

压力升高诱导的视网膜神经节细胞-5 的凋亡和自噬

王余萍 王靖 袁源智

200032 上海, 复旦大学附属中山医院眼科 复旦大学循证医学中心

通信作者: 袁源智, Email: yuan.yuanzhi@zs-hospital.sh.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.04.002

【摘要】 背景 研究表明线粒体途径的凋亡和自噬均是影响青光眼视网膜神经节细胞(RGCs)存活的重要因素,但压力是否引发 RGCs 线粒体途径的凋亡和自噬尚未阐明。目的 探讨压力对体外培养的 RGCs 线粒体途径凋亡和自噬的影响。方法 将培养的 RGC-5 细胞分为正常对照组及 0、20、40 和 60 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 压力组,根据分组使用自制加压装置对离体培养的 RGC-5 细胞密闭加压处理 4 h,倒置相差显微镜下观察各组细胞的形态学变化,采用流式细胞仪检测细胞的凋亡和坏死率,采用 JC-1 荧光染料检测细胞线粒体膜电位的改变,采用 Western blot 法检测各组细胞中细胞色素 C(Cyt-c)、微管相关蛋白轻链 3(LC3)和 Beclin-1 的表达。结果 正常对照组和 0 mmHg 压力组培养的 RGC-5 细胞呈梭形,可见较多的树突,而 20、40 和 60 mmHg 压力组随着压力的增大,细胞密度变小,部分细胞树突缩短且变少,死亡细胞增多。正常对照组及 0、20、40 和 60 mmHg 压力组总凋亡和坏死细胞比例分别为 (15.69±0.77)%、(15.77±1.14)%、(18.30±1.07)%、(23.28±1.33)% 和 (34.47±1.17)%,总体比较差异有统计学意义 ($F=150.90, P<0.001$),其中 40 mmHg 压力组和 60 mmHg 压力组总凋亡和坏死细胞率明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。正常对照组细胞线粒体膜电位呈橙色荧光,20 mmHg 压力组和 40 mmHg 压力组细胞荧光强度减弱,橙色变淡,60 mmHg 压力组细胞呈绿色荧光。与正常对照组比较,60 mmHg 压力组细胞中 Cyt-c 蛋白相对表达量明显增加,40 mmHg 压力组和 60 mmHg 压力组细胞中 LC3-II 的相对表达量明显增加,20、40 和 60 mmHg 压力组细胞中 Beclin-1 的相对表达量明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 压力升高可诱导体外培养的 RGC-5 细胞形态异常,导致细胞线粒体膜电位下降,并通过线粒体途径发生凋亡和自噬。

【关键词】 青光眼/生理病理; 压力; 线粒体/代谢; 视网膜神经节细胞/代谢; 凋亡; 自噬

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470637); 白求恩·朗沐中青年眼科科研基金项目(BJ-LM2015004J)

Apoptosis and autophagy of retinal ganglion cell-5 cells induced by hydrostatic pressure Wang Yuping, Wang Jing, Yuan Yuanzhi

Department of Ophthalmology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Center for Evidence-based Medicine, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Yuan Yuanzhi, Email: yuan.yuanzhi@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 **Background** Researches showed that the mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy play an important role in the survival of retinal ganglion cells (RGCs) in glaucoma. However, whether high pressure will lead to mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy is not elucidated. **Objective** This study was conducted to explore whether elevated pressure can directly induce the mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy in cultured RGC-5 cells *in vitro*. **Methods** RGC-5 cells were exposed to self-made pressure device and treated by 0, 20, 40 and 60 mmHg pressure for four hours in pressurized bottles. RGC-5 cells were incubated simultaneously in sealed incubator bottles and served as normal control. The morphological changes of the cells were examined under the inverted phase-contrast microscope. The apoptosis percentages of the cells were detected by flow cytometry. Mitochondrial membrane potentials of the cells were assessed using the JC-1, a fluorescent dye. And the expressions of cytochrome C (Cyt-c), microtubule associated protein light chain 3 (LC3) and Beclin-1 protein in the cells was detected by Western blot. **Results** Cultured cells showed fusiform shape in the normal control group and 0 mmHg group with more dendritic process. The cell density was obviously reduced and the number of dead cells was increased in the 20, 40 and 60 mmHg groups. The apoptotic percentage was (15.69±0.77)%, (15.77±1.14)%, (18.30±

1.07)%, (23.28±1.33)% and (34.47±1.17)% in the normal control group and 0, 20, 40 and 60 mmHg groups, respectively, showing a significant intergroup difference ($F=150.90, P<0.001$), and the apoptotic percentage in the 40 mmHg group and 60 mmHg group was significantly increased in comparison with the normal control group (both at $P<0.01$). The mitochondrial membrane potential was high in the normal control group and 0 mmHg group, with the reddish fluorescence in the cells, and the reddish fluorescence was weakened in the 20 mmHg group and 40 mmHg group. The lowering of mitochondrial membrane potential was seen in the 60 mmHg group, with the green fluorescence. Compared with the normal control group, the expression of Cyt-c, LC3-II and Beclin-1 proteins in pressured groups was correspondingly increased (all at $P<0.05$). **Conclusions** Elevated pressure induces the morphologic change of RGC-5 cells, results in mitochondrial membrane potential reduction and mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy.

[Key words] Glaucoma/physiopathology; Pressure; Mitochondria/metabolism; Retinal ganglion cells/metabolism; Apoptosis; Autophagy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470637); Bethune-Langmu Ophthalmic Foundation for Young and Middle-aged Researchers (BJ-LM2015004J)

青光眼性视神经纤维退行性改变由多种因素引起,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行性死亡是各种类型青光眼共同的病理特征,其中高眼压是目前公认的导致视神经损害的主要危险因素。视网膜和视神经内含有丰富的线粒体,为视觉信号传导和细胞内物质运输提供必需的能量,是维持其正常生理活动的重要物质基础。线粒体是决定细胞存活及凋亡的重要因素,在青光眼视神经损伤中具有重要作用^[1-3]。研究表明,除了线粒体途径的细胞凋亡途径外,自噬也参与青光眼的病理生理过程,从而影响 RGCs 的存活和死亡^[4-6]。自噬是缺氧、饥饿、某些药物等多种原因引起的、细胞受到复杂通路高度调节的溶酶体降解过程,对细胞成分的更新和维持细胞内环境的稳定发挥重要作用^[7]。控制眼压是目前青光眼患者保护视神经的主要措施^[8]。然而,压力因素是否会引起来线粒体途径的 RGCs 凋亡和自噬目前尚不明确。本研究拟通过检测不同压力梯度下 RGCs 的凋亡、线粒体膜电位变化及自噬相关蛋白的表达,探讨压力因素与线粒体途径的 RGCs 凋亡及自噬的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 小鼠 RGC-5 细胞系,购于复旦 IBS 细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 不完全 DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶消化液、JC-1 试剂盒、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-c) 蛋白印迹试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);胎牛血清(美国 Corning 公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);兔抗微管相关蛋白轻链 3 (microtubules associated protein light chain3, LC3) A/B 单克隆抗体 (Cell

Signaling # 12741)、兔抗 Beclin-1 单克隆抗体 (Cell Signaling#3495)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Cell Signaling 公司)。自制加压装置:用橡皮塞封闭培养瓶,橡皮塞连接三通管,三通管的另两端分别通过橡皮管连接压力表和加压球;CO₂ 恒温细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);荧光显微镜、IX70 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Flex Station 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RGC-5 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞生长 2~3 d 后用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化并以 1:4 比例传代。

1.2.2 实验分组 传代后的细胞培养 24 h,然后分为 5 个组,正常对照组不使用加压装置,仅用封口膜密闭处理,另外 4 个加压组分别用不同压力 [0、20、40、60 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)] 的密闭加压装置处理细胞,用加压球向培养瓶内打气,同时用压力表检测瓶内的压力。当压力到达目标值时,用夹子将橡皮管夹闭,维持培养瓶内的压力稳定,置培养箱中培养 4 h,倒置相差显微镜下观察并拍照,记录各组细胞的形态变化。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 参照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书,各组细胞处理 4 h 后用胰蛋白酶消化、离心并收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞悬浮于 100 μl 的结合缓冲液中;分别加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 PI,避光孵育 15 min;再加入 400 μl 结合缓冲液混匀,用流式细胞仪进行分析。

1.2.4 荧光素染色法检测细胞线粒体膜电位 参照 1.2.3 方法收集细胞,用 PBS 将细胞洗涤 2 次后加入 JC-1 工作液,在 37 °C 环境中孵育 15~20 min。最后用

染色缓冲液洗 2 次,立即于荧光显微镜下观察。红色荧光显示膜电位依赖性 JC-1 在线粒体的聚集,呈正常线粒体膜电位,绿色荧光显示线粒体膜去极化后膜电位下降,通过荧光颜色的不同判断细胞线粒体膜电位变化。

1.2.5 Western blot 法检测 Cyt-c、LC3-II 和 Beclin-1 蛋白的表达 将处理的细胞置于冰上,弃去培养基,用 PBS 清洗 2 次,滴加细胞裂解液裂解细胞,13 000×g 离心 15 min。吸取上清液,收集提取的蛋白。BCA 法测定每个样品中的蛋白质含量。添加蛋白上样缓冲液,经变性后配制质量分数 12% SDS-PAGE 胶,取 40 μg 蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳,再将蛋白转印至 PVDF 膜上。转膜后用质量分数 10% 脱脂牛奶封闭 1 h,洗膜后加相应的一抗(1:1 000),置于 4 °C 冰箱过夜。洗膜后加相应二抗(1:5 000),常温下孵育 1.5 h。洗膜,加曝光液,用化学发光仪进行曝光。实验至少重复 3 次,用 Image J 软件对曝光条带进行灰度分析,目标蛋白的灰度值与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值为目标蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,正常对照组和 0、20、40、60 mmHg 压力组间细胞凋亡比例及细胞中 Cyt-c、LC3-II 和 Beclin-1 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组培养细胞的形态及存活状态

正常对照组培养的 RGC-5 细胞呈梭形,可见较多树突。0 mmHg 压力组培养的细胞形态与正常对照组接近,20 mmHg 压力组、40 mmHg 压力组及 60 mmHg 压力组培养的部分细胞树突变短且变少,部分细胞内有空泡形成,细胞轮廓模糊,皱缩细胞增多。随着压力的增加,上述异常表现逐渐明显(图 1)。

2.2 各组细胞的凋亡率比较

与正常对照组比较,0 mmHg 压力组细胞在各象限的比例和分布非常接近;随着压力的增加,晚期凋亡和坏死细胞的比例有所增加(图 2)。各组间总凋亡和坏死细胞比例的总体比较差异有统计学意义($F = 150.90, P < 0.001$),其中 40 mmHg 压力组和 60 mmHg 压力组总凋亡和坏死细胞比例明显高于正常对照组,

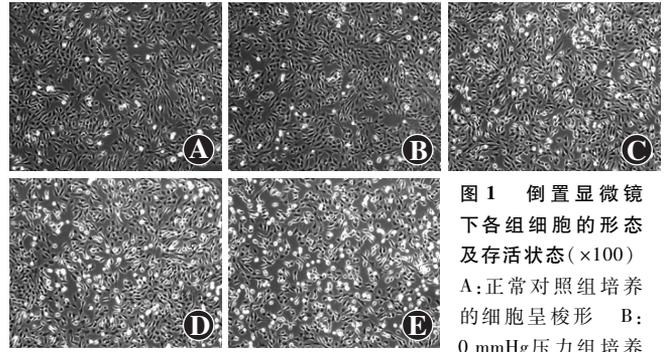


图 1 倒置显微镜下各组细胞的形态及存活状态(×100)

A:正常对照组培养的细胞呈梭形 B:0 mmHg 压力组培养的细胞形态学接近正常对照组 C:20 mmHg 压力组培养的细胞密度较小,灰白色死亡细胞较正常对照组增加 D:40 mmHg 压力组培养细胞中灰白色死亡细胞明显增加 E:60 mmHg 压力组培养的细胞排列稀疏,多数细胞死亡

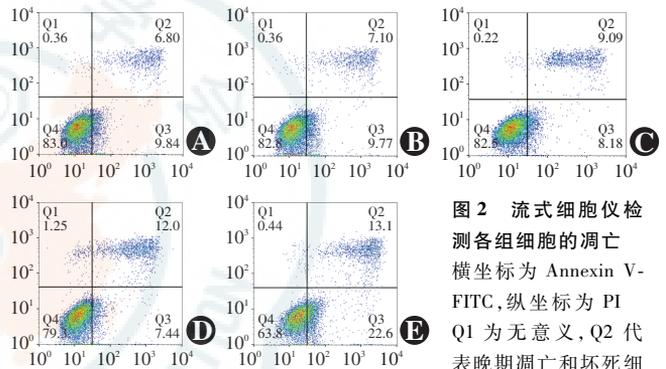


图 2 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡

横坐标为 Annexin V-FITC,纵坐标为 PI Q1 为无意义,Q2 代表晚期凋亡和坏死细胞比例,Q3 代表早期凋亡细胞比例,Q4 代表活细胞比例 随着压力的增加,凋亡细胞比例逐渐增加,细胞成活比例逐渐下降 A:正常对照组晚期凋亡细胞比例为 6.80%,早期凋亡细胞比例为 9.84%,活细胞比例为 83.00% B:0 mmHg 压力组晚期凋亡细胞比例为 7.10%,早期凋亡细胞比例为 9.77%,活细胞比例为 82.80% C:20 mmHg 压力组晚期凋亡细胞比例为 9.00%,早期凋亡细胞比例为 8.18%,活细胞比例为 82.50% D:40 mmHg 压力组晚期凋亡细胞比例为 12.00%,早期凋亡细胞比例为 7.44%,活细胞比例为 79.30% E:60 mmHg 压力组晚期凋亡细胞比例为 13.10%,早期凋亡细胞比例为 22.60%,活细胞比例为 63.80%

差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),而 0 mmHg 压力组和 20 mmHg 压力组总凋亡和坏死细胞比例与正常对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 1)。

表 1 不同压力组凋亡和坏死细胞比例的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | 样本量 | 早期凋亡细胞比例 | 晚期凋亡和坏死细胞比例 | 总凋亡和坏死细胞比例 |
|-------------|-----|------------|-------------|-------------------------|
| 正常对照组 | 6 | 9.02±0.38 | 6.67±0.40 | 15.69±0.77 |
| 0 mmHg 压力组 | 6 | 8.77±0.88 | 7.00±0.36 | 15.77±1.14 |
| 20 mmHg 压力组 | 6 | 9.90±0.60 | 8.40±0.50 | 18.30±1.07 ^a |
| 40 mmHg 压力组 | 6 | 11.14±1.18 | 12.13±1.20 | 23.28±1.33 ^b |
| 60 mmHg 压力组 | 6 | 20.80±1.58 | 13.67±0.55 | 34.47±1.17 ^b |
| F 值 | - | - | - | 150.90 |
| P 值 | - | - | - | <0.001 |

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验) -:未进行统计学分析

2.3 各组细胞线粒体膜电位变化

正常对照组线粒体膜电位呈橙色荧光,与正常对照组比较,0 mmHg 压力组细胞橙色荧光强度稍弱,20 mmHg 压力组和 40 mmHg 压力组细胞荧光强度减弱,橙色变淡,60 mmHg 压力组细胞呈绿色荧光(图 3)。

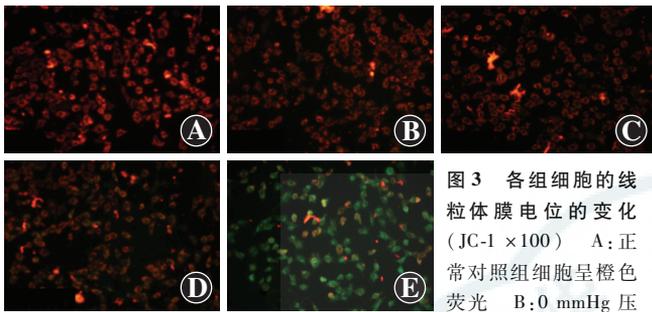


图 3 各组细胞的线粒体膜电位的变化 (JC-1 ×100) A: 正常对照组细胞呈橙色荧光 B:0 mmHg 压力组细胞呈橙色荧光,强度稍弱于正常对照组 C:20 mmHg 压力组细胞呈橙色荧光,强度较正常对照组减弱 D:40 mmHg 压力组细胞呈较弱的橙色荧光 E:60 mmHg 压力组细胞呈绿色荧光

2.4 各组细胞中 Cyt-c、LC3-II 和 Beclin-1 蛋白的表达

正常对照组及 0、20、40、60 mmHg 压力组细胞中 Cyt-c 相对表达量分别为 1.29 ± 0.08 、 1.15 ± 0.10 、 1.42 ± 0.06 、 1.43 ± 0.04 和 2.28 ± 0.27 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 31.02, P < 0.001$), 与正常对照组比较,0 mmHg 压力组细胞中 Cyt-c 蛋白相对表达量的变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 20 mmHg 压力组和 40 mmHg 压力组细胞中 Cyt-c 蛋白相对表达量升高,但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 60 mmHg 压力组细胞中 Cyt-c 蛋白相对表达量明显升高,差异有统计学意义 ($t = 6.14, P < 0.01$)。正常对照组及 0、20、40、60 mmHg 压力组细胞中 LC3-II 蛋白的相对表达量分别为 1.07 ± 0.07 、 1.01 ± 0.06 、 1.10 ± 0.18 、 1.33 ± 0.08 和 2.01 ± 0.12 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 41.31, P < 0.001$), 与正常对照组比较,40 mmHg 压力组和 60 mmHg 压力组细胞中 LC3-II 蛋白的相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t = 4.21, P < 0.05$; $t = 11.79, P < 0.001$)。正常对照组及 0、20、40、60 mmHg 压力

组细胞中 Beclin-1 蛋白的相对表达量分别为 0.68 ± 0.05 、 0.81 ± 0.06 、 1.19 ± 0.12 、 1.04 ± 0.07 和 1.43 ± 0.18 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 23.11, P < 0.001$), 与正常对照组比较,20、40 和 60 mmHg 压力组细胞中 Beclin-1 蛋白的相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义 ($t = 6.63, 7.57, 6.99$, 均 $P < 0.01$) (图 4)。

3 讨论

已经证实青光眼患者眼压的升高是 RGCs 丢失和视网膜神经纤维退行性改变的主要原因之一。本研究发现在 RGC-5 培养过程中施加不同的压力会导致细胞形态和功能改变,随着压力的逐渐增大,细胞结构发生异常,细胞受到损伤甚至死亡,证实压力可致 RGCs 死亡,且压力越大对细胞造成的损伤越大。流式细胞仪检测发现,60 mmHg 压力组与正常对照组及 0、20、40 mmHg 压力组比较时差别最大之处在于早期的细胞凋亡率,而晚期细胞凋亡和坏死率各组间差别并不是很明显,进一步证实了压力可致使 RGC-5 细胞发生凋亡,较高压力会导致更多的细胞开始启动凋亡过程,但也有研究表明 40 mmHg 压力作用后 24 h RGC-5 细胞出现凋亡趋势^[9]。

目前公认的凋亡信号通路包括死亡受体信号通路、线粒体信号通路和内质网应激死亡信号通路,现已知线粒体功能障碍在帕金森病和阿尔茨海默病等神经变性疾病中起重要作用^[10-12]。青光眼也是一种神经变性疾病,所以线粒体功能障碍在青光眼视神经损害中的作用也越来越受到重视。氧化应激可引起线粒体外膜的通透性增加,导致线粒体膜电位下降,Cyt-c

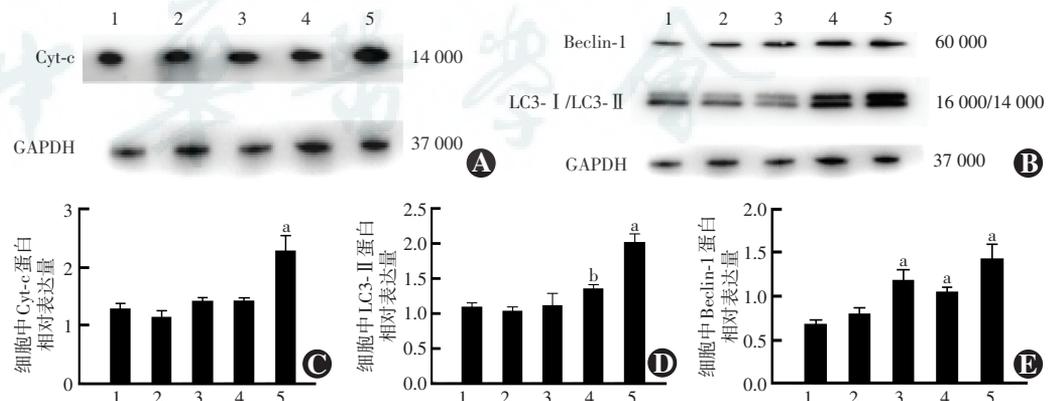


图 4 Western blot 法检测各组细胞中 Cyt-c、LC3-II 和 Beclin-1 蛋白的表达 A: 各组细胞中 Cyt-c 蛋白表达电泳图 B: 各组细胞中 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白表达的电泳图 C: 各组细胞中 Cyt-c 蛋白表达量的比较 $F = 31.02, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n = 6$) D: 各组细胞中 LC3-II 蛋白表达量的比较 $F = 41.31, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01, ^b P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n = 6$) E: 各组细胞中 LC3-II 蛋白表达量的比较 $F = 23.11, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n = 6$) 1: 正常对照组 2: 0 mmHg 压力组 3: 20 mmHg 压力组 4: 40 mmHg 压力组 5: 60 mmHg 压力组 Cyt-c: 细胞色素 C; LC: 微管相关蛋白轻链

从线粒体释放到细胞质,进而激活 caspase 凋亡途径,启动线粒体途径的凋亡^[13-14]。本研究中对 RGCs 线粒体膜电位和 Cyt-c 蛋白表达变化进行检测,结果发现 20 mmHg 压力组和 40 mmHg 压力组细胞的线粒体膜电位已有所下降,但与正常对照组比较差异无统计学意义, Cyt-c 蛋白释放至细胞质中的量较少,而 60 mmHg 压力组早期凋亡细胞明显增多,细胞的线粒体膜电位明显下降,细胞中 Cyt-c 的表达量也明显高于正常对照组,因此认为 RGC-5 细胞在低于 40 mmHg 压力下作用 4 h 对线粒体功能的影响并不足够大,而在 60 mmHg 压力下细胞的线粒体功能明显受损,线粒体膜电位明显下降, Cyt-c 大量释放至细胞质,从而使细胞发生凋亡。

自噬相关蛋白 LC3 有 LC3-I 和 LC3-II 2 种形式。免疫电子显微镜下显示 LC3-II 存在于自噬体膜的内外膜,且 LC3-II 量的多少与自噬体的形成有关^[15-16],此外自噬相关蛋白 Beclin-1 在自噬过程中也发挥关键作用^[16],因此检测细胞中 LC3-II 及 Beclin-1 蛋白的表达一定程度上可以显示细胞自噬活动的强弱。本研究结果显示,不同压力组中自噬相关蛋白 LC3-II 和 Beclin-1 的表达逐渐增加,以 60 mmHg 压力组更为明显,说明在压力作用下 RGC-5 细胞的自噬活动也发生了变化,60 mmHg 压力作用下自噬活动明显,但自噬作用对细胞起保护作用还是属于死亡的另一形式目前尚未完全明确^[17-19]。

本研究进一步证实加压可致 RGC-5 细胞发生线粒体途径凋亡和自噬,这 2 种细胞变化并不是完全独立的,两者之间有许多相同的分子调节机制且存在着相互作用^[4]。因此,我们可尝试从细胞凋亡和自噬角度来研究青光眼的视神经保护机制,进一步探讨在一定眼压水平下通过调控线粒体途径凋亡及自噬来延缓 RGCs 的进行性死亡对视神经保护具有重要的临床意义。

本研究中采用对离体培养细胞进行密闭加压的模型进行研究,但在这种培养环境中不能完全排除细胞缺氧的情况。对此,我们通过设置以封口膜封闭瓶口的正常对照组,并适当缩短处理时间,尽可能地消除这个影响。细胞处理 4 h 后倒置显微镜下和流式细胞仪检测显示正常对照组和 0 mmHg 压力组未见异常的细胞死亡,且两组间细胞形态及细胞中 Cyt-c、LC3-II 及 Beclin-1 蛋白的表达均无明显差别,说明在该实验条件下,培养瓶内的空气能够满足培养的细胞正常存活的条件。此外,本研究中采用的是 RGC-5 细胞系,有利于体外实验的进行,但 RGC-5 与 RGCs 的原代细胞存在一定差别。若能进一步进行青光眼动物模型的在

体实验,探究对线粒体途径细胞凋亡和自噬的调节以保护青光眼视神经损害病程中进行性的 RGCs 死亡,可为青光眼视神经病变的靶向治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies[J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1): 53-89.
- [2] Osborne NN. Mitochondria; their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma [J]. Exp Eye Res, 2010, 90(6): 750-757. DOI:10.1016/j.exer.2010.03.008.
- [3] Yang XJ, Ge J, Zhuo YH. Role of mitochondria in the pathogenesis and treatment of glaucoma[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(22): 4358-4365.
- [4] Munemasa Y, Kitaoka Y. Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 47: 1-18. DOI:10.1016/j.preteyeres.2015.03.002.
- [5] 许毓鹏. 自噬与青光眼视神经病变相关性研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(3): 284-288. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.020.
- [6] Xu YP. Current researches in correlation between autophagy and glaucomatous optic neuropathy[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(3): 284-288. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.020.
- [7] 傅诗雅, 张旭. 青光眼动物模型中自噬与视网膜神经节细胞的关系[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(2): 180-183. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.018.
- [8] Fu SY, Zhang X. Relationship between autophagy and retinal ganglion cells in animal models of glaucoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(2): 180-183. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.018.
- [9] 范舒欣, 傅煜轩, 袁志兰. 羟喜树碱通过蛋白激酶 R 样内质网激酶途径促进人 Tenon 囊成纤维细胞自噬作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(3): 201-206. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.003.
- [10] Fan SX, Fu YX, Yuan ZL. Enhancement of hydroxycamptothecin to human Tenon capsule fibroblasts autophagy via PERK pathway [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(3): 201-206. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.003.
- [11] Lee PP, Sultan MB, Grunden JW, et al. Assessing the importance of IOP variables in glaucoma using a modified delphi process[J]. J Glaucoma, 2010, 19(5): 281-287. DOI:10.1097/IJG.0b013e3181b4ca8d.
- [12] Li Y, Chen YM, Sun MM, et al. Inhibition on apoptosis induced by elevated hydrostatic pressure in retinal ganglion cell-5 via laminin upregulating β 1-integrin/focal adhesion kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(8): 976-983. DOI:10.4103/0366-6999.179785.
- [13] Gu XM, Huang HC, Jiang ZF. Mitochondrial dysfunction and cellular metabolic deficiency in Alzheimer's disease[J]. Neurosci Bull, 2012, 28(5): 631-640. DOI:10.1007/s12264-012-1270-2.
- [14] Eckert GP, Renner K, Eckert SH, et al. Mitochondrial dysfunction—a pharmacological target in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2012, 46(1): 136-150. DOI:10.1007/s12035-012-8271-z.
- [15] Santos D, Cardoso SM. Mitochondrial dynamics and neuronal fate in Parkinson's disease[J]. Mitochondrion, 2012, 12(4): 428-437. DOI:10.1016/j.mito.2012.05.002.
- [16] Levkovitch-Verbin H, Dardik R, Vander S, et al. Mechanism of retinal ganglion cells death in secondary degeneration of the optic nerve [J]. Exp Eye Res, 2010, 91(2): 127-134. DOI:10.1016/j.exer.2009.11.014.
- [17] Biermann J, Grieshaber P, Goebel U, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection and regeneration in injured retinal ganglion cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(1): 526-534. DOI:10.1167/iiov.09-3903.
- [18] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing [J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [19] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4): 571-580. DOI:10.1038/cdd.2010.191.
- [20] Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, et al. Autophagy: for better or for worse [J]. Cell Res, 2012, 22(1): 43-61. DOI:10.1038/cr.2011.152.

[18] Huang SP, Chien JY, Tsai RK. Ethambutol induces impaired autophagic flux and apoptosis in the rat retina[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(8): 977-987. DOI:10.1242/dmm.019737.

[19] Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, et al. Axonal protection by Nmnat3 overexpression with involvement of autophagy in optic nerve degeneration[J/OL]. Cell Death Dis, 2013, 4: e860 [2016-05-17].

http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n10/full/cddis2013391a.html. DOI:10.1038/cddis.2013.391.

(收稿日期:2016-09-30)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

· 短篇论著 ·

不同麻醉方式对高眼压模型小鼠眼压的影响

杜磊 陈佳 鲍庆 邢怡桥

430060 武汉大学人民医院眼科中心

通信作者:杜磊, Email:du-lei@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.04.003

青光眼是一组以视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)损害为特征的不可逆致盲眼病,眼压升高是青光眼发生和发展的主要危险因素,目前的动物实验主要以眼压升高为理论基础,采用多种方法建立高眼压动物模型,并在全身麻醉状态下测量小鼠眼压^[1]。但研究表明,全身麻醉对人和小鼠的眼压测量值均会产生一定影响,如异氟烷麻醉对正常儿童眼压没有明显影响,但对先天性青光眼儿童的眼压影响明显,会造成其眼压降低^[2-3]。也有研究发现大多数全身麻醉药物会造成大鼠眼压的降低^[4-5],然而,对清醒小鼠进行眼压测量的适应性训练并非易事,并且大多数小鼠生理和病理改变的活体观察研究仍需要在全身麻醉下进行,因此麻醉状态下测量模型小鼠眼压仍是目前采用的主要方法。本研究拟比较 2 种常用的全身麻醉方式对正常眼压小鼠和高眼压模型小鼠眼压的影响,为相关的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 选取 8 周龄 C57BL 小鼠 62 只,雌雄不限,所有小鼠均由 Jackson 实验室购买并饲养。将小鼠分为正常眼压组 42 只(其中 22 只采用异氟烷吸入麻醉,20 只采用氯胺酮腹腔内注射麻醉)、高眼压模型组 15 只和眼压计校准组 5 只。所有动物实验操作均遵守武汉大学动物管理委员会关于动物实验的相关规定。

1.2 小鼠行为训练 按照 Ding 等^[5]的方法对小鼠进行 2 周的清醒状态下眼压测量训练。

1.3 眼压测量的校准 参照文献^[6]的方法进行 Tonometer 校准。采用体积分数 2% 异氟烷和 0.8 L/min 的氧气吸入麻醉。小心地将玻璃微管针头(外径为 1.00 mm,内径为 0.58 mm)刺入小鼠前房,微管针另一头连接至装满注射用水的灌注装置,通过改变灌注瓶高度调节压强。左眼表面涂透明质酸钠予以保护。将压强分别调节至 5、10、20、30、40 和 50 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),使用



图 1 Tonometer 眼压计对小鼠眼压的测量和校准

Tonometer 眼压计测量右眼眼压,每只眼重复测 6 次,取其平均值(图 1)。

1.4 高眼压模型制作 术前 3 d 测量高眼压模型组小鼠基线眼压。术前 30 min 用复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社)点眼,用 2% 异氟烷

和 0.8 L/min 氧气(载体)吸入麻醉。盐酸奥布卡因滴眼液点眼,用一支玻璃微管针(外径为 1.00 mm,内径为 0.58 mm)连接 1 ml 注射器,针孔斜面向上插入前房,使房水流出,前房变浅。裂隙灯显微镜(德国卡尔蔡司公司)下用波长 532 nm 二极管激光光凝角膜缘,设定能量为 100 mV,曝光时间为 0.05 s,光斑直径为 50 μm,激光光束直接垂直于角膜缘进行 360°光凝,共 60~70 个激光点。以上操作在 10 min 内完成。术后结膜囊内用妥布霉素地塞米松眼膏(美国爱尔康公司)涂眼。小鼠置于保温板上,术后每 0.5 h 监测小鼠体征,共 2 h。术后 30 d 内小鼠眼压均值高于基线值 30% 者为造模成功。

1.5 小鼠麻醉方法 所有操作均在 10:00~12:00 进行。(1) 2% 异氟烷吸入麻醉:小鼠头戴自制呼吸面罩,以氧气作为载体行异氟烷和 0.8 L/min 氧气吸入麻醉,麻醉器监测麻醉气体浓度和流速,观察小鼠的呼吸频率、肢端和口唇颜色。(2) 用氯胺酮(87 mg/kg)和甲苯噻嗪(13 mg/kg)混合物行腹腔内注射麻醉。所有小鼠均分别于麻醉前 5 min 和麻醉后 3、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min 测量右眼眼压。

1.6 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同麻醉方法麻醉前后小鼠眼压降低幅度的比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tonometer 眼压计的校准 Tonometer 眼压计在实际灌注压为 5、10、20、30、40 和 50 mmHg 时测量的眼压分别为(4.97±0.08)、(10.05±0.14)、(20.13±0.14)、(30.18±0.28)、(39.07±0.58)和(48.37±0.46) mmHg,实际灌注压为 5~30 mmHg 时,测量眼压值接近实际眼压值,在实际灌注压为 40~50 mmHg 时测量值低于实际眼压值。

2.2 不同麻醉方法下正常眼压小鼠眼压的变化 异氟烷吸入麻醉前 5 min 及麻醉后 3、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min 正常眼压小鼠眼压缓慢下降,在麻醉后 30 min 进入平台期(图 2);氯胺酮麻醉正常眼压小鼠,眼压在麻醉开始 30 min 内处于一种急速上升和降低交替状态,此后缓慢下降并进入平台期(图 3)。

2.3 不同麻醉方法下高眼压模型小鼠眼压的变化 15 只实验小鼠术前基线眼压为(13.2±5.3) mmHg,其中 11 只小鼠术后 30 d 内平均眼压为(24.03±1.86) mmHg,高于基线眼压的