

摘 要

背景:

原发性开角型青光眼（primary open-angle glaucoma, POAG）是一类隐匿性的以视神经节细胞进行性退化和视野丢失为特征的视神经病变。我国 40 岁以上人群 POAG 的患病率为 0.7%~2.6%，其中约 10%发展为双眼致盲，严重影响生活质量，增加家庭及社会负担^[1]。该病发生和发展的主要危险因素是升高的眼内压（intraocular pressure, IOP）^[2]，IOP 主要由房水产生和排出的平衡决定，对于维持眼睛的稳态和形状至关重要。

房水主要通过睫状体的睫状突上皮产生后到达后房，通过瞳孔进入前房。在人类中，约 80%的房水由前房角经小梁网进入 Schlemm 管，少部分房水通过葡萄膜巩膜途径引流^[3]。房水流出的主要阻力位于小梁网的邻管区（juxtacanalicular tissue, JCT）区和 Schlemm 管的内皮层，是由胶原纤维、蛋白聚糖、纤连蛋白（fibronectin, FN）等细胞外基质成分（extracellular matrix, ECM）组成的复杂网络^[4-6]。在生理情况下，眼睛局部保持一个相对稳定的环境，IOP 在正常范围内波动。在青光眼患者中，小梁网细胞的行为被改变，ECM 发生重塑导致房水流出阻力增加和升高 IOP。因此，抑制这些区域的细胞外基质的重塑，恢复细胞外基质稳态是防止青光眼疾病进展的一个重要方法。

肾素血管紧张素系统（renin-angiotensin system, RAS）不仅参与调节血压、维持体液电解质平衡，而且在心脏^[7]、肝脏^[8]、眼部^[9]等器官的 ECM 重塑方面也发挥着重要作用。目前，已在眼部组织鉴定出多种 RAS 系统成分的表达，包括肾素、血管紧张素转化酶（angiotensin converting enzyme, ACE）、血管紧张素 II（angiotensin II, Ang II）^[10-12]。其中，Ang II 是一种八肽激素，是 RAS 系统中的主要效应因子，可引起 ECM 重塑、血管收缩、纤维化、炎症、活性氧产生和离子通道功能障碍等。目前，研究表明 Ang II 水平在青光眼患者房水中升高^[13]，可能与青光眼的发病机制密切相关，但关于 Ang II 在青光眼发病过程中的作用及具体分子机制尚不清楚，还需要进一步的研究。

目的:

分析 Ang II 在 POAG 和白内障（对照组）患者房水中的浓度差异及其与眼压的关

系，探讨 Ang II 对小梁网细胞纤维化的影响及其机制，为 RAS 系统在眼睛局部的病理意义提供实验证据，为 POAG 的发病机制提供新的理论支持，为新的治疗方法提供潜在靶点。

方法：

1、(1) 使用 Western blot 方法检测患者的房水、小梁网、巩膜和角膜细胞中的血管紧张素原 (angiotensinogen, AGT) 蛋白表达情况；(2) 收集 POAG 和白内障患者的房水，使用人 Ang II ELISA 试剂盒检测房水中 Ang II 的浓度，非接触电子眼压计测量眼压，统计分析眼压与 Ang II 浓度的关系；

2、原代与转化 HTMCs 的培养与鉴定：

使用人眼小梁网组织块贴壁培养法进行原代培养；含或不含有 400nM 地塞米松的培养液处理体外培养的 HTMCs，免疫荧光染色检测肌纤蛋白 (myocilin, MYOC) 的表达进行鉴定。

3、培养的原代 HTMCs 和转化细胞系，分别进行下列实验：

3.1 观察 Ang II 对小梁网 ECM 纤维化指标的影响。方法：实验分为 2 组，空白对照组、10 μ M Ang II 组，分别处理转化和原代的 HTMCs 48h 后，采用 Western blot 和免疫荧光技术检测 ECM 纤维化指标：胶原蛋白 1 (collagen 1, Col1)、FN、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的蛋白表达水平，qPCR 方法检测 Col1、FN、 α -SMA mRNA 表达情况，并进行统计分析。

3.2 观察 Ang II 对 HTMCs 中 ROS 水平和 NOX 家族蛋白表达水平的影响。方法：实验分为 2 组，空白对照组、10 μ M Ang II，分别处理转化和原代的 HTMCs 48h 后，使用 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 的水平，qPCR 方法检测两组 HTMCs NOX1-5 mRNA 的表达水平，Western blot 检测 NOX4 蛋白水平的变化；

3.3 敲低 NOX4 对 Ang II 诱导 ROS 和 ECM 纤维化指标的影响。方法：HTMCs 随机分为 3 组：空白对照组、Ang II、AngII+NOX4i，作用 48h 后，使用 DCFH-DA 荧光探针检测的水平，Western blot、免疫荧光方法检测 NOX4、Col1、FN 和 α -SMA 的蛋白表达水平。

3.4 GLX351322, NAC 两种抗氧化剂对 Ang II 诱导的 ECM 纤维化指标的影响。方法：实验分为 4 组：空白对照组、Ang II、Ang II+ GLX351322 (NOX4 抑制剂，10 μ M)、Ang II+NAC (ROS 清除剂，40 μ M)，分别处理转化的 HTMCs，48h 后，使用

DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 的水平, Western blot、免疫荧光方法检测各组 Col1, FN 和 α -SMA 的蛋白表达水平, 并进行统计分析。

3.5 Ang II 对 Smad3 信号通路的影响。方法: (1) 实验分为 2 组: 空白对照、Ang II, Western blot 检测 Ang II 对 HTMCs 中 Smad3, p-Smad3 蛋白表达的影响; (2) 实验分为 3 组: 空白对照、Ang II、Ang II+GLX351322, Western blot 检测各组药物对 Smad3, p-Smad3 及 ECM 纤维化指标的影响; (3) 实验分为 3 组: 空白对照组、Ang II、Ang II+SIS3 (Smad3 抑制剂), Western blot 检测各组细胞中 Smad3、p-Smad3、Col 1、FN 和 α -SMA 蛋白表达差异。

4、动物实验:

4.1 观察 NOX4 抑制剂 GLX351322 对 Ang II 眼局部注射的小鼠眼压及眼前段小梁网组织中 Col1, FN 表达的影响。方法: 建立动物模型; 将小鼠分为对照 (0.9%生理盐水)、Ang II、Ang II+GLX351322 三组, 使用非接触式电子眼压计监测的小鼠眼压。4 周后, 免疫组织化学染色鉴定小梁网组织中 Col1, FN 的表达情况, 并对结果进行记录和统计分析。

4.2 观察 Smad3 抑制剂 SIS3 对 Ang II 眼局部注射的小鼠眼压及眼前段小梁网组织中 Col 1, FN 表达的影响。方法: 建立动物模型; 将小鼠分为对照 (0.9%生理盐水)、Ang II、Ang II+ SIS3 三组, 使用非接触式电子眼压计监测小鼠眼压的变化。4 周后, 免疫组织化学染色鉴定小梁网组织中 Col1, FN 的表达情况, 并对结果进行记录和统计分析。

结果:

1、(1) 患者的房水、小梁网细胞、巩膜细胞和角膜细胞均可表达 AGT。(2) 白内障组 (28 例) 与 POAG 组 (20 例) 患者房水中 Ang II 浓度分别为 (27.67 ± 50.63) , (44.35 ± 60.77) pg/ml, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 POAG 患者中, 房水中的 Ang II 浓度与眼压呈正相关 ($R = 0.422$, $P < 0.05$);

2、DEX 干预后, 体外培养的转化小梁网细胞系及原代 HTMCs 中 MYOC 表达上调 ($P < 0.05$), HTMCs 体外培养成功。

3、Ang II 干预后, 小梁网中 ECM 纤维化指标 Col 1、FN、 α -SMA mRNA 和蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。

4、与空白对照组相比, Ang II 干预后 HTMCs ROS 水平显著增加; NOX1-5 中

NOX4 mRNA 的表达明显增加 ($P<0.05$);

5、与单独加入 Ang II 相比, 激光共聚焦显微镜观察到 Ang II+NOX4i 组 ROS 水平显著降低 ($P<0.05$), Western blot、免疫荧光检测到敲低 NOX4 可显著抑制 Ang II 诱导 ECM 纤维化指标 NOX4、Col 1、FN、 α -SMA 的蛋白表达 ($P<0.05$)。

6、与 Ang II 组相比, Ang II+GLX351322、Ang II+ NAC 组细胞中的 ROS 水平和 ECM 纤维化指标 Col 1、FN 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);

7、与对照组相比, Ang II 导致 HTMCs 中 Smad3 的磷酸化水平显著增加 ($P<0.05$), Western Blot 结果显示 GLX351322 或 SIS3 可显著抑制 Ang II 诱导的 p-Smad3、Col 1、FN、 α -SMA 表达上调 ($P<0.05$), Smad3 总蛋白含量基本不变 ($P>0.05$)。

8、对照组小鼠眼压波动在 10~15mmHg, 生理盐水、Ang II、Ang II+GLX351322 干预 4 周后, 三组的眼压分别为 (10.40 ± 1.075)、(19.40 ± 3.098)、(13.0 ± 1.633) mmHg, GLX351322 显著抑制 Ang II 诱导的眼压升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 通过免疫组织化学染色结果证明 GLX351322 抑制 Ang II 诱导的小梁网组织 Col 1、FN 的表达上调 ($P<0.05$)。

9、对照组小鼠眼压波动在 10~15mmHg, 生理盐水、Ang II、Ang II+ SIS3 干预 4 周后, 三组的眼压分别为 (10.80 ± 1.229)、(19.30 ± 2.359)、(13.40 ± 0.843) mmHg, SIS3 显著抑制 Ang II 诱导的眼压升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 通过免疫组化结果证明 SIS3 抑制 Ang II 诱导的小梁网组织 Col 1、FN 的表达上调 ($P<0.05$)。

结论:

1、POAG 患者房水中的 Ang II 较对照组显著升高, 且与眼压呈正相关。

2、Ang II 促进小梁网 ECM 的纤维化。

3、Ang II 通过上调 NOX4 介导氧化应激, 激活 Smad3, 促进小梁网 ECM 的纤维化。

关键词: 原发性开角型青光眼, Ang II, 氧化应激, Smad3, 细胞外基质, 纤维化

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	V
英文缩略词表.....	XIII
1 引 言	1
2 实验材料、试剂、设备	3
2.1 实验材料.....	3
2.2 实验试剂与仪器.....	3
2.2.1 主要试剂	3
2.2.2 常用试剂配制	5
2.2.3 主要实验仪器	6
3 实验方法.....	7
3.1 前房穿刺.....	7
3.2 ELISA 实验	7
3.3 细胞分离及培养.....	7
3.3.1 原代细胞分离 ^[29]	7
3.3.2 细胞复苏	8
3.3.3 细胞传代	8
3.3.4 细胞冻存	8
3.3.5 细胞转染	8
3.4 qPCR 法检测 mRNA 的表达水平.....	9
3.4.1 细胞总 RNA 的提取	9
3.4.2 反转录	9
3.4.3 qPCR 操作步骤.....	10
3.5 Western Blot 法检测蛋白表达情况	11
3.5.1 细胞蛋白的提取	11
3.5.2 按 BCA 法进行蛋白浓度的测定:	11
3.5.3 Western Blot	11

3.6 免疫荧光实验.....	12
3.7 ROS 检测.....	13
3.8 动物实验.....	13
3.8.1 动物模型制作与眼压测量	13
3.8.2 动物组织的获取	13
3.8.3 免疫组化染色	13
3.9 统计学分析.....	14
4 结果.....	15
4.1 POAG 患者房水中的 Ang II 浓度较对照组高, 且 Ang II 浓度与眼压成正相关.....	15
4.2 Ang II 促进体外培养的 HTMCs ECM 纤维化.....	16
4.3 Ang II 通过选择性上调 NOX4 引起 HTMCs 中 ROS 水平升高	19
4.4 敲低 NOX4 可逆转 Ang II 诱导的 ECM 纤维化.....	20
4.5 NOX4 抑制剂和 ROS 清除剂可逆转 Ang II 诱导的 ECM 纤维化.....	21
4.6 Ang II 通过激活 Smad3 诱导 ECM 纤维化指标的表达	24
4.7 抑制 NOX4 活性可逆转 Ang II 诱导的小鼠小梁网组织的纤维化表型并部分逆转 Ang II 诱导的小鼠眼压升高	25
4.8 抑制 Smad3 活性可逆转 Ang II 诱导的小鼠小梁网组织的纤维化指标表达并部分 逆转 Ang II 诱导的小鼠眼压升高	27
讨 论.....	31
结 论.....	33
参考文献.....	35
综 述.....	39
参考文献.....	43
致 谢.....	47
攻读学位期间发表的学术论文.....	49

英文缩略词表

英文缩写	英文全名	中文译名
ACE	angiotensin converting enzyme	血管紧张素转化酶
AGT	angiotensinogen	血管紧张素原
Ang I	angiotensin I	血管紧张素 I
Ang II	angiotensin II	血管紧张素 II
α -SMA	α -smooth muscle actin	α 平滑肌肌动蛋白
AT1R	angiotensin I receptor	血管紧张素 1 受体
AT4R	angiotensin IV receptor	血管紧张素IV受体
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
Col1	collagen 1	胶原蛋白 1
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶连免疫吸附实验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FN	fibronectin	纤连蛋白
HTMCs	human trabecular meshwork cells	人小梁网细胞
IOP	intraocular pressure	眼内压
JCT	juxtacanalicular tissue	汇管区
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
MYOC	myocilin	肌纤蛋白
NADPH/ NOX	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase	还原型烟酰胺腺嘌呤二核 苷酸磷酸氧化酶

PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
POAG	primary of open angle of glaucoma	原发性开角型青光眼
p-Smad3	smad3 phosphorylation	磷酸化 Smad3
PVDF	poly vinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	定量聚合酶链反应
RAS	renin-angiotensin system	肾素血管紧张素系统
RGC	retinal ganglion cell	视网膜神经节细胞
RIPA	radio immunoprecipitation assay lysis buffer	放射免疫沉淀法裂解缓冲液
ROS	reactive oxygen species	活性氧
SIS3	Smad3 inhibitor	Smad3 抑制剂
TBST	tris buffered saline tween	缓冲液
TGF- β 2	transforming growth factor- β 2	转化生长因子 2
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
μ M	μ mol/L	微摩尔每升
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	8-羟基脱氧鸟苷酸

1 引言

青光眼是全球范围内导致不可逆失明的最主要病因。全球 40-80 岁人群的青光眼患病率估计为 3.5%。随着人口的老龄化, 预计 2040 年将有 1.118 亿人患有青光眼^[14]。青光眼是指一组进行性视神经病变, 表现为特征性的视盘的凹陷和萎缩, 视神经节细胞的凋亡, 以及相应的视野缺损。根据房角的解剖结构, 主要分为闭角型青光眼和开角型青光眼两大类型。POAG 是最常见的类型之一, 发病初期往往不表现出任何症状。当视神经大部分损伤, 疾病进展到晚期时, 一些人会出现视力下降、视野丢失等症状。POAG 是一个多因素且复杂的眼部疾病, 发病机制尚不完全清楚, 主要风险因素包括高度近视、家族史、年龄增加、高 IOP 等^[15, 16], 目前尚无有效的方法逆转青光眼对视觉系统的损害, 但早期诊断和治疗可以防止疾病的进展。因此, 探究其发病机制具有重要的意义。

研究表明, 在人体内, IOP 升高和视野缺损与小梁网中的 DNA 氧化损伤程度呈正相关^[17]。生理情况下, 活性氧 (reactive oxygen Species, ROS) 是细胞信号传导和调节的重要参与者, 氧化与抗氧化防御系统处于动态平衡。但当细胞 ROS 产生过多或抗氧化能力减弱时, 就会造成氧化应激, 引起生物膜磷脂中多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应、细胞内蛋白及酶变性、DNA 氧化损伤。这种“氧化应激状态”被认为是许多神经退行性疾病的发病机制^[17, 18]。ROS 包括超氧阴离子、羟自由基和过氧化氢等, 可以由上皮细胞、中性粒细胞的正常代谢产生, 也可以由吸烟、辐射、粉尘等外源因素诱导产生, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH/NOX) 已被确定是慢性压力下小梁网中 ROS 生成的主要来源^[19]。ROS 可以直接攻击生物大分子 DNA, 诱发小梁网发生氧化损伤。8-羟基脱氧鸟苷酸 (8-OHdG) 是 DNA 氧化损伤的生物标记物^[20], Izzotti 等对比青光眼和对照组小梁网中的 8-OHdG 水平发现, 青光眼病人的 8-OHdG 水平显著高于对照组^[21]。小梁网是前房中氧化应激最敏感的组织^[22]。受到氧化应激的小梁网细胞会引起多种形式的损伤^[23-26], 包括线粒体呼吸活性降低、细胞生长停滞、膜通透性增加、细胞骨架结构重排、细胞外基质重塑、以及细胞凋亡和细胞死亡等, 这些最终都会导致青光眼患者视野缺损的发生。

血管紧张素原 (Angiotensinogen, AGT) 由肝脏产生, 为肾素作用的底物, 是一种球状糖蛋白, 由两条肽链组成。AGT 在肾素作用下, 氨基酸之间肽链断裂生成血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I), 除肾素外, ACE 及组织蛋白酶亦可将 AGT 转换为 Ang I, 即非肾素转换途径。ACE 是一种糖蛋白, 将 Ang I 降解为 Ang II。Ang II 主要通过这两种方式生成, 发挥促进 ECM 重塑、血管收缩、纤维化、炎症、活性氧产生和离子通道功能障碍等作用。与白内障患者相比, 房水中 Ang II 的浓度在青光眼患者中明显升高^[13]; 另外, 沈凤梅等人用不同浓度的 Ang II 作用于小梁网细胞 12-24 小时, 证实了其类生长因子样作用启动了细胞的增殖过程, 通过一系列作用机制, 使小梁细胞合成和分泌胶原作用增强, 导致 ECM 的异常堆积, 不利于房水的引流^[27]。Kufman 等认为 Ang II 可能引起小梁网收缩导致房角空间减小, 引流阻力增大。这反过来阻碍了轴浆运输, 导致视网膜神经节细胞凋亡, 这些结果为我们探索 Ang II 与小梁网细胞外基质之间的分子关系奠定了基础^[28]。

为了进一步研究 Ang II 在 POAG 疾病中的作用及相关机制, 我们初步检测了 12 例白内障患者的 AGT 蛋白含量, 并进一步比较分析了 AGT 在小梁网、巩膜、角膜细胞中的分布; 除此之外, 我们还对比分析了白内障和 POAG 患者房水中的 Ang II 浓度及其与眼压的关系。使用体外分离培养的原代 HTMCs 和购买的转化的 HTMCs, 采用 Western blot、免疫荧光和 qPCR 方法, 以空白对照、Ang II、Ang II 与 GLX351322 (NOX4 抑制剂), NAC (ROS 清除剂) 或 SIS3 (Smad3 抑制剂) 分别作用于 HTMCs, 观察这些药物对 HTMCs 纤维化相关指标 Col1、FN 和 α -SMA 的变化。在此基础上, 我们进行了两组体内实验, 在眼穹窿部间断注入 1 μ l 生理盐水、Ang II、Ang II 与 GLX351322 或 SIS3 的混合物, 观察这些药物对小鼠眼压及小梁网细胞外基质成分 Col1 和 FN 的影响。本研究不仅有助于加深对 POAG 发病机制的认识, 而且将为 POAG 的治疗提供新的理论依据和治疗靶点。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/246221101032011003>