

嘌呤受体 P2X₇ 激活谷氨酸受体 NMDA 引起 视网膜神经节细胞凋亡

张秀兰¹, 张梅², 胡慧玲¹, Claire H. Mitchell³, 葛坚¹

(1. 眼科学国家重点实验室//中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 厦门大学医学院眼科研究所厦门眼科中心, 福建 厦门 361005; 3. 宾夕法尼亚大学医学院生理学系, 美国 费城 19104)

摘要: 【目的】研究嘌呤受体 P2X₇ 和谷氨酸受体 NMDA 激活诱导大鼠视网膜神经节细胞(RGC)凋亡的相互作用机制。【方法】对新生 Long-Evan 大鼠进行上丘注射荧光标记物 Aminostilbamidine 标记 RGC, NMDA受体通道拮抗剂 MK-801、APV 和 Memantine 分别与 P2X₇受体激动剂 BzATP 共培养, 检测它们对体外培养 RGC 存活率的影响; 未经 Aminostilbamidine 标记的新生大鼠 RGC, 以 10 μmol/L 钙离子(Ca²⁺) 荧光染料 Fura-2 标记后, 利用 Ca²⁺影像测定仪分别测定 BzATP 及三种 NMDA 拮抗剂对 RGC 胞内 Ca²⁺浓度的影响。【结果】(1) 三种 NMDA 拮抗剂均不同程度阻断 BzATP 引起的 RGC 凋亡。BzATP 在 50 μmol/L 浓度下, 约杀死 (36% ± 2%) 的 RGC, 而 MK-801 (10 μmol/L)、APV (100 μmol/L) 和 Memantine (100 μmol/L) 则均可明显减轻 BzATP 对 RGC 的毒性作用, 使 RGC 存活率分别提高至 (96% ± 4%, P < 0.001)、(80% ± 5%, P = 0.010) 和 (76% ± 9%, P = 0.144)。(2) BzATP 可引起 RGC 胞内 Ca²⁺持续升高, 在 50 μmol/L 浓度下可使胞内 Ca²⁺升高至 (1183 ± 109) nmol/L。而 MK-801 (10 μmol/L)、APV (300 μmol/L) 和 Memantine (30 μmol/L) 则均可显著降低 BzATP 介导的 Ca²⁺升高幅度, 分别为 (76% ± 7%, P = 0.003)、(51% ± 17%, P = 0.033) 和 (55% ± 16%, P = 0.025)。【结论】NMDA 受体拮抗剂可阻断嘌呤受体 P2X₇ 激活诱导的 RGC 凋亡。P2X₇受体和 NMDA 受体通道激活可能共同介导着兴奋性神经毒作用且 P2X₇在 NMDA 受体的上一环节先起作用。

关键词: 视网膜神经节细胞; P2X₇受体; NMDA

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0490-05

P2X₇ Receptor Activation Kills Retinal Ganglion Cell Mediated by NMDA Receptor Stimulation

ZHANG Xiu-lan¹, ZHANG Mei², HU Hui-ling¹, Claire H. MITCHELL³, GE Jian¹

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Eye Institute and Xiamen Eye Center, Xiamen University Medical School, Xiamen 361005, China; 3. Department of Physiology, The University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, 19104 USA)

Abstract: 【Objective】To demonstrate if P2X₇ receptor and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor link to initiate retinal ganglion cells (RGC) death. 【Methods】(1) Long-Evan neonatal rats were back labeled with Aminostilbamidine to identify RGC. RGC cell viability was then examined using P2X₇ receptor agonist BzATP and NMDA receptor antagonists MK-801, APV and Memantine. (2) RGC were dissociated from the retinas of unlabeled neonatal rats and were loaded with Fura-2, an intracellular calcium indicator. BzATP and three NMDA receptor antagonists were applied to RGC to examine their effects on intracellular Ca²⁺ levels using Ca²⁺ imaging system. 【Results】(1) BzATP (50 μmol/L) could kill about (36% ± 2%) of the RGC. Cell death was prevented by MK-801 (10 μmol/L), APV (100 μmol/L) and Memantine (100 μmol/L) with a increasing the cell viability of (96% ± 4%) (P < 0.001), (80% ± 5%, P = 0.010) and (76% ± 9%, P = 0.144), respectively. (2) BzATP (50 μmol/L) led to a large, sustained increases of intracellular Ca²⁺ (1183 ± 109) nmol/L. Calcium influx triggered by BzATP was attenuated by pre- and co-incubation of MK-801 (10 μmol/L), APV (300 μmol/L) and Memantine (30 μmol/L) with (76% ± 7%, P = 0.003), (51% ± 17%, P = 0.033) and (55% ± 16%, P = 0.025), respectively. 【Conclusions】Stimulation of P2X₇ receptor leads RGC to death may upstream act on NMDA receptors. It implicates that both P2X₇ and NMDA receptor are in excitotoxic death of RGC.

Key words: retinal ganglion cell; P2X₇ receptor; N-methyl-D-aspartate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):490-494]

收稿日期: 2007-06-07

基金项目: 广东省科技计划国际合作项目(2006B60501003); 广州市科技计划项目(2006J1-C0051)

作者简介: 张秀兰(1964-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: xiulan_z@yahoo.com

青光眼高眼压最终导致视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGC) 凋亡。兴奋性神经毒谷氨酸 (Glutamate) 升高、N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体激活是引起 RGC 凋亡的重要原因^[1]。前期研究已证实高眼压^[2,3]可引起嘌呤信号 ATP 释放, 激活嘌呤受体 P2X₇ 导致 RGC 细胞内钙离子 (Ca²⁺) 浓度升高^[4-7]、细胞凋亡^[4]和 RGC 释放出谷氨酸^[7]。为进一步探讨 P2X₇ 与 NMDA 受体在介导 RGC 凋亡机制中的相互作用关系, 本文进行了如下研究。

1 材料与方法

1.1 RGC 标记及 RGC 体外培养

购买怀孕 Long-Evan 大鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 饲养, 取生后第 4-6 天新生鼠, 按本实验室成熟的技术^[6], 从上丘注射荧光染料 Aminostilbamidine (Molecular Probes, Eugene, OR), 逆行标记 RGC。注射后 2~8 d 内将动物给予过量麻醉药处死幼鼠, 摘取眼球, 分离视网膜, 按 RGC 体外培养方法^[6]获得 RGC 细胞悬液, 进行 24 h 培养。

1.2 RGC 细胞存活率的测定

取 5 只来自不同母鼠的幼鼠进行 P2X₇ 与 NMDA 受体相互作用的实验。将每个培养板内的 12 个盖玻片分为 3 组, 每组 4 孔: 4 孔为对照组, 不含任何药物; 4 孔含 P2X₇ 受体激动剂 BzATP (50 μmol/L); 4 孔先加入 NMDA 受体通道拮抗剂 MK-801 (10 μmol/L) 或 APV (100 μmol/L) 或 Memantine (100 μmol/L), 在 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 30 min, 进行预处理, 然后加入 BzATP (50 μmol/L)。最佳浓度由预实验获得。加药后培养板置于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 然后将盖玻片取出, 置于荧光显微镜 (Nikon Eclipse E600) 下, 计数荧光标记的 RGC。存活的 RGC 细胞胞体发绿色荧光, 胞浆内含发黄绿色强荧光的不规则颗粒。在 40× 高倍显微镜下计数 80 个视野内存活的 RGC。细胞计数由固定的实验人员完成。计数时采用单盲法: 计数前由另一实验员将盖玻片进行随机编号, 计数人员对所计数玻片的处理不知情。

1.3 RGC 胞内 Ca²⁺浓度的测定

同前法培养 RGC^[6], 但 RGC 事先不用荧光染料标记。细胞内 Ca²⁺浓度测定: 细胞培养 24 h 后, 加入 10 μmol/L 钙离子荧光标记物 Fura-2 和 200

mg/L pluaronic (Molecular Probes, Eugene, Oregon), 室温下孵育 60 min。将盖玻片取出置于 Ca²⁺测定影像仪上 (PTI, Photon Technologies International, Inc., Lawrenceville, NJ), 进行单个 RGC 胞内 Ca²⁺浓度的测定。获取 Ca²⁺影像时, 盖玻片分别用 340 nm 和 380 nm 光源激发, 选定的视野内 (RGC 所在区域) > 520 nm 的发射光被系统捕获。Ca²⁺浓度由 340 nm 和 380 nm 激发下测定的荧光强度的比率换算而得 (配套软件 ImagMaster and Flix software, PTI, Inc.)。灌注液 (pH 7.4) 含 105 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl, 2.8 mmol/L Na-Hepes, 7.2 mmol/L Hepes acid, 1.3 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L Glucose, 75 mmol/L Mannitol。校正液 (pH 8.0) 含 5 μmol/L ionomycin 和 5 mol/L EGTA。所有实验均在室温下进行。被检测的 RGC 取自 4 只来源于不同母鼠的幼鼠。

进行单独 BzATP 实验时, 每次加入 BzATP (50 μmol/L) 15 s, 之间用灌注液冲洗 6 min, 在同一细胞上重复 4 次, 获取可重复性的波峰; 进行 NMDA 拮抗剂阻断 BzATP 作用实验时, 分别用三种不同拮抗剂 MK-801 (10 μmol/L)、APV (300 μmol/L) 和 Memantine (30 μmol/L), 最佳浓度亦由预实验获得。加入 BzATP (50 μmol/L) 15 s 后, 用灌注液冲洗 3 min, 接着分别加入三种不同拮抗剂 3 min。后再给予 BzATP (50 μmol/L) 15 s。在同一细胞上实验重复 2 次, 获取可重复性的波峰。

1.4 数据处理

数据表达为平均值 ± 标准误。采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理和分析。应用独立样本 t 检验检测组间差异。对于细胞活性实验研究, 实验次数 (n) 表示每次 80 个视野的载玻片个数。因每次实验获取 RGC 浓度不同, 每次 RGC 计数结果先经标准化再列入统计学分析: 每个载玻片中 RGC 的百分比 = (80 个视野的 RGC 总数 / 当次实验对照组 RGC 数的平均值) × 100%。对 Ca²⁺影像测定, n 为测定的细胞个数。设定 P < 0.05 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 NMDA 受体拮抗剂阻断 P2X₇ 受体激动剂 BzATP 介导的 RGC 胞内 Ca²⁺升高作用
P2X₇ 受体激动剂 BzATP 可引起 RGC 胞内 Ca²⁺显著升高^[4,6]。本研究应用 50 μmol/L BzATP 作用 15

s, RGC 胞内 Ca^{2+} 最大可升高至 (1183 ± 109) nmol/L。移除 BzATP 后, 用灌注液冲洗 6 min, 待胞内 Ca^{2+} 浓度稳定后给予第 2 次刺激, 胞内 Ca^{2+} 又升高, 重复 3-4 次得到可重复均一波峰, BzATP 反应的平均峰值为 (904 ± 95) nmol/L ($n = 8$, 图 1A)。

NMDA 受体拮抗剂可阻断 BzATP 介导的 Ca^{2+} 升高: 分别用三种不同拮抗剂 MK-801 ($10 \mu\text{mol/L}$)、APV ($300 \mu\text{mol/L}$) 和 Memantine ($30 \mu\text{mol/L}$) 进行实验。如先用 BzATP ($50 \mu\text{mol/L}$) 15 s 后, 得到第一个 RGC 胞内 Ca^{2+} 升高的波峰, 峰值为 (468 ± 154) nmol/L, 用灌注液冲洗 3 min, 接着 MK-801 ($10 \mu\text{mol/L}$) 预处理 3 min 后, 给予 $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP 刺激 15 s, 得到第 2 个 RGC 胞内 Ca^{2+} 升高的波峰, 峰值为 (69 ± 13) nmol/L。为了更客观地观察 MK-801 的作用, 在同一细胞再重复上述实验, 分别得到第 3 和第 4 个波峰, 峰值分别为 (296 ± 89) nmol/L、 (72 ± 22) nmol/L (图 1B)。将图 1B 中两次 MK-801 作用下 BzATP 的反应高峰的平均值 (70 ± 12) nmol/L 与两次单独 BzATP 刺激的反应高峰的平均值 (382 ± 117) nmol/L 进行比较, MK-801 ($10 \mu\text{mol/L}$) 可显著降低 BzATP 介导的 Ca^{2+} 升高幅度达 $(76\% \pm 7\%, n = 4, t = 4.739, P = 0.003)$ 。同法进行 APV ($300 \mu\text{mol/L}$) 和 Memantine ($30 \mu\text{mol/L}$) 的实验, 得到图 1C 和 1D, 两者分别降低 BzATP 介导的 Ca^{2+} 升

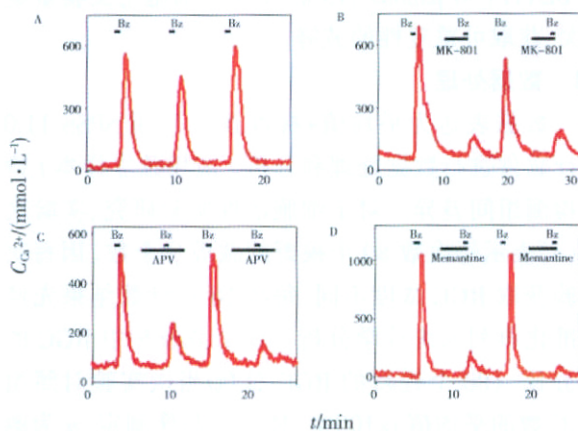


图 1 NMDA 受体拮抗剂阻断 BzATP 介导的 RGCs Ca^{2+} 升高作用

Fig.1 NMDA receptor antagonists reduce Ca^{2+} elevation triggered by P2X₇ receptor agonist BzATP in RGCs.

A: Application of $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP (Bz) for 15 s led to a large increase in Ca^{2+} levels with multiple responses; B: Application of $10 \mu\text{mol/L}$ MK-801 reduced the Ca^{2+} elevation triggered by $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP; C, D: A similar response was found with $300 \mu\text{mol/L}$ APV and with $30 \mu\text{mol/L}$ Memantine, respectively; Horizontal bars: duration of drugs application

高幅度为 $(51\% \pm 17\%, n = 4, t = 2.760, P = 0.033)$ 、 $(55\% \pm 16\%, n = 11, t = 2.436, P = 0.025)$ 。三组数据均表明 NMDA 受体拮抗剂可阻断 BzATP 介导的 Ca^{2+} 升高。

2.2 NMDA 受体拮抗剂减少 P2X₇ 受体激活剂 BzATP 介导的 RGC 凋亡

对事先用荧光染料 Aminostilbamide 标记的幼鼠 RGC 进行原代培养。已知与 $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP 共同孵育 24 h 后, RGC 数量较正常对照组明显减少 (图 2A、B), 呈剂量依赖性, 且细胞以凋亡形式死亡。本实验 $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP 组 RGC 的数量为对照组的 $(64\% \pm 2\%)$ 。事先分别用 NMDA 受体通道

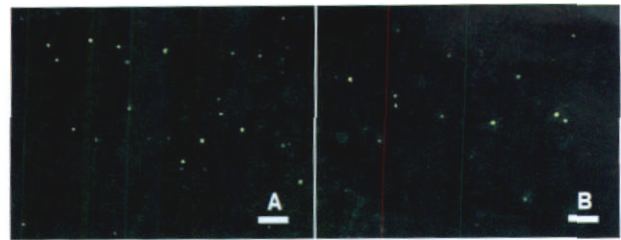


图 2 BzATP 对外体培养的 RGCs 的作用

Fig.2 The effect of BzATP on RGCs viability

A. The fluorescence labeled RGCs was exposed to control culture medium for 24 h ($\times 100$). B. The number of labeled cells was decreased after being exposed to $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP for 24 h ($\times 100$)

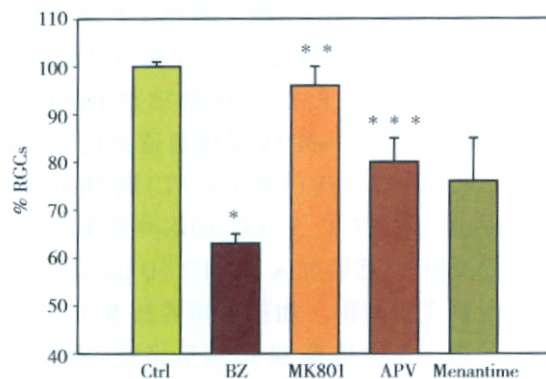


图 3 NMDA 受体拮抗剂减少 BzATP 介导的 RGCs 凋亡
Fig. 3 NMDA antagonists reduce RGCs death triggered by BzATP

While incubation with $50 \mu\text{mol/L}$ BzATP for 24 h reduced $(36\% \pm 2\%)$ of surviving of retinal ganglion cells compared to that in control solution (* -differ from control alone, control was indicated as "Ctrl", BzATP was indicated as "Bz", Student's t test, $n = 42, t = 5.02, P < 0.001$), this loss was prevented by $10 \mu\text{mol/L}$ MK-801 (** -differ from BzATP alone, Student's t test, $n = 15, t = -5.794, P < 0.001$). The antagonist APV ($100 \mu\text{mol/L}$) also increased cell survival (***) -differ from BzATP alone, Student's t test, $n = 15, t = -2.746, P = 0.010$). At $100 \mu\text{mol/L}$, Memantine did not show significant neuroprotection ($n = 15, t = -1.504, P = 0.144$)

拮抗剂 MK-801 (10 μmol/L)、APV (100 μmol/L) 和 Memantine (100 μmol/L) 孵育 30 min, 再与 BzATP 共同孵育 24 h。MK-801 (10 μmol/L) 和 APV (100 μmol/L) 使 BzATP 诱导的 RGC 凋亡数目大大减少, 存活率上升, 但 Memantine (100 μmol/L) 的作用较弱 (图 3)。

3 讨 论

3.1 嘌呤研究的进展

嘌呤和嘌呤受体是重要的调节递质影响着中枢和周围神经系统功能^[4], 近年来成为神经科学领域研究的热点之一。

嘌呤家族分为 P₁、P₂ 两大类。P₁ 代表着以腺苷 (Adenosine) 及其 A₁、A_{2A}、A_{2B} 和 A₃ 受体的一类核苷; P₂ 家族包括 ATP 及其核苷酸受体 P2X₁₋₇ 和 P2Y₁₋₆, 其中, P2X₇ 受体是近年来发现的、有独特特点的受体, 在钙离子 (Ca²⁺) 内流、细胞凋亡等方面起重要作用^[5-10]。研究表明哺乳类及鼠视网膜神经元含有 P2X₁₋₇ 的受体表达, 尤其 RGC 层有 P2X₇ 的存在^[11]。近年来研究发现 P2X₇ 受体的激活参与了大量视网膜疾病的发生、发展^[12-14]。例如在玻璃体视网膜病变中, P2X₇ 受体的表达增加^[12]; 受体的激活可引起视网膜周细胞收缩^[14]。

我们已有的研究阐明了 ATP 受体 P2X₇ 激活是导致 RGC 凋亡的重要环节^[5-8], 提出青光眼视神经损伤嘌呤调节的可能机制: 青光眼高眼压引起嘌呤信号 ATP 释放^[2-3], 作用于视网膜细胞上 P2X₇ 受体, 引起 Ca²⁺ 内流导致 RGC 凋亡^[5]。将嘌呤调节引入青光眼中研究, 为探讨青光眼发病机制提供了新的思路与途径。

3.2 NMDA 与青光眼发病机制

青光眼是由病理性高血压引起, 以 RGC 死亡、视功能逐渐丧失为主要特征的一种进行性视神经病变。RGC 以凋亡的形式死亡, 但目前 RGC 凋亡的机制尚未完全清楚。

有学说认为升高的眼内压可能降低了视神经乳头的血流灌注, 但在没有眼内压升高的视网膜动脉阻塞的病例中, 却没有见到在青光眼中应见到的同样改变, 表明在正常的血管弹性下, 单纯血管因素是不足以引起 RGC 死亡的; 另有人认为, 升高的眼内压也可能因为扩张了视神经乳头筛板从而抑制了神经营养因子诸如脑源性 BDNF 等的轴浆运

输, 但研究发现 RGC 的死亡可以先于神经营养因子的缺乏, 这表明 RGC 的死亡在早期可能胞体早有变化, 后因神经营养因子的缺乏而加速了死亡进程。另一理论涉及的是兴奋性神经毒损伤: 兴奋性神经毒谷氨酸 (Glutamate) 升高、NMDA 受体激活引起 RGC 细胞内 Ca²⁺ 升高导致细胞死亡^[1]。尽管目前对此学说仍未完全肯定^[15, 16], 但可重复性的研究证实谷氨酸受体激动剂确实对 RGC 表现出毒性作用^[1, 17, 18]。临床和基础研究表明谷氨酸受体 NMDA 拮抗剂 Memantine 能预防压力诱导的 RGC 死亡, 提示谷氨酸在青光眼发生发展中起一定作用^[19]。然而, 升高的眼内压是如何产生过量的谷氨酸去过激 NMDA 受体还不清楚, 最初有研究报道, 降低谷氨酸转运子水平并不能逆转这一作用^[19, 20]。

3.3 P2X₇ 受体/NMDA 受体在青光眼发病机制中的作用

研究已表明, 嘌呤信号转导在高眼压致谷氨酸增高的过程中起重要中介调节作用。首先高眼压可引起 ATP 释放。实验发现, 压力、损伤、应激等均可刺激嘌呤信号 ATP 的释放^[2, 3, 22, 23], 如轻度的压力可导致内层视网膜星状细胞释放出 ATP^[22], 眼内压升高可检测到视网膜持续的释放出 ATP^[2, 3]。我们将剪去眼前段的新鲜牛眼放入自制压力容器中, 牛眼杯内 ATP 浓度随压力升高而增高^[2]。另外, 在激光诱导的实验性猴青光眼模型中检测到玻璃体腔 ATP 水平的增高^[2]。最近在临床高眼压青光眼病人房水中也证实有 ATP 释放 (数据待发表)。

ATP 受体 P2X₇ 激活可导致 RGC 凋亡^[1-3, 5-8]。关键的研究显示 P2X₇ 受体激活可诱发出视网膜星状细胞^[25]和 RGC^[9]释放出谷氨酸 (Glutamate)。因此, 眼内压力、P2X₇ 受体、谷氨酸释放及 NMDA 受体之间可能存在一定的相互作用, 而明确其相互作用机制可能是理解 RGC 死亡和保护的关键部分。

本研究结果显示, 三种 NMDA 受体拮抗剂 MK-801、APV 和 Memantine 均可阻断 P2X₇ 受体激动剂 BzATP 介导的 RGC 胞内 Ca²⁺ 升高作用和减少体外培养的 BzATP 介导的 RGC 死亡数量。有力地说明, P2X₇ 与 NMDA 受体之间可能共同介导着 RGC 兴奋性神经毒损伤机制, 且 P2X₇ 在 NMDA 受体的上一环节先起作用。

参考文献:

- [1] LEI A Z, ZHANG D, ABELE A E, et al. Blockade of

- NMDA receptor mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} prevent neurotoxicity [J]. *Brain Res*, 1992, 598(1-2): 196-202.
- [2] ZHANG X, REIGADA D, MITCHELL C H. Increased ocular pressure increases vitreal levels of ATP. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(8): 426-428.
- [3] MITCHELL C H, ZHANG X, REIGADA D, et al. Pressure-induced ATP release may stimulate $P2X_7$ receptors to trigger retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8): 2083-2085.
- [4] 朱永红, 李海标, 黄嘌呤抗神经切断后视网膜细胞凋亡的作用 [J]. *解剖学研究*, 2001, 23(4): 295-297.
- [5] ZHANG X, ZHANG M, LATIES A M, et al. Stimulation of $P2X_7$ receptor elevated Ca^{2+} and kills retinal ganglion cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(6): 2183-2191.
- [6] ZHANG X, ZHANG M, MITCHELL C H. Adenosine prevents death of retinal ganglion cells following $P2X_7$ receptor activation by acting the A3 receptors [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(2): 566-575.
- [7] 张秀兰, 张梅, 葛坚, 等. 嘌呤受体 $P2X_7$ 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.
- [8] MITCHELL C H, ZHANG M, ZHANG X, et al. Neuronal death evoked by the $P2X_7$ receptor mediated by the NMDA receptor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(8): 2589-2594.
- [9] GORODESKI G I. Estrogen attenuates $P2X_7$ - R - mediated apoptosis of uterine cervical cells by blocking calcium influx [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004, 23(8-9): 1287-1293.
- [10] YOON M J, LEE H J, LEE Y S, et al. Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 671-676.
- [11] PUTHUSSERY T, FLETCHER E L. Synaptic localization of $P2X_7$ receptors in the rat retina [J]. *J Comp Neurol*, 2004, 472(1): 13-23.
- [12] SUGIYAMA T, OKU H, KOMORI A, et al. Effect of $P2X_7$ receptor activation on the retinal blood velocity of diabetic rabbits [J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124(8): 1143-1149.
- [13] BRINGMANN A, PANNICKE T, MOLL V, et al. Upregulation of $P2X_7$ receptor currents in müller glial cells during proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(3): 860-867.
- [14] SUGIYAMA T, KAWAMURA H, YAMANISHI S, et al. Regulation of $P2X_7$ - induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(3): C568-576.
- [15] ULLIAN E M, BARKIS W B, CHEN S, et al. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 26(4): 544-557.
- [16] LUO X, BABA A, MATSUDA T, et al. Susceptibilities to and mechanisms of excitotoxic cell death of adult mouse inner retinal neurons in dissociated culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(12): 4576-4582.
- [17] LAN Y W, ISHII Y, PALMER K E, et al. 2-Deoxy-D-glucose protects retinal ganglion cells against excitotoxicity [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(18): 2369-2372.
- [18] MANABE S, LIPTON S A. Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina [J]. *Invest ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(1): 385-392.
- [19] WOLDEMUSSIE E, YOLES E, SCHWARTZ M, et al. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats [J]. *J Glaucoma*, 2002, 11(6): 474-480.
- [20] WOLDEMUSSIE E, WIJONO M, RUIZ G. Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats [J]. *Glia*, 2004, 47(2): 109-119.
- [21] HARTWICK A T, ZHANG X, CHAUHAN B C, et al. Functional assessment of glutamate clearance mechanisms in a chronic rat glaucoma model using retinal ganglion cell calcium imaging [J]. *J Neurochem*, 2005, 94(3): 794-807.
- [22] NEWMAN E A. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and müller cells [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(7): 2215-2223.
- [23] SANTOS P F, CAMELO O L, CARVALHO A P, et al. Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons [J]. *J Neurobiol*, 1999, 41(3): 340-348.
- [24] BUMSTOCK G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction [J]. *J Anat*, 1999, 194(Pt 3): 335-342.
- [25] DUAN S, ANDERSON C M, KEUNG E C, et al. $P2X_7$ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1320-1328.

(编辑 刘清海)