

引文格式:魏婷,高珊,程翹楚,崔丽珺,康前雁. 急性视网膜缺血再灌注损伤后大鼠视网膜副凋亡和自噬的发生[J]. 眼科新进展,2018,38(6):501-505. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2018. 0117

【实验研究】

急性视网膜缺血再灌注损伤后大鼠视网膜副凋亡和自噬的发生[△]

魏婷 高珊 程翹楚 崔丽珺 康前雁

作者简介:魏婷,女,1984年8月出生,陕西延安人,博士。研究方向:青光眼。联系电话:18966910163; E-mail: lu840828lu@163.com; ORCID:0000-0002-1983-1205

About WEI Ting: Female, born in August, 1984. Doctor degree. Tel: 18966910163; E-mail: lu840828lu@163.com; ORCID: 0000-0002-1983-1205

收稿日期:2018-01-16
修回日期:2018-03-23
本文编辑:盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30772373、81600733);陕西省自然科学基金计划(编号:2016JM8042);西安交通大学第一附属医院青年创新基金(编号:2017QN-02)

作者单位:710061 陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科
通讯作者:康前雁,E-mail: Kangqy@mail.xjtu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-6744-658X

Received date: Jan 16, 2018
Accepted date: Mar 23, 2018

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 30772373, 81600733); Natural Science Basic Research of Shaanxi Province of China (No: 2016JM8042); Youth Foundation of the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University (No: 2017QN-02)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Responsible author: KANG Qian-Yan, E-mail: Kangqy@mail.xjtu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-6744-658X

视网膜组织,利用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)检测视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)副凋亡及自噬的发生;利用免疫荧光染色法检测视网膜微管相关蛋白1轻链3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)的表达。结果 急性RIRI后1 d持续至28 d, TEM可见RGCs细胞质空泡数量较正常对照组增高。急性RIRI后1 d持续至28 d, TEM可见RGCs细胞质中自噬体数量增加。正常对照组RGCs的细胞质中自噬体每50 μm²平均为0.79个,急性RIRI后7 d自噬体的平均数量达到高峰,每50 μm²平均为2.29个,与正常对照组相比差异具有统计学意义(P<0.05)。免疫荧光法检测发现,与正常对照组相比,急性RIRI后1 d开始,RGCs的细胞质中LC3表达增加,并在整个实验期间持续高表达,正常对照组RGCs层的LC3阳性细胞百分比为15.90%,急性RIRI后1 d、28 d时LC3阳性细胞百分比分别为46.95%和52.30%,与正常对照组相比差异均具有统计学意义(均为P<0.05)。结论 急性RIRI后RGCs涉及副凋亡和自噬的激活,各种类型的程序性细

Activation of paraptosis and autophagy in rat retina following acute retinal ischemia-reperfusion injury
WEI Ting, GAO Shan, CHENG Qiao-Chu, CUI Li-Jun, KANG Qian-Yan
【Abstract】 Objective To investigate whether paraptosis and autophagy have an effect on acute retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI) in an experimental rat model that recapitulates features of acute hypertensive glaucoma and to explore the possible underlying mechanisms. Methods A total of 30 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into RIRI group and control group. The acute RIRI model was induced with normal saline in the right eye of rats from the RIRI group by anterior chamber perfusion, while the rats in the control group left untreated. On day 1, day 3, day 7, day 28 after RIRI model establishment, the changes in morphology of retinal ganglion cells (RGCs) were observed by transmission electron microscopy (TEM), and the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was measured by immunofluorescence methods. Results When compared with the control group, the number of cytoplasmic vacuoles predominantly derived from the progressive swelling of mitochondria and/or endoplasmic reticulum (ER) in RGCs were increased in the RIRI group from day 1 to day 28 by TEM. And ultra-structural analyses showed the double-or multiple-membrane autophagosomes were markedly accumulated in the cytoplasm of RGCs following acute RIRI. The average number of autophagic vacuoles in the cytoplasm of RGCs was 0.79 per 50 μm² in the control group, and the average number of autophagosomes reached to a maximum on day 7 after acute RIRI at 2.29 per 50 μm², which was statistically significant compared with the control group (P<0.05). Compared to the control group, LC3 expression in the cytoplasm of RGCs was up-regulated on day 1 after acute RIRI, which sustained throughout the experimental period. The percentage of LC3 positive cells in the retinal ganglion cell layer was 15.90% in the control group, and the data was 46.95% and 52.30% on day 1 and day 28 after RIRI, respectively, both which were statistically significant compared with the normal control group (both P<0.05). Conclusion Both paraptosis and autophagy participate in death of RGCs after acute RIRI. Programmed cell death in different cells, either coexistence of multiple-cell death form or a single-cell death form, participates in the pathogenesis of acute RIRI.
【Key words】 paraptosis; autophagy; retinal ischemia-reperfusion injury; retinal ganglion cells
【摘要】 目的 探讨大鼠急性视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)后不同时间点视网膜中副凋亡及自噬的发生。方法 将30只健康成年SD雄性大鼠随机分为RIRI组及正常对照组。利用高眼压前房灌注法建立SD大鼠急性RIRI动物模型。正常对照组不做任何处理。急性RIRI后1 d、3 d、7 d、28 d各时间点取各组大鼠的

胞死亡可作为单一细胞死亡的形式或多种细胞死亡形式共存,参与急性 RIRI 视网膜损伤。

【关键词】 副凋亡;自噬;视网膜缺血再灌注损伤;视网膜神经节细胞

【中图分类号】 R775

视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia reperfusion injury, RIRI)是青光眼、糖尿病视网膜病变及其他相关眼病共同的病理基础,可导致视功能的损害并最终致盲^[1]。青光眼是全球导致失明的主要原因之一,属于神经退行性疾病,以病理性高眼压为特征并导致视网膜缺血和渐进性神经元死亡^[2]。各种类型的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)参与神经退行性疾病^[3-4]。那么非凋亡形式 PCD——副凋亡和自噬是否参与了青光眼急性 RIRI 大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的死亡?本研究利用大鼠急性 RIRI 模型,探讨非凋亡形式 PCD 与急性 RIRI 后 RGCs 死亡的关系及其作用机制,为预防急性 RIRI 后 RGCs 死亡的发生和探索新的治疗途径提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康成年 SD 雄性大鼠 30 只,体质量 220 ~ 250 g,无眼疾,购自西安交通大学医学院实验动物中心。大鼠随机分为急性 RIRI 组(24 只)及正常对照组(6 只)。急性 RIRI 组按 RIRI 后不同时间点分为 1 d、3 d、7 d、28 d 四个小组,每组 6 只大鼠。各组 SD 大鼠均在正常温度、湿度、光亮下生活,定时喂养。正常对照组不做任何处理;急性 RIRI 组建立急性 RIRI 模型。实验动物的使用遵循国家实验动物管理保护条例。

1.1.2 主要实验试剂及仪器 兔抗鼠视网膜微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体(日本 MBL 公司),FITC 标记抗兔 IgG(北京康为世纪公司),DAPI(美国 Sigma 公司)。显微手术器械(苏州 66 视觉医疗器械厂),透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)(H-7650,日本 Hitachi 公司),超薄切片机(LKB-V/NOVA,瑞典 LKB 公司),倒置荧光显微镜(BX51,日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 急性 RIRI 模型的建立 采用前房灌注生理盐水升高眼压法建立急性 RIRI 模型(均选择右眼为实验眼)^[5]。80 g · L⁻¹水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,清洁大鼠头部,盐酸奥布卡因滴眼液行表面麻醉,氯霉素滴眼液消毒眼部。将连接生理盐水滴瓶输液管的 4 号半针头沿大鼠右眼颞侧角巩膜缘斜刺入前房,液平高度与鼠眼垂直距离为 150 cm,造成大鼠眼内 110 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg)的高眼压,见瞳孔区反光由橘红色变为苍白,眼底镜检查视网膜苍白,说明已完全阻断视网膜中央动脉供血。高眼

压状态持续 60 min 后拔出输液针头,可见瞳孔区反光迅速变为暗红色,视网膜呈橘红色,说明阻断的血管重新开放,已形成再灌注。术中保持大鼠体温 37 ℃,术后给予红霉素眼膏涂眼预防感染。

1.2.2 电镜标本的取材及处理 正常对照组取 3 只大鼠,RIRI 组分别于急性 RIRI 后 1 d、3 d、7 d、28 d 各取 3 只大鼠,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 + 40 g · L⁻¹多聚甲醛固定液 200 mL,先快速滴注至大鼠四肢抽搐,待抽搐停止后,缓慢滴注 20 min 后取材。取视网膜组织块,浸泡于体积分数 2.5%戊二醛 + 40 g · L⁻¹多聚甲醛固定液中后固定 2 ~ 4 h,磷酸缓冲液漂洗,10 g · L⁻¹四氧化锇固定液 4 ℃后固定 2 ~ 3 h,乙醇梯度脱水,环氧树脂 Epon 812 浸透、包埋;聚合后做半超薄切片 1 ~ 2 μm,染色后光学显微镜下定位,超薄切片机行 80 nm 超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色后,TEM 下观察、拍照。每例标本检测 10 个视野。

1.2.3 免疫荧光染色标本的取材 正常对照组取 3 只大鼠,RIRI 组分别于急性 RIRI 后 1 d、3 d、7 d、28 d 各取 3 只大鼠,深度麻醉,经左心室快速灌注 4 ℃预冷的生理盐水 200 mL,随即灌入 40 g · L⁻¹多聚甲醛 500 mL,快速滴注至大鼠四肢抽搐,待抽搐停止后,缓慢滴注 2 h 后取材。取双眼眼球,置于 40 g · L⁻¹多聚甲醛溶液中后固定 24 h,梯度蔗糖溶液脱水至眼球沉于体积分数 30%蔗糖溶液底部,制作厚度 12 μm 的冰冻切片,用于 LC3 免疫荧光染色。

1.2.4 LC3 免疫组织化学检测 切片以 0.01 mmol · L⁻¹ PBS 冲洗,体积分数 0.03% TritonX-100 室温放置 30 min;PBS 冲洗,体积分数 5%山羊血清封闭,室温孵育 30 min,滴加兔抗 LC3(1 : 500)一抗孵育,4 ℃过夜;PBS 冲洗,滴加 FITC 标记的小鼠抗兔 IgG(1 : 200)二抗室温孵育 2 h;PBS 洗涤;DAPI 染色,室温孵育 10 min,PBS 冲洗;缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察、照相;阴性对照采用体积分数 5%正常山羊血清代替一抗,其余步骤同上。于倒置荧光显微镜下观察自噬的发生及变化。为避免实验过程中非特异性染色造成的误差,每例标本检测 3 张切片,每张切片检测 5 个视野。定量评价急性 RIRI 损伤引起 RGCs 的丢失程度,每组随机选取 5 张切片,计数距视盘边缘 100 μm 处两侧 RGCs 层 200 μm 长度内 RGCs 的数量。

1.3 统计学方法 数据均以均数 ± 标准差表示,应用 SPSS 18.0 进行数据分析,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行显著性检验,多组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性 RIRI 后副凋亡的超微结构特征 TEM 下正常对照组 RGCs 偶见核周出现细胞内空泡(图 1A – 图 1B)。副凋亡的典型特征是细胞质空泡化,空泡内清晰且无细胞质。RIRI 组 RIRI 后 1 d,RGCs 细胞质空泡化明显,但伴随着同时发生的坏死状形态。随 RIRI 时间的延长,RGCs 细胞质空泡化持续出现,再灌注损伤引起 RGCs 的内质网和(或)线粒体渐进性肿胀,线粒体嵴出现扩张(图 1C – 图 1H)。这些观察结果符合副凋亡的特征^[6-7]。因此,急性 RIRI 可部分通过副凋亡途径诱导 RGCs 死亡。RIRI 导致细胞器的

肿胀可能提示细胞内环境稳态的破坏。

2.2 急性 RIRI 后自噬的超微结构特征 TEM 示,正常对照组 RGCs 细胞质中偶见自噬体(图 2A – 2B),每 50 μm^2 平均为 0.79 个。急性 RIRI 后 1 d,RGCs 细胞质中已经可见自噬体的激活,并在整个实验期间持续激活(图 2C – 图 2H)。急性 RIRI 后 7 d 自噬体的平均数量达到高峰,每 50 μm^2 平均为 2.29 个,与正常对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。自噬激活的表现自噬体包裹损伤的线粒体或自噬泡包裹部分降解的膜性物质。这些结果表明,急性 RIRI 损伤的病理机制涉及 RGCs 自噬的激活。

图 1 急性 RIRI 后 RGCs 副凋亡的超微结构。A:正常对照组($\times 10\,000$);B:正常对照组($\times 50\,000$);C:RIRI 组 3 d($\times 10\,000$);D:RIRI 组 3 d($\times 50\,000$);E:RIRI 组 7 d($\times 10\,000$);F:RIRI 组 7 d($\times 50\,000$);G:RIRI 组 28 d($\times 10\,000$);H:RIRI 组 28 d($\times 50\,000$)

2.3 LC3 在急性 RIRI 后视网膜中的表达 LC3 免疫荧光法检测急性 RIRI 后 1 d、3 d、7 d、28 d 及正常对照组 RGCs 自噬的激活情况。正常对照组 LC3 免疫荧光染色(绿色)存在于 RGCs 层和内丛状层(图 3A)。阴性对照未检测到 LC3 免疫荧光染色。LC3 免疫反应性在急性 RIRI 后 1 d 的 RGCs 层和内丛状层显著增加,表现为小簇状、致密染色颗粒,并在整个实验期间持续高表达(图 3)。急性 RIRI 后 7 d,内丛状层的 LC3 免疫反应性降低。正常对照组 RGCs 层的 LC3 阳性细胞百分比为 15.90%,RIRI 后 1 d LC3 阳性细胞百分比显著增高,达到 46.95%,与正常对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。急性 RIRI 后 28 d LC3 阳性细胞百分比仍高达到 52.30%,与正常对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3E)。以 400 倍的放大率对 RGCs 层的 DAPI 阳性细胞数(蓝色)进行计数,正常对照组每 200 μm 为(11.1 ± 1.27)个,而急性 RIRI 后 28 d

DAPI 阳性细胞的数量下降到每 200 μm (8.57 ± 1.72)个,与正常对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3F)。急性 RIRI 后 7 d 内丛状层和内核层的厚度显著下降并持续至 28 d,这反映了视网膜内层结构的破坏。

3 讨论

RIRI 是青光眼、糖尿病视网膜病变及其他相关眼病的共同病理基础^[1]。青光眼是全球导致失明的主要原因之一,属于视神经的神经退行性疾病,最终会导致不可逆性视功能损害^[1-2]。越来越多的证据表明,各种类型的 PCD,如细胞凋亡和自噬作用,在青光眼患者和哺乳动物模型的青光眼性视网膜损伤中发挥重要作用^[5,7-8]。更好地了解每种 PCD 的分子机制,并选择性阻止这些类型的 PCD 可能对神经元的存活和视功能的保留有益。

本研究结果表明,大鼠急性 RIRI 模型中,副凋亡

图 2 急性 RIRI 后 RGCs 自噬的超微结构。A:正常对照组(×10 000);B:正常对照组(×50 000);C:RIRI 组 3 d(×10 000);D:RIRI 组 3 d(×50 000);E:RIRI 组 7 d(×10 000);F:RIRI 组 7 d(×50 000);G:RIRI 组 28 d(×10 000);H:RIRI 组 28 d(×50 000)

图 3 急性 RIRI 后各组大鼠视网膜 LC3 的表达情况(标尺:50 μm)。A:正常对照组;B:RIRI 组 1 d;C:RIRI 组 7 d;D:RIRI 组 28 d;E:各组 LC3 阳性细胞百分比(与正常对照组相比,**P*<0.05);F:各组每 200 μm RGCs 的数量(与正常对照组相比,**P*<0.05)

和自噬的激活与 RIRI 引起的视网膜损伤相关。本研究证实急性 RIRI 可诱导 RGCs 细胞质中不规则的空泡形成。对细胞质空泡化的进一步观察表明,其与内质网和(或)线粒体肿胀相关并伴随核染色质的保存。这些结果表明,急性 RIRI 诱导的细胞质空泡

化可能与副凋亡相关,并可能导致副凋亡样细胞死亡。肿胀的内质网和线粒体已涉及到细胞内环境稳态的破坏^[9]。副凋亡是一种新近定义的 PCD,目前对其发生的机制知之甚少,国内外学者正努力鉴别特定副凋亡样变化,但仅在过去的几年中才有研究

对其蛋白质组学分析进行描述^[10-11]。副凋亡在神经系统发育的细胞分化阶段及许多神经变性疾病中发生^[12]。近年来,许多研究强调神经元对涉及副凋亡过程的应激相关信号的损伤易感性,这加强了副凋亡和神经退行性疾病之间的联系^[7,13]。

免疫组织化学检测 results 和 TEM 的观察结果表明,与正常对照组比较,急性 RIRI 后 RGCs 自噬活性明显增加。急性 RIRI 后不同时间点,通过 TEM 可观察到双层或多层膜嗜酸性自噬囊泡的超微结构特征。TEM 观察到包裹细胞质结构的双层膜囊泡是验证自噬体产生的金标准。在大鼠急性 RIRI 模型中,RGCs 层涉及伴随神经退行性变性发生的自噬持续性激活。免疫荧光染色结果显示,急性 RIRI 后 1 d RGCs 层的 LC3 表达增加,并在整个实验期间持续高表达。急性 RIRI 后 3 d RGCs 丢失显著,而 RGCs 细胞质中 LC3 免疫反应性显著增加。RGCs 细胞质中 LC3 高表达与 RGCs 显著丢失的时期相对一致。然而,LC3 反应性的增加并非自噬特异性。此外,除了在自噬中起到重要作用外,最近有文献报道,LC3 还涉及非自噬性细胞质空泡化^[14]。自噬在急性 RIRI 的视网膜激活增加可能代表受损物质再循环和导致细胞死亡两种机制。根据不同的细胞环境,自噬作为真核细胞中的溶酶体介导的自我降解过程,既可以促进存活,也可进行性恶化并最终导致细胞死亡^[7,15]。

本研究结果表明,急性 RIRI 可诱导三种类型的 PCD,副凋亡、自噬和凋亡在 RGCs 同时发生。在以往的研究中,Kim 等^[16]发现急性高眼压与 RGCs 细胞死亡和细胞存活途径的多种变化相关联。最近的研究发现,PCD 可作为单一细胞死亡的形式,也可与副凋亡、自噬、细胞凋亡等多种细胞死亡形式共存,参与缺血性损伤、神经退行性变性和病毒感染^[11,17-18]。

综上所述,我们的研究结果不仅证实之前的报道,即细胞凋亡引起急性 RIRI 后 RGCs 的死亡,同时也表明,副凋亡和自噬的失调可能参与了急性 RIRI 导致的 RGCs 死亡。新的共识认为副凋亡和自噬是一把双刃剑,既可参与促进存活的机制,也可进行性恶化并最终导致细胞死亡。多种微环境的改变,可能会激活副凋亡和自噬的其中一种或多种生化途径。在青光眼及其他神经退行性疾病中,无论是通过抑制或增强,靶向干预副凋亡和自噬,可能是神经系统疾病治疗性干预的潜在目标。

参考文献

[1] GILLIPSIE M, JYOTI S, NOORUDDIN K. Cellular stress response

- and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(24):444.
- [2] QUIGLEY H A. Glaucoma [J]. *Lancet*, 2011, 377(9774):1367-1377.
- [3] WANG J T, MEDRESS Z A, BARRES B A. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(1):7-18.
- [4] YANG Z, KLIONSKY D J. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9):814-822.
- [5] KONG X P, ZHOU L H. Autophagy dysfunction of retinal ganglion cells in glaucoma [J]. *Chin J Anat*, 2017, 40(3):337-341.
- 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.
- [6] SPERANDIO S, DE B I, BREDESEN D E. An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26):14376-14381.
- [7] SPERANDIO S, POKSAY K S, SCHILLING B, CRIPPEN D, GIBSON B W, BREDESEN D E. Identification of new modulators and protein alterations in non-apoptotic programmed cell death [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6):1401-1412.
- [8] FU S Y, ZHANG X. Relationship between autophagy and retinal ganglion cells in animal models of glaucoma [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(2):180-183.
- 傅诗雅, 张旭. 青光眼动物模型中自噬与视网膜神经节细胞的关系 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(2):180-183.
- [9] HOA N, MYERS M, DOUGLASS T, ZHANG J G, DELGADO C, DRIGGERS L, et al. Molecular mechanisms of paraptosis induction; implications for a non-genetically modified tumor vaccine [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2):e4631.
- [10] BROKER L E, KRUYT F A, GIACCONE G. Cell death independent of caspases; a review [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9):3155-3162.
- [11] YUMNAM S, HONG G E, RAHA S, SARALAMMA V V, LEE H J, LEE W S, et al. Mitochondrial dysfunction and Ca²⁺ overload contributes to hesperidin induced paraptosis in hepatoblastoma cells, HepG2 [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(6):1261-1268.
- [12] WANG W B, FENG L X, YUE Q X, WU W Y, GUAN S H, JIANG B H, et al. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(5):2196-2206.
- [13] PEHAR M, O'RIORDAN K J, BRUNS CUSATO M, ANDRZEJEWSKI M E, DEL ALCAZAR C G, BURGER C, et al. Altered longevity-assurance activity of p53; p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2):174-190.
- [14] KARL R, SINGHA P K, VENKATACHALAM M A, SAIKUMAR P. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(28):2556-2568.
- [15] XIE B S, ZHAO H C, YAO S K, ZHOU D X, JIN B, LV D C, et al. Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(4):599-606.
- [16] KIM H S, PARK C K. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program [J]. *Brain Res*, 2005, 1057(1-2):17-28.
- [17] DANAILA L, POPESCU I, PAIS V, RIGA D, RIGA S, PAIS E. Apoptosis, paraptosis, necrosis, and cell regeneration in posttraumatic cerebral arteries [J]. *Chirurgia (Bucur)*, 2013, 108(3):319-324.
- [18] PAIS V, DANAILA L, PAIS E. Ultrastructural patterns of the activated cell death programs in the human brain [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2013, 37(2):110-120.