

引文格式:李雨雨,李如意,李根林.视网膜色素变性行精准医疗的机制及方法进展[J].眼科新进展,2021,41(4):397-400. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0083

【文献综述】

视网膜色素变性行精准医疗的机制及方法进展[△]

李雨雨 李如意 李根林

【摘要】 原发性视网膜色素变性(RP)引起严重的视网膜营养不良和视力损害,具有高度的临床异质性。基因组测序可以协助RP进行分子诊断来确定致病基因,阐述其发病机制,同时分析基因型-表型的相关性,进而设计个性化治疗方案,奠定精准医疗的基础。本文就RP精准医疗中的基因治疗、基因编辑技术及光遗传学治疗进行综述,以期提供RP精准医疗的方法和应用前景。

【关键词】 原发性视网膜色素变性;精准医疗;基因治疗;基因编辑;光遗传学

【中图分类号】 R774.1

原发性视网膜色素变性(RP)是一组遗传性视网膜疾病,发病率约为1/4000。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、视盘蜡黄、视网膜电图显著异常或无波形等。其主要发生在婴儿期或青少年期,引起严重的视网膜营养不良和视力损害。由于个体在分子、生理、环境暴露和行为水平上具有细微差别和独特的特征,故个体对干预的反应有所差异。现代生物医学技术,如DNA测序、蛋白质组学、无线健康监测设备的可用性,使这种差异得以识别,在一定程度上暴露了对个性化医学的需求,即精准医疗(precision medicine)的需求^[1]。基因组测序的实现及基因治疗的成熟使得RP成为一种非常适合精准医疗策略的眼部疾病。目前,关于RP实行精准医疗的分子机制及可行性分析研究较少,本文对基因测序技术对RP的分子诊断价值及其对基因型-表型相关性的意义进行综述,为阐明RP的发病机制,进而设计基因治疗的个性化方案提供依据。

隐性 RP (ARRP) 是最具异质性的一种, 有 41 个基因被鉴定或定位; 对于常染色体显性遗传性 RP (AD-RP), 已知约一半的基因有疾病相关突变; 与 X 连锁 RP 相关的基因相对较少, 目前被鉴别的基因有 2 个 (Retnet; <https://sph.uth.edu/retnet/>)。RP 的高度异质性使得 RP 患者进行可靠和有效的临床分子诊断变得尤其具有挑战性。

3 基因测序协助 RP 进行分子诊断

不同的视网膜疾病有许多重叠的临床特征,使得准确的临床诊断变得困难,特别是在晚期视网膜营养不良的情况下。通过对不同人群(包括患者和对照组)进行全基因组测序、全外显子测序,以及进行基因型-表型分析可以确定突变基因是致病突变还是良性突变。通过筛选已知的 RP 基因和其他视网膜疾病基因,以靶基因外显子序列为基础进行全面的分子诊断,可以为临床医师提供更准确的临床诊断,从而实现更好的患者指导和更优质的疾病管理。

Yang 等^[5]对 34 个中国 RP 家族患者进行了一项外显子测序, 结果发现, 对最初被误诊为 Leber 先天性黑蒙 (LCA) 的 RP352 家系, 外显子测序证实了

作者简介:李雨雨 (ORCID: 0000-0002-8741-6492), 女, 1992 年 5 月出生, 陕西榆林人, 在读博士研究生。研究方向: 眼底病、视网膜色素变性。E-mail: 1005404551@qq.com

通信作者: 李根林 (ORCID: 0000-0002-4641-4386), 男, 1963 年 5 月出生, 北京人, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 视网膜色素变性。E-mail: ligenlin2018@163.com

收稿日期:2020-06-11

修回日期:2021-01-22

本文编辑:王燕

[△]基金项目:国家自然科学基金(编号:81271046);北京市自然科学基金项目暨北京市教育委员会科技发展计划重点项目(编号:KZ201510025025)

其为 RP。在一些系谱有限的家系中,如 RP110 家系,很难确定遗传模式是 ADRP 还是 ARRP。在这些情况下,分子遗传检测可以帮助确定实际的遗传方式。考虑到常染色体显性遗传 50% 的遗传风险,精确的分子遗传学诊断可以为更好的计划生育铺平道路。Birtel 等^[6]进行基因组测序的研究发现,家族系谱结合测序结果可以使大多数患者(82% ~ 100%)获得分子诊断。

4 基因组测序分析基因型-表型的相关性

通过基因组测序确定突变基因不仅有助于分子诊断,也有助于分析基因型-表型的相关性,进而实现精准医疗。Parmeggiani 等^[7]对基因测序患者的基因型-表型相关分析结果表明:(1) RP2-XLRP 先证者比 RPGR 突变患者的视锥细胞和视杆细胞功能损害更严重;(2) RPGR-XLRP 患者表现出相似的表型,普遍存在视杆细胞功能丧失和轻中度视锥细胞功能丧失。研究扩大了导致 XLRP 的 RPGR 突变谱,有助于进一步提高基因型表型诊断水平。

同一个基因的不同突变形式同样会伴有不同的基因型-表型关系。Wheway 等^[8]的研究记录了 PRPF31 基因突变患者首次出现症状的年龄和诊断疾病的年龄,发现无义突变、移位或插入缺失的患者出现首次症状(通常为夜盲)的年龄最小,发病年龄中位数为 8 ~ 12 岁。缺失或剪切异常的患者往往在 20 ~ 24 岁首次出现症状。有重复、插入或错义突变的发病年龄中位数约为 27 岁。不同类型突变的发病年龄差异有统计学意义(单因素方差分析 $P = 5.76 \times 10^{-5}$)。

5 RP 精准医疗方法

5.1 基因治疗

RP 分子诊断的实现为基因治疗带来了无限的潜力,基因治疗是通过替换、沉默或编辑受影响的基因来纠正由基因突变引起的病理表型的一种强有力的治疗方法。不同的突变基因、遗传方式和基因大小均会影响基因治疗方式的选择。世界范围内临床试验数量的不断增加反映了基因治疗的潜力:在过去 30 年中完成、进行中或批准的临床试验超过 2335 项,自 2012 年以来显著增加^[9]。眼有几个特点使其成为基因治疗的理想靶点:可视性和相对非侵入性,即疗效可以通过临床常规无创性检查进行评估和监测,血-视网膜屏障可减少全身性的免疫反应^[10-11]。2017 年 12 月,针对遗传性视网膜变性(IRD)的基因治疗产品首次上市。由 Spark Therapeutics Inc. 开发的 Luxturna(Voretigene Neparvovec)被美国食品和药物管理局(FDA)批准通过向视网膜色素上皮(RPE)细胞递送 RPE65 基因来治疗严重 IRD、LCA^[12]。

5.1.1 基因替代治疗

基因替代治疗主要适用于功能丧失的 ARRP,通过载体把一个正常基因导入感光细胞内,以非生理方式持续提高基因表达,以代替

不正常、缺陷的基因,从而延缓或阻止光感受器细胞的凋亡。

MERTK 是控制 RPE 细胞吞噬功能的重要信号蛋白,其丢失导致感光细胞变性。MERTK 突变导致外节碎片的积累。在人类中,MERTK 突变会导致 ARRP 和早期发病的视网膜营养不良。Ghazi 等^[13]的研究将人 MERTK(hMERTK)包装成腺相关病毒(AAV2),黄斑下注射 rAAV2-VMD2-hMERTK 治疗 6 例 MERTK 相关性 RP 患者,所有患者均完成 2 年随访。结果显示,3 例患者在治疗后主观和客观视力得到改善,基因治疗 MERTK 可以改善部分患者的临床症状。

5.1.2 基于 RNA 的治疗

RP 中某些突变基因的大小超过传统 AAV 载体负载,可选择基于 RNA 的疗法,对于显性负性的情况,使用反义寡核苷酸(AONs)可以使突变的等位基因被定位和降解,本来被阻断的正确的等位基因可以重新编码有功能的蛋白质,USH2A^[14]、ABCA4^[15]突变基因的前 mRNA 剪切被更正。siRNA 和核酶用于转录后基因沉默,可以用于降解 ADRP 中 RHO 的转录^[16]。

5.2 基因编辑

视杆细胞决定簇 Nr1 的急性基因敲除被证明能将成年视杆细胞重新编程成视锥细胞,使其抵抗 RP 特异基因突变的影响,从而防止继发性视锥细胞丢失。

Zhu 等^[17]报道了一种利用 CRISPR/Cas9 介导的细胞重编程的基因治疗策略,通过将一种突变敏感细胞类型转换为一种突变不敏感/耐药的细胞类型,从而恢复组织结构和功能。将此策略应用于 ARRP 的 RD10 小鼠和 PDE 突变小鼠,发现视锥细胞增多,同时保留了视锥细胞、视杆细胞和视网膜组织,恢复了视觉功能。吴世靖^[18]发现,CRISPR/Cas9 系统可准确、有效地进行基因编辑。Bakondi 等^[19]在 RHO 突变的大鼠模型视网膜下单次注射 sgRNA/Cas9 质粒,利用电穿孔刺激光感受器吸收质粒,进而选择性地删除携带突变的等位基因,注射后大鼠的视功能改善。Latella 等^[20]对携带 Pro23His(P23H)突变大鼠模型进行基因编辑治疗,使 Rho 蛋白表达下降。Suzuki 等^[21]通过 CRISPR/Cas9 将携带 Mertk 2 号外显子的载体插入到 Mertk 基因 1 号内含子至 2 号外显子间,大鼠视功能提高。

以上研究说明基因编辑技术作为一种与基因和突变无关的治疗方式,在基因治疗方面有极大的潜能,可能成为未来基因治疗的主要发展方向。

5.3 光遗传学

视觉恢复的光遗传策略基于一个简单的概念——在视杆细胞和视锥感光细胞死亡后,将剩余的光不敏感的视网膜神经元转化为光敏细胞,以传递视网膜的光敏感性^[22]。RP 有广泛的光感受器丢失,只剩下双极细胞和视网膜神经节细胞。

微生物视紫红质能在动物模型中通过腺相关病

毒(AAV)玻璃体内注射 ChR2,成功地恢复视觉功能^[22-25]。有研究通过对病毒载体的检测,发现在正常鼠和 rd1 小鼠的视网膜中,ChR2 的表达稳定,且持续时间接近小鼠的整个生命周期^[26]。在长达 64 周的观察中发现,在 RCS 大鼠视网膜中,ChR2 的表达既不会产生可检测到的毒性反应,也不会产生免疫有害反应^[27-28]。

因此,在临床应用中 ChR2 的潜力似乎相当大。在 2017 年 Allergan 收购的 Retrosense Therapeutics 公司赞助下,ChR2 基因被转导到晚期 RP 患者的视网膜内神经元正在进行 1/2 期临床试验中^[29]。

6 RP 精准医疗的挑战及前景

精准医疗在遗传性视网膜疾病中已经取得了长足的进展,但并不意味着开发合适的治疗产品是容易的,目前仍存在很多挑战。

治疗晚期光感受器变性是一个很大的挑战。基因治疗载体合成过程中可能引起新的突变,而突变可能引起有害蛋白质的合成^[30]。非病毒载体对目的基因的转移效率低,病毒载体对携带基因有大小限制,且病毒载体有一定的免疫原性,其安全性仍是问题^[31]。视网膜下注射是目前基因治疗载体传递到视网膜最主要的方式,但操作本身会损害正常的视网膜结构^[32],而眶周及系统性传递方式会因血-视网膜屏障的存在降低传递效率,新的替代方案仍需进一步研究。但基于近年取得的进展,视网膜基因治疗的前景仍非常光明^[33]。

参考文献

- [1] GOETZ L H, SCHORK N J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress [J]. *Fert Ster*, 2018, 109 (6): 952-963.
- [2] CARRASCO-RAMIRO F, PEIRÓ-PASTOR R, AGUADO B. Human genomics projects and precision medicine [J]. *Gene Ther*, 2017, 24 (9): 551-561.
- [3] VAYENA E, BLASIMME A. Biomedical big data: new models of control over access, use and governance [J]. *J Bioethical Inquiry*, 2017, 14 (4): 501-513.
- [4] HUGHE S, DYFRIG A. Economics of pharmacogenetic-guided treatments: underwhelming or overstated? [J]. *Clin Pharmacol Therap*, 2018, 103 (5): 749-751.
- [5] YANG L, CUI H, YIN X, DOU H, ZHAO L, CHEN N, et al. Dependable and efficient clinical molecular diagnosis of Chinese RP patient with targeted exon sequencing [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0140684.
- [6] BIRTEL J, GLIEM M, MANGOLD E, MÜLLER P L, HOLZ F G, NEUHAUS C, et al. Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (12): e207958.
- [7] PARMEGGIANI F, BARBARO V, MIGLIORATI A, RAFFA P, NESPECA P, DE NADAI K, et al. Novel variants of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa families and genotype-phenotype correlation [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2017, 27 (2): 240-248.
- [8] WHEWAY G, DOUGLAS A, BARALLE D, GUILLOT E. Mutation spectrum of PRPF31, genotype-phenotype correlation in retinitis pigmentosa, and opportunities for therapy [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 192: 107950.
- [9] HANNA E, RÉMUZAT C, AUQUIER P, TOUMI M. Gene therapies development: slow progress and promising prospect [J]. *J Mark Access Health Policy*, 2017, 5 (1): 1265293.
- [10] PETRS-SILVA H, LINDEN R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa [J]. *Clin Ophthalmol*, 2014, 8: 127-136.
- [11] MOORE N A, MORRAL N, CIULLA T A, BRACHA P. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18 (1): 37-49.
- [12] DARROW J J, LUXTURNA. FDA documents reveal the value of a costly gene therapy [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24 (4): 949-954.
- [13] GHAZI N G, ABOUD E B, NOWILATY S R, ALKURAYA H, ALHOMMADI A, CAI H, et al. Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial [J]. *Human Genetics*, 2016, 135 (3): 327-343.
- [14] SLLJKERMAN R W, VACHÉ C, DONA M, GARCÍA-GARCÍA G, CLAUSTRES M, HETTERSCHILT L, et al. Antisense oligonucleotide-based splice correction for ush2a-associated retinal degeneration caused by a frequent deep-intronic mutation [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5 (10): e381.
- [15] SANGERMANO R, GARANTO A, KHAN M, RUNHART E H, BAUWENS M, BAX N M, et al. Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides [J]. *Genet Med*, 2019, 21 (8): 1751-1760.
- [16] YAU E H, BUTLER M C, SULLIVAN J M. A cellular high-throughput screening approach for therapeutic trans-cleaving ribozymes and RNAi against arbitrary mRNA disease targets [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 151: 236-255.
- [17] ZHU J, MING C, FU X, DUAN Y, HOANG D A, RUTGARD J, et al. Gene and mutation independent therapy via CRISPR-Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (6): 830-833.
- [18] 吴世靖. CRISPR/Cas9 技术在遗传性眼病基因治疗中的应用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36 (11): 892.
- [18] WU S J. Applications of CRISPR/Cas9 genome editing technology in gene therapy for hereditary eye diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36 (11): 892.
- [19] BAKONDI B, LV W, LU B, JONES MK, TSAI Y, KIM K J, et al. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Mol Ther*, 2016, 24 (3): 556-563.
- [20] LATELLA M C, DI SALVO M T, COCCHIARELLA F, BENATI D, GRISENDI G, COMITATO A, et al. In vivo editing of the human mutant rhodopsin gene by electroporation of plasmid-based CRISPR/Cas9 in the mouse retina [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 22, 5 (11): e389.
- [21] SUZUKI K, TSUNEKAWA Y, HERNANDEZ-BENITEZ R, WU J, ZHU J, KIM E J, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, 540 (7631): 144-149.
- [22] PAN Z H, LU Q, BI A, DIZHOOR A M, ABRAMS G W. Optogenetic approaches to restoring vision [J]. *Ann Rev Vis Sci*, 2015, 1 (1): 185-210.
- [23] BI A, CUI J, MA Y P, OLSHEVSKAYA E, PU M, DIZHOOR A M, et al. Ectopic expression of a microbial - type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration [J]. *Neuron*, 2006, 50 (1): 23-33.
- [24] CRONIN T, VANDENBERGHE L H, HANTZ P, JUTTNER J, REIMANN A, KACSÁ A E, et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6 (9): 1175-1190.
- [25] DOROUDCHI M M, GREENBERG K P, LIU J, SILKA K A, BOYDEN E S, LOCKRIDGE J A, et al. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness [J]. *Mol Ther*, 2011, 19 (7): 1220-1229.
- [26] IVANOVA E, PAN Z H. Evaluation of the adeno-associated virus mediated long-term expression of channelrhodopsin-2 in the mouse retina [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1680-1689.
- [27] SUGANO E, ISAGO H, WANG Z, MURAYAMA N, TAMAI M, TOMITA H. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2011, 18 (3): 266-274.
- [28] DOROUDCHI M M, GREENBERG K P, LIU J, SILKA K A,

BOYDEN E S, LOCKRIDGE J A, *et al.* Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(7):1220-1229.

[29] BAKALL B, HARIPRASAD S M, KLEIN K A. Emerging gene therapy treatments for inherited retinal diseases [J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 2018, 49(7):472-478.

[30] MARTINEZ-FERNANDEZ DE LA CAMARA C, CEHAJIC-KAPETANOVIC J, MACLAREN R E. RPGR gene therapy presents challenges in cloning the coding sequence [J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2020, 20(1):63-71.

[31] 李淑贤, 刘铁城, 陈晓菲, 代艾艾, 高旭辉, 李润璞. 视网膜色素变性的基因治疗进展 [J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(1):82-84, 88.

LI S X, LIU T C, CHEN X F, DAI A A, GAO X H, LI R P. Advances in gene therapy for retinitis pigmentosa [J]. *Acad J Chin PLA Med Sch Jan*, 2017, 38(1):82-84, 88.

[32] GREGOREVIC P, BLANKINSHIP M J, ALLEN J M, CRAWFORD R W, MEUSE L, MILLER D G, *et al.* Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors [J]. *Nat Med*, 2004, 10(8):828-834.

[33] AURICCHIO A, SMITH A J, ALI R R. The future looks brighter after 25 years of retinal gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(11):982-987.

The mechanism and methods of precision medicine for retinitis pigmentosa

LI Yuyu, LI Ruyi, LI Genlin

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Laboratory, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Genlin, E-mail: ligenlin2018@163.com

[Abstract] Primary retinitis pigmentosa (RP) is an inherited degenerative disease causing severe retinal dystrophy and visual impairment, with a high clinical heterogeneity. Genome sequencing can assist RP in molecular diagnosis to determine disease-causing genes, its pathogenesis, and the correlations of phenotype-genotype, so as to design personalized treatment and promote the development of precision medical. In this paper, we summarize gene therapy, gene editing technology and optogenetic methods in RP precision therapy to provide the methods and prospective of RP precision medicine.

[Key words] retinitis pigmentosa; precision medicine; gene therapy; gene editing; optogenetics