

糖尿病对血-视网膜屏障超微结构影响的研究进展

周 媛, 崔 浩, 刘洪涛, 张丽琼

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(No. D200949);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 11541219);黑龙江省卫生厅科研项目(No. 2007-222);哈尔滨市科技局资助项目(No. 2007RFQXS090)

作者单位:(150000)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院

作者简介:周媛,在读硕士研究生,研究方向:视网膜疾病。

通讯作者:张丽琼,医学博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼. zhanglq600@sina.com

收稿日期:2014-03-11 修回日期:2014-06-11

Research progress of diabetes on the ultrastructure of blood retina barrier

Yuan Zhou, Hao Cui, Hong - Tao Liu, Li - Qiong Zhang

Foundation items: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, China (No. D200949); Science and Technology Department Project of Education Department, Heilongjiang Province, China(No. 11541219);The Scientific Research Project of Health Department, Heilongjiang Province, China(No. 2007-222); Harbin Science and Technology Fund, China(No. 2007RFQXS090) The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Correspondence to:Li-Qiong Zhang. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. zhanglq600@sina.com

Received:2014-03-11 Accepted:2014-06-11

Abstract

• Diabetic retinopathy is a major cause of blindness all over the world, and it is one of the most serious and common microvascular complications of diabetes. Breakdown of the endothelial blood - retinal barrier (BRB), as occurs in diabetic retinopathy, result in vasogenic edema and neural tissue damage, causing loss of vision. The inner BRB is created by complex tight junctions of retinal capillary endothelial cells, this barrier prevents the free diffusion of substances between the circulating blood and the neural retina, the inner BRB efficiently supplies nutrients to the retina and removes endobiotics and xenobiotics from the retina to maintain a constant milieu in the neural retina. The central mechanism of altered inner BRB function is a change in the permeability characteristics of retinal endothelial cells caused by elevated levels of cytokines, growth factors, advanced glycation end products, inflammation, hyperglycemia and loss of pericytes. This article reviews the relationship between diabetes and the ultrastructure changes of BRB.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; inner blood - retinal

barrier; ultrastructure

Citation: Zhou Y, Cui H, Liu HT, *et al.* Research progress of diabetes on the ultrastructure of blood retina barrier. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(7):1220-1222

摘要

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是全世界最主要的致盲性眼病,也是最严重和最常见微血管病变之一。糖尿病可造成血-视网膜屏障的损害引起血管源性水肿和神经组织损伤,造成视力下降。内层血-视网膜屏障主要是由视网膜毛细血管内皮细胞的紧密连接构成,此屏障阻碍血液的渗透及内源性物质和外源性物质在视网膜中的自由扩散,使视网膜保持恒定的环境,有效的供应营养物质。糖尿病患者的视网膜中由于细胞因子、生长因子、晚期糖基化终产物、炎症、高血糖症和周细胞丢失的增加,导致视网膜血管内皮细胞通透性增加。本文就糖尿病所引起的血-视网膜屏障超微结构改变进行综述。

关键词:糖尿病;血-视网膜内屏障;超微结构

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.07.11

引用:周媛,崔浩,刘洪涛,等. 糖尿病对血-视网膜屏障超微结构影响的研究进展. 国际眼科杂志 2014;14(7):1220-1222

0 引言

糖尿病是由于胰岛素分泌功能不足或胰岛素作用失调而引起全身代谢性疾病。目前,已成为一种常见病、多发病,在中老年人中常见。糖尿病会引起全身性损害,表现为心、脑血管病变;肾脏病变;神经性病变以及眼部病变。糖尿病患者由于长期高血糖,引起体内代谢紊乱及全身微循环障碍。眼底视网膜血管容易受损,即发生糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR),DR是糖尿病最严重和最常见微血管并发症之一,也是一种世界范围内主要的后天致盲性眼病。目前全世界DR患者约9300万,其中影响视力者约2800万。近年来,随着分子生物学的发展,分子基础研究已成为目前DR发病机制研究的焦点和热点,本文就DR主要的诱发因素及超微结构改变的关系进行综述。

1 糖尿病引起血-视网膜屏障改变的主要诱发因素

1.1 高血糖 高血糖是糖尿病患者微血管并发症的主要原因。目前提出多种相关假说,多元醇途径的增加,晚期糖基化终末产物增多,增加己糖胺途径,蛋白激酶C亚型的激活,及氧化应激增强等^[1]。此外,多种生长因子,包括:血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor, VEGF-A),转化生长因子-β(transforming growth factor, TGF-β),肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF),血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),血管形成素-2(angiotensin, Ang-2),促纤维结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,

CTGF)因体内糖尿病微环境的诱导表达增加,对糖尿病的进展至关重要^[2]。

高血糖的另一个效果是,血浆蛋白和细胞内分子发生非酶糖基化反应,导致形成稳定的晚期糖基化终产物(advanced glycation endproducts, AGEs),AGEs可以改变胞内区的跨膜蛋白,如整合素与整合素受体的作用。在红细胞中的糖化血红蛋白增加会导致氧的运输量降低,需增加局部血流量来补偿^[3]。视网膜甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)的暴露,高级糖基化终末产物前体的表达,导致血-视网膜屏障通透性增加,通过观察白蛋白的通透性和紧密连接蛋白的降解增加,据推测该蛋白的降解主要是由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)介导的,通过观察患糖尿病两个星期的实验动物,可知基质金属蛋白酶的强烈表达诱导了甲基乙二醛的产生和暴露^[4]。基质金属蛋白酶在体外实验中可降解VE-钙粘蛋白,Bastimastat(一种强效的MMP抑制剂)防止视网膜血管的通透性增加和VE-钙粘蛋白的破坏,但这种药物还没有在DR患者中进行测试^[5]。

高血糖诱导的内皮细胞功能障碍也可能导致内皮细胞黏附蛋白表达上调,促进附件单核细胞和白细胞停滞,可能引起血管内皮细胞死亡^[6]。检测糖尿病患者以及高血糖水平的健康受试者的内皮祖细胞数量均减少,内皮祖细胞对受损血管的修复非常重要^[7]。

1.2 缺氧和缺血及氧化应激 缺氧条件下可导致无细胞血管生成增多,使视网膜无灌注区形成增加,是非增生性糖尿病性视网膜病变(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR)的表现之一。视网膜局部的血流动力学异常及纤溶系统的异常,内皮损伤、血小板聚集、局部凝血,血栓形成,使视网膜毛细血管缺血,被动扩张,引起毛细血管正常结构破坏,缺血使促血管生成的物质生成增加,促进微动脉瘤及新生血管形成,引起增生性糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)的发生。高糖引起线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过多,当ROS产生和细胞利用氧失去平衡时就产生了氧化应激^[8]。现已明确:糖尿病与线粒体活性氧过度产生和抗氧化酶减少有关。正常生理状态下视网膜的需氧量全天在变化,因为适应暗适应的视杆细胞比其他细胞更需要氧气^[9]。

缺血是血管源性水肿和新生血管生成的前提,在动物实验表明,缺血性视网膜条件下氧分压很低^[9]。缺氧诱导因子-1(Hypoxia-inducible factor, HIF-1)在缺血缺氧氧化应激里很可能扮演一个角色。HIF-1在细胞氧化代谢中起关键作用,激活特定靶基因的转录,介导了许多自产氧途径,使细胞得以在低氧环境下存活^[10]。这些靶基因包括血管内皮生长因子(VEGF),促红细胞生成素-1(Erythropoietin, EPO-1),葡萄糖转运蛋白1(Glucose transporter, GLUT1),碳酸酐酶IX(Carbonic anhydrase, CAIX),以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。

此外,HIF的激活诱导由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, iNOS)的神经胶质细胞的产生。最近的一项研究显示,尽管HIF-1可预防屏障破坏,但并不能阻止视网膜水肿的形成和神经元损伤^[11]。相关研究表明,在正常生理条件下视网膜中也存在着HIF-1a亚型^[12],HIF-1a下游效应基因的表达调节着正常视网膜神经元细胞的活性。但HIF-1的作用机制并不明确,应谨慎考虑HIF-1作为

眼部疾病如DR和老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的治疗靶标^[13]。

1.3 炎症和炎症介质 有越来越多的证据表明,糖尿病可引起全身性炎症反应,在眼部可表现大量炎症因子聚集在玻璃体和房水中,由此可推测DR的发病机制及病程进展中炎症因子具有重要意义^[14]。炎症是视力受损的主要原因,增加了血管通透性及新生血管的形成。

大量研究已经证实,在DR中炎症介质作为炎症反应的引发剂。这些介质中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),这是已知的炎症反应的引发剂,它是一种促炎性细胞因子。几项研究调查NPDR及PDR患者的玻璃体、视网膜及血清中,IL-1 β ,IL-6,IL-8,SIL-2R,TNF- α 含量较正常对照组高,且含量水平与DR的严重程度相关^[15],随着炎症反应的加重而逐渐升高^[16]。在以前的报告中,IL-1 β 被证明诱导白细胞募集滞留,导致血管闭塞,血流减少甚至消失,血管通透性增加,并改变内皮细胞形态学。趋化因子如趋化因子配体-2(CCL2),CCL5,CXCL8,CXCL10,CXCL12在糖尿病患者玻璃体样本中含量上调。给予类固醇细胞培养模型中可增强血-视网膜屏障的屏障功能^[17]。

全身应用TNF- α 的抑制可能有严重的副作用,这说明局部治疗可能是一个更好的方法。研究发现TNF- α 的血清水平与糖化血红蛋白及VEGF的水平具有相关性^[18]。炎症介质中通过对细胞间黏附分子-1(Intercellular adhesion molecule, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)及白细胞的活化可使白细胞附着在血管上皮引起炎症细胞因子、生长因子和血管通透性因子的释放,从而改变内皮细胞连接蛋白,允许白细胞血细胞渗透到视网膜外^[19]。类固醇类可有效抑制炎症细胞及炎症因子的扩散^[20]。

2 血-视网膜屏障破坏的机制

2.1 细胞旁通路及跨细胞通路的增加 血-视网膜屏障内皮细胞间有两种转运途径:细胞内途径和细胞旁途径,血-视网膜屏障通透性改变时主要为细胞旁通路的改变。血-视网膜内屏障主要由血管内皮细胞间的紧密连接构成,参与形成紧密连接(tight junctions, TJs)复合体的蛋白包括多种蛋白如跨膜蛋白Claudin, Occludin,膜相关蛋白如ZO-1,ZO-2,ZO-3和TJs黏附因子等^[21]。

细胞旁途径通过紧密连接、粘着连接和缝隙连接调节。在模型中,在注射VEGF后mRNA水平下调,观察到claudin-5的水平显著降低,注射24h后恢复到基础水平,表明瞬态效应^[22]。实验观察当培养中的牛视网膜微血管内皮细胞受到VEGF的刺激,可观察到Claudin-5的一过性下调,以及Occludin和其他紧密连接蛋白基因表达异常^[23]。实验中,氢化可的松,地塞米松可以加强Claudin-5的和Occludin蛋白表达,增强视网膜微血管内皮细胞屏障的完整性^[24]。大量临床试验证实:糖皮质激素可降低糖尿病黄斑水肿。在模型中观察,BRB的通透性与VEGF诱导的跨细胞膜转运有关。两项研究报告表明,在糖尿病大鼠模型中视网膜血管通道蛋白类型发生改变,正常大鼠视网膜血管水通道蛋白为AQP-4,而在糖尿病视网膜病变模型中为AQP-1^[25]。AQP-1导致视网膜病变加重,包括增强视网膜血管通透性,增加视网膜厚度和促炎性细胞因子,VEGF和纤维酸性蛋白(GFAP)升高^[26]。

2.2 内皮细胞及周细胞的损伤与凋亡 视网膜血管内皮细胞损伤是微血管瘤形成的前提,也是血-视网膜内屏障

功能障碍的直接原因^[27]。长期的缺氧条件下氧化应激可使内皮细胞衰老甚至凋亡。在观察 DR 临床前期视网膜血管细胞时,可见 TGF- β 与视网膜血管内皮细胞及周细胞上 TGF- β 受体大量结合引起毛细血管基底膜增,继而引起管腔狭窄和血流改变,促使 DR 后期发生视网膜缺血、缺氧和新生血管形成。当周细胞受损时,可导致 VEGF-A, Ang-2 表达上调,使 Ang-1 表达下调^[28]。血管形成素-1 (Ang-1) 和血管形成素-2 (Ang-2) 对于视网膜血管内皮细胞屏障的作用不同。在大鼠玻璃体腔内注射 Ang-2 可以使视网膜血管渗透性增加,当培养人视网膜血管内皮细胞暴露于 Ang-2 作用下,可诱导 VE-钙黏连蛋白磷酸化形成内皮细胞间间隙^[29],对于视网膜起到破坏血管内皮细胞的屏障作用。目前认为,视网膜毛细血管主要由血管内皮细胞及周细胞组成,周细胞可调节视网膜毛细血管局部血流量及血管通透性,起支持血管内皮细胞的作用。高糖状态下,周细胞收缩功能受抑制,同时毛细血管血流量也受到影响。VEGF-A, Ang-2 的和 PLVAP 表达上调,使 Ang-1 表达下调可引起周细胞缺乏。

2.3 神经胶质细胞的损伤 DR 与神经胶质细胞功能异常有关,当视网膜神经功能障碍时,伴随视网膜神经元细胞肿胀和破裂。在病理条件下,神经胶质细胞激活并过度表达血管生成因子,如血管内皮因子,碱性成纤维细胞生长因子,肿瘤坏死因子和基质金属蛋白酶等是 DR 发生发展的重要原因之一^[30]。

3 结语

全球糖尿病患病率、发病率和死亡率逐年增高。DR 成为人群致盲和视力下降的首要因素之一。本文概述了 DR 的病理生理学特点,详细探讨 DR 的发生和发展。目前常见的综合治疗,例如综合使用激素和抗 VEGF 药物,对于激光治疗无效的患者使用贝伐单抗已经表现出良好的治疗效果。更多的综合疗法的临床试验正在进行中,随着科技的发展,新的治疗方法和治疗途径有可能取代目前的基本治疗,如视网膜干细胞的研究等,但仍需要进一步探索。取得更好的治疗效果降低费用,提高糖尿病人群的生活质量。

参考文献

- 1 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications; A unifying mechanism. *Diabetes* 2005;5(6):1614-1625
- 2 Van Geest RJ, Klaassen I, Vogels IM, et al. Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells; a role in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(4):1857-1865
- 3 Glenn JV, Stitt AW. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(10):1109-1116
- 4 Kim J, Kim CS, Lee YM, et al. Methylglyoxal induces hyperpermeability of the blood-retinal barrier via the loss of tight junction proteins and the activation of matrix metalloproteinases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(5):691-697
- 5 Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, et al. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007;56(9):2380-2387
- 6 Rahman S, Rahman T, Ismail AA, et al. Diabetes - associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(6):767-780
- 7 Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, et al. Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord* 2010;10:5
- 8 Wang Q, Pfister F, Dorn-Beineke A, et al. Low-dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *Diabetologia* 2010;53(6):1227-1238

- 9 Arden GB, Sidman RL, Arap W, et al. Spare the rod and spoil the eye. *Br J Ophthalmol* 2005;89(6):764-769
- 10 Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007;80:51-60
- 11 Yan J, Zhou B, Taheri S, et al. Differential effects of HIF-1 inhibition by YC-1 on the overall outcome and blood-brain barrier damage in a rat model of ischemic stroke. *PLoS One* 2011;6(11):e27798
- 12 Hughes JM, Groot AJ, vander Groep P, et al. Active HIF-1 in the normal human retina. *J Histochem Cytochem* 2010;58(3):247-254
- 13 Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability. *High Alt Med Biol* 2012;13:153-161
- 14 Rangasamy S, McGuire PG, Das A. Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2012;19(1):52-59
- 15 Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, et al. Increases of vitreous monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 levels in patients with concurrent hypertension and diabetic retinopathy. *Retina* 2011;31(9):1951-1957
- 16 Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* 2010;30(2):339-344
- 17 Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res* 2012;96:181-190
- 18 Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med (Plovdiv)* 2011;53(2):44-50
- 19 Zhang W, Liu H, Rojas M, et al. Anti-inflammatory therapy for diabetic retinopathy. *Immunotherapy* 2011;3(5):609-628
- 20 McAllister IL, Vijayasekaran S, Chen SD, et al. Effect of triamcinolone acetonide on vascular endothelial growth factor and occludin levels in branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 2009;147(5):838-846
- 21 Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions - ahistorical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(3):a003061
- 22 Fromow-Guerra J, Quiroz-Mercado H, Wu L, et al. Primary intra-vitreous Bevacizumab (Avastin) for diabetic macular edema - results from the pan-American Collaborative Retina Study Group at 6-month follow-up. *Ophthalmology* 2007;114(4):743-750
- 23 Klaassen I, Hughes JM, Vogels IM, et al. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp Eye Res* 2009;89:4-5
- 24 Felinski EA, Cox AE, Phillips BE, et al. Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element. *Exp Eye Res* 2008;86:867-878
- 25 Fukuda M, Nakanishi Y, Fuse M, et al. Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res* 2010;90:17-25
- 26 Cui B, Sun JH, Xiang FF, et al. Aquaporin 4 knockdown exacerbates streptozotocin-induced diabetic retinopathy through aggravating inflammatory response. *Exp Eye Res* 2012;98:37-43
- 27 Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res* 2013;34:19-48
- 28 Armulik A, Genove G, Mae M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010;468(7323):557-561
- 29 Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, et al. A potential role for angiotensin II in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3784-3791
- 30 Shen W, Li S, Chung SH, et al. Retinal vascular changes after glial disruption in rats. *J Neurosci Res* 2010;88(7):1485-1499