

论著·基础研究

经静脉注射的单链 9 型腺相关病毒介导基因在星形胶质细胞表达

王晓丹¹, 杨 钊¹, 沈帆霞^{1,2}

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院北院, 上海 201801; 2. 美国加州大学旧金山分校麻醉与围术期医学系脑血管研究中心, 旧金山 94110, 美国

[摘要] **目的**·探讨静脉注射含低氧反应元件 (hypoxia-responsive element, HRE) 启动子的单链 9 型腺相关病毒 (single-stranded adeno-associated virus serotype 9, ssAAV9) 能否介导 *LacZ* 基因在脑缺血区表达, 及其可转染的脑细胞类型。**方法**·建立永久性左侧远端大脑中动脉闭塞 (distal middle cerebral artery occlusion, dMCAO) 小鼠模型, 模型建立 1 d 和 5 d 后检测脑缺血区中低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的表达。dMCAO 模型建立 1 h 经颈静脉注射 AAV9-H9*LacZ* 载体, 注射 5 d 后 X-gal 染色检测脑缺血区和肝组织中 *LacZ* 基因编码蛋白 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -gal) 的表达, 免疫荧光双染色检测 β -gal 在星形胶质细胞、神经元及血管内皮细胞内的表达。**结果**·dMCAO 模型建立 1 d 和 5 d 后小鼠缺血病灶局部 HIF-1 表达增高。 β -gal 主要在 AAV9-H9*LacZ* 注射小鼠的缺血半暗带区表达, 其肝脏组织无 β -gal 阳性表达。脑缺血区 β -gal 主要与胶质细胞原纤维酸性蛋白共表达, 少量 β -gal 与神经元特异核蛋白共表达。**结论**·经静脉注射的 ssAAV9 主要介导基因在脑缺血区星形胶质细胞表达。HRE 能有效控制 *LacZ* 基因主要在脑缺血区表达。

[关键词] 9 型腺相关病毒; 脑缺血; 低氧反应元件; 星形胶质细胞

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.08.006 **[中图分类号]** R741 **[文献标志码]** A

Single-stranded adeno-associated virus serotype 9 mediated gene expression in astrocyte via intravenous delivery

WANG Xiao-dan¹, YANG Zhao¹, SHEN Fan-xia^{1,2}

1. Ruijin Hospital North, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201801, China; 2. Center for Cerebrovascular Research, Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco, San Francisco 94110, California, USA

[Abstract] **Objective**·To investigate the expression of *LacZ* gene mediated by intravenous injection of the single-stranded adeno-associated virus serotype 9 (ssAAV9) containing hypoxia-responsive element (HRE) promoter in the cerebral ischemic area, and further identify the types of brain cells that can be transfected by the vector. **Methods**·A mouse model of permanent left distal middle cerebral artery occlusion (dMCAO) was established. The expression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in cerebral ischemic area was detected at 1 and 5 days after ischemia. The ssAAV vector containing HRE-regulated *LacZ* gene was packaged into the capsid of AAV9 virus (AAV9-H9*LacZ*), and AAV9-H9*LacZ* was injected into mice through jugular vein 1 h after the establishment of dMCAO model. Five days after injection of AAV9-H9*LacZ*, X-gal staining was used to detect the expression of β -galactosidase (β -gal) encoded by the *LacZ* gene in the ischemic area and liver tissue. Immunofluorescence double staining was used to detect the expression of β -gal in astrocyte, neurons and vascular endothelial cells. **Results**·The expression of HIF-1 was increased 1 and 5 days after ischemia. β -gal was mainly expressed in ischemic penumbra of mice injected with AAV9-H9*LacZ*. There was no positive expression of β -gal in the liver tissue of mice. β -gal was mainly co-expressed with glial fibrillary acidic protein as an astrocyte-specific marker, and a little of β -gal was co-expressed with neuron-specific nuclear protein. **Conclusion**·After cerebral ischemia, intravenous injection of AAV9-H9*LacZ* can effectively mediate gene expression in astrocyte in the cerebral ischemia area. HRE can effectively control the expression of the *LacZ* gene in cerebral ischemia.

[Key words] adeno-associated virus serotype 9 (AAV9); cerebral ischemia; hypoxia-responsive element (HRE); astrocyte

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体是一种单链 DNA 病毒, 属于非致病的、辅助病毒依赖型的细小病毒家族成员。与其他病毒载体相比, AAV 具有免疫原性较低、能够感染分裂和非分裂细胞、介导目的基因在

宿主体内长期表达等特点^[1]。AAV 可作为中枢神经系统疾病研究和基因治疗理想的重组病毒载体。

AAV 载体有多种血清型, 然而大多数血清型由于不能通过血脑屏障 (brain blood barrier, BBB), 仅能通过立体

[基金项目] 国家自然科学基金 (81771281, 81471177)。

[作者简介] 王晓丹 (1983—), 女, 主治医师, 硕士; 电子信箱: 13405066606@163.com。

[通信作者] 沈帆霞, 电子信箱: sfx20140602@outlook.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81771281, 81471177)。

[Corresponding Author] SHEN Fan-xia, E-mail: sfx20140602@outlook.com。



定向注射等方法将其直接注射至脑中。经静脉给药的 9 型 AAV (AAA serotype 9, AAV9) 能有效通过新生小鼠和非人灵长类动物的 BBB 而受到广泛的关注^[2]。然而经静脉注射的 AAV9 不仅介导基因在脑部表达, 也可能在其他外周器官如肝脏和心脏表达。因此如何调控目的基因在病变部位表达已成为近年来基因治疗领域的研究热点之一。组织出现缺氧时, 低氧诱导因子 -1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 与低氧反应元件 (hypoxia-responsive element, HRE) 相互作用, 可以诱导一系列缺氧响应相关基因表达, 如促红细胞生成素和血管内皮生长因子。因此在启动子区加入 9 个拷贝 HRE 作为调控元件的 AAV 载体能控制目的基因在缺血、缺氧区表达^[3]。

自身互补 AAV9 (self-complementary AAV9, scAAV9) 能够介导目的基因在新生小鼠脑中稳定表达, 但当目的基因的互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 片段大于 2.1 kb, 则无法构建 scAAV。因而, 本研究用单链 AAV9 (single-stranded AAV9, ssAAV9) 构建载体, 探讨通过静脉注射含 9 个拷贝 HRE 的 ssAAV9 (AAV9-H9LacZ) 是否能有效控制目的基因 *LacZ* [β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -gal) 编码基因] 在成年小鼠脑缺血区表达, 并研究其可转染的脑细胞类型, 以期为脑血管病的基因治疗提供新的方法和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 CD-1 雄性小鼠购自美国 Charles River 实验室, 动物饲养和实验步骤均符合加州大学旧金山分校动物伦理委员会的要求。小鼠在清洁级动物房饲养, 每笼 5 只, 温度控制在 $(25.0 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$ 。

1.2 AAV9-H9LacZ 构建和病毒包装

AAV9 载体购自 Vector Biolabs (美国), 其中含 β -gal 编码基因的启动子 (p β gal)。载体以 *Sma* I 和 *Hind* III 为酶切位点进行酶切, 在 2 个末端反向重复序列 (inverted terminal repeats, ITRs) 之间插入 *LacZ* cDNA 质粒, 并将 9 个拷贝 HRE 作为启动子用来控制 *LacZ* 基因表达^[4]。AAV9-H9LacZ 病毒的包装采用三质粒共转染法 (helper-free AAV 包装系统)。2 个辅助质粒 (其中一个携带腺病毒的 VA、E2A 和 E4 区, 另一个携带 AAV 的 *Rep* 和 *Cap* 基因) 和 AAV9-H9LacZ 质粒共转染 HEK293 细胞, 包装 AAV 重组病毒载体。采用氯化铯梯度离心纯化病毒。通过 DNA 斑点杂交分析确定病毒滴度^[5]。

1.3 实验分组

取 12 只小鼠, 随机分为假手术组和脑缺血组, 每组 6 只。在远端大脑中动脉闭塞 (distal middle cerebral artery occlusion, dMCAO) 模型建立 1 d 和 5 d 后处死。取小鼠新鲜脑组织提取蛋白用于 Western blotting, 并制备石蜡切片用于免疫组织化学染色。

另外取 12 只小鼠, 全部建立 dMCAO 模型, 随机分为对照组和 AAV9-H9LacZ 组, 每组 6 只。dMCAO 模型建立后 1 h 分别静脉注射生理盐水和 AAV9-H9LacZ 病毒。模型建立 5 d 后处死, 取小鼠新鲜脑组织制备冰冻切片用于免疫荧光染色, 取脑组织和肝脏组织用于 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷酶 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal) 染色。

1.4 dMCAO 模型建立

1.5% 异氟烷吸入麻醉小鼠。手术显微镜下, 在右侧眼眶和耳屏间切 1 cm 切口。移除约 2 mm² 的头骨后, 用电凝阻塞大脑中动脉。后将骨板、颞肌复位并缝合皮肤。在手术过程中用热毯将体温保持在 $(37.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 。用激光多普勒血流仪 (Vasamedics 公司, 美国) 监测小鼠表面脑血流 (surface cerebral blood flow, sCBF), 如小鼠缺血核心区的 sCBF 超过基线的 15% 则除外。

1.5 AAV9-H9LacZ 的静脉注射

AAV9-H9LacZ 组在小鼠 dMCAO 模型建立后 1 h, 经颈静脉注射溶解在 200 μL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 的 AAV9-H9LacZ [1×10^{12} GC, GC 为基因组拷贝 (genome copy)]。对照组经颈静脉注射等量的生理盐水。

1.6 Western blotting 检测

利用 BCA (bicinchoninic acid) 法测定蛋白浓度。蛋白经 7% ~ 12% 梯度凝胶电泳后转膜, 抗 HIF-1 α 抗体 (1:500 稀释; Novus 公司, 美国) 室温孵育 1 h, PBS 清洗后, 辣根过氧化物酶标记的抗体 (1:2 000 稀释; Amersham 公司, 美国) 孵育。使用增强型化学发光反应试剂盒 (Amersham 公司, 美国), 曝光, 显影。用 Image J 1.63 软件定量分析蛋白条带。

1.7 免疫组织化学染色

脑组织切片以抗 HIF-1 抗体 (1:500 稀释; Chemicon 公司, 美国) 孵育 60 min, PBS 洗涤, 滴加生物素化的二抗, PBS 洗涤, 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine,

DAB) 显色, 苏木精复染细胞核。

1.8 免疫荧光染色

dMCAO 模型建立 5 d 后处死小鼠, 脑组织迅速冷冻保存在 -80°C 。然后置恒冷冰冻切片机, 由嘴侧向尾侧行序列冰冻切片, 脑冠状切片厚 $20\ \mu\text{m}$ 。免疫荧光染色所需特异性抗体为血小板-内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31) 抗体 (1:50 稀释; AbD Serotec 公司, 英国)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (1:500 稀释; Sigma-Aldrich 公司, 美国)、神经元特异核蛋白 (neuron-specific nuclear protein, NeuN) 抗体 (1:500 稀释; Chemicon 公司, 美国) 和 β -gal 抗体 (1:500 稀释; Abcam 公司, 美国)。样本在一抗溶液中孵育 90 min, 在二抗 Alexa 594 抗小鼠 IgG 和 Alexa 488 抗兔 IgG (1:500 稀释; Invitrogen 公司, 美国) 中孵育 60 min 后, 用含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的防荧光淬灭封片剂 (vectashield) 封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。用德国 Leica DMLS 荧光显微镜采集图像, 每张切片在脑梗死周边区选取 2 个高倍视野。各组所选部位相同, 用 Image J 1.63 软件对 β -gal 阳性细胞定量分析。

1.9 X-gal 染色

脑和肝脏组织制备 $20\ \mu\text{m}$ 厚冠状切片, 用 0.5% 戊二醛固定 10 min 后, 在 X-gal 溶液 (5 mmol/L 铁氰化钾、5 mmol/L 亚铁氰化钾、2 mmol/L 氯化镁、0.01% 脱氧胆酸钠、1 mg/mL X-gal) 中孵育 2 h。梯度乙醇脱水, 封片, 脑片扫描。蓝色所示为 β -gal 阳性区, 浅红色为脑缺血区。定量分析结果以 β -gal 阳性区面积占脑缺血区面积的百分比表示。

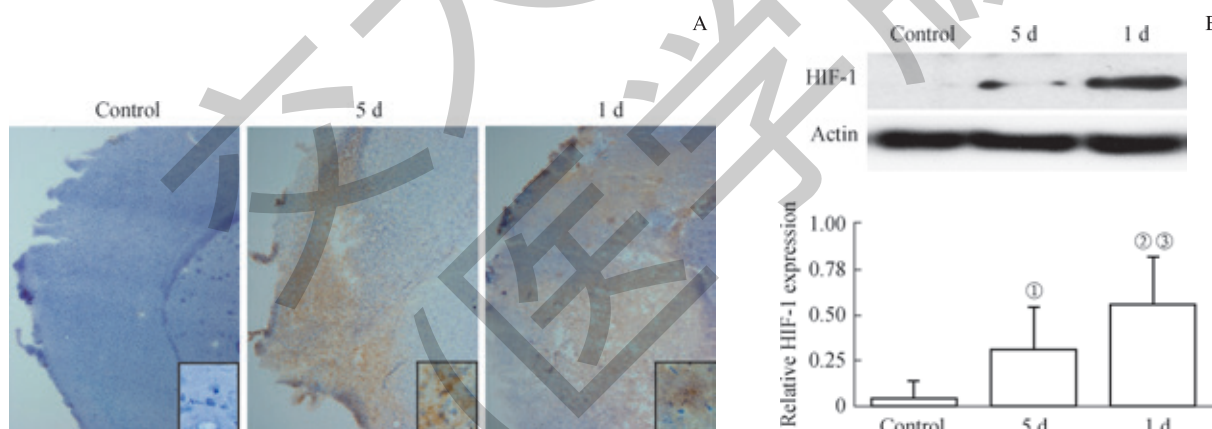
1.10 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑缺血区 HIF-1 的表达

免疫组织化学染色结果显示, dMCAO 模型建立 1 d 和 5 d 后 HIF-1 在脑缺血区阳性表达 (图 1A)。Western blotting 结果见图 1B, 局灶性脑缺血 1 d 和 5 d 后, 小鼠缺血病灶局部 HIF-1 的表达水平较假手术组明显增高, 差异有统计学意义 ($P=0.049$, $P=0.007$)。



Note: A. Immunohistochemistry staining showed that HIF-1 were expressed in cerebral ischemia area 1 and 5 d after ischemia (large, $\times 50$; small at bottom right, $\times 400$). B. Western blotting was used to detect the expression of HIF-1 in cerebral ischemic area 1 and 5 d after ischemia. Control—sham operation group. ^① $P=0.049$, ^② $P=0.007$, compared with control; ^③ $P=0.042$, compared with 5 d.

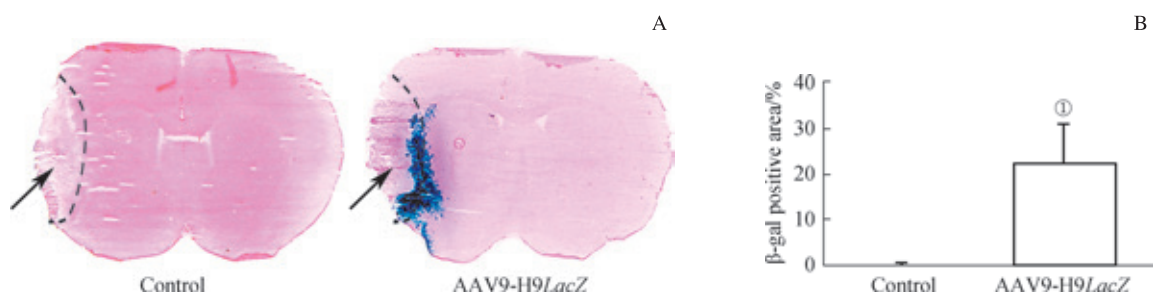
图 1 HIF-1 在脑缺血区的表达

Fig 1 Expression of HIF-1 in the ischemic area

2.2 脑缺血区 β -gal 的表达

在 dMCAO 模型建立 1 h 后, 将 AAV9-H9LacZ 经颈静脉注入小鼠体内。dMCAO 模型建立后第 5 日, 处死小鼠, 取脑组织制备切片。AAV9-H9LacZ 组和对照组可见左侧大脑中动脉区域出现缺血灶, 提示造模成功。X-gal 染色结果显示, AAV9-H9LacZ 组的脑缺血区周围 (缺血半暗带区) 可见深蓝色的 β -gal 阳性表达, 在缺血区中心

可见少量的 β -gal 表达, 在其他区域偶见 β -gal 表达, 而对照组在脑缺血区周围和其他区域均未检测到 β -gal 表达 (图 2A)。定量分析结果见图 2B, 2 组 β -gal 阳性区占脑缺血区面积的百分比的差异有统计学意义 ($P=0.000$)。提示经静脉注射的 AAV9-H9LacZ 能通过 BBB 进入脑部, 并主要在缺血区周围表达。



Note: A. Expression of β -gal in the ischemic area. The black arrow indicated the infarct area of the brain. The blue color showed β -gal positive area. B. Comparison of β -gal positive area between AAV9-H9LacZ group and control group. $^{\text{①}}P=0.000$, compared with control.

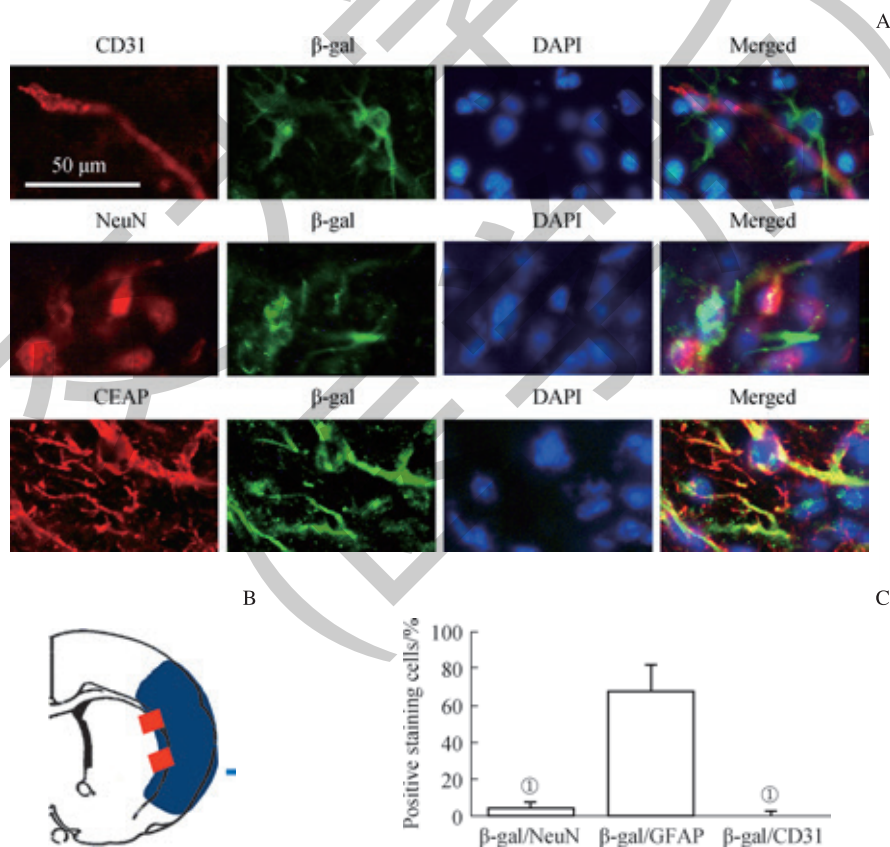
图 2 X-gal 染色检测 β -gal 在脑缺血区的表达

Fig 2 Expression of β -gal in the ischemic area detected by X-gal staining

2.3 脑缺血区 β -gal 阳性表达的细胞类型

免疫荧光结果显示, 脑缺血 5 d 后大量 β -gal 阳性细胞存在于脑缺血区周围。 β -gal 阳性细胞主要表达星形胶质细胞标志物 GFAP, 少部分 β -gal 阳性细胞表达神经元标志物 NeuN, 几乎未见 β -gal 阳性细胞表达上皮细胞标

志物 CD31 (图 3A)。随机选取 2 个视野 (图 3B), 定量分析 β -gal/GFAP 共表达、 β -gal/NeuN 共表达以及 β -gal/CD31 共表达的细胞数, 发现 β -gal/GFAP 共表达的细胞数最多 ($P=0.000$), 见图 3C。



Note: A. Immunofluorescence staining of brain tissue. B. Two areas randomly selected for statistical analysis. C. Comparison of β -gal/CD31, β -gal/NeuN and β -gal/GFAP positive cells. $^{\text{①}}P=0.000$, compared with β -gal/GFAP.

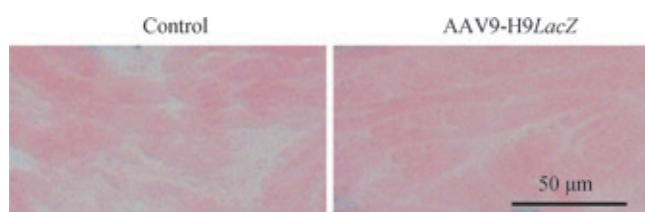
图 3 脑缺血区 β -gal 阳性表达的细胞类型

Fig 3 Types of β -gal positive cells in the cerebral ischemic area

2.4 肝脏组织中 β -gal 的表达

在小鼠的肝脏组织中, AAV9-H9LacZ 组及对照组未

检测到明显的 β -gal 表达 (图 4)。

图4 肝脏组织 β -gal 的表达 (X-gal 染色)Fig 4 Expression of β -gal in the liver tissue (X-gal staining)

3 讨论

中枢神经系统疾病基因治疗的关键是载体能够介导目的基因通过 BBB 或者直接进入中枢神经系统。AAV 有多种血清型,许多 AAV 载体不能通过正常的 BBB,只能通过立体定向注射等有创方法将病毒注射至脑部。直接注射是一种侵入性的方法,可导致患者的额外伤害,因而制约了 AAV 载体在中枢神经系统疾病基因治疗中的运用。

经静脉注射 AAV9 载体能通过 BBB,介导目的基因在脑部表达。但中枢神经系统以外的器官如肝脏、心脏、肾脏和骨骼肌等,也有目的基因的高表达。鉴于基因的表达会过度表达会给宿主带来危害,因此如何调控基因的表达及其时间是基因治疗的关键。

既往研究^[3]显示脑缺血模型建立 1 h,用立体定向注射 AAV1-H9LacZ 至脑缺血边缘区域能介导 LacZ 基因在局部表达,注射至正常脑组织则无 LacZ 基因表达。提示 HRE 能控制目的基因仅仅在缺血和缺氧的条件下表达,为条件性地控制基因表达并进行治疗提供了新的方法。

本研究结果显示选用 AAV9-H9LacZ (1×10^{12} GC) 这一剂量,能使目的基因主要在脑缺血部位有效表达。我们的研究显示在 dMCAO 模型建立 1 h 后静脉注射 AAV9-H9LacZ 能通过 BBB,介导 LacZ 基因在缺血区及周围区表达。而正常脑组织和外周器官并未见到明显的 LacZ 基因表达,提示 AAV9-H9LacZ 不能介导目的基因在正常组织表达。因此,通过非侵入性地静脉注射 AAV9-H9LacZ 可以介导目的基因在脑部表达。dMCAO 模型建立 1 d

和 5 d 后,小鼠脑缺血组织局部 HIF-1 的表达增高,提示 HRE 能限制基因在脑缺血区周围的表达,即 9 拷贝的 HRE 能控制治疗基因局限在缺血区及周边区域表达。

AAV9 能介导目的基因通过 BBB^[6]。主动转运在促进 AAV9 跨越 BBB 方面的作用机制已被证实^[7]。在 dMCAO 模型建立后 10 min 之内 BBB 通透性增加,并持续至少 24 h 至数日。本研究发现缺血周围区 LacZ 基因表达明显高于脑的其他部位,提示除了 AAV9 通过主动转运来通过 BBB,脑缺血后的 BBB 通透性增加可能也在其中起作用。

通过免疫荧光双染色,本研究发​​现经静脉注射的 scAAV9 所介导的 LacZ 基因主要转染 GFAP 阳性细胞,少数 NeuN 阳性细胞有 LacZ 基因的表达,几乎无 CD31 阳性细胞有 LacZ 基因的表达。尽管其他研究表明静脉注射的 scAAV9 能通过新生小鼠的 BBB,主要转染神经元^[8],以及星型胶质细胞和小胶质细胞等^[9]。但在成年小鼠中,scAAV9 能转染星型胶质细胞^[10-11]。由于脑梗死后,星型胶质细胞迅速活化,活化的星形胶质细胞发生重要的形态学改变,如增生和肥大,形成胶质瘢痕,围绕损伤区形成物理和功能的壁垒^[12]。鉴于脑缺血后局部神经元死亡,星形胶质细胞活化,我们推测在本研究中经静脉注射的 ssAAV9 主要转染至 GFAP 阳性的星形胶质细胞,而非神经元,这可能与脑缺血区大量神经元的死亡有关。

既往研究^[5]显示静脉注射 AAV9 和生理盐水组相比较,脑缺血体积无差异,提示静脉注射 AAV 载体并不加重脑缺血损伤。AAV 具有能够在宿主细胞长期稳定表达、安全性高并与人类疾病无相关性、病毒本身稳定性好等多种优点^[13]。

总之,本研究表明静脉注射 ssAAV9 可介导基因通过成年小鼠 BBB 通透性增加的相关区域。脑缺血后静脉注射 ssAAV9 介导的基因主要在星形胶质细胞表达,部分在神经元表达。此外通过与调控元件 HRE 的结合,目的基因可以被局限在脑损伤区域表达,以减少由于目的基因在全身其他器官表达所导致的不良反应。与调控元件结合的 ssAAV9 可作为缺血性卒中及其他中枢神经系统疾病基因治疗的安全、有效的载体。

参 考 文 献

- [1] Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy[J]. Nat Rev Genet. 2014, 15(7): 445-451.
- [2] Mattar CN, Wong AM, Hoefer K, et al. Systemic gene delivery following intravenous administration of AAV9 to fetal and neonatal mice and late-gestation nonhuman primates[J]. FASEB J. 2015, 29(9): 3876-3888.
- [3] Shen FX, Su H, Fan YF, et al. Adeno-associated viral-vector-mediated hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor gene expression attenuates ischemic brain injury after focal cerebral ischemia in mice[J]. Stroke. 2006, 37(10): 2601-2606.
- [4] Su H, Arakawa-Hoyt J, Kan YW. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(14): 9480-9485.
- [5] Shen FX, Kuo R, Milon-Camus M, et al. Intravenous delivery of adeno-associated viral vector serotype 9 mediates effective gene expression in ischemic stroke lesion and brain angiogenic foci[J]. Stroke. 2013, 44(1): 252-254.
- [6] Hudry E, Andres-Mateos E, Lerner EP, et al. Efficient gene transfer to the central nervous system by single-stranded Anc80L65[J]. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018, 10: 197-209.
- [7] Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, et al. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates[J]. Mol Ther. 2011, 19(6): 1058-1069.
- [8] Wang D, Li SY, Gessler DJ, et al. A rationally engineered capsid variant of AAV9 for systemic CNS-directed and peripheral tissue-detargeted gene delivery in neonates[J]. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018, 9: 234-246.
- [9] Kirschen GW, Kéry R, Liu HX, et al. Genetic dissection of the neuro-glio-vascular machinery in the adult brain[J]. Mol Brain. 2018, 11(1): 2.
- [10] Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes[J]. Nat Biotechnol. 2009, 27(1): 59-65.
- [11] Dashkoff J, Lerner EP, Truong N, et al. Tailored transgene expression to specific cell types in the central nervous system after peripheral injection with AAV9[J]. Mol Ther Methods Clin Dev. 2016, 3: 16081.
- [12] Liu ZW, Li Y, Cui YS, et al. Beneficial effects of GFAP/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke[J]. Glia. 2014, 62(12): 2022-2033.
- [13] Grimm D, Büning H. Small but increasingly mighty: latest advances in AAV vector research, design, and evolution[J]. Hum Gene Ther. 2017, 28(11): 1075-1086.

[收稿日期] 2019-12-04

[本文编辑] 崔黎明

