DOI: 10.16016/j.2097-0927.202202158

急性高眼压致大鼠视网膜节细胞焦亡及抗 Caspase-1 处理的神经保护作用

孙煜林,刘 莛 400042 重庆,陆军特色医学中心眼科

[摘要] **目的** 探讨在 SD 大鼠急性高眼压模型中,细胞焦亡及抗 Caspase-1 处理对视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell,RGCs)的保护作用。**方法** 42 只 SPF 级雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、急性高眼压模型组和 VX-765(Caspase-1 抑制剂)干预组,均以右眼为实验眼。模型组和干预组用生理盐水前房灌法建立急性高眼压模型,干预组在建模当日及次日玻璃体腔注入 VX-765(200 μmol/L)溶液 4 μL,模型组于相同时间玻璃体腔注入等容量生理盐水。正常对照组不处理。造模后 7 d 处死大鼠,HE 染色观察视网膜形态学变化及 RGCs 密度;免疫组化观察 RGCs 并检测视网膜平均光密度;实时荧光定量 PCR 检测视网膜 Caspase-1、gsdmd、IL-1b、IL-18 分子 mRNA 表达;Western blot 法检测 Caspase1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18 蛋白表达。**结果** 模型组大鼠视网膜厚度为(164.53±1.04)μm,低于正常对照组[(181.44±5.13)μm]和干预组[(173.15±2.15)μm],模型组 RGCs 密度为(332.87±16.37)个/mm^2,低于正常对照组[(520.39±18.62)个/mm^2]和干预组[(373.97±20.32)个/mm^2],模型组大鼠视网膜光密度为(0.443±0.014),低于正常对照组(0.517±0.015)和干预组(0.492±0.006),差异均有统计学意义(P<0.05)。模型组大鼠视网膜 IL-1b、IL-18 mRNA 相对表达量高于正常对照组和干预组,Caspase 1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18 蛋白相对表达量同样高于正常对照组和干预组,差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 急性高眼压暴露后,依赖 Caspase-1 的细胞焦亡通路分子表达明显增多,抑制 Caspase-1 活性能减轻视网膜组织损伤,有效保护 RGCs,减少 RGCs 死亡数量。

[关键词] 青光眼;急性高眼压;细胞焦亡;Caspase-1;gsdmd;视网膜神经节细胞
[中图法分类号] R774.1; R775; R966 [文献标志码] A

Acute ocular hypertension induced pyropotosis in rat retinal ganglion cells and protective effect of inhibiting Caspase-1 in rat model

SUN Yulin, LIU Ting Department of Ophthalmogy, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of pyroptosis and anti-Caspase-1 treatment on retinal ganglion cells (RGCs) in rats with acute ocular hypertension. **Methods** Forty-two SPF male SD rats were randomly divided into normal control group, acute ocular hypertension model group and VX-765 (Caspase-1 inhibitor) intervention group, with the right eye as the experimental eye. Acute ocular hypertension was inflicted by anterior chamber irrigation with normal saline in the model group and intervention group. The rats in the intervention group were further given 4 μL VX-765 (200 μmol/L) solution by intravitreal injection on the modeling day and the next day, and those of the model group were injected with equal volume of normal saline in vitreous cavity at the same time. No such treatment was performed on the rats from the control group. All rats were killed at the seventh day after modeling. Retinal morphology and the density of RGCs were observed by HE staining. The survival of RGCs and average absorbance of retina were observed by immunohistochemical assay. The mRNA levels of Caspase-1, gsdmd, IL-1b and IL-18 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein expression of Caspase 1-p20, gsdmd-n, IL-1b and IL-18 were detected by Western blotting. **Results** The retinal thickness was 164.53±1.04 μm in

[通信作者] 刘 莛,E-mail:tingliu1597@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

the model group, which was significantly thinner than that in the normal control group (181.44±5.13 μm) and the intervention group (173.15±2.15 μm). The density of RGCs was (332.87±16.37)/mm^2 in the model group, obviously lower than that in the normal control group [(520.39±18.62)/mm^2] and the intervention group [(373.97±20.32)/mm^2]. The average absorbance of retina was 0.443±0.014 in the model group, statistically lower than in the normal control group (0.517±0.015) and the intervention group (0.492±0.006). The differences were statistically significant in above values ($P<0.05$). The mRNA relative expression levels of IL-1b and IL-18 were significantly higher in the model group than the control group and intervention group ($P<0.05$). The protein levels of Caspase1-p20, gsdmd-n, IL-1b and IL-18 were remarkably higher in the model group than the other 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion** Acute ocular hypertendion exposure enhances the expression of the molecules in Caspase-1-dependent pyropotosis pathway. So, inhibiting Caspase-1 activity can reduce the severity of retinal injury, protect RGCs effectively, and reduce RGCs death.

[**Key words**] glaucoma; acute ocular hypertension; pyropotosis; Caspase-1; gsdmd; retinal ganglion cells

Corresponding author: LIU Ting, E-mail: tingliu1597@126.com

急性青光眼是亚洲人群中最常见的青光眼类型,据估计,到2040年将影响全球1.118亿人,其特征是突发性眼压(intraocular pressure,IOP)大幅度升高,伴剧烈眼痛导致不可逆的视力下降,增高的眼压影响视神经的轴浆流,使视乳头灌注不良,造成视神经萎缩,可能最终导致视功能丧失永久性失明[1-4]。目前对于急性青光眼的治疗,主要针对高眼压,采用药物或者手术的方式降低眼压至正常水平,但MONRRISON等[5]在临床试验研究中发现,即使将眼压控制在正常范围的情况下,仍有大概1/3的患者视功能伤害会持续恶化,说明单从稳定眼压上着手,并不能较好地保护视功能。因为在急性青光眼中快速大幅度升高的眼压会导致视网膜产生缺血再灌注损伤,视网膜在整个过程中缺血缺氧,引起视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell,RGCs)大量死亡造成视功能的损害,该过程被启动后,并不能随着眼压被控制而停止[6]。如何保护RGCs让其在青光眼病程中免于受损是解决青光眼造成不可逆致盲问题的关键。

关于RGCs死亡机制的研究表明,先天免疫及炎症反应可能是青光眼病理生理过程的关键因素[7-9]。而以往关于RGCs的细胞凋亡研究是一种不涉及炎症的程序性细胞死亡方式,这似乎不能完全说明在炎症性青光眼的神经退行性病变中RGCs细胞的死亡机制。而近几年一种与炎症紧密相关的新的细胞死亡方式走近人们的视线——细胞焦亡。它不同于细胞凋亡产生凋亡小体导致细胞死亡,可通过由Caspase-1分子介导的经典焦亡途径,引起质膜破裂,释放各种炎症分子及胞内容物,引起细胞死亡[10-15]。这种炎性细胞死亡方式是否参与急性青光眼中RGCs死亡?如果抑制Caspase-1分子介导的细胞焦亡能否在急性高眼压中保护RGCs?本研究利用SD大鼠建立急性高眼压动物模型,探讨用VX-765抑制Caspase-1对大鼠RGCs和视网膜的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择成年SPF级雄性SD大鼠42只,3月龄,体质量200~250 g,饲养于陆军特色医学中心实验动物中心,室温20~25 ℃,相对湿度50%~65%,12 h明暗交替。动物实验严格遵循实验动物伦理"3R"原则,并通过陆军军医大学动物实验伦理委员会审批(AMUWEC20192098)。

1.2 主要试剂及仪器

苏木精-伊红(HE)检测试剂盒、RIPA裂解液和BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);荧光定量PCR仪(ABI公司,美国);逆转录试剂盒(Roche),兔抗大鼠Caspase1-p20抗体(Invitrogen,PA5-99390),兔抗大鼠gsdmd-n抗体(Invitrogen,PA5-116815),兔抗大鼠IL-1b抗体(Invitrogen,PA5-105048),兔抗大鼠IL-18抗体(博奥森,bs-0529R),兔抗大鼠brn3a抗体(赛维尔,GB111661),Caspase-1抑制剂VX-765(MCE公司),山羊抗兔IgG多克隆抗体(博奥森),Caspase-1、gsdmd、IL-1b、IL-18引物(重庆塞维尔生物有限公司),动物专用眼压计Tonolab(芬兰Icare公司),光学显微镜(日本尼康)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 将42只SPF级SD大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、急性高眼压模型组和VX-765(Caspase-1抑制剂)干预组,每组$n=14$只,均以右眼为实验眼。模型组和干预组大鼠采用生理盐水

前房灌注的方法建立急性高眼压模型,干预组在建模当日及第2天采用玻璃体腔注射的方法注入VX-765(200 μmol/L)溶液4 μL,模型组于相同时间玻璃体腔注入等容量的生理盐水,正常对照组不作任何处理。

1.3.2 急性高眼压动物模型建立 用10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,构建急性高眼压模型,将生理盐水瓶置于高于大鼠眼球水平面约150 cm的输液架上,利多卡因表面麻醉并用复方托吡卡胺散瞳后,注射针于大鼠右眼颞侧角巩膜缘向前房插入并固定,持续灌注生理盐水90 min,期间使用芬兰Icare公司Tonolab动物专用眼压计实时监测眼压,保证眼压持续稳定在90 mmHg以上90 min,期间观察虹膜及视网膜血供情况。双眼角膜表面放置生理盐水棉片,防止角膜干燥。

1.3.3 HE染色观察各组视网膜形态厚度及RGCs平均密度 分为正常对照组、模型组、干预组,每组3只。均于7 d后处死SD大鼠,处死后立即摘除右眼于4%多聚甲醛中固定,后蔗糖脱水,OCT包埋冷冻后用冰冻切片机切片。常规使用HE染色,光学显微镜下观察视网膜形态结构,成像时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致,统一以μm作为标准单位,分别测量每张切片中5处视网膜厚度取平均值;计数每张切片3个视野内视神经节细胞数,并测量视野内视网膜面积,计算出视神经节细胞密度=视神经节细胞数/视网膜面积。

1.3.4 免疫组织化学染色观察各组RGCs细胞存活情况 正常对照组、模型组、干预组,每组3只。均于7 d后处死SD大鼠,处死后立即摘除右眼于4%多聚甲醛中固定,后蔗糖脱水,OCT包埋冷冻后用冰冻切片机切片。PBS洗3次,每次5 min,0.4% Triton打孔10 min,PBS洗3次,每次5 min,3% H_2O_2 处理10 min,PBS洗3次,每次5 min,封闭液封闭1 h,一抗按1∶600的比例用抗体稀释液稀释,4 ℃过夜孵育后,PBS洗3次,每次5 min,二抗按1∶200的比例用PBS稀释,室温孵育1 h,PBS洗3次,每次5 min,加辣根酶30 min,PBS洗3次,每次5 min,DBA显色30 s,封片后观察视网膜染色情况。使用赛维尔图像分析系统观察视网膜情况并统计平均光密度,计数每张切片3个视野内视神经节细胞数并比较。

1.3.5 荧光定量PCR法检测各组Caspase-1、gsdmd、IL-1b、IL-18相对表达量 分为正常对照组、模型组、干预组,每组4只。均于7 d后处死SD大鼠,处死后立即摘除右眼并剥离视网膜,分别将视网膜置于装有1 mL TRIzol离心管中并吹打溶解,每管中加入200 μL三氯甲烷,混匀15 s冰上放置10 min后,离心(12 000 r/min,15 min,4 ℃),取上清于新的离心管中,1∶1加入异丙醇,轻轻混匀15 s,冰上放置10 min后离心(12 000 r/min,15 min,4 ℃),离心后弃上清,每管中加入1 mL 75%乙醇(无酶水),混匀后离心(12 000 r/min,15 min,4 ℃),弃上清重复1次,再弃上清,管中干燥后加入50 μL无酶水,mRNA提取完成。每组均配成20 μL体系进行逆转录获得cDNA,最后将得到的cDNA进行Caspase-1、gsdmd、IL-1b、IL-18荧光定量PCR。见表1。

表1 各引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	片段长度/bp
Caspase-1	上游:AAAGACAAGCCCAAGGTGATC	277
	下游:CCAAGTCACAAGACCAGGCATA	
gsdmd	上游:TAAGGCTCTGGAGACAACGGTG	262
	下游:TGACAATAGGAACAGGGAGGC	
IL-1b	上游:GCATCCAGCTTCAAATCTCGC	256
	下游:TGTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
IL-18	上游:TGAAGTAAGAGGACTGGCTGTGA	211
	下游:TTGGCAAGCAAGAAAGTGTCC	

1.3.6 蛋白印迹法检测各组Caspase1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18蛋白相对表达量 分为正常对照组、模型组、干预组,每组4只,均于7 d后处死SD大鼠,处死后立即摘除右眼并剥离视网膜置于离心管中,用眼科显微手术剪充分剪碎组织后,置于配好的RIPA溶液中,超声机中处理2个循环再取出,离心(12 000 r/min、4 ℃、15 min)后,取上清液视网膜蛋白提取完成。用BCA法检测蛋白浓度,进行Western blot实验,加入蛋白体积1/4量的缓冲液后,煮沸10 min,然后进行SDS-PAGE电泳,将凝胶中的蛋白质转移至PVDF膜上,用5%的脱脂牛奶封闭2 h,一抗均按照1∶1 000稀释,二抗按照1∶5 000比例稀释,将膜置于一抗中4 ℃摇床孵育过夜,第2天用TBST溶液清洗3次,每次10 min,在室温二抗孵育2 h,同样用TBST溶液清洗3次,每次10 min,显影拍照,用Image J软件分析各蛋白条带灰度,计算各目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

使用SPSS 26.0统计软件对实验数据进行正态分布和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐性的数据进行单因素方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多重比较采用LSD-t检验,非正态分布的数据进行Kruskal-Wallis检验,多重比较选择多个独立样本比较,结果以四分位数 $M(Q_L,Q_U)$ 表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性高眼压大鼠造模结果

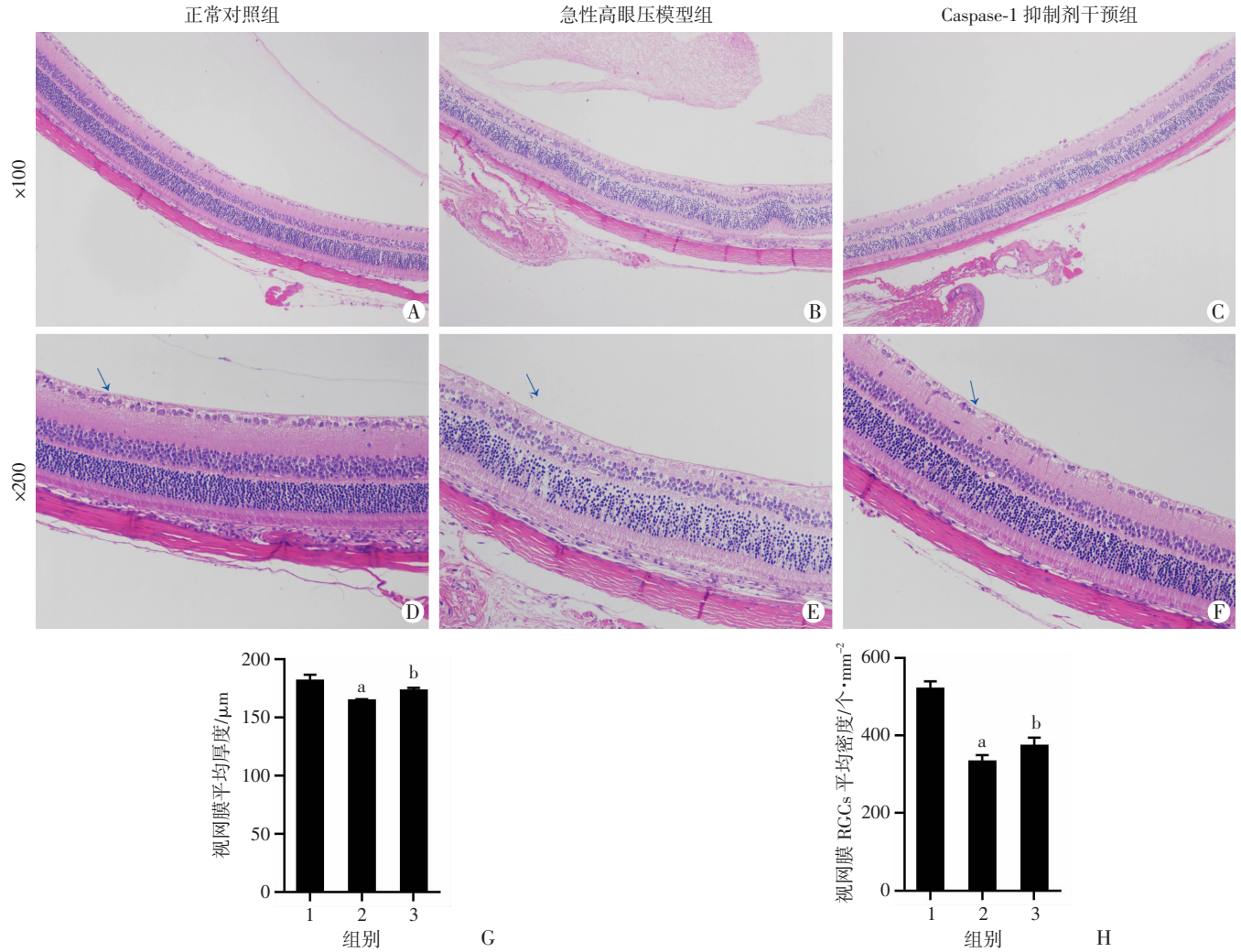
模型组和干预组大鼠在造模期间眼压均维持在90 mmHg以上,眼部虹膜变白且红色反射消失,说明发生视网膜缺血,造模成功。

2.2 各组大鼠视网膜组织病理学表现

正常对照组大鼠视网膜层次结构清楚,各层细胞及 RGCs 排列整齐;模型组视网膜组织结构层次不清晰,各层内细胞排列疏松,RGCs 细胞数目明显减少;干预组视网膜层次结构较模型组相对清晰,RGCs 细胞数量有所恢复且排列相对整齐。计算各组大鼠视网膜厚度,发现模型组大鼠视网膜厚度明显低于正常对照组和干预组的视网膜厚度,差异均有统计学意义($P<0.05$)。200 倍显微镜下观察到正常对照组视网膜 RGCs 排列紧密,细胞形态规则;模型组视网膜 RGCs 数量明显减少,排列凌乱且形状不规则;干预组 RGCs 数量有所恢复,细胞排列相对整齐。统计各组 RGCs 细胞密度,发现模型组单位面积 RGCs 数量明显低于正常对照组和干预组的 RGCs 数量,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

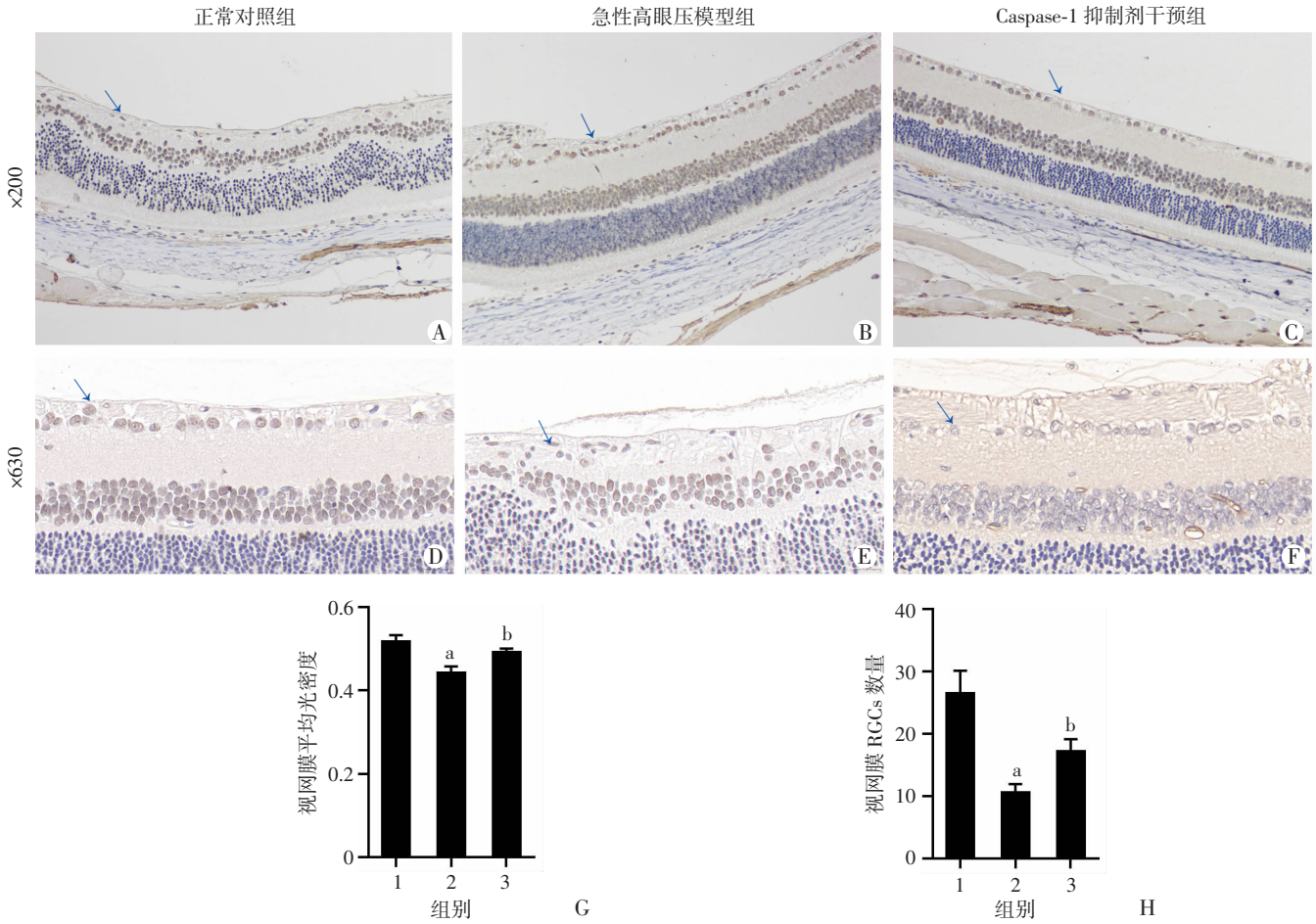
2.3 各组大鼠视网膜 RGCs 数量比较

观察 3 组视网膜 RGCs 细胞存活情况,计算视网膜平均光密度及各组视网膜神经节细胞数。正常对照组 RGCs 排列整齐且细胞形态正常规则;模型组 RGCs 数量明显减少,且细胞形态及排列均不规则;干预组 RGCs 数量相对恢复,细胞排列比模型组整齐且形态较模型组规则。检测 3 组视网膜平均光密度,发现模型组平均光密度明显低于正常对照组和药物干预组,差异有统计学意义($P<0.05$),在高倍镜下分别计数 3 组视网膜神经节细胞数,发现模型组视网膜 RGCs 数量明显低于正常对照组和干预组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



A~F:各组大鼠视网膜形态学和 RGCs 密度的比较 箭头示 RGCs 层;G:各组视网膜平均厚度比较;H:各组视网膜 RGCs 平均密度比较;1:正常对照组;2:急性高眼压模型组;3:Caspase-1 抑制剂干预组;a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与急性高眼压模型组比较

图 1 各组大鼠造模后 7 d 视网膜 HE 染色病理学观察及 RGCs 平均厚度和密度



A~F:各组大鼠视网膜平均光密度和 RGCs 数量的比较　箭头示 RGCs 层;G:各组视网膜平均光密度比较;H:各组视网膜 RGCs 数量比较;1:正常对照组;2:急性高眼压模型组;3:Caspase-1 抑制剂干预组;a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与急性高眼压模型组比较

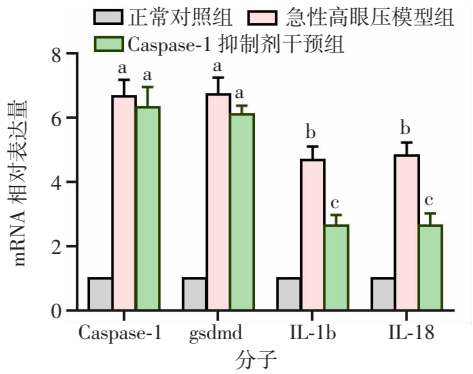
图 2　各组大鼠造模 7 d 后免疫组织化学染 Brn3a 观察 RGCs 存活情况

2.4　各组大鼠视网膜组织中细胞焦亡相关活性分子 mRNA 相对表达量

模型组细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、gsdmd 以及焦亡相关炎症分子 IL-1b、IL-18 的 mRNA 表达量较正常对照组明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。使用 Caspase-1 活性抑制剂干预后,Caspase-1 和 gsdmd 的 mRNA 表达并无明显减少,差异无统计学意义,但焦亡相关炎症分子 IL-1b 和 IL-18 的 mRNA 表达明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

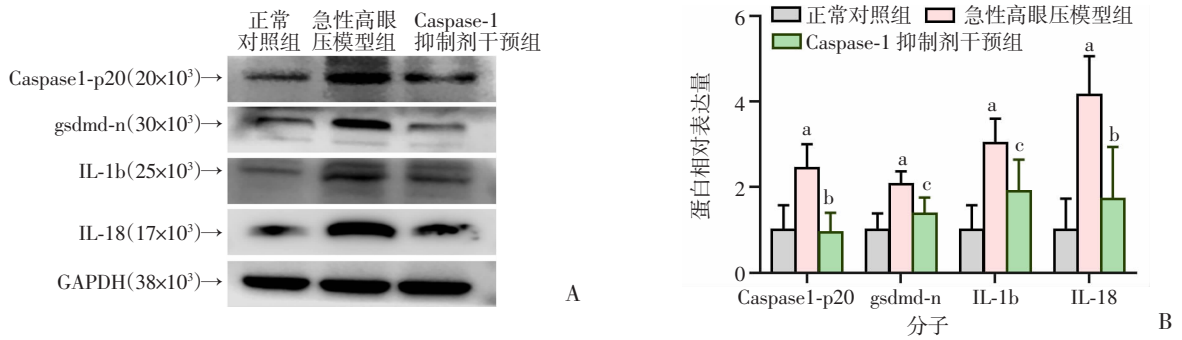
2.5　各组大鼠视网膜组织中细胞焦亡相关活性分子蛋白相对表达量

急性高眼压组大鼠视网膜细胞焦亡相关通路蛋白及炎性分子 Caspase1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18 蛋白表达量相比正常对照组明显增多($P<0.05$),使用 Caspase-1 抑制剂后焦亡相关分子 Caspase1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18 的蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。见图 4。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较;c:$P<0.01$,与急性高眼压模型组比较

图 3　各组大鼠视网膜 Caspase-1、gsdmd、IL-1b 和 IL-18 的 mRNA 相对表达量比较



A: Western blot 结果;B: 各蛋白灰度值统计分析 a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,c: $P<0.05$,与急性高眼压模型组比较

图 4 Western blot 检测各组大鼠视网膜 Caspase1-p20,gsdmd-n,IL-1b,IL-18 蛋白表达

3 讨论

急性青光眼是目前世界范围内造成视力急剧下降的常见原因之一,主要的治疗方式依旧是采用药物或手术达到降压目的。目前对于急性青光眼的治疗缺乏公认的、有效的措施。因此,如何预防或减轻急性青光眼的视力损害依旧是一大难题。此前,缺血缺氧引起的炎症反应被认为在高眼压诱导的视网膜损伤中发挥重要作用[16-17]。细胞焦亡正是近年来发现的一种以炎症反应为特征的细胞死亡方式,主要依赖于 Caspase-1 这一重要信号传导物质[18-19]。研究发现,细胞焦亡与多种炎症相关疾病的发生密切相关[20-21]。最新研究表明在青光眼中炎症和免疫方面的变化在病理过程和病情进展中起着重要作用[22]。

本研究 HE 染色结果和免疫组织化学染 Brn3a 抗体标记 RGCs 细胞发现,模型组的大鼠视网膜层次结构不清楚,厚度变薄,RGCs 数量及密度明显减少且形态不规则,说明急性高眼压造成的缺血缺氧环境及其再灌注损伤对视网膜的形态及 RGCs 细胞都产生很多伤害,这与现阶段对急性高眼压模型及缺血缺氧再灌注模型的损伤结果一致。但在使用 Caspase-1 抑制剂后,可观察到视网膜形态结构及厚度有明显恢复,RGCs 细胞存活数量也有所增加,且细胞形态变规则并排列整齐。说明在急性高眼压的情况下,抑制 Caspase-1 分子活性可以有效保护 RGCs 细胞,减少伤害,增加 RGCs 细胞存活率。

在明确抑制 Caspase-1 活性可以有效保护 RGCs 细胞后,哪些分子参与其中,是否有细胞焦亡通路参与? 本研究采用 qPCR 法检测 3 组大鼠视网膜 Caspase-1,焦亡特异性蛋白 gsdmd,焦亡相关性炎性分子 IL-1b、IL-18 的 mRNA 相对表达量。结果发现,模型组中这 4 种分子的 mRNA 相对表达量均有所增加,其中 Caspase-1 和 gsdmd mRNA 表达量约为对照组的 6 倍,IL-1b 及 IL-18 mRNA 表达量约为对照组的 4 倍。在抑制 Caspase-1 活性后,再检测这 4 种分子的表达,结果发现 IL-1b 和 IL-18 mRNA 的表达几乎减少一半,但 Caspase-1 和 gsdmd 的 mRNA 表达并没有变化。研究表明 Caspase-1 分子主要是以前体的形式存在于细胞中,但只有其活性形式(Caspase1-p20)才具有引起细胞焦亡的能力。细胞内前体 Caspase-1 分子结构包含 p10 小亚基和 p20 大亚基,当细胞受到胞内或者胞外危险信号刺激时,胞质中一些天然免疫受体分子比如 NOD 样受体等就会参与组成炎症小体,目前已知的炎症小体包括 AIM2、NLRP3、NLRP1、NLRC4 和 Pyrin 等,主要根据不同的核心蛋白将它们区分开来。这些炎症小体都带有 N 端 Caspase 招募区(CARD)或者 Pyrin 域(PYD),被相应的刺激分子激活后,即开始募集 ASC 蛋白,CARD 或者 PYD 这两个结构域可通过相互作用连接 ASC 蛋白,连接上 ASC 蛋白的炎症小体具有招募大量 Caspase-1 前体分子的能力,局部高浓的 Caspase-1 前体使其发生自溶水解,形成具有活性的 Caspase1-p20 分子。同样存在于胞浆中的全结构的 gsdmd 蛋白并不是其活性形式,活化的 Caspase-1 分子能够在 Asp276 位点上切割 gsdmd 蛋白,产生 gsdmd-n 和 gsdmd-c 两个重要结构域,其中 gsdmd-n 才是真正引起细胞焦亡的功能蛋白[23-26]。gsdmd-n 具有很强的脂质结合能力,在焦亡过程中能够稳定地锚定在生物膜上,通过单体的寡聚化形成直径 10~16 nm 的蛋白孔洞,使焦亡炎性分子 IL-1b、IL-18 及一些细胞内容物释放到细胞外,引起炎症反应的扩大,致使细胞最终发生肿胀、质膜破裂,这种炎症的扩大又可恶性循环引起伤害的不断深入[27-30]。

本研究发现 Caspase-1 和 gsdmd 蛋白及 IL-1b 和 IL-18 这两种炎性分子在模型组大鼠视网膜中都高度表达,而局部高浓度的 Caspase-1 分子在细胞应激引起炎性小体激活的情况下会发生水解激活。本研究通过

Western blot 方法检测 3 组大鼠视网膜 Caspase1-p20、gsdmd-n、IL-1b、IL-18 蛋白的相对表达量,结果发现模型组 4 种蛋白表达量均明显增加,使用 Caspase-1 抑制剂后 Caspase1-p20 和 gsdmd-n 明显减少。细胞焦亡通路标志性活性蛋白减少,说明细胞焦亡通路被抑制,抑制细胞焦亡可以在急性高眼压下有效保护 RGCs 细胞。

综上所述,本实验通过建立急性高眼压动物模型,观察大鼠视网膜形态及 RGCs 细胞存活情况,并检测大鼠视网膜细胞焦亡相关标志物的表达,初步得出 Caspase-1 依赖性细胞焦亡参与了急性高眼压下视网膜 RGCs 的死亡。使用 VX-765 抑制 Caspase-1 活性后观察大鼠视网膜形态及 RGCs 细胞存活情况并检测焦亡相关标志物,发现抑制 Caspase-1 分子活性,减少细胞焦亡的发生确实可以在急性高眼压下保护视网膜形态并保护 RGCs,提高 RGCs 细胞存活率。本研究对急性青光眼的发病机制做了补充,为其寻求有效的治疗方法提供了一定的理论基础。但对于细胞焦亡是如何被驱动的,如何在细胞焦亡进程中有效中止伤害保护 RGCs,以及在急性青光眼发病中细胞焦亡和细胞凋亡如何相互作用,仍需要更深入的研究。

参考文献:

[1] TANNER L, GAZZARD G, NOLAN W P, *et al*. Has the EAGLE landed for the use of clear lens extraction in angle-closure glaucoma? And how should primary angle-closure suspects be treated? [J]. Eye (Lond), 2020, 34(1): 40-50. DOI: 10.1038/s41433-019-0634-5.

[2] THAM Y C, LI X, WONG T Y, *et al*. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040 [J]. Ophthalmology, 2014, 121(11): 2081-2090. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.

[3] ZHU X L, ZENG W, WU S Y, *et al*. Measurement of retinal changes in primary acute angle closure glaucoma under different durations of symptoms[J]. J Ophthalmol, 2019, 2019: 5409837. DOI: 10.1155/2019/5409837.

[4] WEINREB R N, AUNG T, MEDEIROS F A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review[J]. JAMA, 2014, 311(18): 1901-1911. DOI: 10.1001/jama.2014.3192.

[5] MORRISON J C, NYLANDER K B, LAUER A K, *et al*. Glaucoma drops control intraocular pressure and protect optic nerves in a rat model of glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 526-531.

[6] ALMASIEH M, WILSON A M, MORQUETTE B, *et al*. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(2): 152-181. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.002.

[7] BARIŞ M, TEZEL G. Immunomodulation as a neuroprotective strategy for glaucoma treatment[J]. Curr Ophthalmol Rep, 2019, 7(2): 160-169. DOI: 10.1007/s40135-019-00212-1.

[8] BAUDOUIN C, KOLKO M, MELIK-PARSADANIANTZ S, *et al*. Inflammation in glaucoma: from the back to the front of the eye, and beyond[J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 83: 100916. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100916.

[9] WILLIAMS P A, MARSH-ARMSTRONG N, HOWELL G R, *et al*. Neuroinflammation in glaucoma: a new opportunity [J]. Exp Eye Res, 2017, 157: 20-27. DOI: 10.1016/j.exer.2017.02.014.

[10] SILVERMAN S M, KIM B J, HOWELL G R, *et al*. C1q propagates microglial activation and neurodegeneration in the visual axis following retinal ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Neurodegener, 2016, 11: 24. DOI: 10.1186/s13024-016-0089-0.

[11] JO D H, YUN J H, CHO C S, *et al*. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy [J]. Glia, 2019, 67(2): 321-331. DOI: 10.1002/glia.23542.

[12] GONG Y R, CAO X N, 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]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2019, 33: 2058738419861777. DOI: 10.1177/2058738419861777.

[13] CUEVA VARGAS J L, 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.

[14] RIECK J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(3): 2393. DOI: 10.1167/iovs.12-9781.

[15] NYSTRÖM S, ANTOINE D J, LUNDBÄCK P, *et al*. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis[J]. EMBO J, 2013, 32(1): 86-99. DOI: 10.1038/emboj.2012.328.

[16] CHI W, LI F, CHEN H R, *et al*. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1β production in acute glaucoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(30): 11181-11186. DOI: 10.1073/pnas.1402819111.

[17] WANG K, PENG B, LIN B. Fractalkine receptor regulates microglial neurotoxicity in an experimental mouse glaucoma model[J]. Glia, 2014, 62(12): 1943-1954. DOI: 10.

1002/glia.22715.

[18] JORGENSEN I, ZHANG Y, KRANTZ B A, *et al*. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis[J]. J Exp Med, 2016, 213(10): 2113-2128. DOI: 10.1084/jem.20151613.

[19] GONG T, YANG Y Q, JIN T C, *et al*. Orchestration of NLRP3 inflammasome activation by ion fluxes[J]. Trends Immunol, 2018, 39(5): 393-406. DOI: 10.1016/j.it.2018.01.009.

[20] TODD L, PALAZZO I, SUAREZ L, *et al*. Reactive microglia and IL1β/IL-1R1-signaling mediate neuroprotection in excitotoxin-damaged mouse Retina[J]. J Neuroinflam, 2019, 16(1): 118. DOI: 10.1186/s12974-019-1505-5.

[21] MCKENZIE B A, MAMIK M K, SAITO L B, *et al*. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(26): E6065-E6074. DOI: 10.1073/pnas.1722041115.

[22] TEZEL G. Molecular regulation of neuroinflammation in glaucoma: current knowledge and the ongoing search for new treatment targets[J]. Prog Retin Eye Res, 2021: 100998. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.100998.

[23] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, *et al*. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665. DOI: 10.1038/nature15514.

[24] LIU X, ZHANG Z B, RUAN J B, *et al*. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153-158. DOI: 10.1038/nature18629.

[25] YE J, ZHANG R N, WU F, *et al*. Non-apoptotic cell death in malignant tumor cells and natural compounds[J]. Cancer Lett, 2018, 420: 210-227. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.061.

[26] DE GASSART A, MARTINON F. Pyroptosis: caspase-11 unlocks the gates of death[J]. Immunity, 2015, 43(5): 835-837. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.10.024.

[27] POH L, KANG S W, BAIK S H, *et al*. Evidence that NLRC4 inflammasome mediates apoptotic and pyroptotic microglial death following ischemic stroke[J]. Brain Behav Immun, 2019, 75: 34-47. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.09.001.

[28] SILVERMAN S M, WONG W T. Microglia in the retina: roles in development, maturity, and disease[J]. Annu Rev Vis Sci, 2018, 4: 45-77.

[29] HONG P, GU R N, LI F X, *et al*. NLRP3 inflammasome as a potential treatment in ischemic stroke concomitant with diabetes[J]. J Neuroinflam, 2019, 16(1): 121. DOI: 10.1186/s12974-019-1498-0.

[30] ANTTILA J E, WHITAKER K W, WIRES E S, *et al*. Role of microglia in ischemic focal stroke and recovery: focus on Toll-like receptors[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017, 79(Pt A): 3-14. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.07.003.

(**收稿**:2022-02-26;**修回**:2022-03-01)

(编辑 张 维)