

横向定量牵拉损伤对大鼠视网膜神经节细胞自噬水平的影响

尚孟秋¹, 廖良², 吴琼³, 孙武¹, 夏燕婷², 王露露⁴, 王妍¹, 曹琳琳¹

引用:尚孟秋,廖良,吴琼,等. 横向定量牵拉损伤对大鼠视网膜神经节细胞自噬水平的影响. 国际眼科杂志 2022; 22(11): 1771-1775

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81973909)

作者单位:¹(100015)中国北京市,北京中医药大学;²(100078)中国北京市,北京中医药大学东方医院眼科;³(100005)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院;⁴(100040)中国北京市,中国中医科学院眼科医院

作者简介:尚孟秋,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:廖良,毕业于北京中医药大学东方医院,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. 58273677@qq.com

收稿日期:2022-03-18 修回日期:2022-10-09

摘要

目的:研究不同程度牵拉力对大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)存活率和神经传导功能的影响,探讨RGCs自噬水平对上述指标的影响。

方法:选取健康雄性SD大鼠30只随机分为空白组、假手术组、0.15N组、0.3N组、0.6N组,每组各6只。模型组采用横向定量牵拉法制作视神经损伤大鼠模型。空白组大鼠不予处理。假手术组仅暴露视神经,不予牵拉。造模后第1、3d行闪光视觉诱发电位(f-VEP)检查,第3d取视网膜组织行Brn-3a免疫组织化学染色观察RGCs存活情况,透射电子显微镜观察自噬小体,蛋白质印迹法检测LC3B II/I蛋白表达水平。

结果:造模后第3d,与假手术组比较,模型组大鼠f-VEP P2潜伏期延长,振幅降低,视网膜组织中RGCs存活率降低,LC3B II/I蛋白表达水平降低,且各组大鼠视网膜组织中均可见自噬小体。

结论:视神经牵拉伤会降低大鼠早期视网膜自噬水平,导致RGCs死亡和相应的神经传导功能障碍,且不同牵拉力造成的损伤程度不同,RGCs存活情况可能与其自噬水平有关。

关键词:自噬;外伤性视神经病变;视网膜神经节细胞;横向定量牵拉法;闪光视觉诱发电位

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.11.02

Effect of transverse quantitative tractive injury on autophagy level of retinal ganglion cells in rats

Meng-Qiu Shang¹, Liang Liao², Qiong Wu³, Wu Sun¹, Yan-Ting Xia², Lu-Lu Wang⁴, Yan Wang¹, Lin-Lin Cao¹

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81973909)

¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100015, China; ²Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; ³Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China; ⁴Eye Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Liang Liao. Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China. 58273677@qq.com

Received: 2022-03-18 Accepted: 2022-10-09

Abstract

• AIM: To investigate the effect of different degrees of traction power on the survival rate of retinal ganglion cells (RGCs) and nerve conduction in rats, and to discuss the effect of autophagy level of RGCs on the above parameters.

• METHODS: A total of 30 healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into empty group, sham-operation group, 0.15N, 0.3N and 0.6N group, with 6 rats in each group. Modeling group was performed the transverse quantitative traction to make a rat model of optic nerve injury. In addition, rats in empty group were not operated and rats in sham-operation group only got optic nerve exposed. Flash visual evoked potentials (f-VEP) were performed respectively on 1 and 3d after modeling. The survival of retinal ganglion cells was observed by Brn-3a staining at 3d after modeling, autophagy bodies were observed by transmission electron microscope, and the expression level of LC3B II/I protein was detected by Western blotting.

• RESULTS: Compared with sham-operation group, the f-VEP P2 peak was significantly delayed and the amplitude reduced at 3d after modeling. In addition, the survival rate of RGCs was decreased, and the expression level of LC3B II/I protein were decreased. Autophagy bodies were observed in the retinal tissue of rats in all groups.

• CONCLUSION: Optic nerve traction reduced early retinal autophagy level, death of RGCs and corresponding nerve conduction dysfunction in rats, and different traction caused different degrees of injury. In addition, there was a correlation between the autophagy level and the survival of RGCs.

• KEYWORDS: autophagy; traumatic optic neuropathy; retinal ganglion cells; transverse quantitative traction method; flash visual evoked potential

Citation: Shang MQ, Liao L, Wu Q, *et al.* Effect of transverse quantitative tractive injury on autophagy level of retinal ganglion cells in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022; 22 (11): 1771-1775

0 引言

外伤性视神经病变 (traumatic optic neuropathy, TON) 在闭合性头颅外伤中约占 2%~5%^[1], 是眼外伤的重要急症之一, 也是头部损伤中的严重并发症之一。该病预后不佳, 患者常出现急性视功能下降, 超过 60% 的患者视力仅为光感甚至无光感^[2]。目前治疗视神经损伤的方法主要有视神经管减压术和激素冲击治疗等。然而, 目前还没有一种药物或手术方法对受损视神经的保护有明确的疗效。探究视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的损伤机制、寻求更有效的保护 RGCs 的措施是研究 TON 的热点。实验动物模型是研究 TON 损伤保护的关键技术之一, 本课题组前期实验证实横向定量牵拉法可导致大鼠 RGCs 损伤^[3], 但损伤的具体机制尚待进一步研究。大量研究发现, 自噬 (autophagy) 的发生与细胞凋亡、坏死密切相关。自噬是细胞在应激条件下的一种自我保护过程, 细胞在外界环境因素的影响下, 对其内部受损的细胞器、错误折叠蛋白质和侵入其内的病原体进行降解; 病理条件下, 自噬作为适应性应激反应能够有效促进细胞存活^[4], 这对外伤后 RGCs 的保护非常重要。为进一步研究自噬对 TON 后 RGCs 的影响, 本研究运用闪光视觉诱发电位 (flash visual evoked potential, f-VEP) 技术与分子生物学技术探索牵拉伤对大鼠 RGCs 自噬水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选择 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只 (购自北京维通利华实验动物有限公司), 体质量 220±20g, 双眼外观正常, 检查双眼屈光间质清, 瞳孔等大等圆, 对光反射灵敏, 眼底无异常。饲养于北京中医药大学东方医院实验中心, 自由摄食、饮水, 室内通风干燥。按照随机数字表分为空白组、假手术组、0.15N (牛顿) 组、0.3N 组、0.6N 组, 每组各 6 只。本研究通过北京中医药大学动物实验伦理审查 (No.202007)。

1.1.2 主要试剂和仪器设备 主要试剂: 苏木素染液 (MDL, 货号 MD911477); DAB kit (中杉金桥, 货号 ZLI-9017); LC3B 抗体 (Cell signaling, 货号 83506s); Brn-3a 抗体 (Abcam, 货号 ab245230); 二抗 (MDL, 货号 MD912566)。主要仪器设备: 石蜡切片机 (Leica, RM2235); 显微镜 (Leica, DM3000); 电泳仪 (北京百晶生物技术有限公司, BG-subMIDI); ChemiDoc MP 化学发光成像系统 (Bio-rad, 170-8280)。

1.2 方法

1.2.1 视神经牵拉伤模型构建 采用横向定量牵拉法制作视神经损伤大鼠模型^[5], 具体方法如下: 2%戊巴比妥腹腔注射全身麻醉大鼠, 待角膜反射消失, 用镊子轻夹下肢脚趾无反应时即为麻醉成功; 麻醉成功后取俯卧位, 在体式显微镜下操作, 剪开大鼠右眼颞侧眶缘皮肤约 1cm, 摘

除部分眶脂肪, 剪断 (亦可保留) 上直肌和外直肌, 向眶尖部钝性分离直至暴露视神经, 采用 6-0 聚酯缝合线在球后 1~2mm 处圈住视神经并打结 (圈长等于视神经横截面周长, 注意不能拉紧), 缝线另一头连接横向拉力计 (最小刻度 0.01N), 根据分组不同, 以 0.15、0.3、0.6N 拉力垂直于视神经水平牵拉并持续 20s。牵拉完成后立即观察, 如术眼瞳孔散大、直接对光反射消失、间接对光反射存在、眼底视网膜无血管闭塞, 则为造模成功。空白组大鼠不予处理。假手术组仅暴露视神经, 不予牵拉。造模成功后, 将眼球恢复原位, 缝合伤口, 在眼脸上涂用红霉素眼膏敷眼以抗炎, 后将大鼠放回笼中, 观察呼吸有无异常。

1.2.2 f-VEP 测量 各组随机选择大鼠 1 只, 于造模后第 1、3d 将大鼠暗适应 2h; 麻醉方法同前; 麻醉成功后将大鼠固定于视觉电生理仪托盘上, 双眼各点 1 滴复方托吡卡胺充分散瞳; 对侧眼使用不透光眼罩遮盖; 连接电极, 记录电极从双耳连线中点皮下向头侧进针约 1cm, 参考电极置于待查眼的同侧颊部, 地电极置于尾部皮下; 使用眼科罗兰电生理仪进行测量, 每只眼球重复测量 3 次, 使用仪器自动峰型识别确定实验大鼠 f-VEP P2 潜伏期和振幅 (其中 P2 振幅为 P2-N2 数值)。

1.2.3 取材 各组均于造模后第 3d 取材。10%水合氯醛过量麻醉处死大鼠, 完整摘取眼球, 每组随机选取 2 只眼球投入多聚甲醛固定液中进行免疫组织化学和透射电子显微镜观察, 其余 4 只眼球置于冰上分离视网膜, 沿冠状面剪去角膜、虹膜及晶状体, 用镊子缓慢钝性分离视网膜, 小心剥离视网膜置于冻存管中, 立即投入液氮保存。

1.2.3.1 免疫组织化学染色观察 RGCs 存活情况 视网膜组织切片脱脂, 逐次水化, 去除过氧化物酶, 抗原修复, 羊血清封闭后, 加入一抗 Brn-3a 抗体 (1:200), 4℃摇床孵育过夜, 加入相应的二抗, 于 37℃恒温箱中孵育, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木精复染, 梯度脱水, 烤干封片。每张切片随机选取 10 个高倍视野, 采用定量软件 Image J 分析结果, 蓝色有核细胞数量为视网膜神经节细胞层 (GCL) 细胞总数, 棕色细胞数量为含 Brn-3a 蛋白的细胞 (阳性细胞) 数, 即 RGCs 存活细胞数, 记录各组 GCL 层的细胞总数和阳性细胞数, 计算阳性细胞百分比。

1.2.3.2 透射电子显微镜观察自噬小体变化 视网膜组织经 1%锇酸固定、2%醋酸水溶液快速染色、乙醇脱水、浸透、包埋、切片后, 采用醋酸铀和枸橼酸铅进行双重染色后用清水洗净, 置于透射电子显微镜下观察视网膜组织中自噬小体并拍照记录。

1.2.3.3 Western blotting 检测视网膜组织中自噬相关蛋白表达水平 取视网膜组织, 每组 4 个视网膜混合为 1 个样本, 冰浴超声裂解组织后, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 60μg 样品, 加入 Buffer 缓冲液, 混匀。100℃沸水处理 10min, 蛋白变性。采用蛋白质印迹 Western blotting 法检测视网膜组织自噬相关蛋白 LC3B II/I 表达水平。β-actin 作为内参。UVP 软件采集图片结果, Image J 软件计算各组灰度值。

统计学分析: 采用 R4.0.3 统计软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 正态性检验均符合正态分布, 满

足方差齐性,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,造模后第1、3d f-VEP 检测结果的比较均采用配对样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,采用 LSD-*t* 法进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 f-VEP P2 潜伏期和振幅比较 造模后第1、3d,各组大鼠 f-VEP 检查均可引出正常 N-P-N 波形。与假手术组相比,造模后第1d,各模型组手术眼振幅及潜伏期差异均无统计学意义($P>0.05$),但造模后第3d 各模型组手术眼振幅均降低,潜伏期延长,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明造模后大鼠视神经传导功能下降。此外,造模后第3d,各模型组手术眼潜伏期较造模后第1d 延长,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见图1,表1。

2.2 各组大鼠 RGCs 存活情况 各组大鼠视网膜 GCL 层均可见 Brn-3a 表达,阳性细胞百分比差异有统计学意义($F=11.05, P=0.001$),0.15N 组、0.3N 组、0.6N 组阳性细胞百分比低于假手术组,0.6N 组阳性细胞百分比低于0.15N 组和0.3N 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明模型组 RGCs 存活率低于假手术组,且0.6N 组较0.15N 组和0.3N 组低,见图2,表2。

2.3 各组大鼠视网膜组织中自噬小体情况 空白组和假手术组大鼠 RGCs 形态较正常,有较完整的细胞核、线粒体、溶酶体,而0.15N 组、0.3N 组、0.6N 组大鼠 RGCs 形态破坏,出现较多空泡结构,并可见大量增加的溶酶体。各组均可见由膜包裹部分细胞质和细胞内需要降解的细胞器、蛋白质等形成封闭的、圆球形的结构,即自噬小体,见图3。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 LC3B II / I 蛋白表达水平 各组大鼠视网膜组织中 LC3B II / I 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义($F=11.81, P=0.001$)。与假手术组相比,模型组 LC3B II / I 蛋白表达水平均降低,其中0.3N 组和0.6N 组与假手术组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),LC3B II / I 表达水平随牵拉力度增加依次递减,但各模型组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明0.3N 组和0.6N 组大鼠视网膜组织中自噬蛋白表达水平较假手术组降低,见图4,表3。

3 讨论

TON 是指由于外力冲击造成的急性视神经损伤,其病理机制多为直接或间接性损伤造成的视神经撕断^[6]、视神经轴浆流阻断及视神经缺血性梗死,导致 RGCs 变性坏死,引起 RGCs 凋亡,最终引起严重的视功能障碍。RGCs 的不可逆损伤和选择性丢失是 TON 发生发展的病理基础^[7]。Brn-3a 在鼠 RGCs 的分化、存活及轴突发育过程中具有重要作用,可作为存活的 RGCs 的标记物,用于体外识别大鼠视网膜 RGCs,且其在视网膜损伤后表达模式没有改变,因此,Brn-3a 可以作为一种可靠的标记物用于定量评估 RGCs 的数目^[8]。在动物模型中,大鼠 f-VEP 较易记录,波形易辨认,能反映大鼠视网膜和视觉传导通路基本功能状态的改变,可作为实验中的常规指标使用^[9]。f-VEP 中 P2 较为稳健,因此 P2 潜伏期及 P2 振幅变化在

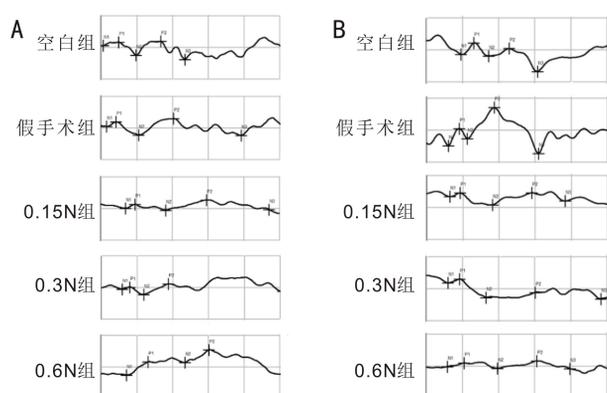


图1 各组大鼠 f-VEP P2 潜伏期和振幅比较 A:造模后第1d;B:造模后第3d。

临床上最为常用^[10-11]。P2 波峰延迟常见于脱髓鞘疾病,P2 振幅降低常见于以视神经轴索变性坏死为主要病理改变的疾病。研究表明,在大鼠缺血性视神经病变模型中,P2 振幅可用于评估 RGCs 的结构和功能,RGCs 损失可导致 P2 振幅衰减^[12-13]。本研究结果表明,模型组大鼠 f-VEP 振幅及 RGCs 存活率均较假手术组降低,表明成功造成大鼠手术眼出现视神经损伤并引起 RGCs 改变。

自噬是一种溶酶体依赖性的自我降解途径,其发生的关键是自噬小体的形成,在透射电子显微镜下观察到自噬小体结构是检测自噬发生的金标准。自噬相关蛋白 LC3 是哺乳动物细胞中酵母自噬相关基因 8 的同源物,靶向定位于自噬体膜分为 I 型和 II 型^[14]。自噬发生时,I 型与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成 II 型 LC3,LC3 II 蛋白结合并始终位于细胞内自噬体膜上,其含量与自噬泡数量呈正比,被认为是自噬体的标志分子^[15]。

本研究发现,视神经牵拉伤 3d 后大鼠视网膜组织中自噬水平出现下降,且牵拉的力度与自噬水平呈负相关。视神经损伤后自噬产生的时间仍存在争议, Lee 等^[16]研究发现青光眼模型大鼠在眼压升高 7d 后自噬蛋白的表达增加具有统计学意义,且第 1、3d 自噬蛋白表达水平出现下降; Russo 等^[17]通过前房加压制备大鼠视网膜缺血、RGCs 凋亡模型,造模后第 6h 自噬蛋白表达增加,第 24h 自噬蛋白水平下降至与第 0h 差异无统计学意义。以上研究表明大鼠视神经损伤后的自噬水平可能于第 6h、7d 出现两次明显增加,但在 6h 与 7d 间自噬水平与损伤前无明显增加甚至下降。本研究结果表明,视神经牵拉伤 3d 后自噬水平出现下降,且自噬水平与牵拉力度呈负相关,可能与自噬水平高峰未到,同时 RGCs 的死亡有关。 Lee 等研究证明自噬激活剂雷帕霉素及饥饿均可提高自噬水平保护高眼压模型大鼠 RGCs 的存活,自噬可降低 RGCs 对氧化损伤的反应,抑制细胞凋亡以促进细胞存活^[18],此外神经元自噬可以阻止受损细胞器聚集和神经元中蛋白质的积累,并通过清除轴突碎片或重塑细胞骨架以保护细胞功能^[19]。本研究中大鼠视网膜自噬水平与 RGCs 存活数量呈正相关,证明自噬可能对 RGCs 具有保护作用。

然而,本研究尚存在不足之处:(1)因 f-VEP 检查具有个体间差异及重复测量差异大的特点,本研究中各组大鼠 P2 潜伏期及振幅对比对其视功能的改变的可信度有

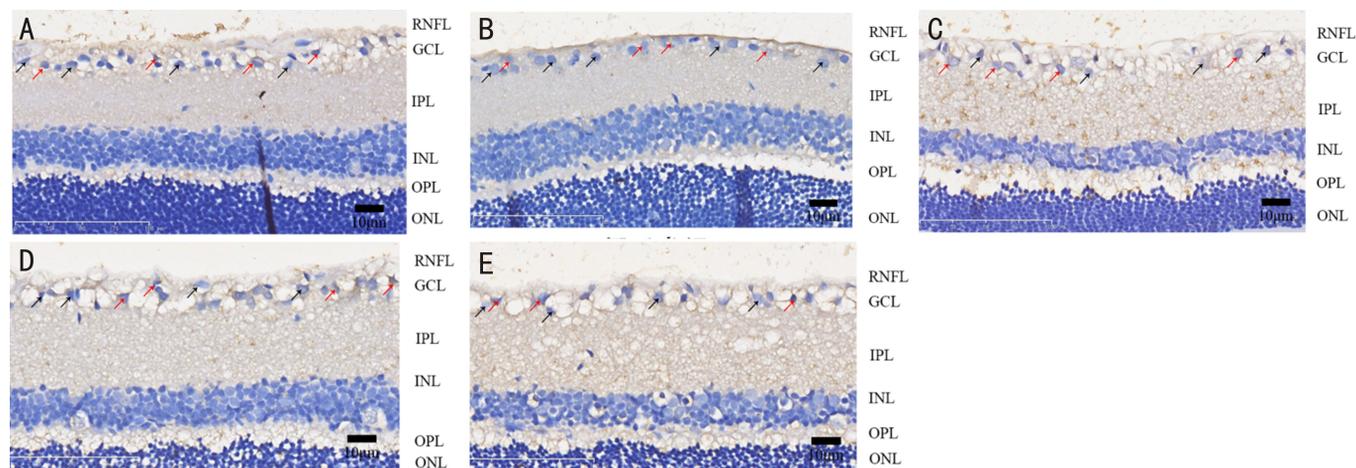


图2 免疫组织化学染色观察各组大鼠RGCs存活情况 A:空白组;B:假手术组;C:0.15N组;D:0.3N组;E:0.6N组。RNFL:神经纤维层;GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外层。红色箭头:Brn-3a表达阳性细胞;黑色箭头:其他细胞。

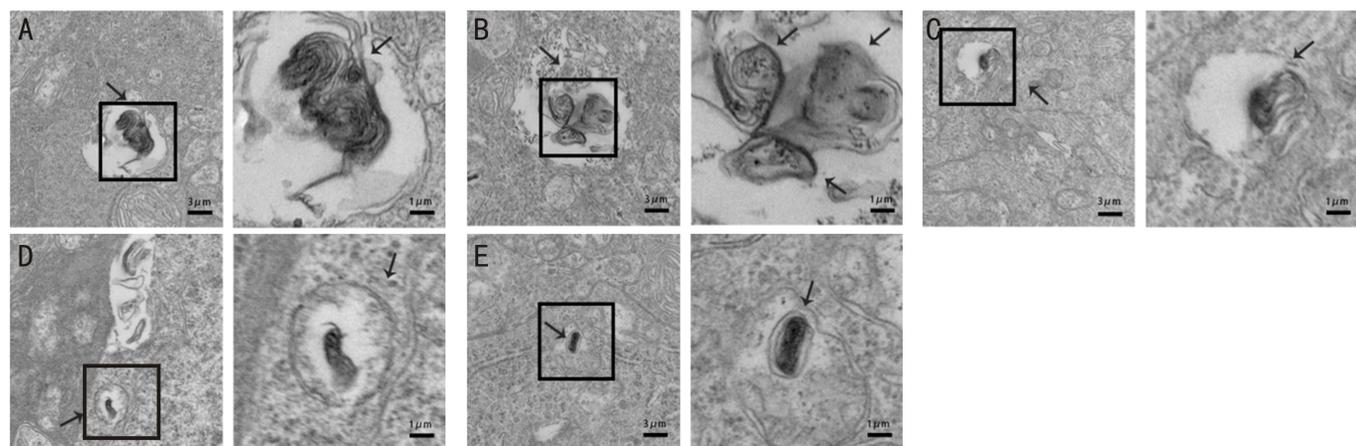


图3 透射电子显微镜观察各组大鼠视网膜组织中自噬小体 A:空白组;B:假手术组;C:0.15N组;D:0.3N组;E:0.6N组。每组右图为左图黑色框放大3倍,黑色箭头示自噬小体。

表1 各组大鼠手术眼f-VEP P2潜伏期和振幅比较

组别	n	造模后第1d		造模后第3d		t_1/P_1	t_2/P_2
		P2潜伏期(ms)	P2振幅(V)	P2潜伏期(ms)	P2振幅(V)		
空白组	3	95.47±11.83	3.01±1.38	106.77±10.04	1.70±0.68	1.66/0.24	1.24/0.34
假手术组	3	97.07±6.96	3.79±3.14	99.60±16.95	6.81±2.59	0.31/0.79	1.89/0.20
0.15N组	3	118.37±41.37	2.00±1.08	136.17±14.03 ^a	2.23±1.34 ^a	1.13/0.37	1.26/0.34
0.3N组	3	114.30±17.03	2.16±1.42	147.17±4.46 ^a	1.78±0.45 ^a	3.67/0.07	0.45/0.70
0.6N组	3	124.33±24.36	2.99±1.77	146.57±8.04 ^a	2.09±1.79 ^a	1.62/0.25	0.78/0.52
F		0.906	0.436	11.39	7.752		
P		0.496	0.780	0.001	0.004		

注: t_1/P_1 :造模后第1、3d P2潜伏期比较; t_2/P_2 :造模后第1、3d P2振幅比较。^a $P<0.05$ vs 假手术组。

表2 各组大鼠视网膜GCL层阳性细胞百分比

组别	总细胞数	阳性细胞数	阳性细胞百分比(%)
空白组	83.00±23.79	44.67±8.99	55.6±8
假手术组	93.67±11.03	57.00±2.94	59.8±8
0.15N组	299.67±166.06	139.00±89.02	47.1±3 ^a
0.3N组	109.67±23.10	52.33±10.34	47.8±1 ^a
0.6N组	434.67±213.43	134.67±58.38	32.1±3 ^{a,c,e}

注:^a $P<0.05$ vs 假手术组;^c $P<0.05$ vs 0.15N组;^e $P<0.05$ vs 0.3N组。

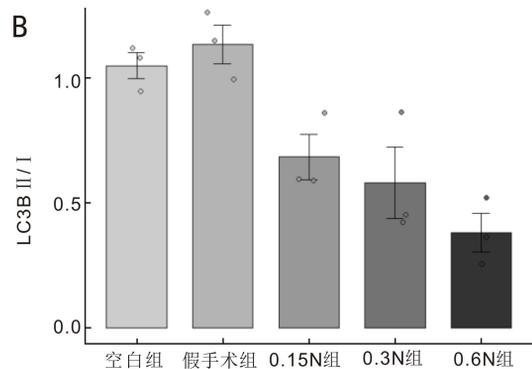
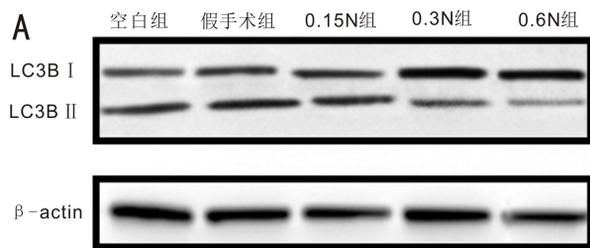


图4 Western blotting 检测各组大鼠视网膜组织中 LC3B II/I 蛋白表达水平 A:Western blotting 检测结果;B:Western blotting 量化分析结果。

表3 各组大鼠视网膜组织中 LC3B II/I 蛋白表达水平比较

组别	LC3B II	LC3B I	LC3B II/I
空白组	0.477±0.04	0.457±0.05	1.049±0.09
假手术组	0.589±0.07	0.519±0.05	1.135±0.14
0.15N 组	0.375±0.04	0.619±0.08	0.684±0.16
0.3N 组	0.345±0.01	0.736±0.09	0.581±0.25 ^a
0.6N 组	0.228±0.01	0.66±0.22	0.380±0.13 ^a

注:^a $P < 0.05$ vs 假手术组。

限,但由于动物实验的局限性,尚无更有效证明大鼠视功能变化的检查;(2)由于经费限制,本研究每组仅有6只大鼠,样本量较小。基于上述问题,本课题组将开展大样本研究,并进一步探索横向牵拉法影响视网膜组织自噬的分子生物学信号调控机制。

综上所述,横向牵拉法可制作精确定量的视神经损伤模型,并造成手术眼视网膜自噬水平下降、RGCs死亡和相应的神经传导功能障碍,且不同牵拉力造成的损伤程度不同,该模型建立方法难度适中,具有较高可重复性,且可模拟轻、中、重不同程度的TON病变,是开展TON基础研究的良好模型。此外,本研究表明RGCs存活情况可能与其自噬水平有关,这也为通过调节自噬促进TON患者RGCs存活、保护视功能的研究提供了方向。

参考文献

- 1 《外伤性视神经病变中医诊疗指南》项目组. 外伤性视神经病变中医诊疗指南. 中国中医眼科杂志 2022; 32(2): 89-93
- 2 Karimi S, Arabi A, Ansari I, et al. A systematic literature review on traumatic optic neuropathy. *J Ophthalmol* 2021; 2021: 5553885
- 3 谷新怡, 周剑, 赵朋波, 等. 横向定量牵拉法制作大鼠视神经精确损伤模型. 国际眼科杂志 2016; 16(9): 1625-1628
- 4 Nakamura S, Yoshimori T. Autophagy and longevity. *Mol Cells* 2018; 41(1): 65-72
- 5 Miyake KI, Yoshida M, Inoue Y, et al. Neuroprotective effect of transcorneal electrical stimulation on the acute phase of optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(5): 2356-2361
- 6 Moysenchenko N. The retino-hypothalamic ultrastructural changes in traumatic optic neuropathy. *J Med Clin Res Rev* 2021; 5(7): 1-7

- 7 Hirahara Y, Wakabayashi T, Koike T, et al. Change in phospholipid species of retinal layer in traumatic optic neuropathy model. *J Neurosci Res* 2020; 98(2): 325-337

- 8 Wierońska JM, Zorn SH, Doller D, et al. Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: historical perspective and critical comparative assessment. *Pharmacol Ther* 2016; 157: 10-27
- 9 王鹏飞, 申晨, 喻哲昊, 等. 大鼠外伤性视神经损伤的闪光电生理特性和Tau蛋白及其磷酸化研究. 国际眼科杂志 2021; 21(4): 585-591

- 10 Houlden DA, Turgeon CA, Amyot NS, et al. Intraoperative flash visual evoked potential recording and relationship to visual outcome. *Can J Neurol Sci* 2019; 46(3): 295-302

- 11 Zhang SM, Wang D, Huang TT, et al. Pim-1 expression in rat retina and its changes after optic nerve crush. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; 301(11): 1968-1976

- 12 Le MANN, Wen YT, Ho YC, et al. Therapeutic effects of puerarin against anterior ischemic optic neuropathy through antiapoptotic and anti-inflammatory actions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(10): 3481-3491

- 13 Huang TL, Wen YT, Ho YC, et al. Algae oil treatment protects retinal ganglion cells (RGCs) via ERK signaling pathway in experimental optic nerve ischemia. *Mar Drugs* 2020; 18(2): 83

- 14 Bansal M, Moharir SC, Swarup G. Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun Integr Biol* 2018; 11(2): 1-4

- 15 Xu J, Kong XJ, Xiu H, et al. Combination of curcumin and vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced behavioral deficits. *Biomed Pharmacother* 2018; 103: 614-620

- 16 Lee SH, Shim KS, Kim CY, et al. Characterization of the role of autophagy in retinal ganglion cell survival over time using a rat model of chronic ocular hypertension. *Sci Rep* 2021; 11(1): 5767

- 17 Russo R, Varano GP, Adornetto A, et al. Rapamycin and fasting sustain autophagy response activated by ischemia/reperfusion injury and promote retinal ganglion cell survival. *Cell Death Dis* 2018; 9: 981

- 18 Zhang SQ, Shao ZB, Liu XN, et al. The E50K optineurin mutation impacts autophagy-mediated degradation of TDP-43 and leads to RGC apoptosis *in vivo* and *in vitro*. *Cell Death Discov* 2021; 7: 49

- 19 Russo R, Varano GP, Adornetto A, et al. Rapamycin and fasting sustain autophagy response activated by ischemia/reperfusion injury and promote retinal ganglion cell survival. *Cell Death Dis* 2018; 9(10): 981