

【文献综述】

岳丽霞 徐积兄

将外源基因导入靶细胞,以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病。然而,现在越来越多的研究是借助病毒载体(包括各种逆转录病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒等),将目的基因插入病毒基因的非必需区形成重组病毒颗粒,通过回体转移或直接转移将目的基因转入体内,以达到基因治疗的目的。但上述载体各有其优缺点:逆转录病毒能有效地将目的基因整合进被感染细胞的基因组,但靶细胞必须处于增殖状态;腺病毒载体因其具有包装容量较大、制备方便且易纯化和浓缩、宿主范围广、感染效率高等特点,在基因治疗中作用广泛,但因其载体不能和宿主细胞发生整合,导致外源基因只能瞬时表达,需重复使用,同时可诱导机体免疫反应,并

且存在体内复制的可能,有安全隐患;腺相关病毒虽无免疫排斥反应和细胞毒作用,但是其载体制备纯化需要的技术含量高,感染效率低,并且包装容量有限;慢病毒能稳定地整合入宿主染色体,持久稳定地表达外源基因,但其不能沾染有复制能力的病毒,否则会造成严重后果^[3]。其他还包括疱疹病毒和痘病毒等,均能造成不同程度的严重后果。上述各种整合载体插入后可能存在导致肿瘤的风险,所以,现在已经研究出高删除、自失活、非整合的慢病毒载体作为更安全的替代品。还有一些非病毒眼部基因转移方式备受关注,优势是:(1)转移时受基因大小的影响较小;(2)和病毒载体不同的是不存在安全性问题;包括利用DNA纳米粒子、ΦC31整合系统,电穿孔和脂质体转染法,并且已在眼内成功应用^[4]。当前针对DR基因治疗研究较多的是将外源基因对抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[5]、色素上皮衍生因子(pigment epithelial derived factor, PEDF)^[6-7]、血管抑素(angiotatin, AS)、内皮抑素(endostatin, ES)^[8],以抑制视网膜微血管内皮细胞增生,从而抑制新生血管的形成,达到治疗视网膜病变的目的。

2 DR 相关基因

2.1 VEGF VEGF是一种具有高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂素,一种强效的血管生成因子,具有促进内皮细胞增殖、诱导血管形成、增加血管通透性等多种生物学功能。通过与特异性受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合,介导蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)途径,而发挥其生物学功能。生理状态下,视网膜的周细胞、内皮细胞、色素上皮细胞低表达VEGF,维持眼部血管的完整性。在缺血、缺氧等因素影响下,诱导VEGF的表达升高,且其表达量和视网膜新生血管形成的严重程度成正比^[9]。临床发现,与这些改变有显著相关的基因有RAGE、整合素 $\alpha 2\beta 1$ 。同时有研究表明,VEGF的基因多态性也与DR相关^[9], SNP-2578C/A中AA基因型与DR显著相关^[10]。VEGF启动区-634C/G位点的基因多态性与DR的发生有密切关系,而且此位点可能是促使血浆中VEGF升高的主要原因^[11]。可溶性受体FLT-1(sFLT-1)是特异性VEGF抑制剂, PEDF、血管抑素、金属蛋白酶组织抑制物-3(tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP-3)也具有抗血管生成的作用。大多数眼内抗新生血管形成治疗策略主要集中在抑制VEGF活性方面,但是从基因层面来阻断DR的进展,尚未见报道,因此,DR的基因治疗逐渐被关注和重视。Colella等^[12]以VEGF转基因属作为模型,利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体介导可溶性受体sFLT-1编码基因转移,通过将该载体注射到视网膜下腔,使治疗基因在被注射的眼内表达,有效地抑制了

视网膜内微血管异常的发生。Ambati等^[13]以ROP小鼠为模型,分别采用腺病毒和AAV载体介导sFLT-1基因转移,结果显示正常的小鼠眼部低表达VEGF,高表达sFLT-1,同时sFLT-1抑制VEGF的表达,对眼部起到保护作用。然而,在ROP小鼠眼内VEGF表达量显著升高,而sFLT-1则受抑制,实验通过病毒介导细胞内sFLT-1基因的高表达,对ROP小鼠起到治疗作用^[13-15]。

2.2 PEDF 基因 PEDF是一种含418个氨基酸的糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员,具有多种生物学活性。在糖尿病并发症中, PEDF发挥新生血管的抑制、抗炎、抗氧化、神经营养和神经保护作用。PEDF主要存在于神经系统和视网膜,在房水和玻璃体内也有较高浓度的PEDF^[16]。PEDF不仅能抑制视网膜血管内皮细胞的增殖与迁徙,减少眼内的血管性出血,还能抑制缺氧诱导的视网膜新生血管化,同时能避免机械、激光和缺氧诱导的视网膜损伤,抑制VEGF体外诱导的内皮细胞的增殖和迁徙,促进视网膜的修复^[17-18]。在眼内, PEDF含量与VEGF含量保持着一个动态平衡的关系, PEDF的下降可使VEGF对内皮细胞的促有丝分裂活性占支配地位,导致糖尿病中血管渗漏和新生血管形成。有研究显示, PEDF可以显著降低VEGF在视网膜毛细血管内皮和Müller细胞中的表达;另一方面, VEGF通过其受体介导的过程可以显著下调细胞内PEDF的表达^[16]。

2.3 AS 和 ES 基因 在血管生成抑制因子中除了PEDF, AS和ES也被发现可以特异抑制血管内皮细胞增殖并诱导其凋亡, AS和ES具有抑制趋化作用,而不影响能够调节内皮细胞迁移和增殖/存活的细胞内信号转导通路^[8]。ES可作用于内皮细胞的增殖、凋亡、迁徙过程,抑制VEGF的作用,从而抑制新生血管形成。LeGat等^[19]通过在高压氧诱导的DR小鼠模型玻璃体内注射携带ES基因的腺病毒载体,成功抑制视网膜新生血管形成。此外,还有研究发现由AAV介导的PEDF、ES、TIMP-3基因转移,在早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)模型^[20]中对新生血管形成也产生抑制作用,但介导的TIMP-3抑制作用较AAV介导的PEDF或ES基因转移所产生的作用略低。

2.4 晚期糖基化终末产物受体基因 糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)是一种具有多配体的跨膜信号转导受体,属于免疫球蛋白超家族的细胞表面分子。不仅可与糖基化终末产物(advanced glycation end-products, AGEs)结合,还可与其他配体如两性素/高速泳动族盒1蛋白(HMGB1)、S100/钙粒蛋白等结合而发挥作用。AGEs与RAGE结合,激活JAK-STAT、MAPKs、Ras-Rac-Cdc42、(PI3-K)-Akt/PKB旁路途径而发挥作用,如增加血管通透性、促进细胞因子释

放、诱导炎症反应、减轻 NO 的舒张血管作用、促进低密度脂蛋白的氧化等作用,最终导致糖尿病血管病变如动脉粥样硬化、肾脏病变、视网膜病变等的发生发展^[21]。内源分泌型 RAGE(endogenous secretory receptor for advanced glycation end products,esRAGE)是 RAGE 基因的一种可变剪接体,缺少胞内段和跨膜区域,但存在于配体结合的胞外段,不能向细胞内转导信号,竞争性结合 RAGE 的配体 AGEs。因此,esRAGE 作为 RAGE-AGEs 系统的重要抑制物,提高视网膜局部 esRAGE 可阻止或延缓 DR 的发生发展^[22]。

2.5 醛糖还原酶基因 醛糖还原酶(aldehyde reductase,AR)是一种存在于细胞质中的以 NADPH 为辅酶的单体酶,属于 AR 超家族的一员,大量存在于周细胞中,广泛存在于血管、肾脏、心脏、脑、骨骼肌、视网膜、胎盘、神经等组织中^[2],以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,NADPH)为辅酶催化多种醛类、酮类物质还原为醇,参与氧化应激、细胞转导和细胞增殖过程。AR 通过多元醇通路引起糖尿病微血管损伤^[23]。研究发现^[24],AR 抑制剂可以减弱氧化应激诱导的 NF- κ B 活化和 AP1 信号,从而减轻因 NF- κ B 活化和 AP1 信号引起的细胞凋亡和细胞生长,但是疗效有限。基因的遗传变异在糖尿病并发症的发生发展中起重要的作用,研究发现^[25],醛糖还原酶基因(aldo-keto reductase family 1,member B1,AKR1B1)的遗传变异与 DR 密切相关,rs9640883 与糖尿病病程、DR 显著相关,通过影响糖尿病病程、血压、BMI、视网膜功能、血清胆固醇水平和糖化血红蛋白水平,间接影响 DR 发生发展。

2.6 血管紧张素转换酶基因 血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme,ACE)是一种 Zn^{2+} 依赖型羧二肽酶,为膜整合的单链糖蛋白,其功能主要通过肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)介导,而在 DR 中,RAS 系统平衡受损。有研究表明^[26],通过克隆 ACE2/Ang-(1-7) AAV 体(AAV-ACE2/Ang-(1-7)),增加了视网膜内 ACE2/Ang-(1-7)表达,能够起到防治 DR 的作用。在 AAV-ACE2/Ang-(1-7)治疗糖尿病小鼠 2 个月后,无细胞毛细血管 10 倍增生,其能显著降低 DR 的发生,同时阻止基底膜的增厚。同时在糖尿病大鼠得到了进一步验证,其毛细血管 5 倍增生,AAV-ACE2/Ang-(1-7)通过基因传递治疗几乎能完全阻止无细胞毛细血管形成,且对体质量、血糖、血压无影响。AAV 载体通过增加视网膜内 ACE2 和 Ang-(1-7)的表达水平,从而阻止糖尿病引起的视网膜血管通透性、基底膜增厚、视网膜炎症、无细胞毛细血管形成和氧化损伤。同时观察到在小鼠糖尿病模型中能显著改善血糖、血压和其他相关并发症。增加眼内 RAS 系统轴的 ACE2/Ang-(1-7)表达,可以作为 DR 的一个

新的治疗目标^[26]。

2.7 一氧化氮合酶基因 一氧化氮合酶(nitric oxidesynthase,NOS)是 NO 合成的关键酶,NO 是可调节眼底微循环血流动力学,维持视网膜血管的张力,使血管舒张,阻止白细胞和血小板侵犯血管壁,保护血管内皮细胞。目前对 NOS 基因与 DR 进展相关性研究最多的是 NOS 亚型基因,如 eNOS 和 iNOS。研究发现^[27],在敲除 eNOS 基因的糖尿病小鼠中,与同龄的 C57BL/6 小鼠相比,eNOS 基因敲除的糖尿病小鼠视网膜的血管渗透性明显增加,显示出早期发病和无细胞毛细血管数量增加、持续胶质增生、毛细血管基底膜增厚,伴随着总 NO 水平升高和视网膜 iNOS 的表达增加。同时研究表明,eNOS 基因 T-786C、Glu298Asp 基因多态性与 DR 进展密切相关^[28]。

2.8 促红细胞生成素基因 促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是一种单链的酸性糖蛋白,不仅可促进骨髓干细胞和红系祖细胞的增生,还能诱导分化,调节红细胞生成,其在缺血、缺氧状态下,具有神经元保护及促进神经系统发育作用^[29]。在 DR 的发生发展中,EPO 表达明显增高,同时显示出能刺激因缺氧引起的血管内皮细胞的增殖、迁移和新生血管的形成。在视网膜和内皮细胞中有 EPO 受体,EPO 通过与其受体结合,依赖蛋白酪氨酸激酶(tyrosine protein kinases,TPK)信号转导途径的激活来发挥其作用。研究表明^[30],通过使用 EPO 抑制剂,能明显改善新生血管的形成。同时,单核苷酸多态性对 EPO 表达的影响较大,并且 EPO 在玻璃体内和血浆中的表达无相关性,使得识别 EPO 基因标记开发新的治疗及预防疗法成为可能。Takagi 等^[9]证实 EPO 在增殖性 DR 中增加,在 ROP 中,抑制 EPO 与抑制 VEGF 同样有效。

2.9 酪氨酸激酶-2 基因 酪氨酸激酶-2(Tie-2)表达于内皮细胞,调节血管的重塑和成熟,其配体 Ang-1 和 Ang-2 的平衡决定了 Tie-2 的磷酸化状态。同时调节内皮的屏障功能、血管分支、炎症反应和血管生成。Ang-1 被认为是 Tie-2 的活化剂,而 Ang-2 是拮抗 Tie-2 上 Ang-1 活动的同源配体。在血管形成阶段,Ang-1 的表达出现在血管成熟的早期,引起内皮细胞分化和招募周细胞前体,以稳定新生血管。转化生长因子- β 1(Transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)进一步下调细胞迁移和促进细胞分化的最后成熟步骤。成人血管重塑涉及 VEGF 和 Ang-1 与 Ang-2 之间比例的相互作用。Ang-2 在引起周细胞丢失方面起着重要作用,在缺氧环境中 Ang-2 的表达上调^[9]。

3 其他

诱导 TXNIP 转基因沉默和改善病理影响途径而开辟新的治疗策略,旨在阻止 DR 的发生发展。糖尿病特征是血-视网膜屏障的破坏、新生血管形成、

神经胶质功能障碍和神经元死亡^[31]。

4 问题与展望

目前 DR 的发病机制仍不完全清楚,针对 DR 基因治疗可选择的基因也越来越多,如: VEGF、RAGE、PEDF、ACE、EPO、NOS、醛糖还原酶基因、Tie-2 基因等,但基因治疗依然存在需要深入研究和解决的技术性问题,同时依赖于基因治疗技术本身的进步。目前运用较多的 AAV、腺病毒(AD)、慢病毒均有各自的优势和局限性,三种整合载体插入均可能增加肿瘤发生的风险。因此,更安全有效的基因转移方式是当前基因治疗的主要研究方向。与此同时,载体构建和导入的高效性有待于进一步提高,目的基因的毒性和免疫原性及作用的靶细胞和切入点均有待于进一步观察和研究。由此寻找与 DR 发生发展密切相关的、切实有效的目的基因,以进一步了解 DR 的发病机制。目前,大多数研究仍局限于动物实验,大鼠、小鼠、兔仍然是实验的主要研究对象,并且取得了一定的进展。但进行临床应用还需要克服许多实际的困难,如病毒载体的毒性作用及诱发肿瘤的风险增加、注射部位及不同注射部位下用药剂量和时间间隔的问题,均有待于进一步研究。然而,随着基因治疗相关技术的发展,对与 DR 密切相关的基因的深入研究,基因治疗将会为 DR 患者带来福音。

参考文献

- 1 Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107(5): 75-84.
- 2 Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(4): 253-264.
- 3 Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM. Lentiviral vectors; regulated gene expression[J]. *Mol Ther*, 2000, 1(6): 516-521.
- 4 Liu MM, Tuo J, Chan CC. Gene therapy for ocular diseases[J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(5): 604-612.
- 5 Ramirez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, Jeziorski MC, Arnold E, Diaz-Lezama N, et al. Vasoinhibin gene transfer by adeno-associated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12): 8944-8950.
- 6 Zhu XF, Zou HD. PEDF in diabetic retinopathy: a protective effect of oxidative stress[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 580687.
- 7 Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, Bosch A, Ramos D, Ruberte J, et al. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41511.
- 8 Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways[J]. *FEBS Lett*, 2003, 536(1-3): 19-24.
- 9 Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 9-16.
- 10 Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247(1): 21-26.
- 11 Yang Y, Andresen BT, Yang K, Zhang Y, Li X, Li X, et al. Association

- of vascular endothelial growth factor-634C/G polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic Han Chinese[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(10): 1204-1211.
- 12 Colella P, Auricchio A. AAV-mediated gene supply for treatment of degenerative and neovascular retinal diseases[J]. *Curr Gene Ther*, 2010, 10(5): 371-380.
- 13 Ambati BK, Patterson E, Jani P, Jenkins C, Higgins E, Singh N, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier[J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(4): 505-508.
- 14 Asato R, Kita T, Kawahara S, Arita R, Mochizuki Y, Aiello LP, et al. Vitreous levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1 in eyes with vitreoretinal diseases[J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(12): 1745-1748.
- 15 Liu X, Brandt CR, Rasmussen CA, Kaufman PL. Ocular drug delivery: molecules, cells, and genes[J]. *Can J Ophthalmol*, 2007, 42(3): 447-454.
- 16 Filleur S, Neliut T, de Riese W, Kennedy RC. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5): 769-775.
- 17 Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, Bosch A, Ramos D, Ruberte J, et al. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41511.
- 18 Li S, Fu XA, Zhou XF, Chen YY, Chen WQ. Angiogenesis-related cytokines in serum of proliferative diabetic retinopathy patients before and after vitrectomy[J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5(6): 726-730.
- 19 LeGat L, Gogat K, Bouquet C, Saint-Geniez M, Darland D, Van Den Berghe L, et al. In vivo adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(25): 2098-2103.
- 20 Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, O'Connor EM, Bennett J, Wilson JM, et al. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents[J]. *Mol Ther*, 2002, 6(4): 490-494.
- 21 Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 183-194.
- 22 Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(10): 1379-1386.
- 23 Obrosova IG, Kador PF. Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(3): 373-85.
- 24 Ramana KV. Aldose Reductase: New insights for an old enzyme[J]. *Biomol Concepts*, 2011, 2(1-2): 103-114.
- 25 Abhary S, Burdon KP, Laurie KJ, Thorpe S, Landers J, Goold L, et al. Aldose reductase genepolymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(8): 1834-1836.
- 26 Verma A, Shan Z, Lei B, Yuan L, Liu X, Nakagawa T, et al. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy[J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1): 28-36.
- 27 Li Q, Verma A, Han PY, Nakagawa T, Johnson RJ, Grant MB, et al. Diabetic eNOS-knockout mice develop accelerated retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(10): 5240-5246.
- 28 Ezzidi I, Mitravou N, Mohamed MBH, Mahjoub T, Kacem M, Al-mawi WY. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 68(4): 542-546.
- 29 Zhou Z, Xu G. Progress on genetic polymorphism associated with diabetic retinopathy[J]. *Int Eye Sci*, 2013, 13(8): 1575-1578.
- 30 Abhary S, Burdon KP, Casson RJ, Goggin M, Petrovsky NP, Craig JE. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy[J]. *Arch Ophthalmol*, 2010, 128(1): 102-106.
- 31 Perrone L, Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy[J]. *Cell Death Dis*, 2010, 19(1): e65.