

帕金森病基因治疗研究进展

欧阳佳 武广永 综述 刘如恩 审校

【关键词】 帕金森病;基因治疗;目的基因;载体
【文章编号】 1009-153X(2015)03-0187-03 【文献标志码】 B 【中国图书资料分类号】 R 742.5; R 459.9

随着我国老龄化的进展,帕金森病(Parkinson’s disease, PD)已成为危害老年人健康最多发的疾病之一,是位居第二的神经变性疾病,发病率仅次于阿尔茨海默病,其临床表现主要为静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态异常,其病理学特征是黑质多巴胺能神经元变性缺失,患病率在 60 岁以上人群达 1%~2%^[1],给家庭和社会都带来了沉重的负担。目前,PD 最常用的治疗方法是药物治疗,但长期服用会有一定的副作用,远期效果不好^[2],而手术治疗费用昂贵并且有一定的适应症,尚未广泛的应用于临床中。当前基因治疗被认为是一种很有潜力的治疗方法,这种治疗方法可以改变神经营养因子、抗凋亡蛋白、抗氧化分子的表达水平,从而阻止中枢神经系统细胞尤其是神经元的凋亡,起到治疗疾病的作用^[3]。PD 的基因治疗已成为全球研究的热点,而如何选择合适目的基因及载体是基因治疗的关键,现就 PD 基因治疗目的基因及载体选择最新研究进展予以概述。

1 目的基因的选择

1.1 与多巴胺合成相关的基因 黑质纹状体多巴胺水平的降低是引起 PD 的直接原因,立体定向注射参与多巴胺合成的基因对 PD 有一定的治疗作用。参与多巴胺合成的基因有:酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)基因、GTP 环水解酶 1(GTP cyclohydrolase 1, GCH1)基因、芳香左旋氨基酸脱羧酶(aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC)基因等。TH 基因是最早被研究的基因之一,TH 将酪氨酸转化为左旋多巴,是多巴胺合成途径的限速酶。

周政等^[4]研究表明 TH 基因修饰的神经干细胞移植对 PD 大鼠有明显的治疗作用。四氢生物嘌呤是合成 TH 的辅酶, GCH1 又是合成四氢生物嘌呤的限速酶, GCH1 在多巴胺神经元合成过程中也发挥着重要的作用。Shen 等^[5]研究证明在体外细胞实验中, TH、AADC、GCH1 基因共转染比 TH、AADC 基因共转染产生更多的多巴胺。AADC 基因是将左旋多巴转变成多巴胺的关键酶,是最近研究的热点之一。2010 年, Shin-ichi 等^[6]用腺相关病毒将 AADC 基因导入 PD 患者的脑内,对 6 名 PD 患者进行了一项为期 6 个月的临床试验,并用帕金森病统一评分量表(unified Parkinson’s disease rating scale, UPDRS)评分等多种方法进行评估,为 AADC 基因治疗的安全性和有效性提供了四级证据。目前, AADC 基因是参与多巴胺合成基因中的热点,有望投入到 PD 的后期临床治疗中。

1.2 对多巴胺神经元起保护作用的基因 在 PD 治疗的基因选择方面,除了参与多巴胺合成的基因,保护多巴胺神经元的基因也发挥着重要的作用。保护多巴胺神经元的基因有:胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)基因、核受体相关蛋白 1(nuclear receptor-related protein 1, NURR1)基因、神经营养因子(neurturin, NTN)基因等。GDNF 基因最先因为其在保护多巴胺神经元方面潜在的作用被发现,随后许多研究者用腺相关病毒将 GDNF 基因导入 6-羟基多巴胺诱导的 PD 大鼠黑质纹状体均可减弱多巴胺神经元的丢失^[7]。亦有研究用慢病毒将 GDNF 基因导入 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶诱导的灵长动物的 PD 模型中可以阻止黑质纹状体的退变^[8]。现在 GDNF 基因的研究已有大量报道,并取得一定的成果,但在用于 PD 患者的研究中治疗效果并不令人满意^[9]。

最近研究表明 NURR1 基因、NTN 基因与 PD 的发病也有重要的关系。NURR1 基因是最近研究的

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.03.022
作者单位:330006 南昌,南昌大学医学院研究生院(欧阳佳);100700 北京,北京军区总医院(武广永);100029 北京,中日友好医院(刘如恩)

热点。NURR1 基因属于孤儿核受体家族,在大鼠中作为一种转录因子被发现,调控 TH 基因的表达。Kaoru 等^[10]研究发现 NURR1 基因通过抑制星形胶质细胞和小胶质细胞炎症相关基因的表达来保护多巴胺神经元,说明 NURR1 基因与 PD 发生发展的联系是多方面的。目前研究显示 PD 的发病与脑内的神经炎症有一定的关系^[11],而 NURR1 基因可抑制星形胶质细胞及小胶质细胞的炎症相关基因的表达,可改善动物或人体脑内的微环境,不仅有利于多巴胺神经元的存活,而且有利于提高移植神经干细胞的存活率及神经干细胞分化成的多巴胺神经元的存活率,所以 NURR1 基因是目前最有前景的 PD 治疗的目的基因。

NTN 基因与 GDNF 基因是同一蛋白质家族的成员,因修复损坏及濒死的多巴胺神经元而被知晓。Gasmi 等^[12]研究显示在 6-羟基多巴胺诱导的大鼠实验中,NTN 基因对多巴胺能神经元的保护作用长达 6 个月。2008 年, Marks 等^[13]在一项 I 期临床试验中,对 12 例 PD 患者注射腺相关病毒转染的 NTN 基因,不管是低剂量还是高剂量注射组,患者 UPDRS 评分显著提高,而且安全性高。2011 年, Travis 等^[14]研究发现 NTN 基因不仅能减缓 PD 的发展进程,而且可以提高治疗效果。NTN 的基因治疗效果也逐渐引起人们的注意,是一个比较成熟的 PD 治疗的目的基因。

1.3 其他 在 PD 基因治疗的研究过程中,研究发现除了参与多巴胺神经元合成和保护多巴胺神经元的基因外, RNA 等分子在 PD 治疗中的作用也逐渐被人们所认识。目前, miRNA 和 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 在 PD 治疗中的作用引起人们的关注。

miRNA 是小的非编码调控分子,参与多个生理和疾病中的重要过程,如干细胞生物学和神经退行性病变。由于它们相对较小的体积和易于导入的特点,在大多数疾病中, miRNA 是非常有前途的基因治疗靶点,如神经退行性疾病。许多研究证明 miRNA 对于神经元和未成熟的神经元的存活和分化是必须的^[15]。Junn 等^[16]发现 MiR-7 通过调控内源性 α -突触核蛋白的水平来调控 PD 的发生发展。多种 miRNA 与 PD 相关,为 PD 治疗开启了新的方向。

RNAi 是指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时,该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默,从而抑制特定基因表达。 α -突触核蛋白是一种小的蛋白,最近发现 PD 的发病与这种蛋白的表达有关。依靠 RNAi 选择性地破坏 α -突触核蛋

白 mRNA 和/或阻止蛋白质翻译,已被证明可成功的减少内源性及过表达的 α -突触核蛋白的水平。在体内和体外实验中,进一步推进了对 PD 的研究^[17]。RNAi 已经逐渐成为研究的热点,为 PD 的治疗提供新的可能。

2 PD 基因转移的载体及方式

将目的基因转染到靶细胞,需要选择合适的载体。目前,基因转移的载体主要有病毒载体和非病毒载体。

2.1 病毒介导的基因转移 病毒载体具有广泛的宿主而且导入率高等特点,是目前基因治疗的主要选择,用于 PD 基因脑内转移的病毒载体包括慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体以及逆转录病毒载体等。腺相关病毒和慢病毒载体,是唯一已应用于中枢神经系统临床基因治疗试验的载体^[9]。

慢病毒属于逆转录病毒家族。慢病毒的最大容量为 18 kb,但最有效的包装取值范围为 6~9 kb。慢病毒有能力整合到宿主细胞基因组,导致稳定的转基因表达。此功能对于体外基因治疗的应用特别有用,使用慢病毒转导可以使基因在细胞株或干细胞稳定表达。2010 年, Lim 等^[18]研究显示,慢病毒载体是相对安全的,尚没有任何形成肿瘤的依据。但是因为整合可以发生在任意位置,在用于体内基因治疗中,插入突变是必须考虑到的,在临床治疗中我们需要找到更加安全有效的载体。腺相关病毒是最常见地应用于中枢神经系统疾病临床试验中的载体,是细小病毒家族的一些小的无包膜病毒,其载体颗粒可以有效感染范围广泛的细胞,包括有丝分裂后细胞,并表现出良好的嗜神经细胞性,它有良好的安全性,并提供高效的传导和持久表达的神经元。Shen 等^[19]使用腺相关病毒载体转染的 TH、AADC 和 GCH1 基因表达持久,并改善 6-羟基多巴胺损毁 PD 大鼠的行为。腺相关病毒的主要缺点是包装能力有限 (4.7 kb)^[9]。总体而言,在中枢神经系统, AAV 载体是传递基因的理想载体。

2.2 非病毒介导的基因转移 非病毒介导的基因转移主要包括脂质体介导的基因转移、DNA-磷酸钙共沉淀法、微粒子轰击法 (基因枪)、受体介导的转移和基因直接注射等。相对于病毒载体,非病毒载体有以下优点:易于制作,可以大规模生产,免疫原性低;缺点是转染效率相对较低^[3]。

越来越多的 PD 基因治疗的实验正在开展,并取得一定的效果,但是基因治疗在目前还有许多问题

亟待解决,比如如何选择治疗时机、如何对目的基因表达的调控、如何使目的基因稳定的表达。虽然还有许多问题需要解决,但我们有理由相信,随着对基因结构功能及 PD 基因调控机制研究的深入,以及基因转染技术的改进,基因治疗必将成为人类彻底治愈 PD 的一种重要手段。

【参考文献】

[1] Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, *et al.* Epidemiology of Parkinson's disease [J]. J Neurol, 2008, 255(Suppl 5): 18-32.

[2] Fahn S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias [J]. Ann Neurol, 2000, 47(1): 2-11.

[3] Goyal AK, Khatri K, Vyas SP. Patents on Non-viral mediated gene delivery [J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2008, 2(1): 44-60.

[4] 周政,阴金波,杨辉,等. TH 基因修饰的神经干细胞移植治疗帕金森病的实验研究 [J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(5): 375-379.

[5] Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, *et al.* Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease [J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(11): 1509-1519.

[6] Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, *et al.* A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease [J]. Mol Ther, 2010, 18(9): 1731-1735.

[7] Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, *et al.* Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system [J]. J Neurosci, 2000, 20(12): 4686-4700.

[8] Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, *et al.* Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease [J]. Science, 2000, 290(5492): 767-773.

[9] Coune PG, Schneider BL, Aebischer P, *et al.* Parkinson's disease: gene therapies [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(4): a009431.

[10] Kaoru S, Beate W, Christian TC, *et al.* A Nurr1/CoREST transrepression pathway attenuates neurotoxic inflammation in activated microglia and astrocytes [J]. Cell, 2009, 137(1): 47-59.

[11] Nolan YM, Sullivan AM, Toulouse A, *et al.* Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation [J]. Trends Mol Med, 2013, 19(3): 187-196.

[12] Gasmi M, Herzog CD, Brandon EP, *et al.* Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease [J]. Mol Ther, 2007, 15(1): 62-68.

[13] Marks WJJ, Ostrem JL, Verhagen L, *et al.* Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial [J]. Lancet Neurol, 2008, 7(5): 400-408.

[14] Travis BL and David GS. Parkinson disease, primates, and gene therapy: vive la différence [J]. Mov Disord, 2011, 26(1): 2-3.

[15] Choi PS, Zakhary L, Choi WY, *et al.* Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis [J]. Neuron, 2008, 57(1): 41-55.

[16] Junn E, Lee KW, Jeong BS, *et al.* Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(31): 13052-13057.

[17] McCormack AL, Mak SK, Henderson JM, *et al.* Alpha-synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra [J]. PloS One, 2010, 5(8): e12122

[18] Lim ST, Airavaara M, Harvey BK. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS [J]. Pharmacol Res, 2010, 61(1): 14-26.

(2013-08-19 收稿, 2014-11-14 修回)