

# 脑源性神经营养因子与视网膜色素变性

张英瑜<sup>1</sup>, 高朋芬<sup>1, 2</sup>, 杨丽霞<sup>1, 2</sup>

基金项目: 中国福建省青年科技人才项目基金资助项目 (No. 2006F3104)

作者单位: <sup>1</sup> (350025) 中国福建省福州市, 福建医科大学福州总医院临床医学院; <sup>2</sup> (350025) 中国福建省福州市, 南京军区福州总医院眼科

作者简介: 张英瑜, 男, 硕士, 研究方向: 视网膜色素变性。

通讯作者: 高朋芬, 女, 博士, 主治医师, 讲师, 研究方向: 眼底病、小儿眼科. gaopengfen@yahoo. com. cn

收稿日期: 2010-06-09 修回日期: 2010-06-23

## Brain-derived neurotrophic factor and retinitis pigmentosa

Ying-Yu Zhang<sup>1</sup>, Peng-Fen Gao<sup>1, 2</sup>, Li-Xia Yang<sup>1, 2</sup>

**Foundation item:** Science and Technology Research of Youth, Fujian Province, China (No. 2006F3104)

<sup>1</sup> Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China; <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Peng-Fen Gao. Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. gaopengfen@yahoo. com. cn

Received: 2010-06-09 Accepted: 2010-06-23

### Abstract

• The development of molecular biology has thrown new light on the treatment of retinitis pigmentosa. We reviewed the progress of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and iris pigment epithelial (IPE) cells in the treatment of retinal pigment degeneration. Combination of neurotrophic factors, transgene and transplantation technology is a promising way to treat retinitis pigmentosa.

• **KEYWORDS:** brain-derived neurotrophic factor; iris pigment epithelial cells; retinitis pigmentosa; treatment

Zhang YY, Gao PF, Yang LX. Brain-derived neurotrophic factor and retinitis pigmentosa. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10 (7): 1327-1329

### 摘要

分子生物学的发展为治疗视网膜色素变性带来了新的希望。我们综述了脑源性神经营养因子和虹膜色素上皮细胞移植在视网膜色素变性治疗中的研究进展, 将神经营养因子、转基因和移植技术结合起来, 在视网膜色素变性治疗中有广阔的前景。

**关键词:** 脑源性神经营养因子; 虹膜色素上皮细胞; 视网膜色素变性; 治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 07. 029

张英瑜, 高朋芬, 杨丽霞. 脑源性神经营养因子与视网膜色素变性. *国际眼科杂志* 2010; 10(7): 1327-1329

### 0 引言

视网膜色素变性是一组以视网膜光感受器细胞和色素上皮细胞的渐进性凋亡以及死亡为结局, 引起视力下降和视野缺损等为共同表现的疾病, 具有遗传倾向性, 现已有 100 多个的相关基因被发现<sup>[1]</sup>。目前, 对这些疾病还没有有效的治疗措施, 因其几乎不可避免的致盲性和较高的发病率<sup>[2]</sup>引起人们的广泛关注。近年来研究者从视网膜移植、基因以及给予神经营养因子等方面探索视网膜色素变性的治疗, 我们就脑源性神经营养因子与视网膜色素变性作一简要综述。

### 1 关于 BDNF

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是继神经生长因子后发现的第二个神经营养因子, 自 1982 年由德国神经生物学家 Barde 及其同事首先由猪脑提取液中分离获得, 其单体由含有 252 个氨基酸残基的前体合成, 经加工形成 119 个残基, 相对分子质量为 13 000 的成熟碱性蛋白, 等电点为 9. 99。1989 年德国科学家 Leibroek 等<sup>[3]</sup>根据所测出的 BDNF 部分氨基酸残基序列设计 PCR 引物, 用 RT-PCR 方法从猪脑 mRNA 中成功克隆了 BDNF cDNA, 序列比较分析表明 BDNF 基因编码区不存在内含子。目前已知 BDNF 基因定位于人的 11 号染色体短臂的 1 区 3 带和鼠 12 号染色体上。BDNF 通过与靶细胞表面的特异性受体结合后, 激发分子间的级联效应, 影响细胞代谢等多种基本功能<sup>[4]</sup>。BDNF 虽与神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 同属于神经营养素家族成员, 但与 NGF 相比, 它的作用更广泛, 中枢神经系统中的某些对 NGF 无反应的神经元, 可对 BDNF 反应强烈, 因此 BDNF 在神经系统发育、功能维持和神经元群的成形性上起重要作用。

### 2 BDNF 对视网膜的保护作用

随着 BDNF 在中枢和周围神经系统研究的进展, 人们开始关注 BDNF 在视网膜疾病发生发展中的作用。BDNF 是视网膜神经如视网膜节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 所必需的神经营养因子, BDNF 能使培养的 RGC 存活, 能保护因营养素缺乏而导致的 RGC 程序性死亡, 当神经损伤后 BDNF 能够促进 RGC 存活, 促进视网膜光损伤的修复, 具有保护神经和调节功能的作用<sup>[5-7]</sup>。BDNF 能促进培养的人和牛 RPE 细胞分化, 在 RPE 分化与存活上能通过自分泌或通过胶质细胞间接作用改善光损伤, 调节视网膜变性中感光细胞的生存<sup>[8-10]</sup>。Okoye 等<sup>[11]</sup>也发现 IRBP/rtTA-TRE/BDNF-Q344ter 三杂合子转基因小鼠中, 强力霉素诱导的小鼠光感受器 BDNF 表达强阳性, 显著延缓了该动物模型光感受器细胞死亡, 视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 检测也发现视网膜功能得以维持。这一模型去除了在体注射损伤等实验干扰因素, 直接地证明了 BDNF 的神经保护作用, 为营养因子的筛选提供了可靠途

径。Keegan等<sup>[12]</sup>将出生后5~7d的雪旺细胞(Schwann cells,此期为高分泌BDNF状态)植入rho(-/-)变性小鼠视网膜下,发现实验组视网膜内光感受器细胞(retinal photoreceptor cells, RPCs)有6~7层,约800 $\mu$ m,而对照组视网膜内仅有1~2层RPCs,推测rho(-/-)变性小鼠生后早期BDNF低表达可能是视网膜色素变性形成的关键因素,而补充BDNF可以延缓或改善视网膜色素变性。Lawrence等<sup>[8]</sup>用BDNF转染反转录病毒-雪旺细胞系,然后将悬液注入RCS(royal college of surgeons)大鼠视网膜下腔,结果显示,术后8周龄时,实验组仍保持着4~8层RPCs,而对照组视网膜中RPCs仅有2~6层;术后20周龄时,对照组已无RPCs存活,而实验组细胞移植区内仍有较多RPCs存活,提示BDNF能够防止RPCs变性,促进其细胞存活。因此及时有效地补充BDNF有望成为治疗视网膜色素变性疾病的有效方法。

### 3 神经营养因子给药方式的研究进展

随着研究的深入,神经营养因子对多种视网膜变性疾病的治疗作用得到了肯定,这为其临床应用提供了基本条件。但目前使用的神经营养因子的分子量都较大,经全身系统给药后无法穿透血视网膜屏障,在视网膜局部达不到有效浓度,若加大剂量副作用则显著增加。Axokine在美国进行I期临床验证全身给药时有激活体内潜伏疱疹病毒的报道<sup>[13]</sup>。反复玻璃体腔注射虽然可以得到较好的治疗效果,但反复注射可能会引起视网膜脱离、眼内炎等并发症,在临床使用中存在较大风险和推广上的困难。因此,开发新的安全的给药方式,使神经营养因子在局部发挥持久有效的作用,对于神经营养因子治疗视网膜变性疾病从动物实验过渡到临床具有重要意义。

目前人们主要开展了两方面尝试:(1)神经营养因子的基因疗法,(2)是半透膜缓释系统,又被称为封装细胞治疗系统(encapsulated cell therapy, ECT),已开始II期临床验证。在一项对比基因载体眼内注射和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)的封装细胞治疗系统的实验中,前者的效果更显著并且神经因子的表达可持续到8mo<sup>[14]</sup>。

研究者把含有神经营养因子DNA的病毒载体注入动物眼内,发现其神经保护作用可维持很长时间<sup>[15]</sup>。Bok等<sup>[15]</sup>报道了将载有CNTF的cDNA片断的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)注入视网膜色素变性rd小鼠(retinal degeneration, rd)和先天性视网膜变性rds小鼠(retinal degeneration slow, rds)的玻璃体腔,延缓了光感受器细胞的萎缩,视杆细胞内的视紫红质含量增加,相应暗适应ERG的波幅也得到改善。也有报道以AAV为载体的CNTF治疗,虽然延缓了rds小鼠、P23H和S334ter突变视紫红质转基因大鼠的光感受器萎缩,但是引起了实验动物ERG的恶化<sup>[16]</sup>,推测可能与载体效应有关。由于报道结果的不统一,对神经营养因子、载体选择有待进一步研究。Lawrence等<sup>[8]</sup>将BDNF和胶质细胞系源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)的cDNA导入新生大鼠坐骨神经的雪旺细胞中,基因工程修饰后的细胞植入RCS大鼠的视网膜下腔,8, 12, 16, 20wk的视功能和视网膜形态结构的检查均明显优于伪手术组和无干预组,显示了长时间神经保护作用。张萌等<sup>[17]</sup>报道了在体电穿孔辅助BDNF基因转染至视网膜神经节细胞层和视网膜色素上皮细胞层能够延缓RCS大鼠视网膜色素变性的病程,基因治疗眼视网膜外核层较同期的对照

眼厚度增加,存活的光感受器数量较对照眼多。

ECT首先在中枢神经系统的研究中得到应用。Tao等<sup>[18]</sup>首次将这一系统引入眼科领域治疗视网膜色素变性,这一系统由封装膜、治疗细胞、细胞攀附支架和基质组成,治疗细胞是基因工程细胞系,可以持续分泌神经营养因子,封装膜是中空纤维半透膜,允许低分子量神经营养因子透过,而阻止高分子量抗体进入以避免机体免疫系统对治疗细胞的攻击。系统呈管状,一端固定在睫状体扁平部的眼球壁上,一端游离于玻璃体腔,植入眼内后可以持续、低浓度分泌神经营养因子。Tao将这一系统植入Rcd1犬(携带PDE6B基因的突变)眼内,使之持续、低浓度释放CNTF,7wk后治疗组光感受器细胞数量显著高于对照组,而且治疗作用有剂量依赖关系,当CNTF的分泌量达到5~15ng/d时起到完全保护作用,在系统植入的7wk中,未发现排斥及严重炎症反应,也未见并发症。Bush等<sup>[19]</sup>也通过动物实验验证了这一系统的安全性。

### 4 虹膜色素上皮细胞移植的研究

虹膜色素上皮细胞(iris pigment epithelium, IPE)是虹膜结构中重要的一层细胞,在解剖结构和睫状体上皮细胞等相连,为单层上皮细胞,其下可见基底膜,可与基质分离。虹膜色素上皮就胚胎学而言与RPE来源相同,研究也证明虹膜色素上皮的很多细胞学特征与RPE相近,例如具有色素、细胞形态相似、具有紧密连接复合体,更重要的是功能上的近似,IPE移植所产生的细胞因子与RPE 95%都是相同的,IPE也具备许多RPE的功能:摄取、代谢维生素A的功能,吞噬视杆细胞外部片段(rod photoreceptor outer segment, ROS)的功能。Amhold等<sup>[20]</sup>发现体外培养的IPE含有多种生长因子和细胞因子,如碱性成纤维因子,肝细胞生长因子,脑源性神经营养因子,色素上皮生长因子等,这些生长因子可以起到保护神经细胞的作用。

Schraermeyer等<sup>[21]</sup>将IPE细胞移植到RCS大鼠眼内,6mo后发现实验组的光感受器细胞数目和外核层厚度较对照组有明显增多,同时未见到IPE细胞出现异常形态学改变。N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)对视网膜神经元细胞具有毒性,Kano等<sup>[22]</sup>将BDNF的cDNA导入大鼠的IPE,在NMDA存在的情况下与视网膜神经元共同培养,转基因IPE细胞起到了保护作用,同时转基因IPE细胞视网膜下移植对视网膜光损伤模型中的光感受器细胞也表现出了保护作用。徐国兴等<sup>[23]</sup>尝试将自体IPE细胞移植到确诊为双眼视网膜色素变性患者的视网膜下腔,术后2wk检查:左眼视力从术前的0.15提高至0.2,多焦ERG显示移植区P1波平均反应密度上升。

### 5 总结与展望

视网膜色素变性的治疗至今仍然是个未攻破的难题。BDNF对视网膜色素变性疾病的有效性已得到了证实,有可能被试用于临床或与CNTF, GDNF等联合应用,这为治疗视网膜变性带来希望。但在过渡到临床之前,要求我们解决好给药途径和安全给药的问题;基因治疗的出现,给我们的研究带来了新的曙光,但基因治疗存在病毒载体潜在安全性等问题;IPE不能完全代替RPE,以及IPE移植受困于神经组织再整合等难题,这些都有待于进一步解决。虽然人类攻克视网膜色素变性将是一个艰难而漫长的过程,但是随着分子生物学、基因工程以及相关学科的发展,视网膜色素变性的治疗将会有有一个崭新的突破。

参考文献

- 1 Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2007;125(2): 151-158
- 2 Kanski JJ. Clinical Ophthalmology. Fifth Edition. Philadelphia USA: Elsevier Science Limited 2003; 491-494
- 3 Leibroek J, Lottspeich H, Hohn A, et al. Molecular cloning and expression of brain derived Neurotrophic factor. *Nature* 1989; 341(14): 149-152
- 4 Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. The combined effects of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(10): 2967-2971
- 5 Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, et al. Characterization of a transformed rat ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 86(1-2): 1-12
- 6 Cui Q, Tang LS, Hu B, et al. Expression of trkA, trkB, trkC in injured and regenerating retinal ganglion cell of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1954-1964
- 7 Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, et al. Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem* 2003;87(2):290-296
- 8 Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, et al. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):267-274
- 9 Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-Müller cell interactions control neurotrophic factor production during light induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2002;22(21):9228-9236
- 10 Bringmann A, Reichenbach A. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 2001;6:72-92
- 11 Okoye G, Zimmer J, Sung J, et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci* 2003;23(10): 4164-4172
- 12 Keegan DJ, Kenna P, Humphries MM, et al. Transplantation of syngeneic Schwann cells to the rhodopsin knock out [rho(-/-)] mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(44):3526-3532
- 13 Hauswirth WW, Beaufre L. Ocular gene therapy: Quo vadis? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2821-2826
- 14 Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration; phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(10):3896-3901
- 15 Bok D, Yasumura D, Matthes MT, et al. Effects of adenoassociated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res* 2002; 74(6):719-735
- 16 Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, et al. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV; CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2001;4:461-472
- 17 张萌, 莫晓芬, 郭文毅, 等. 在体电穿孔辅助 BDNF 基因眼内双腔延缓 RCS 大鼠视网膜色素变性的实验研究. *生物物理学报* 2009; 25(S1):244
- 18 Tao W, Wen R, Goddard MB, et al. Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3292-3298
- 19 Bush RA, Lei B, Tao W, et al. Encapsulated cell-based intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor in normal rabbit: dose-dependent effects on ERG and retinal histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2420-2430
- 20 Amhold S, Semkova I, Andressen C, et al. Iris pigment epithelial cells: a possible cell source for the future treatment of neurodegenerative diseases. *Experimental Neurology* 2004;187(2):410-417
- 21 Schraermeyer U, Kayatz P, Thumann G, et al. Transplantation of iris pigment epithelium into the choroid slows down the degeneration of photoreceptors in the RCS rat. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2000;238(12):979-984
- 22 Kano T, Abe T, Tomita H, et al. Protective Effect against Ischemia and Light Damage of Iris Pigment Epithelial Cells Transfected with the BDNF Gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3744-3753
- 23 徐国兴, 谢茂松, 郭健, 等. 自体虹膜色素上皮细胞移植治疗视网膜色素上皮细胞变性. *国际眼科杂志* 2008;8(3):538-539