

原发性开角型青光眼患者小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 蛋白的共表达

柴芳 艾华 李娟 杨新光

710004 西安市第四医院眼科

通信作者:柴芳,Email:chaifang14@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.04.004

【摘要】 **背景** Myocilin 蛋白的错误折叠是原发性开角型青光眼 (POAG) 的重要发病机制,GRP78 能将错误折叠的蛋白质转移到内质网外,以保持应激状态下内质网蛋白质合成功能的正常运转,但二者的相互关系及其在 POAG 发病中的作用机制仍未阐明。 **目的** 检测体外培养的 POAG 患者小梁细胞内 GRP78 与 Myocilin 蛋白的共定位表达。 **方法** 在手术中获取 POAG 患者的小梁网组织,采用组织块培养法分离和培养小梁细胞,采用免疫化学染色法检测培养的细胞中特征性因子的表达,并将其形态学特征与健康供体眼培养的小梁细胞进行比较。将体外培养的小梁细胞分为衣霉素 (Tm) 组、十字孢碱 (STS) 组和正常对照组,分别在培养液中加入含有 1 $\mu\text{mol/L}$ Tm、0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS 和不含药物的培养液培养细胞 24 h,采用免疫荧光法检测各组培养的细胞中 GRP78 与 Myocilin 蛋白的共表达情况。 **结果** 培养的原代细胞多呈扁平星形或不规则形,可见细胞突起,细胞核呈椭圆形,细胞体较大,细胞质丰富,可见大量黑色吞噬颗粒。POAG 来源小梁细胞培养 3~7 代生长良好,细胞中层黏连蛋白 (LN)、纤维连接蛋白 (FN)、神经烯醇化酶 (NSE) 和波形蛋白 (Vimentin) 均呈阳性表达。免疫荧光染色结果显示,Tm 组、STS 组和正常对照组细胞的细胞质中均可见 GRP78 和 Myocilin 阳性表达,分别为红色和绿色荧光,正常对照组中来源小梁细胞的周边部可见 GRP78 和 Myocilin 的不完全共表达,POAG 来源小梁细胞周边部 GRP78 和 Myocilin 呈完全共表达;Tm 组和 STS 组中不同来源的小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 均呈完全共表达,Tm 组中不同来源小梁细胞均出现细胞核周围 GRP78 蛋白聚集现象。 **结论** POAG 来源小梁细胞中 GRP78 蛋白与 Myocilin 蛋白共表达,提示二者在 POAG 的发病和进展过程中可能存在相互作用。GRP78 可能保护小梁细胞免受内质网应激途径诱导的细胞凋亡。

【关键词】 开角型青光眼/病理;内质网/代谢;糖蛋白/代谢;小梁网/病理;肌纤蛋白;细胞培养;人

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81273902、81400424); 陕西省社会发展科技攻关项目 (2016SF-100); 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2014K11-03-07-04); 西安市重点学科优势专科建设项目 ([2015]228 号-7)

Co-expression of GRP78 and Myocilin in trabecular meshwork cells of primary open angle glaucoma Chai

Fang, Ai Hua, Li Juan, Yang Xinguang

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Chai Fang, Email: chaifang14@163.com

[Abstract] **Background** Misfolding of Myocilin protein plays an important role in the pathogenesis of primary open angle glaucoma (POAG). GRP78 can transfer the misfolded proteins out endocytosplasmic reticulum and keep the protein synthesis function of endoplasmic reticulum. However the relationship between GRP78 and Myocilin in the pathogenesis of POAG has not been elucidated. **Objective** This study was to investigate and analyze the co-expressions of GRP78 and Myocilin in trabecular meshwork cells (TMCs) of POAG. **Methods** The trabecular meshwork tissues were obtained during the surgery of POAG and healthy donor for the isolated and *in vitro* culture of TMCs, and the morphology of the cells was compared between POAG-derived TMCs and donor-derived TMCs. The expression of specific factors for TMCs were detected by immunochemistry. The cells were divided into normal control group, tunicamycin (Tm)-treated group and staurosporine (STS)-treated group, and the cells were cultured by regular medium, the 1 $\mu\text{mol/L}$ Tm medium or 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS medium for 24 hours respectively. The co-expression of GRP78 and Myocilin in the cells were detected using immunofluorescence assay. This study was approved by Ethics Committee of Xi'an No. 4 Hospital, and written informed consent was obtained from each patient before surgery.

Results Primarily cultured cells showed the flat star-like and irregular appearance with 3-5 processes, round nuclei,

abundant cytoplasm and black engulf particles. The 3–7 generations of POAG-derived cells grew well, showing positive expressions of laminin (LN), fibronectin (FN), neuronal specific enolase (NSE) and Vimentin. Immunofluorescence assay showed positive expressions of GRP78 and Myocilin in the cells of the Tm group, STS group and normal control group, with the reddish and green fluorescence separately. Incomplete co-expression of GRP78 and Myocilin was seen in donor-derived TMCs, and complete co-expression of GRP78 and Myocilin was found in the POAG-derived TMCs in the normal control group. Complete co-expression of GRP78 and Myocilin was exhibited in both donor- and POAG-derived TMCs in the Tm group and STS group. In addition, accumulation of GRP78 protein around nucleus was seen in both donor- and POAG-derived TMCs in the Tm group. **Conclusions** GRP78 and Myocilin proteins are completely co-expressed in POAG-derived TMCs, inferring that GRP78 and Myocilin play an interaction role in the pathogenesis and development of POAG. GRP78 may play a cytoprotective role against the apoptosis of TMCs caused by endoplasmic reticulum stress.

[Key words] Glaucoma, open angle/pathology; Endoplasmic reticulum/metabolism; Glycoproteins/metabolism; Trabecular meshwork/pathology; Myocilin; Cells, cultured; Human

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81273902, 81400424); Shanxi Social Development Science and Technology Project (2016SF-100); Shanxi Science and Technology Research Research Project (2014K11-03-07-04); Xi'an Key Discipline Advantage Specialized Subject Construction Project ([2015] 228-7)

青光眼为不可逆性致盲眼病,其中原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是常见类型之一。目前,POAG 的发病机制尚不十分明确。关于 POAG 发病机制的研究多涉及基因突变位点的检测、编码蛋白错误折叠导致的小梁细胞功能异常以及线粒体功能障碍介导的小梁细胞凋亡^[1-4]。由于基因突变 Myocilin 蛋白不能转移,在内质网中堆积引起了 PERK (PKR-like ER kinase) 从 GRP78 复合物中释放出来,激活 CHOP 蛋白表达,最终导致小梁细胞凋亡。同时研究发现,突变型 Myocilin 蛋白以积聚体形式存在于小梁细胞的细胞质内,并产生细胞毒性,激活 GRP78 表达上调,导致小梁细胞功能异常,甚至发生凋亡^[5-6]。近年来研究认为细胞受刺激时 GRP78 呈高表达并合成 GRP78 的反应可能是细胞一种重要的防御机制,该机制对细胞有保护作用,从而延长在各种不利因素刺激下细胞的生存期。GRP78 能将错误折叠的蛋白质转移到内质网外,以保持应激状态下内质网蛋白质合成功能的正常运转,但二者的相互关系及其在 POAG 发病中的作用机制仍未阐明。为进一步明确 GRP78 在细胞内的分布及其与 Myocilin 蛋白的共定位情况,本研究通过体外培养正常人来源及 POAG 患者来源的小梁细胞,分别应用内质网应激诱导剂衣霉素(tunicamycin, Tm)和凋亡诱导剂十字孢碱(staurosporine, STS)作为内质网应激刺激因素,观察细胞中 GRP78 蛋白与 Myocilin 蛋白在小梁细胞内的表达与分布情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人小梁网组织 正常人小梁网组织由西安市眼库获得,取材自死亡 48 h 以内、无任何眼科疾患的健康供体眼球;POAG 患者小梁网组织取材于已签署知情同意书行复合式小梁切除手术的 POAG 患眼。本研究已获得西安市第四医院伦理委员会审批(伦审号:2016-182)。

1.1.2 主要试剂及仪器 鼠抗人纤维连接蛋白(fibronectin, FN)一抗、鼠抗人层黏连蛋白(laminin, LN)一抗、鼠抗人波形蛋白(Vimentin)一抗、鼠抗人神经元特异性烯醇化酶(neuronal specific enolase, NSE)一抗(福州迈新公司);山羊抗人 GRP78 一抗、兔抗人 Myocilin 抗体、Cy3 标记的兔抗山羊 IgG 二抗、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Santa Cruz 公司);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、Tm、STS(美国 Sigma 公司);逆转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司);100 bp DNA ladder PCR 反应体系(大连宝生物工程有限公司);Western blot 检测试剂盒(美国 Cell Signaling 公司)。细胞培养瓶、培养板、培养皿(美国 Corning Costar 公司);水平凝胶电泳仪、电泳槽(北京六一公司)。

1.2 方法

1.2.1 小梁细胞的分离与体外培养 将角膜移植供体眼球于无菌环境下用 D-Hanks 液冲洗干净,自角膜缘后 4~5 mm 处以眼科剪环形剪开巩膜,取眼前段组织,于台式手术显微镜下用角膜剪去除虹膜和睫状体组织;将获得的组织内面朝下放于培养皿中,加入 DMEM/F12 完全培养液浸没组织块,置于 37 °C 恒温细

胞培养箱中孵育 2 d; 眼前节组织取出后分辨出 Schwalbe 线与白色巩膜突之间呈浅褐色、带状、疏松、半透明的小梁组织, 置于少量 DMEM/F12 培养液中并剪成 3~5 mm 长的组织块, 用无齿镊将组织块夹入 24 孔板中, 待组织块贴壁较牢时加入浸没组织块的 DMEM/F12 完全培养液进行培养。将术中获得的 POAG 患者小梁组织面朝下贴于 25 cm² 培养瓶底, 组织块黏附牢固后加入浸没组织块的 DMEM/F12 完全培养液, 于 37 °C 恒温细胞培养箱中培养并传代。将第 3 代小梁细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 加入浸没组织块的 DMEM-F12 培养液 (含体积分数 15% 胎牛血清、60 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素) 中培养。

1.2.2 实验分组 以 POAG 患者原代小梁细胞作为研究对象, 正常人原代小梁细胞作为对照。将细胞接种于培养瓶中, 待细胞完全融合后分为 Tm 组、STS 组和正常对照组, 分别加入含有 1 μmol/L Tm 培养液、0.1 μmol/L STS 和不含上述任何药物的培养液, 分别处理细胞 6 h 和 24 h。

1.2.3 免疫组织化学法检测培养细胞中 FN、LN、Vimentin 和 NSE 因子的表达 组织块接种后 48 h, 每日于倒置相差显微镜下观察细胞的生长情况。取培养的第 4 代小梁细胞, 待其融合后常规用胰蛋白酶消化细胞, 12 000×g 离心 5 min。弃去上清液, 用细胞培养液重悬细胞, 细胞密度调整为约 1×10⁵/ml。将细胞悬液滴于载玻片上, 37 °C 静置 30 min, 待细胞贴壁牢固后加入适量培养液, 37 °C 培养箱中继续培养 24 h。在爬片细胞面滴加质量分数 4% 多聚甲醛, 固定组织 15 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加体积分数 3% 过氧化氢溶液, 室温下孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加质量分数 0.1% Triton X-100 50 μl, 室温下孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 分别滴加相应抗体 50 μl, 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 50 μl 试剂 A (聚合物增强剂), 室温下孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 50 μl 相应二抗, 室温下孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入新鲜配置的 DAB 显色剂, 光学显微镜下观察, 细胞着色时用自来水洗净多余的染色剂。苏木素复染, 梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察细胞中 FN、LN、Vimentin 和 NSE 的表达, 细胞质中呈棕黄色着色者为阳性细胞。

1.2.4 免疫荧光化学法检测各组细胞中 GRP78 和 Myocilin 的表达及分布 取出细胞爬片, PBS 漂洗 3 次。在爬片细胞面滴加 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,

PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。细胞面滴加 0.1% Triton X-100+质量分数 1% 牛血清白蛋白 50 μl, 室温下孵育 30 min。每张载玻片滴加 50 μl 相应一抗, 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入 50 μl FITC 标记的荧光二抗, 37 °C 条件下孵育 50 min。PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。滴加 Hotchest33342 (5 μg/ml) 孵育 5 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 于激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 体外培养人眼小梁细胞的形态特点

倒置相差显微镜下观察显示, 组织块接种后小梁细胞由组织块周边爬出, 逐渐形成典型内密外疏的单细胞层。培养的原代细胞形态各异, 多呈扁平的星形或不规则形, 有 3~5 个细胞突起; 细胞核呈椭圆形, 核膜清晰, 可见 2~3 个明显的核仁; 细胞体较大, 细胞质丰富、透明, 可见大量黑色吞噬颗粒 (图 1)。POAG 患者来源小梁细胞第 3~7 代细胞生长良好、增生能力强, 大部分细胞在传代后 0.5~2 h 贴壁, 培养 3~5 d 传代 1 次, 用于后续实验。光学显微镜下可见 POAG 患者与正常人小梁细胞在形态和分布上未见明显差别; 用 Tm、STS 处理后, 小梁细胞突起减少, 细胞体积缩小, 密度降低, STS 组较 Tm 组变化明显, 正常对照组小梁细胞形态无明显变化。

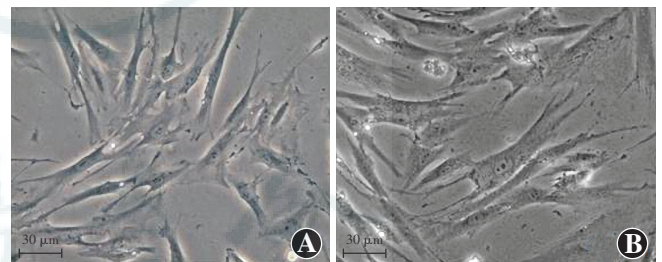


图 1 各组小梁细胞体外培养 (×200, 标尺=30 μm) 小梁细胞传代后约 5 d 融合, 细胞突起重叠而细胞体不重叠, 细胞形态、大小一致, 分布均匀, 胞体间排列紧密, 呈轴向排列的单层细胞层, 细胞质中可见吞噬的色素颗粒 A: 正常小梁细胞 B: POAG 患者小梁细胞

2.2 培养的 POAG 患者小梁细胞中 FN、LN、Vimentin 和 NSE 因子的表达

培养的 POAG 患者小梁细胞中 LN 表达阳性, 可见细胞质中点状和网状棕黄色着色 (图 2A); 培养的人眼小梁细胞中 FN 表达阳性, 可见细胞间的点状或条状棕黄色着色, 彼此相连呈单层网状结构 (图 2B); 培养的小梁细胞中可见 NSE 和 Vimentin 均呈阳性表达 (图 2C, D)。

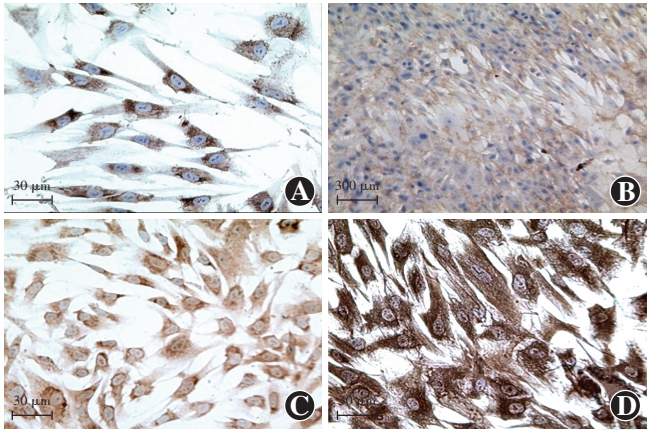


图 2 体外培养 POAG 患者小梁细胞的鉴定 A: 细胞中 LN 表达阳性, 可见细胞质中棕黄色着色 (DAB ×200, 标尺 = 30 μm) B: 细胞中 FN 表达阳性, 可见细胞间点状或条状并彼此相连的棕黄色染色 (DAB ×10, 标尺 = 300 μm) C: 细胞中 NSE 表达阳性, 可见细胞质呈棕黄色着色 (DAB ×200, 标尺 = 30 μm) D: 细胞中 Vimentin 表达阳性, 可见细胞质中呈深棕色着色 (DAB ×200, 标尺 = 30 μm)

2.3 不同来源小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 的表达及分布

免疫荧光检测结果显示, 正常人小梁细胞及 POAG 来源小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 表达阳性, 表现为细胞质内均质的颗粒状红色荧光, Myocilin 表现为细胞质中呈绿色荧光。正常对照组正常人来源的小梁细胞中可见 GRP78 和 Myocilin 呈不完全共表达, 共表达部位为橘红色荧光, 位于周边部细胞质中, POAG 患者小梁细胞中周边部可见 GRP78 和 Myocilin 呈完全共表达, 呈橘红色荧光。Tm 组和 STS 组正常人来源的小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 均呈不完全共表达, 共表达部位为橘红色荧光, 位于周边部细胞质中, 而在 POAG 来源的小梁细胞中均呈完全共表达, 呈橘红色荧光, 同时 Tm 组中不同来源的小梁网细胞均可见 GRP78 蛋白在细胞核周围聚集 (图 3)。

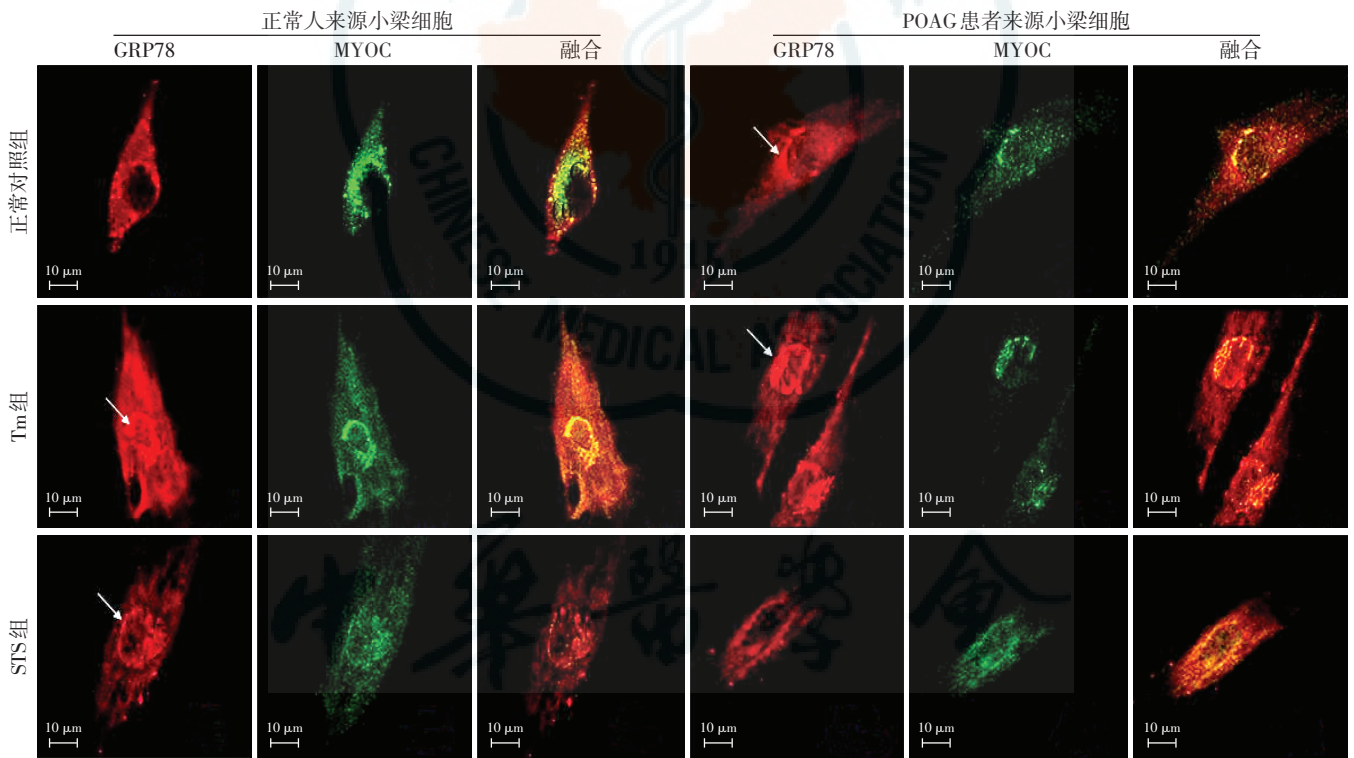


图 3 各组中不同来源小梁细胞 GRP78 与 Myocilin 蛋白表达共定位 (标尺 = 10 μm) 人眼小梁细胞中 GRP78 和 Myocilin 呈阳性表达, 分别为红色荧光 (Cy3) 和绿色荧光 (FITC), GRP78 和 Myocilin 均在细胞质内呈均质、颗粒状分布。正常对照组中正常人来源小梁细胞周边部 GRP78 和 Myocilin 呈部分重叠 (箭头示 GRP78 呈核周聚集分布), POAG 患者来源小梁细胞周边部 GRP78 和 Myocilin 呈完全重叠, Tm 组和 STS 组中不同来源小梁细胞 GRP78 和 Myocilin 呈现完全重叠, Tm 组中不同来源小梁细胞均出现 GRP78 蛋白在细胞核周围聚集的现象 POAG: 原发性开角型青光眼; Tm: 衣霉素; STS: 十字孢碱

3 讨论

POAG 是青光眼中的常见类型, POAG 患者眼压升高是由于房水排出阻力增加所致。小梁网是房水流出通道及眼压调节的主要部位, 小梁网部位房水外流阻

力增大所造成的病理性眼压升高是引起青光眼视神经损害的重要原因。小梁网由胶原纤维形成的小梁束与其上覆盖的单层小梁细胞组成, 小梁细胞的损害势必影响小梁网的结构和功能, 从而影响房水流出的效率, 关于小梁细胞凋亡的研究已成为探索 POAG 发病机制

和治疗手段有效的方法之一^[7-11]。本研究中采用组织块培养法对 POAG 患者小梁细胞进行分离和培养,并与用健康供体眼培养的小梁细胞进行比较,培养的细胞生长良好,并采用免疫组织化学法对培养细胞进行鉴定,NSE 染色阳性证实了小梁细胞的神经嵴来源,Vimentin 染色阳性证实了小梁细胞的间充质来源。以上结果显示成功进行了正常人和 POAG 患者小梁细胞体外培养,因此无论从形态学还是免疫组织化学检测方面均证实本研究培养的细胞为小梁细胞。

内质网应激反应是细胞内质网稳态失衡、生理功能发生紊乱时细胞为维持细胞内环境稳定而启动的自我保护反应机制^[10-12]。内质网应激反应可诱导内质网对未折叠或错误折叠蛋白质的加工和处理,激活一系列细胞内信号转导和相关基因,并表达具有保护作用的蛋白质,通过减少蛋白质合成、降解未折叠蛋白及维持细胞内钙的平衡,促进细胞内环境稳态的恢复,从而维持细胞的正常功能。当内质网应激反应过强或过久时可导致细胞死亡;当内质网应激反应能力低下时,细胞对损伤性刺激因素的敏感性增加,最终也可导致细胞的死亡^[13-14]。

Tm 为放线菌产生的核苷酸抗生素,常作为内质网应激的诱导剂,主要用于破坏蛋白质之间的二硫键,使蛋白正确折叠发生障碍。STS 是一种广泛诱导细胞凋亡的刺激因子,它通过抑制脂质及 Ca²⁺ 依赖的蛋白激酶,如蛋白激酶 C 来诱导细胞凋亡。本研究中采用 Tm 及 STS 构建细胞内质网应激模型及细胞凋亡模型,旨在模拟体内内质网应激及细胞凋亡环境下 GRP78 和 Myocilin 蛋白的分布与表达情况。

Wang 等^[15]研究发现,突变型 Myocilin 蛋白以积聚体形式存在于小梁细胞的细胞质内,并产生细胞毒性,激活 GRP78 表达上调,导致小梁细胞功能异常,甚至发生凋亡,从而提出内质网应激参与家族性开角型青光眼的发病过程;而在散发性 POAG 患者中是否存在 Myocilin 蛋白的错误堆积以及 GRP78 的表达变化?基于上述思考,本研究观察了散发型 POAG 患者小梁细胞和正常人小梁细胞中 GRP78 的表达与分布情况,结果表明 POAG 患者小梁细胞及 Tm、STS 处理过的正常人小梁细胞内 GRP78 蛋白与 Myocilin 蛋白共定位,而未处理的正常人小梁细胞内 GRP78 蛋白与 Myocilin 蛋白分布有差异,提示 POAG 患者小梁细胞 GRP78 可能与 Myocilin 蛋白存在相互作用,共同导致小梁细胞凋亡。

GRP78 位于真核细胞的内质网膜上,与热休克蛋白 70 家族具有高度同源性。在低糖、低氧和低 Ca²⁺ 等

因素刺激下,细胞中 GRP78 基因的转录活性可提高 10~25 倍,其蛋白表达量显著升高,从而维持细胞内环境的稳定,因此 GRP78 高表达可能是细胞在应激状态下的一种重要的防御机制^[16-18]。相关研究发现,青光眼患者与 Myocilin 基因突变有关,导致 Myocilin 蛋白不能转移,在内质网中堆积,引起 PERK 从 GRP78 复合物中释放出来,激活 CHOP 蛋白表达,最终导致小梁细胞凋亡。基于上述研究,为了探讨 POAG 患者的发病机制及 GRP78 与 Myocilin 蛋白的相互作用,本研究利用免疫荧光技术检测显示散发的 POAG 患者小梁细胞内 GRP78 及 Myocilin 蛋白存在共定位,且共定位范围在 POAG 患者及正常人之间存在差别,进而提示散发人群 POAG 的发病机制也涉及内质网应激。

近年国内外广泛开展针对 GRP78 的作用机制研究,提出 2 型糖尿病、肿瘤患者细胞内 GRP78 呈高表达,同时研究表明 GRP78 对敏感神经元、缺氧晚期心脏组织具有保护作用,可抑制肝细胞内脂肪合成等^[19-22]。GRP78 的功能研究已引起研究者的广泛重视,而其在眼科的相关研究尚未完全开展。本研究中结果显示,POAG 患者小梁细胞内 GRP78 及 Myocilin 在正常人及 POAG 患者小梁细胞内均出现共定位,且 Tm 和 STS 诱导 POAG 患者来源的小梁细胞内质网应激后 GRP78 及 Myocilin 共定位范围明显增大,提示 POAG 患者小梁网组织中 GRP78 与 Myocilin 亦有可能存在交互作用,共同诱导细胞凋亡,其具体机制及信号通路有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 葛坚. 我国近五年青光眼临床与基础研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(8): 710-716.
Ge J. Recent advances of clinical and basic studies in glaucoma in China in the last five years[J]. Chin J Ophthalmol, 2005, 41(8): 710-716.
- [2] He Y, Leung KW, Zhang YH, et al. Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(4): 1447-1458. DOI: 10.1167/iov.07-1361.
- [3] He Y, Ge J, Tombran-Tink J. Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(11): 4912-4922. DOI: 10.1167/iov.08-2192.
- [4] Izzotti A, Saccá SC, Longobardi M, et al. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma[J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(6): 724-730. DOI: 10.1001/archophth.2010.87.
- [5] Ozasa R, Okada T, Nadanaka S, et al. The antipsychotic olanzapine induces apoptosis in insulin-secreting pancreatic β cells by blocking PERK-mediated translational attenuation[J]. Cell Struct Funct, 2013, 38(2): 183-195.
- [6] 王德贵, 张铭志. 原发性开角型青光眼的基因学研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(9): 885-889. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.019.
Wang DG, Zhang MZ. Advances in molecular genetic study of primary open angle glaucoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(9): 885-889. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.019.

- [7] 安琳,季健.原发性开角型青光眼房水外流通路改变的研究进展[J].中华眼科杂志,2011,47(10):953-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2011.10.020.
An L, Ji J. The progress of aqueous humor outflow pathway in open-angle glaucoma [J]. Chin J Ophthalmol, 2011, 47 (10) : 953 - 956. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2011.10.020.
- [8] Luna C, Li G, Liton PB, et al. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(1):198-204. DOI: 10.1016/j.fct.2008.10.029.
- [9] 张亚琴,徐亮,李建军,等.正常眼压性青光眼的研究现状[J].国际眼科纵览,2011,35(1):9-13. DOI:10.3706/cma.j.issn.1673-5803.2011.01.003.
Zhang YQ, Xu L, Li JJ, et al. Current research about normal tension glaucoma[J]. Int Rev Ophthalmol, 2011, 35 (1) : 9 - 13. DOI: 10.3706/cma.j.issn.1673-5803.2011.01.003.
- [10] Qian Y, Tiffany-Castiglioni E. Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system [J]. Neurochem Res, 2003, 28(1):153-162.
- [11] 关丽英,许彩民,潘华珍.内质网应激介导的细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(11):1136-1141.
Guan LY, Xu CM, Pan HZ. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Prog Biochem Biophys, 2007, 34 (11) : 1136 - 1141.
- [12] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833 (12) : 3460 - 3470. DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.06.028.
- [13] Ghosh S, Adhikary A, Chakraborty S, et al. Cross-talk between endoplasmic reticulum (ER) stress and the MEK/ERK pathway potentiates apoptosis in human triple negative breast carcinoma cells: role of a dihydropyrimidone, nifetepimine [J]. J Biol Chem, 2015, 290(7):3936-3949. DOI:10.1074/jbc.M114.594028.
- [14] Li G, Luna C, Qiu J, et al. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6):2999-3007. DOI:10.1167/iovs.10-6708.
- [15] Wang L, Zhuo Y, Liu B, et al. Pro370Leu mutant myocilin disturbs the endoplasmic reticulum stress response and mitochondrial membrane potential in human trabecular meshwork cells [J]. Mol Vis, 2007, 13 : 618 - 625.
- [16] 王淑雅,华宁,李筱荣. PERK 通路介导的内质网应激与眼科疾病研究进展 [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48 (8) : 759 - 762. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.08.021.
Wang SY, Hua N, Li XR. Research of eye diseases associated with PERK mediated endoplasmic reticulum stress [J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 48 (8) : 759 - 762. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.08.021.
- [17] Li M, Xu J, Chen X, et al. RNA interference as a gene silencing therapy for mutant MYOC protein in primary open angle glaucoma [J/OL]. Diagn Pathol, 2009, 4 : 46 [2016 - 04 - 11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801471/. DOI:10.1186/1746-1596-4-46.
- [18] Pi L, Li X, Song Q, et al. Knockdown of glucose-regulated protein 78 abrogates chemoresistance of hypopharyngeal carcinoma cells to cisplatin induced by unfolded protein in response to severe hypoxia [J]. Oncol Lett, 2014, 7(3):685-692. DOI:10.3892/ol.2013.1753.
- [19] Joe MK, Sohn S, Hur W, et al. Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3):592-600.
- [20] Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2014, 7 : 25 - 34. DOI:10.2147/DMSO.S37649.
- [21] Zhou Y, Shu F, Liang X, et al. Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(2):e89021 [2016 - 03 - 23]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3923868/. DOI:10.1371/journal.pone.0089021.
- [22] Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, et al. GRP78 suppresses lipid peroxidation and promotes cellular antioxidant levels in glial cells following hydrogen peroxide exposure [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1):e86951 [2016 - 03 - 11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3901711/. DOI:10.1371/journal.pone.0086951.

(收稿日期:2016-09-20)

(本文编辑:刘艳)

· 病例报告 ·

Valsalva 视网膜病变合并黄斑病变一例

解正高 陈放 陈曦 朱霞 马远东

225001 扬州大学临床医学院眼科 江苏省苏北人民医院眼科(解正高、陈放、陈曦);
211400 南京鼓楼医院集团仪征医院眼科(朱霞);211400 扬州市仪征中医院眼科(马远东)

通信作者:解正高, Email: zgxie87@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.04.005

患者,男,34岁,因俯卧撑后左眼视力骤降半天于苏北人民医院眼科就诊。患眼既往屈光度为-1.50 DS,否认其他眼部疾病、高血压、糖尿病病史。全身检查未见明显异常。眼部检查:右眼裸眼视力0.5,矫正视力1.0(-1.50 DS),左眼数指/50 cm,不能矫正;眼压右眼18 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼15 mmHg。双眼外眼及眼前节未见明显异常。眼底检查见左眼黄斑区视网膜前出血,并形成液平面,直径约3 PD,呈盘状隆起,周边视网膜未见异常(图1A);右眼底未见异常。B型超声示左眼黄斑前中等回声(图1B),OCT显示左眼黄斑区内界膜下隆起,其下方为中等反射区(图1C)。临床诊断:左眼Valsalva视网膜病变。给予卵磷脂络合碘片口服,每天3次。

发病后3个月复诊,检眼镜下可见左眼黄斑区出血明显吸收,视力提升至0.12,OCT显示黄斑区内界膜隆起高度下降,中等反射区面积缩小,其下神经纤维层增厚,伴囊腔形成(图2)。发病后9个月复诊左眼黄斑区出血已完全吸收,矫正视力0.9,OCT显示黄斑中心凹处内界膜平伏,但除内界膜和色素上皮层光带连续外,其他8层神经上皮层光带断裂,提示黄斑板层裂孔形成(图3)。发病后17个月时复查情况无变化,目前仍在继续随访中。

讨论:Valsalva视网膜病变由Duane^[1]于1972年报道,为Valsalva动作导致胸腔压力增高,使黄斑周围浅层毛细血管破裂,引起视网膜前出血,常见诱因有剧烈咳嗽、用力擤鼻涕、