

基因治疗心肌缺血的载体应用新进展 *

周 鸣 彭建强[△] 郭 莹

(湖南师范大学第一附属医院湖南省人民医院心内科 湖南 长沙 410005)

摘要 近年来,随着基因治疗技术的不断进步,为心肌缺血的治疗开辟了一条全新的途径,并取得了一些令人鼓舞的进展。基因治疗主要包括治疗基因、基因转移载体以及基因导入途径三个方面。基因转移载体又在治疗基因和基因表达之间起着桥梁作用,因此,发展安全、高效的基因转移系统是基因治疗的关键之一。目前用于基因治疗心肌缺血基因转移的载体主要有病毒载体和非病毒载体。下面将就不同载体在心肌缺血的基因治疗中的应用进展进行简要的总结。

关键词 基因治疗 心肌缺血 基因转移载体

中图分类号 R541 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 12-2395-03

Application of Different Vectors in Gene Therapy of Myocardial Ischemia*

ZHOU Ming, PENG Jian-qiang[△], GUO Ying

(Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, 410005, China)

ABSTRACT: Recently, the progress of gene therapy technology has opened up a new way for the therapy of myocardial ischemia, and some inspiring developments have been achieved. Gene therapy includes theoretical gene, gene transfer vector and gene transfer path. Gene transfer vector acts as the bridge between the others. Therefore, develop a safe and efficient gene transfer system is the one key of gene therapy. At present, the mainly gene transfer vector for gene therapy of myocardial ischemia are viral vectors and non-viral vectors. The article focused on recent application of different vectors in gene therapy of myocardial ischemia.

Key word: Gene therapy; Myocardial Ischemia; Gene transfer vector

Chinese Library Classification(CLC): R541 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2395-03

基因治疗定义为将人的正常基因或有治疗作用的基因,通过一定方式导入人体靶细胞,以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用,从而达到治疗疾病的目的。成功的进行基因治疗并不是治疗基因的缺乏,而是高效的无毒性的基因转移系统的缺乏。因此,发展安全、高效的基因转移系统是基因治疗的关键。

载体的选择十分重要,它将决定基因表达的靶向性、有效性、表达持续时间。在临床上成功的基因治疗心肌缺血,我们必须克服很多的障碍。包括基因转导,基因的表达式,基因表达式,基因的大小、机构和形式以及基因治疗的安全性,目前由于病毒载体固有的特性,在基因治疗心肌缺血中得到了广泛应用。

1 非病毒载体

非病毒载体主要指裸质粒,即利用裸露 DNA 携带目的基因(如血管内皮生长因子 VEGF)通过外科手术将其直接注入心肌细胞,可以促其基因表达。在动物模型中达到了一定的治疗效果,Losordo DW et al 直接将 VEGF 注入有症状的慢性心肌缺血患者的心肌细胞,这是人类首次安全的将裸质粒注入心肌细胞,证实了可以减少患者症状,并增加了心肌灌注^[1]。但是这些研究只能说明在症状和运动耐力上有所改善,而不能增加

血管新生。在动物实验中注射裸质粒对心肌缺血的基因治疗无效^[2]。

非病毒载体具有价格低廉,对转基因大小不受限制,低毒性以及低免疫原性等优点,但是效果欠佳,他要求高剂量的质粒,并通过侵袭性的操作直接注入心肌细胞。虽然将质粒联合到各种复合物,如脂质体、非胆固醇-高分子聚合物和明胶均可以提高转染率,同时利用声纳术及电穿孔法也可以提高转染效率,但是这些均不能增加心肌的特异性,并且与病毒载体相比不能达到较高的基因表达水平。

2 病毒载体

病毒载体进入细胞,需要克服许多的屏障,主要过程包括在遗传物质周围的蛋白衣壳,遗传物质通过蛋白衣壳后与细胞表面的特异性受体结合,再经过细胞内摄取以及基因组转移到靶细胞。而衣壳直接陷入基因组运输到细胞核后,通过溶酶体途径裂解分离。由于这些屏障的存在,影响了目的基因表达效率,但是不同的病毒载体各具特点,而且具有天然的感染细胞的能力,我们还可以通过蛋白衣壳的修饰提高组织特异性的靶向性,所以在目前的基因治疗中应用比较广泛。

应用于临床的病毒载体生产价格昂贵,主要是能达到临床

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30570073)

作者简介:周鸣 (1983),女,硕士,心肌缺血的基因治疗, Tel:13508472474, E-mail:103ming@163.com

[△] 通讯作者 彭建强,硕士生导师, Tel:13507426900, E-mail:pengjq@gmail.com

(收稿日期 2010-12-10 接受日期 2010-12-31)

级的标准其纯化工艺非常复杂,限制了其应用。另外有些类型的病毒衣壳蛋白的免疫原性比较强,限制了基因的持续表达及转染靶向性,同时有的亦存在着插入突变。目前用于基因转移的三个典型的病毒包括逆转录病毒/慢病毒,腺病毒和腺相关病毒。

2.1 逆转录病毒载体

逆转录病毒(Retroviruses)是一类动物RNA病毒。其基因组是由2条相同的单链RNA分子组成。逆转录病毒可以高效的感染许多类型的宿主细胞,它虽然是RNA病毒,但有逆转录酶,可以使RNA转录为双链DNA,再整合到宿主细胞基因组中。常用的逆转录病毒载体是从小鼠白血病病毒的前病毒中制备的,除去了大多数野生型基因,而保留了在靶细胞进行逆转录起始的末端重复序列(LTR)。染色体的整合需要在逆转录病毒基因的表达及在分裂细胞中进行。因此,逆转录病毒载体能在分裂的肿瘤细胞中有效地表达,但却限制了在非分裂细胞中的应用。同时在转染过程中的插入突变可能有潜在的致癌性,并可以垂直传播给小孩,这些缺点限制了逆转录病毒的应用。由于本身的特性限制了在心肌缺血的基因治疗。

2.2 慢病毒

慢病毒属于逆转录病毒家族,是逆转录病毒的一个亚类。慢病毒载体可感染分裂细胞及非分裂细胞,转移基因片段容量较大,目的基因表达时间较长,不易引发宿主免疫反应等诸多优点,因此,慢病毒载体已成为基因治疗中载体研究的热点。

目前现有的慢病毒载体来源于多个物种,如人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)、2型(HIV-2),猴免疫缺陷病毒(SIV),马传染性贫血病毒(EIAV)等。他的结构更加复杂,可转染非分裂细胞;可容纳10Kb左右的外源基因;可兼容多个转录启动子;其载体携带的目的基因可以在宿主细胞中长期而稳定的表达。

野生型HIV-1蛋白有直接感染CD4阳性细胞的趋势,这就限制对其他组织的感染。因此,杂交的“假型慢病毒载体”,含有水泡性口炎病毒(VSV)env蛋白G糖蛋白使病毒颗粒能够非特异性地结合于靶细胞的膜磷脂,而不需要特异型膜受体。这使得可以感染更加广泛的组织,包括在体内或体外的心肌细胞。慢病毒是基因治疗潜在的载体,成功的用于法布里病的小鼠模型中 α -半乳糖A替代治疗^[3]。同时,慢病毒在血管内皮细胞的转染也是有效的,对于内皮的基因的靶向治疗可能是最好的载体^[4]。但是,大家熟知由HIV引发的生物安全问题。再者,治疗学病毒是复制缺陷的,野生型病毒同源重组的可能性也逐渐变小。通过建立自身纯化的慢病毒载体,删除野生型长末端重复序列的启动子编码序列可以解决^[5]。基因重组后野生型HIV有了在长末端重复序列进行基因表达的能力,而减少插入突变的风险。目前最佳的选择是采用一些对人类不致病的病毒来源的慢病毒载体,如猴和猴的免疫缺陷病毒^[6]。但是人们还不知道这些病毒导入人体后引发的风险。最近,成功的生产了未整合的慢病毒载体转移到非分裂细胞后可以稳定的表达,为临床应用提供安全的慢病毒载体^[7]。

2.3 腺病毒

腺病毒是最早用于心肌基因治疗的载体。腺病毒载体宿主范围广,它可以高效的感染分裂细胞和非分裂细胞,容易制备

和操作,理化性质稳定,遗传毒性较低,插入突变的风险低,能相对高效的转移到心肌细胞,可携带35Kb外源基因,可直接体内注射;在滴度达到每毫升 10^{13} 病毒颗粒接受纯化的生产过程相当的廉价。但腺病毒载体缺乏靶向性,介导的靶基因表达的时间短而需要重复注射以及诱发机体的免疫反应。腺病毒可自发的发生毒理作用,从心脏病患者的角度上来看,将会导致腺病毒相关的免疫性心肌炎^[8]。免疫反应限制了治疗基因表达的稳定性的。

至今腺病毒载体已经发展到第四代,第四代腺病毒载体仅仅保留了末端反向重复序列,删除了所有的病毒基因,进一步降低了免疫原性,这就是所谓的“高容量”载体。这种载体能以减弱的毒性感染中枢神经细胞,但是转导效率同时也会下降。

另外腺病毒在许多组织中有天生的趋向性,它可自发的感染呼吸道,消化道,肝脏,神经元和横纹肌组织。它必须结合科萨奇腺病毒受体(CAR)后才能进入细胞,为了克服这一问题,发展了不同处理的腺病毒表面蛋白的方法,有些方法已经用于提高腺病毒基因转移到脉管组织,但不是心肌组织。在高齢患者体内与CAR结合可能减少心肌基因治疗的靶向性。

Gray等的研究显示,腺病毒载体已经发展成为有希望治疗心脏病的一种工具^[9]。重组腺病毒载体曾今应用于顽固性心绞痛的患者的心脏血管发生的随机的临床实验中。心肌细胞是这些腺病毒的靶细胞之一,尽管血管平滑肌细胞和成纤维细胞为转基因的表达起重要的作用,比起心肌细胞来脉管系统更适合作为其治疗靶点,在首次心肌基因治疗试验中,他们将给出一些关于早期使用腺病毒作为心肌载体有用的数据^[10]。在A-GENT2这个实验中,通过冠脉内灌注腺病毒5FGF-4对心肌梗死患者进行基因治疗^[11]。没有证据可以检测到腺病毒诱导的心肌炎,也没有证据来证实大量的心肌转染或者FGF-4基因表达。在这些治疗患者中有13个严重的事件报道,包括短暂的转氨酶升高和血栓形成。在一项注册研究中首先对300患者进行间断分析,尽管在严重的患者(严重的心绞痛症状,低运动耐力及高齢患者)可以改善的症状,但是在平板运动持续时间的主要终点事件中没有任何益处而被迫中止试验,在接受腺病毒载体的患者中没有显著的不利的事件发生。

总之,早期的临床使用证实了应用重组腺病毒载体转移血管生长因子有治疗益处,且没有增加显著的心脏事件或者全身的相反事件。主要的缺陷可能与患者的数量,载体的剂量或者治疗蛋白的转移的短暂的表达或者生长因子的转移有关。

2.4 腺相关病毒

腺相关病毒是目前最适合心肌基因治疗的载体。他们有很多特点适合于基因治疗:对血管平滑肌细胞,心肌细胞,骨骼肌细胞有自然的趋向性;可以在宿主细胞中长期的基因表达,而避免了反复注入;载体转导之后AAV剂量达峰时间只需要几天,而腺病毒需要几周^[12];可减少免疫反应,宿主范围广,可高效感染分裂细胞与非分裂细胞;不同的血清型有不同的靶向性,其中AAV-8、-9对心肌细胞有高的靶向性^[13,14],而AAV9有最高的心肌倾向性,从而避免了异位的基因转移^[15];可以产生局部炎症反应,虽然整合到人类基因组,但迄今未发现任何人类相关疾病。腺相关病毒也有些缺点:所携带治疗基因小,仅能

携带 4.5Kb 的外源基因,很难大规模的生产且生产费用相当的昂贵,在人体中存在天然的腺相关病毒抗体。

目前,腺相关病毒有 11 种血清型,在心肌的基因治疗的动物模型中应用 AAV1 和 AAV6 均证实了其能有效的基因转移和表达^[16]。在小鼠模型中,单独静脉注入携带有报告基因的 AAV9 与有心肌趋向性相对高的 AAV1 相比在心肌转染率上增加 220 倍^[17]。另外一个小鼠模型表明在单独静脉注入 AAV9 后几乎 100%的心肌转染^[18]。AAV9 同时能高效的转染非人类的灵长类动物的心肌。

AAV 进入细胞主要是通过通过与细胞表面特异性受体结合后经过受体介导的内吞作用进入^[19]。同时,AAV 需要利用内吞转运作用经血管内转移后穿过内皮细胞到达心肌细胞。这就使得 AAV 能有效的通过冠脉内注射转移到心肌细胞,而达到进行基因治疗的目的,也使通过静脉注射达到提高病毒对心肌的趋向性。

野生型 AAV 插入人类基因组,趋向于插入人类 19 号染色体的非编码区域。但是重组 AAV (rAAV) 的基因治疗缺乏特异的部位且缺乏 ITR 和 rep 蛋白。因此,用重组 AAV 进行基因治疗,不需要整合到特异的位点。同时来自 AAV 所引起的插入突变是可以忽略不计的^[20]。

AAV 作为基因治疗载体也存在着许多缺点,主要限制在于外源基因的大小,AAV 是细小病毒,仅能容纳 4.5Kb 的基因组。这种缺陷限制了基因的包装和转移,及基因启动子的选择。为了防止这些问题的出现,有研究表明转录剪切或者通过在插入到 AAV 载体之前删除野生型基因的非编码区域(内含子)。这就允许 AAV 携带 7.2KB 的囊性纤维跨膜通道调节因子基因。

AAV 基因表达相对缓慢,在转移到心肌后需要 2 到 4 周达到高峰。AAV 包含单链 DNA,它需要转运至心肌细胞细胞核并合成双链 DNA 后才开始转录。Jude Samulski's 博士实验组已经合成了双链 AAVDNA 基因组,删除在 AAV 基因组末端形成 ITR 序列的正常发夹结构后^[21],使得互补链很快恢复。只要在 AAV 衣壳中成功的包装小基因,在基因转移之后就会快速的进行基因表达和高水平的蛋白表达。在基因治疗中通过交叉包装 AAV 和应用不同的启动子来提高 AAV 的应用。Dawn 等则用一种以同源重组为基础的系统作为一种转换方法来生产复合 AAV 载体,即在不同血清型衣壳的亚单位之内交换它们的功能区域,合成自然上同源的复合体病毒,这种方法的一个优点是 AAV 结构域的交流是建立在对 AAV 血清型选择和对 AAV 功能选择的基础上而不是通过它们的物理结构来进行选择交换。

AAV 是能自然的发生在人的病毒,人群中有 20%-40%可以检测到 AAV 抗体。普通的野生型 AAV2 的衣壳结构,在 AAV 转移的基因表达的效果上有很大副作用,目前暂时没有在抗 AAV 抗体患者体内进行 AAV 基因治疗的实验。第二,抗体反应的产生在治疗的患者中如果重复输入,所需的剂量可能会阻止 AAV 基因治疗的给药效果。

生产 rAAV 的价格相当的昂贵,特别是如果要求生物工程的载体。但是,生产和纯化的技术变得越来越有效,最终会使得

翻译临床的载体在价格上变得可能,最后,重新评估已经完成的 20 个临床实验,输入 AAV 载体到数百个患者体内没有产生严重副作用。

3 展望

各种病毒载体各具优缺点,目前最需要解决的问题是病毒性载体均存在缺陷,它们的靶向性和组织特异性差,可控性弱,因此要筛选靶向性好、组织特异性强且可精确调控的病毒性载体还需要做大量工作。在具有心肌趋向性的改善,有效的基因表达,载体制备的简化,病毒载体的免疫原性这些最关注的问题之一有待进一步解决。但基因治疗载体发展得非常的迅速,我们相信在不远的将来,可以通过对病毒载体、心肌特异性缺氧诱导表达启动子以及促血管生成基因这三要素分别优化的基础上进行适当组合,可以得到具有最佳心肌缺血基因治疗效果,使基因治疗心肌缺血真正应用于临床。

参考文献(References)

- [1] Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2002,105(17):2012-2018
- [2] Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, et al. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmurals angiogenesis in porcine heart[J]. *Circulation*, 2004,109(8):1029-1035
- [3] Yoshimitsu M, Higuchi K, Dawood F, et al. Correction of cardiac abnormalities in fabry mice by direct intraventricular injection of a recombinant lentiviral vector that engineers expression of alpha-galactosidase A[J]. *Circ J*, 2006,70(11):1503-1508
- [4] Sakoda T, Kasahara N, Kedes L, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer to endothelial cells compared with adenoviral and retroviral vectors[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2007,37(1):1-11
- [5] Bahner I, Sumiyoshi T, Kagoda M, et al. Lentiviral Vector Transduction of a Dominant-negative Rev Gene Into Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells Potently Inhibits Human Immunodeficiency Virus-1 Replication [J]. *Mol Ther*, 2007,15(1):76-85
- [6] Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model[J]. *Nature*, 2004,429(6990):413-417
- [7] Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, et al. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors [J]. *Nat Med*, 2006,12(3):348-353
- [8] Fleury S, Driscoll R, Simeoni E, et al. Helper-dependent adenovirus vectors devoid of all viral genes cause less myocardial inflammation compared with first-generation adenovirus vectors [J]. *Basic Res Cardiol*, 2004,99(4):247-256
- [9] Gray SJ, Samulski RJ. Optimizing gene delivery vectors for the treatment of heart disease [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008,8(7):911-922
- [10] Rissanen TT, Yla-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2007,15(7):1233-1247

(下转第 2400 页)

- neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing[J].Nature,1983,304(5922):129-135
- [2] Wimalawansa SJ.Amylin,calcitonin gene-related peptide,calcitonin, and adrenomedullin:a peptide superfamily [J].Crit Rev Neurobiol, 1997,11(2-3):167-239
- [3] 孙飞, 秦旭平. 降钙素基因相关肽 (CGRP) 受体 [J]. 生命的化学, 2009,29(5):731-734
Fei SUN,Xu-Ping QIN. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor[J]. Chemistry of Life, 2009,29(5):731-734
- [4] Avila G,Aguilar Ci,Ramos Mondragon R,et al.Sustained CGRP1 receptor stimulation modulates development of EC coupling by Camp/PKA signalling pathway in mouse skeletal myotubes [J].J Physiol, 2007,584(Pt 1): 47-57
- [5] Wang Y,Wang DH.Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure:role of endogenous CGRP[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2004,287(4): 1868-1874
- [6] Coupe Mo,Mak JC,Yaconb M,et al.Autoradiographic mapping of calcitonin-gene related peptide receptors in human and guinea pig heart[J].Circulation,1990,81(3):741-747
- [7] 李晓艳,黄从新,孙有刚.降钙素基因相关肽对人血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J].中国病理生理杂志,2000,16(1):24-26
LI Xiao-yan,HUANG Cong-xin,SUN You-gang. Effect of calcitonin gene-related peptide on proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2000,16(1):24-26
- [8] Clarke MC,Talib S,Figg NL,et al.Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation:effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis [J].Circ Res , 2010,106(2):363-372
- [9] OrrAW,HastingsNE,BlackmanBR,et al.Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis[J].J Vasc Res,2009,47(2):168-180
- [10] Kocaman SA.Asymmetric dimethylarginine,NO and collateral growth[J].Anadolu Kardiyol Derg,2009,9(5):417-420
- [11] De Hoon JN,Pickkers P,Smits P,et al.Calcitonin gene-related peptide: Exploring its vasodilating mechanism of action in humans [J].Clin Pharmacol Ther,2003,73(4):312-321
- [12] 赵守琪,于晓光,潘洪明,等.降钙素基因相关肽对血管内皮细胞凋亡的保护作用[J].齐齐哈尔医学院学报,2006,27(2):133-134
Zhao Shouqi,Yu Xiaoguang,Pan Hongming,et al. Effect of CGRP on the Apoptosis in Cultured Vascular Endothelial Cells [J]. Journal of Qiqihar Medical College, 2006,27(2):133-134
- [13] 林平,赵守琪,刘洋,等.CGRP对葡萄糖诱导血管内皮细胞凋亡保护作用的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2005,39(2):18-120,123
LIN Ping,ZHAO Shou-qi,LIU Yang,et al. Effect of CGRP on the high glucose-induced apoptosis in cultured vascular endothelial cells [J]. Journal of Harbin Medical University, 2005,39(2):18-120,123
- [14] Micheletti RG,Fishbein GA,Currier JS,et al.Calcification of the internal elastic lamina of coronary arteries[J].Mod Pathol,2008,21(8): 1019-1028
- [15] Rogers MJ.Statins;Lower lipids and better bones [J].Nat Med,2000;6 (1):21-23
- [16] U.H.lerner and E.Persson.Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide,substance P and vasoactive intestinal peptide[J].J Musculoskelet Neuronal Interact,2008,8(2):154-165
- [17] Villa I,Mrak E,Rubinacci A,et al.CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cell via Camp/PKA-dependent pathway[J].Am J Physiol Cell Physiol 2006,291(3): 529-537
- [18] Lerner UH.Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and receptor-like receptors in bone [J].J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006,6(1): 87-95

(上接第 2397 页)

- [11] Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, et al. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina [J]. J Am Coll Cardiol, 2003,42(8):1339-1347
- [12] Su H, Huang Y, Takagawa J, et al. AAV serotype-1 mediates early onset of gene expression in mouse hearts and results in better therapeutic effect[J]. Gene Ther,2006,13(21): 1495-1502
- [13] Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(3): 321-328
- [14] Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo[J]. Circ Res,2006 99(4): e3-e9
- [15] Work LM, Buning H, Hunt E, et al. Vascular bed-targeted in vivo gene delivery using tropism-modified adeno-associated viruses [J]. Mol Ther,2006, 13(4): 683-693
- [16] Ferrarini M, Arsic N, Recchia FA, et al. Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs[J]. Circ Res, 2006,98(7):954-961
- [17] Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo.[J] Circ Res,2006,99(4):e3-e9
- [18] Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, et al. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy [J]. J Thromb Haemost, 2007,5(1):16-24
- [19] Di Pasquale G, Chiorini JA.AAV Transcytosis through Barrier Epithelia and Endothelium[J]. Mol Ther, 2006,13(3):506-516
- [20] McCarty DM, Young SM Jr, Samulski RJ.Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAVvectors [J].Annu Rev Genet,2004,38:819-45
- [21] Wang Z, Ma HI, Li J, et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo[J]. Gene Ther, 2003,10(26):2105-2111