

· 实验研究 ·

正常人眼结膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞过程中 p53 的表达变化及其对微小 RNA-29b 表达的影响

晏维玲 廖荣丰 李宁

230031 合肥, 安徽医科大学第一附属医院眼科

通信作者: 廖荣丰, Email: liaorfyf@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.09.004

【摘要】 目的 检测正常人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 活化为肌成纤维细胞 (MFs) 过程中微小 RNA (miR)-29b 和 p53 的表达水平, 探讨 p53 表达变化对 miR-29b 表达的影响。 **方法** 收集安徽医科大学第一附属医院 2016 年 3—7 月行眼科斜视手术眼正常 Tenon 囊组织, 用组织块培养法培养出原代 HTFs, 传代至 2~4 代并进行实验。将细胞分为 4 个组: HTFs 组细胞常规培养; TGF- β 1 活化组细胞用 10 ng/ml TGF- β 1 处理; 将成纤维细胞活化为肌成纤维细胞; siRNA 转染组及阴性对照组分别采用含 p53 siRNA 以及阴性 siRNA 转染细胞后经 10 ng/ml TGF- β 1 活化。分别采用免疫组织化学染色法和细胞划痕实验检测 HTFs 组和 TGF- β 1 活化组细胞 p53 蛋白表达水平及细胞迁移能力。采用荧光定量 PCR 法检测各组细胞 miR-29b 和 p53 mRNA 相对表达量。 **结果** 原代 HTFs 呈长梭形, 细胞间呈螺旋状排列, TGF- β 1 活化后细胞转化为 MFs, 细胞形态不规则, 排列呈无序状态。TGF- β 1 活化组细胞中 p53 蛋白染色强度显著强于 HTFs 组, 差异有统计学意义 ($t=10.384, P<0.05$)。TGF- β 1 活化组细胞的相对迁移距离明显大于 HTFs 组细胞, 差异有统计学意义 ($t=9.750, P=0.000$)。HTFs 组、TGF- β 1 活化组、siRNA 转染组及阴性对照组细胞中 p53 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 3.95 ± 2.61 、 0.06 ± 0.06 和 0.98 ± 0.16 , miR-29b 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.54 ± 0.09 、 5.10 ± 2.31 和 1.03 ± 0.09 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F=6.688, P=0.006; F=13.640, P=0.000$)。TGF- β 1 活化组细胞 p53 mRNA 相对表达量显著高于 HTFs 组和 siRNA 转染组, miR-29b 相对表达量显著低于 HTFs 组和 siRNA 转染组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。 **结论** 在 HTFs 转变为 MFs 过程中, p53 显著升高, miR-29b 明显降低; 抑制 p53 表达后, miR-29b 表达升高。p53 与 miR-29b 之间可能存在相互作用来调控纤维化瘢痕的形成。

【关键词】 青光眼; 瘢痕; p53; 微小 RNA-29b**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金项目 (81500716)

Expression of p53 and its effect on microRNA-29b expression in the process of normal human conjunctival fibroblasts transforming to myofibroblast

Yan Weiling, Liao Rongfeng, Li Ning

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230031, China

Corresponding author: Liao Rongfeng, Email: liaorfyf@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between p53 and miR-29b in myofibroblasts (MFs) induced from human Tenon fibroblasts (HTFs). **Methods** Human Tenon tissues were obtained from strabismus surgery patients in the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University from March to July 2016. The primary HTFs were cultured by tissue culture method and passaged to 2–4 generations. The cells were divided into 4 groups: HTFs group cells were normally cultured, the TGF- β 1 activation group cells was activated with 10 ng/ml tumor necrosis factor- β 1 (TGF- β 1), the siRNA transfection group and the negative control group were transfected with p53 siRNA and negative siRNA, respectively. The expression of p53 protein and cell migration ability of HTFs and MFs were detected by immunohistochemical and cell scratch assay. The relative expression level of miR-29b and p53 mRNA in each group was detected by real-time PCR. This study followed the Helsinki declaration and the patients or their guardians signed informed consent. **Results** The primary HTFs had long fusiform shape, and were arranged in a spiral shape. After activated by TGF- β 1, the cells were transformed into MFs, and the cell morphology was irregular and the arrangement was disordered. The staining intensity of p53 protein in TGF- β 1 activation group was

significantly stronger than that in HTFs group ($t = -10.384, P < 0.05$). The migration distance of TGF- $\beta 1$ activation group cells was significantly larger than that of HTFs group ($P < 0.05$). The relative expression level of p53 mRNA was $1.00 \pm 0.00, 3.95 \pm 2.61, 0.06 \pm 0.06$ and 0.98 ± 0.16 in HTFs group, TGF- $\beta 1$ activation group, siRNA transfection group and negative control group, respectively; the relative expression levels of miR-29b was $1.00 \pm 0.00, 0.54 \pm 0.09, 5.10 \pm 2.31$ and 1.03 ± 0.09 in HTFs group, TGF- $\beta 1$ activation group, siRNA transfection group and negative control group, respectively; the overall differences were statistically significant (p53 mRNA: $F = 6.688, P = 0.006$; miR-29b: $F = 13.640, P = 0.000$). The relative expression of p53 mRNA was significantly higher and the relative expression of miR-29b was significantly lower in the TGF $\beta 1$ activation groups than those in the HTFs group and siRNA transfection group, the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** During the process of HTFs transforming to MFs, the expression of p53 is upregulated and the expression of miR-29b is downregulated, Suppressing the expression of p53 can upregulate the expression of miR-29b. There may exist interactions between p53 and miR-29b, which regulate the formation of fibrotic scars.

[Key words] Glaucoma; Scar; p53; MicroRNA-29b

Fund program: National Natural Science Youth Foundation of China (81500716)

青光眼是主要的致盲眼病之一, 降眼压是其主要的治疗方法^[1]。滤过性手术可有效地降低眼压, 临床上常联合使用抗代谢药物来减少术后滤过道瘢痕形成^[2-5], 但丝裂霉素等抗代谢药物的应用会引起一系列并发症, 如术后低眼压、滤过泡渗漏、黄斑病变等, 导致手术失败。因此探索更安全有效的治疗方法来对抗青光眼术后瘢痕化, 或者研发出更为优化愈合反应的药物是亟待解决的问题^[6]。人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon capsule fibroblast, HTFs) 转化为肌成纤维细胞 (myofibroblast, MFs) 并产生大量细胞外基质是青光眼术后滤过道瘢痕形成过程中细胞表型转化的主要特征^[7]。微小 RNA (microRNA, miR)-29b 是大小为 20~25 个核苷酸的內源性非编码小 RNA。有研究报道, 在心肌梗死的进程中, 多种 miRNA 参与成纤维细胞转化为肌成纤维细胞过程, 其中 miR-29b 起关键作用^[8]。在小鼠纤维化肝脏的造血干细胞中, miR-29b 显著的下调^[9]。近年来, 研究者发现在小梁网细胞中 miR-29b 可通过过表达来抑制肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TGF)- $\beta 1$ mRNA 和蛋白质水平的表达, 进而实现对纤维化的抑制作用^[8], 但其机制尚未完全阐明。p53 是一种转录调节因子, 对促进纤维化基因的表达具有重要作用, 并且在促纤维化的过程中, p53 和 TGF- $\beta 1$ 诱导的 Smad3 通路具有协同作用。有研究报道, miR-29 家族成员可以通过控制 p85a 和 CDC42 的表达来负向调控 p53 的表达^[10]。本实验检测 MFs 和正常未活化 HTFs 中 miR-29b 和 p53 的表达水平, 通过 siRNA 抑制 p53 表达来观察 miR-29b 的变化, 以期探讨青光眼滤过术后滤过道瘢痕形成的机制, 为青光眼滤过性手术术后预防瘢痕形成的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 收集安徽医科大学第一附属医院 2016 年 3—7 月行斜视手术患者术眼的结膜下正常 Tenon 囊组织, 原代培养出 HTFs 作为研究对象。本研究遵循赫尔辛基宣言, 患者或其监护人签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 TGF- $\beta 1$ (美国 peprotech 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); miRNeasy Mini Kit、miScript II RT Kit、miScript SYBR Green PCR Kit (德国 Qiagen 公司); siRNA oligo (上海 GenePharma 公司); DMEM、Lipofectamine RNAimax Reagent (美国 Life Technologies 公司); 兔 p53 单克隆抗体 (ab62376, 美国 Abcam 公司); 生物素-链霉卵白素免疫组织化学检测试剂盒、DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。荧光定量 PCR 仪 (美国 Agilent Technologies 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人眼结膜下 Tenon 囊组织剪成约 0.5 mm^3 的块状, 平铺于细胞培养瓶中, 倒置放置于体积分数为 5% CO_2 的 37°C 恒温培养箱中, 约 40 min 后取出, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 放入恒温培养箱中培养, 待 HTFs 铺满瓶底面积约 80% 时用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代至 2~4 代备用。

1.2.2 免疫组织化学法检测 p53 蛋白的表达 将培养瓶中的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后均匀地接种在 6 孔板中, 将细胞分成 2 个组, HTFs 组为不做任何处理, TGF- $\beta 1$ 活化组加入 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ 作用 48 h 以诱导 HTFs 活化为 MFs^[11-12]。倾去 6 孔板中的细胞培养液, PBS 清洗 3 次, 加入体积分数 75% 乙醇固定 30 min; PBS 冲洗 3 次后加入体积分数 0.3% Triton X-100 破膜 15 min, PBS 清洗 3 遍; 按照免疫组织化学试剂盒说明书操作, 加入体积分数 3% H_2O_2 作用 15 min, PBS 冲洗 3 次后加入试剂 A, 室温孵育 15 min,

加入 p53 一抗(1:100)4℃ 孵育过夜,再用 PBS 冲洗 3 次后,滴加试剂 B,室温孵育 15 min 后 PBS 冲洗 3 遍,滴加试剂 C 室温孵育 15 min, DAB 染色,当细胞核着色且背景未着色时用自来水轻轻冲去 DAB 染色剂;200 倍显微镜下拍照,以 GAPDH 为内参照,用 Image Proplus 软件(美国 Media Cybernetics 公司)根据平均吸光度值进行分析。

1.2.3 实验分组及处理 将体外培养的 HTFs 接种于 6 孔板中,分为 HTFs 组、TGF-β1 活化组、siRNA 转染组和阴性对照组。待细胞生长至孔板面积 60% 时, TGF-β1 活化组、siRNA 转染组以及阴性对照组细胞培养液中加入终质量浓度为 10 ng/ml TGF-β1, siRNA 转染组根据 Lipofectamine RNAiMAX Reagent 说明书,按照 siRNA 和 LipoRNAiMAX 等比例混合后加入 p53 siRNA,每孔 siRNA 浓度为 60 nmol/L,转染开始 6 h 后给细胞换液,并在荧光显微镜下观测 siRNA 转染效果;阴性对照组按照同法加入空白 siRNA;HTFs 组细胞常规培养。将各组细胞放回 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h,荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 p53 mRNA 及 miR-29b 表达量的差异。

1.2.4 p53 基因和 miR-29b 的提取和逆转录 收集各组细胞,按照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒操作方法,将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后,离心去上清,加入 700 μl QIAzol,反复吹散细胞,室温放置 5 min 后加入 140 μl 氯仿,振荡 15 s,静置 2 min,4℃ 条件下 12 000×g 离心 15 min,取上层水相加入 1.5 倍体积 100% 乙醇,混匀后取 700 μl 至 RNeasy Mini spin Column 中,4℃ 条件下 12 000×g 离心 15 s,弃流出液,加入 700 μl Buffer RWT 至 RNeasy Mini spin Column 中,4℃ 条件下 12 000×g 离心 2 min,取出 RNeasy Mini spin Column 置于新的 2 ml 收集管中,离心 1 min,将 RNeasy Mini spin Column 置于 1.5 ml 收集管中,加入 20 μl RNase-free 水,4℃ 条件下 12 000×g 离心 1 min,得到的 RNA 经完整性及质量鉴定后,按照 miScript II RT Kit 逆转录试剂盒说明书加入逆转录酶,将提取的 mRNA 和 miRNA 置于 PCR 仪中,设置反应条件:37℃ 60 min,95℃ 5 min,逆转录得到 cDNA。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 p53 mRNA 和 miR-29b 的表达 根据 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒说明书,将 cDNA 稀释 3~5 倍,按照 25 μl 的反应体系进行反应。引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程有 限公司合成,反应条件为:95℃ 预变性 15 min;94℃ 变性 15 s,55℃ 退火 30 s,70℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。每个样本设置 2 个复孔,其中所有的目的基因均设有

阴性对照,以去离子水代替 cDNA 进行 PCR 反应。每次实验至少重复 1 次,取 Ct 平均值进行计算, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}$,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 公式计算基因相对表达量。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
p53	F:ACCTATGGAACTACTTCTCTGAAA	24
	R:CTGGCATTCTGGGAGCTTCA	20
miR-29b	P:TAGCACCATTGAAATCAGTGTT	23
U6	P:AGAGAAGATTAGCATGCCCCCTG	23
GAPDH	F:GGAAGGTGAAGGTCCGAGT	19
	R:GAGGTCAATGGAAAGGGGTC	20

注:GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.6 细胞划痕试验 将处于对数期增长期的细胞以 1.5×10^5 /孔的密度均匀接种于 12 孔板中,分成 2 个组,分别加入 1 ml 培养基和 1 ml 含 10 ng/ml TGF-β1 的培养基,培养 12~24 h 细胞约长至 80%,用 10 μl 移液枪头在 12 孔板中垂直划痕,用 PBS 冲洗 3 遍,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养,并在划痕后 6 h 和 12 h 取样拍照。测量不同时间点无细胞区域的平均宽度并与 0 h 无细胞区域宽度比较,即细胞相对迁移距离。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析,采用 Graphpad Prism(美国 Graphpad 软件公司)进行作图。各组数据经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。TGF-β1 活化组与 HTFs 组细胞中 p53 蛋白染色强度采用独立样本 t 检验,迁移距离比较均采用重复测量两因素方差分析。HTFs 组、TGF-β1 活化组、siRNA 转染组和阴性对照组细胞中 p53 mRNA 及 miR-29b 相对表达量比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代细胞及活化后细胞的形态

Tenon 囊组织培养约 2 周可见 HTFs 从组织边缘长出,6~8 周可见 HTFs 铺满瓶底,细胞体积较大,呈典型的扁平长梭形,细胞核居中,呈规则卵圆形,细胞之间呈螺旋状排列(图 1A)。10 ng/ml TGF-β1 活化后 48 h 细胞活化为 MFs,细胞体积增大且形态不规则,边缘毛糙,细胞之间呈无序状态(图 1B)。

2.2 TGF-β1 活化组与 HTFs 组细胞中 p53 蛋白的表达分布

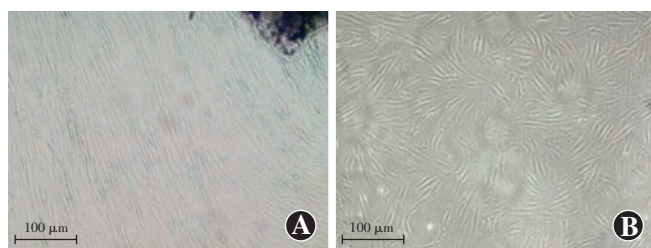


图1 光学显微镜下观察 HTFs 和 MFs 细胞形态($\times 100$, 标尺 = $100\ \mu\text{m}$) A: 正常培养的 HTFs 细胞呈典型的纺锤形, 细胞核居中, 细胞之间呈螺旋状规则排列 B: TGF- $\beta 1$ 活化后的 HTFs 细胞胞体变大, 形态不规则, 边缘毛糙, 细胞之间排列无规律, 活化为 MFs

免疫组织化学结果显示, p53 蛋白在 HTFs 细胞核中呈阳性表达, 呈黄褐色弥漫性分布, 在细胞质中未见表达; TGF- $\beta 1$ 活化组细胞中 p53 蛋白染色着色程度明显高于 HTFs 组(图 2)。TGF- $\beta 1$ 活化组细胞中 p53 蛋白染色强度为 0.042 ± 0.012 , 显著强于 HTFs 组的 0.009 ± 0.008 , 差异有统计学意义($t = -10.384, P < 0.05$)。

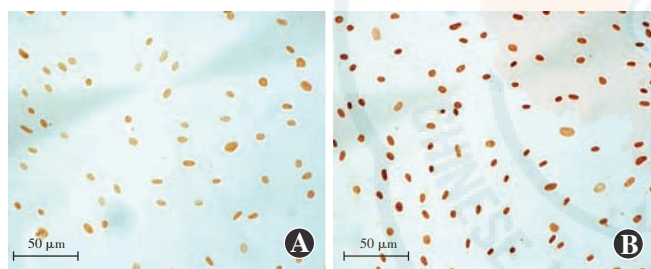


图2 免疫组织化学检测 p53 蛋白在细胞中的表达(DAB $\times 200$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) A: HTFs 中 p53 蛋白呈淡褐色表达分布于细胞核中 B: MFs 中 p53 蛋白呈深褐色弥漫分布于细胞核中, 细胞质中均未出现 p53 蛋白表达

2.3 HTFs 组与 TGF- $\beta 1$ 活化组细胞迁移情况

HTFs 组与 TGF- $\beta 1$ 活化组各时间点细胞相对迁移距离总体比较, 差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 9.750, P = 0.000$)。划痕后 6 h 和 12 h TGF- $\beta 1$ 活化组细胞的相对迁移距离明显大于 HTFs 组细胞, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3)。

2.4 各组细胞中 p53 mRNA 及 miR-29b 相对表达量变化

HTFs 组、TGF- $\beta 1$ 活化组、siRNA 转染组和阴性对照组细胞中 p53 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 3.95 ± 2.61 、 0.06 ± 0.06 和 0.98 ± 0.16 , miR-29b 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.54 ± 0.09 、 5.10 ± 2.31 和 1.03 ± 0.09 , 总体比较差异均有统计学意义($F = 6.688, P = 0.006$; $F = 13.640, P = 0.000$), 其中 HTFs 组细胞 p53 mRNA 相对表达量显著高于 siRNA 转染组, miR-29b 相对表达量显著低于 siRNA 转染组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); TGF- $\beta 1$ 活化组细胞

p53 mRNA 相对表达量显著高于 HTFs 组和 siRNA 转染组, miR-29b 相对表达量显著低于 HTFs 组和 siRNA 转染组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4)。

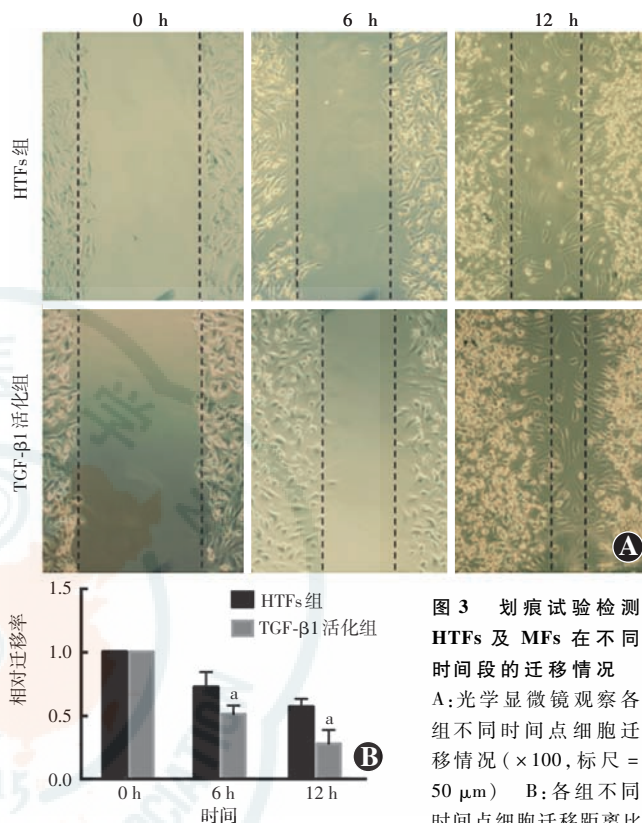


图3 划痕试验检测 HTFs 及 MFs 在不同时间段的迁移情况 A: 光学显微镜观察各组不同时间点细胞迁移情况($\times 100$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) B: 各组不同时间点细胞迁移距离比较

$F_{\text{分组}} = 9.750, P = 0.000$ 与 HTFs 组比较, $^a P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) HTFs: 人 Tenon 囊成纤维细胞; MFs: 肌成纤维细胞; TGF: 转化生长因子

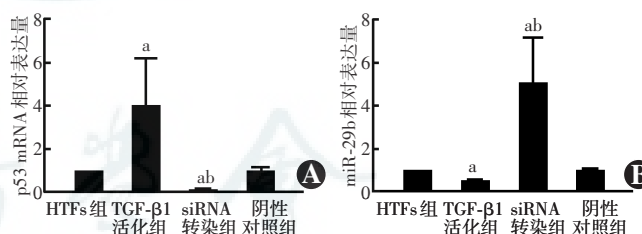


图4 各组细胞中 p53 及 miR-29b 相对表达量比较 A: 各组细胞中 p53 mRNA 相对表达量比较 $F = 6.688, P = 0.006$. 与 HTFs 组比较, $^a P < 0.05$, 与 TGF- $\beta 1$ 活化组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) B: 各组细胞中 miR-29b 相对表达量比较 $F = 13.640, P = 0.000$. 与 HTFs 组比较, $^a P < 0.05$; 与 TGF- $\beta 1$ 活化组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) HTFs: 人 Tenon 囊成纤维细胞; TGF: 转化生长因子; miR: 微小 RNA; siRNA: 小干扰 RNA

3 讨论

关于 p53 与 miRNA-29b 促进纤维化作用机制的研究很多, 然而二者之间相关性的研究较少。本研究探讨了在纤维化瘢痕形成过程中 p53 与 miR-29b 的表达变化及两者之间的相互作用关系。

有研究表明,p53 家族包括 p53、p63 和 p73,其在各种纤维化瘢痕组织中的表达均上调^[9]。在促纤维化形成过程中,p53 是由 TGF- β 1 诱导,在许多纤维化基因中起重要作用,且与 TGF- β 1 诱导的促纤维化的 Smad3 通路具有协同作用^[10]。Kodama 等^[13]研究发现,p53 表达的增加可以诱导小鼠肝脏细胞的结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)合成,并导致小鼠的肝纤维化。Samarakoon 等^[10]研究也证实,在小鼠肾脏纤维化形成过程中,p53 的表达量增加。Wu 等^[14]对人群中 p53 与纤维化瘢痕形成的关系做了相关分析,结果表明 p53 基因 Arg72 蛋白的多态性与中国人群瘢痕形成的易感性相关^[14]。然而,Nishizawa 等^[15]研究发现,p53 是由 IGF 所诱导的,并在抗纤维化的过程中起到十分重要的作用。本研究中活化的 MFs 中 p53 mRNA 及蛋白的表达量较 HTFs 明显升高,推测 p53 的激活可能参与青光眼术后瘢痕形成。

MiRNA 是一种内源性的非编码 RNA,其功能是促使 mRNA 加速降解或抑制翻译来调节基因表达^[16-17]。Roderburg 等^[18]对小鼠肝纤维化组织中的 miRNA 提取后分析证实,miR-29b 可抑制 HSCs 中胶原蛋白的表达,并在 HSCs 活化期间下调;同时对 2~4 级肝纤维化患者的肝脏样本中 miRNA 进行分析,结果显示患者肝纤维化组织中 miR-29b 在 HSCs 活化期间下调。Li 等^[19]曾用基因芯片的方式对 HTFs 及 MFs 中的 miRNA 进行筛查发现,活化后的 MFs 中 miR-29b 的表达下调。而 Zhao 等^[20]和 Park 等^[21]也发现 NF- κ B-miR-29b-p53 通路对乳腺癌细胞的增生有影响。目前对 miR-29b 及 p53 在纤维瘢痕形成中的相互作用关系研究较少,而 p53 mRNA 作为转录因子,可以调节 miRNA 的阵列表达^[22]。根据本研究结果,我们推测 p53 mRNA 可通过抑制 miR-29b 的转录来促进诱导纤维化的产生。故当纤维化瘢痕形成后,p53 mRNA 的表达升高,可抑制 miR-29b 的表达。然而,这些实验结果仅证明了 p53 与 miR-29b 之间的相互调节关系,并没有验证 p53 是通过哪一位点对 miR-29b 的转录进行调控来调节纤维化瘢痕的形成与发展的。

本研究显示,HTFs 活化为 MFs 后 p53 表达显著升高,miR-29b 表达明显降低,而当抑制 p53 表达时,miR-29b 表达反之升高;同时,随着 HTFs 活化为 MFs,细胞迁移能力也随之增强。推测在 HTFs 转变为 MFs 过程中,p53 与 miR-29b 之间存在相互作用来调控纤维化瘢痕的形成。

综上所述,本实验通过调节 p53 表达来探讨其与

miR-29b 的相关性,探讨青光眼滤过术后滤过道瘢痕形成的相关机制对减少青光眼术后瘢痕形成并提高手术成功率具有重要意义,可为青光眼术后预防瘢痕形成的研究提供新的思路。当然本研究也存在一些设计缺陷,如仅采用免疫组织化学方法对 p53 蛋白进行定量检测不够准确。同时,未来需采用更加直接的方式证明 p53 与 miR-29b 之间的相关性。

参考文献

- [1] Tolentino-Reyes RA, Garza-Cantu D, del CPG. Effectiveness of trabeculectomy trabeculotomy in the reduction of intraocular pressure in patients with primary congenital glaucoma [J]. *Gac Med Mex*, 2015, 151(6): 720-725.
- [2] Lindemann F, Plange N, Kuerten D, et al. Three-year follow-up of trabeculectomy with 5-fluorouracil [J]. *Ophthalmic Res*, 2017, 58(2): 74-80. DOI: 10.1159/000464446.
- [3] Yamanaka O, Kitano-Izutani A, Tomoyose K, et al. Pathobiology of wound healing after glaucoma filtration surgery [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15 Suppl 1: 157 [2018-03-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818010>. DOI: 10.1186/s12886-015-0134-8.
- [4] Amoozgar B, Lin SC, Han Y, et al. A role for antimetabolites in glaucoma tube surgery: current evidence and future directions [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2016, 27(2): 164-169. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000244.
- [5] Koutsonas A, Remky A, Plange N. Long-term results after trabeculectomy with 5-fluorouracil [J]. *Ophthalmologie*, 2014, 111(8): 749-756. DOI: 10.1007/s00347-013-2970-3.
- [6] Kiddee W, Orapiriyakul L, Kittigoonpaisan K, et al. Efficacy of adjunctive subconjunctival bevacizumab on the outcomes of primary trabeculectomy with mitomycin C: a prospective randomized placebo-controlled trial [J]. *J Glaucoma*, 2015, 24(8): 600-606. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000194.
- [7] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210. DOI: 10.1002/path.2277.
- [8] Luna C, Li G, Qiu J, et al. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor- β in trabecular meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3567-3572. DOI: 10.1167/iovs.10-6448.
- [9] Tanaka A, Hatoko M, Tada H, et al. Expression of p53 family in scars [J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 34(1): 17-24.
- [10] Samarakoon R, Dobberfuhr AD, Cooley C, et al. Induction of renal fibrotic genes by TGF- β 1 requires EGFR activation, p53 and reactive oxygen species [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(11): 2198-2209. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.07.007.
- [11] Hong S, Han SH, Kim CY, et al. Brimonidine reduces TGF- β -induced extracellular matrix synthesis in human Tenon's fibroblasts [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15: 54 [2018-02-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26017119>. DOI: 10.1186/s12886-015-0045-8.
- [12] Stahnke T, Kowtharapu BS, Stachs O, et al. Suppression of TGF- β pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts in vitro [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172592 [2018-02-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28231275>. DOI: 10.1371/journal.pone.0172592.
- [13] Kodama T, Takehara T, Hikita H, et al. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(8): 3343-3356. DOI: 10.1172/JCI44957.
- [14] Wu Y, Wang B, Li YH, et al. Meta-analysis demonstrates association between Arg72Pro polymorphism in the P53 gene and susceptibility to keloids in the Chinese population [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(2): 1701-1711. DOI: 10.4238/2012. June. 29. 2.
- [15] Nishizawa H, Iguchi G, Fukuoka H, et al. IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34605 [2018-05-11]. <http://europepmc.org/articles/PMC5056388?pdf=render>. DOI: 10.1038/srep34605.
- [16] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102-114. DOI: 10.1038/nrg2290.
- [17] Masud KSM, Liu L, Le TD, et al. Identification of miRNA-mRNA regulatory modules by exploring collective group relationships [J/OL]. *BMC Genomics*, 2016, 17 Suppl 1: 7 [2018-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26817421>. DOI: 10.1186/s12864-015-2300-z.
- [18] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 209-218. DOI: 10.1002/hep.23922.
- [19] Li N, Cui J, Duan X, et al. Suppression of type I collagen expression by

miR-29b via PI3K, Akt, and Sp1 pathway in human Tenon's fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (3): 1670-1678. DOI: 10.1167/iov.11-8670.

[20] Zhao H, Wilkie T, Deol Y, et al. Erratum to: miR-29b defines the pro-/anti-proliferative effects of S100A7 in breast cancer [J/OL]. Mol Cancer, 2015, 14 (1): 195 [2018-05-11]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573004. DOI: 10.1186/s12943-015-0451-9.

[21] Park SY, Lee JH, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16 (1): 23-29. DOI: 10.1038/nsmb.1533.

[22] Voudsen KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53 [J]. Cell, 2009, 137 (3): 413-431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.

(收稿日期: 2017-12-11 修回日期: 2018-07-26)

(本文编辑: 张宇)

· 病例报告 ·

LASIK 术后行飞秒激光辅助的白内障超声乳化摘除联合多焦点人工晶状体植入术一例

王晓明 郑秀华 高传晶 党光福

250200 山东省济南市明水眼科医院(王晓明、郑秀华、高传晶); 250011 济南市, 山东省千佛山医院眼科(党光福)

通信作者: 党光福, Email: dangguangfu@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.09.005

患者男性, 43 岁, 因自觉左眼视物不清 2 个月于济南市明水眼科医院就诊。眼科检查: 视力右眼为 1.0, 左眼为 0.2; 眼压右眼为 14 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 左眼为 16 mmHg; 验光左眼为 -1.00 DS/-1.25 DC×90°, 矫正无助; 裂隙灯显微镜下双眼角膜周边部可见角膜切削印记, 角膜中央区透明; 左眼晶状体混浊(混浊分级为 C2N2P3), 玻璃体液化混浊, 眼底未见明显异常; 右眼晶状体透明, 眼底结构正常。患者于 2005 年 4 月 10 日在本院行双眼激光原位角膜磨镶(laser-assisted in situ keratectomy, LASIK)手术, 既往资料: 右眼视力为 0.1, -4.50 DS/-0.50 DC×70° = 0.8⁺, 左眼视力为 0.4, -1.50 DS/-0.50 DC×90° = 0.8⁻; 角膜曲率右眼 K₁ = 44.6 D@99°, K₂ = 44.0 D@9°, 左眼 K₁ = 44.8 D@88.7°, K₂ = 44.1 D@177°。LASIK 术中机械刀制瓣(Hansatome, 美国博士伦公司), 设定光学区右眼为 6.0 mm, 左眼为 6.5 mm; 角膜瓣厚度为 160 μm, 直径为 8.8 mm; 激光切削深度右眼为 90 μm, 左眼为 51 μm。术后 1 周, 视力右眼为 0.8, 左眼为 0.8; 术后 3 周, 视力右眼为 1.0⁻, +0.25 DS/+0.75 DC×165°, 左眼为 0.8, +0.75 DS/-0.75 DC×85°, 双眼眼前节检查大致正常, 患者无不适症状, 之后未再复诊。结合既往病历资料, 临床诊断: 左眼白内障, 双眼 LASIK 术后。

在征得病人同意并签署协议书后, 实施飞秒激光辅助的白内障超声乳化摘除联合多焦点人工晶状体(intraocular lens, IOL)植入。术前对角膜进行了全面系统的评估: Pentacam 角膜地形图结果见图 1; RTVue 眼前节光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)仪检查显示角膜瓣厚度约 153 μm, 角膜瓣直径 8.8 mm。黄斑 OCT 示黄斑区视网膜各层反光均匀; 角膜内皮细胞计数 2 377 个/mm², 变异系数为 35; 眼生物测量: A 型超声测量左眼眼轴轴长为 24.72 mm, 前房深度为 4.34 mm, 晶状体厚度为 3.04 mm; 角膜曲率测量: K₁ = 42.80 D@65°, K₂ = 42.10 D@155°。拟植入 Alcon 多焦点 IOL (SN6AD1), 应用 ASCRS 在线算法计算 IOL 度数为 19.63 D; IOL Master Haigis-L 公式计算 IOL 度数为 19.5 D(+0.24), 20.0 D(-0.11); LS 900 (Haag-Streit) Shammas 公式计算 IOL 度数为

19.5 D(+0.05), 20.0 D(-0.31)。最终选取 IOL 度数为 19.5 D。

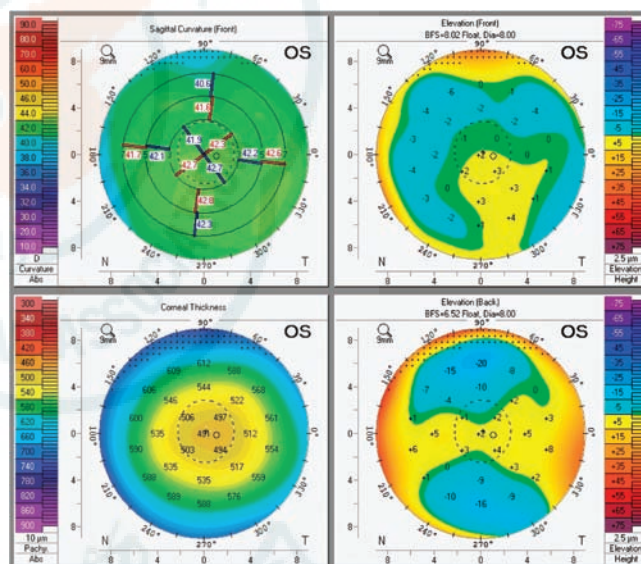


图 1 飞秒激光辅助的白内障超声乳化摘除联合多焦点 IOL 植入术前左眼角膜地形图 角膜曲率 K₁ = 42.6 D@66.2°, K₂ = 42.2 D@156.2°, 形态对称, 角膜厚度为 489 μm, 角膜前表面高度+2, 后表面高度+3, 角膜直径 11.6 mm。

手术应用 LenSx 飞秒激光(美国 Alcon 公司)行角膜切口制作、前囊撕囊、晶状体预劈核, 角膜主切口尽量靠近角膜缘, 切口位置 30°, 长度 1 200 μm, 宽度 2.2 mm, 辅助切口位置 300°, 前囊膜撕囊直径 5.2 mm, 劈核直径 5.2 mm, 行十字形联合 6 环圆柱形劈核, 劈核能量 12 μJ, 术毕行常规白内障超声乳化摘除联合 IOL 植入, 超声乳化累积释放能量为 3。

术后 1 d, 左眼远视力为 1.0, +0.12 DS/+0.25 DC×71°, 近视力为 J4, 眼压为 17 mmHg, 角膜切口对合良好, 主切口轻度水肿, 瓣缘处未见异常, 前房中深, 前房闪辉(+), 瞳孔圆, 对光反射灵敏, IOL 居中透明。术后 1 周, 左眼远视力为 1.0, +0.25 DS, 近视力为 J2, 眼压为 16 mmHg, 眼前节正常。术后 1