

·基础研究·

## 活化转录因子4激活致小鼠小梁网炎症及细胞凋亡

薛 然<sup>1</sup>, 李晶明<sup>2</sup>, 陈 果<sup>1</sup>, 钟毅敏<sup>1</sup>

(1. 中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 西安交通大学医学院第一附属医院, 陕西 西安 710061)

**摘要:**【目的】旨在通过体内研究,探讨内质网应激的主要标志物,活化转录因子4(ATF4)在小梁网功能障碍、细胞凋亡中所起的作用,以期为阐明原发性开角青光眼(POAG)的发病机制提供新的思路。【方法】选取6~8周大的C57BL/6J小鼠47只,实验组(24只,24眼)单眼前房注射ATF4腺病毒,对照组(23只,23眼)单眼前房注射GFP腺病毒。在注射后的不同时间点,分别取实验组和对照组小鼠的前房角组织,用冰冻切片和免疫荧光染色法观察病毒荧光及内质网应激相关蛋白ATF4和C/EBP同源蛋白(CHOP)的表达;用实时荧光定量PCR法检测炎症因子IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6以及内皮细胞白细胞黏附分子1(ELAM-1)在mRNA水平的表达;用TUNEL染色法观察小梁网细胞的凋亡情况;用超薄切片和透射电镜观察小梁网细胞的超微结构。在注射前及注射后第3、7、10及13天分别用回弹式眼压计测量小鼠的日间及夜间眼压。【结果】注射后24h即可观察到注射眼小梁网内的病毒荧光,且实验组小梁网ATF4的表达明显上调。在注射后3天,实验组小梁网组织的炎症因子在mRNA水平的表达较对照组明显升高。注射后7天,实验组小梁网组织出现CHOP的表达上调;小梁网TUNEL阳性细胞数比对照组显著增加;实验组小梁网细胞内可见明显扩张的粗面内质网。在注射后第7、10及13天,实验组日间眼压及夜间眼压均高于对照组,在术后第7天差别具有统计学意义( $P < 0.05$ )。【结论】小梁网组织ATF4的表达上调可以引起炎症因子表达的上调,内质网相关凋亡通路的活化,以及小梁网细胞的凋亡。这些改变可能在眼压的升高中起到一定作用。

**关键词:**活化转录因子4;炎症;细胞凋亡;小梁网

中图分类号:R775.2

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2018)04-0493-08

### Activation of ATF4 Mediates Inflammation and Cell Apoptosis in Mice Trabecular Meshwork

XUE Ran<sup>1</sup>, LI Jing-ming<sup>2</sup>, CHEN Guo<sup>1</sup>, ZHONG Yi-min<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology// Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. The First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China)

Corresponding to: ZHONG Yi-min; E-mail: zhongyim@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the possible role of an endoplasmic reticulum stress marker, activating transcription factor 4 (ATF4) in the dysfunction and cell apoptosis of trabecular meshwork in vivo, and to provide new clues to investigate the pathogenesis of primary open angle glaucoma (POAG).【Methods】ATF4 adenoviral vectors or GFP adenoviral vectors as control were injected into the anterior chamber of 6~8 week-old C57BL/6J mice (experimental group: 24 mice, 24 eyes; control group: 23 mice, 23 eyes). Iridocorneal angle tissue was taken at different time intervals after the injection. Frozen sectioning and immunofluorescent staining were performed to detect the fluorescence of the viruses and expression of ATF4 and C/EBP homologous protein (CHOP). Real time PCR was used to detect the RNA level of the inflammatory factors IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and endothelial leukocyte adhesion molecule-1

收稿日期:2018-03-19

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81200686);高校博士学科点专项科研基金(20120171120108);广东省自然科学基金博士启动项目(S2011040005378);中山大学青年教师培育项目(11ykpy65)

作者简介:薛然,硕士研究生,研究方向:青光眼防治,E-mail: xuer3@mail2.sysu.edu.cn;钟毅敏,通信作者,眼科学博士,副教授,硕士生导师,E-mail: zhongyim@mail.sysu.edu.cn

(ELAM-1). TUNEL assay was performed to determine apoptosis of trabecular meshwork cells. Ultrathin sectioning and transmission electronic microscope were used to observe the ultrastructure of the trabecular meshwork cells. Daytime and nocturnal intraocular pressure (IOP) were measured by rebound tonometer 3, 7, 10, and 13 days after injection. 【Results】 GFP fluorescence of adenovirus could be seen in mice trabecular meshwork 24 h after injection in both groups. Markedly increased expression of ATF4 in trabecular meshwork cells could be found in ATF4-injected group 24 h after injection. The RNA level of the inflammatory cytokines was significantly up-regulated in the iridocorneal angle tissues of ATF4-injected eyes compared to the control 3 days after injection. Up-regulated CHOP expression and TUNEL staining, marked distention of rough endoplasmic reticulum were detected in the trabecular meshwork cells of ATF4-injected eyes 7 days after injection. Daytime and nocturnal IOP were elevated in the ATF4-injected eyes 7, 10 and 13 days after injection and were significantly different 7 days after injection ( $P < 0.05$ ). 【Conclusions】 Over-expression of ATF4 may lead to up-regulation of inflammatory cytokines and activation of ER stress-associated apoptotic pathway in mice trabecular meshwork tissues. These changes may play an important role in the pathogenesis of increased IOP.

**Key words:** ATF4; inflammation; cell apoptosis; trabecular meshwork

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(4):493-500;625]

青光眼是位居全球第二位的不可逆性致盲眼病。WHO 报告显示,中国及全球青光眼患者数量呈增加趋势。2010 年全世界范围内有超过 6600 万人患青光眼,其中至少 680 万人是双眼盲。预计到 2020 年,全球青光眼患者将达到 7 960 万,我国青光眼患者将达 2200 万。原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)是青光眼之中最常见的类型之一,也是其中主要的致盲原因<sup>[1]</sup>。POAG 的发病较为隐蔽,在出现典型的青光眼视野损害、视力下降之前,患者往往已有明显的视网膜神经纤维层变薄及视神经萎缩。关于 POAG 具体发病机制至今尚未完全明了。病理性高眼压被认为是 POAG 发病最主要的危险因素之一<sup>[2]</sup>。小梁网功能障碍造成房水外流阻力的升高是导致眼压升高的重要原因<sup>[3]</sup>。内质网应激是近年来的研究热点之一,有研究显示,突变的肌纤蛋白发生错误折叠可导致内质网应激及小梁网细胞凋亡从而使眼压升高<sup>[4-6]</sup>,但其具体机制现在尚不完全清楚。活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)是内质网应激信号通路的一个关键转录因子。研究发现,ATF4 参与了氨基酸和葡萄糖代谢,眼球发育,以及细胞内抗氧化应激反应<sup>[7-9]</sup>。ATF4 还参与了一系列炎症因子的转录调控,在动脉粥样硬化和肿瘤细胞的扩散中起着重要作用<sup>[10-11]</sup>。ATF4 过度表达可以引发凋亡因子的级联反应,引发细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。我们以往的研究表明,在视网膜 Müller 细胞,ATF4 介导高糖和缺氧诱导的炎症因子 ICAM-1, VEGF 的

表达,在糖尿病视网膜病变中起着关键作用<sup>[14]</sup>。然而 ATF4 在小梁网细胞功能障碍和细胞凋亡中所起的作用,目前国内外研究尚未见报道。本研究以体内研究的方式,将 ATF4 腺病毒导入小鼠小梁网,观察小鼠眼压改变,小梁网组织内质网应激蛋白及炎症因子的表达,以及小梁网细胞的凋亡情况,以期阐明 POAG 眼压升高的发病机制提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用试剂

ATF4 腺病毒(Ad-ATF4,滴度  $1.8 \times 10^{11}$  PFU/mL)及对照 GFP 腺病毒(Ad-GFP,滴度  $2.0 \times 10^{11}$  PFU/mL)购自上海和元生物技术有限公司。TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司。一抗兔多克隆抗体 ATF4 购自美国 Abcam 公司。一抗兔多克隆抗体 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)购自于美国 Santa Cruz 公司。Cy3 结合的羊抗兔二抗购自美国 Thermo Fisher 公司。含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂购自美国 Vector Laboratories 公司。总 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。反转录反应试剂 PrimeScript RT Master Mix 及 Real Time PCR 反应试剂 SYBR Premix Ex Taq 均购自大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 实验动物

SPF 级的 C57/BL6 小鼠(实验组 24 只,对照组 23 只),雌性,6~8 周,体质量 17~20 g,购自广东

省医学实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002)。动物饲养及实验操作均在中山大学中山眼科中心动物实验中心屏障区进行(实验单位使用许可证编号:SCXK(粤)2013-0058),并遵守中山大学中山眼科中心动物实验伦理规定以及“眼科和视觉研究动物使用”的ARVO声明。饲养环境采用12 h光照-黑暗循环,室温20~25℃,动物可自由取食和取水。

### 1.3 前房注射

前房注射采用瑞士Hamilton公司的超微注射器完成。小鼠采用40 mg/L水合氯醛按0.01 mL/g的剂量行腹腔麻醉及单眼用盐酸丙美卡因眼表麻醉后,以1 mL无菌胰岛素针头于小鼠透明角膜处做穿刺口,将微量注射器33G钝性针头从穿刺口进入前房,于前房内注射2 μL的腺病毒及2 μL的无菌气泡,待气泡封住穿刺口后,缓慢拔出针头。注意勿损伤晶状体、虹膜、角膜内皮等组织。术后以妥布霉素眼膏涂眼预防感染。如术后出现明显的前房出血,晶状体混浊则剔除出组。

### 1.4 眼压测量

在手术前及手术后第3、7、10及13天的上午8-11点及晚上8-11点分别测量小鼠的日间眼压及夜间眼压。小鼠在异氟烷和氧气的混合气体麻醉后5 min,待小鼠的呼吸睡眠平稳后,使小鼠处于俯卧位,使用芬兰icare公司的动物专用回弹式眼压计对小鼠注射眼进行眼压测量,每只眼分别记录3次无错误条出现的眼压测量结果,取3次的平均值为本次测量结果。

### 1.5 冰冻切片制作及免疫荧光

取小鼠注射眼的眼前段组织于40 mg/L多聚甲醛溶液中固定1 h,分别用100、200、300、300 mg/L的蔗糖溶液梯度脱水后,OCT包埋剂包埋后立即冻存于-80℃冰箱。在-20℃的冰冻切片机

中制作7 μm厚的冰冻切片,切好后的切片存于-80℃冰箱以待使用。免疫荧光染色所用一抗分别为抗ATF4(1:100)及抗CHOP(1:70),二抗为Cy3结合的羊抗兔二抗(1:400)。最后加入含DAPI的抗荧光淬灭封片剂。

### 1.6 TUNEL 染色

将冰冻切片浸入含有1 mg/L Triton X-100的1 mg/L 枸橼酸通透液中,在2~8℃条件下促渗2 min,加入含有核苷酸和末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)的TUNEL反应混合液。阴性对照只加核苷酸。37℃下避光和加湿环境下反应60 min后,用PBS漂洗切片3次。最后加入含DAPI的抗荧光淬灭封片剂。

### 1.7 实时定量PCR

按照总RNA提取试剂盒说明书分别提取小鼠各眼虹膜角膜角组织的总RNA,加入反转录反应试剂并反转录为cDNA,然后将cDNA、引物及SYBR Premix Ex Taq试剂混合均匀后进行实时定量PCR反应。引物如表1所示。目标基因的mRNA水平以GAPDH核糖核酸RNA作内参。

### 1.8 透射电镜

在无菌条件下取小鼠注射眼约2 mm×4 mm的包含小梁网的虹膜角膜角组织,在25 mg/L戊二醛磷酸缓冲液中固定4 h,10 mg/L锇酸固定1.5 h,蒸馏水洗后,用500、700、800、900、1 000 mL/L乙醇及两次1 000 mL/L丙酮逐级常规脱水,包埋,制超薄切片后,用饱和醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,在透射电镜下观察。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 23.0统计软件做统计处理。计量资料以均数±标准差表示。实验组与对照组之间炎症因子数据的比较采用两独立样本的*t*检验(方差齐)或校正的*t*检验(方差不齐)。两组眼压值

表1 实时荧光定量PCR引物序列  
Table 1 Primers sequence of real time PCR

Gene	Forward	Reverse
ELAM-1	ATGCCTCGCGCTTTCTCTC	GTAGTCCCGCTGACAGTATGC
IL-1α	GCACCTTACACCTACCAGACT	AAACTTCTGCCTGACGAGCTT
IL-1β	GCAACTGTTCTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

的比较采用重复测量资料的方差分析。双侧检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 注射ATF4腺病毒诱导小鼠小梁网ATF4的表达

小鼠单眼前房注射Ad-ATF4,以Ad-GFP作对照。术后24 h处死小鼠并取注射眼的眼前段组织制作冰冻切片,在荧光显微镜下可以观察到小梁网组织中有腺病毒的绿色荧光,提示转染成功。行免疫荧光染色可观察到Ad-ATF4注射眼小梁网中有明显的ATF4表达上调,而对照眼小梁网中未见明显的ATF4蛋白表达(图1)。

### 2.2 小鼠小梁网组织炎症因子的表达

以Ad-ATF4或Ad-GFP前房注射后3 d,处死小鼠取虹膜角膜角组织,提取组织中的RNA,用实时PCR法分析炎症因子在mRNA水平的表达。结果发现Ad-ATF4注射眼IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6以及内皮细胞白细胞黏附分子1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1)在mRNA水平的表达均明显高于对照眼,分别是对照眼的(2.0  $\pm$  1.1)倍( $t = 2.672$ ,  $P = 0.037$ );(1.9  $\pm$  0.4)倍( $t = 4.301$ ,  $P = 0.005$ );(5.1  $\pm$  3.0)倍( $t = 4.169$ ,  $P = 0.020$ );以及(1.6  $\pm$  0.6)倍( $t = 2.666$ ,  $P = 0.037$ ) (图2)。

### 2.3 小鼠小梁网CHOP的表达及电镜结果

Ad-ATF4或Ad-GFP前房注射后7 d,处死小鼠取眼前段组织制作冰冻切片并行免疫荧光染

色,可观察到Ad-ATF4组较对照眼组小梁网中内质网应激相关凋亡蛋白CHOP的表达上调(图3A)。取小鼠的虹膜角膜角组织制作超薄切片,在透射电镜下观察小梁网细胞的超微结构,可发现Ad-ATF4组小梁网细胞的粗面内质网明显扩张,而对照组小梁网细胞的粗面内质网的形态结构相对正常(图3B)。

### 2.4 小鼠小梁网细胞凋亡情况

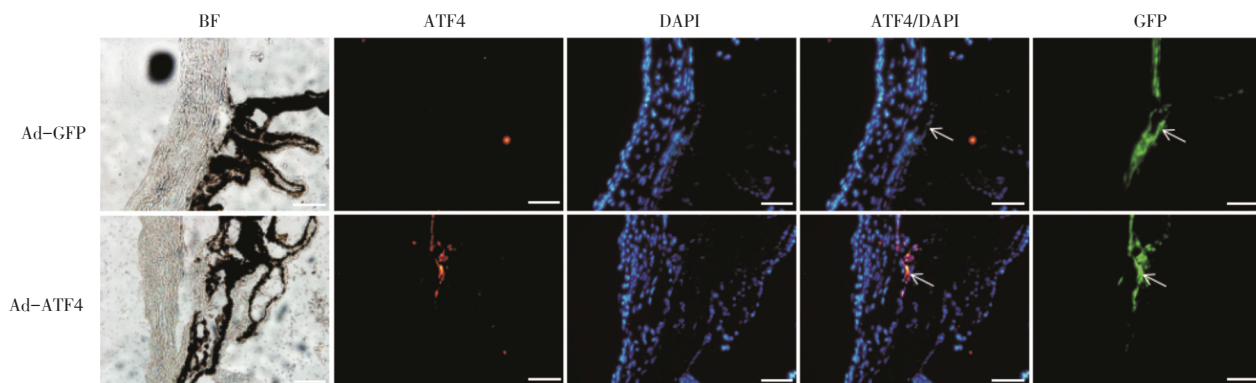
Ad-ATF4或Ad-GFP前房注射后7 d,取小鼠的眼前段组织制作冰冻切片并用TUNEL染色检测凋亡的细胞。发现Ad-ATF4组小鼠小梁网TUNEL阳性染色细胞数明显多于对照组,提示小梁网细胞凋亡增多(图4)。

### 2.5 诱导ATF4的表达对小鼠眼压的影响

在Ad-ATF4组或对照组前房注射前(0 d)及注射后第3、7、10、13天的分别测量小鼠的日间眼压及夜间眼压(mmHg),结果发现注射后第7、10、13天,Ad-ATF4注射眼日间眼压及夜间眼压均高于对照眼,且在术后第7天差别具有统计学意义(日间眼压:实验组13.9  $\pm$  3.3 vs. 对照组10.5  $\pm$  1.2,  $F = 6.85$ ,  $P = 0.02$ ;夜间眼压:实验组14.1  $\pm$  3.4 vs. 对照组10.6  $\pm$  1.0,  $F = 7.23$ ,  $P = 0.02$ ,图5)。

## 3 讨论

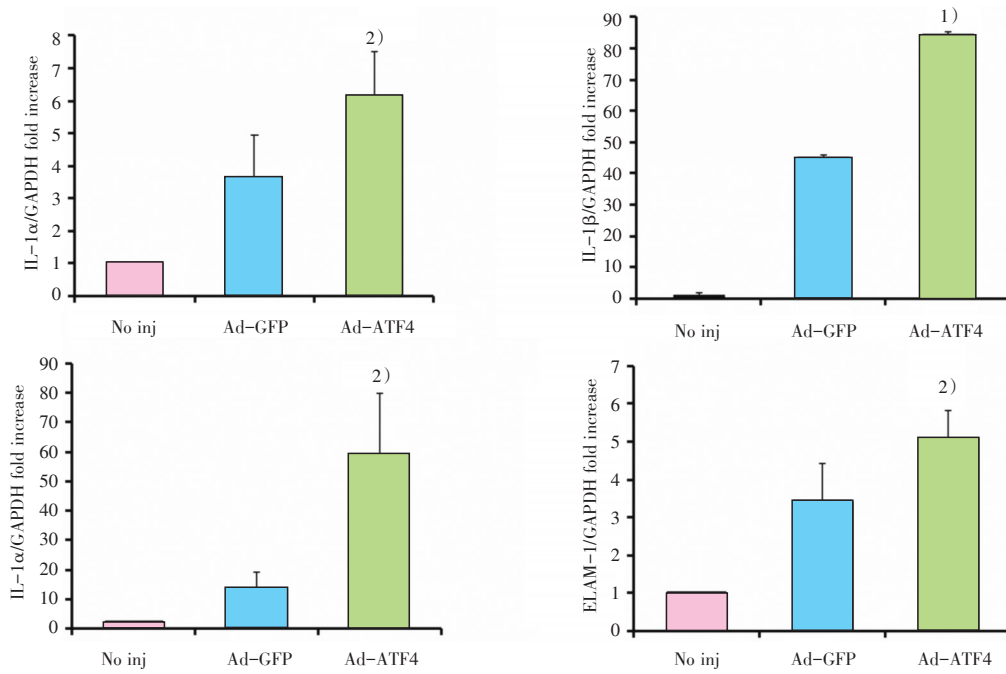
青光眼小梁网功能障碍、房水外流阻力升高导致眼压升高的分子生物学机制尚待阐明。小梁网由小梁网细胞及细胞外基质组成,其中小梁网



Visualization of the GFP fluorescence (green) of adenovirus in mice trabecular meshwork (TM) after anterior chamber injection for 24 h and increased ATF4 fluorescence (red) could be seen in the ATF4 virus injected eye (Ad-ATF4) compared to the control (Ad-GFP) ( $n = 3$ ). Arrows mark the TM. Blue: nuclear staining with DAPI. BF: bright field. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

图1 前房注射ATF4腺病毒对小鼠小梁网ATF4表达的影响

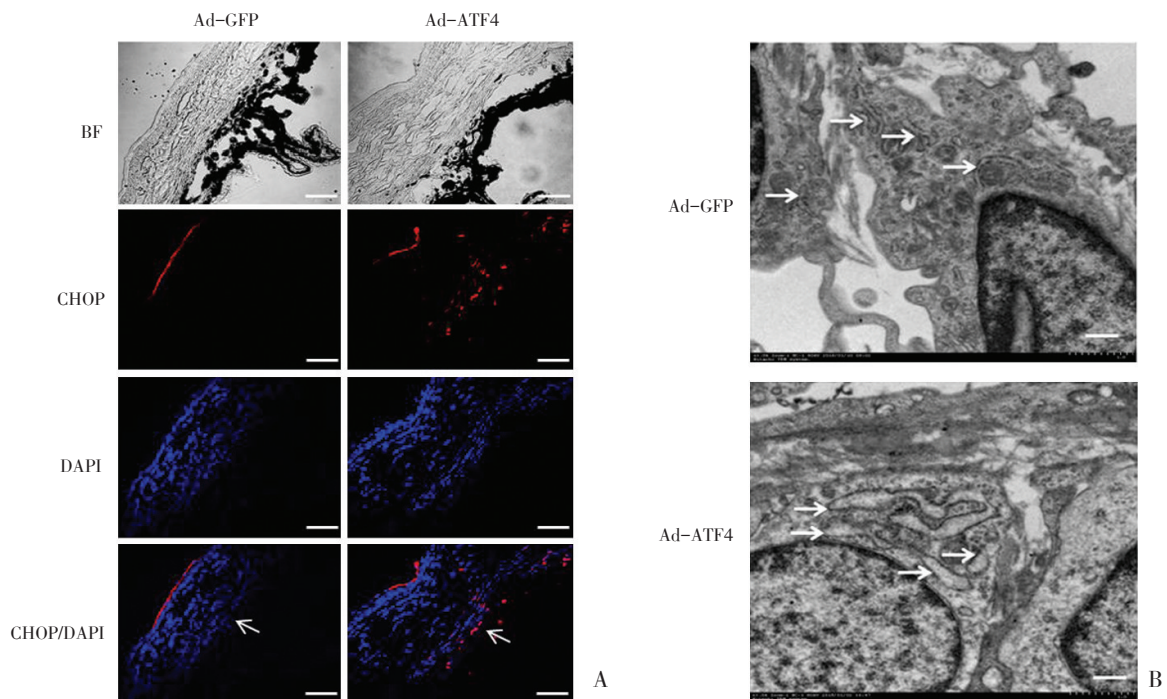
Fig.1 Expression of ATF4 in the mice TM after anterior chamber injection of ATF4 adenovirus



Significant increased mRNA level of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and ELAM-1 of the iridocorneal angle tissues was detected in the Ad-ATF4 group 3 days after injection compared to the Ad-GFP group and no-injection eyes (No inj) (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ), 1)  $P < 0.01$  vs Ad-GFP, 2)  $P < 0.05$  vs Ad-GFP.

图2 小梁网ATF4表达上调后炎症因子实时定量PCR的结果

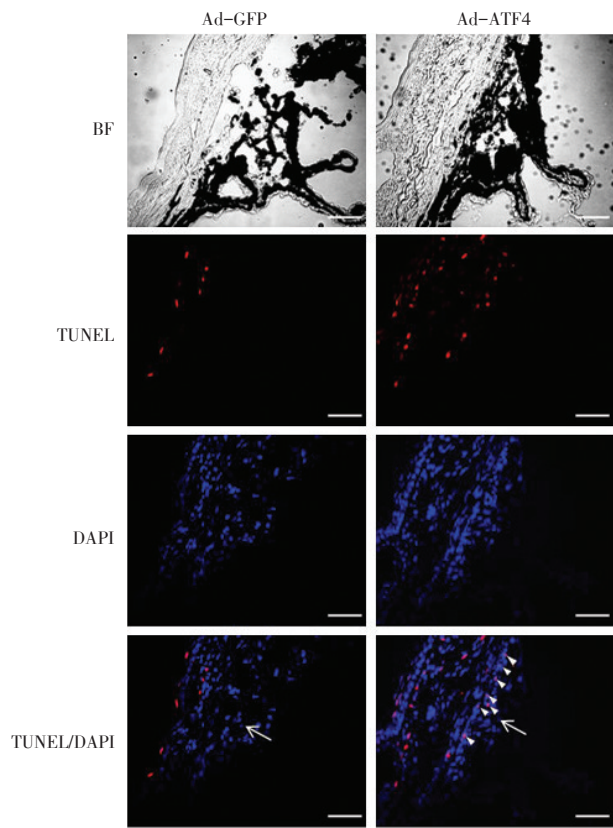
Fig.2 The real-time PCR results after induction of ATF4 in the mice trabecular meshwork(TM)



A: Immunofluorescent staining of the iridocorneal angle showing increased expression of CHOP (red) in the trabecular meshwork(TM) of Ad-ATF4 group after anterior chamber injection for 7 d ( $n = 3$ ). Arrows mark the TM. Blue: nuclear staining with DAPI. BF: bright field. Scale bar: 50  $\mu$ m. B: The images showed the ultrastructure of the TM cells 7 d after anterior chamber injection. Marked distention of rough endoplasmic reticulum (rER) could be seen in Ad-ATF4 group compared to the control. Arrows mark the rER. Scale bar: 500 nm.

图3 前房注射后小鼠小梁网CHOP蛋白表达及透射电镜检测结果

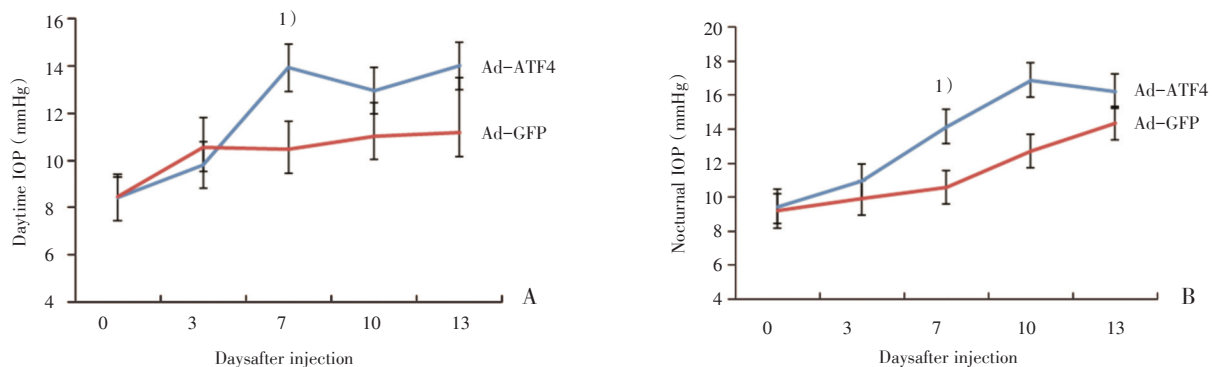
Fig.3 CHOP immunostaining and transmission electron microscope images of mice TM after anterior chamber injection



Apoptotic cells (red) of mice trabecular meshwork (TM) were examined by TUNEL staining 7 d after anterior chamber injection ( $n = 3$ ). Arrows mark the TM. Arrowheads mark the apoptotic TM cells. Blue: nuclear staining with DAPI. BF: bright field. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

图4 小梁网 TUNEL 染色结果

Fig.4 TUNEL staining of mice TM after induction of ATF4



Intraocular pressure (IOP) of the mice was measured day (A) and night (B) before and after anterior chamber injection. IOP was markedly elevated in the Ad-ATF4 group ( $n = 8$ ) compared to the control (Ad-GFP) ( $n = 7$ ) 7 days after the injection, 1)  $P < 0.05$  vs Ad-GFP.

图5 小梁网 ATF4 上调后小鼠眼压的改变

Fig. 5 Change of IOP after up-regulation of ATF4 in mice trabecular meshwork

细胞在房水流出道的生理和病理变化中起着关键性的作用。研究发现, POAG 患者存在小梁网细胞的凋亡及细胞减少<sup>[15-17]</sup>; 内质网应激在青光眼小梁网细胞的凋亡和丧失中可能起着重要作用<sup>[18-19]</sup>。POAG 患者小梁网中, 内质网应激蛋白标记物的表达增加<sup>[17]</sup>。Zode 等<sup>[20]</sup>报道用衣霉素诱导小梁网组织的内质网应激, 可以引起眼压升高。内质网是细胞内蛋白质合成和加工的重要细胞器, 多种生理或病理条件会引起未折叠的或错误折叠的蛋白堆积在内质网, 激活内质网应激<sup>[21]</sup>。细胞通过未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 以清除蓄积在内质网内的错误折叠或未折叠蛋白质, 从而恢复细胞正常的生理功能<sup>[22]</sup>。然而持续的内质网应激将启动细胞的凋亡通路, 引发细胞死亡<sup>[23]</sup>。本文用体内研究的方法, 探讨内质网应激的关键转录因子 ATF4 在小梁网细胞凋亡及眼压升高中的作用, 有关内容目前国内外尚未见报道。

ATF4 是内质网应激中 PERK-eIF2 $\alpha$  信号通路的转录因子, 它从属于 ATF/CREB 转录因子家族, 富含碱性亮氨酸拉链结构 (bZIP); 它是一个应激反应因子, 在氧化应激、内质网应激、氨基酸缺乏等多种应激条件下表达上调, 可以对多条应激反应通路进行转录调控<sup>[24]</sup>。研究发现, GRP78、ATF4、ERO-1 $\alpha$ 、CHOP 等内质网应激相关蛋白在 POAG 患者小梁网中表达增加, 提示 ATF4 可能参与了 POAG 的病理生理过程<sup>[17]</sup>, 但具体机制不详。本研究利用小鼠前房注射 ATF4 腺病毒的方法将基因载体转入了小鼠小梁网细胞, 上调小梁

网ATF4蛋白的表达,并观察到实验组小鼠眼压的明显升高,提示小梁网中ATF4的表达可能与眼压升高有一定关联。

已有研究表明,亚临床炎症在POAG的发病中起着重要作用<sup>[25-26]</sup>。体外培养的青光眼小梁网细胞持续分泌炎症因子IL8、CXCL6和MCP1<sup>[27]</sup>。Wang等<sup>[25]</sup>发现POAG患者的小梁网细胞有多种炎症因子表达的上调,包括IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B以及ELAM-1,并在自分泌信号调控下不断反馈和加强。而正常小梁细胞不表达IL-1 $\alpha$ 及ELAM-1,仅有极少量的IL-1 $\beta$ 和IL-6分泌。ELAM-1是青光眼的小梁网特异性标志分子,可能在跨膜信号传导和信号通路的激活中起着重要作用。这些炎症因子的短暂激活可能有一定的保护作用,但如果炎症持续可以引起小梁网细胞的损害和凋亡。ATF4介导细胞内多个炎症信号传导的级联反应通路。在人主动脉内皮细胞,ATF4参与磷酸胆碱对IL6、IL8、MCP1的激活<sup>[10]</sup>。在视网膜Müller细胞,ATF4介导高糖和缺氧诱导的炎症因子ICAM-1、VEGF的表达,参与高糖和缺氧对HiF1 $\alpha$ 的调控,并通过激活JNK参与高糖诱导的VEGF的激活<sup>[14]</sup>。本研究结果提示,激活小鼠小梁网ATF4的表达,可以上调多种炎症因子,以及刺激青光眼标记分子ELAM-1的表达,提示ATF4在小梁网细胞参与了炎症因子IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6及ELAM-1的调控。我们在实验中还观察到,小梁网组织IL-1 $\alpha$ 表达的上调可以持续到注射后的第10天。炎症因子的持续上调在小梁

网细胞的凋亡中可能有一定作用。

轻度而短暂的内质网应激有助于保护细胞,然而持续、过度的内质网应激将破坏内质网的稳态,引发细胞凋亡。内质网应激可能参与青光眼视网膜节细胞及小梁网细胞的死亡机制。缺血-再灌注损伤及慢性青光眼动物的视网膜节细胞都有内质网标记分子表达<sup>[27-28]</sup>。体外和体内实验表明,内质网应激激活可以引发视网膜节细胞的凋亡。玻璃体内注射衣霉素可以引起视网膜节细胞的丧失和内层视网膜的变薄<sup>[29]</sup>。在Y437H MYOC基因变异的POAG小鼠模型中,使用内质网应激的保护剂,可以明显减少小梁网细胞的凋亡及降低眼压<sup>[20]</sup>。在本研究结果中,小梁网组织ATF4过表达后,CHOP的表达随之上调,伴有小梁网细胞凋亡的增加。CHOP是内质网诱导的细胞凋亡的主要介质蛋白,参与转录调节大量的促凋亡和抗凋亡基因,包括Bcl-1、GADD34和TRB3。CHOP直接结合于TRB3基因的启动子,激活TRB3,进而抑制AKT的活化,导致凋亡和细胞死亡<sup>[30]</sup>。我们的研究结果提示,ATF4是CHOP的诱导因子,可以通过激活CHOP,引发小梁网细胞的凋亡。

综上所述,小梁网组织ATF4的激活可以引起炎症因子表达的上调,内质网相关凋亡通路的活化,以及小梁网细胞的凋亡。这些改变可能在小鼠小梁网细胞功能障碍,以及眼压的升高中起到一定作用。进一步阐明ATF4在小梁细胞功能障碍中的作用机制,有助于为POAG寻找更有效的治疗靶点和药物提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3): 262-267.
- [2] Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, et al. Primary open-angle glaucoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(11): 1113-1124.
- [3] Stamer WD, Acott TS. Current understanding of conventional outflow dysfunction in glaucoma [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2012, 23(2): 135-143.
- [4] Anholt RR, Carbone MA. A molecular mechanism for glaucoma: Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(10): 586-593.
- [5] Maddineni P, Kasetti RB, Zode GS. Methods for analyzing endoplasmic reticulum stress in the trabecular meshwork of glaucoma models [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1695(9): 121-134.
- [6] 葛坚. 青光眼和近视眼的分子机制及干预研究 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2010, 31(2): 154-160, 165.  
Ge J. Molecular mechanisms and interference strategies of glaucoma and myopia [J]. *J Sun Yat-sen Univ(Med Sci)*, 2010, 31(2): 154-160, 165.
- [7] Hettmann T, Barton K, Leiden TM. Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2

- transcription factor [J]. *Dev Biol*, 2000, 222(1): 110-123.
- [8] Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(3): 619-633.
- [9] Ma TJ, Lan DH, He SZ, et al. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative and ER stress: The ATF4 may be involved [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 169(8): 28-37.
- [10] Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, et al. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(11): 2490-2496.
- [11] Wang Y, Gao S, Zhu Y, et al. Elevated activating transcription factor 4 and glucose-regulated 78 Kda protein levels correlate with inflammatory cytokines in the aqueous humor and vitreous of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(8): 1202-1208.
- [12] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529.
- [13] Kim MH, Aydemir TB, Cousins RJ. Dietary zinc regulates apoptosis through the phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha/activating transcription factor-4/C/EBP-homologous protein pathway during pharmacologically induced endoplasmic reticulum stress in livers of mice [J]. *J Nutr*, 2016, 146(11): 2180-2186.
- [14] Zhong YM, Li JM, Chen YM, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes [J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 492-504.
- [15] Gonzalez P, Epstein DL, Luna C, et al. Characterization of free-floating spheres from human trabecular meshwork (HTM) cell culture in vitro [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(6): 959-967.
- [16] Tektas OY, Lutjen-Drecoll E. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(4): 769-775.
- [17] Peters JC, Bhattacharya S, Clark AF, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in human glaucomatous trabecular meshwork cells and tissues [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(6): 3860-3868.
- [18] Zode GS, Sharma AB, Lin X, et al. Ocular-specific ER stress reduction rescues glaucoma in murine glucocorticoid-induced glaucoma [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5): 1956-1965.
- [19] Kalouche G, Boucher C, Coste A, et al. Prostaglandin EP2 receptor signaling protects human trabecular meshwork cells from apoptosis induced by ER stress through down-regulation of p53 [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2016, 1863(9): 2322-2332.
- [20] Zode GS, Kuehn MH, Nishimura DY, et al. Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3542-3553.
- [21] 王蔚东. 内质网应激与肾脏疾病 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(2): 196-203.
- Wang WD. Endoplasmic reticulum stress and kidney diseases [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(2): 196-203.
- [22] Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response [J]. *Physiol (Bethesda)*, 2007, 22(22): 193-201.
- [23] Merksamer PI, Papa FR. The UPR and cell fate at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 7): 1003-1006.
- [24] Lange PS, Chavez JC, Pinto JT, et al. ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(5): 1227-1242.
- [25] Wang N, Chintala SK, Fini ME, et al. Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype [J]. *Nat Med*, 2001, 7(3): 304-309.
- [26] Khalef N, Labib H, Helmy H, et al. Levels of cytokines in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract [J]. *Electr Physician*, 2017, 9(2):