

译者前言

神经科学作为现代医学的前沿领域，正以前所未有的速度推动着人类对脑与神经系统的认知革新。神经系统疾病因其复杂性、多样性和高致残率，一直是医学研究的重点与难点。近年来，基因治疗、干细胞技术及神经调控等领域的突破性进展，为阿尔茨海默病、帕金森病、脊髓损伤、肌萎缩侧索硬化等难治性疾病带来了曙光。然而，如何将这些科学发现转化为临床应用，仍是全球医学界共同面临的挑战。

本书由国际上从事神经科学转化研究的权威专家团队编写，系统梳理了神经科学领域近二十年的关键进展。全书以神经转化医学为核心，聚焦基因治疗、干细胞技术、神经调控三大方向，深入探讨了从基础研究到临床实践的全链条创新路径。书中不仅详述了腺相关病毒（AAV）载体在中枢神经系统疾病治疗中的应用机制和潜在方法、神经营养因子在神经退行性疾病中的保护机制，还剖析了反义寡核苷酸（ASO）技术、干细胞移植及神经调控等策略的科学基础与临床潜力。每一章均以扎实的临床前研究与临床试验数据为支撑，既展现了当前技术的突破性成就，也客观指出了转化过程中亟待解决的瓶颈问题。

在人口老龄化加剧、神经系统疾病负担日益沉重的今天，本书的翻译出版恰逢其时。中国神经科学领域近年来虽发展迅猛，但在原创性技术转化和跨学科协作方面仍有提升空间。本书的引入，不仅能为临床医师、科研人员提供最新的理论框架与技术参考，也能为政策制定者与医药企业提示未来方向。我们尤其希望，书中关于基因治疗载体优化、干细胞定向分化、神经环路精准调控等内容，能激发国内学者对本土化创新路径的探索。

翻译团队由陆军军医大学第一附属医院的神经科学专家领衔，联合多所高校及研究机构的青年学者共同完成。为确保专业性与准确性，我们严格遵循“信、达、雅”的原则：在术语处理上，兼顾学术规范与中文表达习惯；在复杂机制的阐释中，通过图表辅助与案例解析增强可读性；同时，在行文阅读上，针对中外医疗体系的差异，优化语句逻辑与流畅度，使译文更易于理解与阅读。翻译过程中，我们深刻体会到原著作者对科学严谨性的坚守，以及对临床转化的人文关怀——这种精神亦是我们团队的重要指引。

本书的出版得益于科学出版社的鼎力支持，以及国内外同行的无私帮助。最后，谨以此书献给所有奋战在神经科学领域的同行者。我们深信，通过不断探索与奋斗，定能为最终战胜神经系统疾病、实现高效救治与康复的漫漫长路照亮方向。

冯 华 陈图南
陆军军医大学第一附属医院

第 1 章 概论	1	三、Ⅱ期研究	50
第 2 章 重组 AAV 载体用于中枢 神经系统疾病的基因治疗 ...	4	第 6 章 反义寡核苷酸治疗肌萎 缩侧索硬化	53
一、重组 AAV 载体	5	一、SOD1	54
二、代谢缺陷性中枢神经系统 疾病的基因治疗	6	二、C9ORF72	56
三、运动性障碍的基因治疗	11	三、miRNA 和 ALS	58
第 3 章 阿尔茨海默病的神经生长 因子与脑源性神经营养因 子基因治疗	16	四、ALS 中 ASO 的药效学生物 标志物	58
一、阿尔茨海默病 (AD)	16	第 7 章 先天性代谢异常的基因 治疗: 巴滕 (Batten) 病 ...	60
二、AD 基因治疗	19	一、确定目标疾病	61
三、AD 的 NGF 基因治疗	19	二、基因治疗方案的研发	61
四、AD 的 BDNF 基因治疗	26	三、载体	62
五、AD 基因治疗: 其他治疗 基因的递送	29	四、中枢神经系统递送	63
六、未来的 AD 基因治疗	30	五、临床前研发策略	65
第 4 章 GDNF 联合 AADC 基因 治疗帕金森病	32	六、第二代临床前研发策略	65
一、AAV 向壳核的递送	33	七、临床转化: 安全性和毒理学 研究	66
二、轴突运输	36	八、监管挑战与应对策略	66
三、AAV2-hAADC 治疗 PD 的 临床经验	39	九、临床策略	67
四、神经营养素基因治疗	42	十、安全参数	67
第 5 章 帕金森病的 GAD 基因 治疗	47	十一、疗效评估指标	68
一、临床前数据	48	十二、组建临床团队	68
二、I 期研究	49	十三、确定纳入 (排除标准)	68
		十四、临床转化经费	69
		十五、经验总结	69
		第 8 章 脊髓损伤的基因治疗	71
		一、利用体外修饰细胞进行轴突	

生长的基因递送·····	72	七、诱导多能干细胞可用于治疗 或模拟 AD 吗·····	113
二、面向脊髓的体内基因递送·····	74	八、iPSC 来源细胞的移植 ·····	113
三、基因表达的时间调控·····	76	九、使用 iPSC 建立 AD 模型 ·····	113
四、轴突定向生长与靶神经支配·····	76	第 13 章 干细胞治疗肌萎缩侧 索硬化 ·····	115
五、通过基因递送激活内在再生 程序·····	77	一、神经干细胞·····	118
六、SCI 基因治疗的非神经元 靶点·····	78	二、间充质干细胞·····	126
第 9 章 癫痫的基因治疗 ·····	80	三、骨髓干细胞·····	130
一、调节性神经活性肽·····	81	四、嗅觉鞘细胞·····	132
二、神经营养因子·····	82	五、脐带血·····	133
三、腺苷·····	83	第 14 章 干细胞治疗多发性硬化 ···	135
四、离子通道·····	83	一、“经典”干细胞疗法：替代 丢失的少突胶质细胞进行髓 鞘修复·····	136
五、DREADD 受体 ·····	84	二、免疫重建：造血干细胞疗法··	137
第 10 章 将疼痛的基因治疗从动物 研究转化到临床 ·····	86	三、“恢复性”细胞疗法·····	139
一、疼痛基因转移的动物研究·····	87	第 15 章 儿童胶质细胞疾病的 细胞治疗 ·····	143
二、转化到临床试验·····	88	一、细胞替代治疗的候选细胞 类型·····	143
三、未来发展方向·····	93	二、神经胶质细胞治疗的疾病 靶点·····	146
第 11 章 干细胞治疗帕金森病 ·····	95	三、细胞疗法的技术路径·····	148
一、细胞疗法的历史·····	96	四、酶缺陷疾病的神经干细胞与 祖细胞疗法·····	150
二、胎儿黑质移植·····	97	五、细胞移植治疗发育性髓鞘疾 病的临床考虑·····	153
三、多巴胺能神经元的干细胞 分化·····	98	第 16 章 神经干细胞治疗脊髓 损伤 ·····	156
四、当前的干细胞治疗方法·····	101	一、神经干细胞的分离和特性·····	156
五、结论和未来发展方向·····	102	二、神经干细胞治疗脊髓损伤的 体内研究 ·····	159
第 12 章 干细胞能否用于治疗 阿尔茨海默病或建立 疾病模型 ·····	103	三、未来展望·····	167
一、阿尔茨海默病神经病理学 和淀粉样蛋白级联假说·····	103	第 17 章 脑卒中的骨髓间充质 基质细胞疗法 ·····	168
二、神经干细胞的特性和来源·····	104	一、脑卒中是人类残疾的主要	
三、干细胞移植治疗阿尔茨海 默病·····	105		
四、临床转化面临的独特挑战·····	111		
五、干细胞自我更新·····	111		
六、规模和递送的挑战·····	112		

原因	168	剂的临床前研究	210
二、MSC 有多种作用机制	168	四、临床试验中阻断 Nogo-A	
三、与 MSC 生成和运输相关的		信号转导的干预措施	211
问题	170	第 21 章 脊髓损伤后轴突再生的	
四、临床前数据	170	内源性神经机制	213
五、MSC 在脑卒中患者中的		一、为什么要探索内源性机制	213
临床试验	171	二、哺乳动物中枢神经系统神	
六、脑卒中后脑修复原理及 MSC		经元内源性轴突生长能力	
治疗	174	的丧失	214
第 18 章 胶质瘤干细胞	176	三、感觉神经元的“预处理”	
一、小脑神经元与胶质细胞的		效应	218
发育	178	四、增强轴突内在再生能力的	
二、胶质瘤的起源细胞	178	策略	218
三、干细胞假说	179	五、展望	220
四、干细胞的特性	181	第 22 章 电压门控离子通道：疼痛	
五、CSC 的鉴定识别	182	治疗的分子靶点	221
六、胚胎干细胞标志物	185	一、钠通道：疼痛的分子靶标	221
七、干细胞标志物对治疗和预后		二、电压门控钙通道	228
的影响	186	三、电压门控钾通道	230
八、CSC 放疗和化疗耐药性	186	四、发展前景与未来展望	231
九、靶向胶质瘤干细胞的可能		第 23 章 脊髓损伤后的康复依赖性	
治疗方案	187	神经可塑性	233
十、免疫治疗与干细胞	188	一、正常与受损运动功能的神经	
十一、基因治疗与干细胞	188	元调控机制	234
第 19 章 强效 γ-分泌酶调节剂		二、人类脊髓损伤后运动功能的	
的发现及其在阿尔茨		重建	236
海默病治疗中的应用	190	第 24 章 神经创伤修复中的神经	
第 20 章 阻断 Nogo-A 信号通路		假体技术	241
对脊髓损伤与脑卒中后		一、电刺激的释放	241
神经再生及可塑性的促		二、脉冲序列的性质	242
进作用	196	三、NP 的类型	242
一、简介：髓鞘相关轴突生长		第 25 章 为什么功能性电刺激	
抑制剂——关注 Nogo-A	198	疗法能够在中枢神经	
二、中枢神经系统损伤及中枢		系统严重损伤后恢复	
神经系统疾病后的再生和		运动功能	250
可塑性	199	一、功能性电刺激	250
三、转化前准备：Nogo-A 阻滞		二、功能性电刺激治疗	251

三、正常中枢神经系统与损伤

后神经修复相关的主要生
理过程····· 255

四、神经系统损伤与功能性电
刺激疗法····· 257

**第26章 深部脑刺激治疗神经
精神疾病 ····· 260**

一、边缘系统····· 261

二、强迫症····· 262

三、抑郁症····· 263

四、成瘾····· 265

五、创伤后应激障碍与焦虑····· 266

六、神经性厌食症····· 267

**第27章 脑卒中新型干预措施：
神经系统低温疗法 ····· 269**

一、基于传统模型的卒中建模
优化研究····· 272

二、低温疗法····· 274

**第28章 脑卒中与神经创伤后
恢复性康复策略 ····· 283**

一、康复策略的基础要素····· 284

二、神经康复策略····· 285

三、结局指标····· 289

**第29章 中枢神经系统疾病：
从科学发现到关键临
床试验的跨越——核
查清单 ····· 291**

一、中枢神经系统疾病常见的
挑战····· 291

二、开展人体研究前的临床前
验证····· 292

三、良好实验室规范可以减少
实验偏倚····· 293

四、实验疗效验证后的临床前
治疗药物开发····· 294

五、临床试验的基本要求与各
研究阶段的目标····· 295

六、临床试验指南制定····· 296

七、临床试验项目计划注意事项····· 296

第30章 结论 ····· 308

第 1 章

概 论

Mark H. Tuszynski

【关键词】转录组·蛋白质组·基因治疗·反义疗法·阿尔茨海默病·帕金森病·孤独症·肌萎缩侧索硬化

近二三十年兴起的技术革命，不仅深刻改变了神经系统研究的手段，也为向临床转化新型疗法奠定了基石。

首先且最为重要的是，基因组学工具已经改变了我们理解神经功能及功能障碍遗传机制的能力。这些工具包括全基因组测序、RNA 测序、表观遗传机制研究，以及对 microRNA 等 RNA 分子在调控细胞功能中复杂作用的新认知。研究这些遗传机制（即“转录组”），需要开发计算工具来处理大量数据。而这些数据正在深刻改变我们对神经系统、个体疾病易感性及治疗方法的理

解。随着对细胞功能遗传调控机制认识的深入，基因操作工具也日趋精进。从转基因小鼠模型〔如基于细菌人工染色体（BAC）构建的相关模型〕到 CRISPR/Cas9 等精准基因编辑技术，这些工具不仅可应用于培养细胞或生殖细胞系以快速构建筛选转基因小鼠模型，还可通过果蝇与秀丽隐杆线虫等非哺乳动物的快速基因及突变体筛查，加速疾病机制相关基因的发掘和潜在疗法的筛选。然而，这些能力催生的编辑人类生殖细胞系假想，正引发激烈的伦理争论。

与基因组操作工具同步发展的是基因功能抑制技术，包括反义疗法和载体介导的基因敲减，以及基因编辑技术。

在细胞功能调控的更高维度，细胞蛋白质组（即蛋白质组）的检测工具在速度和灵敏度上取得重大突破，使我们能以空前灵敏高效的方式解析特定操作对大量细胞蛋白及磷酸化蛋白类型的影响。其他细胞组分也可以一样进行探测，包括脂质组和代谢组。事实上，微生物组（如肠道菌群）也被确定为中枢神经系统疾病机制的一个潜在的重要调节因子。

神经工程与生物工程的技术突破催生了神经回路记录与刺激能力，使我们在正常学习记忆过程，以及神经退行性疾病或癫痫等相关功能障碍情境中，获得对神经回路组装本质的新认知。这项工作催生了一系列新一代疗法，诸如用于帕金森病和肌张力障碍的长期植入式刺激器，以及针对神经系统损伤后的脑机接口技术。

成像技术也取得了长足的进步，从能够随时间多次重复成像单个细胞和亚细胞结构的新型显微镜，到全脑定量 MRI（磁共振）。阿尔茨海默病的新型 PET（正电子发射断层成像）扫描成像，如 PIB 成像，以及潜在的 tau 成像，使得在症状出现之前就能够对潜在疗

法进行临床成像检测。结构 MRI 可能成为疾病进展和治疗反应的生物标志物，而功能 MRI 通过揭示脑区行为调控机制助推疾病机制解析及疗法开发。上述技术突破正被用于探索血液 / 脑脊液中生物标志物的存在价值，以优化疾病诊断与治疗监测。

在过去的 20 年里，神经干细胞技术取得了惊人的进展，从最初发现成年哺乳动物神经系统中都存在自我更新的细胞，到如今能利用特定转录因子组合生成个体专属干细胞及其分化细胞。事实上，从“终末”分化的成体细胞直接生成神经干细胞和特定神经细胞的技术已经迅速发展到神经转分化，甚至可以绕过细胞诱导的多能干细胞阶段。目前人类神经干细胞治疗已进入初期临床探索阶段。

每项技术都被用于深入探究人类疾病机制并开发新型疗法。为实现这一目标，研究者广泛应用各类筛选工具——既包括能对成千上万种化合物进行体外效应检测的高通量筛选平台，也涵盖沿用 20 世纪传统方式的体内动物疾病模型。然而，在筛选链的末端——活体动物疾病模型——是评估可能进入临床转化疗法的终极且最重要的方法。

简而言之，这是一个神经科学大发展的时代。到目前为止，我们在转化神经科学的诊断和治疗方面取得了哪些实质性进展？数千亿美元、欧元、英镑、日元和人民币的科研投入，在解析人类疾病机制、开发新型高效疗法方面究竟带来了怎样的成果？下面是几个例子。

(1) 近 20 年的遗传学分析（尤以近年显著加速），已揭示多种人类疾病的发病基础，涵盖脊髓性肌萎缩症、脊髓小脑共济失调、进行性核上性麻痹等系统变性病、遗传性阿尔茨海默病与帕金森病，以及部分儿童癫痫与孤独症谱系障碍。与疾病风险相关的突变和单核苷酸多态性的发现，反过来又让人们得以了解疾病的机制。例如，研究表明，人类脊髓性肌萎缩症某些形式的可变剪接会导致 SMN 蛋白水平降低，而通过化学筛选和优化小分子化合物，人们发现了新的药物候选物，这些候选物已经开始在这种难以治愈的疾病中进行临床试验。在孤独症谱系障碍中，基因筛查发现了一种可能通过饮食调整治疗的代谢缺陷。

(2) 最近，基因分析还确定了以前仅凭解剖 / 病理分析无法区分的原发性神经系统肿瘤的不同亚型。以Ⅲ级星形细胞瘤为例，其遗传异质性现已被证实与不同预后特征相关，据此选择针对性疗法可显著延长患者生存期数年。这是原发性神经系统恶性肿瘤治疗取得重大进展的开始。

(3) 在过去 10 年中，单克隆抗体治疗取得了进展，为神经免疫性疾病提供了更有效但也更具风险的治疗方法。例如，一种针对整合素受体的单克隆抗体显著减缓了多发性硬化症的疾病进展，但存在机会性感染的风险。定向免疫疗法的适应证正快速扩展，包括针对阿尔茨海默病的 β 淀粉样蛋白的靶向治疗，以及针对帕金森病的靶向研究。

(4) 近年来，基因治疗领域取得了进展。基于改良型病毒载体在神经元长期转导中的稳定性与安全性突破，阿尔茨海默病、帕金森病、癫痫、疼痛和先天性眼病的临床试验已经进展到临床阶段。许多临床项目仍在进行中，并有望在未来确定有效的治疗方法。

然而，尽管取得了如此程度的进展，神经系统疾病领域仍存在大量未满足的医疗需求。以下病症或完全缺乏有效疗法，或缺失延缓 / 阻断病程进展的治疗手段：

- (1) 阿尔茨海默病，最常见的神经退行性疾病。
- (2) 脑卒中损伤修复，全因致死率第二。
- (3) 肌萎缩侧索硬化，使患者在短期内丧失行动能力与生命的疾病。
- (4) 脊髓损伤，一种在生命早期就经常发作并导致终身神经功能障碍的疾病。

(5) 创伤性脑损伤，是冲突和打斗的常见后果，经常发生在年轻人身上，并可能导致终身功能障碍。

(6) 帕金森病，是第二常见的神经退行性疾病，通常病程较长且破坏性很强。

(7) 遗传性神经系统疾病，尤其是导致早期死亡、精神发育迟缓或终身残疾的代谢性疾病，包括雷特（Rett）综合征、泰 - 萨克斯（Tay-Sachs）病、糖原贮积病及其他疾病。

(8) 孤独症谱系障碍，是一种非常常见的疾病，包括多种临床表型和潜在病因。

本书将聚焦上述领域的转化探索。尽管过去数年间美国对该研究领域的资助力度有所减弱，转化医学前景却空前光明。在资金支持不足背景下，研究工作仍高速推进。在过去 10 年里，治疗方法已经取得了不少进展，在下个 10 年里，我们期待监管部门批准的有效疗法的数量会不断增加。

（马 康 王玉海 孙德玲 雷 丹 译）

第 2 章

重组 AAV 载体用于中枢神经系统疾病的基因治疗

Giridhar Murlidharan , R. Jude Samulski , and Aravind Asokan

【摘要】 中枢神经系统（CNS）疾病的纠正性干预通常需要补充耗尽的生物分子（如分解代谢酶），保护神经元和神经胶质细胞以免过早死亡，或者利用中枢神经系统细胞作为生物工厂来生产神经递质或其生物前体 / 辅因子。基因疗法通过提供治疗性转基因来恢复丧失的功能，从而有望治疗各种器官的疾病。腺相关病毒（AAV）载体是一种常用的基因治疗载体。本章系统综述 AAV 载体在代谢贮积症与运动障碍两大类 CNS 疾病的临床前及临床研究中的关键发现。

【关键词】 腺相关病毒（AAV）· 病毒载体 · 基因治疗 · 神经疾病 · 神经退行性疾病 · 中枢神经系统

哺乳动物的中枢神经系统是一个复杂而精确的神经元交织连接网络，它由胶质细胞（星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞）滋养和支持。中枢神经系统的平稳运行是通过调节神经元放电 / 动作电位的兴奋和抑制来实现的，即调节细胞体（胞体）与其轴突末端 / 神经末梢之间传递的电位差。神经元上分布着神经递质受体，如谷氨酸和 γ - 氨基丁酸（GABA），它们分别与兴奋性或抑制性反应相关。

神经元亚群活动的时空精准调控（兴奋与抑制的动态平衡）是维持运动、行为、内分泌、感觉及认知功能的基础，而神经元异常放电或特定神经元 / 胶质细胞亚群的丢失则与多种 CNS 疾病密切相关。此类疾病可由药物滥用、创伤、遗传、表观遗传及环境因素诱发，临床表现包括运动功能衰退（如帕金森病、癫痫、图雷特综合征、肌萎缩侧索硬化）、认知功能损伤（如阿尔茨海默病、孤独症），甚至早年致死（如卡纳万病）。此类疾病患者的一个共同特点是，他们在执行日常活动方面存在困难，导致生活质量严重下降、社交生活受到干扰、治疗费用昂贵，而且在大多数情况下，没有治愈的可能。

为了改善这种疾病的表型，人们对神经递质信号转导等事件进行了大量的药理学调控，例如通过基因重编程来合成受体激动剂 / 操纵受体结构域等。虽然成功逆转症状并不常见，但此类干预通常能在短时间内缓解症状，因此被批准用于临床。不幸的是，药物的副作用，大多数基因改变的不可逆性，中枢神经系统细胞自我修复能力的限制，以及复杂的临床操作，使得中枢神经系统疾病的治疗变得异常困难。病毒载体介导的基因治疗能够在体内有效地将治疗转基因导入中枢神经系统。具体地说，通过不同的基因治疗策略，可以补充因疾病

而耗竭的生物分子（如分解代谢酶），保护神经元和胶质细胞免于过早死亡，甚至利用中枢神经系统细胞作为生产神经递质及其生物辅因子的生物工厂。

病毒载体，特别是腺相关病毒（AAV），已经成为向哺乳动物中枢神经系统提供健康治疗基因的首选载体。在过去的几十年里，在小型/大型动物和非人灵长类动物（NHP）中 AAV 载体的表征和临床前评估方面得到了持续的发展。这些努力使我们能够对病毒血清型、给药途径、免疫应答、剂量和生物安全性等参数做出明智的决定，并在临床上使用 AAV 载体进行治疗性基因的转移。

一、重组 AAV 载体

野生型（wt）AAV 是一种非包膜细小病毒，直径约为 25nm，具有单链 DNA（ssDNA）基因组，大小约为 4.7kb。wt AAV 依赖于更大的辅助病毒（如腺病毒、疱疹病毒、乳头瘤病毒等）的基因组元素进行复制。AAV 基因组的 5' 端和 3' 端由发夹状反向末端重复序列侧翼，包含两个开放阅读框，分别编码复制蛋白（Rep）、衣壳蛋白（Cap）以及一个组装激活蛋白（AAP）。由于存在可变的起始密码子、剪接变体以及启动子使用的差异，野生型 AAV 基因组可编码 4 种 Rep 蛋白和 3 种 Cap 蛋白变体。Rep 蛋白负责病毒生命期中各种事件的顺利运行，如 DNA 复制、转录、基因组封装等。另一方面，衣壳蛋白编码结构蛋白 VP1 ~ VP3，其单体亚基以 5:5:50 的比例组成 60 聚体 $T=1$ 二十面体衣壳。可以理解为：衣壳的表面暴露区域赋予不同的 AAV 与宿主细胞表面附着和抗原性相关的特征。这些特性在很大程度上决定了特定基因转移应用中 AAV 血清型的最佳性。关于 AAV 基因组元素及其功能的更全面分析，可以参考其他著作。

自从最初发现野生型病毒作为腺病毒库中的污染物以来，AAV 基因治疗已经取得长足的进步。结合对 AAV 生物学的全面了解和 AAV 载体工程的一些重要成果，我们已经具备了生成重组 AAV（rAAV）的能力。该技术允许将目标转基因包装至具有特定优势的 AAV 血清型中，形成单链（ss）或自身互补（sc）构型（图 2-1）。这种灵活性使科学家能够将大量的天然和工程 AAV 作为基因转移载体，用于研究和治疗应用。从中枢神经系统基因治疗的角度来看，AAV 载体提供了以下吸引人的特征——①没有可信的证据表明 AAV 血清型与动物模型或人类患者的致病性/疾病相关。②与其他病毒不同，AAV 不具有高度的免疫原性，免疫反应通常仅限于产生抗衣壳中和抗体。③在进入宿主细胞核后，AAV 的基因组主要以游离状态存在，并利用宿主细胞机制进行基因表达。值得一提的是，有报道称有一小部分 AAV 基因组在人类染色体 19 的 AAVS1 位点发生了高度特异性的插入。相比之下，宿主基因组整合是慢病毒、腺病毒和疱疹病毒等其他病毒载体生命周期的一个组成部分。这类情况通常与插入突变和移码突变有关，有时会导致宿主细胞的致癌结果。④ AAV 既可转导分裂细胞，也可转导未分裂的哺乳动物细胞。这对中枢神经系统转导尤其重要，因为大多数细胞一旦完全成熟就会停止分裂。⑤最后，不同 AAV 血清型经脑内直接注射后，在 CNS 中呈现独特的细胞与区域特异性表达模式。这种转导特性差异源于衣壳蛋白与宿主受体的特异性互作。例如：AAV9 通过结合细胞表面半乳糖残基，在动物模型中实现神经元与胶质细胞广泛转导；AAV2 以硫酸乙酰肝素为主要受体，具有神经元嗜性且注射位点扩散有限；AAV4 通过唾液酸结合机制，在脑内注射部位显示星形胶质细胞特异性转导。

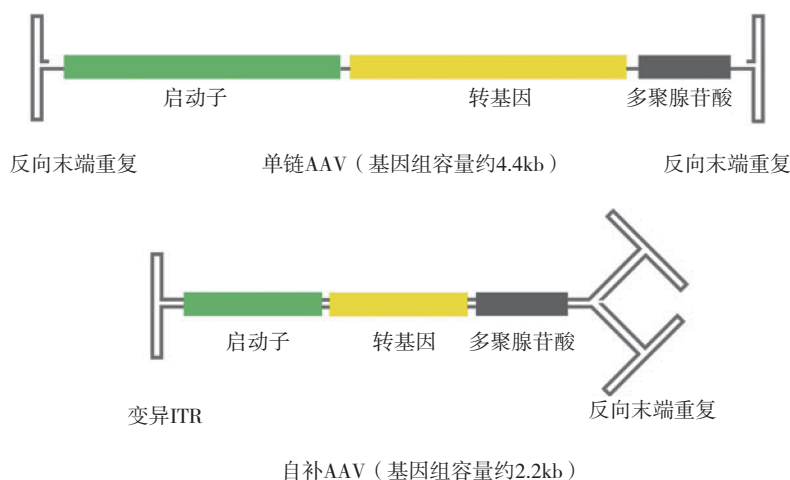


图 2-1 AAV 基因组示意图：启动子、转基因和多聚腺苷酸化信号 (PolyA) 由单链 (ss) 或自身互补 (sc) 构型中的反向末端重复序列 (ITR) 连接

为了展示 AAV 载体在中枢神经系统转导谱上的差异，我们在新生小鼠脑中注射了携带由鸡 β 肌动蛋白 (CBA) 启动子驱动的 TdTomato (TdTom) 荧光报告基因的 AAV4 或 AAV9。对 AAV4 进行脑室注射 (白色箭头，图 2-2) 后，在注射部位附近 (室管膜) 出现了 TdTom 表达 (红色) (AAV4-CBA-TdTom，图 2-2)。另一方面，AAV9 给药导致多个区域脑实质内广泛出现 TdTom 表达 (AAV9-CBA-TdTom，图 2-2)。这些结果表明，AAV 载体可用于在中枢神经系统内实现空间受限和广泛分布的转基因表达。

本章总结了在应用 AAV 载体治疗两大类中枢神经系统疾病 (即溶酶体贮积症和运动障碍) 时的观察结果。

二、代谢缺陷性中枢神经系统疾病的基因治疗

哺乳动物细胞不断地将复杂的生物材料分解成更简单的最终产物，这些最终产物构成细胞营养，或者充当后续新陈代谢活动的临时前体。这类生物材料来源于饮食摄入或之前的酶降解。溶酶体是细胞内富含酶的消化室，专门用来分解这类堆积物。可以认为，功能失调的溶酶体会导致未消化的酶底物的稳定积累，最终导致细胞死亡。随着时间的推移，细胞不断进行分裂的哺乳动物器官通常能够通过补充新细胞来弥补这种损失。另一方面，一旦完全成形，中枢神经系统就很少进行细胞分裂和重组。这使得它容易受到此类细胞应激导致的功能性组织丧失的影响。由代谢贮积引发的 CNS 疾病主要归类为溶酶体贮积症 (LSD)。另一类被称为神经元蜡样质脂褐质沉积症 (NCL) 的疾病表现出类似的表型，起源于细胞不能分解代谢物脂褐质。代谢储存障碍与衰弱性的人类疾病首次联系在一起的是以严重进行性肌病为特征的庞贝病 (II 型糖原贮积症)。我们目前已知有 50 种影响人类的溶酶体贮积病 (LSD)，其中大多数会累及中枢神经系统组织。值得一提的是，大多数 LSD 和神经元蜡样质脂褐质沉积症 (NCL) 是通过常染色体隐性方式遗传的，这也解释了它们为何在人群中较为罕见。过去几十年中，许多此类疾病的分子基础已被揭示，并在其他文献中有综述。这些努力在制订将基因疗法应用于疾病治疗和改善的策略中发挥了重

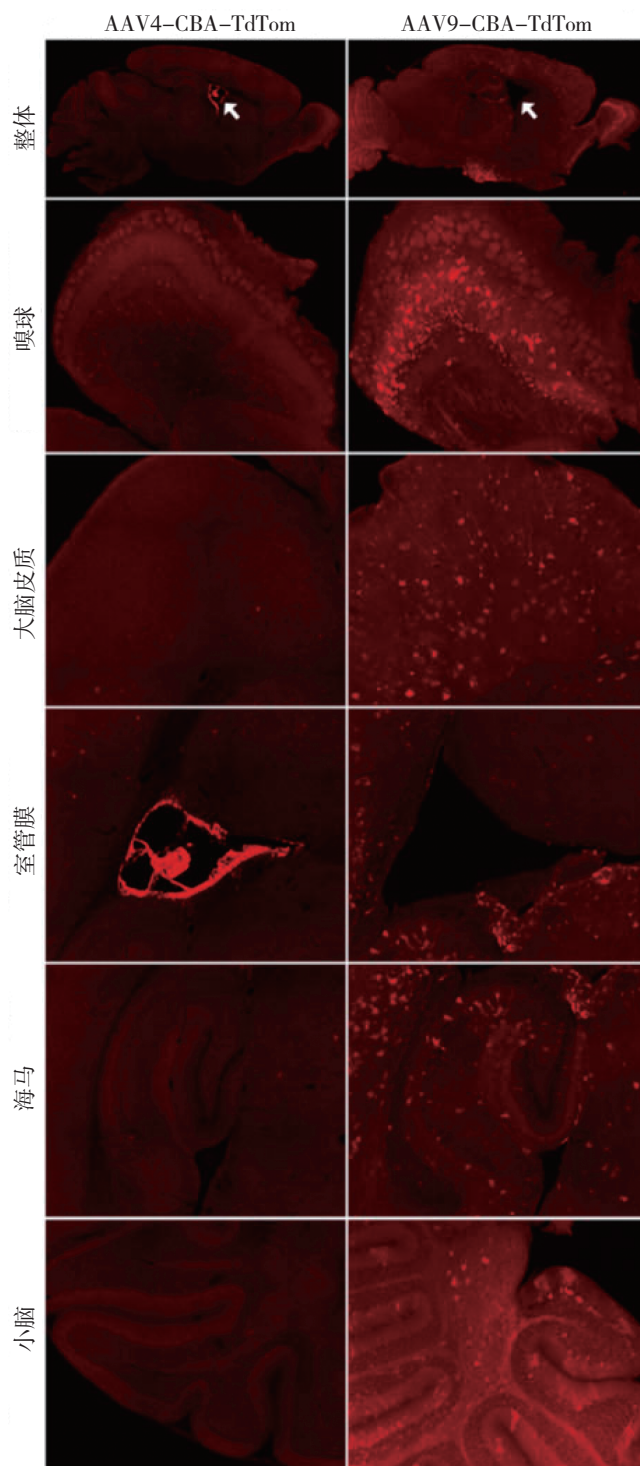


图 2-2 AAV4 和 AAV9 的中枢神经系统转导通路在新生小鼠脑内的扩散差异：出生后第 0 天（P0）小鼠左侧脑室注射 1×10^9 vg（病毒基因组）携带着 CBA-TdTom 荧光报告基因的 AAV4 或 AAV9。注射后 2 周处死小鼠，取多聚甲醛固定的脑组织切片。使用 Zeiss CLSM 700 共聚焦激光扫描显微镜对脑切片成像。共聚焦图像显示 TdTom 转基因（红色）在 $50\mu\text{m}$ 的小鼠全脑振动切片上（整体）的表达，以及脑实质头尾轴上各区域的高倍放大图像

要作用。在正常情况下,分解代谢酶利用特定的细胞大分子作为底物。出现 LSD 和 NCL 是由于编码这些酶的功能基因的“丢失”或“突变”。黏多糖贮积症(mucopolysaccharidosis, MPS)是一类广泛的 LSD,源于分解黏多糖的共同能力不足,导致中枢神经系统环境迅速恶化。由于中枢神经系统组织的低效渗透和重组酶无法通过血脑屏障(BBB)等检查点,药理学酶替代疗法(ERT)只能提供短暂和局部的细胞积聚缓解。要完全逆转疾病病理,需要在中枢神经系统和外周器官中持续产生和分泌缺失的酶。腺相关病毒基因治疗可为患者的功能组织提供必要的基因组元件,以细胞自主/非自主的方式生物合成缺失的酶。此外,腺相关病毒载体的组合扩散与翻译产物的协同作用,可有效覆盖病变中枢神经系统及外周器官。我们重点讨论了几种主要的黏多糖贮积症(MPS),作为案例来展示在理解这些影响中枢神经系统的典型代谢贮积病方面所取得的进展,以及应用 AAV 基因转导进行治疗的研究进展。

MPS VII型(Sly 病)是一种严重衰弱性 LSD,是因 β -葡萄糖醛酸酶(GUSB)不足导致糖胺聚糖(GAG)的积累引起的。这种疾病的症状包括骨骼畸形、智力低下、感觉功能丧失(视力和听力)、面容扭曲和寿命缩短。在针对 MPS VII 小鼠模型的早期基因治疗探索中,研究者构建了携带 GUSB 转基因的 AAV2 载体。实验显示,在出生后第 2 天(P2)通过静脉注射递送 AAV2-GUSB,可逆转小鼠模型的骨骼长度异常、视网膜功能缺陷及组织空泡贮积等表型。理论上,利用血液系统将药物输送到多个器官是一种很有吸引力的方法,但并非所有腺相关病毒血清型都适合用于基因治疗的给药途径。

Elliger 及其同事早期的研究得出结论,静脉注射 AAV2 载体导致中枢神经系统的转导水平较低,而在外周组织(即心脏和肝脏)中转基因的表达水平较高。最近的研究表明,AAV2 载体无法穿过血脑屏障(BBB)。因此,在这些最初使用 AAV2 的研究中观察到的中枢神经系统组织中糖胺聚糖(GAG)积累的清除,可能是由于分泌的酶穿过脑微血管,或通过水通道蛋白介导的间质液清除进入脑实质组织。进一步支持这一论点的是,通过成年小鼠鞘内注射直接将 AAV2-GUSB 递送至中枢神经系统,已被证明可以在中枢神经系统组织实现酶水平的增加和空泡形成的减少。该研究凸显了为 CNS 基因治疗选择匹配 AAV 血清型最佳递送途径的重要性。Skorupa 及其同事实现了 GUSB 酶产品在中枢神经系统组织中的广泛扩散。他们的报告表明,将 AAV2-GUSB 直接注射到成年啮齿动物大脑的 4 个部位——纹状体、皮层、丘脑和海马,可以实现酶的最大扩散。作者报告称,通过此类注射,可清除同侧半球整个神经轴上的溶酶体的储存负担。

最近,为了实现治疗酶的有效生物分布,使用多次颅内注射的方法已被其他更易于临床转化的策略所取代。为此,Bosch 及其同事的研究表明,在成年 MPS VII 型大鼠大脑中仅进行一次纹状体注射,即可在约 10% 的脑体积中产生酶表达,从而使储存负担减轻约 16 周。实现转导水平增强的另一种策略是整合来自其他感染性哺乳动物病毒的基因元件,如启动子和增强子。Sferra 及其同事的研究表明,当由巨细胞病毒启动子-增强子元件驱动时,小鼠 β -GUSB 转基因的转导效率得到了提高。作者报告称,酶表达在 CNS 的扩散范围达到 50%~240%,并在 3 月龄内维持代谢贮积改善效果。

视网膜退化导致的进行性视力丧失是人类 MPS VII 型疾病的一个典型临床表型。为了纠正这种病理状况,Hennig 及其同事通过眼内注射的方式,将 AAV2-GUSB 注入成年 MPS VII 小鼠体内。结果显示,在接收来自眼睛的视觉输入的大脑区域(如丘脑和中脑顶盖)观

察到了酶活性。有趣的是,邻近的非视觉区域,如海马和视觉皮层,也表现出了 GUSB 活性。这种转导模式提示病毒载体的突触传递与翻译产物的扩散存在协同作用。可以理解的是,在中枢神经系统的大型三维空间中表达 GUSB 转基因对于快速清除溶酶体以及缓解 MPS VII 型相关症状至关重要。Cearley 及其同事将来源于灵长类的 AAV 血清型 7、8、9 和 rh.10 注入成年小鼠的大脑区域,包括皮层、纹状体、丘脑和海马,以评估它们作为中枢神经系统基因转移载体的特性。作者报告称,所有测试的血清型均优先转导神经元,而不是星形胶质细胞和少突胶质细胞。尽管 AAV7 在皮层、丘脑和海马中的基因转移效率很高,但 AAV9 和 AAV rh.10 在同侧和对侧大脑半球的扩散和转导方面表现优于其他血清型。具体来说,对注射了 AAV9 的啮齿动物大脑进行评估显示,在注射后 2 个月,大脑多个区域的溶酶体清除得到了逆转。作者还观察到 AAV9 介导的跨海马连接区神经投射的转导,这为载体通过轴突运输在中枢神经系统覆盖长距离的能力提供了支持性证据。

尽管 AAV 介导的基因疗法在出生后体内动物模型中成功逆转了溶酶体贮积症(LSD)的临床表现,但这些动物的存活率仍远低于野生型对照组。Karolewski 团队首次尝试在胚胎期进行干预:在胚胎第 15.5 天(E15.5)注射携带 GUSB 转基因的 AAV1 载体。实验观察到载体介导的 CNS 转导使酶活性扩散至全脑和脊髓,同时肝脏、脾脏、肾脏及性腺等外周器官也检测到低水平 GUSB 活性,但未在外周组织中发现载体基因组。作者进一步讨论了酶的外周渗漏可能是由于脑脊液(CSF)代谢产物进入静脉系统所致。这种中枢神经系统特异性治疗足以维持注射后 1 年内的溶酶体贮积病变改善,并使生存率接近野生型对照组。令人惊讶的是,一些如面部和骨骼变形等临床表现,在治疗后没有得到纠正。这种喜忧参半的结果表明,在载体设计和 AAV 给药途径等方面还有改进的空间。

在基因治疗向临床转化的过程中,一些最具挑战性的难题与临床上载体给药时所需的外科手术操作有关。在降低治疗性载体递送至中枢神经系统过程中侵入性方面,已经取得了重大进展。脑脊液内注射方式,如脑室内注射(ICV)、枕大池注射(IC)以及腰椎穿刺鞘内注射(IT),都是实现一次给药即可最大程度接触 CNS 组织的可行策略。此外,病毒还可利用轴突运输通过突触间传递跨越长距离,不同 AAV 血清型在神经元连接中的运动效率和方向偏好存在差异。基于此,利用大脑中具有密集传入与传出神经投射的关键枢纽区域可作为有效策略。Cearley 及其同事报道了将 AAV 1、9 和 Rh.10 注射到主要的神经元投射中枢腹侧被盖区(VTA)的对比评估。作者将 AAV 载体的 VTA 注射与传统的纹状体注射进行了比较。虽然 3 种 AAV 血清型都显示了转导到大脑远端区域的扩散增加,但 AAV9 载体的扩散范围最大。基于此策略,研究者将 AAV9 载体包裹的 GUSB 治疗基因注射至 MPS VII 小鼠模型,结果显示单次 1 μ l (约 1×10^{10} 总病毒基因组)注射即可实现治疗基因的广泛转导,促使酶在整个大脑中呈现扩展的生物分布。

在行为方面,MPS VII 患者由于神经元和胶质细胞死亡而表现出智力低下。Frisella 及其同事假设,AAV 介导的 GUSB 转基因递送将成功恢复丧失的认知功能。为此,作者在 MPS VII 小鼠体内进行了 AAV2-GUSB 的颅内注射,从而在中枢神经系统中实现了酶的持久供应。然后,作者利用 Morris 水迷宫测试显示,接受 AAV 载体治疗的小鼠表现出接近野生型水平的认知功能。认知敏锐度的丧失通常与海马功能障碍有关,如学习记忆障碍、恐惧调节困难等。Liu 及其同事对 AAV 介导的基因治疗 MPS VII 小鼠身上观察到的认知受益程度进行了临床前评估。作者通过双侧纹状体内注射,将包装有 β -GUSB 的

AAV5 给予成年的 MPS VII 小鼠。先前已证明 AAV5 是一种高度嗜神经的载体,能够在中枢神经系统中传递到比 AAV2 更广泛的区域。重复采集与性能测试 (RAPC) 实验证明, AAV5 介导的矫正 GUSB 转基因纹状体内注射可改善 MPS VII 小鼠的认知功能。具体地说,感染的 MPS VII 成年小鼠在载体注射前后进行了 RAPC 试验检测。具体表现为治疗后 MPS VII 小鼠的学习错误率和获得奖励的潜伏期显著降低。此外,作者还鉴定了 MPS VII 感染小鼠海马神经元表面谷氨酸受体的特异性丢失。在海马神经元中观察到与学习障碍有关的谷氨酸受体 GluR1、GluR2 和 NR1 的缺失率为 40% ~ 60%。此外,作者还证明, AAV5- β GUSB 处理的小鼠的谷氨酸受体水平确实恢复到了与杂合子小鼠相当的水平,从而为治疗效果提供了分子基础。

MPS III B 型 (黏多糖贮积症 III B 型) 是一种罕见的遗传性 LSD, 患者体内会出现糖胺聚糖肝素硫酸盐的细胞内积聚。本病源于中枢神经系统中 α -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 (NaGlu) 的缺失。这种疾病的特点是中枢神经系统和周围组织迅速恶化, 导致患者严重的智力低下和早逝 [《遗传病的代谢和分子基础》(The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease)]。使用基因疗法进行酶生物合成能够成功保护神经元和外周组织, 并在 MPS III B 小鼠模型中提供症状缓解。最早的治疗性 AAV 基因转移的例子之一是由 Fu 及其同事报道的。他们构建了携带 NaGlu 转基因的 AAV2 载体。转基因由组成性巨细胞病毒 (CMV) 启动子或神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 启动子驱动。在人 MPS III B 患者成纤维细胞、小鼠体细胞和原代脑细胞中成功地转导了 AAV2, 导致 GAG 明显降解。然后将低剂量 (约 1×10^7 病毒基因组) 的 AAV2-NSE-NaGlu 病毒基因组注射到成年 MPS III B 小鼠的脑内, 观察到 NaGlu 的成功表达, 从而纠正了在广泛的中枢神经系统区域的 GAG 储存问题。

Cressant 等评估了 AAV 介导的 NaGlu 基因转移对 MPS III B 小鼠行为学结局的影响。研究证实, AAV2 等特定血清型具有顺行轴突运输的偏好性。具有广泛突触连接性的区域是理想的注射部位, 因为携带矫正性转基因的 AAV 通过一次注射就可以靶向大脑的大片区域。在哺乳动物中枢神经系统中, 多个区域的轴突投射起源于尾壳核。通过比较 6 周龄成年 MPS III B 小鼠纹状体内注射 AAV2 与 AAV5 的效果, 发现 AAV5 介导的转导范围显著大于 AAV2。机制研究表明, AAV5 通过结合细胞表面 N-连接唾液酸完成基因递送, 而 AAV2 依赖硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 的结合, 这种受体依赖性可能限制了 AAV2 在 CNS 中的扩散能力。AAV2 与其同源受体 (HSPG) 的相互作用是细胞受体结合不利于 AAV 载体在中枢神经系统扩散的少见现象之一。这一现象可能解释了 AAV5 载体在注射部位远处扩散和转导中枢神经系统组织的能力增强。两种 AAV 载体注射均使酶的生物利用度高于未经治疗的对照组, 从而逆转了神经元、小胶质细胞和血管周围细胞的疾病表型。此外, 据报道, 经 AAV2 和 AAV5 治疗的行为症状完全逆转。行为恢复评估是通过昼夜节律控制的开放场地试验进行的。在试验过程中, 监测了小鼠在光照和黑暗时间段的活动情况、探索性导航和习惯性导航等参数。综上所述, 这些测试为基因治疗逆转 MPS III B 患者 (表现为焦虑、躁动、过度兴奋和攻击性) 的细胞病理和行为症状的成功提供了客观的评估。

许多天然或工程化的 AAV 变体正在被发现, 它们具有一些理想特性, 比如能够在中枢神经系统中广泛扩散并高效转导大体积组织。为了实现对中枢神经系统中 MPS III B 病理的广泛矫正, Fu 及其同事在 BBB 受损的小鼠体内进行了 AAV2 介导的 NaGlu 基因转移。具体来说, 作者在 AAV 给药后动脉内注射甘露醇, 导致了 BBB 短暂开放。虽然这种治疗不