



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：不同 AAV 突变衣壳在食蟹猴脑的转导效果分析
作者：秦一帆，陈晔菲，洪泽璇，路中华，张誉竞，严世荣
收稿日期：2025-12-26
网络首发日期：2026-06-01
引用格式：秦一帆，陈晔菲，洪泽璇，路中华，张誉竞，严世荣. 不同 AAV 突变衣壳在食蟹猴脑的转导效果分析[J/OL]. 中国比较医学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260530.1037.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

不同 AAV 突变衣壳在食蟹猴脑的转导效果分析

秦一帆¹, 陈晔菲², 洪泽璇², 路中华², 张誉亮^{2✉}, 严世荣^{1✉}

(1. 湖北医药学院生物医学工程学院, 湖北 十堰 442000; 2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055)

*通信作者 张誉亮 (1997—), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 腺相关病毒的改造和应用。E-mail: yj.zhang@siat.ac.cn; 严世荣 (1965—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤的基因诊断。E-mail: graceyan@163.com

摘要 目的 系统评价 AAV-PHP.B 与 AAV-PHP.eB 等突变衣壳在食蟹猴脑内的神经元转导效率, 并分析不同注射剂量及给药途径对全脑感染效果的影响。方法 将携带 hSyn-EYFP 表达框的 AAV9、AAV-PHP.B 及 AAV-PHP.eB 重组病毒, 通过脑室、枕大池及静脉途径以不同剂量注射至食蟹猴体内。病毒表达 6 周后灌流取材, 制备脑组织冰冻切片并进行免疫荧光染色, 定量分析前额叶皮层、壳核/尾状核、海马及丘脑等区域的 EYFP 与 NeuN 共标细胞比例, 以评估神经元特异性转导效率。结果 侧脑室注射途径下, 低剂量 (1×10^{13} vg/kg) AAV-PHP.B 在前额叶皮层及壳核/尾状核的神经元转导效率显著高于 AAV9 (8.4% vs. 1.2%, $P < 0.0001$, 6.3% vs. 0.5%, $P < 0.0001$); 将病毒剂量提升至 5×10^{13} vg/kg, AAV-PHP.B 在壳核/尾状核区域的转导效率进一步提升 ($P < 0.0001$)。脑室与枕大池联合注射可协同增强 AAV-PHP.B 的全脑转导范围, 尤其在前额叶皮层 (14.7%) 和丘脑 (2.6%) 区域。在联合注射条件下, AAV-PHP.eB 对海马和丘脑等深部核团的转导效率显著优于 AAV-PHP.B ($P < 0.01$)。静脉注射 AAV-PHP.eB 在所有检测脑区均未实现有效转导 ($< 1\%$)。结论 AAV-PHP.B 与 AAV-PHP.eB 在食蟹猴脑中表现出优于 AAV9 的转导能力, 且侧脑室与枕大池联合注射是实现全脑广泛神经元转导的有效策略。本研究为筛选适用于非人灵长类的 AAV 递送工具及优化脑内给药方案提供了关键实验依据。

关键词 腺相关病毒, 脑部转导, 病毒注射, 突变衣壳, 食蟹猴

Analysis of AAV capsid variant-mediated gene expression and tropism in the macaque brain

QIN Yifan¹, CHEN Yefei², HONG Zexuan², LU Zhonghua², ZHANG Yujing^{2✉}, YAN Shirong^{1✉}

(1. Department of Biomedical Engineering, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 2. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055)

Abstract Objective: To systematically evaluate the neuronal transduction efficiency of adeno-associated virus (AAV) capsid variants, including AAV-PHP.B and AAV-PHP.eB, in the brain of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), and to analyze the effects of different injection doses and routes on whole-brain infection. Methods: Recombinant AAVs carrying the hSyn-EYFP expression cassette packaged into AAV9, AAV-PHP.B, and AAV-PHP.eB capsids were administered to cynomolgus monkeys through different routes (intracerebroventricular [ICV], intracisternal magna [ICM], and intravenous [IV]) and at different doses. After 6 weeks of transgene expression, the animals were perfused, and brain tissues were collected for cryosectioning and immunofluorescence staining. The ratio of EYFP and NeuN co-labeled cells to the total NeuN-positive cells in regions including the prefrontal cortex, caudate/putamen nucleus, hippocampus, and thalamus was quantified to assess neuronal transduction efficiency. Results: Following ICV injection, low-dose AAV-PHP.B (1×10^{13} vg/kg) demonstrated significantly higher neuronal transduction efficiency than AAV9 in the prefrontal cortex (8.4% vs. 1.2%, $P < 0.0001$) and caudate/putamen nucleus (6.3% vs. 0.5%, $P < 0.0001$). Increasing the AAV-PHP.B dose to 5×10^{13} vg/kg further enhanced its efficiency in the caudate/putamen nucleus ($P < 0.0001$). Combined ICV and ICM injection synergistically enhanced the whole-brain transduction of AAV-PHP.B, particularly in the prefrontal cortex (14.7%) and thalamus (2.6%).

收稿日期: 2025-12-26

基金项目: 深圳市医学研究专项资金项目 (B2402029); 国家自然科学基金 (32400927)。

作者简介: 秦一帆 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 腺相关病毒的改造和应用。E-mail: 13610624602@163.com

网络首发时间: 2026-06-01 11:37:32 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260530.1037.002>

When delivered using the combined route, AAV-PHP.eB showed significantly superior transduction efficiency in deep brain structures such as the hippocampus and thalamus compared with AAV-PHP.B ($P < 0.01$). In contrast, intravenous injection of AAV-PHP.eB failed to achieve efficient transduction ($< 1\%$) in any brain region examined. Conclusions: The AAV-PHP.B and AAV-PHP.eB capsids exhibited superior transduction capabilities in the cynomolgus monkey brain compared with AAV9. Combined ICV and ICM injection represents a highly effective approach for achieving widespread neuronal transduction throughout the brain. This study provides crucial experimental evidence for selecting appropriate AAV delivery tools and optimizing administration protocols for non-human primate studies and future clinical translation.

Key words adeno-associated virus; brain transduction; injection routes; capsid variants; cynomolgus monkey

重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体因其低免疫原性、长期稳定表达及良好的安全性, 已成为中枢神经系统 (center nervous system, CNS) 基因治疗与神经科学研究的重要工具^[1]。在帕金森病^[2]、脊髓性肌萎缩症^[3]等神经系统疾病的临床前与临床研究中, rAAV 展现出广阔的应用前景。然而, rAAV 在临床转化中面临如何实现高效、广泛且特异性的脑内递送的重大挑战^[4]。天然血清型如 AAV9 虽能在啮齿类实验动物中实现一定程度的 CNS 转导, 但在非人灵长类 (如食蟹猴) 中的效率普遍较低, 存在显著的物种差异^[5,6]。这一瓶颈限制了基于啮齿类实验动物数据开发的治疗策略向临床方向的推进^[7]。

为突破此限制, 衣壳工程化技术已成为优化载体递送效率的关键策略^[8]。通过定向进化、点突变及结构域插入等手段, 研究者开发出多种具有增强血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 穿透及神经趋向性的突变衣壳, 如 AAV-PHP.B^[9]、AAV-PHP.eB^[10]、AAV-CPP16^[11]等。其中, AAV-PHP.B 是基于 Cre 重组酶介导的 AAV 靶向进化 (Cre recombination-based AAV targeted evolution, CREATE) 平台筛选获得的衣壳变体^[9]。该变体在 AAV9 衣壳表面暴露的 VR-VIII 环区 (位于 VP1 蛋白第 588~589 位氨基酸之间) 插入 1 段七肽序列 (TLAVPFK), 从而获得在小鼠模型中经静脉注射后高效穿越 BBB 的能力^[9]。在此基础上, CHAN 等^[10]进一步对 AAV-PHP.B 七肽插入位点上游的氨基酸残基进行系统性筛选, 并结合神经元与胶质细胞特异性 Cre 转基因小鼠施加定向进化压力。经两轮体内筛选, 获得性能优化的 AAV-PHP.eB 变体, 其七肽及上游序列由原始的 AQTLAVPFK 置换为 DGTAVPFK。相较于 AAV-PHP.B, AAV-PHP.eB 在中枢神经系统的转导效率显著提升。这些变体在小鼠模型中表现出卓越的全脑感染能力, 但其在非人灵长类脑内的表现是否同样优异, 尚未有系统研究予以阐明。此外, 除衣壳优化外, 给药途径与剂量同样是影响转导效果的关键因素。脑室注射、枕大池注射及静脉注射等不同途径, 各有其理论与应用优劣, 其在非人灵长类中的比较研究仍较为缺乏^[12,13]。

为此, 本研究以食蟹猴为模型, 系统比较了 AAV9、AAV-PHP.B 与 AAV-PHP.eB 在不同剂量、不同注射途径下的脑内转导效率, 旨在: (1) 评估突变衣壳在非人灵长类中的实际性能; (2) 探索适用于全脑感染的优化给药策略; (3) 为未来神经疾病基因治疗的临床转化提供工具选择与方法学支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

本研究所用 8 只普通级健康雄性食蟹猴 (年龄 10.3 ± 0.7 个月, 体重 1.3 ± 0.1 kg) 购于广东蓝岛公司 [SCXK (粤) 2024-0074], 并于环境可控的中国科学院深圳先进技术研究院设施内饲养 [SYXK (粤) 2023-0351]。设施温度维持在 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $50\% \pm 5\%$, 每天 7 点开始光照, 12 h/12 h 明/暗轮换。动物饲喂科澳协力 (天津) 饲料有限公司猴生长繁殖配合饲料 (产品批号: 23128111) 并辅以新鲜水果, 自由饮水。所有动物均接受常规健康监测, 包括每天两次的兽医巡查。实验经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审批, 符合国家实验动物福利伦理相关规定 (SIAT-IACUC-20221021-NS-NBJZX-LZH-A2104-01)。实验动物在饲养和实验过程中均按照 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 病毒

AAV 表达载体 pAAV-hSyn-EYFP (Addgene, 50465) 及 AAV9 衣壳载体 (Addgene, 112865) 由本实验室保存。根据文献报道, 对 AAV9 衣壳进行定点突变, 构建 AAV-PHP.B 与 AAV-PHP.eB 衣壳载体^[9,10]。所有 rAAV 病毒颗粒的包装与纯化工作委托派真生物科技有限公司完成。包装采用三质粒共转染 HEK293T 细胞系统, 经碘克沙醇密度梯度离心纯化后, 进行以下质控检测: 病毒基因组滴度采用微滴式数字 PCR (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 法测定, 所有病毒滴度均 $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL; 衣壳蛋白纯度通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 银染检测, 衣壳条带大小符合参考值; 空壳率采用透射电子显微镜计数完整颗粒与空颗粒的比例, 空壳率 <20%; 内毒素含量使用鲎试剂 (limulus ameocyte lysate, LAL) 显色法检测, 均 <1.0 EU/mL; 同时通过支原体定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测及 48 h 无菌培养确保无外源因子污染。所有病毒均分装保存于 -80°C 备用。

1.2 主要试剂与仪器

组织包埋液 (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, OCT, 货号: 4583) 购自日本 Sakura 公司; 兔源 anti-GFP 抗体 (Anti-GFP antibody, 货号: ab290)、鼠源 anti-NeuN 抗体 (Anti-NeuN antibody [1B7] - Neuronal Marker, 货号: ab104224)、Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG 抗体 (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488), 货号: ab150073) 以及 Alexa Fluor 594 标记驴抗鼠 IgG 抗体 (Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594), 货号: ab150108) 均购自英国 Abcam 公司; DAPI 染液 (DAPI Dihydrochloride, 货号: T19827) 购自美国 TargetMol Chemicals Inc. 公司。

大动物立体定位仪 (型号: 68816)、耳杆 (型号: 68304)、颅钻 (型号: 78001)、注射泵 (型号: KDS LEGATO 130) 均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 定位格栅 (中国发明专利号: ZL202021548817.X) 由中国科学院深圳先进研究院研发; 灌流泵 (型号: BT100FC) 购自保定融柏恒流泵制造有限公司; 冰冻切片机 (型号: CM1950) 购自德国徕卡显微系统有限公司; 全玻片扫描仪 (型号: BX61VS) 购自日本奥林巴斯株式会社; 核磁共振仪 (型号: uS1129) 购自上海联影医疗科技股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒注射动物

脑室注射: 参照已发表的磁共振引导下非人灵长类脑内病毒注射方案进行^[14]。简要步骤如下: 食蟹猴麻醉后, 安装磁共振兼容定位格栅, 进行脑部磁共振影像 (magnetic resonance imaging, MRI) 扫描。随后将动物固定于立体定位仪, 根据影像导航坐标, 使用微量注射泵将病毒溶液精准注射至脑室。

枕大池注射: 对食蟹猴颈部区域进行消毒, 使用 1 mL 注射器经枕骨大孔穿刺抽取等体积脑脊液后, 保留穿刺针头, 更换为含病毒溶液的注射器, 将病毒缓慢注入枕大池, 并进行 2~3 次回抽与再注入, 以确保病毒完全递送。

静脉注射: 对食蟹猴腿部小隐静脉区域进行消毒, 使用 2 mL 注射器抽取病毒溶液, 经静脉缓慢推注。

1.3.2 灌流与切片

病毒注射后 6 周, 将动物深度麻醉, 经左心室灌注 $1 \times$ PBS 及 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 溶液进行心脏灌流固定。完整取出猴脑, 于 4% PFA 中 4 °C 后固定过夜, 随后转入 30% 蔗糖溶液 (4 °C) 中脱水至组织沉底。组织块经组织包埋液 OCT 包埋后, 使用冰冻切片机进行冠状位连续切片, 切片厚度为 50 μ m。

1.3.3 免疫荧光染色

切片在含 5% 牛血清白蛋白及 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液中, 于室温封闭并透化 1 h。随后,

与一抗混合液（兔抗 GFP，1:500；鼠抗 NeuN，1:500）在 4 °C 下孵育 48 h。用 PBS 漂洗 3 次（每次 5 min）后，切片与二抗（Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG，1:500、Alexa Fluor 594 标记驴抗鼠 IgG，1:500）及 DAPI 核染料于室温避光孵育 2 h，随后转移至 37 °C 恒温箱中孵育 30 min 以增强信号。再次用 PBS 漂洗后，切片使用抗荧光淬灭封片剂封片，并通过全玻片扫描仪进行图像采集。

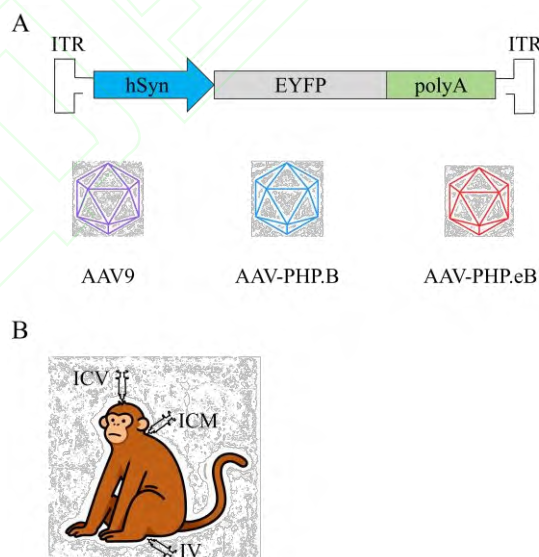
1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差（*Mean* ± *SD*）表示。基于非人灵长类动物成本限制及动物实验 3R 原则，本研究各处理组样本量为 1 只，每只动物针对每个目标脑区均采集多个非连续切片进行免疫荧光染色分析。具体而言，每个脑区取 3~5 张间隔不少于 200 μm 的非连续切片，每张切片依据各脑区面积截取不同数量的视野（前额叶皮层：10；壳核与尾状核：6；海马：3；丘脑：3）进行人工计数。以每张切片的 EYFP 与 NeuN 双阳性细胞占 NeuN 阳性细胞总数的比例作为基本统计单位，代表该区域的神经元转导效率。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）及 Tukey 事后多重比较。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验设计与转导效率定量分析

为系统评估不同 AAV 衣壳在非人灵长类脑中的转导特性与生物分布，本研究将神经元特异性启动子 hSyn 驱动的 EYFP 报告基因分别包装至 AAV9、AAV-PHP.B 及 AAV-PHP.eB 衣壳中（图 1A），并通过不同剂量与给药途径对食蟹猴进行干预（图 1B，表 1）。所有受试动物对病毒载量耐受良好，注射后未观察到明显的生理或行为学异常。病毒表达 6 周后，收取脑组织进行免疫荧光染色分析。本研究主要定量评估了前额叶皮层、壳核与尾状核、海马以及丘脑的转导情况。为保障计数的代表性，依据各脑区面积截取不同数量的视野（前额叶皮层：10；壳核与尾状核：6；海马：3；丘脑：3）进行人工计数。分别统计 EYFP 阳性细胞总数与 NeuN 阳性神经元总数，其中 EYFP 与 NeuN 双阳性细胞被判定为成功转导的神经元。通过计算双阳性细胞数与 NeuN 阳性细胞总数的比值，评估 AAV 在各脑区神经元群体中的转导效率。



注：A：AAV 基因组及衣壳示意图；B：食蟹猴注射方式示意图，ICV：脑室注射；ICM：枕骨大孔注射；IV：静脉注射。

图 1 实验示意图

Note. A, Schematic diagram of AAV genome and capsid. B, Schematic diagram of the injection routes for cynomolgus monkeys. ICV, Intraventricular injection. ICM, Intracisternal magna injection. IV, Intravenous injection.

Figure 1 Schematic diagram

表1 食蟹猴与病毒注射信息
Table 1 Information of monkey and AAV injection

猴子编号 Monkey ID	体质量/ kg Body weight /kg	年龄/months Ages /months	病毒名称 AAV name	剂量/(vg/kg) Doses/(vg/kg)	注射方式 Injection routes
1	1.4	10	AAV9-hSyn-EYFP	1×10 ¹³	ICV
2	1.1	10	AAV9-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	ICV
3	1.4	10	AAV-PHP.B-hSyn-EYFP	1×10 ¹³	ICV
4	1.1	10	AAV-PHP.B-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	ICV
5	1.4	12	AAV-PHP.B-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	ICM
6	1.2	10	AAV-PHP.B-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	ICV+ICM
7	1.2	10	AAV-PHP.cB-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	ICV+ICM
8	1.2	10	AAV-PHP.cB-hSyn-EYFP	5×10 ¹³	IV

注：ICV：脑室注射；ICM：枕骨大孔注射；IV：静脉注射。

Note. ICV, Intracerebroventricular. ICM, Intracisternal magna. IV, Intravenous.

2.2 不同剂量下 AAV9 与 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

脑室注射是一种通过穿刺技术将药物直接注入脑室系统的给药方式，可以突破 BBB，药物随着脑室系统流动至全脑，是常见的实现脑内广泛感染的注射方式。为评估衣壳类型与注射剂量对中枢神经系统转导的影响，本研究首先通过脑室注射途径，比较了 AAV9 与 AAV-PHP.B 在不同剂量下的表达差异。

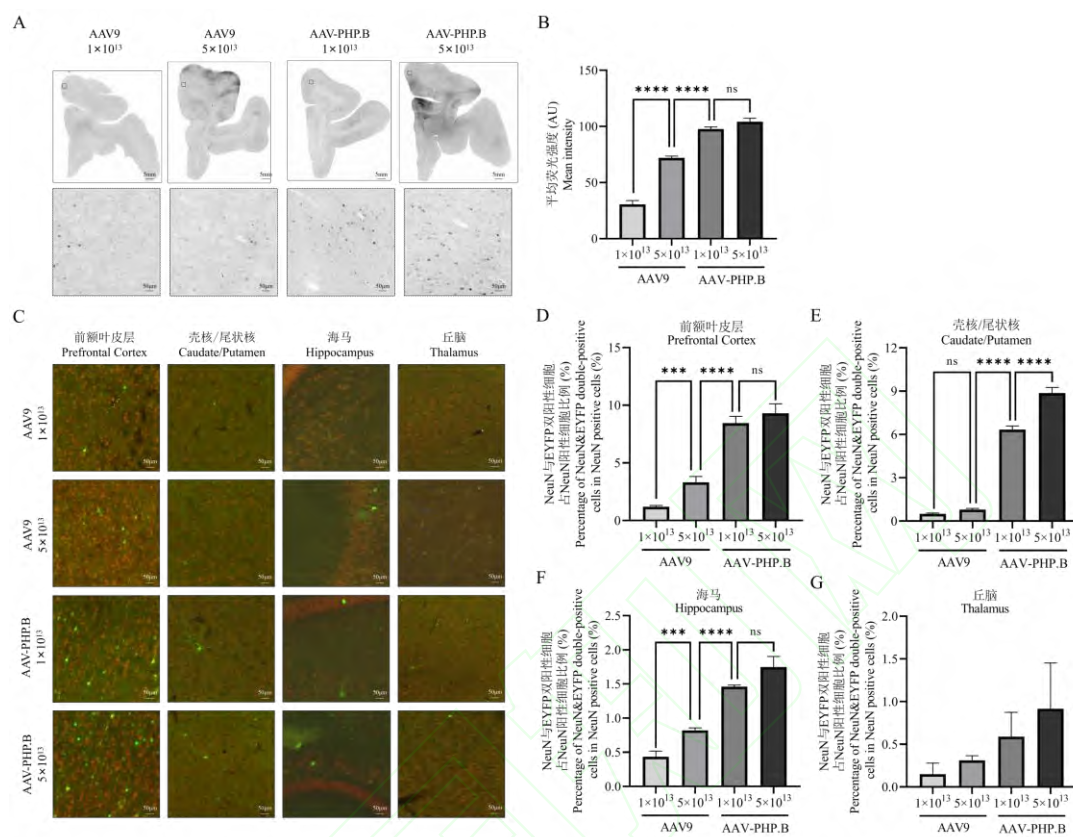
通过前额叶皮层的荧光信号分析发现，低剂量（1×10¹³ vg/kg）AAV9 仅能检测到零星的 EYFP 信号，高剂量（5×10¹³ vg/kg）注射可显著提升其平均荧光强度（*P*<0.0001，图 2A、2B）。在啮齿类模型中筛选出的 AAV-PHP.B 衣壳，在食蟹猴脑中同样表现出显著增强的转导能力。低剂量 AAV-PHP.B 的平均荧光强度已显著高于高剂量 AAV9（*P*<0.0001），表明其在较低病毒载量下仍能维持高效的转导特性。然而，当 AAV-PHP.B 病毒载量提升至高剂量时，其平均荧光强度未观察到显著提升（图 2A、2B）。

对神经元转导效率的定量统计结果与上述发现一致（图 2C）。具体而言，低剂量 AAV9 仅能在约 1.2%的前额叶皮层神经元与 0.5%的壳核/尾状核神经元中检测到 EYFP 表达。将病毒剂量提升至高剂量后，AAV9 在前额叶皮层的转导效率提升至约 2.8%（*P*<0.001），而在壳核/尾状核区域未见显著提升。相比之下，低剂量 AAV-PHP.B 能高效转导 8.4%的前额叶皮层神经元与 6.3%的壳核/尾状核神经元。高剂量 AAV-PHP.B 在前额叶皮层的转导效率未见显著提升，但在壳核/尾状核区域达到约 8.9%，较其低剂量组提升约 1.4 倍（*P*<0.0001，图 2D、2E）。

在海马区域，低剂量与高剂量 AAV9 的转导效率均极低（分别为 0.5%与 0.8%）。低剂量 AAV-PHP.B 可标记约 1.5%的海马神经元，但增加剂量并未显著提升其效率（图 2F）。在丘脑区域，两种衣壳在不同剂量下均仅能标记不足 1%的神经元，且组间无显著差异（*P*>0.05，图 2G）。

综上，两种载体均实现了不同程度的脑内转导，EYFP 阳性细胞主要富集于前额叶皮层和壳核/尾

状核。注射位点附近或与脑室系统直接相邻的脑区通常呈现更密集的标记信号，而海马、丘脑等深部、远离脑室的皮质下结构则仅见稀疏的 EYFP 阳性细胞散布。



注：A：前额叶皮层 EYFP 荧光信号代表图，虚线框为放大细节图；B：前额叶皮层 EYFP 平均荧光强度， $n=3$ 切片/组；C：前额叶皮层、壳核/尾状核、海马和丘脑荧光代表图，绿色：EYFP；红色：NeuN；D：前额叶皮层被标记神经元比例， $n=5$ 切片/组；E：壳核/尾状核被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组；F：海马被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组；G：丘脑被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组。不同组间相互比较，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ 。

图 2 不同剂量下 AAV9 与 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

Note. A, Representative images of EYFP fluorescence signals in the prefrontal cortex, the dashed box represents the enlarged detail image. B, Mean fluorescence intensity of EYFP in prefrontal cortex, $n=3$ slices per group. C, Representative fluorescent images of the prefrontal cortex, putamen/caudate nucleus, hippocampus and thalamus. Green, EYFP. Red, NeuN. D, Ratio of labeled neuron in prefrontal cortex, $n=5$ slices per group. E, Ratio of labeled neuron in caudate/putamen nucleus, $n=3$ slices per group. F, Ratio of labeled neuron in hippocampus, $n=3$ slices per group. G, Ratio of labeled neuron in thalamus, $n=3$ slices per group. Compared with each other group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 2 Comparison of brain transduction between AAV9 and AAV-PHP.B at different doses

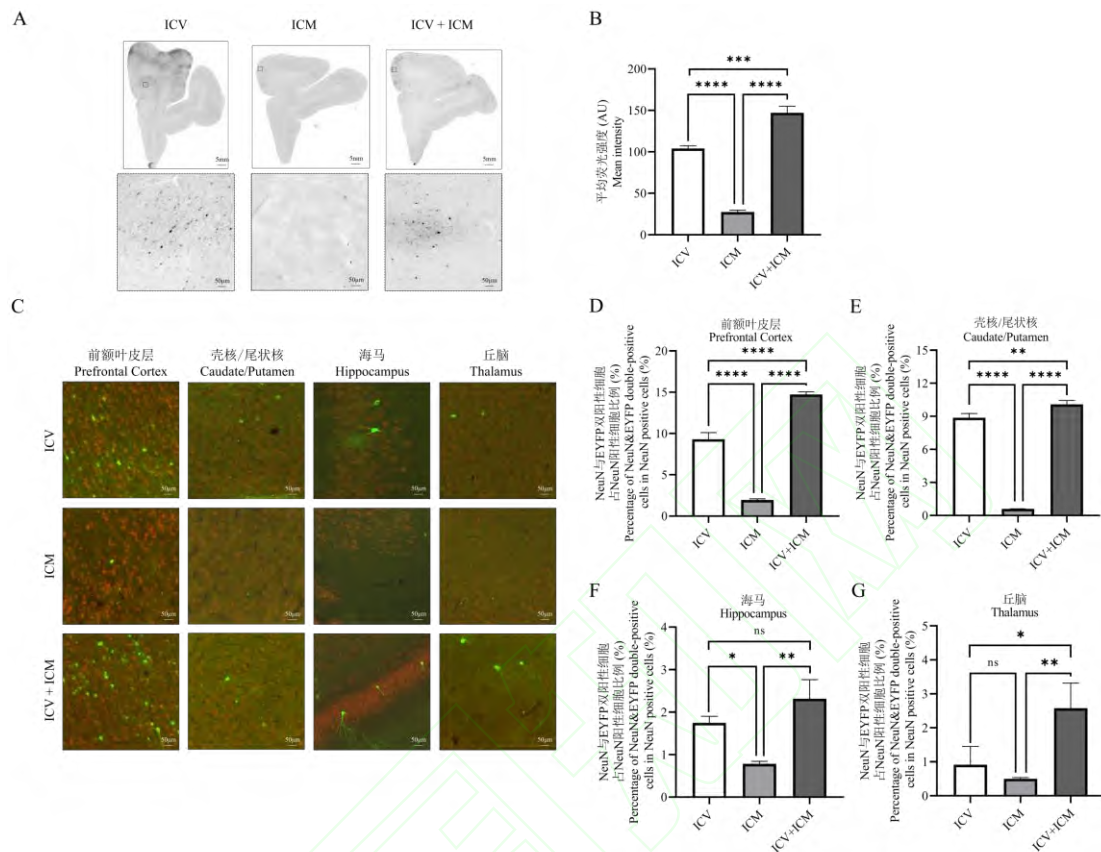
2.3 不同注射方式下 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

枕大池是位于颅后窝的重要解剖结构，连接颅腔与椎管，为中枢神经系统递送提供了另一潜在途径。为探索更优的全脑感染策略，本研究在高剂量（ 5×10^{13} vg/kg）下，进一步比较了单纯枕大池注射与脑室联合枕大池注射 AAV-PHP.B 的效果。

荧光成像显示，单纯枕大池注射在前额叶皮层的表达水平显著低于脑室注射（ $P<0.0001$ ），而联合注射则展现出更强的荧光信号（ $P<0.001$ ，图 3A、3B）。神经元转导的定量统计进一步证实了这一观察：单纯枕大池注射仅能感染约 1.9% 的前额叶皮层与 0.6% 的壳核/尾状核神经元，其效率显著低于脑室注射（ $P<0.0001$ ， $P<0.0001$ ）。相比之下，联合注射将前额叶皮层与壳核/尾状核的神经元转导效率分别提升至约 14.7% 与 10.1%，较单纯脑室注射有显著增强（ $P<0.0001$ ， $P<0.01$ ，图 3C、3E）。

在海马区域，单纯枕大池注射的转导效率（ $<1\%$ ）低于脑室注射（ $P<0.05$ ），且联合注射未能进一步提升标记水平（图 3F）。值得注意的是，在丘脑区域，联合注射实现了约 2.6% 的神经元转导，

显著优于单纯脑室或枕大池注射 ($P<0.05$, $P<0.01$, 图 3G)。以上结果表明, 脑室与枕大池联合注射策略能有效增加 AAV 在食蟹猴脑内的转导细胞数量, 是实现全脑广泛感染的优势范式。



注: A: 前额叶皮层 EYFP 荧光信号代表图, 虚线框为放大细节图; B: 前额叶皮层 EYFP 平均荧光强度, $n=3$ 切片/组; C: 前额叶皮层、壳核/尾状核、海马和丘脑荧光代表图, 绿色: EYFP; 红色: NeuN; D: 前额叶皮层被标记神经元比例, $n=5$ 切片/组; E: 壳核/尾状核被标记神经元比例, $n=3$ 切片/组; F: 海马被标记神经元比例, $n=3$ 切片/组; G: 丘脑被标记神经元比例, $n=3$ 切片/组。不同组间相互比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$ 。

图 3 不同注射方式下 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

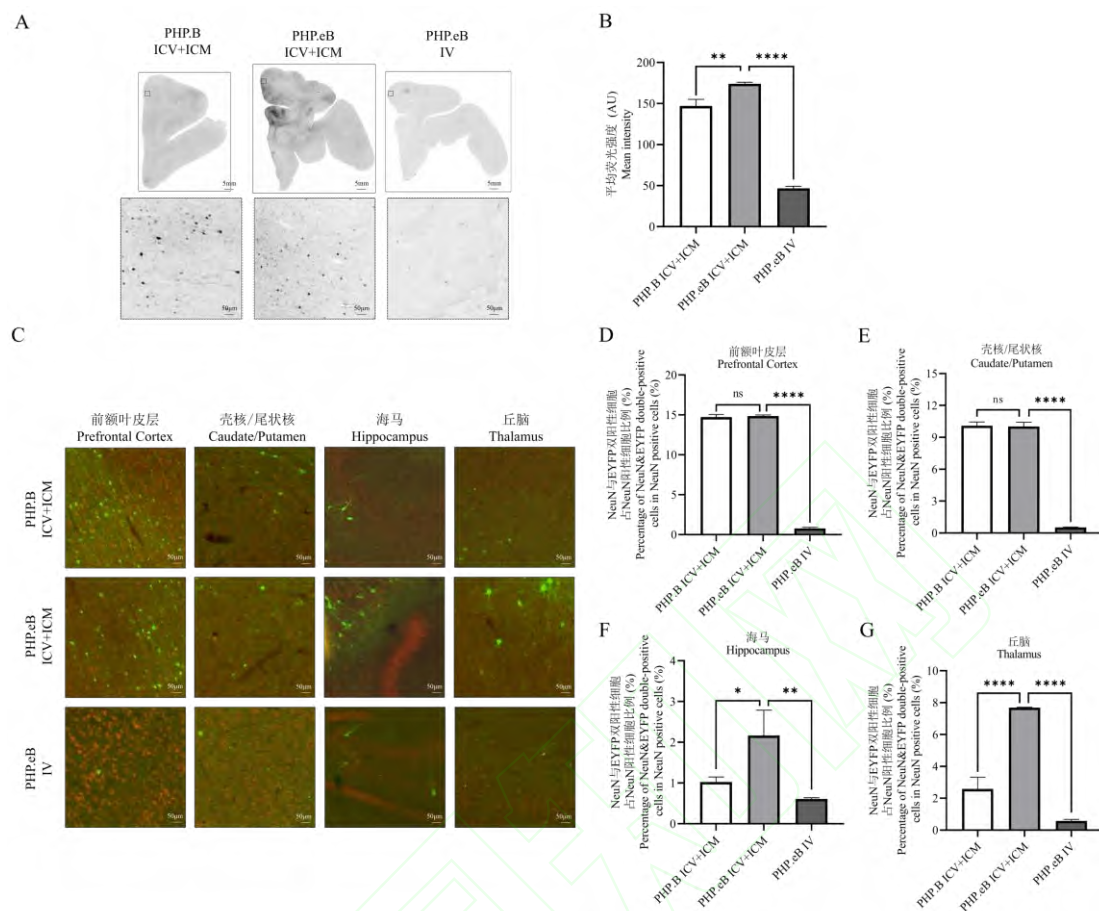
Note. A, Representative images of EYFP fluorescence signals in the prefrontal cortex, the dashed box represents the enlarged detail image. B, Mean fluorescence intensity of EYFP in prefrontal cortex, $n=3$ slices per group. C, Representative fluorescent images of the prefrontal cortex, caudate/putamen nucleus, hippocampus and thalamus, Green, EYFP. Red, NeuN. D, Ratio of labeled neuron in prefrontal cortex, $n=5$ slices per group. E, Ratio of labeled neuron in caudate/putamen nucleus, $n=3$ slices per group. F, Ratio of labeled neuron in hippocampus, $n=3$ slices per group. G, Ratio of labeled neuron in thalamus, $n=3$ slices per group. Compared with each other group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$.

Figure 3 Comparison of brain transduction of AAV-PHP.B under different injection routes

2.4 AAV-PHP.eB 与 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

鉴于 AAV-PHP.eB 在小鼠模型中报道的更强 BBB 穿透能力, 本研究在高剂量 (5×10^{13} vg/kg) 下, 比较了其 AAV-PHP.B 经脑室与枕大池联合注射后的表现。结果显示, AAV-PHP.eB 在前额叶皮层的荧光信号强度显著高于 AAV-PHP.B ($P<0.01$, 图 4A、4B)。然而, 神经元统计显示两者在前额叶皮层、壳核/尾状核的神经元转导效率相近, 无显著差异 ($P>0.05$, 图 4D、4E)。在深部脑区, AAV-PHP.eB 展现出显著优势: 其海马的转导效率约为 2.2%, 在丘脑达到约 7.7%, 均显著高于 AAV-PHP.B ($P<0.05$, $P<0.0001$, 图 4F、4G)。

最后, 本研究评估了 AAV-PHP.eB 经静脉注射 (5×10^{13} vg/kg) 的效果。结果显示, 受血脑屏障限制, 该途径的转导效率极低, 在前额叶皮层几乎无法检测到荧光信号, 在所有统计脑区 (前额叶皮层、壳核/尾状核、海马、丘脑) 的神经元标记率均低于 1% (图 4)。



注：A：前额叶皮层 EYFP 荧光信号代表图，虚线框为放大细节图；B：前额叶皮层 EYFP 平均荧光强度， $n=3$ 切片/组；C：前额叶皮层、壳核/尾状核、海马和丘脑荧光代表图，绿色：EYFP；红色：NeuN；D：前额叶皮层被标记神经元比例， $n=5$ 切片/组；E：壳核/尾状核被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组；F：海马被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组；G：丘脑被标记神经元比例， $n=3$ 切片/组。不同组间相互比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，**** $P<0.0001$ 。

图 4 AAV-PHP.eB 与 AAV-PHP.B 的脑部转导比较

Note. A, Representative images of EYFP fluorescence signals in the prefrontal cortex, the dashed box represents the enlarged detail image. B, Mean fluorescence intensity of EYFP in prefrontal cortex, $n=3$ slices per group. C, Representative fluorescent images of the prefrontal cortex, caudate/putamen nucleus, hippocampus and thalamus. Green, EYFP. Red, NeuN. D, Ratio of labeled neuron in prefrontal cortex, $n=5$ slices per group. E, Ratio of labeled neuron in caudate/putamen nucleus, $n=3$ slices per group. F, Ratio of labeled neuron in hippocampus, $n=3$ slices per group. G, Ratio of labeled neuron in thalamus, $n=3$ slices per group. Compared with each other group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 4 Comparison of brain transduction between AAV-PHP.eB and AAV-PHP.B

3 讨论

本研究首次在食蟹猴模型中系统比较了 AAV-PHP.B、AAV-PHP.eB 与 AAV9 在不同剂量与多种给药途径下的脑内转导特性，主要发现如下：首先，AAV-PHP.B 在食蟹猴脑中展现出显著优于 AAV9 的转导效率。即使在低剂量下，AAV-PHP.B 在前额叶皮层及壳核/尾状核的神经元标记率仍可达 AAV9 的 7 倍以上，这一结果直接将源于啮齿类模型的衣壳工程成果，在非人灵长类中进行了效能验证^[9]。本研究结果与 MATSUZAKI 等^[15]在绒猴中的观察一致，他们同样发现 AAV-PHP.B 经脑室注射后皮层转导效率优于 AAV9，进一步证实了该衣壳在多种新世界猴与旧世界猴中可能具备跨物种的转导优势。值得注意的是，AAV-PHP.B 的剂量-反应关系存在明显的脑区异质性：在壳核/尾状核，提高剂量能带来转导效率的进一步提升；而在前额叶皮层和海马，剂量提升的增益则不明显。这种脑区异质性在 LIGUORE 等^[16]对非人灵长类鞘内注射 AAVrh10 的研究中也有类似的报道，表明这是脑内基因递送的一个普遍特征。这强烈提示，不同脑区的微环境（如细胞表面受体丰度、细胞内在特性或

局部屏障)是影响病毒衣壳利用效率的关键限速因素。因此,未来针对特定脑区疾病的基因治疗,单纯增加系统剂量可能并非最优策略,而需结合对局部转导障碍机制的深入理解。AAV9 和 AAV-PHP.B 在深部脑区如丘脑不能实现有效的感染,提示在非人灵长类中通过脑室注射实现深部脑区的有效地送仍面临着巨大挑战。

为了更好地实现全脑递送,本研究创新性地对比了脑室注射、枕大池注射以及脑室、枕大池联合注射地转导效果,证实了“多入口、多路径”联合递送策略在灵长类动物中的优越性。单纯的枕大池注射在食蟹猴中的转导效率有限,这可能与病毒在脑脊液中扩散的动力学及与脑实质接触的表面积有关。然而,当脑室、枕大池联合注射时,转导范围与深度,尤其是在传统脑室注射难以触及的丘脑区域,得到了显著扩展。类似的,也有研究者在食蟹猴的研究中发现联合鞘内注射(涵盖腰池和枕大池)能实现更均匀的全脑基因表达^[12]。这些结果暗示联合注射可能通过提供更多的病毒扩散起始点,更有效地利用了脑脊液循环网络。

尤为重要的是,AAV-PHP.eB 在联合注射下对海马与丘脑的转导效率显著优于 AAV-PHP.B,表明其在灵长类动物深部脑区中可能具有独特的趋向性。这一发现与近期在恒河猴中的鞘内注射研究结果相呼应^[14]。在成年恒河猴中,AAV-PHP.eB 相较于 AAV-PHP.B 可能具有更高的中枢神经系统转导趋势,尽管其具体分布模式存在研究间差异,但共同指向 PHP.eB 在灵长类动物中可能具备更优的潜力。这种衣壳间的性能差异,可能与它们和灵长类动物脑内特定细胞表面受体结合的亲和力不同有关^[17]。未来的工作可着眼于深入解析 AAV-PHP.eB 在灵长类动物深部脑区的分子机制。后续可通过膜蛋白亲和纯化、CRISPR 筛选等技术,鉴定 AAV-PHP.eB 在灵长类动物脑内的功能性受体,为下一代衣壳工程提供靶点。

另一方面,AAV-PHP.eB 经静脉注射在所有脑区均未能实现有效转导,突显出灵长类动物血脑屏障对系统给药仍构成重大阻碍。这主要是因为非人类灵长类动物缺乏 LY6A,而 LY6A 是 AAV-PHP.B/eB 在啮齿类动物中实现高效跨 BBB 转导的关键受体^[18, 19]。这与近期多项在非人灵长类中进行的静脉注射研究结果一致^[18, 20],提示 BBB 的跨物种分子结构差异对 AAV 感染模式的影响,因此,基于灵长类动物筛选的新一代衣壳也是未来发展的重要趋势^[21, 22],通过 TRACER 平台在食蟹猴体内筛选获得的 VCAP-102 衣壳,在多种灵长类动物中展现出优于 AAV9 数十倍的转导效率,且与高度保守的 ALPL 受体结合,具有良好的跨物种可转化性^[23, 24]。后续可结合此类平台,筛选真正适用于人类临床的 CNS 靶向衣壳变体。除了 AAV 衣壳筛选,结合聚焦超声等开放 BBB 的技术,有望进一步提高 AAV-PHP.eB 静脉注射后脑内转导效率。通过聚焦超声联合微泡技术,可实现血脑屏障的瞬时、可逆性开放,可显著增强 AAV9 在脑内的递送效率^[25-27],为实现无创、靶向性脑内基因递送提供了新思路。

此外,本研究也存在一定局限:第一,样本性别单一,缺乏个体间变异评估。本研究仅使用雄性食蟹猴,未纳入雌性个体,因此无法探讨性别因素对 AAV 转导效率的潜在影响,亦难以评估个体间的生物学变异。后续需扩大样本量并纳入雌性动物,以验证结论的稳健性与普适性,并进一步阐明 AAV 中枢神经系统转导的性别差异。第二,细胞嗜性分析不全面,未覆盖胶质细胞群体。本研究主要聚焦于神经元(NeuN⁺)的转导效率评估,未系统检测星形胶质细胞、小胶质细胞及少突胶质细胞的转导情况。然而,胶质细胞在神经炎症、神经退行性疾病病理及基因治疗应答中均发挥重要作用^[28, 29]。FORTUNA 等^[30]近期在食蟹猴中的研究显示,AAV-PHP.eB 经侧脑室注射后亦可转导部分胶质细胞,但其比例存在显著的脑区异质性。因此,后续研究需系统解析 AAV 突变衣壳在灵长类动物脑中的全细胞类型嗜性谱,以更全面地评估其应用潜力。第三,观察时间点单一,缺乏长期安全性与有效性数据。本研究观察时间点为病毒注射后 6 周,属于中期表达阶段,尚未评估转导效率的长期稳定性、转基因表达的维持时间,亦未对潜在的迟发性免疫毒性进行监测。AAV 介导的基因治疗在灵长类动物中可能诱发先天性和适应性免疫反应,包括衣壳特异性 T 细胞应答及中和抗体的产生,这些因素可能影响治疗的持久性和安全性^[31]。此外,外周器官的病毒脱靶分布及潜在毒性亦未系统检测。后续研究需延长观察时间窗至 6 个月以上,结合血清学、组织病理学及行为学评估,全面考察病毒载体

的长期安全性与有效性。

综上,本研究证实了 AAV-PHP.B 与 AAV-PHP.eB 在食蟹猴脑中相较于 AAV9 的转导优势,并确立了脑室与枕大孔联合注射为实现全脑广泛感染的高效策略。这些发现为神经疾病基因治疗的临床前研究提供了重要的工具选择与给药方案参考。未来工作应聚焦于开发更具灵长类动物特异性的衣壳变体,并探索协同递送技术,以最终实现安全、高效、精准的脑内基因递送。

参考文献:

- [1] WANG D, TAI P W L, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358-378.
- [2] CHEN Y, HONG Z, WANG J, et al. Circuit-specific gene therapy reverses core symptoms in a primate Parkinson's disease model [J]. *Cell*, 2023, 186(24): 5394-5410.
- [3] MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18): 1713-1722.
- [4] HUDRY E, VANDENBERGHE L H. Therapeutic AAV gene transfer to the nervous system: a clinical reality [J]. *Neuron*, 2019, 101(5): 839-862.
- [5] GRAY S J, 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.
- [6] SAMARANCH L, SALEGIO E A, SAN SEBASTIAN W, et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman Primates [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(4): 382-389.
- [7] GRAY S J. Primates in translational neuroscience [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13: 163-164.
- [8] BÜNING H, HUBER A, ZHANG L, et al. Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 24: 94-104.
- [9] DEVERMAN B E, PRAVDO P L, SIMPSON B P, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 204-209.
- [10] CHAN K Y, JANG M J, YOO B B, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(8): 1172-1179.
- [11] YAO Y, WANG J, LIU Y, et al. Variants of the adeno-associated virus serotype 9 with enhanced penetration of the blood-brain barrier in rodents and primates [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(11): 1257-1271.
- [12] STANTON A C, LAGERBORG K A, TELLEZ L, et al. Systemic administration of novel engineered AAV capsids facilitates enhanced transgene expression in the macaque CNS [J]. *Med*, 2023, 4(1): 31-50.e8.
- [13] AROTARENA M L, DOVERO S, BIENDON N, et al. Pilot study assessing the impact of intrathecal administration of variants AAV-PHP.B and AAV-PHP.eB on brain transduction in adult *Rhesus* Macaques [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 762209.
- [14] YU P, ZHANG Z, WANG Y, et al. Protocol for MRI-guided virus injection in macaque deep brain regions [J]. *STAR Protoc*, 2023, 4(4): 102768.
- [15] MATSUZAKI Y, TANAKA M, HAKODA S, et al. Neurotropic properties of AAV-PHP.B are shared among diverse inbred strains of mice [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 700-704.
- [16] LIGUORE W A, DOMIRE J S, BUTTON D, et al. AAVrh10 administration in the spinal cord of nonhuman primates reveals long-term gene expression in the absence of toxicity [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(7): 841-853.
- [17] HORDEAUX J, WANG Q, KATZ N, et al. The neurotropic properties of AAV-PHP.B are limited to C57BL/6J mice [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(3): 664-668.
- [18] MATSUZAKI Y, KONNO A, MOCHIZUKI R, et al. Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 665: 182-188.
- [19] BATISTA A R, KING O D, REARDON C P, et al. *Ly6a* Differential expression in blood-brain barrier is responsible for strain specific central nervous system transduction profile of AAV-PHP.B [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31(1/2): 90-102.
- [20] YANG B, TRELEAVEN C M, RYAN J, et al. AAV-PHP.eB transduces both the central and peripheral nervous systems in marmosets [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 28: 266-278.
- [21] TECEDOR L, CHEN Y H, LEIB D E, et al. An AAV variant selected through NHP screens robustly transduces the brain and drives secreted protein expression in NHPs and mice [J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(798): eadr2531.
- [22] STAMATAKI M, LÜSCHOW J, SCHLUMBOHM C, et al. Identification of AAV variants with improved transduction of human vascular endothelial cells by screening AAV capsid libraries in non-human Primates [J]. *Gene Ther*, 2025, 32(5): 529-541.
- [23] MOYER T C, HOFFMAN B A, CHEN W, et al. Highly conserved brain vascular receptor ALPL mediates transport of engineered AAV vectors across the blood-brain barrier [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(8): 3902-3916.
- [24] MATSUZAKI Y, KONNO A, UCHIDA Y, et al. VCAP-102 achieves exceptional BBB penetration in marmosets after ten years of AAV capsid evaluation [PP/OL]. *BioRxiv*(2025-12-06)[2025-12-26]. <https://doi.org/10.64898/2025.12.06.692617>
- [25] TIMBIE K F, MEAD B P, PRICE R J. Drug and gene delivery across the blood-brain barrier with focused ultrasound [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 61-75.
- [26] GUMUSGOZ E, KASIRI S, YOUSSEF I, et al. Focused ultrasound widely broadens AAV-delivered Cas9 distribution and activity [J]. *Gene Ther*, 2025, 32(3): 237-245.
- [27] TODD N, OWUSU-YAW B, FLETCHER S P, et al. Comparison of gadolinium and AAV9-GFP distributions in the brain following focused ultrasound-mediated delivery across the BBB [J]. *Phys Med Biol*, 2026, 71(1): 015014.
- [28] PATANI R, HARDINGHAM G E, LIDDELOW S A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19(7): 395-409.
- [29] ASIMAKIDOU E, PLUCHINO S, SILVA B A, et al. The metabolic engine of cognition: microglia-neuron interactions in health, ageing and disease [J]. *Nat Metab*, 2025, 7(12): 2395-2413.
- [30] FORTUNA M G, NYBERG L H, TASKIN N, et al. AAV-PHP.eB achieves superior neuronal transduction over AAV9 in pigtail macaques following intracerebroventricular administration [J]. *Mol Ther Meth Clin Dev*, 2025, 33(4): 101636.
- [31] KEELER A M, ZHAN W, RAM S, et al. The curious case of AAV immunology [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(5): 1946-1965.