

一氧化氮与视网膜缺血-再灌注损伤

张 然 综述 李平华 审校

Nitric oxide and retinal ischemia-reperfusion injury

Zhang Ran, Li Pinghua. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Nitric oxide (NO) plays an important role in retinal ischemia-reperfusion injury. Nitric oxide synthase is activated by many kinds of mediators of inflammation and cytokines and therefore produce generous NO under the retinal ischemia-reperfusion condition. NO is a free radical with widely biologic activities. In the earlier period of retinal ischemia-reperfusion injury, a little of NO contents can decline the injury degree of retina by ischemic and hypoxia down. However, at the advanced stage of retinal ischemia-reperfusion injury, a great amount of NO damage retina via multiple physiological and pathological approaches. To identify the injury mechanism of NO to retina and control its excessive production is very critical for preventing and treating ischemia-reperfusion injury of retina. The research advance in effects of NO on ischemia-reperfusion injury of retina is reviewed.

Key words retina; ischemia-reperfusion; nitric oxide

摘要 一氧化氮(NO)在视网膜缺血-再灌注损伤中占重要地位。视网膜缺血-再灌注时,一氧化氮合成酶(NOS)被多种炎性介质和细胞因子激活,使 NO 大量生成。NO 是一种活性很强的自由基,具有广泛的生物学活性。在缺血-再灌注早期,少量 NO 可降低缺血缺氧对视网膜的损伤程度;晚期过多的 NO 可通过多种途径对视网膜造成损害。就目前有关 NO 在视网膜缺血-再灌注损伤中的研究进展进行综述。

关键词 视网膜; 缺血-再灌注; 一氧化氮

分类号 R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0935-04

视网膜作为神经组织,在缺血缺氧环境中易受损伤,常见的原因包括视网膜血管阻塞性疾病、高血压及影响视网膜血流量的眼科手术等。有效挽救缺血视网膜组织的措施是早期恢复血液再灌注。然而临床上发现,经历了一段时间缺血的视网膜可能并未出现明显的功能改变,但在再灌注时却出现明显的功能障碍,这些功能障碍有时候甚至不可逆;或者视网膜组织在缺血时已发生了功能受损,但再灌注并不使功能障碍减轻,反而加重了组织损伤,即视网膜缺血-再灌注损伤。视网膜缺血-再灌注损伤是由多种因素介导的复杂病理生理过程^[1-3],本文仅就目前有关一氧化氮(nitric oxide, NO)在视网膜缺血-再灌注损伤中的研究进展进行综述。

1 NO 的生物合成、代谢及生理效应

NO 是由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸生成的,并与半胱氨酸、白蛋白或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)结合到达靶细胞,激活鸟苷酸环化酶(GC)使磷酸鸟苷(GMP)水平升高而发挥其生物学效应。NOS 有 3 种异构体,即神经元型 NOS(nNOS)、内皮型 NOS(eNOS)和诱导型 NOS(iNOS)。nNOS 和 eNOS 合称结构型 NOS(cNOS),平时可在组织内持续、低水平表达,其活性受 Ca^{2+} 浓度调节^[4-5],催化合成少量 NO,发挥舒张血管调节血流、抑制血小板的聚集和黏附效应;当内皮细胞受到某些神经递质(如 ACh)或机械刺激时,eNOS 和 nNOS 的表达上调,加快 NO 的合成和释放^[6]。iNOS 主要由内毒素、脂多糖和细胞因子诱导调节,催化产生大量 NO,抑制细胞呼吸 NADH-辅酶 Q 氧化还原酶和琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶活性,破坏 DNA 双螺旋结构,诱导 DNA 损伤和突变,并与超氧阴离子(O_2^-)形成强毒性自由基过氧化亚硝基阴离子($ONOO^-$),发挥细胞毒效

应。在眼部, cNOS 存在于脉络膜、视网膜、睫状体及小梁网, 以脉络膜和视网膜的 NOS 活性最强。而 iNOS 在正常视网膜组织中几乎无表达, 在内毒素等介质刺激下可表达于视网膜内皮细胞、周细胞、视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGCs)、视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞等细胞浆之中。生成的 NO 可被氧自由基、血红蛋白、氢琨等迅速灭活, 失去其生物活性; 如未被氧化则随呼吸排出体外。

2 视网膜缺血-再灌注时 NO 的生成及变化

有研究表明在缺血早期, 由于视网膜视神经、视盘释放兴奋性氨基酸增多, 激活细胞表面 N-甲基 D-天门冬氨酸受体 (NMDA) 使电压门控 Ca^{2+} 通道连续开放, 结果 Ca^{2+} 大量进入细胞内, 细胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 与钙调蛋白相结合, 激活了许多钙敏感酶, 如核酸内切酶、蛋白酶、NOS, NOS 刺激 L-精氨酸产生大量 NO^[7]。缺血缺氧时, ATP 耗竭, 能量代谢障碍, cAMP 依赖性蛋白激酶活性下降, 使 NOS 脱磷酸化而活性增强, 合成 NO 增多, 致 NO 含量和 NOS 活性首次升高。随着缺血时间的延长, 视网膜组织中 O_2 、L-精氨酸供给减少, NOS 磷酸化及巯基亚硝基化, 加上血管内皮细胞的损伤, 故在缺血后期 NOS 活性降低, NO 合成减少, 缺氧也可通过转录及转录后机制抑制 cNOS (内皮型) 表达, 使 NO 合成减少。当视网膜恢复血供即再灌注后, O_2 及 L-精氨酸恢复供应, 细胞内 Ca^{2+} 浓度再次升高, NOS 被激活, 使 NO 含量和 NOS 活性再次升高形成复氧期的第 2 次高峰。此时 NO 增高的主要原因不在于 cNOS 的合成作用, 而是由于 iNOS 被激活在缺血区高表达的结果^[8]。Iadecola 等^[9]研究表明, NO 在缺血-再灌注后 24 ~ 48 h 达高峰。另有研究结果显示, iNOS 在再灌注 6 h 后开始表达, 24 h 时最强, 以后逐渐减弱, 但在再灌注 72 h 时仍可见 iNOS 的阳性表达, 并且在第 24 h 时缺血组各期视网膜电图波幅最低, 此时视网膜损伤最严重^[10]。iNOS 在正常的视网膜组织中检测不到, 缺血-再灌注时, 缺血受损视网膜中的中性粒细胞黏附和聚集, 巨噬细胞系统激活, 这些炎症反应使多种炎症介质和细胞因子释放, 如 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、内毒素和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 其共同激活 iNOS, 使 NO 持续大量地表达, 从而对视网膜造成更大的损害^[8]。在缺血-再灌注过程中, NO 的量呈双峰样改变, 并且第 2 个峰高于第 1 个。

3 NO 在视网膜缺血-再灌注损伤中的作用及机制

在缺血早期, 视网膜由 nNOS 和 eNOS 介导生成 NO, 由于 NO 生成时间短暂且量少, 对神经系统的毒性作用相对较小; 因 nNOS 的半衰期短, 在缺血极早期, 内皮细胞产生的 NO 量超过神经元产生的有毒性 NO, 并可通过 NO/cGMP 途径使血管扩张, 血流增加, 阻止血小板和白细胞凝聚和微血栓的形成, 保护血管内膜, 改善微循环, 抵消了毒性作用^[11]; 抑制肾上腺素物质对血管的收缩作用, 减轻缺血性损害抵抗损伤, 在一定程度上降低了视网膜的损伤程度, 起到一定的保护作用。有研究表明在缺血早期补充 NO 或 NO 供体能减轻心肌缺血-再灌注损伤, 缩小心肌梗死面积、减轻内皮功能紊乱^[12]。在缺血晚期及再灌注时, 由于 iNOS 的激活, 大量 NO 持续生成, 使视网膜损伤加重。在缺血性视网膜病变及实验性动物模型的发病机制中, 凋亡起着重要作用^[13], Oz 等^[14]研究发现缺血 5 ~ 10 min 后再灌注即可造成视网膜细胞层的明显凋亡。

由 NO 生成过多引起的视网膜神经细胞死亡机制尚不完全清楚, 但是已有多项研究表明 NO 对细胞的毒性损伤的机制可能是视网膜在缺血性损伤后, 由于 NMDA 受体被激活, 导致 iNOS 表达, 同时引起线粒体氧自由基产生增加, NO 与 O_2^- 反应生成过氧化亚硝酸阴离子 ($ONOO^-$); $ONOO^-$ 是一种强氧化剂, 能氧化蛋白质的巯基, 使多种酶失活并且可使脂质过氧化, 其速率是 H_2O_2 脂质过氧化的 1 000 倍, 过氧化物对神经元产生毒性作用, 从而影响生物膜的功能。 $ONOO^-$ 是神经细胞凋亡的诱导剂, RGCs 对 $ONOO^-$ 介导的神经毒性十分敏感而易被损伤并且循线粒体介导途径诱导凋亡^[15]。 $ONOO^-$ 进一步生成具有强毒性的羟自由基 (OH^-) 及 NO_2 自由基而引起氧化应激, 也可造成脂质膜的损伤。 $ONOO^-$ 的作用底物之一为线粒体的 Mn-SOD, 后者活性被抑制后, 致使线粒体内 O_2^- 积聚, 进一步加重过氧化损伤^[16]。同时, $ONOO^-$ 可导致酪氨酸硝基化生成 3-NT, 而酪氨酸硝基化会给组织细胞带来损伤^[17]。高浓度的 $ONOO^-$ 可使机体许多重要酶被抑制、灭活和活性部位破坏, 引起能量衰竭, 导致细胞死亡^[18]。NO 能够与许多蛋白质的巯基起反应导致亚硝酰化, 也可导致细胞核酸亚硝酰化, 使 DNA 双链降解而破坏 DNA 的螺旋结构, 导致细胞损害; 因 DNA 双链降解而引起的 DNA 损伤, 可激活一种耗能的 DNA 修复酶-多聚 ADP 核糖聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP], PARP 激活后引发其底物 NAD^+ 的大量消耗, 抑制糖酵解途径, 从而降低细胞 ATP 的生

成,引发细胞凋亡^[15],这也是目前比较明确的由 NO 介导的细胞死亡通路。NO 还可与呼吸链中与线粒体电子传递系统及柠檬酸循环有关的酶的某些含亚铁原卟啉基团的铁离子结合,形成亚硝酰铁络合物使线粒体电子传递受阻,导致能量代谢障碍,从而抑制某些与细胞呼吸和 DNA 复制有关的关键酶(如线粒体 NADH-泛醌氧化还原酶、NADH 琥珀酸氧化还原酶和 cis-乌头酸酶)的活性,最终抑制线粒体呼吸,进一步引起自由基产生增多,加重氧化应激反应^[18]。弥散到突触间隙的 NO 不断刺激谷氨酸的释放,使兴奋性氨基酸进一步增多。谷氨酸主要作用于细胞膜上的 AMPA 和 K 受体,使其过度兴奋,对 Na⁺ 的通透性增加,Na⁺ 的大量内流,膜电位发生变化,Cl⁻ 顺着电位差大量内流,导致 H₂O 大量内流,造成神经元的急性肿胀,甚至死亡。Aikawa 等^[19] 利用免疫技术和 RT-PCR 法证实了在大鼠 RIR 时,兴奋性氨基酸受体及 mRNA 在视网膜内层表达增多,并指出 NMDA 在视网膜细胞坏死中起一定作用。谷氨酸、NO、O²⁻、ONOO⁻ 与 Ca²⁺ 超载相伴形成恶性循环,加重视网膜的损伤^[20]。NO 可改变离子通道、激活 G 蛋白和相关激酶及转录因子 AP-1/NF-KB。NF-KB 被激活转位,导致相关炎症因子表达上升而引起炎症反应,还可能进一步在转录水平上激活一些“死亡基因”的表达^[21]。现已发现在一种重要的抗凋亡基因 bcl-2,可以防止或明显降低自由基细胞因子引起的细胞凋亡^[22]。Bcl-2 中有 p53 结合元件,p53 与之结合可以使 bcl-2 表达下降,这可能是 p53 诱导凋亡的机制之一。而且 NO 还可诱导 bax 的表达,破坏 bcl-2/bax 平衡,诱发细胞凋亡。Chen 等^[23] 报道,bcl-2 mRNA 阳性神经细胞再灌注后可延长存活时间,bcl-2 蛋白阳性表达的细胞存活;bcl-2/bax 蛋白的比例决定细胞凋亡的趋势,bcl-2/bax 的比例升高可抑制细胞的凋亡,反之,则可促进细胞凋亡;而 bax 与 p53 mRNA 阳性细胞随再灌注时间延长多趋于死亡;p53 蛋白阳性表达的细胞多死亡。袁春燕等^[24] 通过建立视网膜缺血-再灌注损伤动物模型,用免疫组织化学链霉亲和素-生物素过氧化物酶复合物(SABC)法检测再灌注后不同时段视网膜组织中 p53、bax 和 bcl-2 基因表达的变化发现,缺血组视网膜再灌注后 p53、bax 蛋白表达增加,与正常组比较,再灌注 6~72 h 差异有统计学意义,缺血组视网膜再灌注后 bcl-2 蛋白表达明显降低,与正常组比较,差异有统计学意义。

4 视网膜缺血-再灌注损伤的防护

由于 NOS 是 NO 生成过程中的唯一限速酶,目前

多采用抑制 NOS 的活性来减少 NO 的生成。NOS 抑制剂多为精氨酸衍生物,可竞争性抑制 NOS 的活性。

N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)是一种非选择性 NOS 抑制剂,有研究表明在缺血-再灌注早期,高浓度的 NO 对内层视网膜有神经毒性作用,而 NAME 可以保护内层视网膜免于缺血性损伤。Ju 等^[25] 在鼠高眼压模型中发现,在缺血后 1 h 腹腔内注射 L-NAME 可以在再灌注 3 d~1 周保护内丛状层免于灌注损伤,在再灌注 2~4 周保护外丛状层免于损伤。其早期的保护机制是由于 NAME 抑制了再灌注早期过度释放的谷氨酸与其受体结合而刺激 nNOS 和 eNOS 产生 NO。其晚期保护机制可能是由于 NAME 抑制了 NO 的合成,使其对光感受器细胞的直接作用受到抑制。Hangai 等^[26] 在研究 iNOS 抑制剂 N^G(1-亚氨基乙基)-L-氨基酸(L-NIO)对视网膜缺血-再灌注损伤的作用时发现,L-NIO 可以明显改善再灌注后视网膜 ERG b 波的恢复,表明 iNOS 抑制剂可以减轻 NO 介导的视网膜缺血-再灌注损伤。其他的 NOS 抑制剂,如 N-硝基-L-精氨酸(L-NNA)和 N-单甲基-L-精氨酸(L-NMMA)也被证明对视网膜缺血-再灌注损伤具有保护作用^[27]。氨基胍(AG)是 iNOS 的相对特异性抑制剂,通过抑制 iNOS 的合成阻断作为自由基的 NO 生成,较非选择性 NOS 抑制剂-L-NMMA 对 iNOS 的抑制作用强 7 倍,并且作用持续^[28]。Syed 等^[29] 发现大鼠缺血-再灌注损伤后,内皮素受体的非选择性抑制剂-磺胺异恶唑,能明显减少 nNOS 的生成,而使 ERG a 波和 b 波明显恢复。

NO 介导的细胞凋亡是 RGCs 死亡的主要形式,最新研究表明碱性成纤维细胞生长因子^[30]、色素上皮源性因子^[31]及胶质细胞源性神经营养因子^[32]均可抑制缺血-再灌注损伤时的细胞凋亡而保护视网膜神经元,同时也为进行缺血-再灌注损伤的防治提供了新的途径。另外,应用氧自由基清除剂、白细胞聚集和黏附抑制剂、钙离子阻断剂、刺激性氨基酸抑制剂、神经营养因子等均能明显减轻视网膜缺血-再灌注损伤。

5 展望

视网膜缺血-再灌注损伤在视网膜缺血性疾病的病程中是普遍存在的,明确其发病机制,对临床预防和治疗有着极为重要的意义。NO、NOS 与缺血-再灌注损伤有密切的关系,但其确切的效应及作用机制仍不十分清楚,可能在不同的缺血-再灌注时期,其含量、活性及病理生理效应是不同的,在不同时期用不同的方法调控 NOS、NO 的表达量,使其维持在一个适当的

范围,有效抑制 NO 引起的细胞凋亡,有望成为一种新的抗缺血-再灌注损伤疗法。

参考文献

1 Aydemir O, Naziroglu M, Celebi S, et al. Antioxidant effects of alpha, gamma and succinate tocopherols in guinea pig retina during ischemia-reperfusion injury [J]. Pathophysiology, 2004, 11(3): 167 - 171

2 Kwon YH, Rickman DW, Baruah S, et al. Vitreous and retinal amino acid concentrations in experimental central retinal artery occlusion in the primate [J]. Eye, 2005, 19(4): 455 - 463

3 Turin N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizine, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate induced neurotoxicity and ischemia reperfusion damage in rat retina [J]. Exp Eye Res, 2000, 70(4): 475 - 484

4 Levy RM, Prince JM, Billiar TR. Nitric oxide: a clinical primer [J]. Crit Care Med, 2005, 33(12): S492 - 495

5 Garcia X, Stein F. Nitric oxide [J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2006, 17(2): 55 - 57

6 Rajj L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease [J]. J Clin Hypertens, 2006, 8(12): 30 - 39

7 Cheon EW, Park CH, Kang SS, et al. Change in endothelial nitric oxide synthase in the rat retina following transient ischemia [J]. Neuroreport, 2003, 14(3): 329 - 333

8 Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL, et al. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia [J]. Stroke, 1997, 28: 1283 - 1288

9 Iadecola C, Xu X, Zhang F, et al. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(1): 52 - 59

10 游志鹏,姜德咏. 一氧化氮合酶在大鼠视网膜缺血-再灌注损伤中的表达及意义 [J]. 眼视光学杂志, 2003, 5(4): 237 - 238

11 Abrams J. Beneficial action of nitrates in cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 1996, 77(13): 31 - 37

12 Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(11): 1897 - 1918

13 Lopez-Nebolina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion [J]. J Invest Surg, 2005, 18(6): 335 - 350

14 Oz O, Gurdik G, Akyurek N, et al. A short duration transient ischemia induces apoptosis in retinal layers: an experimental study in rabbits [J]. Eur J Ophthalmol, 2005, 15(2): 233 - 238

15 Boyd CS, Cadenas E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis [J]. Biol Chem, 2002, 383(3-4): 411 - 423

16 Dawson TM, Gonzalez-Zulueta M, Kusel J. Nitric oxide: diverse actions in the central and peripheral nervous systems [J]. Neuroscience, 1998, 4(2): 96 - 142

17 Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress [J]. Int J Clin Pract Suppl, 2002, 129: 51 - 58

18 Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria [J]. Biochem Soc Symp, 1999, 66: 17 - 25

19 Aikawa H, Tomita H, Ishiguro S, et al. Increased expression of glutamate binding protein mRNA in rat retina after ischemia-reperfusion injury [J]. Tohoku J Exp Med, 2003, 199(1): 25

20 Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia [J]. Life Sci, 2001, 69(4): 369 - 381

21 Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YM. A prominent role for airway epithelial NF-κB activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation [J]. J Immunol, 2003, 170(12): 6257 - 6265

22 Wang X, Su XZ. The expression of Fas and Bcl-2 in hamster buccal [J]. Carcinogen, 2005, 14(2): 155 - 158

23 Chen J, Graham SH, Nakayama M, et al. Apoptosis repressor gene bcl-2 and bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(1): 1 - 10

24 袁春燕,牛膺筠,张瑞,等. 视网膜缺血再灌注损伤后凋亡相关基因表达的变化 [J]. 青岛大学医学院报, 2006, 42(4): 339 - 344

25 Ju WK, Kim KY, Park SJ, et al. Nitric oxide is involved in sustained and delayed cell death of rat retina following transient ischemia [J]. Brain Res, 2000, 881(2): 231 - 236

26 Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, et al. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Eye Res, 1996, 63(5): 501 - 509

27 Lam TT, Tso MO. Nitric oxide synthase (NOS) inhibitors ameliorate retinal damage induced by ischemia in rats [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1996, 92(3): 329 - 340

28 Sakamoto K, Yonoki Y, Kubota Y, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibitors abolished histological protection by late ischemic preconditioning in rat retina [J]. Exp Eye Res, 2006, 82(3): 512 - 518

29 Syed H, Safa R, Chidlow G, et al. Sulfoxazole, an endothelin receptor antagonist, protects retinal neurones from insults of ischemia/reperfusion or lipopolysaccharide [J]. Neurochem Int, 2006, 48(8): 708 - 717

30 Niu YJ, Zhao YS, Gao YX, et al. Therapeutic effect of bFGF on retina ischemia-reperfusion injury [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(2): 252 - 257

31 Takita H, Yoneya S, Gehlbach PL, et al. Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(10): 4497 - 4504

32 Wu WC, Lai CC, Chen SL, et al. GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats [J]. Mol Vis, 2004, 10(13): 93 - 102

(收稿:2008-12-02 修回:2009-08-23)

(本文编辑:王莉红)

论文中对“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。