

· 实验研究 ·

敲低 NLRP12 对高眼压大鼠 RGCs 的保护作用及其抑制细胞焦亡的机制

宋伟琼¹ 何芳¹ 杜玲芳¹ 谭华霞¹ 刘丹²¹湖南省郴州市第一人民医院眼科, 郴州 423000; ²中南大学湘雅医院眼科, 长沙 410078

通信作者: 何芳, Email: 726414122@qq.com

【摘要】 目的 探讨敲低 NOD 样受体家族热蛋白结构域 12 (NLRP12) 对高眼压大鼠视网膜神经节细胞 (RGCs) 炎症因子水平和视网膜损伤的影响及其机制。 **方法** 选取 70 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠, 采用随机数字表法分为对照组、高眼压组、高眼压+小干扰 RNA 阴性对照 (siNC) 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+重组大鼠 caspase-1 (rrcaspase-1) 组, 每组 14 只。其中对照组仅接受右眼结膜切口处理, 其他各组均采用巩膜外静脉烧灼法建立大鼠右眼高眼压模型; 高眼压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组建立高眼压模型后分别给予尾静脉注射 siNC、siNLRP12 和 siNLRP12+rrcaspase-1 试剂。巩膜外静脉烧灼术后 1 d、1 周、2 周、3 周, 测量大鼠右眼眼压; 巩膜外静脉烧灼术后 3 周, 采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠视网膜结构, 计数各组 RGCs 数量。将 RGCs 分为对照组、rrcaspase-1 组、siNC+rrcaspase-1 组、siNLRP12+rrcaspase-1 组, 其中 rrcaspase-1 组、siNC+rrcaspase-1 组、siNLRP12+rrcaspase-1 组分别采用 rrcaspase-1、siNC+rrcaspase-1 和 siNLRP12+rrcaspase-1 处理细胞 24 h, 对照组不予处理。采用 Western blot 法检测 RGCs 和大鼠视网膜组织中 NLRP12、caspase-1、cleaved-caspase-1 蛋白表达水平; 采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清或细胞培养物上清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及白细胞介素 1 β (IL-1 β) 浓度。 **结果** 与对照组比较, 术后 1、2、3 周高眼压组眼压高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。对照组视网膜各层组织清晰, RGCs 呈单层排列, 高眼压组和高眼压+siNC 组 RGCs 层松散, 视网膜内丛状层变薄。高眼压+siNLRP12 组视网膜内丛状层较高眼压组增厚, 高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 层松散。对照组、高眼压组、高眼压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量分别为 (119.31 \pm 23.25)、(89.19 \pm 16.98)、(88.87 \pm 13.92)、(109.33 \pm 10.25) 和 (92.89 \pm 12.58) 个, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 201.932, P < 0.001$), 其中高眼压组、高眼压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量少于对照组, 高眼压+siNLRP12 组 RGCs 数量多于高眼压+siNC 组, 高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量少于高眼压+siNLRP12 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。高眼压组、高眼压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组大鼠视网膜组织中 caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF- α 和 IL-1 β 浓度较对照组升高, 高眼压+siNLRP12 组较高眼压+siNC 组降低, 高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组较高眼压+siNLRP12 组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。rrcaspase-1 组、siNC+rrcaspase-1 组 RGCs 中 caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量较对照组增加, siNLRP12+rrcaspase-1 组 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量较对照组降低, rrcaspase-1 组、siNC+rrcaspase-1 组、siNLRP12+rrcaspase-1 组 TNF- α 和 IL-1 β 相对质量浓度较对照组升高, siNLRP12+rrcaspase-1 组 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF- α 和 IL-1 β 相对质量浓度较 siNC+rrcaspase-1 组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** 敲低 NLRP12 可通过抑制 caspase-1 激活改善高眼压引发的炎症反应和视网膜损伤。

【关键词】 青光眼; 高眼压; 视网膜神经节细胞; NOD 样受体家族热蛋白结构域 12; 半胱天冬酶 1; 细胞焦亡

基金项目: 湖南省自然科学基金科卫联合项目 (2019JJ80012)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211021-00572

Protective effect of NLRP12 knockdown on retinal damage in rats with ocular hypertension and its mechanism of inhibiting cell pyroptosis

Song Weiqiong¹, He Fang¹, Du Lingfang¹, Tan Huaxia¹, Liu Dan²¹Department of Ophthalmology, The First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, China; ²Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China

Corresponding author: He Fang, Email: 726414122@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the effect and mechanism of NOD-like receptor family pyrin domain containing 12 (NLRP12) knockdown on inflammatory factor levels and retinal injury in retinal ganglion cells (RGCs) of rats with high intraocular pressure. **Methods** Seventy SPF adult male SD rats were selected and randomized into control group, high intraocular pressure (IOP) group, high IOP + small interfering RNA negative control (siNC) group, high IOP+siNLRP12 group and high IOP+siNLRP12+recombinant rat caspase-1 (rrcaspase-1) group, with 14 rats in each group. Rats in the control group were only treated with conjunctival incision in the right eye, and ocular hypertension model was established in the other four groups with external scleral vein cauterization. High IOP+siNC group, high IOP+siNLRP12 group and high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group were injected with siNC, siNLRP12 and siNLRP12+rrcaspase-1 reagent via the tail vein, respectively. The IOP of the right eye was measured at 1 day, 1, 2 and 3 weeks after the operation. Three weeks after the operation, the retinal structure was observed by hematoxylin-eosin staining, and the number of RGCs in each group was counted. RGCs were divided into control group, rrcaspase-1 group, siNC+rrcaspase-1 group, siNLRP12+rrcaspase-1 group. The cells in rrcaspase-1 group, siNC+rrcaspase-1 group and siNLRP12+rrcaspase-1 group were treated with rrcaspase-1, siNC+rrcaspase-1 and siNLRP12+rrcaspase-1 reagent for 24 hours, respectively. No treatment was given to the control group. The expression levels of NLRP12, caspase-1 and cleaved-caspase-1 proteins in RGCs and retinal tissue were detected by Western blot. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in rat serum or cell culture supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the First People's Hospital of Chenzhou (No. 2020086). **Results** Compared with control group, the IOP was higher in high IOP group at 1, 2 and 3 weeks after cauterization, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The retinal tissue was clear with the RGCs in a single layer arrangement in the control group. In the high IOP group and the high IOP+siNC group, the RGCs layer was loose and the inner plexiform layer was thin. The inner plexiform layer was thickened in high IOP+siNLRP12 group compared with high IOP group, and the RGCs layer was loose in the high IOP+siNLRP12 group and the high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group. The number of RGCs in control group, high IOP group, high IOP+siNC group, high IOP+siNLRP12 group and high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group was 119.31 ± 23.25 , 89.19 ± 16.98 , 88.87 ± 13.92 , 109.33 ± 10.25 and 92.89 ± 12.58 , respectively, showing a statistically significant overall difference ($F = 201.932$, $P < 0.001$). The number of RGCs was lower in the high IOP group, high IOP+siNC group, high IOP+siNLRP12 group and high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group than the control group, higher in the high IOP+siNLRP12 group than the high IOP+siNC group, and lower in the high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group than the high IOP+siNLRP12 group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative expressions of caspase-1 and cleaved-caspase-1 proteins and the concentrations of TNF- α and IL-1 β in the retinal tissue were higher in high IOP group, high IOP+siNC group, high IOP+siNLRP12 group and high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group than control group, higher in high IOP+siNLRP12 group than high IOP+siNC group, and higher in high IOP+siNLRP12+rrcaspase-1 group than high IOP+siNLRP12 group (all at $P < 0.05$). Relative expression levels of caspase-1 and cleaved-caspase-1 protein were increased in rrcaspase-1 group and siNC+rrcaspase-1 group compared with control group, and relative expression levels of NLRP12, caspase-1 and cleaved-caspase-1 protein were decreased in siNLRP12+rrcaspase-1 group compared with control group (all at $P < 0.05$). The relative mass concentrations of TNF- α and IL-1 β were increased in rrcaspase-1 group, siNC+rrcaspase-1 group and siNLRP12+rrcaspase-1 group compared with the control group (all at $P < 0.05$). Relative expression levels of NLRP12, caspase-1 and cleaved-caspase-1 proteins and relative mass concentrations of TNF- α and IL-1 β in siNLRP12+rrcaspase-1 group were lower than those in siNC+rrcaspase-1 group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Knockdown of NLRP12 can reduce the inflammatory response and retinal injury induced by high IOP by inhibiting the activation of caspase-1.

[Key words] Glaucoma; Ocular hypertension; Retinal ganglion cells; NLRP12 protein; Caspase-1; Pyroptosis

Fund program: Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ80012)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211021-00572

视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 死亡是青光眼致盲或视野缺损的潜在病理机制^[1]。

年龄是青光眼的主要危险因素,而目前认为眼压升高是关键的可变危险因素^[2-3]。而且,通过手术或药物



降低眼压可将视网膜损伤和渐进性视野丧失的发生率降低近一半^[3],从而确立了降低眼压是治疗青光眼的有效方法。高眼压会导致细胞毒性因子和退化因子的产生。其中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种促炎细胞因子,在青光眼患者和青光眼模型大鼠的视盘中检测到 TNF- α 及其受体表达升高,而且 TNF- α 介导了高眼压对 RGCs 的细胞毒性作用^[4]。研究发现,NOD 样受体家族热蛋白结构域 12 (NOD-like receptors family pyrin domain containing 12, NLRP12) 在调节自身炎症性疾病中发挥重要作用^[5-6]。Caspase-1 介导的细胞焦亡在促进促炎细胞因子表达方面具有关键作用^[7]。NLRP12 可以通过激活 caspase-1 诱发神经节细胞焦亡和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 成熟,促进青光眼的 RGCs 死亡和神经炎症^[7]。然而,在高眼压中 NLRP12 能否通过激活 caspase-1 调控 RGCs 炎症及阻断 NLRP12/caspase-1 信号对高眼压环境下视网膜损伤是否具有改善作用尚不清楚。本研究拟探讨高眼压造成大鼠 RGCs 损伤的炎性机制,研究敲低 NLRP12 对 RGCs 的影响及其作用机制,为青光眼视神经损伤的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞来源 8~10 周龄成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 70 只,体质量 200~300 g,购自西安交通大学动物实验中心。大鼠在 12 h 光/暗循环中饲养,可自由获取水和食物。所有动物实验均遵循视觉与眼科研究协会关于在眼科和视力研究中使用动物的声明,并获得湖南省郴州市第一人民医院动物伦理委员会批准(批文号:2020086)。大鼠 RGCs (CP-R122) 购于武汉普诺赛公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗大鼠 NLRP12 抗体 (#A6671)、兔抗大鼠 caspase-1 抗体 (#A0964) (美国 ABclonal Biotech 公司);兔抗大鼠 cleaved-caspase-1 抗体 (YC0002)、兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (YM3029) (美国 Immunoway 公司);山羊抗兔二抗 (美国 Bioworld Technology 公司);兔抗大鼠 β -微管蛋白 III (β -tubulin III) 抗体 (ab18207), Alexa Fluor 488 偶联的山羊抗兔 IgG (ab150077), IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 Abcam 公司);靶向大鼠 NLRP12 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (上海吉

玛公司);Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司);活性重组大鼠 caspase-1 (rat recombinant caspase-1, rrcaspase-1) (7524-100) (美国 Biovision 公司);氯胺酮、甲苯噻嗪 (美国 Phoenix Scientific 公司);苏木精-伊红染色试剂盒、RIPA 裂解液 (上海碧云天公司);增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (美国 eBioscience 公司)。眼科烧灼器 (美国 Rumex 国际公司);眼压计 (TV02, 芬兰 TonoLab 公司);RM2235 型石蜡切片机、Leica DM2000 生物显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 常规培养大鼠 RGCs 及分组处理 采用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 RGCs,将细胞置于体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 湿润培养箱中培养 24 h,更换新鲜 DMEM 培养基,培养 5~7 d。RGCs 到达对数生长期后,将其分为对照组、rrcaspase-1 组、siRNA 阴性对照 (siRNA negative control, siNC) + rrcaspase-1 组、siNLRP12 + rrcaspase-1 组,其中 rrcaspase-1 组、siNC + rrcaspase-1 组、siNLRP12 + rrcaspase-1 组分别采用加入 rrcaspase-1 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、siNC + rrcaspase-1 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 siNLRP12 (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + rrcaspase-1 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 试剂的含 Lipofectamine 3000 的 DMEM 培养基处理细胞 24 h,对照组不予处理。去除各组细胞培养基,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次,免疫固定液室温固定 15 min, PBS 洗涤 5 次,每次 10 min;室温下用免疫染色封闭缓冲液将 RGCs 封闭 1 h,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用以 1:500 稀释的抗 β -tubulin III 一抗孵育过夜。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,将细胞用荧光二抗 (1:1000) 在室温下孵育 2 h。荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.2 大鼠高眼压模型建立及分组处理 采用氯胺酮 (100 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10 mg/kg) 肌肉注射全身麻醉大鼠。采用随机数字表法将 70 只大鼠分为对照组、高眼压组、高眼压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组,每组 14 只。于右眼建模,参照文献[8-9]的方法通过巩膜外静脉烧灼术诱发高眼压模型。通过角膜缘周边的结膜和 Tenon 囊做 1 个切口。右眼巩膜外静脉通过其相对于眼外肌的位置来识别,其中 2 条背静脉和 1 条颞腹静脉在手术显微镜下用手持眼科烧灼器进行烧灼。对照组大鼠仅接受右眼结膜切口处理,不进行烧灼。成功的高眼压模型被定义为眼压升高大于基线眼压的 30%,并且巩膜外静脉烧灼术后没有与烧灼相关的并发症。高眼

压+siNC 组、高眼压+siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组建立高眼压模型后立即分别给予尾静脉注射 0.2 ml siNC、siNLRP12 (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 siNLRP12 (20 $\mu\text{mol/L}$)+rrcaspase-1 (2 $\mu\text{g/ml}$) 试剂。

1.2.3 siRNA 细胞转染 通过 NCBI 数据库获得 NLRP12 的基因序列 CCAAATGGAGACCCTCTTT。RGCs 接种至 6 孔板,待 RGCs 长至 70% 融合后,将 siRNA 加入含 Lipofectamine 3000 的 DMEM 培养基并替换原来的培养基,培养细胞 24 h。随后收集细胞抽提细胞总蛋白,采用 Western blot 法检测 NLRP12 的表达量评估转染效果。

1.2.4 大鼠眼压测量 巩膜外静脉烧灼术后 1 d、1 周、2 周、3 周,采用质量分数 0.5% 盐酸丙胺卡因滴眼液局部麻醉大鼠,测量大鼠右眼眼压,若峰值眼压高于基线或 <6 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 或发生角膜溃疡、前房积血及其他眼部病变,则将大鼠排除,同时补充大鼠至基线数量。

1.2.5 苏木精-伊红染色法观察大鼠视网膜结构 造模后 3 周,采用随机数字表法每组选择 3 只大鼠,腹腔内注射 3 倍麻醉剂量的巴比妥钠进行安乐死。左手抓住小鼠颈部皮肤,轻压在实验台上,取侧卧位,左手食指尽量将小鼠眼周皮肤往颈后压,使眼球突出。用眼科弯镊迅速夹出完整眼球,用质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min,沿角巩膜剪开眼球,去除角膜和晶状体,用 2 把显微镊夹住巩膜缘,并用镊子蜕去巩膜,用滤纸吸干房水和残余玻璃体,轻轻保留视网膜。视网膜组织用石蜡包埋保存。沿矢状面切片,每个组织制备 3 个视网膜组织切片,厚度为 5 μm ,用苏木精-伊红染色试剂盒进行染色。使用 Leica DM2000 生物显微镜观察切片,观察区域为内界膜至外界膜且距离视神经 1 mm 内,并获取该区域图片。由 2 名独立的观察者利用 ImageJ 1.8.0 软件中的计数模块获得各组图片中细胞核(紫蓝色)的数量即为视网膜细胞数量。

1.2.6 Western blot 法检测 RGCs 和视网膜组织中 NLRP12、caspase-1、cleaved-caspase-1 蛋白表达水平 大鼠造模后 3 周,采用随机数字表法各组选取 3 只大鼠,参照 1.2.5 部分提取大鼠视网膜组织。提取 1.2.1 部分 RGCs 和视网膜组织总蛋白,其中 RGCs 在冰浴中超声破碎 10 s,共 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心半径 6.5 cm,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。采用 RIPA 裂解液(强)裂解视网膜组织,离心收集上清液及蛋白定量方法同 RGCs。将等量的蛋白质(RGCs 为 50 μg ,视网膜组织为 100 μg)加样到 SDS-PAGE 凝胶上并转移至 PVDF

膜,用 TBST 稀释的质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 下兔抗大鼠 NLRP12 抗体(1:200)、caspase-1 抗体(1:200)、cleaved-caspase-1 抗体(1:500)、GAPDH 抗体(1:1 000)孵育过夜;次日,洗膜后用相应二抗(1:5 000)在室温下孵育 1 h,用 ECL 试剂盒观察条带并用 Image Lab 成像系统记录,使用 ImageJ 软件进行灰度分析。目的蛋白相对表达水平=(处理组目标灰度值/内参灰度值)/(对照组目标灰度值/内参灰度值)。

1.2.7 ELISA 法检测大鼠血清和 RGCs 培养物上清中 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度 收取各组培养 RGCs 的上清液和造模 3 周后 14 只大鼠静脉血清,用预冷 PBS 洗涤,离心半径 15 cm,1 500 r/min 离心 20 min。将上清液转移至新管中,分别使用 TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒检测 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平。使用 96 孔板分光光度计测量 450 nm 处的吸光度(A)值。通过与同时生成的标准曲线进行比较,将 A 值转换为 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度,并对数据进行标准化处理(对照组数值化为 1)得到 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度变化的相对值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经 Brown-Forsythe 和 Bartlett 检验证实方差齐。对照组和高眼压组术后不同时间点眼压总体比较采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。各组 RGCs 数量、目的蛋白相对表达量、TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度总体比较采用单因素方差分析,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 各组 RGCs 培养

对照组、rrcaspase-1 组、siNC + rrcaspase-1 组、siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 均被带有绿色荧光的 β -tubulin III 抗体所标记(图 1)。

2.2 对照组和高压眼组大鼠术后不同时间点眼压比较

对照组和高眼压组术后不同时间点眼压总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 128.255, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 92.562, P < 0.001$),其中与对照组比较,术后 1、2、3 周高眼压组眼压高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

2.3 各组大鼠视网膜结构和 RGCs 数量比较

对照组视网膜各层组织清晰,RGCs 呈单层排列,高眼压组和高眼压+siNC 组 RGCs 层松散,视网膜内丛

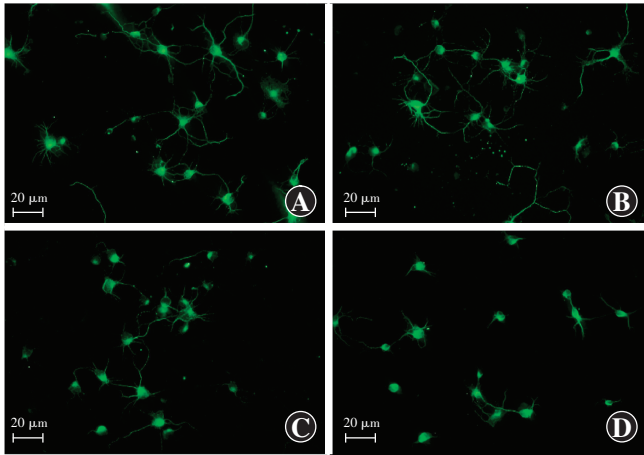


图 1 各组 β -tubulin III 标记的 RGCs (Alexa Fluor 488 \times 200, 标尺 = 20 μ m) 绿色荧光为 β -tubulin III 标记 RGCs A: 对照组 B: rrcaspase-1 组 C: siNC+rrcaspase-1 组 D: siNLRP12+rrcaspase-1 组
Figure 1 RGCs cells labeled with β -tubulin III (Alexa Fluor 488 \times 200, bar = 20 μ m) Green fluorescence showed β -tubulin III labeled RGCs A: control group B: rrcaspase-1 group C: siNC + rrcaspase-1 group D: siNLRP12+rrcaspase-1 group

状层变薄。高眼压+siNLRP12 组视网膜内丛状层较高血压组增厚, 高眼压+ siNLRP12 组和高眼压 + siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 层松散(图 2)。

对照组、高血压组、高血压 + siNC 组、高血压 + siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量分别为 (119.31 \pm 23.25)、(89.19 \pm 16.98)、(88.87 \pm 13.92)、(109.33 \pm 10.25)、(92.89 \pm 12.58) 个, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 201.932, P < 0.001$), 其中高血压组、高血压 + siNC 组、高血压 + siNLRP12 组和高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量少于对照组, 高眼压+siNLRP12 组 RGCs 数量多于高血压 + siNC 组, 高眼

压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 数量少于高血压 + siNLRP12 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 NLRP12 表达、caspase-1 活化及炎症因子表达水平比较

蛋白电泳结果显示, 与对照组比较, 高血压组、高血压 + siNC 组 高血压 + siNLRP12 组和高眼压 + siNLRP12+rrcaspase-1 组 caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白条带表达强度增加高血压组、高血压+siNC 组、高血压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 NLRP12 蛋白条带表达强度增加, 高眼压+siNLRP12 组 NLRP12 蛋白条带表达强度减弱; 与高血压组比较, 高血压+siNLRP12 组和高眼压 + siNLRP12+rrcaspase-1 组 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白条带表达强度减弱(图 3)。各组大鼠视网膜组织中 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 139.022, 36.981, 69.587, 96.065, 103.223$, 均 $P < 0.05$), 其中高血压组、高血压 + siNC 组、高血压 + siNLRP12 组和高眼压 + siNLRP12+rrcaspase-1 组 caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度较对照组升高, 高眼压+siNLRP12 组较高眼压+siNC 组降低, 高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组较高眼压+siNLRP12 组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 1 术后不同时间点各组大鼠眼压比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)
Table 1 Comparison of intraocular pressure of rats at different time points between control group and high IOP group ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

| 组别 | 样本量 | 1 d | 1 周 | 2 周 | 3 周 |
|------|-----|------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 | 14 | 14.67 \pm 0.84 | 14.63 \pm 1.25 | 14.54 \pm 1.62 | 14.42 \pm 0.30 |
| 高血压组 | 14 | 14.84 \pm 0.75 | 21.69 \pm 5.07 ^a | 27.61 \pm 4.06 ^a | 47.62 \pm 12.73 ^a |

注: $F_{\text{分组}} = 128.255, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 92.562, P < 0.001$. 与同时点对照组比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) 1 mmHg = 0.133 kPa

Note: $F_{\text{group}} = 128.255, P < 0.001; F_{\text{time}} = 92.562, P < 0.001$. Compared with control group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) 1 mmHg = 0.133 kPa

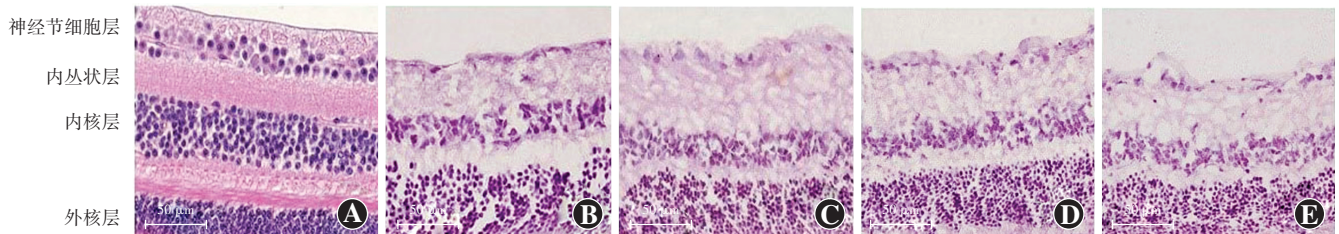


图 2 NLRP12 敲低后各组大鼠视网膜结构 (HE \times 200, 标尺 = 50 μ m) A: 对照组视网膜各层组织清晰, RGCs 呈单层排列 B: 高血压组 RGCs 层松散, 视网膜内丛状层变薄 C: 高血压+siNC 组 RGCs 层松散, 视网膜内丛状层变薄 D: 高血压+siNLRP12 组 RGCs 层松散, 内丛状层较高血压组变厚 E: 高血压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 RGCs 层松散

Figure 2 Retinal structures after knockdown of NLRP12 (HE \times 200, bar = 50 μ m) A: Retinal layers were clear with RGCs in a single layer arrangement in control group B: RGCs layer was loose and the inner plexiform layer was thinned in high IOP group C: RGCs layer was loose and the inner plexiform layer was thinned in high IOP+siNC group D: RGCs layer of the high IOP+siNLRP12 group was loose, and its inner plexiform layer was thickened in comparison with high IOP group E: RGCs layer was loose in high IOP+siNLRP12+ rrcaspase-1 group

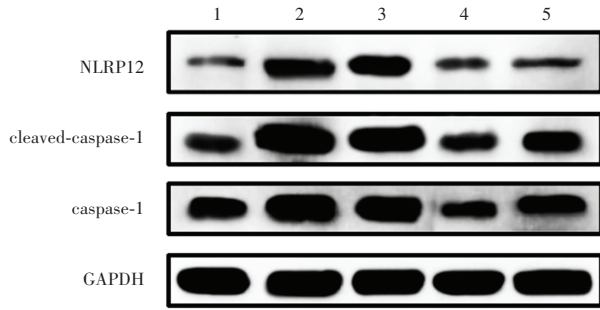


图 3 Western blot 法检测术后 3 周大鼠视网膜组织中 NLRP12、cleaved-caspase-1 和 caspase-1 表达 1: 对照组; 2: 高眼压组; 3: 高眼压+siNC 组; 4: 高眼压+siNLRP12 组; 5: 高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 NLRP: NOD 样受体家族热蛋白结构域; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Expression of 3-week postoperative NLRP12, cleaved-caspase-1 and caspase-1 in rat retinal tissue detected by Western blot 1: control group; 2: high IOP group; 3: high IOP+siNC group; 4: high IOP+siNLRP12 group; 5: high IOP + siNLRP12 + rrcaspase-1 group NLRP: NOD-like receptors family pyrin domain containing; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2.5 各组 RGCs 中 NLRP12 表达、caspase-1 活化及炎症因子表达水平比较

蛋白电泳结果显示, 与对照组比较, rrcaspase-1 组 cleaved-caspase-1 条带表达强度明显增加, NLRP12 条带表达强度变化不明显。与 siNC + rrcaspase-1 组比较, siNLRP12 + rrcaspase-1 组 cleaved-caspase-1 及 NLRP12 蛋白条带表达强度降低(图 4)。各组 RGCs 中 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF-α 和 IL-1β 相对质量浓度总体比较差异均有统计学意义 ($F = 56.302, 106.286, 108.629, 95.305,$

68.207, 均 $P < 0.05$), 其中 rrcaspase-1 组、siNC + rrcaspase-1 组 caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量较对照组升高, siNLRP12 + rrcaspase-1 组 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量较对照组降低, rrcaspase-1 组、siNC + rrcaspase-1 组、siNLRP12 + rrcaspase-1 组 TNF-α 和 IL-1β 相对质量浓度较对照组升高, siNLRP12 + rrcaspase-1 组 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF-α 和 IL-1β 相对质量浓度较 siNC + rrcaspase-1 组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

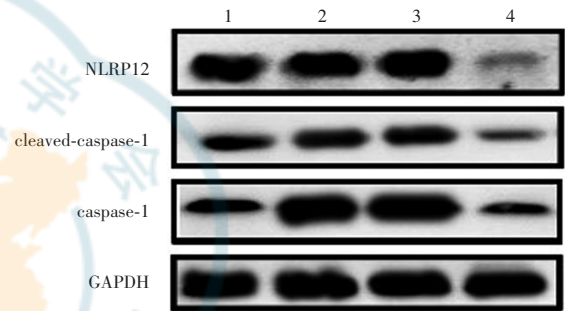


图 4 Western blot 法检测 RGCs 中 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 表达 1: 对照组; 2: rrcaspase-1 组; 3: siNC + rrcaspase-1 组; 4: siNLRP12 + rrcaspase-1 组 NLRP: NOD 样受体家族热蛋白结构域; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 Expression of NLRP12, caspase-1, and cleaved caspase-1 in RGCs detected by Western blot 1: control group; 2: rrcaspase-1 group; 3: siNC + rrcaspase-1 group; 4: siNLRP12 + rrcaspase-1 group NLRP: NOD-like receptors family pyrin domain containing; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组大鼠视网膜组织中 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF-α 和 IL-1β 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of NLRP12, caspase-1 and cleaved-caspase-1 expressions and relative expression levels of TNF-α and IL-1β in rat retinal tissues among various groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | NLRP12 | caspase-1 | cleaved-caspase-1 | TNF-α | IL-1β |
|----------------------------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 3 | 1.00±0.01 | 1.00±0.00 | 1.00±0.02 | 1.00±0.02 | 1.00±0.03 |
| 高眼压组 | 3 | 2.12±0.09 ^a | 1.37±0.07 ^a | 3.62±0.42 ^a | 6.55±0.06 ^a | 3.57±0.08 ^a |
| 高眼压+siNC 组 | 3 | 2.11±0.11 ^a | 1.35±0.09 ^a | 3.59±0.39 ^a | 6.56±0.10 ^a | 3.55±0.06 ^a |
| 高眼压+siNLRP12 组 | 3 | 0.73±0.02 ^{ab} | 1.08±0.02 ^{ab} | 1.53±0.07 ^{ab} | 4.87±0.11 ^{ab} | 2.48±0.02 ^{ab} |
| 高眼压+siNLRP12+rrcaspase-1 组 | 3 | 1.26±0.06 ^{ac} | 1.25±0.10 ^{ac} | 2.45±0.28 ^{ac} | 6.24±0.06 ^{ac} | 3.27±0.03 ^{ac} |
| F 值 | | 139.022 | 36.981 | 69.587 | 96.065 | 103.223 |
| P 值 | | <0.001 | 0.020 | 0.009 | <0.001 | <0.001 |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高眼压+siNC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与高眼压+siNLRP12 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) NLRP: NOD 样受体家族热蛋白结构域; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; siNC: 小干扰 RNA 阴性对照; rrcaspase-1: 重组大鼠 caspase-1

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with high IOP+siNC group, ^b $P < 0.05$; compared with high IOP+siNLRP12 group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) NLRP: NOD-like receptors family pyrin domain containing; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; siNC: small interfering RNA negative control; rrcaspase-1: rat recombinant caspase-1

表 3 各组 RGCs 中 NLRP12、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量及 TNF- α 和 IL-1 β 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of NLRP12, caspase-1 and cleaved-caspase-1 expressions and relative expression levels of TNF- α and IL-1 β in RGCs among various groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | NLRP12 | caspase-1 | cleaved-caspase-1 | TNF- α | IL-1 β |
|------------------------|-----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组 | 3 | 1.00 \pm 0.01 | 1.00 \pm 0.02 | 1.00 \pm 0.04 | 1.00 \pm 0.01 | 1.00 \pm 0.02 |
| rrcaspase-1 组 | 3 | 0.99 \pm 0.02 | 1.40 \pm 0.06 ^a | 2.68 \pm 0.19 ^a | 3.59 \pm 0.32 ^a | 2.38 \pm 0.26 ^a |
| siNC+rrcaspase-1 组 | 3 | 1.01 \pm 0.01 | 1.45 \pm 0.07 ^a | 2.75 \pm 0.13 ^a | 3.64 \pm 0.25 ^a | 2.45 \pm 0.34 ^a |
| siNLRP12+rrcaspase-1 组 | 3 | 0.01 \pm 0.00 ^{ab} | 0.76 \pm 0.10 ^{ab} | 0.51 \pm 0.14 ^{ab} | 2.67 \pm 0.19 ^{ab} | 1.80 \pm 0.29 ^{ab} |
| F 值 | | 56.302 | 106.286 | 108.629 | 95.305 | 68.207 |
| P 值 | | 0.019 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a P <0.05;与 siNC+rrcaspase-1 组比较,^b P <0.05(单因素方差分析,LSD- t 检验) NLRP:NOD 样受体家族热蛋白结构域;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素;rrcaspase-1:重组大鼠 caspase-1;siNC:小干扰 RNA 阴性对照

Note:Compared with control group,^a P <0.05;Compared with siNC+rrcaspase-1 group,^b P <0.05(One-way ANOVA,LSD- t test) NLRP:NOD-like receptors family pyrin domain containing;TNF:tumor necrosis factor;IL:interleukin;rrcaspase-1:rat recombinant caspase-1;siNC:small interfering RNA negative control

3 讨论

本研究证实,在 RGCs 中激活 caspase-1 对 NLRP12 表达的影响不明显,但明显增强 RGCs 的炎症水平;敲低 NLRP12 可以通过下调 NLRP12 表达抑制 caspase-1 活化,并减轻高眼压对视网膜的损伤和 RGCs 的炎症反应。本研究结果巩固了青光眼中 RGCs 损伤和炎症与 NLRP12/caspase-1 信号的联系。另外,国内外通过高血压大鼠接受 siRNA 转染改变目标基因用于探讨 RGCs 损伤和炎症机制的研究尚不多见。本研究表明敲低 NLRP12 可抑制高血压大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,减轻炎症反应和 RGCs 损失。本研究结果为青光眼疾病的治疗提供了关键靶点。

青光眼是亚洲人群中常见的眼病,其特点是眼压突然大幅升高、严重眼痛和不可逆性视力丧失,可发展为永久性盲^[10-11]。眼压的快速升高可导致视网膜缺血-再灌注损伤和 RGCs 死亡^[12]。当血管破裂引起的缺血/缺氧导致氧气和葡萄糖缺乏时,视网膜变得脆弱,随后引发一系列炎症过程^[13]。研究证实,高血压诱导的缺血会引发小胶质细胞神经炎症,从而介导视网膜损伤和 RGCs 死亡^[14-17]。视网膜缺血不仅直接诱导 RGCs 死亡,还会通过触发损伤相关分子模式诱导的 Toll 样受体 4 炎症小体依赖性神经炎症以激活小胶质细胞,从而进一步诱导 RGCs 死亡^[18-20]。尽管如此,目前仍缺乏对青光眼的有效治疗方案。而且关于高血压中 RGCs 神经炎症发生机制的研究仍较少,因此需要更深入地了解潜在的神经炎症机制,以确定青光眼治疗的关键目标。

本研究通过巩膜外静脉烧灼术升高眼压,导致视神经轴突退化并最终丧失 RGCs。研究表明,巩膜外静脉烧灼术诱导的眼压升高导致 TNF- α 水平在 3 d 内升

高,7 d 时水平比正常高 17 倍,并至少保持升高 4 周^[21]。另外,多项研究证实青光眼患者视网膜和视盘中 TNF- α 水平升高^[22-23]。本研究与这些研究的结果一致,通过 ELISA 法观察到大鼠血清中 TNF- α 浓度明显升高。另外,IL-1 β 是中枢神经系统的重要炎症介质^[24],而且成熟 IL-1 β 和 NLRP12 之间发生相互作用,从而放大炎症级联反应^[7]。另外,脂多糖诱导的实验性炎性高血压青光眼模型中,TNF- α 和 IL-1 β 水平同样升高^[25],因此,结合本研究通过苏木精-伊红染色观察到的 RGCs 损伤可知本研究成功建立了高血压模型,其特征是导致明显的视网膜炎症和 RGCs 损失。

Caspase-1 介导一种新的程序性裂解细胞死亡形式,即细胞焦亡,其特征是细胞肿胀、单层脂质体中的孔形成、膜破裂和炎性细胞因子的释放^[26-29]。研究发现 NLRP12 是调控肠道微生物群紊乱导致炎症疾病的关键^[5-6]。NLRP12 通过体内和体外的 caspase-1 依赖性启动细胞焦亡,导致炎症水平升高^[7]。而且,Truax 等^[30]观察到 NLRP12 可以激活核因子 κ B 炎症信号通路依赖的促炎症因子加工。本研究观察到 rrcaspase-1 处理的 RGCs 中炎症因子水平上调,而敲低 NLRP12 后观察到无论血清水平还是 RGCs 水平,TNF- α 和 IL-1 β 浓度均明显降低,证实 NLRP12 在高血压大鼠中是促炎的关键原因之一。另外,NLRP12 基因缺失显著减轻了 RGCs 丢失和视网膜损伤的严重程度,证实 NLRP12 激活是青光眼视网膜缺血性损伤的触发因素^[7]。本研究使用 siRNA 敲低 NLRP12,不仅观察到其抑制了高血压大鼠的视网膜细胞损失,还观察到 caspase-1 的活性模式 cleaved-caspase-1 的表达水平被明显抑制,而当重新补充 rrcaspase-1 后高血压大鼠的视网膜细胞损失和炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度均明显升高。这表明减少 NLRP12 表达可能是治疗高

眼压大鼠视网膜损伤的有效手段,其机制是通过抑制 caspase-1 的激活。

本研究巩膜外静脉烧灼术操作简单,眼压升高重复性好,尽管本实验中成功造模,造模后未见异常,但不排除眼内局部存在淤血及缺血的风险。另外,尽管敲低 NLRP12 对高血压大鼠 RGCs 数量的保护作用以及对高血压中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达有抑制作用,但是敲低 NLRP12 对 RGCs 数量的保护作用和对 TNF- α 和 IL-1 β 表达的抑制作用似乎仅有部分作用效果,因此可能仍存在其他调控机制,需要进一步验证。

综上所述,本研究得出与高血压中视网膜损伤和 RGCs 炎症相关的新机制。我们认为,敲低 NLRP12 可抑制 RGCs 的缺失和炎症反应,减轻视网膜组织损伤的严重程度,而且敲低 NLRP12 对 caspase-1 激活的抑制作用是其核心机制。表明抑制 NLRP12/caspase-1 诱导的神经炎症可能是治疗青光眼的潜在策略,为青光眼治疗提供新的治疗靶点。本研究也为将来 NLRP12/caspase-1 抑制剂在治疗青光眼方面的临床应用提供了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 宋伟琼:参与论文选题、研究设计、实验实施、数据采集和分析、论文撰写;何芳:参与论文选题、研究设计、实验实施、数据采集和统计分析、文章内容的审核和定稿;杜玲芳:参与论文选题、研究设计、实验实施、对文章智力性内容修改和定稿;谭华霞:参与数据采集;刘丹:参与数据收集和统计分析

参考文献

- [1] Kasetti RB, Maddineni P, Kiehlauch C, et al. Autophagy stimulation reduces ocular hypertension in a murine glaucoma model via autophagic degradation of mutant myocilin [J/OL]. JCI Insight, 2021, 6 (5) : e143359 [2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33539326/>. DOI:10.1172/jci.insight.143359.
- [2] Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the early manifest glaucoma trial [J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120 (10) : 1268-1279. DOI:10.1001/archoph.120.10.1268.
- [3] Roh M, Zhang Y, Murakami Y, et al. Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor- α (TNF- α), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma [J/OL]. PLoS One, 2012, 7 (7) : e40065 [2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22802951/>. DOI:10.1371/journal.pone.0040065.
- [4] Kunimi H, Miwa Y, Katada Y, et al. HIF inhibitor topotecan has a neuroprotective effect in a murine retinal ischemia-reperfusion model [J/OL]. PeerJ, 2019, 7 : e7849 [2022-06-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31592359/>. DOI:10.7717/peerj.7849.
- [5] Lukens JR, Gurung P, Shaw PJ, et al. The NLRP12 sensor negatively regulates autoinflammatory disease by modulating interleukin-4 production in T cells [J]. Immunity, 2015, 42 (4) : 654-664. DOI:10.1016/j.immuni.2015.03.006.
- [6] Chen L, Wilson JE, Koenigsknecht MJ, et al. NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth [J]. Nat Immunol, 2017, 18 (5) : 541-551. DOI:10.1038/ni.3690.
- [7] Chen H, Deng Y, Gan X, et al. NLRP12 collaborates with NLRP3 and NLRP4 to promote pyroptosis inducing ganglion cell death of acute glaucoma [J/OL]. Mol Neurodegener, 2020, 15 (1) : 26 [2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32295623/>. DOI:10.1186/s13024-020-00372-w.
- [8] Anders F, Mann C, Liu A, et al. Correlation of crystallin expression and RGC susceptibility in experimental glaucoma rats of different ages [J]. Curr Eye Res, 2018, 43 (10) : 1267-1273. DOI:10.1080/02713683.2018.1485950.
- [9] Wang F, Ma F, Song Y, et al. Topical administration of rapamycin promotes retinal ganglion cell survival and reduces intraocular pressure in a rat glaucoma model [J/OL]. Eur J Pharmacol, 2020, 884 : 173369 [2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32712092/>. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173369.
- [10] 何理焯, 梁亮, 朱梦男, 等. 鼠尾草酸对急性高血压模型大鼠视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36 (4) : 254-258. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.04.005. He LY, Liang L, Zhu MN, et al. Protective effects of carnosic acid on retinal ganglion cells in acute ocular hypertension rats model [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36 (4) : 254-258. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.04.005.
- [11] Li Y, Wang Q, Chu C, et al. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway [J/OL]. J Chem Neuroanat, 2020, 110 : 101876 [2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33129943/>. DOI:10.1016/j.jchemneu.2020.101876.
- [12] Amagasaki K, Nagayama M, Watanabe S, et al. Acute glaucoma attack following microvascular decompression surgery for trigeminal neuralgia [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2018, 58 (6) : 266-269. DOI:10.2176/nmc.cr.2017-0251.
- [13] Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular stress response and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury [J/OL]. Front Immunol, 2016, 7 : 444 [2022-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27822213/>. DOI:10.3389/fimmu.2016.00444.
- [14] Cueva Vargas JL, Belforte N, Di Polo A. The glial cell modulator ibudilast attenuates neuroinflammation and enhances retinal ganglion cell viability in glaucoma through protein kinase A signaling [J]. Neurobiol Dis, 2016, 93 : 156-171. DOI:10.1016/j.nbd.2016.05.002.
- [15] Silverman SM, Kim BJ, Howell GR, et al. C1q propagates microglial activation and neurodegeneration in the visual axis following retinal ischemia/reperfusion injury [J/OL]. Mol Neurodegener, 2016, 11 : 24 [2022-06-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27008854/>. DOI:10.1186/s13024-016-0089-0.
- [16] Gong Y, Cao X, Gong L, et al. Sulforaphane alleviates retinal ganglion cell death and inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation in a rat model of retinal ischemia/reperfusion injury [J/OL]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2019, 33 : 2058738419861777 [2022-06-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31266422/>. DOI:10.1177/2058738419861777.
- [17] Coucha M, Shanab AY, Sayed M, et al. Modulating expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP) prevents secondary damage and preserves visual function in a mouse model of ischemia/reperfusion [J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (16) : 3969 [2022-06-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31443163/>. DOI:10.3390/ijms20163969.
- [18] Chi W, Li F, Chen H, et al. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in acute glaucoma [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111 (30) : 11181-11186 [2022-06-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25024200/>. DOI:10.1073/pnas.1402819111.
- [19] Qi Y, Zhao M, Bai Y, et al. Retinal ischemia/reperfusion injury is mediated by Toll-like receptor 4 activation of NLRP3 inflammasomes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (9) : 5466-5475. DOI:10.1167/iovs.14-14380.
- [20] Chen H, Song Z, Ying S, et al. Myeloid differentiation protein 2 induced



- retinal ischemia reperfusion injury via upregulation of ROS through a TLR4-NOX4 pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 282 : 109-120. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.10.018.
- [21] Li Q, Cheng Y, Zhang S, et al. TRPV4-induced Müller cell gliosis and TNF- α elevation-mediated retinal ganglion cell apoptosis in glaucomatous rats via JAK2/STAT3/NF- κ B pathway [J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18 (1) : 271 [2022 - 06 - 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34789280/>. DOI: 10.1186/s12974-021-02315-8.
- [22] Dohlman CH, Zhou C, Lei F, et al. Glaucoma after corneal trauma or surgery—a rapid, inflammatory, IOP-independent pathway [J]. *Cornea*, 2019, 38 (12) : 1589-1594. DOI: 10.1097/ICO.0000000000002106.
- [23] Zeng HL, Shi JM. The role of microglia in the progression of glaucomatous neurodegeneration—a review [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11 (1) : 143-149. DOI: 10.18240/ijo.2018.01.22.
- [24] Wong R, Lénárt N, Hill L, et al. Interleukin-1 mediates ischaemic brain injury via distinct actions on endothelial cells and cholinergic neurons [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76 : 126-138. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.11.012.
- [25] Diéguez HH, González Fleitas MF, Aranda ML, et al. Melatonin protects the retina from experimental nonexudative age-related macular degeneration in mice [J/OL]. *J Pineal Res*, 2020, 68 (4) : e12643 [2022 - 06 - 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32133696/>.
- DOI: 10.1111/jpi.12643.
- [26] Aglietti RA, Dueber EC. Recent insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin family functions [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38 (4) : 261-271. DOI: 10.1016/j.it.2017.01.003.
- [27] Hsu SK, Li CY, Lin IL, et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (18) : 8813-8835. DOI: 10.7150/thno.62521.
- [28] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24 (8) : 1380-1389. DOI: 10.1038/cdd.2017.44.
- [29] Maltez VI, Tubbs AL, Cook KD, et al. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium [J]. *Immunity*, 2015, 43 (5) : 987-997. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.10.010.
- [30] Truax AD, Chen L, Tam JW, et al. The inhibitory innate immune sensor NLRP12 maintains a threshold against obesity by regulating gut microbiota homeostasis [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24 (3) : 364-378. DOI: 10.1016/j.chom.2018.08.009.

(收稿日期:2022-07-15 修回日期:2023-01-10)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)4个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文文题(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和Email地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登录中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)