

17-β 雌二醇和他莫昔芬对小鼠慢性高眼压模型的作用研究

马雪云, 邓琴琴, 沈 吟, 邢怡桥

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81470628); 武汉市科技计划项目 (No. 2016070204010153)

作者单位: (430060) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院眼科中心

作者简介: 马雪云, 在读硕士研究生, 研究方向: 玻璃体视网膜膜疾病。

通讯作者: 邢怡桥, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障与玻璃体视网膜膜疾病. yiqiao_xing57@whu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-18 修回日期: 2018-05-04

Effects of 17-beta estradiol and tamoxifen in chronic ocular hypertension mouse model

Xue - Yun Ma, Qin - Qin Deng, Yin Shen, Yi - Qiao Xing

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81470628); Wuhan Science and Technology Project (No. 2016070204010153)

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Yi-Qiao Xing. Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yiqiao_xing57@whu.edu.cn

Received: 2017-11-18 Accepted: 2018-05-04

Abstract

• **AIM:** To explore the modulation effects of 17-β estradiol (E2) and tamoxifen (TAM) in chronic intraocular hypertension mouse model.

• **METHODS:** We performed anterior chamber injection of magnetic beads to induced chronic ocular hypertension models. Adult C57BL/6 male mice were used in the experiments and randomly divided into four groups: control, Beads group, E2 group and E2+TAM group. The intraocular pressure (IOP) were measured by Tonolab tonometer. Central retinal thickness was evaluated by HE staining. Brn3a as a specific marker of retinal ganglion cells (RGCs), were stained and counted by immunohistochemistry (IHC) staining. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a marker of proliferation of astrocytes, was quantified using western blotting.

• **RESULTS:** The IOP level was significantly elevated after anterior chamber injection of magnetic beads compared to control group ($P < 0.05$), while in E2 and E2+TAM group, the IOP levels were reduced ($P < 0.05$ vs Beads group), especially in E2+TAM group in 2wk. The RGCs happened

to degenerated in Beads group after 2wk, while the effects were reversed by E2+TAM ($P < 0.05$). The central retinal thickness showed no significant statistical difference among the four groups after 2wk ($P > 0.05$). The expression level of GFAP increased caused via beads injection, however, decreased in E2 and E2+TAM group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** E2 and E2+TAM could both effectively decrease the IOP level in chronic intraocular hypertension mouse model, increase the survival of RGCs from high intraocular pressure, suppress expression of GFAP, which indicated neuroprotective effects of E2 and TAM in glaucoma through an anti-inflammatory effects.

• **KEYWORDS:** 17-beta estradiol; tamoxifen; intraocular hypertension; retinal ganglion cells; neuroprotection

Citation: Ma XY, Deng QQ, Shen Y, et al. Effects of 17-beta estradiol and tamoxifen in chronic ocular hypertension mouse model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(6):994-998

摘要

目的: 探讨 17-β 雌二醇 (17-β-estradiol, E2) 和他莫昔芬 (tamoxifen, TAM) 在慢性高眼压小鼠模型中的调节作用。

方法: 通过前房注射磁珠堵塞房角构建小鼠慢性高眼压模型。将 C57BL/6 成年小鼠随机分为对照组、Beads 组、E2 组和 E2 + TAM 组。采用眼压计监测各组眼内压 (intraocular pressure, IOP) 的变化; HE 染色观察并测量中央视网膜厚度; Brn3a 免疫组织化学染色观察并计数存活的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs); Western blot 法检测视网膜中胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达。

结果: 造模后 2wk 内, Beads 组小鼠平均眼压显著高于对照组, 而 E2 组和 E2+TAM 组眼压均明显低于 Beads 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 E2+TAM 组小鼠平均眼压较 E2 组更低。造模 2wk 后, Beads 组小鼠视网膜 RGCs 数量较对照组显著减少 ($P < 0.05$), 而皮下注射 E2+TAM 可明显抑制该现象。造模 2wk 后, 各组小鼠中央视网膜厚度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blot 结果显示, Beads 组小鼠视网膜 GFAP 蛋白表达量升高, 注射 E2 和 E2+TAM 后, GFAP 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

结论: 皮下注射 E2 和 E2+TAM 均能降低慢性高眼压模型小鼠眼内压, 增加 RGCs 存活数量, 且降低视网膜 GFAP 蛋白表达量, 表明 E2 和 TAM 在青光眼的发生发展过程中具有一定的保护作用。

关键词: 17-β 雌二醇; 他莫昔芬; 高眼压; 视网膜神经节细胞; 神经保护

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.04

引用:马雪云,邓琴琴,沈吟,等. 17- β 雌二醇和他莫昔芬对小鼠慢性高血压模型的作用研究. 国际眼科杂志 2018;18(6):994-998

0 引言

眼压作为青光眼发生发展最主要且可调节的因素,一直备受关注。研究显示,对于早期原发性开角型青光眼患者,眼压每降低 1mmHg,疾病进展风险将会下降 10%^[1]。同时,未进入更年期的女性比同龄已进入更年期的女性眼压低 1.5~2mmHg^[2-3],提示眼压与雌激素间可能存在密切联系。17- β 雌二醇(17- β -estradiol, E2)作为机体内雌激素的主要生物活性形式,一直是科研工作中研究的热点。本研究通过建立小鼠慢性高血压模型,同时给予小鼠皮下注射 E2 或雌激素受体调节剂他莫昔芬(tamoxifen, TAM),以期探索 E2 及 TAM 对慢性高血压小鼠模型的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄)32 只,由湖北动物实验中心提供。随机分为 4 组:(1)对照组:双眼前房注射 3 μ L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)+皮下注射 0.5mL 生理盐水;(2)Beads 组:双眼前房注射 3 μ L 磁珠+皮下注射生理盐水 0.5mL;(3)E2 组:双眼前房注射 3 μ L 磁珠+皮下注射 E2(10 μ g/mL)0.2mL;(4)E2+TAM 组:双眼前房注射 3 μ L 磁珠+皮下注射 E2(10 μ g/mL)0.2mL+皮下注射 TAM(0.1mg/mL)0.5mL。

1.1.2 试剂及仪器 磁珠(Corpuscular),30mg/mL,直径 10 μ m;17- β 雌二醇(上海紫一试剂);他莫昔芬(Tocris);Brn3a 抗体(山羊来源,Santa Cruz),GAPDH 抗体(兔来源,谷歌生物),胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(兔来源,DAKO),IF-594 标记的二抗(驴抗山羊 IgG, Jackson),HRP 标记的二抗(山羊抗兔 IgG,谷歌生物);荧光显微镜(Olympus);共聚焦显微镜(FV1000, Olympus);TonoLab 眼压计(Tiolat)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠慢性高血压模型建立 异氟烷持续吸入麻醉小鼠后,碘伏消毒小鼠术眼周围皮肤。混匀磁珠,用连接 33G 穿刺针头的 Hamilton 微量注射器吸入 3 μ L 磁珠,沿角膜缘进针,穿刺入前房,避免刺伤虹膜及角膜内皮。放出少许房水后,将磁珠注入前房。用小磁块在穿刺口对侧进行吸引,避免拔出针头时磁珠溢出。针头拔出后,用小磁块吸引磁珠,将其均匀分布在房角周围。术毕,涂抗生素眼膏。对照组双眼前房注入 3 μ L PBS 缓冲液。造模后第 2d 开始测量眼内压,若造模后眼内压稳定大于造模前 5mmHg 且持续 2wk 即认为造模成功^[4]。

1.2.2 皮下注射 高血压模型造模后,E2 组和 E2+TAM 组分别颈部皮下注入 10 μ g/mL E2 0.2mL 和 10 μ g/mL E2 0.2mL+0.1mg/mL TAM 0.5mL,对照组和 Beads 组分别皮下注入 0.5mL 生理盐水。连续注射 2wk。皮下注射均于每日 8:00~10:00 进行,在眼压测量之后完成。

1.2.3 眼压测量 固定小鼠,在 TonoLab 眼压计中选择小鼠模式,置入一次性测量探针。测量眼压计手柄与地面垂直,测量探针垂直于小鼠角膜中央。每眼连续测量 6 次后

系统会自动显示该 6 次测量的平均值,以该平均值记为测量一次的有效眼压值。每眼测得 3 次有效眼压值,并记录。眼压测量在每日 8:00~10:00 进行,在皮下注射前完成。眼压测量均由同一位实验者完成。

1.2.4 视网膜切片 HE 染色测量中央视网膜厚度 造模 2wk 后,每组取 2 只小鼠,共摘除 4 只眼球,PBS 漂洗后于 4% 多聚甲醛中固定 24h。石蜡包埋,沿平行于视神经的矢状轴切片,厚度为 5 μ m。苏木素-伊红染色,封片后显微镜下观察,取包含视神经在内的中央视网膜进行测量。每只眼球选取 3 张包含视神经的视网膜切片,测量以视神经为中心、200 μ m 范围内的中央视网膜厚度。

1.2.5 全视网膜铺片计数神经节细胞 造模 2wk 后,每组取 2 只小鼠,共摘除 4 只眼球,PBS 中漂洗后于 4% 多聚甲醛中固定 40min。去除眼前节、晶状体及脉络膜,分离视网膜。将视网膜转移入 5% BSA-T 中室温封闭 2h,PBS 漂洗后,Brn3a 一抗(山羊来源,1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,5min/次,驴抗山羊 IgG 二抗(1:400)室温孵育 2h,PBS 漂洗 3 次,5min/次。在显微镜下,将视网膜剪成四叶草形状,加入封片剂固定封片^[5]。荧光显微镜下(\times 400)以视盘为中心向 4 个瓣方向移动,分别于距离视盘 1、1.5mm 处拍照,每片视网膜共计 8 张图片。该视网膜平均视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)计数=8 张图片总视网膜神经节细胞数/8 张图片总面积。

1.2.6 Western blot 检测视网膜 GFAP 蛋白的表达 造模 2wk 后,每组取 4 只小鼠,共摘除 8 只眼球,迅速冰上分离视网膜后加入裂解液,低温超声裂解视网膜。BCA 法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳时每孔蛋白上样量为 30 μ g,后转入 NC 膜。5% BSA 室温封闭 2h,TBST 漂洗,GFAP 一抗(兔来源,1:2000)孵育,摇床 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 漂洗 3 次,10min/次,HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:4000)室温孵育 2h。TBST 漂洗 3 次,10min/次,暗室中 ECL 液显影,胶片曝光。Image J 软件分析蛋白条带,GFAP 蛋白相对表达量=GFAP 曝光 A 值/GAPDH 曝光 A 值。GAPDH 为内参蛋白。

统计学分析:Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E2 和 TAM 对眼内压的影响 观察造模后 2wk 内小鼠眼压曲线可知,前房磁珠注射后,由于大量磁珠堵塞房角,造成房水回流不畅,导致造模后 2wk 内 Beads 组小鼠平均眼压(16.34 \pm 3.122mmHg)明显高于对照组(10.38 \pm 0.839mmHg),差异有统计学意义($P<0.001$),表明小鼠慢性高血压模型建立成功;而 E2 组和 E2+TAM 组小鼠平均眼压(12.77 \pm 2.053mmHg 和 11.73 \pm 1.96mmHg)均较 Beads 组显著下降($P<0.001$);但两组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

2.2 E2 和 TAM 对视网膜厚度的影响 HE 染色结果表明,造模 2wk 后,各组小鼠视网膜结构未见明显异常,各层细胞排列较为规整,仅 Beads 组小鼠视网膜神经节细胞层见部分 RGCs 排列中断区,见图 2A。中央视网膜厚度测量结果表明,与对照组(170.2 \pm 1.43 μ m)相比,Beads 组视网膜厚度(159.0 \pm 4.27 μ m)略有下降,E2 组(170.1 \pm 1.49 μ m)

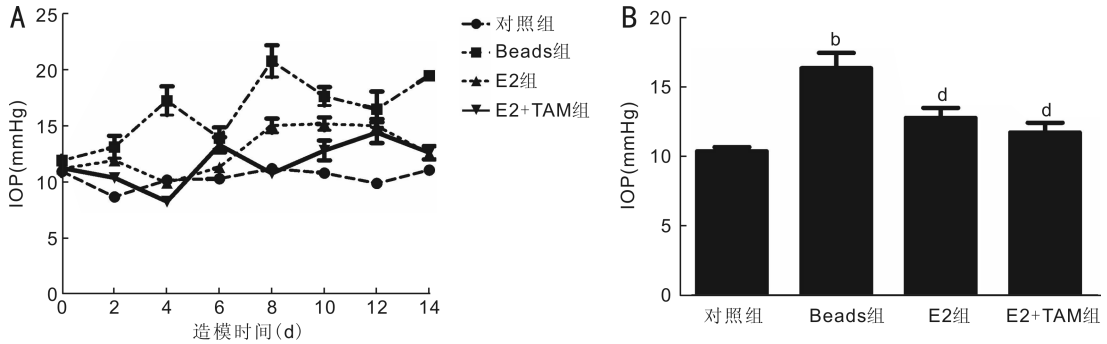


图1 各组小鼠眼内压变化情况 A:造模后2wk内各组小鼠眼压变化曲线(0d表示造模前);B:造模后2wk内各组小鼠平均眼压值比较; $F=11.24, P=0.025$; ^b $P<0.01$ vs 对照组; ^d $P<0.01$ vs Beads组。

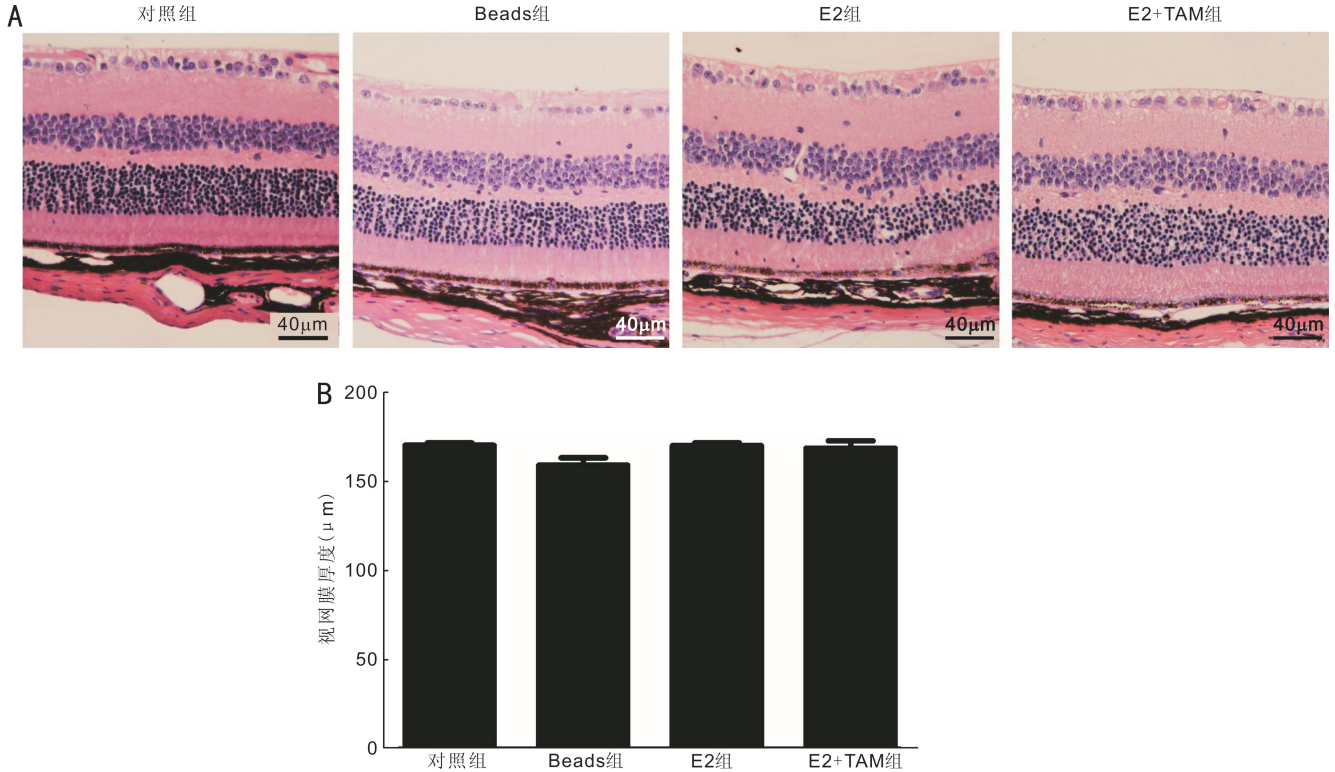


图2 各组视网膜厚度变化 A:各组中央视网膜HE染色结果($\times 400$);B:各组平均中央视网膜厚度的比较。

及E2+TAM组($168.5 \pm 4.22 \mu\text{m}$)视网膜厚度较Beads组略有增加,但各组视网膜厚度比较,差异无统计学意义($F=2.853, P>0.05$),见图2B。

2.3 E2和TAM对视网膜神经节细胞的影响 免疫荧光组织化学染色结果显示,造模2wk后,各组视网膜RGCs计数差异有统计学意义($F=5.562, P=0.023$)。Beads组视网膜RGCs计数($3579 \pm 192.5/\text{mm}^2$)较对照组($4146 \pm 236.8/\text{mm}^2$)显著减低($P<0.05$);E2组($3867 \pm 416.8/\text{mm}^2$)和E2+TAM组($4323 \pm 157.3/\text{mm}^2$)视网膜RGCs计数较Beads组有所升高,其中E2+TAM组和Beads组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3。

2.4 E2和TAM对GFAP蛋白表达的影响 Western blot检测结果显示,将对照组GFAP蛋白相对表达量定为1, Beads组、E2组、E2+TAM组GFAP蛋白相对表达量分别为 1.139 ± 0.142 、 0.722 ± 0.301 、 0.494 ± 0.043 ,各组GFAP蛋白表达量比较差异有统计学意义($F=8.944, P=0.012$),其中Beads组分别与E2组和E2+TAM组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),但E2组与E2+TAM组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图4。

3 讨论

青光眼作为全球第二大致盲性眼病,是由于各种原因所致的RGCs及其轴突不断丢失,从而形成的缓慢进展的神经变性疾病,其最主要的危险因素是眼压升高。E2作为机体内雌激素的主要生物活性形式,参与了众多生理病理过程。近年研究发现,经典的雌激素受体 α (ER- α)和 β (ER- β)在眼内血管、视网膜、脉络膜中均有表达^[6]。在许多相关的临床研究中发现雌激素与眼压间存在密切关系,Mayo研究发现,43岁前进入更年期的女性比43岁后进入更年期的女性发生原发性开角型青光眼的风险高1.6倍^[7]。另有研究发现,针对更年期后的女性单纯给予雌激素治疗时,双眼眼压均有0.5~0.6mmHg下降,与安慰剂组比较有统计学差异^[8]。动物实验也发现,E2具有降低眼压,保护视网膜的作用^[9-11]。TAM是一种选择性雌激素受体调节剂(SERM),在不同的组织中具有类似或拮抗雌激素的效应。其在骨骼组织中表现为类似雌激素效应,故应用于绝经后骨质疏松症的替代治疗,但在子宫内膜、乳腺等组织中却起到拮抗雌激素的效应^[12],能够抑制子宫内膜上皮细胞和乳腺细胞的增生,因而在乳腺癌的

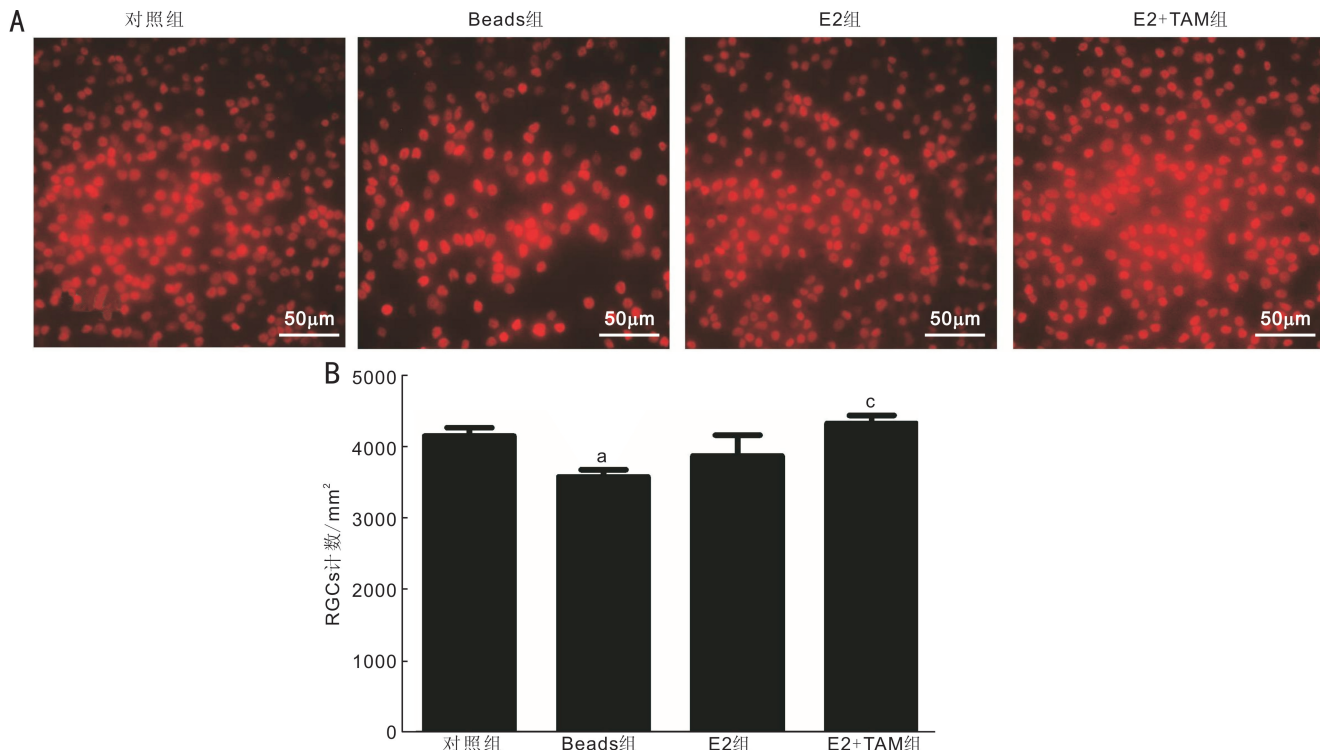


图3 各组视网膜铺片 RGCs 计数 A: 各组视网膜铺片 Brn3a 免疫荧光组织化学染色结果 ($\times 400$); B: 各组铺片 RGCs 计数结果。^a $P < 0.05$ vs 对照组, ^c $P < 0.05$ vs Beads 组。

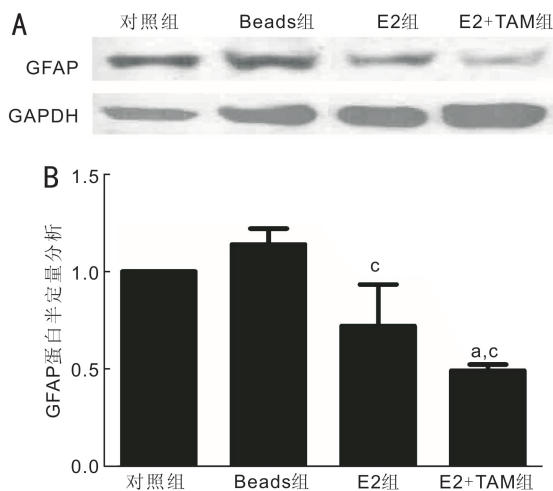


图4 各组视网膜 GFAP 蛋白表达情况 A: 各组视网膜 GFAP 蛋白 Western blot 检测结果; B: 各组视网膜 GFAP 蛋白表达量; ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs Beads 组。

临床治疗中广泛应用。此外, TAM 也可不通过雌激素受体发挥作用, 在中枢神经系统的研究中, TAM 可通过阻断星形胶质细胞上的体积调节性阴离子通道抑制损伤后胶质细胞的增殖活化, 达到神经保护作用^[13]。

Müller 细胞是脊椎动物视网膜最主要的一类胶质细胞^[14-15], 贯穿视网膜全层。视网膜受到持久性应激损伤后, Müller 细胞会去成熟转变为分化状态^[16], 并通过释放某些毒性细胞因子如一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、氧自由基等诱发神经元的凋亡或死亡。GFAP 作为 Müller 细胞激活最敏感的指标^[17-18], 在检测 Müller 细胞激活水平中起到很好的指示作用。本研究通过检测各组小鼠视网膜中 GFAP 蛋白的表达观察 Müller 细胞增殖活化状态。

本研究中, 为避免雌性小鼠体内内源性雌激素对研究结果的干扰, 选择机体内雌激素含量较少的成年雄性小鼠作为研究对象, 通过前房注射磁珠堵塞房角, 影响房水回流, 能够较稳定且有效地致小鼠眼内压升高。有研究认为, 小鼠慢性高血压模型建立 3wk 后才会引起视网膜 RGCs 数量显著减少^[4]; 但我们前期研究发现, 模型建立 2wk 后即可在一定程度上引起 RGCs 数量减少, 故本研究选择造模后 2wk 进行观察。本研究发现, 皮下注射外源性 E2 能够显著降低高血压模型小鼠眼内压, 增加 RGCs 数量, 降低 GFAP 蛋白的表达; 但各组中央视网膜厚度并未发生明显变化, 其原因可能是 2wk 的造模时间过短, 还不足以造成视网膜厚度出现明显变化。同时, 本研究发现 E2 所致的视网膜保护作用并不能被 TAM 拮抗, 反而 E2 联合 TAM 后这一保护作用更为明显。分析可能的机制包括: (1) TAM 作为选择性雌激素受体调节剂, 在视网膜中发挥了雌激素的类似效应。但既往关于糖尿病视网膜病变的研究发现, E2 能有效减少 RGCs 的凋亡, 该过程可以被 TAM 阻断^[19]。(2) E2 对视网膜的保护作用主要通过 ER- β 实现。体外培养视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 进行研究发现, 给予氧化应激刺激时, E2 能够通过激活 ER- β 发挥 RPE 细胞保护作用, 该作用可被雌激素受体拮抗剂 ICI 182, 780 (ER- α 和 ER- β) 和 THC (ER- β) 阻断, 但 TAM (ER- α) 并不能阻断该效果^[20], 故认为 E2 的保护作用主要是通过 ER- β 实现的。(3) TAM 通过激活雌激素新型膜受体 GPER1 发挥视网膜保护作用。研究发现, 通过外源性基因沉默对 TAM 耐药的乳腺癌细胞新型雌激素受体 GPER1 蛋白表达后, TAM 刺激细胞增殖的作用减弱, 表明 TAM 可能是通过激活该细胞新型雌激素受体 GPER1 而起作用^[21]。此外, 本课题组的前期研究证实, 视网膜中确实有 GPER1 的表达^[22]。而 TAM 作为

GP1R1的激动剂可能通过快速非基因调节通路激活细胞内的相关信号通路,起到视网膜保护作用。(4)TAM不通过雌激素受体而单独起作用。在中枢神经系统的研究发现,TAM可通过阻断星形胶质细胞上的体积调节性阴离子通道抑制损伤后胶质细胞的增殖活化,达到神经保护作用^[13]。

综上所述,E2能够减轻眼内压增高带来的视网膜损伤,TAM并不能阻断E2的这一保护作用,反而与E2具有协同效应,具体原因和机制仍需进一步探索。

参考文献

- 1 Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;20(10):1268-1279
- 2 Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 2004;363(9422):1711-1720
- 3 Altıntaş O, Caglar Y, Yuksel N, et al. The effects of menopause and hormone replacement therapy on quality and quantity of tear, intraocular pressure and ocular blood flow. *Ophthalmologica* 2004; 218(2): 120-129
- 4 Ito YA, Belforte N, Cueva Vargas JL, et al. A Magnetic Microbead Occlusion Model to Induce Ocular Hypertension-Dependent Glaucoma in Mice. *J Vis Exp* 2016;109:e53731
- 5 Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3860-3868
- 6 Lang Y, Lang N, Ben-Ami M, et al. The effects of hormone replacement therapy(HRT)on the human eye. *Harefuah* 2002;141(3): 287-291,312,313
- 7 Vajaranant TS, Grossardt BR, Maki PM, et al. Risk of glaucoma after early bilateral oophorectomy. *Menopause* 2014;21(4):391-398
- 8 Vajaranant TS, Maki PM, Pasquale LR, et al. Effects of Hormone Therapy on Intraocular Pressure: The Women's Health Initiative-Sight Exam Study. *Am J Ophthalmol* 2016;165:115-124

- 9 范海燕,倪卫杰,施彩虹. 17 β -雌二醇对高氧诱导的大鼠视网膜细胞凋亡的保护作用. *国际眼科杂志* 2009;9(3):447-450
- 10 李贞,强晓鑫,马雅玲. 雌激素对慢性高血压模型大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响. *宁夏医科大学学报* 2015;37(4):384-387,481
- 11 矫梦瑶,张洋洋,孙旋,等. 17- β 雌二醇对高糖诱导RPE细胞保护作用的研究. *国际眼科杂志* 2017;17(10):1830-1833
- 12 Muchmore DB. Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects. *Oncologist* 2000;5(5): 388-392
- 13 何丹,谢敏杰,王伟,等. Tamoxifen对星形胶质细胞增殖的作用. *脑与神经疾病杂志* 2012;20(1):1-4
- 14 Bejarano-Escobar R, Sánchez-Calderón H, Otero-Arenas J, et al. Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *J Anat* 2017; 231(4):471-483
- 15 MacDonald RB, Charlton-Perkins M, Harris WA. Mechanisms of Müller glial cell morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2017;47:31-37
- 16 Mac Nair CE, Nickells RW. Neuroinflammation in Glaucoma and Optic Nerve Damage. *Prog Mol Biol Trans Sci* 2015;134:343-363
- 17 Ji M, Miao Y, Dong LD, et al. Group I mGluR-Mediated Inhibition of Kir Channels Contributes to Retinal Müller Cell Gliosis in a Rat Chronic Ocular Hypertension Model. *J Neurosci* 2012;32(37):12744-12755
- 18 Gao F, Li F, Miao Y, et al. Group I metabotropic glutamate receptor agonist DHPG modulates Kir4.1 protein and mRNA in cultured rat retinal Müller cells. *Neurosci Lett* 2015;588:12-17
- 19 Hao M, Li Y, Lin W, et al. Estrogen prevents high-glucose-induced damage of retinal ganglion cells via mitochondrial pathway. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;253(1):83-90
- 20 Giddabasappa A, Bauler M, Yepuru M, et al. 17-beta estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):5278-5287
- 21 严玉钊,余腾骅,涂刚,等. 他莫昔芬抑制G蛋白偶联雌激素受体沉默的乳腺癌相关成纤维细胞的增殖并促进其凋亡. *细胞与分子免疫学杂志* 2015;31(9):1189-1193,1199
- 22 江梦南,罗雪,沈雨濛,等. 雌激素受体GPR30介导的小鼠视网膜神经节细胞保护作用. *武汉大学学报(医学版)* 2016;37(2): 195-199