

RNA 干扰技术与眼科疾病

秦贤杰¹, 彭燕一²

作者单位:¹(541004) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院;²(541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科

作者简介:秦贤杰, 在读硕士研究生, 研究方向:眼底病。

通讯作者:彭燕一, 教授, 主任医师, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向:白内障、角膜屈光手术、眼底病。 yypeng_7@hotmail.com

收稿日期:2014-01-12 修回日期:2014-04-11

RNA interference technology and Ophthalmic diseases

Xian-Jie Qin¹, Yan-Yi Peng²

¹Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yan-Yi Peng, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yypeng_7@hotmail.com
Received:2014-01-12 Accepted:2014-04-11

Abstract

• RNA interference is an important discovery in the field of biology in recent years, which is a gene silencing phenomena of specific sequences induced by double-stranded RNA. RNAi technology becomes perfect and mature increasingly, and has been gradually applied in functional genomics, regulatory mechanisms of gene expression research areas. As an effective tool, RNAi technology in gene therapy of eye disease has also made great progress. This paper briefly reviews the current researches of RNAi technology adopting in corneal endothelial cells injury and therapies of cataract, glaucoma, neovascular diseases and proliferative vitreoretinopathy.

• **KEYWORDS:** RNAi technology; corneal endothelial cells injury; cataract; glaucoma; neovascular diseases; proliferative vitreoretinopathy

Citation: Qin XJ, Peng YY. RNA interference technology and Ophthalmic diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14 (5):849-851

摘要

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年来生物学研究领域的一项重大发现, 是由双链 RNA 诱导的特异性序列的基因沉默现象。近年来, RNAi 技术日益完善、成熟, 已逐渐应用于功能基因组学、基因表达调控机制等研究

领域。作为一种有效的工具, RNAi 技术在眼科疾病的基因治疗方面也取得了很大的进展。本文就近年来国内外关于 RNAi 技术与角膜内皮细胞损伤、白内障、青光眼、新生血管性疾病、增生性玻璃体视网膜病变的研究现状进行简要概括。

关键词: RNAi 技术; 角膜内皮细胞损伤; 白内障; 青光眼; 新生血管性疾病; 增生性玻璃体视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.17

引用: 秦贤杰, 彭燕一. RNA 干扰技术与眼科疾病. 国际眼科杂志 2014; 14(5):849-851

0 引言

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体转录水平上的基因阻断, 是外源性和内源性双链 RNA 在生物体内特异性诱导同源靶基因 mRNA 的降解进而引起转录后的基因沉默现象。这一现象在自然界中广泛存在, 是生物体为抵御外来基因侵害的一种防御反应机制, 在稳定基因组方面发挥了重要的作用。目前 RNAi 技术已成功应用于病毒复制的抑制、肿瘤的治疗、功能基因组学、遗传性疾病等方面。近年来的研究表明, RNAi 技术可以促进角膜内皮细胞增殖修复; 抑制青光眼滤过术后 Tenon 囊成纤维细胞的增生和移行; 还可以抑制晶状体上皮细胞的分化与增殖; 在治疗新生血管性疾病、增生性玻璃体视网膜病变的研究中也取得了较大的进展。RNAi 技术在眼科疾病的治疗研究中显示出了广阔的发展前景。

1 RNAi 技术的作用机制

RNAi 的作用机制现阶段还不十分清楚, 现已初步阐明 RNAi 发生机制大致分为三个阶段: (1) 起始阶段: 外源性基因如病毒基因、人工转入基因、转座子等随机整合到宿主细胞组内并进行转录, 产生的 dsRNA 被一双链 RNA 酶 III 型 (Dicer 酶) 切割成 21 ~ 23nt 的短链 dsRNA, 即小干扰 RNA (siRNA)。 (2) 效应阶段: 反义 siRNA 与体内一些酶 (包括内切酶、外切酶、解旋酶等) 结合成一个核酶复合物, 形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 激活 RISC 还需要一个 ATP 依赖的 siRNA 解双链的过程。反义 RNA 单链作为引导序列, 遵循碱基互补配对原则特异性识别互补的 mRNA, 由核酸内切酶在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置将 mRNA 切割成 21 ~ 23nt 的片段, 特异性地抑制了靶基因的表达。 (3) 级联放大阶段: 新产生的 dsRNA 片段作为靶 mRNA 的引物并与其结合, 在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 作用下以 mRNA 为模板, 扩增产生更多新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 酶切割产生大量的次级 siRNA, 使得 RNAi 的作用进一步放大, 最终靶 mRNA 完全降解, 从而抑制相关基因的表达^[1,2]。

2 RNAi 技术与眼科疾病

2.1 RNAi 与角膜内皮细胞损伤 角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CECs) 位于角膜后部的内皮层, CECs 通过机械性屏障及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、水通道蛋白-1、ATP 酶及各类离子通道共同作用维持着角膜的透明度及角膜基质层的半脱水状态。成年人角膜内皮细胞丧失有丝分裂能力, 损伤后只能靠周围邻近细胞扩大移行来填补缺失细胞的空间。然而, 除了年龄、种族外, 一些意外创伤和眼部疾病如 Fuchs 角膜内皮营养不良、内眼手术、眼外伤、药物毒性、青光眼和眼内炎等均可导致角膜内皮细胞的丢失, 引起角膜失代偿^[3]。研究表明转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族可以调节细胞的生长和分化, 抑制肿瘤的生长等多种生物学功能。人眼房水中 TGF- β 家族的主要亚型为 TGF- β_2 型。TGF- β_2 在角膜内皮细胞的增殖分化过程中起到重要调节作用, 其信号转导的下游调节因子中 CTGF 被认为是最重要的。张红旭等^[4] 利用人工合成的 CTGF siRNA 通过脂质体转染入培养的牛 CECs, 观察 RNA 干扰沉默 CTGF 的表达对牛 CECs 增殖的影响, 结果发现 CTGF siRNA 能有效沉默 CECs 内 CTGF mRNA 表达, 减弱 TGF- β_2 对牛 CECs 增殖的抑制作用并可促进牛 CECs 的增殖。研究者还发现成年人 CECs 对分裂素敏感性的下降可能与细胞周期依赖性激酶抑制因子 p27Kip1 等因子相关。p27Kip1 作为一种酶抑制蛋白 (kinase inhibition protein, KIP) 类细胞周期依赖性激酶抑制剂, 其通过抑制 eyelinD 与 CDK2、eyelinE 与 CDK4 的活性, 阻断了细胞周期由 G1 期向 S 期转化, 从而抑制细胞有丝分裂。黄渝侃等^[5] 设计合成了针对 p27Kip1 的 siRNA 寡核苷酸, 并成功构建了表达载体, 以脂质体转染入培养的牛 CECs, 以免疫印迹法检测 p27Kip1 的蛋白表达, 发现针对 p27Kip1 的 shRNA 可显著降低 p27Kip1 基因及蛋白的表达水平, 研究表明针对 p27Kip1 的 RNA 干扰可以促进 CECs 增殖。RNAi 技术为 CECs 增殖功能的研究提供了新的方法。

2.2 RNAi 与白内障 晶状体混浊称为白内障。白内障在我国的致盲性眼病中居于首位。目前白内障治疗以手术为主, 白内障摘除术后出现的晶状体后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 又称为后发性白内障, 是白内障摘除术后最常见的并发症, 也是导致术后患者已恢复的视力再次下降的主要原因, PCO 的发生率在成人 30% ~ 40%, 在儿童几乎为 100%^[6,7]。随着手术的技巧、人工晶状体材料和设计的改进, PCO 的发生率较之前有所降低, 但在临床上仍是一个常见的难题。研究发现, 白内障术后 PCO 的发生机制是由于术后炎症反应和血-房水屏障的破坏, 残余的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在各种细胞因子及细胞外基质共同参与下, 在后囊膜上增殖、迁移及上皮-间质转化^[8]。随着分子生物学技术的发展, 基因治疗在 PCO 的防治研究中日益受到关注。细胞周期蛋白在调控细胞周期中起到重要作用, 周期蛋白及其调控因子对细胞增殖、分裂具有重要意义。周期蛋白 D1 是细胞周期的启动因子, 通过抑制周期蛋白 D1 的表达, 可使细胞停滞于 G1 期。陆宏等^[9] 通过合成靶向大鼠 Cend1 基因的 siRNA 转染至体外培养大鼠的 LECs 中, 发现靶向 Cend1 的 siRNA 可以有效降低大鼠 LECs Cend1 mRNA 及周期蛋白 D1 蛋白的表达, 进而抑制 LECs 增殖。染色体端粒 DNA 的长度是由

端粒来维持的, 端粒酶活性对维持端粒长度及细胞长期生存有重要意义。蒋永祥等^[10] 将人工合成的 TERT siRNA 片段转染至 LECs, PCR 检测端粒酶反转录酶 (TERT) 的基因表达的变化, 发现 RNAi TERT 能有效抑制 LECs 的增殖。通过应用 RNAi 技术阻断引起 LECs 增殖的路径, 可以达到阻止 PCO 发生的目的。为临床上治疗术后发性白内障提供了新的路径。

2.3 RNAi 与青光眼 青光眼是一组以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的疾病, 是世界第二位致盲性眼病。当前滤过性手术仍是青光眼的主要治疗手段, 虽然滤过性手术有了较大的发展, 但滤过通道的狭窄及滤过区瘢痕组织增生是青光眼滤过手术失败的主要原因, 尽管抗代谢药物的应用使手术的成功率得到了提高, 但因其可产生长期低眼压、感染、滤过泡渗漏等毒副作用, 使得该类药的应用受到了限制^[11]。近年来研究发现, TGF- β_2 可以调节创伤愈合过程中多种细胞的反应, 骆玮等^[12] 构建针对 TGF- β_2 基因的特异性 shRNA 载体, 转染入体外培养的人眼 Tenon's 成纤维细胞 (Tenon's capsule fibroblasts, TCFs), 采用 MTT 比色法及 ELISA 法分别检测细胞增生的情况及 shRNA 对 TGF- β_2 表达相应蛋白的抑制作用, 结果转染 TGF- β_2 shRNA 实验组的细胞增生及 TGF- β_2 蛋白的表达都受到一定程度的抑制, 得出靶向 TGF- β_2 的 siRNA 表达载体能显著抑制人的 TGF- β_2 蛋白的表达及成纤维细胞增殖。乔芳等^[13] 通过转染 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体入人结膜囊成纤维细胞, 采用 RT-PCR 检测, 证实了 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体对 TGF- β_2 mRNA 表达的抑制, 为提高青光眼手术成功率奠定了实验基础。研究表明, 核转录因子 κB (NF- κB) 在创伤后组织的修复、促进创伤愈合中起到重要的作用。NF- κB 抑制蛋白激酶 (IKK) 是 NF- κB 信号系统上游的一个关键激酶, Ye 等^[14] 等通过向小梁切除术后的猴子球结膜下注射靶向猴 IKK- β 的 siRNA, 发现其可以显著抑制猴眼球筋膜囊成纤维细胞的增殖, 为利用 RNA 干扰技术治疗青光眼滤过术后滤过区瘢痕的形成提供了新的靶点、方法。

2.4 RNAi 与新生血管性疾病 眼部新生血管性疾病是多种损害人类视力的因素之一, 血管新生是由多因素共同参与的过程, 因此确定并调控血管新生的各种相关因子是当前抗血管新生的主要研究目标。以往的研究表明, 在一系列复杂的调控机制中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 被认为是新生血管形成的诸多调节因素中起关键作用的因子^[15]。Zuo 等^[16] 利用化学合成的针对小鼠 VEGF-A 特异的 siRNA 片段注射到角膜碱烧伤小鼠的球结膜下, 发现 VEGF-A siRNA 能有效地抑制小鼠碱烧伤后角膜新生血管的形成, 其在角膜新生血管治疗的发展中有着很大的潜在可能。毛妮妮等^[17] 通过构建针对 OIR 小鼠 VEGF 的 siRNA 干扰载体, 筛选并进行慢病毒包装后玻璃体腔注射, 发现靶向 VEGF 的 RNA 干扰慢病毒能有效抑制 OIR 小鼠模型中 VEGF 及其下游通路蛋白的表达, 从而抑制视网膜新生血管的形成, 为临床上视网膜新生血管病变的防治提供了新的思路和途径。研究发现, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 特异性 dsRNA 能显著抑制 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达。宋伟

涛等^[18]在研究 HIF-1 α 特异性 dsRNA 抑制鼠视网膜新生血管的剂量效应的关系中,证实了这一观点并得出脂质体与质粒的最佳比例为 1:1。RNAi 技术作为一种阻断基因表达的新手段,为眼部新生血管性疾病开创了一条基因治疗的新途径。

2.5 RNAi 与增生性玻璃体视网膜病变 增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是指穿通性眼外伤、裂孔源性视网膜脱离或视网膜复位术后,视网膜色素上皮细胞(RPE)、神经胶质细胞的增生和收缩,在玻璃体腔及视网膜前后面形成可收缩的细胞性膜,造成牵拉性视网膜脱离的病变。虽然通过手术治疗能够使 PVR 患者脱离的视网膜复位,但仍有约 8% ~ 10% 的病例因 PVR 的再发而最终失败^[19]。PVR 发病的具体机制目前还不太清楚,但已证实 PVR 是多种体液因素和细胞因素之间相互调节、作用调控眼内细胞增殖的过程^[20],大多数学者认为 RPE 和神经胶质细胞的增殖和移行是 PVR 发生发展的关键因素。目前临床上尚没有疗效确切的药物用于治疗 PVR,因此,寻求新的治疗 PVR 的途径成为当前的研究的热点。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是近年来新发现的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与多种信号转导通路,与细胞的持续增殖、粘附性丧失、迁移以及分化凋亡等相关。张奕霞等^[21]将人工合成靶向 ILK 基因的特异性 siRNA 转染 hRPE 细胞,得出 siRNA 可以抑制 ILK 基因的表达,同时还可以抑制 hRPE 细胞的增殖并且在一定范围成时间浓度依赖性。Robo 家族(Roundabout family)是与发育有关的保守跨膜蛋白家族,主要在神经系统中表达并且在神经元轴突发育中发挥着重要作用。研究发现 Robo1 存在于 PVR 膜的细胞外基质中,而且也可能来源于去分化的 RPE 细胞中。Huang 等^[22]体外实验中用 siRNA 阻断 Robo1 的表达发现人 RPE 细胞的增殖受到抑制,同时在兔 PVR 模型中也有效的抑制了 PVR 的形成。Robo 可能成为预防或治疗 PVR 发生的新的靶点。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)能够促进细胞生长、增殖、移行、黏附以及合成细胞外基质等功能,是 TGF- β 的下游效应介质,在创伤修复、组织纤维化进程中起重要作用。于颖^[23]利用人 CTGF RNAi 慢病毒载体经细胞包装以后产生慢病毒体外感染 ARPE-19 细胞,结果显示慢病毒感染后的 ARPE-19 细胞中的 CTGF 的蛋白水平明显减低,ARPE-19 产生 CTGF、FN、MMP-2 以及 α -SMA 的表达受到干扰。研究表明 CTGF 特异性 siRNA 能够明显抑制 ARPE-19 细胞的增殖,对利用 RNAi 技术抑制 CTGF 的表达来治疗与 CTGF 有关的 PVR 等增生性疾病提供了新的思路。

3 展望

RNAi 作为一种新的基因阻断技术,可以高效、特异地抑制目的基因的表达,其设计简便,可操作性强,因此,近年来得到了迅速发展,成为当前分子生物学领域研究的热点,为特异性基因治疗提供了新的技术手段。RNAi 技术在眼科的研究尚处于起步阶段,研究还多限于基因功能及体外细胞培养和动物实验,RNAi 技术的疗效及安全性还需要进一步证实,真正应用于人体以及临床还存在诸多的困难。随着基因工程技术日益完善,RNAi 技术

的不断改进, RNAi 技术必将从实验阶段走向临床,为眼科疾病的治疗带来巨大的飞跃,成为人类战胜疾病的有力武器。

参考文献

- Rual JF, Klitgord N, Achaz G. Novel insights into RNAi off-target effects using *C. elegans* paralogs. *BMC Genomics* 2007;8:106
- Manjunath N, Dykxhoorn DM. Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov Med* 2010;9(48):418-430
- 朱妮, 张仲臣. 白内障超声乳化手术与角膜内皮细胞损伤. *国际眼科杂志* 2013;13(7):1344-1347
- 张红旭, 陈宏, 张惠成. RNA 干扰沉默 CTGF 对角膜内皮细胞增殖的影响. *实用医学杂志* 2011;27(12):2128-2130
- 黄渝侃, 张明昌, 王勇. 针对 p27 Kipl 基因的小发夹 RNA 对角膜内皮细胞增殖的影响. *中华眼科杂志* 2009;45(3):254-259
- Ronbeck M, Zetterstrom C, Wejde G, et al. Comparison of posterior capsule opacification development with 3 intraocular lens types: five-year prospectivestudy. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(11):1935-1940
- Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):555-562
- Saika S. TGF- β pathobiology in the eye. *Lab Invest* 2006;86(2):106-115
- 陆宏, 张黎明, 管怀进, 等. 靶向 Cnd1 基因的 siRNA 对大鼠晶状体上皮细胞增殖的抑制作用. *江苏医药* 2011;37(9):1015-1018
- 蒋永祥, 吴新华, 卢奕, 等. RNA 干扰抑制端粒酶反转录酶对晶状体上皮细胞增殖的影响. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2012;12(3):157-159
- Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound modulation after filtration surgery. *Surv Ophthalmol* 2012;57(6):530-550
- 骆玮, 孙璐, 李静敏, 等. 特异性转化生长因子- β_2 shRNA 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞的抑制作用. *实验研究* 2010;28(12):1150-1152
- 乔芳, 张芳婷, 傅培, 等. TGF- β_2 特异性 siRNA 载体干扰人结膜囊成纤维细胞表达的研究. *国际眼科杂志* 2012;12(1):30-32
- Ye H, Qian Y, Lin M, et al. Cationic nano-copolymers mediated IKK β targeting siRNA to modulate wound healing in a monkey model of glaucoma filtration surgery. *Mol Vis* 2010;16:2502-2510
- DeNiro M, Al-Mohanna FH, Alsmadi O, et al. The nexus between VEGF and NF κ B orchestrates a hypoxia-independent neovasclogenesis. *PLoS One* 2013;8(3):e59021
- Zuo L, Fan Y, Wang F, et al. A siRNA targeting vascular endothelial growth factor - A inhibiting experimental corneal neovascularization. *Curr Eye Res* 2010;35(5):375-384
- 毛妮妮, 李正原, 黄娟, 等. 靶向血管内皮生长因子的 RNA 干扰抑制氧诱导视网膜病变小鼠视网膜新生血管生成的研究. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2012;14(1):47-52
- 宋伟涛, 张海艳, 夏晓波, 等. HIF-1A 特异性 dsRNA 抑制鼠视网膜新生血管的剂量效应关系. *眼科新进展* 2011;31(5):415-418
- Ricker LJ, Kessels AG, de Jager W, et al. Prediction of proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery: potential of biomarker profiling. *Am J Ophthalmol* 2012;154(2):347-354
- Garweg JG, Tappeiner C, Halberstadt M. Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment. *Surv Ophthalmol* 2013;58(4):321-329
- 张奕霞, 杨炜, 邱明磊, 等. 整合素连接激酶对人视网膜色素上皮细胞增殖的影响. *眼科新进展* 2012;32(9):831-833, 840
- Huang L, Xu Y, Yu W, et al. Effect of Robo1 on retinal pigment epithelial cells and experimental proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(6):3193-3204
- 于颖. 结缔组织生长因子在视网膜色素上皮细胞中的作用机制研究. *北京协和医学院* 2011;31-33