

## 视网膜色素变性的基因治疗进展

李淑贤, 刘铁城, 陈晓菲, 代艾艾, 高旭辉, 李润璞  
解放军医学院 眼科, 北京 100853

**摘要:** 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组进行性致盲的遗传性视网膜疾病, 以视网膜光感受器和色素上皮变性为主要特征, 现有的治疗方法尚不能治愈, 但可在不同程度上阻止 RP 进展。随着基因测序的发展, 基因治疗逐渐兴起, 基因治疗通过载体将外源性正常基因导入患者细胞内, 以纠正或替代致病基因的缺陷而治疗遗传病。基因载体是将基因导入细胞的工具, 主要分为病毒载体与非病毒载体。目前基因治疗主要包括基因替代、核酶治疗、RNA 干扰治疗和抑制凋亡治疗, 本文主要对 RP 的基因治疗及其进展进行综述。

**关键词:** 视网膜色素变性; 基因载体; 基因治疗

中图分类号: R 774.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2017)01-0082-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.01.022

网络出版时间: 2016-12-14 09:53 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20161214.0953.002.html>

### Advances in gene therapy for retinitis pigmentosa

LI Shuxian, LIU Tiecheng, CHEN Xiaofei, DAI Aiai, GAO Xuhui, LI Runpu

Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Tiecheng. Email: liutc301@sina.com

**Abstract:** Retinitis pigmentosa is a group of inherited retinal diseases, which leads to progressive blindness and characterized by photoreceptor and pigment epithelial cells degeneration and apoptosis. There is no known cure for RP and the treatment aims at relieving symptoms currently. Gene sequencing brings development of gene therapy. In gene therapy, exogenous normal gene is introduced into target cells to modify or replace pathogenic gene through gene vectors, which include viral gene vector and non-viral gene vector. At present, gene therapy mainly includes gene replacement, ribozyme therapy, RNA interference and inhibition of apoptosis treatment. This article mainly reviews the current advances of gene therapy in treatment of retinitis pigmentosa.

**Keywords:** retinitis pigmentosa; gene vector; gene therapy

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组由于视网膜光感受器 (视锥细胞和视杆细胞) 退化及视网膜色素上皮变性为主要特征的进行性可致盲的遗传性视网膜疾病<sup>[1]</sup>, 世界范围内发病率约为 1/3 500<sup>[2]</sup>。RP 的临床特点主要有进行性视野缩小、夜盲、后极部或赤道部出现骨细胞样色素沉着、视神经乳头蜡黄、视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 显著异常或无波形等。RP 依据是否有伴随症状分为非综合征性 RP (nonsyndromic retinitis pigmentosa, NSRP) 和综合征性 RP (syndromic retinitis pigmentosa, SRP)。目前已知的 NSRP 大多数为单基因遗传, 遗传方式主要有 4 种: 常染色体显性遗传 RP (autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP)、常染色体隐性遗传 RP (autosomal recessive retinitis pigmentosa, ARRP)、X 染色体连锁遗传 RP (X-linked retinitis pigmentosa, XLRP) 及线粒体连锁遗传 RP。SRP 有 30 多种, 多为常染色体显性遗传, 如 Usher 综合征、Bardet-Biedl 综合征等<sup>[3]</sup>。RP 现在仍无有效治疗方法,

但随着基因测序方法的不断发展, 越来越多的致病基因及突变被发现, 目前已经确定 81 个与 RP 相关的基因位点, 其中 ADRP 相关 26 个, ARRP 相关 52 个, XLRP 相关 3 个<sup>[4]</sup>。致病基因的发现对 RP 的基因治疗起了重要的指导作用, 随着大量相关动物实验的展开, 基因治疗也得到了有力推动, 有少量已用于临床, 取得了较好的治疗效果, 给 RP 的根治带来了曙光。本文主要对 RP 的基因治疗及其进展进行综述。

#### 1 RP 基因治疗概述

基因治疗是通过基因载体将外源性正常基因导入患者细胞内, 以纠正或替代致病基因。眼与其他内脏器官相比更适合基因治疗, 这是因为: 1) 眼部的相对封闭状态及血-视网膜屏障能避免载体向体内扩散, 使眼球处于部分免疫赦免状态, 从而限制了针对转染基因及载体蛋白的免疫反应<sup>[5]</sup>; 2) 视网膜的结构及目前的检查手段 (如视网膜电图和光学相干断层扫描) 决定了我们能很容易地通过无创方法来监测治疗结果。RP 的基因治疗分为体内基因治疗与体外基因治疗。体内基因治疗是用合适的载体携带目的基因经玻璃体腔注射或视网膜下注射进行治疗的方法, 所用载体可分为非病毒载体和病毒载体; 体外基因治疗是把转基因的靶细胞移植到眼内, 联合使用外源性基因表达与视网膜移植来进行基因治疗。

#### 2 RP 基因治疗的主要载体

基因载体是将基因导入细胞的工具, 作用是运载目的

收稿日期: 2016-08-11

基金项目: 海南省医药卫生科研项目 (琼卫 2013 重点一号)

Supported by the Program of Medicine and Health Science Research of Hainan Province (琼卫 2013 重点一号)

作者简介: 李淑贤, 女, 在读硕士。研究方向: 眼底病与眼遗传病。

Email: lzfy0602@126.com

通信作者: 刘铁城, 男, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师。

Email: liutc301@sina.com

基因进入宿主细胞,使之能得到复制和进行表达。基因载体分为以下2类。

**2.1 非病毒载体** 主要包括DNA纳米粒、脂质体载体和阳离子聚合物型载体等。非病毒载体相对安全,对携带基因的大小无要求,但对目的基因的转移效率低,在动物模型中用脂质体载体将基因转移到光感受器细胞几乎无效。纳米粒子进行基因转移的效率高,其转移可通过基因枪和电穿孔。基因枪不适合将基因转移到视网膜,而电穿孔被证实能将粒子携带的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)导入视网膜神经节细胞,进而改善视网膜神经节细胞的损伤程度<sup>[6]</sup>。

**2.2 病毒载体** 病毒载体主要包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒(adenovirus, AD)载体、腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)载体、重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体及自身互补型重组腺相关病毒(self-complementary rAAV, ScrAAV)等。慢病毒载体可携带基因8 kb<sup>[7-8]</sup>,腺病毒可携带基因35 kb,但两者对目的基因的转移效率比较低。AAV载体无致病性,且能有效转移目的基因,但所携带基因要求<4.7 kb<sup>[9]</sup>,AAV载体依据对器官和组织的感染嗜好性分为AAV1、AAV2、AAV5、AAV8、AAV9。目前对视网膜疾病基因的治疗用得较多的是AAV2、AAV5和AAV8<sup>[10]</sup>。rAAV载体浓度高,使目的基因表达时间长,但整合慢、研究周期长。ScrAAV携带基因的能力更高可达5.7 kb,转移目的基因的效率,使目的基因的表达时间长。总的来说,病毒载体虽高效,但对携带基因有大小限制,且病毒载体有一定的免疫原性,其安全性仍是个问题。

### 3 RP基因治疗方法

基因治疗因干预时间的不同分为3个阶段:早期,当有大量幸存光感受器细胞时,通过用基因治疗或药物治疗来纠正潜在的生化异常,尽量阻止细胞的退化;中期,用神经营养因子和抗凋亡的办法减少视网膜毒性分子的生成和光感受器细胞氧化损伤;晚期,当有极少有功能的光感受器细胞存在时,可用视网膜移植等方法<sup>[5]</sup>。研究显示细胞凋亡是RP病理变化的共同途径<sup>[11]</sup>,基因治疗依据纠正RP机制的不同可分为以下几类。

**3.1 基因替代治疗** 通过载体把一个正常基因导入感光细胞内以代替不正常、缺陷或不能存活的基因,从而延缓或阻止光感受器细胞的凋亡。Mao等<sup>[12]</sup>将野生型人RHO基因导入RHO<sup>-/-</sup>小鼠,治疗6个月后观察到视网膜电图与对照组相比A波振幅增加79%。基因替代治疗在RPE65基因突变方面有大量研究,有人将rAAV载体携带的野生RPE65基因注射到伯瑞犬(一种先天性RPE65基因突变的动物模型)的视网膜下腔,发现光感受器细胞的光敏性明显提高,在随后4年多的随诊中,治疗组犬视力的恢复和Rpe65基因表达稳定,用这种方法治疗的50多只犬中,95%都有视力恢复<sup>[13]</sup>。目前已有30多个PR患者接受了这种基因治疗,随访时间90 d~1.5年,大部分患者无论从主观感受还是客观指标(如暗视力、ERG、眼球震颤等)视力都有大幅提高,

且无明显不良反应。儿童的视力改善的最明显,表明早期干预效果更好<sup>[14]</sup>。

**3.2 核酶治疗** 核酶(Ribozyme)是一种具有核酸内切酶活性的RNA分子,可特异性地切割、降解靶RNA序列,破坏转录产物而对机体无害,达到治疗目的。依据结构主要分为锤头状核酶和发夹状核酶。锤头状核酶是一种具有催化裂解其他顺式或反式RNA功能的小型RNA,可识别患者细胞内的特异性片段并催化清除编译蛋白的产生,对裂解位点要求不太严格<sup>[15]</sup>。Gorbatyuk等用锤头状核酶Rz397体外转染HEK293细胞与野生型RHO基因,可下调RHO mRNA的表达,将AAV2-Rz397从视网膜下腔注入P6小鼠后发现锤头核酶可显著降低RHO基因在P6小鼠视网膜中的表达。

**3.3 核糖核苷酸干扰治疗** 向细胞中导入与目的基因序列同源的双链小干扰RNA,会导致细胞的基因转录后沉默,这种现象称为核糖核苷酸干扰(RNA interference, RNAi)。RNAi治疗包括3种类型的小RNA分子,即miRNA(microRNA)、shRNA(short hairpin RNA)及siRNA(short interfering RNA),miRNA多是通过从miR-30或miR-155中人工提取获得,shRNA选择性抑制RHO突变的表达,siRNA直接修复dsDNA分子<sup>[16-18]</sup>。RNAi是机体为适应环境变化而在蛋白翻译水平进行调控的重要机制,这种机制在各种细胞中广泛存在。RNA干扰治疗是一种相对独立的基因灭活技术,可完全下调内源性视紫红质的生成<sup>[18]</sup>。Georgiadis等<sup>[19]</sup>用病毒载体转录的针对外周蛋白-2(Prph 2)基因的siRNA研究小鼠视网膜上Prph2基因表达情况,观察3周后发现siRNA可特异、有效地沉默Prph基因,从而抑制Prph2基因的表达。研究表明RNAi能有效清除mRNA突变并有助于取代野生型基因<sup>[18,20]</sup>。Jiang等<sup>[21]</sup>用scAAV2/8携带的shRNA视网膜下注入显性视网膜变性的GCAP1(Y99C)小鼠模型可见shRNA有效沉淀GCAP1的转基因效率,提高感光细胞的生存率,增加视功能和延缓疾病的发展。但RNAi有它的缺点:过度表达的shRNAs对中枢神经系统及肝有毒性<sup>[22]</sup>。有研究表明在动物模型中用>21 bp的siRNAs能导致视网膜退化变性<sup>[23]</sup>。shRNAs和人工miRNAs潜在的问题是降低靶效应<sup>[24]</sup>。

**3.4 抑制凋亡治疗** 依据抑制凋亡的物质不同分为以下两种。

**Bcl-2治疗:** Bcl-2基因是1984年由Tsuiimoto等从B细胞淋巴瘤染色体易位t(1 4;1 8)(q 32;q 21)断裂点发现的,是目前应用最广泛的一种抑制基因, Bcl-2基因对光感受器细胞的调控是双向的,即正常表达对光感受器细胞起保护作用,而过度地表达可促进凋亡。其机制尚不明确,可能是打破了Bcl2/Bax的平衡。Bennett等研究表明,将Bcl-2基因导入RP小鼠模型,和对照组相比,光感受器细胞的变性减缓,表明其对视网膜感光细胞起保护作用。Nir等<sup>[25]</sup>将Bcl-2基因导入rds小鼠(视网膜色素变性动物模型),表达Bcl-2基因的小鼠凋亡细胞数量明显减少。

**神经营养因子的治疗:** 神经营养因子是一类对神经元

的存活、轴突的再生及神经系统的分化有重要作用的细胞因子。研究表明,神经营养因子通过阻断细胞凋亡来延缓光感受器细胞变性。目前的神经营养因子有睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、晶状体上皮源性生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等,其中CNTF应用较多。有学者通过视网膜下腔注射将rAAV介导的CNTF种植到R小鼠视网膜上,发现可以减慢感光细胞凋亡<sup>[26]</sup>。Sieving等把细胞膜胶囊包裹的CNTF基因移植到10名受试者的单侧眼的玻璃体腔内,观察6个月后,发现受试眼的视网膜正常细胞的丢失明显低于对照眼。Lipinski等<sup>[27]</sup>通过将CNTF导入视网膜色素变性小鼠模型的视网膜中,发现CNTF通过上调补体因子蛋白及蛋白酶抑制剂,延缓视网膜色素变性的进展并保留部分视功能。

#### 4 3种主要RP类型的基因治疗

**4.1 ADRP的基因治疗** ADRP患者感光细胞变性的原因主要是异常基因产物的堆积,治疗上较困难,要达到治疗目的必须抑制基因突变而不是单纯的正常基因导入。抑制基因突变可以在DNA水平上通过基因修复或在RNA水平上通过RNA干扰或转录抑制而达成目标。目前ADRP的治疗有了新的进展,将核酶导入RHO基因P23H突变的小鼠中,其在视网膜赤道部视杆细胞中基因表达明显<sup>[28]</sup>。最近一个双基因治疗策略(siRNA抑制RDS的基因治疗和携带有siRNA的AAV载体进行的基因替代治疗)通过向视网膜下腔注射治疗视网膜色素变性模型rds小鼠,抑制了小鼠视网膜中RDS基因的表达,减缓了光感受器细胞的退化<sup>[29]</sup>。

**4.2 ARRP的基因治疗** ARRP主要由于基因突变、基因缺失引起。对于这种类型的RP,治疗上主要是把正常基因导入感光细胞内,以产生正常的基因表型<sup>[30]</sup>。最近一项研究将AAV载体转导MERTK基因进入RCS鼠的视网膜下,ERG显示感光细胞仅存在12周,视网膜形态短暂改善,可能原因是基因突变激活光感受器细胞退化,这种退化很难阻止,也可能是局部的视网膜注射不能覆盖整个眼底视网膜,影响了治疗效果。有研究用rAAV(Y733F)载体来转导MERTK进行基因治疗,注入成年大鼠视网膜下腔,发现被标记的基因可更长久、高效的表达<sup>[5]</sup>。这种rAAV-MERTK载体比其他载体能更有效、更长久地挽救视网膜的形态及视功能<sup>[31]</sup>。

**4.3 XLRP的基因治疗** XLRP主要是由于基因突变导致细胞凋亡,主要的基因治疗方法是替代治疗,常用载体把野生型该基因导入感光细胞内,延缓细胞凋亡。XLRP患者与其他RP患者相比ERG缺损更严重,视野更小。其中PRGR/RP3基因突变占XLRP患者中的70%,Beltran等<sup>[32]</sup>已在两个犬模型中进行有关RPGR/RP3的基因治疗,用rAAV/5载体携带人类RP3基因注入犬的视网膜下腔,与对照眼相比,视杆细胞和视锥感光功能都处在较高的水平,能保护外丛状层的厚度,这为进一步用于人类治疗提供了依据。

#### 5 小结

由于基因测序能高效、准确地从分子学水平确定病因,发现了越来越多致病基因,这为RP的根治带来希望。RP未来的基因治疗不是以上的某一种治疗,而是在疾病的不同时期几种方法的联合治疗。但目前基因治疗也存在以下问题:基因治疗研究大多应用动物模型,还没有系统、完全地应用到人类;如何找到能让目的基因在感光细胞中稳定和长期表达的载体;目前越来越多致病基因及其突变被发现,但用于治疗RP的甚少,如何让这些资源充分发挥作用还待研究;如何根治RP等,要使基因治疗能真正解决RP患者视力问题,仍需要我们不懈努力。

#### 参考文献

- Zhang Q. Retinitis pigmentosa : progress and perspective [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2016, 5 (4): 265-271.
- Narayan DS, Wood JP, Chidlow G, et al. A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa [J]. Acta Ophthalmol (Copenh), 2016, 94 (8): 748-754.
- Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, et al. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa [J]. Vision Res, 2012, 75: 117-129.
- Almoguera B, Li J, Fernandez-San Jose P, et al. Application of whole exome sequencing in six families with an initial diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa : lessons learned [J]. PLoS One, 2015, 10 (7): e0133624.
- Petrus-Silva H, Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa [J]. Clin Ophthalmol, 2014, 8: 127-136.
- 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.
- Han Z, Conley SM, Naash MI. AAV and compacted DNA nanoparticles for the treatment of retinal disorders : challenges and future prospects [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (6): 3051-3059.
- Tosi J, Sancho-Pelluz J, Davis RJ, et al. Lentivirus-mediated expression of cDNA and shRNA slows degeneration in retinitis pigmentosa [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236 (10): 1211-1217.
- Boye SE, Alexander JJ, Witherspoon CD, et al. Highly Efficient Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors to the Primate Retina [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27 (8): 580-597.
- Deng WT, Dyka FM, Dinculescu A, et al. Stability and safety of an AAV vector for treating RPGR-ORF15 X-Linked retinitis pigmentosa [J]. Hum Gene Ther, 2015, 26 (9): 593-602.
- 张承芬. 眼底病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 20-25.
- Mao H, James T Jr, Schwein A, et al. AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. Hum Gene Ther, 2011, 22 (5): 567-575.
- Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, et al. Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa : from neuroprotection to gene therapy [J]. Curr Genomics, 2011, 12 (4): 276-284.
- Simonelli F, Maguire AM, Testa F, et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration [J]. Mol Ther, 2010, 18 (3): 643-650.
- Scott G, Horan H, Martick M. The hammerhead ribozyme : structure, catalysis, and gene regulation [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 120: 1-23.

- 16 Beer S, Bellovin DI, Lee JS, et al. Low-level shRNA cytotoxicity can contribute to MYC-induced hepatocellular carcinoma in adult mice [ J ] . *Mol Ther*, 2010, 18 ( 1 ) : 161-170.
- 17 Sin O, Mabila P, Liu Y, et al. Gene silencing efficiency and INF-beta induction effects of splicing miRNA 155-based artificial miRNA with pre-miRNA stem-loop structures [ J ] . *Biochem Genet*, 2012, 50 ( 1-2 ) : 112-121.
- 18 Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa [ J ] . *Mol Vis*, 2012, 18 : 2479-2496.
- 19 Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge W, et al. AAV-mediated knockdown of peripherin-2 in vivo using miRNA-based hairpins [ J ] . *Gene Ther*, 2010, 17 ( 4 ) : 486-493.
- 20 Li C, Xiao P, Gray SJ, et al. Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins [ J ] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 ( 34 ) : 14258-14263.
- 21 Jiang L, Frederick JM, Baehr W. RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused by GCAP1 mutations [ J ] . *Front Mol Neurosci*, 2014, 7 : 25.
- 22 Martin N, Wolken N, Brown T, et al. Lethal toxicity caused by expression of shRNA in the mouse striatum : implications for therapeutic design [ J ] . *Gene Ther*, 2011, 18 ( 7 ) : 666-673.
- 23 Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, et al. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3 [ J ] . *Mol Ther*, 2012, 20 ( 1 ) : 101-108.
- 24 Jiang L, Zhang H, Dizhoor AM, et al. Long-term RNA interference gene therapy in a dominant retinitis pigmentosa mouse model [ J ] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 ( 45 ) : 18476-18481.
- 25 Nir I, Kedziński W, Chen J, et al. Expression of Bcl-2 protects against photoreceptor degeneration in retinal degeneration slow ( rds ) mice [ J ] . *J Neurosci*, 2000, 20 ( 6 ) : 2150-2154.
- 26 Wen R, Tao W, Li Y, et al. CNTF and retina [ J ] . *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31 ( 2 ) : 136-151.
- 27 Lipinski M, Barnard R, Singh S, et al. CNTF gene therapy confers lifelong neuroprotection in a mouse model of human retinitis pigmentosa [ J ] . *Mol Ther*, 2015, 23 ( 8 ) : 1308-1319.
- 28 Mao H, Gorbatyuk MS, Rossmiller B, et al. Long-term rescue of retinal structure and function by rhodopsin RNA replacement with a single adeno-associated viral vector in P23H RHO transgenic mice [ J ] . *Hum Gene Ther*, 2012, 23 ( 4 ) : 356-366.
- 29 Petrs-Silva H, Yasumura D, Matthes MT, et al. Suppression of rds expression by siRNA and gene replacement strategies for gene therapy using rAAV vector [ J ] . *Adv Exp Med Biol*, 2012, 723 : 215-223.
- 30 Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing [ J ] . *Hum Mol Genet*, 2010, 19 ( R2 ) : R227-R240.
- 31 Dinculescu A, Estreicher J, Zenteno JC, et al. Gene therapy for retinitis pigmentosa caused by MFRP mutations : human phenotype and preliminary proof of concept [ J ] . *Hum Gene Ther*, 2012, 23 ( 4 ) : 367-376.
- 32 Beltran A, Cideciyan V, Lewin S, et al. Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa [ J ] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 ( 6 ) : 2132-2137.