

# 脑红蛋白在高原视网膜疾病中表达的研究进展

段文娟 综述 燕振国 审校

## Advance study of neuroglobin expressing in high altitude retinopathy

Duan Wenjuan, Yan Zhenguo. Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China

**Abstract** Neuroglobin is a new globin in the vertebrate brain, retina and endocrine tissue that play the role neuroprotection against hypoxic/ischemic injury. The neuroglobin exists at the combination form with hemoglobin and myoglobin, therefore it is considered as the third kind of oxygen-carrying globulin. The oxygen-carrying function of neuroglobin is to supply oxygen for brain, retina and endocrine tissue organ and gland. Expression of neuroglobin in tissue is regulated by soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase, hypoxia, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ) and mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase. At plateau area, the expression of neuroglobin in retina of biobody is higher than that at plain and sub-plateau areas. This result indicates that neuroprotection plays a protection role to retina from injury of hypoxia, especially at plateau area. The study on neuroglobin offer a new approach to diagnosis and treatment of high altitude retinopathy.

**Key words** neuroglobin; high altitude area; retina

**摘要** 脑红蛋白是继血红蛋白和肌红蛋白之后发现的第3类携氧球蛋白,主要分布在脑和视网膜及内分泌组织中,与这些组织的氧供有着密切的关系。在视网膜中主要表达于丛状层和光感受器的内节中。在高原缺氧环境中,兔眼球钝挫伤后视网膜脑红蛋白(NGB)的表达较平原及亚高原环境中增加,推测 NGB 可能作为一种内源性的机制在低氧环境下保护视网膜神经细胞,使其免受或减少低氧损伤。在高原环境下,有关 NGB 表达的研究为高原视网膜疾病的诊治指出了新的方向。就 NGB 在高原视网膜疾病中表达的研究进行综述。

**关键词** 脑红蛋白; 高原地区; 视网膜

**分类号** R 774.01 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0732-04

在医学上,高原是指使人体产生明显生物学效应的海拔3 000 m以上的地域<sup>[1]</sup>。在我国,海拔在3 000 m以上的高原和高山地区占全国总面积的 1/6,人口约 6 000万。在青藏高原有 1 千万常住居民<sup>[2]</sup>,由于其特殊的地理环境和气候因素,可以引起人体多种高原疾病。近年高原病患者越来越多,高原病的研究日益迫切,其中高原视网膜疾病渐受关注。脑红蛋白(neuroglobin, NGB)属血红蛋白类球蛋白家族,是一种单体珠蛋白,与一些无脊椎动物神经球蛋白有亲系相关性,表达在远古进化时期。研究表明 NGB 主要表达在视网膜丛状层和光感受器的内节及脑和一些高氧要求的内分泌组织中<sup>[3]</sup>,与氧具有高度亲和力。它在神经系统缺氧的适应性反应过程中起重要作用,体外低

氧损伤和体外中枢系统缺血试验中 NGB 的表达增高<sup>[4]</sup>。故高原缺氧的特性提示 NGB 可能与高原眼病中的高原视网膜疾病存在一定联系。就 NGB 在高原视网膜疾病中表达的研究进行综述。

## 1 NGB 的生物学特性

### 1.1 NGB 的结构

NGB 最早由 Burmester 等<sup>[5]</sup>发现。人的 NGB 基因位于染色体 14q24, NGB 基因组为 8 041 bp, mRNA 序列全长为 7 727 bp,有 3 个内含子,4 个外显子结构。人 NGB 全长 cDNA 序列为 1 909 bp, 5' 非编码区为 375 bp,编码区为 456 bp,可编码 151 个氨基酸, 3' 非编码区为 1 078 bp,其中含 27 bp 的 poly(A)<sup>[6]</sup>。基因序列同源性分析发现大鼠 NGB 与小鼠 NGB 基因编码区的序列同源性为 96%,与人 NGB 基因的同源性为 88%<sup>[7]</sup>。

本课题为甘肃省科技攻关基金项目资助(2GS054 — A43-014-15)

作者单位:730050 兰州军区总医院眼科中心

通讯作者:燕振国 (Email: zyzhangguo@126.com)

NGB 为细胞内蛋白。X 射线晶状体结构分析显示<sup>[8]</sup>,人 NGB 有 2 种晶状体结构形式:一种为典型 0.4 nm×0.2 nm×0.1 nm 的菱形结构,不稳定;另一种为稳定的结构形式,个体单元参数为  $a:3.96\text{ nm}$ ,  $b:9.49\text{ nm}$ ,  $c:6.75\text{ nm}$ ,  $\beta:94.4^\circ$ ,其中每个不对称晶格可以容纳 2~4 个分子。

## 1.2 NGB 在视网膜的分布

在正常大鼠眼球中 NGB 主要存在于视网膜中<sup>[9]</sup>,其中在视网膜的丛状层和光感受器的内节中分布最多,这与视网膜的耗氧部位线粒体的亚细胞定位基本一致。视网膜的耗氧主要发生在内节、外丛状层和内丛状层,因为在视网膜光感受器细胞和突触接触的区域(即丛状层)中能量需求特别高。通过免疫荧光研究也证实,大多数的 NGB 蛋白都存在于这 3 层高耗氧层中。在光感受器细胞内的亚细胞定位则显示:NGB 主要位于线粒体最集中的区域—顶部内节的椭圆体区。但视网膜各层内的 NGB 蛋白和 mRNA 在细胞内的分布上有显著差异。Burmester 等<sup>[5]</sup>和 Dewilde 等<sup>[10]</sup>的免疫染色和原位杂交实验显示,尽管 NGB mRNA 主要位于核层和节细胞的大细胞体以及光感受器的内节,但 NGB 蛋白主要存在于丛状层和光感受器的内节。这种重新分布提示,至少在丛状层,NGB 蛋白是在翻译后大量地被转运。研究还发现黄斑区域的 NGB 含量明显高于其他部位,由于黄斑是视功能最重要的区域,因此,进一步支持了 NGB 与视网膜耗氧有关的假设,即 NGB 可能在视网膜活动的高峰期促进了线粒体呼吸链中的氧气运输或提供了氧气的短暂储存。

## 1.3 NGB 的生物功能

NGB 的结构和分布表明,NGB 的功能与氧有关。现大量文献报道,NGB 有为神经组织和视网膜储存、运输氧的功能。该蛋白和氧具有较高的亲和力,半饱和和压力  $P_{50}$  约为 2 torr,高于哺乳动物血红蛋白(约为 26 torr),低于肌红蛋白(约为 1 torr)<sup>[5]</sup>。虽然细胞浓度较低,但 NGB 的高氧亲和力能够帮助氧通过血脑屏障并增加氧的效用以适应神经组织活跃的代谢<sup>[11]</sup>。Sun 等<sup>[4,12]</sup>观察了 NGB 与皮层细胞缺氧之间的关系,通过对培养的皮层细胞进行持续 24 h 的缺氧,发现随着缺氧时间的增加,NGB 的表达呈逐渐增高的趋势。NGB 表达较未转染组明显下降,下降的 NGB 表达在缺氧环境下加速了神经细胞的死亡。将 NGB 反义寡聚核苷酸注入脑室可增加梗死体积和增加神经传出功能的受损,将有 NGB 表达的淋巴瘤附属的病毒载体大脑内给药,可减少梗死面积和改善神经的传出功能。通过

NGB 表达重组质粒 pcDNA NGB 转染 HN33 细胞,转染后的 HN33 细胞 NGB 表达明显高于未进行转染的对照组。同时证实 NGB 的过量表达可降低缺氧环境下的细胞死亡,说明 NGB 在缺氧或缺血性损伤中作为一个缺氧诱导的神经保护因子。

除运输和储存氧的功能外,NGB 可作为酶或酶的底物。Trandafir 等<sup>[13]</sup>研究表明,虽然 NGB 没有明显的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶活性,但是人 NGB 内部的二硫化物键(CD7-D5)能被硫氧还蛋白还原酶降解。再者,体内外的研究表明大肠杆菌细胞有酶降解系统,这一系统能保持 NGB 的亚铁血红素  $\text{Fe}^{2+}$  形式的。这种降解系统需要低分子量结合物作为辅助因子,体外研究提示 NADH 和 NADPH 可发挥这种作用。NGB 可能还有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的功能,在 ATP 生成中起重要作用,增加细胞的能量供应。此外,NGB 还具有清除 NO 的作用。氧合 MGB 使 NO 氧化成  $\text{NO}_3$ ,本身转变为高铁 MGB,并迅速被还原成 MGB,再结合氧成为氧合 MGB,形成降解 NO 的循环。有学者在胚胎肾和正常人肝组织中发现了高表达的 NGB,这些器官在代谢过程中产生了大量的 NO,也表明 NGB 具有与 HGB 和 MGB 相似的清除 NO 的功能,参与 NO 的代谢过程,从而减少 NO 对神经系统的损伤。NGB 可保护 PC12 细胞来抵抗氧化应激和防止  $\beta$  淀粉样蛋白诱导的细胞损伤,提示 NGB 可能有 ROS 清道夫功能<sup>[14-15]</sup>。

## 1.4 NGB 的调节途径

NGB 基因表达受鸟苷酸环化酶—环鸟苷酸依赖的蛋白激酶(soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase, sGC-PKG)信号转导途径的调控,氯化血红素可诱导 NGB 基因在 mRNA 和蛋白质水平表达增强,且这一诱导作用有浓度和时间依赖性;用 PKG 抑制剂和 sGC 抑制剂阻断 sGC-PKG 信号转导途径,明显抑制氯化血红素对 NGB 基因表达的诱导<sup>[16]</sup>。

有实验表明,细胞低氧信号转导途径参与 NGB 基因表达的调控,低氧和低氧诱导因子  $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )的诱导子如 CoCl<sub>2</sub> 和 Deferoxamine (Dfx)等能使 NGB 基因表达增强。另外在 NGB 基因 5' 端非编码区发现了多个 HIF-1 结合位点相同序列,提示 NGB 为 HIF-1 的靶基因<sup>[4,12]</sup>。

丝裂原活化蛋白激酶的激酶或细胞外信号调节激酶的激酶(mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase, MEK)的抑制子能够阻断低氧诱导 NGB 基因的表达,提示可能另外有途径参与了 NGB 基因表达的调控<sup>[16]</sup>。

## 2 NGB 与高原视网膜疾病

高原眼病是人们长期处于海拔3 000 ~ 5 000 m的亚高原、高原地区,引起眼球这一高需氧器官缺氧、代谢紊乱而导致的一系列眼部疾病。

高原视网膜病变首次在1969年提出<sup>[17-18]</sup>,低氧的高原环境引起视网膜血管迂曲充血和视盘充血,火焰状出血、棉绒斑、点片状前视网膜出血常见。一种假说是高原改变了血液黏稠度。促红细胞生成素被释放以应对低动脉血氧饱和度,引起红细胞比容增加。高原视网膜疾病的病理生理阶段:(1)高原的低氧导致视网膜脉管系统充血以保证足够的氧供应光感受器代谢的需要,这是正常的生理反应。(2)脉管系统的超负荷使调节系统在它的生理限制之外,引起毛细血管内皮的破坏和出血。

高原的低氧环境是引起高原病的主要因素。而在机体所有的组织器官中,对缺氧最为敏感的是大脑中枢神经系统,而视网膜为高度分化的神经组织,是脑组织的延续,对缺氧更为敏感。在视觉的形成过程中视细胞需要消耗大量的能量以维持其功能,其内节含有丰富的线粒体,为视细胞提供能量,以维持暗环境中的电流,控制视细胞膜上的离子通道以及通过化学突触将视觉信息经双极细胞传到神经节细胞等功能活动。因此,推测大量存在于小鼠和大鼠视网膜内的脑红蛋白,其功能可能是促进氧向神经元中线粒体的扩散或直接介导氧向线粒体的传递,有助于ATP的产生,从而对视觉的产生发挥重要作用<sup>[19]</sup>。视网膜中NGB的浓度是大脑中的100倍,NGB在大脑中的浓度约1  $\mu\text{mol/L}$ ,而其在视网膜中的浓度大于100  $\mu\text{mol/L}$ ,与肌肉组织中肌红蛋白的浓度相似。Schmidt等<sup>[20]</sup>经免疫蛋白印迹实验证实:NGB占整个视网膜总蛋白量的2%~4%,视网膜组织中可溶性蛋白的质量浓度约为100 mg/mL,因此,NGB在视网膜中的浓度为100~200  $\mu\text{mol/L}$ ,提示高原视网膜疾病可能与NGB的表达有关。

在高原低氧环境下,正常兔视网膜组织中NGB的表达高于平原及亚高原环境;高原低氧环境下兔眼球钝挫伤后视网膜组织中NGB的表达高于平原及亚高原环境,但增长幅度低于平原及亚高原环境下兔眼球钝挫伤后视网膜组织中NGB表达的增长幅度<sup>[21]</sup>。说明NGB可能作为一种内源性的机制在低氧环境下使神经细胞受到保护,免受或减少低氧损伤。但是NGB功能的正常发挥,需要外界环境氧浓度在一定水平。且在不同低氧环境下,NGB的增高程度有差异。虽然

在高原低氧环境下NGB增高,但增高程度较平原地区低,推测在高原低氧环境下视网膜缺氧性损伤时,视网膜神经元的损伤较平原地区严重。故进一步的研究如果能将NGB利用蛋白转导技术应用于外伤后视觉器官缺血缺血性疾病,即利用特殊的蛋白转导域将抗凋亡、神经保护蛋白导入缺氧模型视觉器官,以期达到保护组织细胞,防止其凋亡,缩小损伤范围,增强视网膜对缺氧的耐受性,缓解眼球钝挫伤时因缺氧对视网膜的继发性损害,从而获取更多的时间,降低眼球钝挫伤的致盲率。可见高原眼病的视网膜组织中表达的NGB发挥着在缺氧条件下进一步为神经组织供氧且具有使氧向神经组织加速转运的功能。说明NGB在低氧预适应过程中起重要作用,NGB的浓度越低对缺氧的耐受性越差。长期的缺氧使NGB处于一高水平,可以推测NGB对视网膜起到一定的保护作用。

## 3 展望

随着对NGB在高原视网膜疾病中的作用和功能相关研究的深入,新的问题接踵而至,NGB与视网膜氧的供应可能与储存等有关,故针对高原视网膜疾病可以通过某些因素干预增加NGB表达以保护视神经减少视网膜缺血缺氧造成的出血、新生血管形成等病变,并进一步研究NGB表达的调控机制。秦力维等<sup>[22]</sup>报道NGB是高原视网膜疾病诊治的新发现,也为高原视网膜疾病的诊治提出了新的思路。通过对NGB相关问题的深入研究,NGB将为缺血缺氧性视网膜病变的患者带来福音。

## 参考文献

- 1 吕永达.高原医学与生理学[M].天津:天津科技翻译出版公司,1995:1-2
- 2 吴天一.浅谈青藏高原人类群体及对低氧的适应[J].高原与人体健康,2005,1:12-13
- 3 Burmester T, Hankeln T. Neuroglobin and cytoglobin in search for their role in the vertebrate globin family[J]. Comparat Biochem Physiol, 2007, 6(59): 148
- 4 Sun YJ, Jin KL, Peel A, et al. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(6): 3497-3500
- 5 Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. Nature, 2000, 407(6803): 520-523
- 6 王春丽, 张成岗. 人脑红蛋白全长 cDNA 序列的克隆[J]. 生物化学和生物物理进展, 2002, 29(6): 946-951
- 7 张成岗, 李林, 邓美玉, 等. 大鼠脑红蛋白基因编码区的克隆、多态性分析及该基因组织表达谱研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(11): 997-1001
- 8 Pesce A, Nardini M, Dewilde S, et al. Human neuroglobin: crystals and preliminary X-ray diffraction analysis[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002, 58(102): 1848-1850
- 9 李耀宇, 刘惠玲, 童绎, 等. 脑红蛋白在大鼠眼球中分布的免疫组化研究[J]. 眼科研究, 2006, 10(24): 461-465

- 10 Dewilde S, Kiger L, Burmester T, et al. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(42): 38949 - 38955
- 11 Geuens E, Brouns I, Flamez D, et al. A globin in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 30417 - 30420
- 12 Sun Y, Jin K, Mao XO, et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15306 - 15311
- 13 Trandafir F, Hoogewijs D, Altieri F, et al. Neuroglobin and cytoglobin as potential enzyme or substrate[J]. *Gene*, 2007, 2(38): 103 - 113
- 14 Li RC, Morris MW, Lee SK, et al. Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress[J]. *Brain Res*, 2008, 1190: 159 - 166
- 15 Li RC, Pouranfar F, Lee SK, et al. Neuroglobin protects PC12 cells against  $\beta$ -amyloid-induced cell injury[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 5(1): 1 - 8
- 16 Zhu YH, Sun YJ, Jin KL, et al. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells[J]. *Blood*, 2002, 100(7): 2494 - 2498
- 17 Morris DS, Somner J, Donald MJ, et al. The eye at altitude, advances in

- experimental medicine and biology[J]. Springer US, 2006, 21: 249 - 270
- 18 Pavlidis M, Stupp T, Georgalas I, et al. Intraocular pressure changes during high-altitude acclimatization[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244: 298 - 304
- 19 冉建华, 孙善全, 毕杰. 脑红蛋白 mRNA 在大鼠眼球中的表达[J]. *重庆医学*, 2005, 34(7): 1035 - 1036
- 20 Schmidt M, Giessl A, Laufs T, et al. How does the eye breath[J]? *Biol Chem*, 2003, 278(3): 1932 - 1935
- 21 金尚丽. 高原低氧环境下兔眼球钝挫伤后 NGB 及 TGF- $\beta_2$  的表达及意义[D]. 兰州大学, 2007
- 22 秦力维, 郭建巍. 脑红蛋白 - 高原性眼疾诊治的新方向[J]. *国际眼科杂志*, 2007, 8(7): 1104 - 1106

(收稿: 2008-10-04 修回: 2009-06-26)

(本文编辑: 高 红)

## · 临床经验 ·

## 高眼压状态下外伤性前房积血的手术治疗

王 宏 王 丽 丽 谷 世 波

在持续高眼压状态下行青光眼手术可引起严重的术中、术后并发症,应在术前用药物将眼压降至正常水平。但临床上常见外伤性前房积血继发青光眼的患者应用药物不能有效控制眼压,如不采用手术治疗,将导致严重的视神经损伤,造成不可逆的视功能下降<sup>[1]</sup>。抗青光眼手术是否能在高眼压下状态下实施目前颇有争议。本研究回顾性分析外伤性前房积血继发急性青光眼患者的临床资料,探讨持续性高眼压青光眼患者的抗青光眼手术疗效。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 1998 年 1 月—2009 年 2 月我院收治外伤性前房积血继发急性青光眼 35 例 35 眼,其中爆炸伤 15 眼,拳击伤 15 眼,钝器伤 5 眼;均在高眼压下行抗青光眼手术;其中男 29 眼,女 6 眼;年龄 6 ~ 59 岁。入院时视力:无光感者 2 眼,光感 ~ < 0.05 者 16 眼,0.05 ~  $\leq$  0.2 者 15 眼,0.3 ~  $\leq$  0.5 者 2 眼。入院时眼压 40 ~ 45 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 者 19 眼,46 ~ 50 mmHg 者 16 眼。患者否认其他眼病史,裂隙灯、检眼镜检查未见异常,11 眼 B 型超声检查未见异常。其中 2 眼 B 型超声检查提示眼部出血加重。

**1.2 前房出血情况** 前房首次出血继发青光眼 12 眼,二次出血继发青光眼 23 眼。术前止血散瘀药物治疗后依据 Oksala 前房出血分级法<sup>[1]</sup>分为:Ⅰ级前房出血 26 眼,Ⅱ级前房出血 8 眼,Ⅲ级前房出血 1 眼。

**1.3 术前处理** 患者入院后均给予止血散瘀药物治疗,静脉滴注 20% 甘露醇注射液 250 mL,每日 2 次。口服碳酸酐酶抑制剂,眼部滴用  $\beta$  受体阻滞剂等滴眼液,眼压有所下降,但仍不能控制在正常范围内,眼内出血均减轻,患者于发病 4 ~ 8 d

手术。

**1.4 手术方法** 术前静脉滴注 20% 甘露醇注射液 250 mL, 30 min 内滴完,口服醋氯酰胺片 0.5 g。常规局部麻醉,于 1:00 ~ 11:00 方位做以穹隆部为基底、沿角膜缘切开的结膜瓣,再以角膜缘为基底,用隧道刀于角膜缘后切开 3 mm  $\times$  4 mm 的矩形 1/2 厚度巩膜瓣,于 9:00 方位做透明角膜侧切口,缓慢放出房水,在巩膜瓣下角膜巩膜灰白线后 1 mm 切透后 1/2 角膜巩膜小梁组织 1 mm  $\times$  1.5 mm,虹膜膨出,将其切除 1.5 mm  $\times$  1.5 mm。在侧切口放房水时对前房内再出血者给予 4℃ 的生理盐水经侧切口处冲洗,经角膜巩膜 12:00 方位小梁切口流出,至不再出血为止。缝合关闭巩膜及结膜瓣。术后继续用止血药物 2 d,复方妥布霉素滴眼液点眼。

**1.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。本组患者测试的视力和眼压值以  $\bar{x} \pm s$  表示,术前和术后的视力及眼压比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

患者术后视力为光感 ~ < 0.05 者 5 眼,0.05 ~  $\leq$  0.2 者 15 眼,0.3 ~  $\leq$  0.5 者 15 眼。术后眼压为 10 ~ 14 mmHg 者 16 眼,15 ~ 20 mmHg 者 19 眼。手术前后的视力及眼压比较见表 1。

表 1 手术前后视力及眼压的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	视力	眼压 (mmHg)
术前	35	0.063 $\pm$ 0.067	45.457 $\pm$ 3.211
术后	35	0.266 $\pm$ 0.177	15.171 $\pm$ 2.134
<i>P</i>		0.021	0.000

术后无 1 眼发生浅前房。2 眼前房再出血,应用止血药及甘露醇后出血吸收,半个月后检查有 7 眼前房角不同程度的后