

# 嘌呤受体 P2X<sub>7</sub> 激活介导大鼠视网膜神经节 细胞死亡的实验研究

张秀兰<sup>1</sup>, 张梅<sup>1</sup>, 葛坚<sup>1</sup>, Claire H. Mitchell<sup>2</sup>

(1. 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 宾夕法尼亚大学医学院生理系, 美国 费城 19104)

**摘要:**【目的】研究嘌呤受体 P2X<sub>7</sub> 激动剂、拮抗剂对大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)的影响。【方法】(1)对新生 Long-Evan 大鼠进行上丘注射荧光标记物 Aminostilbamidine 以标记 RGCs, 检测 P2X<sub>7</sub> 激动剂 BzATP (0、50、100、500 μmol/L) 和特异性拮抗剂 OxATP (100 μmol/L) 对体外培养 RGCs 存活率的影响 (2)体外培养未经 Aminostilbamidine 标记的新生大鼠 RGCs, 以 10 μmol/L 钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 荧光染料 Fura-2 标记后, 利用 Ca<sup>2+</sup> 影像测定仪分别测定 P2X<sub>7</sub> 激动剂 BzATP (50 μmol/L) 和拮抗剂 OxATP (100 μmol/L) 对 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响。【结果】P2X<sub>7</sub> 受体激动剂 BzATP 可引起体外培养的 RGCs 死亡, 反应呈剂量依赖性, EC<sub>50</sub> = 35 μmol/L。在 50 μmol/L 浓度下, BzATP 约杀死 30% 的 RGCs; 而 100 μmol/L OxATP 则可明显减轻 BzATP 对 RGCs 的毒性作用, 使 RGCs 存活率从 77% ± 4% 提高至 96% ± 3% (P < 0.001)。BzATP 可引起 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup> 持续升高, 在 50 μmol/L 浓度下可使胞内 Ca<sup>2+</sup> 升高 (1022 ± 113) nmol/L。在 OxATP 作用下, BzATP 介导的 Ca<sup>2+</sup> 升高幅度显著降低, 仅升高 (63 ± 13) nmol/L (P < 0.001)。【结论】嘌呤能 P2X<sub>7</sub> 受体激活可导致大鼠视网膜神经节细胞死亡和胞内钙离子浓度升高。

关键词: 视网膜神经节细胞; P2X<sub>7</sub> 受体; 钙离子

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0130-05

## An Experimental Study on Lethal Effect of P2X<sub>7</sub> Receptor Activation on Rat Retinal Ganglion Cell

ZHANG Xiu-lan<sup>1</sup>, ZHANG Mei<sup>1</sup>, GE Jian<sup>1</sup>, Claire H. MITCHELL<sup>2</sup>

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Physiology, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA19104, USA)

**Abstract:** 【Objective】To study the effects of the agonist and the antagonist of the purinergic P2X<sub>7</sub> receptor on rat retinal ganglion cells (RGCs). 【Methods】(1) Long-Evan neonatal rats were back labeled with Aminostilbamidine to identify RGCs. The effect of P2X<sub>7</sub> receptor stimulation on RGCs cell viability was then examined using P2X<sub>7</sub> receptor agonist BzATP (0, 50, 100, 500 μmol/L) and antagonist OxATP (100 μmol/L). (2) Retinal ganglion cells were dissociated from the retinas of unlabeled neonatal rats and were loaded with Fura-2, an intracellular calcium indicator. P2X<sub>7</sub> agonist BzATP (50 μmol/L), antagonist OxATP (100 μmol/L) were applied to RGCs to examine their effects on intracellular Ca<sup>2+</sup> levels using Ca<sup>2+</sup> imaging system. 【Results】P2X<sub>7</sub> receptor agonist BzATP killed RGCs in a concentration-dependent pattern with a EC<sub>50</sub> of 35 μM. Under the concentration of 50 μmol/L, BzATP could kill about 30% of the RGCs. Cell death was prevented by P2X<sub>7</sub> antagonists OxATP, increasing the cell viability from 77% ± 4% to 96% ± 3% (P < 0.001). BzATP (50 μmol/L) led to a large, sustained increases of intracellular Ca<sup>2+</sup> (1022 ± 113 nmol/L). Calcium influx triggered by BzATP was attenuated by pre- and co-incubation of P2X<sub>7</sub> antagonist OxATP with a slight increase of (63 ± 13) nmol/L (P < 0.001). 【Conclusions】The activation of purinergic P2X<sub>7</sub> receptor can cause rat retinal ganglion cell death and the increase of intracellular calcium.

Key words: retinal ganglion cell; P2X<sub>7</sub> receptor; calcium

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):130-134]

收稿日期 2005-11-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471850); 广东省自然科学基金资助项目(04009334); 教育部回国人员科研启动基金资助项目(200555)

作者简介: 张秀兰(1964-), 女, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师. E-mail: xiulan\_z@yahoo.com

嘌呤物质及其受体的研究近年来在国内外神经科学领域蓬勃发展<sup>[1,2]</sup>。近年来的研究发现, P2X<sub>7</sub> 受体与视网膜的功能密切相关<sup>[3-7]</sup>, 在钙离子内流、细胞凋亡等方面起重要作用<sup>[7,8]</sup>。已证实, P2X<sub>7</sub> 受体主要在分布在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 层<sup>[5,6]</sup>。然而, 对受体激活后引起 RGCs 功能变化的研究很少。初步的研究用 ATP 类似物刺激体外培养的大鼠 RGCs 得到了内向的电流<sup>[7]</sup>, 但还未能对特异性拮抗剂的作用进行深入研究。本研究通过生理学方法研究 P2X<sub>7</sub> 受体激活对 RGCs 的影响及其机制, 发现 P2X<sub>7</sub> 激动剂 BzATP 可引起 RGCs 细胞内钙离子浓度升高和 RGCs 死亡; 拮抗剂氧化 ATP (oxidized ATP, OxATP) 可拮抗这一过程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 RGCs 标记

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, 全身麻醉下 (50 mg/kg Ketamine, 5 mg/kg xylazine) 从上丘注射荧光染料 Aminostilbamidine (Molecular Probes, Eugene, OR), 逆行标记 RGCs: 在对应上丘所在位置的头颅处用电钻各钻一个直径 1 mm 的小孔, 暴露上丘表面的脑皮质, 用显微注射针 (Hamilton, Reno, NV) 向两侧上丘各注入 2.5  $\mu$ L 荧光染料, 注射深度 1~2 mm, 药物停留时间 2 min。注射后 2~8 d 内将动物用同样方法麻醉后给予过量麻醉药处死幼鼠, 摘取眼球, 分离视网膜, 按下述方法获得 RGCs 细胞悬液, 进行培养。

### 1.2 RGCs 体外培养

分离的视网膜用 Hanks 平衡盐溶液冲洗 (HBSS, Gibco, Carsbad, CA), 置于含有 4.5 U/mL 木瓜蛋白酶水解酶的 Hanks 平衡盐溶液中, 37  $^{\circ}$ C 下消化 12 min。用 Hanks 平衡盐溶液冲洗 2 遍后, 留 1 ml Hanks 平衡盐溶液, 用 1 000  $\mu$ L 加样器将视网膜吹打 30~50 次, 使其成为细胞混悬液, 加入 12 mL 细胞培养液, 混匀, 然后将视网膜细胞混悬液接种在置于 24 孔细胞培养板中的直径为 12 mm 盖玻片上, 盖玻片事先经多聚左旋赖氨酸预处理。然后将培养板置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。本研究所用细胞培养液为

神经细胞培养液 (neurobasal medium, Life Technologies Inc.), 并加入以下成分: 7 mL/L 甲基纤维素 (methylcellulose) 2 mmol/L 谷氨酰胺 (glutamine), 100 mg/L 庆大霉素 (gentamycin), 25 mL/L 大鼠血清和 25 mL/L B<sub>27</sub> 补充剂。本研究中谷氨酰胺、大鼠血清及 B<sub>27</sub> 为每次实验前临时加入。

### 1.3 RGCs 细胞存活率的测定

取 5 只来自不同母鼠的幼鼠进行 BzATP 毒性实验。将每个培养板内的 12 个盖玻片分为 4 组, 每组 3 孔, 分别加入 0、50、100、500  $\mu$ mol/L BzATP。取 6 只来自不同母鼠的幼鼠进行 OxATP 保护作用实验。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 50  $\mu$ mol/L BzATP; 4 孔先加入 100  $\mu$ mol/L OxATP, 在 37  $^{\circ}$ C、190 升、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 30 min, 进行预处理, 然后加入 50  $\mu$ mol/L BzATP。最佳浓度由预实验获得。加药后培养板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 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 RGCs。存活的 RGCs 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 $\times$ 高倍显微镜下计数 80 个视野内存活的 RGCs。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。

### 1.4 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度的测定

RGCs 细胞培养: 同上法, 但 RGCs 事先不用荧光染料标记。胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度测定: 未经标记的 RGCs 细胞, 培养在含盖玻片的细胞培养板中, 培养 24 h 后, 加入 10  $\mu$ mol/L 钙离子荧光标记物 Fura-2 Am 和 200 mg/L pluronic (Molecular Probes, Eugene, Oregon), 室温下孵育 60 min。将盖玻片取出置于 Ca<sup>2+</sup>测定影像仪上 (PTI, Photon Technologies International, Inc., Lawrenceville, NJ), 进行单个 RGC 胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度的测定。获取 Ca<sup>2+</sup>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。Ca<sup>2+</sup>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 ImageMaster 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 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L

glucose, 75 mmol/L mannitol。校正液(pH 8.0)含 5  $\mu\text{mol/L}$  ionomycin 和 5 mol/L EGTA。所有实验均在室温下进行。被检测的 RGCs 取自 6 只来源于不同母鼠的幼鼠。

### 1.5 数据处理

应用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理与分析。数据表达为:平均值 $\pm$ 标准误。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 RGCs 浓度不同,每次 RGCs 计数结果先经标准化再列入统计学分析:每个载玻片中 RGCs 的百分比=(80 个视野的 RGCs 总数/当次实验对照组 RGCs 数的平均值)%。对  $\text{Ca}^{2+}$  影像测定, n 为测定的细胞个数。应用 least-squares 方法计算 BzATP 的  $\text{EC}_{50}$ 。设定  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养的 RGCs 细胞

经 24 h 混合培养,相差显微镜下可见 RGC 呈圆型或椭圆形,胞体发亮,胞浆内可见多量的发光颗粒,细胞膜边缘圆钝,可见细小的轴突(图 1A),可与其他细胞鉴别(图 1B)。

### 2.2 $\text{P2X}_7$ 受体激活剂和拮抗剂对 RGCs 细胞存活率的影响

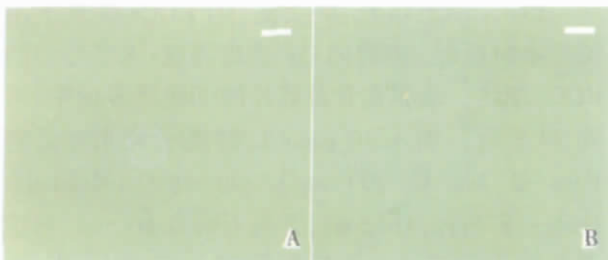


图 1 相差显微镜下所见的体外培养 24 h 的视网膜细胞  
Fig.1 Retinal cells after 24 - hour culture under inverted phase microscope

Under light microscope, retinal ganglion cells can be differentiated from other cell types. A: After being cultured for 24 h, typical retinal ganglion cell presents bright granular cytoplasm with tiny axons, which makes the cell border blunt. B: Non-ganglion cell presents dark cell body and sharp cell margin. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$

对事先用荧光染料 Aminostilbamidine 标记的幼鼠 RGCs 进行原代培养。与 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP 共同孵育 24 h 后,RGCs 数量较正常对照组明显减

少(图 2A、B),为未加药组 RGCs 的数量为对照组的 77%  $\pm$  4%,差异有统计学意义( $t = 5.02$ ,  $P < 0.001$  图 2D)。BzATP 的作用为剂量依赖性,应用  $y = y_0 + ae^{(bx)}$  公式和 least-squares 方法计算出 BzATP 的  $\text{EC}_{50}$  为 35  $\mu\text{mol/L}$  (图 2C)。应用拮抗剂 OxATP (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 事先孵育 30 min,再与 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP 共同孵育 24 h,则大大减少 BzATP 诱导的 RGCs 死亡数目(图 2D),存活率上升至 96%  $\pm$  3%,结果有统计学意义(OxATP 组与 BzATP+ OxATP 组比较,  $t = 3.92$ ,  $P < 0.001$ )。

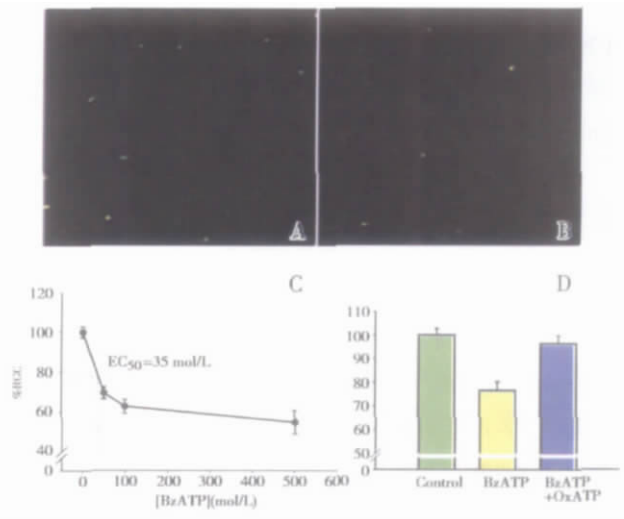


图 2 BzATP 和 OxATP 对体外培养 RGCs 存活率的作用  
Fig.2 The effect of BzATP and OxATP on RGCs viability

A: The fluorescence labeled RGCs was exposed to control culture medium for 24 hours ( $\times 100$ ). B: The number of labeled cells was decreased after being exposed to 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP for 24 hours ( $\times 100$ ). C: BzATP killed RGCs in a concentration-dependent fashion, with an  $\text{EC}_{50} \sim 35 \mu\text{mol/L}$ . Cells had been cultured for 24 hours with the presence of different concentration of BzATP. D: RGCs number was 77%  $\pm$  4% of control with the presence of 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP alone.  $\text{P2X}_7$  antagonist OxATP (100  $\mu\text{mol/L}$ ) could prevent RGCs death triggered by 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP: the RGCs count was increased to 96%  $\pm$  3% of control. ( $n = 24$  for each, BzATP vs. control,  $t = 5.02$ ,  $P < 0.001$ ; BzATP vs. BzATP+OxATP  $t = 3.92$ ,  $P < 0.001$ )

### 2.3 $\text{P2X}_7$ 受体激活的 RGCs 胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 测定

$\text{P2X}_7$  受体激动剂 BzATP 可引起 RGCs 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  显著升高(图 3A): 50  $\mu\text{mol/L}$  BzATP 作用 2 min,RGCs 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高至(1438  $\pm$  145) nmol/L,移除 BzATP 后, $\text{Ca}^{2+}$  缓慢下降,但仍持续较长时间。移除 BzATP 后,用灌注液冲洗 5-7 min,待胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度稳定后给予第二次刺激,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  又升

高到(606 ± 101) nmol/L, 两次 BzATP 反应的平均胞内 Ca<sup>2+</sup> 升高值为(1022 ± 113) nmol/L (n = 9)。P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂 OxATP (100 μmol/L) 可阻断 BzATP 介导的 Ca<sup>2+</sup> 升高 (n = 7)。经 OxATP 预处理 3 min 后, 给予 50 μmol/L BzATP 和 OxATP (100 μmol/L) 刺激 2 min。第一次刺激的高峰仅为 (115 ± 23) nmol/L, 第二次刺激的高峰为 (11 ± 4) nmol/L (图 3B), 两次反应的平均胞内 Ca<sup>2+</sup> 升高值为 (63 ± 13) nmol/L (n = 7), 比单用 BzATP 刺激明显降低 (t = 8.44, P < 0.001)。图中横杠表示在药物的作用下时间(短横杠为 BzATP, 长横杠为 OxATP)。

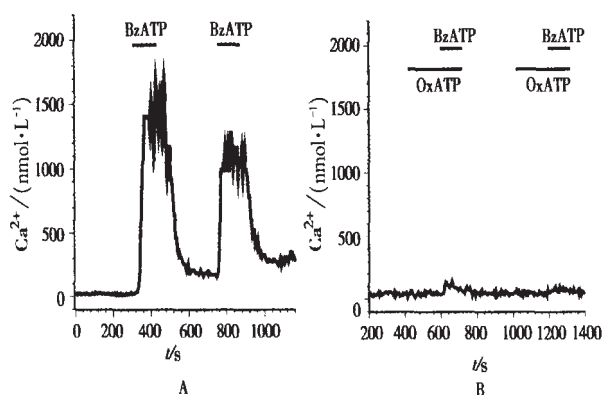


图3 P2X<sub>7</sub> 受体激动剂 BzATP 和拮抗剂 OxATP 对 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup> 的影响

Fig.3 The effect of P2X<sub>7</sub> agonist BzATP and antagonist OxATP on intracellular Ca<sup>2+</sup> in RGCs

A: P2X<sub>7</sub> agonist BzATP (50 μmol/L, 2 min) led to a rapid, sustained rise of Ca<sup>2+</sup> in retinal ganglion cells (n = 9). The average intracellular Ca<sup>2+</sup> increase of two consecutive responses was (1022 ± 113) nmol/L. B: The ability of 50 μmol/L BzATP (2 min) to increase Ca<sup>2+</sup> was greatly attenuated by pre-treatment (3min) and co-treatment with 100 μmol/L OxATP with an average Ca<sup>2+</sup> increase of (63 ± 13) nmol/L (n = 7, t = 8.44, P < 0.001). Horizontal bars: duration of drugs application

## 3 讨论

### 3.1 P2X<sub>7</sub> 受体激活对 RGCs 的作用

嘌呤家族分为 P1 和 P2 两大类。P1 代表着腺苷(adenosine)及其受体的一类核苷,在嘌呤信号传导调控中通过 G-蛋白偶联发挥作用;P2 家族包括 ATP 及其核苷酸受体 P2X<sub>1-7</sub> 和 P2Y<sub>1-6</sub>, 这些受体为一组压力门控的离子型通道。

ATP 是细胞赖以生存的能量分子,然而,功能又远远超越于此,它还是中枢神经系统的重要神

经递质<sup>[1,2]</sup>。ATP 分子通过不同类型的嘌呤受体行使多种多样的功能。近年发现 P2X<sub>7</sub> 受体功能特殊,而且与钙离子内流和细胞凋亡有重要关系<sup>[7,8]</sup>, 此方面研究是近年来嘌呤研究的热点和重点。

近年来研究发现 P2X<sub>7</sub> 受体与视网膜的功能密切相关<sup>[3-7]</sup>。例如在玻璃体视网膜病变中, P2X<sub>7</sub> 受体的表达增加<sup>[3]</sup>, 受体的激活可引起视网膜周细胞收缩<sup>[4]</sup>。已证实哺乳类及鼠视网膜内、外层神经元含有 P2X<sub>1-7</sub> 的受体表达<sup>[5]</sup>, 其中 P2X<sub>7</sub> 受体主要在分布在 RGCs 层<sup>[5,6]</sup>。然而,对受体激活后引起的功能变化还不太清楚。本研究发现 P2X<sub>7</sub> 受体激动剂 BzATP 可导致体外培养的部分 RGCs 死亡,其作用呈剂量依赖性, EC<sub>50</sub> 为 35 μmol/L。50 μmol/L BzATP 约杀死 30% 的 RGCs, 而 100 μmol/L OxATP (P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂) 则可阻止 BzATP 对 RGCs 的毒性作用。细胞内钙离子浓度检测发现 50 μmol/L BzATP 可引起 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup> 持续性显著升高, 而 100 μmol/L OxATP 则可明显抑制 BzATP 引起的 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高。P2X<sub>7</sub> 受体的激动剂有 ATP、BzATP。ATP 可激活所有的 P2X<sub>1-7</sub> 和 P2Y<sub>1-6</sub> 受体, 但对 P2X<sub>7</sub> 受体, BzATP 有着比 ATP 更特异的作用, 而 OxATP 则是 P2X<sub>7</sub> 受体的特异性拮抗剂。因此, 本研究结果表明 P2X<sub>7</sub> 受体的激活可导致 RGCs 死亡和钙离子内流。

### 3.2 P2X<sub>7</sub> 受体激活引起 RGCs 死亡的可能机制

P2X<sub>7</sub> 受体的功能在中枢和外周系统表现不同, 这与该受体的特殊结构有关。P2X<sub>7</sub> 受体对单价和多价阳离子通透起着重要作用, 可引起胞内 Ca<sup>2+</sup> 升高<sup>[7]</sup>。除此之外, P2X<sub>7</sub> 受体还含有一个独特的结构, 当 ATP 等激动剂持续存在时, 受体通道可额外扩张, 形成孔洞。该孔洞可开大至 3 nm, 允许分子质量大至 900 u 的分子诸如染料 Yo-Pro-1 自由通过, 并导致细胞溶解、死亡。其机制可能与形成一个与受体-信号偶联相关的细胞骨架和整合分子复合体有关<sup>[9]</sup>。也有研究认为该孔洞是受体旁边的一个独立结构。这种孔洞的形成主要发生在外周细胞, 如免疫细胞。在中枢神经系统神经元并未发现有与孔洞形成相关的整合分子复合体<sup>[10]</sup>。因此, 不同细胞 P2X<sub>7</sub> 受体激活引起细胞死亡的机制不一。P2X<sub>7</sub> 受体对中枢神经系统神经元的作用可能是通过另一途径影响细胞生物学活性, 目前普遍认为可能与钙离子内流和细胞凋亡有关<sup>[7,8]</sup>。

对于视网膜的各类细胞, Innocenti 等<sup>[11]</sup>的研究

发现 P2X<sub>7</sub> 受体激活后,只有 Müller 细胞通过形成孔洞这种途径引起细胞死亡。而 Müller 细胞被认为是眼内的免疫细胞,与外周细胞类同。本研究发现 P2X<sub>7</sub> 受体激动剂 BzATP 可引起 RGCs 胞内 Ca<sup>2+</sup>持续大幅升高,在 ATP 作用下,BzATP 介导的 Ca<sup>2+</sup>升高幅度显著降低。结合以前的研究结果,我们推测 P2X<sub>7</sub> 受体激活对 RGCs 的毒性作用不是通过细胞形成孔洞,而是引起细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度显著升高产生细胞毒作用。进一步的研究需对 BzATP 引起 RGCs 凋亡作深入研究。

### 3.3 P2X<sub>7</sub> 受体与青光眼发病机制

青光眼是由病理性高眼压引起,以 RGCs 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。RGCs 以凋亡的形式死亡,但目前 RGCs 凋亡的机制尚未完全清楚。

研究提示嘌呤家族可能在这一过程起一定的作用。研究发现机械压力可导致视网膜内层表面星状细胞(astrocytes)释放 ATP<sup>[7]</sup>,释放量>100 μmol/L,足以到达 RGCs 层。虽然瞬间升高的压力刺激不能完全等同于慢性青光眼疾病中持续眼内压的升高,但这一现象可能在急性青光眼病程中起一定作用。另外,业已观察到非神经组织如膀胱、子宫等受到张力性刺激后(由于肿胀、牵拉或压力引起机械感应扩张)可发生 ATP 释放,提示在高眼压作用下,眼球壁受到的机械牵拉也可能引起 ATP 释放。我们也确实是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(尚未公开数据)。这进一步提示青光眼高眼压可能引起嘌呤 ATP 水平升高,作用于 RGCs 的 P2X<sub>7</sub> 受体,导致钙离子内流,最终细胞凋亡。但这一设想尚需进一步的实验证实。

最新资料显示 P2X<sub>7</sub> 受体激活可诱发出视网膜星状细胞大量释放谷氨酸(glutamate)<sup>[12]</sup>。谷氨酸升高,激活 NMDA(N-甲基-D-天冬氨酸)受体是引起 RGCs 细胞死亡的一个重要原因。因此,眼内压力、P2X<sub>7</sub> 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视网膜神经节细胞死亡和保护的关键部分。本研究是该系列研究的一个部分,尚有许多问题需要解答。不过,关于嘌呤家族在青光眼中作用的研究为青光眼发病机制的研究以及进一步防治青光眼提供了新的思路。

### 参考文献:

- [1] KOLES L, FURST S, ILLES P. P2X and P2Y receptors as possible targets of therapeutic manipulations in CNS illnesses [J]. *Drug News Perspect*, 2005,18(2): 85- 101.
- [2] GORDON G R, BAIMOUKHAMETOVA D V, HEWITT S A, et al. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(8): 1078- 1086.
- [3] BRINGMANN A, PANNICKE T, MOLL V, et al. Upregulation of P2X (7) receptor currents in Muller glial cells during proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001 ,42(3):860- 867.
- [4] KAWAMURA H, SUGIYAMA T, WU D M, et al. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina [J]. *J Physiol*, 2003, 551(Pt 3):787- 799.
- [5] ISHII K, KANEDA M, LI H, et al. Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina [J]. *J Comp Neurol*, 2003 ,459(3):267- 277.
- [6] PUTHUSSERY T, FLETCHER E L. Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina [J]. *J Comp Neurol*, 2004, 472(1):13- 23.
- [7] NEWMAN E A. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(7):2215- 2223.
- [8] GORODESKI G I. Estrogen attenuates P2X7 - R-mediated apoptosis of uterine cervical cells by blocking calcium influx [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004, 23(8- 9):1287- 1293.
- [9] WILSON H L, WILSON S A, SURPRENANT A, et al. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 34017- 34023.
- [10] KIM M, SPELTA V, SIM J, et al. Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 23262- 23267.
- [11] INNOCENTI B, PFEIFFER S, ZRENNER E, et al. ATP-induced non-neuronal cell permeabilization in the rat inner retina [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(39):8577- 8583.
- [12] DUAN S, ANDERSON C M, KEUNG E C, et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1320- 1328.

(编辑 刘清海)