

综述

谷氨酸受体在实验性青光眼视网膜细胞损伤中的作用

王中峰*, 杨雄里

复旦大学脑科学研究院, 神经生物学研究所, 上海市视觉损害与重建重点实验室, 医学神经生物学国家重点实验室, 脑科学协同创新中心, 上海 200032

摘要: 青光眼是第二大致盲性眼病, 为不可逆致盲的最主要原因。视网膜神经节细胞损伤和死亡是青光眼所致视功能损害的根本原因。在青光眼视神经损伤的众多病理过程中, 谷氨酸受体功能的改变是导致神经节细胞凋亡的重要因素。本课题组在大鼠慢性高眼压实验性青光眼模型上, 围绕这一主题开展了一系列研究。研究表明, 一方面, 高眼压导致的众多信号变化通过直接调控谷氨酸的NMDA和AMPA受体功能参与神经节细胞的凋亡过程; 另一方面, 高眼压导致的细胞外谷氨酸集聚激活Müller细胞上的I型代谢型谷氨酸受体(group I metabotropic glutamate receptors, mGluR I), 经下调细胞膜的Kir4.1钾通道引发Müller细胞的胶质化激活, 进而导致神经节细胞的凋亡。结合这些结果, 本文综述了有关谷氨酸受体在实验性青光眼视网膜细胞损伤中的作用及机制的若干研究进展。

关键词: 青光眼; 视网膜; Müller细胞; 胶质化激活; 神经节细胞凋亡

中图分类号: R339.14+6; R775.9

Glutamate receptor-mediated retinal neuronal injury in experimental glaucoma

WANG Zhong-Feng*, YANG Xiong-Li

Institutes of Brain Science, Institute of Neurobiology, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Key Laboratory of Visual Impairment and Restoration, Collaborative Innovation Center for Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Glaucoma, the second leading cause of blindness, is a neurodegenerative disease characterized by optic nerve degeneration related to apoptotic death of retinal ganglion cells (RGCs). In the pathogenesis of RGC death following the onset of glaucoma, functional changes of glutamate receptors are commonly regarded as important risk factors. During the past several years, we have explored the mechanisms underlying RGC apoptosis and retinal Müller cell reactivation (gliosis) in a rat chronic ocular hypertension (COH) model. We demonstrated that elevated intraocular pressure in COH rats may induce changes of various signaling pathways, which are involved in RGC apoptosis by modulating glutamate NMDA and AMPA receptors. Moreover, we also demonstrated that over-activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR I) by excessive extracellular glutamate in COH rats could contribute to Müller cell gliosis by suppressing Kir4.1 channels. In this review, incorporating our results, we discuss glutamate receptor-mediated RGC apoptosis and Müller cell gliosis in experimental glaucoma.

Key words: glaucoma; retina; Müller cells; gliosis; retinal ganglion cell apoptosis

1 引言

位居不可逆致盲性眼病第二位的青光眼, 以视神经乳头病变、神经节细胞数目减少和视野缺失为

特征, 眼内压增高是其最重要的致病因素之一^[1-3]。随着我国人均寿命的延长, 青光眼的发病率逐年增加。在我国部分地区, 50岁以上的老年人群中, 原发性青光眼患病率高达2.07%~3.8%^[4, 5]。由于青光

Received 2016-02-02 Accepted 2016-03-29

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31070966, 31271173, 31470054, 81430007).

*Corresponding author. Tel: +86-21-54237810; Fax: +86-21-54237643; E-mail: zfwang@fudan.edu.cn

眼造成的视功能损伤是不可逆的, 后果极其严重, 对个人、家庭和社会造成了难以估计的痛苦和损失。青光眼所致的视功能损害, 视网膜神经节细胞损伤和死亡是其根本原因。在青光眼众多的病理过程中, 细胞外过量集聚的谷氨酸所产生的兴奋性毒性 (excitotoxicity) 作用得到大多数实验室的认可, 即: 谷氨酸激活神经节细胞的 *N*-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体, 引发钙离子的大量内流, 导致胞内钙超载, 通过一系列的胞内级联反应, 最终引起细胞凋亡或死亡, 从而导致青光眼视神经损害^[3, 6]。青光眼视网膜神经节细胞损伤与其它的慢性神经退行性疾病, 如阿尔茨海默病和帕金森病等有许多相似的病理过程, 因此, 也常把青光眼视神经细胞损伤归属于慢性神经退行性疾病^[7]。有效保护和恢复青光眼的视网膜视神经功能, 即视神经保护 (optic neuroprotection), 是视觉神经科学亟待解决的问题之一。目前, 临床治疗青光眼的主要手段是降低眼内压^[8], 在此基础上, 针对青光眼具有慢性神经退行性疾病的特点, 利用钙通道阻断剂、NMDA 受体拮抗剂、抗氧化剂、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 合酶抑制剂和神经营养因子等, 从不同环节发挥神经保护作用。然而, 与其它慢性神经退行性疾病相似, 青光眼视网膜神经节细胞损伤的确切机制还不十分清楚, 进一步探索青光眼神经节细胞死亡的机制和寻找新的治疗手段仍是该领域的努力方向。本文综述了近年来有关谷氨酸受体在实验性青光眼视网膜细胞损伤中的作用及机制的若干研究进展。

2 谷氨酸受体在视网膜神经节细胞损伤中的作用

2.1 谷氨酸在实验性青光眼视网膜细胞外的累积

作为一种主要的兴奋性神经递质, 谷氨酸广泛分布于中枢神经系统 (包括视网膜), 通过与突触后神经元细胞膜上的离子型谷氨酸受体 [包括 NMDA, AMPA 和红藻氨酸 (Kainic acid, KA) 受体] 结合, 介导兴奋性突触传递; 或是激活与膜内 G 蛋白耦联的代谢型谷氨酸受体, 从而调节胞内第二信使信号系统, 产生较缓慢的生理效应。同时, 分布于神经元或胶质细胞膜上的谷氨酸转运体会及时地清除多余的谷氨酸, 从而精确调控它在突触间隙中的浓度。在缺血缺氧等应激条件下, 谷氨酸因释放过多或清除不足而过多或长时间地留存于突触间隙, 持续激活突触后膜上的离子通道, 促发胞外

Ca²⁺ 的大量内流, 引发突触后神经元的钙超载, 从而激活复杂的核酸酶、蛋白酶、磷脂酶信号途径, 生成氧自由基和一些中介物质, 导致 DNA 亚硝基化和片段化, 并最终导致神经元的凋亡, 这即是谷氨酸所介导的兴奋性毒性作用。

有关青光眼病理中神经节细胞凋亡的机制, 最受关注的就是谷氨酸诱导的兴奋性毒性作用。1996 年 Dreyer 等首次报道, 青光眼患者以及实验性青光眼猕猴玻璃体中谷氨酸浓度是增高的^[9]。随后, Brooks 等在狗的青光眼模型上重复了这一发现^[10]。但此后也有不少学者报道在青光眼患者和实验性青光眼猕猴的玻璃体中谷氨酸浓度并没有显著增高^[11–13]。关于谷氨酸在青光眼病理中所起的作用之所以存在一定的分歧, 其中一个重要原因就是尚无可靠的技术手段精确测定在体视网膜谷氨酸的浓度。然而, 在实验性青光眼动物模型, 形态学和电生理实验研究均发现, 随着眼内压的增高, 视网膜胶质细胞上的谷氨酸转运体功能降低, 这将导致细胞对谷氨酸的清除障碍, 进而使谷氨酸在细胞外累积^[14–17]; 而且, 谷氨酸受体参与青光眼视网膜神经节细胞损伤也得到实验的验证。Novelli 和 Choi 等报道, 谷氨酸通过其受体发挥对神经节细胞的兴奋性毒性作用, 而 NMDA 受体阻断剂对实验性青光眼大鼠视网膜神经节细胞有保护作用^[18, 19]。此后, NMDA 受体及其亚基 NR2A、NR2B 在青光眼病理中的作用, 以及各种不同的 NMDA 受体阻断剂对青光眼进程可能的影响, 日渐引起人们的兴趣。例如, NMDA 受体的阻断剂 MK-801 或 memantine 可有效减少急、慢性青光眼动物视网膜神经节细胞的凋亡^[20–24]。曾有报道, 选择性 NR2B 亚基拮抗剂 ifenprodil, 甚至在眼压增高之后注射, 也可减少神经节细胞的凋亡^[20]。这些工作提示, NMDA 受体亚基的表达及通道活性的改变是青光眼神经节细胞损伤的重要机制之一。

2.2 调控 NMDA 受体在实验性青光眼视网膜神经节细胞损伤中的作用

Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) 是细胞周期素依赖蛋白激酶家族的一个特殊成员, 在中枢神经系统发育和神经退行性疾病中有重要作用^[25]。Cdk5 及其辅酶 p35 在视网膜也有广泛的分布。本研究组的研究结果显示, 在大鼠慢性眼内压增高青光眼模型, 伴随眼内压的增高, Cdk5/p35 表达显著上调, 同时, NR2A 和丝氨酸 1 232 位点磷酸化的 NR2A

(p-NR2A^{S1232}) 蛋白水平上调, 且在时程上和 Cdk5 相一致, 也与神经节细胞凋亡的变化一致, 进而免疫共沉淀方法确认了 Cdk5 与 p-NR2A^{S1232} 之间有直接的相互作用。对高眼压术后大鼠腹腔注射 Cdk5 的抑制剂 roscovitine, 可显著减少神经节细胞 TUNEL 阳性信号数量, 表明神经节细胞凋亡减少; 同时可显著增加在上丘注射霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin subunit B, CTB) 逆行标记的神经节细胞数目, 表明 roscovitine 改善了高眼压导致的视神经损伤。尽管 roscovitine 注射后大鼠视网膜组织中 Cdk5 和 NR2A 的表达没有明显变化, 但 p35 和 p-NR2A^{S1232} 的表达量以及 p-NR2A^{S1232}/NR2A 的比率都明显降低。这些结果表明, Cdk5/p35 对 NR2A 特定丝氨酸位点磷酸化的异常调节, 参与了慢性眼压增高所致的视网膜神经节细胞的凋亡^[26]。在培养的视网膜细胞上, 我们进一步证实了 Cdk5/p-NR2A^{S1232} 在视网膜神经节细胞凋亡中的作用。用谷氨酸处理培养的视网膜细胞可降低活细胞的数目, 诱导细胞凋亡, Cdk5 和 p-Cdk5^{T15} 蛋白水平同步显著升高, 说明 Cdk5 的活性增强; 而 roscovitine 可逆转活细胞数目和凋亡的变化。此外, 谷氨酸处理使 Cdk5 的上游分子 calpain 2、SBDPs (calpain-specific alpha-spectrin breakdown products) 和 p35 蛋白水平升高, p-NR2A^{S1232}/NR2A 比值显著增高。p-NR2A^{S1232} 蛋白水平升高可被 roscovitine 抑制, 但可被过表达 Cdk5 增强。这些结果表明, calpain/p35-p25/Cdk5 信号通路激活通过上调 p-NR2A^{S1232} 参与视网膜谷氨酸神经毒性作用^[27]。此外, 在遗传性慢性自发高眼压的 DBA/2J 小鼠青光眼动物模型上, 本研究组的研究结果显示, 从出生后第 6 个月开始, 随月龄增加, NMDA 受体的 NR2B 亚单位表达和年龄相匹配的 C57BL/6 小鼠相比显著增强, 然而, Cdk5、p35 蛋白水平和 p-NR2A^{S1232}/NR2A 比值在两组动物均随月龄增加而增高, 但两组动物之间没有显著差异, 说明 Cdk5/p35 信号在老龄小鼠视网膜被激活, 而 NR2B 的表达增强可能参与了 DBA/2J 小鼠视网膜神经节细胞的退行性变化^[28]。

2.3 调控 AMPA 受体在实验性青光眼视网膜神经节细胞损伤中的作用

除了 NMDA 受体外, 谷氨酸 APMA 受体亚型也参与实验性青光眼神经节细胞的损伤。本研究组最近的结果显示, 促红细胞生成素产生肝细胞受体 (erythropoietin-producing hepatocyte receptor, Eph 受

体) 信号通过调控 AMPA 受体诱导视网膜神经节细胞的凋亡^[29]。Eph 受体属已知的最大的受体酪氨酸激酶家族^[30], 包含 16 个结构上相关的跨膜酪氨酸激酶。根据它们结合配体的不同, 可分为 EphA 受体 (EphA1~EphA10) 和 EphB 受体 (EphB1~EphB6), 相应的配体为 ephrinA (ephrinA1~5) 和 ephrinB (ephrinB1~3)。该信号系统的特点之一是, EphB 类受体和配体之间的相互作用表现为双向性, 除了配体可以激活受体导致受体的酪氨酸磷酸化 (正向信号传递) 以外, 配体也会被受体激活, 从而发生酪氨酸残基的磷酸化 (反向信号传递)^[31, 32]; 其另一特点是 Eph 受体和配体的表达呈现一种交互表达的模式 (reciprocal expression pattern), 即受体和配体分别表达在相邻的细胞上, 这种分布模式保证了在一个小的范围内只有一小部分的受体可以被激活。此外, 在同一细胞也可以同时表达相同亚型的受体和配体^[32]。Eph 受体及其配体在神经系统的发育、突触可塑性、神经再生和修复等过程中发挥重要作用。近年来的研究表明, ephrin/Eph 信号系统也与机体多个系统的多种疾病发生密切相关^[32]。在实验性青光眼小鼠模型中, 原位杂交和 RT-PCR 实验结果表明, 术后早期 (1~2 天) EphB2, EphB3 和 ephrinB3 的 mRNA 在视神经乳头部位即开始显著上调, 并保持在高水平至少 3 周; ephrinB 反向信号在视神经乳头轴突、小胶质细胞和部分星形胶质细胞上瞬时增加^[33]。这些结果与在慢性自发高眼压 DBA/2J 小鼠、灵长类和人的青光眼组织上观察的结果一致^[34, 35]。此外, 在 DBA/2J 小鼠视神经乳头部位施加 EphB2 受体可溶性蛋白片断 (EphB2-Fc), 可导致单个神经节细胞轴突内 Ca²⁺ 升高^[34]。这些结果提示, 视神经乳头 ephrin/Eph 信号的上调在青光眼的进程中有重要作用, 而 ephrinB 反向信号在神经节细胞轴突的瞬时增加提示其参与神经节细胞轴突的损害^[36]。然而, 同一实验室随后在 EphB2^{-/-} 和 EphB3^{-/-} 小鼠建立的实验性青光眼模型上的研究显示, 与野生型小鼠相比, EphB2^{-/-} 和 EphB3^{-/-} 小鼠的视神经呈现更严重的轴突退行性病变, 而外源性施加 EphB2-Fc 则提高神经节细胞轴突的存活, 这提示激活 ephrinB/EphB 正向和反向信号可减轻青光眼导致的神经节轴突损害, 从而起到保护视神经的作用^[36]。这些矛盾的结果说明, 有关 ephrinB/EphB 信号在青光眼视网膜神经节细胞损伤中的作用及其机制还有待阐明。本研究组在大鼠慢性高眼压模型

上的研究显示, EphB1 和 ephrinB2 蛋白表达在视网膜明显增多, EphB1 的变化主要发生在 Müller 细胞, 而 ephrinB2 的变化则在 Müller 细胞和神经节细胞上, 且 EphB1 的升高早于 ephrinB2, 提示神经节细胞 EphB/ephrinB 反向信号的激活。玻璃体内注射 EphB2-Fc 激活 EphB/ephrinB 反向信号, 导致正常大鼠视网膜神经节细胞的凋亡, 其机制是通过 src 酪氨酸激酶途径使 GluA2 磷酸化, 进而使神经节细胞膜上含有 GluA2 亚单位的 AMPA 受体数量减少, 钙通透性增加。而玻璃体内注射 src 酪氨酸激酶抑制剂 PP2, 则可以通过抑制 GluA2 磷酸化, 逆转神经节细胞膜上 GluA2 的减少, 从而减弱由注射 EphB2-Fc 和高眼压引起的神经节细胞凋亡。这些结果提示, EphB/ephrinB 反向信号的激活引起 AMPA 受体 GluA2 的下膜, 参与慢性高眼压视网膜神经节细胞的损伤^[29](图 1)。此外, 另有报道, 慢

性高眼压大鼠 Müller 细胞和小胶质细胞肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF α) 表达显著升高, 抑制 TNF α 信号可有效保护神经节细胞, 其机制是高眼压导致的 TNF α 升高诱导 GluA2 的下调, 进而上调 Ca^{2+} - 通透的 AMPA 受体在细胞膜上的表达, 导致神经节细胞的损伤^[37]。这些研究结果提示, 在青光眼的病理过程中, 众多的因素可以通过调控 NMDA 和 / 或 APMA 受体的功能, 参与神经节细胞的凋亡。

3 谷氨酸受体在视网膜Müller胶质细胞激活中的作用

胶质细胞是神经系统重要的组成部分, 视网膜的胶质细胞主要包括 Müller 胶质细胞、星形胶质细胞及小胶质细胞。Müller 细胞是脊椎动物视网膜最主要的一类胶质细胞, 它取代了中枢神经系统中的

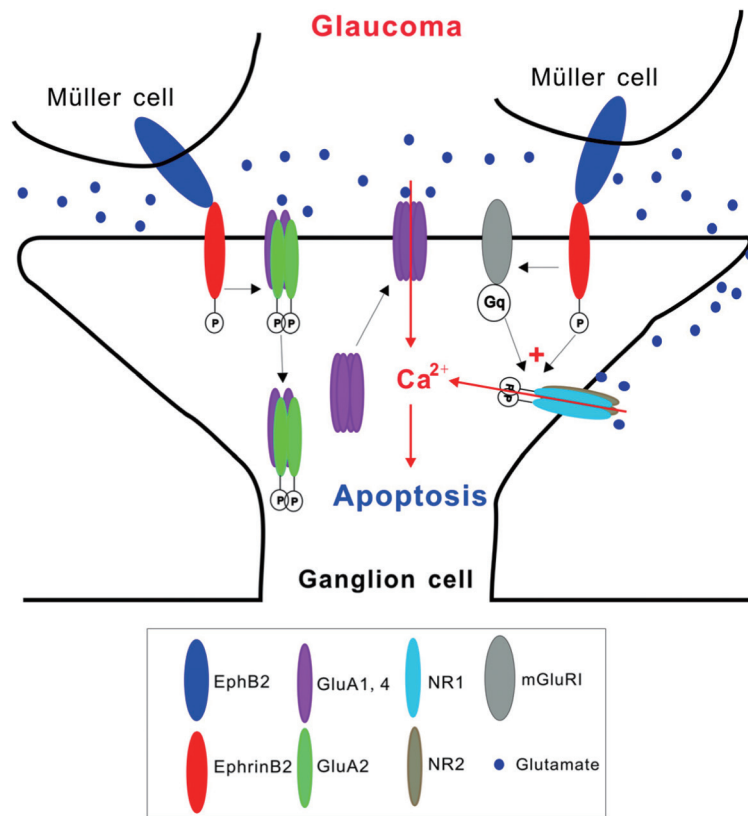


图 1. EphB/ephrinB反向信号激活参与慢性高眼压视网膜神经节细胞凋亡的机制

Fig. 1. Activated EphB/ephrinB reverse signaling is involved in retinal ganglion cell apoptosis in a chronic ocular hypertension experimental glaucomatous model. Elevation of intraocular pressure induces activation of EphB/ephrinB reverse signaling in retinal ganglion cells, which increases protein levels of phosphorylated GluA2 (p-GluA2). Phosphorylation of GluA2 results in GluA2 endocytosis and downregulation of GluA2-containing AMPA receptors on the surface of the cells, thus increasing Ca^{2+} influx and contributing to retinal ganglion cell apoptosis. In addition, activated EphB/ephrinB reverse signaling may also interact with NMDA receptors, thus involving in retinal ganglion cell apoptosis. This figure is drawn depending upon the results in paper of Dong *et al*^[29].

少突胶质细胞、室管膜细胞, 及大部分星形胶质细胞的功能^[38]。Müller细胞呈放射状, 贯穿整个视网膜, 胞体位于内核层, 主干向内侧延伸至内界膜膨大为终足, 向外延伸至光感受器层, 主干分出侧枝突起包绕视网膜血管, 再分出次级突起包绕神经元胞体、树突及神经节细胞轴突, 在解剖和功能上与视网膜各层神经元的胞体和突起广泛接触。同时, Müller胶质细胞也表达许多神经递质的受体、转运体和离子通道等^[39, 40]。因此, Müller细胞在视网膜正常形态、功能的维持, 以及与神经元之间的信息交换和相互作用中起着极其重要的作用^[40, 41]。

3.1 实验性青光眼视网膜Müller细胞的激活

胶质细胞的激活 (reactivation, gliosis) 在中枢神经系统损伤和疾病病理过程中的作用日益受到重视, 目前的研究证实, 几乎所有的中枢神经系统 (包括视网膜) 损伤和疾病都伴随有胶质细胞的激活 (或活化)^[40, 42, 43]。胶质细胞激活是指细胞由成熟状态转化为非成熟的分化状态, 其作用包括两个方面, 一方面, 是细胞对损伤所做出的急性反应, 通过释放神经营养因子和抗氧化物质, 以及摄取胞外集聚的谷氨酸等, 从而阻止神经元的进一步损伤, 促进神经轴突的再生和突触重塑^[44-46]。但这一过程取决于损伤的严重程度, 有时候很短暂, 稍纵即逝。另一方面, 激活的胶质细胞也可释放多种细胞毒性因子, 如 NO、TNF α 、氧自由基 (ROS) 及前列腺素 (prostaglandin E₂, PGE₂) 等^[47-50], 这些细胞因子作用于神经细胞, 诱发其凋亡或死亡。同时, 过度激活的胶质细胞可形成胶质瘢痕, 阻止轴突的再生和神经生长^[51, 52]。

有关 Müller细胞在视网膜损伤和疾病病理过程中的功能变化已有众多的研究^[39, 40, 43]。而关于 Müller细胞激活的研究, 主要可以概括为以下几个方面: (1) 几乎所有的视网膜损伤和疾病的早期反应标志是胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP)、波形蛋白 (vimentin) 和巢蛋白 (nestin) 的表达上调, 其中 GFAP 是细胞激活最敏感的指标^[53-57], 另一非特异性的细胞反应是 ERK1/2 的激活^[58, 59]; (2) 细胞膜钾电导降低, 如视网膜脱离、缺血-再灌注损伤和糖尿病视网膜病变等都伴有内向整流钾通道 (Kir) 的表达下调, 尤其是 Kir4.1 介导的膜电流的降低^[56, 57, 60-62]。因为胶质细胞和神经元之间的功能联系需要胶质细胞维持相对负的膜电位 (-80 mV 左右), Kir 电流的下调将导致 Müller细胞去极化 (约

-40 mV), 使其维持细胞内外 K⁺ 和水的平衡功能发生障碍, 从而严重影响视网膜的功能。(3) 细胞膜的去极化将激活多种膜离子通道, 如钠通道、钙通道、大电导钙激活钾通道 (BK) 和通透钙的 P2X₇ 受体通道等^[63-67]。钠通道的激活将进一步使细胞去极化, 钙通道和 P2X₇ 的激活增加了胞内钙浓度, 这可能是 Müller细胞激活的重要因素。BK 通道的激活驱使膜电位超极化, 从而反馈调制钙通道的活动。

在研究青光眼视网膜细胞损伤机制的过程中, 通过多种手段阻断巩膜静脉血流导致的眼内压增高是最常用的动物模型之一^[26, 29, 56, 68]。尽管慢性眼内压增高青光眼模型伴随有视网膜缺血性损伤, 但其损伤机制和视网膜缺血又有所不同。在实验性青光眼大鼠模型中, 视网膜 Müller细胞 GFAP 表达显著增高, 提示细胞的激活^[26, 29, 69]。本研究组的研究结果表明, 通过结扎巩膜上静脉制备的大鼠慢性高眼压模型, 随着眼内压的增高, 视网膜 Müller细胞 GFAP 表达逐渐增强^[29, 56]。通过激光烧灼小梁网制备的大鼠急性高眼压模型, 在眼内压增高的 12 h 内 GFAP 就开始在 Müller细胞终足表达增多, 这种表达增多在 2 周内延伸至外层视网膜^[70]。在高眼压小鼠模型和遗传性自发高眼压青光眼的 DBA/2J 小鼠也发现 GFAP 表达的增加^[71, 72]。与此相一致, 在青光眼患者的视网膜切片上也观察到 GFAP 表达的增强^[73]。这些研究结果表明, Müller细胞的激活是青光眼视网膜的特征病理变化之一。

3.2 谷氨酸受体在实验性青光眼视网膜Müller细胞的激活中的作用

如上所述, 尽管研究发现青光眼视网膜 Müller细胞被激活, 但有关 Müller细胞激活的机制还有许多问题没有阐明。钾通道的抑制可能是青光眼视网膜损伤时 Müller细胞激活的共同特点。例如, 在继发性青光眼患者的视网膜上发现 Müller细胞的 Kir 电流降低^[60]。本研究组在慢性高眼压大鼠模型上的研究结果也显示, Müller细胞 Kir 电流下调 (主要是弱整流特性的 Kir4.1 电流)。Kir 电流幅度自高眼压手术后 1 天开始明显减小, 在我们观察的眼内压升高的 6 周时间内, 电流幅度显著降低。免疫组化双标和 Western blot 实验结果表明, Müller细胞的 Kir4.1 蛋白表达随眼内压增高而持续降低, 和 Kir 电流的变化一致^[56]。然而, 自发高眼压 DBA/2J 小鼠则表现出不同的特征, 尽管 GFAP 表达随眼压升高而增加, 但钾电流没有明显的改变^[74], 其原因之

一可能是, Kir 电流的变化与细胞胶质化的程度有密切关系, 也就是说, Müller 细胞增殖性变化会伴随 Kir 电流的显著下调, 而非增殖性变化或许其 Kir 电流没有显著改变。DBA/2J 小鼠视网膜 Müller 细胞的胶质化激活是非增殖性, 所以没有观察到 Kir 电流及蛋白表达的明显下调。接下来的问题是眼内压增高通过什么途径引起 Kir 电流的下调? 如上所述, 大多数实验室的结果表明, 由于谷氨酸转运体的下调导致细胞外谷氨酸集聚, 进而参与视网膜神经元的损伤^[14-17]。尽管有研究显示在人的视网膜 Müller 细胞上激活 NMDA 受体通过增加胞内钙抑制 Kir 电流^[75], 但此后更多的研究显示, 谷氨酸在哺乳动物视网膜 Müller 细胞上不能诱导明显的胞内钙增加^[76-78]。这些结果提示, 离子型谷氨酸受体的激活在 Kir 电流的下调中可能不起主要作用。因此, 我们推测谷氨酸可能通过激活代谢型谷氨酸受体从而下调 Kir 电流。与此一致, 本研究组进一步的研究结果显示, I 型代谢型谷氨酸受体 (group I metabotropic glutamate receptors, mGluR I) 激动剂 DHPG 可压抑 Müller 细胞的 Kir 电流, 其作用是通过激活

mGluR I 的 5 亚型 (mGluR5), 经胞内 Ca²⁺- 依赖的 PI-PLC/IP₃-ryanodine/PKC 信号通路实现的。眼玻璃体腔注射 DHPG 诱导的 Müller 细胞 GFAP 变化与慢性高眼压相似, 且两者均可被 mGluR5 的特异拮抗剂 MPEP 所阻断。用 Ba²⁺ 预先阻断 Kir 通道, DHPG 诱导的 Müller 细胞 GFAP 表达增加也不再出现^[56] (图 2)。在纯化培养的大鼠视网膜 Müller 细胞上, 我们观察到 DHPG 处理确实可诱导细胞的激活 (GFAP 表达增加), 同时细胞膜上的 Kir4.1 蛋白表达降低; RT-PCR 结果显示 Kir4.1 RNA 下调, 进一步证实 mGluR I 在 Müller 细胞激活中的作用^[57], 也为深入研究 Müller 细胞激活的机制奠定了细胞学基础。Kir 电流的下调, 导致细胞膜去极化, 通过影响离子和水的动态平衡及神经递质的循环利用, 使胶质细胞 - 神经元之间的“通讯”障碍, 最终促进神经元的凋亡。

4 结语

综上所述, 在实验性青光眼视神经损伤的病理过程中, 视网膜胞外集聚的谷氨酸通过激活胶质细

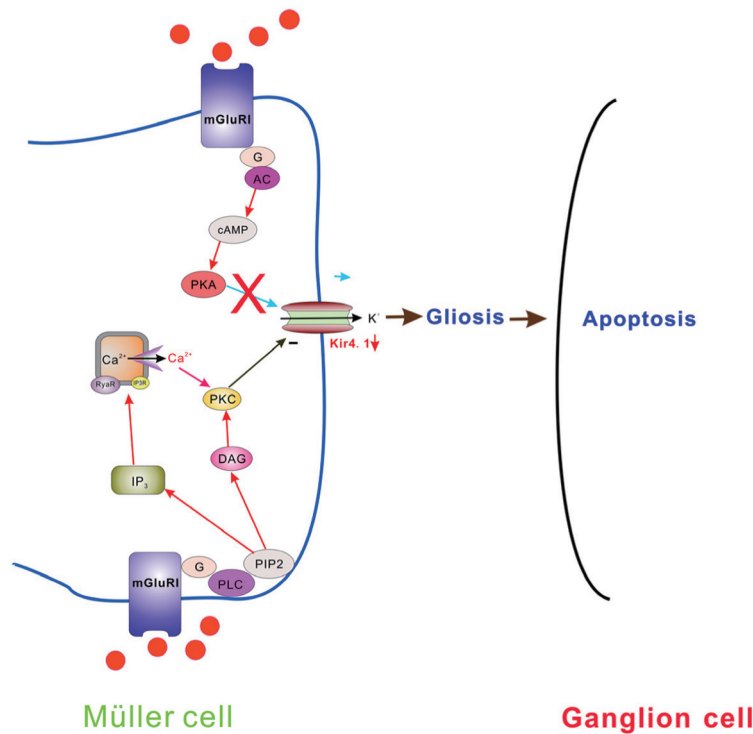


图 2. 慢性高眼压大鼠模型视网膜Müller细胞激活的胞内信号通路

Fig. 2. The intracellular signaling pathway for retinal Müller cell gliosis in a rat chronic ocular hypertension model. The over-activation of mGluR I by excessive extracellular glutamate induces a robust retinal Müller cell gliosis, which is mediated by downregulating Kir4.1 currents via intracellular Ca²⁺-dependent PLC/IP₃-RyaR/PKC signaling pathway, but the cAMP-PKA pathway was not involved. This figure is drawn depending upon the results in paper of Ji *et al*^[56].

胞的代谢型谷氨酸受体, 参与胶质细胞的激活, 进而导致神经节细胞损伤; 同时, 青光眼视网膜改变的众多信号, 通过直接调控谷氨酸的 NMDA 和 AMPA 受体功能参与神经节细胞的凋亡。尽管人们对青光眼视网膜细胞损伤的机制有了一定程度的了解, 对谷氨酸受体在其中的作用及其机制的研究向前推进了一步, 但仍然有许多问题值得进一步深入研究。如 Kir 通道下调的分子机制是什么? Kir 通道下调通过什么机制引起 GFAP 的上调? 青光眼激活的信号系统除了引起 NMDA 和 AMPA 受体的功能发生改变外, 是否还有其它的机制参与其中? 随着对视网膜细胞功能研究的不断深入, 可能为研究者深入探索这些问题提供新的思路。

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: 262–267.
- 2 Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 2004; 363: 1711–1720.
- 3 Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol* 2007; 42: 278–287.
- 4 He M, Foster PJ, Ge J, Huang W, Zheng Y, Friedman DS, Lee PS, Khaw PT. Prevalence and clinical characteristics of glaucoma in adult Chinese: a population-based study in Liwan District, Guangzhou. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2782–2788.
- 5 Sun XY (孙兴怀). Characteristics of common glaucoma in the elderly. *Prac Geriatr (实用老年医学)* 2008; 22: 326–329 (in Chinese).
- 6 Ge J (葛坚). Research progress and development trend of glaucoma. *Chin J Ophthalmol (中华眼科杂志)* 2000; 36: 192–196 (in Chinese).
- 7 Gupta N, Yücel YH. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 110–114.
- 8 Heijl A, Leske MC, Bengtsson B. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1268–1279.
- 9 Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 299–305.
- 10 Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; 58: 864–867.
- 11 Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, Khanna CL, Weaver YK, Narkiewicz J, Waziri R, Gehrs KM, Weingeist TA, Boldt HC, Folk JC, Russell SR, Kwon YH. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 183–188.
- 12 Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D. Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *J Glaucoma* 2002; 11: 396–405.
- 13 Wamsley S, Gabelt BT, Dahl DB, Case GL, Sherwood RW, May CA, Hernandez MR, Kaufman PL. Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 64–70.
- 14 Salt TE, Cordeiro MF. Glutamate excitotoxicity in glaucoma: throwing the baby out with the bathwater? *Eye* 2006; 20: 730–731.
- 15 Seki M, Lipton SA. Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 2008; 173: 495–510.
- 16 Martin KR, Levkovitch-Verbin H, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Quigley HA. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2236–2243.
- 17 Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, Quinto K, Zurakowski D, Gochenauer G, Robinson MB, Mackler SA, Dreyer EB. Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3615–3621.
- 18 Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 1988; 451: 205–212.
- 19 Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7: 369–379.
- 20 Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 626–633.
- 21 Chaudhary P, Ahmed F, Sharma SC. MK801-a neuroprotectant in rat hypertensive eyes. *Brain Res* 1998; 792: 154–158.
- 22 Hare WA, WoldeMussie E, Weinreb RN, Ton H, Ruiz G, Wijono M et al. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2640–2651.
- 23 Hare WA, WoldeMussie E, Lai RK, Ton H, Ruiz G, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for

- reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2625–2639.
- 24 Greenfield DS, Girkin C, Kwon YH. Memantine and progressive glaucoma. *J Glaucoma* 2005; 14: 84–86.
- 25 Chen J (陈洁), Wang ZF. Roles of cyclin-dependent kinase 5 in central nervous system development and neurodegenerative diseases. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2010; 62: 295–308 (in Chinese with English abstract).
- 26 Chen J, Miao Y, Wang XH, Wang Z. Elevation of p-NR2AS1232 by Cdk5/p35 contributes to retinal ganglion cell apoptosis in a rat experimental glaucoma model. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 455–464.
- 27 Miao Y, Dong LD, Chen J, Hu XC, Yang XL, Wang Z. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *PLoS One* 2012; 7: e42318.
- 28 Dong LD, Chen J, Li F, Gao F, Wu J, Miao Y, Wang Z. Enhanced expression of NR2B subunits of NMDA receptors in the inherited glaucomatous DBA/2J mouse retina. *Neural Plast* 2013; 2013: 670254.
- 29 Dong LD, Gao F, Wang XH, Miao Y, Wang SY, Wu Y, Li F, Wu J, Cheng XL, Sun XH, Yang XL, Wang Z. GluA2 trafficking is involved in apoptosis of retinal ganglion cells induced by activation of EphB/EphrinB reverse signaling in a rat chronic ocular hypertension model. *J Neurosci* 2015; 35: 5409–5421.
- 30 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The proteinkinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298: 1912–1934.
- 31 Murai KK, Pasquale EB. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 2004; 10: 304–314.
- 32 Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008; 133: 38–52.
- 33 Fu CT, Tran T, Sretavan D. Axonal/glial upregulation of EphB/ephrin-B signaling in mouse experimental ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 991–1001.
- 34 Du J, Tran T, Fu C, Sretavan DW. Upregulation of EphB2 and ephrin-B2 at the optic nerve head of DBA/2J glaucomatous mice coincides with axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 5567–5581.
- 35 Schmidt J, Agapova OA, Yang P, Kaufman PL, Hernandez MR. Expression of EphrinB1 and its receptor in glaucomatous optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 1219–1294.
- 36 Fu CT, Sretavan D. Involvement of EphB/Ephrin-B signaling in axonal survival in mouse experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 76–84.
- 37 Cueva Vargas JL, Osswald IK, Unsain N, Arousseau MR, Barker PA, Bowie D, Di Polo A. Soluble tumor necrosis factor alpha promotes retinal ganglion cell death in glaucoma via calcium-permeable AMPA receptor activation. *J Neurosci* 2015; 35: 12088–12102.
- 38 Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 1996; 19: 307–312.
- 39 Gao F (高凤), Ji M, Wu JH, Wang ZF. Roles of retinal Müller cells in health and glaucoma. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2013; 65: 654–663 (in Chinese with English abstract).
- 40 Bringmann A, Landiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Widemann P, Osborne NN, Reichenbach A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retinal Eys Res* 2009; 28: 423–451.
- 41 Newman EA. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 2004; 47: 268–274.
- 42 Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 2005; 11: 400–407.
- 43 Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Widemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the health and diseased retina. *Prog Retinal Eye Res* 2006; 25: 397–424.
- 44 Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004; 89: 1092–1100.
- 45 Privat A. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia* 2003; 43: 91–93.
- 46 Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1149–1163.
- 47 Goureau O, Regnier-Ricard F, Courtois Y. Requirement for nitric oxide in retinal neuronal cell death induced by activated Müller glial cells. *J Neurochem* 1999; 72: 2506–2515.
- 48 Kashiwagi K, Lizuka Y, Araie M, Suzuki K, Tsukahara S. Effects of retinal glial cells on isolated rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2686–2694.
- 49 Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1787–1794.
- 50 Tezel G, Wax MB. Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma. *J Glaucoma* 2003; 12: 63–68.
- 51 Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 1992; 94: 367–379.
- 52 Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2004; 15: 415–436.
- 53 Bignami A, Dahl D. The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp*

- Eye Res 1979; 28: 63–69.
- 54 Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 1321–1328.
- 55 Bringmann A, Reichenbach A. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 2001; 6: E77–E92.
- 56 Ji M, Miao Y, Dong LD, Chen J, Mo XF, Jiang SX, Sun XH, Yang XL, Wang Z. Group I mGluR-mediated inhibition of Kir channels contributes to retinal Müller cell gliosis in a rat chronic ocular hypertension model. *J Neurosci* 2012; 32: 12744–12755.
- 57 Gao F, Li F, Miao Y, Dong LD, Zhang SH, Wu J, Sun XH, Wang Z. Group I metabotropic glutamate receptor agonist DHPG modulates Kir4.1 protein and mRNA in cultured rat retinal Müller cells. *Neurosci Lett* 2015; 588: 12–17.
- 58 Takeda M, Takamiya A, Yoshida A, Kiyama H. Extracellular signal-regulated kinase activation predominantly in Müller cells of retina with endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 907–911.
- 59 Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3025–3033.
- 60 Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Faude F, Wiedemann P, Reichenbach A, Reichelt W. Loss of inwardly rectifying potassium currents by human retinal glial cells in diseases of the eye. *Glia* 1997; 20: 210–218.
- 61 Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Kodal H, Faude F, Reichelt W, Reichenbach A. Role of glial K⁺ channels in outgrowth and gliosis: a hypothesis based upon studies on Müller cells. *Glia* 2000; 29: 35–44.
- 62 Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A. Diabetes alters osmotic swelling and membrane characteristics of glial cells in rat retina. *Diabetes* 2006; 55: 633–639.
- 63 Puro DG, Mano T. Modulation of calcium channels in human retinal glial cells by basic fibroblast growth factor: a possible role in retinal pathobiology. *J Neurosci* 1991; 11: 1873–1880.
- 64 Bringmann A, Biedermann B, Schnurbusch U, Enzmann V, Faude F, Reichenbach A. Age- and disease-related changes of calcium channel-mediated currents in human Müller glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2891–2796.
- 65 Bringmann A, Pannicke T, Moll V, Milenkovic I, Faude F, Enzmann V, Wolf S, Reichenbach A. Upregulation of P2X7 receptor currents in Müller glial cells during proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 860–867.
- 66 Moll V, Weick M, Milenkovic I, Kodal H, Reichenbach A, Bringmann A. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 766–773.
- 67 Yang W (杨薇), Wu HJ, Wang ZF. Changes of Ca²⁺ channel currents in retinal Müller cells in a rat chronic ocular hypertension model. *Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol (中国眼耳鼻喉科杂志)* 2013; 13: 352–356 (in Chinese with English abstract).
- 68 Wu J, Zhang S, Sun X. Neuroprotective effect of upregulated sonic Hedgehog in retinal ganglion cells following chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 2986–2992.
- 69 Wang X, Tay SS, Ng YK. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res* 2000; 132: 476–484.
- 70 Lam TT, Kwong JM, Tso MO. Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 638–645.
- 71 Gallego BJ, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramirez AI, Salinas-Navarro M, Ortin-Martinez A, Valiente-Soriano FJ, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Trivino A, Ramirez JM. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 92.
- 72 Inman DM, Horner PJ. Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia* 2007; 55: 942–956.
- 73 Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1088–1094.
- 74 Bolz S, Schuettauf F, Fries JE, Thaler S, Reichenbach A, Pannicke T. K⁺ currents fail to change in reactive retinal glial cells in a mouse model of glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 1249–1254.
- 75 Puro DG, Yuan JP, Sucher NJ. Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Müller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. *Vis Neurosci* 1996; 13: 319–326.
- 76 Bringmann A, Pannicke T, Weick M, Biedermann B, Uhlmann S, Kohlen L, Wiedemann P, Reichenbach A. Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Müller (glial) cells. *Glia* 2002; 37: 139–152.
- 77 Newman EA. Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci* 2005; 25: 5502–5510.
- 78 Newman EA, Zahs KR. Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 1997; 275: 844–847.