

博 士 学 位 论 文

|  |  |
| --- | --- |
| 题 目 | 大鼠慢性高眼压模型视神经损害及保护研究 |
| 英文题目 | Optic nerve lesion and neuroprotection in chronic ocular hypertension model in rats. |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓 名 | 马迪 | 学 号 | 21020013 |
| 所 在 学 院 | 医学院 | 导师姓名 | 张铭志 |
| 专 业 | 眼 科 学 | |  |
| 入 学 日 期 | 2010 年 9 月 | 答辩日期 | 2013 年 6 月 |

学位论文原创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的工作研究及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

作者签名： 马迪 日期： 2013 年 6 月 5 日

学位论文使用授权声明

本人授权汕头大学保存本学位论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅；学校可将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索， 可以采用影印、缩印或其它复制手段保存和汇编论文；学校可以向国家有关部门或机构送交论文并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密的论文，按照保密的有关规定和程序处理。

作者签名： 马迪 导师签名： 张铭志

日期： 2013 年 6 月 5 日 日期： 2013 年 6 月 5

学位论文知识产权声明

本人在就读研究生期间所完成的学位论文以及相关结果，知识产权归属汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心。本人在毕业离校前会将有关的研究资料和结果全部上交导师，离校后发表或使用学位论文或与学位论文直接相关的学术论文或成果时，须征得导师及导师所在单位的同意，并要求署名单位仍为汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心。本人不得以本博士论文的研究成果申报研究课题。导师和导师单位可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段进行保存、汇编学位论文，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。导师及导师所在单位享有发表学位论文、申请成果和专利的权利。

注：保密的学位论文在解密后适用本声明。

研究生签名： 马迪 日期： 2013 年 6 月 5 日

导师签名： 张铭志 日期： 2013 年 6 月 5 日

汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心科教科（公章）

日期： 2013 年 6 月 5 日

摘 **要**

**目的：**构建大鼠慢性高眼压模型并评估视网膜形态学改变；观察低氧预处理对大鼠慢性高眼压损伤是否存在视神经保护作用。

**方法：**健康成年Fischer344大鼠，8-12周龄，共75只。1）532激光经角膜（经角膜组，

n=20）及经房角镜下（放角镜组，n=14）光凝大鼠右眼小梁网，激光后3用Tonolab眼压计测量双眼眼压；第3周对经角膜组（n=4），房角镜组（n=6）Tuj-1标记的视网膜节细胞计数并与正常大鼠视网膜节细胞数（n=3）进行比较。2）大鼠低氧预处理（11%O2, 2小时）

24小时后，用经角膜激光光凝右眼小梁网作为实验组（n=4），单纯激光组作为对照组（n=6），

观察激光后双眼眼压，第18天采用免疫组织化学法对视网膜节细胞计数，并观察胶质细胞变化；观察低氧预处理后视网膜低氧诱导因子1α（免疫组化法）及EPO蛋白（western

blot法）表达变化。多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用Bonferroni检验；两组间多种数据比较采用多元方差分析（Wilks'λ检验），对于观察值相差较大数据采用对数变换方法进行分析。

**结果：**1）经角膜激光组14只大鼠中6只（43%）需二次激光；房角镜下激光组（房角镜组）

23只大鼠中有20只（87%）经单次激光后眼压持续升高，其余3只大鼠激光后3眼压降

至正常，其眼压数据未予计入。角膜组平均眼压24.4±7.4 mmHg，峰眼压48.6±9.8 mmHg，节细胞数目645.2.4±204.5/mm2；房角镜组平均眼压为26.6±6.8mmHg，峰眼压为43.7±10.8，节细胞存活密度为1141.4±241.5/mm2，正常眼视网膜节细胞为1984.0±161.3/mm 2。房角镜和角膜组间各项眼压值无统计学差异（*P*=1.000），各组激光眼与对照眼各项眼压值皆存在统计学差异（*P*<0.001）。经角膜组及房角镜视网膜节细胞组与正常眼视网膜节细胞比较，均有显著统计学差异（*P*<0.001, *P*=0.016），两模型组间亦有显著统计学差异（*P*=0.001）。对照组及实验组平均眼压分别为：23.2±5.0mmHg，23.2±4.4mmHg；峰眼压分别为：42.8±12.3mmHg（n=6）、45.0±6.8mmHg，视网膜节细胞密度分别为631.6±339.6/mm2，

1100.8±279.1/mm2。两组间各项眼值压皆无统计学差异（*p*=1.0），而视网膜节细胞统计学差异显著（*p*＜0.005）。两组大鼠激光眼及对侧眼视网膜胶质细胞均有不同程度激活，单次低氧预处理联合高眼压组中对侧眼胶质细胞激活程度及范围相对轻微。低氧预处理后视网膜低氧诱导因子1α及EPO蛋白表达有增加趋势。

**结论：**经房角镜及经角膜激光光凝小梁网方法能够眼压持续升高及视网膜节细胞损害，两模型眼压升高方式视网膜节细胞损害程度存在差异；单眼眼压升高会诱导双眼视网膜胶

质细胞激活；低氧预处理在大鼠慢性高眼压模型视神经损伤有保护作用。**关键词：** 低氧预处理，视神经保护，慢性高眼压大鼠模型，胶质细胞

**Abstract**

**Purpose:** To develop a model of chronic ocular hypertension induced optic neuropathy in rats by evaluating the histological changes in retina; observe the optic nerve protection effects of hypoxic preconditioning on the chronic ocular.

**Methods:** Totally 75 healthy adult Fischer344 rats were used for this study, 8-12 weeks old. 1) 532 laser through the cornea (corneal group, n = 14) or gonioscope (gonioscope group, n = 20) photocoagulation trabecular meshwork in right eye of rats, Binoculus IOP was measured by a Tonolab tonometer after laser treatment. Three weeks after laser, Tuj-1 labeled retinal ganglion cells number was assessed of the cornea group (n = 4), gonioscope group (n = 6) and and normal group(n = 3). 2) 24 hours after hypoxic preconditioning (11% O2, 2 h), the right eyes were treated by laser photocoagulation, as the experimental group (n = 4); simple laser group was control group (n = 6 ). IOP was observed after laser. Tuj-1 labeled retinal ganglion cells was counted after the 18 days, and changes in glial cells was observed; The hypoxia inducible factor 1α(immunohistochemistry) and EPO protein (western blot method) expression was observed in retinas, which was dealed with hypoxic preconditioning. Data from different groups were statistically analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test and multivariate analysis of variance (Wilks'λtest).

Results: 1) 6 rats in the (43%) need a second laser; 20 (87%) rats in got persistently elevated intraocular pressure by a single laser. IOP of the remaining three rats reduced to normal level at three days after laser, and the data were not included. The mean IOP, peak IOP and RGCs number of corneal group was 24.4±7.4 mmHg, 48.6±9.8 mmHg, 645.2.4±204.5/mm2 respectively; The mean IOP, peak IOP and RGCs number of gonioscopy group was 26.6±6.8mmHg, 43.7±10.8, 1141.4±241.5/mm2 respectively, The mean IOP and peak IOP between the gonioscope group and corneal group had no The mean IOP and peak IOP between the laser eye and fellow eye had statistically significant difference (P <0.001). The RGCs number of normal retinal was 1984.0±161.3 /mm2. The RGCs number between any two groups among the three groups had a statistically significant difference (P <0.001, P = 0.016, P = 0.001). 2) The mean IOP of control group and the experimental group was 23.2±5.0mmHg, 23.2±4.4mmHg respectively; peak IOP was 42.8 ±12.3mmHg (n = 6), 45.0 ±6.8mmHg respectively, retinal

Ganglion cell density was 631.6±339.6/mm2, 1100.8±279.1/mm2 respectively. The difference of IOP between the two groups were not statistically significant (p = 1.0), and retinal ganglion cells had statistically significant difference (p <0.005). Glial cell activation in varying degrees was observed in the laser eye and the contralateral eye of two groups. The degree of microglial activation in contralateral eye of experimental group was relatively minor. Hypoxia-inducible factor 1α and EPO protein tended to increase in the retina after hypoxic preconditioning.

Conclusion: Laser photocoagulation trabecular meshwork through gonioscope and corneal can persistently elevated intraocular pressure, accompany retinal ganglion cell damage. Pattern of IOP elevation in two models and the extent of RGCs damage were different; IOP elevation in one eye may induce binocular retinal glial cells activation; hypoxic preconditioning reduced optic nerve injury in rats model of chronic ocular.

**Key words:** Hypoxia preconditioning; Neuroprotection; Chronic ocular hypertension rat model; Glial cell

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩略语** | **英文全称** | **中文全称** |
| ADM | adrenomedullin | 肾上腺髓素 |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor | 脑源性神经营养因子 |
| CNS | Central nervous systerm | 中枢神经系统 |
| CNTF | Ciliary neurotrophic factor | 睫状神经营养因子 |
| Cy3 | Cyanine 3 | 花青素 3 |
| EPO | erythropoietin | 蛋白促红细胞生产素 |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor | 表皮生长因子受体 |
| F344 | Fischer 344 | Fischer344 大鼠 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 胶质纤维酸性蛋白 |
| HE | Hematoxylin & Eosin | 苏木精伊红染色 |
| HIF1-a | Hypoxia induceing factor 1-a | 低氧诱导因子 1 a |
| HO-1 | Heme Oxygenase-1 | 血红素加氧酶-1 |
| HP | Hypoxia preconditioning | 低氧预处理 |
| HSP27 | Heat Shock Proteins 27 | 热休克蛋白 27 |
| Iba-1 | Ionized calcium binding adaptor molecule 1 | 钙离子受体结合蛋白 1 |
| IOP | Intral ocular pression | 眼内压 |
| mmHg | Millimeters of mercury | 毫米汞柱 |
| NO | Nitric Oxide | 一氧化氮 |
| NOS | Nitric oxide synthase | 一氧化氮合酶 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| RGCs | Retinal ganglion cells | 视网膜神经节细胞 |
| ROS | Reactive Oxygen Species | 活性氧 |
| TrkB | Tyrosine kinase B | 酪氨酸激酶 B |
| TM | Trabecular meshwork | 小梁网 |
| TNF-a | Tumor necrosis factor | 肿瘤坏死因子 |
| TUJ-1 | Anti-tubulin antibody | 抗 βⅢ微管蛋白 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |

目 录

[摘](#_Toc686394618)[要](#_Toc686394618) 3

**[Abstract](#_Toc686394619)** 3

[缩略词表](#_Toc686394620) 3

[目 录](#_Toc686394621) 6

[第](#_Toc686394622)**[1](#_Toc686394622)**[章 前言](#_Toc686394622) 7

**[1.1](#_Toc686394623)** [青光眼概述](#_Toc686394623) 7

**[1.2](#_Toc686394624)** [青光眼病理损伤机制](#_Toc686394624) 7

**[1.2.1](#_Toc686394625)** [高眼压与青光眼](#_Toc686394625) 7

**[1.2.2](#_Toc686394626)** [神经胶质细胞与青光眼](#_Toc686394626) 8

**[1.2.3](#_Toc686394627)** [低氧与青光眼](#_Toc686394627) 9

**[1.3](#_Toc686394628)** [低氧预处理的神经保护作用](#_Toc686394628) 9

**[1.4](#_Toc686394629)** [本实验设计](#_Toc686394629) 9

**[1.5](#_Toc686394630)** [课题来源](#_Toc686394630) 10

[第](#_Toc686394631)**[2](#_Toc686394631)**[章 材料与方法](#_Toc686394631) 10

**[2.1](#_Toc686394632)** [材料](#_Toc686394632) 10

**[2.1.1](#_Toc686394633)** [研究对象](#_Toc686394633) 10

**[2.1.2](#_Toc686394634)** [实验仪器](#_Toc686394634) 10

**[2.1.3](#_Toc686394635)** [实验试剂](#_Toc686394635) 11

**[2.2](#_Toc686394636)** [方法](#_Toc686394636) 12

**[2.2.1](#_Toc686394637)** [溶液配制](#_Toc686394637) 12

**[2.2.2](#_Toc686394638)** [腹腔麻醉](#_Toc686394638) 13

**[2.2.3](#_Toc686394639)** [低氧预处理](#_Toc686394639) 13

**[2.2.4](#_Toc686394640)** [建立高眼压模型](#_Toc686394640) 13

**[2.2.4](#_Toc686394641)** [眼压测量](#_Toc686394641) 13

**[2.2.5](#_Toc686394642)** [心脏灌流](#_Toc686394642) 13

**[2.2.6](#_Toc686394643)** [石蜡切片制备](#_Toc686394643) 13

**[2.2.7](#_Toc686394644)****[HE](#_Toc686394644)**[染色](#_Toc686394644) 13

**[2.2.8](#_Toc686394645)** [视网膜冰冻切片制备](#_Toc686394645) 14

**[2.2.9](#_Toc686394646)** [冰冻切片免疫组织化学染色](#_Toc686394646) 14

**[2.2.10](#_Toc686394647)** [冰冻切片载波片处理](#_Toc686394647) 14

**[2.2.11](#_Toc686394648)** [视网膜铺片免疫组织化学染色](#_Toc686394648) 14

**[2.2.12](#_Toc686394649)** [视网膜免疫组化细胞计数](#_Toc686394649) 14

**[2.2.13](#_Toc686394650)****[Western blot](#_Toc686394650)** 14

**[2.2.14](#_Toc686394651)** [统计分析](#_Toc686394651) 16

[第](#_Toc686394652)**[3](#_Toc686394652)**[章 结果](#_Toc686394652) 16

**[3.1](#_Toc686394653)** [两种大鼠慢性高眼压模型构建及比较](#_Toc686394653) 16

**[3.1.1](#_Toc686394654)** [两种动物模型激光眼眼压升高](#_Toc686394654) 16

**[3.1.2](#_Toc686394655)** [房角镜组视网膜及房角](#_Toc686394655)**[HE](#_Toc686394655)**[染色结果](#_Toc686394655) 19

**[3.1.3](#_Toc686394656)** [两种动物模型视网膜神经节细胞的损伤](#_Toc686394656) 20

**[3.2](#_Toc686394657)** [低氧预处理对慢性高眼压损害的神经保护作用](#_Toc686394657) 20

**[3.2.3](#_Toc686394658)** [低氧预处理减轻视网膜节细胞损害](#_Toc686394658) 20

**[3.2.3](#_Toc686394659)** [两组中双眼胶质细胞激活](#_Toc686394659) 21

**[3.3](#_Toc686394660)** [低氧预处理后视网膜中HIF-1α及](#_Toc686394660)**[EPO](#_Toc686394660)**[蛋白表达增加](#_Toc686394660) 23

[第](#_Toc686394661)**[4](#_Toc686394661)**[章 讨论](#_Toc686394661) 23

[第](#_Toc686394662)**[5](#_Toc686394662)**[章 结论与展望](#_Toc686394662) 24

[参考文献](#_Toc686394663) 24

[发表论文](#_Toc686394664) 26

[附](#_Toc686394665)[录](#_Toc686394665) 26

[参考文献](#_Toc686394666) 28

[本人简历](#_Toc686394667) 29

# 第**1**章 前言

## **1.1** 青光眼概述

青光眼是全球范围内最常见的不可逆致盲眼病。目前全球约6千万人患有青光眼，到

2020年患病人数会上升至8千万[[1]](#_bookmark42)。以原发性开角型及慢性闭角型青光眼为代表的大部分慢性青光眼都具有隐匿性、进行性、不可逆性损害的特点，最终导致严重视神经损害而致盲。这不仅给患者本人及家属带来了沉重心理及生活负担，也成为社会的一大难题。我国近年来大型流行病学调查研究表明，青光眼位于我国致盲性眼病前列，已成为21世纪我国社会和经济发展的一大负担[[2]](#_bookmark43)。

青光眼是一类以视神经受损以及特征性视野缺损为特征的眼疾病[[3](#_bookmark44)]。多种因素引发一系列级联反应最终导致继发性视网膜节细胞（Retinal ganglial cell, RGC）凋亡是青光眼的病理学特征，而病理性眼压升高是主要的致病因素[[4,](#_bookmark45) [5]](#_bookmark46)。研究表明，控制眼压是目前治疗青光眼唯一有效的手段[[5](#_bookmark46)]。但是，部分患者眼压虽然得到有效控制，视神经病变以及视野缺损仍会进一步加重[[6](#_bookmark47)]。提示了除眼压外还有其他的病理学因素参与了青光眼的发展。但迄今为止青光眼发病及视神经损害机制尚不明确，临床治疗手段也不能完全停止甚至修复青光眼视神经及视功能损伤。因此进一步明确青光眼神经损害机制，寻找有效的治疗途径，最大限度保护甚至修复青光眼患者的视神经功能具有重要意义。

## **1.2** 青光眼病理损伤机制

青光眼病因方面的主要理论学说为机械压力学说、血管缺血性学说，此外还与免疫[[7]](#_bookmark48)、遗传、应激、胶质细胞激活有关[[8]](#_bookmark49)。机械压力学说主要理论为高眼压对神经元、筛板、结缔组织、血管等造成机械性压迫损伤，引发视神经乳头结构改变，轴浆流受阻至神经营养因子缺乏。血管缺血学说认为青光眼患者的视网膜和脉络膜血管自身条件异常，循环灌注及氧运输减少等改变造成视网膜和神经缺血缺氧、组织代谢异常，继而形成或促进视网膜及视神经损害。眼压升高在一定程度参与诱发视网膜缺血缺氧、胶质细胞激活、组织细胞代谢及自身免疫异常等多种病理过程。近年来研究发现，在正常生理状态下起到神经营养

支持作用的胶质细胞在眼压升高后被激活，同时伴随多种细胞因子蛋白表达变化，其中很多对视神经细胞存活及其周围环境改变具有重要作用。因而，胶质细胞在青光眼神经损害中的作用逐渐受到关注和重视，并成为研究热点之一。

### **1.2.1** 高眼压与青光眼

青光眼患者病理性眼压升高引起筛板各层变形移位产生剪切力，使视神经细胞轴浆流阻滞于筛板区，轴突蛋白的生成和转运减少，导致细胞代谢受损[[9,](#_bookmark50)[10]](#_bookmark51)，视网膜神经节细胞缺乏营养因子的支持继而发生凋亡[[11]](#_bookmark52)。实验研究表明眼压升高所致的逆轴浆运输的脑源性神经营养因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）及其受体酪氨酸激酶B（tyrosine kinase

B，TrkB）受阻并在视乳头处蓄积[[12]](#_bookmark53)，构成了青光眼发病机制机械理论；凋亡的神经节细胞在视网膜及神经缺血缺氧、胶质细胞激活等多种因素共同作用下会导致周围正常的视神经节细胞发生损伤凋亡，从而形成继发性损伤即二次损伤。此外，临床上观察到许多青光眼患者都存在明显的眼压波动，同时越来越多的证据提示眼压波动也是青光眼疾病进展的重要因素之一[[13]](#_bookmark54)。在目前临床青光眼治疗主要通过控制眼压，视神经保护治疗也是目前青光眼的研究热点，临床疗效尚不能确定，大多处于体外实验或动物实验阶段。

目前青光眼损伤机制及治疗仍存在许多疑问和空白领域需要通过基础研究深入探讨。慢性高眼压动物模型能够较好的模拟人类青光眼的主要视网膜神经损伤的病理过程，广泛应用于青光眼基础研究领域，对揭示青光眼发病机制、降眼压药物治疗及视神经保护等方面研究起到推动作用。

#### **1.2.1.1** 高眼压动物模型

慢性高眼压动物模型构建方法目前有很多种，包括遗传型及诱导型。前者通常为小鼠模型，如DBA/2J小鼠，其病变特征与人类色素性青光眼类似，6-8个月左右双眼同时或先后自然眼压升高，但发生时间不能准确预测[[14]](#_bookmark55)，同时也存在色素播散、炎症等其他病理改变，因此其应用受到一定限制。目前，青光眼研究多应用诱导型慢性高眼压动物模型，采用的诱导方法多种多样，存在各自优缺点。建立经济、稳定、可操作性强、可重复性好、与人类青光眼发病过程相似的理想高眼压模型仍然是青光眼动物模型领域研究的热点。

大鼠、小鼠、兔子、灵长类动物等都被报道应用于不同高眼压模型。兔子因眼部结构与人类差异较大，且在模型诱导中成功率较低而应用较少。灵长类动物与人类眼部组织结构更为相近，用猴子诱导的慢性高眼压模型的病理改变也更接近人类青光眼，但由于其体型较大，各项检查常需麻醉进行，难以获得动态眼压，再加上动物来源少且成本高，限制了其广泛应用[[15-17]](#_bookmark56)。而啮齿类动物视神经乳头部的解剖结构与人类相似，具有价格低、易饲养、繁殖快、个体小、反复测取眼压方便，可大量多次实验等优点[[16,](#_bookmark57) [18,](#_bookmark58) [19]](#_bookmark59)，因而逐渐成为研究青光眼视神经病变的常用实验动物。

常用的鼠类慢性高眼压模型包括激光光凝法、注射高渗盐水法及烧灼巩膜浅层静脉法，此外，还可通过结扎法或前房注射微粒法及应用糖皮质激素诱导高眼压[[20-22]](#_bookmark60)。

高渗盐水法：通过注射高渗盐水使房水流出通道瘢痕硬化[[23,](#_bookmark61) [24]](#_bookmark62)，两次注射后成功率可达80%[[25]](#_bookmark63)，凋亡的细胞主要出现在神经节细胞层，且节细胞丢失与眼压升高之间存在明显的相关性[[26]](#_bookmark64)。该模型的优点在于可预见眼压升高的程度和维持时间，且炎症反应轻。但对手术操作技术要求较高，通常高于预期值，眼压升高程度存在个体差异，因而会加大实验动物用量[[27]](#_bookmark65)。

灼烧巩膜浅层静脉法：通过烧灼角巩膜缘后巩膜浅层静脉而增加小梁网后阻力，其眼压升高维持时间各研究报道不一，持续1个月至7个月不等[[28,](#_bookmark66) [29]](#_bookmark67)。此模型类似于继发性青光眼，高眼压维持时间相对较长且稳定，可重复性强[[28]](#_bookmark66)，但存在破坏眼部静脉引流系统，因此眼压并非影响导致视网膜的损伤唯一因素[[27]](#_bookmark65)。

结扎法：Yu等通过结扎巩膜浅层静脉诱导小鼠高眼压[[20]](#_bookmark60)。该模型眼压轻微升高，二次结扎后成功率94.7%，动物个体之间的眼压变异小。眼压升高20周后出现神经节细胞丢失等青光眼损害。

激光光凝法：多采用氩激光或二极管激光光凝小梁网或角巩膜缘1mm范围内的巩膜浅层静脉及角巩膜缘静脉丛[[30-32]](#_bookmark68)，，或经角膜以一定角度向周边房角及小梁网组织激光[[33]](#_bookmark70)，此方法多用于非色素大鼠。激光光凝法诱导的眼压升高迅速，随后眼压逐渐降低，多3 周

内降至正常，重复光凝，可延长眼压升高时间至9周[[16]](#_bookmark57)。另外，有研究采用改良法，如激光联合前房内注入吲哚氰绿或前房穿刺形成浅前房后再联合激光光凝，可延长眼压升高时间（4-6周），提高成功率[[34,](#_bookmark71) [35]](#_bookmark72)。此方法易操作、省时、炎症反应轻，可通过激光能量大小调整眼压升高的幅度[[33]](#_bookmark70)；主要缺点是需多次重复光凝[[36,](#_bookmark73) [37]](#_bookmark74)，眼压波动明显，组内个体差异大，对眼部血液循环或者房角周围组织可能造成一定的损害，前房出血、角膜病变等并发症的发生率较高[[15,](#_bookmark56) [32]](#_bookmark69)，而改良方法中的联合操作多具有侵入性或创伤性，会增加眼部损

伤机率，加重炎症反应等不良作用，从而使高眼压诱导视神经损害的不确定因素增加。此外，还可以应用Argon激光房角镜下直接光凝内部小梁网诱导慢性眼压升高。此方

法多应用灵长类动物且获得良好效果[[38]](#_bookmark75)。既往由于鼠类眼球较小，缺乏适当的房角镜，从而限制了此种方法在鼠类的应用。2002年RichardS. Smith成功应用房角镜观察青光眼小鼠的周边虹膜、小梁网等房角结构动态形态变化[[39]](#_bookmark76)。也使得房角镜下激光光凝内部小梁网诱导慢性高眼压模型应用于鼠类成为可能，是值得探索的新方向。

### **1.2.2** 神经胶质细胞与青光眼

神经胶质细胞指除神经元以外的所以细胞，其正常生理功能包括支持滋养神经元，产生神经营养因子，吸收和调节局部离子浓度，活化状态下则具有分裂吞噬功能，可以吞噬坏死及破碎神经元，修补填充形成瘢痕。

早期人们发现胶质细胞参与机械、缺血等原因导致的中枢神经系统（Central nervous

systerm，CNS）神经元损伤病理过程。近年来随着研究的不断深入，更多的证据证实的二者关系的密切性。其中星形胶质细胞、小胶质细胞，及Müller细胞与神经损害的关系被人们越来越关注。这三种细胞也是视神经和视网膜中主要的胶质细胞类型。通常缺氧等各种原因引起神经组织损伤后，各种胶质细胞会被不同程度激活，并产生系列的神经保护及损伤的多种作用。低氧诱导因子1（Hypoxia Inducible Factor 1, HIF-1）是一种核转录因子，其已被证实是组织及细胞缺氧的核心反应因子和直接指示信号。而低氧诱导因子1α

（Hypoxia Inducible Factor 1α, HIF-1α）是其主要活性部分。在人类青光眼患者视网膜中HIF-1α表达较正常人视网膜增多，并且其分布区域和其视野损害区域有很高的一致性[[40]](#_bookmark77)。近期Ceren Ergorul 等也在报道在实验性慢性高眼压鼠模型视网膜中HIF-1α 蛋白表达及

mRNA呈中度持续性增加，而且其蛋白表达在Müller细胞、星形胶质细胞中增加更为明显

[[41]](#_bookmark78). HIF-1α广泛存在于视网膜内层，与胶质细胞关系密切，以上即表明低氧与胶质细胞及青光眼视神经损害过程有密切联系。虽然胶质细胞参与神经元病变的作用和机制不尽相同，而且尚未完全明确，但已让人们逐渐从只关注神经元细胞本身变化的单一思维转向神经元细胞、周围胶质细胞及环境的相互影响的整体思维。

青光眼视神经病变的许多发病机制和病理过程与中枢神经病变有着显著的相似性。胶质细胞与青光眼疾病的密切关系近十年才被人们所认识和关注，并成为此领域研究热点之一。

#### **1.2.2.1** 高眼压眼胶质细胞变化

神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是一种中间丝蛋白，正常视网膜中通常只有星形胶质细胞特异性表达GFAP，也可作为中枢星形胶质细胞活化的特异性检查指标。在巩膜静脉灼烧诱导大鼠慢性高眼压模型中，眼压升高后3 天视网膜中

Müller细胞GFAP显著表达，星形胶质细胞GFAP表达变化明显，但在青光眼动物模型及人类青光眼中变化存在差异[[42,](#_bookmark79) [43]](#_bookmark80)。

在中枢神经系统中小胶质细胞高度特异表达钙离子结合蛋白1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1) ，被认为是正常中枢神经系统中最有代表性的免疫细胞。对

DBA/2J慢性高眼压小鼠模型的研究表明，胶质细胞激活后出现形态及密度改变，此现象早于视神经损害时间，而抑制小胶质细胞激活，可明显减轻视神经损害作用[[44](#_bookmark81)]。以上提示小胶质细胞激活是青光眼视网膜及神经损害的早期改变，对青光眼视神经病变发生发展有潜在的促进作用，而抑制其激活反应可能会延缓青光眼神经损害进程。

人类青光眼中，星形胶质细胞及Müller细胞出现形态改变及密度增加，GFAP表达强度增加[[45]](#_bookmark82)。视神经乳头的小胶质细胞激活，早期可以产生细胞因子，调节因子等，有助于维持组织稳定，此后细胞吞噬性增强则加重视神经损害。

#### **1.2.2.2** 高眼压对侧眼胶质细胞变化

单侧眼压升高后引起双侧眼胶质细胞激活变化的现象已有研究报道。Akiyasu

Kanamori等用巩膜静脉灼烧法诱导单侧眼压升高一个月后，对侧眼Müller细胞GFAP显著增加，而星形胶质细胞表达减少，小胶质细胞密度增加伴随形态改变，这些胶质细胞的变化与高眼压眼变化相似[[42]](#_bookmark79)。然而，不同慢性高眼压动物模型的对侧眼是否有相似表现，这种变化对视神经及视网膜有无明确损害或保护作用，及内在机制如何，都是需要进一步研究而明确的。

#### **1.2.2.3** 胶质细胞对视网膜神经细胞作用机制

近年来，随着细胞学研究的不断深入和分子生物学的广泛应用，人们对于胶质细胞在

哺乳动物中枢神经损伤后再生过程中的作用有了新的发现。正常生理环境下，胶质细胞对神经元细胞起着隔离、清洁、营养和支持等抗损伤作用。神经损伤后出现的胶质细胞活化、增殖，小胶质细胞激活早期会表达炎症及吞噬关的受体和因子，吞噬损伤的神经元、胶质细胞碎片以及外来抗原[[18]](#_bookmark58)，星形胶质细胞分泌神经营养因子、细胞因子和基质分子促进轴突再生[[20,](#_bookmark60) [45]](#_bookmark82)，müller细胞则发挥抗氧化应激作用；过度激活的胶质细胞可以改变视神经局部正常结构及神经元的生存环境，基础支持及营养作用减弱，神经细胞谷氨酸增多，合成活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS），一氧化氮(Nitric Oxide, NO) 等有害细胞因子[[46]](#_bookmark83)。胶质瘢痕的形成又阻碍了损伤后的修复以及神经元轴突再生[51]，因此胶质细胞对神经元的作用具有利弊双重性。视网膜多种胶质细胞激活后对机体产生不同作用效应，对神经细胞存活起到促进和加重作用，这种作用不仅取决于损伤因素和程度，还取决于胶质细胞激活程度及各类型细胞间的相互作用结果。目前胶质细胞对神经细胞具体作用机制尚未明确。

### **1.2.3** 低氧与青光眼

多项临床及基础研究表明青光眼病变过程存在视网膜缺氧。青光眼患者存在高眼压、视神经乳头微循环异常及波动性眼血流异常[[47-49]](#_bookmark84)，可能诱发视神经及网膜营养物质供应减少等系列组织缺血缺氧病理变化而发生损害，这一病理变化参与青光眼视神经损害发生发展过程。

## **1.3** 低氧预处理的神经保护作用

众所周知，缺血缺氧参与多种中枢神经病变及视网膜神经病理过程，针对这一环节的神经保护研究也是此领域的热点之一。人们发现人体很多组织经过一次或多次短暂、非致命性低氧刺激后，组织或细胞能对其后一段时间内严重甚至致命性缺血或缺氧损伤产生一定程度耐受，这种现象被称为低氧预处理(hypoxic preconditioning, HP)。

众多脑缺血病变研究表明，低氧预处理对于中度脑缺血损伤具有显著神经保护作用，此作用与核转录因子HIF-1α的激活有密切关联。在低氧预处理后，组织短暂缺氧增加HIF-1α 蛋白活性及稳定性，上调血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，

VEGF、EPO[[50]](#_bookmark85)、HSP27[[51]](#_bookmark86)等蛋白表达，这些蛋白对脑缺血性神经病变具有神经保护作用，

因而HIF-1α被认为是缺血性脑病中神经保护作用的关键所在[[52]](#_bookmark87)。近期对于体外星形胶质细胞研究实验表明，低氧预适应后减少星形胶质细胞损伤及其激活后细胞毒性反应，并增加神经元活性[[53]](#_bookmark88)。这也从另外一个侧面提示：低氧预处理对于胶质细胞存活及活化状态调节可能是其神经保护作用机制之一。

青光眼视神经病变在损伤机制及神经保护方面与中枢神经具有很多相似性。早在1999年在急性高眼压视网膜缺血模型研究表明：低氧预处理可以减轻急性高眼压视网膜缺血模型中视网膜损害[[15]](#_bookmark56)，此后研究也相继证实此结论，并发现HIF-1α是此作用的介导因素。

Zhu, Y等研究表明：单剂量或反复剂量腹腔注射去铁胺或低氧预处理（11%O2,2h）后，视网膜中HIF-1α、肾上腺髓素(adrenomedullin, ADM)及血红素加氧酶-1（Heme Oxygenase-1, HO-1）表达明显增多，4周后予急性眼高压缺血损伤（眼内压90mmHg，维持30分钟）；预处理组的视网膜厚度及RGC层细胞计数明显多于对照组[[54,](#_bookmark89) [55]](#_bookmark90)。目前，低氧预处理的视神经保护作用的具体机制、关键因子与环节、与胶质细胞是否相关等众多问题尚未解决。临床中慢性高眼压造成视神经损害通常较急性高眼压更严重、持久、难以控制。因此，对针对此类人群的慢性高眼压模型神经保护的研究更具有临床意义和必要性。

综上所述，青光眼视神经损伤与高眼压、低氧、胶质细胞激活等因素有着密切关系。以上各因素对视网膜节细胞具体作用机制及针对性的神经保护研究仍需进一步的科学探索和验证。本课题拟对不同方法诱导大鼠慢性高眼压、低氧预处理对慢性青光眼的神经损伤及胶质细胞的作用进行初步研究探讨。

## **1.4** 本实验设计

**实验路线图：**

##### 1）532激光经房角镜及经角膜光凝小梁网诱导大鼠慢性高眼压模型并进行对比观察。

通常慢性高眼压模型眼压持续升高2周以上即被视为建模成功，既往报道表明在眼压

升高后3周出现明显视神经节细胞损害。因此本研究以3周为观察点，对两种高眼压模型眼压及视网膜节细胞进行观察，因房角镜下激光诱导大鼠慢性高眼压模型方法既往未见相关报道，本研究对此模型房角及视网膜进行石蜡切片病理观察。

3 周

3 周

经角膜 532 激光光凝小梁网诱导大鼠慢性高眼压

房角镜下 532 激光光凝小梁网诱导大鼠慢性高眼压

测量眼压

视网膜铺片免疫组化观察视网膜节细胞及胶质细胞变化

视网膜及房角石蜡切片 HE 染色

2,4 周

##### 2）低氧预处理对激光诱导慢性高眼压大鼠模型的视神经保护作用及胶质细胞变化研究。经角膜激光诱导慢性高眼压大鼠模型技术成熟应用广泛，本实验第一部分研究表明此

模型视网膜节细胞损害明显，表现为双峰波动性眼压升高方式，短时间内眼压升高回落可能形成视网膜神经的缺血再灌注损伤，相对于经房角镜激光诱导慢性高眼压模型更适于进行低氧和缺血因素相关的视神经保护研究，因此本研究采用此模型进行低氧预处理的神经保护研究。既往已有多项研究表明低氧预处理在神经组织中度缺氧环境起到神经保护作用，而在重度缺氧环境则会加重神经损害。由于高眼压会诱发或加重组织缺氧，视网膜缺氧程度可能会随眼压升高时间延长而加重，而目前缺乏对慢性高眼压大鼠视网膜缺氧程度进行准确评估的成熟方法和标准。考虑到视神经细胞对于缺氧的敏感性，本课题以视神经节细胞损害的程度来间接评估视网膜缺氧的程度。本课题组前期实验结果表明激光后3周视网膜神经节细胞损伤接近70%，18天视网膜神经节细胞损伤约40%，以视神经损伤程度参考，本研究选取18天作为观察时间点对低氧预处理的视神经保护作用进行观察研究。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 低氧预处理联合高眼压组/高眼压组 | | | | | |  |
|  | | | | 18 天 | | | |
|  |  | | |  | | |  |
| 测量眼压 | |  | 视网膜铺片免疫组化视网膜节细胞存活状况 | |  | 视网膜铺片免疫组化观察胶质细胞变化 | |

##### 3）低氧预处理后低氧诱导因子1α及EPO蛋白表达变化。

观察在低氧预处理后2小时，正常，冰冻切片免疫组化法观察低氧诱导因子1α表达变化，

western blot 法观察视网膜EPO蛋白表达变化。

## **1.5** 课题来源

本课题受教育部博士点专项基金博导项目<<低氧诱导因子1α对慢性高眼压视网膜节细胞的作用>>（编号20114402110005）。

# **第2**章 材料与方法

## **2.1** 材料

### **2.1.1** 研究对象

健康成年Fischer344大鼠，8－12周龄，由北京维通利华实验动物技术有限公司供应。

5只/笼，按清洁级标准饲养于12小时明暗环境中，所有实验操作均遵从《眼科及视光学动物使用规范》。

### **2.1.2** 实验仪器

（1）电子台秤（无锡衡器厂，中国）

（2）电子天平（北京赛多利斯仪器公司，中国）

（3）1ml注射器（上海凯乐输液器厂，中国）

（4）输液管、500ml输液瓶、量筒

（5）生物通风柜（广东科艺普公司，中国）

（6）磁力搅拌器（广州爱科，中国）

（7）眼科常用手术器械一套（苏州六六视觉科技公司，中国）

（8）双人双目手术显微镜（Topcon，日本）

（9）超纯水系统装置（Millipore, 美国）

（10）不同量程的移液器（1000μl、200μl、100μl、10μl，Eppendorf公司，德国）

（11）微量离心管（1.5ml、10μl, Eppendorf管）

（12）PH计（Thermo Orion, 美国）

（13）微型离心机（Microcentrifuge i-6K, Eppendorf, 德国）

（14）制冰机（Ice generator, AF100, SCORSMAN）

（15）电干恒温热鼓风干燥箱（DHG-9240A）

（16）电子摇床（上海琪特分析仪器公司，中国）

（17）24孔培养板（Cornin，美国）

（18）-20℃低温冰箱（Sanyo，日本）

（19）4℃低温冰箱（Haier，中国）

（20）-80℃低温冰箱（Thermo, 美国）

（21）毛笔、锡纸、口罩、乳胶手套、Kingwipe 纸

（22）显微镜载玻片、盖玻片（世泰，江苏世泰实验器材有限公司）

（23）加样枪头、塑料样本架、清洁用纸

（24）荧光显微镜（Nikon E1000, 日本）

（25）图像采集分析系统（Conpix，美国）

（26）共聚焦激光扫描显微镜（TCS SP5, Leica, 德国）

（27）石蜡轮转切片机（KM2235, Leica, 德国）

（28）高级自动脱水机（Excelsior Shandon, Thermo Electron Corporation, 美国）

（29）全自动组织包埋机（EG1160, Leica, 德国）

（30）生物显微镜（YS100, NiKon, 日本）

（31）生物组织摊烤片机（YT-6C，湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司）

（32）立体显微镜（M29.5, Leica, 德国）

（33）532nm激光机（Quantel Medical, 法国）

（34）Tono-Lab眼压计(Toilat，芬兰)

（35）微量移液器（Eppendorf, 德国）

（36）恒温水浴震荡器（SELL LAB, 美国）

（37）冷冻切片机(RM1850, Leica, 德国)

（37）解剖显微镜（MZ95, Leica, 德国）

（39）实验用大鼠房角镜（VOLK，美国）

（40）氧控制仪ProOx 110(Biospherix, 美国)

（41）半密闭氧箱（自制）

### **2.1.3** 实验试剂

（1）2，4，6-三硝基酚：苦味酸（广东介ft化工厂，中国）

（2）水合氯醛（汕头西陇化工有限公司）

（3）盐酸赛拉嗪（Sigma, Germany）

（4）盐酸氯胺酮注射液（2ml，福建古田药业有限公司）

（5）蔗糖

（6）一次性无菌手术巾

（7）氯化钠（上海凌峰化学试剂有限公司，中国）

（8）氯化钾（上海凌峰化学试剂有限公司，中国）

（9）无水磷酸氢二钠（上海新华化工厂，中国）

（10）无水磷酸二氢钾（天津科密欧化学试剂开发中心，中国）

（11）多聚甲醛（上海凌峰化学试剂有限公司，中国）

（12）正常ft羊血清（Sigma, Germany）

（13）Triton X -100（上海生工生物工程有限公司，中国）

（14）GFAP-43(C-19)抗体，goat(Sigma, Germany)

（15）Iba1抗体，rabbit(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

（16）Cy3, rabbit (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)

（17）TUJ-1抗体，rabbit (Covance, USA)

（18）HIF-1a抗体，mouse (NOVUS, USA)

（19）Epo抗体, rabbit (Santa Cruz, USA)

（20）硫酸铬钾

（21）明胶

（22）苏木素溶液

（23）二甲苯溶液

（24）盐酸丙美卡因滴眼液（15ml，苏州工业园区天龙制药有限公司）

（25）伊红溶液甲基纤维素

（26）氮气（99.99%浓度）

## **2.2** 方法

### **2.2.1** 溶液配制

10％水合氯醛的配制：

称取10g水合氯醛，溶于100ml超纯水中，摇匀至全部溶解。

0.01M磷酸盐缓冲液（PBS）的配制：

称取8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na2HPO4和0.24g KH2PO4，溶于800ml蒸馏水中，用HCl

调节pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至1L即可。

4%多聚甲醛固定液的配制：

称取80g多聚甲醛溶于近2000ml的PBS中，持续加热并用磁力搅拌至55－60℃，使其完全溶解，冷却、过滤后调pH值至7.4，定容至2000ml。

1: 1氯胺酮/噻拉嗪混合液配制：

50mg/ml的氯胺酮注射液与20mg/ml的噻拉嗪（0.2mg噻拉嗪固体溶于10ml生理盐水中）等体积混合。

柠檬酸盐缓冲液配制：

0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液（CB, pH6.0, 1000ml）：柠檬酸三钠3g，柠檬酸0.4g. PH 6.0.

封片剂配制：

甘油与PBS按2:1体积比混合。

### **2.2.2** 腹腔麻醉

取健康成年Fischer大鼠，用苦味酸标记编号，秤取体重，用1ml注射器抽取100mg/mL氯胺酮/20mg/mL噻拉嗪的1: 1混合液，以1.5ml/kg计算抽取总用量。左手握持大鼠，头朝下，于近腹股沟处腹腔下45°进针，回抽无血液成分后注入麻醉药。

### **2.2.3** 低氧预处理

打开氮气调整适当流量，将氧气控制仪ProOx 110设置为11%低氧环境，氧控制仪的探测器可实时监测箱内氧气浓度，通过调整仪器入口链接的氮气输入量来维持设定的11%低氧环境。具体装置示意图见图2-2B。待箱内氧浓度稳定于11%时将大鼠置于箱内，放置

2小时后取出恢复正常氧环境。

### **2.2.4** 建立高眼压模型

**方法一：**

经角膜532激光光凝小梁网方法诱导慢性高眼压模型法[[33]](#_bookmark70)：在腹腔麻醉大鼠后右眼滴

0.5%丙美卡因滴眼液1滴；置大鼠于裂隙灯下颌托上。裂隙灯下使用波长为532nm的激光（参数：440mw，0.7s，光斑100μm）经角膜作用于小梁网。激光光束透过角膜，与小梁网成锐角（图2-1A），环角巩膜源作用360°，共约60-80个激光点，激光后一周，若实验眼与对照眼之间的眼压差小于6mmHg，同样参数重复激光。

低氧预处理组在预处理24小时后，按上述方法诱导高眼压模型。**方法二**

房角镜下直视大鼠小梁网并用532激光光凝方法：腹腔麻醉大鼠后右眼滴0.5%丙美卡因滴眼液1滴，置大鼠于裂隙灯下颌托上。裂隙灯下将实验用大鼠房角镜置于大鼠眼球表面，同过反射镜面可直视小梁网等房角结构，使用波长为532nm的激光（参数：850mw，

0.7s，光斑100μm）于房角镜下直接光凝右眼内小梁网360°，共80-150个激光点。激光部位出现变白，出现轻微收缩感视为有效激光。（图2-1B, C）

### **2.2.4** 眼压测量

大鼠于清醒平静状态下，使用Tonolab眼压计（rat model）测量眼压。该眼压计测量原理：由磁力产生装置把磁性探头推向角膜，由感应装置将记录到的参数（探头接触角膜的时间、探头反弹速度及探头减速时间等）转换成眼压值。研究表明，减速时间的倒数与眼压之间有良好的相关性[61]。测量时应保持眼压计置于水平位置，测量探头距离角膜顶点约3－5mm，与视轴之间的夹角小于25°(图2－1D)[[56]](#_bookmark91)。眼压计计数系统自动排除在测量误差范围外的数值，经6次有效测量后，自动显示平均值[[57]](#_bookmark92)。分别于激光前、激光后3天，以及激光后每周分别测量双眼的眼压。

所有眼压测量均在上午9－12点之间完成， 以减少昼夜波动对眼压造成的影响[[58]](#_bookmark93)。

### **2.2.5** 心脏灌流

腹腔麻醉大鼠，在生物通风柜内用眼科组织剪于剑突水平剪开腹部的皮肤、皮下组织和肌层，暴露膈肌。水平剪开膈肌，沿两侧腋前线向上将肋骨剪开，翻起前胸壁用大血管钳钳夹固定，完全暴露胸腔。用无齿镊夹起肺组织，暴露其下的腹主动脉并用弯血管钳钳夹阻断血流。用眼科剪在左心尖部剪透心肌厚度的2/3（切口长度约1mm），用与装有生理盐水的输液瓶相连的灌流针头从切口刺入并进入主动脉弓，确认针头在主动脉内后，用小血管钳钳夹固定针头。打开输液器开关，调整针头位置至液体流出通畅后，剪开右心耳。灌流生理盐水约250ml至流出液体澄清后改用新鲜配制的4%多聚甲醛溶液，灌流约20分钟后大鼠上肢僵硬，用眼科剪取出双眼眼球，并在角膜剪一小口放入盛有4%多聚甲醛溶液的24孔板中，4℃冰箱固定30分钟。

### **2.2.6** 石蜡切片制备

将眼球从4%多聚甲醛溶液中取出，然后取出放入组织切片盒内，置入自动脱水机，按常规脱水程序进行脱水：10%福尔马林30min；酒精-福尔马林30min；70％酒精1h；85％酒精1h；95％酒精（Ⅰ）1h；95％酒精（Ⅱ）1h；100％酒精（Ⅰ）1h；100％酒精

（Ⅱ）1h；二甲苯（Ⅰ）1h；二甲苯（Ⅱ）1h；浸蜡（Ⅰ）64.7℃常压1h 20min；浸蜡

（Ⅱ）64.7℃常压1h 20min；浸蜡（Ⅲ）64.7℃常压1h 20min。包埋：将眼球内气泡轻轻挤出后放入盛有石蜡的模具中，摆好位置，于石蜡包埋机的冷却台上包埋，自然冷却。切片和考片：将包埋好的组织与切片机中进行切片，厚度为6μm，放于漂片机中展开，漂片温度42℃，再将切片贴附于载玻片上，编号，62℃干拷2h。

### **2.2.7** **HE**染色

将石蜡切片从烤片机取出，分别浸入下述溶液中，二甲苯（Ⅰ）15min；二甲苯（Ⅱ）

10min；二甲苯（Ⅲ）5min；酒精二甲苯溶液10s；100%酒精10min；100%酒精10min；

90%酒精2min；70%酒精2min；自来水中过水片刻；进入苏木素染液20～25min；自来水冲洗片刻；1%盐酸酒精中片刻分化；自来水冲洗2～5min；饱和碳酸锂溶液中蓝化2min；自来水冲洗2～5min；0.5%水溶性伊红染色2～5min；自来水冲洗片刻；70%酒精脱水片刻；90%酒精片刻；100%酒精2min；100%酒精5min；酒精二甲苯溶液片刻；分别进入二甲苯溶液中，5min×3次；中性树脂封片。细胞核呈蓝色，细胞浆呈淡红色，其他组织粉红

色。

### **2.2.8** 视网膜冰冻切片制备

将眼球从4%多聚甲醛溶液中取出，放入含有少量0.01M PBS缓冲液的培养皿中，置于显微镜下用角膜剪沿锯齿缘剪除眼前段，用显微镊轻轻将玻璃体拨除，避免损伤视网膜。用无齿镊和有齿镊小心将视网膜从色素上皮层分离，从视网膜周边对称位置向视盘做四个垂直切口。用毛笔去除残留玻璃体并将视网膜置于4%多聚甲醛中固定60分钟；弃去，0.01M的PBS洗10min×3次；以除去残留的多聚甲醛；视网膜转移至15%蔗糖中（PBS配制），

4°C 过夜，再转移至30%蔗糖（PBS配制），4°C 过夜；以1: 1比例向蔗糖中加入OCT，浸泡30分钟，把眼球组织转移至100%OCT中，浸泡30分钟；用OCT在-20°C下包埋视网膜组织，待OCT凝固后根据需要调节切片厚度为10um进行切片，将切片平整的贴在经硫酸铬钾-明胶处理过的玻片上，-20℃保存

### **2.2.9** 冰冻切片免疫组织化学染色

将前述已完成冰冻切片取出，于0.01M的PBS洗10min×3次；加封闭液（含10％ft羊血清, 0.3％Triton X－100, 用0.01M PBS稀释）在室温下封闭1小时；去掉多余液体，加人一抗Anti-HIF1α(1:100)，用封闭液稀释，4℃湿盒内过夜，PBS洗10 min×3次，加二抗；用PBS稀释，湿盒内室温避光1小时；PBS洗10 min×3次，封片剂封片，显微镜下观察或-20℃保存。绿色荧光为HIF1α表达阳性。

### **2.2.10** 冰冻切片载波片处理

载玻片清洁：用洗衣粉逐个清洗玻片（或玻片浸泡于洗衣粉水中，电炉煮沸1~2h），洗净晾干；浸泡于酸缸中，每一个玻片逐个放入，浸酸时间6~8h或过夜，去除玻片表面

的有机杂质，流水冲洗30mins，玻片浸入无水酒精中，时间15mins，浸入另一缸无水酒精，15mins；玻片依次放入两个丙酮容器内，时间要超过15分钟，流水冲洗> 30mins；蒸馏水

淋洗3遍，玻片放入烤箱中，烤干备用。

制胶及涂胶：称量7.5g明胶，0.75g硫酸铬钾，将其溶解于375ml 55℃蒸馏水中，过

滤。将过滤好的溶液置37℃环境中，将烤干的玻片浸入溶液里3次后，置37℃烤干，24h

再重复浸入溶液里3次，再置37℃烤干。

### **2.2.11** 视网膜铺片免疫组织化学染色

将眼球从4%多聚甲醛溶液中取出，放入含有少量0.01M PBS缓冲液的培养皿中，置于显微镜下用角膜剪沿锯齿缘剪除眼前段，用显微镊轻轻将后段玻璃体拨除，避免损伤视网膜。用无齿镊和有齿镊小心将视网膜从色素上皮层分离，从视网膜周边对称位置向视盘做四个垂直切口。用毛笔去除残留玻璃体并将视网膜置于4%多聚甲醛中固定60分钟；弃去，0.01M的PBS洗10min×3次；加封闭液（含10％ft羊血清, 0.3％Triton－X100, 用0.01M PBS稀释）在室温下封闭1小时；吸掉多余液体，加一抗Anti-GFAP(1:500) / Anti -Iba1 (1:1000) / TUJ-1 (1:400)，用封闭液稀释，湿盒内4℃孵育过夜；PBS洗10 min×3次，加二抗（Cy3，用PBS稀释为1: 400，避光），湿盒内4℃避光过夜；PBS洗10 min×3次，用毛笔将视网膜置于载玻片上，封片剂封片荧光显微镜镜下观察或-20℃避光保存。

### **2.2.12** 视网膜免疫组化细胞计数

视网膜铺片免疫组化染色后，将视网膜铺片置于荧光显微镜下，用绿色荧光激发红色Cy3，在20倍视野下计数一定区域内（目镜正方形框0.5×0.5mm）细胞的数量。按从左到右、从上到下的顺序移动计数，上下左右间隔恒定区域，每个视网膜计数约30-40个区域。

计算视网膜上所有计数区域阳性细胞的平均值(/mm2) [[27](#_bookmark65)]。（图2-2）

### **2.2.13** **Western blot**

#### 2.2.13.1 样品处理

1）匀浆 取视网膜100mg加1ml裂解液。手动匀浆。保持低温，快速匀浆。2）12000g离心，4℃，2min。

3）取少量上清进行定量。

4）将所有蛋白样品调至等浓度，充分混合沉淀加loading buffer后直接上样，剩余溶液

（溶于1×loading buffer）低温储存，每次上样前98℃，3min。

#### 2.2.13.2 电泳

1）上样前将胶板下的气泡赶走。

2）所有蛋白样品调至等浓度后上样，样品两侧的泳道用等体积的1×loading buffer上样，Marker也用1×loading buffer调整至与样品等体积。

3）以初始电压为45V时的电流强度进行稳流电泳，当电压达65V时改为稳压电泳。

4）在目的蛋白泳动至距胶下缘1cm以上结束。

#### 2.2.13.3 转膜

##### 1） 电泳结束前20分钟左右戴上手套开始准备：

使用常规电转液：Tris 3.0g, Gly 14.4g, M-OH 200ml，加去离子水至1, 000ml。浸泡NC膜：将NC膜平铺于去离子水面，靠毛细作用自然吸水后再完全浸入水中10min

以排除气泡，随后浸泡入转移液中。PVDF膜则在M-OH中浸泡20min以上后转入转移液中。将滤纸也浸入转移液中。

##### 2） 取胶：

将胶卸下，保留10-100KD或分子量范围更广些的胶，左上切角。在转移液中稍稍浸泡一下，置于洁净玻璃板上，按顺序铺上膜与每侧一张（干转每侧三张）滤纸。用玻棒逐出气泡，剪去滤纸与膜的过多部分。

##### 3） 转膜：

湿转：电转槽用去离子水淋洗晾干，加入1000ml电转液。将胶平铺于海绵上，滴加少许电转液再次驱赶气泡，封紧后放入电转槽。注意膜在正极一侧。将电泳槽置于冰盒中，参数为100mA，1h。将膜取出经丽春红S预染后可见蛋白条带。

#### 2.2.13.4 封闭及杂交

封闭液与抗体溶剂均为含5%脱脂奶粉的PBST或TTBS，临用时取200ml PBST或TTBS加入10g脱脂奶粉即为封闭液。

##### 1） 封闭：

将膜从电转槽中取出，去离子水与PBST或TTBS稍加漂洗，浸没于封闭液中缓慢摇荡一小时。

##### 2） 结合一抗：

一抗的准备：使用反贴法时每张3×9cm2膜约需2ml一抗(EPO, 1:100)稀释液。

反贴法的操作：含一抗的封闭液滴加于摇床的塑料膜上，将Western膜从封闭液中取出，滤纸贴角稍吸干，正面朝下贴在一抗上，注意不要留下气泡，室温下轻摇孵育一小时或4℃静置过夜。在反应体系外面罩一湿润平皿以防止液体过多蒸发。

##### 3） 洗涤：

一抗孵育结束后，用PBST或TTBS漂洗膜后再浸洗三次，每次5-10min。

##### 4） 结合二抗：

加入相应的二抗（羊抗兔抗体），根据鉴定方法选择HRP标记的抗体，按相应比例稀释（1:1000），室温轻摇一小时。

##### 5） 洗涤：

二抗孵育结束后，用PBST或TTBS漂洗膜后再浸洗三次，每次5-10min。

##### 6）内参：

加入内参GAPDH，按相应比例稀释(1: 1000)，室温轻摇半小时。

##### 7）洗涤：

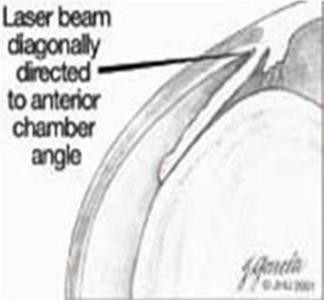
内参孵育结束后，用PBST或TTBS漂洗膜后再浸洗三次，每次5-10min。

#### 2.2.13.5 发光鉴定

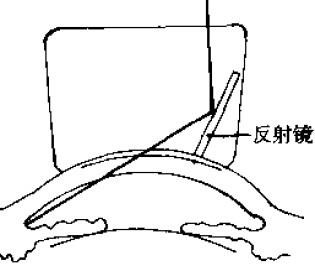
将PVDF膜平放在凝胶成像系统仪平台上，将A、B发光液按比例稀释混合后滴加于整张膜上，避光反应5分钟后，暗视野下拍照。标定Marker，进行分析。

### **2.2.14** 统计分析

采用SPSS13.0统计分析软件（SPSS Inc, Chicago, IL），多组数据间分析采用单因素方差分析（One way ANOVA），两两比较采用Bonferroni检验。两组间多种数据比较采用多元方差分析（Wilks’λ检验），对于观察值相差较大数据采用对数变换方法进行分析。以α= 0.05为检验水准，*P*<0.05认为有统计学意义。



A



B



C



D

图2－1 A. 经角膜激光光凝小梁网法激光束的作用方向示意图 B. 经房角镜激光光凝小梁网法激光束的作用方向示意图C.实验用房角镜的使用示意图D. Tonolab眼压计测量眼压时探头与角膜的相对位置



A

Figure 2-1 A. Schematic diagram of the rat anterior chamber illustrates the direction of the laser beam in the trans-corneal trabecular treatment B. Schematic diagram of the rat anterior chamber illustrates the direction of the laser beam in the trabecular treatment with a gonio-lens C. Schematic diagram of the use of research gonio lens D. Relative position between probe and cornea while using Tonolab tonometer



B

图2-2 A视网膜铺片节细胞计数方法, B低氧预处理装置示意图

Figure 2-2 A Method of RGC counting, Bschematic diagram of processing unit of HP

# 第**3**章 结果

## **3.1** 两种大鼠慢性高眼压模型构建及比较

本研究表明经房角镜可观察无色素Fischer大鼠房角结构，略呈粉红色的小梁网，小梁网与虹膜根部交界白色的巩膜嵴，虹膜根部等房角结构。房角镜下可直视小梁网，激光准确而有效光凝小梁区域，一次激光可高成功率诱导持续慢性眼压升高。本方法既往无相关报道，因而采用既往报道中技术相对成熟经角膜激光光凝小梁网诱导慢性高眼压模型作比较，观察两种模型眼压及视神经节细胞损伤等病理改变。

### **3.1.1** 两种动物模型激光眼眼压升高

经角膜诱导高眼压组共14只Fischer大鼠，本组（n=14）激光眼平均眼压25.1±7. 6 mmHg，峰眼压48.2±9. 9 mmHg；对侧眼平均眼压为12.8±2.2 mmHg, 峰眼压为15.9±3. 9 mmHg；双眼眼压存在明显统计学差异（*P*<0.001），激光眼眼压升高约为对侧眼2倍。激光后眼压呈双峰大范围波动曲线，激光后第1天全部大鼠激光侧眼压显著升高，其中单一次激光后57 %大鼠激光眼眼压持续升高2-3周，其余43%大鼠激光后第3天时眼压明显下降，第7天眼压基本恢复到正常范围，二次激光后第1天再次显著升高，此后呈下降趋势，3周时大部分大鼠眼压基本恢复正常眼压范围，其中眼压两次峰值点与两次激光时间相对应。（图3-1）

经房角镜诱导高眼压组共23只Fischer大鼠，一次激光后87 %大鼠（n=20）激光眼眼压持续升高3周，其余3只大鼠眼压升高3天后基本恢复正常眼压范围，因此其眼压数值未纳入统计。本组大鼠激光眼平均眼压为26.6±6.8mmHg，平均峰眼压为43.7±10.8 mmHg，对侧眼平均眼压为12.2±1.7 mmHg, 峰眼压为15.9±4.8 mmHg；激光眼眼压显著升高，约为对侧眼2倍，双眼平均眼压及峰眼压存在明显统计学差异（*P*均<0.001）。散点图分布范围相对分散，组内各体间眼压差异较明显，部分眼压与对侧眼存在轻度交叉，不同时间平均眼压的标准差值较大，由此可以看出组内大鼠个体差异较为明显（图3-2A, B）。平均眼压曲线图表明激光后眼压呈小幅度波动曲线，第1天显著升高，3天时下降至20mmHg，第10天小幅度升高，此后呈缓慢降趋势，但第3周时仍然明显高于对侧眼眼压（图3-2B）。

两组间激光眼平均眼压、峰眼压值相近，均无显著统计学差异(*p*=1.00)。从眼压值及标准差可判断对侧眼眼压基本维持在基线，且无明显波动。这表明清醒状态下测量眼压不会引起明显情绪及行为变化而影响眼压测量，间接表明本研究用眼压测量相对真实可靠，同时避免了因麻醉引起的眼压测量值偏低的误差。（表3-1, 2, 3）

A



60.0 50.0 40.0

IOP(mmHg)

30.0 20.0

10.0

0.0

Laser control

图3-1. 经角膜激光后3周双眼平均眼压曲线图。



Figure 3-1. 3 weeks after trans- corneal laser eyes average IOP curve.

0 5 10 15 20 25

Exposure days

**A** 70

60

50

40

IOP(mmHG)

◆laser

◇control

图3-2A. 经房角镜组激光后双眼眼压散点图。

Figure 3-1 A, scatter diagram of gonioscope group.

30

20

10

0

0 5 10 15 20 25

Exposure Days



B 50.0

40.0

IOP(mmHg)

30.0

20.0

10.0

0.0

Laser control

图3-2B. 经房角镜组激光后3周双眼平均眼压曲线图：可见激光眼为持续眼压升高。

Figure 3-1 B. 3 weeks after laser eyes average IOP curve: visible laser eye for continuous elevated intraocular pressure, intraocular pressure



0 5 10 15 20 25

Exposure days

Average intraocular pressure laser after a significant rise in 1 day.

表3-1 两种模型激光后激光眼及对侧眼眼压比较

Table3-1 Comparison of IOP after photocoagulation between laser eye and contralateral eye.

| 眼压（mmHg，均数±标准差） | 激光眼 | 对侧眼 | P |
| --- | --- | --- | --- |
| 房角镜组 平均眼压  （n=20） 峰眼压经角膜组 平均眼压  （n=14） 峰眼压 | 26.6±6.8  43.7±10.8  25.1±7. 6  48.2±9. 9 | 12.2±1.7  15.9±4.8  12.8±2.2  15.9±3. 9 | <0.001  <0.001  <0.001  <0.001 |

表3-2 两种模型组间激光后眼压比较

Table3-2 Comparison of IOP after photocoagulation between two groups.

| 眼压（mmHg，均数±标准差） | 经角膜组  (n=14) | 房角镜组  (n=20) | P |
| --- | --- | --- | --- |
| 激光眼 平均眼压  峰 眼 压 对侧眼 平均眼压  峰眼压 | 25.1±7. 6  48.2±9. 9  12.8±2.2  15.9±3. 9 | 26.6±6.8  43.7±10.8  12.2±1.7  15.9±4.8 | 1.00  1.00  1.00  1.00 |

### **3.1.2** 房角镜组视网膜及房角**HE**染色结果

#### **3.1.2.1** 视网膜节细胞层细胞数目减少

正常组视网膜神经节细胞层细胞密度均匀，排列规则，细胞核规整，呈椭圆形；经房角镜诱导高眼压后2周激光眼视网膜神经节细胞层细胞数目较正常对照组明显减少，细

胞核广泛缩小，4周时上述改变更为显著。（图3-3）



**A**



**B**

图3-3 激光后2周视网膜石蜡切片HE染色(40×光镜下):A对照组, B、高眼压组，可见节细胞层细胞减少。

Figure 3- l3aser retinal paraffin section 2 weeks after HE staining (40 x angiohyalinosis). A, the control group, B, high intraocular pressure group, ganglion cells layer cells decreased significantly.

#### **3.1.2.1** 小梁网形态及结构改变

正常组房角小梁网结构可见周边房角开放，小梁网结构排列规则，间隙明显。房角镜下激光光凝小梁网诱导慢性高眼压模型中激光眼2周时房角小梁网多量炎症细胞聚集，充满小梁网间隙，细胞形态呈圆形或卵圆形，胞浆为红色，胞核呈蓝色，核呈分叶状，或多核；4周时小梁网空间压缩，小梁束纤细、排列紊乱，细胞形态，仍可见炎症细胞聚集于小梁网，未见明显虹膜前粘连及房角关闭改变。（图3-4）





### **3.1.3** 两种动物模型视网膜神经节细胞的损伤

****

图3-4 经房角镜激光组激光侧房角石蜡切片HE染色(40×光镜下)

A，对照组、B激光侧(2W)、C激光侧(4W)

Figure 3-4 HE staining of angle paraffin section after laser with gonioscope(40 x then)

A, the control group, B the laser side (2 w), C the laser side (4 w)

既往已有文献报道单侧视神经损伤，对侧眼胶质细胞有明显改变，本研究中对于高眼压组双眼胶质细胞观察结果亦证实此结论。既往视神经横切模型中，对侧眼视网膜节细胞亦有明显减少，不建议将对侧眼作为对照，因此本研究采用正常Fischer大鼠视网膜节细胞作为对照。

激光后3周视网膜铺片TUJ-1免疫组化染色可显示视网膜神经节细胞及其轴突。房角镜组激光眼视网膜神经节细胞存活密度为1141.4±241.5/mm2（n=6）,经角膜组激光眼为

645.2±204.5/mm2（n=4）,正常Fischer大鼠视网膜节细胞为1984.0±161.3/mm2（n=3）。三组间比较差异有统计学意义（One way ANOVA, F=0.605, *p*<0.001），进一步两两比较，房角镜组、经角膜组与正常视网膜节细胞数目明显减少，差别有显著统计学差异（*P*＜0.001, *P*=0.001），经角膜诱导高眼压组较角镜下诱导高眼压组视网膜节细胞损害更为明显，两组间存在统计学差异（*P*=0.016）。两组视网膜中的神经纤维变得纤细，视网膜节细胞则出现不同程度变小的改变。两种模型中部分大鼠视网膜节细胞损害表现为明显的区域性，即其节细胞减少在一两个象限更为明显。（图3-5,6）



**A**



**B**



**C**

图3-5 视网膜神经节细胞存活情况(3周)

A正常视网膜B经房角镜激光组激光侧、C经角膜激光组激光侧。

Figure 3-5. TUJ -1 mark survival retinal ganglion cell (3 weeks) A, the laser side (gonioscope), B the laser side (trans-corneal limbus).



图3-6 房角激光组（n=6）、经角膜光组（n=4）3周视网膜节细胞密度较正常对照（n=3）

组明显减少，任意两组间差异有统计学意义，*P*为＜0.001～0.016 。

Figure 3-6 normal controls (n = 3), trans-corneal limbus group (n = 3) and gonioscope group (n = 6) RGC density change after 3 weeks, the difference was statistically significant between any two groups, *P* <0.001. ～0.016.

## **3.2** 低氧预处理对慢性高眼压损害的神经保护作用

### **3.2.3** 低氧预处理减轻视网膜节细胞损害

经角膜诱导慢性高眼压方法既往已有报道，技术比较成熟，视网膜节细胞损伤明显，眼压波动显著，更符合低氧及缺血再灌注的病理环境，因此本研究采用此模型进行低氧预处理对慢性高眼压的保护性研究。经角膜激光组作为对照组，低氧预处理联合经角膜激光组作为实验组。采用多元方差分析（Wilks’λ检验）对两组间眼压及视神经节细胞进行比较，由于视网膜节细胞数目这一观察值相差较大，接近倍数关系，因而对此部分数据采用对数变换方法进行再次分析。

激光后18天，高眼压组（n=4）、单次低氧预处理联合高眼压组（n=6）平均眼压分别为：23.2±5.0mmHg、23.2±4.4mmHg，两组峰眼压分别为：42.8±12.3mmHg、45.0±6.8mmHg，两组间平均眼压及峰眼压皆无统计学差异（*p*=0.987, *p*=0.716; F<0.001, F=0.142）。

对照组（n=4）、实验组（n=6）激光后18 天平均视网膜节细胞密度分别为

631.6±339.6/mm2、1100.8±279.1/mm2，单次低氧预处理联合高眼压组比高眼压组节细胞存活数目增多，两组间存在统计学差异（*p*=0.043, F=5.748）。(图3-7,8)进行对数转换后对照组节细胞对数值为2.8±0.2，实验组3.0±0.1，两组间存在显著统计学差异（*p*=0.026，



**A**

F=7.464）。(图3-7, 3-8, 表3-3)



**B**

图3-7 Tuj-1标记的RGC细胞A.激光组高眼压侧；B. 单次预处理联合激光组激光侧

Figure 3-7 Tuj - 1 mark RGC cell. A. laser group high intraocular pressure side; B. single HPC

combined laser group laser side

27

1600

1400

1200

RGC(个/mm2)

1000

800

600

400

200

0

对照组实验组

图 3-8 对照组及实验组激光侧视网膜存活节细胞密度比较。（*p*=0.043）

Figure 3-8 Comparison of density of retinal ganglion cells survival of laser side between control group and experiment group.（*p*=0.043）

表3-3 对照组及实验组激光侧视网膜存活节细胞密度

Table 3-1: Density of retinal ganglion cells survival of laser side in control group and experiment group.

| 分组 | RGC 密度(个/mm2) | RGC 密度对数值 |
| --- | --- | --- |
| 对照组  实验组 | 631.6±339.6  1100.8±279.1 | 2.8±0.2  3.0±0.1 |

### **3.2.3** 两组中双眼胶质细胞激活

正常组视网膜内层小胶质细胞均匀分布，呈高度分支的形态；激光后18天，高眼压组激光眼视网膜内层小胶质出现显著形态改变，包括细胞胞体增大增长，细胞分支点数目明显减少，甚至消失，部分呈长杆状或条索状，走行与视神经纤维方向相一致，形成了以视乳头为中心的放射状分布，细胞密度明显增加，以上变化视乳头附近区域最为明显，由后极部到周边部网膜逐渐减弱。单次低氧预处理联合高眼压组双眼视网膜内层小胶质细胞变化与高眼压组相近，但视乳头附近小胶质细胞簇状聚集现象相对更为明显。两组视网膜外层小胶质细胞形态未见明显变化。

高眼压组激光对侧眼视乳头附近小胶质细胞分支点数减少，小部分呈长杆状或条索状，细胞密度未见明显增加，其激活程度较激光眼变化程度及范围明显减小。单次低氧预处理联合高眼压组激光对侧眼视乳头附近小胶质细胞分支减少，极少部分小胶质细胞胞体

变长，细胞激活数目及范围较高眼压组对侧眼相对轻微。（图3-9）

视网膜铺片GFAP免疫组化染色发现，正常组双眼视网膜GFAP表达阳性，胞体与分支表达均匀一致，胞体纤细，分支均匀舒展，多为4-6支，细胞形态呈规则星形，细胞均匀分布于全视网膜且相互交织成疏松网状，细胞间存在明显空隙和空间，未见müller细胞表达GFAP。激光后18天，高眼压组激光眼全视网膜可见星形胶质细胞普遍性形态改变，包括胞体增大，部分细胞维丝增多，分支增加为6-10支，也有部分细胞分支不增加但变得粗壮强直并向两端聚集，星形形态不明显；星形胶质细胞数目显著增加，交织密集，细胞间空隙和空间明显减少；大部分星形胶质细胞GFAP表达显著增强，呈非均匀性，胞体较分支部分增强更为明显，与小部分未增强区间相互交错，分布于全视网膜；全视网膜可见大量müller细胞表达GFAP，呈点状，圆形或椭圆形，分布于星形胶质细胞间，在胶质细胞激活部位及周边网膜更加密集；对侧眼星形胶质细胞密度增加，交织紧密，细胞间空隙减少，胞体变粗大，分支粗健，均匀伸展，分支及纤维丝明显增加，呈星形，GFAP表达也呈普遍性增强，极少数müller细胞GFAP表达阳性，两种细胞相对高眼压侧激活程度减轻；单次低氧预处理联合高眼压组，双眼视网膜星形胶质细胞及müller细胞变化与高眼压组相近，但星形胶质细胞GFAP增强区域及程度相对减小，对侧眼偶见müller细胞GFAP表达阳性。如图3-10，红色代表GFAP表达阳性的星状的星形胶质细胞及圆点状的Müller细胞。



**A**



**C**



**B**

**D**

图3-9 Iba1标记的小胶质细胞



**E**

A. 对照组；B.激光侧；C.激光对侧；D单次预处理联合激光侧；F单次预处理联合激光对侧。

Figure 3-9 Iba1 markers of microglia

A. the control; B. the laser side of laser group; C. contralateral eye of laser group; D laser side of single HPC combined laser group; F. contralateral eye of of single HPC combined laser



**A**



**B**



**C**



**D**



**E**

图3-10 GFAP标记的星形胶质细胞及Müller细胞A.对照组；B.激光侧；C.激光对侧；D单次预处理联合激光侧；F单次预处理联合激光对侧。

Figure 3-10 GFAP markers of astrocytes and Müller cells. A. the control; B. the laser side of laser group; C. contralateral eye of laser group; D laser side of single HPC combined laser group; F. contralateral eye of single HPC combined laser group.

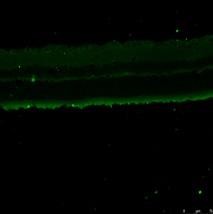
## **3.3** 低氧预处理后视网膜中HIF-1α及**EPO**蛋白表达增加

低氧预处理2小时后视网膜及正常视网膜中HIF-1α均呈阳性表达（绿色荧光）；正常视网膜仅微量表达，主要位于视网膜光感受器层，外核层，内核层，视网膜节细胞层；低氧预处理后2小时在节细胞层及内核层表达轻度增加。结果提示低氧预处理可以一定程度增加视网膜HIF-1α其蛋白表达。如图3-11，绿色强荧光代表HIF-1α蛋白表达阳性。

低氧预处理2小时及正常视网膜中均有EPO蛋白表达，前者EPO蛋白较后者表达量增多，二者内参GAPDH表达相近。（图3-12）



**A**



**B**

图3-11正常组、低氧预处理组视网膜中HIF1-a蛋白表达变化。A.正常组，B.低氧预处理后2小时。



Figure 3-11 HIF1 - a protein expression changes in the retina of normal group, hypoxic preconditioning group. A. normal group, B. hypoxic preconditioning after 2 hours

图3-12正常组、低氧预处理组视网膜中EPO蛋白表达变化。normal：正常视网膜，HP：低氧预处理后2小时。

Figure 3-12 EPO protein expression changes in the retina of normal group, hypoxic preconditioning group. N. normal group, HP2h. hypoxic preconditioning after 2 hours

# 第**4**章 讨论

高眼压是动物模型中诱导节细胞死亡的重要原因，高眼压动物模型是青光眼研究中应用最广泛的模型，它可以帮助我们更深入了解青光眼发生的病因病理学机制。建立经济、稳定、可操作性强、可重复性好、与人类青光眼发病过程相似的高眼压模型是青光眼研究的理想动物模型。目前，众多高眼压动物模型中都存在各自的优缺点，不同模型视神经损伤的机制和影响因素有所不同，适用于不同目的的研究。构建更新更理想的高眼压模型是青光眼领域研究热点之一。

众所周知，小梁网通通道是眼部房水由眼内排出眼外的主要途径，大部分慢性高眼压动物模型是通过激光房角小梁网造成局部损伤，引起小梁网收缩、粘连，房水外流阻力增加，眼压升高。本研究两组模型通过两种不同方法激光光凝小梁网都成功诱导眼压升高。经房角镜激光模型眼压呈一种相对持续伴随小范围波动曲线变化。波动原因可能是由于激光光凝小梁网后引起小梁组织功能性及器质性改变导致眼压变化，激光早期小梁网出现多量炎症细胞聚集及组织水肿等急性炎症反应，这种早期短暂的反应导致小梁网通透性及房水外引流功能急剧下降，而使眼压显著增高；此后炎症及水肿减轻，逐渐转为慢性，房水外流部分增加，眼压较前回落；随着小梁网组织器质性损害及瘢痕形成，眼压呈慢性反弹性增高。本研究中观察激光后眼压升高至少持续3周，且形成视网膜节细胞损伤，而本动物模型眼压升高最长持续时间则会在下一步研究中进行探讨。本模型也存在一些缺点和不足，即组内个体间眼压差异较为明显，这在既往的激光诱导慢性高压模型中亦有相同报道

[[27]](#_bookmark65)，考虑此现象与操作过程中激光对小梁网的损伤程度差异有关。由于Fischer大鼠小梁网缺乏色素，组织本身呈淡粉色与周边巩膜嵴等房角结构分界不明显，大鼠周边房角相对狭窄，这一解剖特点给房角观察及小梁网光凝及聚焦带来一定难度，操作过程部分激光点可能未能达到预定的损伤程度，由于以上等因素，在激光时对小梁网部位瞄准及损伤程度可能存在差异；当然，大鼠本身对激光及能量反应的个体差异也有一定影响。另外，房角镜观察对眼部屈光介质透明性要求较高，因此一次激光后眼压未能升高的大鼠由于角膜前房屈光介质透明性下降而大大增加第二次房角镜下激光操作的难度。本模型中应用的激光能量为850mw, 80-150 点，比既往经角膜激光光凝小梁诱导大鼠慢性高眼压模型参数

（400-500mw, 40-50点）相对较高。分析原因有以下几点：既往激光构建高眼压模型中作用部位主要为眼表血管或者周边虹膜及房角组织，这些部位血管较为丰富，对于激光能量

吸收性强，反应较为敏感，因此较低的能量即可形成房角粘连或者眼静脉压升高，从而诱发高眼压。本模型构建操作全程都是在房角镜下，激光能够在直视下较为精准定位于内部小梁网，而此部位并无血管组织存在，同时因采用无色素大鼠，其小梁网缺乏色素细胞，正是由于小梁组织缺乏血管及色素因此大大减少了其对激光吸收能力；此外，激光在经房角镜时能量可能会有部分消耗和减弱。由于以上各种因素，本模型构建过程中需较高能量才能形成小梁网组织损伤，从而减少房水外流诱导眼压升高。在应用灵长类动物房角镜下激光小梁网并成功诱导慢性高眼压模型中应用的激光能量为：500-1500mw[[38]](#_bookmark75)，人类青光眼中以将眼压为目的非损伤性小梁网激光成型术中应用的激光参数为500-1000mw，人类及灵长类动物小梁网组织中存在多量色素，对于激光能量吸收性更优，对于以形成小梁组织损伤为目的无色素大鼠而言，本研究采用的激光能量仍在合理范围内。由于模型构建过程中激光的准确定位，对视网膜、虹膜、睫状体等眼内组织损伤可维持在可预见最小程度和范围内，在本研究结果中，本模型与以往激光方法构建模型中眼压相似，即使本模型能量应较高，其视网膜节细胞损害程度反而更为轻微，这间接证明激光能量提高本身并不会加重视网膜节细胞损害。此模型采用的激光参数是在实验过程中初步摸索而选择的，对于激光能量、持续时间、激光点数三项参数的进一步调整及优化后，有望构建出更为理想的慢性高眼压模型。既往应用房角镜下激光光凝小梁网主要是灵长类动物，此种动物体型及眼部结构较大，前房深，一方面房角镜应用及房角组织结构观察更为方便容易，另一方面也有相关检查困难，成本及饲养条件高，只能小样本研究等缺点。本课题应用实验用大鼠房角镜，以相同方法进行模型构建并取得成功，具有损伤小、成功率、高眼压持续、炎症缺血等其他影响因素少的优点，可以减少不必要的支出和动物消耗。为此研究领域的提供一种新平台，同时啮齿类动物自身优点填补了以往灵长类动物应用受限等方面的不足。

经角膜激光光凝小梁网模型既往已被报道和广泛应用。本课题中此模型眼压呈明显的双峰呈波动式眼压升高。这种眼压变化与我们前期试验结果及既往相关模型报道相一致。本模型构建过程中大鼠眼压升高模式表现为持续性升高和波动性升高两种，前者经单次激光处理后眼压持续升高，后者再首次激光后眼压大约持续2-4天，1周时降至正常范围，需二次激光维持高眼压。分析两种不同模式形成的原因可能与在操作过程中激光损伤的部位不和程度差异造成的，激光形成确切有效的小梁网或周边虹膜损害损伤，可形成小梁网通道损害或者虹膜前粘连及房角关闭，从而有效减少房水外引流诱发持续性高眼压；其他激光未达到有效损伤部位和程度的大鼠则表现短暂眼压升高，需二次激光诱导。这种激光光凝小梁网效果的不确切性也是形成组内大鼠眼压升高方式不同的主要原因。本实验室在

前期镜角膜诱导大鼠动物模型研究中发现波动性高眼压与持续性高眼压对Fisher大鼠都能造成视网膜节细胞的损伤，两者的视网膜节细胞丢失率相近。这一现象与部分青光眼患者临床表现具有一定相似性，多项临床研究表明眼压波动是加重青光眼视神经病变的重要因素之一，降眼压的同时平稳控制眼压波动会更好的延缓视神经损害的进展。在动物模型中的这一发现也为临青光眼患者中昼夜及长期眼压大幅度波动导致视神经损伤进展提供了基础研究的实验证据。

节细胞损伤凋亡是青光眼最主要的病理改变，也是平价青光眼动物模型构建是否成功的标准之一，本研究中通过两种方法构建的大鼠慢性高眼压模型都出现了显著节细胞损伤。其中部分大鼠视网膜节细胞损伤区域性明显，主要集中于1-2个象限。本研究将房角镜下激光小梁网诱导高眼压模型与以往众多文献报道应用的经角膜激光小梁网的模型相比较，两组平均眼压，峰眼压，对侧眼压等无显著差异。但经角膜激光组视网膜节细胞损害程度较经房角镜组更为显著，且前者的存活的视网膜节细胞出现细胞形态改变。其原因可能为：1）损伤因素差异。房角镜下激光诱导慢性高眼压模型中为经房角直视下操作，激光直接瞄准内部小梁组织向schlemm管及巩膜方向光凝，精准率高，激光效果可见，很少损伤房角周边及其他眼内组织。这一点从此组大鼠房角小梁网组织形态改变，未发现明显的虹膜明显损伤前粘连得到进一步证实。由此，本模型中因缺血、炎症等眼压以外因素诱导的继发性视网膜节细胞损伤机率大大降低，其视网膜节细胞损伤主要是眼压升高本身而引起的；经角膜激光小梁网方法在操作过程中无法看见小梁结构，只是按一定角度向小梁网方向进行盲打，而大鼠眼部解剖结构具有晶体厚，位置靠前，前房浅，周边虹膜高度膨隆等解剖特点，都使得准确光凝小梁网的难度增大，精准性降低，因此即使是操作经验性和熟练度较高的人员进行操作，很大部分大鼠仍需要两次激光才能诱导成功。每次激光过程中都可能造成眼部血管、角膜、虹膜、晶体、睫状体等眼内结构不同程度的损伤，从而增加除高眼压以外的缺血、炎症反应等多种因素诱发的视神经节细胞损伤。2）眼压差异。虽然两组间平均眼压及峰眼压无统计学差异，但经房角镜激光模型为持续性眼压升高，虽然有一定幅度波动，但也具有良好的持续性和平稳性；经角膜组激光模型中眼压波动性相对幅度大且更为显著，两次激光间眼压通常降低到正常范围。由人类青光眼的临床观察可得知，眼压波动大是高眼压以外加重视神经损害的因素之一，而降低眼压日间波动有利于视神经功能保护。眼压升高时会对视网膜造成一定程度的缺血缺氧，而后降至正常视网膜血流灌注得到恢复，经角膜激光模型中这种短时间内眼压升高、下降再升高很可能对视网膜形成缺血再灌注的损伤，也是出高眼压以外的视神经损伤机制。因此眼压波动幅度差

异，可能是两种模型视网膜节细胞损伤程度差异的主要原因之一。这种慢性高眼压动物模型不同眼压升高方式及缺血缺氧等眼压以外损伤因素参与都参与的视网膜节细胞及视神经损害，各个模型损伤机制和因素的不同决定自身的特点，也为基础实验过程中针对不同青光眼损伤机制及药物进行的研究提供了适合的模型和平台。

本研究采用经角膜激光小梁网诱导慢性高眼压模型对双眼视网膜星形胶质细、müller细胞、小胶质细胞进行观察，结果表明单侧眼压升高会引起双眼的胶质细胞改变。既往对

DBA/2J慢性高眼压小鼠模型的研究表明，视神经损害通常发生于4个月左右，而早在3个月龄时小胶质细胞就已激活并达到高峰，小胶质细胞簇状聚集于视网膜内层中央区，5-8个月主要集中于视神经部位。在巩膜静脉灼烧诱导大鼠慢性高眼压模型中，眼压升高后3天视网膜中Müller细胞GFAP显著表达，而星形胶质细胞表达在青光眼动物模型及人类青光眼中变现存在差异[[42,](#_bookmark79) [43]](#_bookmark80)。人类青光眼中，视乳头周边视网膜胶质细胞密度较正常眼增加，细胞足末端变形，星形胶质细胞及Müller细胞变得肥大，GFAP表达强度增加[49]。本研究中星形胶质细胞变化与人类青光眼视网膜中星形胶质细胞改变表现相似[67]。本研究中对侧眼视网膜星形胶质细胞及小胶质细胞出现与眼压升高眼相似激活改变，但程度及范围相对轻微，偶见müller细胞表达GFAP。文献表明GFAP表达增强表明神经细胞损伤，而本研究中眼压升高侧视网膜这种GFAP表达增强分布上的特点是否和神经网膜损伤及纤维化部位相一致还不得而知；本研究中双眼小胶质细胞激活表现与以往大鼠慢性高眼压模型相关报道结果相一致；müller细胞激光眼增强[[43]](#_bookmark80)，对侧眼早期不明显，已报道为3天，本研究为18天，已报道于1个月时出现显著改变，本研究未观察[[42]](#_bookmark79)。但也有不同之处，即本研究中星形胶质细胞GFAP表达区域性增强，细胞数量增加，但在大鼠巩膜静脉灼烧方法诱导的高眼压模型中高眼压眼激光后3天及对侧眼1个月时先后出现星形胶质细胞GFAP表达减弱，随时间延长逐渐有所恢复。此结果差别，可能与不同慢性高眼压诱导方式、鼠种、观察时间点等因素差异相关。在动物急性高眼压模型及一些视神经挫伤中，视乳头区域的

GFAP表达密度降低，提示在眼压升高的急性期星形胶质细胞发生损伤，这与大鼠巩膜静脉灼烧模型的观察结果相似，考虑这种慢性高眼压模型的病理损伤过程可能更接近视网膜及视神经急性损伤的病理过程。鉴于胶质细胞激活与青光眼视神经损害的密切联系，这种不同慢性高眼诱导方式中胶质细胞变化的差异性，可能是各种慢性高眼压模型的神经损伤及保护作用机制差异的影响因素之一。

星形胶质细胞位于视网膜有血管区的神经节细胞层和神经纤维层及内丛状层，人类星形胶质细胞根据形态分为狭长状和星状两种。该细胞激活后主要表现为GFAP表达增加及

形态改变，并出现多种蛋白因子表达变化。人类青光视乳头处星形胶质细胞表达调节基质产生的转化生长因子-β明显增多，抑制中枢神经轴突生长的髓鞘相关Nogo C蛋白表达增加，一氧化碳合酶表达及NO产生增多等等。

正常大鼠视网膜中小胶质细胞主要分布在神经上皮层的节细胞层及内丛状层，少量于外丛状层。生理状态下其呈现高度分支状的形态，当暴露于各种刺激后，会迅速活化迁移，胞体变形呈阿米巴样，突起减少变短。小胶质细胞在早期进入一种中间状态，具有吞噬性，可以产生细胞因子，调节因子，细胞外基质相关酶类，这种改变早期有助于维持组织稳定，并有益于维持血视网膜外屏障，起到一定的神经保护作用，但如果胶质细胞持续激活，将演变成具有吞噬功能的吞噬细胞，更多发挥多种细胞毒性效应，如促进大量兴奋性神经递质谷氨酸释放，从而对周围残存或正常组织造成继发损害[[59]](#_bookmark94)]。激活后小胶质细胞在视网膜重新分布，在视乳头周围血管脉络膜相对集中，提示其可能参与视乳头周围脉络膜萎缩病理变化[[46]](#_bookmark83)。目前研究普遍认为，小胶质细胞激活后与视神经变性疾病密切相关。对DBA/2J小胶质细胞激活早于视神经损害发生时间。后续有研究表明应用放射及米诺环素药物的方法可以显著抑制DBA/2J慢性高眼压小鼠视网膜小胶质细胞激活，并对视网膜及视神经损害有明显减轻作用[48]。以上提示小胶质细胞激活是青光眼视网膜及神经损害的早期改变，对病变发生发展有潜在促进作用，而调节其激活反应可能会改善青光眼神经损害进程。

视网膜多种胶质细胞激活后对机体产生不同作用效应，对神经细胞存活起到促进和加重作用，这种作用不仅取决于损伤因素和程度，还取决于胶质细胞激活程度及各类型细胞间的相互作用结果。目前胶质细胞对神经细胞不同作用机制尚未明确，通过以往研究报道，初步总结如下：

神经保护机制：神经组织损伤后各类胶质细胞被不同程度激活。小胶质细胞早期激活可表达大量与炎症及吞噬作用密切相关的受体和因子，如分泌生长因子等，并吞噬损伤的神经元、胶质细胞碎片以及外来抗原，产生保护效应[[18,](#_bookmark58) [43,](#_bookmark80) [44]](#_bookmark81)；星形胶质细胞分泌大量的神经营养因子、细胞因子和基质分子促进轴突再生，使神经元免受或减轻损伤，有利于损伤后神经元的功能恢复[[20,](#_bookmark60) [45]](#_bookmark82)；müller细胞不仅能给予神经元营养支持、维持正常代谢，参与神经元的信号传导，还可以通过抗氧化应激发挥保护作用；同时缺血缺氧环境下胶质细胞内低氧诱导因子1α激活，其下游神经保护性蛋白促红细胞生产素（Erythropoietin, EPO）、热休克蛋白27（Heat Shock Proteins 27, HSP27）的表达增加[[41]](#_bookmark78)，起到保护视网膜节细胞及视神经作用。

神经损伤机制：胶质细胞过度激活后对神经细胞的基础支持及营养作用减弱，谷氨酸

受体减少，不能有效清除细胞周围过多谷氨酸，同时合成活性氧，一氧化氮、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF-a)、nitric oxide synthase（一氧化氮合酶，NOS）等有害细胞因子[50]。过度激活增生的星形胶质细胞内GFAP及vimentin表达增多，促进胶质疤痕的形成并抑制视神经再生[[46]](#_bookmark83)。星形胶质细胞激活后缝隙连接蛋白43（connexin 43）重新分配细胞间缝隙连接减少导致神经节细胞内稳态环境及血视网膜通透性改变，从而促进青光眼视神经病变进展[[60]](#_bookmark95)。

单侧眼视神经受损，双侧眼胶质细胞变化[[61]](#_bookmark96)，甚至影响对侧眼视网膜节细胞，此现象在以往视神经损伤模型中已有报道。在视神经夹伤模型中逆行标记存活的节细胞，夹伤后

1周对侧眼视网膜被标记上的节细胞数与神经夹伤侧接近[[62]](#_bookmark97)。以上结果表明一侧眼视神经严重损伤后对侧眼视网膜节细胞是不利的。在慢性青光眼模型中对侧眼视网膜节细胞损伤及凋亡的观察尚未见报道，本研究也未进行相关观察，但不能排除单侧眼压升高有潜在的影响及损害对侧眼视网膜节细胞的作用。总之，单眼高眼压至双眼神经胶质细胞激活的现象表明胶质细胞可能在青光眼发生及发展的病理过程发挥着重要作用，双眼之间在免疫及解剖方面存在某种内在的联系，其机制有待于进一步探讨。目前大多数青光眼及视神经损伤等研究仍采用以对侧眼作为对照，虽然有自身对照的多种优点，但建议谨慎应用此法，以免影响结果的客观性和真实性。

本研究观察单次低氧预处理联合激光诱导高眼压组存活视网膜节细胞比单纯激光组增多，表低氧预处理对慢性高眼压大鼠模型视神经损伤具有保护作用。其中可能机制推断如下：本研究采用动物模型及观察时间点符合低氧预处理发挥神经保护作用的环境。众多研究表明，在脑缺血性神经病变中低氧诱导因子1α在中度缺氧环境下对神起到保护作用，而在严重低氧环境下则为有害作用。慢性青光眼动物模型眼压多为中度升高，升高幅度基础眼压的50%-150%，较急性青光眼模型缺血缺氧程度轻，因此具备低氧预处理发挥神经保护作用的环境。此外，本研究中低氧预处理后2小时视网膜免疫组化结果表示低氧诱导因子1α表达较正常视网膜增加，表明低氧预处理可以诱导低氧诱导因子1α激活并稳定其蛋白表达。HIF-1α是低氧反应的核心因子，研究表明低氧可以诱导HIF-1α靶基因HSP27和EPO在内的靶基因转录并显著表达[[41]](#_bookmark78)。在视网膜缺血性病变及青光眼模型中HSP和EPO已被证明对RGC具有保护作用[[63-65]](#_bookmark98)。本课题对低氧预处理后视网膜EPO蛋白表达初步观察结果表明低氧预处理可以增加EPO蛋白表达。因此，以HIF-1α为核心启动EPO等具有神经保护作用靶基因的系列代偿反应，可能是低氧预处理对慢性高眼压是神经病保护作用的主要机制之一；此外，低氧预处理可以减少体外胶质细胞损伤[[53]](#_bookmark88)，提示改变胶质细胞活

性状态抑制其损伤也可能是神经低氧预处理神经保护的机制之一。本研究中低氧预处理组在眼压升高18天时，眼压升高侧胶质细胞激活程度在两组间差别不明显，而对侧眼中，

低氧预处理组胶质细胞激活程度相对减轻。通常眼压升高后3天胶质细胞开始早期激活，

对侧眼1个月时出现胶质细胞激活[[42]](#_bookmark79)。本研究中观察点为18天，激光眼进入明显的激活期，对侧眼表现为早期的轻度激光改变。两组间的胶质细胞变化比较表明低氧预处理对于早期胶质细胞激活有一定程度的抑制和延缓作用，对于显著激光的胶质细胞无明显作用。由此，我们推测本研究中低氧预处理可能对早期胶质细胞激活有一定抑制作用，继而减轻胶质细胞过度激活所诱导后续细胞毒性反应，这可能是本研究中其发挥神经保护作用的原因之一。综上所述，低氧预处理可以促进慢性高眼压大鼠视网膜中RGC的存活，HIF-1α激活，EPO表达增加，抑制胶质细胞早期激活，可能是其神经保护作用机制的重要组成部分。由于本研究对于以上机制研究仅进行了初步观察进行观察，以上推论需要在接下来的研究中进一步加以证实，对其中关键环节和因素进行深入探讨。

本研究为小样本短期观察研究，结果表明：经房角镜和经角膜激光光凝小梁网慢性高眼压大鼠模型在眼压升高方式及视神经损伤方面有着一定程度的差异性，有着各自的特点和优势，可以为各种青光眼基础研究提供有效手段和理想平台；胶质细胞在青光眼病变有密切关系，单眼激光诱导眼压升高诱发双眼胶质细胞改变，对未激光眼视网膜有潜在影响；低氧预处理对在慢性高眼压大鼠模型中具有视神经保护作用进行了初步探讨，这可能是今后青光眼神经损伤机制及视神经保护研究的新生方法和新方向。对于以上各项研究内容的长期观察和具体机制研究将在后续工作中进行。

# 第**5**章 结论与展望

本研究首次采用房角镜下激光光凝小梁网诱成功导慢性大鼠高眼压模型，与目前常用的经角膜激光光凝小梁网诱导慢性高眼压模型进行比较，监测了眼压和视网膜神经节细胞的变化，研究发现两种模型都能成功诱导慢性眼压升高，视网膜节细胞损害明显，经角膜激光方法单次激光即可取得高成功率的持续高眼压，经角膜激光组在眼压相近的状态下其视网膜节细胞损伤更为显著；激光诱导单眼眼压升高会导致双眼视网膜胶质细胞改变；本研究表明低氧预处理对慢性高眼压具有视神经保护作用，其作用机制可能与低氧预处理激活低氧诱导因子1α及相关神经保护性蛋白及因子，抑制早期胶质细胞过度激活相关。对于经角膜激光光凝小梁网诱导慢性高眼压模型的长期眼压及视神经病理及功能变化观察需进一步研究，而低氧预处理视神经保护的具体机制以及与小胶质细胞的关系也是青光眼领域值得深入研究的课题，并有可能为视神经保护研究提供新的思路，开拓新途径。

参考文献

[1]. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol. 2006; 90(3): 262-7.

[2]. Huang S, Zheng Y, Foster PJ, et al. Prevalence and causes of visual impairment in Chinese adults in urban southern China. Arch Ophthalmol. 2009; 127(10): 1362-7.

[3]. Rivera JL, Bell NP, Feldman RM. Risk factors for primary open angle glaucoma progression: what we know and what we need to know. Curr Opin Ophthalmol. 2008; 19(2): 102-6.

[4]. Bron A, Chaine G, Villain M, et al. [Risk factors for primary open-angle glaucoma]. J Fr Ophtalmol. 2008; 31(4): 435-44.

[5]. Leske MC HL, Hussein M, et al.. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. Am J Ophthalmol. 1998; 126(4): 487-97.

[6]. McKinnon SJ, Goldberg LD, Peeples P, et al. Current management of glaucoma and the need for complete therapy. Am J Manag Care. 2008; 14(1 Suppl): S20-7.

[7]. Wax MB, Tezel G. Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. Exp Eye Res. 2009; 88(4): 825-30.

[8]. 谢媛, 王宁利, 马建民. Muller细胞对青光眼视网膜神经节细胞影响的研究进展. 眼科研究. 2010; 28(8): 786-90.

[9]. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, et al. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. Arch Ophthalmol. 1981; 99(4): 635-49.

[10]. Quigley HA, Addicks EM, Green WR. Optic nerve damage in human glaucoma. III. Quantitative correlation of nerve fiber loss and visual field defect in glaucoma, ischemic neuropathy, papilledema, and toxic neuropathy. Arch Ophthalmol. 1982; 100(1): 135-46.

[11]. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41(11):

3460-6.

[12]. Iwabe S, Moreno-Mendoza NA, Trigo-Tavera F, et al. Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma. Vet Ophthalmol. 2007; 10 Suppl 1: 12-9.

[13]. Asrani S, Zeimer R, Wilensky J, et al. Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with glaucoma. J Glaucoma. 2000; 9(2): 134-42.

[14]. Nagaraju M, Saleh M, Porciatti V. IOP-dependent retinal ganglion cell dysfunction in glaucomatous DBA/2J mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(10): 4573-9.

[15]. Ji J, Chang P, Pennesi ME, et al. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. Vision Res. 2005; 45(2): 169-79.

[16]. Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, et al. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. Prog Retin Eye Res. 2005; 24(2): 217-40.

[17]. Weinreb RN, Lindsey JD. The importance of models in glaucoma research. J Glaucoma. 2005; 14(4): 302-4.

[18]. Morrison JC. Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat. J Glaucoma. 2005; 14(4): 315-7.

[19]. Lindsey JD, Weinreb RN. Elevated intraocular pressure and transgenic applications in the mouse. J Glaucoma. 2005; 14(4): 318-20.

[20]. Yu S, Tanabe T, Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. Exp Eye Res. 2006; 83(4): 758-70.

[21]. Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. Exp Eye Res. 2005; 81(1): 71-80.

[22]. Miyara N, Shinzato M, Yamashiro Y, et al. Proteomic analysis of rat retina in a steroid-induced ocular hypertension model: potential vulnerability to oxidative stress. Jpn J Ophthalmol. 2008; 52(2): 84-90.

[23]. Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO. Rat models for glaucoma research. Prog Brain Res. 2008; 173: 285-301.

[24]. Nissirios N, Chanis R, Johnson E, et al. Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: an ultrasound biomicroscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(6):

2478-82.

[25]. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. Exp Eye Res. 1997; 64(1): 85-96.

[26]. Guo L, Moss SE, Alexander RA, et al. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46(1): 175-82.

[27]. Pang IH, Clark AF. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. J Glaucoma. 2007; 16(5): 483-505.

[28]. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. Exp Eye Res. 1995; 61(3): 379-82.

[29]. Neufeld AH, Das S, Vora S, et al. A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma. J Glaucoma. 2002; 11(3): 221-5.

[30]. Chiu K, Chang R, So KF. Laser-induced chronic ocular hypertension model on SD rats. J Vis Exp. 2007; (10): 549.

[31]. Luo XG, Chiu K, Lau FH, et al. The selective vulnerability of retinal ganglion cells in rat chronic ocular hypertension model at early phase. Cell Mol Neurobiol. 2009; 29(8): 1143-51.

[32]. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(10): 4314-20.

[33]. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002; 43(2): 402-10.

[34]. Grozdanic SD, Kwon YH, Sakaguchi DS, et al. Functional evaluation of retina and optic nerve in the rat model of chronic ocular hypertension. Exp Eye Res. 2004; 79(1): 75-83.

[35]. Biermann J, van Oterendorp C, Stoykow C, et al. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. Exp Eye Res. 2012; 104: 7-14.

[36]. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. Jpn J Ophthalmol. 1998; 42(5): 337-44.

[37]. Goldblum D, Mittag T. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. Vision Res. 2002; 42(4): 471-8.

[38]. Quigley HA, Hohman RM. Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983; 24(9): 1305-7.

[39]. Smith RS, Korb D, John SW. A goniolens for clinical monitoring of the mouse iridocorneal angle and optic nerve. Mol Vis. 2002; 8: 26-31.

[40]. Tezel G, Wax MB. Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. Arch Ophthalmol. 2004; 122(9): 1348-56.

[41]. Ergorul C, Ray A, Huang W, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma. J Mol Neurosci. 2010; 42(2): 183-91.

[42]. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, et al. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. Exp Eye Res. 2005; 81(1): 48-56.

[43]. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, et al. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. J Neurosci. 2007; 27(50): 13781-92.

[44]. Orellana JA, Froger N, Ezan P, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. J Neurochem. 2011; 118(5): 826-40.

[45]. Muller A, Hauk TG, Fischer D. Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. Brain. 2007; 130(Pt 12): 3308-20.

[46]. Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. Acta Neurochir Suppl. 2004; 89: 87-92.

[47]. Hayreh SS. Inter-individual variation in blood supply of the optic nerve head. Its importance in various ischemic disorders of the optic nerve head, and glaucoma, low-tension glaucoma and allied disorders. Doc Ophthalmol. 1985; 59(3): 217-46.

[48]. Hayreh SS. The blood supply of the optic nerve head and the evaluation of it - myth and reality. Prog Retin Eye Res. 2001; 20(5): 563-93.

[49]. Trew DR, Smith SE. Postural studies in pulsatile ocular blood flow: II. Chronic open angle glaucoma. Br J Ophthalmol. 1991; 75(2): 71-5.

[50]. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. J Cereb Blood

Flow Metab. 2002; 22(4): 393-403.

[51]. Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, et al. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. Neuroscience. 2003; 118(2): 379-86.

[52]. Taie S, Ono J, Iwanaga Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha has a key role in hypoxic preconditioning. J Clin Neurosci. 2009; 16(8): 1056-60.

[53]. 周烜, 张海福, 刘发益, 等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞低氧耐受性影响. 中国应用生理学杂志. 2008; 24(1): 30-3.

[54]. Zhu Y, Zhang L, Gidday JM. Deferroxamine preconditioning promotes long-lasting retinal ischemic tolerance. J Ocul Pharmacol Ther. 2008; 24(6): 527-35.

[55]. Zhu Y, Zhang Y, Ojwang BA, et al. Long-term tolerance to retinal ischemia by repetitive hypoxic preconditioning: role of HIF-1alpha and heme oxygenase-1. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(4): 1735-43.

[56]. Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, et al. The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. Exp Eye Res. 2001; 73(6): 781-5.

[57]. Pease ME, Hammond JC, Quigley HA. Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. J Glaucoma. 2006; 15(6): 512-9.

[58]. Krishna R, Mermoud A, Baerveldt G, et al. Circadian rhythm of intraocular pressure: a rat model. Ophthalmic Res. 1995; 27(3): 163-7.

[59]. ZHONG Yi-sheng CK-sLaC-pP. Medical progress Glial cells and glaucoma neuropathy. Chin Med J (Engl). 2007; 120(4): 326-35.

[60]. Danesh-Meyer HV, Kerr NM, Zhang J, et al. Connexin43 mimetic peptide reduces vascular leak and retinal ganglion cell death following retinal ischaemia. Brain. 2012; 135(Pt 2): 506-20.

[61]. Bodeutsch N, Siebert H, Dermon C, et al. Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. J Neurobiol. 1999; 38(1): 116-28.

[62]. Macharadze T, Goldschmidt J, Marunde M, et al. Interretinal transduction of injury signals after unilateral optic nerve crush. Neuroreport. 2009; 20(3): 301-5.

[63]. Fu QL, Wu W, Wang H, et al. Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular

Hypertension. Cell Mol Neurobiol. 2008; 28(2): 317-29.

[64]. Whitlock NA, Agarwal N, Ma JX, et al. Hsp27 upregulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46(3): 1092-8.

[65]. Huang W, Fileta JB, Filippopoulos T, et al. Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(9): 4129-35.

致 **谢**

在博士研究生学业即将结束之时，我真诚地感谢我的导师三年来对我的辛勤培养。她学风严谨、胸襟广阔、为人睿智，在跟随导师学习的过程中受益颇深。自接触视神经损伤与修复课题以来，从开题报告的设计，具体实验过程的实施，到课题过程中遇到的困难与艰辛，都离不开老师的悉心指导和鼓励，在生活和工作中也给予了无私的关怀与帮助，在此谨表达我最诚挚的谢意！我亦感激我的指导老师陈浩宇副教授、岑令平博士，感谢你们传授课题方面的宝贵经验和教训，使我少走许多弯路，谢谢你们在我迷茫时候的大力支持与鼓励。

感谢彭智培教授、陈彬教授、陈建欢博士后、耿义群博士在实验技术上的指导和帮助。感谢实验室梁嘉健、许慈燕、黄少芬、卢芝浩、郑玉倩，实验室秘书陈纯慧及动物饲养员谢琪珊，以及黄楚开、韩淼淼、林世斌、段觉昵、吕文娟对我的支持与帮助。特别感谢国家教育部及国家自然科学基金委员会对本课题提供的资金资助。

最后，我感谢我的家人，他们的支持与鼓励是我努力学习的精神支柱，是我顺利完成学业的信心所在。

# 发表论文

1. 无

附 **录**

**综 述**

**低氧诱导因子1与缺血相关神经病变**

**【摘要】**

神经组织是对氧十分敏感的组织，许多神经病变都与缺血缺氧相关。低氧诱导因子1 (HIF-1)是机体组织及细胞适应低氧的重要转录调节因子，在缺氧调节中起关键作用。低氧环境下HIF-1及其下游靶基因血管内皮生长因子(VEGF)、促红细胞生成素(EPO )、核因子kB (NF-kB)等基因表达上调。本文将HIF-lα的结构与功能、分布及表达调控、氧依赖调节、信号通路，HIF-lα在缺血相关脑神经病变、视神经及视网膜缺血相关疾病中的作用等研究进展状况作一综述。

**关键词**：低氧诱导因子1； 缺血相关神经病变； 脑； 视网膜； 缺血缺氧

体内氧浓度的稳定是机体维持自身功能的一个必要条件。在低氧条件下，机体内部在低氧信号的刺激下形成一个强大的防御体系以保护自身的组织。低氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)是机体组织细胞适应低氧的重要转录调节因子，在缺氧调节中起关键作用。HIF-1是1992年最先由Semenza等在缺氧诱导的Hep3B细胞核抽提物中发现，该物质是一种DNA结合蛋白分子，能与人红细胞生成素（Erythropoietin, EPO）基因的3’端增强子序列结合，促进其转录[1]。它对多种缺氧反应基因（Hypoxia responsive genes, HRG）的转录都有调控作用，并可能参与低氧反应的其它信号传导过程。

**1. HIF-1的蛋白和基因结构**

HIF-1主要以二异源二聚的形式存在，由120kD的α亚基（HIF-1α）和具有91，93, 94kD3种分子量β亚基（HIF-1β）组成，异源四聚体少见。HIF-1α为HIF-1所特有。HIF-1β又称为芳香烃受体核易位子或核转运蛋白（Aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator,

ARNT），为哺乳动物芳香烃受体复合物的亚基，可与其它碱性螺旋－环－螺旋(Basic-helix-loop-helix, bHLH)蛋白形成二聚体[2, 3]。HIF-1α既是HIF-1的调节亚基又是活性亚基，氧气对HIF-1活性的调节主要通过该亚基，目前认为序列同源性α亚基有3种：HIF-1α，HIF-2α、HIF-3α，三者均受O2调节；而β亚基属构建型表达，不受O2调节和影响，其功能可能与保持HIF-1结构稳定性及二聚化引起的活性构像转变有关。HIF-1α和HIF-1均为bHLH转录因子超家族成员，并具有PAS(Per-AHR/ARNT-sim)[4]。PAS结构为50个氨基酸重复序列，由His-X-X-Asp基序构成[2, 4]，bHLH和PAS结构与二聚化有关。HIF-1α的

N端包含bHLH和PAS结构域，主要介导异源二聚体的形成及其与DNA的结合，而C端包含的反式激活结构域（Transactivation domain, TAD），主要参与转录激活作用。HIF-1α存在两个TAD，分别为TAD－N（531～575位氨基酸）和TAD－C（786至826位氨基酸），在人和鼠中100％保守。TAD－N和TAD－C之间576～785位氨基酸序列的抑制结构域能降低TAD活性，在非缺氧细胞中尤其如此[5]。小鼠HIF-1αcDNA序列与人的HIF-1αcDNA序列有90％的同源性。人的HIF-1α基因位于第14号染色体上（14q21-14）,小鼠HIF-1α基因位于第12号染 色体。进一步研究HIF-1α的基因组序列，剪接位点分析发现人和鼠的外显子剪接位点完全相同[2, 6]。

**2. HIF-1的分布及表达调控**

低氧诱导因子1广泛参与哺乳动物细胞中缺氧诱导产生的适应性反应，目前已知的受HIF-1调节的靶基因超过100种[7]，广泛参与及调控细胞凋亡、细胞存活与增殖、红细胞生成素、血管生成及血管张力、能量代谢、糖代谢、铁代谢等诸多生理病理过程[8, 9]，被认为是低氧反应的核心元素。

Wiener等观察了人、大鼠和小鼠HIF-1 mRNA在不同组织的分布，在常氧条件下，人的心、脑、胎盘、肺、骨骼肌、肾和胰腺等组织HIF-1均有较低水平表达[5]。在正常人视网膜及鼠视网膜亦检测出HIF-1α呈阳性表达[10]。常氧条件下HIF-1α极易被降解，其降解途径是泛素-蛋白水解酶复合体，抑制蛋白水解酶复合体或缺失泛素依赖酶均能阻断这一过程；低氧条件下HIF-1α降解过程被阻断，导致HIF-1α堆积。研究发现，抑癌蛋白VHL (von Hippel-

Lindau，VHL）可能是调控HIF-1α表达的重要因素[6]。人HIF-1α的401～603位氨基酸为氧敏感区，是影响降解的重要结构，称为氧依赖降解区(oxygen depent degradation domain, ODD)。

VHL能与HIF-1α的ODD区结合形成复合物，类似于泛素连接酶的作用，使HIF-1α与泛素依

赖的蛋白水解酶复合体结合并被该酶水解细胞研究表明，脯氨酸羟化酶(PHD)可将ODD区的402和564位脯氨酸残基羟化，从而增强HIF-1α与VHL蛋白的亲合力，提供VHL的结合位点，促进HIF-1α水解；；天冬氨酸羟化酶(FIH-1)可将C末端转录活性区(CAD)内的803位天冬氨酸残基羟化，从而阻断转录辅因子(p300)与CAD的结合，抑制HIF-1α转录活性[11]。两者均负向调节HIF-1α，PHD和FIH-1同属于依赖α-酮戊二酸的羟化酶，在这些酶的羟化过程中，氧分子提供氧，α-酮戊二酸脱羧形成琥珀酸，消耗氧原子，产生CO2。低氧通过对依赖氧的PHD和FIH1羟化活性作用的抑制，阻断PHD-HIF-1α-VHL的HIF-1α降解和p300与

CAD结合2条通路，分别使HIF-1α蛋白含量和转录活性发生快速反转。低氧可正向调节HIF-1α。

低氧除了使HIF-1α蛋白质保持稳定外，还可诱导HIF-1α入核并募集共刺激因子CBP／

p300反式作用于低氧反应元件诱导细胞的低氧反应。Lando等m最近发现HIF-1α在常氧下C-TAD中保守性的天冬酰胺803(Asp-803)发生羟基化，这种羟基化后使得HIF-1α入核后不能募集p300；反之低氧则取消Asp-803羟基化并募集共刺激因子从而激活低氧反应基因的转录。Mahon等在2001年就发现-种被其称之为HIF-1抑制因子(factor inhibidng HIF-1, FIH-1)，这种因子能特异性的结合于HIF-1α抑制性结构域(IDaa576-785)，从而抑制HIF-1的转录活性；这种抑制作用也必须在常氧下才能进行[12]。最近两个研究小组证实FIH-1正是所谓的天冬酰胺羟化酶。[13, 14]

此外，HIF-1α的稳定性和活性增强也可以不依赖于细胞乏氧。如胰岛素生长因子2

（insulin growth factor 2, IGF2）和α转化生长因子（transforming growth factorα, TGFα）可通过非氧依赖途径引起HIF-1α增加[15]。

**3. HIF-1与缺血性脑病**

众所周知，缺氧缺血可导致多种神经病变。然而，非致命性的缺血或缺氧可以增强组织细胞对后续致命性缺血或缺氧损伤的耐受。这种现象被称作缺血或缺氧预处理。研究发现，经预处理后，在脑皮质、海马、纹状体和背侧丘脑这些对缺氧缺血性损伤最为敏感的区域，HIF-1αmRNA和HIF-1α蛋白水平明显升高。如果将P7幼鼠阻塞颈动脉并缺氧3h后立即处死，阻塞对侧的大脑半球中有HIF-1α蛋白表达，同侧半球脑实质中HIF-1α表达减少而在脑的微血管中显著上调。这主要是因为HIF-1活化需要启动蛋白质合成。在缺血缺氧时蛋白质合成减弱，相比较而言，血管对缺血性损伤的抗性较强，即使有缺血缺氧仍能合成关

系到它们存亡的蛋白质[16]。卒中主要是由脑血管阻塞引起脑缺血所导致的，血流严重减少使得组织O2和营养物质缺乏，最终引起脑梗死。在永久性大脑中动脉阻塞后，半暗带（梗死周围存活的组织）内缺氧诱导HIF-1活性增加，它反过来激活了VEGF和VEGFR-1(VEGF受体1)基因表达，随后，VEGFR-2基因转录也被诱导。VEGF／VEGFR系统的激活导致了血管内皮细胞增殖和新的血管生成，从健康组织开始，向半暗带延伸，最后到梗死的核心区[17]。因此，缺氧诱导的血管生成和糖酵解增强可以抵消卒中造成的神经损伤。另有研究表明，HIF-1具有诱导脑源性促红细胞生成素生成的作用，在脑缺血时EPO具有直接的神经保护作用，并且它还可以通过促进脑血管生成而发挥间接保护作用[18]。

除缺氧以外，氯化钴(CoCl )或去铁胺(DFX)也可以诱导HIF-1α蛋白表达、增强HIF-1的

DNA结合和转录活性以及靶基因的表达。当给小鼠腹腔注射CoCl后可引起HIF-1α和HIF-1蛋白水平显著升高，24h后负担了75％的脑保护作用。注射DFX后，HIF-1α小幅度升高，HIF-1明显升高，它担负了56％的脑保护作用。由于细胞内HIF-1的DNA结合和转录活性是由HIF-1α决定的，因此缺氧、CoCl、DFX诱导HIF-1α表达能力与它们的神经保护作用是相关的(缺氧> CoCl> DFX)[16] 。

众多对脑缺血性病变研究表明：HIF-1α对神经元细胞的促凋亡及抗凋亡作用与低氧持续时间、低氧的程度、不同类型的病理刺激、不同类型的大脑细胞有关。近期研究表明：中度缺氧处理、或应用小分子物质抑制脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase enzyme, PHD)及HIF-1α去磷酸化过程而增加HIF-1α蛋白活性及稳定性，上调VEGF、EPO等靶基因转录水平，对脑缺血性神经病变起到神经保护作用[19]。Yeh SH等通过HIF-1α基因沉默等技术证实其对早期脑缺血性病变中有神经保护作用[20]，Teia等对HIF-1α基因敲除鼠的研究也证明HIF-1α是缺血性脑病中神经保护作用的关键所在[21]。而重度低氧环境下HIF-1α会增加P53稳定性及BNP3的表达而诱导神经细胞亡[22]。因此，HIF-1α在脑组织缺血性疾病发展过程中起着重要调节作用，被认为是对神经细胞凋亡具有正负作用的调节因子。

**4. HIF-1与缺血性视网膜病变**

视网膜由于光感受器的存在需大量耗氧以维持正常生理功能，当前研究表明这会引起生理性低氧，而且与视网膜内HIF-1α的分子信号相关。John M.等研究已证实，正常人视网膜及鼠视网膜的节细胞、内核层、外核层细胞核中有HIF-1α表达，可能参与维持视网膜生理功能[10]。

**4.1 HIF-1参与视网膜缺血缺氧疾病**

临床常见缺血相关视网膜及视神经病变包括糖尿病视网膜病变、青光眼、老年黄斑变性等。研究表明这些眼部疾病都有与HIF-1相关。低氧状态下HIF-1α激活导致下游靶基因VEGF表达增加，后者正是引起渗出性老年黄斑病变糖尿病视网膜病变中新生血管形成的主要因子之一；同时，低氧可激活磷脂酰肌醇3激酶（phosphotidylinositol-3'- phosph ate-kinase, PI3K/ AKt）信号通路，此通路可同时激活NF-kB及HIF-1α，前者可以调节多种促炎分子表达，还可以与后者的启动子结合，引发一系列转录反应[23, 24]。M. Lin对HIF-1α基因敲除鼠研究表明：Müller细胞衍生的HIF-1α是糖尿病视网膜病变及视网膜缺血性病变中的炎症，渗漏，新生血管形成的关键因素。氧诱导视网膜缺血中HIF-1α表达增加[25]。血管异常及缺血缺氧也是青光眼发生发展的重要影响因素。研究表明：在犬及人类青光眼视网膜中HIF-1α表达较正常人视网膜增多，这也间接证实了缺血或血流动力学异常等因素参与了青光眼发病[26, 27]。而且，视网膜中HIF-1α表达分布区域和视野损害区域有很高的一致性[27]。近期Ceren Ergorul等也在报道在高渗盐水诱导的实验性青光眼鼠模型视网膜中HIF-1α蛋白表达及mRNA较正常鼠视网膜HIF-1α增多，从而进一步证实HIF-1α与青光眼疾病有着密切的内在联系[28]。此外，HIF-1α下游的靶基因血管内皮素1（Endothelin-1, ET-1）已被证明具有血管收缩作用并参与血管舒缩平衡调节。在原发性开角型青光眼患者房水中ET -1含量升高，与之相关的血管痉挛也在青光眼患者中被证实存在[29]。但在慢性青光眼鼠模型中内皮素1水平较正常降低，这也可能是青光眼病变某时期组织对缺氧应激的保护性反应，亦或是一种代偿机制[28]。以上皆提示在低氧条件下经HIF-1α激活及其下游多种靶基因表达的调节可能参与多种眼部缺血缺氧相关的视网膜及视神经病变的发生发展过程。

**4.2 HIF-1α与视神经损伤及保护**

低氧预处理可以保护缺血性视网膜病变已被众多研究证实[9, 30]。研究表明HIF-1α对多种具有神经保护作用的因子和蛋白有直接或间接的调控作用。HIF-1α在青光眼鼠模型中上调其下游靶基因促红细胞生产素（Erythropoietin, EPO）、热休克蛋白27（Heat Shock Proteins 27, HSP27）的表达，在视网膜缺血性病变及青光眼模型中已被证明对RGC具有保护作用[31,

32]. Zhu，Y L等对鼠视网膜缺血模型进行低氧预处理后，视网膜缺血性损害减轻，同时检测视网膜HIF-1α及血红素氧化酶heme oxygenase (HO) -1增加，可能是低氧预处理对视神经保护的机制之一[33]。但也有一些文献报道结果与以上不同，最近两篇关于毛果芸香碱及溴莫尼定药物对RGC保护作用的研究中都存在HIF-1α表达的下调，认为HIF1-α的表达对RGC存活可能是反向调节作用[34, 35]。

HIF-1α的作用存在不同细胞型中存在明显的差异性：星形细胞中HIF-1α功能缺失保护缺氧后神经，而神经细胞中HIF -1α功能缺则增加其对缺氧损害的敏感性[36]。近年研究表明胶质细胞与青光眼视神经损害有着密切关系[37, 38]，人类及动物青光眼视网膜中胶质细胞都有不同程度的激活及功能改变[39-42]。这些改变包括有利于神经细胞存活的因素和促进神经细胞损害的因素，因此具有双面作用[43]。青光眼中高眼压、低氧导致神经细胞损伤是胶质细胞激活的主要诱因。在高渗盐水法诱导大鼠慢性高眼压动物模型中，视网膜中低氧诱导因子1α蛋白表达的增加主要在星形胶质细胞及Müller细胞更为明显，细胞内HIF -1α的多种具有神经保护作用的靶基因也增加转录并表达相应蛋白，如EPO、HSP27等[28]。因此在低氧预处理时HIF -1α的激活可能会引起胶质细胞内发生一系列蛋白及功能变化。近期对于体外星形胶质细胞研究实验表明，低氧预适应后减少星形胶质细胞损伤及其激活后细胞毒性反应，并增加神经元活性[44]。这也从另外一个侧面提示：低氧预处理对于胶质细胞存活及活化状态调节可能是其神经保护作用机制之一。研究表明，体外培养的星形胶质细胞中，消除了HIF -2α的细胞培养液的保护作用大大减少，消除了HIF -1α的细胞培养液的保护作用则影响不大，这一结果提示星形胶质细胞的神经保护作用与HIF -2α的关系更为密切。大鼠原代小胶质细胞及小胶质细胞系BV-2在低氧诱导下会产生诱生型一氧化氮合成酶（inducible NO synthase, iNOS）激活，一氧化氮合成增加，不利于神经细胞存活。这一病理过程受PI-3K/AKT及HIF-1α调节[45]。对DBA/2J慢性高眼压小鼠模型的研究表明小胶质细胞激活早于视神经损害[46]，而抑制小胶质细胞激活，可明显减轻并对其损害有作用[47,48]。以上提示小胶质细胞激活是青光眼视网膜及神经损害的早期改变，对青光眼视神经病变发生发展有潜在的促进作用，而调节其激活反应可能会改善青光眼神经损害进程。因此，胶质细胞在低氧环境下激活损伤，细胞内发生细胞因子、蛋白、酶等表达变化[39]，在不同环境不同细胞内反应不尽相同。低氧预处理后胶质细胞状态及功能改变更倾向于视神经保护还是损害还有待于更多研究证实。

总之，HIF-1α对神经细胞的两种不同作用，机制复杂，涉及多种因子和信号，又会在不同细胞及环境下作掩护存在差异。在今后研究中明确具体机制，寻找其中关键因子和环

节是视神经保护研究的新的方向。

**5. HIF-1α信号调节通路**

Mazure等将HIF-1α报道质粒和P38或Akt失活的载体共转染NIH3T3R细胞并置于低氧环境中，观察到PI-3K/Akt信号途径被阻断，HIF-1激活及其下游靶基因VEGF基因转录受到抑制，表明低氧状态下HIF-1激活是PI-3K/Akt信号途径依赖的[49]。Salceda等研究表明低氧状态Hep3B细胞应用MEK1抑制剂PD98059可以阻断HIF-1 转录活性而不影响其

DNA结合活性[50]，表明ERK信号途径对HIF-1转录活性调节有重要作用，但并不参与调节其稳定性。在一项激光诱导舒脉络膜新生血管的研究中：体内及体外pAkt, pERK, HIF-1α，

VEGF上调. PI3K抑制剂Ly294002明显减少pAkt活性、HIF-1α及VEGF表达，而MEK抑制剂PD98059减少ERK磷酸化及VEGF表达，但不影响HIF-1α[51]。以上研究表明在低氧状态下磷脂酰肌醇3激酶、丝裂元激活蛋白激酶细胞外调节蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase/ extracellular signal regulated kinase, MARK/ERK）两条通路被激活，参与细胞中HIF-1α的转录活性及稳定性的调节，并且此调节作用具有细胞类型的特异性。

此外，Yuan，G等对PC12应用钙离子/钙调蛋白激酶抑制剂KN93可以阻断间歇性低氧诱导的HIF-1α转录激活，表明通过钙离子/钙调蛋白激酶是PI3K及ERK以外的一个新的调节HIF-1α转录活性的信号途径[52]。

综上所述，HIF-1广泛参与神经缺血缺氧相关损害的发生和发展，，在神经组织的生理及病理过程发挥重要的作用和功能，并可能是在缺血缺氧环境下调节神经元凋亡和存活的关键性调节因子。而其对神经元的存活的具体作用可能因周围环境、组织缺血缺氧程度等环境影响因素的不同而产生截然相反的作用；它的激活可以调节多种靶基因表达，触发一系列后续反应，其作用和功能可能是多向的，复杂的，并可能受组织细胞类型、缺氧程度、缺氧时间等多种因素影响而发挥不同作用；此外，其作用也可能受到相关信号通路、蛋白、因子等多种因素影响和调节。HIF-1对神经组织的许多作用及其机制仍未十分明确，。因此，深入探索HIF-1与神经病变的关系及其具体作用机制，寻找关键环节和影响因素，将可能成为缺血缺氧相关神经损害机制及神经保护治疗研究提供一个新的方向和靶点。

参考文献

[1]. Semenza, G. L. and G. L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol, 1992. 12(12): p. 5447-54.

[2]. Talks, K. L., et al., The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol, 2000. 157(2): p. 411-21.

[3]. Ryan, H. E., et al., Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. Cancer Res, 2000. 60(15): p. 4010-5.

[4]. Chen, C., et al., Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. J Biol Chem, 2001. 276(12): p. 9519-25.

[5]. Wiener, C. M., G. Booth and G. L. Semenza, In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 225(2): p. 485-8.

[6]. Maxwell, P. H., et al., The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature, 1999. 399(6733): p. 271-5.

[7]. Ke, Q. and M. Costa, Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol, 2006. 70(5): p. 1469-80.

[8]. Semenza, G. L., HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. Curr Opin Cell Biol, 2001. 13(2): p. 167-71.

[9]. Grimm, C., et al., Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2005. 16(4-5): p. 531-538.

[10]. Hughes, J. M., et al., Active HIF-1 in the normal human retina. J Histochem Cytochem, 2010. 58(3): p. 247-54.

[11]. Berra, E., et al., HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J, 2003. 22(16): p. 4082-90.

[12]. Mahon, P. C., K. Hirota and G. L. Semenza, FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes Dev, 2001. 15(20): p. 2675-86.

[13]. Lando, D., et al., FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev, 2002. 16(12): p. 1466-71.

[14]. Hewitson, K. S., et al., Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. J Biol Chem, 2002. 277(29): p. 26351-5.

[15]. Marx, J., Cell biology. How cells endure low oxygen. Science, 2004. 303(5663): p. 1454-6.

[16]. Bergeron, M., et al., Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. Ann Neurol, 2000. 48(3): p. 285-96.

[17]. Marti, H. J., et al., Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. Am J Pathol, 2000. 156(3): p. 965-76.

[18]. Marti, H. H., et al., Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. News Physiol Sci, 2000. 15: p. 225-229.

[19]. Bernaudin, M., et al., Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. 22(4): p. 393-403.

[20]. Yeh, S. H., et al., Selective Inhibition of Early-but Not Late-Expressed HIF-1alpha Is Neuroprotective in Rats after Focal Ischemic Brain Damage. Brain Pathol, 2010.

[21]. Taie, S., et al., Hypoxia-inducible factor-1 alpha has a key role in hypoxic preconditioning. J Clin Neurosci, 2009. 16(8): p. 1056-60.

[22]. Fan, X., et al., The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Brain Res Rev, 2009. 62(1): p. 99-108.

[23]. Belaiba, R. S., et al., Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. Mol Biol Cell, 2007. 18(12): p. 4691-7.

[24]. Salminen, A., et al., Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(7-8): p. 1049-58.

[25]. Mowat, F. M., et al., HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. PLoS One, 2010. 5(6): p. e11103.

[26]. Savagian, C. A., R. R. Dubielzig and M. Nork, Comparison of the distribution of glial fibrillary acidic protein, heat shock protein 60, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in retinas from glaucomatous and normal canine eyes. American Journal of Veterinary Research, 2008. 69(2): p. 265-272.

[27]. Tezel, G. and M. B. Wax, Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. Arch Ophthalmol, 2004. 122(9): p. 1348-56.

[28]. Ergorul, C., et al., Hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma. J Mol Neurosci, 2010. 42(2): p. 183-91.

[29]. Nicolela, M. T., Clinical clues of vascular dysregulation and its association with glaucoma. Can J Ophthalmol, 2008. 43(3): p. 337-41.

[30]. Roth, S., et al., Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. 39(5): p. 777-85.

[31]. Fu, Q. L., et al., Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. Cell Mol Neurobiol, 2008. 28(2): p. 317-29.

[32]. Whitlock, N. A., et al., Hsp27 upregulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(3): p. 1092-8.

[33]. Zhu, Y., et al., Long-term tolerance to retinal ischemia by repetitive hypoxic preconditioning: role of HIF-1alpha and heme oxygenase-1. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(4): p. 1735-43.

[34]. Zhu, X., et al., Pilocarpine Protects Cobalt Chloride-induced Apoptosis of RGC-5 Cells: Involvement of Muscarinic Receptors and HIF-1 alpha Pathway. Cellular and Molecular Neurobiology, 2010. 30(3): p. 427-435.

[35]. Goldenberg-Cohen, N., et al., Possible neuroprotective effect of brimonidine in a mouse model of ischaemic optic neuropathy. Clin Experiment Ophthalmol, 2009. 37(7): p. 718-29.

[36]. Vangeison, G., et al., The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 alpha in neurons and astrocytes. J Neurosci, 2008. 28(8): p. 1988-93.

[37]. ZHONG Yi-sheng CK-sLaC-pP. Medical progress Glial cells and glaucoma neuropathy. Chin Med J (Engl). 2007; 120(4): 326-35.

[38]. 谢媛, 王宁利, 马建民. Muller细胞对青光眼视网膜神经节细胞影响的研究进展. 眼

科研究. 2010; 28(8): 786-90.

[39]. 孟凤熙, 郭文. 人类青光眼和青光眼动物模型中神经胶质细胞的改. 中华眼科杂志. 2009; 45(10): 947-51.

[40]. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. Exp Eye Res 2005; 81: 48-56.

[41] Tezel G, Wax MB. Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. Arch Ophthalmol. 2004; 122(9): 1348-56.

[42] Wax MB, Tezel G. Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. Exp EyeRes. 2009; 88(4): 825-30.

[43] Grace V DAR. The Janus-faced effects of hypoxia on astrocyte function. Neuroscientist. 2009; 15(6): 579-88.

[44] 周烜, 张海福, 刘发益, 等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞低氧耐受性影响. 中国应用生理学杂志. 2008; 24(1): 30-3.

[45] Hypoxia-inducediNOSexpressioninmicrogliaisregulatedbythe PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha】

[46] Beatriz I G JJS, Rosa de H, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-IIand microglia reactivity in mice retinacontralateral to experimental glaucoma. J Neuroinflammation. 2012; 9(92): 1-18.

[47] Bosco A, Crish SD, Steele MR, et al. Early reduction of microglia activation by irradiation in a model of chronic glaucoma. PLoS One. 2012; 7(8): e43602.

[48] Bosco A, Inman DM, Steele MR, et al. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(4): 1437-46.

[49] Mazure, N. M., et al., Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. Blood, 1997. 90(9): p. 3322-31. [50]. Salceda, S., et al., Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. Kidney Int, 1997. 51(2): p. 556-9.

[51] Yang, X. M., et al., Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in Mediating Hypoxia-Induced

Expression of HIF-1 alpha and VEGF in Laser-Induced Rat Choroidal Neovascularization. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009. 50(4): p. 1873-1879.

[52]. Yuan, G., et al., Ca2+/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. J Biol Chem, 2005. 280(6): p. 4321-8.

# 本人简历

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 马迪 | 性别 | 女 |
| 生日 | 1979 年 8 月 | 民族 | 汉族 |
| 籍贯 | 辽宁朝阳市 | 政治面貌 | 共产党员 |
| 毕业院校 | 汕头大学医学院 | 专业 | 眼科学 |
| 博士导师 | 张铭志 | 研究方向 | 白内障、青光眼、视光 |
| 英语水平 | CET-6 | 计算机水平 | 初级， 熟练应用 Office  2003,NoteExpress,SPSS 软件 |
| 通讯地址 | 广东省汕头市东厦北路广厦新城汕头大学・香港中文大学联合汕头国际眼科中心 | | |
| 专业水平 | 2011 年通过国家执业医师资格考试  2011 年通过国际眼科医师协会考试（ ICO） 基础部分熟悉眼科常见病及多发病的诊治、基本检查仪器操作参加汕头国际眼科中心规范化住院医师培训  参加香港中文大学眼视光学系远程培训 | | |
| 科 研 训练 | 1. 参加教育部博士点专项基金项目低氧诱导因子 1α 对青光眼视神经节细胞存活作用的研究  2.参加汕头市科技计划睫状神经营养因子在青光眼小鼠模型中的视神经保护作用的研究  3. 国家自然科学基金面上项目 PI3K、MAPK 和 JAK 信号传递通路及 RNA 干扰在神经保护中的作用的研究  4. 参加第三届汕头大学 ・牛津大学临床试验培训课程及汕头大学医学院第一届动物实验培训班  5.熟练掌握文献检索与阅读技巧 | | |
| 主要参会 | 2011.12 参加广东省医学会第十二次眼科学术会议， 广东汕头， 大会发言  2012.5 参加 ARVO 会议， 美国， 展板 | | |