

鼠尾草酸对急性高眼压模型大鼠视网膜神经节细胞的保护作用

何理焯 梁亮 朱梦男 肖长义 涂晓坤

443000 湖北省宜昌市, 三峡大学第一临床医学院眼科 三峡大学眼科与视觉科学研究所

通信作者: 梁亮, Email: liangliang419519@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.04.005

【摘要】 目的 观察鼠尾草酸对急性高眼压模型大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)的保护作用。方法 采用抽签法将 60 只雄性 8~12 周龄 SPF 级 SD 大鼠随机分为正常对照组、鼠尾草酸组和模型对照组, 每组 20 只。正常对照组大鼠不接受任何处理; 鼠尾草酸组和模型对照组大鼠左眼采用前房内生理盐水灌注法将眼压升至 110 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa) 60 min 制备急性高眼压模型; 鼠尾草酸组大鼠于造模后腹腔内注射鼠尾草酸(溶于 DMSO) 25 mg/(kg·d) 连续 7 d, 模型对照组大鼠以同样的方法注射 DMSO。造模后 2 周各组任意取 10 只大鼠实验眼制备视网膜切片行苏木精-伊红染色及 TUNEL 染色, 观察大鼠视网膜形态学变化及 RGCs 凋亡情况, 另取 10 只大鼠制备视网膜铺片行 RGCs 免疫荧光染色, 计算大鼠存活的 RGCs 数目。结果 苏木精-伊红染色显示, 正常对照组大鼠视网膜结构清晰, RGCs 数目多且排列紧密, 细胞核边界清晰。模型对照组大鼠视网膜高度水肿, RGCs 排列疏松, 细胞核肿胀。鼠尾草酸组大鼠视网膜结构较为清晰, RGCs 排列较模型对照组整齐。正常对照组、模型对照组和鼠尾草酸组大鼠视网膜神经纤维层(RNFL)厚度分别为(32.96±1.63)、(58.96±1.57)和(50.11±2.37) μm; 各组大鼠 RGCs 细胞凋亡数分别为(6.92±2.96)、(29.85±6.40)和(14.69±2.98)个/视野; 各组大鼠存活的 RGCs 数分别为(2363.17±148.45)、(1308.67±106.02)和(1614.17±96.39)个/0.235 mm², 组间总体比较差异均有统计学意义($F=339.284, 81.583, 122.68$, 均 $P<0.01$)。与正常对照组比较, 模型对照组 RNFL 明显变薄, RGCs 凋亡数明显增加, 存活的 RGCs 数目明显减少; 与模型对照组大鼠比较, 鼠尾草酸组大鼠 RNFL 厚度值明显下降, RGCs 凋亡数明显减少, 存活的 RGCs 数目明显增加, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。结论 一定剂量的鼠尾草酸能明显减少急性高眼压导致的大鼠 RGCs 凋亡, 对 RGCs 具有保护作用。

【关键词】 高眼压; 视网膜神经节细胞; 视网膜神经纤维层; 迷迭香; 植物提取物/治疗用途; 凋亡; 动物模型; SD 大鼠

基金项目: 湖北省卫生计生委青年人才项目 (WJ2017Q037)

Protective effects of carnosic acid on retinal ganglion cells in acute ocular hypertension rats model He Liye, Liang Liang, Zhu Mengnan, Xiao Changyi, Tu Xiaokun
Department of Ophthalmology, The First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang 443000, China
Corresponding author: Liang Liang, Email: liangliang419519@163.com

【Abstract】 Objective To observe the protective effects of carnosic acid on retinal ganglion cells (RGCs) in acute ocular hypertension rats model. **Methods** Sixty male SPF SD rats (8-12 weeks) were randomly assigned to normal control group, carnosic-acid treated group and model control group with 20 rats for each group. The acute ocular hypertension animal model was induced by the perfusion of normal saline solution into anterior chamber of eyes to elevate the intraocular pressure (IOP) to 110 mmHg for 60 minutes in the rats of the carnosic-acid treated group and model control group, and then the carnosic-acid (dissolving in DMSO) was intraperitoneally injected for consecutive 7 days in the carnosic-acid treated group, and only DMSO was injected in the same way in the model control group. The rats were sacrificed 2 weeks after experiment and retinal sections were prepared for histopathological and apoptotic retinal ganglion cells (RGCs) examination by hematoxylin & eosin staining and TUNEL staining, and immunofluorescence was employed to examine the survival cell number of RGCs. This study protocol was approved by the Ethic Committee for Experimental Animal of Three Gorges University. **Results** The retinal morphology and structure were clear in the normal control group. The edema of retinal tissue, loosely arranged RGCs and swollen nucleus were seen in the model control group. In the carnosic-acid treated group, the retinal morphology and structure were regular. The retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness was (32.96±1.63), (58.96±1.57) and (50.11±2.37) μm, and the apoptotic cell number was (6.92±2.96), (29.85±6.40) and (14.69±2.98)/field, and the survived cell number was (2363.17±148.45), (1308.67±106.02) and (1614.17±96.39)/

0.235 mm² in the normal control group, model control group and carnosic-acid treated group, respectively, with significant differences among the groups ($F=339.284, 81.583, 122.68$, all at $P<0.01$). Compared with the normal control group, the RNFL thickness was thickened, the number of apoptotic RGCs was much more and the number of survived RGCs was decreased in the model control group, with significant differences (all at $P<0.01$). In the carnosic-acid treated group, the RNFL thickness was thinner, the number of apoptotic RGCs was reduced and the number of survived RGCs was increased in comparison with the normal control group, with significant differences (all at $P<0.01$). **Conclusions** Carnosic-acid plays a protective effect on RGCs by inhibiting the cell apoptosis in acute ocular hypertension rats.

[Key words] Ocular hypertension; Retinal ganglion cells; Retinal nerve fiber layer; Rosmarinus; Plant extracts/therapeutic use; Apoptosis; Disease models, animal; Rats, Sprague-Dawley

Fund program: Hubei Health and Family Planning Commission Youth Talent Project (WJ2017Q037)

青光眼是目前全球范围内不可逆盲的主要病因。目前认为青光眼的发病是多因素综合作用的结果,但其病理结局是视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的凋亡^[1]。近年来的研究证据表明,氧化应激与青光眼 RGCs 凋亡过程有关^[2]。寻找一种具有抗氧化功能、对 RGCs 具有保护作用的药物成为国内外青光眼视神经保护研究领域的热点。鼠尾草酸是从迷迭香中提取的抗氧化多酚成分,具有抗氧化、抗炎等多种药理活性^[3]。体外实验研究证实其能够一定程度地抑制 Cu²⁺/H₂O₂反应体系且有神经营养活性^[4-6]。眼科相关的动物实验和离体细胞学研究表明,鼠尾草酸的抗氧化作用对光和氧化引起的视网膜黄斑损伤以及色素性视网膜炎疾病均有防治作用^[7],基于青光眼 RGCs 损伤与上述疾病有部分共同的发病机制,我们推测鼠尾草酸可用于青光眼视神经保护,但目前鲜见相关研究。本研究观察鼠尾草酸在急性高眼压大鼠 RGCs 细胞氧化损伤中对 RGCs 的保护作用,为鼠尾草酸类抗氧化药物治疗青光眼性视神经损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 8~12 周龄 SPF 级 SD 大鼠 60 只,体质量 230~250 g,由三峡大学实验动物中心提供(质量合格证:42010200000521、42010200000418)。大鼠眼屈光间质清,眼底无明显异常,以 5 只/笼按 SPF 级标准饲养于 12 h 明/12 h 暗交替屏障环境中,实验动物操作及饲养均在三峡大学动物中心进行。本课题方案经三峡大学动物实验伦理委员会审查批准(批文号:2016120A),符合三峡大学实验动物伦理标准。

1.1.2 主要试剂及仪器 TUNEL 原位凋亡试剂盒(瑞士罗氏公司);DAB 显色剂(丹麦 DAKO 公司); β III Tubulin 抗体(ab52623,美国 Abcam 公司);山羊抗兔 Cy3 荧光标记抗体(武汉谷歌生物科技有限公司);鼠

尾草酸(成都普菲德生物技术有限公司)。眼科显微手术器械(苏州六六视觉公司);手术显微镜(德国 Zeiss 公司);图像采集系统(德国莱卡公司);倒置荧光显微镜(NIKONECLIPSETI-SR,日本尼康公司)。

1.2 方法

1.2.1 急性高眼压模型的建立及分组 采用抽签法将 60 只大鼠随机分为正常对照组、鼠尾草酸组和模型对照组,正常对照组不行任何干预,鼠尾草酸组及模型对照组大鼠左眼均制备急性高眼压模型,右眼不给予任何干预。造模前用质量分数 2% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉大鼠,将含 500 ml 质量分数 0.9% 氯化钠注射液的容器挂在输液架上,容器高于大鼠眼球水平约 150 cm。将注射针于大鼠眼球角巩膜缘处进针,进入前房中央并灌注生理盐水 60 min,使眼压升至 110 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。操作时避免伤及虹膜及晶状体。双眼角膜表面放置生理盐水棉片,防止角膜干燥。术毕待大鼠清醒后送回动物房。因鼠尾草酸不溶于水而易溶于有机溶剂,故实验中鼠尾草酸溶解于常用溶剂 DMSO。鼠尾草酸组大鼠于造模后腹腔内注射鼠尾草酸溶液 25 mg/(kg·d),溶于溶剂 DMSO 至 0.15 ml,连续注射 7 d,模型对照组大鼠以同样的方法注射等容量药物溶剂 DMSO 0.15 ml。目前,青光眼视神经损害主要集中于 RGCs 层及视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL),故本研究主要观察 RGCs 和 RNFL 变化。

1.2.2 常规组织病理学方法检查大鼠视网膜结构 任意取各组 10 只大鼠的实验眼用质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋,在视神经处制作 5 μ m 厚连续切片,60 $^{\circ}$ C 烤片 20 min;常规行苏木精-伊红染色,切片脱蜡至水,苏木素浸染 10 min,流水冲洗 1 min,体积分数 1% 盐酸乙醇分化 20 s,水洗 10 min,质量分数 1% 伊红染色 2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后显微镜下观察并拍照,根据染色测定距视神经节中心 2 PD 的视网膜处 RNFL 厚度。

1.2.3 TUNEL 染色法检测 RGCs 凋亡 将 1.2.2 中包埋好的眼球组织切片脱蜡至水。用体积分数 3% 双氧水室温下避光孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 微波修复 2 次, 每次 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。每张切片滴加 TUNEL 试剂盒混合液 30 μ l, 37 $^{\circ}$ C 下湿盒中孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。每张切片滴加适量 converter-POD 覆盖组织, 37 $^{\circ}$ C 下湿盒中孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。质量分数 3% BSA 覆盖整个组织, 室温封闭 30 min。每张切片滴加一抗 (1:200) 覆盖组织, 湿盒 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。DAPI 复染细胞核, 避光室温孵育 10 min, 加抗荧光淬灭封片剂封片。倒置荧光显微镜下观察。高倍镜下随机选取每张切片的 5 个视野进行观察, 计算 TUNEL 阳性 RGCs 平均数。

1.2.4 免疫荧光法检测存活 RGCs 数目 取各组另 10 只大鼠实验眼制备视网膜铺片, 手术显微镜下用角膜剪沿锯齿缘剪除眼前段, 去除后段玻璃体。用无齿镊和有齿镊小心将视网膜与色素上皮层分离, 从视网膜周边对称位置向视盘做 4 个垂直切口。用毛笔将视网膜置于 4% 多聚甲醛中固定 60 min; 蘸干, 用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 加封闭液 (含体积分数 10% 羊血清和质量分数 0.3% Triton-X100, 用 PBS 稀释), 室温下封闭 1 h; PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 添加 β III Tubulin 一抗 (1:100 用封闭液稀释), 湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 d; PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 添加二抗 (Cy3; 1:100 用 PBS 稀释), 湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 甘油封片, 荧光显微镜下采用绿色荧光激发 Cy3。采用 LEICA 图像采集软件进行图片分析, 采用盲法选择每个视网膜的 20~30 个区域进行阳性细胞计数, 取平均值, 存活 RGCs 数 = 平均存活 RGCs 数 / 0.235 mm²。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间方差经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组单因素干预三水平研究设计, 正常对照组、模型对照组和鼠尾草酸组大鼠 RNFL 厚度、RGCs 凋亡数和存活 RGCs 数目的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*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 各组大鼠视网膜组织结构变化

光学显微镜下发现正常对照组大鼠视网膜组织层

次清晰, 结构分明, 主要有 3 层细胞以及相应的丛状层结构组成, 细胞层从内到外依次为 RGCs 层、内核层 (inner nuclear layer, INL) 和外核层 (outer nuclear layer, ONL), 各层细胞排列规整, RNFL 结构正常, 组织无水肿, RGCs 为单层排列, 大小和形态基本接近, 细胞核清晰。细胞大小稍有不一, 与切面相关 (图 1A)。模型对照组大鼠各层视网膜水肿, RNFL 组织疏松, RGCs 排列疏松, 数目减少, 部分 RGCs 细胞核肿胀、溶解、碎裂 (图 1B)。鼠尾草酸组大鼠视网膜水肿, RNFL 水肿程度较模型对照组大鼠明显减轻, 各层次结构较清晰, RGCs 细胞排列稍紊乱, RGCs 形态接近正常, 部分细胞细胞核肿胀或裂解, 但与模型对照组大鼠比较程度较轻 (图 1C)。

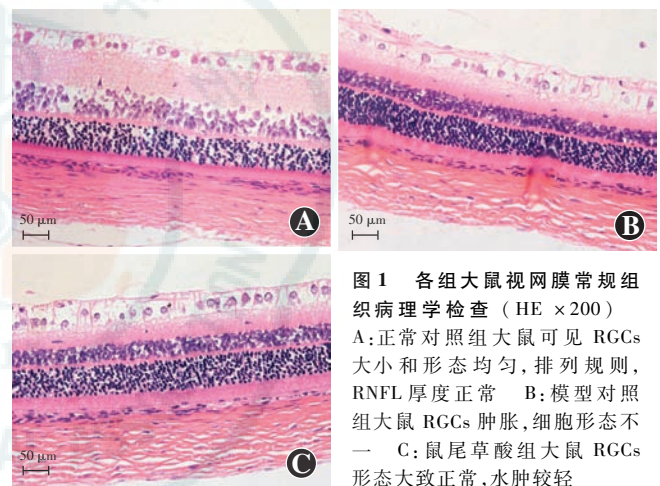


图 1 各组大鼠视网膜常规组织病理学检查 (HE $\times 200$)
A: 正常对照组大鼠可见 RGCs 大小和形态均匀, 排列规则, RNFL 厚度正常 B: 模型对照组大鼠 RGCs 肿胀, 细胞形态不一 C: 鼠尾草酸组大鼠 RGCs 形态大致正常, 水肿较轻

2.2 各组大鼠 RNFL 厚度变化

造模后 2 周大鼠视网膜全层水肿, 以 RNFL 为甚。模型对照组及鼠尾草酸组大鼠较正常对照组大鼠 RNFL 厚度均显著增厚, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 339.284, P < 0.01$), 其中鼠尾草酸组大鼠 RNFL 厚度值低于模型对照组而高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 1)。

表 1 各组大鼠 RNFL 厚度比较 ($\bar{x} \pm s, \mu$ m)

组别	样本量	RNFL 厚度
正常对照组	10	32.96 \pm 1.63
模型对照组	10	58.96 \pm 1.57 ^a
鼠尾草酸组	10	50.11 \pm 2.37 ^{ab}
<i>F</i> 值		339.284
<i>P</i> 值		0.000

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RNFL: 视网膜神经纤维层

2.3 各组大鼠 RGCs 凋亡数目的比较

正常对照组大鼠视网膜可见散在 TUNEL 阳性细

胞,呈绿色荧光;模型对照组大鼠视网膜可见大量 TUNEL 阳性细胞,鼠尾草酸组大鼠视网膜可见少量 TUNEL 阳性细胞。正常对照组、模型对照组和鼠尾草酸组大鼠 RGCs 凋亡数分别为 (6.92 ± 2.96) 、 (29.85 ± 6.40) 和 (14.69 ± 2.98) 个/视野,组间总体比较差异有统计学意义 ($F=81.583, P<0.01$),其中模型对照组大鼠 RGCs 凋亡数较正常对照组明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.01$),鼠尾草酸组大鼠 RGCs 凋亡数明显低于模型对照组而高于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 2)。

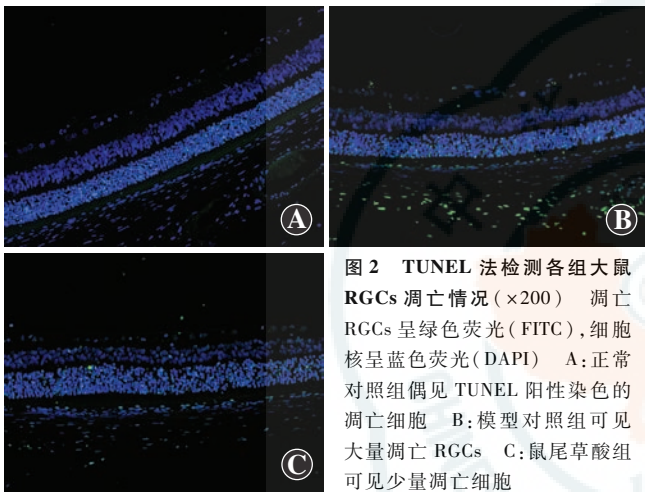


图 2 TUNEL 法检测各组大鼠 RGCs 凋亡情况 ($\times 200$) 凋亡 RGCs 呈绿色荧光 (FITC),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A:正常对照组偶见 TUNEL 阳性染色的凋亡细胞 B:模型对照组可见大量凋亡 RGCs C:鼠尾草酸组可见少量凋亡细胞

2.4 各组大鼠视网膜中存活 RGCs 数比较

荧光显微镜下可见正常对照组大鼠存活的 RGCs 数量多,排列致密,模型对照组大鼠 RGCs 分布稀疏,存活的 RGCs 数量少,鼠尾草酸组大鼠存活的 RGCs 数量多于模型对照组,但少于正常对照组。正常对照组、模型对照组和鼠尾草酸组大鼠存活的 RGCs 数分别为 $(2\,363.17 \pm 148.45)$ 、 $(1\,308.67 \pm 106.02)$ 和 $(1\,281.67 \pm 84.30)$ 个/ 0.235 mm^2 ,组间总体比较差异有统计学意义 ($F=122.68, P<0.01$),其中模型对照组大鼠存活的 RGCs 数明显少于正常对照组,鼠尾草酸组大鼠存活的 RGCs 明显高于模型对照组但低于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 3)。

3 讨论

青光眼的发病与多种因素有关,包括机械压力、缺血、氧化应激、自身免疫、遗传等,其病理结局是 RGCs 的凋亡。研究证据表明,单纯降低眼压并不能有效地阻止 RGCs 凋亡所引起的视功能损害^[8],并且目前尚无确切的证据证实临床用药对 RGCs 具有保护作用。

近年来,关于氧化应激引起青光眼 RGCs 凋亡机制的研究日益受到关注,氧化应激与线粒体衰竭在青

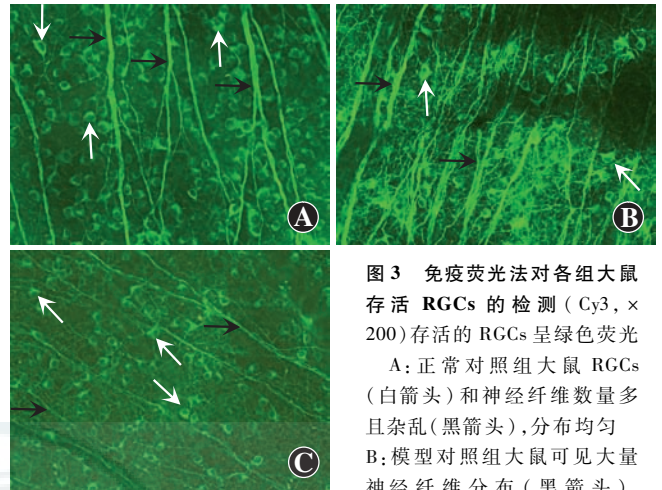


图 3 免疫荧光法对各组大鼠存活 RGCs 的检测 (Cy3, $\times 200$) 存活的 RGCs 呈绿色荧光 A:正常对照组大鼠 RGCs (白箭头) 和神经纤维数量多且杂乱 (黑箭头),分布均匀 B:模型对照组大鼠可见大量神经纤维分布 (黑箭头),

RGCs 分布稀疏 (白箭头) C:鼠尾草酸组大鼠存活的 RGCs 多于模型对照组 (白箭头),神经纤维排列规则 (黑箭头)

光神经退行性病变发病机制中的作用研究进一步阐明氧化应激作用与青光眼发生和进展的关系^[2]。氧化应激作用的核心研究目标主要聚焦于线粒体的功能。RGCs 细胞质中富含线粒体,生理活动中就可以产生大量的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS),在高眼压以及低血流灌注等病理状态下,细胞摄取和清除 ROS 能力下降,导致自由基和脂质过氧化产物增多,自由基可直接攻击细胞膜及各种质膜,使其发生脂质过氧化反应,破坏膜的通透性、流动性以及离子转运功能,造成细胞代谢功能障碍及线粒体肿胀并失去其功能,激活 caspase 等信号通路引起细胞凋亡^[9-11]。已有研究表明,ROS 参与眼科疾病的发生,在青光眼疾病中 ROS 还可以诱导蛋白修饰,从而增加神经元损伤敏感性,触发脂质、蛋白质和核酸损伤^[12-13]。因此抗氧化治疗逐渐成为视神经保护的新策略。

鼠尾草酸是抗氧化多酚,近年来有研究发现,鼠尾草酸通过抑制 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应体系中羰基化程度而抑制牛血清蛋白和肝匀浆蛋白经 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应体系作用后造成的氧化损伤,但是过高剂量的鼠尾草酸 ($100\ \mu\text{mol/L}$) 对 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应体系诱导羰基化和氧化损伤起到促进作用^[4]。鼠尾草酸还可提高神经元内过氧化物歧化酶活性并显著降低细胞内丙二醛含量,提高神经元的活性,减弱 H_2O_2 所造成的神经元氧化应激损伤^[14]。大脑及眼相关疾病的研究发现,5 ~ $10\ \mu\text{mol/L}$ 鼠尾草酸能下调 $\text{A}\beta$ 损伤引起的海马神经元 caspase-3 mRNA 的表达,逆转 $\text{A}\beta$ 引起的海马神经元细胞活性的降低^[15]。鼠尾草酸对离体的 PC12 细胞具有神经营养活性,是抗衰老和治疗阿尔茨海默症的潜在中草药^[5,16],同时在动物以及细胞学研究中也发现其对光照和氧化引起的视网膜黄斑变性以及色素性视

网膜炎疾病中对细胞有保护作用^[7]。鼠尾草酸还具有一定的抗癌作用,与 1,25(OH)₂D₃、全反式维甲酸联合应用可增强这些药物的疗效^[17-18]。

本研究采用前房生理盐水灌注法制备高眼压模型,观察到眼睑、结膜苍白,直接检眼镜下眼底视网膜色苍白、血管断流,表明已造成缺血性改变^[19-21],是常用的急性青光眼造模方法。本研究发现,高眼压导致 RNFL 增厚,RGCs 凋亡及 RGCs 存活数目减少。模型鼠用鼠尾草酸干预后能降低 RNFL 增厚的幅度,减少 RGCs 凋亡数目,使 RGCs 存活数目增多,证实青光眼急性视神经损害中,氧化应激途径在 RGCs 的损伤中起到了关键作用,并提示鼠尾草酸对 RGCs 有保护作用。本实验中鼠尾草酸是从迷迭香中提取的单体成分,本研究结果说明鼠尾草酸可能是迷迭香提取物中治疗青光眼 RGCs 损害的有效成分之一。目前,关于中成药及其提取物在青光眼视神经损害疾病中对 RGCs 保护作用的研究受到关注,但研究的药物均为混合剂及联合用药制剂,无法辨别有效的药物成分,需要深入进行药物单体研究。

鉴于 SD 大鼠的 RGCs 与在体的人 RGCs 有一定差别,不同种属的 RGCs 对各种损伤的反应以及耐受性也不尽相同,同时本研究的结果主要是基于细胞的形态学分析,还缺少离体细胞层面的研究以及特定凋亡通道及因子的研究,所以鼠尾草酸保护 RGCs 的确切机制还有待进一步研究。

志谢 感谢湖北宜昌中心人民医院中心实验室在本研究实施过程中提供的技术支持

参考文献

- [1] Varma R, Lee PP, Goldberg I, et al. An assessment of the health and economic burdens of glaucoma[J]. *Am J Ophthalmol*, 2011, 152(4): 515-522. DOI:10.1016/j.ajo.2011.06.004.
- [2] Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Gallego-Pinazo R, et al. Oxidative stress and mitochondrial failure in the pathogenesis of glaucoma neurodegeneration[J]. *Prog Brain Res*, 2015, 220: 127-153. DOI:10.1016/bs.pbr.2015.06.001.
- [3] 夏田娟, 毕良武, 赵振东, 等. 鼠尾草酸的抗氧化活性及抑菌活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(1): 35-40.
- [4] 相启森, 孟旭, 乔燕, 等. 鼠尾草酸对自由基诱导蛋白质氧化损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 281-284. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201315058.
Xiang QS, Meng X, Qiao Y, et al. Effect of carnosic acid on free radical-mediated oxidative damage to proteins[J]. *Food Sci*, 2013, 34(15): 281-284. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201315058.
- [5] Maruoka H, Sasaya H, Sugihara K, et al. Low-molecular-weight compounds having neurotrophic activity in cultured PC12 cells and neurons[J]. *J Biochem*, 2011, 150(5): 473-475. DOI:10.1093/jb/mvr113.
- [6] Tai J, Cheung S, Wu M, et al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(5): 436-443. DOI:10.1016/j.phymed.2011.12.012.
- [7] Rezaie T, McKercher SR, Kosaka K, et al. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(12): 7847-7854. DOI:10.1167/iiov.12-10793.
- [8] The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators[J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 130(4): 429-440.
- [9] Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(11): 1323-1367.
- [10] Trinei M, Migliaccio E, Bernardi P, et al. p66Shc, mitochondria, and the generation of reactive oxygen species[J]. *Methods Enzymol*, 2013, 528: 99-110. DOI:10.1016/B978-0-12-405881-1.00006-9.
- [11] Namekata K, Kimura A, Kawamura K, et al. Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(9): 1250-1256. DOI:10.1038/cdd.2013.91.
- [12] Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes[J]. *Clin Interv Aging*, 2014, 9: 637-652. DOI:10.2147/CIA.S52662.
- [13] Galbis-Estrada C, Pons-Vázquez S, Gallego-Pinazo R, et al. Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (ADH3) and low km mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). New evidence for differential expression in the rat retina in response to oxidative stress[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(1): 77-84. DOI:10.3109/10715762.2011.640324.
- [14] 魏静, 胡炜彦, 张兰春, 等. 鼠尾草酸稳定性及对 H₂O₂ 损伤神经元的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 43-46. DOI:10.13412/j.cnki.zyy.2016.02.013.
- [15] 胡炜彦, 于浩飞, 张荣平. 鼠尾草酸对 Aβ 损伤海马神经元的保护作用研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(4): 490-493. DOI:10.16333/j.1001-6880.2014.04.010.
- [16] Zhang D, Lee B, Nutter A, et al. Protection from cyanide-induced brain injury by the Nrf2 transcriptional activator carnosic acid[J]. *J Neurochem*, 2015, 133(6): 898-908. DOI:10.1111/jnc.13074.
- [17] Tai J, Cheung S, Wu M, et al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(5): 436-443. DOI:10.1016/j.phymed.2011.12.012.
- [18] Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, et al. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2010, 65(2): 158-163. DOI:10.1007/s11130-010-0166-4.
- [19] Goldblum D, Mittag T. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye[J]. *Vision Res*, 2002, 42(4): 471-478.
- [20] Unoki K, La Vail MM. Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(3): 907-915.
- [21] Kara S, Gencer B, Karaca T, et al. Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats[J/OL]. *Sci World J*, 2014, 2014: 797824 [2017-01-03]. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/797824/>.

(收稿日期:2017-01-03 修回日期:2018-03-02)

(本文编辑:尹卫靖)