

视网膜缺血再灌注后 RGC 凋亡分子机制研究进展

刘索新,王浩,鞠学红

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2010HL043)

作者单位:(261053) 中国山东省潍坊市,潍坊医学院解剖学教研室

作者简介:刘索新,在读硕士研究生,研究方向:神经解剖学。

通讯作者:鞠学红,男,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经解剖学. juxh@wfmc.edu.com

收稿日期:2012-11-29 修回日期:2013-04-18

Molecular mechanism of ganglion cell apoptosis after retinal ischemia-reperfusion

Suo-Xin Liu, Hao Wang, Xue-Hong Ju

Foundation item: Natural Science Foundation of Shandong Province, China(No. ZR2010HL043)

Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Correspondence to: Xue-Hong Ju. Weifang Medical University,

Weifang 261053, Shandong Province, China. juxh@wfmc.edu.com

Received:2012-11-29 Accepted:2013-04-18

Abstract

• Retinal ischemia-reperfusion injury is a common eye disease, as manifested in apoptosis of retinal ganglion cell, which results in serious diseases such as the optic nerve damage and produces disastrous influence on vision and life of the patient. Cell apoptosis is the self-dying process, which is controlled by a variety of gene. This article assesses functions of different gene in promoting ganglion cell apoptosis after retinal ischemia-reperfusion injury.

• KEYWORDS: retinal ischemia-reperfusion; ganglion cell; apoptosis; molecular mechanism

Citation: Liu SX, Wang H, Ju XH. Molecular mechanism of ganglion cell apoptosis after retinal ischemia-reperfusion. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(5):909-911

摘要

视网膜缺血再灌注(retinal ischemia reperfusion, RIR)损伤是常见的眼科疾病,主要表现为神经节细胞的凋亡,可造成视神经损害等严重的疾病,对患者的视觉功能和生活质量造成严重的影响。细胞凋亡是在基因控制下的自我消亡过程,受多种基因调控。我们结合文献,综述了不同基因在 RIR 后神经节细胞凋亡中的作用。

关键词:视网膜缺血再灌注;节细胞;凋亡;分子机制

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.19

引用:刘索新,王浩,鞠学红. 视网膜缺血再灌注后 RGC 凋亡分子机制研究进展. 国际眼科杂志 2013;13(5):909-911

0 引言

视网膜血供主要来源于视网膜中央动脉,而视网膜中央动脉是终末动脉,极易发生缺血,并且可在极短的时间内对视网膜造成严重损伤,因此视网膜缺血性损伤是一种较为常见的眼科疾病。而造成视网膜损伤的主要因素不是缺血本身,而是恢复血液供应后,在自由基以及钙超载等因素的作用下,对重新获得血液供应的组织内细胞造成损伤。一系列研究^[1-3]证实,视网膜缺血再灌注(retinal ischemia reperfusion, RIR)后,细胞的进行性凋亡是视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)损失的重要机制之一。凋亡由大量的死亡受体信号引起,是一种程序性级联式的细胞死亡^[4],大量与凋亡相关的基因表达,通过信号传导通路引发凋亡。关于 RIR 后视神经节细胞的凋亡已有越来越多的研究,但具体机制尚不完全明确。我们就 RIR 后视神经节细胞凋亡的分子机制进行综述。

1 Fas/FasL 的过表达可致 RGC 凋亡

Fas 为 I 型跨膜蛋白,分子量约为 45kD,是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族的细胞表面分子,与 Fas 配体(FasL)结合,可以向细胞传导死亡信号,引起携带 Fas 的细胞凋亡^[5],多种哺乳动物细胞表达 Fas,而 FasL 仅表达于活化的 T 细胞。Fas 蛋白 N 端位于膜外,具有 3 个富含半胱氨酸的结构域;C 端位于膜内,其结构中含有 1 段 80 个氨基酸组成的序列,它与细胞凋亡信号传递的调节密切相关,称为死亡结构域。TNFR1/Fas 激活胞内 Caspase 酶,后者作用到线粒体,触发细胞色素释放,使下游某些蛋白酶活化,继而引发蛋白变性,核膜崩破及 DNA 降解最终造成细胞死亡。在正常情况下,视网膜组织中 Fas 蛋白是很少的,在可检查水平之下,FasL 也在视网膜层表达微弱,它与视觉的免疫机制有关^[6]。庞东渤等^[7]在正常大鼠视网膜未见凋亡细胞,而在 RIR 损伤模型中发现再灌注后 12h RGC 层有节细胞凋亡,24h 后凋亡细胞明显增多,达到高峰,全层可见,48h 后凋亡细胞开始减少,72h 仍可见凋亡细胞;再灌注后 12h Fas 开始表达,24h 达高峰,48h 后逐渐减少;而 FasL 在 24h 表达升高,48h 达高峰,此后表达稍微下降,72h 仍维持高表达;Fas/FasL 高表达的部位也在神经节细胞层,说明 Fas/FasL 的过表达可能导致了节细胞的凋亡。

2 Caspase 在 RGC 凋亡中的作用

Caspases 家族成员有 13 个,每一成员均以无活性的酶原形式存在于胞浆中,半胱氨酸特异性蛋白酶-3(Caspase-3)最重要。家族某一成员的激活都会引起其他成员的一系列酶联反应,逐级水解活化,将 Caspases 激活成活性形式,作用于各自不同的底物,最终引起细胞凋亡。凋亡是一个复杂的蛋白水解酶级联反应过程,Caspase 在视神经节细胞凋亡信号传导通路中有重要作用^[8,9]。Caspase-3 的底物可以是肌动蛋白,也可以是细胞核蛋白,还可以是细胞核酶(如核酸聚合酶 PARP 和 DNA 断裂因

子)。这些酶或因子的活化往往造成细胞核膜完整性损害,还引发DNA转录与复制等功能丧失。有研究^[10]表明丙戊酸(VPA)在RIR损伤中通过诱导抗凋亡蛋白Bcl-2的产生,和抑制凋亡蛋白Caspase-3与Bax的表达产生抗节细胞凋亡的作用。Caspase-3是细胞进入程序性死亡的特异性标志,其被称为细胞凋亡的“执行者”,如果细胞凋亡中去执行这一阶段,则细胞不发生凋亡^[11]。Caspase-2也是Caspases家族成员之一,活化的Caspase-2能直接或间接地通过切割Bid(一类Bcl-2蛋白,能促进凋亡产生)诱导凋亡相关蛋白(cyt2c,Smac和AIF)的释放。Caspase-2有两方面的作用:第一是信号转导作用,能激活下游的Caspase;第二直接使蛋白裂解,诱发凋亡,在凋亡过程中Caspase-3是凋亡的“执行者”。

3 Bcl-2 基因家族有抑制/促进凋亡的双向性

Bcl-2 基因家族包括两大类:抑制凋亡的基因如 Bcl-2 和 Bcl-xl 等,促进凋亡的基因如 Bax, Bad, Bak 等。这些基因的表达产物引起细胞内一系列生化及结构改变。凋亡因子和抑凋亡因子的平衡保证了细胞的稳态,两者的失衡可导致细胞的增殖或凋亡。Bcl-2 蛋白定位于核膜、粗面内质网和线粒体膜上,在胚胎组织中广泛表达,在成人的组织中其表达局限于淋巴组织、造血组织的祖细胞,它可防止或延迟由 γ -辐射、糖皮质激素、休克和多种化疗药物所诱导的凋亡。细胞接受凋亡刺激后,Bcl-2 可调节线粒体膜上通透性转换孔来改变线粒体膜的通透性,阻止 Cyt-c 的释放,从而发挥抗凋亡作用^[12];而 Bax 基因被激活后,破坏细胞骨架中蛋白质,致使凋亡发生^[13-15]。在凋亡诱发因素的刺激下,位于细胞质或线粒体膜上的 Bax 还可能通过插入线粒体膜,诱导线粒体蛋白的释放,促进凋亡。有研究^[16]证实,在 RIR 组中 Bax/Bcl-2 的比例在 mRNA 水平上升高,而治疗组 Bax/Bcl-2 的比例降低,说明 Bax 与 Bcl-2 共同参与节细胞凋亡的发生。当 Bax 形成同源二聚体,则促进凋亡,随着 Bcl-2 蛋白表达量的上升,Bax 同源二聚体分开,与 Bcl-2 形成更稳定的 Bax-Bcl-2 异源二聚体,从而抵制诱导凋亡的作用。不同的组织,不同的治疗方法,其 Bax 与 Bcl-2 的变化不同,在玻璃体内注射辛伐他丁治疗 RIR 损伤,Bcl-2 的量增加,而 Bax 没有受到任何影响,推测 Bcl-2/Bax 的比例上升也能减少视网膜节细胞的退变^[17]。

4 p53 通过调控其他基因而对凋亡产生作用

p53 基因是一种重要的抑癌基因,该基因编码一种分子量为 53kDa 的蛋白质,即为基因调节蛋白(p53 蛋白)。人类 p53 基因定位于 17P13.1,鼠 p53 定位于 11 号染色体。其生物学功能是在 G₁ 期监视细胞基因组 DNA 的完整性。如果 DNA 受损伤,p53 蛋白就会使细胞停留在 G₁ 期,待修复后再进入 S 期。如果损伤不能修复,则诱导其凋亡,从而避免细胞癌变;一旦 p53 基因发生突变,p53 蛋白失活,细胞分裂失去节制,就会发生癌变。体外实验和动物实验证实,神经细胞发生凋亡时伴随着 Wtp53 基因高水平的表达^[18,19],而王红云等^[20]在 RIR 损伤模型中应用免疫组织化学法检测到在神经节细胞层与神经纤维层,缺血再灌注后 6h WT p53 蛋白开始表达,24h 达高峰,72h 明显减少,提示 WT p53 的过表达可能导致了神经细胞及视网膜节细胞的凋亡,抑制 WT p53 表达则可抑制神经细胞凋亡的发生^[21]。单一基因表达往往不足以引发凋亡,常需要几种基因协调一致,共同调节凋亡过程。Sun 等^[22]

通过建立视网膜缺血模型,发现血红素氧化酶发挥作用是通过降低 p53 和 Caspase-3 的表达,上调 Bcl-xl 的表达来达到抗节细胞凋亡的目的。因此,p53 和 Caspase-3 具有促进节细胞凋亡的作用。p53 是 Bax 的正调控因子,是 Bcl-2 和 Bcl-xl 的负调控因子。p53 基因的上调可降低 Bcl-2 和 Bcl-xl 基因的表达和增加 Bax 基因的表达,促进细胞色素 c 的释放和 Caspase-3 的活化而促进细胞凋亡^[23]。迄今发现受 p53 调节的基因多达 6~7 个,如 p21, Waf1, MDM2, 周期素 G 和 Bax 等。它还可能通过协调其家族成员 p63 和 p73 来共同参与细胞凋亡^[24]。

5 p38 基因对 RGC 凋亡的调控

p38 是由 360 个氨基酸构成的,分子质量约为 38kDa 的蛋白质。p38MAPK 信号通路为 MAPK 家族的重要成员,不仅在炎症、应激反应中具有重要作用,还参与细胞的存活、分化和凋亡等过程,被认为是细胞众多信号转导通路的中转站。一些研究者发现,在大鼠视网膜损伤中,抑制 p38 的活性可明显促进恢复和减弱节细胞的凋亡^[25]。Dreixler 等^[26]建立大鼠视网膜缺血模型前,先进行视网膜缺血预适应,通过对照发现预适应可减弱 p38 基因的表达,达到保护视网膜节细胞的作用。在特定条件下,p38MAPK 激活后神经元细胞是否存活与它被激活的时间有关,在视网膜缺血损伤中早期激活 p38MAPK 可以保护节细胞^[27]。因此在视网膜缺血预处理与缺血后处理中,观察 p38 和其抑制剂在 MAPK 信号通路整个过程中的变化,对视网膜节细胞的作用具有重要意义。

6 c-jun 基因可诱导 RGC 凋亡

jun 也是一种原癌基因,分为细胞 jun 基因(c-jun)和病毒 jun 基因(v-jun)两种。有学者研究发现,c-jun 诱导凋亡的过程中,当使用诱导剂诱导细胞凋亡时,不仅有 c-jun 的表达增多,还伴有细胞内一些蛋白酶含量增多及活性增高等现象,推测某些蛋白酶在凋亡的进程中起一定的作用。JNK 信号转导通路是 MAPK 通路家族的一重要成员,在未受刺激的细胞中,JNK 主要存在于胞质内,但核内也有一定分布。在受到刺激后,JNK 迅速而显著地聚积于核内,并导致相应基因表达改变。MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内,在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。有研究证实抑制 MAPK 可以改变 NF- κ B 的活性,从而发挥神经保护作用^[28,29]。在 Biermann 等^[30]的 RIR 模型中,H₂S 通过使 p-JNK 活性减弱发挥神经节细胞保护作用,说明 JNK 信号通路存在于视网膜中,并发挥重要作用。

7 NF- κ B 的激活可促进 RGC 凋亡

细胞核因子 κ B (NF- κ B) 是一种由两个 Rel 蛋白单体组成的二聚物转录因子。它能够调控一系列参与细胞生理活动的基因,这些基因参与先天性和习得性免疫、炎症、应激、淋巴形成等生理活动。在非激活状态下,NF- κ B 与其抑制分子(I- κ B)以无活性形式存在于胞浆中,在缺血、缺氧刺激下 NF- κ B 与 I- κ B 分离,NF- κ B 能被氧自由基、钙超载等因素刺激而活化,参与炎症因子和细胞因子的调控。在 RIR 损伤中,炎症反应与凋亡因子相互作用共同参与节细胞的凋亡^[31]。NF- κ B 能启动许多炎症基因的转录,通过经典或非经典途径激活这些因子。IKK (IkBa kinase) 是一个很大的蛋白复合体,包含两个激酶亚单位 IKKa 和 IKKb 和一个调节亚单位 IKKg。IKKa

和 IKK β 都属于丝/苏氨酸激酶。NF- κ B 的经典途径是通过激活 IKK β 使 I- κ B 被磷酸化, I- κ B 从 NF- κ B 上脱落再被泛素蛋白酶体降解, 使得 NF- κ B 由已抑制状态被激活, NF- κ B/p65:p50 二聚体转移到核内, 激活下游的基因^[32]。在非经典途径中, NF- κ B/RelB:p52 二聚体转移到核内是通过 IKK α 被激活而发生的^[33]。RIR 后 NF- κ B 的激活有助于神经节细胞的凋亡, 相反, 抑制 NF- κ B 则减少节细胞的凋亡^[34]。

另外有许多学者对 CyclinD1, 低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 水通道蛋白-4 (AQP4) 和热休克蛋白 90 (HSP-90) 等相关因子有研究, 指出它们对 RIR 损伤中神经节细胞的凋亡起重要的调节作用。很多研究是通过抑制和凋亡通路相关的基因表达, 来达到保护神经细胞作用的^[35,36]。

8 展望

RIR 损伤中最关键的是视神经节细胞的凋亡。关于细胞凋亡的机制有大量的研究, 而针对视网膜节细胞的凋亡机制研究较少。诱导细胞凋亡的基因是否都是视网膜节细胞凋亡的因素, 是否都在节细胞表达, 这些问题尚未明了。因此, 研究 RIR 损伤后节细胞凋亡的分子机制, 对从基因水平预防和治疗 RIR 损伤具有重要意义。

参考文献

- 1 Yoshida E, Atkinson TG, Chakravarthy B. Neuroprotective gene expression profiles in ischemic cortical cultures preconditioned with IGF-1 or bFGF. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;131(1-2): 33-50
- 2 Dijk F, Kamphuis W. An immunocytochemical study on specific amacrine cell subpopulations in the rat retina after ischemia. *Brain Res* 2004;1026(2):205-217
- 3 Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1053(8): 137-147
- 4 Qu J, Wang D, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res* 2010;91(1):48-53
- 5 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203): 1449-1456
- 6 Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a Mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270(5239):1189-1192
- 7 庞东渤, 毕燃, 赵海雁. α -硫辛酸治疗大鼠视网膜缺血再灌注损伤 Fas/FasL 的表达与细胞凋亡的关系. *国际眼科杂志* 2011;11(4): 596-598
- 8 Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(11): 4049-4059
- 9 Colussi PA, Harvey NL, Shearwin-Whyatt LM, et al. Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *Biol Chem* 1998;273(41):26566-26570
- 10 Zhang Z, Qin X, Tong N, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection in retinal ischemia injury via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. *Exp Eye Res* 2012;94(1):98-108
- 11 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88(3):355-365
- 12 Cheong JW, Chong SY, Kim JY, et al. Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(13):5018-5027
- 13 Hockenbery D, Nunes G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348(6299):334-336
- 14 Oltval ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74(4): 609-619
- 15 Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, et al. Estrogen and Bcl-2 gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *Neurosci* 2001;21(19):

7543-7550

- 16 Song H, Gao D. Fasudil, a Rho-associated protein kinase inhibitor, attenuates retinal ischemia and reperfusion injury in rats. *International Journal of Molecular Medicine* 2011;28(2):193-198
- 17 Ko ML, Chen CF, Peng YH. Simvastatin upregulates Bcl-2 expression and protects retinal neurons from early ischemia/reperfusion injury in the rat retina. *Exp Eye Res* 2011; 93(5): 580-585
- 18 Wood KA, Youle RJ. The role of free radicals and P53 in neuron apoptosis in vivo. *Neurosci* 1995;15(8): 5851-5857
- 19 LaFeria FM, Hall CK, Ngo L, et al. Extracellular deposition of β -amyloid upon P53-dependent neuronal cell death in transgenic mice. *Clin Invest* 1996;98(7):1626-1632
- 20 王红云, 牛鹰钧, 袁春燕, 等. 碱性成纤维细胞生长因子及 WTP53 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的作用. *中国临床康复* 2005;9(6): 140-141
- 21 Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 1999;72(3):1187-1203
- 22 Sun MH, Pang JH, Chen SL, et al. Retinal protection from acute glaucoma-induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(9): 4798-4808
- 23 Sot B, Freund SM, Fersht AR. Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* 2007; 282(40):29193-29200
- 24 Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2(7): 371-386
- 25 Kikuchi M, Tennesi L, Lipton SA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000;20(13):5037-5044
- 26 Dreixler JC, Barone FC, Shaikh AR, et al. Mitogen-activated protein kinase p38 α and retinal ischemic preconditioning. *Exp Eye Res* 2009;89(5):782-790
- 27 Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2004;65(5):1172-1180
- 28 Häke I, Schonenberger S, Neumann J, et al. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by extract from the tropical plant *Krema laurina* after inflammatory damage in living brain tissue. *Neuroimmunol* 2009; 206(1-2):91-99
- 29 Pan XD, Chen XC, Zhu YG, et al. Tripchlorolide protects neuronal cells from microglia-mediated beta-amyloid neurotoxicity through inhibiting NF-kappaB and JNK signaling. *Glia* 2009;57(11):1227-1238
- 30 Biermann J, Lagrèze WA, Schallner N, et al. Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Vision* 2011;17:1275-1286
- 31 Schallner N, Fuchs M, Schwer CI, et al. Postconditioning with inhaled carbon monoxide counteracts apoptosis and neuroinflammation in the ischemic rat retina. *PLoS One* 2012;7(9):1-14
- 32 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132(3): 344-362
- 33 Yamamoto Y, Gaynor RB. IkkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(2):72-79
- 34 Dvorianchikova G, Barakat D, Brambilla R, et al. Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci* 2009;30(2):175-185
- 35 Asomugha CO, Linn DM, Linn CL. ACh receptors link two signaling pathways to neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in isolated RGCs. *Neurochem* 2010;112(1): 214-226
- 36 Shen J, Wu Y, Xu JY, et al. ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(1):35-46