

氧化应激诱导视网膜神经节细胞凋亡的研究进展

司俊康¹, 郭俊国², 王兴荣^{2,3}

基金项目:山东省中医药科技发展计划资助项目(No.2011-130)
作者单位:¹(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学;
²(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学眼科研究所;
³(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院
作者简介:司俊康,山东中医药大学2012级在读硕士研究生,
研究方向:屈光不正、眼底病。
通讯作者:王兴荣,主任医师,教授,硕士研究生导师,山东中医药大学附属眼科医院副院长,研究方向:屈光不正、眼底病。
semwxr@163.com

收稿日期:2013-07-19 修回日期:2013-11-10

Research advances of oxidative stress – induced apoptosis of retinal ganglion cells

Jun-Kang Si¹, Jun-Guo Guo², Xing-Rong Wang^{2,3}

Foundation item: Shandong Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Plans (No. 2011-130)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ²Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ³Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Xing-Rong Wang. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. semwxr@163.com

Received: 2013-07-19 Accepted: 2013-11-10

Abstract

• Apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) is an important step in the mechanism of a variety of diseases such as glaucoma, diabetic retinopathy, optic neuritis etc. In these diseases, oxidative stress induces the apoptosis of RGCs. In recent years, many experimental studies have found that anti-oxidative stress drugs have a powerful protective efficacy in RGCs. This article reviewed the recent advances in the researches on oxidative stress-induced apoptosis of RGCs and related anti-oxidative stress drugs.

• **KEYWORDS:** retinal ganglion cells; apoptosis; oxidative stress

Citation: Si JK, Guo JG, Wang XR. Research advances of oxidative stress-induced apoptosis of retinal ganglion cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(12):2424-2426

摘要

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡是青

光眼、糖尿病视网膜病变、视神经炎等多种疾病过程中的一个重要环节。在这些疾病过程中,氧化应激参与诱导RGCs的凋亡。近年的实验研究发现抗氧化应激药物对RGCs有良好的保护作用。我们将近年来氧化应激诱导RGCs凋亡以及相关抗氧化应激药物的研究进展做一综述。

关键词:视网膜神经节细胞;凋亡;氧化应激

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.17

引用:司俊康,郭俊国,王兴荣.氧化应激诱导视网膜神经节细胞凋亡的研究进展.国际眼科杂志2013;13(12):2424-2426

0 引言

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡是青光眼、糖尿病视网膜病变、视神经炎等多种疾病过程中的一个重要环节,RGCs凋亡可以导致视力、视野、色觉等视觉功能的下降。阻止或逆转RGCs的凋亡可以延缓疾病的发展,甚至使一部分已经丧失的视觉功能得到恢复。研究表明,氧化应激在相关疾病中起到了诱导和促进RGCs凋亡的作用。近期的实验研究已经证实了抗氧化应激药物对于RGCs具有较好的保护作用。现就氧化应激诱导RGCs凋亡以及相关抗氧化应激药物的研究进展做一综述。

1 氧化应激

氧化应激(oxidative stress, OS)是指机体在遭受各种有害刺激时,体内活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)生成过多,造成体内清除氧化物不及时,从而导致细胞和组织损伤的生理和病理反应。氧化应激反映了病理条件下机体氧化系统与抗氧化系统之间的不平衡,即氧化活性分子的系统损害与生物系统解毒活性中间体或修复活性中间体所产生的损伤之间的不平衡错误^[1]。

1.1 ROS ROS是指由氧诱发形成,并在分子组成上含有氧的一类化学性质非常活泼的物质的总称。ROS是细胞代谢的产物,主要在线粒体中产生,包括两大部分:一是氧自由基,包括超氧阴离子(super oxide anion, O₂⁻)和羟自由基(hydroxyl radical, ·OH);二是非自由基的过氧化氢(H₂O₂)和单线态氧(¹O₂)。在生理浓度时,ROS可以作为信号分子调节机体免疫炎症反应和转录因子的产生,但是当持续较高浓度时,ROS可导致细胞线粒体、蛋白质、脂质和核酸的严重损害。过量的ROS还会直接攻击线粒体,造成线粒体功能紊乱。线粒体功能紊乱又会造成ROS产生增加,进一步损害线粒体的电子转移,使ROS产生倍增^[2,3]。

1.2 RNS RNS是指由氮诱发形成,在分子组成上含有氮的一类化学性质非常活泼的物质的总称。RNS包括一

氧化氮 (nitric oxide, NO) 和其他活性氮, 如过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite, ONOO⁻), 硝酰基阴离子 (nitroxyl anion, NO₂⁻) 等。NO 是一种无机小分子气体, 是由 L-精氨酸在 NO 合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 作用下生成的一种气体自由基。它的分子中含有未配对的电子, 高度活泼, 极不稳定, 容易与 O₂、O₂⁻ 以及 Fe²⁺、Ca²⁺ 等过渡金属离子反应而卒灭。在视网膜中 NO 主要由星形胶质细胞产生, 生理浓度的 NO 具有舒张血管平滑肌的作用, 而且是一种重要的神经递质。疾病发生时, 线粒体中产生大量的超氧阴离子, NO 与超氧阴离子形成一种强自由基 ONOO⁻。ONOO⁻ 是一种强氧化剂, 能够氧化蛋白质的巯基, 使多种酶失活, 而且可以使脂质过氧化, 其速率是 H₂O₂ 使脂质过氧化的 1 000 倍, 从而严重影响生物膜的功能。RGCs 对 ONOO⁻ 介导的神经毒性十分敏感, ONOO⁻ 能够直接诱导 RGCs 凋亡。NO、超氧阴离子、ONOO⁻ 相伴发生, 互相强化, 形成 RGCs 损伤的恶性循环^[4]。

2 氧化应激诱导视网膜神经节细胞凋亡

凋亡是一种程序性细胞死亡, 这种程序性死亡对于维持生物体组织器官的稳定性具有至关重要的作用^[5], 它可以清除体内有害的、无功能的、突变的或受损的细胞, 保证细胞的数量和质量。因此, 生理性的凋亡是有益的, 它可以保证正常的生长发育以及维持内环境的稳定, 还可以通过诱导感染的细胞发生凋亡, 发挥积极的防御功能。但是, 一旦出现凋亡异常, 细胞群体的稳定性就会受到破坏, 凋亡过度会造成细胞数量减少, 组织器官功能异常。现在已知, 神经细胞凋亡过度会导致阿尔茨海默病、帕金森病等多种神经退行性病变。RGCs 凋亡可以在青光眼、糖尿病视网膜病变、视神经炎等多种疾病过程中出现, 会导致多种视觉功能的丧失。近年来的研究表明, 氧化应激可以诱导视网膜神经节细胞凋亡。

研究表明, 氧化应激可以诱导体外视网膜神经节细胞 caspase 依赖性的凋亡^[6,7], Guo 等发现, 氧化应激诱导体外视网膜神经节细胞凋亡过程中, 有 caspase-9, caspase-12 参与其中, 引发内质网应激, 最终造成视网膜神经节细胞凋亡。在体内, 青光眼、糖尿病性视网膜病变、视网膜中央动脉阻塞等疾病过程中会出现视网膜的缺血缺氧, 缺血缺氧所致的视网膜损伤常常会造成氧化应激及 RGCs, 造成 RGCs 凋亡^[8]。除了缺血缺氧直接造成 RGCs 损伤以外, 缺血再灌注损伤也会加重视网膜中氧化应激诱导的 RGCs 凋亡^[9]。在缺血缺氧以及缺血再灌注损伤过程中, 自由基和脂质过氧化产物增多。自由基可以直接攻击线粒体膜脂质, 造成线粒体功能下降, ATP 生成减少, 细胞能量代谢障碍。在自由基作用下, 细胞结构蛋白和酶的巯基氧化形成二硫键, 氨基酸残基氧化, 胞浆以及膜蛋白和细胞中的某些酶交联形成二聚体或者更大的聚合物, 直接损害蛋白质的功能。活性氧自由基还可以直接损伤 DNA, 使 ADP 核糖转移酶活化促进凋亡, 或者活性氧自由基直接激活某些死亡基因程序。此外, 细胞膜脂质过氧化会造成细胞膜正常结构的破坏, 造成 Ca²⁺ 内流增多, 形成 Ca²⁺ 超载, Ca²⁺ 可以激活核酸内切酶, 促使 DNA 断裂, 经过一系列的级联反应, 细胞结构发生解体, 最终造成细胞凋亡 (图 1)。

3 抗氧化应激药物与视网膜神经节细胞保护的实验研究

氧化应激作用受到越来越多学者的关注, 目前的实验研究表明, 通过抑制氧化应激可以有效地保护 RGCs, 减少 RGCs 凋亡, 从而控制疾病的发展。最近研究较多

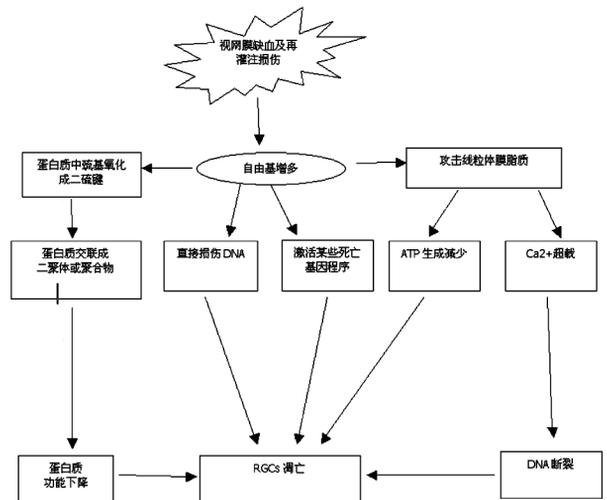


图 1 氧化应激诱导视网膜神经节细胞凋亡。

的通过抗氧化应激保护 RGCs 的药物主要有以下几种。

3.1 叶黄素 叶黄素属于类胡萝卜素中胡萝卜醇家族的一员, 在绿叶蔬菜, 如菠菜或甘蓝中含量丰富^[10]。它的特点是分子的每一个末端都有一个羟基基团, 使它更具有亲水性。与其他类胡萝卜素相比, 叶黄素能够更高效的与单线态氧反应^[11], 这些特点都使叶黄素具有很强的抗氧化应激能力。在眼组织中, 叶黄素主要存在于黄斑区, 黄斑区大量存在的叶黄素可以吸收高能蓝光, 保护黄斑和光感受器免受光毒性损伤和氧化损伤^[12]。相关临床研究表明叶黄素可以提高年龄相关性黄斑变性患者的视觉功能, 而且具有良好的安全性和有效性^[13]。Li 等^[14]研究发现, 叶黄素可以通过降低氧化应激来保护内层视网膜神经免受缺血再灌注损伤, 有效减少因此造成的 RGCs 凋亡, 这可能与叶黄素清除内源性过氧化氢和其他氧自由基, 避免细胞内过氧化氢和氧自由基积存有关。

3.2 虾青素 虾青素是一种天然的类胡萝卜素, 在体内和体外都有很强的抗氧化能力^[15]。在四氧嘧啶诱导的糖尿病大鼠的唾液腺中, 虾青素能够恢复抗氧化酶的活性^[16]。而且虾青素能够保护体外培养的视网膜细胞和小鼠体内的细胞免受氧化应激的损伤^[17]。Dong 等应用 db/db 小鼠作为 2 型糖尿病动物模型, 经虾青素处理 8wk 以后, 发现视网膜中凋亡相关基因 BAD, caspase-3 的水平明显下降, 而且视网膜神经节细胞层中凋亡细胞的数量明显减少。此外, 在体外实验中, 虾青素能够逆转视网膜神经节细胞系 RGC-5 中氧化应激标志物如超氧阴离子(O₂⁻), 丙二醛(MDA), 8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-OHdG), 锰超氧化物歧化酶(MnSOD)水平的改变, 并能够有效减少过氧化氢诱导的 RGC-5 的凋亡^[5]。

3.3 硫辛酸 硫辛酸是一种强效的新型抗氧化剂, 其氧化型、还原型在水脂两相环境中均能发挥很好的抗氧化作用。它能够清除 ROS, 减弱氧化应激, 使神经生长因子等物质逐渐恢复正常, 刺激神经纤维再生并能够整合过渡金属离子, 而且增强其他抗氧化剂在疏水相和亲水相中的抗氧化能力^[18]。多种研究显示硫辛酸可以用于治疗糖尿病性视网膜病变等多种氧化应激相关的神经变性疾病^[19-21]。最近的一项研究表明, 硫辛酸可以减轻高压对 RGC-5 造成的损伤, 提高锰超氧化物歧化酶的水平, 减少 ROS 产生, 增强高压条件下 RGC-5 的抗氧化损伤

能力,提示硫辛酸对青光眼性视神经损伤可能有一定的保护作用^[22]。

3.4 灯盏花素 灯盏花素是从灯盏细辛中提取的黄酮类化合物,大量的动物实验及临床研究均证实灯盏花素具有抗血栓、改善血液流变及抗氧化作用等^[23]。近年来灯盏花素注射液被大量用于治疗视网膜中央静脉阻塞和缺血性视神经病变等缺血性视网膜疾病^[24,25]。张远平等^[26]发现,与对照组相比,灯盏细辛静脉注射的高眼压新西兰兔的视网膜神经节细胞中,反映脂质过氧化和氧自由基水平的MDA含量下降,而内源性抗氧化物质过氧化物歧化酶和过氧化氢酶的水平则上升。这表明,灯盏花素可以通过抗氧化应激机制有效地保护视网膜神经节细胞。

3.5 银杏叶提取物 银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba leaf,EGB)具有较强的抗氧化活性,能够减少血管痉挛、保护血管内皮细胞、降低血液黏稠度、抑制血小板激活因子的活性、清除自由基、抗炎、抗变态反应,还有抑制细胞凋亡的作用。项楠等^[27]研究发现,EGB能够有效保护糖尿病大鼠视网膜神经节细胞,保护视网膜神经节细胞的最主要的机制之一是消除自由基,减轻氧化损伤。银杏叶的保护效应还可在线粒体水平上发挥作用,通过稳定线粒体的功能来增加RGCs对缺血再灌注损伤的抵抗能力。

4 小结

总之,氧化应激对于RGCs的损伤作用已经受到了广泛的关注,通过抗氧化应激机制保护RGCs的药物已经有了相当多的研究。通过抗氧化应激药物对RGCs凋亡机制的研究,研制新的治疗视网膜神经节细胞凋亡相关疾病的药物,具有广泛的临床应用价值。许多中药、中药复方、中药提取物及其有效单体成分具有良好的抗氧化应激作用,通过研究其对视网膜神经节细胞的保护作用,有助于阐明其作用机制。我们要加快对中医药保护视网膜神经节细胞的基础与临床研究,充分发挥祖国医学的优势。

参考文献

- 1 Dong LY, Jin J, Lu G, et al. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. *Mar. Drugs* 2013;11(3):960-974
- 2 Panieri E, Gogvadze V, Norberg E, et al. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med* 2013;57:176-187
- 3 Hwang AB, Jeong DE, Lee SJ. Mitochondria and organismal longevity. *Curr Genomics* 2012;13(7):519-532
- 4 Sato T, Oku H, Tsuruma K, et al. Effect of hypoxia on susceptibility of RGC-5 cells to nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):2575-2586
- 5 Peng Y, Zhang J, Xu H, et al. Neuroprotective effect of protease-activated receptor-2 in the hypoxia-induced apoptosis of rat RGC-5 cells. *J Mol Neurosci* 2013;50(1):98-108
- 6 Guo D, Bi H, Liu B, et al. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicol In Vitro* 2013;27(2):731-738
- 7 Guo D, Bi H, Wu Q, et al. Zinc oxide nanoparticles induce rat retinal ganglion cell damage through bcl-2, caspase-9 and caspase-12 pathways. *J Nanosci Nanotechnol* 2013;13(6):3769-3777
- 8 Li SY, Fu ZJ, Ma H, et al. Effect of lutein on retinal neurons and

- oxidative stress in a model of acute retinal Ischemia/Reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(2):836-843
- 9 Qi Y, Chen L, Zhang L, et al. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway. *Exp Eye Res* 2013;107:44-51
- 10 Rink SM, Mendola P, Mumford SL, et al. Self-report of fruit and vegetable intake that meets the 5 a day recommendation is associated with reduced levels of oxidative stress biomarkers and increased levels of antioxidant defense in premenopausal women. *J Acad Nutr Diet* 2013;113(6):776-785
- 11 Maoka T, Tokuda H, Suzuki N, et al. Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxynitrite. *Mar. Drugs* 2012;10(6):1391-1399
- 12 Chucair AJ, Rotstein NP, Sangiovanni JP, et al. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):5168-5177
- 13 Ramkumar HL, Tuo J, Shen de F, et al. Nutrient supplementation with n3 polyunsaturated fatty acids, lutein, and zeaxanthin decrease A2E accumulation and VEGF expression in the retinas of Ccl2/Cx3cr1-deficient mice on Crblrd8 background. *J Nutr* 2013;143(7):1129-1135
- 14 Li SY, Lo AC. Lutein Protects RGC-5 Cells Against Hypoxia and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2010;11(5):2109-2117
- 15 Ye Q, Zhang X, Huang B, et al. Astaxanthin suppresses MPP(+)-induced oxidative damage in PC12 cells through a Sp1/NR1 signaling pathway. *Mar. Drugs* 2013;11(4):1019-1034
- 16 Leite MF, Lima AM, Massuyama MM, et al. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol* 2010;55:479-485
- 17 Nakajima Y, Inokuchi Y, Shimazawa M, et al. Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress *in vitro* and in mice *in vivo*. *J Pharm Pharmacol* 2008;60(10):1365-1374
- 18 Connell BJ, Saleh TM. Co-administration of apocynin with lipoic acid enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *Neurosci Lett* 2012;507(1):43-46
- 19 Emmez H, Yildirim Z, Kale A, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of α -lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Acta Neurochir (Wien)* 2010;152(9):1591-1601
- 20 Erşahin M, Toklu HZ, Cetinel S, et al. Alpha lipoic acid alleviates oxidative stress and preserves blood brain permeability in rats with subarachnoid hemorrhage. *Neurochem Res* 2010;35(3):418-428
- 21 Toklu HZ, Hakan T, Celik H, et al. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. *J Spinal Cord Med* 2010;33(4):401-409
- 22 Liu B, Ma X, Guo D, et al. Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrostatic pressure-induced damage of retinal ganglion cells *in vitro*. *Neurosci Lett* 2012;526(1):24-28
- 23 方睿,杜树山. 灯盏花素制剂研究进展. *中国实验方剂学* 2011;17(4):233-237
- 24 宋方军,徐平. 灯盏花素联合沃丽汀治疗视网膜静脉阻塞的临床观察. *中国现代药物应用* 2010;4(4):26
- 25 朱益华,蒋幼芹,刘忠浩,等. 灯盏细辛注射液对鼠实验性高血压视神经轴浆运输的影响. *中华眼科杂志* 2000;36(4):289-291
- 26 张远平,李静华,赵学英,等. 灯盏花素注射液对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用. *眼科新进展* 2008;28(6):422-424
- 27 项楠,林哈,刘恒明,等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡的作用观察. *医药导报* 2007;26(10):1127-1130