

糖尿病视网膜病变缺血再灌注损伤中相关调控因子的研究进展

种泽龙 综述 郑曰忠 赵堪兴 审校

Research progress in regulatory factors of ischemia-reperfusion injury induced by diabetic retinopathy

Zhong Zelong, Zheng Yuezhong, Zhao Kanxing. Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Abstract Diabetic retinopathy(DR) is a kind of often ischemic ophthalmopathy. In three stages of ischemia, reperfusion injury and its ending of retinal ischemia reperfusion(RIR) injury is induced by DR. Many inflammatory mediators and genes are expressed excessively because of oxidative stress, calcium overloading, nitric oxide, excitatory amino acid and other factors and further lead to inflammatory reaction, injury, apoptosis, necrosis, histopathology change and dysfunction. These courses are regulated by many related factors such as apoptotic genes, erythropoietin, monocyte chemotactic protein-1, vascular epithelial growth factor, basic fibroblast growth factor, stromal cell-derived factor-1, nitric oxide, nitric oxide synthase. The characters and clinical application of major regulatory factors in RIR of DR were summarized.

Key words diabetic retinopathy; ischemia-reperfusion injury; regulatory factors

摘要 糖尿病视网膜病变(DR)是一种常见的缺血性眼病。DR视网膜缺血再灌注(RIR)损伤的缺血过程、再灌注损伤过程及其结局3个阶段中氧化应激、钙超载、一氧化氮(NO)、兴奋性氨基酸(EAA)等因素引起多种炎性介质和基因过度表达,进而造成炎症反应、损伤、凋亡和坏死等组织改变和功能障碍。这些过程受凋亡基因、促红细胞生成素、单核细胞趋化蛋白1、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、基质细胞衍生因子-1、NO、一氧化氮合酶(NOS)等多种相关因子的调控。就其中主要调控因子的特点及临床应用方面的研究进展进行综述。

关键词 糖尿病视网膜病变; 缺血再灌注损伤; 调控因子

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0072-04

视网膜缺血再灌注(retinal ischemia reperfusion, RIR)损伤的机制十分复杂,是目前国内外视网膜研究领域的热点之一。近来的研究显示,高眼压RIR损伤模型可致视网膜神经元变性和严重的毛细血管变性,炎性细胞通过刺激细胞凋亡信号引起毛细血管变性,这些改变与糖尿病视网膜病变(diabetic retino-Pathy, DR)血管变性的过程相似^[1-2]。因而DR同视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变、视网膜静脉周围炎等新生血管性眼病均可存在RIR过程。现将DR的RIR过程中主要调控因子的特点及临床应用方面的研究进展做一概述。

1 缺血过程

1.1 兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)机制

调控因子

Louzada-Junior等^[3]于1992年首次提出在缺血期,视网膜神经元细胞外有谷氨酸的积聚。Dijk等^[4]发现AMPA受体及其mRNA表达是持续减少的,并能作为缺血引起视网膜兴奋性神经传导的证据。NMED是一种EAA的受体,可与释放的谷氨酸结合,改变视网膜通透性,引起Ca²⁺、Na⁺等的平衡失调,引起细胞损伤。NMED受体和非NMED受体拮抗剂在体外阻止RIR损伤有强大协同作用。有实验通过研究糖尿病大鼠模型视网膜神经胶质细胞,发现糖尿病可诱发谷氨酸盐转运机能不良,引起神经元兴奋过度和谷氨酸盐的兴奋毒性^[5-6]。此外,雌激素、硫酸镁可拮抗NMDA受体,有对抗NMDA诱导的兴奋毒性作用。

1.2 细胞的凋亡机制调控因子

由于谷氨酸的转运发生异常,而导致神经元机能的障碍和细胞的凋亡。

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院
通讯作者:赵堪兴 (Email: zkx@tjmu.edu.cn)

1.2.1 凋亡基因调控 多种基因均参与细胞凋亡的调控,主要有促进细胞凋亡的基因,如水通道-4 基因、Bax 基因、野生型 p53 基因、Caspase 基因、AQP-4 基因、c-fos 和 c-jun 基因、Fas 和 Fas 配体结合诱导细胞凋亡;抑制细胞凋亡的基因如 Bcl-2^[7]、h-ras 基因、Rb 基因等。

1.2.2 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 血清 EPO 可保护光感受器,能减少病理性血管损害和继发的增生性病变^[8]。EPO 具有神经保护作用,能通过抗细胞凋亡机制保护视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 避免缺血和再灌注损伤,且 EPO 和血管内皮生长因子 (vascular epithelial growth factor, VEGF) 有显著相关性^[9]。DR 早期玻璃体内注射 EPO 可减少视网膜细胞凋亡,保护血-视网膜屏障功能^[10]。

1.2.3 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) MCP-1 调控视网膜脱离模型光感受器的凋亡,在血管生成和中枢神经系统疾病 RIR 的发病机制中,可募集白细胞到达损伤部位^[11]。

1.2.4 VEGF-A VEGF-A 作为 VEGF 家族的成员,是一种重要的中枢神经系统神经保护剂, Kazuaki 等^[12]发现 VEGF-A 参与视网膜缺血的适应性反应, RIR 前缺血预处理 24 h 增加了 VEGF-A 水平,实质上减少了视网膜凋亡细胞的数量。

1.2.5 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 视网膜缺血诱导前给予重组人 bFGF,可以明显减少 RGCs 层坏死和内丛状层、内核层变薄,从而减轻 RIR 损伤,推测其通过抑制钙超载和 caspase-3 表达而抑制细胞凋亡^[13]。色素上皮源性因子、胶质细胞源性神经营养因子均可抑制 RIR 的细胞凋亡,并可能与 bFGF 一起作为机体自我保护的机制,来调节 RIR 的损伤。

1.2.6 其他调控因子 Vasoinhibins 可直接作用于眼部的内皮细胞,阻碍血管生长及扩张,促进凋亡机制介导的血管萎缩,而且能防止 DR 视网膜新生血管形成和血管通透性改变^[14]。神经保护因子 D1、热休克蛋白 (heatshockprotein, HSP)、雌激素等能抑制细胞凋亡。此外,胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、血红素氧合酶 (heme oxygenase, HO) 的过度表达可抑制细胞凋亡。

1.3 毛细血管缺血调控因子

白细胞通过表面的 β 整合素与血管内皮细胞表面的对应受体细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 黏附于血管并迁移至视网膜中,造成血-视网膜屏障损害,同时释放自由基等细胞毒

性物质,引起血管通透性改变和邻近内皮细胞损伤,后者又导致血小板黏附、微血栓形成及毛细血管缺血。

2 再灌注损伤过程

2.1 氧化应激机制调控因子

自由基产生于组织恢复血流灌注的早期阶段,缺氧组织重新获得氧时由于自由基爆发性的产生,往往发生局部 RIR,自由基与脂质、蛋白质及核酸等的氧化反应将引起细胞内环境紊乱和物质丢失^[15],也可使核酸发生氧化,最终可导致细胞坏死或凋亡。RIR 产生大量活性氧,引起组织抑制蛋白 I κ B α 的降解和核转录因子 κ B (nuclear factor-kappaB, NF- κ B) 的活化,使白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等的表达增加,故认为氧化应激是 NF- κ B 活化介导组织 RIR 的重要刺激因素。腺苷能促进 I κ B 生成,血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素 1 可减少 I κ B 降解,四氢吡咯二硫代氨基甲酸酯 (PDTC) 等抗氧化剂能较好地抑制 NF- κ B。此外,谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、二氧化锰歧化酶、谷氨酰半胱氨酸连接酶等内源性抗氧化酶、N-乙酰-5-氧基色胺、雌激素、非促分裂人酸性成纤维细胞生长因子、HO-1 等均能抑制氧化应激。

2.2 炎症机制调控因子

缺血区内白细胞聚集,炎症细胞因子出现和增多是再灌注阶段最早的反应,表明炎症和免疫反应在 RIR 发病机制中起重要作用。

2.2.1 基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) Brooks 等^[16]通过实验证实阻断 SDF-1 活性可完全阻止成体造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 源性内皮前体细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 的功能和局部缺血处内皮细胞的修复,有效防止视网膜新生血管的形成,可能与血-视网膜屏障的完整性和 EPCs 行为的改变,影响白细胞和巨噬细胞移行及调节、紧密连接和细胞黏附蛋白有关。

2.2.2 曲安奈德 临床中玻璃体内或后部 Tenon 氏囊下注射曲安奈德治疗 DR 等眼病导致的眼内组织水肿或新生血管性疾病,可以减少视网膜厚度,抑制视网膜缺血后白细胞和内皮间的相互作用,下调视网膜血管内皮黏附分子^[17]。

2.2.3 萘帕芬胺 (Nepafenac) 胰岛素缺乏的糖尿病大鼠视网膜前列腺素 E₂ (prostaglandinE₂, PGE₂)、超氧化物、VEGF、一氧化氮 (NO)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和视网膜微血管的白细胞淤滞显著增加,这些

异常除了 VEGF 和 NO 均能被 Nepafenac 明显抑制^[18]。

2.2.4 其他调控因子 有研究表明缺血引起 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 和 IL-6 表达增加,糖尿病引起 caspase-1、血管细胞间黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、ICAM-1、IL-1 β 及 IL-6 表达增加,缺血合并糖尿病不能引起这些因子的显著增加,表明 RIR 触发的炎症反应在 DR 中起一定作用,调控基于脂质结构的 Ω -3-多不饱和脂肪酸或他汀类对糖尿病患者的炎症反应可能有益^[19]。此外,IL-1、IL-6、TNF- α 、黏附分子、IL-1 β 、ICAM-1、炎症早期的 COX-2 等调控因子有介导炎症的作用。重组人 IL-1 受体拮抗剂、IL-1 β 中和抗体、生理条件下的 HSP、PGE1、抗 ICAM-1 抗体、抗凝血酶 III、炎症早期的 COX-2 等调控因子可减轻炎症。

2.3 NO 机制调控因子

2.3.1 NO 视网膜缺血再灌注初期即有 NO 的升高,NO 具有使视网膜血管扩张、增加视网膜血流、抗血小板凝集的保护作用,但 NO 大量释放可致 RGCs 膜脂质过氧化,细胞核 DNA 断裂,细胞损伤和凋亡。

2.3.2 一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) NOS 在白细胞淤滞和 BRB 功能障碍过程中发挥了优势作用,这种机制包括 ICAM-1 的上调和紧密连接蛋白的下调^[20]。

2.3.3 其他调控因子 调控氨基胍能显著抑制 RIR 诱导的大鼠模型毛细血管变性合并神经变性,RIR 增加了多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 的活动,同时上调大鼠诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、COX-2、TNF 和 ICAM-1 水平并一直持续于炎症过程中^[21]。

2.4 钙超载机制调控因子

再灌注开始后大量钙离子进入 RGCs 内,提示钙超载主要是发生于再灌注期。HSP60 能诱导人树突状细胞成熟并分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等因子,人外周血单核细胞表面 CD14 抗原是 HSP60 的受体,它同时也参与 HSP70 介导的细胞内钙超载和激活前炎性细胞因子,从而活化单核细胞的过程^[21]。此外,硫酸镁、雌激素等对钙超载引起的损伤过程均有一定的预防保护作用。

3 再灌注损伤的结局

DR 发生 RIR 最终导致组织细胞凋亡和坏死、视网膜水肿、新生血管形成和纤维组织增生性病变。

3.1 神经保护调控因子

美金胺 (memantine, MEM)^[22]、烟酰胺^[23]、bFGF、

雌激素等对 RIR 损伤具有神经保护作用。

3.2 视网膜再生调控因子

bFGF 在体内或体外均可促进视网膜的再生及视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞表型转化,还可刺激成纤维细胞、血管内皮细胞、角膜内皮细胞、RPE 细胞及 RGCs 的增生及移行。

3.3 视网膜水肿调控因子

azurocidin^[24]、VEGF、 β 型蛋白激酶 C、基质金属蛋白酶、组织型纤溶酶原激活物、MEM^[22] 等可加重 RIR 引起的视网膜水肿;而组织基质金属蛋白酶抑制物、纤溶酶原激活物抑制物可减轻视网膜水肿。

3.4 血管生成调控因子

促进新生血管形成的调控因子有 VEGF、bFGF、表皮生长因子、肝细胞生长因子、瘦素、Fractalkine (FKN)^[25]、促血管生成素-1、血管生成素、类胰蛋白酶、糖基化终末产物、血管紧张素 II、黏附分子、基质金属蛋白酶等。VEGF 在视网膜病变中可能起双重作用:高氧下调 VEGF 引起血管退化,而随后的 VEGF 上调导致视网膜新生血管形成;缺氧状态下 VEGF 的表达是由缺氧诱导因子-1 诱导的。此外,NO、TNF、转化生长因子- α 和转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)、血小板源性生长因子、IGF、前列腺素 E1、E2、白介素 1、2、6、8 兼具直接和间接促血管新生的作用。抑制眼部新生血管的调控因子主要有血管抑制素、内皮抑制素、色素上皮衍生因子、软骨源抑制因子、催乳素、血栓反应素-1、促血管生成素-2、组织金属蛋白酶抑制剂、凝血酶敏感蛋白-1、血小板因子-4、MEM^[23]、干扰素、NOS、IL-4、12、18、24 等。

3.5 增生性病变更调控因子

增生型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者血浆中肾素原和玻璃体液肾素原均高于非 PDR,推测眼内血管紧张素 II 与 PDR 发病有关。细胞间联结分子、局部 TNF 的激活及血管细胞吸附分子的作用加强,对 PDR 的发生有重要作用。TGF- β 可调控细胞的生长和分化、细胞的黏附和迁移、细胞外基质的产生和纤维化,参与 PDR 的发生发展过程。HSP47 在纤维化病变中表达增加,曲安奈德预防增生性玻璃体视网膜病变及 PDR 玻璃体切割术后复发,以及治疗 DR 引起的黄斑水肿可能与其抑制 HSP47 的表达有关。有研究显示玻璃体内 FKN 水平在 PDR 患者中明显高于对照组,表明在眼部血管形成异常疾病如 PDR 中 FKN 发挥了重要作用^[25]。

4 小结与展望

综上所述,随着细胞生物学和分子生物学技术与

临床研究的紧密结合,以及人们对于 DR 病理过程中 RIR 机制的认识不断深化,对其相关调控因子的作用途径及相互之间的联系等将进行深入研究。RIR 相关调控因子在 DR 治疗方面显示出良好的应用前景,这给 DR 治疗提供了新的理论依据,对临床预防和控制 DR 具有极为重要的意义。

参考文献

- Mauler DA, Semkova I, Huenemke M, et al. Severe vascular lesions and neurodegeneration in retina of mice following elevated intraocular pressure (iop)-induced retinal ischemia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 4419
- Zheng L, Gong BD, Hatala DA, et al. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 361 - 367
- Louzada-Junior P, Dias JJ, Santos WF, et al. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis [J]. *J Neurochem*, 1992, 59: 358 - 363
- Dijk F, Kraal-Muller E, Kamphuis W. Ischemia-induced changes of AMPA-type glutamate receptor subunit expression pattern in the rat retina: a real-time quantitative PCR study [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45: 330 - 341
- Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, et al. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 633 - 639
- Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 3109 - 3116
- Zheng L, Levin LA, Kern TS, et al. Endothelial cell-specific overexpression of Bcl-2 delays neuronal and vascular lesions in a retinal ischemia/reperfusion model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 4200
- Souza-Ramalho PD, Silva APD, Bicho MP, et al. Erythropoietin (epo) can protect retinal cell apoptosis and prevent visual loss in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 4529
- Katsura Y, Okano T, Matsuno K, et al. Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28: 2252 - 2254
- Zhang JF, Wu YL, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 732 - 742
- Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 2425 - 2430
- Kazuaki N, Yin-Shan Ng, Zhong LC, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171: 53 - 67
- Niu YJ, Zhao YS, Gao YX, et al. Therapeutic effect of bFGF on retina ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117: 252 - 257
- Clapp C, Thebault S, Arnold E, et al. Vasoinhibins: Novel inhibitors of ocular angiogenesis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295: E772 - 778
- Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, et al. Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina [J]. *Glia*, 2005, 50: 1 - 11
- Brooks HL, Caballeo S, Newell CK, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122: 1801 - 1807
- Mizuno S, Nishiwaki A, Morita H, et al. Effects of periocular administration of triamcinolone acetonide on leukocyte-endothelium interactions in the ischemic retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 2831 - 2836
- Timothy SK, Miller CM, Du YP, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 373 - 379
- Gustavsson C, Agardh CD, Hagert P, et al. Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion [J]. *Retina*, 2008, 28: 645 - 652
- Leal EC, Manivannan A, Hosoya Ken-Ichi, et al. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 5257 - 5265
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD-14 dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 435 - 442
- Kusari J, Zhou S, Padillo E, et al. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 5152 - 5159
- Tam D, Tam M, Maynard K. Nicotinamide modulates energy utilization and improves functional recovery from ischemia in the in vitro rabbit retina [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1053: 258 - 268
- Skondra D, Noda K, Almulki L, et al. Characterization of azurocidin as a permeability factor in the retina: Involvement in VEGF-induced and early diabetic blood-retinal barrier breakdown [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 726 - 731
- You JJ, Yang CH, Huang JS, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, as a mediator of ocular angiogenesis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 5290 - 5298

(收稿:2008-02-10 修回:2008-10-21)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)

本刊对“结果”和“讨论”部分的要求

结果是论文最重要的部分。结果应尊重事实,得出的各种数据应有统计学处理;能用简要文字讲清楚的内容不用图表;图和表应有自明性;各种数据应严谨准确,具有可靠性和重现性。

讨论是整篇文章的最后总结,主要回答“研究出什么”的问题。讨论的内容:由研究结果所揭示的原理及其普遍性;研究中有无发现例外或本论文尚难以解释和解决的问题;与先前已发表过的(他人或自己)研究工作的异同,引用他人成果要有出处,列出参考文献;本论文在理论上与实用上的价值;对进一步深入研究本课题的建议。