

大鼠急性高眼压后视网膜神经节细胞自噬和副凋亡的发生

魏 婷,高 珊,马 波,高 宁,康前雁

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30772373);国家自然科学基金青年基金(No. 81600733);陕西省自然基础研究计划(No. 2016JM8042)

作者单位:(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介:魏婷,毕业于西安交通大学,博士,住院医师,助理研究员,研究方向:青光眼。

通讯作者:康前雁,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:青光眼、眼底病。Kangqy@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期:2018-01-28 修回日期:2018-05-14

Activation of autophagy and paraptosis in rat retinal ganglion cells following acute intraocular hypertension

Ting Wei, Shan Gao, Bo Ma, Ning Gao, Qian - Yan Kang

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 30772373); National Natural Science Foundation of China Youth Fund (No. 81600733); Natural Science Basic Research of Shaanxi Province of China (No. 2016JM8042)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qian - Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

Received:2018-01-28 Accepted:2018-05-14

Abstract

• **AIM:** To study whether autophagy and paraptosis were activated in retinal ganglion cells (RGCs) after acute high intraocular pressure (IOP) in an experimental rat model and to explore the possible underlying mechanisms.

• **METHODS:** A total of 50 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, and 3d, 1, 4, 8wk group after acute elevated intraocular pressure (IOP) ($n = 10$ per group). Acute intraocular hypertension model was established by anterior chamber perfusion of normal saline in the right eye. The expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was measured by immunofluorescence method. To determine whether autophagy and paraptosis were activated. Retinal sections were examined by transmission electron microscopy (TEM). Autophagosomes and cytoplasmic vacuoles in the cytoplasm of RGCs were measured.

• **RESULTS:** TEM analysis revealed that double- and multiple-membrane vacuoles containing electron-dense materials of autophagosomes were found in RGCs. The number of autophagosomes per $50\mu\text{m}^2$ were 0.79 ± 0.43 , 2.14 ± 0.36 , 2.29 ± 0.47 , 1.57 ± 0.51 and 1.21 ± 0.43 in the normal control group and in acute IOP group at 3d, 1wk, 4wk, 8wk, respectively. The number of autophagosomes markedly increased in the cytoplasm of RGCs at 3d, 1wk, 4wk, 8wk groups than those in the normal control group (all at $P < 0.05$). LC3 positive expression was rarely detected in ganglion cell layer (GCL) in the normal control group and percentage of LC3 positive cells was 15.90%. Immunofluorescence analysis showed that the percentage of LC3 positive cells statistically increased in acute IOP groups when compared with control group ($P < 0.05$). The number of RGCs per $200\mu\text{m}$ in each group of acute IOP injury significantly decreased compared with the normal control group ($P < 0.05$). Cytoplasmic vacuolization were observed in RGCs at 3d after acute IOP injury and lasting to 8wk. TEM also revealed that a large number of cytoplasmic vacuoles were derived predominantly from the progressive swelling of mitochondria and/or endoplasmic reticulum (ER).

• **CONCLUSION:** Autophagy and paraptosis participate in the death of RGCs under transiently elevated intraocular pressure. Different types of programmed cell death (PCD), coexistence of multiple cell death forms or a single cell death form, participates in the pathogenesis of acute elevation of intraocular pressure.

• **KEYWORDS:** autophagy; paraptosis; acute high intraocular pressure; retinal ganglion cells

Citation: Wei T, Gao S, Ma B, *et al.* Activation of autophagy and paraptosis in rat retinal ganglion cells following acute intraocular hypertension. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(6):999-1003

摘要

目的: 观察急性高眼压后不同时间点大鼠视网膜神经节细胞中自噬及副凋亡的发生,并探讨其机制。

方法: 将 50 只健康成年 SD 雄性大鼠随机分为正常对照组、急性 IOP 损伤 3d、1、4、8wk 组。利用高眼压(elevated intraocular pressure, IOP)前房灌注法建立 SD 大鼠急性 IOP 损伤模型,取各组大鼠的视网膜组织,采用免疫荧光染色法检测视网膜微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 的表达;利用透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)检测视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)细胞质中自噬体及胞质空泡的产生,验证自噬及副凋亡的发生。

结果:透射电镜观察可见大鼠 RGCs 细胞质中包裹着电子致密物的双层或多层膜的自噬泡,正常对照组、急性 IOP 损伤后 3d,1、4、8wk 组,RGCs 细胞质中每 $50\mu\text{m}^2$ 自噬泡数量分别为 0.79 ± 0.43 、 2.14 ± 0.36 、 2.29 ± 0.47 、 1.57 ± 0.51 、 1.21 ± 0.43 个,急性 IOP 损伤后各组大鼠 RGCs 内每 $50\mu\text{m}^2$ 自噬泡数量均较正常对照组明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。正常对照组视网膜神经节细胞层 (ganglion cell layer,GCL) 仅见少量 LC3 阳性表达,LC3 阳性细胞百分比 15.90%。急性 IOP 损伤后 3d,1、4、8wk 组大鼠 GCL 中 LC3 阳性细胞百分比均较正常对照组明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。急性 IOP 损伤后 3d,1、4、8wk 组大鼠每 $200\mu\text{m}$ 内 RGCs 数量较正常对照组明显减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。急性 IOP 后 3d 持续至 8wk 透射电镜观察可见大量由线粒体和/或内质网肿胀形成的细胞质空泡。

结论:急性 IOP 损伤后 RGCs 涉及自噬和副凋亡的激活,各种类型的程序性细胞死亡 (programmed cell death,PCD) 可作为单一细胞死亡的形式或多种细胞死亡形式共存,参与急性 IOP 后视网膜神经节细胞的损伤。

关键词:自噬;副凋亡;急性高眼压;视网膜神经节细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.05

引用:魏婷,高珊,马波,等.大鼠急性高眼压后视网膜神经节细胞自噬和副凋亡的发生.国际眼科杂志 2018;18(6):999-1003

0 引言

青光眼是全球导致失明的主要原因之一,属于中枢神经系统退行性疾病,并导致视网膜缺血和渐进性神经元死亡。病理性 IOP 是青光眼视神经病变最主要的危害因素。然而在临床研究发现,青光眼患者即使是可测得的眼压得到良好地控制,视网膜的神经损伤仍会进行,并最终导致不可逆性视功能损害^[1-2]。各种类型的程序性细胞死亡 (programmed cell death,PCD) 参与神经系统发育期的细胞死亡及一些神经退行性变性^[3-4]。已有研究证实,自噬和凋亡可共存于青光眼同一受损的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells,RGCs) 中,自噬功能紊乱是发挥对 RGCs 的保护作用还是导致其死亡,目前还不十分明确^[5]。那么非凋亡形式 PCD——自噬和副凋亡是否参与了青光眼急性 IOP 损伤大鼠模型 RGCs 的死亡?本研究利用大鼠急性 IOP 损伤模型,模拟青光眼急性发作,以免疫荧光染色方法鉴定 IOP 损伤后 RGCs 自噬的发生,以透射电镜观察 IOP 损伤后 RGCs 超微结构的变化,鉴定自噬及副凋亡的发生。探讨非凋亡形式 PCD 与急性青光眼 RGCs 死亡的关系及其作用机制,为预防青光眼性损伤后 RGCs 死亡的发生和探索新的治疗途径提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康成年 SD 雄性大鼠 50 只 (SPF 级),体质量 220~250g,无眼疾,购自西安交通大学医学院实验动物中心。本实验经本院伦理委员会批准。应用随机数字表法将大鼠随机分为正常对照组和急性 IOP 损伤 3d 组、1wk 组、4wk 组、8wk 组,每组 10 只大鼠。SD 大鼠均在正常温度、湿度、光亮度下生活,自由摄食饮水。

1.1.2 实验试剂及仪器 兔抗大鼠微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3,LC3) 抗体

(日本 MBL 公司),FITC 标记抗兔 IgG (康为世纪公司),DAPI (美国 Sigma 公司),显微手术器械 (苏州 66 视觉医疗器械厂),倒置荧光显微镜 BX51 (日本 Olympus 公司),超薄切片机 LKB-V/NOVA (瑞典 LKB 公司),透射电镜 H-7650 (日本 Hitachi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 急性 IOP 损伤组采用高血压前房灌注生理盐水法^[5],模拟青光眼急性发作时的损伤情况制成大鼠急性 IOP 损伤模型。正常对照组不做任何处理。称重大鼠,80g/L 水合氯醛 (5mL/kg) 腹腔注射麻醉大鼠,清洁大鼠头部,盐酸奥布卡因滴眼液行表面麻醉,氧氟沙星滴眼液消毒结膜囊。将连接生理盐水滴瓶输液管的 4 号半针头沿大鼠右眼颞侧角巩膜斜刺入前房,液平高度与鼠眼垂直距离为 150cm,造成大鼠眼内 110mmHg (1mmHg=0.133kPa) 的 IOP,见瞳孔区反光由橘红色变为苍白,眼底镜检查视网膜苍白,说明已完全阻断视网膜中央动脉供血。IOP 状态持续 60min 后,拔出输液针头,可见瞳孔区反光迅速变为暗红色,视网膜呈橘红色,受阻血管重新开放。术中保持大鼠体温 37℃,术后给予红霉素眼膏涂眼预防感染。

1.2.2 免疫荧光染色标本的取材 分别将正常对照组及急性 IOP 损伤 3d,1、4、8wk 组,每个时间点取 5 只大鼠,深度麻醉大鼠,经左心室快速灌注 4℃ 预冷的生理盐水 200mL,随即灌入 40g/L 多聚甲醛 500mL,快速滴注至大鼠四肢抽搐,待抽搐停止后,缓慢滴注 2h 后取材。取双眼球,置于 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 24h,梯度蔗糖溶液脱水至眼球沉于 30% 蔗糖溶液底部,制作厚度 12 μm 的冰冻切片,用于 LC3 免疫组织化学染色。

1.2.3 LC3 免疫组织化学检测 切片以 0.01mmol/L PBS 冲洗,0.03% TritonX-100 室温放置 30min;PBS 冲洗,5% 山羊血清封闭,室温孵育 30min,滴加兔抗 LC3 (1:500) 一抗溶液孵育,4℃ 过夜;PBS 冲洗,滴加 FITC 标记的小鼠抗兔 IgG (1:200) 二抗室温孵育 2h;PBS 洗涤;DAPI 染核,室温孵育 10min,PBS 冲洗;缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察,照相;阴性对照试验采用 5% 正常山羊血清代替一抗,其余步骤同上。后于倒置荧光显微镜下观察自噬的发生及变化。为避免实验过程中非特异性染色造成的误差,每例标本检测 3 张切片,每张切片检测 5 个视野。计数 400 倍放大倍数下每张图片中视网膜神经节细胞层的 LC3 阳性细胞数及总细胞数,LC3 阳性细胞百分比 = LC3 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$,计数 200 μm 长度内视网膜神经节细胞层 (ganglion cell layer,GCL) 的 DAPI 阳性细胞的平均数量为 RGCs 细胞密度。

1.2.4 电镜标本的取材及处理 分别取正常对照组及急性 IOP 损伤 3d,1、4、8wk 组各组大鼠,每组 5 只,深度麻醉大鼠,经左心室快速灌注 4℃ 预冷的生理盐水,随即灌入体积分数 2.5% 戊二醛 + 40g/L 多聚甲醛灌注固定液 200mL,先快速滴注至大鼠四肢抽搐,待抽搐停止后,缓慢滴注 20min 后取材。取视网膜组织块,置于体积分数 2.5% 戊二醛 + 40g/L 多聚甲醛固定液中固定 2~4h,磷酸缓冲液漂洗,体积分数 1% 四氧化锇固定液 4℃ 固定 2~3h,乙醇梯度脱水,环氧树脂 Epon812 浸透、包埋;聚合后作半超薄切片 1~2 μm ,美兰染色后光学显微镜下定位,瑞典 LKB-V 型超薄切片机进行超薄切片 80nm,醋酸铀、柠檬酸铅染色后,日本日立 H-7650 透射式电子显微镜下观察、拍照。每例标本检测 10 个视野。

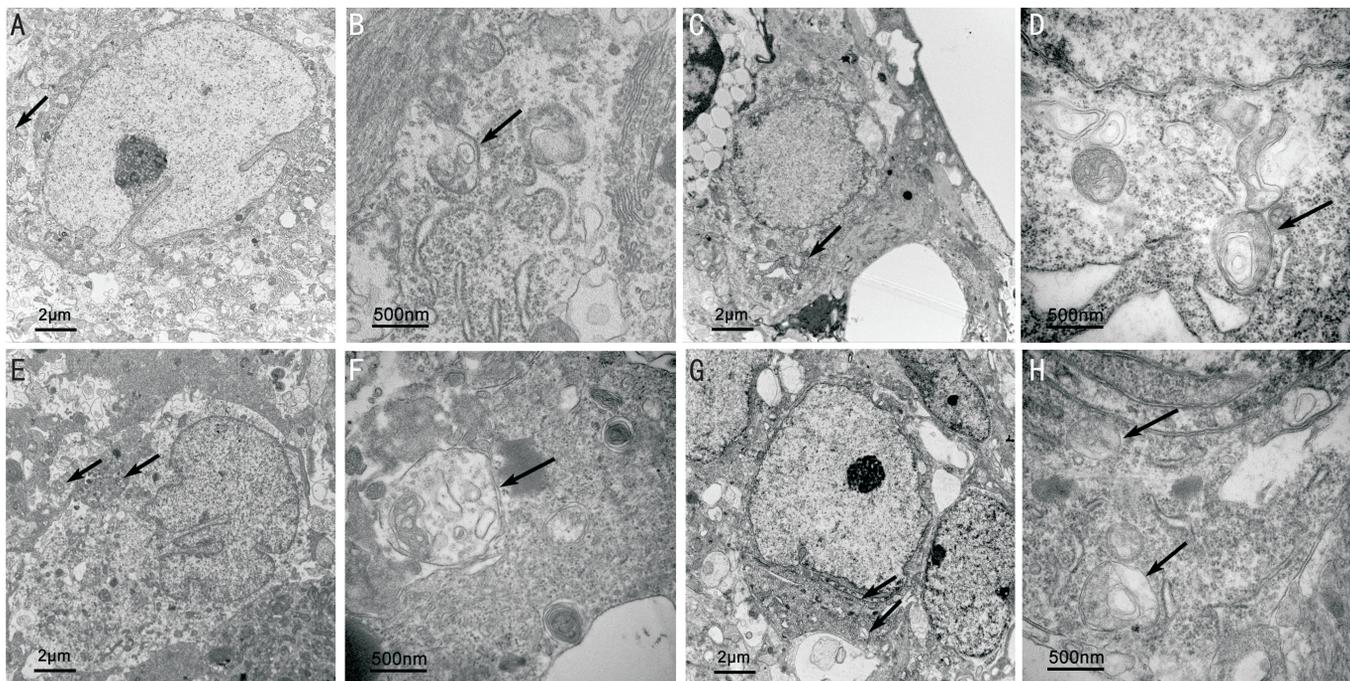


图1 急性IOP后RGCs自噬的超微结构(箭头指示自噬体) A;正常对照组($\times 10000$);B;正常对照组($\times 50000$);C;急性IOP 1wk组($\times 10000$);D;急性IOP 1wk组($\times 50000$);E;急性IOP 4wk组($\times 10000$);F;急性IOP 4wk组($\times 50000$);G;急性IOP 8wk组($\times 10000$);H;急性IOP 8wk组($\times 50000$)。

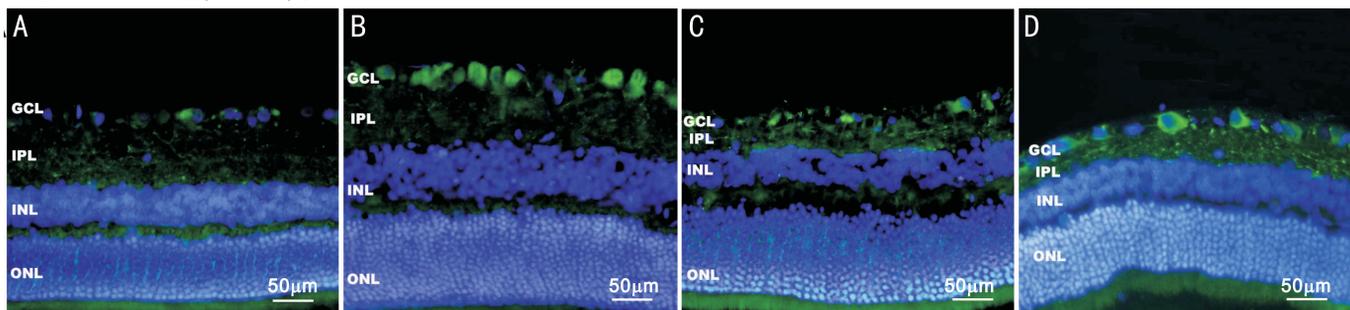


图2 急性IOP后大鼠视网膜LC3的表达变化($\times 400$) A;正常对照组;B;急性IOP 3d组;C;急性IOP 1wk组;D;急性IOP 4wk组。GCL:视网膜神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;ONL:外核层。

统计学分析:应用SPSS18.0进行数据分析,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行显著性检验。多组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性IOP损伤后自噬的超微结构特征 通过透射电子显微镜(TEM)分析细胞超微形态清楚地证实了急性IOP损伤3d,1,4,8wk后RGCs的自噬活性的改变。TEM可观察到包裹胞质结构的双层膜囊泡,是验证自噬体产生的金标准。正常对照组的RGCs偶见自噬体(图1A,B)。正常对照组RGCs的细胞质中自噬泡的平均数量为0.79个/ $50\mu\text{m}^2$ 。急性IOP损伤3d后RGCs细胞质中每 $50\mu\text{m}^2$ 自噬体的平均数量开始增加,急性IOP损伤1wk后RGCs细胞质中自噬体的平均数量达到高峰(图1C,D),之后逐渐减弱,但其数量较正常对照组仍明显增多(图1)。急性IOP损伤后3d组、1wk组、4wk组、8wk组大鼠RGCs的细胞质中自噬泡数量(2.14 ± 0.36 、 2.29 ± 0.47 、 1.57 ± 0.51 、 1.21 ± 0.43 个/ $50\mu\text{m}^2$)明显增加,各组与正常对照组(0.79 ± 0.43 个/ $50\mu\text{m}^2$)相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果表明,IOP损伤的病理机制涉及RGCs自噬的激活。

2.2 急性IOP损伤后视网膜中LC3的表达 LC3免疫荧光染色(绿色)结果显示,正常对照组仅见少量LC3表达存在于GCL(图2A)。阴性对照未检测到LC3免疫反应性。LC3的表达在急性IOP损伤3d后的GCL显著增加,表现为小簇状、致密染色颗粒(图2B)。急性IOP损伤后1,4,8wk组GCL的LC3均呈高表达(图2C,D)。正常对照组GCL的LC3阳性细胞百分比15.90%,急性IOP损伤后3d组LC3阳性细胞百分比开始显著增高并达到46.95%,与正常对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。急性IOP损伤8wk后LC3阳性细胞百分比降至34.44%,但仍高于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表1)。正常对照组GCL的RGCs的平均数量为 11.14 ± 1.57 个/ $200\mu\text{m}$,急性IOP损伤后3d组GCL的RGCs的平均数量开始下降,而急性IOP损伤后8wk组,GCL的RGCs的平均数量下降到 7.29 ± 0.76 个/ $200\mu\text{m}$ 。与正常对照组相比,急性IOP损伤后3d,1,4,8wk各组GCL的RGCs的平均数量显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1)。总之,这些结果表明,IOP后RGCs出现自噬的激活。此外,急性IOP损伤后各时间点RGCs胞质自噬的显著激活伴随RGCs死亡。

2.3 急性IOP损伤后副凋亡的超微结构特征 正常对照组RGCs偶见核周出现的胞内空泡(图3A,B)。副凋亡的

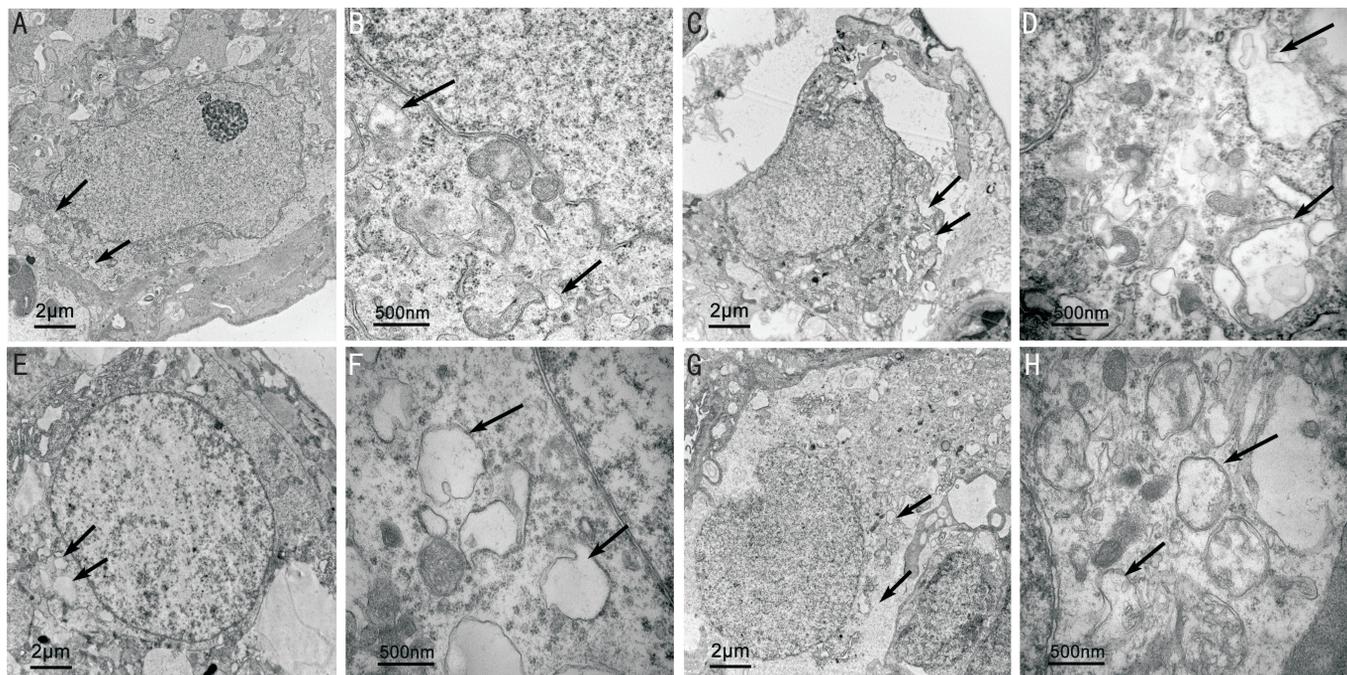


图3 急性 IOP 后 RGCs 副凋亡的超微结构(箭头指示符合副凋亡特征的细胞质空泡) A:正常对照组($\times 10000$);B:正常对照组($\times 50000$);C:急性 IOP 1wk 组($\times 10000$);D:急性 IOP 1wk 组($\times 50000$);E:急性 IOP 4wk 组($\times 10000$);F:急性 IOP 4wk 组($\times 50000$);G:急性 IOP 8wk 组($\times 10000$);H:急性 IOP 8wk 组($\times 50000$)。

表1 急性 IOP 后大鼠 GCL 中 LC3 阳性细胞百分比和 RGCs 数量的比较

组别	LC3 阳性细胞百分比(%)	<i>P</i>	RGCs(个/200 μ m)	<i>P</i>
正常对照组	15.90 \pm 4.93		11.14 \pm 1.57	
急性 IOP 3d 组	46.95 \pm 9.54	<0.01	8.71 \pm 1.38	0.003
急性 IOP 1wk 组	51.16 \pm 8.22	<0.01	8.43 \pm 1.51	0.001
急性 IOP 4wk 组	52.30 \pm 5.25	<0.01	8.57 \pm 1.72	0.002
急性 IOP 8wk 组	34.44 \pm 5.81	<0.01	7.29 \pm 0.76	<0.01

注:*P* 值为各组与正常对照组比较。

典型特征是细胞质空泡化,空泡内清晰且无细胞质物质。TEM 观察证实急性 IOP 损伤后 3d 胞浆空泡化明显,但伴随着同时发生的坏死状形态,细胞自噬和凋亡,从而表现出特殊的形态。急性 IOP 损伤后 3d,1,4,8wk 组,RGCs 胞质空泡化持续出现(图3)。如图所示,急性 IOP 损伤引起 RGCs 的内质网(ER)和/或线粒体渐进性肿胀,线粒体嵴出现扩张。这些观察结果符合副凋亡的特征,即线粒体和 ER 的扩张^[6-7]。因此,大鼠急性 IOP 损伤诱导副凋亡的发生参与 RGCs 死亡。

3 讨论

青光眼是全球导致失明的主要原因之一,属于视神经的神经退行性疾病,最终会导致不可逆性视功能损害^[1-2]。短暂的“域上”损伤可以触发 RGCs 级联损伤。即使当病理性 IOP 降低至正常范围内,视网膜的神经损伤可能会继续进行。越来越多的证据表明,各种类型的 PCD,如细胞凋亡和自噬作用,在青光眼患者和哺乳动物模型的青光眼性视网膜损伤中发挥重要作用^[5,7-8]。更好地了解每种 PCD 的分子机制,并选择性阻止这些类型的 PCD 可能对神经元的存活和视功能的保留有益。由短暂升高眼压诱导的急性 IOP 损伤动物模型是模拟急性闭角型青光眼的临床表现,这能更好地理解青光眼 RGCs 死亡的机制,并可为疾病的治疗提供新的见解。

副凋亡的激活与 IOP 引起的视网膜损伤相关。免疫组织学和 TEM 的证据表明,与正常对照组比较,急性 IOP 损伤后自噬活性在视网膜中明显增加。IOP 损伤后,TEM 观察 RGCs 细胞质中空泡的积累,这些空泡由线粒体和/或内质网肿胀形成,这表明另一种类型的非凋亡形式的 PCD——副凋亡,与急性 IOP 损伤相关。

本研究表明,在大鼠急性 IOP 模型中,GCL 涉及伴随神经退行性变性发生的自噬持续性激活。免疫荧光分析显示,急性 IOP 损伤 3d 后 GCL 的 LC3 表达增加,并在整个实验各时间点持续发生。急性 IOP 损伤 1wk 后 RGCs 显著丢失,而 RGCs 细胞质中 LC3 免疫反应性显著增加。RGCs 细胞质中 LC3 高表达与显著 RGCs 损失的时期相一致。然而,LC3 反应性的增加并非自噬特异性。此外,除了在自噬中起到重要作用,最近有文献报道 LC3 还涉及非自噬性细胞质空泡化^[9]。此外,大量研究表明,在急性 IOP 后 1wk 视网膜厚度显著下降。与这些研究相符,本实验大鼠急性 IOP 模型的视网膜厚度在 IOP 损伤后 1wk 降低,这反映了视网膜内层结构的破坏^[5,10]。急性 IOP 损伤 1wk,通过 TEM 可观察到双层或多层膜嗜酸性自噬囊泡的超微结构特征。自噬在青光眼性损伤的视网膜激活增加可能代表受损物质再循环和导致细胞死亡两种机制。根据不同的细胞环境,自噬作为真核细胞中的溶酶体介导的自我降解过程,可以促进存活或作为神经元 PCD 的替代

机制^[7,11]。作为一种清除有毒物质、多聚体及聚集蛋白的防御机制,在神经退行性疾病中自噬可激活自我消化和自我清除,而抑制基础性自噬甚至可能导致神经退行性疾病^[7-8]。另一方面,自噬可能通过过度的细胞自我分解及重要的细胞成分降解促进细胞死亡^[12]。

副凋亡是一种新近定义的PCD,且对其发生的机制知之甚少。目前国内外学者正努力鉴别特定副凋亡样变化,但仅在过去的几年中才有研究对这种类型的非凋亡性PCD的首例蛋白质组学分析进行描述^[13]。通过TEM的评估,本研究证实急性IOP损伤可诱导RGCs胞质中不规则的空泡形成。对胞质空泡化的进一步观察表明,其与内质网和/或线粒体肿胀相关并伴随核染色质的保存。这些结果表明,急性IOP损伤诱导的细胞质空泡化可能与副凋亡相关,这可能导致副凋亡样细胞死亡。肿胀的内质网和线粒体已涉及到细胞内环境稳态的破坏^[14]。此外,自噬抑制剂并没有阻止,与此相反,增加了细胞质空泡的形成^[15]。副凋亡在神经系统发育的细胞分化阶段及许多神经变性疾病中发生^[16]。近年来,许多研究强调神经元对涉及副凋亡过程的应激相关信号的损伤易感性,这加强了副凋亡和神经退行性疾病之间的联系^[7,17]。针对副凋亡的研究不仅有助于阐明PCD的机制,也更有利于开辟探索针对于缺血治疗更有效,更安全的手段。诱导非凋亡形式的PCD,如副凋亡等,可能是抑制多药抗性表型的方法,这些疗法往往涉及抗细胞凋亡^[15]。因此,鉴别不同类型的PCD可能对基于凋亡代偿的治疗方法相当有益。

本实验的结果表明,急性IOP损伤可诱导3种类型的PCD、副凋亡、自噬和凋亡在RGCs同时发生。在先前的研究中, Kim等^[18]发现急性IOP与RGCs细胞死亡和细胞存活途径的多种变化相关联。虽然急性IOP损伤可诱导RGCs的副凋亡和自噬发生,但它们可能并非促进细胞死亡,与此相反,可能作为细胞存活的机制。我们初步观察到自噬和副凋亡在GCL激活增加,而RGCs死亡通过这一非凋亡途径。最近的研究发现,PCD可作为单一细胞死亡的形式,也可作为副凋亡、自噬、细胞凋亡等多种细胞死亡形式共存,参与缺血性损伤、神经退行性变性和病毒感染^[15,19-20]。

对于细胞死亡的形式,甚至是针对某些过程的量化检测,TEM仍然是最精确的检测方法之一。例如,副凋亡的首次发现是通过TEM^[6]。此外,TEM可见细胞死亡的基本特征,亦可见相同细胞中不同亚细胞特征间的联系,如细胞凋亡样、副凋亡样、自噬样改变,这提示一种细胞程序重排。在大量临床案例中,RGCs死亡的超微结构特征利于明确不同类型激活的PCD间形态学比较,这不仅有助于诊断和预后,而且益于制定治疗性干预措施。PCD生化标志物的鉴定及其他方法的改进,最终将有助于理解神经元死亡的不同细胞死亡程序的多种作用。

综上所述,我们的研究结果不仅证实之前的报道,即细胞凋亡引起急性IOP损伤后RGCs的死亡,同时也表明,自噬和副凋亡的失调可能参与了急性IOP导致的RGCs死亡。新的共识认为自噬和副凋亡是一把双刃剑,既可参与促存活的机制,也可进行性恶化并最终导致细胞死亡。多种微环境的影响,可能会诱发和/或激活自噬和副凋亡的其中一种或多种生化途径。TEM可在细胞死亡的关键时期观察到特征性细胞死亡的形态。因此,这些现

象增强我们对视网膜急性IOP损伤后非凋亡性细胞死亡机制的理解。在青光眼及其他神经退行性疾病中,无论是通过抑制或增强,靶向干预自噬和副凋亡,可能代表神经系统疾病治疗性干预的潜在目标。

参考文献

- 1 Quigley HA. Glaucoma. *Lancet* 2011;377(9774):1367-1377
- 2 Hardy J,Revesz T. The Spread of Neurodegenerative Disease. *N Eng J Med* 2012;366(22):2126-2128
- 3 Wang JT, Medress ZA, Barres BA. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol* 2012;196(1):7-18
- 4 Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9):814-822
- 5 孔祥攀,周利红. 青光视网膜节细胞病变中的自噬异常. *解剖学杂志* 2017;40(3):337-341
- 6 Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(26):14376-14381
- 7 Sperandio S, Poksay KS, Schilling B, et al. Identification of new modulators and protein alterations in non-apoptotic programmed cell death. *J Cell Biochem* 2010; 111(6):1401-1412
- 8 Yang L, Li S, Miao L, et al. Rescue of Glaucomatous Neurodegeneration by Differentially Modulating Neuronal Endoplasmic Reticulum Stress Molecules. *J Neurosci* 2016;36(21):5891-5903
- 9 Karl R, Singha PK, Venkatachalam MA, et al. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene* 2009;28(28):2556-2568
- 10 Park HY, Kim JH, Park CK. Activation of autophagy induces retinal ganglion cell death in a chronic hypertensive glaucoma model. *Cell Death Dis* 2012;3(4):e290
- 11 Xie BS, Zhao HC, Yao SK, et al. Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. *Int J Mol Med* 2011;27(4):599-606
- 12 傅诗雅,张旭. 青光眼动物模型中自噬与视网膜神经节细胞的关系. *中华实验眼科杂志* 2017;35(2):180-183
- 13 Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3155-3162
- 14 Hoa N, Myers M, Douglass T, et al. Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PLoS One* 2009;4(2):e4631
- 15 Yumnam S, Hong GE, Raha S, et al. Mitochondrial Dysfunction and Ca²⁺ Overload Contributes to Hesperidin Induced Paraptosis in Hepatoblastoma Cells, HepG2. *J Cell Physiol* 2016;231(6):1261-1268
- 16 Wang WB, Feng LX, Yue QX, et al. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90. *J Cell Physiol* 2012;227(5):2196-2206
- 17 Pehar M, O'Riordan KJ, Burns Cusato M, et al. Altered longevity assurance activity of p53: p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death. *Aging Cell* 2010; 9(2):174-190
- 18 Kim HS, Park CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain Res* 2005;1057(1-2):17-28
- 19 Danaila L, Popescu I, Pais V, et al. Apoptosis, paraptosis, necrosis, and cell regeneration in posttraumatic cerebral arteries. *Chirurgia (Bucur)* 2013;108(3):319-324
- 20 Pais V, Danaila L, Pais E. Ultrastructural patterns of the activated cell death programs in the human brain. *Ultrastruct Pathol* 2013;37(2):110-120