

氧化应激与 GDx-VCC 在原发性开角型青光眼诊断中的对比研究

沙倩¹, 孙立滨¹, 王健平¹, 李艳¹, 常东², 崔海滨¹

作者单位:¹(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江省眼科医院 黑龙江省眼病防治研究所;²(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院检验科

作者简介:沙倩,女,主任医师,博士后。

通讯作者:崔海滨,男,主任医师. sq_1972@126.com

收稿日期:2011-03-08 修回日期:2011-05-05

Comparative study of oxidative stress and GDx-VCC in the diagnosis of primary open angle glaucoma

Qian Sha¹, Li-Bin Sun¹, Jian-Ping Wang¹, Yan Li¹, Dong Chang², Hai-Bin Cui¹

¹Eye Hospital of Heilongjiang Province, Heilongjiang Provincial Institution of Eye Disease Prevention, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;²Department of Physical Examination, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hai-Bin Cui. Eye Hospital of Heilongjiang Province, Heilongjiang Provincial Institution of Eye Disease Prevention, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. sq_1972@126.com

Received:2011-03-08 Accepted:2011-05-05

Abstract

• **AIM:** To investigate the important role oxidative stress response plays in the pathogenesis of primary open angle glaucoma through comparative studies of oxidative stress and GDx-VCC checking between the normal and primary open angle glaucoma patients of different stages.

• **METHODS:** Totally 30 cases (60 eyes) with normal subjects, 40 patients (50 eyes) with early glaucoma and 40 patients (60 eyes) with advanced open angle glaucoma were detected with serum MDA, CAT, Vc, SOD, GSH-PX, GST detection and RNFL detection by application of GDx-VCC, the difference of RNFL parameters were compared. Finally, the relevance of indicators of oxidative stress and GDx-VCC in primary open angle glaucoma patients at different times were compared.

• **RESULTS:** Compared with the normal population, serum GST and MDA of early primary open angle glaucoma patients increased, that of advanced patients increased more significantly, while the CAT, GSH-PX, SOD, Vc decreased at early stage, and were significantly lower late; RNFL of early primary open angle glaucoma patients became thinner, RNFL in advanced patients

became significantly thinner than earlier. The parameters from both methods were statistically significant differences ($P < 0.01$), with good separating capacity between normal and early primary open angle glaucoma, and with consistency for the staging of glaucoma.

• **CONCLUSION:** Oxidative stress may be clinically used as auxiliary means of detection for primary open angle glaucoma.

• **KEYWORDS:** oxidative stress; GDx-VCC; primary open angle glaucoma

Sha Q, Sun LB, Wang JP, et al. Comparative study of oxidative stress and GDx-VCC in the diagnosis of primary open angle glaucoma. *Guji Yanke Zazhi*(Int J Ophthalmol) 2011;11(6):995-998

摘要

目的:通过对正常人与不同阶段的原发性开角型青光眼患者的氧化应激状况与 GDx-VCC 的检查进行对比研究,来探讨氧化应激反应在原发性开角型青光眼发病机制中的重要作用。

方法:分别对 30 例 60 眼正常人、40 例 50 眼早期青光眼和 40 例 60 眼中晚期的开角型青光眼患者的血清进行 MDA, CAT, VC, SOD, GSH-Px, GST 检测并应用 GDx-VCC 对其 RNFL 进行检测,分别比较其 RNFL 参数的不同。最后比较氧化应激指标与 GDx-VCC 在不同时期的原发性开角型青光眼患者中的相关性。

结果:与正常人群相比,早期原发性开角型青光眼患者血清中 GST 和 MDA 即有所升高,中晚期患者升高较为明显,而 CAT, GSH-Px, SOD, VC 早期即有所降低,中晚期则明显降低;早期原发性开角型青光眼的 RNFL 变薄,中晚期患者的 RNFL 较早期的明显变薄。两种方法所得的各参数均有极显著统计学差异($P < 0.01$),具有良好地区分正常人和早期原发性开角型青光眼的的能力,对于青光眼的分期诊断中具有有一致性。

结论:氧化应激的检测可作为临床原发性开角型青光眼的辅助检测手段之一。

关键词:氧化应激; GDx-VCC; 原发性开角型青光眼

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.019

沙倩,孙立滨,王健平,等. 氧化应激与 GDx-VCC 在原发性开角型青光眼诊断中的对比研究. 国际眼科杂志 2011;11(6):995-998

0 引言

青光眼是一组以视神经凹陷性萎缩和视野缺损为共同特征的疾病,近年来已跃居全球主要致盲眼病的第二位,严重危害人类健康。它主要的病理特征为视网膜神经节细胞凋亡和视神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)

表1 原发性开角型青光眼早期及中晚期患者与正常人氧化应激测定结果的比较 $\bar{x} \pm s$

	正常组	早期组	中晚期组
MDA (nmol/mL)	21.32 ± 5.13	23.42 ± 13.62	27.74 ± 16.21
CAT (U/mL)	7.94 ± 3.26	6.32 ± 2.02 ^a	5.65 ± 2.41 ^a
Vc (mg/L)	42.39 ± 6.35	40.03 ± 6.52	38.25 ± 8.07
SOD (U/mL)	62.85 ± 14.01	58.72 ± 12.49	55.88 ± 14.30
GSH - Px (μmol/L)	201.28 ± 22.90	173.43 ± 11.55 ^a	144.57 ± 14.02 ^b
GST (U/mL)	11.39 ± 4.40	13.06 ± 8.93	14.13 ± 10.80

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组。

进行性丢失,进而导致视功能的损害。故早期诊断和治疗是防治青光眼的关键,而原发性青光眼起病隐匿,症状不典型,进展极为缓慢,大部分患者到中晚期中心视力受到影响后才被发现,这给患者的早期诊断和愈后带来了极大的困难。Hoyt 等 1973 年首次提出青光眼患者最早的临床表现是 RNFL 缺损,5a 后 Sommer 等发现 RNFL 的损害最早发生在视野损害前 5a^[1]。视野出现异常前,已有 25% ~ 50% 的神经纤维及节细胞丧失^[2,3],同时相关文献表明 GDx-VCC 能够准确地测量 RNFL,并具有良好的区分早期青光眼与正常人 RNFL 的能力^[4]。因此 GDx-VCC 正在被临床医师广泛应用于 POAG 的早期诊断。GDx-VCC 是近年来才投入到临床中的一种定量测量 RNFL 厚度的视网膜神经纤维层分析仪。它使用共焦激光作光源,利用视网膜神经纤维的光学双折射特性,当偏振光通过 RNFL 时,平行 RNFL 与垂直 RNFL 的偏振光发生位相地延迟,并与 RNFL 厚度成正比,通过测量不同象限的“延迟”值可以准确测量 RNFL 厚度。小梁细胞与细胞外基质的正常黏附,小梁细胞内皮层的完整性是维持正常小梁网功能所必需的。Zhou 等^[5]发现氧化应激可以影响小梁细胞的细胞骨架结构和细胞与细胞外基质的联系,提出过量或过于频繁的氧化应激超过小梁细胞代偿能力,可导致小梁细胞的细胞骨架改变,降低细胞黏附性,引起细胞丢失,最后导致病理性改变。所以氧化应激的状况在青光眼发病过程中可能具有重要的机制。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2009-04/2010-09 在哈尔滨医科大学附属眼科医院门诊及病房已确诊的 POAG 患者早期 40 例 50 眼和中晚期的原发性开角型青光眼 40 例 60 眼为研究对象,所有患者均除外下列疾病:急性心肌梗塞,急、慢性心力衰竭,急、慢性心律失常,不稳定性心绞痛,脑梗塞、脑出血急性期,肝、肾功能不全,急、慢性感染,肿瘤,结缔组织病等。其中早期患者男 19 例,女 21 例,年龄 28 ~ 60(平均 39.38 ± 7.61)岁;中晚期患者中男 16 例,女 24 例,年龄 32 ~ 69(平均 51.26 ± 8.79)岁。正常对照组:来自同期体检健康正常人,血压、血脂正常,无心、脑血管等疾病,无眼部疾患。男 20 例,女 20 例,年龄 30 ~ 60(平均 44.15 ± 8.32)岁。

1.2 方法

1.2.1 试剂 无水乙醇,超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、总抗氧化能力(TAC)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)测试盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2.2 主要仪器 电热恒温水箱(上海医疗器械七厂)、

电子天平(Shimadzu)、752 紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)、电热恒温鼓风干燥箱(山东潍坊医疗器械厂)、离心机(上海安亭科学仪器厂)。GDx-VCC(scanning laser polarimetry with variable corneal compensation)激光扫描偏振仪(美国圣地亚哥 Laser Diagnostic Technologies, LDT 生产),对数视力表,Goldmann 压平眼压计,900 型裂隙灯显微镜,前房角镜(Goldmann 型,美国 Ocular Instruments 公司),直接检眼镜。

1.2.3 诊断标准 原发性开角型青光眼诊断标准^[6,7]:(1)眼压多次测量 > 21mmHg;(2)标准自动视野计检查 MD ≥ 3dB 或可重复性青光眼特征性视野缺损(如旁中心暗点、鼻侧阶梯、弓形暗点等)并与视盘改变相一致,但不包括生理盲点扩大等非特异性改变;(3)通过检眼镜发现青光眼特征性视盘损害及视神经纤维(RNFL)局部或弥漫性缺损;(4)房角检查为宽房角。具有以上 4 项或具有 1,4 项与 2 或 3 项才能诊断为原发性开角型青光眼^[8]。青光眼的严重程度按视野平均缺损(MD)程度:(1)早期:视野正常或 MD < 5dB;(2)中期:MD 在 5 ~ 10dB;(3)晚期:MD > 10dB。

1.2.4 检查方法 所有受试者均进行全面的眼科检查,包括眼屈光状态测量及最佳矫正视力、进行 3 次以上压平眼压测量、裂隙灯显微镜眼前节及直接检眼镜眼底检查、有 2 次或以上 GDx-VCC 检查 RNFL 厚度。视神经纤维层扫描:应用 GDx-VCC 系统(美国圣地亚哥 Laser Diagnostic Technologies, LDT 美国)。采用 780nm 真空二极管激光作光源,受检者不需要散瞳。每次扫描时间仅需要 0.7s。GDx2VCC 应用其可变角膜补偿系统自动对首次接受检查者进行角膜、晶状体等眼前节双折射特性组织的偏振轴和振幅进行补偿,从而精确地测量 1.75 倍视盘直径范围的 RNFL 厚度,并与 GDx2VCC 系统内附带不同人种及不同年龄正常数据库进行比较。GDx2VCC 可以提供 6 个参数的检测:TSNIT(平均 RNFL 厚度),Superior Average(上方 RNFL 厚度均值,SA),Inferior Average(下方 RNFL 厚度,IA),TSNIT SD(平均 RNFL 厚度的标准差),IES(双眼对称性,IES)和 NFI(神经网络青光眼鉴别数,NFI)。GDx 象限定义为上方(120°)、下方(120°)、颞侧(70°)和鼻侧(50°)^[2,3]。氧化应激的检查方法:超氧化物歧化酶(SOD)使用黄嘌呤氧化酶法;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)使用二硫代二硝基苯甲酸法;丙二醛(MDA)使用硫代巴比妥酸(TBARS)比色法;过氧化氢酶(CAT)使用钼酸铵比色法;谷胱甘肽硫转移酶(GST)使用谷胱甘肽-氯二硝基苯显色法;维生素 C 使用比色法。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据分析。统计学方法采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表2 GDx-VCC 检测正常人和早期及中晚期青光眼 RNFL

参数	$\bar{x} \pm s$		
	正常组 ^b	早期组	中晚期组 ^b
TSNIT	46.37 ± 4.89	56.13 ± 4.25	38.87 ± 6.54
Superior Average	54.38 ± 5.99	67.36 ± 6.19	44.26 ± 9.64
Inferior Average	53.97 ± 7.36	66.57 ± 6.62	43.21 ± 8.67
TSNIT SD	17.85 ± 3.57	24.18 ± 4.12	11.89 ± 3.32
IES	0.72 ± 0.13	0.64 ± 0.07	0.43 ± 0.18
NFI	44.87 ± 1.92	16.40 ± 7.79	72.92 ± 23.12

^b $P < 0.01$ vs 早期组。

2 结果

2.1 正常人与青光眼患者氧化应激测定结果的比较 与正常人群相比,青光眼患者血清中 GST 和 MDA 有所升高, CAT, GSH-PX 明显降低, 而 SOD 和维生素 C 也有所降低。结果表明, 与正常对照组相比, 青光眼患者存在着一定程度的氧化损伤(表 1)。

2.2 正常人与青光眼患者检测指标的比较 正常人和早期青光眼患者 RNFL 各参数的比较显示, 其视神经纤维层厚度已经明显变薄, 所有参数差异均有统计学意义($P < 0.01$, 表 2)。而进展到中晚期的青光眼患者 RNFL 厚度较之早期青光眼持续明显变薄, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 体现了青光眼性视神经损害的发展特点(表 2)。

3 讨论

青光眼早期诊断是防治的关键, 也是现代青光眼研究的重点。已有研究表明, 青光眼视野损害出现前 6a 就有视网膜神经纤维层的丢失^[9]。通过对 RNFL 的检查能更早地发现青光眼。GDx-VCC 系统可以敏感的检测到早期青光眼的视网膜神经纤维层结构变化, 为青光眼诊断提供可靠证据。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。研究表明, 抗氧化剂可以减缓氧化应激带来的危害。SOD 是细胞内一个重要的抗氧化酶, 主要有 Cu, Zn-SOD 和 Mn-SOD 两种。青光眼患者 SOD 活性降低, 明显低于健康人。人类线粒体中存在着含锰(Mn)的 SOD(MnSOD), 细胞质则为含铜(Cu)、含锌(Zn)的 SOD。目前还认为, SOD 尚有存在于细胞外的其它 3 种类型。线粒体虽可代谢掉细胞中氧的 95% 以上, 但因该处缺少组蛋白, 故超氧化物等引起的氧化应激比较弱, 而 MnSOD 将在此类防御机制中发挥重要作用。CAT 是一种与 D-氨基酸氧化酶等一系列需氧脱氢酶相偶联的酶, 广泛存在于动植物体内。CAT 可催化 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 , 从而防止 H_2O_2 在过渡金属离子作用下转变为 $\cdot OH$ 。CAT 是细胞内主要的抗氧化酶之一, 在抗氧化过程中发挥重要作用。CAT 活力的降低可能造成 H_2O_2 在细胞内的蓄积, 从而导致一系列的氧化损伤。谷胱甘肽转硫酶(GST)是一种多功能的二聚体蛋白质, 参与机体的二相解毒反应, 主要催化各种化学物质。本研究发现, 与正常对照组相比, 青光眼患者体内抗氧化酶活力普遍减低。丙二醛是脂质过氧化作用的最终分解产物, 浓度相对稳定, 其含量的高低可反映组织细胞的脂质过氧化速率或强度, 通过测定 MDA 的含量可检测体内一段时期内氧化应激水平的变化^[10], 间接反映出细胞损伤的程度。本研究测定了青光眼患者血清中脂质过氧化产物, 结果显示, 与正常对照组相比, MDA 明显升高, 说明青光眼患者存在着严重的脂质过氧化损伤。

青光眼最主要的病理改变是 RGCs 的损伤, RGCs 的损伤包括网膜内 RGCs 胞体的损伤和视觉通路内轴突的损伤。OS 与 RGCs 的这种损伤有关^[10], 且其损伤形式为促进 RGCs 程序性死亡, 即凋亡^[11]。OS 一方面可以引起 RGCs 发生受体依赖 caspase 级联的外源性凋亡^[12]; 另一方面可通过破坏线粒体功能致使 RGCs 发生内源性凋亡^[13]。研究原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)患者房水中 OS 产物发现, 与对照组相比 POAG 眼不仅受到 OS 损伤, 其房水中整体抗氧化状态也明显下降^[10]。一方面 RGCs 轴突的能量来源于线粒体, 线粒体损伤破坏了这种能量供给, 导致神经传递缺乏能量^[14]; 另一方面线粒体功能失调可释放一些青光眼相关刺激因子(如肿瘤坏死因子等), 促进 RGCs 凋亡^[13]。线粒体失调反过来又可导致活性氧的产生增多, 加重 RGCs 及组织氧化损伤。在对 POAG 患者的研究中发现, OS 在小梁网细胞引起的 DNA 损伤与眼内压的升高和视野丧失显著有关^[15]。而在 DNA 的损伤中, 持续的 OS 使 miR29b(一种微 RNA)负调控 ECM 相关基因表达的功能下降, 进而促进了小梁网处 ECM 沉积, 使得房水流出受阻^[16]。在 POAG 患者小梁网细胞 NOS₂ 的表达和活性均增加, 且增加的程度与视野丧失程度成比例, 增加的 NOS₂ 还能导致小梁网组织内 ONOO⁻ 水平增加, 进一步说明 POAG 患者小梁网内亦遭受氧化损伤^[17]。

选择 GDx-VCC 与氧化应激状况进行对比研究, 是因为 GDx-VCC 是目前一种最新的能够准确且定量视网膜神经纤维层厚度的检测手段, 所有参数都有较强能力区分正常人和早期青光眼, 对于青光眼早期诊断有较强的参考价值。通过对两者检测结果的相比较可知, 在原发性开角型青光眼的各个时期, 两者的变化具有一致性, 从而说明氧化应激在青光眼的发病机制中具有重要的作用, 检测氧化应激指标亦可作为青光眼早期诊断的一种手段与方法, 这对于青光眼患者来说无疑是一个福音, 对于青光眼患者抽血样进行氧化应激指标的检测将会既经济又快捷。越来越多的证据证明氧化应激在青光眼视神经病变中具有重要作用。过多的活性氧导致 RGCs 凋亡、胶质细胞功能失调及小梁网组织损伤。氧化应激青光眼发生发展中精确的分子机制和实际影响还需要进一步阐明。随着科学实验技术的发展和研究的深入, 青光眼的诊断治疗将进入一个全新的时代。但是氧化应激反应对青光眼视神经损伤的具体机制与信号通路还有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 李美玉. 青光眼学. 北京: 人民卫生出版社 2004; 225-226
- 2 Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR. Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with

- glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1989;107(5):453-464
- 3 Kerrigan Baumrind LA, Quigley HA, Pease ME, *et al.* Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):741-748
- 4 Wang Z, Cui BH, Cao Q, *et al.* Retinal nerve fiber layer images captured by GDx-VCC in early diagnosis of glaucoma. *Ophthalmologica* 2008;222(1):17-20
- 5 Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180(2):182-189
- 6 Dandona L, Dandona R, Sriniva M, *et al.* Open-angle glaucoma in and urban population in Southern India: the Andhra Pradesh Eye disease study. *Ophthalmology* 2000;107(4):1702-1709
- 7 Dandona L, Dandona R, Mandal P, *et al.* Angle-closure glaucoma in an urban population in southern India The Andhra Pradesh eye disease study. *Ophthalmology* 2000;107(9):1710-1716
- 8 罗知卫,段宣初,蒋幼芹,等. GDxVCC 检测原发性开角型与可疑青光视网膜神经纤维层损坏的对比研究. *眼科* 2005;14(2):104-108
- 9 Poinosawny D, Fontana L, Wu X, *et al.* Variation of nerve fiber layer thickness measurements with age and ethnicity by scanning laser polarimetry. *Br J Ophthalmol* 1997;81(5):350-354
- 10 Zanon Moreno V, Marco Ventura P, Lleo Perez A, *et al.* Oxidative stress in primary open angle glaucoma. *Glaucoma* 2008;17(4):263-268
- 11 Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, *et al.* A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative stress responses and extends life span. *Cell* 2006;125(5):987-1001
- 12 Tezel G, Wax MB. The mechanisms of hsp27 antibody mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J Neurosci* 2000;20(10):3552-3562
- 13 Tezel G, Yang X. Caspase independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(11):4049-4059
- 14 Osborne NN. Mitochondria: Their role in ganglion cell death and Survival in primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res* 2010;90(6):750-757
- 15 Sacc SC, Pascotto A, Camicione P, *et al.* Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005;123(4):458-463
- 16 Luna C, Li G, Qiu J, *et al.* Role of miR29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis* 2009;15(6):2488-2497
- 17 Fernandez Durango R, Fernandez Martinez A, Garca Feijoo J, *et al.* Expression of nitrotyrosine and oxidative consequences in the trabecular meshwork of patients with primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2506-2511

欢迎访问 IJO 英文版网站并引用英文版文献

《国际眼科杂志》英文版为我国唯一被 SCI 收录的眼科专业期刊。自 2008 年创刊以来全部文献已上传到国际眼科网——国际眼科杂志英文版网站(www. IJO. cn)。进入本刊主页后点击 English Edition 即 IJO 英文版网页。欢迎广大读者免费查阅本刊英文版全文。特别希望眼科专家在向 SCI 期刊投稿时适当引用本刊英文版文献,这对于提高本刊他引率将有重要意义。我们真诚希望继续得广大眼科专家教授的宝贵支持,让我们同心协力,努力争取把 *International Journal of Ophthalmology*——IJO (English edition) 办成国际一流的学术期刊!

IJO 编辑部