

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.049

DNA 损伤与眼病相关性的研究进展*

刘玲华 刘正杨 李明 李伟军 付小玻 张晓梅

(哈尔滨医科大学附属第一医院眼科 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: DNA 损伤是复制过程中发生的 DNA 核苷酸序列永久性改变,并导致遗传特征改变的现象。对 DNA 损伤与修复的研究是现代分子生物学研究的热点之一。目前, DNA 损伤对眼组织细胞凋亡、基因改变、细胞活性的影响已成为眼科疾病研究的热点。在年龄相关性白内障、老年性黄斑病变等眼科疾病的病因研究中证实氧化应激是其致病因素,当机体遭受有害刺激导致氧化应激时,机体、组织、细胞受到一系列损伤,而 DNA 的损伤对氧化应激最为敏感。本文就 DNA 损伤及其与晶状体上皮细胞及视网膜色素上皮细胞相关性的研究进展作一综述,为眼科疾病的研究以及防治提供新的方法及思路。

关键词: DNA 损伤;修复;晶状体上皮细胞;视网膜色素上皮细胞

中图分类号: Q75;R77 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)11-2177-04

Research Progress in Eye Diseases Associated with DNA Damage*

LIU Ling-hua, LIU Zheng, YANG Ming, LI Wei-jun, FU Xiao-bo, ZHANG Xiao-mei

(Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: DNA damage is a permanent change which occur during replication of DNA nucleotide sequence and it can result in genetic characteristics changes. The study of DNA damage and repair is one of the hot topics in the study of modern molecular biology. Currently, DNA damage has become a ophthalmic diseases hot research in eye tissue cells apoptosis, genetically modified, cell activity. In senile cataract, age-related macular degeneration and other eye disease etiology study confirmed that oxidative stress is the main pathogenic factors. However, when the body is stimulated by harmful factors which cause the oxidative stress, the body, tissues and cells will be injured, And the DNA damage of oxidative stress are the most sensitive. In this paper, DNA damage and its correlation with lens epithelial cells and retinal pigment epithelial cells research progress are reviewed, In order to provide new method and thought for the research and prevention of eye disease.

Key words: DNA damage; Repair; Lens epithelial cells; Retinal pigment epithelial cells

Chinese Library Classification(CLC): Q75; R77 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2177-04

DNA 存储着各种生物体内赖以生存和繁衍的遗传信息,是生命活动中最重要的遗传物质,也是环境因素攻击的靶分子^[1]。外界环境和生物体内部的诸多因素均可以导致 DNA 分子的损伤或改变。DNA 损伤是指在各种化学或物理因素作用下而引起的 DNA 链断裂、分子基体修饰和交联等。如果这种损伤未得到及时修复,就会引起突变乃至癌变,因此, DNA 损伤是造成细胞突变、衰老和死亡的重要原因。DNA 损伤可因 DNA 代谢异常、化学试剂、电离辐射(如紫外线)和活性氧损伤等原因而产生^[2], DNA 损伤直接影响 DNA 的复制、转录及蛋白质的合成,进而影响细胞生长、发育、遗传、代谢和繁殖。DNA 损伤与许多人体疾病相关,可以引起眼病、糖尿病、老年病、肿瘤等疾病的发生^[3]。本文主要探讨其与晶状体上皮细胞及视网膜色素上皮细胞的关系,进一步研究 DNA 损伤与这两类眼科常见病的相关性。

1 DNA 损伤类型

生物体内 DNA 分子可以由于各种原因发生变化, DNA 损伤效应的大小和类型与细胞当时所处的周期状态有关。DNA 损伤可归纳为以下 4 种主要类型:(1) 碱基的异构互变, DNA 中的 4 种碱基各自的异构体间都可以自发地相互变化,包括嘧啶二聚体、碱基脱落和碱基烷基化。紫外线(UV)照射后 DNA 分子上的两个相邻的胞嘧啶(C)或胸腺嘧啶(T)之间可以共价键连结形成环丁酰环,这种环式结构称为二聚体。胸腺嘧啶二聚体的形成是 UV 对 DNA 分子的主要损伤方式。(2) 碱基变化及糖基破坏,主要是由 OH⁻ 自由基引起,包括 DNA 链上的碱基氧化修饰、过氧化物的形成、碱基环的破坏和脱落等,一般嘧啶比嘌呤更敏感。(3) 链断裂,包括 DNA 双链断裂(DSB)、单链断裂(SSB)。这是电离辐射引起的严重损伤事件,断链数随照射剂量而增加。(4) DNA 链交联,包括 DNA 链间交联、链内交联、DNA 蛋白质交联^[4]。DNA 与蛋白质之间或同一条 DNA 链上及两条 DNA 链上的碱基间都可以共价键结合,组蛋白、染色质中的非

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11531179)

作者简介:刘玲华(1961-),女,本科,副主任医师,主要研究方向:眼底病,E-mail:hydliulinghua@126.com

(收稿日期:2014-08-04 接受日期:2014-08-25)

组蛋白、调控蛋白都会与 DNA 共价键连接,这些交联是细胞受电离辐射后在显微镜下看到的染色体畸变的分子基础,会影响细胞的功能和 DNA 复制。

2 DNA 损伤检测方法

直接或间接检测 DNA 损伤的方法很多,以往常用的实验技术包括 SOS/umu 实验、姐妹染色体交换实验(SCE)和微核实验(MN)^[5]。SCE 实验和 MN 实验通常检测基因的有丝分裂期或者是无丝分裂间期,此时染色体的后期修复通常已经开始发生。近年来新发展的单细胞凝胶电泳(SCGE)技术,又称彗星实验,主要用于检测有核细胞 DNA 损伤的技术,可以在单个细胞水平上检验未修复 DNA 分子的单/双链损伤,是一种较敏感的 DNA 损伤检测手段,其原理为各种因素致细胞损伤后,其 DNA 的超螺旋结构就变得松散,将细胞包埋在琼脂糖凝胶中经裂解、解旋等一系列过程后,细胞内的 DNA、蛋白质及其他成分进入凝胶并扩散到裂解液中,但只有核 DNA 仍附着在剩余的核骨架上而保留在原位,在电泳时损伤的单链 DNA 片断便从细胞核中溢出,在电场中向阳极方向迁移泳动,而未损伤的 DNA 部分保持球形,荧光显微镜下二者形成了头尾分明的头部和尾部,酷似彗星的图像,因此又称为彗星实验^[6]。DNA 损伤越严重,DNA 断片越多,电泳时 DNA 迁移量就越大,距离会增长,镜下表现为彗星尾长增长,荧光强度增加,因此,通过测定迁移部分的光密度值和迁移长度即可定量测量单个细胞 DNA 的损伤程度。与以往检测技术相比,单细胞凝胶电泳技术更为敏感,操作相对简单,需要样本量少,具有快速、灵敏、简便、花费少等优点,避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足因此备受关注^[7]。

3 DNA 损伤修复

人体细胞在一生中必须尽可能少的产生 DNA 变异,因为各种 DNA 损伤不仅有可能影响干细胞的工作,甚至可以将它们置于死地。生物在进化过程中获得的 DNA 修复功能,对生物的生存和维持遗传的稳定性是至关重要的^[8]。细胞可以通过 DNA 修复来弥补基因损伤,DNA 损伤修复依赖于许多修复酶系统的协同作用,人的 DNA 修复功能很强,对有些 DNA 的损伤,细胞能将其完全修复到原样,但随着年龄的增长或各种 DNA 修复酶之间作用的不平衡,细胞中的 DNA 损伤修复功能逐渐减弱,不能及时清除突变细胞,同时突变细胞数也相应增加,所以老年人癌症的发病率也比较高。检测各年龄组正常人的染色体畸变率和 DNA 修复功能证实了这一点。DNA 修复功能先天缺陷的病人其免疫系统常是有缺陷的,所以,衰老、DNA 修复、免疫和肿瘤四者是紧密关联的。因为 DNA 修复在损伤后立即发生,在体内 DNA 损伤体现的可能只是未修复的一小部分,从而反映了不同个体 DNA 修复能力和细胞抗氧化损伤能力的差别。

DNA 损伤的修复方式有很多种,主要包括:(1)回复式修复:指在单一基因产物的催化作用下,经一步反应即可完成的

修复,主要包括光复合修复、单链断裂重接、烷化剂转移修复和嘌呤直接插入修复;(2)切除修复:指修复中将损伤部位切除,然后用正确配对的完好的碱基来代替,它是 DNA 损伤最为普遍的修复方式,包括识别、切除、修补和连接等基本过程。(3)容忍状态下的修复:指 DNA 分子的损伤不能立即被修复时,尤其在 DNA 复制已经开始,损伤又位于复制叉附近,细胞可以在完成复制后在性修复,包括重组修复和 SDS 修复。研究证明,DNA 损伤后的修复并不是同步进行的,对生命重要的基因先修复,再修复其次要基因,但对于较严重的 DNA 损伤,细胞可采取重组修复、SDS 修复等方式进行反应,以期提高细胞的存活率,但并不能完全消除 DNA 的损伤,极易发生错误修复,会带给细胞较高的突变率^[9]。

4 DNA 损伤与晶状体上皮细胞

年龄相关性白内障是世界上首位致盲因素,同时也是我国第一位的致盲眼病,它是由基因和环境因素共同作用而引起的复杂病症。既往研究表明,糖尿病、强光照射或紫外线暴露及营养不良等均是白内障发生的危险因素^[10]。近年来随着细胞分子生物学的蓬勃发展,对白内障发生机制的研究已经深入到基因、分子水平,蛋白质、脂类及 DNA 的内源性氧化损伤也被认为是白内障的重要病因学因素^[11]。因此,探讨 DNA 的损伤与修复已成为各学科研究的一个重要领域。

晶状体无血管分布,是眼球中含水量最丰富的组织,晶状体上皮细胞是晶状体代谢最活跃的部位,在晶状体中扮演着重要角色,赤道部的上皮细胞一生中不断生长和分化,为晶状体的生长、损伤及修复等提供营养物质和能量代谢,最终形成一个具有极性、透明性和屈光性的眼组织^[12]。近年来,普遍认为氧化损伤在白内障的形成过程中起重要作用,随着年龄的增长、紫外线照射、辐射、药物、全身代谢紊乱、过量烟酒及不合理的饮食等因素刺激,可以导致房水及晶状体中自由基含量的增加,在长期氧化应激的刺激下,晶状体细胞膜通透性发生改变,细胞内蛋白渗漏,房水成分发生变化,从而导致细胞内环境改变,氧化应激造成的 DNA 的损伤,使晶状体上皮细胞凋亡增加,进而引起晶状体所需营养物质缺乏,加重氧化损伤,从而造成晶状体的混浊。研究显示增加摄入抗氧化剂或补充多种维生素的老年人群,白内障形成的危险率减低^[13]。

研究证实,晶状体老化与自由基形成有关,细胞代谢过程和外部因子均可使细胞不断形成自由基,如羟自由基、超氧阴离子过氧自由基,这些自由基会导致 DNA 的损伤^[14]。研究表明晶状体上皮细胞可能是白内障发生的最初位置^[15],而 DNA 是晶状体上皮细胞受紫外线损伤最薄弱的靶子之一,晶状体上皮细胞的 DNA 损伤与白内障的发生密切相关,在培养的晶状体上皮细胞中,诱导细胞发生氧化应激和 DNA 损伤的标记明显增高^[16,17]。Kleiman 等^[17]发现在近 50%的白内障样本中,DNA 单链断裂的比例显著高于对照组。Sorte 等^[18]通过手术获得了 49 例老年性白内障患者的前囊膜标本,然后培养、提取晶状体上皮细胞,单细胞凝胶电泳测定技术检测白内障患者 DNA 损伤

的程度,结果发现:与对照组相比,白内障患者的核膜无明显损伤,而白内障患者 DNA 有明显的损伤,并且这种损伤集中在 DNA 的尾部,且在白内障患者组内,皮质型白内障患者 DNA 损伤程度远较核型、囊膜下型高。目前已知导致晶状体上皮细胞 DNA 损伤有很多因素^[19],其中包括年龄、氧化损伤、蛋白质糖基化、辐射损伤(可见光、紫外线和 X-射线等)、饮食、外伤和药物等。

Jose 1978 年曾提出:白内障是继发于晶状体上皮细胞 DNA 损伤后未修复或错误修复这一假说^[20]。秦虹等^[21]研究发现,在老年性白内障病人晶状体上皮细胞中,存在 DNA 单链断裂,支持 Jose 的假说,证实白内障的发生于晶状体上皮细胞 DNA 损伤有关。Grabner 等^[22]采用非程序 DNA 合成测定(unscheduled DNA synthesis, UDS),从蛙、大鼠及培养的人晶状体均证实有 DNA 的损伤与修复过程的存在。据估计人体内的 DNA 每天有 104 个碱基对发生损伤,可以想象, DNA 损伤与修复在晶状体上皮细胞中是一个始终存在的动态过程,因为 DNA 修复在损伤后立即发生,在体内 DNA 损伤体现的可能只是未修复的一小部分,反映了不同个体 DNA 修复能力和细胞抗氧化能力的差别^[21]。总之, DNA 损伤与年龄相关性白内障关系密切,但具体机制仍不甚明了,深入研究其相互关系对研究晶状体的损伤机制提供依据。

5 DNA 损伤与视网膜色素上皮细胞

视网膜色素上皮细胞(RPE)是位于视网膜神经上皮层和 Bruch's 膜之间的单层六角形细胞,作为一层色素上皮,正常的 RPE 细胞具有多种复杂的生理功能。RPE 吸收光能通过晶状体聚焦于视网膜,保证视锥、视杆细胞对光讯号的接收和传递,调控营养物质由脉络膜毛细血管向光感受器细胞的运送,同时消化、吞噬这些细胞脱落的外段膜盘以维持其恒定的轴长,是构成血-视网膜屏障的单层结构。一旦 RPE 细胞发生功能障碍,将会出现年龄相关性黄斑变性(AMD)、视网膜色素变性(RP)等一系列眼部病变。既往研究表明,RPE 吞噬、降解光感受器细胞外节能力下降而引起的脂褐质的集聚是引起 RPE 功能障碍的重要原因,脂褐质是一种脂质蛋白聚合物,其主要荧光团 A2E 是一种视黄醛衍生物的吡啶盐,A2E 主要对可见光中的蓝光光谱感光,可见光边缘的蓝光照射激活作用首先造成 DNA 的损伤,其主要机理为:一方面 A2E 分子吸收蓝光后,将能量传递给氧分子,然后转换成氧自由基,造成细胞损害;另一方面是激活的 A2E 分子经过一系列生化作用转化成 A2E 的衍生物,可以直接与上皮细胞反应导致细胞的损害和凋亡,Sparrow 等发现含有 A2E 分子的 RPE 细胞在蓝光照射后可以直接造成 DNA 损伤,且此损伤与光照持续时间成正比^[23,24]。因此, DNA 的损伤改变可以为评价氧化应激损伤程度提供良好的检测指标。

视网膜 DNA 对于光损伤十分敏感,在初期便可测到大量抗凋亡基因表达上调,以对抗氧化和凋亡^[25]。但如果辐射不能及时清除,c-fos 基因和 P53 促凋亡基因即开始表达,产生缺陷

DNA 并最终启动凋亡^[26]。本课题组在研究长效糖皮质激素曲安奈德(TA)对兔眼 RPE 细胞 DNA 的损伤作用时观察到,在 TA 浓度大于或等于 0.01g/L 时即可观察到明显的 DNA 损伤,且具有量效相关性^[27]。Wang 等^[28]和 Imam 等^[29]分别通过研究不同年龄段人眼和鼠眼视网膜色素上皮和脉络膜发现,随着年龄增长,人眼和鼠眼内视网膜色素上皮和脉络膜内 DNA 损伤加重, DNA 损伤修复能力下降,细胞凋亡增加,视网膜色素上皮和脉络膜细胞功能异常。并且很多学者推测视网膜色素上皮和脉络膜内的 DNA 损伤是引起年龄相关性黄斑变性的重要诱因之一^[30]。

6 问题与展望

DNA 的损伤和修复与遗传、突变、衰老、肿瘤发生、某些毒剂的作用以及遗传性疾病等有密切的关系^[31]。环境和生物体内的因素都经常会使 DNA 的结构发生改变。最后导致 DNA 的点突变、DNA 核苷酸的缺失、插入或转位、DNA 链的断裂等,结果可能影响生物细胞的功能和遗传特性^[32]。因此, DNA 损伤与角膜病、青光眼、白内障、视网膜病变等疾病的发生、发展均存在一定程度的相关性。研究 DNA 损伤与眼病的相关性关系也必将为相关眼病的发病、诊断及治疗带来新的思路。

参考文献(References)

- [1] Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227: 671-682
- [2] Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12: 620-636
- [3] Jiang J, Zhou J, Yao Y, et al. Copy number variations of DNA repair genes and the age-related cataract: Jiangsu Eye Study [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54: 932-938
- [4] Anderson D, Laubenthal J. Analysis of DNA Damage via Single-Cell Electrophoresis [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1054: 209-218
- [5] 朱文文, 王晓涛. DNA 损伤检测单细胞凝胶电泳技术的研究 [J]. *微量元素与健康研究*, 2007, 24: 6-7
Zhu Wen-wen, Wang Xiao-tao. Review on DNA damage assay using Single cell gel electrophoresis assay [J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2007, 24: 6-7
- [6] 赵倩, 段丽菊, 刘英帅. 彗星实验检测单细胞 DNA 损伤的方法 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2004, 15(5): 57-59
Zhao Qian, Duan Li-ju, Liu Ying-shuai. The method of detecting single cell DNA damage by the comet assay [J]. *Jof Pub Health and Prev Med*, 2004, 15(5): 57-59
- [7] 闫学昆, 陈英, 杜杰, 等. 彗星实验图像分析中彗星分割阈值的选择 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, 27(1): 15-19
Yan xue kun, Chen ying, Du jie, et al. Reasonable threshold value used to segment the individual comet from the comet assay image [J]. *Radiat. Res. Radjat. Process*, 2009, 27(1): 15-19
- [8] Honda S, Hjelm LM, Handa JT. The use of hyperoxia to induce chronic mild oxidative stress in RPE cells in vitro [J]. *Mol Vis*, 2001,

- 7:63-70
- [9] Escribano-Diaz C, Durocher D. DNA repair pathway choice a PTIP of the hat to 53BP1[J]. EMBO Rep, 2013, 14: 665-666
- [10] Asbell PA, Dualan I, Mindel J, et al. Age -related cataract[J]. Lancet, 2005, 365(9459): 599 -609
- [11] Padma G, Mamata M, Reddy KRK, et al. Polymorphisms in two DNA repair genes (XPD and XRCC1) association with age related cataracts[J]. Mol Vis, 2011,17: 127-133
- [12] Lipman RM, Tripathi BJ, Tripathi RC. Cataracts induced by microwave and ionizing radiation[J]. Surv Ophthalmol, 1988, 33:200-210
- [13] 陈莺, 陈大本. 白内障发病机制及预防治疗的研究进展[J]. 眼科新进展, 2005, 25(2):190-193
Chen Ying, Chen Da-ben. Progress on pathogenesis, prevention and treatment of cataract[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2005, 25(2):190-193
- [14] Johnson AB, Barton MC. Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function[J]. Mutat Res, 2007, 618: 149-162
- [15] Shui YB, Sasaki H, Pan J H, et al. Morphological observation on cell death and phagocytosis induced by ultraviolet irradiation in a cultured human lens epithelial cell line [J]. Exp Eye Res, 2000, 71: 609-618
- [16] Truscott R J. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key [J]. Exp Eye Res, 2005, 80: 709-725
- [17] SPECTORA. Oxidative stress-induced cataract mechanism of action [J]. FASEBJ, 1995, 9: 1173-1182
- [18] Sorte K, Sune P, Bhake A, et al. Quantitative assessment of DNA damage directly in lens epithelial cells from senile cataract patients[J]. Mol Vis, 2011, 17(1):1- 6
- [19] Shinohara T, Singh DP, Chylack LT Jr. Age-related cataract: immunity and lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)[J]. Ocul Pharmacol Ther, 2000, 16: 181-191
- [20] Jose JG. The role of DNA damage, its repair and its misrepair in the etiology of cataract[J]. Ophthalmic Res, 1978, 10: 52
- [21] 秦虹. 白内障病人晶状体上皮细胞 DNA 损伤初探[J]. 眼科, 2001, 10(4): 239-242
Qin Hong. Preliminary study on DNA damage in lens epithelial cells of cataract patients[J]. Ophthalmol CHN, 2001, 10(4): 239-242
- [22] Grabner G, Brenner W. Unscheduled DNA repair in human lens epithelial following “in vivo” and “in vitro” ultraviolet irradiation[J]. Ophthalmic Res, 1982, 14: 160-166
- [23] Hammer M, Richter S, Guehrs KH, et al. Retinal pigment epithelium cell damage by A2E and its photo -derivatives [J]. Mol Vis, 2006, 12: 1348-1354
- [24] Sparrow J R, Zhou J, Ben Shabat S, et al. Involvement of oxidative mechanisms in blue light -induced damage to A2E-laden RPE [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43:1222-1227
- [25] Chen L, Wu W, Dentchev T, et al. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression [J]. Exp Eye Res, 2004, 79 (2) : 239-247
- [26] Sun MH, Pang JH, Chen SL, et al. Photoreceptor protection against light damage by AAV- mediated overexpression of heme oxygenase [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(12): 5699-7707
- [27] 刘玲华, 刘正, 杨明, 等. 曲安奈德对兔视网膜色素上皮细胞 DNA 的损伤作用[J]. 眼科新进展, 2008, 28(12):898-901
Liu Ling-hua, Liu Zheng, Yang Ming, et al. Triamcinolone acetone on DNA damage in rabbit retinal pigment epithelium [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2008, 28(12): 898-901
- [28] Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, et al. Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes in age related retinal pigment epithelium and choroids [J]. Mol Vis, 2008, 14: 644-651
- [29] Imam SZ, Karahalil B, Hogue BA, et al. Mitochondrial and nuclear DNA repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner[J]. Neurobiol Aging, 2006, 27: 1129-1136
- [30] Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration [J]. Exp Eye Res, 2003, 76: 397-403
- [31] Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, et al. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy [J]. Exp Cell Res, 2013, 319: 1001-1012
- [32] Zhao B, Ye J, Li B, et al. DNA repair gene XRCC3 Thr241Met polymorphism and glioma risk: a meta-analysis [J]. Int J Clin Exp Med, 2013, 6: 438-443