

引文格式:张敏,王强,王康.糖基化终末产物对体外培养牛眼小梁细胞氧化应激及凋亡的影响[J].眼科新进展,2014,34(7):640-642,646. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0175

【实验研究】

糖基化终末产物对体外培养牛眼小梁细胞氧化应激及凋亡的影响

张敏 王强 王康

作者简介:张敏,女,1986年9月出生,山东潍坊人,在读硕士研究生。研究方向:青光眼。联系电话:15684203717;E-mail:bzyxym2008@126.com

About ZHANG Min: Female, born in September, 1986. Postgraduate students. Tel: 15684203717; E-mail: bzyxym2008@126.com

收稿日期:2013-07-28
修回日期:2013-11-12

本文编辑:周志新

作者单位:264003 山东省烟台市,滨州医学院(张敏);256603 山东省滨州市,滨州医学院附属医院(王强,王康)

通讯作者:王强,E-mail:bywq001@126.com

Received date: Jul 28, 2013

Accepted date: Nov 12, 2013

From the Binzhou Medical University (ZHANG Min), Yantai 264003, Shandong Province, China; Affiliated Hospital of Binzhou Medical University (WANG Qiang, WANG Kang), Binzhou 256603, Shandong Province, China

Responsible author: WANG Qiang, E-mail: bywq001@126.com

difference after treating with BSA ($P > 0.05$). **Conclusion** AGE can increase the ROS level in bovine TM cells cultured *in vitro* to mediate their apoptosis.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(7): 640-642, 646]

【关键词】 小梁细胞;糖基化终末产物;活性氧;原发性开角型青光眼;细胞凋亡

【摘要】 目的 通过观察糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)对体外培养牛眼小梁细胞凋亡的影响,研究AGE与原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)之间的关系,进一步探讨其发病机制。方法 体外培养牛眼小梁细胞,通过形态学观察和神经特异性烯醇化酶染色对培养的细胞进行鉴定。将第3代小梁细胞接种于6孔培养板,在培养基中加入不同浓度($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的AGE-BSA培养96 h。终浓度($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的AGE-BSA培养液处理细胞不同时间(48 h、72 h、96 h)。应用流式细胞仪检测小梁细胞凋亡率;活性氧荧光探针2', 7'-二氧荧光黄双乙酸盐检测细胞内活性氧(ROS)水平。结果 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AGE-BSA作用96 h后细胞凋亡率分别为(5.60 ± 0.25)%、(9.57 ± 0.08)%、(17.68 ± 0.21)%,与对照组($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AGE-BSA)细胞凋亡率(4.45 ± 0.12)%相比均明显增高,且差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$); $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AGE-BSA作用细胞48 h、72 h、96 h后凋亡率分别为(10.51 ± 0.28)%、(13.47 ± 0.42)%、(17.68 ± 0.21)%,与对照组相比也均明显增高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。与对照组比较,AGE-BSA处理后细胞内ROS水平显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),BSA组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在体外培养的条件下,AGE可能通过刺激牛眼小梁细胞产生大量ROS介导小梁细胞凋亡。

[眼科新进展, 2014, 34(7): 640-642, 646]

原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是一种常见致盲性眼病,大型流行病学

研究显示糖尿病为POAG最常见的病因,与POAG发病率呈正相关^[1]。糖尿病患者中POAG的发病率为

Effects of advanced glycation end products on oxidative stress and apoptosis of bovine trabecular meshwork cells cultured *in vitro*

ZHANG Min, WANG Qiang, WANG Kang

【Key words】 trabecular meshwork cell; advanced glycation end products; reactive oxygen species; primary open angle glaucoma; apoptosis

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of advanced glycation end products (AGE) on apoptosis of bovine trabecular meshwork cells (TM cells) cultured *in vitro*, and further explore the relationship between AGE and primary open angle glaucoma (POAG), probe its pathogenesis. **Methods** The bovine TM cells were cultured *in vitro* and identified by morphological evaluation and neuronspecific enolase staining. The third generation of cells were inoculated to 6-well plate, and different concentrations ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) AGE-BSA was added into the medium for 96 hours, or treated with AGE-BSA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for different time (48 hours, 72 hours and 96 hours). Flow cytometry was performed to detect the cells apoptosis, and the level of reactive oxygen species (ROS) was evaluated by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) method. **Results** The apoptotic rates after treating with different concentrations ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) AGE-BSA for 96 hours were (5.60 ± 0.25)%, (9.57 ± 0.08)% and (17.68 ± 0.21)%, respectively, which were obviously higher than the control group (4.45 ± 0.12)% (all $P < 0.05$). The apoptotic rates after treating with $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AGEs-BSA for 48 hours, 72 hours and 96 hours were (10.51 ± 0.28)%, (13.47 ± 0.42)% and (17.68 ± 0.21)%, respectively, which were also obviously higher than the control group (all $P < 0.05$). Compared with control group, the ROS level in bovine TM cells after treating with AGE-BSA was increased ($P < 0.05$), but there was no statistical

4%~11%^[2],比一般人群(2%)高。糖尿病与 POAG 间的关系密切,但糖尿病患者并发 POAG 的发病机制尚不明确。研究表明糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)是糖尿病眼部并发症发生发展的重要影响因素^[3-4]。本研究通过研究不同浓度 AGE 对体外培养牛眼小梁细胞凋亡的影响,进一步探讨糖尿病患者中青光眼发病率较正常人高的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 眼球 1岁左右公牛新鲜眼球8只,取自本地屠宰场,4℃冰桶运回实验室。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清、Hepes及胰蛋白酶均购自Hyclone生物化学制品有限公司,兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)单克隆抗体一抗、羊抗兔 FITC-IgG 二抗均购自博士德公司,AGE-牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(10 mg·mL⁻¹)购自 Calbiochem 公司,BSA 购自 Biovision 公司,2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)购自 Sigma 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 牛眼小梁细胞培养及细胞鉴定 采用本实验室既往方法^[5-6],取新鲜牛眼球,常规消毒后,截取距角膜缘后5mm的组织,剔除晶状体及其后组织,暴露虹膜。解剖显微镜下,小心去除虹膜组织,用显微镊轻轻撕取巩膜突和 Schwalbe 线中间的白色疏松小梁网组织,移入10cm培养皿中,37℃培养箱静置0.5h。组织块贴壁后,加入12mL DMEM 高糖培养基(含150g·L⁻¹胎牛血清,青霉素、链霉素各100×10³U·L⁻¹),于37℃、体积分数5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养。每4d更换一次培养液,倒置显微镜下观察细胞生长和形态特征。用2.5g·L⁻¹胰蛋白酶含0.2g·L⁻¹EDTA 消化传代。取传二代小梁细胞接种于预置盖玻片的培养皿中。待细胞接近融合期时,用0.01mol·L⁻¹PBS(pH=7.2)缓冲液冲洗,40g·L⁻¹多聚甲醛溶液固定,室温干燥。免疫荧光法行NSE染色(兔抗人NSE单克隆抗体一抗,羊抗兔FITC-IgG二抗),共聚焦显微镜下观察鉴定小梁细胞的组织来源。

1.2.2 Annexin V-FITC/PI 双标流式细胞术检测细胞凋亡率 将第3代小梁细胞以每孔100×10³个的密度接种于6孔板。经无血清培养基培养24h达细胞同步化后,将其分为6组,每组设6个复孔。任意取其中4组,培养基中加入不同浓度(0μg·mL⁻¹、50μg·mL⁻¹、100μg·mL⁻¹、200μg·mL⁻¹)的AGE-BSA培养细胞96h,剩余2组培养基中加入200μg·mL⁻¹的AGE-BSA分别培养细胞48h、72

h。不含EDTA的胰酶消化各组细胞后收集于流式管中,制成单细胞悬液。4℃下离心(2000r·min⁻¹,5min)2次。500μL缓冲液重悬细胞。加入Annexin V-FITC、PI各5μL,混匀后避光孵育15min,1h内流式细胞仪检测。

1.2.3 细胞内活性氧检测 采用活性氧(ROS)特异荧光探针DCFH-DA检测细胞内ROS的水平。将传3代小梁细胞以每孔100×10³个的密度接种于6个孔板,细胞贴壁后将其分为4组,每组设6复孔。在培养基中加入不同浓度(0、50μg·mL⁻¹、100μg·mL⁻¹、200μg·mL⁻¹)的AGE-BSA培养细胞96h后弃去细胞培养液,加入适量稀释好的10μmol·L⁻¹DCFH-DA溶液,37℃避光孵育20min。用无血清培养基充分洗去未进入细胞内的DCFH-DA。2.5g·L⁻¹胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,收集于流式管中。30min内流式细胞术检测各组DCF荧光强度。

1.3 统计学方法 采用SPSS 13.0统计学软件进行统计处理。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈近似正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经数据转换后各组样本均数经 Levene 检验证实方差齐。不同浓度AGE-BSA作用细胞96h后的凋亡结果及细胞内ROS水平采用单因素方差分析,组间多重比较采用Dunnett *t* 检验。AGE-BSA培养小梁细胞不同时间段的凋亡结果用重复测量资料的方差分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养的小梁细胞形态观察、鉴定 倒置显微镜下观察,原代培养5~10d小梁细胞开始围绕组织块贴壁向外生长。细胞形态多样化,呈梭形、不规则多边形等,有突起和分支(图1A)。13d左右组织块周围可形成单细胞层。取3代细胞进行免疫荧光鉴定,荧光倒置显微镜下观察细胞NSE染色阳性(图1B)证明小梁细胞为神经外胚层神经嵴间充质来源,确认所培养细胞为小梁细胞。

2.2 流式细胞术检测 AGE-BSA 对小梁细胞凋亡的影响 50μg·mL⁻¹、100μg·mL⁻¹、200μg·mL⁻¹AGE-BSA作用96h后细胞凋亡率分别为(5.60±0.25)%、(9.57±0.08)%、(17.68±0.21)%、与对照组(0μg·mL⁻¹AGE-BSA)细胞凋亡率(4.45±0.12)%相比均明显增高,且差异均有统计学意义(均为*P*<0.05),提示AGE-BSA可诱导小梁细胞凋亡,且凋亡率在一定范围内呈浓度依赖性增加。200μg·mL⁻¹AGE-BSA作用细胞48h、72h、96h后凋亡率分别为(10.51±0.28)%、(13.47±0.42)%、(17.68±0.21)%、与对照组相比也均明显增高,差异均有统计学意义(均为*P*<0.05),提示AGE-BSA诱导小梁细胞凋亡在一定范围内呈时间依赖性增加。BSA对照组与正常对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05,见图2)。

Figure 1 Identification of cultured bovine trabecular meshwork cells. A; Primary cultured bovine trabecular meshwork cells for 8 days with rhomboid or polygonal appearance(×400); B; Positive staining of neuron-specific enolase under inverted fluorescent microscope(×400) 培养的牛眼小梁细胞的鉴定。A: 原代培养 8 d 的小梁细胞呈菱形、多边形(×400); B: 荧光倒置显微镜观察传代的细胞 NSE 染色阳性(×400)

Figure 2 Effects of different concentrations, treatment time and pre-treatment of AGE-BSA on apoptosis of cultured bovine trabecular meshwork cells. A; Normal control group; B; 50 μg · mL⁻¹ AGE-BSA group; C; 100 μg · mL⁻¹ AGE-BSA group; D; 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA for 48 hours group; E; 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA for 72 hours group; F; 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA for 96 hours group; G; BSA control group 不同浓度 AGE-BSA 作用不同时间和不同预处理对细胞凋亡率的影响。A: 正常对照组; B: 50 μg · mL⁻¹ AGE-BSA 组; C: 100 μg · mL⁻¹ AGE-BSA 组; D: 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA 48 h 组; E: 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA 72 h 组; F: 200 μg · mL⁻¹ AGE-BSA 96 h 组; G: BSA 对照组

2.3 流式细胞术检测 AGE-BSA 对小梁细胞内 ROS 水平的影响 ROS 特异荧光探针 DCFH-DA 本身没有荧光,但可以自由穿过细胞膜进入细胞内,被酯酶水解生成 DCFH。无荧光的 DCFH 可以被 ROS 氧化生成有荧光的 DCF,检测 DCF 的荧光强度可反映细胞内 ROS 的水平。与对照组比较,AGE-BSA 处理后细胞内 ROS 水平显著提高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BSA 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$,见图 3)。

3 讨论

POAG 是一种常见的致盲性眼病,眼压升高是其 主要病理特征。房水排出通道的病理改变可以引起眼压升高。作为房水流出的主要通道小梁网在调节房水外流及控制眼压方面发挥重要作用。氧化应激可通过损伤小梁网而导致眼压升高^[7-8]。

循环血中沉积在眼部的 AGE 以及眼组织中的长寿蛋白糖化形成的 AGE 与其受体相互作用,导致了糖尿病和年龄相关性眼病^[3]。在培养的肾间质成纤维细胞中,AGE 呈时间和剂量依赖性促进 ROS 的产生,ROS 被证实是 AGE 致病的重要中介导因子^[9],其引起的氧化应激是细胞凋亡的一个重要触发因素^[10]。本实验中发现,AGE-BSA 可以明显提高小梁细胞内 ROS 水平,同时小梁细胞的凋亡率随 AGE-BSA 浓度的增大以及作用时间的延长而增加。我们推测 AGE-BSA 可能是通过诱导小梁细胞产生大

Figure 3 Effects of AGE-BSA on ROS level in trabecular meshwork cells AGE-BSA 对细胞内 ROS 水平的影响

量 ROS 引起氧化应激并通过某些途径导致小梁细胞凋亡。小梁网主要由小梁柱以及内衬的小梁细胞组成,小梁细胞具有吞噬、收缩、合成和分泌等功能,其数量的异常减少是 POAG 最重要的病理改变之一,与它的发病密切相关^[11]。在小梁细胞,氧化应激还可以激活 NF-κB 通路,促进 MMPs/TIMPs 的表达,调节小梁细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的重塑,持续的氧化应激可以引起小梁细胞功能失代偿,导致小梁网处 ECM 沉积^[12]。据此我们推测,AGE 引起的持续氧化应激一方面可能通过诱导小梁细胞凋亡,使小梁细胞数目随 AGE 浓度的增高而减少,导致小梁网的正常功能难以维持,另一方面激活小梁 (下转第 646 页)

白内障患病率仍较高。在陕西省医疗保险计划中,标准的白内障手术费用每例为2000~5000元,这对于大多数农村人口是负担不起的,所以经济状况是制约白内障手术的一个主要原因。因此我们应该继续开展“视觉第一中国行动”,加强眼科专业医师的培训,组派医疗队赴农村和边远、贫困山区,增强农村人群的眼保健意识,提高白内障手术的覆盖率。

本调查中高度近视性视网膜病变在低视力中占10.8%,为第二位,屈光不正低视力中占9.6%,为第三位,与国内一些调查结果相似^[19-20]。2006年“北京城乡地区致盲及视力损害原因的北京眼科研究”调查发现中国成年人最常引起视力损害的第二原因为变性近视^[19]。北京同仁医院调查结果显示,低视力门诊1500例视力病例分析,高度近视占20%^[20]。

3.3 防盲致盲工作 本调查中,大量盲是可治疗性盲,如白内障、部分弱视和一些眼底病,这就要求我们在“视觉第一中国行动”、“爱眼日”等咨询活动中,大力宣传致盲眼病的防治知识,不断加强农村防盲治盲队伍的建设,通过“视觉2020——人人享有看见的权利”的全球性计划以达到控制致盲性眼病的目的。

总之,本次调查发现:陕西省盲(1.0%)和低视力(4.8%)的患病率较高,已知陕西省总人口数为3596万人,根据此次调查推算全省有35.7万盲人、172.6万低视力患者,因而陕西省的防盲、治盲工作仍很艰巨。

参考文献

- 1 Resnikoff S, Pascolini D, Etya' ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002[J]. *Bull World Health Organ*, 2004, 82(11): 844-851.
- 2 Thygefors B, Ne' grel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness[J]. *Bull World Health Organ*, 1995, 73(1): 115-121.
- 3 陈莉,任百超,杨建刚,何媛,孙乃学. 陕西省农村盲的患病率和白内障手术[J]. *中国实用眼科杂志*, 2006, 24(6): 648-653.
- 4 World Health Organization. Magnitude and causes of visual im-

- pirment[EB/OL]. [2013-10-10]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/>. Accessed December 17, 2007.
- 5 Michon JJ, Lau J, Chan WS, Ellwein LB. Prevalence of visual impairment blindness, and cataract surgery in the Hong Kong elderly[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(2): 133-139.
- 6 张唯伟,肖家翔. 贵州省老年人视力残疾抽样调查分析[J]. *中国老年医学杂志*, 1996, 15(5): 306-308.
- 7 谢婷玉,陈雪艺,穆塔里甫·吾布力哈斯木,宋艳,王燕. 新疆库车县40岁及以上维吾尔族农民盲和低视力流行病学调查[J]. *眼科研究*, 2007, 25(10): 785-788.
- 8 赵家良,睢瑞芳,贾丽君, Ellwein LB, 降丽娟, 张承训, 等. 北京顺义县50岁及以上人群中青光眼患病率和正常眼压的调查[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(6): 335-339.
- 9 Taylor HR, Livingstone PM, Stanislavsky YL, McCarty CA. Visual impairment in Australia: distance visual acuity, near vision, and visual field findings of the Melbourne Visual Impairment Project[J]. *Am J Ophthalmol*, 1997, 123(3): 328-337.
- 10 Xu L, Cui T, Yang H, Hu A, Ma K, Zheng Y. Prevalence of visual impairment among adults in China: The Beijing Eye Study[J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(3): 591-593.
- 11 李景荣,邹克智,毕万银. 甘肃省平凉市崆峒区人群盲和低视力现状调查[J]. *国际眼科杂志*, 2011, 11(8): 1452-1454.
- 12 Varma R, Ying-Lai M, Klein R, Stanley P. Prevalence and risk indicators of visual impairment and blindness in Latinos: The Los Angeles Latino Eye Study[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(6): 1132-1140.
- 13 Attebo K, Mitchell P, Smith W. Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study[J]. *Ophthalmology*, 1996, 103(3): 357-364.
- 14 Klaver C, Wolfs R, Vingerling J, Hofmann A, De Jong P. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: The Rotterdam Study[J]. *Arch Ophthalmol*, 1998, 116(5): 653-658.
- 15 顾永昊. 1988-2008全球盲的改变[J]. *实用防盲技术*, 2009, 4(1): 1-2.
- 16 Zhou J, Yuan Y, Zhang X, Guan HJ. A prevalence investigation of blindness and low vision in 2008 among adults aged 60 years or above in 2 villages of Nantong[J]. *Zhonghua Yanke Zazhi*, 2012, 48(10): 908-914.
- 17 Saw SM, Foster PJ, Gazzard G, Seah S. Causes of blindness, low vision and -assessed poor visual function in Singaporean Chinese adults: The Tanjong Pagar Survey[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(6): 1161-1168.
- 18 Hsu WM, Cheng CY, Liu JH, Tsai SY, Chou P. Prevalence and causes of visual impairment in an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(1): 62-69.
- 19 Jonas JB, 喻平平. 北京城乡地区致盲及视力损害原因的北京眼科研究[J]. *世界核心医学期刊文摘眼科学分册*, 2006, 2(11): 45-46.
- 20 魏林娜,孙葆忱,张书泰,苏小锋,郑远远,严肃. 1500例低视力分析[J]. *中国实用眼科杂志*, 1990, 8(3): 395-397.

(上接第642页)

网细胞NF-κB通路,破坏MMPs/TIMPs的表达平衡,进而促进小梁网处ECM沉积。这两方面最终导致房水流出受阻,引发POAG。本研究从一个侧面解释了糖尿病患者易并发POAG的机制并对指导糖尿病并发POAG患者的临床用药提供了一定理论依据。

参考文献

- 1 Lin HY, Hsu WM, Chou P, Liu CJ, Chou JC, Tsai SY, et al. Intraocular pressure measured with a noncontact tonometer in an elderly Chinese population: the Shihpai Eye Study[J]. *Arch Ophthalmol*, 2005, 123(3): 381-386.
- 2 李美玉. 青光眼学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:501.
- 3 Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE(RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(3): 235-247.
- 4 Péterszegi G, Robert AM, Robert L, Renard G. The importance of the Maillard reaction in ophthalmology[J]. *J Soc Biol*, 2007, 201(2): 209-214.
- 5 张强,王强. 肿瘤坏死因子α对体外培养牛眼小梁细胞纤维连接

- 蛋白的影响[J]. *眼科新进展*, 2009, 29(11): 811-814.
- 6 王强,魏厚仁. 体外培养人眼小梁细胞吞噬乳胶微粒的研究[J]. *中华眼科杂志*, 1999, 35(5): 389-390.
- 7 Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A, Pons-Vazquez S, Garcia-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2008, 17(4): 263-268.
- 8 Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Reides CG, Evelson PA, Llesuy SF. Time course changes of oxidative stress markers in a rat experimental glaucoma model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(9): 4635-4640.
- 9 Yan HD, Li XZ, Xie JM, Li M. Effects of advanced glycation end products on renal fibrosis and oxidative stress in cultured NRK49F cells[J]. *Chin Med J*, 2007, 120(9): 787-793.
- 10 Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(3): 341-346.
- 11 Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open angle glaucoma and nonglaucomatous normals[J]. *Ophthalmology*, 1984, 91(6): 564-579.
- 12 朱玉广,王杰,朱艳,钟莹莹,杜孝楠,张荣. 氧化应激介导的NF-κB信号通路对猪小梁细胞MMPs/TIMPs表达的作用研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2012, 50(5): 51-54.