

反义寡核苷酸技术与眼科疾病

蒋姣姣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(541004)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:蒋姣姣,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:2011-12-28 修回日期:2012-03-09

Antisense oligonucleotide technology and ophthalmic diseases

Jiao-Jiao Jiang¹, Yan-Yi Peng²

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

Correspondence to: Yan-Yi Peng. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yypeng_7@hotmail.com
Received:2011-12-28 Accepted:2012-03-09

Abstract

• Corneal injury, cataract, proliferative vitreoretinopathy and glaucoma can all be blindness-causing eye disease, such diseases currently rely mainly on drugs and surgical treatment, but surgery can not prevent their recurrence. In recent years, many researchers discovered that antisense oligonucleotide technology played an important role in eye diseases of the above, and tried to explore a new way to prevent these diseases. This paper briefly reviewed the current research situation of antisense oligonucleotide technology and corneal injury, cataract, proliferative vitreoretinopathy, glaucoma.

• **KEYWORDS:** antisense oligonucleotide technology; corneal wound healing; cataract; glaucoma; proliferative vitreoretinopathy

Jiang JJ, Peng YY. Antisense oligonucleotide technology and ophthalmic diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(5):861-863

摘要

角膜损伤、白内障、青光眼、增殖性玻璃体视网膜病变都是可以致盲的眼科疾病,对此类疾病目前主要是采取药物及手术治疗,而手术不能阻止它们的再发。近年来,越来越多的研究者发现,反义寡核苷酸技术在以上眼科疾病的发生发展中起重要作用,并试图探索出一条新的防治途径。现就近年来国内外对于反义寡核苷酸技术与角膜损伤、白内障、青光眼、增殖性玻璃体视网膜病变的

研究现状进行简要概述。

关键词:反义寡核苷酸技术;角膜损伤修复;白内障;青光眼;增殖性玻璃体视网膜病变

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.16

蒋姣姣,彭燕一.反义寡核苷酸技术与眼科疾病.国际眼科杂志 2012;12(5):861-863

0 引言

反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)^[1]技术是应用反义寡核苷酸类药物通过 Watson-Crick 碱基配对与细胞内核酸(DNA 或 RNA)特异结合形成杂交分子,从而在转录和翻译水平抑制特定基因表达的基因治疗技术,是一种新的药物开发方法。ASODN 主要是针对癌基因、生长因子及其受体、信号传导通路等设计的,其作为一种新的工具已广泛应用于体内外生物进程机制的研究,作为一种新的有希望的药物可用于癌症、病毒感染等疾病^[2]。近来的研究表明,ASODN 技术在眼科疾病的发展过程中起重要作用,应用 ASODN 技术可抑制兔角膜基质成纤维细胞^[3]、兔青光眼滤过术后结膜囊成纤维细胞^[4]的转化、增殖,还可以抑制晶状体上皮细胞的增殖;其在体外可明显抑制人视网膜色素上皮细胞(human retinal pigment epithelium, hRPE)增殖,并能诱导其凋亡^[5];亦可抑制体外视网膜神经胶质细胞(retinal glial, RG)的迁移^[6]。ASODN 技术及其与眼科疾病关系的研究取得了重要的进展。

1 ASODN 技术的作用机制及药物研究

在目前的基础研究和临床实验中,ASODN 技术已经成为调节基因表达的一种重要工具。随着第一代的硫代寡核苷酸,第二代的混合骨架寡核苷酸,第三代的多肽核酸的出现,对 ASODN 作用机制的研究不断深入。除了诱导 RNaseH 切割机制以外,ASODN 诱导的其它切割机制也不断出现,ASODN 还可以干扰 mRNA 代谢,包括 5'加帽、剪接、翻译起始、延长等各个步骤,使人们可以根据不同的需要选择不同作用机制的反义寡核苷酸^[7]。

ASODN 作为基因表达的反向抑制剂,首先必须具备 3 个主要条件:即它应有足够的稳定性、对目的基因的选择性以及细胞的通透性和靶向性。满足 3 个首要条件的方法主要是针对 ASODN 在化学修饰、序列选择、靶向转运等方面加以改善:ASODN 的各种化学修饰包括第二代、第三代 ASODN 明显增强其反义作用和对核酸酶的稳定性;对 mRNA 结构研究的深入、计算机辅助药物设计及生物芯片技术的发展有望进一步优化 ASODN 靶向序列的选择;多种药物靶向转运系统的应用改善了 ASODN 类药物的生物利用度及其对作用部位的通透性和靶向性。这些方面的研究进展必将使 ASODN 类药物具有更为广阔的应用前景^[8]。

2 ASODN 技术与眼科疾病

2.1 角膜损伤修复 角膜是位于眼球前壁的一层透明膜。透明是角膜组织的最大特征,是担负其生理功能的基本要素。一旦因外伤或者有害刺激,导致角膜损伤而造成其透明度丧失发生混浊,将会对视力产生重大影响甚至失明。角膜的创伤修复是一系列的动态级联过程^[9],通常包括细胞的激活、增殖、分化、细胞因子的释放、细胞外基质的合成和重建等,此过程是由多种细胞和细胞因子在时间和空间上高度协调而完成的,既可以恢复角膜组织的正常结构,又可导致瘢痕形成。

近年来,许多研究表明细胞因子特别是转化生长因子(TGF- β)在机体伤口愈合过程中起到重要的调节作用。其中 TGF- β_2 为术后修复过程的启动因子,激活的 TGF- β 对于白细胞、单核巨噬细胞、T 细胞和成纤维细胞具有很强的趋化作用,同时,TGF- β 可以与细胞表面的特异受体结合从而活化成纤维细胞的功能,增加 I 型胶原和 III 型胶原的 mRNA 表达并促进胶原合成和成熟,影响细胞外基质其它成分 mRNA 的转录^[10]。从分子生物学的基础理论出发,抑制术后瘢痕的形成,可以通过抑制细胞因子 TGF- β 活性的途径实现,即阻断 TGF- β 的转录和翻译,而通过 TGF- β 的反义寡核苷酸在基因水平减少蛋白产物的量,可抑制该因子或受体的活性。李金瑛等^[3]通过制备兔眼角膜基质创伤模型,用浸有 TGF- β_2 反义寡核苷酸的 8-0 薇乔缝线缝合角膜创口的角膜,其成纤维细胞数明显少于用普通 8-0 薇乔缝线缝合角膜创口,从而得出通过 TGF- β_2 反义寡核苷酸转染至兔眼的角膜上皮细胞、成纤维细胞,在基因水平减少了 TGF- β_2 的生物合成,从而减弱了其下的一系列级联反应,随着角膜的修复,活跃的成纤维细胞逐渐变为静止的纤维细胞,即 TGF- β_2 反义寡核苷酸可抑制兔角膜基质成纤维细胞转化、增殖,为调控角膜基质伤口修复提供了一个新的途径。

2.2 白内障 晶状体混浊称为白内障,晶状体蛋白中的 85% 为水溶性的白蛋白,水溶性白蛋白可以转变为不溶性蛋白,年龄越大,不溶性蛋白含量越多;另外,维生素 C 缺乏、晶状体 pH 值的改变以及一些有毒物质渗入晶状体都可引起晶状体蛋白的变性,造成混浊。白内障是我国老年人中最常见的致盲性眼病,目前治疗白内障以手术为主,白内障术后后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 亦称后发性白内障,是当前白内障摘除术后影响视力恢复的最主要并发症之一,PCO 的发生率在成人为 20% ~ 50%,在儿童几乎为 100%^[11],目前临床证实唯一有效治疗 PCO 是 Nd:YAG 激光后囊膜切开术^[12],但 YAG 激光治疗可能导致严重并发症,术中可能损伤人工晶状体,术后可能引起眼压升高、黄斑囊样水肿、视网膜脱离等。因此,如何预防 PCO 的发生已成为目前研究的热点。研究发现术后残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LEC) 增殖、移行、化生以及炎症反应可能是 PCO 形成的原因^[13]。LEC 的增殖过程与其他细胞一样,受细胞周期调控机制的支配,周期蛋白 (Cyclin)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、TGF- β 及其他相关分子是目前细胞周期调控研究中的热点。陆宏等^[14]通过制作大鼠 LEC Cend1 基因表达和细胞增殖模型,得出 Cend1-ASODN 脂质体能有效地转染至培养的大鼠 LEC,降低大鼠 LEC Cend1 表达,抑制 LEC 增殖。徐国兴

等^[15]将结缔组织生长因子 (CTGF) 反义寡核苷酸直接转染至人晶状体上皮细胞 (hLEC),能抑制 TGF- β 诱导的 CTGF 与 α -SMA 表达上调,提示阻断 CTGF 可能是防治后发性白内障的有效手段。ASODN 类药物针对性强、靶向性好、毒副作用小,主要是通过抑制术后 LEC 增殖来预防和治疗 PCO,ASODN 化学修饰技术、载体开发技术等研究都为 ASODN 进入白内障临床应用开辟了光明的前景。

2.3 青光眼 青光眼是眼内压调控功能发生障碍使眼压异常升高,导致视功能障碍,并伴有视网膜视神经形态学变化的疾病。目前手术建立滤过通道是治疗青光眼的主要有效途径,然而术后滤过通道的瘢痕组织过度增殖往往会导致手术失败。越来越多的研究表明 TGF- β_2 为术后修复过程的重要因子,为进一步阐明该细胞因子在青光眼滤过泡瘢痕形成中的作用,李金瑛等^[4]将 TGF- β_2 反义寡核苷酸应用于青光眼滤过模型上,研究表明:TGF- β_2 反义寡核苷酸可降低兔青光眼滤过术后眼压,延长滤过泡生存时间,抑制兔青光眼滤过术后结膜囊成纤维细胞的转化、增生,这就为抗青光眼术后瘢痕过度增生导致手术效果不理想的治疗提供了一条新的思路和途径。小梁网作为房水流出的主要通道,在调节房水外流及控制眼压方面具有重要作用。小梁网主要由小梁柱以及内衬的小梁细胞组成,随着年龄增长,小梁细胞数会逐渐减少,而原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 患者小梁细胞数减少则更加明显。研究表明:CD44 分子在人眼小梁细胞有表达并且与小梁细胞的黏附等功能有关,提示 CD44 可能参与了 POAG 的发病过程。从分子生物学角度出发,可以用特异性 CD44 反义核苷酸封闭 CD44mRNA 来观察其对小梁细胞增生功能的影响,CD44 反义核苷酸通过碱基互补配对原则与互补链杂交,结合核酸序列,从而特异性影响目的基因转录和翻译过程进而使小梁细胞的 CD44 表达下降。李中国等^[16]用 CD44 反义寡核苷酸封闭 CD44 基因表达,可以抑制人眼小梁细胞的增生功能,同时促进人眼小梁细胞的凋亡,从而说明将 ASODN 导入 CD44 是通过影响小梁细胞的增生以及凋亡而参与 POAG 的发病过程,这为治疗 POAG 提供了一个新的方向。

2.4 增殖性玻璃体视网膜病变 增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreousretinopathy, PVR) 是指眼球穿通伤、眼内出血、孔源性视网膜脱离及视网膜复位手术后,由于玻璃体内及视网膜表面的细胞增生和收缩,造成牵引性视网膜脱离的一种严重眼病。虽然目前手术是治疗 PVR 的主要手段且疗效肯定,但手术不能阻止 PVR 的再发生,临床上仍有不少患者在手术后因 PVR 再发而导致永久性的视功能损害,甚至致盲。因此,发展新的药物治疗 PVR 很有必要性。PVR 主要表现为增生细胞在视网膜和玻璃体腔形成具有收缩能力的细胞性膜,RPE, RG 细胞作为主要的细胞成分参与了这种病理性增生过程^[5,6],通过控制 RPE, RG 细胞增生相关基因表达而抑制其反应性增生过程,将 ASODN 技术导入至 PVR 相关生长因子、蛋白中,有望防治 PVR。RPE 细胞是 PVR 病理过程的主要细胞,其在细胞因子及细胞外基质的作用下,经视网膜裂孔进入视网膜表面或玻璃体腔,并在血浆中的一些成分如纤维连接蛋白、血小板源性生长因子 (PDGF) 或自身分泌的 PDGF 作用下大量增生,从而引

起恶性循环,导致PVR的发生。邱梅园等^[5]通过体外化学合成特异性的针对hRPE细胞的PDGFR- α 基因的反义寡核苷酸(PDGFR- α ASODN)转染至RPE细胞内,hRPE细胞的增殖受到显著的抑制,且呈现明显的时间-剂量效应;流式细胞检测示PDGFR- α ASODN转染于hRPE细胞后能将细胞阻滞于G0/G1期,G1/S期为细胞增殖限制点,通过控制限制点,使细胞的G1期延迟,引起细胞增殖的抑制^[17]。该实验表明PDGFR- α ASODN转染于hRPE细胞后,细胞出现明显的凋亡现象,进一步说明下调PDGFR- α ASODN的表达来抑制细胞增殖是通过诱导hRPE细胞凋亡来实现的。因此,PDGFR- α ASODN有可能成为治疗或预防PVR发生的新的治疗靶点。RG细胞在维持视网膜正常的代谢和功能中起了重要的作用,同时也参与多种病理过程,RG细胞在一些因素的启动下,迁移到玻璃体腔或视网膜表面,增生、形成增生膜并收缩导致一系列病变,在PVR、增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)和特发性黄斑表面膜等病变中起重要作用,是某些视网膜前膜和视网膜后膜的主要细胞成分。许多生长因子及其受体和RG细胞的迁移有关,其中表皮生长因子受体(EGFR)在RG细胞迁移的过程中起重要作用。严浩等^[6]设计EGFR反义寡核苷酸,并用脂质体作为载体转染其至RG细胞内,结果表明EGFR反义寡核苷酸能有效的抑制人RG细胞的EGFR的表达,同时可以有效地抑制RG细胞的迁移,从而阻断了细胞增生性病变的第一步反应,对利用ASODN技术针对RG细胞有关的PVR等增生性等疾病的基因治疗提供了参考。

3 展望

ASODN作为一种新型的基因治疗药物,近年来在治疗眼科疾病方面发挥重要作用。随着研究的深入,ASODN在稳定性、选择性以及对细胞的通透性和靶向性等方面不断完善。人类基因组计划的完成,以及分子生物学的飞速发展,有助于人类找出对疾病发生起关键作用的靶基因,明确其靶序列,筛选最优的反义靶序列,从而提高反义治疗效果。如果能将ASODN技术导入眼部疾病相关基因、生长因子及受体等,可能为临床上干预和治疗眼科疾病提供一种新的途径。

参考文献

- 1 吕艳秋,石刚刚.反义寡核苷酸技术研究进展.广东医学 2006;8(27):1270-1272
- 2 潘光锦,韩金祥.反义核酸类药物的药理学研究进展.医学综述 2002;8(5):302-304
- 3 李金瑛,肖诗艺,傅培.TGF- β 2反义寡核苷酸对兔角膜基质创伤修复的影响.中国现代医学杂志 2006;7(16):1016-1018
- 4 李金瑛,傅培,杨琦.TGF- β 2反义寡核苷酸抑制抗青光眼术后滤过泡瘢痕的实验研究.国际眼科杂志 2007;7(1):10-14
- 5 邱梅园,彭燕一,黄岚珍,等.PDGF- α 受体反义寡核苷酸对体外视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡的影响.国际眼科杂志 2011;11(2):229-231
- 6 严浩,邱庆华,王艳丽.EGFR反义寡核苷酸对人视网膜神经胶质细胞迁移的影响.国际眼科杂志 2010;10(8):1488-1489
- 7 帅晓明,王国斌.反义寡核苷酸作用机制研究进展.国外医学分子生物学分册 2001;4(23):237-240
- 8 杨鹏远,芮耀诚.反义寡核苷酸类药物的研究进展.国外医学药学分册 2002;4(29):193-197
- 9 Dave H, Kadner A, Bauersfeld F, et al. Early results of using the bovine jugular vein for right ventricular outflow reconstruction during the Ross procedure. *Heart Surg Forum* 2003;6(5):390-392
- 10 Carrel T, Berdat P, Pavlovic M, et al. The bovine jugular vein: a totally integrated valved conduit to repair the right ventricular outflow. *J Heart Valve Dis* 2002;11(4):552-556
- 11 Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, et al. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998;105(7):1213-1221
- 12 Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):555-562
- 13 Dewey S. Posterior capsular opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(1):45-53
- 14 陆宏,管怀进,吴坚,等.Ccnd1反义寡核苷酸脂质体抑制大鼠晶状体上皮细胞增殖的研究.交通医学 2007;6(21):626-628
- 15 徐国兴,庄华,徐巍,等.CTGF反义寡核苷酸对人晶状体上皮细胞转分化的探讨.国际眼科杂志 2011;11(2):216-219
- 16 李中国,王林农,张红.CD44反义寡核苷酸对人眼小梁细胞增生与凋亡的影响.眼科新进展 2007;11(27):821-823
- 17 倪琦,曾思恩,谭宁,等.姜黄素对肝癌细胞增殖及凋亡的影响.山东医药 2010;50(7):6-8