

ATP 与 P2X₇ 受体在 Müller 细胞激活导致视网膜神经节细胞株 RGC-5 凋亡中的作用研究

薛 博¹, 季 敏², 管怀进^{2*}

(¹南京医科大学附属无锡第二人民医院眼科, 江苏 无锡 214000; ²南通大学附属医院眼科研究所, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:探讨 Müller 细胞胶质化激活对 RGC-5 细胞的影响及 ATP 与 P2X₇ 受体在其中的相关作用。方法:纯化培养 Müller 细胞、RGC-5 细胞株,免疫荧光进行细胞鉴定,并观察加入 DHPG 后 Müller 细胞的 GFAP 表达情况。荧光素酶法检测加入 DHPG 后 Müller 细胞外 ATP 的含量变化;DHPG 刺激后的培养液作为条件培养基加入 RGC-5 细胞株 (RGC-5 预先使用 MPEP 及 MPMQ 处理 2 h),TUNEL 法检测 RGC-5 凋亡情况,预先加入 P2X₇ 受体阻断剂亮蓝 G(brilliant blue G, BBG)后检测 RGC-5 的凋亡情况。同时使用 Western blot 检测抗凋亡蛋白及促凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 的变化情况。免疫荧光及 Western blot 检测 RGC-5 上 P2X₇ 受体的表达变化。结果:DHPG 激活 Müller 细胞后可以导致细胞外 ATP 的增加;激活的 Müller 细胞条件培养基(conditioned medium, CM)可以导致 RGC-5 凋亡的明显增加。而 BBG 可以抑制 RGC-5 凋亡的增加,同时 Western blot 也显示与对照组相比 CM 显著降低 RGC-5 细胞上的 Bcl-2 蛋白水平,但增加了 Bax 的蛋白表达,而当预先加入 BBG 后再用 CM 处理则呈现相反的结果。另外 Western blot 及免疫荧光显示加入条件培养基后 RGC-5 细胞的 P2X₇ 受体蛋白表达增加。结论:Müller 细胞的激活可以导致 RGC-5 细胞的凋亡,该现象可能与 Müller 细胞激活引起的 ATP 释放增加及 RGC-5 上 P2X₇ 受体有关。

[关键词] Müller 细胞激活;P2X₇ 受体;ATP;凋亡;RGC-5

[中图分类号] R774.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-182-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20160211

Involvement of P2X₇ receptor and ATP in Müller cell gliosis induced RGC-5 cells apoptosis

Xue Bo¹, Ji Min², Guan Huaijin^{2*}

(¹Department of Ophthalmology, Wuxi Second Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214000; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible involvement of Müller cell gliosis, ATP/ P2X₇ receptors and RGC-5 apoptosis *in vitro*. **Methods:** We cultured and purified rat retinal Müller cells, RGC-5. The concentration of extracellular ATP was quantified by bioluminescence assay. After adding the medium of DHPG-activated Müller cells Medium(conditioned medium /CM) to RGC-5 cells, TUNEL assay and Western blot of anti-and pro-apoptotic proteins were used to observe RGCs apoptosis. Immunofluorescence and Western blot were also used to detect the P2X₇ expression of RGC-5 with CM. **Results:** DHPG induced an increasing ATP release from Müller cells. After adding the CM to RGC-5 cells, TUNEL assay showed a significantly increase RGCs apoptosis while P2X₇ receptor blocker BBG reduced apoptosis of RGCs. Moreover, CM treatment of RGC-5 cells significantly increased Bax protein level and decreased Bcl-2 protein level, which was also mimicked by BzATP and blocked by BBG, respectively. **Conclusion:** The current study suggests that DHPG-activated Müller cells could aggravate RGCs apoptosis, while the release of ATP from Müller cells and the activation of P2X₇ receptor in the RGC-5 might be involved in this process.

[Key words] glaucoma; Müller cell gliosis; ATP; apoptosis; P2X₇ receptor; RGC-5

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 182-188]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81200680)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guanhuajeye@126.com

青光眼是一种视网膜视神经的退行性病变,视网膜神经节细胞(retina ganglion cells, RGCs)的凋亡为基本病理基础,最近的研究显示胶质细胞激活在青光眼的疾病发展过程中也扮演了重要角色。

Müller细胞是视网膜上最主要的胶质细胞,贯穿视网膜全层,过度激活时可以释放有害因子对神经元造成损伤作用^[1]。在面对外界刺激时,Müller细胞可以释放包括ATP在内的胶质递质,已有的研究表明ATP受体P2X₇激活是导致RGC凋亡的重要原因之一^[2]。此外,已有研究证明在纯化培养的大鼠视网膜Müller细胞中,使用DHPG激活谷氨酸I类受体可以在蛋白及mRNA层面下调Kir 4.1,引起Müller细胞激活,故本研究选择DHPG作为体外激活Müller细胞的工具药^[3]。为进一步阐明Müller细胞激活对RGC可能产生的损伤作用及ATP和P2X₇受体是否参与这一过程,进行如下研究。

1 材料和方法

1.1 材料

使用出生后1、3 d红皮鼠(南通大学实验动物中心提供)。红皮鼠用于Müller细胞培养,实验过程中尽量减轻实验动物的痛苦,符合ARVO声明中对实验动物的使用要求。RGC-5细胞株(ATCC公司,美国);小鼠抗GS多抗,小鼠抗Bax单抗,小鼠抗Bcl-2单抗(Santa Cruz公司,美国)小鼠抗GFAP单抗,兔抗鼠 β -actin(Sigma-Aldrich公司,美国),小鼠抗P2X₇单抗(Alomone Labs公司,以色列),辣根过氧化物酶HRP标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(Thermo Scientific公司,美国),TUNEL试剂盒(Roche公司,瑞士),ATP生物荧光法试剂盒(Biotek公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代Müller细胞及RGC-5细胞株的培养

Müller细胞培养:取出生3 d的清洁级SD(Sprague-Dawley)大鼠5只,75%酒精消毒30 s,处死后无菌条件下取出眼球置于D-Hanks液中,冲洗数遍,解剖显微镜下角巩膜缘处剪开,钝性分离去除眼前节组织,小心剥离视网膜组织,剔除干净血管组织。显微眼科剪将其剪碎(小于1 mm²),加入D-Hanks,1 000 r/min离心5 min,去除上清,加入4 mL 0.25%胰酶(复温后使用)(Gibco公司,美国),37℃消化8 min,加入4 mL含15%FBS(Gibco公司,美国)的DMEM/F12(Gibco公司,美国)培养基终止消化,1 000 r/min离心5 min,弃去上清液。加入含9 mL 15%FBS的DMEM/F12培养基(Gibco公司,美国),吸管吹打成细胞悬液后,接种于3个培养瓶中,将培养瓶置于95%空气、37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。48~72 h后首次换液,以后3~4 d换液1次,原代细胞约10 d后融合。融合后

传代,弃去培养基,D-Hanks液冲洗3遍,加入0.25%胰酶消化,显微镜下观察细胞待形态变圆,部分细胞悬浮后,弃去培养液及少量悬浮细胞,加入含15%血清的培养基,吹打,以1:2方式分瓶传代,选取2次传代后的细胞进行鉴定及作为后续实验材料。

RGC-5细胞株的培养:RGC-5细胞系是应用鼠视网膜细胞通过转染技术建立的,细胞的生长条件以及细胞膜或者细胞内表达的物质与RGCs一致。故这里选用RGC-5作为本研究对象。复苏RGC-5细胞,将RGC-5细胞株从液氮罐中取出,立即放入36℃水浴1 min,见有少量冰时轻轻摇晃冻存管使冰融化。1 000 r/min离心5 min,吸出上清后加入含10%血清的DMEM重悬细胞,调整密度后接种于洁净培养瓶中。置于95%空气、37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养,当细胞达到70%融合时进行后续试验。

1.2.2 Western blot

样品制备:收获各组RGC-5细胞,PBS洗涤后加入蛋白裂解液,冰上刮下细胞,震荡混匀后沸水煮15 min,冰浴20 min。4℃离心,12 000 r/min×5 min,取上清。蛋白样品-80℃保存。蛋白使用前于100℃加热3 min。目标蛋白浓度使用Bio-Rad蛋白检测系统测量(Bio-Rad公司,意大利)。含等量蛋白的细胞裂解物用10%SDS-PAGE分离并转移至PVDF膜上,膜转移到含有丽春红的玻璃皿中染色,观察条带情况。TBST漂洗3次后用5%的脱脂奶粉封闭2 h,与P2X₇一抗(1:1 000),Bax、Bcl-2(1:200), β -actin(1:1 000)4℃孵育过夜。1×TBST洗膜5 min×3次后二抗辣根过氧化物酶HRP标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(1:2 000)室温孵育2 h。然后用ECL显影,暗室冲洗胶片。胶片予扫描仪扫描后使用Image J分析其灰度。将目的分子与 β -actin的灰度进行对比,所得的比值为该目的分子的相对表达量,以control组的相对表达量作为基数,各组数值以倍数表示。每组实验相同条件下重复3次,并绘制相应的直方统计图。

1.2.3 免疫荧光

接种Müller细胞或RGC-5至24孔板内的小圆片上,过夜贴壁后实验前先予以低血清浓度培养基(含1%FBS的DMEM/F12培养基)培养24 h,各组细胞爬片用0.01M PBS漂洗5 min×3次后加入4%新鲜多聚甲醛室温下固定40 min。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后加入1%Triton100冰上破膜2 min。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后,用1%BSA封闭

液室温封闭2 h。吸去爬片上的封闭液,分别加入一抗稀释液(P2X₇ 1:200,GS 1:400),4度孵育过夜。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后加入二抗混合液及DAPI,室温避光孵育2 h。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。最后封片剂封片,荧光显微镜下观察(每批实验均同时设阴性对照)。

1.2.4 细胞外ATP检测

使用Biotek公司的ATP生物荧光法试剂盒检测细胞外的ATP含量。Müller细胞以 1×10^5 /孔的密度种植培养于6孔板中,待细胞长满后备用,每孔添加1 mL DMEM/F12作为培养基,在加入药物之前,去除原先的培养基,改为1 mL低血清浓度培养基。加入100 μmol/L DHPG后6 h,24 h收集离心培养基上清并根据试剂盒说明书利用多功能酶标仪检测其中的ATP浓度,每组选取6个复孔,实验至少重复3次。

1.2.5 TUNEL法检测凋亡

24孔板置入已消毒的细胞爬片,每孔接种 5×10^4 个细胞过夜。待细胞贴壁并分组处理24 h后(加入CM前为避免DHPG对RGC-5产生直接损伤作用,提前2 h加入mGluR 1及mGluR5的阻断剂MPMQ及MPEP),根据说明书使用TUNEL检测试剂盒检测(罗氏公司,德国):0.01 mol/L PBS漂洗1遍,4%多聚甲醛固定1 h,PBS漂洗5 min×3,滴加0.1% Triton X-100冰上破膜2 min,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,吸弃PBS,干燥细胞爬片。配置TUNEL染色液,阳性对照液及阴性对照液,滴加在相应细胞爬片上,置入湿盒防止干燥,37℃避光孵育60 min,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。室温下DAPI复染核15 min,PBS漂洗5 min×3次后封片剂封片,荧光显微镜下观察。每批实验均同时设阴性对照。

1.3 统计学方法

各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数

据比较使用单因素方差分析进行统计检验,两组数据比较采取*t*检验进行统计分析,所有数据分析采用SPSS17.0统计学分析软件,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,统计图采用Sigma plot绘制。每组实验独立重复3次或以上。

2 结果

2.1 细胞鉴定

为了识别和测试Müller细胞的纯度,进行了免疫细胞化学分析(图1)。选择了GS抗体作为Müller细胞的特异性标记,实验结果显示,原代培养的Müller细胞纯度达97.36%。

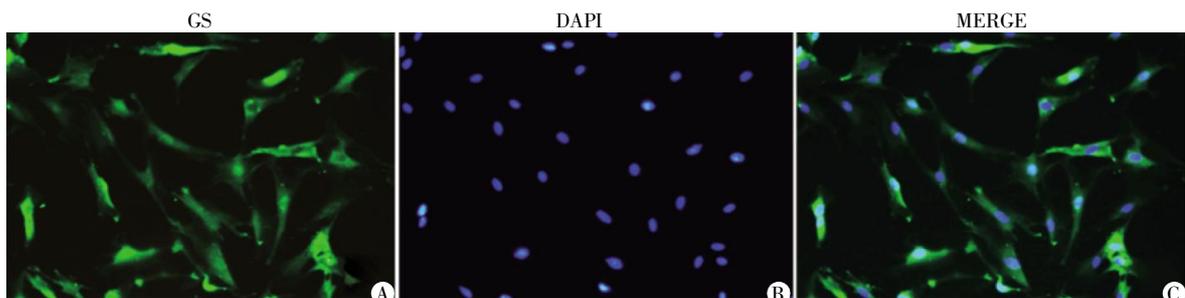
2.2 mGluR I受体激动剂DHPG可以在体外增加Müller细胞上GFAP的表达

先前的研究表明,青光眼中Müller细胞的激活伴随着GFAP的表达增加^[13]。在本研究中,采用免疫荧光观察DHPG在体外对Müller细胞上GFAP表达的影响(图2)。细胞试验中,在Müller细胞中加入DHPG(100 μmol/L),刺激24 h后,收集包括对照组在内的各组细胞,使用免疫荧光来检测GFAP的表达情况。实验结果显示未经DHPG刺激的Müller细胞仅表达少量的GFAP,而加入DHPG刺激后,GFAP的表达明显增高。

2.3 DHPG激活Müller细胞后导致ATP的释放

加入DHPG 6 h,24 h后,检测了Müller细胞培养基中ATP的含量,结果显示与未加DHPG的对照组(以对照组作为基数1,其余各组以倍数表示)相比,处理6 h及24 h ATP释放达到 (1.56 ± 0.20) 倍及 (2.89 ± 0.51) 倍(P 均 <0.05),并呈上升趋势,同时因Müller细胞在DHPG处理24 h后明显激活,综上故以24 h作为DHPG处理Müller细胞的时间来进行后续试验。

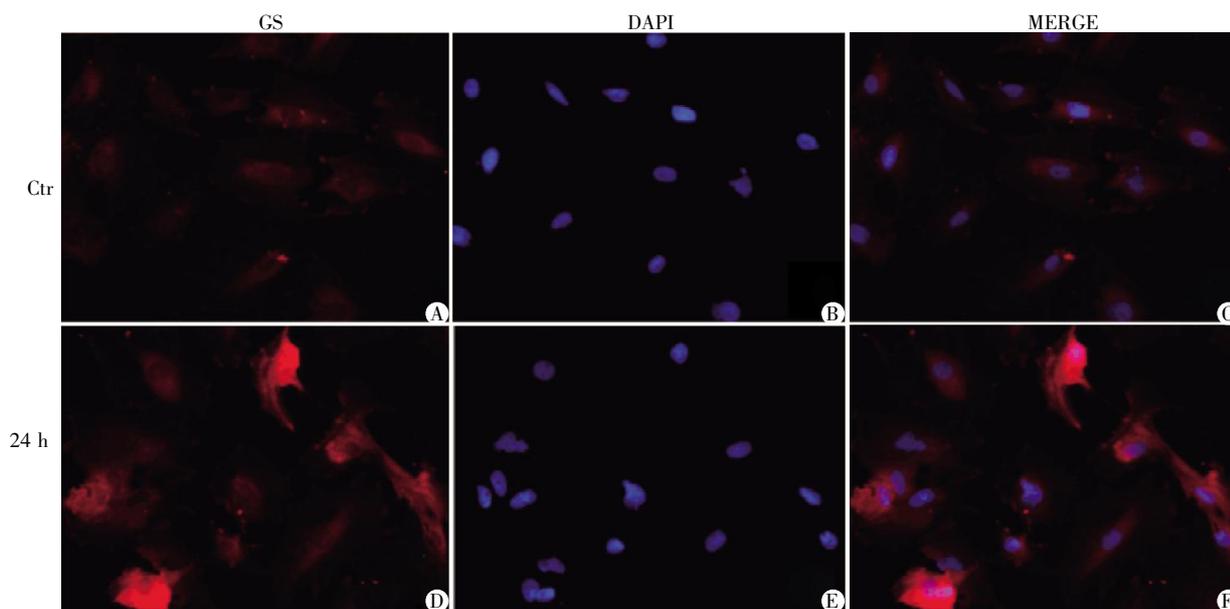
2.4 Müller细胞激活可导致RGC-5细胞的凋亡,阻断P2X₇受体可以部分抑制凋亡



A: GS 标记的 Müller 细胞(绿色); B: DAPI 标记细胞核(蓝色); C: A 图和 B 图的重合。

图1 Müller细胞鉴定

Figure 1 Identification of the purity of cultured Müller cells



免疫荧光检测显示红色为 GFAP 阳性细胞,蓝色为 DAPI。

图 2 Müller 细胞加入 DHPG 后 GFAP 的表达情况

Figure 2 DHPG-induced change of GFAP expression in Müller cells

Müller 细胞的胶质化激活被认为参与了青光眼 RGCs 的凋亡过程,因此,在体外检测了加入 Müller 细胞激活条件培养基 24 h 后 RGC-5 的凋亡情况。正常未处理的 RGC-5 细胞仅有极少数的 TUNEL 染色阳性细胞($7.79\% \pm 1.35\%$),在条件培养基处理的 RGC-5 细胞中出现了较多的 TUNEL 染色阳性信号($27.03\% \pm 2.63\%$, $P < 0.05$)。而预先加入 P2X₇ 受体阻断剂 BBG($1 \mu\text{mol/L}$) 1 h 后, TUNEL 染色阳性的 RGC-5 细胞有明显减少 ($19.77\% \pm 2.22\%$, $P < 0.05$), 另外加入 P2X₇ 受体激动剂 BzATP ($100 \mu\text{mol/L}$) 组则可以显著增加 TUNEL 阳性表达的 RGC-5 细胞数量($40.66\% \pm 6.45\%$, $P < 0.05$, 图 3)。Müller 细胞的胶质化激活被认为在青光眼病理过程中扮演重要角色, 本实验结果显示激活的 Müller 细胞可以引起 ATP 的释放, P2X₇ 受体阻断剂 BBG 可以抑制凋亡。此外, Western blot 的方法检测抗凋亡蛋白及促凋亡蛋白 Bcl-2 与 Bax 的。结果显示, 与对照组相比(以对照组作为基数 1, 其余各组以倍数表示), CM 组显著降低了 RGC-5 细胞上 Bcl-2 的表达 (0.68 ± 0.03), 但增加了 Bax 的表达(1.54 ± 0.17), 而 BBG+CM 组则增加了 Bcl-2 的表达(0.90 ± 0.06), 但降低了 Bax 的表达结果(1.19 ± 0.07), P 均 < 0.05 (图 4)。

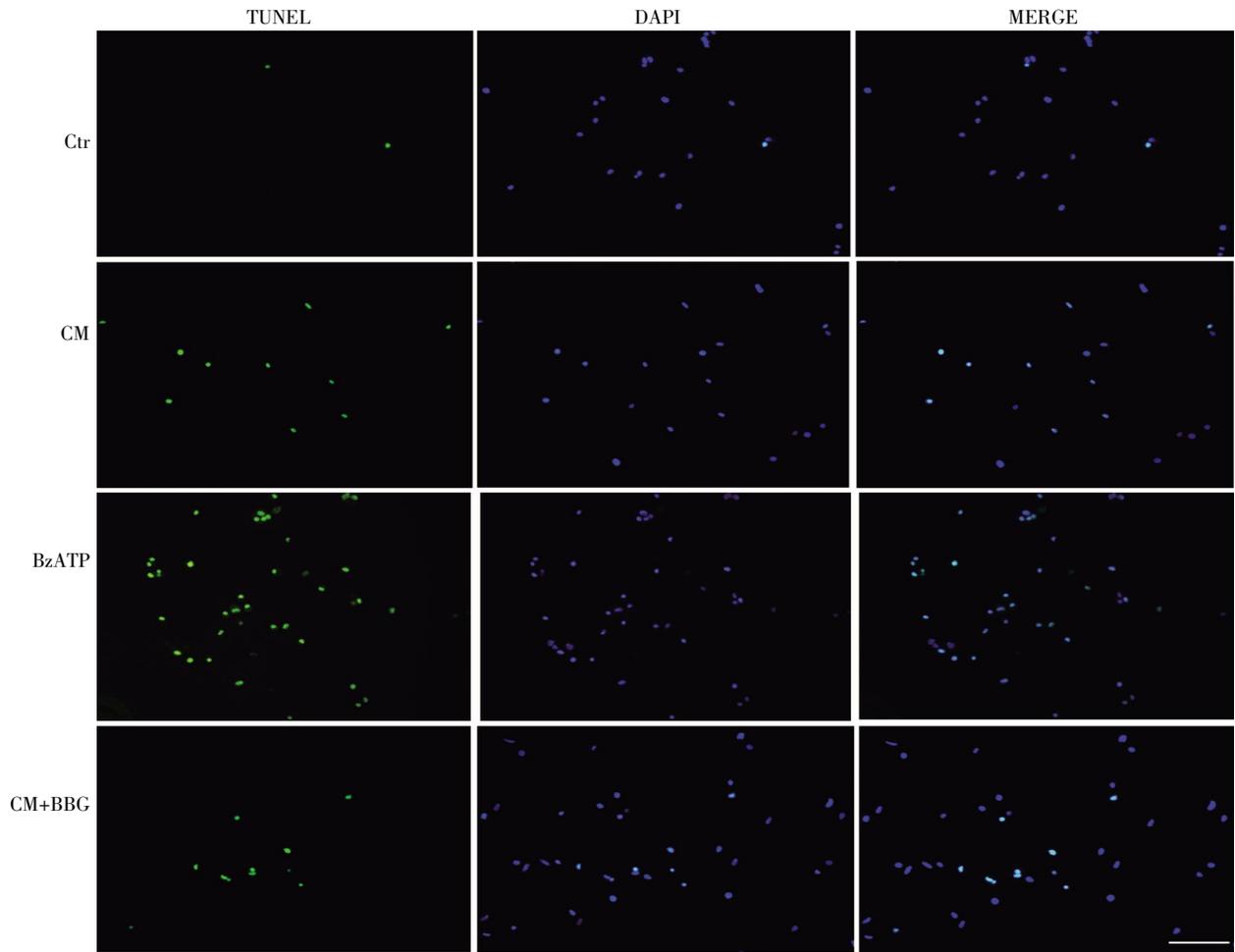
2.5 Müller 激活条件培养基可以增加 RGC-5 细胞的 P2X₇ 受体表达

研究表明 RGCs 中存在 P2X₇ 受体的表达, 而在 RGC-5 中也发现了类似的结果: 免疫荧光显示在未

处理的 RGC-5 中有较多的 P2X₇ 阳性信号 (绿色荧光), 并且可以定位于细胞浆中, 而 CM 组 RGC-5 细胞的 P2X₇ 阳性信号明显增强 (图 5)。Western blot 结果显示正常未处理的 RGC-5 细胞(对照组)中存在一定的 P2X₇ 受体表达, 而加入 CM 的 RGC-5 细胞的 P2X₇ 表达则明显增加(以对照组相对值为基数 1, 加入 CM 组则以倍数表示为 1.35 ± 0.03 , $P < 0.05$)。

3 讨论

Müller 细胞是视网膜上最主要的胶质细胞, 生理条件下可以发挥营养和支持神经元、参与神经递质的再循环及维持视网膜水和离子的动态平衡的作用。而在青光眼等病理条件下 Müller 细胞可以发生胶质化激活反应, 表现为特异性激活和非特异性激活。特异性激活包括谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS) 的表达变化, 谷氨酸转运体(glutamate-aspartate transporters, GLAST) 的表达及功能改变, 去分化及增殖性改变; 非特异性激活则包括胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达增强和内向整流钾通道的下调^[4]。Müller 细胞的激活是一把双刃剑, 一方面可以保护神经元^[5-7], 另一方面, 过度激活时又可能会加重神经元的损伤^[8-9], 本研究采取体外实验的方法更加直接的表明了当 Müller 细胞过度激活时可以导致 RGC-5 的凋亡。



A: 免疫荧光检测绿色显示为 TUNEL 阳性细胞,蓝色显示为 DAPI 标记的细胞核;B: TUNEL 阳性细胞数百分比统计图。

图 3 不同组别 RGC-5 细胞的凋亡情况

Figure 3 RGC apoptosis in different groups of RGC-5 cells

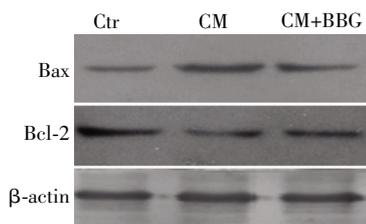


图 4 P2X₇ 受体对 CM 处理的 RGC-5 细胞的凋亡及抗凋亡蛋白的表达情况影响

Figure 4 Changes in Bax and Bcl-2 protein expression in the CM-treated RGC-5 cells

ATP 及其降解产物是重要的信息传递因子。Müller 细胞是视网膜上 ATP 的重要来源。有研究表明谷氨酸可以通过激活 Müller 细胞上的 NMDA 及非 NMDA 受体导致 ATP 的释放^[10]。此外,一些研究也推测谷氨酸可以通过激活 I/II 型代谢性谷氨酸受体引起 Muller 细胞上 ATP 的释放^[11-12],本课题之前的研究显示在大鼠视网膜上激活代谢性谷氨酸

I 型受体可以在增加 GFAP 的表达,导致 Müller 细胞的激活^[13]。而本文结果表明 DHPG 在体外也可以增加 Müller 细胞的 GFAP 表达,验证了 DHPG 对 Müller 细胞的激活作用。在激活 Müller 细胞的同时,本结果也显示在加入 mGluR I 受体激动剂 DHPG 激活 Müller 细胞后确实可以引起 ATP 的释放从而可以作用于 RGC-5 的 P2X₇ 受体上,这里值得注意的是,由于检测样本为部分上清,ATP 检测值反映的是 ATP 在大体积的相对稀释情况,通常比预计近细胞膜水平的 ATP 值要低数个数量级^[14]。此外继发性的 ATP 释放也可能参与其中,当 Müller 细胞过度激活时,Müller 细胞可以释放有害因子如 NO 去妨碍 Müller 细胞的正常生理作用并对周围的神经元产生后续损伤^[8],接着当 RGC 本身在收到 ATP 刺激时自身也会向细胞外释放大量的 ATP 从而进一步作用于自己的 P2X₇ 受体^[15]。而在观察到的 ATP 之外,ATP 的降解产物 ADP、AMP 同样可以作用于

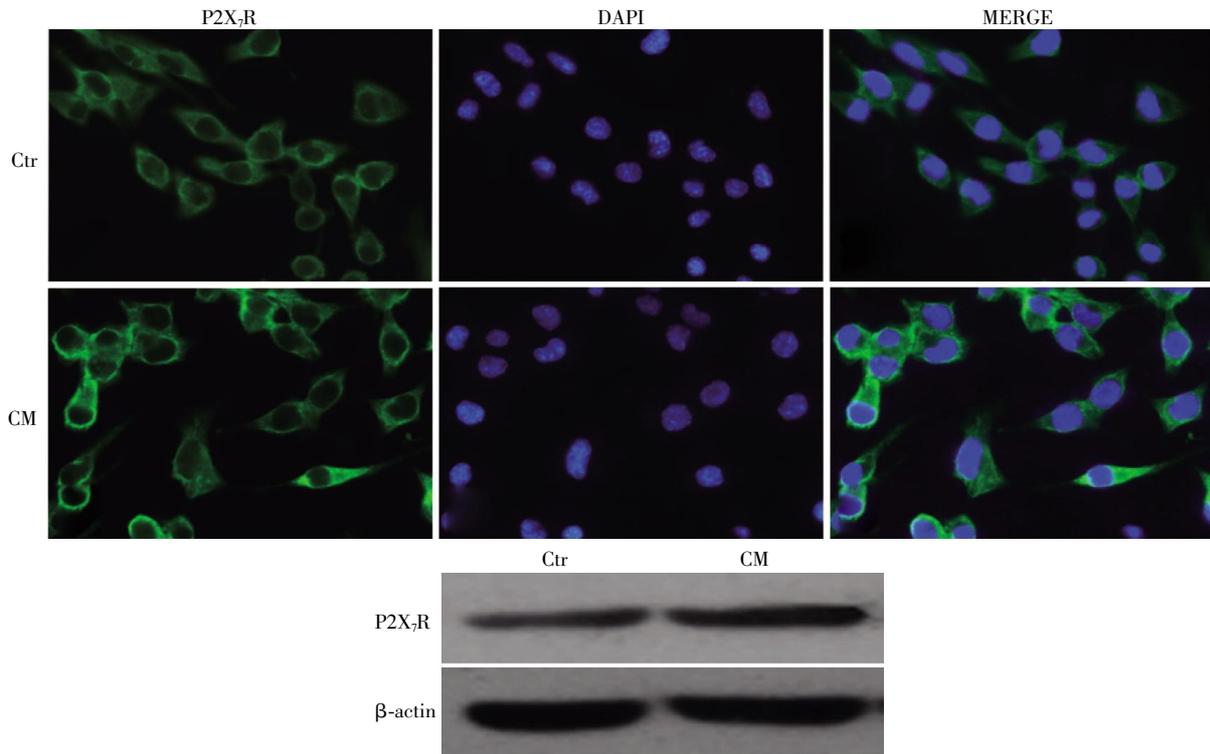


图 5 Western blot 及荧光检测各组 RGC-5 细胞中 P2X₇ 受体的表达情况
Figure 5 The expression of P2X₇ receptor in different groups of RGC-5 cells

P2X₇ 受体, 尽管 ADP 及 AMP 是 P2X₇ 受体较弱的激动剂, 但与 ATP 短暂接触后, ADP 及 AMP 的激活有效性会得到增强(仍低于 ATP)^[16], 这些综合因素可能共同作用于 P2X₇ 受体, 使之产生相应的改变。

P2X₇ 受体是嘌呤受体家族成员, 众多研究显示 P2X₇ 受体参与了神经元的损伤。在中枢神经系统中, Delarasse 等^[17] 发现细胞外 ATP 可以通过激活 P2X₇ 受体引起神经前体细胞的损伤。Zhang 等^[18] 发现加入 P2X₇ 受体激动剂 BzATP 可以引起 RGCs 钙离子内流, caspase 激活从而引起 RGCs 凋亡, Hu 等^[19] 发现在大鼠玻璃体腔注射 BzATP 可以引起 RGCs 的减少, 并且这两组实验的 RGC 减少都可以被 P2X₇ 受体阻断剂抑制。本结果显示 P2X₇ 受体阻断剂 BBG 可以减少 RGC 细胞的死亡, 并且有别于先前的研究, 直接观察到了 Müller 细胞激活可以通过 P2X₇ 受体来对 RGC-5 细胞产生直接损伤作用, 并且这一损伤作用与 Müller 细胞激活后释放的 ATP 有关。同时也看到 BBG 只是部分缓解了 Müller 细胞激活所导致的 RGC-5 凋亡, 所以 P2X₇ 受体的激活不是导致 RGC-5 细胞凋亡的唯一原因。研究表明, 注射 BzATP 诱导的 RGC 死亡可以被腺苷 A₃ 受体激动剂的 MRS 3558 阻断^[19], 这意味着在病理条件下, 细胞外 ATP 和其保护代谢腺苷之间的平衡情

况对影响着 RGC 的存活, 当然这其中更复杂的细胞间作用, 还需要进一步研究。

已有研究表明成熟的 RGCs 中稳定表达 P2X₇^[20], 本研究用免疫荧光及 Western blot 也证明了 P2X₇ 受体在 RGC-5 细胞胞浆中有着一定量的表达, 这些均提示 P2X₇ 有可能参与了 RGC-5 细胞的功能调节。有研究观察到在大鼠视神经夹伤模型中造模后 3 d P2X₇ 受体的表达明显增高^[21], 并且 Müller 细胞呈明显激活状态^[22]。这些结果提示 Müller 细胞可能参与 P2X₇ 受体的表达增高, 本研究结果也表明 Müller 细胞激活的条件培养基在引起 RGC-5 凋亡的同时增加 RGC-5 上的 P2X₇ 的表达, 这与先前的研究是相一致的。

综上, 认为激活的 Müller 细胞可以对 RGC-5 产生直接损伤作用, 而 Müller 细胞 ATP 的释放和 RGC-5 细胞上 P2X₇ 受体可能共同参与这一损伤过程。这些可能为今后包括青光眼在内的视神经疾病提供一个新的研究基础和研究方向。

[参考文献]

- [1] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the health and diseased retina [J]. Prog Retin Eye Res, 2006, 25(4): 397-424
- [2] 张秀兰, 张梅, 葛坚, 等. 嘌呤受体 P2X₇ 激活介导

- 大鼠视网膜神经节细胞死亡的实验研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(2): 130-134
- [3] Gao F, Li F, Miao Y, et al. Group I metabotropic glutamate receptor agonist DHPG modulates Kir4.1 protein and mRNA in cultured rat retinal Müller cells [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 588: 12-17
- [4] 高凤, 季敏, 吴继红, 等. 视网膜 Müller 细胞的生理功能及在青光眼病理中的作用[J]. *生理学报*, 2013, 65(6): 654-663
- [5] Carter-Dawson L, Shen FF, Harwerth RS, et al. Glutathione content is altered in Müller cells of monkey eyes with experimental glaucoma[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 364(1): 7-10
- [6] Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, et al. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Müller cells[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(17): 5998-6010
- [7] Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, et al. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 111(1-2): 189-197
- [8] Chen C, Xu Y, Zhang J, et al. Altered expression of nNOS/NIDD in the retina of a glaucoma model of DBA/2J mice, and the intervention by nNOS inhibition[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(1): 47-56
- [9] Ganesh BS, Chintala SK. Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18305
- [10] Loiola EC, Ventura AL. Release of ATP from avian Müller glia cells in culture[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(3): 414-422
- [11] Uckermann O, Wolf A, Kutzera F, et al. Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide [J]. *Neurosci Res*, 2006, 83(4): 538-550
- [12] Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, et al. Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF[J]. *J Neurochem*, 2008, 104(2): 386-399
- [13] Ji M, Miao Y, Dong LD, et al. Group I mGluR-mediated inhibition of Kir channels contributes to retinal Müller cell gliosis in a rat chronic ocular hypertension model [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12744-12755
- [14] Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, et al. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1999, 276(1 Pt 1): C267-278
- [15] Xia J, Lin JC, Lu W, et al. Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X7 receptors[J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt 10): 2285-2304
- [16] Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, et al. ADP and AMP induce interleukin-1 release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(8): 3061-3069
- [17] Delarrasse C, Gonnord P, Galante M, et al. Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor [J]. *J Neurochem*, 2009, 109(3): 846-857
- [18] Zhang X, Zhang M, Laties AM, et al. Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca²⁺ and kills retinal ganglion cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(6): 2183-2191
- [19] Hu H, Lu W, Zhang M, et al. Stimulation of the P2X7 receptor kills rat retinal ganglion cells *in vivo* [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(3): 425-432
- [20] Brandle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 62(1): 106-109
- [21] Kakurai K, Sugiyama T, Kurimoto T, et al. Involvement of P2X(7) receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 237-241
- [22] Juming Zhu, Junfang Zhang, Min Ji, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor and effects of its agonist, pioglitazone, on a rat model of optic nerve crush: PPAR α in retinal neuroprotection [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68935

[收稿日期] 2015-07-07