

• 综 述 •

视网膜色素变性的自然动物模型及人工造模

胡小凤 综述 黎晓新 审校

Nature and medicine-induced animal model of retinitis pigmentosa

Hu Xiaofeng, Eye Center, Beijing People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China

Abstract Retinitis pigmentosa is the most common cause in adults hereditary disorders leading to blindness. There are currently many experimental researches in effort to develop an effective therapy for retinitis pigmentosa. Thus, an appropriate animal model is necessary for the progression in relevant experiments. Two types of animal models are offered, that is natural and artificial ones, and each also include different animals and types. Variant retinitis pigmentosa phenotypes have been found in nature type in mouse, rat, dog, cat, ect., in which mouse and rat are earliest utilized as animal models of retinitis pigmentosa, whose pathologic process and phenotypes have been thoroughly investigated. Transgenic animals and chemical drugs are also applied in attempts to find more feasible animal models. Owing of the relatively large volume of eye, transgenic pigs are thought to be very good retinitis pigmentosa models during operation on the eyes. With respect to the chemical drugs, NaIO_3 is most frequently used in ophthalmology. In addition, light with different wavelengths is also used to induce the damage of different ocular tissue. Characteristics and pathology of different animal models are overviewed.

Key words retinitis pigmentosa; animal model; transgenic animal; medicine-induced animal model

摘要 遗传性视网膜色素变性(RP)是成人遗传性致盲眼病中最常见的疾病。到目前为止,这种疾病还没有有效的治疗方法。RP动物模型分为自然动物模型及人工造模,它们又分别包括不同的动物及种类,每种都有其不同的特点。探索RP的治疗方法需要合适的动物模型。就RP动物模型的种类及机制做一综述。

关键词 视网膜色素变性;动物模型;转基因动物;化学造模

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2007)02-0157-04

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是引起中央及周边视力不可逆丧失的较常见的病因,常累及双眼,持续进展。引起RP的基因异常种类较多,已经发现的大约有48个,其中每个基因又包含多个不同的突变^[1]。目前一些学者试图通过视觉假体来治疗RP,并已取得了一些进展。RP的动物模型有多种,各有特点,因此实验中选择合适的动物模型比较关键。

1 自然动物模型

1.1 小鼠为常染色体隐性遗传RP动物模型

由于Pde6b基因发生了无意突变,引起了磷酸二酯酶(PDE) β 亚基的功能异常^[2]。视杆细胞在4d时开始变性,到4周时全部消失。许多近亲交配的鼠系如C3H、SWR、FVB、129Sv小鼠等,都是Pde6b^{rd1}纯合子^[3]。

作者单位:100044北京大学人民医院眼科中心

通讯作者:黎晓新 (Email: drlixiaoxin@vip.sina.com.cn)

1.2 RCS大鼠为常染色体隐性遗传RP动物模型

RCS大鼠由Boume等^[4]首先报道。生后2周表现正常,18d时光感受器细胞的数目开始减少,3个月时所有的光感受器细胞均消失^[5]。与退化光感受器相邻的一些视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞比同龄正常的RPE细胞要高一些,基底面的皱褶明显增多,细胞质中的线粒体增加。8周时,后极部RPE细胞开始丢失;10周时,在RPE丢失的地方,毛细血管内皮细胞变厚,内皮窗消失。这种退化性改变的多中心发生在视网膜的不同地方^[6]。

RCS大鼠的RPE细胞表达一种基因,不能吞噬脱落的膜盘,从而导致了病变的发生^[7]。目前已经发现RCS大鼠的隐性基因突变存在于受体酪氨酸酶的Mertek基因^[8]。此基因409碱基对的缺失,使RPE细胞一种参与结合脱落膜盘的蛋白产物的功能发生改变。这一基因位于染色体2q14.1^[9],其突变也存在于人类RP中。

RCS大鼠是第1个用于RP的病因及治疗方法研究的动物模型,是一种较成熟的视网膜退化的动物模型,与人类RP有许多相似之处。

1.3 rds小鼠 (retinal degeneration slow mouse) 为常染色体显性遗传RP动物模型

突变影响了 *peripherin/rds* 基因,从而影响了基因编码的一种表达于光感受器细胞外段盘膜边缘维持膜盘形态及稳定性的蛋白^[10]。纯合子中,感光细胞外节不发育,外核层、外丛状层2周时开始变薄,12个月时整个视网膜感光细胞完全消失,内层视网膜基本不受影响^[11]。RDS基因突变的一个重要特点就是疾病类型的多样化,许多不同位点的突变可导致相似的临床表现;而同一位点的突变在不同家系之间甚至同一家系内却有不同的临床表现。

1.4 猫类动物模型

Abyssinian猫是常染色体隐性遗传RP动物模型,也有人报道这种动物模型也有显性遗传的模式,但基因型到目前还未确认^[12]。早期视杆细胞受影响,晚期视杆、视锥细胞均受损。

最近在波斯猫中发现了一种早期发病的常染色体隐性遗传RP。生后2周开始出现光感受器、外丛状层及RPE的变性,16周时完全消失。这一模型对人类早期发病的一些类型的RP的研究提供了一种良好的动物模型^[13]。

1.5 犬类动物模型

视网膜营养不良是纯种狗中常见的致盲疾病,而其中RP最为常见。大部分是常染色体隐性遗传,极少数为X连锁。目前,人们不仅发现了许多种犬类RP模型,而且已经建立了一些种系以供研究。其中爱尔兰长毛犬为 α GMP磷酸二酯酶 β 亚基基因的缺陷,这与rd小鼠及一些人类隐性RP家族的病变相似。患有进行性视杆、视锥细胞变性的小型贵妇犬表现为二十二碳六烯酸浓度降低,与人类Usher综合征伴发的RP类似^[14]。

瑞典比格犬中有一种先天性RP。患此病的狗RPE65基因外显子5有一个4碱基对的缺失,导致了基因框移。其症状与人类某些RP的症状十分相似,给多种治疗方式,包括视网膜移植、视假体植入提供了一种很好的中等大小动物模型^[15]。T4R视蛋白基因突变可以引起英国獒的常染色体显性遗传RP^[16]。

1.6 其他动物模型

RP自然动物模型多种多样,除了以上所述,果蝇、斑点鱼等繁殖周期短,突变的种类多,对于发现基因突变的类型也作出了巨大的贡献^[17,18]。鸡的视锥细胞

占的比例较大,与人类视网膜的结构更接近,也是一种很好的动物模型^[19]。

2 人工RP模型

2.1 转基因动物

大部分转基因动物都是常染色体显性遗传。

2.1.1 RPE-65基因敲除小鼠 位于1p31的Pde γ 亚基(Pde6g),编码RPE特异蛋白,与视网膜VitA代谢有关^[20]。此基因敲除使小鼠RPE细胞功能遭到破坏,导致了全反视黄醇的过度积聚和11-顺-视黄醇脂的缺乏^[21]。为常染色体隐性遗传。

2.1.2 视紫红质(Rhodopsin)基因敲除小鼠 人类中,RHO基因突变约占RP的15%。由Humphries等培育的视紫红质基因敲除小鼠是一种常染色体显性遗传RP动物模型^[22]。

2.1.3 P23H突变的转基因大鼠 Steinberg的建立 视紫红质基因中的23位脯氨酸被组氨酸代替,导致了异常基因产物的合成及感光细胞的死亡^[23]。为常染色体显性遗传RP。

2.1.4 其他小鼠转基因动物模型 Naash等将一个突变的Opsin基因转入小鼠体内^[24]。最近,Hong等还建立了一个X连锁的RP动物模型,与人类RP3相似^[25]。C214S小鼠P/rds基因中的C214S(Cys214→Ser)无义突变可引起一种迟发的常染色体显性遗传RP。对此转基因小鼠的研究发现突变导致单倍剂量不足^[26]。S334ter-line-5大鼠是一种慢性光感受器变性的转基因动物模型,而S334ter-line-3大鼠光感受器变性发生得较早^[27]。

2.1.5 P237L转基因猪 在人类中,P237L突变是一种常见的引起常染色体显性遗传RP的突变。1973年,Peters等建立了一个Pro347Leu转基因猪的动物模型,早期出现严重的视杆细胞丧失,随后出现视锥细胞的缓慢变性。由于与人类的RP非常相似,因此对一些治疗方法临床前期的研究非常有效^[28]。

2.2 化学造模

化学造模操作比较容易,效果比较明确,可以选择较大体型的动物,便于手术操作,是一种较好的动物模型。

2.2.1 NaIO₃RP模型 NaIO₃可以选择性地作用于色素上皮,继而引起视网膜其他的结构如光化学感受器、脉络膜等的病变。

对绵羊NaIO₃静脉注入的研究发现,在药物注入早期(大约2h),RPE细胞结构遭到了显著的破坏。视杆和视锥细胞的外节相对正常^[29]。3d后,外节出

现了不同大小的空泡,膜盘结构变形。Müller细胞远段出现了明显的水肿,失去了细胞质的结构。外丛状层的树突、内核层的胞体、内丛状层的突起以及许多节细胞中的线粒体膨胀,嵴消失。节细胞轴突没有明显改变^[30]。

在靠近 RPE 坏死或缺失的地方,脉络膜毛细血管的内皮增厚,血管管腔变细,毛细血管丛密度减少。而在相对正常的 RPE 处,可见到小片的正常的毛细血管被萎缩的毛细血管丛所包围^[31]。

作为血-视网膜屏障的组成部分,色素上皮细胞膜具有活跃的主动和被动运输功能。 Na^+D_3 能够抑制酸性磷酸酶^[32]、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶及 II 型碳酸酐酶 (CA_2) ^[33]等的活性,从而引起 RPE 细胞膜的破坏。对细胞膜,特别是基底部细胞膜的严重损害,影响了离子泵的活动机制及膜的通透性,细胞膜通透性增加,引起细胞内的水肿包括线粒体、内质网及其他细胞器的破裂。

光感受器依赖 RPE 的代谢,那么当 RPE 细胞受到损伤,引起膜通透性及运转功能的改变,细胞器结构的破坏时,最终不可避免会影响到光感受器、脉络膜等。

2.2.2 单色光照射的视网膜损害 不同波长的单色光照射后主要引起两种病理改变, 320~440 nm 波长的光主要引起光感受器的损伤,而 470~550 nm 波长的光则对 RPE 的影响最大。在低及中剂量照射时, RPE 的损害可以是可逆的,而在较高剂量时, RPE 单层结构被破坏,一些 RPE 细胞退化。造成同样程度的光损伤,黄斑部需要的能量是旁黄斑部的 2 倍,表明叶黄素对光照有保护作用^[34]。

对于老鼠的视网膜,两种波长引起病理改变的阈值分别为: 380 nm: $0.61 \text{ J}/\text{cm}^2$, 6~8 min; 470 nm: $513 \text{ J}/\text{cm}^2$, 60~90 min。兔子光照实验表明,破坏血-视网膜屏障所需的蓝光阈值为 $50 \text{ J}/\text{cm}^2$,而黄光阈值为 $1600 \text{ J}/\text{cm}^2$ ^[34]。

通过对基因缺陷的大鼠 $\text{Rho}^{-/-}$ 的研究发现, 380 nm 波长光照射后引起的急性期改变可能与视紫质的漂白有关。而 470 nm 波长光照射后线粒体酶如细胞色素 C 氧化酶可能介导了 RPE 损伤,继发了大量的光感受器的退化损伤^[35, 36]。

2.2.3 N-乙基-N-亚硝基脒 (ENU) 诱导模型 ENU 可以诱导 Pde6b 基因的突变,是建立 RP 动物模型的一种新的方法。Hart 等将 ENU 用于小鼠发现了 7 个新的 Pde6b 的点突变^[37]。ENU 诱导 RP 模型可重复性较好,全身用药 7 d 后(成年小鼠 60 mg/kg 大鼠 60

~75 mg/kg 仓鼠 90 mg/kg 猴子 40 mg/kg), 就可以出现光感受器的丧失^[38]。

随着对 RP 疾病发病机制认识的加深、基因工程技术的发展及人工视觉研究的进展, RP 疾病的治疗将有重大突破,而动物模型的成功建立和应用将会起到重要的作用。

参考文献

- Doonan F, Cotter TG. Apoptosis: a potential therapeutic target for retinal degenerations [J]. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1: 41-53
- Carter DLD, LaVail MM, Siman RL. Differential effect of the mutation on rods and cones in the mouse retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17: 489-498
- Dalke C, Loster J, Fuchs H, et al. Electoretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 601-609
- Boume MC, Campbell DA, Tansley K. Hereditary degeneration of rat retina [J]. *Br J Ophthalmol* 1938; 22: 613-623
- Lue CL. Rod cell activity in retinal degenerative rats [J]. *J Formos Med Assoc* 1994; 93: 605-610
- Neuhardt TH, May CA, Wilsch C. Morphological changes of retinal pigment epithelium and choroids in mice [J]. *Exp Eye Res* 1999; 68: 75-83
- Strauss O, Stumpf F, Mergler S. The royal college of surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect [J]. *Acta Anat* 1998; 162: 101-111
- Cruz FM, Yasumura D, Weir J. Mutation of the receptor tyrosine kinase Merck in the retinal dystrophic RCS rat [J]. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 645-651
- Andreas G, Li Y, Thompson DA. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa [J]. *Nature genet* 2000; 26: 270-271
- Neeraj A, Catherine J, Steve EJ. Immunocytochemical colocalization of clusterin in apoptotic photoreceptor cells in retinal degeneration slow rods mutant mouse retinas [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 84-91
- Sanyal S, de Ruiter A, Hawkins RK. Development and degeneration of retina in rd mutant mice: light microscopy [J]. *J Comp Neurol* 1980; 194: 193-207
- Narfstrom K. Hereditary progressive retinal atrophy in the Abyssinian cat [J]. *J Heredity* 1983; 74: 273-276
- Rah H, Maggs DJ, Blankenship TN, et al. Early-onset autosomal recessive progressive retinal atrophy in Persian cats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 1742-1747
- Aguirre GD, Acland GM, Maude MB, et al. Diet enriched in docosahexaenoic acid fail to correct progressive rod-cone degeneration (pro) phenotype [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2387-2407
- Andres V, Sven EGN, Kristina N. Retinal dystrophy of Swedish Briard/Briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65 [J]. *Genomics* 1999; 57: 57-61
- Zhu L, Jang GF, Jastrzebska R, et al. A naturally occurring mutation of the opsin gene (T4R) in dogs affects glycosylation and stability of the G protein-coupled receptor [J]. *J Biol Chem* 2004; 279: 53828-53839
- Pak WL. Drosophila in vision research: The Friedenwald Lecture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 33: 1599-1609
- Brockerhoff SE, Hurley JB, Janssen-Bienhold U, et al. A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10545-10549
- Senpe-Rowland SL, Lee NR. Avian models of inherited retinal disease [J]. *Method Enzymol* 2000; 316: 526-536
- Morimura H, Fishman GA, Grover SA. Mutations in the RPE65 gene in

- patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3088- 3093
- 21 Redmond TM, Yu S, Lee E. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle[J]. Nat Genet 1998; 20: 344- 351
- 22 Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ. Retinopathy induced in mice by targeted-disruption of the rhodopsin gene[J]. Nat Genet 1997; 15: 216- 219
- 23 Steinberg RH, Flannery JG, Naash M, et al Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37: S698
- 24 Naash MJ, Hollyfield JG, Al-Hubaidi MR, et al Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 5499- 5504
- 25 Hong DH, Pawlyk BS, Shang J, et al A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; 10: 329- 333
- 26 Stricker HM, Ding XQ, Quimbao A, et al The Cys214→Ser mutation in peripherin/rds causes a loss-of-function phenotype in transgenic mice[J]. Biochem J 2005; 388: 605- 613
- 27 Thomas BB, Seiler MJ, Sadda SR, et al Superior colliculus responses to light-preserved by transplantation in a slow degeneration rat model[J]. Exp Eye Res 2004; 79(1): 29- 39
- 28 Petters RM, Alexander CA, Wells KD. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa[J]. Nat Biotechnol 1997; 15: 965- 970
- 29 Sven EG, Bengt K, Hans EP. Changes in ultrastructure and function of the sheep pigment epithelium and retina induced by sodium iodate II. Early effects[J]. Acta Ophthalmologica 1977; 55: 1007- 1025
- 30 Sven EGN, Bengt K, Hans EP. Changes in ultrastructure and function of the sheep pigment epithelium and retina induced by sodium iodate III. Delayed effects[J]. Acta Ophthalmologica 1977; 55: 1027- 1043
- 31 Gary EK, Teddy G, Florence P, et al Choriocapillaris atrophy after experimental destruction of the retinal pigment epithelium in the rat[J]. Acta Anat 1986; 127: 171- 175
- 32 Seiji H, Sachiko N, Tomoichi S. Effect of drugs in vitro on lysosomal enzyme activities in bovine retinal pigment epithelial cells[J]. Jpn J Ophthalmol 1988; 32: 316- 321
- 33 Korte GE, Smith J. Carbonic anhydrase type II in regenerating retinal pigment epithelium. A histochemical study in the rabbit[J]. Experimentia 1993; 49: 789- 791
- 34 Han WT, Jr Ruffolo JJ, Jr Mueller HA, et al Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17: 1029- 1035
- 35 Eelco MB, Theo GMFG, van Norren D. Temporal sequence of changes in rat retina after UV-A and blue light exposure[J]. Vis Res 1999; 39: 1233- 1247
- 36 Pautler EL, Morita M, Beezley D. Hemoprotein mediated blue light damage in the retinal pigment epithelium[J]. Photochem Photobiol 1990; 51: 599- 605
- 37 Hart AW, McKie L, Morgan JE, et al Genotype-phenotype correlation of mouse pde6b mutations[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46: 3443- 3450
- 38 Yoshizawa K, Tsubura A. Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals and application for the therapy of human retinitis pigmentosa[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2005; 109: 327- 337

(收稿: 2006-02-10 修回: 2006-11-22)

(本文编辑: 胡纯钢 周洁)

本刊对来稿的基本要求

文稿必须具有较高的学术价值, 论点新颖, 论据可靠, 论述严谨, 数据准确, 文笔通顺, 必要时应做医学统计处理。外文字母请注意大小写、正斜体, 希腊文、拉丁文等请注明。

论著、综述、讲座 4 000字以内 (包括图表); 论著简报、临床经验、技术方法等 1 500字以内; 病例报告 1 000字以内。

(本刊编辑部)

欢迎订阅 2007年《中国神经再生研究(英文版)》杂志

《中国神经再生(英文版)》(Nerve Regeneration Research)杂志, 是一本令神经再生研究与专业人员感兴趣的, 有特色、有品位、高层次、高水平、高质量的全英文版的学术期刊。2006年创刊, CN 11-5422/R, ISSN 1673-5374 国内外公开发行, 月刊, A4开本, 96页/期。

本刊关注国际神经再生研究方面的热点和重大应用性课题, 跟踪国际神经再生研究方面高科技的前沿成果。创刊后便被世界著名出版商荷兰 Elsevier Science出版集团的 Science Direct On Site (SDOS)数据库全文收录, 并被中国核心期刊遴选数据库、中国学术期刊全文数据、中文科技期刊数据库、《中国学术期刊文摘(英文版)》、中文生物医学文献数据库收录。

本刊重视神经再生研究领域具有前瞻性、创造性和较高学术水平的基础研究、应用基础研究以及相关临床研究, 力求每一篇文章都清楚阐述与他人、他篇的不同之处。

从投稿至接到录用通知 30天。一般稿件作者修回到发表为 90天, 欢迎投稿。

本刊订阅: 沈阳 1234邮政信箱, 邮编: 110004 15元/册, 2007年邮发代号 8-585

投稿电邮: sjzs101@163.com sjzs102@163.com, 咨询电邮: sjzs100@163.com

电话: +862423381085 传真: +862423394178

更多信息详见 www.sjzsyj.com

(中国神经再生研究(英文版)杂志编辑部)