

# HSV 载体用于中枢神经损伤基因治疗的研究进展

庄 静,马林昆,曹 霞

基金项目:国家自然科学基金地区基金(No. 31160206)

作者单位:(650101)中国云南省昆明市,昆明医科大学第二附属医院中心实验室

作者简介:庄静,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:马林昆,毕业于东南大学医学院,硕士,主任医师,硕士研究生导师,院长,研究方向:眼底病. mlk-ynkm@163.com

收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-11-04

## Research progress on herpes simplex virus vectors in gene therapy for central nervous system injury

Jing Zhuang, Lin-Kun Ma, Xia Cao

Foundation item: National Natural Science Area Foundation (No. 31160206)

Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Lin-Kun Ma. Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. mlk-ynkm@163.com

Received: 2013-09-03 Accepted: 2013-11-04

### Abstract

• Gene therapy has increasingly shown a significant role in clinical trials in recent years, and has become a new treatment for the central nervous system diseases which conventional methods are difficult to cure. Herpes simplex virus (HSV), a common human natural pathogen, has a natural neural tropism and can naturally infect post-mitotic neurons from retrograde infection of peripheral nerves into the central nervous system (CNS) and has a long-term incubation. Therefore, HSV can be used as a means of delivery of exogenous genes. The optic nerve belongs to the CNS, thus, HSV vectors may be considered for gene therapy after optic nerve injury. In this paper, we reviewed the research progress of HSV as a vector for gene therapy after CNS injury and explained the feasibility of HSV for gene repair after optic nerve injury.

• KEYWORDS: herpes simplex virus; central nervous system; gene therapy; optic nerve injury

Citation: Zhuang J, Ma LK, Cao X. Research progress on herpes simplex virus vectors in gene therapy for central nervous system injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(12):2411-2413

### 摘要

近年来,基因治疗(gene therapy)在临床试验上越来越受

到重视,正成为常规方法难以治愈的中枢神经系统疾病的新的治疗手段。单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是自然界普遍存在的人类病原体,具有天然的神经趋向性,能自然感染有丝分裂后的神经元,可从外周神经逆行感染进入中枢神经系统(CNS)并在其中长期潜伏,是外源大容量基因常用的的运载工具。视神经属于中枢神经系统,因此,HSV载体可考虑用于视神经损伤后的基因治疗。本文综述了HSV作为载体用于CNS损伤后的基因治疗的研究进展并阐述用于视神经损伤后基因修复的可行性。

关键词:单纯疱疹病毒;中枢神经系统;基因治疗;视神经损伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.13

引用:庄静,马林昆,曹霞. HSV载体用于中枢神经损伤基因治疗的研究进展. *国际眼科杂志* 2013;13(12):2411-2413

### 0 引言

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是一类双链DNA病毒,其宿主范围广,能将外源基因导入终末分化细胞及有丝分裂后静止期细胞中表达,对神经系统有天然的亲嗜性,并能在神经元中建立长期稳定的隐性感染。近年来,由于神经遗传学研究的进展、CNS疾病发病机制的进一步阐明、导入外源性基因载体的改进及其基因转移技术的进步,使基因介导CNS疾病的治疗越来越趋近现实,CNS作为基因治疗的靶器官正逐步实现。视神经损伤后再生修复比较困难,常常因缺乏有效的治疗而失明,而视神经属于中枢神经系统,研究HSV载体用于视神经损伤后的基因修复作用是当前比较有创新性的想法。

### 1 HSV载体的研究进展

1.1 HSV的基因结构特点<sup>[1]</sup> 单纯疱疹病毒(HSV)是一类双链DNA病毒,HSV基因组中已知的84个基因中有一半是非必需基因,允许被删除、插入包括内含子及调节序列的多基因或大基因。HSV病毒滴度较高,可达108~109 PFU/mL。在目前所知的病毒载体系统中,HSV载体的包装容量最大,可容纳长达30kb的外源基因,因此,可以同时装载多个目的基因,而且删除某些特殊的非必需基因还可能限制病毒仅在某类细胞中复制。HSV载体宿主范围广,能将外源基因导入终末分化细胞及有丝分裂后静止期细胞中表达,对神经系统有天然的亲嗜性,并能在神经元中建立长期稳定的隐性感染。在HSV隐性感染期内,病毒基因组环化、甲基化、并被压缩为较有序的染色质样结构,大部分病毒基因不表达,但病毒启动子仍保持转录活性。在一定条件下,隐形感染的病毒可被激活。HSV嗜神经的特性使其可在神经细胞间顺行或逆行传播,或跨轴突传播,故提供了一种间接的靶向性基因转移途径。因HSV感染细胞后呈潜伏状态,这使得外源基因能在宿主

神经元长期稳定表达。因此,HSV 载体的研究将有助于神经系统疾病基因治疗,如帕金森病、阿尔茨海默病等的基因治疗<sup>[2]</sup>。

**1.2 HSV 载体的构建** HSV 在宿主细胞的复制是裂解性感染,这就有可能引起宿主细胞的死亡,因此要利用 HSV 成为基因治疗的载体就必须消除野生型病毒固有的致病性,这是构建 HSV 载体的主要障碍。目前,有条件复制型 HSV 和复制缺陷型 HSV 两种策略可以消除病毒的裂解性感染或使裂解性感染仅在某些细胞类型出现。多数研究表明条件复制型 HSV 常用在肿瘤等的基因治疗中,而复制缺陷型由于其基因特点常常用在其他神经系统方面的基因治疗<sup>[3]</sup>。

**1.2.1 复制缺陷型 HSV 基因特点** HSV 的毒性可使宿主细胞死亡,通过敲除或突变等方法影响一些立早基因(ICP4 和 ICP27),能使病毒产生复制缺陷,只有在细胞内补足 ICP4 和 ICP27 后病毒才能恢复复制的能力。复制缺陷病毒引起类似潜伏的状态,携带外源基因的病毒载体可在细胞中长期潜伏下来,但由于缺乏必需的基因又不能激活。

**1.2.2 复制缺陷型 HSV 载体结构特点** 复制缺陷型 HSV 载体分为重组子载体(HSV-RV)和扩增子载体两大类。HSV-RV 含有全部病毒基因组,其中一个或多个基因已突变,以降低其毒性和提供转基因空间。最新版本 HSV-RV 删除了多个含转录激活因子的即刻早期基因,基本消除了病毒基因的表达。HSV 扩增子载体由一个含有 HSV DNA 复制起点序列 *oris* 和包装信号 *pac* 的质粒组成,在 HSV 辅助病毒作用下被允许以串联体形式包装入 HSV 病毒,无 HSV 辅助病毒时,这些载体可以通过与一组已删除 HSV 基因组保留 *pac* 信号序列的粘粒或 BAC 质粒共转染而得到包装。这些载体的优点有:基本上无毒性或免疫原性;较大的转基因容量,通常可达 22kb,最大可达 150kb;相当高的病毒滴度;对神经细胞的高度感染性,在非分裂细胞中潜伏达数月。但 HSV 存在神经细胞毒性作用和免疫反应,可引起较明显的局部炎症和坏死,故 HSV 作为基因载体还有待于进一步研究和改进。

## 2 HSV 载体用于中枢神经系统疾病基因治疗

有研究表明,直接对鼠脑内注射胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)对缺血性脑损伤具有保护作用。Harvey 等<sup>[4]</sup>利用 HSV 扩增子载体携带 GDNF 基因在鼠大脑皮质预先注射,希望在脑缺血局部产生的 GDNF 能起到保护神经元的作用。与对照组相比,实验组在单侧阻塞大脑中动脉 60min 后出现运动迟缓和失调情况大为减少,免疫组化显示胶质细胞原纤维酸性蛋白和凋亡标志蛋白 *caspase-3* 较对照组减少。

通过病毒载体向受损的脊髓内转入神经营养因子可以帮助神经元再生<sup>[5]</sup>,Natsume 等<sup>[6]</sup>将抗凋亡肽(*bcl-2*)基因和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因利用 HSV 载体转染鼠脊髓前角运动神经元,使得 L4-6 脊神经撕脱伤导致的脊髓前角运动神经元的死亡数大为减少,胆碱乙酰转移酶在受损的神经元中得以增多。Sun 等<sup>[7]</sup>利用神经丝蛋白基因启动子构建无辅助病毒的 HSV-1 载体能在脑神经元长时间表达的特性,将脑内合成多巴胺所必需的四种基因:酪氨酸羟化酶(TH)、GTP 环水解酶工(GTP CH I)、芳香氨基酸脱羧酶(AADC)、泡状单胺转运蛋白(VMAT-2)通过 HSV 载体转导入小鼠脑内,结果显

示,所有四种基因都呈现高水平表达,细胞外多巴胺及其代谢产物 3,4-二羟苯乙酸浓度明显增高,帕金森氏病模型鼠的行为也得到明显纠正,并能持续达 6mo 之久。Sun 等<sup>[8,9]</sup>同时发现,向帕金森模型小鼠纹状体内注射表达神经营养因子的 HSV 载体可以保护黑质纹状体处的神经元,且表达胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)的载体效果最好。Yamada 等<sup>[10]</sup>将携带 *bcl-2* 基因的 HSV 载体注射至大鼠脑内黑质区,证实 *bcl-2* 的表达能保护黑质神经元免受 6-羟多巴胺的损害。Poliani 等<sup>[11]</sup>对恒河猴鞘内注射表达 IL-4 的 HSV 载体后,通过感染室管膜细胞使 IL-4 在 CNS 持续均匀的分布。而且,IL-4 显著减少了脑脊髓周围小静脉的炎症浸润,脱髓鞘改变、坏死和轴突的缺失,对超急性自身免疫性脑脊髓炎有很好的保护作用,其保护作用与局部肿瘤 TNF- $\alpha$  下调以及 GF-8 上调有关。应用 HSV 载体表达 72kD 热休克蛋白也可暂时提高局部缺血区神经元的存活<sup>[11]</sup>;应用 HSV 扩增子载体传递热休克蛋白(HSP72)可保护海马神经元免受海藻酸的毒性损害<sup>[12]</sup>。

## 3 HSV 载体对视神经损伤基因修复的研究可行性

目前视神经损伤后的基因治疗是将质粒工具、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等作为载体工具,将 HSV 载体用于视神经损伤后的基因治疗暂时还没有相关的临床试验。视神经损伤后其所处的微环境会有很多改变,包括络氨酸激酶受体 EphA5 表达下降<sup>[13]</sup>;与细胞凋亡新号相关的基因 *caspase-3*、*bax* 的上调,抗凋亡基因 *bcl-2*、*bacl-x* 的减少;转录调节因子 *c-jun* 上调;睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)受体  $\alpha$  的上调和白细胞抑制因子受体(leukaemia inhibitory factor receptor, LIFR)表达的变化;*trk* 受体和神经营养因子表达的上调;细胞黏附分子如 TAG-1 和 SC-1 的下降;细胞骨架蛋白的表达和磷酸化改变;生长相关蛋白 GAP-43 的上调,但仅限于视神经在眼球后 3mm 以内的损伤;转录因子 *Brn-3a / 3b* 表达的改变;有关神经生长因子家族受体(DCC、*Unc<sub>5</sub>H<sub>1</sub>*、*Unc<sub>5</sub>H<sub>2</sub>*)的下调;对轴突具有排斥作用;同时还参与与神经死亡的导向蛋白 *semaphorin3A* 的短暂上调<sup>[14]</sup>;众所周知,视神经属于中枢神经的一种,视神经及其神经元-视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)与相关的视觉通路是一种非常成熟的中枢神经系统研究模型,可以用来研究神经损伤后的神经保护和轴突再生的分子、细胞机制,从而为基因治疗奠定基础,且 HSV 可以在神经节内潜伏的观点已提出多年。1973 年美国学者 Baringer 成功地从 HSV-1 潜伏感染期的人三叉神经节中分离出 HSV-1,首次证实了三叉神经节为 HSV-1 的潜伏部位。随后又有学者在人的睫状神经节、兔的颈上神经节和三叉神经的眼部分支中检测到 HSV-1 的 DNA<sup>[15]</sup>。另外,也有实验表明 HSV-1 可以潜伏在小鼠面神经的运动核、室旁核和视交叉上核中<sup>[16]</sup>,这些结果均证实 HSV-1 可潜伏在任何一个神经分布位点的神经节中引起感染。

视神经损伤后的微环境改变是发挥保护作用还是破坏作用,以及这些分子的表达怎样随时间的变化而达到平衡还不是很清楚,但最终结局仍是大多数的 RGCs 的死亡。近年来,对于视神经损伤后的基因修复多是质粒工具、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒作为载体工具,即使研究者们对视神经损伤后微环境改变进行了基因干预,以增强

保护性作用或减弱破坏性作用,但在实际应用中还存在一些问题,使用质粒细胞转染的效果和特异性均不理想,且玻璃体也会影响这些高分子聚合物向细胞扩散;通过病毒载体来转染可编码支持存活、促进再生因子基因,有转染特异性的问题,不同年龄动物转染的细胞类型不同,对RGCs的转染率也存在差异,并且病毒载体本身存在毒性作用,无法避免对玻璃体腔注射造成损伤。而改良的HSV载体可以减少这些毒性作用,将其用于中枢神经系统损伤的基因治疗也有很大的优越性,因此将HSV载体应用到视神经损伤后的基因治疗中不失为一种积极的考虑,同时也应该有较大的潜在应用价值。

#### 4 小结

随着中枢神经系统疾病发病机制的进一步阐明、导入外源性基因载体的改进及基因转移技术的进步,基因治疗必将成为治疗中枢神经系统疾病的一种新的强有力的手段。将HSV载体用于中枢神经系统疾病基因治疗的研究已显示出较大的优势,将其应用于视神经损伤的基因治疗更需要大量的基础试验来验证,但总体来说,HSV载体在基因治疗中的优势将会越来越明显。

#### 参考文献

- 1 Goins WF. Herpes simplex virus vectors for gene transfer to the nervous system. *Neurovirol* 1997;3(Suppl 1):80-88
- 2 Glorioso JC, Fink DJ. Use of HSV vectors to modify the nervous system. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2002;5(2):289-295
- 3 Ozuer A. Effect of genetic background and culture conditions on the production of herpesvirus based gene therapy vectors. *Biotechnol Bioeng* 2002;77(6):685-692
- 4 Harvey BK. HSV amplicon delivery of gLial cell line - derived neurotrophic factor is neuroprotective against ischemic injury. *Exp Neurol* 2003;183(1):47-55
- 5 Hendriks WT, Ruitenber MJ, Blits B, et al. Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord. *Prog Brmn Res* 2004;146:451-476
- 6 Natsume A, Mata M, Wolfe D, et al. Bcl-2 and GDNF delivered by HSV - mediated gene transfer after spinal root avulsion provide a

synergistic effect. *Neurotrauma* 2002;19(1):61-68

7 Sun M, Zhang GR, Kong L, et al. Correction of a rat model of Parkinson's disease by coexpression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase from a helper virus—free herpes simplex virus type 1 vector. *Hum Gene Ther* 2003;14(5):415-424

8 Sun M, Kong L, Wang X, et al. Coexpression of tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase I, aromatic amino acid decarboxylase, and vesicular monoamine transporter 2 from a helper virus - free herpes simplex virus type 1 vector supports high level, long-term biochemical and behavior correction of a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2004;15(12):1177-1196

9 Sun M, Kong L, Wang X, et al. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2005;1052:119-129

10 Yamada M, Oligino T, Mata M, et al. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):4078-4083

11 Poliani PL. Delivery to the central nervous system of a non replicative herpes simplex type 1 vector engineered with the interleukin 4 gene protects rhesus monkeys from hyperacute autoimmune encephalomyelitis. *Hum Gene Ther* 2001;12(8):905-920

12 Yenari MA, Fink SL, Sun GH, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998;44:584-591

13 Symonds AC, King CE, Bartlett CA, et al. EphA5 and ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration: A 'two-edged sword'. *Eur J Neurosci* 2007;25(3):744-752

14 Harvey AR, Hu Y, Leaver SG, et al. Gene therapy and transplantation in CNS repair: The visual system. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(5):449-489

15 Bustos DE, Atherton SS. Detection of herpes simplex virus type 1 in human ciliary ganglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2244-2249

16 Labetoulle M, Maillat S, Efshathiou S, et al. HSV-1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:217-225