

DOI: 10.13376/j.cblls/2021043

文章编号: 1004-0374(2021)03-0392-08

腺相关病毒的基因疗法在心血管疾病中的应用

廖敏琪, 郭素峡*

(东莞市人民医院心血管内科, 东莞 523000)

摘要: 尽管现代医疗手段不断改进, 但心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)的病死率仍居高不下, 寻找新的防治方法将具有良好的临床应用前景。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为基因治疗的载体之一, 可以通过基因替代、基因沉默、递送新基因、基因编辑等方式在CVD中起到治疗作用。AAV有多种血清型, 其中AAV1型、6型、8型、9型对心脏有组织亲和性, 并且转导后能在体内稳定长效表达, 安全性高。该文主要针对AAV基因疗法在心力衰竭、冠心病、肥厚型心肌病、扩张型心肌病以及心律失常等CVD中的应用进行综述。目前, AAV载体在克服宿主中和抗体、心脏选择性以及注射剂量和途径的优化等方面仍存在一些挑战, 利用外泌体包裹AAV以克服宿主抗体中和, 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术设计有心脏或血管特异性启动子的AAV载体等改进方法还需要进一步探索。因此, AAV基因治疗在心血管领域还有很大的研发空间和很好的应用价值。

关键词: 基因治疗; 腺相关病毒; 心血管疾病

中图分类号: R394.8; R730.54 **文献标志码:** A

Adeno-associated virus-based gene therapy for cardiovascular diseases

LIAO Min-Qi, GUO Su-Xia*

(Department of Cardiovascular Medicine, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523000, China)

Abstract: Despite the improvement of modern medical methods, the mortality rate of cardiovascular diseases (CVD) is still high. Finding new prevention and treatment methods will have good clinical application prospects. Adeno-associated virus (AAV), one of the vectors for gene therapy, can play a therapeutic role in CVD through gene replacement, gene silencing, gene addition, and gene editing. There are many serotypes of AAV, among which AAV1, 6, 8 and 9 have cardiac tropism. AAVs can be expressed stably and for long-term in the body with high safety. This article mainly reviewed the application of AAV gene therapy in CVD such as heart failure, coronary heart disease, hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy and arrhythmia. At present, there are still some challenges for AAV vector in overcoming the neutralizing antibody of host, cardiac selectivity, and optimization of injection dose and route. Further exploration is needed in using exosome to encapsulate AAV to overcome neutralization of host antibody, and designing AAV vector with cardiac- or vascular-specific promoter based on CRISPR/Cas9 gene editing technology. Therefore, AAV gene therapy in the cardiovascular field still needs a lot of researches and has a good application value.

Key words: gene therapy; adeno-associated virus; cardiovascular diseases

基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞, 以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的疾病。AAV作为基因治疗的一种有力载体被广泛应用, 从1965年AAV被发现, 到1993年重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)第一次被应用于体内实验, 再到2017年被FDA批准应用于临床, AAV的研

究历程达50多年^[1-3]。对AAV基本生物学的早期研究为载体开发和治疗应用奠定了基础, AAV载体在基

收稿日期: 2020-10-14; 修回日期: 2020-11-18

基金项目: 东莞市社会发展(重点)项目(20205071500-1179); 东莞市人民医院院内项目(k201906)

*通信作者: E-mail: guo7771812@163.com

因治疗中的应用进一步激发了人们对研究AAV生物学的兴趣。

1 rAAV的基本构造

AAV是一种单链DNA病毒, 它由直径约26 nm的二十面体蛋白衣壳和长度为4.7 kb的单链DNA基因组构成。蛋白衣壳包含3种类型的亚基, VP1、VP2和VP3 (比例为1:1:10)^[4]; 衣壳mRNA包含一个开放阅读框, 编码组装激活蛋白(AAP), 促进病毒的组装; 单链DNA基因组包含两个开放阅读框, rep基因编码病毒复制所需的4种蛋白质, cap基因通过可变剪接和来自不同起始密码子的翻译来编码3个衣壳亚基^[5]。AAV编码区的两端为两个“T”型的末端反向重复序列(inverted terminal repeat, ITR)。作为基因疗法载体的rAAV, 其携带的蛋白衣壳与野生型AAV几乎完全相同, 然而衣壳内的基因组中编码病毒蛋白的部分被完全删除, 取而代之的是治疗性转基因。AAV基因组中唯一被保留的部分是ITRs, 它起到指导基因组复制和病毒载体组装的作用^[6]。将编码病毒蛋白的部分完全删除, 一方面最大化重组AAV携带转基因的容量, 另一方面减小体内递送转基因时产生的免疫原性和细胞毒性。

AAV有多种血清型, 最早被发现的血清型是AAV2; 感染谱最广的AAV9是从人类肝脏组织中分离出的, 应用最为广泛, 并且AAV9能穿过血脑屏障, 成为通过全身给药转导中枢神经系统的主要衣壳^[7]。不同血清型感染的细胞类型和效率也各不相同, 其中AAV1型、6型、8型、9型对心脏有亲和性, AAV1型和AAV6型更适合通过心肌内、心包内或冠状动脉内途径进行基因治疗, AAV8型和AAV9型则通过全身给药也可以实现有效的心脏转导^[8]; AAV6型和AAV9型因其对心脏的更高转导效率, 已成为需要在心脏中选择性表达的首选AAV血清型^[9]。

2 rAAV转导细胞的工作机制

rAAV被宿主细胞表面的糖化受体识别, 通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。然后, AAV通过由细胞骨架网络介导的细胞质运输。由于内体的pH值较低, 在内吞形成的内体酸化之后, 病毒衣壳的VP1/VP2部分构象发生变化, 导致病毒从内体中脱离, 并且通过核孔进入细胞核。进入细胞核后, 单链DNA从衣壳中释放出来, 利用宿主细胞的DNA聚合酶来合成互补链, 或者由两条不同AAV颗粒中释放的互补链退火形成双链DNA^[5-6]。当前有

两种类型的rAAV: 单链AAV(ssAAV)和自互补AAV(scAAV)。ssAAV被包装为正链或负链基因组, 当这些单链形式到达细胞核时, 它们在转录上仍然是惰性的, 必须将其转化为双链DNA来作为转录的前提条件。可以通过宿主细胞DNA聚合酶进行第二链合成, 或者对可能共存于细胞核中的正负链进行链退火, 从而实现这种转化。而scAAV已通过设计进行了双链处理, 可以立即进行转录。rAAV基因组中存在的ITR可以驱动分子间或分子内重组, 形成环化的游离基因组, 该基因组可以持续存在于细胞核中^[5-6]。

rAAV有以下优点: (1)可以感染多种细胞, 而且不受细胞分化的影响; (2)致病性低; (3)免疫原性非常低; (4)表达时间相对较长。rAAV可以通过基因替代、基因沉默和递送新基因、基因编辑等方式起到治疗作用^[5], 治疗基因不限于编码互补DNA的蛋白质, 还包括shRNA和miRNA^[10]。基因替代旨在提供基因产物以补偿功能丧失的突变, 适用于治疗隐性单基因疾病; 基因沉默则与基因替代相反, 主要治疗由基因突变引起的单基因疾病; 除单基因疾病外, rAAV还通过递送新基因治疗复杂遗传疾病和后天疾病; 基因编辑则可直接纠正疾病中某些体细胞的基因突变, 从而改善, 甚至根治疾病。

3 rAAV在心血管疾病中的应用

3.1 rAAV在心血管疾病中的基础研究

大多数心血管疾病是多基因的, 并受环境因素的影响。基因治疗不仅能够调节单一基因缺陷的遗传性疾病, 而且还可以调节多因素疾病, 一些涉及信号通路和代谢的基因已被尝试用于治疗CVD。目前, rAAV基因疗法在治疗心力衰竭(heart failure, HF)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、冠心病、扩张型心肌病、肥厚型心肌病以及心律失常等CVD中起到很好的作用。

3.1.1 rAAV应用于HF

目前, 与 β -肾上腺素能(β -AR)信号转导、钙离子平衡炎症和氧化应激相关的基因已成为AAV基因治疗HF的主要靶点, 均有调节和恢复心脏收缩力的潜力。

在衰竭的心脏中, β -AR信号转导因功能偶联丧失(脱敏)而减弱或下调, 靶向 β -AR可以阻断神经激素和心肌重构的恶性循环, 从而缓解心衰。Mdm2是一个泛素连接酶, 可泛素化G蛋白偶联受体激酶2(GRK2), 从而调节 β -AR的信号转导。敲除Mdm2使

GRK2降解受损, β -AR被锁定在脱敏状态, 导致心脏收缩反应迟钝。AAV9递送Mdm2基因可有效挽救Mdm2敲除小鼠的 β -AR信号转导反应性, 显著增强小鼠心脏收缩^[11]。而 β ARKct是与GRK2结构相似的多肽, 通过竞争性结合抑制GRK2, 使 β -AR信号转导上调, AAV9- β ARKct长期治疗可以显著改善抗肌营养不良蛋白基因缺乏小鼠的左心室收缩功能并改善心肌肥大^[12]。磷酸二酯酶4B (PDE4B)在HF患者中表达减少, 导致异常的 Ca^{2+} 交换。注射AAV9-PDE4B的小鼠心脏cAMP-PDE活性增加约50%, 通过减弱 β -AR反应减少心肌细胞凋亡和纤维化。利用AAV9编码PDE4B使其在心脏中适度表达可能成为治疗HF患者收缩功能障碍和病理重塑的新策略^[13]。

冠脉内注射AAV9-VEGF- B_{167} 通过抑制活性氧的产生, 防止心肌细胞凋亡, 改善HF。与对照组相比, AAV9-VEGF- B_{167} 治疗组的左心室舒张末期压力和左心室舒张末期直径减少, $\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)增加^[14]。Tang等^[15]发现, 在小鼠左心尖、侧壁和前壁注射AAV9过表达Prdx1, 能通过增加Nrf2及其下游HO-1的水平, 减少压力超负荷引起的心脏炎症和氧化应激, 改善小鼠的心脏肥大和纤维化。AAV9通过靶向mAKAP β 信号抑制或促进SRF-Ser¹⁰³磷酸化, 分别改善了向心性和偏心性心脏病小鼠的心脏结构和功能, 为HF的防治提供了新的治疗靶点^[16]。利用有心脏倾向性的rAAV9-shPLB, 通过静脉内注射将RNAi活性传递给心脏, 使心脏PLB蛋白降低至25%, 并激活了HF患者组肌质网的 Ca^{2+} -ATP酶的活性。rAAV9 shPLB治疗使左室舒张末期压、 $\text{dp}/\text{dt}_{\text{min}}$ 和EF恢复到正常范围, 心肌肥大、心肌细胞直径和心肌纤维化明显减少^[17]。AAV治疗HF的基础研究靶点还有SERCA2a、SUMO-1、CaPI3K、Ic1等^[9,18-23], 通过纠正心肌细胞的功能异常, 调节心肌收缩力, 为提高HF的疗效提供了可能。

3.1.2 rAAV应用于AS与冠心病

现已发现多个靶基因是AS发展的关键因素。PCSK9结合肝LDLR, 使LDLR在溶酶体中降解, 而PCSK9过度活跃会增加人和小鼠的LDL水平。给小鼠单次静脉内注射AAV8/PCSK9, 经12周高脂饮食, 小鼠总胆固醇迅速增加并维持在高水平, 使主动脉中形成AS病变^[24]。与传统的AS模型相比, 全身注射AAV8/PCSK9的方法能克服ApoE敲除或LDLR敲除小鼠的一些局限性, 用于涉及多基因敲除技术、其他小鼠品系或与当前基因工程模型无法

很好结合的物种的实验, 成为构建动物AS模型的一种快速且通用的方法。

同时, 用编码IL-10和STAT3的两种AAV8载体治疗LDLR缺陷AS小鼠, 与对照组相比, 单纯AAV8/h IL-10或AAV8/hSTAT3治疗组的腹主动脉搏管腔增大, 壁厚减小, 主动脉收缩期血流速度明显降低, 反映了对AS的抑制作用^[25-26]。然而, AAV8/hIL-10+hSTAT3的联合治疗并不能进一步抑制AS的发展^[27]。Khan等^[28]发现, 通过AAV8递送hNetrin-1可以减少单核/巨噬细胞的堆积, 减轻炎症反应, 减少AS斑块的形成, 从而减缓AS。LDLR的突变是家族性高胆固醇血症的主要原因之一, 可诱发AS, 并且终生罹患心血管疾病的风险较高。研究发现, 与对照组($n = 6$)相比, 经皮下注射AAV-CRISPR/Cas9靶向sgRNA组($n = 6$)的LDLR^{E208X}小鼠血清中总胆固醇、总甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇显著降低, 主动脉AS斑块较小, 巨噬细胞浸润程度较低, 表明AAV-CRISPR/Cas9技术可以有效纠正肝细胞LDLR基因中的点突变, 可部分挽救LDLR表达并有效改善LDLR突变体中的AS表型^[29]。

由蛋白质G和AAV2特异性抗体组成的亲和桥将AAV2固定在支架表面, 赋予AAV载体持续释放的特性, 向动脉壁进行特异性转导, 使诱导型一氧化氮合酶过表达, 抑制损伤血管壁细胞的增殖, 能有效预防大鼠支架内再狭窄^[30]。Lompre等^[31]设计的AAV2.5载体向血管平滑肌细胞有效转导SERCA2a, 减少平滑肌细胞向泡沫细胞转化, 为支架内再狭窄基因治疗提供了新视角。

在猪心肌梗死模型中通过AAV1共表达VEGF和AngI, 诱导新生血管生成, 刺激心肌细胞增殖并减少细胞凋亡, 共同改善心脏功能^[32]。AAV9有心脏亲和性, 静脉注射AAV9/细胞外超氧化物歧化酶(EcSOD), 使心脏中的EcSOD酶活性提高了5.6倍, 与对照组相比, EcSOD治疗小鼠的梗死面积减少了40%, 心肌毛细血管新生增加, 并减少了中性粒细胞浸润, 保护心脏免受心肌梗死后的左心室重塑^[33]。利用AAV9靶向心肌细胞转导褪黑素受体能在心肌缺血/再灌注损伤中对心脏起保护作用, 减少心肌损伤面积^[34]。心肌内注射包被AAV的相变微针, 28 d后AAV在心肌内均匀分布, AAV-VEGF负载的微针通过增强VEGF表达、促进功能性血管生成和激活AKT信号通路来改善心脏功能, 治疗缺血性心脏病^[35]。因此, rAAV载体也可能成为治疗AS、支架再狭窄以及冠心病等慢性疾病的有力工具。

3.1.3 rAAV应用于肥厚型心肌病及扩张型心肌病

CIP4是钙调神经磷酸酶A β (CaNA β)的支架蛋白, 小鼠心肌细胞特异性CIP4基因缺失可减轻压力超负荷引起的病理性心脏重塑和HF; 使用竞争性肽阻断CaNA β 的特异性锚定可抑制培养的心肌细胞肥大; 敲除小鼠心肌CIP4基因或使用AAV9基因治疗载体破坏体内锚定可抑制心脏肥大, 并改善压力超负荷后的收缩功能^[36]。小鼠尾静脉注射AAV9/miR-1治疗7周后, 通过超声心动图和血液动力学分析发现, 与对照组相比, miR-1治疗使左心室后壁厚度减少, 左心室间隔壁厚度减少, LVEF增加, 逆转心肌肥厚。此外, miR-1替代疗法可显著减少心肌纤维化, 改善钙交换, 抑制细胞凋亡以及使MAPK信号途径失活, 这表明其在预防适应不良的心室重构方面具有良好的作用^[37]。miR-378通过调节MAPK通路能显著减轻胸主动脉缩窄引起的心肌肥大并改善心脏功能, 靶向心肌细胞的AAV9/miR-378能修复miR-378的表达缺失, 改善肥厚型心肌病^[38]。

同样, AAV基因治疗也可用于扩张型心肌病。杜氏肌营养不良(DMD)的致病特征是胞浆钙显著升高, 肌浆网/内质网钙ATP酶(SERCA)是一种钙泵, 在兴奋-收缩偶联过程中将胞浆钙转运到内质网。DMD模型小鼠静脉注射AAV9/SERCA2a, 肌浆网/内质网钙摄取量明显增加, SERCA2a治疗能预防心肌纤维化, 治疗组小鼠的收缩和舒张血流动力学参数正常化, 完全防止了心室扩张, LVEF恢复到野生型水平^[39], 提示一次系统性AAV9/SERCA2a治疗可以预防和逆转DMD小鼠的扩张型心肌病。体内压力超负荷时, miR146a抑制心肌细胞能量代谢, 通过AAV9靶向心肌细胞使二氢脂酰琥珀酰转氨酶(DLST)过表达可减轻心肌肥厚, 保护心脏功能, 这表明DLST和miRNA-146a是扩张型心肌病的潜在治疗靶标^[40]。

3.1.4 rAAV应用于心律失常

部分室性心律失常是由某个基因缺失或者基因变异所导致的, 因此, 对该基因的修复对治疗此类心律失常至关重要。CASQ2基因突变诱导肌浆网舒张期钙离子释放, 导致迟发性后除极和触发性活动, 可能诱发危及生命的心律失常。Denegri等^[41]研究发现, 递送AAV/CASQ2基因到小鼠的心脏可以预防和逆转儿茶酚胺能多态性室性心动过速的严重表现, 并且这种疗效在单次注射载体后持续1年。左星状神经节(LSG)抑制可防止室性心律失常, 光遗传学是一种可逆调节目标神经元活性的新技术。

以AAV为载体, 将一种抑制性光敏感视蛋白ArchT传递到LSG, ArchT在所有犬中均成功表达。光调节可逆转地抑制LSG的神经活性, 从而增加电生理稳定性, 保护心肌缺血引起的室性心律失常^[42]。CaMKII是一种促肾上腺皮质激素激活酶, 有致心律失常作用, 而CaMKII抑制肽(AIP)可能对儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速(CPVT)有治疗作用。对已知RYR2^{R176Q/+}突变的新生小鼠施用AAV9-GFP-AIP可有效抑制由 β -肾上腺素刺激或程序性起搏引起的室性心律失常, 且没有明显的致心律失常作用。经静脉将AAV9-GFP-AIP注射至青春期小鼠可转导50%的心肌细胞, 并有效抑制CPVT小鼠的心律不齐^[43]。

3.2 rAAV在心血管疾病中的临床应用

AC6是心肌细胞中的膜蛋白, 能催化决定心功能的第二信使cAMP。Hammond等^[44]纳入了56例左室EF降低的HF患者, 冠脉内注射AAV5/AC6一年后, HF再住院率相较于安慰剂组减少(9.5% vs 28.6%, $p = 0.10$), 左心室-dP/dt峰值增加($p < 0.03$), 非缺血性HF的EF增加(8.2% vs 1.2%, $p = 0.02$)。尽管样本量有限, 但组间差异显著, 表明AAV5/AC6基因递送增加了左心室功能, 两组严重不良事件发生率相似, 心律失常事件没有增加, 超过了传统心衰治疗方法的水平。

心肌中的SERCA2a酶活性降低, 会导致舒张末期钙摄取减少, 引起心脏舒张功能异常, 能量需求增加。在CUPID试验中, 9名HF患者接受了一次冠脉内注射rAAV1/SERCA2a, 在6~12个月的随访中, 7名患者的症状、左心室功能、心肌重构都有改善, 另外2名心功能无改善患者体内已产生抗AAV1中和抗体^[45]。CUPID 1试验^[46]纳入了39名慢性HF患者, 冠脉内输注低、中、高剂量的rAAV1/SERCA2a, 随访12个月, 高剂量组与安慰剂组相比, 临床事件发生时间显著延长, 心血管事件发生率降低(危险比0.12, $p = 0.003$), 平均住院时间缩短4.1 d ($p = 0.05$); 3年后高剂量组复发心血管事件下降82% ($p = 0.048$)^[47]。但CUPID 2b研究^[48]未能得出有益结果, 该试验纳入近250名患者, 中位随访时间为17.5个月。与安慰剂相比, AAV1/SERCA2a没有减少HF复发事件(危险比0.93, 95%CI 0.53-1.65, $p = 0.81$)。安慰剂组20例(16%)死亡, AAV1/SERCA2a组25例(21%)死亡; 分别有18例和22例因心血管原因死亡。接受了基因治疗的患者3年后心肌活检中可检测到病毒DNA, 但转基因DNA的绝

对水平很低, 并且没有观察到任何功能益处^[49]。得到阴性结果的原因可能是: (1) AAV在冠脉内停留时间短暂, 限制了心肌细胞对载体的暴露; (2) 患者体内已产生抗AAV1中和抗体, 使SERCA2a在心肌细胞中表达水平低。如果使用AAV1在心肌中原位注射或AAV9全身多次注射来传递SERCA2a, 并且利用外泌体包裹AAV等方法克服宿主抗体中和可能产生更好的结果。

目前的动物实验与临床研究结果提示, AAV载体能有效应用于HF的治疗, 但还需研究者们优化剂量、选择合适的血清型和给药途径, 以提高AAV对心脏的选择性和转导效率, 从而为其进入临床打下坚实的基础。

综上, rAAV基因疗法在治疗HF、冠心病、扩张型心肌病、肥厚型心肌病以及心律失常等常见

CVD中都有很好的应用价值(表1)。

4 rAAV基因疗法的局限性

AAV用于治疗心脏疾病主要通过血液注射或者心脏原位注射, rAAV蛋白衣壳、DNA基因组和转基因蛋白产物可与宿主发生不同程度的免疫反应, 影响基因的有效传递和基因的持续表达。已经开发出几种策略来克服该障碍, 如血浆置换术和使用空衣壳作为诱饵, 但是它们不能有效地解决高滴度的中和抗体(NAb)^[50-51]。通过免疫酶消除抗AAV抗体^[52]、利用外泌体包裹AAV以克服宿主抗体中和^[53-54], 这些策略在临床环境下的有效性尚待测试。目前, 在许多临床研究中, NAb筛查和排除血清反应阳性的受试者仍然是必要的步骤。

Sabatino^[55]研究发现, 10年前接受AAV基因疗

表1 AAV基因疗法治疗CVD的研究汇总表

靶基因	血清型	靶组织细胞类型	机制	治疗CVD
Mdm2 ^[11]	AAV9	心肌细胞	改善 β -AR信号传导	HF
β ARKct ^[12]	AAV9	心肌细胞	改善 β -AR信号传导	HF
PDE4B ^[13]	AAV9	心肌细胞	改善 β -AR信号传导	HF
VEGF-B ₁₆₇ ^[14]	AAV9	心肌细胞	增加血管新生, 减少氧化应激	HF
Prdx1 ^[15]	AAV9	心肌细胞	减少炎症和氧化应激	HF
mAKAP β ^[16]	AAV9	心肌细胞	调节心肌细胞大小和长度	HF
shPLB ^[17]	AAV9	心肌细胞	激活Ca ²⁺ -ATP酶活性	HF
SUMO-1 ^[21]	AAV1	心肌细胞	调节钙处理	HF
CaPI3K ^[19-20]	AAV6	心肌细胞	减少氧化应激	HF、糖尿病心肌病
Ic1 ^[18]	AAV9	心肌细胞	改善 β -AR信号传导	HF
AC6 ^[42]	AAV5	心肌细胞	调节cAMP的产生	HF
SERCA2a ^[22-23]	AAV1	心肌细胞	调节钙处理	HF
IL-10 ^[26]	AAV8	血管内皮细胞	减少炎症反应	AS
STAT3 ^[25]	AAV8	血管内皮细胞	减少炎症反应	AS
hNetrin-1 ^[28]	AAV8	单核/巨噬细胞	减少炎症反应	AS
LDLR ^[29]	AAV8	肝细胞	纠正肝细胞LDLR基因中的点突变	AS
iNOS ^[30]	AAV2	血管内皮细胞	抑制损伤血管壁细胞增殖	支架内再狭窄
SERCA2a ^[31]	AAV5	血管平滑肌细胞	减少平滑肌细胞向泡沫细胞转化	支架内再狭窄
VEGF和AngI ^[32]	AAV1	心肌组织	诱导血管新生, 刺激心肌细胞增殖并减少细胞凋亡	心肌梗死
EcSOD ^[33]	AAV9	心肌组织	毛细血管新生增加, 减少中性粒细胞浸润	心肌梗死
MT1/2 ^[34]	AAV9	心肌组织	褪黑素受体对心脏的保护作用	心肌梗死
VEGF ^[35]	AAV9	心肌组织	促进功能性血管生成	心肌梗死
CaNA β ^[36]	AAV9	心肌细胞	调节钙处理	肥厚型心肌病
miR-1 ^[37]	AAV9	心肌细胞	改善钙交换, 抑制细胞凋亡	肥厚型心肌病
miR-387 ^[38]	AAV9	心肌细胞	调节MAPK通路	肥厚型心肌病
SERCA2a ^[39]	AAV9	心肌细胞	肌浆网/内质网钙摄取量增加	扩张型心肌病
miR146a/DLST ^[40]	AAV9	心肌细胞	抑制氧化性心肌细胞代谢	扩张型心肌病
CASQ2 ^[41]	AAV9	心肌细胞	纠正CASQ2基因突变	CPVT
ArchT ^[42]	AAV9	心肌细胞	抑制LSG的神经活性, 增加电生理稳定性	室性心律失常
AIP ^[43]	AAV9	心肌细胞	抑制由 β -肾上腺素刺激或程序性起搏引起的室性心律失常	CPVT

法治疗患有血友病B的狗, 治疗性基因片段有些被整合到了狗的染色体上控制生长的基因附近, 有诱发癌症的可能性。这唤起了人们对病毒载体基因治疗的担忧, 如果对病毒的纯化不到位, 就极易感染心脏外组织, 诱导肿瘤发生。

因此, 在开发和设计心脏特异性的AAV载体、进一步优化载体传递途径和方法、优化剂量、克服载体包装能力的限制以及控制靶基因表达的持续时间等方面仍需要不断摸索和改进, 从而为AAV基因疗法用于临床治疗心血管疾病打下坚实的基础。

5 rAAV基因疗法的现状与展望

大部分AAV基因疗法研发项目的靶向组织是肝脏、横纹肌和中枢神经系统。几乎所有天然AAV能够在肝脏中引发有效的转基因表达, 因此, 靶向肝脏的rAAV为治疗A型血友病^[56-57]、遗传性代谢性肝病^[58]等提供了优良的基因递送平台。AAV8和AAV9衣壳蛋白靶向多种肌肉类型, 能够用于治疗多种肌肉疾病^[59]。Nance等^[60]发现, 基于AAV9的CRISPR基因编辑技术/启动子结合AAV方法可以治疗杜氏肌营养不良症。rAAV基因疗法的另一重要方向是中枢神经系统, 包括眼睛和大脑。眼睛是一个相对隔离的环境, 直接进行眼内注射递送AAV基因疗法能够达到治疗多种遗传性眼病的效果^[61]。Spark Therapeutics公司开发的获批疗法Luxturna就是治疗由于RPE65基因突变所导致失明的患者^[62]。Bravo-Hernandez等^[63]发现, 在颈部和腰部脊髓一次性注射AAV9型病毒, 沉默SOD1基因, 可有效预防或阻止运动神经元退化, 从而预防或治疗肌萎缩侧索硬化。迄今为止, 全球有400多项基因疗法处于临床开发阶段, 有3种以AAV为载体的基因治疗产品获得上市批准, 但AAV在心血管领域的应用离进入临床还有一段距离。

基因治疗的有效性取决于对启动子、转基因、AAV血清型和转染器官的选择。rAAV载体可以通过心脏/冠脉内原位注射或全身静脉注射到达心脏或冠状动脉发挥作用。rAAV由于其安全性高、表达时间长, 可以避免每日给药等依从性相关的问题, 被视为最有前景的基因治疗载体。目前, 以rAAV为基础的基因疗法在CVD中的应用大部分还处于基础研究阶段, 尽管实验动物模型取得了成功, 但将基因治疗策略从实验室转移到临床是一项缓慢而艰巨的任务。利用外泌体包裹AAV以克服宿主抗体中和, 有助于提高AAV基因治疗的成功率和

安全性。基于CRISPR/Cas9基因编辑技术, 设计有心脏或血管特异性启动子的rAAV载体无疑是基因治疗最理想、最具有前景的方式^[64-65]。因此, rAAV基因治疗在心血管领域还有很大的研发空间和很好的应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science*, 1965, 149: 754-6
- [2] Flotte TR, Afione SA, Conrad C, et al. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10613-7
- [3] Dokainish H, Teo K, Zhu J, et al. Global mortality variations in patients with heart failure: results from the International Congestive Heart Failure (INTER-CHF) prospective cohort study. *Lancet Glob Health*, 2017, 5: e665-72
- [4] Grosse S, Penaud-Budloo M, Herrmann AK, et al. Relevance of assembly-activating protein for adeno-associated virus vector production and capsid protein stability in mammalian and insect cells. *J Virol*, 2017, 91: e01198-214
- [5] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358-78
- [6] Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2020, 21: 255-72
- [7] Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 2008, 16: 1073-80
- [8] Bera A, Sen D. Promise of adeno-associated virus as a gene therapy vector for cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev*, 2017, 22: 795-823
- [9] Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, et al. Adeno-associated virus gene therapy: translational progress and future prospects in the treatment of heart failure. *Heart Lung Circ*, 2018, 27: 1285-300
- [10] Zacchigna S, Zentilin L, Giacca M. Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system. *Circ Res*, 2014, 114: 1827-46
- [11] Jean-Charles PY, Yu SM, Abraham D, et al. Mdm2 regulates cardiac contractility by inhibiting GRK2-mediated desensitization of β -adrenergic receptor signaling. *JCI Insight* 2017, 2: e95998
- [12] Bauer R, Enns H, Jungmann A, et al. Various effects of AAV9-mediated β ARKct gene therapy on the heart in dystrophin-deficient (mdx) mice and δ -sarcoglycan-deficient (*Sgcd*^{-/-}) mice. *Neuromuscul Disord*, 2019, 29: 31-41
- [13] Karam S, Margaria JP, Bourcier A, et al. Cardiac overexpression of PDE4B blunts β -adrenergic response and maladaptive remodeling in heart failure. *Circulation*,

- 2020, 142: 161-74
- [14] Woitek F, Zentilin L, Hoffman NE, et al. Intracoronary cytoprotective gene therapy: a study of VEGF-B167 in a pre-clinical animal model of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66: 139-53
- [15] Tang C, Yin G, Huang C, et al. Peroxiredoxin-1 ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110357
- [16] Li J, Tan Y, Passariello CL, et al. Signalosome-regulated SRF phosphorylation determining myocyte growth in width versus length as a therapeutic target for heart failure. *Circulation*, 2020, 142: 2138-54
- [17] Suckau L, Fechner H, Chemaly E, et al. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation*, 2009, 119: 1241-52
- [18] Schwab DM, Tilemann L, Bauer R, et al. AAV-9 mediated phosphatase-1 inhibitor-1 overexpression improves cardiac contractility in unchallenged mice but is deleterious in pressure-overload. *Gene Ther*, 2018, 25: 13-9
- [19] Prakoso D, De Blasio MJ, Tate M, et al. Gene therapy targeting cardiac phosphoinositide 3-kinase (p110 α) attenuates cardiac remodeling in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318: H840-52
- [20] Prakoso D, De Blasio MJ, et al. Phosphoinositide 3-kinase (p110 α) gene delivery limits diabetes-induced cardiac NADPH oxidase and cardiomyopathy in a mouse model with established diastolic dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131: 1345-60
- [21] Tilemann L, Lee A, Ishikawa K, et al. SUMO-1 gene transfer improves cardiac function in a large-animal model of heart failure. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 211ra159
- [22] Katz MG, Brandon-Warner E, Fargnoli AS, et al. Mitigation of myocardial fibrosis by molecular cardiac surgery-mediated gene overexpression. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 151: 1191-200, e1193
- [23] Samuel TJ, Rosenberry RP, Lee S, et al. Correcting calcium dysregulation in chronic heart failure using SERCA2a gene therapy. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1086
- [24] Kumar S, Kang DW, Rezvan A, et al. Accelerated atherosclerosis development in C57B16 mice by overexpressing AAV-mediated PCSK9 and partial carotid ligation. *Lab Invest*, 2017, 97: 935-45
- [25] Khan JA, Cao M, Kang BY, et al. AAV/hSTAT3-gene delivery lowers aortic inflammatory cell infiltration in LDLR KO mice on high cholesterol. *Atherosclerosis*, 2010, 213: 59-66
- [26] Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, et al. Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther*, 2004, 11: 1772-9
- [27] Cao M, Khan JA, Kang BY, et al. Dual AAV/IL-10 plus STAT3 anti-inflammatory gene delivery lowers atherosclerosis in LDLR KO mice, but without increased benefit. *Int J Vasc Med*, 2012, 2012: 524235
- [28] Khan JA, Cao M, Kang BY, et al. Systemic human Netrin-1 gene delivery by adeno-associated virus type 8 alters leukocyte accumulation and atherogenesis *in vivo*. *Gene Ther*, 2011, 18: 437-44
- [29] Zhao H, Li Y, He L, et al. *In vivo* AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, 2020, 141: 67-79
- [30] Fishbein I, Guerrero DT, Alferiev IS, et al. Stent-based delivery of adeno-associated viral vectors with sustained vascular transduction and iNOS-mediated inhibition of in-stent restenosis. *Gene Ther*, 2017, 24: 717-26
- [31] Lompere AM, Hadri L, Merlet E, et al. Efficient transduction of vascular smooth muscle cells with a translational AAV2.5 vector: a new perspective for in-stent restenosis gene therapy. *Gene Ther*, 2013, 20: 901-12
- [32] Tao Z, Chen B, Tan X, et al. Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 2064-9
- [33] Konkalmatt PR, Beyers RJ, O'Connor DM, et al. Cardiac-selective expression of extracellular superoxide dismutase after systemic injection of adeno-associated virus 9 protects the heart against post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2013, 6: 478-86
- [34] Zhang C, Yang JB, Quan W, et al. Activation of paraventricular melatonin receptor 2 mediates melatonin-conferred cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 76: 197-206
- [35] Shi H, Xue T, Yang Y, et al. Microneedle-mediated gene delivery for the treatment of ischemic myocardial disease. *Sci Adv*, 2020, 6: eaaz3621
- [36] Li X, Li J, Martinez EC, Froese A, et al. Calcineurin A β -specific anchoring confers isoform-specific compartmentation and function in pathological cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*, 2020, 142: e153
- [37] Karakikes I, Chaanine AH, Kang S, et al. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2: e000078
- [38] Ganesan J, Ramanujam D, Sassi Y, et al. MiR-378 controls cardiac hypertrophy by combined repression of mitogen-activated protein kinase pathway factors. *Circulation* 2013, 127: 2097-106
- [39] Wasala NB, Yue Y, Lostal W, et al. Single SERCA2a therapy ameliorated dilated cardiomyopathy for 18 months in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 2020, 28: 845-54
- [40] Heggermont WA, Papageorgiou AP, Quaegebeur A, et al. Inhibition of microRNA-146a and overexpression of its target dihydrolipoyl succinyltransferase protect against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation*, 2017, 136: 747-61
- [41] Denegri M, Bongianino R, Lodola F, et al. Single delivery

- of an adeno-associated viral construct to transfer the CASQ2 gene to knock-in mice affected by catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is able to cure the disease from birth to advanced age. *Circulation*, 2014, 129: 2673-81
- [42] Yu L, Zhou L, Cao G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70: 2778-90
- [43] Bezzerides VJ, Caballero A, Wang S, et al. Gene therapy for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Circulation*, 2019, 140: 405-19
- [44] Hammond HK, Penny WF, Traverse JH, et al. Intracoronary gene transfer of adenylyl cyclase 6 in patients with heart failure: a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol*, 2016, 1: 163-71
- [45] Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail*, 2009, 15: 171-81
- [46] Jessup M, Greenberg B, Mancini D, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 2011, 124: 304-13
- [47] Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res*, 2014, 114: 101-8
- [48] Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*, 2016, 387: 1178-86
- [49] Lyon AR, Babalis D, Morley-Smith AC, et al. Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device - the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther*, 2020, 27: 579-90
- [50] Wright JF: AAV empty capsids: for better or for worse? *Mol Ther*, 2014, 22: 1-2
- [51] Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther*, 2014, 22: 338-47
- [52] Leborgne C, Barbon E, Alexander JM, et al. IgG-cleaving endopeptidase enables *in vivo* gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nat Med*, 2020, 26: 1096-101
- [53] Maurya S, Jayandharan GR. Exosome-associated SUMOylation mutant AAV demonstrates improved ocular gene transfer efficiency *in vivo*. *Virus Res*, 2020, 283: 197966
- [54] Meliani A, Boisgerault F, Fitzpatrick Z, et al. Enhanced liver gene transfer and evasion of preexisting humoral immunity with exosome-enveloped AAV vectors. *Blood Adv*, 2017, 1: 2019-31
- [55] Sabatino DE. Clogging up the pipeline: factor VIII aggregates. *Blood*, 2020, 135: 1825-7
- [56] Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med*, 2017, 377: 2519-30
- [57] Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, et al. Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *N Engl J Med*, 2020, 382: 29-40
- [58] Yang L, Wang L, Huo Y, et al. Amelioration of an inherited metabolic liver disease through creation of a *de novo* start codon by cytidine base editing. *Mol Ther*, 2020, 28: 1673-83
- [59] Wang D, Zhong L, Nahid MA, et al. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11:345-64
- [60] Nance ME, Shi R, Hakim CH, et al. AAV9 edits muscle stem cells in normal and dystrophic adult mice. *Mol Ther*, 2019, 27: 1568-85
- [61] Petit L, Khanna H, Punzo C. Advances in gene therapy for diseases of the eye. *Hum Gene Ther*, 2016, 27: 563-79
- [62] Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 2017, 390: 849-60
- [63] Bravo-Hernandez M, Tadokoro T, Navarro MR, et al. Spinal subpial delivery of AAV9 enables widespread gene silencing and blocks motoneuron degeneration in ALS. *Nat Med*, 2020, 26: 118-30
- [64] Moreno AM, Fu X, Zhu J, et al. *In situ* gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation. *Mol Ther*, 2020, 28: 1931
- [65] Wang D, Zhang F, Gao G. CRISPR-based therapeutic genome editing: Strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors. *Cell*, 2020, 181: 136-50