

# 天麻钩藤饮抗大鼠视网膜神经节细胞凋亡机制的实验研究

吕繁涛, 李玉洁, 马科, 王海燕

作者单位: (100010) 中国北京市, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心

作者简介: 吕繁涛, 在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 天麻钩藤饮在青光眼视神经保护方面的作用。

通讯作者: 王海燕, 毕业于首都医科大学, 博士, 主任医师, 研究方向: 天麻钩藤饮在青光眼视神经保护方面的作用。

drwanghaiyan@126.com

收稿日期: 2017-06-27 修回日期: 2017-12-01

## Study of the neuroprotective effects and mechanisms of Tianma Gouteng Decoction on retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model

Fan-Tao Lyu, Yu-Jie Li, Ke Ma, Hai-Yan Wang

Beijing Tongren Eye Center; Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China

Correspondence to: Hai-Yan Wang. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China. drwanghaiyan@126.com

Received: 2017-06-27 Accepted: 2017-12-01

### Abstract

• **AIM:** To observe the mechanism of Tianma Gouteng Decoction on the protein molecular level in the optic nerve crush model rats.

• **METHODS:** Totally 36 participants 36 male Wistar rats were divided randomly into six groups (6 in every group): normal control group, negative control group, Tianma Gouteng Decoction treatment groups (concentrations were 0.6g/mL, 1.2g/mL, 2.4g/mL respectively) and ginkgo biloba tablets positive control group (concentrations was 1.2mg/mL). Nothing was done in the normal control group. The optic nerve of right eye in the other groups was done with the optic nerve crush model. Normal control group and negative control group was treated only with water. The average grey scale values of the N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B (NMDA2B) receptor protein, beta-amyloid protein (A $\beta$ ) in the average grey scale values were detected.

• **RESULTS:** The average grey scale value of Tianma Gouteng Decoction in low, medium and high dose groups about NMDA2B receptor protein was significantly less than that of the negative control group (all  $P < 0.001$ ), and there was no significant difference with the positive

control group ( $P = 0.092, 0.411, 0.676$ ), the difference between normal control group and negative control group was significant ( $P < 0.001$ ). The high dose group of beta-amyloid's average grey scale value reduced significantly than the negative control group ( $P = 0.030, 0.001$ ). The low dose group than the negative control group was not obviously ( $P = 0.614$ ). The high dose group was not significantly different from the positive control group ( $P = 0.927$ ), the difference between normal control group and negative control group was significant ( $P < 0.001$ ).

• **CONCLUSION:** Tianma Gouteng Decoction can go through the decrease of the NMDA2B receptor protein expression and the control of beta-amyloid deposition to reduce the retinal ganglion cell injury and apoptosis.

• **KEYWORDS:** Tianma Gouteng Decoction; optic nerve crush; retinal ganglion cell; N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B receptor protein; beta-amyloid protein

**Citation:** Lyu FT, Li YJ, Ma K, *et al.* Study of the neuroprotective effects and mechanisms of Tianma Gouteng Decoction on retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model. *Guoji Yanke Zazhi* 2018;18(1):35-39

### 摘要

**目的:** 从蛋白分子水平分析天麻钩藤饮抗大鼠视神经夹伤模型视网膜神经节细胞凋亡的机制。

**方法:** 将所有大鼠 36 只随机分为天麻钩藤饮低剂量组 (0.6g/mL,  $n = 6$ )、中剂量组 (1.2g/mL,  $n = 6$ )、高剂量组 (2.4g/mL,  $n = 6$ )、正常对照组 ( $n = 6$ )、阴性对照组 ( $n = 6$ ) 和银杏叶片阳性对照组 (1.2mg/mL,  $n = 6$ ) 共 6 组, 再将 30 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 (除正常对照组外其余五组) 制备成视神经夹伤模型。检测 N-甲基-D-天冬氨酸 2B (N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B, NMDA2B) 受体蛋白平均灰度值和  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 平均灰度值。

**结果:** 天麻钩藤饮低、中、高剂量组 NMDA2B 受体蛋白平均灰度值较阴性对照组明显减少 ( $P < 0.001$ ), 并与阳性对照组比较差异无统计学意义 ( $P = 0.320$ ), 正常对照组与阴性对照组具有显著性差异 ( $P < 0.001$ )。天麻钩藤饮中、高剂量组  $\beta$ -淀粉样蛋白平均灰度值较阴性对照组明显减少 ( $P = 0.086, 0.001$ ); 低浓度组较阴性对照组减少, 但差异无统计学意义 ( $P = 0.614$ ); 其中高剂量组和阳性对照组之间比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.376$ ); 正常对照组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

**结论:** 天麻钩藤饮可以通过下调 NMDA2B 受体蛋白的表达和控制  $\beta$ -淀粉样蛋白的沉积来减少视网膜神经节细胞

的损伤和凋亡,并以此机制对视网膜神经节细胞起到一定的保护作用。

**关键词:**天麻钩藤饮;视神经夹伤;视网膜神经节细胞;NMDA2B受体蛋白; $\beta$ -淀粉样蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.08

**引用:**吕繁涛,李玉洁,马科,等.天麻钩藤饮抗大鼠视网膜神经节细胞凋亡机制的实验研究.国际眼科杂志2018;18(1):35-39

## 0 引言

近年来,相关医学研究表明,在青光眼的病理生理学特征中,最主要是视网膜神经节细胞有进行性慢性丢失发生<sup>[1]</sup>。临床普遍认为,损伤敏感性视网膜神经节细胞首先在缺血、高眼压等原发性损伤因素的作用下崩解死亡<sup>[2]</sup>。在对眼压进行控制的过程中,相关医学学者将目标眼压的改变提了出来,进一步降低了视神经病变继续进展患者(具有正常眼压)的眼压,同时还将视神经保护的概念提了出来,通过药物干预将良好的前提条件提供给视网膜神经节细胞,使抵抗毒性环境能力增强,促进视网膜神经节细胞生存并减少损失,保存视功能<sup>[3]</sup>。研究表明,NMDA受体的激活是导致兴奋性氨基酸毒性损伤致神经节细胞凋亡的重要原因,N-甲基-D-天冬氨酸2B(N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B,NMDA2B)受体是NMDA受体的一个亚型, $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein,A $\beta$ )也是参与神经损伤和致神经节细胞凋亡非常重要的因子<sup>[4-5]</sup>。本研究通过分析天麻钩藤饮在大鼠视神经夹伤模型视网膜神经节细胞中对NMDA2B受体和A $\beta$ 的干预机制,以探究本药对青光眼的视神经保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取36只SPF级Wistar大鼠,体质量190~210(平均200 $\pm$ 10)g。采用银杏叶片(扬子江药业集团有限公司,国药准字Z20027949,生产批号12050522);戊巴比妥钠(进口分装,生产批号100411);天麻钩藤饮(生决明18g,川牛膝12g,钩藤12g,天麻9g,黄芩9g,益母草9g,夜交藤9g,栀子9g,杜仲9g,桑寄生9g,朱茯神9g。低浓度为0.6g/mL、中浓度为1.2g/mL、高浓度为2.4g/mL),由中国中医科学院中药研究所依据既定工艺熬煮成药汤代加工。手术显微镜(日本拓扑康公司,OMS-85型);微型视神经夹(瑞士S&T公司);石蜡切片机(Leica RM2155,德国);光学显微镜(AH-2 Olympus Japan);超纯水制备系统 Milli-Q (Millipore 公司);烘箱(Thermo 公司);37℃温箱(Thermo 公司);苏木素、DAB、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、甲醇、PBS、胃蛋白酶消化液(北京中杉金桥);封闭用山羊血清工作液(中杉金桥 SP-9000/9001/9002 免疫组化染色试剂盒);NMDA2B抗体(ab84184,Abcam 公司);A $\beta$ 抗体(ab68896,Abcam 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 视神经夹伤模型的制备** 将视神经夹伤眼设定为右眼,给予动物腹腔注射20g/L戊巴比妥钠(3mg/kg)进行麻醉,手术显微镜下将10mm左右的外毗处皮肤剪开,将部分眶脂肪组织剔除。将4mm左右的球结膜剪开,对外直肌进行分离并将其剪断,将视神经暴露出来。在球后2mm处用微型视神经夹(夹持力为40g)对视神经进行60s

的夹持。用盖玻片对大鼠角膜进行轻压,对手术显微镜的焦距进行调整,使临床医师能够对大鼠眼底血管情况进行观察。如果夹伤后1min对眼底血管改变情况进行再次观察,发现眼底血管具有良好的充盈,视网膜具有红润的颜色,则说明造模成功;否则评定为造模失败。最后将球结膜和外毗切口缝合起来。

**1.2.2 分组和给药** 将36只SPF级雄性Wistar大鼠随机分为天麻钩藤饮低剂量组(0.6g/mL, n=6)、中剂量组(1.2g/mL, n=6)、高剂量组(2.4g/mL, n=6)、银杏叶片阳性对照组(1.2mg/mL, n=6)、阴性对照组(n=6)、正常对照组(n=6)共6组。不对正常组大鼠进行任何处理,对其他组大鼠建立右眼视神经夹伤模型。用纯净水(10mg/kg)对阴性对照组、正常对照组灌胃,用0.6g/mL天麻钩藤饮(10mL/kg)对天麻钩藤饮低剂量组灌胃,用1.2g/mL天麻钩藤饮(10mL/kg)对天麻钩藤饮中剂量组灌胃,用2.4g/mL天麻钩藤饮(10mL/kg)对天麻钩藤饮高剂量组灌胃,用1.2mg/mL银杏叶(10mL/kg)对银杏叶阳性对照组灌胃,各组动物均正常摄食、饮水,共30d。

**1.2.3 免疫组织化学检测** 免疫组化采用Elivision TM法,分别对大鼠视网膜石蜡切片中NMDA2B受体蛋白和A $\beta$ 蛋白进行免疫组化。

**1.2.3.1  $\beta$ -淀粉样蛋白检测分析** 石蜡切片常规脱蜡至水化;胃蛋白酶37℃湿盒孵育30min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温封闭10min;加A $\beta$ 一抗(稀释浓度1:800)4℃过夜;加二抗37℃湿盒孵育1h;DAB显色3min;苏木素轻度复染;水洗、脱水、透明、封片,光学显微镜观察。

**1.2.3.2 NMDA2B受体蛋白检测分析** 石蜡切片常规脱蜡至水化;胃蛋白酶37℃湿盒孵育30min;30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温封闭10min;加一抗(稀释浓度1:3000)4℃过夜;加二抗37℃湿盒孵育1h;DAB显色3min;苏木素轻度复染;水洗、脱水、透明、封片,光学显微镜观察。

**1.2.3.3 图像采集分析** 光学显微镜下拍照,每张切片在取距视乳头1.5~2mm处400倍镜下拍摄2张照片,并按编号命名,观察NMDA2B受体蛋白和A $\beta$ 表达情况。照片黑白处理后,其像素值将跨度于黑到白之间的所有灰度色调,如把从黑-灰-白之间灰度的连续变化量化成连续的灰度级,此时若将黑色设置为0,白色设置为1,则每一点的像素值都可以量化为蛋白含量的数据,成为黑色数值与白色数值之间的一个数值。使用计算机连接显微镜,为每一点样本免疫组化结果拍照(放大倍数400),图片储存格式为TIFF,选定一张染色效果较好的图片作为校准点,应用IPP软件,选择单色模块,选取认为合适的黑色和白色数值作为基准值,依设定的基准值,测量每张图片的灰度,记录单位面积的灰度值,三次测量取平均值,并进行数据统计。

统计学分析:统计学分析采用SPSS21.0软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差齐性检验和单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠视网膜NMDA2B和A $\beta$ 蛋白表达情况

NMDA2B蛋白免疫组化:正常对照组和阳性对照组蛋白表达较少(+),阴性对照组神经节细胞层、内外丛状层表达明

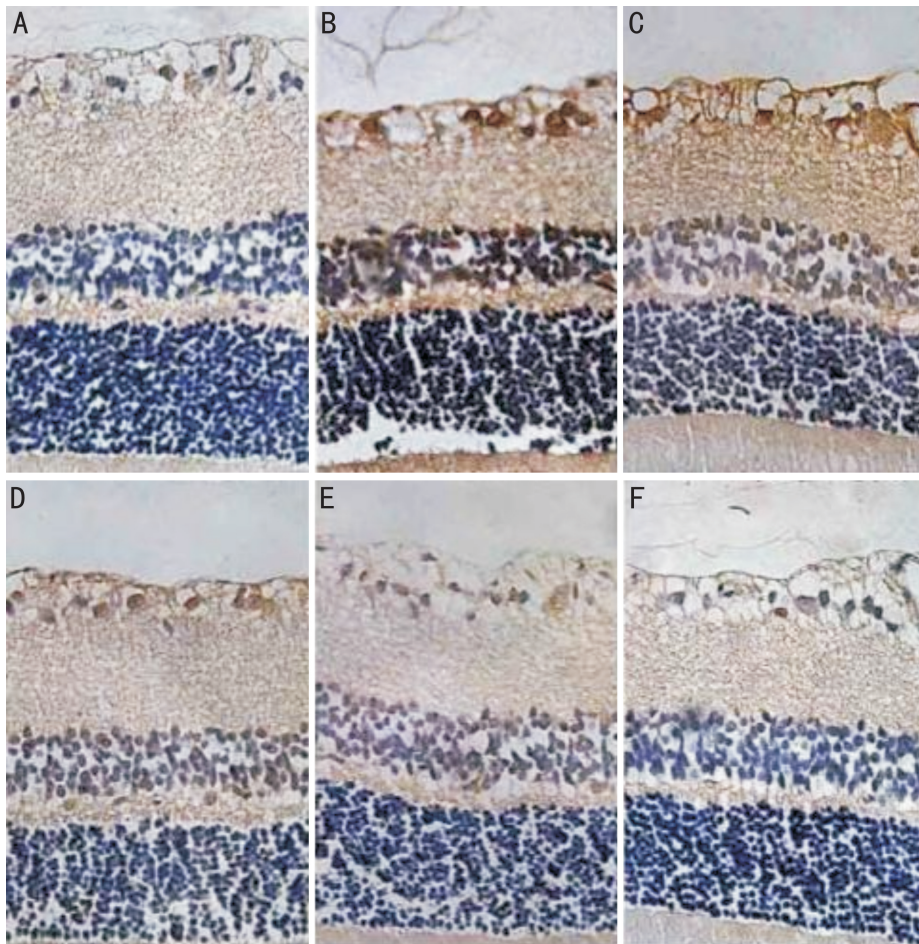


图1 各组大鼠视网膜 NMDA2B 蛋白的免疫组化检测(×400) A:正常对照组;B:阴性对照组;C:天麻钩藤饮低剂量组;D:天麻钩藤饮中剂量组;E:天麻钩藤饮高剂量组;F:银杏叶阳性对照组。

显增多(++++),天麻钩藤饮各剂量组 NMDA2B 蛋白表达呈现随着浓度增加表达减少的趋势,分别为低剂量(+++)、中剂量(++)、高剂量(+),见图1。 $A\beta$  阳性染色是棕黄色颗粒(如黑色箭头所示),正常对照组未见阳性棕黄色颗粒(-),阴性对照组在节细胞层胞浆和细胞间可见大量阳性染色,在内核层和内网状层细胞间也可见棕黄色颗粒(+++),低剂量组在节细胞层胞浆和细胞间及内核层可见较多的棕黄色颗粒(++),中剂量组节细胞层可见到浅棕色颗粒沉积(+),高剂量组和阳性对照组只有少量的阳性表达( $\pm$ ),见图2。

**2.2 各组大鼠视网膜 NMDA2B 受体蛋白免疫组化灰度分析** 正常对照组明显小于阴性对照组的灰度值,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );低剂量组、中剂量组、高剂量组较阴性对照组减小明显,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),而与正常对照组比较差异也有统计学意义( $P < 0.001$ );低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照组比较,差异无统计学意义( $P = 0.320$ ,表1)。

**2.3 各组大鼠视网膜  $A\beta$  蛋白免疫组化灰度分析**  $A\beta$  灰度分析显示,阳性对照组较阴性对照组减少明显( $P < 0.001$ );低剂量组与阴性对照组比较差异无统计学意义( $P = 0.614$ );中剂量组较阴性对照组减少,但差异无统计学意义( $P = 0.086$ );高剂量组较阴性对照组减少明显,差异有统计学意义( $P = 0.001$ );中剂量组较低剂量组减少,但差异无统计学意义( $P = 0.086$ );高剂量组较

表1 各组大鼠视网膜 NMDA2B 和  $A\beta$  蛋白免疫组化灰度分析  $\bar{x} \pm s$

组别	NMDA2B 灰度	$A\beta$ 灰度
正常对照组	0.0482±0.0132	0.0473±2.0126
阴性对照组	0.2401±2.0507	0.2389±0.2089
阳性对照组	0.1387±1.0204	0.1124±0.1202
低剂量组	0.1705±1.0261	0.2243±0.2063
中剂量组	0.1539±1.0330	0.1732±1.0410
高剂量组	0.1464±1.0327	0.1382±1.0135

低剂量组减少明显,差异有统计学意义( $P = 0.006$ );高剂量组与阳性对照组比较,差异无统计学意义( $P = 0.376$ ,表1)。

### 3 讨论

在视网膜神经节细胞保护药物的研究中,大鼠视神经夹伤模型在临床得到了极为广泛的应用,本研究所采用的大鼠视神经夹伤模型虽不同于人类的青光眼性视神经损伤,但两者之间有一些共同点<sup>[6]</sup>。李玉洁等<sup>[7]</sup>曾报道大鼠机械性视神经损伤模型与人类的青光眼性视神经损伤模型相似,两者均出现视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)胞体凋亡的现象,在实验中去掉对视神经造成损伤的原发因素后,视神经变性仍存在,在此过程中 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体、谷氨酸、 $A\beta$  等有着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。

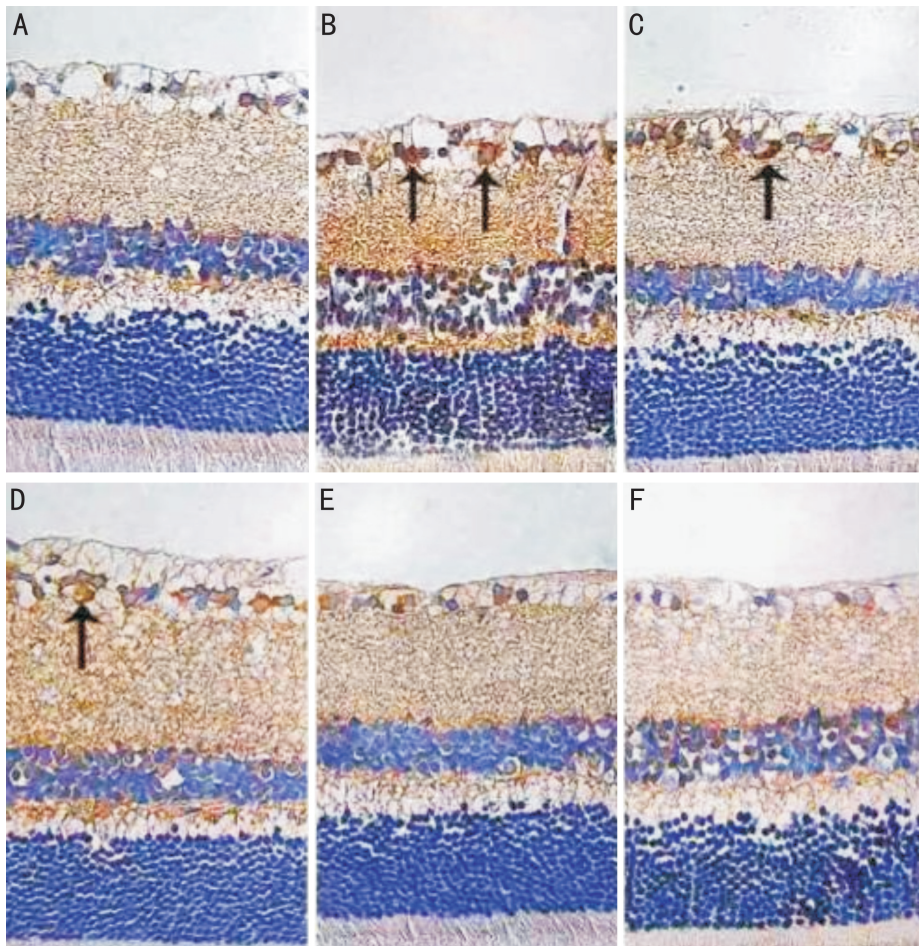


图2 各组大鼠视网膜 A $\beta$  蛋白的免疫组化检测( $\times 400$ ) A:正常对照组;B:阴性对照组;C:天麻钩藤饮低剂量组;D:天麻钩藤饮中剂量组;E:天麻钩藤饮高剂量组;F:银杏叶阳性对照组。

致盲的最终原因为青光眼视网膜神经节细胞死亡,病理基础为视网膜神经节细胞的丢失和轴突数目的减少<sup>[9]</sup>。病理性高眼压和/或视网膜缺血促进一系列链式反应的发生,提升玻璃体和视网膜内谷氨酸浓度,减少视网膜神经节细胞层内神经营养因子,视网膜神经节细胞内  $Ca^{2+}$  超载,一氧化氮(nitric oxide, NO)和自由基的增加,造成视网膜神经节细胞的凋亡。NMDA 受体拮抗剂对这种损伤有拮抗作用, $\beta$  淀粉样蛋白是青光眼视网膜神经节细胞凋亡的关键因素之一<sup>[10]</sup>。

中医中药对治疗青光眼有独到之处,但由于种种局限性,目前的研究大多局限于改善血液黏度、血流动力学、改善微循环水平,而且现有报道大多局限于单味中药的单方面研究,而在中医理论指导下复方中药对青光眼视网膜神经节细胞保护机制的实验研究未见系统报道<sup>[11-12]</sup>。本课题使用的天麻钩藤饮是在原《中医内科杂病证治新义》天麻钩藤饮的基础上,经过临床工作和基础实验的不断摸索,加减而成。天麻钩藤饮是根据中医对老年痴呆症的辨证特点而拟定的方剂,具有平肝潜阳、补益肝肾、清热活血、益智安神等功效,适用于肝肾阴虚、肝阳上亢的老年血管性痴呆症。天麻钩藤饮于 20 世纪 50 年代由胡光慈收载于《中医内科杂病证治新义》中,主治高血压头痛眩晕,失眠,为平肝降逆之剂<sup>[13]</sup>。以天麻、钩藤、生决明之平肝降逆祛风为主,辅以山栀、黄芩、桑寄生、杜仲、牛膝等,其中山栀、黄芩的主要功效为清降,桑寄生、杜仲的主要功效为滋肝肾,牛膝的主要功效为活血等,诸药合用能够达到

滋肾以平肝之逆的功效;夜交藤、朱茯神的主要功效为安神安眠,对其失眠进行缓解,用于肝厥之头痛、眩晕、失眠<sup>[14]</sup>。经临床及药理学实验研究均证明其具有显著地促进智力、改善痴呆症状的作用。对老年人血管性痴呆肝阳上亢、肝肾阴虚所表现的记忆、认知功能减退、人格障碍有很好的疗效,对其伴发的神经症状以及头痛眩晕、烦躁易怒、失眠等症状有显著疗效<sup>[15]</sup>。天麻钩藤饮是出自《中医内科杂病证治新义》,在临床工作和基础实验中不断加减成分才形成现在的十一味制剂。近年来经临床和药理学实验研究均证明其在促进智力、改善痴呆症状等方面具有显著疗效。因此本研究的目的在于研究方剂天麻钩藤饮是否能通过控制降低 NMDA 受体活性,抑制兴奋性氨基酸神经毒性等<sup>[10,16]</sup>,降低青光眼视网膜神经节细胞的损害程度,减少视网膜神经节细胞的凋亡,从而达到保护视功能的目的。

本实验通过分析免疫组化样本的平均灰度值来表现 NMDA2B 受体蛋白含量和 A $\beta$  含量在天麻钩藤饮各剂量组影响下的变化情况,结果显示天麻钩藤饮各剂量组均不同程度地降低了 NMDA2B 受体蛋白的表达,可见天麻钩藤饮可以通过下调 NMDA2B 受体蛋白的表达来降低由于视网膜神经节细胞层内神经营养因子的减少、视网膜和玻璃体内谷氨酸浓度升高、视网膜神经节细胞内  $Ca^{2+}$  超载、NO 和自由基的增加所造成的视网膜神经节细胞损伤,甚至凋亡的发生<sup>[8]</sup>。

本研究数据显示,尚不能认为不同天麻钩藤饮用药浓

度之间产生的作用具有差异,这可由多种因素引起,最主要的原因可能是因为本研究样本量较少,每组仅6只大鼠,小样本造成统计学结果的抽样误差较大。若要明确不同浓度药物之间的作用是否有差异,则需要从更大量的样本中得到结果。

实验结果还显示,天麻钩藤饮各剂量组同样不同程度地减少了A $\beta$ 的堆积,可见天麻钩藤饮可以通过控制A $\beta$ 的堆积来实现对神经节细胞的保护作用,这也在药物机制方面佐证了天麻钩藤饮用于临床治疗阿尔兹海默病的可行性<sup>[17]</sup>。基于青光眼和阿尔兹海默病在病理机制的相似性<sup>[3,10-11]</sup>,可见天麻钩藤饮对青光眼的治疗是有一定的可行性的。本实验首次探索天麻钩藤饮对视神经损伤的保护机制,尽管由于实验中动物数量相对较少,但初步证实了天麻钩藤饮可以通过控制NMDA2B受体蛋白的表达和减少A $\beta$ 的堆积来对视网膜神经节细胞起到一定的保护作用。此外由于本研究给药时间短,药物的安全性和有效性还有待进一步验证,希望在今后的研究中进一步探索。

#### 参考文献

- 1 马科,徐亮. 银杏叶提取物与青光眼视神经保护. 国外医学眼科学分册 2005;29(3):113-118
- 2 Qu J, Wang D, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res* 2010;91(1):48-53
- 3 田冰玉,于敬妮,杨新光. 青光眼视网膜神经节细胞损伤的研究进展. 国际眼科杂志 2009;9(1):118-120
- 4 Janciauskiene S, Westin K, Grip O, et al. Detection of Alzheimer peptides and chemokines in the aqueous humor. *Eur J Ophthalmol* 2010 [Epub ahead of print]

- 5 Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, et al. Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1989;501(2):364-372
- 6 徐新荣,蔡丰英. 葛根素对慢性高血压兔视神经轴浆流影响的实验研究. 中国中医眼科杂志 1997;7(1):3-6
- 7 李玉洁,张海娟,王海燕,等. 天麻钩藤饮抗大鼠视神经夹伤模型视网膜神经节细胞凋亡作用的实验研究. 眼科 2015;24(3):188-192
- 8 Kirby E, Bandelow S, Hogervorst E. Visual impairment in Alzheimer's disease: a critical review. *J Alzheimers Dis* 2010;21(1):15-34
- 9 张丽霞,高健生. 青光眼视网膜神经节细胞凋亡及视功能保护. 中国中医眼科杂志 2006;16(1):55-57
- 10 Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 1998;116(7):906-910
- 11 Wostyn P, Audenaert K, De Deyn PP. Alzheimer's disease and glaucoma: Is there a causal relationship? *Br J Ophthalmol* 2009;93(12):1557-1559
- 12 林东晓,张海滨,陈钢锋. 银杏叶制剂对眼压已控制青光眼患者视功能的保护作用. 中国中医眼科杂志 2005;15(1):14
- 13 张永全,谭文澜,陆晖,等. 天麻钩藤饮合美多巴治疗帕金森病62例. 陕西中医 2008;29(6):666-667
- 14 王宏献. 天麻钩藤饮治疗高血压病的临床研究. 中华中医药学刊 2008;26(2):338-340
- 15 李根龙. 辨证分型治疗老年痴呆120例临床观察. 实用中医内科杂志 2013;27(4):9-11
- 16 Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal-transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11):3460-3466
- 17 Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental Induction of Retinal Ganglion Cell Death in Adult Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(5):1004-1008