

基因治疗在神经眼科中的应用

侯立杰 童绎

【摘要】 目的 应用基因技术治疗眼病的可行性备受国内外学者关注,并且通过利用动物模型进行了一系列实验取得很大进展,在治疗神经眼科疾病方面有临床应用前景。本文就应用该技术治疗视神经疾病的可行性及其研究现状进行综述。

【关键词】 基因; 治疗; 视神经

有关对神经眼科方面疾病的治疗始终是眼科领域关注的焦点与难点,特别是视神经病变系由于局部或全身因素所致视力损害的疾病,例如 LHON、多发性硬化。迄今对该类疾病的病因认识不清,对其病因研究不透,在中国以及日本国不明原因者约占近半数^[1]。因此目前有关视神经性疾病的治疗策略主要以改善微循环、积极抗炎等对症治疗为主,诸如糖皮质激素、免疫抑制剂以及中医药等。更何况在眼科神经性疾病发病过程中所发生的炎症是具有多重作用的,单纯抗炎以及使用非特异性免疫抑制剂常会导致各种严重毒副作用的发生,如近年来临床上已使用的糖皮质类固醇激素常常导致病人产生继发感染和消化道溃疡。为此临床上亟需一种更安全、特异、长期有效的治疗措施。随着近 20 年来基因治疗研究的不断深入,用基因技术治疗人类疾病的可行性近来备受关注。尤其是通过对几种神经学疾病的探讨,认为基因治疗作为一种新型的治疗策略,有可能为神经眼科性疾病的治疗带来新的前景。目前国内外上已有多个研究小组在各种眼科疾病,诸如 HLON、青光眼性视神经病变以及视神经炎等的动物模型中进行各种基因治疗方法的尝试,同时亦有少量用于临床试验的报道,所取得的研究成果还是令人振奋的。

一、基因治疗的研究

1. 基因治疗概述: 基因治疗是指将外源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矫正或弥补基因的缺陷或者外源基因制造的产物发挥治疗作用,最终达到治疗疾病目的新型生物医学技术^[2]。基因是携带遗传信息的基本功能单位,是位于染色体上的一段特定 DNA 序列。基因治

疗的首要步骤是转基因的分子构建。一般转基因由目的基因 cDNA、启动子/增强子以及载体三部分组成。其主要的治疗途径是体外 (ex vivo) 基因治疗与体内 (in vivo) 基因治疗。体外基因治疗即在体外用基因转染靶细胞,然后将经转染的靶细胞输入病人体内,最终经转基因表达的细胞发挥效应起到治疗作用;而在二十世纪九十年代初,Knowles 等^[3]利用经过修饰的腺病毒为载体,成功地将治疗遗传性囊性纤维化病的正常基因转入患者肺组织中。这种直接向人体组织细胞中转移基因的治疗方法叫做体内基因治疗。将外源的基因导入生物细胞内要借助一定的技术方法或载体,目前基因转移的方法分为化学方法、物理方法、同源重组法和病毒介导基因转移方法。病毒载体可分为逆转录病毒载体、腺病毒和 SV40 等 DNA 病毒载体^[2],其中腺相关病毒 (AAV) 载体是目前基因治疗最为常用的病毒载体之一。基因治疗的靶细胞主要分为两大类:体细胞和生殖细胞,目前开展的基因治疗还限于体细胞。基因治疗目前主要是治疗那些对人类健康威胁严重的疾病。包括:遗传病(如血友病、囊性纤维化病、家族性高胆固醇血症等)、恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病(如 AIDS、类风湿等)。基因治疗最终目的是修整宿主基因以减少因疾病发展而带来的严重后果。

2. 基因治疗面临的问题: 目前已拥有众多载体介导基因转染人体许多组织器官,但是这种技术的成功率尚有限。在临床试验中,造成低成功率的一些原因: 1. 早期许多载体会引起多种不良反应以及病人不能耐受载体。例如对于囊性纤维化病患者,始于二十世纪九十年代初用腺病毒载体临床试验中引起严重肺部感染^[3,4]; 2. 细胞转染机会与导入基因稳定高效表达差异性很大。利用物理化学方法转基因效率很低,自然表达也不如人意,逆转录病毒

作者单位: 325000 温州,温州医学院眼视光学院、医院(侯立杰); 福建医科大学附属第一医院眼科(童绎)

通讯作者: 侯立杰, E-mail: hord@163.com

介导的基因转移,只能对处在分裂状态下的细胞进行转染。自从 1989 年克隆囊性纤维化病基因来,已有超过 20 例临床试验,其中 1/3 效果不明显^[5]; 3. 在基因治疗过程中难以确保外源 DNA 产生新的不良变异,载体诱变导致的危险性可会产生严重不良反应。Cavazzana-Calvo 等^[6]用逆转录病毒基因方法治疗 X 性连锁重度联合免疫缺陷病新生儿患者(X-linked severe combined immune deficiency, SCID),他们报道除一例外其他均明显重建免疫系统^[7],但是其中 2 例继发白血病,因此该临床试验的可行性受到质疑^[8,9]。由于继发肿瘤的危险性,应用其它相似载体的人类基因治疗技术临床试验同样面临难题,需要进一步评估它们的利害关系。

基因治疗技术能否用于常规临床实践中?当然不能低估现行治疗技术存在的问题和不足,但有理由相信未来会改善治疗方式。需要进一步研究开发能在宿主细胞中长期转基因稳定表达的更安全载体,进一步认识载体介导基因嵌入宿主基因组后引发插入式诱发变异的机理。进一步弄清转基因表达的机制,开发有更好可控性转染宿主细胞与如何能有效表达外源性基因。例如条件启动子的应用,可以通过一定的信号打开或关闭外源性蛋白质的翻译^[10]。在四环素诱导启动子的实验中,其信号是一种既可导入又可导出特定的抗生素^[11,12],这种技术可以更好控制整个基因治疗进程。另外要建立健全的相关医疗安全体制。

目前,人类体细胞基因治疗临床试验已经普遍开展,特别是近几年来,国外已对人类部分单基因遗传疾病和肿瘤开展临床基因治疗,但在神经眼科临床中需进一步研究?

二、神经眼科疾病的基因治疗研究

与身体其他器官比较,用基因治疗眼科疾病存在一定的优势。眼球是一个相对较小的器官,其组织细胞基因转染机会很高。另外,眼球是相对独立的,可以降低转染全身其它器官细胞的危险度,可降低肿瘤发生的风险。有实验证明神经系统受损后神经保护因子如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)与睫状神经营养因子(CNTF)发生增量调节作用^[13]。Cheng 等^[14]通过切断成年兔视神经,发现去轴突后视网膜神经节细胞(RGC)中脑源性神经营养因子(BDNF)受体 TrkB 的 mRNA 会速降 50%。然后用 TrkB 基因转染 RGC 联合应用外源性 BDNF,二周后发现 RGC 仍有 76% 的存活率,而未经治疗的对照组有超过 90% 神经元死亡,说明在成年人神经系统中加强受损神经元对神经生长因子的反应能力

可以提高其生存能力,此不失是一种有效的治疗神经疾病措施。Acland 等^[15]用重组 AAV 转染野生型 RPE65 (rAAV-RPE65)犬动物模型治疗 Leber 氏先天性黑朦(LCA),证实了基因治疗 LCA 有效。

有效基因治疗载体大多数是病毒。在早期眼基因治疗实验中应用腺病毒,但存在严重感染可能性和转基因瞬时表达^[110]。目前已证实重组腺相关病毒(rAAV)载体用于眼部基因治疗中作用极大^[16],腺相关病毒(AAV)是一种双链 DNA 微小病毒,具有转染宿主的广泛性、高转染性和不致细胞病变的特点,无论是处在分裂状态或非分裂状态的细胞,AAV 都能高效稳定转染宿主细胞。如果没有明显地免疫应答,AAV 可以长期转基因表达,另外利用 Rep 蛋白质(一种解螺旋酶)可以聚集 AAV,这样可以控制它的不良反应^[17,18],目前 Rep 蛋白质已广泛被应用于基因治疗实验。Meur 等^[16]将 rAAV (2, 4, 5 血清型)注入 14 只小猎犬和 9 只恒河猴的视网膜下,用视网膜荧光造影检测绿色荧光蛋白表达情况,并且通过用视网膜血管造影技术和视网膜电描记法评价视网膜解剖功能情况,进行 2 个月的观察,其中 4 只动物用于做长期研究,结果发现 20 只动物均能转基因表达,没有任何动物出现炎症反应,其中作为长期研究的动物模型跟踪 1.5 年至 3 年未发现视网膜在解剖学和功能上出现异常,说明了视网膜下注射 rAAV 是安全的,并且高效进行视网膜转基因表达,进一步说明用基因治疗技术治疗人类眼病的可能。同样,AAV 载体可以转染眼球多种类型细胞,包括视网膜感光细胞^[19-21]、视网膜色素上皮细胞^[19,22,23]、Müller 细胞^[24]、视网膜节细胞^[25,26]。有人用 lacZ-SV40 报告基因或人类绿色荧光蛋白(hgfp)标记的巨细胞病毒(CMV)启动子,再嵌接包含 AAV 末端重复序列的细菌质粒,将上述 CMV-lacZ 或 CMV-hgfp 复合体注入豚鼠玻璃体腔内,用免疫组织化学分析眼内牛乳糖含量,结果显示单次眼内注射后眼内牛乳糖可持续一年,也就是说 AAV 转染视网膜节细胞(RGC)的可基因表达可持续至少一年时间,并且未发现诱发严重眼部感染^[26]。Tsai 等^[27]通过重组腺相关病毒(rAAV)载体将基因转染角膜内皮细胞。经观察发现 AAV 不会导致内皮细胞感染并发生转基因表达。Martin 等^[28]报道 AAV 可以高效转染 RGC。同样,通过在小鼠视乳头前行玻璃体腔内注射病毒载体,发现能成功转基因于视神经,其中 AAV 介导能转染过氧化氢酶基因于靶细胞,此基因能抑制脱髓鞘和保护血脑屏障以免破坏^[29]。故 AAV 介导转基

因治疗视神经病变可行性很高。关于神经保护作用时间的持久性,目前有报道说明AAV介导在RGC中转基因表达至少能持续一年时间^[26]。以下就青光眼性视神经病变、LHON、视神经炎等常见神经眼科疾病在应用基因治疗技术研究现状做一简单介绍。

1. 青光眼: 世界上第二致盲原因—青光眼^[30], 致病原因主要是基因与环境两大因素, 因此很难仅通过修正或弥补单个基因将其治愈。

众所周知, 现行青光神经损害的两大假说: 一是长期高眼压作用, 二是正常眼压下由于遗传因素造成与年龄相关的RGC丢失。引起RGC死亡的原因大致上是因谷氨酸毒性作用所致。一氧化氮合酶(NOS-2)可诱发损害RGC活性氧簇或/和使RGC失去营养因子的支持作用^[31]。当眼内压升高时, 脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体trkB会在视乳头积聚, 可说明BDNF流失可能与青光眼性RGC凋亡有关^[32]。在目前青光眼遗传尚未明确的情况下, 对青光眼进行基因疗法目的就是减少RGC的死亡率。为了降低青光眼性RGC的丢失率, 当然必须还要有合适的神经保护因子的支持。许多实验依据表明BDNF很可能是有效的青光眼神经保护剂, 无论处在正发育或已成熟阶段的个体, RGC生存都要依赖于BDNF^[33-35]。对青光眼动物模型进行玻璃体腔内注射BDNF可有短暂的RGC保护作用, 但是频繁的玻璃体腔内注射, 不能有效控制青光眼病变程度^[36,37]。Martin等^[38]通过AAV结合BDNF的cDNA转染大鼠的RGC, 在研究中发现仅一次玻璃体腔内注射就可转染大部分RGC, 经过四周的实验观察, 玻璃体腔内注射AAV与BDNF组的RGC丢失率为32%, 而仅玻璃体腔内注射AAV无BDNF或仅注射生理盐水的对照组RGC丢失率达52%, 说明了AAV为载体转基因表达BDNF, 并且起到保护RGC作用, 进一步证实神经营养因子基因疗法是抗青光眼的一种可选手段。最近McKinnon等^[39]报道用另外一种基因治疗手段, 通过拮抗半胱天冬酶来调整RGC的凋亡途径, 他们用编码BIRC4(半胱天冬酶拮抗剂)的AAV载体注入阻断房水流出通道诱发试验性青光眼大鼠眼内使其产生转基因表达, 结果发现注射AAV载体一组RGC存活率明显好于单纯控制眼压的另一组, 说明了BIRC4可提高RGC的生存率因此基因疗法更有可能成为一种有效的治疗方法。

当然, 调整小梁网功能也可以治疗青光眼。也就是通过转基因治疗技术调整小梁网生理学特征可以达到长期控制眼压作用。现已有人经过脂质体介

导将报告基因或寡核苷酸成功转染于大鼠或灵长类动物小梁网, 证实了转基因治疗中小梁网细胞是很好的靶细胞^[40]。用腺病毒载体也可以获得较好的转导效果^[41]。病毒载体转基因过程不会破坏小梁网的组织结构, 故不会影响到房水流出道功能^[42]。可以认为, 通过转基因表达改良小梁网功能不失为抗青光眼的另一种治疗手段。

2. 视神经炎: 基因治疗技术已经应用到视神经炎动物模型^[43], 人类多发性硬化动物模型最常见是应用实验性变应性脑脊髓膜炎(EAE)。在多发性硬化动物模型中, 产生髓鞘的视神经少突胶质细胞成为免疫介导损伤的首选目标, 是活性氧簇导致少突胶质细胞损伤。同样, 自由基清除剂如过氧化氢酶(CAT)也可以保护视神经。利用过敏性脊髓炎SJL/J鼠模型, 在其右眼视乳头前注入带有CAT的灭活腺病毒, 而左眼注入无过氧化氢酶的灭活腺病毒作为对照组, 一个月后, 接种CAT的右眼脱髓鞘较左眼减少30%, 视乳头隆起程度减少25%, 血脑屏障破坏减少61%, 体内过氧化氢减少81%。实验说明了腺病毒介导基因转染后可增加所有视神经细胞的CAT水平, 并且可持续一个月。细胞CAT水平增高可以缓解视神经脱髓鞘程度和保护血脑屏障免遭破坏, 运用载有CAT的基因疗法可以治疗视神经炎^[43]。但不幸的是, 由于血脑屏障的重建会限制外源性CAT的效果, 导致只有少量CAT到达少突神经胶质细胞。若能延长将CAT转导给少突神经胶质细胞旁的时间也可获得令人意向不到的神经保护作用, 也就是CAT转基因技术治疗视神经炎成为可能^[43]。

3. Leber氏遗传性视神经病: Leber氏遗传性视神经病变(LHON)是一种主要累及视神经束纤维, 导致视神经退行性改变的家族遗传性病变, 其症状表现为一只眼无痛性视力突降, 待数周或数月后另一眼出现同样症状。于1871年由Theodor Leber首先明确为一独立性疾病^[1]。LHON是最常见遗传性线粒体疾病, 这种疾病基本上遗传到家族第2、3代人, 是单基因缺陷引起视神经疾病的代表。

线粒体DNA(mtDNA)包括16, 569对碱基, 可编码13个多肽, 2条核糖体RNA(rRNA)及22条转移RNA(tRNA), 它比nDNA更易受损, 由于mtDNA参与呼吸链酶合成, 因此它的损害可导致神经元死亡。LHON是由于mtDNA突变所致, 在mtDNA编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶I, 一种氧化磷酸化途径重要酶)的区域内发生突变, 目前已发现有三种mtDNA位点发生突变, 大约有

95% LHON 病人正因为此三种 mtDNA 位点突变而引发辅酶 I 不同亚单位突变, 其中超过半数以上 LHON 是由于 G11778A 位点的突变所致。最近在 LHON 的病理学、病因学以及遗传方面研究上取得一定新的进展, 特别是在遗传方面研究上取得的成果为用基因治疗 LHON 成为可能。1988 年 Wallace 等^[44]报道 LHON 在线粒体 DNA (mtDNA) 上第 11778 位点发生新突变。日本 Oguchi 等^[45]对 72 例 LHON 进行基因定位, 发现其中在 mtDNA 上第 3460 位点发生突变占 4%, 11778 位点发生突变占 83%, 14484 位点发生突变占 8%, 可以看出 LHON 在 mtDNA 上发生突变位点是多样性的。在视力损害预后方面, 同时发现 11778 位点突变者视力预后较差占 93% 以上, 而 3460 位点突变与 14484 位点突变的视力预后较佳者分别有 38% 与 50%。

目前应用艾地苯醌、异丙基乌诺前列酮等脑代谢促进药物仅能缩短视神经疾病自愈期, 而不能起到治愈疾病本身的作用。现已成功克隆视网膜神经节细胞 (RGC) 所特有的胺氧化酶基因。开发一种特定于 RGC 的转基因载体。在 LHON 中 RGC 死亡是细胞凋亡机理, 可通过转染能阻断细胞凋亡的基因从而达到保护 RGC 的作用, 因此可治疗 LHON。Guy 等^[46]已经成功在细胞水平上用 AAV 介导的基因治疗方法去弥补 LHON 病人辅酶 I 亚单位的缺陷。病毒载体不能直接把基因转染到哺乳动物的线粒体上, 要采取另外一种途径去补偿线粒体蛋白缺陷, AAV 用于把异常线粒体基因核编码程序转染到宿主细胞质。胞浆蛋白表达的修正包含一种介导从胞浆转运蛋白到线粒体的线粒体靶向作用肽, 用这种方法矫正 LHON 线粒体氧化磷酸化作用缺乏在体外实验已获得成功, 但是用这种手段治疗人类 LHON 在技术难以突破。治疗大多数有相同位点突变病例可成为一种选择手段, 但在 G11778A 位点突变后会出现视力突降的 LHON 病人中男性占 50%, 女患者仅占 10% 左右, 如果对所有 G11778A 位点突变的 LHON 患者进行基因治疗, 会对正常眼带来高风险^[44]。若出现视力损害后再注射病毒会错过治疗时间, 尤其对 AAV 介导的需要数周时间后才有转基因表达来说更是为时已晚。但考虑到 LHON 双眼视力损害的高风险, 待一眼视力下降后, 应用该技术可成为治疗另一眼的首选方法。用基因治疗 LHON 需要动物模型实验加以进一步明确后, 方可用于人体研究。许多视神经疾病没有特征性基因改变, 许多疾病的病理改变比单一基因特征性突变更复杂。

三、结束语

通过长达几十年对动物模型的广泛研究, 业已证实基因手段治疗神经眼科方面疾病作为一种新治疗策略, 具有广泛的临床应用前景。还有许多能治疗神经眼科方面疾病基因尚未证实, 但利用动物模型已成功获得一些实验上的证据, 下一阶段可进入人类临床试验。对于许多眼病来说, 利用基因治疗还需要解决两大难题: 一是某些眼科动物模型难以成活, 在技术上尚未突破或费用昂贵, 二是转染靶细胞所需的数量和形态学改变难以预料。另外, 许多病毒载体对人体具有毒性和免疫原性, 疱疹病毒载体在眼内仍能导致一些严重不良反应, 腺病毒载体在眼组织中所产生的免疫反应尚需解决。相对而言, AAV 载体即使在眼内高剂量应用也不会产生毒性作用, 而且在一定启动子作用下可以长时间保持转基因表达, 目前其在前期临床试验中应用最为成熟, 大有发展前景。

值得注意的是目前进行神经眼科方面疾病基因治疗的研究大部分是采用动物模型, 只有少数疾病病因比较明确, 而临床上缺血型视神经病变等大多数视神经疾病的病因则不明了, 而且具有个体差异, 因此无论是诱导耐受还是使用神经营养因子进行基因治疗的方法几乎都难以实现。再者, 许多基因转移载体存在转染效率低下, 表达时间短暂。此外, 系统性递送降低了基因治疗的靶向特异性, 有可能产生严重毒副作用, 安全性较低。尽管基因治疗用于处理一些眼科疾病在临床前期试验获得很大进展, 基因治疗有可能为神经眼科方面疾病的治疗带来新的前景。但就其安全性、特异性、长期有效性和生产成本而言, 基因治疗手段还远不够完善, 在其应用于临床之前尚有许多关键问题急需解决, 还需要大量而强有力的临床实验证据在安全性、有效性加以论证。因此, 寻找特异性转基因靶细胞、发展可控性局部递送系统、研究敏感的联合疗法等将成为基因治疗神经眼科方面疾病新的探索方向。

参 考 文 献

- 1 藤野 贞, 童绎, 李卓力等主编. 实用临床神经眼科, 福建: 福建科学技术出版社, 1996, 54-73
- 2 吕建新, 金丽琴主编, 医学分子生物学, 成都: 西南交通大学出版社, 2005, 151-160
- 3 Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, et al. A controlled study of adenoviral-vector mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1995; 333(13): 823-31
- 4 West J, Rodman DM. Gene therapy for pulmonary diseases. *Chest*, 2001, 119(2): 613-7
- 5 Griesenbach U, Ferrari S, Geddes DM, et al. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Therapy*, 2002, 9(20): 1344-50
- 6 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene

- therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288(5466): 669-72
- 7 Haccin-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*, 2002; 346(16): 1185-93
 - 8 Haccin-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2003; 348(3): 255-6
 - 9 Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(7): 477-88
 - 10 Martin KR, Quigley HA. Gene therapy for optic nerve disease. *Eye*, 2004, 18(11): 1049-55
 - 11 Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, et al. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Therapy*, 2003, 10(1): 84-94
 - 12 Kafri T, van Praag H, Gage FH, et al. vectors: regulated gene expression. *Mol Ther*, 2000, 1(6): 516-21
 - 13 Wen R, Song Y, Cheng T, et al. Injury-induced up regulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci*, 1995, 15:7377-85
 - 14 Cheng L, Sapieha P, Kitterlova P, et al. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci*. 2002,22(10):3977-86
 - 15 Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*. 2001,28(1):92-5
 - 16 Le Meur G, Weber M, Pereon Y, et al. Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol*, 2005,123(4):500-6
 - 17 Beaton A, Palumbo P, Berns KI. Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol*, 1989,63(10):4450-4
 - 18 Labow MA, Hermonat PL, Berns KI. Positive and negative auto-regulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol*, 1986,60(1):251-8
 - 19 Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, et al. Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(5): 591-4
 - 20 Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, et al. Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(13): 6916-21
 - 21 Jomary C, Vincent KA, Grist J, et al. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Therapy*, 1997, 4(7): 683-90
 - 22 Lai YK, Rakoczy P, Constable I, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer into human retinal pigment epithelium cells. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1998,26 Suppl 1:S77-9
 - 23 Grant CA, Ponnazhagan S, Wang XS, et al. Evaluation of recombinant adeno-associated virus as a gene transfer vector for the retina. *Curr Eye Res*, 1997, 16(9): 949-56
 - 24 Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther*, 2001, 3(2): 241-8
 - 25 Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(1): 81-6.
 - 26 John Guy, Xiaoping Qi, Nicholas Muzyczka, et al. Reporter Expression Persists 1 Year After Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer to the Optic Nerve. *Arch Ophthalmol*, 1999, 117(7): 929-37
 - 27 Ming-Ling Tsai, Show-Li Chen, Ping-I Chou, et al. Inducible Adeno-Associated Virus Vector-Delivered Transgene Expression in Corneal Endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2002, 43 (3): 751-7
 - 28 Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods*. 2002, 28(2):267-75
 - 29 Guy J, Qi X, Hauswirth WW. Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(23):13847-52
 - 30 Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80(5): 389-93
 - 31 Schwartz M, Yoles E. Self-destructive and self-protective processes in the damaged optic nerve: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000,41(2):349-51
 - 32 Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, et al. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3): 764-74
 - 33 Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, et al. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5): 1632-6
 - 34 Takano M, Horie H, Iijima Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina in vitro. *Exp Eye Res*, 2002, 74(2): 319-23
 - 35 Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y. Survival of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. *Clin Neurosci*, 1997, 4(5): 233-9
 - 36 Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett*, 2001, 305(2): 139-42
 - 37 Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(10): 2967-71
 - 38 Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10):4357-65
 - 39 McKinnon SJ, Lehman DM, Tahzib NG, et al. Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model. *Mol Ther*, 2002, 5(6): 780-7
 - 40 Hangai M, Tanihara H, Honda Y, et al. Introduction of DNA into the rat and primate trabecular meshwork by fusogenic liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(3):509-16
 - 41 Borrás T, Matsumoto Y, Epstein DL, et al. Gene transfer to the human trabecular meshwork by anterior segment perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(8):1503-7
 - 42 Borrás T, Rowlette LL, Erzurum SC, et al. Adenoviral reporter gene transfer to the human trabecular meshwork does not alter aqueous humor outflow. Relevance for potential gene therapy of glaucoma. *Gene Ther*, 1999, 6(4):515-24
 - 43 Guy J, Qi, X, Wang H, et al. Adenoviral Gene Therapy With Catalase Suppresses Experimental Optic Neuritis. *Arch Ophthalmol*, 1999,117(11): 1533-9
 - 44 Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-30
 - 45 Oguchi Y. Past, present, and future in Leber's hereditary optic neuropathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2001, 105(12): 809-27
 - 46 Guy J, Qi X, Pallotti F, et al. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ann Neurol*, 2002, 52(5): 534-42