

# 常见角膜病变基因治疗的进展

## Development of Gene Therapy on Common Corneal Diseases

姚娟 李永平 林建贤

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

Juan Yao, Yongping Li, Jianxian Lin

State Key Laboratory of Ophthalmology, Pathology laboratory, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**摘要:** 角膜是基因治疗的理想靶器官。角膜碱烧伤、角膜新生血管、角膜移植术后排斥反应因其病理机制复杂,所牵涉的致病因素众多而治疗困难,疗效不佳。本文就基因治疗在上述疾病中的应用加以综述,以了解基因治疗应用于角膜病变的新进展。《眼科学报》2010;25:1-3。

**关键词:** 角膜碱烧伤;角膜新生血管;移植物排斥反应;基因治疗

**Abstract:** Cornea is an ideal target organ for gene therapy. Corneal alkali burn, corneal neovascularization and corneal graft rejection tend to be with poor treatment efficacy due to its complex pathogenesis. This article aims to update the recent progress of gene therapy on corneal diseases. *Eye Science* 2010; 25: 1-3.

**Key words:** Corneal alkali burn; Corneal neovascularization; Graft rejection; Gene therapy

**角**膜位于眼前部,解剖结构相对明确,便于进行技术操作,利于基因转染过程的观察。同时,角膜免疫赦免的特殊性使其成为基因治疗的理想靶器官<sup>[1]</sup>。角膜碱烧伤、角膜新生血管、角膜移植术后排斥反应是常见的角膜病变,将基因治疗应用于这类病变,是治疗方法的新突破,其应用价值值得期待。

### 一、角膜碱烧伤

角膜碱烧伤是常见的眼外伤,轻度烧伤可因药物治疗而痊愈,留下不同程度的角膜混浊,中、重度烧伤则导致角、结膜的溶解坏死,无菌性角膜溃疡形成甚至角膜穿孔。角膜碱烧伤已成为导致失明的主要原因之一。

眼部碱烧伤后重要的病理特征表现为接触碱

性物质后短时间内大量中性粒细胞侵入到角膜组织。严重碱烧伤后大量白细胞浸润基质是致无菌性溃疡及穿孔的主要原因。机体对烧伤的应激反应中,细胞因子作为炎症介质起着重要作用。角膜遭受化学性物质损伤早期,大量白细胞介素(Interleukin, IL)-1被释放,与其他细胞因子相互诱导、协同,对炎症反应起级联放大作用,诱导中性粒细胞向角膜浸润。IL-1受体拮抗物(Interleukin-1 receptors antagonist, IL-1ra)能特异性与IL-1受体结合,从而阻断其生物学效应。袁进等<sup>[2]</sup>构建IL-1ra基因质粒,通过角膜原位转染,使IL-1ra在角膜局部表达,发现IL-1ra基因治疗组的角膜基质轻、中度水肿,角膜中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞计数在不同时间点均少于对照组,角膜新生血管管径均较细。该研究表明角膜基因原位转染可使IL-1ra在局部有效表达,抑制碱烧伤引起的角膜免疫炎症反应,为眼碱烧伤的治疗提供了

基金项目:国家自然科学基金(30672276)

通讯作者:李永平, E-mail: yongpingli1961@yahoo.com.cn

新的选择。

角膜碱烧伤引起角膜缘干细胞损伤可导致角膜上皮细胞的生长阻滞,随即新生血管长入,使角膜表面血管化。因此,角膜损伤后促进上皮快速修复是促进创伤愈合,减少炎症反应以及继发感染、瘢痕形成的关键。人表皮生长因子(Human epidermal growth factor, hEGF)是一种促细胞有丝分裂原,通过与表皮细胞等细胞表面受体结合,导致受体自身酪氨酸激酶的磷酸化,进而激活下游一系列信号级联反应,最终表现为广泛的促细胞增殖作用。研究发现, hEGF 对于角膜烧伤后修复及愈合具有明显效果<sup>[3-4]</sup>。鲍玉洲等<sup>[5]</sup>利用基因工程技术体外构建 hEGF 基因序列,将该序列插入真核细胞穿梭质粒内,用脂质体包裹制成基因缓释型滴眼剂,观察该滴眼剂对家兔角膜碱烧伤的治疗疗效。在转染后,免疫组织化学染色在全层角膜细胞内亦可见 hEGF 蛋白质表达,于第 7 日达到高峰,细胞转染率高达 98% 以上。作者认为,用 rhEGF-pcDNA3.1 脂质体基因治疗型滴眼剂对碱烧伤角膜治疗即可人为地控制重组 hEGF 基因表达时间,避免过度表达引起的组织异常增生;而且用法简单方便,为治疗角膜损伤建立了一种新的基因疗法。对于损伤诱导的角膜内皮纤维化, Sumioka 等<sup>[6]</sup>探讨阻断转化生长因子- $\beta$ /Smad 信号途径对抑制损伤诱导的角膜内皮纤维化的影响,该研究将 Smad7 基因转入鼠角膜内皮,免疫组织化学检测及电镜观察结果证实腺病毒介导的 Smad7 过度表达能抑制碱烧伤诱导的角膜内皮纤维化反应。

## 二、角膜新生血管

角膜新生血管(Corneal neovascularization, CNV)是多种病变的共同病理现象。许多眼部免疫炎症性、感染性、外伤性、医源性以及角膜变性等疾病均可诱发角膜新生血管的形成。CNV 不仅严重影响视力,还可破坏角膜及房水的正常微环境,使眼前节相关免疫赦免偏离消失,导致同种异体角膜移植术后排斥反应的发生率大大增加。此外,在角膜移植术后, CNV 的发生和发展也严重影响了角膜植片的长期存活。新生血管结构较脆弱,易渗透,常因出血渗出及继发纤维化等最终导致失明,这也是目前常见的致盲原因之一。

新生血管的形成是一个复杂的生物学过程, CNV 生成学说包括炎症学说、缺氧学说、细胞因子

平衡学说等。有效地抑制 CNV 的形成是当前眼科学研究的热点之一,但到目前为止尚未发现有效的治疗手段,基因疗法或许可以给 CNV 机制研究和治疗带来新的思路。

内皮抑素(Endostatin, ES)是近年来发现的一种内源性新生血管抑制因子,在肿瘤的防治中,利用载体把 ES 基因导入人体内发挥其抗肿瘤效应,已取得了良好的实验进展。Blezniger 等<sup>[7]</sup>采用动物肌肉注射 ES 基因表达质粒, Chen 等<sup>[8]</sup>以阳离子脂质体介导的 ES 表达质粒静脉注入动物体内,两项研究均观察到肿瘤生长受抑制, Sauter 等<sup>[9]</sup>用重组腺病毒介导 ES 基因转至荷瘤裸鼠体内,发现血中 ES 持续明显升高,可达 906  $\mu\text{g/L}$ ,同时还明显抑制了肺癌、乳腺癌的生长。将 ES 作为眼部抗血管生成基因治疗策略的靶点,具有诱人的前景。李华等<sup>[10]</sup>以 pCI 质粒作为 poly RGD-ES 基因的表达载体,通过结膜下注射途径将阳离子脂质体介导将 ES 基因转染至角膜组织,观察其对碱烧伤诱导的 CNV 的抑制作用,发现以转染后 3 d 表达最明显。ES 能在一定程度上抑制角膜新生血管的生长,表现为新生血管出现时间延迟和血管面积减少,但不能完全抑制其生长。

基因治疗 CNV 除了靶向 ES 外,针对角膜血管新生中起主要作用的血管形成因子-VEGF 家族也有相关研究。Kim 等<sup>[11]</sup>利用 siRNA 靶向 VEGFA、VEGFR1、VEGFR2 有效抑制了单纯疱疹病毒诱导的 CNV。Singh 等<sup>[12]</sup>将 VEGF siRNA 质粒 Psec Neo-VEGF.C 注射入碱烧伤诱导的 CNV 模型的鼠角膜基质内,结果显示 VEGF siRNA 明显抑制了 VEGF mRNA 的表达和白细胞的浸润,其对 CNV 的抑制率达到了 73%。纤溶酶原 K5 基因转染研究证实 K5 能有效抑制 CNV,其机制可能是通过抑制 VEGF 的表达。Yu 等<sup>[13]</sup>研究发现表达 K5 质粒能在 COS 细胞表达, K5 转染的 COS 细胞条件培养液明显抑制了人类脐静脉内皮细胞增殖, RT-PCR 和免疫组化证实 K5 在结膜与角膜表达, CNV 受到 K5 基因转染的明显抑制。

## 三、同种异体移植排斥反应

同种异体移植排斥可导致角膜移植术的失败。CD4<sup>+</sup>T 细胞介导异体移植反应,是抗排斥治疗的靶点。Jessup 等<sup>[14]</sup>将复制缺陷腺病毒载体编码的抗 CD4 单体抗体片段(Anti-CD4 scFvs)转入供体鼠角膜内皮,以尝试减轻同种异体移植排斥反

应。研究发现 Anti-CD4 scFvs 能有效阻断同种异体移植排斥反应,但是研究通过对比 344 例接受角膜移植的病人,术时或术前 3 日以 Anti-CD4 scFvs 转入供体角膜, Anti-CD4 scFvs 在眼内的局限性表达并不能延长异体角膜移植的存活率。

外用糖皮质激素几乎运用于每一例接受角膜移植手术的患者,但不可逆的免疫排斥反应仍是移植失败的主要原因。体外实验模型中,基因治疗已被证明能够调节移植排斥反应。Parker 等<sup>[15]</sup>评估糖皮质激素可诱导的启动子用于控制的慢病毒介导的基因转移到羊和人的角膜后的基因表达的疗效。在地塞米松存在的条件下,这一启动子可诱导绵羊和人类角膜供体中转基因快速、持续的表达。因此,研究认为在转基因调节的供体角膜移植排斥反应中,激素诱导的启动子有助于更好的调控基因治疗。

Gong 等<sup>[16]</sup>研究局部和全身病毒介导的 IL-10 基因转移对角膜移植存活率的影响,在这项研究中,作者探讨了病毒 IL-10 体外和体内基因转移在角膜移植实验模型中的免疫调节作用。无论体外脂质体介导 IL-10 基因转移或体外腺病毒介导 IL-10 基因转移均延长角膜移植植物存活率。相比之下,在接受全身性腺病毒介导 IL-10 基因转移角膜移植植物存活率明显延长。此外,只有系统性 IL-10 基因治疗调节了引流淋巴结中作为评判疗效的细胞因子 mRNA 的表达谱。

可见,角膜移植术辅以基因治疗可减轻移植排斥反应,提高角膜移植植物存活率。

#### 四、小结

角膜位于眼球的最前方,易遭受外界损伤。碱烧伤可使角膜缺氧、营养严重障碍,受损的角膜上皮不能再生,溃疡经久不愈,导致角膜血管化、角膜白斑等严重并发症,从而影响角膜透明度,使视力降低。角膜移植术是取代置换混浊、病变的角膜组织,控制角膜病变的及恢复视力的一种重要手段,但术后发生的排斥反应常导致角膜移植术的失败。角膜新生血管多见于感染、炎症、外伤或角膜手术后。血管化的角膜不但严重影响视力,也是角膜移植失败的主要原因。针对角膜病变过程中的核心基因及其表达或调节的靶蛋白、靶因子,在分子水平上进行矫正,可能缓解病情或控制症状,并达到治疗效果。对角膜疾病发生、发展机制的深入研究,对基因及载体的特性、细胞生物学以

及体内的免疫反应有更多了解,设计出有效的载体及进一步维持基因在角膜的表达时效是未来研究的重心,将为角膜病变的基因治疗开辟更广阔的前景。

#### 参考文献

1. Parker DG, Brereton HM, Coster DJ, et al. The potential of viral vector-mediated gene transfer to prolong corneal allograft survival [J]. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(1):33-44.
2. 袁进,周世有,王铮,等. 角膜碱烧伤白细胞介素-1ra 基因治疗的实验研究[J]. *眼科*, 2007, 16(3): 165-167.
3. Crazul-bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, et al. Wound healing: The role of growth factor[J]. *Drug Today*, 2003, 39(10):787-791.
4. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosia R, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma and inflammatory cells[J]. *Prog Retinal Eye Res*, 2001, 20(5):625-637.
5. 鲍玉洲,张艳敏,李建新. 人表皮生长因子真核细胞缓释型滴眼剂的基因治疗研究[J]. *河南医学研究*, 2007, 16(1):7-9.
6. Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, et al. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium [J]. *Mol Vis*, 2008, 14:2272-2281.
7. Blezinger P, Yin G, Xie L, et al. Intravenous delivery of an endostatin gene complexed in cationic lipid inhibits systemic angiogenesis and tumor growth in murine models [J]. *Angiogenesis*, 1999, 3(3):205-210.
8. Chen QR, Kumar D, Stass SA, et al. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(15):3308-3312.
9. Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, et al. Adenovirus mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9):4802-4807.
10. Hua L, Ping L, Hongyan G, et al. Inhibitive effects of antiangiogenesis with mutant endostatin gene transforming on corneal neovascularization induced by alkali burn[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2009, 29(4):259-261.

(下转第 10 页)