

氧化应激因素在干眼中的实验研究

林 启*, 吴康瑞*, 邵 毅

引用: 林启, 吴康瑞, 邵毅. 氧化应激因素在干眼中的实验研究. 国际眼科杂志 2019; 19(12): 2053-2055

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81660158, 81400372)

作者单位: (330006) 中国江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科

*: 林启和吴康瑞对本文贡献一致。

作者简介: 林启, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病与眼表疾病; 吴康瑞, 男, 本科, 研究方向: 角膜病及眼表疾病。

通讯作者: 邵毅, 男, 博士, 硕士研究生导师, 眼科副主任, 研究方向: 角膜病及眼表疾病. freebee99@163.com

收稿日期: 2019-01-07 修回日期: 2019-11-01

摘要

干眼是指任何原因造成的泪液质或量异常或动力学异常, 导致泪膜稳定性下降, 并伴有眼部不适和(或)眼表组织病变特征的多种疾病的总称。干眼是一种多因素疾病, 受年龄、环境因素影响较大。其中氧化应激因素与年龄相关性干眼关系密切。本文将基于动物实验研究, 通过建立氧化应激实验动物模型, 并监测眼表组织氧化损伤的生物标志物及抗氧化防御物水平, 指出氧化应激在干眼中的作用。另外, 一些介入性实验研究表明, 氧化应激可能是干眼局部治疗的直接靶点。某些物质可以有效降低氧化应激损伤, 从而达到治疗干眼的效果。近年来对氧化应激的进一步研究发现其在干眼中具有越来越重要的作用, 为针对氧化应激的临床干预提供了依据。

关键词: 氧化应激; 干眼; 实验

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.12.12

Laboratory study of oxidative stress in dry eye

Qi Lin*, Kang-Rui Wu*, Yi Shao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81660158, 81400372)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Co-first authors: Qi Lin and Kang-Rui Wu.

Correspondence to: Yi Shao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee99@163.com

Received: 2019-01-07 Accepted: 2019-11-01

Abstract

• Dry eye syndrome refers to a general term for various diseases in which tear fluid quality or abnormality or

kinetic abnormality is caused by any cause, resulting in decreased tear film stability, accompanied by ocular discomfort and/or ocular surface tissue lesion characteristics. Dry eye syndrome is a multifactorial disease that is greatly affected by age and environmental factors. Among them, oxidative stress is closely related to age-related dry eye. In this article, based on animal experiments, the role of oxidative stress in dry eye syndrome was pointed out by establishing animal models of oxidative stress and monitoring the levels of biomarkers and antioxidant defenses indicative of oxidative damage in ocular surface tissue. In addition, some interventional studies have shown that oxidative stress may be a direct target for local treatment of dry eye. Certain substances may effectively reduce oxidative stress damage, thereby achieving the effect of treating dry eye. Further research on oxidative stress in recent years has shown that oxidative stress has an increasingly important role in dry eye, providing a basis for clinical intervention against oxidative stress.

• KEYWORDS: oxidative stress; dry eye; laboratory experiment

Citation: Lin Q, Wu KR, Shao Y. Laboratory study of oxidative stress in dry eye. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(12): 2053-2055

0 引言

干眼是指任何原因造成的泪液质或量异常或动力学异常, 导致泪膜稳定性下降, 并伴有眼部不适和(或)眼表组织病变特征的多种疾病的总称。主要的病理生理机制为泪膜不稳定、泪液渗透性升高、眼表炎症与损伤及神经感觉异常^[1]。以往临床和实验室研究发现, 干眼是一种多因素慢性炎症性疾病, 由外在或内在因素导致泪膜不稳定和高渗。在某些情况下泪液成分的这些变化会与全身因素相结合, 导致炎症循环, 引起眼表上皮异常和神经刺激^[2]。衰老是干眼重要的危险因素之一^[3], 流行病学调查研究表明, 干眼的患病率随年龄增长而增加^[4], 而氧化应激是年龄相关性干眼的重要危险因素之一^[5], 同时又与炎症途径的激活有关^[6]。有研究支持铜锌超氧化物歧化酶家族(Cu、Zn SOD 家族)是主要的抗氧化系统, 而缺乏SOD-1的小鼠将加速衰老^[7]。还有研究发现老年大鼠角膜上皮化生和胞质脂褐素样物质沉积增多, 并伴随抗氧化标志物维生素E的含量下降^[8]。而限制热量的饮食可以防止许多器官因营养不良而导致的功能衰退^[9]。本文将对氧化应激因素在干眼中的实验研究进行综述。

1 与氧化应激有关的干眼的病理生理学机制

1.1 活性氧与干眼 氧化应激因素对干眼的影响可用干眼周期来描述^[10]。这个系统的核心因素是活性氧

(reactive oxygen species, ROS), 当 ROS 水平增加时, 各种抗氧化酶水平上调, 可能产生负反馈以调节应激信号的强度或降低 ROS 水平。正常情况下抗氧化防御系统维持 ROS 于低水平, 应激信号强度正常。各种外界因素如紫外线、污染物、药物和年龄等都可引起 ROS 水平升高。不可控制的 ROS 的升高可直接损伤泪液脂质层等结构以及眼表神经的髓鞘, 导致干眼的发生。因此, 抗氧化防御对于保持活性氧水平低于诱导过度应激信号阈值的水平至关重要。ROS 是干眼良好的监测指标, 可以反映干眼的病程和治疗效果。监测过程中可以发现 ROS 水平随年龄升高增加并伴随氧化酶和抗氧化酶水平的降低。也可通过降低 ROS 水平而不必着重纠正干眼周期的其他问题来治疗干眼。

1.2 高渗泪液和眼表炎症与干眼 泪液是眼表面上皮细胞的细胞外液, 含水泪液流量减少或含水泪液蒸发增加将导致泪液高渗透压, 这是干眼进入恶性循环的关键步骤。泪液高渗透压引起形态学变化, 例如结膜和角膜细胞的凋亡, 并引发导致进一步细胞死亡的炎症级联, 包括产生粘蛋白的杯状细胞的丧失。慢性炎症最终会降低特定的泪液成分, 加剧了泪膜的不稳定性, 使干眼恶性循环并长期存在^[11]。

2 氧化应激与干眼相关的实验证据

2.1 体外实验 证明氧化应激与干眼有关的证据主要基于体外实验和动物实验。在体外实验中, 以高渗培养基的形式模拟人角膜上皮细胞氧化应激的环境, 进行人角膜上皮细胞原代培养。实验中可观察到年龄相关的 ROS 生成增加并伴随氧化酶和抗氧化酶水平的降低, 线粒体 DNA 损伤以及膜脂质过氧化中氧化标记物显示的膜损伤^[12]。

2.2 动物实验

2.2.1 SOD1 基因敲除小鼠实验 一项 Sod1(-/-)小鼠的研究指出了氧化应激与干眼之间的关系。该研究显示在 Sod1(-/-)小鼠与野生型小鼠相比泪腺和睑板腺(meibomian gland, MG)中存在组织病理学、功能性和炎性年龄依赖性变化。首先自由基生成和清除抗氧化系统之间的不平衡导致了氧化应激, 这与许多年龄相关疾病中观察到的细胞损伤情况一致。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)家族是一种主要的抗氧化系统, Cu、Zn 超氧化物歧化酶 1(SOD1)在小鼠体内的缺乏导致了类似于加速老化的表型。在这项研究中, 我们检查了 Sod1(-/-)小鼠泪腺的形态特征和分泌功能。泪腺的光镜检查显示腺泡单位萎缩、纤维化, CD4(+)T 细胞、单核细胞和中性粒细胞浸润; 电子显微镜检查结果揭示了上皮-间质细胞化生, 肿胀和退化线粒体, 并且在衰老的 Sod1(-/-)小鼠的泪腺中存在凋亡细胞^[7]。另外还观察到了睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)^[13], MGD 是加剧干眼的主要原因, 造成腺体减少导致泪膜脂质减少, 泪液水分蒸发增加, 泪膜渗透压增加进而形成眼表面的变化, 如泪膜不稳定和睑缘炎^[14]。

2.2.2 转基因小鼠模型实验 氧化损伤和炎症被认为与外分泌腺的年龄相关功能衰退有关。然而, 氧化应激如何影响外分泌腺分泌功能的分子机制尚不清楚。在一种新型 mev-1 条件转基因小鼠模型(Tet-mev-1)中, 发现泪腺线粒体氧化损伤导致泪腺功能障碍, 泪液生成减少, ROS 生成增加, 进而导致干眼的发生。mev-1 基因编码 Cyt-1 是线粒体复合物 II 中琥珀酸-泛醌氧化还原酶的细胞色素

b 560 大亚基, 与人体中的琥珀酸脱氢酶 C 亚基(SDHC)同源。该 mev-1 基因诱导过度氧化应激, 与眼表上皮损伤、泪液蛋白和泪液分泌功能下降有关。Tet-mev-1 小鼠泪液量低于野生型小鼠, 组织病理学分析显示泪腺炎症主要表现为泪腺单个核白细胞浸润和泪腺纤维化。这些发现表明, 氧化应激可能是干眼发展的致病因素^[15]。

2.2.3 糖尿病干眼小鼠模型实验 涉及糖尿病诱导干眼的小鼠研究也支持氧化应激与干眼之间的联系。SIRT1 是一个与延长寿命, DNA 损伤, 代谢应激, 炎症和癌症相关的关键调节因子^[16], 并且与 ROS 生成有关, 是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)的脱乙酰基酶^[17]。而 ROS 的释放和氧化应激的产生被认为是糖尿病发病机制的关键因素^[18], 实验表明糖尿病的诱导产生与 SIRT1 和另一种抗氧化剂 SOD 的表达增加有关, 这个过程会持续 4wk, 并在随后 8wk 内表达降低^[19]。实验将干眼组中的每只小鼠每天 3 次注射氢溴酸东莨菪碱, 并结合低湿度环境以建立干眼模型, 结果显示泪液生成明显减少, 角膜荧光素染色增加, 且与抗氧化功能的时间变化有关。随着疾病的进展, 所有实验组均显示 HE 染色明显的病理改变^[19]。这些实验结果有力地说明了干眼确实与氧化改变有关。

2.2.4 限制大鼠饮食模型实验及其他实验 泪腺分泌功能的降低与衰老密切相关, 并导致干眼的患病率增加。由于热量限制(calorie restriction, CR)被认为可以防止由于衰老引起的各种器官的功能衰退, 故限制大鼠热量摄入可作为抗氧化应激的一种干预。限制热量饮食 6mo 后, 在有意识状态下大鼠检查泪液功能, 结果发现实验组大鼠泪腺功能优于非限热量对照组。用卡巴胆碱进行泪液蛋白分泌刺激实验, 并用 8-羟基-2 脱氧鸟苷(8-hydroxyl-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)和 4-羟基壬烯醛(hydroxynonenal, HNE)评估氧化应激。与对照组相比, 实验组泪液体积明显改善并且在卡巴胆碱刺激后泪液蛋白分泌量增加, 腺泡单位密度显著提高, 表现出较小程度的间质纤维化, 且泪腺中 8-OHdG 的浓度和 HNE 染色的程度降低^[20]。这些结果证明了 CR 可以减轻泪腺中与氧化应激相关的损伤。在另一种大鼠模型中, 将大鼠连续暴露于低湿度气流中 30d, 氧化应激标记物(8-OHdG, HNE)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的免疫反应增强, 荧光素染色增加, 这是干眼的临床特征^[21]。在衰老大鼠中, 有证据表明泪腺分泌泪液所需的关键转运蛋白的改变会导致干眼: rab3d mRNA 和 rab27b mRNA 的表达和 rab3d 蛋白的表达降低, 而突触融合蛋白水平增加^[22]。

3 干眼与氧化应激的介入实验研究

3.1 减少 ROS 的物质 研究表明, 某些物质能够降低 ROS 水平。在过氧化氢诱导氧化应激下培养的角膜上皮细胞中, 用乳铁蛋白和黄原胶培育可以保护细胞免受 ROS 的有害影响^[23-24], 黄原胶还能降低细胞内 ROS 水平^[24]。另外在活细胞中, 某些抗氧化酶的水平可能在对 ROS 威胁的直接反应中受到严格调控。在蓝莓提取物中所发现的左旋肉碱和紫檀芪, 均能降低氧化损伤生物标志物和炎症介质的水平, 同时降低抗氧化酶的水平^[25-26]。

3.2 减轻氧化应激损伤的物质 对小鼠和大鼠疾病模型的临床前干预研究表明氧化应激造成的损伤可以被有效降低。在一项用抗氧化药用植物提取物对干眼小鼠进行的研究中, 未经过给药的对照组小鼠泪腺组织中不仅存在

氧化损伤,而且有眼表炎症的证据:泪液白细胞介素(IL-1b、IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、干扰素(IFN- γ)及其相关趋化因子、CD4 c-x-c 趋化因子受体(Cr3t)细胞均有升高。其临床特点包括泪液产生及泪膜破裂时间(breakup time of tear, BUT)的减少,角膜荧光素染色增加,产生粘液的杯状细胞密度降低。这些特征在实验组通过治疗均得到了改善^[27]。另外,干眼在绝经后妇女中很普遍,因为更年期期间激素水平的变化会影响睑板腺功能,导致蒸发性干眼和泪液不稳定,高渗性和促红细胞生成素的产生。在绝经后干眼大鼠模型中,治疗组大鼠用 α -硫辛酸(α -lipoic acid, ALP)给药,结果发现泪道功能恢复, Schirmer 试验改善。 α -硫辛酸是一种内源性合成的线粒体酶复合物的辅助因子,其生物学效应包括 ROS 的吸收、促进如维生素 C 和维生素 E 等其他抗氧化剂的相互作用和再生,以及氧化还原过程的调节。 α -硫辛酸改变了活性氮物质的代谢,导致泪腺过氧化物酶活性增加和泪液生成改善^[28]。这些研究表明有许多物质能够减少氧化应激的损害,改善干眼状。

4 总结与展望

通过实验室研究证实,氧化应激因素与干眼具有密不可分的关系。眼表氧化应激的研究尚处于起步阶段,极有可能将实验研究成果应用于临床。氧化应激为干眼的治疗提供了新依据,未来研究的潜在领域包括眼部抗氧化治疗的途径。今后几年,对眼表面氧化应激的研究可能会产生越来越大的影响。因此,眼科从业者应该意识到氧化应激在干眼中的作用。

参考文献

- 1 Shao Y. Interpretation of TFOS DEWS II. *Rec Adv Ophthalmol* 2018; 38(1):1-12
- 2 De Paiva CS. Effects of Aging in Dry Eye. *Int Ophthalmol Clin* 2017;57(2):47-64
- 3 Pflugfelder SC, de Paiva CS. The Pathophysiology of Dry Eye Disease. *Ophthalmology* 2017;124(11):S4-S13
- 4 Farrand KF, Fridman M, Stillman IÖ, et al. Prevalence of Diagnosed Dry Eye Disease in the United States Among Adults Aged 18 Years and Older. *Am J Ophthalmol* 2017;182:90-98
- 5 Pinazo - duran M, Gallego - Pinazo R, García - Medina JJ, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Int Aging* 2014;9: 637-652
- 6 Kruk J, Kubasik -Kladna KY, Aboul -Enein H. The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Currnt Status and a Dual Role of Physical Activity. *Mini-Rev Med Chem* 2015;16(3):241-257
- 7 Kojima T, Wakamatsu TH, Dogru M, et al. Age-Related Dysfunction of the Lacrimal Gland and Oxidative Stress. *Am J Pathol* 2012;180(5): 1879-1896
- 8 Gancharova OS, Manskikh VN. Age-related changes in the rat lacrimal gland; Impressive morphology and enigmatic nature. *Russ J Dev Biol* 2014 ;45(5):235-242
- 9 Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 2000;35(3):299-305

- 10 Baudouin C. The Pathology of Dry Eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45(2):S211-S220
- 11 The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92
- 12 Deng R, Hua X, Li J, et al. Oxidative Stress Markers Induced by Hyperosmolarity in Primary Human Corneal Epithelial Cells. *PLoS ONE* 2015;10(5):e0126561
- 13 Ibrahim OMA, Dogru M, Matsumoto Y, et al. Oxidative Stress Induced Age Dependent Meibomian Gland Dysfunction in Cu, Zn - Superoxide Dismutase - 1 (Sod1) Knockout Mice. *PLoS One* 2014 ;9(7):e99328
- 14 Jester JV, Parfitt GJ, Brown DJ. Meibomian gland dysfunction: hyperkeratinization or atrophy? *BMC Ophthalmol* 2015;15(S1):156
- 15 Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, et al. Oxidative Stress Induced Inflammation Initiates Functional Decline of Tear Production. *PLoS One* 2012;7(10):e45805
- 16 Yang H, Bi Y, Xue L, et al. Multifaceted Modulation of SIRT1 in Cancer and Inflammation. Critical Reviews in Oncogenesis. *Begell House* 2015;20(1-2):49-64
- 17 Ou X, Lee MR, Huang X, et al. SIRT1 Positively Regulates Autophagy and Mitochondria Function in Embryonic Stem Cells Under Oxidative Stress. *Stem Cells* 2014;32(5):1183-1194
- 18 Maiese K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Hindawi Limited* 2015;2015:1-17
- 19 Liu H, Sheng M, Liu Y, et al. Expression of SIRT1 and oxidative stress in diabetic dry eye. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(6): 7644-7653
- 20 Amico C, Tornetta T, Scifo C, et al. Antioxidant effect of 0.2% xanthan gum in ocular surface corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 2015; 40(1): 72-76
- 21 Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, et al. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(4): 1552-1558
- 22 Batista TM, Tomiyoshi LM, Dias AC, et al. Age-dependent changes in rat lacrimal gland anti-oxidant and vesicular related protein expression profiles. *Mol Vis* 2012; 18(22-23): 194-202
- 23 Pastori V, Tavazzi S, Lecchi M, Lactoferrin-loaded contact lenses: eye protection against oxidative stress. *Cornea* 2015;34(6):693-697
- 24 Amico C, Tornetta T, Scifo C, et al. Antioxidant effect of 0.2% xanthan gum in ocular surface corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 2015; 40(1): 72-76
- 25 Hua X, Deng R, Li J, et al. Protective effects of L-carnitine against oxidative injury by hyperosmolarity in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(9): 5503-5511
- 26 Li J, Ruzhi D, Hua X, et al. Blueberry component pterostilbene protects corneal epithelial cells from inflammation via anti - oxidative pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 19408
- 27 Choi W, Lee JB, Cui L, et al. Therapeutic efficacy of topically applied antioxidant medicinal plant extracts in a mouse model of experimental dry eye. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1-10
- 28 Andrade AS, Salomon TB, Behling CS, et al. Alpha - lipoic acid restores tear production in an animal model of dry eye. *Exp Eye Res* 2014;120: 1-9