

· 实验研究 ·

Necrostatin-1 对急性高眼压大鼠模型中视网膜神经节细胞程序性坏死的抑制作用

景原媛 马伊 王凯 刘竹青

天津市人民医院眼科, 天津 300121

通信作者: 马伊, Email: mayi1962@163.com

【摘要】 目的 探讨程序性坏死特异性抑制剂 necrostatin-1 (Nec-1) 对急性高眼压大鼠模型中视网膜神经节细胞 (RGCs) 程序性坏死的抑制作用。**方法** 采用随机数表法将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、Nec-1 处理组和阴性对照组, 每组 6 只。其中, 正常对照组大鼠不做任何处理; 其余 3 个组大鼠左眼采用前房灌注质量分数 0.9% 氯化钠溶液的方法将眼压升至 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 持续 60 min, 制备急性高眼压缺血-再灌注模型; Nec-1 处理组和阴性对照组大鼠分别于造模后给予玻璃体腔内注射 4 mmol/L Nec-1 和二甲亚砜各 2 μ l。造模后 7 d, 摘取各组大鼠实验眼制备视网膜石蜡切片, 采用苏木精-伊红染色法观察视网膜结构; 采用免疫组织化学染色法检测胸腺细胞抗原 1 (Thy-1) 和胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达。**结果** 造模后 7 d, 与正常对照组大鼠比较, 模型对照组和阴性对照组大鼠视网膜神经纤维层均变薄, RGCs 层细胞排列疏松, 内核层细胞减少、排列紊乱, 外核层细胞正常或变大; 与模型对照组和阴性对照组比较, Nec-1 处理组大鼠神经纤维层厚度及 RGCs 数量均明显增多。免疫组织化学染色显示, 模型对照组、阴性对照组和 Nec-1 处理组大鼠 Thy-1 染色阳性 RGCs 数量均较正常对照组减少, Nec-1 处理组大鼠 Thy-1 染色阳性 RGCs 数量均较模型对照组和阴性对照组增多。正常对照组、模型对照组、阴性对照组和 Nec-1 处理组 GFAP 平均积分吸光度 (A) 值分别为 47.209 ± 15.311 、 116.220 ± 18.194 、 116.382 ± 19.020 和 92.818 ± 10.236 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 24.675, P < 0.001$), 其中与正常对照组比较, 模型对照组、阴性对照组和 Nec-1 处理组 GFAP 平均积分 A 值均明显升高; Nec-1 处理组 GFAP 平均积分 A 值较模型对照组和阴性对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** Nec-1 对急性高眼压大鼠 RGCs 的程序性坏死有抑制作用, 可促进 RGCs 存活。

【关键词】 高眼压, 急性; 视网膜神经节细胞; Necrostatin-1; 程序性坏死; 胶质纤维酸性蛋白

基金项目: 天津市人民医院基金项目 (2017YJ27)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191108-00488

Inhibitory effect of necrostatin-1 on necroptosis of retinal ganglion cells in rats with acute ocular hypertension

Jing Yuanyuan, Ma Yi, Wang Kai, Liu Zhuqing

Department of Ophthalmology, Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China

Corresponding author: Ma Yi, Email: mayi1962@163.com

[Abstract] Objective To investigate the inhibitory effect of specific inhibitor of necroptosis necrostatin-1 (Nec-1) on necroptosis of retinal ganglion cells (RGCs) in rats with acute ocular hypertension. **Methods** Twenty-four adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into normal control group, model control group, Nec-1 treatment group and negative control group by random number table method, with 6 rats in each group. High intraocular pressure (IOP)-induced ischemia and reperfusion model was established through anterior chamber irrigation of 0.9% sodium chloride solution in left eyes of the rats, raising the IOP to 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) for 60 minutes. Nec-1 (4 mmol/L, 2 μ l) or dimethyl sulfoxide (2 μ l) was intravitreally injected immediately in Nec-1 treatment group and negative control group following modeling, respectively, according to grouping. No intervention was administered to the normal control group. Paraffin sections of rat retinas of the left eyes in different groups were prepared seven days after modeling. The retinal structure was observed by hematoxylin-eosin staining, and the expression levels of thymocyte antigen-1 (Thy-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected via immunohistochemical staining. All animal experiments were approved by an Ethics Committee of Tianjin Union Medical Center (No. 2017 Quick audit C01). **Results** Seven days after modeling, compared with normal control group, the retinal nerve fiber layer was thinner in model control group and negative control group, and the RGCs were arranged loosely, and cells in the inner nuclear layer were reduced and arranged disorderly, and cells in the outer nuclear layer were normal or enlarged. Compared with model control group and negative control group, the nerve fiber



layer was thickened and the number of RGCs was significantly increased in Nec-1 treatment group. The number of Thy-1-positive RGCs was decreased in model control group, negative control group and Nec-1 treatment group than normal control group, and there were more Thy-1-positive RGCs in Nec-1 treatment group than model control group and negative control group. The integrated absorbance (*A*) value of GFAP protein in normal control group, model control group, negative control group and Nec-1 treatment group was 47.209 ± 15.311 , 116.220 ± 18.194 , 116.382 ± 19.020 , 92.818 ± 10.236 , respectively, showing statistically significant differences among them ($F = 24.675$, $P < 0.001$). The integrated *A* value of GFAP protein was significantly increased in model control group, negative control group and Nec-1 treatment group than normal control group, and the integrated *A* value of GFAP protein in Nec-1 treatment group was lower than that in model control group and negative control group, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Nec-1 can promote RGCs survival by inhibiting the necroptosis of RGCs in rats with acute intraocular hypertension.

[Key words] Ocular hypertension, acute; Retinal ganglion cells; Necrostatin-1; Necroptosis; Glial fibrillary acid protein

Fund program: Tianjin Union Medical Center Hospital Level Project (2017YJ27)

DOI:10.3760/ema.j.cn115989-20191108-00488

青光眼是一种神经退行性、不可逆性致盲眼病,其主要特点为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的进行性丢失^[1]。急性青光眼患者眼压急剧大幅度升高可引起视网膜的缺血-再灌注损伤,缺血致细胞死亡的方式包括凋亡和坏死,既往对青光眼的研究多集中在 RGCs 凋亡及其机制上^[1-2]。程序性坏死是一种新发现的由死亡受体介导的 caspases 非依赖的调控细胞死亡的方式,在急性心肌梗死、脑出血等缺血性损伤过程中发挥重要作用^[3-4]。在缺血状态下,因 ATP 消耗,细胞凋亡被抑制,感光细胞的死亡类型由细胞凋亡向受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase 1, RIPK1) 介导的程序性坏死转变^[5-7]。因此,抑制 RGCs 程序性坏死可能成为治疗青光眼的新策略。胶质细胞参与 RGCs 微环境的调节,当视网膜遭受高眼压损伤时,胶质细胞活化进而上调炎症因子表达,起到免疫调节作用。程序性坏死可由肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、TNF 相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)、凋亡相关因子配体 (factor associated suicide ligand, FasL) 等炎症因子诱导^[3,8]。小分子化合物 necrostatin-1 (Nec-1) 可以通过抑制 RIPK1 磷酸化进而抑制其活性和程序性坏死的发生,是程序化坏死的特异性抑制剂^[9-10]。目前程序性坏死与胶质细胞活化之间的关系尚不明确, Nec-1 对因眼压急剧升高导致视网膜缺血-再灌注损伤进而引起的 RGCs 程序性坏死和视网膜胶质细胞活化的作用需要进一步研究。本研究拟探讨 Nec-1 对急性高眼压大鼠 RGCs 程序性坏死的影响, 以期对青光眼的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选取健康无眼疾雄性 6~8 周龄 SD 大鼠 24 只, 体质量 250~300 g, 由中国食品药品检定研究院提供, 于 22~26 ℃、相对湿度 60%~80% 动物房内饲养, 7:00-19:00 进行灯光照射, 定时通风换气, 自由饮食。正式实验前于常规标准环境中适应性饲养 1 周。采用随机数表法将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、Nec-1 处理组和阴性对照组, 每组 6 只。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物质量管理办法》要求, 本研究经天津市人民医院实验伦理委员会批准 [批文号: (2017) 年快审第 (C01) 号]。

1.1.2 主要试剂及仪器 Nec-1 (A4213, 美国 APEX BIO 公司); 兔抗大鼠胸腺细胞抗原 1 (thymocyte antigen-1, Thy-1) 多克隆抗体 (A16986, 武汉爱博泰克生物科技公司); 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂 (美国 Sigma 公司); 兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 多克隆抗体 (ab7260, 美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (GK600705A, 上海基因科技股份有限公司)。眼科手术显微器械、手术显微镜 (苏州六六视觉科技股份有限公司); 包埋机 EG116、石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 光学显微镜、光学显微数码成像系统 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验大鼠的分组处理 正常对照组大鼠不做任何处理, 其余 3 个组均制作急性高眼压缺血-再灌注模型。造模第 2 天, 扩瞳检查大鼠眼部情况, 剔除前房出血、晶状体损伤、玻璃体积血和视网膜脱离大鼠, 并补齐至每组 6 只。模型对照组仅造模; Nec-1 处理组大鼠造模后即刻在光学显微镜下使用微量注射器给予玻璃体腔内注射终浓度为 4 mmol/L 的 Nec-1 DMSO

溶液 2 μ l; 阴性对照组以同法注射 DMSO 2 μ l。

1.2.2 急性高眼压缺血-再灌注模型的制作 参照 Büchi 等^[11] 的方法, 采用质量分数 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔内注射麻醉后, 固定大鼠四肢及头部, 将带有 31G BD 针头的注射器与含 500 ml 质量分数 0.9% 氯化钠注射液输液瓶相连, 针头自鼻上方向角膜中心穿入大鼠左眼前房, 调节输液瓶高度使液面与大鼠角膜缘垂直距离为 150 cm, 即造成相当于 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 的高眼压, 连续维持高眼压 60 min 后降低输液瓶高度至大鼠眼球水平, 拔出前房灌注针头, 恢复视网膜血供。

1.2.3 眼球切片的制作 造模后 7 d, 各组大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛麻醉后打开胸腔, 暴露心脏, 经左心室灌注 0.9% 氯化钠溶液, 并以质量分数 4% 多聚甲醛溶液灌注固定心脏 10 min, 迅速摘取术眼眼球置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋后视盘旁 0.5 mm 处制作 5 μ m 厚切片, 60 $^{\circ}$ C 烤片 20 min, 备用。

1.2.4 苏木精-伊红染色法观察视网膜结构 取 1.2.3 制作的各组眼球相同部位连续 3 张切片行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察切片后极部中点连续 3 个视野视网膜结构并拍照。

1.2.5 免疫组织化学染色法检测视网膜中 Thy-1 的表达 取 1.2.3 制作的各组眼球相同部位连续 3 张视网膜切片, 常规脱蜡、水化, 滴加质量分数 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶。将切片放入 pH 6.0 柠檬酸缓冲液后置于微波炉内高火加热 3 min 后停火, 微波炉内静置 5 min, 再重复此步骤 1 次; 随后中低火加热 1 min 后停火, 微波炉内静置 5 min; 切片自然冷却后置于磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中浸洗 2 次, 每次 3 min; 置于体积分数 10% 山羊血清溶液室温封闭 30 min; 滴加兔抗大鼠 Thy-1 多克隆抗体 (1:100); 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色 10 s ~ 3 min, 苏木素复染, 封片。每张切片在 200 倍光学显微镜下于后极部中点对称选择 5 个视野采集图像并拍照, 细胞核或细胞质呈黄褐色染色为 Thy-1 免疫阳性细胞。

1.2.6 免疫组织化学染色法检测视网膜中 GFAP 的表达 取 1.2.3 制作的各组眼球视网膜切片, 每只眼球随机取 4 张切片, 常规脱蜡、水化, 滴加体积分数 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶。将切片放入

pH 6.0 柠檬酸缓冲液后置于微波炉内, 抗原修复 20 min; 自然冷却后蒸馏水清洗 2 次, 每次 3 min, PBS 浸洗 2 次, 每次 3 min; 置于 10% 山羊血清溶液室温封闭 30 min; 滴加兔抗大鼠 GFAP 多克隆抗体 (1:1000); 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1:100), 室温孵育 30 min, DAB 显色 3 min, 苏木素复染, 封片。GFAP 阳性染色为棕黄色。每张切片随机取 4 个视野采集图像, 采用 ImageJ 软件分析图像, 计算平均积分吸光度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。各组测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经 Levene 检验证实方差齐, 组间总体差异比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜组织结构比较

苏木精-伊红染色结果显示, 正常对照组视网膜结构清晰, RGCs 层排列紧密, 各层结构未发生明显改变。与正常对照组比较, 模型对照组和阴性对照组神经纤维层变薄, RGCs 层细胞排列疏松, 内核层细胞减少、排列紊乱, 外核层细胞正常或变大; 与正常对照组比较, Nec-1 处理组视网膜神经纤维层略薄, RGCs 排列整齐、较疏松, 视网膜层数无明显变化, 细胞数量较少。与模型对照组和阴性对照组比较, Nec-1 处理组神经纤维层厚度增加, RGCs 数量较多、排列整齐 (图 1)。

2.2 各组大鼠视网膜 Thy-1 表达情况比较

免疫组织化学染色结果显示, Thy-1 免疫反应主要存在于神经纤维层及 RGCs 层, 部分内核层也可见 Thy-1 免疫阳性反应。模型对照组和阴性对照组 Thy-1 阳性染色较正常对照组明显减弱, Nec-1 处理组 Thy-1 阳性染色较模型对照组明显增强。模型对照组大鼠视网膜 Thy-1 阳性 RGCs 数量较正常对照组明显减少, Nec-1 处理组大鼠视网膜 Thy-1 阳性 RGCs 数量较模型对照组明显增多 (图 2)。

2.3 各组大鼠视网膜 GFAP 表达比较

免疫组织化学染色结果显示, 正常对照组大鼠视网膜 GFAP 在神经纤维层呈弱阳性表达。与正常对照组比较, 模型对照组、阴性对照组和 Nec-1 处理组 GFAP 在神经纤维层、RGCs 层、内丛状层、内核层有阳性丝状染色, 呈强阳性表达。与模型对照组和阴性对照组比较, Nec-1 处理组 GFAP 在视网膜各层表达减

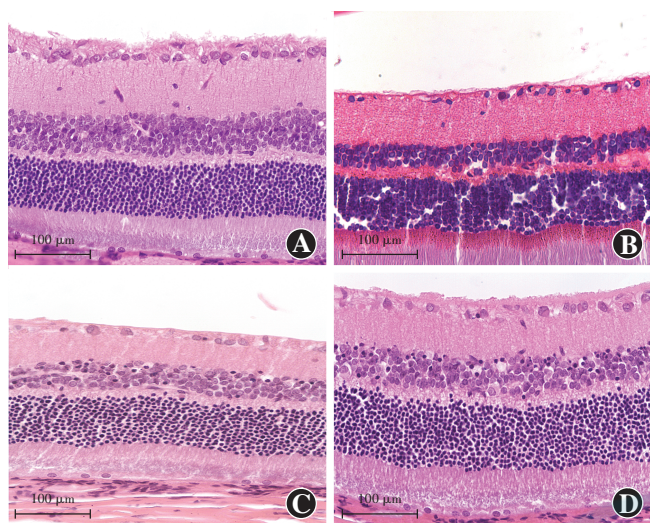


图1 各组大鼠视网膜组织结构变化 (HE ×400, 标尺 = 100 μm)

A: 正常对照组视网膜各层结构正常 B: 模型对照组神经纤维层变薄, RGCs 数量减少、排列疏松 C: 阴性对照组神经纤维层变薄, RGCs 数量减少、排列疏松 D: 与模型对照组比较, Nec-1 处理组神经纤维层厚度增加, RGCs 数量较多、排列整齐

Figure 1 Histopathological staining of rat retinas (HE ×400, bar = 100 μm)

A: Rat retinal structures of normal control group were normal B: The nerve fiber layer of rats in model control group was thinner; the number of RGCs decreased and the arrangement was loose C: The nerve fiber layer of rats in negative control group was thinner; the number of RGCs was reduced and the arrangement was loose D: Compared with model control group, the nerve fiber layer was thickened, and the number of RGCs was increased, and the arrangement of RGCs was more regular in Nec-1 treatment group

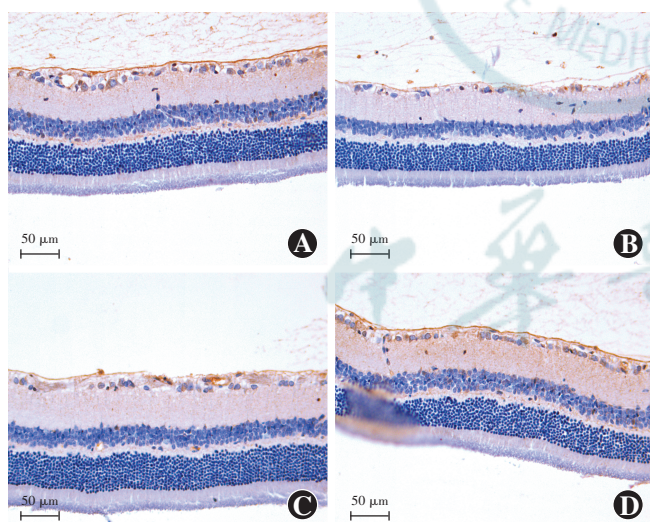


图2 各组大鼠 Thy-1 染色阳性 RGCs 情况 (DAB ×200, 标尺 = 50 μm)

Thy-1 免疫反应阳性 RGCs 的细胞核或细胞质呈黄褐色染色 A: 正常对照组大鼠视网膜呈 Thy-1 阳性染色 B: 模型对照组 Thy-1 染色明显减弱 C: 阴性对照组 Thy-1 染色明显减弱 D: Nec-1 处理组 Thy-1 染色明显增强

Figure 2 Thy-1 staining of rat RGCs (DAB ×200, bar = 50 μm)

The nuclei or cytoplasm of Thy-1 staining-positive RGCs were yellow-brown staining A: Rat retinas of normal control group were Thy-1 staining-positive B: Thy-1 staining of model control group was significantly weakened C: Thy-1 staining of negative control group was significantly attenuated D: Thy-1 staining of Nec-1 treatment group was significantly enhanced

弱(图3)。各组 GFAP 平均积分吸光度值总体比较差异有统计学意义 ($F = 24.675, P < 0.001$), 其中与正常对照组比较, 模型对照组、阴性对照组和 Nec-1 处理组 GFAP 平均积分吸光度值明显升高; Nec-1 处理组 GFAP 平均积分吸光度值较模型对照组和阴性对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表1)。

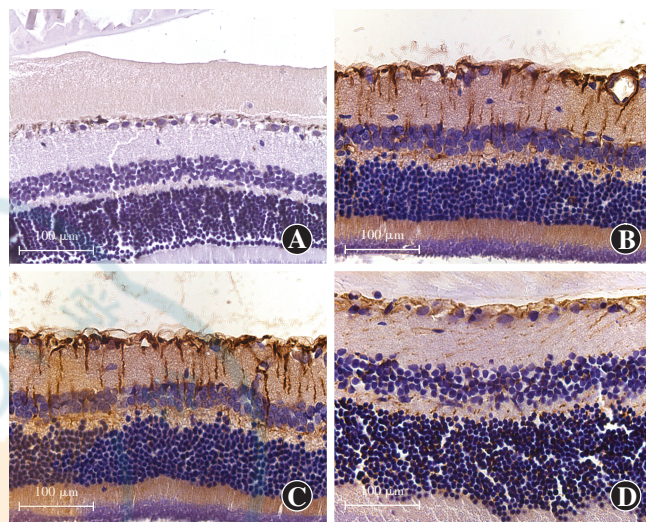


图3 各组大鼠视网膜 GFAP 表达情况 (DAB ×400, 标尺 = 100 μm)

GFAP 阳性染色为棕黄色 A: 正常对照组 GFAP 在神经纤维层有弱阳性表达 B: 模型对照组 GFAP 表达较正常对照组明显增加 C: 阴性对照组 GFAP 表达较正常对照组明显增加 D: Nec-1 处理组视网膜各层散在表达 GFAP

Figure 3 Expression of GFAP protein in rat retinas (DAB ×400, bar = 100 μm)

Positive staining of GFAP protein was brownish yellow A: Weak expression of GFAP was found in the nerve fiber layer of normal control group B: Significantly increased expression of GFAP than normal control group was found in model control group C: Significantly increased expression of GFAP than normal control group was found in negative control group D: Scattered expression of GFAP was found in various layers of Nec-1 treatment group

表1 各组大鼠视网膜细胞中 GFAP

平均积分吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of integrated absorbance values of GFAP protein in rat retinal cells among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	GFAP 的平均积分吸光度值
正常对照组	6	47.209 ± 15.311
模型对照组	6	116.220 ± 18.194 ^a
阴性对照组	6	116.382 ± 19.020 ^a
Nec-1 处理组	6	92.818 ± 10.236 ^{abc}
F 值		24.675
P 值		<0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) GFAP: 胶质原纤维酸性蛋白

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with model control group, ^b $P < 0.05$; compared with negative control group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) GFAP: glial fibrillary acidic protein; Nec-1: necrostatin-1



3 讨论

程序性坏死是一种受调控的细胞坏死机制,已有研究表明程序性坏死在缺血-再灌注损伤、炎症、神经退行性病变等多种疾病中发挥重要作用。程序性坏死是由 RIPK1 和 RIPK3 相互作用形成坏死小体向下游传导信号完成的。Nec-1 是程序性坏死的特异性阻断剂,可以通过抑制 RIPK1 和 RIPK3 相互作用阻止坏死小体形成,从而达到保护神经的作用^[3-4,12]。越来越多的研究表明,程序性坏死参与了青光眼等缺血性相关眼病。Do 等^[13]研究发现,RIPK1 抑制复合物对青光眼大鼠模型 RGCs 缺血损伤有保护作用。彭亚力等^[14]认为,对前房灌注致缺血-再灌注损伤的小鼠行 Nec-1 预处理可以阻断 RGCs 坏死性凋亡。Thy-1 抗原是存在于啮齿类动物多类细胞表面的一种糖蛋白,被认为是成熟 RGCs 的标志^[15]。Dabin 等^[16]研究发现,Müller 细胞的纯培养物被 Thy-1 抗体强烈标记,视网膜神经元缺失后,Müller 细胞可以表达 Thy-1。本研究发现,Thy-1 免疫反应主要存在于神经纤维层及 RGCs 层,部分内核层也有 Thy-1 免疫阳性反应。正常对照组可见 RGCs 细胞核或细胞质 Thy-1 染色明显,而模型对照组 Thy-1 染色阳性的 RGCs 数量明显减少;经玻璃体腔内注射 Nec-1 处理后,Thy-1 染色阳性的 RGCs 数量较模型对照组明显增加,说明 Nec-1 可以抑制急性高眼压大鼠 RGCs 的减少,程序性坏死参与了急性高眼压的病理过程。

胶质细胞是一类重要的视网膜细胞,可以调节神经元活性,影响神经元在各种损伤中的存活。胶质细胞活化是视网膜损伤后常见的现象^[17],但活化的胶质细胞在视网膜中的确切功能尚不明确。有研究表明,活化的胶质细胞可以释放大量炎症介质,引起神经元损伤。GFAP 是一种骨架蛋白,其过度表达是视网膜星形胶质细胞和 Müller 细胞反应性活化的重要标志,是神经系统对各种损伤的必要反应^[18]。凌志红等^[19]研究表明,在慢性高眼压模型建立后 12 h,GFAP 在星形胶质细胞的表达开始增加,同时 Müller 细胞也开始表达 GFAP,提示在慢性高眼压模型建立后 12 h 星形胶质细胞及 Müller 细胞即呈现活化状态,于造模后 4 周达高峰,造模后 8 周活化水平开始降低。Zhang 等^[20]研究发现,在高眼压模型大鼠眼压急性升高后第 1 天视网膜神经纤维层及 RGCs 层即有 GFAP 表达,并持续至第 4 周,同时观察到视网膜中胶质细胞活化发生的时间比 RGCs 的丢失明显较早。张绍丹等^[21]研究也证实,急性眼压升高早期即可引起 RGCs 丢失及

轴突变性,视觉神经元改变的同时伴随胶质细胞的活化。本研究中大鼠急性眼压升高后 7 d,视网膜 GFAP 表达上调,胶质细胞活化;玻璃体腔内注射 Nec-1 后视网膜 GFAP 的表达及胶质细胞活化减少,说明程序性坏死参与了视网膜胶质细胞活化。程序性坏死可以在 TNF- α 、TRAIL、FasL 等炎症因子存在情况下被介导激活。当视网膜受到缺血等损伤时,胶质细胞的免疫调节作用使炎症因子表达上调。TNF- α 作为星形胶质细胞及 Müller 细胞的主要免疫产物,是程序性坏死的主要诱导剂,进一步引起视网膜细胞死亡,造成级联放大作用,加重视网膜细胞损伤^[22]。本研究仅证明急性高眼压损伤后,Nec-1 可以抑制视网膜胶质细胞的活化,但其通过何种途径调控仍需进一步研究。目前有研究表明,中枢神经系统程序性坏死通路可能通过调控 Toll 样受体 4/核因子 κ B (Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B,TLR4/NF- κ B) 途径参与小胶质细胞活化^[23]。Ni 等^[24]研究认为,持续性大脑中央动脉闭塞或葡萄糖剥夺使 RIPK1、RIPK3 和 RIPK1-RIPK3 复合物增加,进而引起神经元及星形胶质细胞死亡。以上中枢神经系统中程序性坏死与胶质细胞活化之间的调控机制研究可为急性高眼压视网膜细胞程序性坏死的机制研究提供一些启示。

综上所述,本研究结果表明 Nec-1 可以抑制急性高眼压大鼠 RGCs 死亡,减少 GFAP 的表达,对急性高眼压大鼠 RGCs 程序性坏死具有抑制作用。目前关于青光眼程序性坏死具体分子机制的研究尚少,视网膜作为视神经系统的延续,Nec-1 是通过何种途径减轻急性高眼压后视网膜的炎症反应和胶质细胞活化仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 景原媛:设计实验、实施研究、文稿书写;马伊:参与选题、指导实验、对文稿审阅修改及定稿;王凯:实施研究、审阅文稿;刘竹青:实施研究

参考文献

- [1] Gupta N, Yücel YH. Glaucoma as a neurodegenerative disease[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2007, 18 (2): 110-114. DOI: 10. 1097/ICU. 0b013e3280895aea.
- [2] Quigley HA. Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny[J]. Aust N Z J Ophthalmol, 1995, 23 (2): 85-91. DOI: 10. 1111/j. 1442-9071. 1995. tb00135. x.
- [3] Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15 (2): 135-147. DOI: 10. 1038/nrm3737.
- [4] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. Nature, 2015, 517 (7534): 311-320. DOI: 10. 1038/nature14191.

- [5] Tamura R, Nemoto T, Maruta T, et al. Up-regulation of NaV1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor- α in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Anesth Analg*, 2014, 118 (2): 318–324. DOI: 10.1213/ANE.0000000000000085.
- [6] Hanus J, Zhang H, Wang Z, et al. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e965 [2021-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336085/>. DOI: 10.1038/cddis.2013.478.
- [7] Sato K, Li S, Gordon WC, et al. Receptor interacting protein kinase-mediated necrosis contributes to cone and rod photoreceptor degeneration in the retina lacking interphotoreceptor retinoid-binding protein [J/OL]. *J Neurosci*, 2013, 33 (44): 17458–17468 [2021-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24174679/>. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1380-13.2013.
- [8] Moquin DM, McQuade T, Chan FK. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e76841 [2021-09-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24098568/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0076841.
- [9] Wurm A, Iandiev I, Uhlmann S, et al. Effects of ischemia-reperfusion on physiological properties of Müller glial cells in the porcine retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (6): 3360–3367. DOI: 10.1167/iov.10-6901.
- [10] Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1 (2): 112–119. DOI: 10.1038/nchembio711.
- [11] Büchi ER, Suvaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study [J]. *Ophthalmologica*, 1991, 203 (3): 138–147. DOI: 10.1159/000310240.
- [12] Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9 (5): 378–390. DOI: 10.1038/nrm2393.
- [13] Do YJ, Sul JW, Jang KH, et al. A novel RIPK1 inhibitor that prevents retinal degeneration in a rat glaucoma model [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359 (1): 30–38. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.012.
- [14] 彭亚力, 胡敏, 孔蕾, 等. 特异性阻断剂 Nec-1 对视网膜缺血再灌注损伤模型小鼠坏死性凋亡的影响及作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37 (10): 914–917. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0232.
- Peng YL, Hu M, Kong L, et al. Effects of Nec-1 on necroptosis and retinal ganglion cells in mouse model of retina ischemia reperfusion injury [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37 (10): 914–917. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0232.
- [15] Partida GJ, Stradleigh TW, Ogata G, et al. Thy1 associates with the cation channel subunit HCN4 in adult rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (3): 1696–1703. DOI: 10.1167/iov.11-9307.
- [16] Dabin I, Barnstable CJ. Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death [J]. *Glia*, 1995, 14 (1): 23–32. DOI: 10.1002/glia.440140105.
- [17] Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 93 (3): 421–443. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
- [18] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25 (4): 397–424. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- [19] 凌志红, 孙兴怀. 慢性高血压大鼠视网膜神经胶质细胞组织病理学改变 [J]. *中华眼科杂志*, 2008, 44 (5): 391–397. DOI: 10.3321/j.issn.0412-4081.2008.05.003.
- Ling ZH, Sun XH. Pathological changes of retinal glial cells in a rat chronic ocular hypertension model [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2008, 44 (5): 391–397. DOI: 10.3321/j.issn.0412-4081.2008.05.003.
- [20] Zhang S, Wang H, Lu Q, et al. Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension [J]. *Brain Res*, 2009, 1303: 131–143. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.029.
- [21] 张绍丹, 李维义, 王文倩, 等. 急性眼压升高所致视网膜、视神经及视交叉胶质细胞的早期反应 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30 (8): 704–708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.08.007.
- Zhang SD, Li WY, Wang WQ, et al. Detection of early glial responses in the retina, optic nerve and optic chiasm in acute ocular hypertension rat model [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30 (8): 704–708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.08.007.
- [22] Kim CR, Kim JH, Park HL, et al. Ischemia reperfusion injury triggers TNF α induced-necroptosis in rat retina [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 (5): 771–779. DOI: 10.1080/02713683.2016.1227449.
- [23] 杨龙, 刘芷含, 张瑞成, 等. Necrostatin-1 对 TLR4/NF- κ B 途径的调控在大鼠缺血再灌注后小胶质细胞活化中的意义 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35 (12): 1079–1082.
- Yang L, Liu ZH, Zhang RC, et al. Effects of necrostatin-1 on microglia activation by regulating the TLR4/NF- κ B pathway after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2018, 35 (12): 1079–1082.
- [24] Ni Y, Gu WW, Liu ZH, et al. RIP1K contributes to neuronal and astrocytic cell death in ischemic stroke via activating autophagic-lysosomal pathway [J]. *Neuroscience*, 2018, 371: 60–74. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.10.038.

(收稿日期:2021-09-20 修回日期:2022-02-11)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本期英文缩略语名词解释

ILK:整合素连接激酶(integrin-linked kinase)

siRNA:小干扰RNA(small interfering RNA)

AAV:腺相关病毒(adeno-associated virus)

PEI:超声乳化白内障摘出人工晶状体植入术(phacoemulsification cataract extraction combined with intraocular lens implantation)

PACG:原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma)

(本刊编辑部)



中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究