

眼部疾病的基因治疗进展

吕菊玲 综述 邢怡桥 沈吟 审校

430000 武汉大学人民医院眼科中心(吕菊玲,现在武汉大学人民医院鄂州医院眼科)

通信作者:沈吟,Email:yinshen@whu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.019

【摘要】 目前,全世界已有 31 项眼部疾病基因治疗临床试验被批准,多数仍处于研究阶段。Leber 先天性黑朦(LCA)目前已开展Ⅲ期临床试验,随访时间最长 6 年;无脉络膜症多中心的临床试验也取得了积极效果;视网膜色素变性(RP)已开展基因治疗 I 期临床试验;年龄相关性黄斑变性(AMD)基因治疗的 I 期临床试验结果令人鼓舞;青光眼基因治疗中使用 RNA 干扰技术和优化的偶联表面活性磷脂纳米微粒也取得了良好效果。就 LCA、RP、无脉络膜症、AMD 和青光眼基因治疗的一些实验室及临床研究进展,包括眼部基因治疗方法、各种基因载体和常用的动物模型等进行综述。病毒载体已广泛应用于眼部疾病的基因治疗中,一些与免疫排斥和基因突变相关的潜在性风险以及个体反应的差异性促使人们去探索更安全、高效的方法。基因编辑技术的出现,必将对眼部疾病的基因治疗领域产生深远影响。

【关键词】 眼部疾病; 基因治疗; 病毒载体; 临床试验; 视网膜

基金项目: 国家自然科学基金项目(81270998、81470628); 湖北省杰出青年项目(2014CFA019); 湖北省卫计委青年人才项目(WJ2015Q014)

Advance in gene therapy of ocular disease Lyu Juling, Xing Yiqiao, Shen Yin

Department of Ophthalmology, Wuhan University, Renmin Hospital, Wuhan 430000, China (Lyu JL, now)

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

【Abstract】 Currently, 31 clinical trials have been approved, most of them are still in progress. Leber congenital amaurosis (LCA) has been conducted to phase III clinical trials, the longest follow-up time was 6 years. A multicenter clinical trial about choroideremia has achieved positive effect. Retinitis pigmentosa (RP) has been conducted to phase I clinical trials. Gene therapy for phase I clinical trials of age-related macular degeneration (AMD) have achieved encouraging results. RNA interference and optimized gemini surfactant-phospholipid nanoparticles (GL-NPs) have been applied to gene therapy for glaucoma and have achieved good effects. In this paper, laboratory and clinical research progress of gene therapy of LCA, RP, choroideremia and AMD, glaucoma are reviewed, including gene therapy drug delivery methods, gene carrier and common animal models, etc. Viral vectors have been widely used, the potential risk associated with immunogenicity and mutagenesis, the differences of individual reaction have promoted the exploration of a safer and more efficient method. Especially, the emergence of gene editing technology will bring a profound effect to gene therapy of eye disease field.

【Key words】 Ocular disease; Gene therapy; Viral vector; Clinical trial; Retina

Fund program: Natural Science Foundation of China (81270998, 81470628); Project of Excellent Scientist Fund of Hubei (2014CFA019); Project of Young scientists of Health and Planning Commission of Hubei Province (WJ2015Q014)

基因治疗指利用 DNA 重组技术将目的基因转染至靶细胞内,包括基因改建、修饰和置换,干预异常基因表达,纠正遗传病的基因缺陷而达到治疗疾病的目的。眼部视网膜变性疾病已成为当今世界上不可逆的主要原因,其视功能损害的病理基础是视网膜神经元的不可逆性损伤,如视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)、Leber 先天性黑朦(Leber congenital

amaurosis, LCA)、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)及青光眼等,目前临床上仍缺少有效的治疗手段。随着分子生物学水平、基因诊断和治疗水平的提高以及基因测序技术的广泛应用,人类对疾病本质的认识更加深刻。就 LCA、RP、无脉络膜症和 AMD、青光眼基因治疗的一些实验室及临床研究进展进行综述。

1 眼部疾病基因治疗的优势

眼球特殊的生理及解剖学特点使之成为基因治疗的理想器官。(1)眼部遗传病多为单基因病,治疗相对简单。(2)眼球是一相对独立的器官,体积较小,所需基因或细胞的数量相对较少。(3)眼球属于相对免疫赦免器官,由视网膜血管和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)共同组成血-视网膜屏障,外来药物、基因和细胞较少引起免疫应答。(4)可以实现双眼间的自身对照。(5)眼的屈光透明性使得我们能够在可视情况下进行眼部操作。(6)可借助裂隙灯显微镜、眼部超声检查仪、眼底照相仪、OCT 等直接观察眼部各组织的结构,也可应用视觉电生理、荧光素眼底血管造影等评价视网膜神经细胞和视功能改变。

2 眼部疾病基因治疗的方法

2.1 常规给药

常规给药方法包括局部点药、球周注射、前房注射、玻璃体腔注射、视网膜下注射和脉络膜上腔注射给药,每种给药方式各有利弊。由于解剖位置的不同,视网膜下注射给药主要转染 RPE 细胞和光感受器细胞;玻璃体腔注射主要转染视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)。球周给药包括球侧注射、球后注射、后巩膜下注射、球筋膜囊下注射和结膜下注射。球结膜下注射适于给药量较大的药物,可重复性好。

2.2 基因导入系统

理想的基因导入系统是通过非侵入或低侵入性方法给药,靶组织能够有效、广泛地吸收,且无异常基因表达。基因导入系统主要包括以下几种导入方式:(1)病毒载体 病毒载体在基因导入系统中最常用,主要包括腺病毒、腺相关病毒载体(adeno-associated viruses, AAVs)、慢病毒载体和逆转录病毒载体。AAVs 转染效率依赖于血清型和衣壳蛋白。衣壳蛋白可以在不同的血清型之间交换形成 AAVs 重组体。AAV2/5 和 AAV2/8 转染光感受器细胞效率最高,以视杆细胞为主。AAVs 转染效率在不同种属和不同组织中各不相同,在活体和离体组织中也不尽相同,如在角膜纤维细胞中,AAV6 的转染效率是 AAV2/8 和 AAV2/9 的 30~50 倍^[2];在活体小鼠角膜和离体人角膜的转染效率 AAV2/9>AAV2/8>AAV2/6^[3]。病毒载体能够瞬时或长期稳定高表达外源基因,通过抗性筛选建立稳定表达的细胞系,但同时也存在一定的免疫原性和靶细胞毒性,不能通过人体代谢;(2)RNA 干扰技术 如小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNAs) 缓释系统可以提高基因导入效率、减少注射次数;(3)非病毒载体 非病毒载体分为物理方法和化学方法。物理方法主要包括离子导入法、电穿孔转染、基因枪法和细胞核转染,该方法转染效率有限;化学方法主要包括脂质类载体和聚合物载体。相较于病毒载体,非病毒载体毒性较低且代谢性较好,可针对病变部位进行个体化转染^[4]。

2.3 基因表达元件

基因表达元件包括:(1)组织特异性启动子 如胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的靶细胞是视网

膜 Müller 细胞^[5];(2)可诱导性调控序列 包括环境诱导系统和药物诱导系统,即启动子对特异性环境信号或药物作出反应,如糖尿病视网膜病变和 AMD 患者在正常氧含量条件下低氧反应元件不起作用,需设计某种载体诱导低氧区域基因表达来对抗视网膜新生血管^[5-6];利用多西环素可诱导表达系统治疗视网膜新生血管、糖皮质激素反应元件治疗青光眼^[7-8]。

3 眼部疾病基因治疗的现状

眼部疾病的基因治疗还处于起始阶段,还需很长一段时间的过渡期实现从动物实验到人体临床试验。目前,眼部疾病的基因治疗已经在 RP、LCA、AMD 和青光眼等遗传性疾病研究中取得了一些进展。

3.1 眼部罕见疾病的基因治疗

3.1.1 LCA LCA 的基础与临床治疗效果显著,是现今眼科基因治疗的典范。到目前为止,已经发现了 14 个与 LCA 相关的致病基因,其中 RPE65 基因在 RPE 细胞中特异性表达,其编码的蛋白质参与光信号物质的代谢循环^[9]。自 2008 年以来,在 LCA 患者中实行基因治疗的临床试验相继开展,部分患者视功能明显改善。Boye 等^[10]在 LCA1 小鼠模型上利用 AAV 载体进行相关基因治疗,结果显示模型鼠视网膜功能恢复且维持 6 个月以上。

Burnight 等^[11]利用慢病毒载体将 CEP290 导入 LCA 患者体外培养的 CEP290 突变细胞中,可改善患者细胞纤毛形成缺陷。Bainbridge 等^[12]对接受临床试验 I~II 期(3 年)rAAV2/2 基因治疗的 12 例 LCA 患者进行研究,患者视敏度明显提高且程度不一,其中 6 例视敏度峰值出现在基因治疗后 6~12 个月,随后开始下降;3 例出现眼内炎;2 例视力减退明显;所有患者中心视网膜厚度变薄;同时研究犬载体剂量与视功能、视网膜电图(electroretinogram, ERG)的关系,发现低载体剂量只能改善视觉引导的相关行为,而高载体剂量引起的视功能改善可以通过 ERG 检测发现。这些结果表明,rAAV2/2 RPE65 可以暂时性地改善视敏度,但载体剂量存在种属差异。Jacobson 等^[13]进行的 LCA 临床试验随访 5~6 年结果显示,3 例患者治疗后 6 个月时视敏度均提高,视力改善最长能够维持 3 年,其中 1 例患者治疗后 1~3 年视敏度明显增加,之后开始下降,但视网膜光感受器细胞数量丢失率同治疗前,说明基因治疗后早期视力改善和后期减退均存在快相期和慢相期,与同时伴有光感受器细胞变性有关。

3.1.2 无脉络膜症 无脉络膜症是性染色体连锁隐性遗传性眼病,发病率为 1/50 000,多为男性,主要由于编码 REPI 的 CHM 基因突变导致。该病主要病理特征为脉络膜、RPE 层和光感受器细胞的进行性萎缩^[14]。MacLaren 等^[15]对 6 例无脉络膜患者黄斑下注射 AAV-REPI 来评估基因治疗的疗效,结果显示所有患者治疗后视力与治疗前相比均有提高,暗适应微视野均有改善,治疗 6 个月后的黄斑视敏度与所治疗区的载体剂量有关。该项临床试验说明,基因治疗对视杆细胞和视锥细胞功能恢复,克服了视网膜脱离所产生的负作用,为进一步研究视网膜疾病基因治疗的临床应用提供了证据支持。

3.1.3 RP 全世界 RP 的发病率为 1/4 000, 中国 RP 的发病率高达 1/1 000^[15-16], 其相关致病基因繁多。目前, RP 已开展基因治疗 I 期临床试验, 3 例患者接受了视网膜下注射携带特异 RPE 启动子的 AAV2, 无不良反应发生^[17]。Choi 等^[18] 在 *Rlbpl*^{-/-} 小鼠视网膜下注射 scAAV8-pRLBP1-hRLBP1 (包含 AAV8 的衣壳和自身互补基因组) 能提高该小鼠的暗适应率。Guo 等^[19] 将 HDAC4 通过质粒转染 rd1 小鼠视网膜, 发现光感受器细胞存活时间延长。RP 的产生机制包括细胞自主机制 (即光感受器表达基因的突变) 和非细胞自主机制 (即炎症的影响)。Zhao 等^[20] 通过基因敲除的方法消除小胶质细胞后, 视杆细胞变性得到改善。

3.2 眼部常见疾病的基因治疗

3.2.1 AMD AMD 是发达国家 50 岁以上人群不可逆盲的主要原因。目前美国有 900 万 AMD 患者, 预计到 2050 年会达到 1 780 万^[21]。中国的 AMD 患者也有逐年增加的趋势。根据组织病理学特点可将 AMD 分为: 早期、中期和晚期 AMD^[22]。Rakoczy 等^[23] 检测了 8 例湿性 AMD 患者单次视网膜下注射 rAAV.sFLT-1 基因治疗的疗效, 并随访 1 年, 证实了其安全性和耐受性较好, 单次基因治疗可以达到长期抗新生血管形成的作用。一项多中心 I 期临床试验对 27 例晚期 AMD 患者行单次玻璃体腔注射 50 ~ 3 000 μg PF-04523655 (小分子干扰 RNA, 可抑制低氧诱导基因 *RTP801*), 随访 2 年, 未发现明显的毒性作用和不良反应, 患者耐受性好^[24]。

3.2.2 青光眼 截止到 2010 年, 世界范围内因青光眼致盲的患者达 6 000 万余, 预计到 2020 年青光眼盲的患者达到近 8 000 万^[25]。40 岁以上成人每 40 人中就有 1 人因青光眼造成视力丧失。目前, 控制眼压仍是青光眼治疗的主要目标, 而青光眼致盲的主要原因是 RGCs 的损伤。青光眼相关易感基因位点 *PLEKHA7*, *COL11A1*, *rs1015213* 的发现促进了青光眼的基因治疗^[26]。这些基因主要影响房水分泌和引流系统, 包括小梁网、虹膜、睫状体来调控青光眼的发生和发展。通过转基因的方法补给外源性神经营养因子、凋亡抑制剂和存活因子或其重组蛋白对阻止和减少进展期青光眼 RGCs 的凋亡具有重要意义。Liu 等^[27] 通过导入细胞凋亡蛋白抑制剂或抗凋亡基因 *Bcl-2* 编码基因来抑制 RGCs 凋亡级联反应, Thumann^[28] 利用 RNA 干扰技术抑制促凋亡因子的表达。Alqawlaq 等^[29] 设计了优化的偶联表面活性磷脂纳米微粒, 大小为 150 ~ 180 nm, 这种非病毒载体可成功地将治疗基因导入青光眼模型的相关靶组织内。

SYL040012 是一种双链寡核苷酸, 能够通过 RNA 干扰技术特异性地抑制 β₂ 肾上腺素受体的合成, 从而达到降低眼压的目的。Moreno-Montañés 等^[30] 将 SYL040012 应用于健康人群临床试验中, 耐受性良好, 全身和局部未见明显不良反应, 24 例受试者给药 (不论剂量高低) 后 7 d, 15 例眼压显著降低。

4 眼部遗传病的常用动物模型

基因治疗中建立动物模型非常重要。眼科疾病中经典的动物模型主要包括 LCA、无脉络膜症、RP、AMD 和青光眼, 其中, LCA 和 RP 具有共用的动物模型。

4.1 LCA

Rpe65^{-/-}, *rd12*, *Lrat*^{-/-} 小鼠和 *RPGRIPI*^{-/-} 犬模型是 LCA 常用的动物模型。RP GTP 酶调节因子结合蛋白 1 (RP GTPase regulator interacting protein 1, *RPGRIPI*) 基因敲除后小鼠的视杆细胞和视锥细胞变性进展迅速, 出生后 20 d 即有大量散布的光感受器细胞感光色素, 残留光感受器外段短小且杂乱^[31]。Pawlyk 等^[32] 利用 AAV8 载体对人 *RPGRIPI* 基因突变的 LCA6 患者进行基因治疗后, 发现视网膜功能丧失得到延缓。Zhang 等^[33] 利用基因删除的办法将 *Lrat*^{-/-} 小鼠的 LCA 模型视锥蛋白去除后, 发现能有效阻止视网膜视锥细胞变性。

4.2 无脉络膜症

目前, 尚未见到人类无脉络膜症患者其他组织和器官受影响的报道。斑马鱼 *CHM* 基因敲除后, 由于其本身缺乏 REP2 (REP1 相似蛋白), 受精后 4 d 视网膜正常发育, 随之即表现出严重的多系统症状, 出生后 6 d 即死亡^[34]。*CHM* 基因敲除的雄性小鼠模型 (*Chm*^{mut/Y}) 胚胎异常而容易死亡, 而 *CHM* 基因敲除的雌性小鼠模型 (*Chm*^{mut/+}) 成活率较高且能够生育, 且存在进行性视网膜变性的表现, 成为无脉络膜症较理想的模型^[35-36]。

4.3 RP

RP 有多种动物模型, 常用模型主要包括自然动物模型和基因动物模型。

4.3.1 自然动物模型 (1) RCS 大鼠 RP 动物模型 该模型大鼠 RPE 细胞存在一种基因表达, 而不能吞噬光感受器细胞脱落的盘膜^[37], 光感受器细胞数目于出生后 18 d 开始减少, 直至出生后 3 个月完全消失。(2) rd1 小鼠 由于 *Pde6b* 基因发生无义突变, 引起磷酸二酯酶 β 亚基功能异常, 该模型小鼠出生 4 d 时视杆细胞开始变性, 出生后 4 周时完全消失;(3) rds 小鼠 rds 小鼠是 *peripherin/rds* 基因发生突变, 影响了该基因编码蛋白的表达^[38], 主要影响外层视网膜, 光感受器细胞外节发育不良, 出生后 2 周时外核层、外丛状层开始变薄, 到出生后 12 个月时视网膜光感受器细胞消失^[39]。

4.3.2 基因动物模型 (1) *RPE-65* 基因敲除小鼠 该模型中视网膜上皮细胞功能被破坏, 造成全反式视黄醇的过多堆积和 11-顺式视黄醇乙酸酯不足^[40]。(2) 视紫红质 (Rhodopsin) 基因敲除小鼠 视紫红质基因突变是人类常染色体显性 RP 中最常见的致病原因, 可用于评价基因治疗效果。(3) 甲基亚硝基脲 (N-Nitroso-N-methylurea, MNU) 诱导 RP 小鼠模型 MNU 诱导 RP 小鼠模型是多种程序共同参与的选择性诱导光感受器细胞凋亡^[41]。Kim 等^[42] 在成年小鼠 60 mg/kg 腹腔注射 MNU 后 5 ~ 7 d, 外层视网膜损伤明显, 成功构建了 RP 小鼠模型。

4.4 AMD

4.4.1 干性 AMD (1) *Elovl4* 5-bp 基因敲除 AMD 模型 *E_mut*^{+/-} 鼠表现为 RPE 层空泡状变化, 得到 ELOVL4 的延伸变性, 从而引起 Stargardt 病动物模型^[43]。(2) Sorsby 眼底退化病 (Sorsby fundus dystrophy, SFD) SFD 与 *TIMPS* 基因突变有关, 是罕见的迟发性视网膜和脉络膜变性遗传病, *Timp3*^{-/-} 鼠是该模型的成功代表^[44]。

4.4.2 湿性 AMD (1)激光诱导模型 Askou 等^[45]使用绿色氩激光诱导小鼠脉络膜新生血管形成, Bruch 膜断裂时光凝部位会出现气泡, 有利于脉络膜新生血管的形成。激光造模的优点是造模迅速, 但存在一定的自限性。(2)眼内注射模型 Baffi 等^[46]利用表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的腺病毒载体构建脉络膜新生血管模型。可溶性 VEGF 受体 1(sFlt-1)是视网膜光感受器和角膜无血管特性的重要保护因子, 视网膜下注射携带 sFlt-1 shRNA 的腺病毒载体后, 可诱发脉络膜新生血管形成^[47]。

4.5 青光眼

4.5.1 玻璃体腔注射兴奋性氨基酸 玻璃体腔注射兴奋性神经毒谷氨酸或 N-甲基-D-天冬氨酸可引起 RGCs 内 Ca^{2+} 超载从而导致细胞死亡^[48]。许多神经保护药物的细胞及分子机制利用该动物模型进行研究。

4.5.2 巩膜表面静脉注射高渗盐水 巩膜表面静脉注射高渗盐水是较理想的慢性青光眼模型, 病理生理过程类似于人类的开角型青光眼, 原理是将高渗盐水注射进巩膜表面静脉致小梁网坏死, 影响房水外流使眼压升高。眼压升高程度与 RGCs 死亡率呈正比^[49]。

5 展望

目前, 全球已有 31 项眼部疾病基因治疗临床试验被批准 (<http://www.abedia.com/wiley/>), 其中部分已经完成。病毒载体是目前眼部疾病最常用的基因导入系统。31 项临床试验中有 21 项使用病毒作为载体(16 项临床试验中使用 AAVs 载体, 4 项使用慢病毒载体, 1 项使用逆转录病毒载体), 5 项利用 siRNA 基因沉默技术, 基因替代治疗在临床治疗中应用广泛。眼部疾病的基因治疗取得了一些令人鼓舞的成果, 但也存在与免疫排斥和基因突变相关的潜在风险, 并且多种基因与药物有效性的研究也发现, 物种之间的药物有效性存在差异。

随着生物技术的不断变革, 从第 1 代人工核酸酶介导的锌指蛋白核酸酶技术, 到第 2 代转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALENs)技术, 以及当前最新的 RNA 引导的成簇规律间隔短回文重复相关核酸酶(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat CRISPR-associated nuclease, CRISPR-Cas)技术, 即“基因剪刀”技术, 各种强有力的基因编辑技术不断涌现, 其中 CRISPR-Cas9 系统成为生命科学领域的最热门研究。CRISPR-Cas9 系统利用一段序列特异性 RNA 分子作为导向, 完成对细胞 DNA 快速、高效和精确的靶向修饰, 且可同时应用于多靶点切割。Wu 等^[50]已将 CRISPR-Cas9 系统应用于白内障小鼠模型的基因治疗中, 取得较好的效果。基因编辑技术已广泛应用于各类物种的遗传学改造、构建转基因动物模型和基因治疗领域, 与中国“精准医疗”战略高度一致, 加快了人类对疾病基因组层面的认识, 进一步探索如何将顶尖的技术和方法延伸应用于临床必将对眼部疾病的基因治疗领域产生深远影响。

参考文献

[1] Amrite AC, Kompella UB. Size-dependent disposition of nanoparticles

and microparticles following subconjunctival administration [J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57(12): 1555-1563. DOI: 10.1211/jpp.57.12.0005.

- [2] Sharma A, Ghosh A, Hansen ET, et al. Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts [J]. Brain Res Bull, 2010, 81(2-3): 273-278. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.07.005.
- [3] Sharma A, Tovey JC, Ghosh A, et al. AAV serotype influences gene transfer in corneal stroma *in vivo* [J]. Exp Eye Res, 2010, 91(3): 440-448. DOI: 10.1016/j.exer.2010.06.020.
- [4] Wang Y, Li Z, Han Y, et al. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA *in vivo* [J]. Curr Drug Metab, 2010, 11(2): 182-196.
- [5] Prentice HM, Biswal MR, Dorey CK, et al. Hypoxia-regulated retinal glial cell-specific promoter for potential gene therapy in disease [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(12): 8562-8570. DOI: 10.1167/iov.10-6835.
- [6] Bainbridge JW, Mistry A, Binley K, et al. Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization [J]. Gene Ther, 2003, 10(12): 1049-1054. DOI: 10.1038/sj.gt.3301945.
- [7] Lamartina S, Cimino M, Roscilli G, et al. Helper-dependent adenovirus for the gene therapy of proliferative retinopathies: stable gene transfer, regulated gene expression and therapeutic efficacy [J]. J Gene Med, 2007, 9(10): 862-874. DOI: 10.1002/jgm.1083.
- [8] Spiga MG, Borrás T. Development of a gene therapy virus with a glucocorticoid-inducible MMP1 for the treatment of steroid glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6): 3029-3041. DOI: 10.1167/iov.09-4918.
- [9] Pelletier V, Jambou M, Delphin N, et al. Comprehensive survey of mutations in RP2 and RPGR in patients affected with distinct retinal dystrophies: genotype-phenotype correlations and impact on genetic counseling [J]. Hum Mutat, 2007, 28(1): 81-91. DOI: 10.1002/humu.20417.
- [10] Boye SL, Peterson JJ, Choudhury S, et al. Gene therapy fully restores vision to the all-cone Nrl^(-/-) Gucy2e^(-/-) mouse model of Leber congenital amaurosis-1 [J]. Hum Gene Ther, 2015, 26(9): 575-592. DOI: 10.1089/hum.2015.053.
- [11] Burnight ER, Wiley LA, Drack AV, et al. CEP290 gene transfer rescues Leber congenital amaurosis cellular phenotype [J]. Gene Ther, 2014, 21(7): 662-672. DOI: 10.1038/gt.2014.39.
- [12] Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2015, 372(20): 1887-1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1414221.
- [13] Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness [J]. N Engl J Med, 2015, 372(20): 1920-1926. DOI: 10.1056/NEJMoa1412965.
- [14] Kalatzis V, Hamel CP, MacDonald IM. Choroideremia: towards a therapy [J]. Am J Ophthalmol, 2013, 156(3): 433-437. e3. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.05.009.
- [15] MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial [J]. Lancet, 2014, 383(9923): 1129-1137. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62117-0.
- [16] Petrs-Silva H, Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa [J]. Clin Ophthalmol, 2014, 8: 127-136. DOI: 10.2147/OPHT.S38041.
- [17] Boye SE, Boye SL, Lewin AS, et al. A comprehensive review of retinal gene therapy [J]. Mol Ther, 2013, 21(3): 509-519. DOI: 10.1038/mt.2012.280.
- [18] Choi VW, Bigelow CE, McGee TL, et al. AAV-mediated RLBP1 gene therapy improves the rate of dark adaptation in Rlbp1 knockout mice [J/OL]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2015, 2: 15022[2015-12-23].

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495722/. DOI: 10.1038/mtm.2015.22.
- [19] Guo X, Wang SB, Xu H, et al. A short N-terminal domain of HDAC4 preserves photoreceptors and restores visual function in retinitis pigmentosa [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6 : 8005 [2015-11-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538705/. DOI: 10.1038/ncomms9005.
- [20] Zhao L, Zabel MK, Wang X, et al. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(9) : 1179-1197. DOI:10.15252/emmm.201505298.
- [21] Cheung LK, Eaton A. Age-related macular degeneration [J]. *Pharmacotherapy*, 2013, 33(8) : 838-855. DOI:10.1002/phar.1264.
- [22] van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, et al. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities [J]. *J Pathol*, 2014, 232(2) : 151-164. DOI:10.1002/path.4266.
- [23] Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase I randomised clinical trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(10011) : 2395-2403. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00345-1.
- [24] Nguyen QD, Schachar RA, Nduaka CI, et al. Phase I dose-escalation study of a siRNA targeting the RTP801 gene in age-related macular degeneration patients [J]. *Eye (Lond)*, 2012, 26(8) : 1099-1105. DOI:10.1038/eye.2012.106.
- [25] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3) : 262-267. DOI:10.1136/bjo.2005.081224.
- [26] Vithana EN, Khor CC, Qiao C, et al. Genome-wide association analyses identify three new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10) : 1142-1146. DOI:10.1038/ng.2390.
- [27] Liu J, Skjærvinge T, Gjetting T, et al. PhiC31 integrase induces a DNA damage response and chromosomal rearrangements in human adult fibroblasts [J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2009, 9 : 31 [2015-12-20]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19341467/. DOI:10.1186/1472-6750-9-31.
- [28] Thumann G. Prospectives for gene therapy of retinal degenerations [J]. *Curr Genomics*, 2012, 13(5) : 350-362. DOI: 10.2174/138920212801619214.
- [29] Alqawlaq S, Sivak JM, Huzil JT, et al. Preclinical development and ocular biodistribution of gemini-DNA nanoparticles after intravitreal and topical administration: towards non-invasive glaucoma gene therapy [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(8) : 1637-1647. DOI: 10.1016/j.nano.2014.05.010.
- [30] Moreno-Montañés J, Súdaba B, Ruz V, et al. Phase I clinical trial of SYL040012, a small interfering RNA targeting β -adrenergic receptor 2, for lowering intraocular pressure [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(1) : 226-232. DOI:10.1038/mt.2013.217.
- [31] Li T. Leber congenital amaurosis caused by mutations in RPGRIP1 [J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(4) : a017384 [2015-11-19]. http://perspective.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=25414380. DOI:10.1101/cshperspect.a017384.
- [32] Pawlyk BS, Bulgakov OV, Liu X, et al. Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(8) : 993-1004. DOI:10.1089/hum.2009.218.
- [33] Zhang T, Enemchukwu NO, Jones A, et al. Genetic deletion of S-opsin prevents rapid cone degeneration in a mouse model of Leber congenital amaurosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(6) : 1755-1763. DOI: 10.1093/hmg/ddu588.
- [34] Moosajee M, Tulloch M, Baron RA, et al. Single choroideremia gene in nonmammalian vertebrates explains early embryonic lethality of the zebrafish model of choroideremia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(6) : 3009-3016. DOI:10.1167/iovs.08-2755.
- [35] Tolmachova T, Anders R, Abrink M, et al. Independent degeneration of photoreceptors and retinal pigment epithelium in conditional knockout mouse models of choroideremia [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2) : 386-394. DOI:10.1172/JCI26617.
- [36] Barnard AR, Grope M, MacLaren RE. Gene therapy for choroideremia using an adeno-associated viral (AAV) vector [J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(3) : a017293 [2015-12-22]. http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/3/a017293.long. DOI: 10.1101/cshperspect.a017293.
- [37] Strauss O, Stumpf F, Mergler S, et al. The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect [J]. *Acta Anat (Basel)*, 1998, 162(2-3) : 101-111.
- [38] Agarwal N, Jomary C, Jones SE, et al. Immunocytochemical colocalization of clusterin in apoptotic photoreceptor cells in retinal degeneration slow rds mutant mouse retinas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(1) : 84-91. DOI:10.1006/bbrc.1996.1134.
- [39] Sanyal S, De Ruiter A, Hawkins RK. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy [J]. *J Comp Neurol*, 1980, 194(1) : 193-207. DOI:10.1002/cne.901940110.
- [40] Redmond TM, Yu S, Lee E, et al. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(4) : 344-351. DOI:10.1038/3813.
- [41] Reichenhofer M, Balmer J, Zulliger R, et al. Multiple programmed cell death pathways are involved in N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor degeneration [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253(5) : 721-731. DOI:10.1007/s00417-014-2906-x.
- [42] Kim KA, Kang SW, Ahn HR, et al. Leaves of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) ameliorate N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced retinal degeneration in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(35) : 7750-7759. DOI:10.1021/acs.jafc.5b02578.
- [43] Vasireddy V, Jablonski MM, Khan NW, et al. Elov4 5-bp deletion knock-in mouse model for Stargardt-like macular degeneration demonstrates accumulation of ELOVL4 and lipofuscin [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(6) : 905-912. DOI:10.1016/j.exer.2009.07.021.
- [44] Weber BH, Lin B, White K, et al. A mouse model for Sorsby fundus dystrophy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(8) : 2732-2740.
- [45] Askou AL, Pournaras JA, Pihlmann M, et al. Reduction of choroidal neovascularization in mice by adeno-associated virus-delivered anti-vascular endothelial growth factor short hairpin RNA [J]. *J Gene Med*, 2012, 14(11) : 632-641. DOI:10.1002/jgm.2678.
- [46] Baffi J, Byrnes G, Chan CC, et al. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11) : 3582-3589.
- [47] Luo L, Uehara H, Zhang X, et al. Photoreceptor avascular privilege is shielded by soluble VEGF receptor-1 [J/OL]. *Elife*, 2013, 2 : e00324 [2015-12-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3687373/. DOI:10.7554/eLife.00324.
- [48] Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, et al. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate [J]. *Mol Vis*, 2002, 8 : 341-350.
- [49] Hänninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, et al. Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma [J]. *Curr Eye Res*, 2002, 25(6) : 389-395.
- [50] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6) : 659-662. DOI:10.1016/j.stem.2013.10.016.

(收稿日期:2016-05-11)

(本文编辑:刘艳 张宇)