

线粒体功能障碍及氧化应激与糖尿病视网膜病变关系的研究

岳嵩, 胡悦东, 王馨鹤, 陈蕾

作者单位:(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属一院眼科
作者简介:岳嵩,硕士,研究方向:糖尿病视网膜病变。
通讯作者:陈蕾,主任,博士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变. leichen0501@163.com
收稿日期:2014-06-25 修回日期:2014-11-10

Relationship between mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic retinopathy

Song Yue, Yue-Dong Hu, Xin-He Wang, Lei Chen

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Lei Chen. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. leichen0501@163.com
Received:2014-06-25 Accepted:2014-11-10

Abstract

• As one of the serious complications of diabetes, diabetic retinopathy(DR) has become a main eye disease which causes blindness. The occurrence and development of DR is related to many factors. The pathogenesis is complicated, and the mechanism has not been clear. Early data suggest that the occurrence and development of DR has relations with many factors such as blood sugar level, diabetes duration and the environment. Among the factors, mitochondrial dysfunction and oxidative stress is the important mechanisms of DR and has become research focus in recent years. Consequences of mitochondrial dysfunction within cells include elevation of the rate of reactive oxygen species(ROS) production due to damage of electron transport chain proteins, mitochondrial DNA (mtDNA) damage, and loss of metabolic capacity. Clear understanding on the mechanism of mitochondrial functional change under high sugar level and oxidative stress response in the occurrence and development of DR is of great significance on prevention and cure of DR. In this article, the development of mitochondrial metabolism and oxidative stress of DR is reviewed.

• **KEYWORDS:** mitochondrial dysfunction; oxidative stress; diabetic retinopathy; seahorse

Citation: Yue S, Hu YD, Wang XH, *et al.* Relationship between mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(12):2176-2178

摘要

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)为糖尿病的严重并发症之一,已成为致盲的主要眼疾。DR的发生发展与多种因素有关,发病机制复杂,尚不明确,早期的资料表明,其发生发展与血糖水平、糖尿病病程、环境等多种因素相关。其中线粒体功能障碍和氧化应激反应是导致DR发生的重要机制之一,已成为近几年的研究热点。细胞内线粒体功能障碍的后果包括因为线粒体活性氧(ROS)的产生率升高而导致的电子传递链蛋白的损伤,以及线粒体DNA(mtDNA)的损害和代谢能力的降低。明确把握高糖下线粒体的功能变化和氧化应激反应在DR发生发展过程中的作用机制,对DR的防治具有重要意义。因此本文就相关研究发展做一综述。

关键词:线粒体功能障碍;氧化应激;糖尿病视网膜病变;海马细胞能量代谢实时测定

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.18

引用:岳嵩,胡悦东,王馨鹤,等.线粒体功能障碍及氧化应激与糖尿病视网膜病变关系的研究.国际眼科杂志2014;14(12):2176-2178

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组以高血糖为特征的代谢性疾病。高血糖则是由于胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损,或两者兼有引起。糖尿病时长期存在的高血糖,导致各种组织,特别是眼、肾、心脏、血管等功能障碍。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是其最严重的微血管并发症之一,主要病理改变包括视网膜炎症、血管渗透性增加、视网膜表面异常血管新生。Brownlee^[1]认为导致糖尿病并发症的发生有四条经典通路,即多元醇通路激活、氨基己糖途径的增加、晚期糖基化终末产物(AGEs)增加与细胞相应受体的相互作用、蛋白激酶C(PKC)激活,实质上都是高糖诱导过氧化物过表达的结果,线粒体的损伤和氧化应激是DR发生发展的重要因素^[2]。由于线粒体功能障碍和氧化应激反应,导致线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加,内皮细胞和周细胞的凋亡增多,最终导致DR的形成。

1 高血糖与糖尿病视网膜病变

高血糖被认为是DR发生发展的重要因素。DR的严重性和视力下降程度与血糖水平控制情况以及患DM时间的长短有关。糖尿病控制与并发症试验和动物模型清晰表明,良好的血糖控制可以减慢DR的发生发展^[3,4]。但是,在高糖状态下,导致DR发生的分子机制尚不十分明确。DM是一种慢性的终身性疾病,所以视网膜长期持续暴露于高浓度葡萄糖中。高血糖可使组织发生改变,随着病情的持续发展,血管壁受损,管径变细,易形成血栓,

毛细血管周细胞丧失,内皮细胞损伤和脱落,使血管发生闭塞,新生血管形成,同时可使血管脆性改变,发生渗漏和出血。当水分被吸收后,血浆脂质和蛋白沉积成为硬性渗出^[5]。然而,DR 动物模型表明,视网膜代谢/功能改变发生在其他任何组织改变之前^[6,7]。当细胞内葡萄糖浓度升高时,多元醇通路激活、氨基己糖途径、糖基化终末产物增加、蛋白激酶 C 激活,这些结果都是由于高血糖时线粒体呼吸链活性氧产生过多所致^[8,9],这些代谢通路相互联系并且可以介导氧化性应激^[10],最后导致 DR 的形成。更好的了解疾病的细胞和分子机制,特别是在这种缓慢进展的疾病的早期阶段,对延缓及治疗疾病起到至关重要的作用。

2 氧化应激与糖尿病视网膜病变

DR 的发生是一个复杂的病理过程,虽然 DR 机制尚未完全阐明,但氧化应激是 DR 发生发展的关键因素^[11]。临床和实验研究表明,高血糖是糖尿病并发症的发病机制中的首要因素,可以损伤组织引起细胞凋亡,造成视网膜的不可逆损伤^[12]。氧化应激反应是指机体在遭受各种有害刺激时,引起机体内 ROS 产生增加,抗氧化能力下降,使细胞产生多种毒性作用的病理状态。ROS 是指由氧诱发形成,并在分子组成上含有氧的一类化学物质的总称。ROS 是细胞的代谢产物,只存在于线粒体中。视网膜在缺血状态下,活性氧增加,氧化应激增强,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽等抗氧化剂水平降低,脂质过氧化物、丙二醛增高,导致视网膜内氧化损伤加剧^[12]。氧化应激反应可引起细胞膜完整性破坏^[13],使细胞凋亡,微血管损害及屏障的破坏,最终导致 DR 的形成。持续的高血糖,ROS 产生增多,可激活许多氧化应激反应途径^[14],包括:(1)多元醇通路激活:在高糖状态下,己糖激酶被饱和,这时醛糖还原酶激活,促使体内的葡萄糖转化为山梨醇,山梨醇在山梨醇脱氢酶作用下,转化为果糖,在细胞内大量堆积,造成细胞内高渗环境,导致细胞水肿、结构功能受损、代谢紊乱,进而造成微血管病变。(2)氨基己糖途径:高糖状态下,生成大量的 ROS,ROS 能抑制 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),导致糖酵解的产物转向氨基己糖途径,产生二磷酸尿嘌呤-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc),而 UDP-GlcNAc 是细胞内因子转录后修饰的底物。激活的氨基己糖途径产生的氨基葡萄糖可增加 H₂O₂ 的生成,导致氧化作用增强,使细胞内皮发生改变,血管通透性增加,生成新生血管等改变。(3)蛋白激酶 C 激活:大量研究证明 PKC 能通过多种方式破坏内皮细胞间紧密连接,内皮渗透性增加,改变 NO 生物利用度、减少前列腺素生成、增加 VEGF 表达、增加血栓素和内皮素-1(Endothelin-1,ET-1)的产生等^[15],糖尿病时,多种异常血管新生,血管渗透性增加、内皮细胞功能障碍、血管膨胀、基底膜增厚和细胞外基质增厚、分裂素激活蛋白激酶(MAPK)、Na⁺-K⁺-ATP 酶等酶活力改变,导致视网膜周细胞死亡,血管内皮细胞受损,出现无结构毛细血管,最后闭塞,引发 DR 的一系列特征性改变。(4)糖基化终末产物增加:长期高血糖,可引起蛋白质非酶糖化形成的 AGEs 堆积在组织血管中^[16],AGEs 能通过影响血管内皮通透性和自我调节功能,促进细胞因子释放和活化蛋白激酶,引起炎症反应,减轻 NO 的舒张血管作用和增加氧压力,最终导致 DR。

3 线粒体与糖尿病视网膜病变

线粒体是细胞功能和代谢的场所,也是呼吸发生的细

胞器。它的主要作用是产生腺苷三磷酸(ATP),控制细胞代谢和调节细胞凋亡^[17]。由于它所发挥的关键作用,线粒体功能障碍将严重影响组织动态平衡。ROS,超氧化物歧化酶,羟自由基主要在线粒体中形成。高糖状态下,ROS 在视网膜长期过量产生,氧化作用增强,可导致线粒体功能的障碍。线粒体功能障碍在使视网膜毛细血管细胞凋亡中以及超氧化物引起的线粒体 DNA(mtDNA)损伤启动线粒体功能障碍的恶性循环中起到了重要作用^[18-20]。在高糖作用下,线粒体的结构和功能会遭到破坏及发生氧化应激反应,其主要的蛋白质和基因改变包括:线粒体超氧化物歧化酶(MnSOD)、过氧化氢酶(CAT)、脂质过氧化物(MDA)、解耦联蛋白(UCPs)、醛糖还原酶、糖基化终末产物(AGEs)、谷胱甘肽过氧化物酶、硝基酪氨酸(NT)、8-羟基脱氧鸟苷酸(8-OH dG)等,其中研究较多的为 MnSOD,MDA,UCPs。解耦联蛋白(uncoupling proteins,UCPs)属于线粒体阴离子载体基因家族,所谓解耦联就是指 ATP 合成与线粒体呼吸过程分离,这一过程是通过质子漏实现的^[21,22]。UCPs 的功能就是通过增加线粒体内膜的质子漏而降低电化学梯度,从而发挥减少 ROS 产生的作用。目前为止已经鉴定出 UCP1-5 五种异构体,研究表明,在高糖状态下,牛视网膜微血管内皮细胞、周细胞 UCP1,UCP2 及 MnSOD 表达阳性^[23],糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡与 MnSOD mRNA 的活性减少有关^[24]。线粒体的形态学也会发生改变,在糖尿病大鼠的视网膜中可以观察到线粒体的膨胀,内皮细胞、周细胞都逐渐丧失原有的形态特征,变的不均一,排列不规则,视网膜细胞凋亡^[25]。由于这些因素的改变,导致线粒体活性氧生成增加,内皮细胞和周细胞的凋亡增多,最终导致 DR 的形成。

4 Seahorse 的应用

线粒体代谢的测定结果直接影响着试验的准确性和结论的可信度,传统上我们所用的测量方法(放射性核素标记物)具有一定的局限性,不能直接体现出活细胞的代谢状态,而 XF 是利用活细胞来进行测量,测量后保留细胞活性,具有生成率高,使用样本量小,大幅改进动态分辨率的优点^[26]。对肥胖症,糖尿病,代谢紊乱,和线粒体功能障碍等疾病提供了新的认识,通过使细胞代谢的实时测量中,利用微量培养板,通过测量耗氧率(OCR)-线粒体呼吸的措施;以及细胞外酸化率(ECAR)-糖酵解的措施,使研究得到的结果更准确,从而了解疾病的代谢特点。在国内外,已有很多实验^[27,28]在不同领域,利用 seahorse 技术获得了理想的研究结果,如:肥胖病、肿瘤、内分泌疾病等。但其在视网膜病变研究利用的还很少,所以,可以利用 seahorse 了解线粒体在高糖状态下的代谢,进一步说明氧化应激反应的原理,和导致糖尿病视网膜病变发生发展的机制。

5 结语

糖尿病视网膜病变的发生发展与氧化应激和线粒体代谢功能密切相关。线粒体结构功能的改变,导致其所产生的产物发生变化,最终引起机体内一系列异常的病理生理反应。并且高糖状态下的氧化应激反应有关的途径都与 DR 的发生发展相关。目前,虽然对 DR 相关氧化应激的研究已经取得了很大进展,但其研究结果对解释其在 DR 疾病过程中所发挥的作用及 DR 的发病机制,仍有待深入探索。如果能够准确把握氧化应激在 DR 发生发展

过程中的作用机制,则可能为DR的诊断和治疗提供依据,对延迟DR的发生发展具有重要意义。

参考文献

- 1 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(13):813-820
- 2 Tarr JM, Kaul K, Chopra M, et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol* 2013;2013:343560
- 3 Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-986
- 4 Madsen-Bouterse SA, Mohammad G, Kanwar M, et al. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(6):797-805
- 5 Kim DI, Park MJ, Lim SK, et al. High-glucose-induced CARM1 expression regulates apoptosis of human retinal pigment epithelial cells via histone 3 arginine 17 dimethylation: role in diabetic retinopathy. *Arch Biochem Biophys* 2014;560:36-43
- 6 Kern TS, Tang J, Mizutani M, et al. Response of capillary cell death to aminoguanidine predicts the development of retinopathy: Comparison of diabetes and alactosemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3972-3978
- 7 Santos JM, Mohammad G, Zhong Q, et al. Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12(3):352-361
- 8 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-820
- 9 Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 2000;404(6779):787-790
- 10 Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009;45(1):S35-S38
- 11 Madsen-Bouterse S, Zhong Q, Mohammad G, et al. Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes, and its protection by manganese superoxide dismutase. *Free Radic Res* 2010;44(3):313-321
- 12 王泓. 氧化应激反应与糖尿病视网膜病变. *临床眼科杂志* 2009;17(5):474
- 13 Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5(5):561-568
- 14 Yamagishi SI, Ueda S, Matsui T, et al. Role of advanced glycation

end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 2008;14(10):962-968

- 15 Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, et al. The PKCbeta/HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochem Pharmacol* 2010;80(8):1230-1237
- 16 Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress and diabetic retinopathy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12(3):362-368
- 17 Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 2001;1(1):3-31
- 18 Madsen-Bouterse SA, Mohammad G, Kanwar M, et al. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(6):797-805
- 19 Santos JM, Kowluru RA. Role of mitochondria biogenesis in the metabolic memory associated with the continued progression of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8791-8798
- 20 Mohammad G, Kowluru RA. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3832-3841
- 21 Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 1999;286(5438):304-306
- 22 Sies H, Masumoto H. Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Adv Pharmacol* 1997;38:229-246
- 23 崔彦. 线粒体活性氧与糖尿病视网膜病变关系及机制的研究. 复旦大学 2006
- 24 Li X, Zhang M, Zhou H. The morphological features and mitochondrial oxidative stress mechanism of the retinal neurons apoptosis in early diabetic rats. *J Diabetes Res* 2014;2014:678123
- 25 Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetic Res* 2007;2007:43603
- 26 Jarrett SG, Rohrer B, Perron NR, et al. Assessment of mitochondrial damage in retinal cells and tissues using quantitative polymerase chain reaction for mitochondrial DNA damage and extracellular flux assay for mitochondrial respiration activity. *Methods Mol Biol* 2013;935:227-243
- 27 俞静. 内脏脂肪棕色化功能改变影响肥胖的分子机制研究. 南京医科大学 2013
- 28 de Moura MB, Van Houten B. Bioenergetic analysis of intact mammalian cells using the Seahorse XF24 Extracellular Flux analyzer and a luciferase ATP assay. *Methods Mol Biol* 2014;1105:589-602