

- chem Biophys Res Commun, 2008, 365(4): 628-635.
- [29] Gautam AH, Zeevalk GD. Characterization of reduced and oxidized dopamine and 3,4-dihydrophenylacetic acid, on brain mitochondrial electron transport chain activities. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807(7): 819-828.
- [30] Liang CL, Wang TT, Luby-Phelps K, et al. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. Exp Neurol, 2007, 203(2): 370-380.

帕金森病基因治疗的研究进展

刘菲¹, 王思² 综述 李秀华¹, 贾军^{3,4} 审校

1. 山东大学附属千佛山医院神经内科, 山东省济南市 250014
2. 潍坊医学院神经内科, 山东省潍坊市 261000
3. 首都医科大学生理教研室, 北京市 100069
4. 首都医科大学神经生物学国家重点实验室, 北京市 100069

摘要: 帕金森病除了药物治疗和手术治疗外, 基因治疗作为一种新的治疗策略备受学术界关注。病毒载体和非病毒载体是常用的基因转导体, 目前人们对于目的基因的研究仍着重于以下基因: 影响多巴胺代谢的相关基因、神经营养因子相关基因以及神经递质平衡调节的相关基因, 多基因联合治疗成为重点。近年来, 国内外相继开展了众多帕金森病基因治疗的实验和临床研究, 取得了一定的成就, 更多的临床实验有待进一步开展。

关键词: 帕金森病; 基因治疗; 目的基因; 载体

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种中老年人常见的中枢神经系统退行性疾病, 其主要病理变化是中脑黑质、纹状体多巴胺能神经元变性坏死及路易小体的形成, 主要临床表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直、姿势步态异常及睡眠、情绪障碍等非运动症状。PD 的发生、发展可能与遗传因素、氧化应激、线粒体功能障碍、免疫功能异常等多种因素有关, *LRRK2*、*ATP13A2*^[1] 等基因突变与帕金森病的发病密切相关。目前 PD 的治疗主要有药物治疗、手术治疗和康复、心理治疗等。但无论何种治疗均不能阻止疾病的进展, 更无法治愈。鉴于 PD 的病损部位局限, 受累神经元相对单一, 可以通过载体良好定位, 因此被认为是最适合进行基因治疗的神经疾病之一。国内外就此进行了众多的实验, 而且也取得了较好的结果, 现就 PD 的基因治疗中常用目的基因的研究现状作一简要综述。

1 PD 基因治疗研究的基础

1.1 PD 基因治疗的动物模型

要研究 PD 基因治疗的效果, 建立能模拟人类 PD 发病特征的动物模型至关重要。目前常用 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 立体定向微注入大鼠单侧黑质、内侧前脑束以及纹状体建立的偏侧 PD 大鼠旋转模型^[2] 和向小鼠腹腔注射 MPTP (MPP⁺) 建立的双侧黑质损伤鼠模型进行基因治疗的研究, 也有少部分向灵长类动物 (如猴子) 体内注射 MPTP 来建立与人类更为相近的模型^[3], 但由于其资金耗费及伦理问题应用较少。最近, 转基因 PD 动物模型, 如 α -synuclein^[4]、*LRRK2* 基因突变鼠和 MitoPark^[5] 在基因治疗研究中也得到了一定应用^[6]。

1.2 PD 基因治疗的基因转移途径

基因转移的途径有两种, 即直接法 (in vivo) 和间接法 (ex vivo)。前者是指直接将携带有目的基因的载体注入到靶点, 此途径简便、直接, 但感染

基金项目: 首都医科大学神经生物学国家重点实验室开放课题 (3500-112291); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (2008BS03012)。

收稿日期: 2014-04-15; 修回日期: 2014-07-25

作者简介: 刘菲 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事帕金森病临床研究。

通讯作者: 李秀华 (1973-), 女, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事帕金森病等神经变性疾病及运动障碍性疾病的临床及实验研究。E-mail: lxh731023@126.com。

率低、靶向性差,可能会对宿主染色体表达产生一定的影响;而后者是指首先将目的基因转入到培养的靶细胞内,在体外筛选、扩增后移植入靶位点,这一途径转染率高,可以进行多基因联合转染,但其操作复杂,植入的靶细胞本身可能对周围的脑组织有侵袭危险。因此,在研究过程中应根据研究条件及目的选择合适的途径。

1.3 PD 基因治疗的载体选择

1.3.1 病毒载体 病毒载体是目前基因治疗的主要载体,其主要包括腺相关病毒(adeno associated virus, AAV)载体、腺病毒(adenovirus, Ad)载体、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)载体以及逆转录病毒(retroviruses, RV)载体,目前国内外应用最多的是 AAV 载体。

AAV 载体中的致病基因已去除,它可以高效转染非分裂细胞,但是可插入的 DNA 片段小,一般小于 4.7 kb,且有产生插入性突变的危险。随着对这一载体的研究,其安全性也得到了认证,成为目前最常使用的基因转移载体^[7,8],最近 McFarland 等^[9]进行了重组腺相关病毒(rAAV)载体的研究,发现在小鼠纹状体系统中 rAAV 2/1, 2/5 和 2/8 的转导率显著高于 rAAV 2/2,为临床研究提供了更好的新型载体。

Ad 载体可用于静息期细胞,也可用于分裂期细胞,转染率高,并且克服了 AAV 载体转染 DNA 片段小的缺点,在体外和体内均有较高的感染效率,但其具有一定的致病性,可引起宿主免疫反应。

HSV 载体和 RV 载体也是 PD 基因治疗的主要载体。HSV 载体为 DNA 病毒,具有嗜神经性和潜伏性,是神经系统疾病基因治疗的有效载体。RV 载体(最常见的是 HIV 载体)为单链 RNA 病毒,转导的基因易于与宿主 DNA 整合,可以转染大于 8 kb 的基因片段,是转染大片段基因的良好载体。目前将慢病毒作为载体进行基因治疗方面的研究也较多,对其有效性有了初步的肯定^[3]。

1.3.2 非病毒载体 病毒载体不能通过血脑屏障,为平时的研究及临床应用带来不便。脂质体和受体介导的基因转移可以解决这一问题,但转导效率相对较低,同时需选择合适的载体。Swanson 等^[10]将胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)与抗人类胰岛素受体的抗体结合成 HIRmAb-GDNF,以通过血脑屏障来治疗帕金森猴,结果却没有发现神经保护效应,而引发了致

胰瘤性及心肌炎等剂量相关不良反应,具体机制有待探讨,在临床研究中应慎用此类载体。

2 常用目的基因的选择

2.1 影响多巴胺代谢的相关基因

PD 患者纹状体内多巴胺(dopamine, DA)含量的显著降低是其临床症状出现的主要原因。DA 是由酪氨酸经酪氨酸羟化酶(tyrosine Hydroxylase, TH)生成左旋多巴,再经芳香族氨基酸脱羧酶(aromatic amino acid decarboxylase, AADC)催化而成。作为这一反应的限速酶,而四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)是 TH 的辅酶, GTP 环化水解酶 1(GTP cyclization hydrolase 1, GCH-1)是 BH4 生物合成所必须的酶。由此可见 TH、AADC 及 GCH-1 酶的活性可影响生物体内多巴胺的水平。因此将 TH、AADC 或 GCH-1 基因导入体内以增加多巴胺的含量是目前 PD 基因治疗的常用策略之一。

2.1.1 TH 基因 TH 是多巴胺合成的重要限速酶,众多的试验研究也证实了这一基因治疗的有效性。Shi 等^[11]将 TH 基因修饰的骨髓基质干细胞注入 PD 大鼠纹状体内,实验组显现了行为学的明显改善,而且多巴胺的含量也有明显的增加。众多类似的研究也同样发现了 TH 基因在 PD 治疗中的有效作用^[2,12,13]。

2.1.2 AADC 基因 AADC 基因的有效表达可以增加内、外源性左旋多巴的利用,减少甚至停用 PD 患者药物的使用。Muramatsu 等^[7]将 AADC 基因导入 6 位 PD 患者体内进行了为期 6 个月的一期临床试验,发现患者在 UPDRS 评分、运动症状及 PET 表现方面均展现了明显的改善,为 AADC 基因临床治疗的安全性和有效性提供了四级证据。Christine 等^[8]也有类似的临床发现。

2.1.3 GCH-1 基因 GCH-1 基因也是多巴胺生成的重要基因之一,目前对于此基因的研究主要采用联合基因研究的策略。鲁玲玲等^[14]将携带有 TH、AADC 和 GCH-1 三种基因和只包含 TH + AADC、TH + GCH-1 双重基因的骨髓基质干细胞分别移植到 PD 模型大鼠纹状体内,发现三重基因治疗组较 AAV - TH + AADC 组的效果更好,提示了除 TH 和 AADC 基因外, GCH-1 基因也是进行基因治疗 PD 的重要目的基因。

2.2 神经营养因子基因

2.2.1 GDNF 基因 胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)能特

异性保护多巴胺能神经元,成为PD治疗最受关注的神经保护剂。Biju等^[15]向MPTP诱导的PD小鼠体内转导*GDNF*基因,发现*GDNF*可明显减少MPTT导致的多巴胺神经元退变。很多类似的研究也有同样的发现^[3,11,16],印证了*GDNF*基因在PD治疗中的有效作用。但Su等^[17]发现经黑质途径向帕金森猴体内注入AAV2-*GDNF*时会引起严重的体重下降。同样Simmons等^[10]通过HIRmAb(人胰岛素受体单克隆受体)介导*GDNF*进入PD猴体内进行研究时,也出现了严重的过敏反应,引发了对*GDNF*导入方式安全性的思考。

2.2.2 BDNF 基因 脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是神经生长因子家族中的一员,具有一定的神经保护作用,因而被选为治疗PD的目的基因之一。Somoza等^[18]运用人骨髓间充质干细胞经过黑质途径向PD模型鼠介导*BDNF*基因,可见*TH*阳性细胞的增加,阿扑吗啡所致的运动障碍也得到了明显的改善。

2.2.3 VEGF 基因 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)同样具有营养神经的作用,对多巴胺神经元的损害及退变也具有一定的保护作用。Yue等^[19]给予6-OHDA诱导的PD鼠*VEGF*治疗后,可以缓解阿扑吗啡所致的不对称旋转运动,一定程度上表明了它的神经保护作用。Herrán等^[16]也同样发现了*VEGF*的治疗作用。

2.2.4 Nurrl 基因 *Nurrl*可以提高多巴胺转运体(DAT)和*TH*基因的转录,对DA能神经元的发育及存活同样具有重要作用。Heng等^[20]发现*Nurrl*基因敲除小鼠体内*TH*阳性神经元明显下降,间接说明*Nurrl*对于多巴胺神经元的正常存活具有重要作用。黄仕雄等^[21]*Nurrl*转基因治疗PD模型鼠时发现其能有效地增加鼠脑内多巴胺的含量和纹状体区*TH*的表达,运动症状也有改善。

2.3 神经递质平衡调节相关基因

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是脑内重要抑制性神经递质,由谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)催化下合成,GABA的作用原理是抑制PD丘脑底核引起的靶核病理理性兴奋,以此消除PD症状。LeWitt等^[22]对66位PD患者进行了临床试验,经过6个月的观察,发现GAD治疗组患者UPDRS评分便得到了明显的改善,虽然发现了一些可能由手术引起的不良反应,但仍不能掩盖GAD对PD患者的治疗作用。

2.4 多基因联合治疗

PD的病因复杂,单基因的转染可能会受局部微环境变化的影响,而使其治疗作用下降,同时转染多种基因,会有更好的效果。鲁玲玲等^[14]将携带有*TH*、*AADC*和*GCH-I*三重基因及*TH* + *AADC*、*TH* + *GCH-I*双重基因的骨髓基质干细胞移植到PD模型大鼠纹状体内,观察各组PD模型鼠的行为改变及组织内多巴胺的含量,结果显示三重基因组较双重基因组效果更明显。而且*TH* + *GCH-I*及*TH* + *GDNF*双重基因比单基因治疗有更为明显的行为改善作用^[11,23]。

3 问题与展望

传统的帕金森病药物治疗和手术治疗只能近期改善部分症状,并不能阻止病情的发展,基因治疗是一理想的治疗方式,但在目前仍不成熟,动物试验虽取得了较好的效果,但进行的临床试验较少,许多问题还有待解决,比如基因治疗的载体安全性及靶向性有待提高,基因治疗导入途径的安全性及有效性有待进一步明确,基因治疗对移植部位微环境的影响大小尚不确定,所致的不良反应还有待进一步解决,PD动物模型与人类本身的生物学差异及对基因治疗的效应差异仍需要进一步的探索及研究。鉴于目前的相关研究,我们认为在对相关基因有效性及安全性研究的基础上,PD基因治疗应向多基因联合转导的方向发展,同时着手开展更多的临床实验,为基因治疗进入临床应用做好准备。

参 考 文 献

- [1] 马越,刘俊平,汤颖. ATP13A2与帕金森病相关性的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2013, 40(5-6): 474-477.
- [2] 邹志浩,张文德,魏成,等. TH基因修饰NdSCs-D-BM-SCs治疗PD大鼠的实验研究. 新疆医学, 2012, 6(24): 21-27.
- [3] Emborg ME, Moirano J, Raschke J, et al. Response of aged parkinsonian monkeys to in vivo gene transfer of GDNF. Neurobiol Dis, 2009, 36(2): 303-311.
- [4] 杨旭,彭国光. α -突触核蛋白过表达转基因帕金森病动物模型研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(3): 278-281.
- [5] Zhuang X, Li X, Redus L, et al. Cognitive Dysfunction Precedes the Onset of Motor Symptoms in the MitoPark Mouse Model of Parkinson's Disease. PLoS ONE, 2013, 8(8): e71341.

- [6] Covy JP , Giasson BI. α -Synuclein , leucine-rich repeat kinase-2 , and manganese in the pathogenesis of Parkinson disease. *Neurotoxicology* , 2011 , 32 (5) : 622-629.
- [7] Muramatsu SI , Fujimoto KI , Kato S , et al. A Phase I Study of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy for Parkinson ' s Disease. *Molecular Therapy* , 2010 , 18 (9) : 1731-1735.
- [8] Christine CW , Starr PA , Larson PS , et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* , 2009 , 73 (20) : 1662-1669.
- [9] McFarland NR , Lee JS , Hyman BT , et al. Comparison of transduction efficiency of recombinant AAV serotypes 1 , 2 , 5 , and 8 in the rat nigrostriatal system. *J Neurochemistry* , 2009 , 109 (3) : 838-845.
- [10] Mosley RL , Ohshima-Hosoyama S , Simmons HA , et al. A Monoclonal Antibody-GDNF Fusion Protein Is Not Neuroprotective and Is Associated with Proliferative Pancreatic Lesions in Parkinsonian Monkeys. *PLoS ONE* , 2012 , 7 (6) : e39036.
- [11] Shi D , Chen G , Lv L , et al. The effect of lentivirus-mediated TH and GDNF genetic engineering mesenchymal stem cells on Parkinson ' s disease rat model. *Neurol Sci* , 2010 , 32 (1) : 41-51.
- [12] 黄月 , 常成 , 张杰文 , 等. TH-NTN 基因修饰的骨髓间充质干细胞对帕金森病模型大鼠脑内相关蛋白表达的影响. *中国医学杂志* , 2012 , 92 (33) : 2353-2356.
- [13] 张耀芬 , 李振洲 , 郑静晨 , 等. TH 基因修饰的永生化的神经干细胞移植对帕金森病大鼠行为和多巴胺代谢的影响. *武警医院* , 2011 , 22 (1) : 34-42.
- [14] 鲁玲玲 , 赵焕英 , 吴均 , 等. 多巴胺合成相关酶基因联合治疗帕金森病大鼠模型的研究. *中国生物工程杂志* , 2009 , 29 (2) : 34-41.
- [15] Biju KC , Zhou Q , Li G , et al. Macrophage-mediated GDNF Delivery Protects Against Dopaminergic Neurodegeneration: A Therapeutic Strategy for Parkinson ' s Disease. *Mol Ther* , 2010 , 18 (8) : 1536-1544.
- [16] Herrán E , Ruiz-Ortega Já , Aristieta A , et al. In vivo administration of VEGF- and GDNF-releasing biodegradable polymeric microspheres in a severe lesion model of Parkinson ' s disease. *Eur J Pharm Biopharm* , 2013 , 85 (3) : 1183-1190.
- [17] Su X , Kells AP , Huang EJ , et al. Safety evaluation of AAV2-GDNF gene transfer into the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged and parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther* , 2009 , 20 (12) : 1627-1640.
- [18] Somoza R , Juri C , Baes M , et al. Intraneural Transplantation of Epigenetically Induced BDNF-Secreting Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cell-Based Therapies in Parkinson ' s Disease. *Bio Blood Marrow Transplant* , 2010 , 16 (11) : 1530-1540.
- [19] Yue X , Hariri DJ , Caballero B , et al. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson ' s disease. *Neuroscience* , 2014 , 258 : 385-400.
- [20] Heng X , Jin G , Zhang X , et al. Nurr1 regulates Top II β and functions in axonogenesis of mesencephalic dopaminergic neurons. *Mol Neurodegen* , 2012 , 7 (1) : 4.
- [21] 黄仕雄 , 刘军 , 文国强 , 等. Nurr1 基因修饰人脐血间充质干细胞源性多巴胺能神经元移植治疗帕金森病. *中山大学学报* , 2009 , 30 (5) : 522-526.
- [22] LeWitt PA , Rezai AR , Leche MA , et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson ' s disease: a double-blind , sham-surgery controlled , randomised trial. *Lancet Neurol* , 2011 , 10 (4) : 309-319.
- [23] Cederfjäll E , Sahin G , Kirik D , et al. Design of a Single AAV Vector for Coexpression of TH and GCH1 to Establish Continuous DOPA Synthesis in a Rat Model of Parkinson ' s Disease. *Mol Ther* , 2012 , 20 (7) : 1315-1326.