

### 【实验研究】

白雪 罗艳 刘太祥 罗鑫

**1.2 动物模型的建立** 参考文献<sup>[15-16]</sup>,用前房加压法制作大鼠急性高眼压模型。将SD雄性大鼠称体质量后,将 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水合氯醛按照 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔内注射麻醉。随机取每只大鼠任意一眼造模,用4号半头皮针(连接有500 mL生理盐水输液

瓶)沿大鼠颞侧的角巩膜缘穿刺入前房。输液瓶高度与实验眼的垂直距离为 176.6 cm,此时眼压为 120 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg),可以看见球结膜、虹膜迅速变白,瞳孔区橘红色反光转为苍白,视网膜苍白,说明已将视网膜中央动脉的供血完全阻断。高眼压状态持续 1 h 后,缓慢将输液瓶高度降低至眼球水平,眼压也同时逐渐降低,拔出针头,球结膜和虹膜颜色快速恢复正常,可见暗红色瞳孔区的反光,眼底镜检查见视网膜呈现橘红色,受阻的血管得以重新开放,提示大鼠 RIRI 模型造模成功。术毕实验眼结膜囊涂妥布霉素眼膏。

**1.3 实验动物分组及 NaHS 干预** 用数字表法将所有大鼠随机分为对照组(4 只)、RIRI 组(24 只)及 NaHS 干预组(24 只)。后两组再各自分为造模后 1 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 6 个时间点( $n=4$ )。所用 NaHS 剂量和给药方法根据文献[17-18]设定。NaHS 干预组分别按大鼠不同体质量腹腔内注射 NaHS 液( $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每次使用前均新鲜配制),连续 5 d,造模前 15 min 再次给药;正常对照组和 RIRI 组同方法同时给予生理盐水  $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。随机取一眼作为实验眼。

**1.4 TUNEL 法测定细胞凋亡** 分别取对照组、RIRI 组和 NaHS 组造模后不同时间点大鼠各 1 只,常规方法在相应时间摘除大鼠眼球并固定,沿视神经长轴经视神经做纵切面石蜡切片。视网膜切片常规脱蜡水化,PBS 漂洗,蛋白酶 K 21~37℃ 孵育 15~30 min,PBS 漂洗 2 次后,检测样本和阳性对照样本,加入适量凋亡反应混合物( $50\text{ }\mu\text{L}$ );阴性对照样本加入标记溶液,37℃ 湿盒避光孵育 60 min,PBS 漂洗 3 次,DAPI 染核,PBS 漂洗,封片荧光显微镜观察,激发波长 450~500 nm(488 nm)。每个视网膜切片选取 10 个视野进行细胞凋亡计数分析。

**1.5 qPCR 检测视网膜中 OPA1 mRNA 表达** 分别取各组大鼠,每组及相应时间点各 1 只。RNAiso Plus 提取各组大鼠视网膜总 RNA,经纯度鉴定和浓度测定后取  $1\text{ }\mu\text{g}$  总 RNA,两步法 RT 反应合成 cDNA (30℃ 10 min,42℃ 60 min,85℃ 10 min)。按说明

书进行 qPCR(20  $\mu\text{L}$  体系:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 32 s,共 40 个循环)。以  $\beta$ -actin 为内参,以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因相对表达量。每个标本设置 3 管重复,取 3 次的平均值计算各组大鼠视网膜中 OPA1 mRNA 的相对表达。

**1.6 Western blot 检测各组大鼠视网膜中细胞质以及线粒体中 OPA1、CytC 蛋白的表达** 摘取各组相应时间点大鼠眼球各 1 只,完整分离视网膜组织,匀浆后离心,沉淀为细胞线粒体,再次离心上清液后取出,即为去除线粒体的细胞质蛋白。分别进行 SDS-PAGE 蛋白电泳;转膜,漂洗,封闭,漂洗,孵育,漂洗。电化学发光法显色发光、胶片曝光。应用图像分析软件 Image J 对蛋白条带进行灰度值分析,分别以 GAPDH、COX IV 为内参,分别计算各组大鼠视网膜细胞的线粒体和细胞质中 OPA1、CytC 蛋白与内参的灰度比值。

**1.7 透射电镜观察线粒体形态** 分别取对照组及 RIRI 组和 NaHS 干预组各时间点大鼠各 1 只,深度麻醉,经左心室快速灌注 4℃ 预冷的生理盐水,随即灌入体积分数 2.5% 戊二醛快速滴注至大鼠四肢抽搐,待抽搐停止后,缓慢滴注 20 min 后取视网膜组织块,置于体积分数 2.5% 戊二醛中固定 2 h,漂洗,  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  锇酸 4℃ 固定 2 h,脱水,浸透,包埋,聚合,超薄切片厚 60 nm,染色,透射电镜下观察、拍照。每例标本检测 10 个视野。

**1.8 统计学分析** 使用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据处理,组间分析行单因素方差分析;数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

**2.1 TUNEL 法检测细胞凋亡结果** 与对照组相比,NaHS 干预组造模后 1 h 细胞凋亡未见明显增多,荧光无明显增强,RIRI 组各个时间点、NaHS 干预组余时间点细胞凋亡增多,荧光明显增强,NaHS 干预组细胞凋亡趋势同 RIRI 组,但各个时间点凋亡指数均较 RIRI 组显著降低,差异均有统计学意义(均为  $P<0.05$ )(见表 1)。

表 1 各组造模后不同时间点视网膜细胞凋亡指数

( $\bar{x}\pm s,n=4$ )

组别	视网膜细胞凋亡指数						F 值	P 值
	造模后 1 h	造模后 6 h	造模后 12 h	造模后 24 h	造模后 48 h	造模后 72 h		
对照组	0.217±0.015	0.217±0.015	0.217±0.015	0.217±0.015	0.217±0.015	0.217±0.015	118.870	0.001
RIRI 组	0.292±0.028*	0.387±0.011*	0.430±0.022*	0.547±0.024*	0.614±0.005*	0.752±0.026*		
NaHS 干预组	0.226±0.010 <sup>#</sup>	0.283±0.009* <sup>#</sup>	0.308±0.021* <sup>#</sup>	0.384±0.019* <sup>#</sup>	0.398±0.035* <sup>#</sup>	0.429±0.024* <sup>#</sup>		
t 值	3.815	6.709	5.934	7.54	7.344	13.509		
P 值	0.044	0.012	0.005	0.004	0.014	<0.001		

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与 RIRI 组同一时间点比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

**2.2 qPCR 检测视网膜中 OPA1 mRNA 表达** NaHS 干预组和 RIRI 组各个时间点 OPA1 mRNA 表达均较对照组有所下降,差异均有统计学意义(均为  $P<0.05$ )。与 RIRI 组同一时间点比较,NaHS 干预组除造模后 1 h 时 OPA1 mRNA 表达低于 RIRI 组外,余时间点 OPA1 mRNA 表达均高于 RIRI 组,差异

均有统计学意义(均为  $P<0.05$ )(见表 2)。

**2.3 OPA1 和 CytC 的蛋白表达量** RIRI 组各个时间点线粒体内 OPA1 和 CytC 的蛋白表达与对照组相比,呈逐渐下降的趋势,差异均有统计学意义(均为  $P<0.05$ );NaHS 干预组各个时间点线粒体内 OPA1 和 CytC 的蛋白表达与对照组相比,呈现造模



后 1 h 大幅度降低,随后缓慢回升的趋势,其差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );NaHS 干预组与 RIRI 组同一时间点比较,从造模后 24 h 开始 NaHS 干预组 OPA1 和 CytC 蛋白表达均高于 RIRI 组,除造模后 12 h 差异均无统计学意义外( $P = 0.091, 0.074$ ),其余各个时间点的差异均有统计学意义(均为  $P <$

0.05)。在细胞质内,两组各个时间点和对照组相比,均呈逐渐增加的趋势,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。与 RIRI 组同一时间点对比,NaHS 干预组 OPA1 和 CytC 蛋白表达均较低,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )(见图 1 和图 2)。

表 2 造模后不同时间点各组大鼠视网膜中 OPA1 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	造模后不同时间 OPA1 mRNA 相对表达量						F 值	P 值
	造模后 1 h	造模后 6 h	造模后 12 h	造模后 24 h	造模后 48 h	造模后 72 h		
对照组	26.62 ± 0.067	26.62 ± 0.067	26.62 ± 0.067	26.62 ± 0.067	26.62 ± 0.067	26.62 ± 0.067	40.909	0.001
RIRI 组	25.91 ± 0.143 *	25.70 ± 0.161 *	25.11 ± 0.138 *	25.45 ± 0.111 *	25.53 ± 0.112 *	25.22 ± 0.099 *		
NaHS 干预组	25.67 ± 0.067 **	25.78 ± 0.106 **	25.49 ± 0.088 **	25.76 ± 0.145 **	25.63 ± 0.127 **	25.80 ± 0.128 **		
t 值	5.615	-3.709	-6.903	-5.233	-4.034	-9.509		
P 值	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.002	<0.001		

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与 RIRI 组同一时间点的比较, #  $P < 0.05$

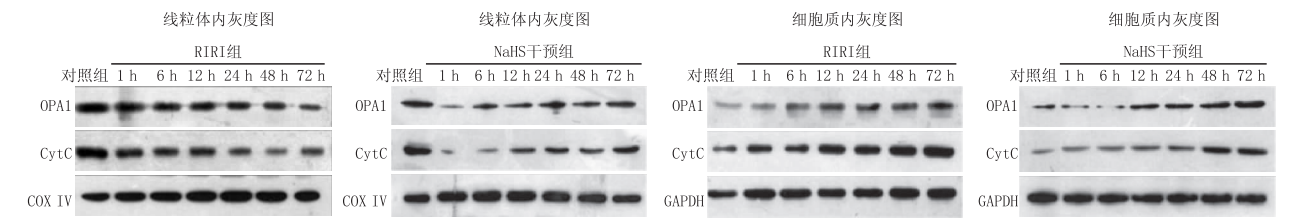


图 1 OPA1 和 CytC 蛋白在线粒体和胞质内表达灰度图

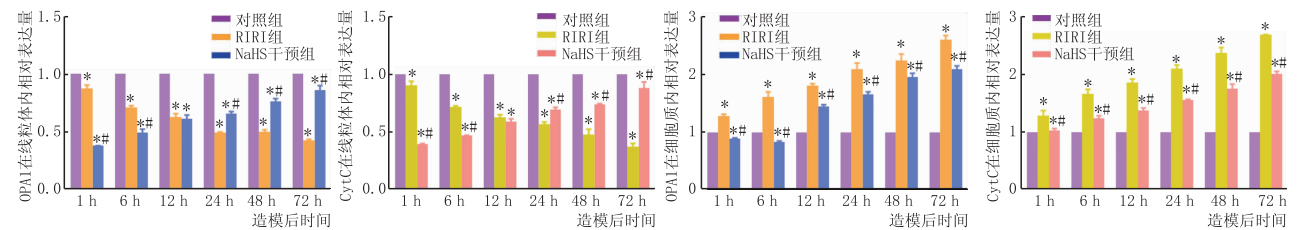


图 2 OPA1 和 CytC 蛋白在线粒体和细胞质内相对表达量 注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与 RIRI 组同一时间点比较, #  $P < 0.05$

2.4 透射电镜观察线粒体形态 与对照组(线粒体嵴清晰)比较,RIRI 组随时间延长线粒体损伤加重,线粒体肿胀,可见细胞质空泡及自噬小体(造模后 24 h 最为明显);NaHS 干预组随时间延长线粒体损伤加重,线粒体肿胀,可见细胞质空泡及自噬小体;NaHS 干预组与 RIRI 组比较,各时间点线粒体损伤减轻(见图 3 至图 5)。

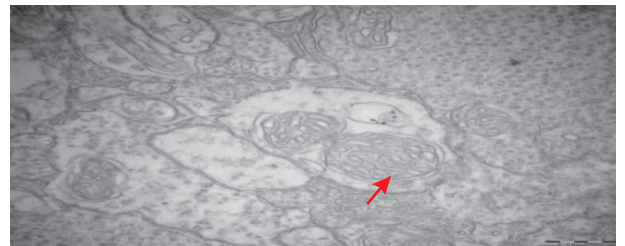


图 3 对照组线粒体嵴形态( $\times 40\,000$ ) 红色箭头表示线粒体

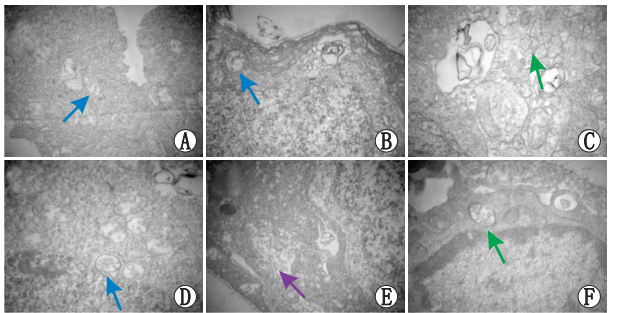
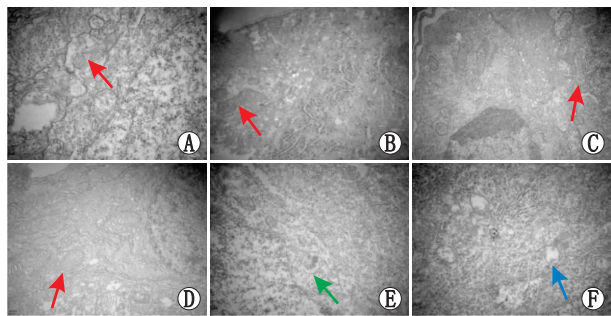


图 4 RIRI 组各时间点线粒体损伤情况( $\times 40\,000$ ) A:RIRI 组造模后 1 h:大量由线粒体和(或)内质网肿胀形成的细胞质空泡;B:RIRI 组造模后 6 h:线粒体嵴消失,成空泡;C:RIRI 组造模后 12 h:细胞质空泡化明显,自噬小体形成;D:RIRI 组造模后 24 h:大量由线粒体和(或)内质网肿胀形成的细胞质空泡;E:RIRI 组造模后 48 h:吞噬泡形成,线粒体渐近性肿胀;F:RIRI 组造模后 72 h:自噬小体形成。蓝色箭头表示细胞质空泡,绿色箭头表示自噬小体,紫色箭头表示吞噬泡



**图5 NaHS 干预组各时间点线粒体损伤**  
( $\times 40\ 000$ ) A: NaHS 组干预 1 h 后: 线粒体轻肿胀, 结构尚完整; B: NaHS 组干预 6 h 后: 线粒体渐进性肿胀, 线粒体嵴出现扩张; C: NaHS 组干预 12 h 后: 线粒体渐进性肿胀, 线粒体嵴出现扩张; D: NaHS 组干预 24 h 后: 线粒体嵴模糊、扩张; E: NaHS 组干预 48 h 后: 自噬体形成; F: NaHS 组干预 72 h 后: 线粒体和 (或) 内质网肿胀形成的细胞质空泡。红色箭头表示线粒体, 蓝色箭头表示细胞质空泡, 绿色箭头表示自噬小体

### 3 讨论

RIRI 是指当视网膜组织缺血、缺氧, 而恢复血液供氧后, 反而加重视网膜的损伤, 是一种公认的视网膜血管阻塞性疾病<sup>[19]</sup>。RIRI 的形成机制仍不明确, 可能与线粒体功能障碍、视网膜缺血、氧化应激、神经胶质细胞活化等有关<sup>[20-25]</sup>, RIRI 可能通过诱导细胞凋亡或坏死而最终导致神经元死亡<sup>[26]</sup>。H<sub>2</sub>S 在神经元细胞、微胶质细胞和星形胶质细胞的病理生理过程的调节中发挥重要作用<sup>[27-29]</sup>, 给予 NaHS (H<sub>2</sub>S 供体) 干预后, 可能通过抑制氧化应激、炎症反应等途径改善线粒体功能, 从而进一步改善神经退行性病变<sup>[30-31]</sup>。有实验研究结果表明, RIRI 前通过 H<sub>2</sub>S 预处理可经过抗凋亡反应触发神经元保护作用<sup>[14]</sup>。而本实验结果也显示在 RIRI 组中视网膜细胞凋亡随时间变化逐渐增多, 同时经过 NaHS 的预处理, 在 NaHS 干预组中细胞凋亡与 RIRI 组比较均明显降低, 说明外源性的 H<sub>2</sub>S 可以改善视网膜神经细胞凋亡, 提高细胞的存活能力, 这与以往的研究结果相符合<sup>[32]</sup>。但 H<sub>2</sub>S 是通过什么途径保护视网膜神经细胞的凋亡目前仍不得而知。

线粒体释放 CytC 是细胞凋亡发生的关键, 而与其有重要关系的一类蛋白被称为线粒体塑形蛋白家族, 该家族的重要成员之一是 OPA1, 其位于线粒体的内膜及膜间隙, 介导线粒体融合, 是控制 CytC 释放的重要环节。OPA1 在细胞中表达增加, 其可以通过稳定线粒体嵴、阻止 CytC 释放而减轻细胞凋亡<sup>[33]</sup>。本研究结果显示, OPA1 在 RIRI 组表达逐渐降低, 经过 NaHS 预处理后可增加 OPA1 表达。而在 Western blot 测定 OPA1 及 CytC 的蛋白表达时, 我们同样也发现随着时间的延长, 与 RIRI 组比较, NaHS 干预组线粒体内 OPA1 及 CytC 蛋白表达是逐渐增加

的, 而在细胞质内, NaHS 干预组与 RIRI 组同一时间点比较, OPA1 及 CytC 蛋白表达是降低的, 远不如 RIRI 组增加明显, 同时这些研究结果也说明, NaHS 预处理后可以增加 RIRI 后总的 OPA1 表达水平以及线粒体内 OPA1 和 CytC 的表达, 减少视网膜的细胞凋亡, 从而保护视网膜的神经损伤。

线粒体是调控细胞凋亡的核心细胞器, 线粒体分裂、破碎激活细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。本课题组前期体外实验也提示 NaHS 预处理后线粒体的肿胀明显减轻<sup>[34]</sup>。本研究从透射电镜观察线粒体形态发现, 各个时间点比较, RIRI 组随时间延长线粒体肿胀明显、线粒体破裂, 在造模后 24 h 最为严重, 加入 NaHS 以后前 24 h 线粒体肿胀仍明显, 然后随时间延长损伤减轻, 但任何时间点都比 RIRI 组的损伤轻。说明 H<sub>2</sub>S 对 RIRI 引起的视网膜神经细胞线粒体损伤有保护作用。

本实验结果表明, 在 NaHS 的干预下, RIRI 后细胞内 OPA1 表达增加, OPA1 在线粒体内外分布与对照组接近, 使线粒体的损伤减轻, 细胞凋亡减少, 从而减轻了视网膜的神经损伤。但是, 在本实验中也发现, NaHS 干预后早期可以减少细胞凋亡, 而 OPA1 表达却下降 (尤其是造模后 1 h), 考虑可能为造模后早期外源性 H<sub>2</sub>S 抑制细胞凋亡并非通过调节 OPA1 的表达与分布, 而是通过另外的途径发挥作用; 同时造模后早期细胞内 H<sub>2</sub>S 浓度较高, 可能抑制了线粒体呼吸作用, 产生细胞毒性<sup>[35]</sup>, 从而可能影响了 OPA1 在线粒体内外分布和表达。

综上所述, 本研究结果显示, H<sub>2</sub>S 可能通过调控 OPA1 的表达与分布抑制 RIRI, 且发挥保护作用的时间是在造模后 24 h。本研究结果为 H<sub>2</sub>S 的视网膜细胞保护作用提供了新的实验依据, 为 H<sub>2</sub>S 的药物剂型及给药时间提供了一定的参考, 具有重要的理论意义和临床实用价值。

**致谢:** 感谢贵州细胞工程重点实验室, 贵州麻醉与器官保护研究中心和遵义医科大学实验动物中心的支持和帮助!

### 参考文献

- [1] CHO J H, MA X, WANG S W, KLEIN W H. Retinal ganglion cell death and optic nerve degeneration by genetic ablation in adult mice[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(3): 542-552.
- [2] ANDREEVA K, ZHANG M, FAN W, LI X, CHEN Y, REBOLLEDO-MENDEZ J D, et al. Time-dependent gene profiling indicates the presence of different phases for ischemia/reperfusion injury in retina[J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2014, 6: 43-54.
- [3] SUN M H, PANG J H, CHEN S I, HAN W H, HO T C, CHEN K J, et al. Retinal protection from acute glaucoma-induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(9): 4798-4808.
- [4] OSBORNE N N, CASSON R J, WOOD J P, CHIDLOW G, GRAHAM M, MELENA J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(14): 91-147.
- [5] LEE Y J, JEONG S Y, KARBOWSKI M, SMITH C L, YOULE R J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion me-

- diators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11):5001-5011.
- [6] FRANK S, GAUME B, BERGMANN-LEITNER E S, LEITNER W W, ROBERT E G, CATEZ F, *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis[J]. *Dev Cell*, 2001, 1(4):515-525.
- [7] OLICHON A, ELACHOURI G, BARICAULT L, DELETTRE C, BELENGUER P, LENAERS G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4):682-692.
- [8] OLICHON A, EMORINE L J, DESCOINS E, PELLOQUIN L, BRICHESE L, GAS N, *et al.* The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space[J]. *FEBS Lett*, 2002, 523(1-3):171-176.
- [9] CHEN H, CHOMYN A, CHAN D C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(28):26185-26192.
- [10] ARNOULT D, GRODET A, LEE Y J, ESTAQUIER J, BLACKSTONE C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome C and subsequent mitochondrial fragmentation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42):35742-35750.
- [11] ABE K, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(3):1066-1071.
- [12] ŁOWICKA E, BELTOWSKI J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists[J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(1):4-24.
- [13] BIERMANN J, LAGRÉZ W, SCHALLNER N, SCHWER C I, GOEBEL U. Hydrogen sulfide; neurochemistry and neurobiology[J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(1-2):155-165.
- [14] BIERMANN J, LAGRÉZ W, SCHALLNER N, SCHWER C I, GOEBEL U. Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Vis*, 2011, 17:1275-1286.
- [15] WEI Y, WANG N, LU Q, ZHANG N, ZHENG D, LI J. Enhanced protein expressions of sortilin and p75NTR in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 429(2-3):169-174.
- [16] 孔祥攀, 周利红. 青光眼视网膜节细胞病变中的自噬异常[J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(3):337-341.
- [17] KONG X P, ZHOU L H. Autophagy dysfunction of retinal ganglion cells in glaucoma[J]. *Chin J Anat*, 2017, 40(3):337-341.
- [18] 张伟, 樊海宁, 秦伟, 邓勇, 张永健, 于宏伟. 气体信号分子硫化氢在大鼠肝缺血一再灌注损伤中的作用[J]. *青海医学院学报*, 2007, 28(2):83-87.
- [19] ZHANG W, FAN H N, QIN W, DENG Y, ZHANG Y J, YU H W. The role of hydrogen sulfide, gaseous signaling molecule, on the hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. *J Qinghai Med Coll*, 2007, 28(2):83-87.
- [20] 黄新莉, 仲维佳, 刘清和, 田庆显, 周君琳. 硫化氢对肢体缺血再灌注所致大鼠急性肺损伤的作用及机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(1):9-13.
- [21] HUANG X L, ZHONG W J, LIU Q H, TIAN Q X, ZHOU J L. Role of hydrogen sulfide in acute lung injury induced by ischemia-reperfusion of hind limbs in rats[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2011, 27(1):9-13.
- [22] BCHI E R, SUIVAIZDIS I, FU J. Pressure-induced retinal ischemia in rats; an experimental model for quantitative study[J]. *Ophthalmologica*, 1991, 2003(3):138-147.
- [23] CRISH S D, CALKINS D J. Central visual pathways in glaucoma; evidence for distal mechanisms of neuronal self-repair[J]. *J Neuroophthalmol*, 2015, 35(Suppl 1):29-37.
- [24] JUNG K I, KIM J H, PARK C K.  $\alpha$ 2-Adrenergic modulation of the glutamate receptor and transporter function in a chronic ocular hypertension model[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765:274-283.
- [25] KLEESATTEL D, CRISH S D, INMAN D M. Decreased energy capacity and increased autophagic activity in optic nerve axons with defective anterograde transport[J]. *Invest Ophthalmol Vis*, 2015, 56(13):8215-8227.
- [26] LASCARATOS G, CHAU K Y, ZHU H, GKOTSI D, KING R, GOUT I, *et al.* Resistance to the most common optic neuropathy is associated with systemic mitochondrial efficiency[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 82:78-85.
- [27] SEITZ R, OHLMANN A, TAMM E R. The role of Müller glia and microglia in glaucoma[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 353(2):339-345.
- [28] WILSON G N, INMAN D M, DENGLER CRISH C M, SMITH M A, CRISH S D. Early pro-inflammatory cytokine elevations in the DBA/2J mouse model of glaucoma[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12:176.
- [29] ZHANG C, ROSENBAUM D M, SHAIKH A R, LI Q, ROSENBAUM P S, PELHAM D J, *et al.* Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(9):3059-3066.
- [30] LEE S W, HU Y S, HU L F, LU Q, DAWE G S, MOORE P K, *et al.* Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells[J]. *Glia*, 2006, 54(2):116-124.
- [31] NAGAI Y, TSUGANE M, OKA J, KIMURA H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes[J]. *FASEB J*, 2004, 18(3):557-559.
- [32] YONG Q C, CHOO C H, TAN B H, LOW C M, BIAN J S. Effect of hydrogen sulfide on intracellular calcium homeostasis in neuronal cells[J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(3):508-515.
- [33] HU L F, LU M, TIONG C X, DAWE G S, HU G, BIAN J S. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2):135-146.
- [34] KAMAT P K, KYLES P, KALANI A, TYAGI N. Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced alzheimer's disease-like pathology, blood-brain barrier disruption, and synaptic disorder[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(4):2451-2467.
- [35] OSBORNE N N, JI D, MAJID A S, DEL S P, SPARATORE A. Glutamate oxidative injury to RGC-5 cells in culture is necrostatin sensitive and blunted by a hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing derivative of aspirin (ACS14)[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(4):365-378.
- [36] CIPOLATT S, RUDKA T, HARTMANN D, COSTA V, SEMEELS L, CRAESSAERTS K, *et al.* Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via, OPA1-dependent cristae remodeling[J]. *Cell*, 2006, 126(1):163-175.
- [37] 罗鑫, 刘太祥, 任荟璇, 罗艳. 硫化氢对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的视网膜神经节细胞氧化损伤的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(6):515-518.
- [38] LUO X, LIU T X, REN H X, LUO Y. Protective effects of H<sub>2</sub>S against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in RGC[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(6):515-518.
- [39] REIFFENSTEIN R J, HULBERT W C, ROTH S H. Toxicology of hydrogen sulfide[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992, 32:109-134.



# Exogenous H<sub>2</sub>S protects against retinal ischemia-reperfusion injury by modulating optic atrophy 1(OPA1) expression

BAI Xue, LUO Yan, LIU Tai-Xiang, LUO Xin

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Corresponding author: LUO Xin, E-mail: 727302110@qq.com

**[Abstract] Objective** To explore the role and possible mechanism of exogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on rat models induced retinal ischemic re-perfusion damage (RIRI) in the acute high eye pressure model. **Methods** An acute high eye pressure model of SD male rats was established by front room pressure method: 120 mmHg (1 kPa=7.5 mmHg) eye internal pressure maintained by a homemade eye pressure device, and the lifting of pressure after 1 hour causes RIRI. Sodium sulfide (NaHS) as a donor to provide exogenous H<sub>2</sub>S, 52 healthy, eye-free SD male rats were randomly divided into control group (4 rats), RIRI group (24 rats) and NaHS intervention group (24 rats) (the injection of NaHS solution into the intraperitoneal cavity of rats for 5 consecutive days, and re-administration 15 minutes before modeling). The latter two groups were then divided into six time periods of 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h (4 rats for each time period). TUNEL methods were used to detect the apoptotic index of rat retinal cells, qPCR to detect the expression of optic atrophy 1 (OPA1) mRNA in the retina, Western blot to detect the expression of OPA1 protein and CytC in the cytoplasm and mitochondria of rat retinal cells in each group, and mitochondrial morphology was observed using transmission electron microscopy (TEM). **Results** Compared with the control group, there was significantly more apoptosis was significantly increased in both experimental groups (all  $P < 0.05$ ), except for the 1 h time point group after NaHS intervention ( $0.226 \pm 0.010, P > 0.05$ ). OPA1 mRNA levels in the retinal cells decreased were significantly lower in both experimental groups (all  $P < 0.05$ ), and OPA1 and CytC proteins expression were significantly decreased lower in the mitochondria (all  $P < 0.05$ ) and increased greater in the cytoplasm (all  $P < 0.05$ ). Mitochondrial swelling, cytoplasmic vacuoles and autophagosomes were obvious under TEM. Comparison between groups: Apoptosis in the NaHS intervention group was reduced ( $P < 0.05$ ); the expression of OPA1 mRNA in the retina was higher than that in the RIRI group 24 h after modeling (both  $P < 0.05$ ). The expressions of OPA1 and CytC proteins in the mitochondria was higher than those in the RIRI group 24 h after modeling ( $P < 0.05$ ). The expressions of OPA1 and CytC in the cytoplasm were all lower than those of the RIRI group (both  $P < 0.05$ ). Mitochondrial damage was significantly less at each time point in the NaHS intervention group. **Conclusion** H<sub>2</sub>S may reduce the damage of acute high-eye pressure RIRI by regulating the expression and distribution of OPA1, and its effect occurs 24 hours after the modeling.

**[Key words]** hydrogen sulphide; optic atrophy 1; retinal ischemia-reperfusion injury; acute high-eye pressure

## 《眼的自稳与眼的休克》一书正式出版

由王建洲教授、李萍教授编著，惠延年教授审校的《眼的自稳与眼的休克》一书近日由陕西科学技术出版社正式出版。全书分上、中、下3篇共25章，主要从临床观察出发，理论联系实际，以动态、整体和微创等不同视角去理解、认识与研究眼组织，阐述了眼的自稳与眼病的关系，并提出了“眼的休克”的观点。

上篇主要涉及眼组织的智慧与自稳，阐述了眼的屏障、眼内腔的代谢、眼内各个组织之间的联动、脉络膜视网膜的功能与玻璃体的功能等。中篇讲述眼的休克，重点围绕眼的自稳的破坏，以伴脉络膜脱离的孔源性视网膜脱离为例，对比体循环休克，揭示出眼的休克的本质是屏障破坏与血管通透性改变，同时对眼的休克的特点、眼的休克对自稳的破坏作用以及

其他相关眼病的休克状态进行了详细地阐述。下篇提出眼的自稳与智慧的呈现，进一步阐述了眼组织的部分缺失与替代对自稳的影响。

本书广泛汇集了既往的相关知识和研究进展，临床资料丰富，论据充分，图文并茂，值得广大眼科临床医生仔细阅读、品味和思考。作者也希望本书能对提高临床眼科医师，特别是年轻的医师、眼科学研究生以及基层医院的眼科工作者的临床诊疗水平有所帮助。该书为16开，铜版纸印刷，共267页，40余万字，定价198元。

联系地址：710004 陕西省西安市解放路21号，西安市第四医院眼科；联系电话：029-87480652，18292170576，13991266548