感受器 注: rAAV: 重组腺相关病毒; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; RPE: 视网膜色素上皮; ONL: 外核层; INL: 内核层; RGC: 视网膜神经节细胞

Figure 6 Fluorescence imaging of frozen section of mice retina after 2 weeks vitreous cavity injection of rAAVs rAAV2 and rAAV6 mainly targeted ganglion cells, and rAAV8 and rAAV9 mainly targeted RPE and photoreceptors Note: rAAV: recombinant adeno-associated virus; EGFP: enhanced green fluorescent protein; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; RPE: retinal pigment epithelium; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; RGC: retinal ganglion cell

2.4 rAAV2 感染视网膜细胞表达的稳定性分析

rAAV2 感染视网膜细胞表达的稳定性分析结果显示, EGFP 在视网膜神经节细胞稳定表达, 且 1 个月、3 个月后荧光强度有所增加(图 7), rAAV2 介导 EGFP 可在视网膜细胞中一定时间内稳定表达。

3 讨论

基因治疗使用的载体多为病毒载体, 包括腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、AAV 等。AAV 作为基因载体在基因治疗中有其他病毒载体或非病毒载体所不具备的

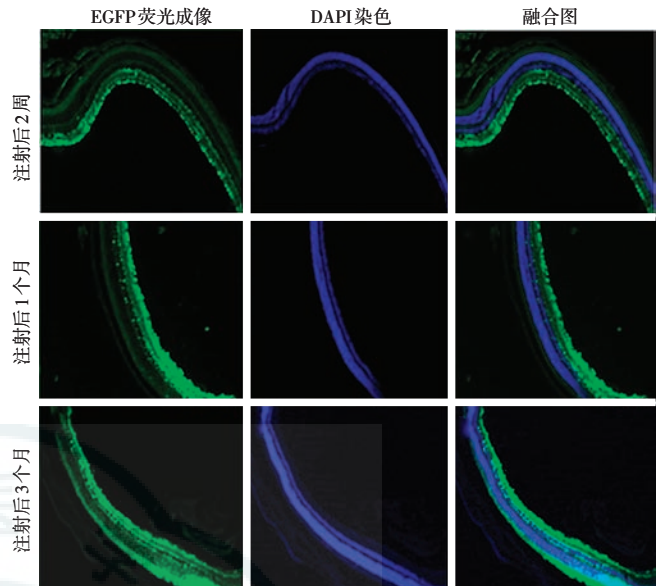


图 7 rAAV2 玻璃体腔注射后不同时间小鼠视网膜冰冻切片内 EGFP 表达荧光成像(EGFP, DAPI ×100) rAAV2 主要靶向视网膜神经节细胞, 且注射后 1 个月、3 个月荧光强度有所增加 注: EGFP: 增强型绿色荧光蛋白; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚

Figure 7 EGFP expression fluorescence imaging of retinal frozen sections at different time after vitreous injection of rAAV2 rAAV2 mainly targeted retinal ganglion cells, and the fluorescence intensity increases after 1 month and 3 months vitreous injection Note: EGFP: enhanced green fluorescent protein; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

优点: (1) AAV 不引起任何疾病; (2) AAV 只有 2 个基因, 即复制基因 *rep* 和编码衣壳蛋白的基因 *cap*, 易于消除, 从而可降低免疫反应和炎症反应的危险性; (3) AAV 有宽广的宿主范围^[17-18]。有研究已证实 AAV 可以感染多种视网膜细胞, 包括光感受器细胞、RPE 细胞、Müller 细胞、视网膜神经节细胞和角膜内皮细胞^[19-22]。2017 年 12 月, 美国 FDA 批准首款基因治疗药物 Luxturna 上市, 用于治疗遗传性视网膜营养不良, 采用 AAV 作为载体介导 *RPE65* 基因。AAV 具有安全性高、免疫原性低、转导效率高等优点, 其作为基因治疗载体的研究和临床应用日益增多^[13]。

AAV 有多种血清型, 不同血清型有特异的识别受体, 因此会有不同靶向目标。Vandenberghe 等^[23] 研究证明, 视网膜下注射 AAV2 和 AAV8 均能到达猴 RPE 层, 其中 AAV8 对光感受器的靶向性比 AAV2 更明显^[23]; 庞继景团队治疗 Leber 先天性黑矇^[24-26] 和李斌团队治疗 Leber 遗传性视神经病变均采用 AAV2^[27]。AAV6 主要靶向心脏和肌肉, 对于眼部研究不多; Klimczak 等^[28] 在 AAV6 基础上构建的突变体对大鼠 Müller 细胞有一定的靶向作用。近年来, 对 AAV8 及突变体的研究逐渐增多, 并有突破性进展^[29-31]。

AAV9 可通过转运机制穿过血-脑屏障,以往研究多采用静脉注射的方式进行,在视网膜中可检测到其表达^[32-33]。

随着基因治疗视网膜疾病的突破性进展,用玻璃体腔注射替换视网膜下注射的研究在持续进行。研究证明,对 AAV 衣壳进行改造可提高 AAV 的转导效率, Petrs-Silva 等^[34-35]将 AAV2、AAV8、AAV9 的 cap 衣壳酪氨酸单突变以及 AAV2 衣壳酪氨酸多位点突变均能有效提高转导效率,但未能完全靶向 RPE 层和感光层;Chen^[16]在昆虫细胞表达体系中增加 AAV2 cap 衣壳内含子序列,明显提高了 AAV 的转导效率。

目前关于 AAV 对视网膜转导效率比较的研究多采用哺乳动物表达系统。与 Klimczak 等^[28]的研究结果相比,本研究结果显示 rAAV2 和 rAAV6 对神经节细胞有明显转导,rAAV8、rAAV9 能达到 RPE 层和光感受器,可能与昆虫细胞表达体系包装,衣壳增加内含子序列,使衣壳蛋白组成成分比例的改变有关。但确切机制还需进一步实验证实。

利益冲突 作者声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Dalkara D, Goureau O, Marazova K, et al. Let there be light: gene and cell therapy for blindness [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27 (2): 134-147. DOI: 10. 1089/hum. 2015. 147.
- [2] 李文生, 郑钦象, 孔繁圣, 等. 遗传性视网膜疾病的基因研究进展 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46 (2): 186-192. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2010. 02. 020.
- [3] Li WS, Zheng QX, Kong FS, et al. Progress in gene studies of hereditary retinal diseases [J]. Chin J Ophthalmol, 2010, 46 (2): 186-192. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2010. 02. 020.
- [4] Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11 (3): 307-316. DOI: 10. 1016/s0959-437x(00)00195-7.
- [5] Liu MM, Tuo J, Chan CC. Republished review: Gene therapy for ocular diseases [J]. Postgrad Med J, 2011, 87 (1029): 487-495. DOI: 10. 1136/pgmj. 2009. 174912rep.
- [6] Petit L, Khanna H, Punzo C. Advances in gene therapy for diseases of the eye [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27 (8): 563-579. DOI: 10. 1089/hum. 2016. 040.
- [7] Hayashi T, Yamagishi A, Kuroiwa A, et al. Highly efficient transfection system for functional gene analysis in adult amphibian lens regeneration [J]. Dev Growth Differ, 2001, 43 (4): 361-370. DOI: 10. 1046/j. 1440-169x. 2001. 00582. x.
- [8] 李鸿翼, 原慧萍. 基因治疗及其在眼科的基础研究 [J]. 中国实用眼科杂志, 2006, 24 (7): 673-677.
- [9] Hastie E, Samulski RJ. Recombinant adeno-associated virus vectors in the treatment of rare diseases [J]. Expert Opin Orphan Drugs, 2015, 3 (6): 675-689. DOI: 10. 1517/21678707. 2015. 1039511.
- [10] Ochakovski GA, Bartz-Schmidt KU, Fischer MD. Retinal gene therapy: surgical vector delivery in the translation to clinical trials [J/OL]. Front Neurosci, 2017, 11: 174 [2019-01-04]. https://www. frontiersin. org/articles/10. 3389/fnins. 2017. 00174/full. DOI: 10. 3389/fnins. 2017. 00174.
- [11] Bennett J, Wellman J, Marshall KA, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial [J]. Lancet, 2016, 388 (10045): 661-672. DOI: 10. 1016/S0140-6736(16) 30371-3.
- [12] Boon CJ, Crama N, Klevering BJ, et al. Reflux after intravitreal injection of bevacizumab [J]. Ophthalmology, 2008, 115 (7): 1270-1271. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2008. 02. 021.
- [13] King L, Dorrepaal SJ, Gale J. Survey of intravitreal injection techniques and treatment protocols among retina specialists in Canada [J]. Can J Ophthalmol, 2014, 49 (3): 261-266. DOI: 10. 1016/j. jcjo. 2014. 03. 009.
- [14] Dias MF, Joo K, Kemp JA, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives [J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 63: 107-131. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2017. 10. 004.
- [15] 许瑞安. 腺相关病毒——从病毒到临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2014: 35-36.
- [16] Xu RA. rAAV vector: from virus to clinic [M]. Beijing: Science Press, 2014: 35-36.
- [17] Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells [J]. Mol Ther, 2009, 17 (11): 1888-1896. DOI: 10. 1038/mt. 2009. 128.
- [18] Chen H. Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells [J]. Mol Ther, 2008, 16 (5): 924-930. DOI: 10. 1038/mt. 2008. 35.
- [19] Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes [J]. Annu Rev Virol, 2014, 1 (1): 427-451. DOI: 10. 1146/annurev-virology-031413-085355.
- [20] Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy [J]. J Control Release, 2016, 240: 287-301. DOI: 10. 1016/j. jeonrel. 2016. 01. 001.
- [21] Sharma A, Ghosh A, Hansen ET, et al. Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts [J]. Brain Res Bull, 2010, 81 (2-3): 273-278. DOI: 10. 1016/j. brainresbull. 2009. 07. 005.
- [22] Bainbridge JW, Mistry A, Binley K, et al. Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization [J]. Gene Ther, 2003, 10 (12): 1049-1054. DOI: 10. 1038/sj. gt. 3301945.
- [23] Boye SL, Peterson JJ, Choudhury S, et al. Gene therapy fully restores vision to the all-cone *Nrl^{-/-} Gucy2e^{-/-}* mouse model of Leber congenital amaurosis-1 [J]. Hum Gene Ther, 2015, 26 (9): 575-592. DOI: 10. 1089/hum. 2015. 053.
- [24] Boye SE, Boye SL, Lewin AS, et al. A comprehensive review of retinal gene therapy [J]. Mol Ther, 2013, 21 (3): 509-519. DOI: 10. 1038/mt. 2012. 280.
- [25] Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, et al. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey [J/OL]. Sci Transl Med, 2011, 3 (88): 88ra54 [2019-01-19]. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC5027886/. DOI: 10. 1126/scitranslmed. 3002103.
- [26] Li X, Li W, Dai X, et al. Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse: a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (1): 7-15. DOI: 10. 1167/iovs. 10-6138.
- [27] Bennett J, Wellman J, Marshall KA, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial [J]. Lancet, 2016, 388 (10045): 661-672. DOI: 10. 1016/S0140-6736(16) 30371-3.
- [28] Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year [J]. Hum Gene Ther, 2009, 20 (9): 999-1004. DOI: 10. 1089/hum. 2009. 086.
- [29] Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, et al. Induction of rapid and highly efficient expression of the human ND4 complex I subunit in the mouse visual system by self-complementary adeno-associated virus [J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128 (7): 876-883. DOI: 10. 1001/archophthol. 2010. 135.
- [30] Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, et al. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Müller cells [J/OL]. PLoS One, 2009, 4 (10): e7467 [2019-01-03]. https://journals. plos. org/plosone/article? id = 10. 1371/journal. pone. 0007467. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0007467.
- [31] Li Y, Wu WH, Hsu CW, et al. Gene therapy in patient-specific stem cell lines and a preclinical model of retinitis pigmentosa with membrane frizzled-related protein defects [J]. Mol Ther, 2014, 22 (9): 1688-1697. DOI: 10. 1038/mt. 2014. 100.
- [32] Da Costa R, Röger C, Segelken J, et al. A novel method combining

vitreal aspiration and intravitreal AAV2/8 injection results in retina-wide transduction in adult mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(13): 5326-5334. DOI: 10.1167/iovs.16-19701.

- [31] Dai X, He Y, Zhang H, et al. Long-term retinal cone rescue using a capsid mutant AAV8 vector in a mouse model of CNGA3-achromatopsia [J/OL]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188032 [2019-01-07]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0188032>. DOI: 10.1371/journal.pone.0188032.
- [32] Bemelmans AP, Duqué S, Rivière C, et al. A single intravenous AAV9 injection mediates bilateral gene transfer to the adult mouse retina [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(4): e61618 [2019-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626698/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0061618.
- [33] Dalkara D, Byrne LC, Lee T, et al. Enhanced gene delivery to the

neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9[J]. Gene Ther, 2012, 19(2): 176-181. DOI: 10.1038/gt.2011.163.

- [34] Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors [J]. Mol Ther, 2009, 17(3): 463-471. DOI: 10.1038/mt.2008.269.
- [35] Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina [J]. Mol Ther, 2011, 19(2): 293-301. DOI: 10.1038/mt.2010.234.

(收稿日期: 2019-11-04 修回日期: 2020-03-11)

(本文编辑: 刘艳)

更正

关于《Dickkopf-1 对人晶状体上皮细胞增生的抑制作用及其生物学机制》一文中图 4 的更正

《中华实验眼科杂志》2020 年 38 卷第 4 期 285~290 页张利民、包秀丽所著《Dickkopf-1 对人晶状体上皮细胞增生的抑制作用及其生物学机制》中图 4 黑白图应为彩色图片, 特此更正。

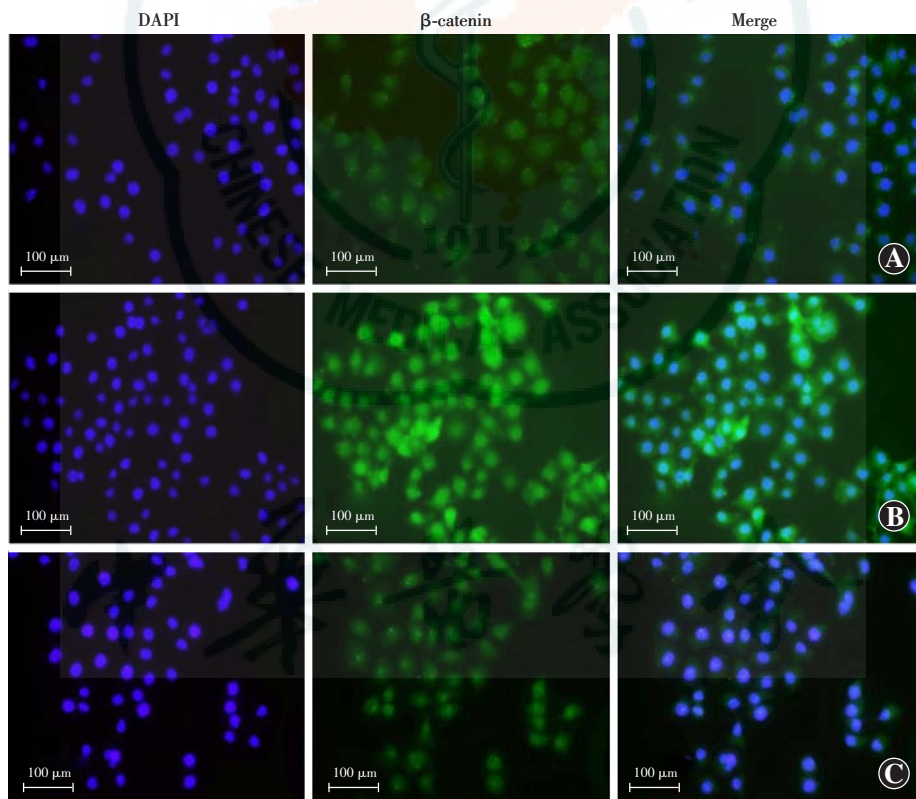


图 4 各组 SRA 01/04 细胞中 β -catenin 蛋白表达比较 (标尺 = 100 μ m) A: 对照组 β -catenin 蛋白仅分布在细胞质, 呈绿色荧光 (Alexa Flour488), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) B: Wnt3a 过表达组 β -catenin 蛋白在细胞质和细胞核中均有大量表达 C: DKK1 组 β -catenin 蛋白多分布于细胞质, 少量分布于细胞核

Figure 4 Comparison of β -catenin expression among various groups (bar = 100 μ m)
 A: β -Catenin protein was only distributed in the cytoplasm in control group, showing a green fluorescence (Alexa Flour488), and cell nucleus showed the blue fluorescence (DAPI) B: β -Catenin protein accumulated in the cytoplasm and nucleus in the Wnt3a overexpression group C: β -Catenin protein was mostly distributed in the cytoplasm and a small amount in the nucleus in the DKK1 group

(本刊编辑部)