

· 实验研究 ·

依达拉奉对视网膜脱离模型大鼠早期感光细胞自噬的调控作用

康紫薇¹ 任秀瑜² 张妍春² 裴澄¹ 张娜娜³ 夏益敏⁴ 杨菁茹⁴¹西安交通大学第一附属医院 710049; ²西安市人民医院(西安市第四医院) 陕西省眼科医院 西安市眼底病研究所 西安交通大学医学院附属广仁医院眼科 710004; ³西安交通大学癌症研究所 710061; ⁴西安市人民医院(西安市第四医院) 病理科 710004

通信作者:张妍春, Email: zhangyanchun1239@126.com; 裴澄, Email: peich71@163.com

【摘要】 目的 研究氧自由基清除剂依达拉奉对视网膜脱离(RD)模型大鼠早期视网膜自噬的调控及感光细胞的保护作用。方法 取 51 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠进行 RD 造模,另取 24 只大鼠作为 PBS 注射组。造模组采用右视网膜下注射 0.5% 透明质酸钠的方法制作 RD 动物模型。将造模成功大鼠按照随机数字表法随机分为 RD 模型组和依达拉奉治疗组。依达拉奉治疗组造模后连续给予 3 mg/kg 依达拉奉腹腔内注射,每天 2 次,PBS 注射组和 RD 模型组腹腔注射等容量 0.9% 氯化钠溶液。分别于造模后 1、3、7 d 处死动物并取材。收集眼内液并检测总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性及丙二醛(MDA)含量。Western blot 法检测视网膜组织中超氧化物歧化酶 2(SOD2)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、自噬相关基因 4(Atg4)、微管相关蛋白质 1 轻链 3(LC3)蛋白表达。全眼球石蜡切片 TUNEL 染色分析感光细胞凋亡情况。结果 所有 RD 模型组视网膜脱离范围均>60%。不同时间点各组眼内液中 MDA 含量和 T-SOD 活性总体比较,差异均有统计学意义(MDA: $F_{\text{分组}} = 385.513, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 13.021, P < 0.01$; T-SOD: $F_{\text{分组}} = 48.865, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 7.700, P = 0.003$);与 PBS 注射组相比,造模后 1、3、7 d RD 模型组和依达拉奉治疗组眼内液 MDA 含量显著升高,T-SOD 活性显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 RD 模型组比较,造模后 1、3、7 d 依达拉奉治疗组 MDA 含量显著降低,T-SOD 活性显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 PBS 注射组相比,RD 模型组和依达拉奉治疗组造模后 1、3、7 d 视网膜中 SOD2 和 Nrf2 蛋白相对表达量显著升高,造模后 1、3 d 视网膜中 Atg4、LC3B-II/LC3B-I 相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 RD 模型组比较,依达拉奉治疗组造模后 1、3、7 d 视网膜中 SOD2 相对表达量显著升高,造模后 1、3 d 视网膜中 Nrf2 蛋白相对表达量显著升高,造模后 3 d 视网膜中 Atg4、LC3B-II/LC3B-I 蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。PBS 注射组各时间点未见明显阳性染色细胞,RD 模型组造模后 1、3 和 7 d 均可见感光细胞 TUNEL 阳性染色细胞,视网膜 caspase-3 水平较 PBS 注射组显著升高,依达拉奉治疗组造模后 1、3、7 d 感光细胞凋亡指数及视网膜 caspase-3 水平较 RD 模型组显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 采用依达拉奉每天 2 次腹腔内注射能明显提高 RD 大鼠视网膜的抗氧化能力,调控视网膜自噬,减轻 RD 早期感光细胞凋亡的发生。

【关键词】 视网膜脱离; 依达拉奉; 自噬; 感光细胞凋亡

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(2015JM8408); 陕西省中医管理局中医药科研课题面上项目(JCMS063); 陕西省重点研发计划项目(2021SF-162); 西安市科技计划重大项目[201805104YX12SF38(3)]; 西安市第四医院科研孵化基金项目(FZ-26)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200228-00123

Regulatory effect of edaravone on the photoreceptor autophagy at the early stage of experimental retinal detachment in ratsKang Ziwei¹, Ren Xiuyu², Zhang Yanchun², Pei Cheng¹, Zhang Nana³, Xia Yimin⁴, Yang Jingru⁴

¹First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; ²Shaanxi Eye Hospital, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an Ocular Fundus Disease Research Institute, Affiliated Guangren Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, China; ³Cancer Research Institute of Basic Medical Science School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ⁴Pathology Department of Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China

Corresponding authors: Zhang Yanchun, Email: zhangyanchun1239@126.com; Pei Cheng, Email: peich71@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of edaravone, a free radical scavenger, on the regulation of retinal autophagy and the protection of photoreceptor cells at the early stage of experimental retinal detachment (RD) in rats. **Methods** Fifty-one adult male Sprague-Dawley rats were used for RD model establishment, and another 24 rats were served as PBS injection group. The RD model was established via subretinal injection of 0.5% sodium hyaluronate into the right eye of the rats and the rats with successful modeling were randomly divided into RD model group and edaravone treatment group. The rats in the edaravone treatment group were given edaravone of 3 mg/kg intraperitoneally, twice a day after modeling, and the rats in the PBS injection group and RD model group were given equal volume of normal saline. Rats were sacrificed on the 1st day, 3rd day and 7th day following modeling. The T-superoxide dismutase (T-SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in the intraocular fluid was detected. The expression levels of superoxide dismutase 2 (SOD2), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), autophagy related gene 4 (Atg4), microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) and other proteins in retinal tissue were identified by Western blot analysis. TUNEL staining was performed on paraffin sections of the whole eyeball to analyze the apoptosis of photoreceptor cells. The study protocol was approved by an Ethics Committee of Xi'an Fourth Hospital (No. 2016016). The use and care of animals complied with the Regulations on the Administration of Experimental Animals. **Results** The RD area was more than 60% in rat eyes of RD model. There were significant differences in MDA content and T-SOD activity among different groups at various time points (MDA: $F_{\text{group}} = 385.513, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 13.021, P < 0.01$. T-SOD: $F_{\text{group}} = 48.865, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 7.700, P = 0.003$). Compared with the PBS injection group, the MDA concentration was significantly increased and the T-SOD activity was significantly decreased in the RD group and edaravone treatment group on the 1st, 3rd and 7th day after modeling (all at $P < 0.05$). The MDA concentration was significantly reduced and the T-SOD activity was significantly elevated in the edaravone treatment group on the 1st, 3rd and 7th day after modeling in comparison with those of the RD group (all at $P < 0.05$). Compared with the PBS injection group, the relative expression levels of SOD2 and Nrf2 proteins were significantly increased in the RD group and edaravone treatment group on the 1st, 3rd and 7th day after modeling (all at $P < 0.05$), and Atg4 and LC3B-II/LC3B-I were significantly increased on the 1st, 3rd and 7th day after modeling (all at $P < 0.05$). The expression level of SOD2 in the edaravone treatment group was significantly higher than that in the RD group on the 1st, 3rd and 7th day after modeling (all at $P < 0.05$), and the expression level of Nrf2 was significantly increased in the edaravone treatment group on the 1st and 3rd day after modeling compared with that of the RD group (both at $P < 0.05$), and the expression levels of Atg4 and LC3B-II/LC3B-I were significantly increased in the edaravone treatment group on the 3rd day after modeling in comparison with those of the RD group (both at $P < 0.05$). No significant TUNEL positive cells were observed in PBS injection group at all time points, and TUNEL positive cells were observed on the 1st, 3rd and 7th day after modeling in the RD group, and the expression level of caspase-3 in the RD group was significantly increased in comparison with that of the PBS injection group ($P < 0.05$). The apoptosis of photoreceptor cells and the expression level of caspase-3 in edaravone treatment group were significantly decreased in comparison with those of the RD group on the 1st, 3rd and 7th day after modeling (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The intraperitoneal injection of edaravone, twice a day, can significantly improve the antioxidant capacity of the retina after experimental RD in rats, regulate retinal autophagy and reduce the apoptosis of photoreceptor cells in early-stage RD.

[Key words] Retinal detachment; Edaravone; Autophagy; Photoreceptor cell apoptosis

Fund program: Shaanxi Provincial Natural Science Basic Research Program (2015JM8408); Traditional Chinese Medicine Scientific Research Program of Shaanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (JCMS063); Major Research and Development Project of Shaanxi province (2021SF-162); Xi'an Science and Technology Major Program (201805104YX12SF38 [3]); Incubation Fund Program of Xi'an Fourth Hospital (FZ-26)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200228-00123

视网膜神经感觉层与色素上皮层之间的黏附力较弱,易发生视网膜脱离(retinal detachment, RD)及视网膜下液滞留,是许多眼底疾病,如年龄相关性黄斑变性等发生和发展过程中常伴发的病理现象^[1]。尽管目前通过手术治疗可使 90% 以上的原发性 RD 解剖复位,但是术后大多数患者视功能丢失严重^[2]。研究表明,感光细胞死亡是 RD 后视功能发生永久性损伤的主要原因, RD 降低视网膜外层氧及营养供应,使感光

细胞层处于低氧状态,产生大量氧自由基,进而导致感光细胞凋亡^[3-4]。然而,神经上皮层与色素上皮层分离后并不立刻发生感光细胞的死亡,这就是临床所谓的能保存 RD 患者有用视力的“窗口期”,这段时间机体内促存活的分子通道被激活,阻止细胞凋亡的发生。研究证实 RD 能激活感光细胞自噬,减少感光细胞凋亡的发生^[5-6]。然而,也有研究表明活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)也可以诱导自噬小体的形成,自

噬可通过减少蛋白质聚集物和清除受损细胞器来减轻氧化损伤^[7-8]。RD 后感光细胞发生自噬与 ROS 水平的相关性目前尚不清楚。依达拉奉(3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮)是一种有效的氧自由基清除剂,具有抗氧化和抗凋亡的作用^[9-11]。动物实验已经证实依达拉奉能够有效减少实验性 RD 感光细胞凋亡,阻止视网膜外核层厚度比例的下降,显著降低活化 caspase-3、caspase-8、caspase-9 以及羧基蛋白水平^[12]。然而,依达拉奉对 RD 模型中感光细胞自噬的调节作用目前尚不清楚。本研究拟使用依达拉奉减少早期 RD 模型大鼠眼内氧自由基水平,观察感光细胞自噬水平变化,探讨依达拉奉是否通过调节自噬来抑制感光细胞的凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 75 只,体质量 263 ~274 g,由第四军医大学动物实验室提供,实验动物饲养于西安交通大学动物实验室,饲养温度为 25 ~27 ℃,相对湿度为 55% ~70%,12 h 光照昼夜循环,通风状况良好。动物分笼饲养,每笼 6 只,给予自由饮水、摄食。实验动物的使用及喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》,动物伦理经西安市第四医院伦理委员会审核批准(批文号:2016016)。

1.1.2 主要试剂及仪器 总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD) 测试盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 测试盒(南京建成生物工程研究所);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、5 倍蛋白上样缓冲液、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究);聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜(美国 Millipore 公司);兔抗自噬相关基因 4B (autophagy related gene 4B, Atg4B) 抗体(A2981, 美国 Sigma 公司);兔抗微管相关蛋白质 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 抗体(#2775S, 美国 CST 公司);兔抗超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2) 抗体(ab16831)、兔抗核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 抗体(ab31163) (英国 Abcam 公司);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(BC010)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (EK020)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (EK010)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒及 ECL 发光检测试剂盒(西安壮志生物科技有限公司);caspase-3 抗体(74T2)、预染蛋白 Marker、BCA 定量试剂盒(美国

Thermo Fisher 公司);医用透明质酸钠凝胶(17 mg/ml) (美国博士伦公司);盐酸氯丙嗪(吉林省华牧动物保健品有限公司);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);眼用平衡盐溶液(H20171363, 美国 Alcon 公司)。琼脂凝胶电泳装置(北京君意东方电泳设备有限公司);BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司);化学发光仪(上海天能科技有限公司);30G 针头(美国 BD 公司);解剖显微镜(EZ4HD)、石蜡切片机(RM2016) (德国 Leica 公司);光学显微镜(BX51, 日本 Olympus 公司);33G 微量动物注射器(瑞士 Hamilton 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 RD 模型的建立及分组处理 取 51 只大鼠进行 RD 模型建立,另取 24 只大鼠作为 PBS 注射组。均以右眼为实验眼。采用盐酸氯丙嗪(0.03 ml/100 g)腹腔内注射麻醉大鼠,PBS 注射组大鼠玻璃体腔内注射眼用平衡盐溶液 15 μ l。RD 造模大鼠复方托吡卡胺滴眼液扩瞳后,取 30G 针头于颞上角巩缘后 4 mm 进入玻璃体腔,在鼻侧视网膜避开血管造孔,用微量进样针向视网膜下推注质量分数 0.5% 透明质酸钠 15 μ l,尽量扩大 RD 面积,行前房穿刺放出少量房水至角膜透明。剔除晶状体意外损伤、眼内大量出血的大鼠。采用随机数字法将造模成功大鼠随机分为 RD 模型组和依达拉奉治疗组。造模后每日扩瞳后使用瞳孔笔及直接检眼镜观察角膜、晶状体及眼底情况。造模后依达拉奉治疗组大鼠腹腔内注射依达拉奉 3 mg/kg, 2 次/d, PBS 注射组及 RD 模型组大鼠腹腔内注射等容量 0.9% 氯化钠溶液。各组于造模后 1、3、7 d 任意选取 8 只大鼠过量麻醉法处死并取材。

1.2.2 眼内液中 T-SOD 活性、MDA 含量测定 各组不同时间点取 8 只大鼠,30G 针头行右眼前房穿刺并抽取眼内液。将各组中每 2 只大鼠的眼内液混匀在一起,成为 1 个实验样本,共 4 个样本。取 10 μ l 眼内液,按 T-SOD 试剂盒说明书操作,采用 BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪测量各组波长 550 nm 处吸光度(A)值,计算各组眼内液中 T-SOD 活力值。另取 10 μ l 眼内液,按照 MDA 试剂盒说明书操作,测量各组波长 532 nm 处 A 值,计算各组眼内液中 MDA 含量。

1.2.3 Western blot 法检测视网膜组织中各抗氧化、凋亡及自噬相关蛋白表达 各组不同时间点分别处死 4 只大鼠,于手术显微镜下分离取出右眼视网膜,显微剪碎组织,加入含有 PMSF 的预冷 RIPA 裂解液 450 μ l, 4 ℃ 条件下 1 200 \times g 离心 10 min,取上清;采用

BCA 定量试剂盒测定上清液中蛋白质量浓度;将蛋白样品质量浓度调整为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,与蛋白上样缓冲液混合后, 100°C 水浴 5 min 使蛋白变性;每孔上样量为 $10 \mu\text{l}$,采用 SDS-PAGE 对蛋白样品进行电泳分离;采用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜,用三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲盐+吐温 (Tris-HCl+Tween, TBST) 溶液洗膜 3 次,每次 5 min,质量分数 5% 脱脂牛奶 37°C 封闭 2 h, TBST 溶液洗膜 3 次,分别加入相应 Atg4 (1:1 000)、LC3B (1:1 000)、SOD2 (1:5 000)、Nrf2 (1:500)、caspase-3 (1:500)、 β -actin (1:5 000) 抗体, 4°C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 HRP 标记的 IgG 抗体 (1:2 000) 37°C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;使用 ECL 和化学发光仪显色并拍照, ImageJ 软件分析蛋白灰度值,以 β -actin 为内参蛋白,计算各目的蛋白相对表达量,实验重复 3 次。

1.2.4 TUNEL 法标记视网膜切片凋亡细胞 各组不同时间点分别处死 4 只大鼠,取右眼全眼球进行石蜡包埋,沿眼球矢状位方向行 $4 \mu\text{m}$ 厚石蜡切片;将石蜡切片常规脱蜡处理后滴加 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 不含 DNase 的蛋白酶 K, 37°C 作用 30 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加体积分数 3% 过氧化氢溶液室温下避光孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加生物素标记液 37°C 避光孵育 1.5 h, PBS 洗涤 1 次,每次 3 min;滴加反应终止标记液,室温下孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加 Streptavidin-HRP 工作液 37°C 湿盒中孵育 40 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;DAB 显色液孵育 35 min, 苏木素染色 30 s, 脱水, 透明, 树胶封片。于光学显微镜下观察视网膜凋亡细胞并拍照;采用 Image-pro plus 图像分析软件对外核层阳性染色细胞计数,计算其占总感光细胞数的比例。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,计量数据经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用 Levene 检验证实方差齐。各组不同时间点 T-SOD 活力值、MDA 含量以及各蛋白相对表达量总体差异比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 检验。RD 模型组与依达拉奉治疗组不同时间点 TUNEL 阳性细胞比率总体差异比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RD 造模情况

造模过程中 2 眼在视网膜造孔时大量出血,1 眼

晶状体损伤,剔除这 3 只大鼠,其余 48 只制备 RD 模型眼于手术显微镜下观察鼻侧视网膜均高度隆起至晶状体后, RD 范围 $> 60\%$ (图 1),鼻下方近赤道部视网膜裂孔大小为 $1/2 \sim 1$ 视盘直径,其中 1 眼视网膜表面少量出血,但不影响眼底观察。所有实验眼在实验观察期间,结膜囊内未见异常分泌物,球结膜稍充血,角膜均透明,前房清亮,玻璃体无明显混浊。实验期间各模型鼠鼻侧视网膜灰白色隆起持续存在。

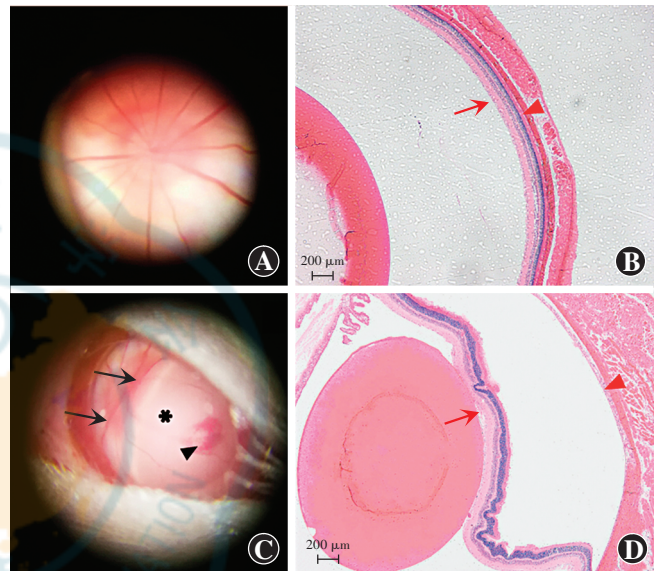


图 1 PBS 注射组与 RD 模型组大鼠眼底及组织病理图 A:手术显微镜下观察显示, PBS 注射组大鼠视网膜平伏,血管走行正常 B:眼球石蜡切片病理学观察显示, PBS 注射组大鼠神经上皮层与色素上皮层贴附良好 (HE $\times 40$, 标尺 = $200 \mu\text{m}$) C:手术显微镜下观察显示, RD 模型组大鼠鼻侧视网膜灰白色高度隆起伴裂孔旁少量出血 D:眼球石蜡切片病理学观察显示, RD 模型组大鼠视网膜脱离,视网膜高度隆起至晶状体后表面 (HE $\times 40$, 标尺 = $200 \mu\text{m}$) 红三角所指为神经上皮层,红箭所指为色素上皮层; * 为视网膜隆起最高处,黑箭所指为视网膜脱离边缘,黑三角所指为造孔处

Figure 1 Fundus and histopathology findings of rats in the PBS injection group and RD model group A: Normal retina was observed and vessel ran normally in rat of the PBS injection group under the operation microscope B: The neuroepithelium layer (red triangle) and the pigment epithelium layer (red arrow) of the paraffin section attached well in the PBS injection group (HE $\times 40$, bar = $200 \mu\text{m}$) C: Nasal retina elevated highly with little hemorrhage besides the artificial hole was observed in rats of the RD model group under the operation microscope D: The retinal neuroepithelium layer (red triangle) detached from the retinal pigment epithelial layer (red arrow) and part of RNL reaching the posterior surface of the lens were observed in the paraffin section of the RD model group (HE $\times 40$, bar = $200 \mu\text{m}$) * showed the highest site of elevated retina; black arrow showed the edge of retinal detachment; black triangle indicated the artificial hole

2.2 各组不同时间点眼内液中 T-SOD 活力及 MDA 含量比较

各组不同时间点眼内液中 MDA 含量及 T-SOD 活力总体比较,差异均有统计学意义 (MDA: $F_{\text{分组}} =$

385.513, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 13.021, P < 0.01$ 。T-SOD: $F_{\text{分组}} = 48.865, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 7.700, P = 0.003$ 。造模后各时间点 RD 模型组眼内液中 MDA 含量较 PBS 注射组明显升高, T-SOD 活力值较 PBS 注射组明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 造模后各时间点依达拉奉治疗组眼内液中 MDA 含量较 RD 模型组

均明显下降, 较 PBS 注射组明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 造模后各时间点依达拉奉治疗组 T-SOD 活力值均较 RD 模型组明显升高, 较 PBS 注射组明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 各组随造模后时间延长, 眼内液中 T-SOD 活力值和 MDA 含量呈现先升高后降低的趋势(表 1)。

表 1 各组不同时间点眼内液中 T-SOD 活力值和 MDA 含量比较 (mean±SD)
Table 1 Comparison of T-SOD activity and MDA content in intraocular fluid at various time points among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 T-SOD 活力值 [mmol/(min·L)]			造模后不同时间点 MDA 含量 (mmol/ml)		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
PBS 注射组	4	309.81±0.55	323.03±2.94	294.60±4.86	5.31±1.08	6.00±0.42	5.47±0.99
RD 模型组	4	101.59±3.83 ^a	215.65±6.37 ^a	205.03±5.15 ^a	16.34±1.86 ^a	19.82±1.80 ^a	17.88±0.74 ^a
依达拉奉治疗组	4	261.54±8.48 ^{ab}	294.67±7.23 ^{ab}	227.87±7.03 ^{ab}	7.12±1.47 ^{ab}	9.32±1.12 ^{ab}	8.69±0.56 ^{ab}

注: T-SOD: $F_{\text{分组}} = 48.865, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 7.700, P = 0.003$ 。MDA: $F_{\text{分组}} = 385.513, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 13.021, P < 0.01$ 。与各自时间点 PBS 注射组相比, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点 RD 模型组相比, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) T-SOD: 总超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛; PBS: 磷酸盐缓冲液; RD: 视网膜脱离

Note: T-SOD: $F_{\text{group}} = 48.865, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 7.700, P = 0.003$ 。MDA: $F_{\text{group}} = 385.513, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 13.021, P < 0.01$ 。Compared with the PBS injection group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$; compared with the RD model group at corresponding time points, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) T-SOD: total superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; PBS: phosphate buffer saline; RD: retinal detachment

2.3 各组视网膜组织中抗氧化蛋白相对表达量比较

各组不同时间点视网膜组织中 SOD2、Nrf2 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义(SOD2: $F_{\text{分组}} = 33.717, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 11.745, P < 0.01$ 。Nrf2: $F_{\text{分组}} = 37.329, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 27.002, P < 0.01$)。造模后各时间点 RD 模型组 SOD2、Nrf2 蛋白相对表达量明显高于 PBS 注射组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 造模后 1、3、7 d 依达拉奉治疗组 SOD2 相对表达量较 RD 模型组明显升高, 造模后 1、3 d 依达拉奉治疗组 Nrf2 蛋白相对表达量较 RD 模型组明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2, 表 2)。

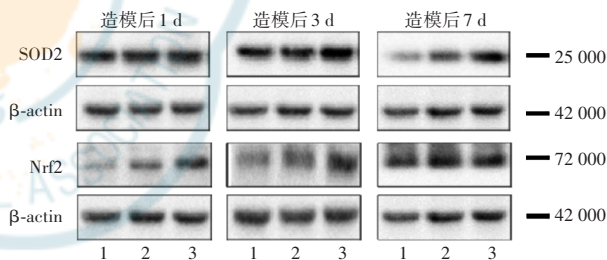


图 2 各组不同时间点视网膜组织中 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达电泳图 1: PBS 注射组; 2: RD 模型组; 3: 依达拉奉治疗组 SOD: 超氧化物歧化酶; β -actin: β 肌动蛋白; Nrf: 核因子 E2 相关因子
Figure 2 Electropherograms of SOD2 and Nrf2 protein in retinal tissue at different time points in each group 1: PBS injection group; 2: RD model group; 3: edaravone treatment group SOD: superoxide dismutase; Nrf: nuclear factor E2-related factor

表 2 各组不同时间点视网膜组织中 SOD2 及 Nrf2 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of SOD2 and Nrf2 protein relative expression levels in retina at various time points among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 SOD2 蛋白相对表达量			造模后不同时间点 Nrf2 蛋白相对表达量		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
PBS 注射组	4	0.96±0.02	0.97±0.03	0.96±0.03	0.98±0.02	0.99±0.03	0.81±0.03
RD 模型组	4	1.21±0.10 ^a	1.53±0.14 ^a	1.20±0.11 ^a	1.23±0.10 ^a	1.34±0.09 ^a	0.97±0.08 ^a
依达拉奉治疗组	4	1.49±0.10 ^{ab}	2.34±0.08 ^{ab}	1.43±0.14 ^{ab}	1.49±0.08 ^{ab}	1.88±0.06 ^{ab}	1.05±0.05 ^a

注: SOD2: $F_{\text{分组}} = 33.717, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 11.745, P < 0.01$ 。Nrf2: $F_{\text{分组}} = 37.329, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 27.002, P < 0.01$ 。与各自时间点 PBS 注射组相比, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点 RD 模型组相比, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) SOD: 超氧化物歧化酶; Nrf: 核因子 E2 相关因子; PBS: 磷酸盐缓冲液; RD: 视网膜脱离

Note: SOD2: $F_{\text{group}} = 33.717, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 11.745, P < 0.01$ 。Nrf2: $F_{\text{group}} = 37.329, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 27.002, P < 0.01$ 。Compared with the PBS injection group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$; compared with the RD group at corresponding time points, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) SOD: superoxide dismutase; Nrf: nuclear factor E2-related factor; PBS: phosphate buffer saline; RD: retinal detachment

2.4 各组视网膜组织中自噬相关蛋白相对表达量比较

PBS 组、RD 模型组和依达拉奉治疗组在不同时间点视网膜 LC3B-II/LC3B-I 与 Atg4 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (LC3B-II/LC3B-I: $F_{\text{分组}} = 9.620, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 20.831, P < 0.001$ 。Atg4: $F_{\text{分组}} = 9.061, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 18.505, P < 0.001$)。造模后 1 d 和 3 d PBS 注射组 LC3B-II/LC3B-I 和 Atg4 相对表达量均明显低于 RD 模型组和依达拉奉治疗组,造模后 3 d RD 模型组 LC3B-II/LC3B-I 和 Atg4 相对表达量均明显低于依达拉奉治疗组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$);造模后 7 d 各组间 LC3B-II/LC3B-I 和 Atg4 相对表达量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 3,表 3)。

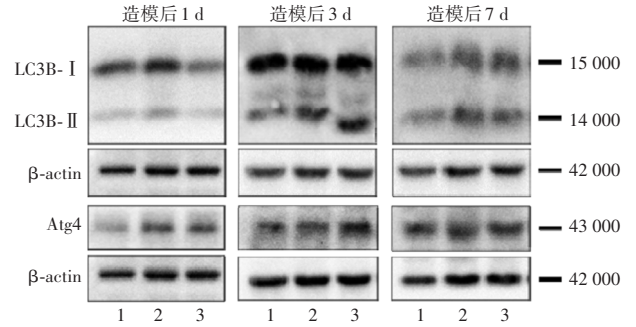


图 3 各组不同时间点视网膜组织中 LC3B-II/LC3B-I 和 Atg4 蛋白表达电泳图 1:PBS 注射组;2:RD 模型组;3:依达拉奉治疗组
LC:微管相关蛋白质 1 轻链;β-actin:β 肌动蛋白;Atg:自噬相关基因
Figure 3 Electropherograms of LC3B-II/LC3B-I and Atg4 protein expression in retinal tissue at various time points in each group 1: PBS injection group; 2: RD model group; 3: edaravone treatment group LC: microtubule-associated protein 1 light chain; β-actin: autophagy related gene

表 3 各组不同时间点视网膜组织中 LC3B-II/LC3B-I 及 Atg4 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 3 Comparison of LC3B-II/LC3B-I and Atg4 protein relative expression levels in retina at various time points among the three groups (mean ± SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 LC3B-II/LC3B-I 蛋白相对表达量			造模后不同时间点 Atg4 蛋白相对表达量		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
PBS 注射组	4	0.80±0.04	0.94±0.06	1.03±0.06	0.97±0.09	1.05±0.06	0.98±0.06
RD 模型组	4	1.02±0.06 ^a	1.88±0.15 ^a	1.03±0.08	1.14±0.13 ^a	1.28±0.12 ^a	0.94±0.02
依达拉奉治疗组	4	0.98±0.05 ^a	2.18±0.10 ^{ab}	1.15±0.06	1.10±0.16 ^a	1.59±0.10 ^{ab}	1.02±0.06

注:LC3B-II/LC3B-I: $F_{\text{分组}} = 9.620, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 20.831, P < 0.01$ 。Atg4: $F_{\text{分组}} = 9.061, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 18.505, P < 0.01$ 。与各自时间点 PBS 注射组相比, ^a $P < 0.05$;与各自时间点 RD 模型组相比, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) LC:微管相关蛋白质 1 轻链;Atg:自噬相关基因;PBS:磷酸盐缓冲液;RD:视网膜脱离

Note:LC3B-II/LC3B-I: $F_{\text{group}} = 9.620, P = 0.001; F_{\text{time}} = 20.831, P < 0.01$ 。Atg4: $F_{\text{group}} = 9.061, P = 0.001; F_{\text{time}} = 18.505, P < 0.01$ 。Compared with the PBS injection group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$; compared with the RD model group at corresponding time points, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) LC: microtubule-associated protein 1 light chain; Atg: autophagy related gene; PBS: phosphate buffer saline; RD: retinal detachment

2.5 各组视网膜细胞凋亡情况比较

各组不同时间点视网膜组织中 caspase-3 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 31.314, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 10.460, P = 0.001$)。其中,造模后各时间点 RD 模型组视网膜组织中 caspase-3 蛋白相对表达量均较 PBS 注射组和依达拉奉治疗组明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4,表 4)。

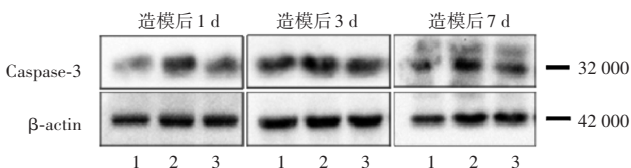


图 4 不同时间点各组视网膜组织中 caspase-3 蛋白表达电泳图 1:PBS 注射组;2:RD 模型组;3:依达拉奉治疗组 β-actin:β 肌动蛋白

Figure 4 Electropherograms of caspase-3 expression in retinal tissue at various time points in each group 1:PBS injection group; 2: RD model group; 3: edaravone treatment group

表 4 各组不同时间点视网膜组织中 caspase-3 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 4 Comparison of caspase-3 protein relative expression levels in retina tissue at various time points among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点视网膜组织中 caspase-3 蛋白相对表达量		
		1 d	3 d	7 d
PBS 注射组	4	1.10±0.08	1.06±0.08	0.95±0.09
RD 模型组	4	1.76±0.13 ^a	2.89±0.12 ^a	1.60±0.19 ^a
依达拉奉治疗组	4	1.47±0.11 ^{ab}	1.64±0.05 ^{ab}	1.28±0.15 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 31.314, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 10.460, P = 0.001$ 。与各自时间点 PBS 注射组相比, ^a $P < 0.05$;与各自时间点 RD 模型组相比, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) PBS:磷酸盐缓冲液;RD:视网膜脱离

Note: $F_{\text{group}} = 31.314, P < 0.01; F_{\text{time}} = 10.460, P = 0.001$ 。Compared with the PBS injection group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$; compared with the RD model group at corresponding time points, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) PBS: phosphate buffer saline; RD: retinal detachment

石蜡切片 TUNEL 染色结果显示,造模后各时间点 RD 模型组及依达拉奉治疗组外核层均见 TUNEL 阳性标记细胞, PBS 注射组外核层未见 TUNEL 阳性标记细胞。各组不同时间点外核层 TUNEL 阳性细胞率比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 60.783, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 64.381, P < 0.01$), 其中 RD 模型组造模后各时间点 TUNEL 阳性细胞率均明显高于相应时间点依达拉奉治疗组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5, 表 5)。

表 5 各组不同时间点视网膜外核层 TUNEL 阳性细胞率比较 (mean±SD)

Table 5 Comparison of ratio of TUNEL-positive cells in the retinal outer nuclear layer at various time points among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 TUNEL 阳性细胞率		
		1 d	3 d	7 d
RD 模型组	4	0.26±0.03	0.45±0.04	0.35±0.04
依达拉奉治疗组	4	0.13±0.03 ^a	0.34±0.04 ^a	0.26±0.04 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 60.783, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 64.381, P < 0.01$ 。与各自时间点 RD 模型组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RD: 视网膜脱离
Note: $F_{\text{group}} = 60.783, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 64.381, P < 0.01$. Compared with the RD model group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) RD: retinal detachment

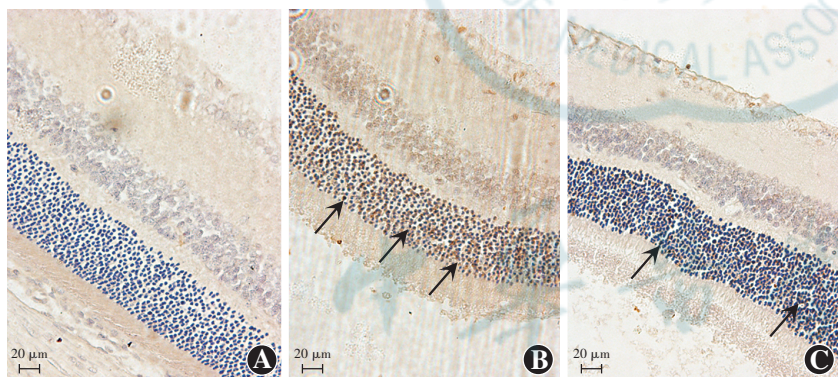


图 5 各组造模后 3 d 眼球石蜡切片 TUNEL 染色图 (×400, 标尺 = 20 μm) PBS 注射组未见明显阳性细胞, RD 模型组感光细胞层散在较多细胞核呈棕色着染的阳性细胞, 依达拉奉治疗组阳性细胞散在, 阳性细胞数量较 RD 模型组减少 箭头所指为 TUNEL 染色阳性细胞 A: PBS 注射组 B: RD 模型组 C: 依达拉奉治疗组

Figure 5 TUNEL staining findings in paraffin sections at 3 days after modeling (×400, bar = 20 μm) No obvious TUNEL-positive cells were observed in the PBS injection group, and more TUNEL-positive cells with brown staining of nuclei were scattered in the photoreceptor cell layer in the RD model group, and the number of TUNEL-positive cells was reduced in the edaravone treatment group than that in the RD model group Arrow pointed to TUNEL-staining positive cells A: PBS injection group B: RD model group C: edaravone treatment group

3 讨论

细胞自噬是 II 型细胞程序性死亡途径, 包括启动、自噬体形成、溶酶体产生、自噬体溶酶体融合和降解等

过程。在胞内或胞外压力应激条件下, 多种基因和蛋白质复合物可介导自噬发生, 将受损、衰老的细胞器或异常的蛋白质转运到溶酶体并降解, 从而实现生命活动物质基础的补给、正常细胞结构基础的维持以及不利因素的清除。作为维持细胞内稳态的关键机制, 自噬在细胞生长、饥饿、低氧适应、肿瘤抑制、衰老及先天和后天免疫中起着重要作用^[13]。自噬与许多眼部疾病的发生和发展有关, 包括角膜营养不良、白内障、青光眼、年龄相关性黄斑变性及 RD^[14-19]。Remé 等^[20]最早利用透射电子显微镜记录了感光细胞自噬, 并认为自噬在生理状态下对视觉周期蛋白和细胞器降解发挥重要作用; 而在病理状态下, 自噬对感光细胞的作用比较复杂, 包括保护性和创伤性 2 种作用。在体研究已经证实自噬对视网膜光损伤具有保护作用^[21]。Besirli 等^[5]报道了大鼠 RD 造模后 Atg5 及 LC3-II 表达水平升高, 感光细胞自噬增强, 而应用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤或敲除 Atg5 基因后 RD 模型鼠感光细胞丢失更严重, caspase-8 表达明显增加。Liu 等^[22]研究表明, 在缺氧环境下, 抑制感光细胞自噬会增加细胞凋亡, 降低细胞活性。以上研究证实, 在病理状态下, 感光细胞可以通过自噬抑制细胞凋亡。而 Kunchithapautham 等^[23]研究发现, 在氧化应激诱导的感光细胞凋亡过程中凋亡和自噬的标记基因共同表达, 抑制自噬活性可减少凋亡, 提示自噬通过触发凋亡参与感光细胞的死亡。本研究推测适度的自噬可发挥保护感光细胞、抑制凋亡发生的作用, 但过度自噬可诱导细胞凋亡。

依达拉奉作为新型抗氧化剂已应用于脑损伤、肺损伤、缺血性心肌疾病以及脉络膜新生血管、RD 的研究中^[12, 24-27]。药代动力学研究表明, 依达拉奉在体内代谢迅速, 半衰期短^[28], Roh 等^[12]研究发现给予依达拉奉 10 mg/kg 每天 1 次腹腔内注射会引起视网膜毒性反应, 而 3 mg/kg 每天 1 次腹腔内注射则无明显抑制感光细胞凋亡的作用。在脉络膜新生血管动物模型的研究中, 给予每天 2 次腹腔内注射依达拉奉 3 mg/kg 取得了较好的实验结果^[27]。分析依达拉奉相关研究及临床应用, 推测每天 2 次的注射频次符合依达拉奉的代谢特点, 安全性更高, 故本研究采用此种给药剂量和频次。

ROS 可攻击生物膜中的多种不饱和脂肪酸, 形成

MDA 等脂质过氧化物,继而引起细胞损伤,因此测量 MDA 含量可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映细胞损伤程度。SOD 可以清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,因而 SOD 活性也可间接反应机体清除氧自由基的能力。Nrf2 通过与抗氧化反应元件相互作用,参与活性氧化剂基因的表达,发挥抗氧化作用^[29];同时,Nrf2 可以通过调控 p62 基因的转录和表达,参与自噬过程中蛋白质的降解^[30]。LC3B 是自噬体复合体的一个重要组成部分,当自噬被激活时,非活性形式的 LC3B-I 将转化为 LC3B-II,形成自噬体^[31]。Atg4 参与自噬体膜的生成和调节,将 LC3 剪切成 LC3-I^[32]。故本研究以 SOD2 和 Nrf2 作为抗氧化蛋白,以 LC3B-II/LC3B-I 和 Atg4 作为自噬相关蛋白对 RD 模型大鼠视网膜进行检测。

在本研究中,RD 模型组 LC3B-II/LC3B-I 及 Atg4 的表达水平于造模后 3 d 达高峰,并于造模后 7 d 表达下降,与 Chinskey 等^[19]的研究结果一致。本研究进一步证实,与 RD 模型组比较,依达拉奉治疗组眼内液中 T-SOD 活性显著升高、MDA 含量显著降低,同时视网膜组织中 SOD2 及 Nrf2 的蛋白水平升高,表明 3 mg/kg 依达拉奉每天 2 次腹腔内注射可以提高视网膜的抗氧化能力,降低眼内氧化应激损伤,在 RD 造模后 7 d,与 RD 模型组相比,依达拉奉组眼内液中 T-SOD 活性增加、MDA 含量下降、视网膜组织中 SOD2 蛋白相对表达量升高,RD 模型组与依达拉奉组 Nrf2 蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义,提示依达拉奉在造模后 7 d 内能较好地改善眼内氧化应激状态。与 RD 模型组比较,依达拉奉组大鼠视网膜组织中 caspase-3 蛋白相对表达量、外核层 TUNEL 阳性细胞率均显著降低,尤其在 RD 后 1 d、3 d 时降低更明显;同时,依达拉奉治疗组视网膜组织中 LC3B-II/LC3B-I 及 Atg4 蛋白水平较 RD 模型组升高,在造模后 3 d 差异显著,但造模后 7 d 时差异无统计学意义,表明抗氧化剂依达拉奉能够诱导 RD 造模后视网膜自噬,该作用可能与其抑制感光细胞凋亡相关,尤其在 RD 早期作用更为明显,随着 RD 时间的进一步延长,视网膜组织缺氧加重,依达拉奉不足以对抗视网膜氧化应激损伤,导致细胞自噬水平降低。

综上所述,在实验性 RD 早期,使用氧自由基清除剂依达拉奉能够降低视网膜氧化应激损伤,提高 RD 后自噬水平并减少感光细胞凋亡发生,提示 ROS 水平可能是该过程中自噬与凋亡发生转换的相关因素之一,但其具体机制仍有待进一步研究。本研究仍存在一些不足,如未能对视网膜 ROS 水平进行直接观察,

同时也未进一步使用自噬抑制剂或促进剂进行干预,未对 ROS 在 RD 过程中感光细胞自噬与凋亡发生的调控作用进行更为深入的研究,后续将进一步细化研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, et al. The role of apoptosis in age-related macular degeneration [J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120 (11): 1435-1442. DOI: 10.1001/archophth.120.11.1435.
- [2] Schaal S, Sherman MP, Barr CC, et al. Primary retinal detachment repair: comparison of 1-year outcomes of four surgical techniques [J]. Retina, 2011, 31(8): 1500-1504. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31820d3f55.
- [3] Galeati G, Zannoni A, Spinaci M, et al. Porcine circovirus type 2 detection in *in vitro* produced porcine blastocysts after virus sperm exposure [J]. Anim Sci J, 2016, 87(4): 511-516. DOI: 10.1111/asj.12465.
- [4] Rotstein NP, Politi LE, German OL, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(5): 2252-2259. DOI: 10.1167/iovs.02-0901.
- [5] Besirli CG, Chinskey ND, Zheng QD, et al. Autophagy activation in the injured photoreceptor inhibits fas-mediated apoptosis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4193-4199. DOI: 10.1167/iovs.10-7090.
- [6] Shelby SJ, Angadi PS, Zheng QD, et al. Hypoxia inducible factor 1 α contributes to regulation of autophagy in retinal detachment [J]. Exp Eye Res, 2015, 137: 84-93. DOI: 10.1016/j.exer.2015.06.016.
- [7] Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(7): 1040-1052. DOI: 10.1038/cdd.2009.49.
- [8] Ureshino RP, Rocha KK, Lopes GS, et al. Calcium signaling alterations, oxidative stress, and autophagy in aging [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(1): 123-137. DOI: 10.1089/ars.2013.5777.
- [9] Kokura S, Yoshida N, Sakamoto N, et al. The radical scavenger edaravone enhances the anti-tumor effects of CPT-11 in murine colon cancer by increasing apoptosis via inhibition of NF-kappaB [J]. Cancer Lett, 2005, 229(2): 223-233. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.06.039.
- [10] Suzuki K, Kazui T, Terada H, et al. Experimental study on the protective effects of edaravone against ischemic spinal cord injury [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(6): 1586-1592. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.08.049.
- [11] Wen J, Watanabe K, Ma M, et al. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(4): 713-718. DOI: 10.1248/bpb.29.713.
- [12] Roh MI, Murakami Y, Thanos A, et al. Edaravone, an ROS scavenger, ameliorates photoreceptor cell death after experimental retinal detachment [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3825-3831. DOI: 10.1167/iovs.10-6797.
- [13] 潘耀柱, 王璇. 自噬与肿瘤 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(9): 1082-1085. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2011.09.029.
- [14] Choi SI, Kim BY, Dadakhujaev S, et al. Inhibition of TGFBIp expression by lithium: implications for TGFBI-linked corneal dystrophy therapy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3293-3300. DOI: 10.1167/iovs.10-6405.
- [15] Morishita H, Eguchi S, Kimura H, et al. Deletion of autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 genes in the lens causes cataract independent of programmed organelle degradation [J/OL]. J Biol Chem, 2013, 288(16): 11436-11447 [2020-06-08]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479732. DOI: 10.1074/jbc.M112.437103.
- [16] 田净净, 贾志旻, 樊芳. 自噬在青光眼发生和发展中的作用 [J]. 中

- 华实验眼科杂志, 2020, 38(5): 442-446. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200326-00213.
- Tian JJ, Jia ZY, Fan F. Role of autophagy in the occurrence and development of glaucoma [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(5): 442-446. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200326-00213.
- [17] Xie L, Ji X, Tu Y, et al. MLN4924 inhibits hedgehog signaling pathway and activates autophagy to alleviate mouse laser-induced choroidal neovascularization lesion [J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110654 [2020-06-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34321162>. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110654.
- [18] 闫泉, 孙晓东. 自噬在干性年龄相关性黄斑变性中的作用研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(10): 949-952. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 018.
- Yan Q, Sun XD. Research progress in autophagy on dry age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(10): 949-952. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 018.
- [19] Chinsky ND, Zheng QD, Zacks DN. Control of photoreceptor autophagy after retinal detachment: the switch from survival to death [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(2): 688-695. DOI: 10. 1167/iovs. 13-12951.
- [20] Remé CE. Autophagy in visual cells and pigment epithelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1977, 16(9): 807-814.
- [21] Remé CE, Wolfrum U, Imsand C, et al. Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(10): 2398-404.
- [22] Liu X, Xie J, Yang L, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells enhance autophagy and help protect cells under hypoxic and retinal detachment conditions [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(6): 3346-3358. DOI: 10. 1111/jcmm. 15008.
- [23] Kunchithapautham K, Rohrer B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress [J]. Autophagy, 2007, 3(5): 433-441. DOI: 10. 4161/auto. 4294.
- [24] 张兵钱, 唐全, 张东霞, 等. 依达拉奉对创伤性脑损伤大鼠预后的改善作用 [J]. 中华创伤杂志, 2019, 35(7): 659-664. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-8050. 2019. 07. 014.
- Zhang BQ, Tang Q, Zhang DX, et al. Role of edaravone in alleviating prognosis of rats following traumatic brain injury [J]. Chin J Trauma, 2019, 35(7): 659-664. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-8050. 2019. 07. 014.
- [25] 包晓辰, 方以群, 马骏, 等. 依达拉奉对小鼠肺型氧中毒的保护作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(1): 73-76. DOI: 10. 12047/j. cjjap. 5919. 2020. 016.
- Bao XC, Fang YQ, Ma J, et al. Edaravone has protective role in a mouse model of pulmonary oxygen toxicity [J]. Chin J Appl Physiol, 2020, 36(1): 73-76. DOI: 10. 12047/j. cjjap. 5919. 2020. 016.
- [26] 蔡丹, 吴星恒, 张丽娜. 依达拉奉联合参麦注射液对窒息新生大鼠的心肌保护作用 [J]. 南昌大学学报: 医学版, 2018, 58(6): 20-24. DOI: 10. 13764/j. cnki. ncdm. 2018. 06. 005.
- Cai D, Wu XH, Zhang LN. Protective effect of edaravone combined with Shenmai injection on myocardia of rats with neonatal asphyxia [J]. J Nanchang University (Med Sci), 2018, 58(6): 20-24. DOI: 10. 13764/j. cnki. ncdm. 2018. 06. 005.
- [27] Masuda T, Shimazawa M, Takata S, et al. Edaravone is a free radical scavenger that protects against laser-induced choroidal neovascularization in mice and common marmosets [J]. Exp Eye Res, 2016, 146: 196-205. DOI: 10. 1016/j. exer. 2016. 03. 020.
- [28] 杨雪, 王丽华. 依达拉奉联合 rt-PA 超时间窗治疗脑梗死的研究进展 [J]. 卒中与神经疾病, 2016, 23(2): 145-146. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-0478. 2016. 02. 024.
- [29] Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress [J/OL]. J Biol Chem, 2009, 284(20): 13291-13295 [2020-07-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182219>. DOI: 10. 1074/jbc. R900010200.
- [30] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(5): 615-621. DOI: 10. 1007/s10571-015-0166-x.
- [31] Sou YS, Waguri S, Iwata J, et al. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(11): 4762-4775. DOI: 10. 1091/mbc. e08-03-0309.
- [32] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. Nature, 2000, 408(6811): 488-492. DOI: 10. 1038/35044114.

(收稿日期: 2020-11-18 修回日期: 2021-08-09)

(本文编辑: 张宇)

消息

《实用眼眶病学》一书正式出版

由天津医科大学眼科医院孙丰源教授主编的《实用眼眶病学》一书于 2021 年 8 月由人民卫生出版社正式出版发行。《实用眼眶病学》分为总论和各论两篇, 共十九章。全书各章节内容涵盖眼眶病学的基础和临床, 总论包括解剖、检查、影像和病理, 各论包括 100 余种眼眶病诊疗技术、手术及非手术治疗原则等。该书图文并茂, 含 600 余幅彩色图片, 并附 63 个经典病例。这些病例多来自近十年来收集的新的临床案例, 病史详实, 临床资料完整, 特别适合初学者参照阅读, 具有较好的临床参考价值。全书突出超声、CT、MRI 等影像学检查特异性讲解, 病理学特征、治疗方法描述详尽。该书紧密结合临床实践, 实用性强, 力求使内容贴近目前的临床实际, 为临床医生对眼眶病的诊疗提供指导。

购买途径:《实用眼眶病学》全书十九章, 精装, 大 16 开, 共 386 页, 铜版纸彩色印刷, 定价 239 元。购书可通过全国新华书店、专业书店、人卫智慧服务商城、人卫天猫旗舰店、京东、当当网等购买或邮购。

(本刊编辑部)

