

## 视神经损伤的基因治疗研究进展

尹小磊 综述 袁容娣 叶 剑 审校

### Gene therapy for optic nerve injury

Yin Xiaolei, Yuan Rongdi, Ye Jian. Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

**Abstract** Injury can induce the microenvironment alteration around the optic nerve. How to control these changes by gene therapy so that the microenvironment change is helpful for us to protect the injured optic nerve are focused by many studies recently. Optic nerve and its neurons-retinal ganglion cells(RGCs) and related visual pathway as a classical model of the central nervous system, the findings of them are also very useful on the central nervous system diseases. In this paper, we provide a brief overview related to characters of dead RGCs after optic nerve injury, the change of microenvironment, gene therapy tools and treatment of injury in common areas such as genetic intervention.

**Key words** optic nerve; injury; gene therapy

**摘要** 视神经损伤后,所处的微环境发生了较大改变,如何通过基因治疗的手段调整这些变化,使其更好地发挥对损伤视神经的保护作用是近期研究的热点。视神经及视网膜神经节细胞(RGCs)与相关的视觉通路作为一种成熟的中枢神经系统研究模型,其研究结果对中枢神经系统疾病的治疗有积极的意义。拟从视神经损伤后 RGCs 死亡的特点、所处微环境的改变、基因治疗工具及治疗损伤常见的基因干预等方面进行综述。

**关键词** 视神经; 损伤; 基因治疗

**分类号** R 774.6 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0341-04

视神经损伤后再生修复困难,因缺乏有效的治疗手段而导致失明<sup>[1]</sup>。作为中枢神经的一部分,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,可用来研究神经损伤后的神经保护作用以及轴突再生的分子、细胞机制,从而为基因治疗奠定基础,备受生物学及相关领域的广泛关注。基因治疗是当今生物学发展中的一项重大突破,它是伴随着 DNA 重组技术的成熟而发展起来的一种新型分子水平的临床医学治疗手段,通过改变关键性的遗传物质(DNA 或 RNA)在患者细胞中的表达而达到治疗疾病的目的。拟对目前较常见的视神经损伤基因治疗研究进行综述。

### 1 视神经损伤后 RGCs 死亡特点

研究表明,视神经损伤后 RGCs 有如下死亡特点:(1)损伤程度不同,RGCs 死亡的快慢不同,视神经横断比挤压伤会使 RGCs 死亡的更快<sup>[2]</sup>;(2)损伤部位不同,RGCs 死亡的快慢不同,损伤位点越靠近视盘,RGCs 死亡的越快<sup>[3]</sup>;(3)RGCs 丢失的速度和年龄也相关,新生鼠 RGCs 的死亡速度在损伤后要比成年鼠快很多,最早在损伤后 6 h 就能观察到 RGCs 的死亡,24 h 达到高峰,48 h 左右细胞基本完全消失<sup>[4]</sup>;而成年鼠 RGCs 在视神经损伤后第 4~5 d 开始凋亡,第 7~8 d 凋亡达到高峰,到 2 周时,丢失的细胞为 85%~90%<sup>[5]</sup>;(4)与视网膜其他种类的细胞群之间存在相互依存关系,RGCs 的丢失可造成视网膜内其他细胞的死亡增加,而这些细胞的死亡反过来又加速了 RGCs 的死亡<sup>[6]</sup>;(5)大 RGCs 比小 RGCs 的死亡速度慢,尽管神经生理研究并无此分类,但有学者发现大鼠的大 RGCs 和猫的大 RGCs,即  $\alpha$ RGCs 一样,与自身的小 RGCs,即相当于猫的  $\beta$ RGCs 相比,损伤后的存活时间

本课题为国家自然科学基金(30572009)、重庆市自然科学基金(CSTC 2007BB5087)资助

作者单位:400042 重庆,中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科

通讯作者:叶剑(Email:yinxiaolei971221@163.com)

较长<sup>[7]</sup>。因此动物模型的构建在研究中也是一个非常关键的因素,在进行各种治疗干预措施效果的对比研究中,需将以上特点考虑在内。

## 2 视神经损伤后微环境的改变

视神经损伤后其所处的微环境会有很多改变,包括酪氨酸激酶受体 EphA5 表达下降<sup>[8]</sup>;与细胞凋亡信号有关的基因 caspase-3、bax 的上调,抗凋亡基因 bcl-2、bcl-x 的减少;转录调节因子 c-jun 上调;但缺乏转录激活因子-2 (activating transcription factor-2) 和 cAMP/Ca<sup>2+</sup> 反应元件结合蛋白;NMDA 受体表达和亚基结构的改变;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 N-CAM 的上调,及其他黏附分子如 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 3 mm 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,同时还参与神经死亡的导向蛋白 semaphorin 3A 的短暂上调<sup>[7]</sup>。以及特别是针对 RGCs 的 7 种基因, TGF- $\beta$  receptor II, integrin $\beta$ -6, c-fos, peroxiredoxin 6, thymosin $\beta$ -like protein, secretogranin-2 和 superoxide dismutase 2 表达上调<sup>[9]</sup>。

在损伤的视神经中,这些改变发挥的是保护作用还是破坏作用,以及这些分子的表达随时间的变化如何达到平衡尚不清楚,最终的结局仍是大多数 RGCs 的死亡,但这些研究为基因治疗奠定了基础。

## 3 视神经损伤基因治疗工具

### 3.1 质粒工具

在宿主体内使用编码再生所需因子的质粒 DNA 是目前比较常见的一种基因治疗的方法。质粒可在横断的视神经末端,甚至是完好的轴突末端通过逆向转运进入 RGCs<sup>[10]</sup>,也可采用电穿孔法,即通过给细胞加上高压电场,让细胞膜短暂开放,使质粒直接进入 RGCs,而获得 BDNF<sup>[11]</sup>、GDNF<sup>[12]</sup> 等的表达。这些研究发现,有的在损伤后 3 个月,仍可观察到这些质粒能发挥延长 RGCs 存活的作用。但是,现有的研究资料也表明这些通过质粒工具的方法还存在转染效率低、表达短暂等局限性,虽然通过反复注射可得到转基因的持续表达或者达到治疗所需的蛋白水平,但同时应注意高浓度的质粒 DNA 对细胞有毒性作用<sup>[11]</sup>。

### 3.2 病毒工具

**3.2.1 慢病毒载体 (lentiviral vector, LV)** van Adel 等<sup>[13]</sup> 研究发现,使用编码 CNTF 基因的 LV 转染 RGCs,可延长 RGCs 的存活时间,在新生动物 LV 载体可有效转染 RGCs,转染后基因能稳定表达数周,但在成年动物的眼内转染效率较差。同时还存在转染特异性的问题,将可表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 LV 注射到眼内,可发现被转染的细胞多位于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层,以及巩膜、结膜和脉络膜中<sup>[14]</sup>,注入前房的 LV 则转染到角膜内皮细胞中<sup>[15]</sup>。因此,目前已较少采用此载体将基因转染到啮齿类动物的视网膜中。

**3.2.2 腺病毒载体 (adenoviral vector, AdV)** AdV 是无被膜、线性、双链的 DNA 病毒,能适应 8 000 bp 的 DNA。大多数类型的细胞对腺病毒都很敏感,该载体可将转基因传递到分裂和不分裂的细胞内。使用该病毒转染 RGCs,细胞内转基因表达和分泌的相关蛋白,短期内都能增强 RGCs 的存活。AdV 编码的抗细胞凋亡蛋白 Bcl-XL 在横断视神经的表达,减少了轴突横断后 10 ~ 14 d 内 RGCs 的死亡,但使用 AdV 过度表达 Bcl-XL,不会诱导横断的视神经再生出新轴突<sup>[16]</sup>。值得注意的是,AdV-CNTF 的使用,虽然使视网膜神经胶质细胞发生了变化,但也有助于 RGCs 的存活<sup>[17]</sup>。然而这些改善作用都是短期的,而且这些病毒载体可能还和有害的免疫反应和毒性作用间存在关联<sup>[18]</sup>。

**3.2.3 腺相关病毒载体 (adeno-associated viral vector, AAV)** AAV 是无被膜单链病毒,来源于细小病毒组,有自然复制缺陷,一般被认为无毒无致病作用,视网膜注射 AAV 载体可有效转染各种不同类型的细胞,并有持续数月高水平的转基因的表达,因此是当前使用最广泛的载体工具。目前已知有超过 100 种的 AAV 分型,其中有 11 种已被设计成重组病毒载体<sup>[19]</sup>,使用最多的主要是亲和神经元的分型<sup>[20]</sup>。AAV-2 和 AAV-5 是眼部最常使用的载体,但以 AAV-2 居多<sup>[21]</sup>。AAV-2 可转染光感受器、RPE 细胞和 RGCs; AAV-1 ~ AAV-4 只能转染 RPE 细胞; AAV-5 和 AAV-2/5 可转染光感受器和 RPE 细胞,但不能转染 RGCs; 而 AAV-2/8 比 AAV-2/5 能更有效地转染光感受器和 RPE 细胞<sup>[22]</sup>。

Leaver 等<sup>[23]</sup> 发现使用 AAV-2 载体使细胞内获得 CNTF、BDNF 的表达可增强大鼠 RGCs 的存活和轴突的再生。在注射 AAV 的眼内,因为病毒转染的细胞释放营养因子对周围未转染的细胞有旁分泌支持作用,未转染的 RGCs 存活能力也有增强<sup>[24]</sup>。借助 AAV 载体,传递抗氧化基因,还可长效阻止视神经炎动物模型

神经元和轴突的丢失<sup>[25]</sup>。

尽管可插入 AAV 的大多数基因对治疗眼部疾病都有帮助,但只能插入约 4 500 bp 的 DNA,这是 AAV 载体使用的一个缺陷。而 AAV 对 RGCs 的转染会因转染基因的不同而不同,若转染基因编码的是非分泌性的抗细胞凋亡蛋白或是可阻断或活化细胞信号途径的蛋白,那么转染的 RGCs 就会相对多一些。不同年龄的动物转染的细胞类型不同,在成年鼠主要转染 RGCs,而在新生鼠转染的细胞则主要是光感受器细胞和无长突细胞,此外对 RGCs 的转染率也存在差异(20%~90%)<sup>[7]</sup>。

#### 4 视神经损伤治疗常见基因干预

##### 4.1 营养保护相关基因

CNTF 是目前使用较多的保护损伤后视神经的营养因子,无论是体内还是体外的使用,都能有效支持 RGCs 的存活<sup>[26]</sup>。BDNF、NT-4/5 等也能在视神经损伤后增强 RGCs 的存活能力<sup>[7]</sup>。但仅通过眼内注射所发挥的保护作用是非常短暂的,即使是反复注射延长治疗时间,也不能最终阻止大部分 RGCs 的死亡,这是因为有些外源性神经营养因子,如 BDNF 和 NT-4/5,使其体内受体 *trk* 家族的 mRNA 及蛋白水平下降,从而减弱 RGCs 对这些营养因子的反应。但通过转基因,使这些因子在体内按照生理所需水平持续释放,可较好地发挥作用,我们的研究也证实了这一点<sup>[27]</sup>。还有通过其他方法调整体内营养因子相关基因的表达,如 Müller 等<sup>[28]</sup>发现眼内注射酵母多糖或刺破晶状体,可增强 CNTF 基因的表达,使 CNTF 增加,从而促进损伤后 RGCs 的存活和再生。而这些因子受体相关基因的干预,在支持 RGCs 损伤后的存活和再生中也同样受到关注<sup>[29]</sup>。

##### 4.2 生长抑制相关基因

目前认为,3 种主要的生长抑制因子 myelin-associated glycoprotein(MAG)、Nogo 和 oligodendrocyte-myelin glycoprotein(OMgp),通过其共同的受体 Nogo receptor(NgR),激活下游 Rho/ROCK 信号途径,造成生长锥的塌陷,从而抑制轴突的再生<sup>[30]</sup>。我们还发现 NgR 在整个发育过程中的视网膜上均有表达<sup>[31]</sup>,因此表达这些蛋白的基因也是干预治疗的对象<sup>[32]</sup>。Venkatesh 等<sup>[33]</sup>的研究证实,NgR 基因敲除的突变小鼠,其 RGCs 的存活和轴突再生能力明显增强。我们也借助 RNA 干扰的方法,在体内对 NgR 基因沉默的效果进行了研究<sup>[34]</sup>。Rho 特异对抗物 C<sub>3</sub>基因的体内细胞转染,同样也可在视神经损伤后促进 RGCs 的

存活<sup>[35]</sup>。

#### 5 结束语

视神经损伤后,其所处的微环境也发生了变化,这些变化有些可发挥保护损伤视神经的作用,而有些会进一步加重损伤。根据这些改变,研究者们进行了基因干预研究,以增强保护性作用或减弱破坏性作用。基因干预领域快速的进展<sup>[36-37]</sup>,将能使造成视网膜发生变性的各种疾病的患者受益于基因治疗的研究。但这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的扩散;通过病毒载体来转染可编码支持存活、促进再生因子的基因,有转染特异性的问题,不同年龄动物转染的细胞类型不同,此外,对 RGCs 的转染率也存在着差异(20%~90%),并且病毒载体本身可能会造成有害的免疫反应和毒性作用,及无法避免的玻璃体腔注射带来的损伤。因此基因治疗的临床应用,尚需进一步深入的研究。

#### 参考文献

- Ofri R, Narfström K. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration[J]. *Vet J*, 2007, 174(1): 10-22
- Selles-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, et al. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve[J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(2): 282-289
- He MH, Cheung ZH, Yu EH, et al. Cytochrome c release and caspase-3 activation in retinal ganglion cells following different distance of axotomy of the optic nerve in adult hamsters[J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(11): 2153-2161
- Spalding KL, Dharmarajan AM, Harvey AR. Caspase-independent retinal ganglion cell death after target ablation in the neonatal rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(1): 33-45
- Koerberle PD, Bahr M. Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone[J]? *J Neurobiol*, 2004, 59(1): 162-180
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, et al. Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells[J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1860-1864
- Harvey AR, Hu Y, Leaver SG, et al. Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(5): 449-489
- Symonds AC, King CE, Bartlett CA, et al. EphA5 and ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration: a two-edged sword[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(3): 744-752
- Liedtke T, Naskar R, Eisenacher M, et al. Transformation of adult retina from the regenerative to the axonogenesis state activates specific genes in various subsets of neurons and glial cells[J]. *Glia*, 2007, 55(2): 189-201
- Thaler S, Rejdak R, Dietrich K, et al. A selective method for transfection of retinal ganglion cells by retrograde transfer of antisense oligonucleotides against kynurenine aminotransferase II[J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 100-107
- Mo X, Yokoyama A, Oshitari T, et al. Rescue of axotomized retinal ganglion cells by BDNF gene electroporation in adult rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(7): 2401-2405
- Ishikawa H, Takano M, Matsumoto N, et al. Effect of GDNF gene transfer

- into axotomized retinal ganglion cells using in vivo electroporation with a contact lens-type electrode [J]. *Gene Ther*, 2005, 12 (4): 289 - 298
- 13 van Adel BA, Kostic C, Deglon N, et al. Delivery of ciliary neurotrophic factor via lentiviral-mediated transfer protects axotomized retinal ganglion cells for an extended period of time [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14 (2): 103 - 115
  - 14 Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, et al. Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats; a comparison with lentiviral vectors [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 21 (1): 141 - 157
  - 15 Bainbridge J, Stephens C, Parsley K, et al. In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium [J]. *Gene Ther*, 2001, 8 (21): 1665 - 1668
  - 16 Kretz A, Kügler S, Happold C, et al. Excess Bcl-XL increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons in vitro [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 26 (1): 63 - 74
  - 17 van Adel BA, Arnold JM, Phipps J, et al. Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo [J]. *J Neurobiol*, 2005, 63 (3): 215 - 234
  - 18 Isenmann S, Schmeer C, Kretz A. How to keep injured CNS neurons viable strategies for neuroprotection and gene transfer to retinal ganglion cells [J]. *Cell Neurosci*, 2004, 26 (1): 1 - 16
  - 19 Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors [J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5 (3): 285 - 297
  - 20 Broekman MLD, Comer LA, Hyman BT, et al. Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or-2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain [J]. *Neuroscience*, 2006, 138 (2): 501 - 510
  - 21 Dinculescu A, Glushakova L, Min SH, et al. Adeno-associated virus-vectored gene therapy for retinal disease [J]. *Gene Ther*, 2005, 16 (6): 649 - 663
  - 22 Natkunarajah M, Trittbach P, McIntosh J, et al. Assessment of ocular transduction using single-stranded and self complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8 [J]. *Gene Ther*, 2008, 15 (6): 463 - 467
  - 23 Leaver SG, Cui Q, Plant GW, et al. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells [J]. *Gene Ther*, 2006, 13 (18): 1328 - 1341
  - 24 Baumgartner BJ, Shine HD. Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population [J]. *J Neurosci*, 1997, 17 (17): 6504 - 6511
  - 25 Qi X, Sun L, Lewin AS, et al. Long-term suppression of neurodegeneration in chronic experimental optic neuritis: Antioxidant gene therapy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (12): 5360 - 5370
  - 26 Lingor P, Tönges L, Pieper N, et al. ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells [J]. *Brain*, 2008, 131 (1): 250 - 263
  - 27 张巍, 叶剑, 陈春林, 等. 腺病毒介导 CNTF 基因眼内转移对视神经损伤大鼠 F-VEP 的影响 [J]. *眼科新进展*, 2006, 26 (10): 721 - 724
  - 28 Müller A, Hauk TG, Fischer D. Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation [J]. *Brain*, 2007, 130 (12): 3308 - 3320
  - 29 Miotke JA, MacLennan AJ, Meyer RL. Immunohistochemical localization of CNTFRalpha in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve crush; evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury [J]. *J Comp Neurol*, 2007, 500 (2): 384 - 400
  - 30 尹小磊, 叶剑. 中枢神经损伤再生修复去抑制作用的研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2007, 7 (1): 154 - 156
  - 31 Yin X, Chen C, Yuan R, et al. An immunofluorescence-histochemistry study of the Nogo receptor in the rat retina during postnatal development [J]. *Ann Ophthalmol*, 2007, 39 (2): 140 - 144
  - 32 Funahashi S, Hasegawa T, Nagano A, et al. Differential expression patterns of messenger RNAs encoding nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system [J]. *J Comp Neurol*, 2008, 506 (1): 141 - 160
  - 33 Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu SS, et al. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition [J]. *J Cell Biol*, 2007, 177 (3): 393 - 399
  - 34 陈春林, 陈小璠, 尹小磊, 等. siNgR 重组质粒载体构建及效应检测 [J]. *中华眼科杂志*, 2008, 44 (3): 244 - 247
  - 35 Fischer D, Petkova V, Thanos S, et al. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo; gene expression and synergy with RhoA inactivation [J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (40): 8726 - 8740
  - 36 陈春林, 陈小璠, 尹小磊, 等. 阳离子聚合物介导的质粒 EGFP 基因逆行转染视网膜神经节细胞 [J]. *眼科研究*, 2007, 25 (3): 161 - 163
  - 37 陈春林, 叶剑, 尹小磊. 玻璃体内注射酵母多糖对钳夹伤大鼠视网膜神经节细胞保护作用的初步观察 [J]. *眼科研究*, 2008, 26 (6): 405 - 408

(收稿: 2008-11-28 修回: 2009-02-24)

(本文编辑: 王莉红)

读者·作者·编者

## 本刊对作者单位的要求

本刊要求以完成论文研究和写作的单位为作者单位。作者单位放于文章首页左下角, 写法举例: “作者单位: 450003 郑州, 河南省眼科研究所(李×、王×); 广州, 暨南大学医学院眼科(刘×)”。院所名体现城市名者不必重复, 例如“100005 北京市眼科研究所”。文稿中只 1 名作者或几名作者同属一个单位者, 只注邮政编码、城市、单位, 不必注姓名。作者中第一作者的工作单位变更时, 则用中括号加小括号注出, 例如: “[陈×(研究生, 现在××医院眼科)]”。作者单位的英文译名放在英文文题之下、作者姓名汉语拼音之后。论文如属国家自然科学基金资助项目或省部级以上重点攻关课题, 请在首页左下角脚注中注明“本课题为××基金资助(基金号: ×××××)”, 列在作者单位之前一行。通讯作者的 Email 地址列在作者单位的后一行。

(本刊编辑部)