

· 实验研究 ·

miR-30b 对大鼠糖氧剥夺性视网膜神经节细胞损伤的保护作用

黄婵娟 霍妍 陈琛 艾李倩玉 周元国 叶剑

400042 重庆,第三军医大学大坪医院眼科

通信作者:叶剑,Email:yejian1979@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.004

【摘要】 背景 缺血缺氧损伤是引起大部分视觉系统损害的主要原因,目前尚无有效药物从根本上缓解缺血缺氧带来的损害。研究发现,微小 RNA(miR)-30b 有助于减轻缺血缺氧导致的心肌损伤,但其对糖氧剥夺的视网膜神经节细胞(RGCs)生存是否有类似的保护作用鲜有文献报道。目的 研究重组腺相关病毒介导的 miR-30b 转染对糖氧剥夺 RGCs 的保护作用。方法 取出生后 24 h 的 8 只 SD 大鼠眼球,剥离出视网膜组织以进行 RGCs 的原代培养,将原代培养的细胞分为重组腺相关病毒(rAAV)-miR 对照组、rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR-30b 抑制物组和 PBS 组,分别在培养液中添加 rAAV-miRNA、rAAV-miR-30b 拟似物、rAAV-miR-30b 抑制物或 PBS 培养细胞 6 d,RGCs:AAV 为 1:10 000。各组细胞分别进行低氧培养箱(37℃,体积分数 5% CO₂、17% N₂、3% O₂)联合低糖(葡萄糖质量浓度为 1.0 g/L)培养液进行培养以建立原代糖氧剥夺 RGCs 模型,并与正常培养(37℃、5% CO₂)的细胞进行对照。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测各组细胞活力,采用免疫荧光染色法检测各组细胞中神经元特异性标志物 Tubulin III 的表达,并计算存活 RGCs 数目。采用 Hoechst/PI 染色法检测各组细胞的凋亡和坏死情况。结果 培养 7 d 的正常成熟 RGCs 可见 1~3 条完整的细长神经元突起及其分支。糖氧剥夺后随着时间延长,培养的 RGCs 逐渐减少和破坏,突起的主干结构破碎。rAAV-miR-30b 拟似物组细胞相对活性分别为 3.310±0.162,明显高于 rAAV-miR-30b 抑制物组和 rAAV-miR 对照组的 0.949±0.141 和 0.900±0.181,差异均有统计学意义($t=10.508, 10.296$, 均 $P<0.001$)。存活的 RGCs 可表达 Tubulin III,呈红色荧光。rAAV-miR-30b 拟似物组 Tubulin III 阳性细胞数量为(13.800±1.924)/视野,明显多于 rAAV-miR-30b 抑制物组的(0.600±0.548)/视野和 rAAV-miR 对照组的(0.800±1.304)/视野,差异均有统计学意义($t=15.141, 14.912$, 均 $P<0.001$)。rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR 对照组和 PBS 组细胞凋亡率和死亡率的总体比较差异均有统计学意义($F=10.851, P=0.002; F=6.378, P=0.013$),rAAV-miR-30b 拟似物组细胞凋亡率和死亡率均明显低于 rAAV-miR 对照组和 PBS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 低氧培养箱联合低糖培养液建立稳定的原代 RGCs 糖氧剥夺模型;rAAV 介导的 miR-30b 转染可抵抗糖氧剥夺对 RGCs 的损伤。

【关键词】 微小 RNA/代谢; 视网膜神经节细胞; 细胞缺氧/生理病理; 糖/生理; RNA 干扰; 细胞保护/药物; SD 大鼠; 糖氧剥夺

基金项目:国家自然科学基金项目(81371006、81300762)

Protective effect of miR-30b on retinal ganglion cells against oxygen-glucose deprivation *in vitro* Huang Chanjuan, Huo Yan, Chen Chen, Ai Liqianyu, Zhou Yuanguo, Ye Jian

Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Ye Jian, Email: yejian1979@126.com

【Abstract】 **Background** Retinal ganglion cell (RGCs) death following ischaemic insult is the major cause of a number of vision-threatening diseases. Recent studies confirmed that micro RNA (miR-30b) can alleviate hypoxia-induced cardiac injury. However, whether miR-30b can protect RGCs against oxygen-glucose deprivation damage is still not elucidated. **Objective** The aim of this study was to investigate the protective effect of miR-30b on RGCs damage caused by oxygen-glucose deprivation. **Methods** The retinas were isolated from the eyeballs of eight SD rats aged postnatal 24 hours and RGCs were primarily cultured. The cells were divided into the recombinant adeno-associated virus (rAAV) control group, rAAV-miR-30b mimic group and AAV-miR-30b inhibitor group. Then the cells were transfected using rAAV-miR plasmid, rAAV-miR-30b mimic plasmid and AAV-miR-30b inhibitor

plasmid, respectively for 6 days with the RGCs: AAV as 1:10 000. The cells were cultured with low glucose medium in hypoxigen incubator (5% CO₂, 17% N₂, 3% O₂) or 5% CO₂ incubator respectively for 24 hours. Cell viability was detected by cell counting kit-8 assay. The expression of Tubulin III, a neuron specific marker, was detected by immunofluorescence technology to evaluate the survival of RGCs. The apoptosis and necrosis of the cells were assessed by Hoechst/PI double staining. **Results** The RGCs grew well with round shape and 1—3 processes 7 days after cultured in the normal cells. However, the RGCs were diminished and the cell process disrupted in the oxygen-glucose deprivation group. The relative viability of the cells was 3.310±0.162 in the rAAV-miR-30b mimic group, which was significantly higher than 0.949±0.141 in the rAAV-miR-30b inhibitor group and 0.900±0.181 in the rAAV-miR control group ($t=10.508, 10.296$, both at $P<0.001$). It was positively expressed in survival RGCs, with the red fluorescence. The number of Tubulin III⁺ cells was (13.800±1.924)/field in the rAAV-miR-30b mimic group, showing a significant increase in comparison with (0.600±0.548)/field in the rAAV-miR-30b inhibitor group and (0.800±1.304)/field in the rAAV-miR control group ($t=15.141, 14.912$, both at $P<0.001$). Significant differences were found in the apoptosis rate and necrosis rate among the rAAV-miR-30b mimic group, rAAV-miR control group and PBS group ($F=10.851, P=0.002; F=6.378, P=0.013$), and the apoptosis rate and necrosis rate in the rAAV-miR-30b mimic group were considerably lower than those in the rAAV-miR control group and PBS group (all at $P<0.05$). **Conclusions** The oxygen-glucose deprivation models can be established in RGCs by hypoxigenic and low-glucose cultivation. rAAV encoding miR-30b mimics transfection can protect RGCs against oxygen-glucose deprivation damage.

[Key words] MicroRNAs/metabolism; Retinal ganglion cells; Cell hypoxia/physiology; Glucose/physiology; RNA interference; Cytoprotection/drug effects; Rats, Sprague-Dawley; Oxygen-glucose deprivation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81371006, 81300762)

眼外伤、青光眼等缺血缺氧性眼病可对视神经造成不可逆的损伤,目前认为氧剥夺损伤机制在其中发挥重要作用^[1],用糖皮质激素类、抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和非甾体类抗炎药物等进行治疗往往不能达到预期疗效^[2-3],因此寻找新疗法是该领域的研究方向之一。对离体培养的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行糖氧剥夺处理来模拟体内缺血缺氧损伤是最常用的方法,建立稳定的离体糖氧剥夺模型有利于治疗药物的筛选。近年的研究表明,微小RNA(microRNAs, miR)参与机体内稳态的调节,包括机体组织对缺氧的应答反应^[4-5]。我们前期的研究发现,大鼠视神经钳夹伤后视网膜中 miR-30b 表达水平升高,提示 miR-30b 可能参与伤后 RGCs 缺血缺氧的应答。此外,将 miR-30b 转染至 RGCs 可促进细胞轴突生长^[6]。还有研究表明,人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 可通过抑制 miR-30b 而增加过氧化氢酶的表达,从而抵抗氧化应激损伤^[7]。由此我们推测 miR-30b 可能对糖氧剥夺导致的 RGCs 损伤发挥保护作用。本研究中拟利用体外培养的 RGCs 建立糖氧剥夺模型,观察 miR-30b 对 RGCs 糖氧剥夺损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 24 h 以内的健康 SD 大鼠(第三军医大学第三附属医院实验动物中心提供),雌雄不限。本研究经第三军医大学大坪医院伦理委员会批准(医研伦审 2014-23),实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂 重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)-miR-30b 拟似物、rAAV-miR-30b 抑制物、rAAV-miRNA 腺病毒空白载体(上海生博医药科技有限公司合成);胰蛋白酶、DMEM/F-12 培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);低糖 DMEM、L-谷氨酰胺、Neurobasal 培养基、B27 复合物(美国 Gibco 公司);多聚赖氨酸、多聚甲醛(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠神经元特异性标志物 Tubulin III 一抗(ab78078)、Cy3 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(ab97035)(英国 Abcam 公司);DAPI 染色液(北京中杉金桥生物技术公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、细胞凋亡和坏死检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代 RGCs 的培养和转染 取出生 24 h 以内的 SD 大鼠 8 只,以体积分数 75% 乙醇浸泡消毒溺亡,摘取大鼠眼球,取出晶状体及玻璃体,钝性分离并取出视网膜。加入 2 ml、质量分数 0.25% 胰蛋白酶,在 37℃ 水浴中消化 15~20 min,用含体积分数 10% 胎牛血清

的 DMEM 完全培养基 8 ml 终止消化;然后 3 000 g 离心 15 min, 弃上清;加入神经元培养液 (Neurobasal+ B27+0.5 mmol/L 谷氨酰胺), 吹打成细胞悬液, 经直径 70 μm 的筛网滤过, 以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞密度接种于 0.1 mg/ml 的多聚赖氨酸包被的 24 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱内培养 24 h。将细胞分为 rAAV-miR 对照组、rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR-30b 拮抗物组和 PBS 组, 分别于不同培养液中添加 rAAV-miR、rAAV-miR-30b 拟似物、rAAV-miR-30b 拮抗物或 PBS 各 1 μl , 其中 RGCs: rAAV 为 1:10 000, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱内继续培养, 于培养后第 7 天取出细胞进行实验。

1.2.2 糖氧剥夺模型的建立 收集各组培养 7 d 的 RGCs, 参照 Gwag 等^[4]的方法用缺氧培养箱制备 RGCs 的糖氧剥夺模型, 即用低糖 (葡萄糖质量浓度为 1.0 g/L) DMEM 培养液在温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 及含 5% CO_2 、17% N_2 、3% O_2 的缺氧培养箱中分别培养 0、1 和 3 h, 正常培养的细胞用 DMEM 培养液在温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的正常培养箱中分别培养 0、1 和 3 h, 倒置相差显微镜下观察各组 RGCs 形态。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 各组 RGCs 以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔板, 各转染组细胞糖氧剥夺后 3 h 将低糖 DMEM 培养液换成正常培养液, 同时每孔加入 10 μl CCK-8 培养 4 h, 用酶联免疫检测仪上测定波长为 450 nm 的吸光度 (A_{450}), 计算细胞活性。细胞活性 (%) = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。细胞相对活性 = 细胞活性 (%) / 对照组细胞活性 (%)。

1.2.4 免疫组织化学法检测 RGCs 细胞标志物 Tubulin III 的表达 各组 RGCs 以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 24 孔板中培养 7 d, 在糖氧剥夺后 3 h 以质量分数 5% 多聚甲醛于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 Triton 打孔 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。滴加神经元特异性标志物 Tubulin III (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 清洗 3 次。滴加 Cy3 标记的山羊抗鼠 IgG (1:200), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 清洗, 荧光显微镜下观察细胞形态和数量。每孔取 5 个固定视野, 计算每个视野内的细胞个数, 取平均值, 实验重复 3 次 (图 1)。

1.2.5 Hoechst/PI 双染色法检测细胞的凋亡和坏死 各组 RGCs 以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 24 孔板, 病毒转染后培养 7 d。糖氧剥夺后 3 h 弃培养液, 每孔加入 500 μl 混合液 ($V_{\text{Hoechst染色液}} : V_{\text{PI染色液}} : V_{\text{细胞染色缓冲液}} = 5 : 5 : 1\ 000$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 荧光显微镜下观察 Hoechst/PI 染色阳性细胞数。细胞凋亡率 = Hoechst 阳

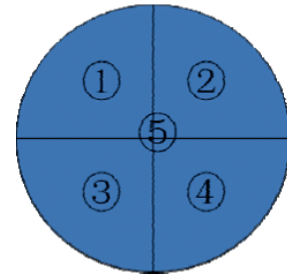


图 1 每孔 5 个固定视野的选取示意图

性细胞个数/总细胞个数 $\times 100\%$; 细胞坏死率 = PI 阳性细胞个数/总细胞个数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组多水平实验设计, rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR-30b 抑制物组和 rAAV-miR 对照组间 RGCs 活性和存活 RGCs 数目的总体差异比较以及 rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR 对照组和 PBS 组间细胞凋亡率和坏死率的总体差异比较均采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常培养和糖氧剥夺模型细胞的形态学表现

培养 7 d 的正常成熟 RGCs 可见 1~3 条完整的细长神经元突起及其分支。在糖氧剥夺后 1 h 可见神经元分支减少, 而神经元突起的主干结构较完整, 细胞体周围光泽度好, 透亮。糖氧剥夺后 3 h 神经元的分支消失, 神经元突起的主干结构破碎, 细胞体周围无光泽, 细胞体内反光明暗不均 (图 2)。

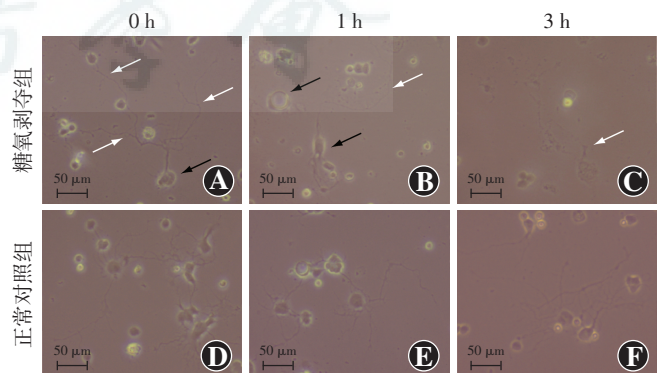


图 2 各组 RGCs 的形态学表现 (标尺 = 50 μm) A: 糖氧剥夺即刻 (0 h) RGCs 呈近圆形 (黑箭头), 可见细胞体周围的细长突起 (白箭头) B: 糖氧剥夺 1 h RGCs 细胞体大小不规则 (黑箭头), 细胞体周围突起变细, 分支减少 (白箭头) C: 糖氧剥夺后 3 h RGCs 减少, 细胞突起的主干破坏 (白箭头) D~F: 与培养同时时间点糖氧剥夺组 RGCs 比较, 正常对照组 RGCs 细胞体大小规则, 细胞突起明显

2.2 各组 RGCs 相对活性的比较

rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR-30b 抑制物组和 rAVV-miR 对照组相对细胞活性分别为 3.310 ± 0.162 、 0.949 ± 0.141 和 0.900 ± 0.181 ，3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 72.129, P < 0.001$)。rAAV-miR-30b 拟似物组细胞活性明显高于 rAAV-miR-30b 抑制物组和 rAVV-miR 对照组，差异均有统计学意义 ($t = 10.506, 10.294$ ，均 $P < 0.001$)。rAAV-miR-30b 抑制物组与 rAVV-miR 对照组比较细胞活性的差异无统计学意义 ($t = 0.212, P = 0.839$) (图 3)。

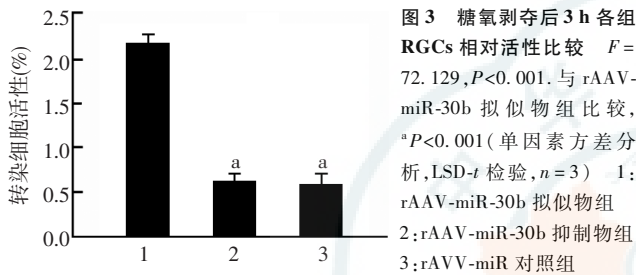


图 3 糖氧剥夺后 3 h 各组 RGCs 相对活性比较 $F = 72.129, P < 0.001$ 。与 rAAV-miR-30b 拟似物组比较， $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: rAAV-miR-30b 拟似物组 2: rAAV-miR-30b 抑制物组 3: rAVV-miR 对照组

2.3 各组 RGCs 细胞形态和存活数量

存活的 RGCs 可表达 Tubulin III，呈红色荧光。正常对照组和 rAAV-miR-30b 拟似物组细胞形态完整，神经元细胞体呈类圆形，形态规则，可见神经突起，存活的 RGCs 较多；rAAV-miR-30b 抑制物组及 rAVV-miR 对照组中神经元细胞体形态不规则，细胞数量明显减少，神经元细胞体和神经突起辨别不清。rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR-30b 抑制物组和 rAAV-miR 对照组 Tubulin III 阳性细胞数的总体比较差异有统计学意义 ($F = 150.561, P < 0.001$)。rAAV-miR-30b 拟似物组 Tubulin III 阳性细胞数量为 (13.800 ± 1.924) /视野，明显多于 rAAV-miR-30b 抑制物组的 (0.600 ± 0.548) /视野和 rAVV-miR 对照组的 (0.800 ± 1.304) /视野，差异均有统计学意义 ($t = 15.141, 14.912$ ，均 $P < 0.001$) (图 4)。

2.4 糖氧剥夺后各组 RGCs 凋亡和坏死情况

rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR 对照细胞和 PBS 组凋亡率分别为 $(13.0 \pm 8.7)\%$ 、 $(46.6 \pm 19.5)\%$ 和 $(67.8 \pm 24.5)\%$ ，3 个组总体比较差异有统计学意义 ($F = 10.851, P = 0.002$)，rAAV-miR-30b 拟似物组细胞凋亡率明显低于 rAAV-miR 对照组和 PBS 组，差异均有统计学意义 ($t = 2.831, P = 0.030$; $t = 4.619, P = 0.002$)，rAAV-miR 对照组与 PBS 组之间细胞凋亡率的差异无统计学意义 ($t = 1.788, P = 0.099$)。rAAV-miR-30b 拟似物组、rAAV-miR 对照组和 PBS 组细胞坏

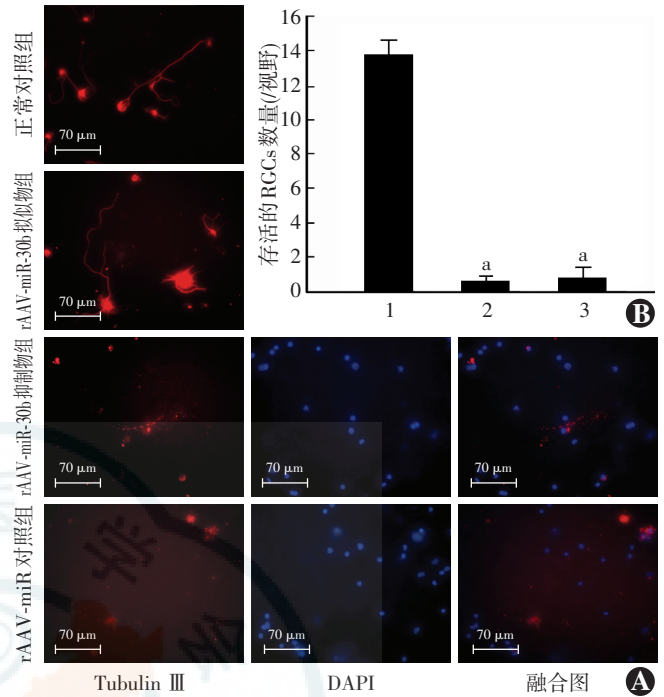


图 4 免疫荧光染色观察各组 RGCs 的形态和数量变化 (Cy3, 标尺 = $70 \mu\text{m}$) A: 存活的 RGCs 可表达神经元特异性标志物 Tubulin III，呈红色荧光。正常培养的 RGCs 细胞体呈圆形，可见细长形细胞突起；rAAV-miR-30b 拟似物组 RGCs 形态类似于正常培养的 RGCs，rAAV-miR-30b 拮抗物组和 rAAV-miR 对照组 RGCs 形态不规则，细胞突起崩解 rAAV: 重组腺病毒; miR: 微小 RNA B: 3 个组存活的 RGCs 数量的比较 $F = 150.561, P < 0.001$ 。与 rAAV-miR-30b 拟似物组比较， $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) 1: rAAV-miR-30b 拟似物组 2: rAAV-miR-30b 抑制物组 3: rAAV-miR 对照组

死率分别为 $(13.0 \pm 3.3)\%$ 、 $(25.9 \pm 10.7)\%$ 和 $(27.4 \pm 4.8)\%$ ，3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 6.378, P = 0.013$)，rAAV-miR-30b 拟似物组细胞坏死率明显低于 rAAV-miR 对照组和 PBS 组，差异均有统计学意义 ($t = 2.900, P = 0.026$; $t = 3.255, P = 0.021$)，rAAV-miR 对照组之间细胞坏死率的差异无统计学意义 ($t = 0.355, P = 0.729$) (图 5)。

表 1 各组 RGCs 凋亡率和坏死率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | 样本量 | 凋亡率 | 坏死率 |
|-------------------|-----|-------------------|-------------------|
| rAAV-miR-30b 拟似物组 | 5 | 13.0 ± 8.7 | 13.0 ± 3.3 |
| rAAV-miR 对照组 | 5 | 46.6 ± 19.5^a | 25.9 ± 10.7^a |
| PBS 组 | 5 | 67.8 ± 24.5^a | 27.4 ± 4.8^a |
| <i>F</i> | | 10.851 | 6.378 |
| <i>P</i> | | 0.002 | 0.013 |

注:与各自的 rAAV-miR-30b 拟似物组比较， $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) RGC: 视网膜神经节细胞; rAAV: 重组腺病毒; miR: 微小 RNA

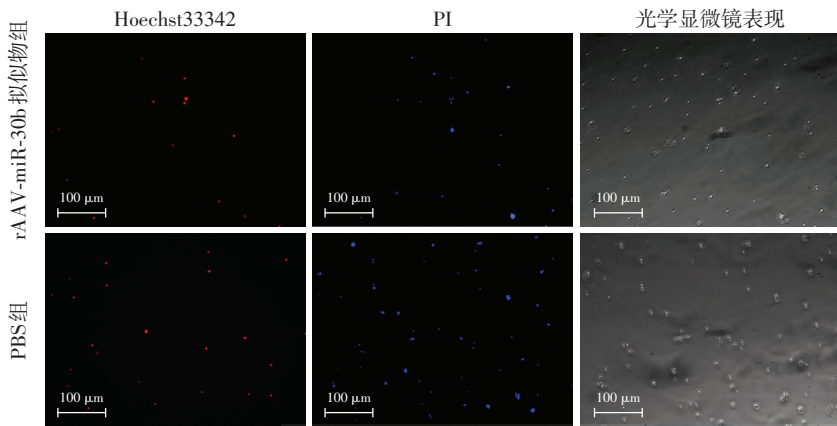


图5 各组 RGCs 凋亡和坏死情况 (Hoechst/PI, 标尺 = 100 μm) rAAV-miR-30b 拟似物组强蓝色荧光+弱红色荧光的凋亡细胞及强红色荧光+强蓝色荧光的坏死细胞均明显多于 PBS 组. 光学显微镜图片表示单位面积细胞个数(细胞密度)大致相同的情况下, 2 个组红色和蓝色荧光染色有差别 rAAV: 重组腺病毒; miR: 微小 RNA

3 讨论

视网膜神经元离体培养模型在视觉科学研究中具有重要价值及其独特的特点, 它可以建立离体视网膜神经元缺血缺氧模型, 以探讨缺血缺氧性神经元的细胞及分子保护机制^[8]。尽管体外细胞实验不能完全模拟体内环境, 但已有研究分别运用低氧、低糖和糖氧剥夺 3 种处理方式处理神经元, 发现糖氧剥夺模型较其余 2 种模型对神经元造成的伤害更为有效^[9], 因此对体外培养的神经元进行糖氧剥夺处理已成为模拟体内缺血缺氧损伤的常用方法。糖氧剥夺模型一般包括低糖培养基联合缺氧损伤模型, 而目前构建缺氧模型的方法多样, 但这些方法, 如药物 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ^[10]) 造成缺氧损伤需要人为调制浓度和加样, 重复实验容易产生误差; 封口膜密封培养板的方式不能精确控制和测量培养板内环境。本研究采用 Gwag 等^[4] 中的缺氧培养箱联合低糖培养基的方法建立离体 RGCs 糖氧剥夺模型, 该方法具有更好的可重复性, 操作简单, 可准确调控细胞培养环境。同时采用原代 RGCs 比 RGC-5 细胞株能更好地反映糖氧剥夺后的 RGCs 状态^[11]。离体糖氧剥夺模型在评价神经保护剂中具有其独特的优点^[12], 该模型可以排除活体状态下内分泌、循环、体液等多种因素的影响, 为进一步研究 miR-30b 对视网膜神经元糖氧剥夺的保护作用提供良好的离体实验模型, 但该模型不能完全模拟损伤后神经节细胞所处内环境的变化, 同时缺氧模型中氧浓度数值的设定还需要更多的临床数据分析研究。

Han 等^[6] 在大鼠视神经钳夹伤后, 通过 PCR 检测发现 miR-30b 在损伤早期含量迅速升高, 同时在体实验显示早期提高 miR-30b 浓度可以在一定程度上保护

RGCs, 减少细胞凋亡或死亡。而视网膜缺血缺氧是大鼠视神经钳夹伤早期病理变化之一, 提示 miR-30b 参与大鼠视网膜缺血缺氧过程。本研究中对转染 rAAV 的 RGCs 进行糖氧剥夺发现转染 rAAV-miR-30b 拟似物组与转染 rAAV-miR 对照组比较细胞活性明显增加。同时利用神经元特异性标志物 Tubulin III 免疫荧光染色法观察糖氧剥夺后 RGCs 结构改变情况, 结果显示上调该 miRNA 可保持 RGCs 结构的完整性。本研究中对各组 RGCs 凋亡与坏死检测显示, rAAV-miR-30b 转染后可降低糖氧剥夺后细胞的凋亡率和坏死率。结合上述

结果本研究中认为, miR-30b 可保护视网膜神经元受到糖氧剥夺的损害。Shen 等^[13] 对心肌细胞的研究也发现, miR-30 家族可以减轻心肌细胞糖氧剥夺造成的损害, 提示 miR-30b 可能是调节机体抵抗缺氧缺血环境的重要分子之一, 但其在其他细胞中以及 miR-30 家族的其他成员是否也具有相似的作用尚待进一步研究。

临床常见的眼外伤是由于眼内的急性糖氧剥夺环境所导致的视神经损伤, 因此眼外伤具有其他所有视神经疾病共同的病理学特征, 即 RGCs 的死亡。糖氧剥夺的动物模型发现, RGCs 具有早期坏死和凋亡并存的现象^[14-15]。本研究中发现, 原代转染 miR-30b 的 RGCs 在糖氧剥夺后 3 h 细胞活性明显增强, 细胞凋亡率和坏死率下降, 并可维持细胞的正常形态, 提示 miR-30b 可以增强 RGCs 对糖氧剥夺环境的适应能力, 有助于维持细胞内环境稳态。

本研究为离体实验, 发现 miR-30b 可在糖氧剥夺情况下保护 RGCs, 以减少细胞凋亡和细胞坏死, 尽管 miR-30b 在离体细胞培养实验中能够减轻糖氧剥夺带来的细胞损害, 但是其在在体动物实验中是否能够对 RGCs 发挥保护作用有待进一步研究。总之, 本研究的结果为治疗缺血缺氧性视网膜病变提供了一种新的思路, 即在视网膜损伤早期应用药物提高并维持 RGCs 内 miR-30b 的表达水平, 可能有利于 RGCs 抵抗缺血缺氧损伤。

参考文献

- [1] 林莉, 王伟. 视网膜神经节细胞损伤机制及神经保护药物研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15 (24): 3745-3748. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2009.24.023.
- Li L, Wei W. Retinal ganglion cells injury mechanisms and neuroprotective drug research[J]. Med Recapitulate, 2009, 15 (24): 3745-3748. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2009.24.023.

- [2] 李珍,杜玉敏,郭华,等.不同方式治疗外伤性视神经病变疗效分析[J].中华眼外伤职业眼病杂志,2001,23(4):396-397.
Li Z, Du YM, Guo H, et al. Therapeutic efficacy of traumatic optic neuropathy treated with different protocol [J]. Chin J Ocul Traum Occupat Eye Dis, 2001, 23(4): 396-397.
- [3] 张凤兰,李元彬.缺血缺氧性血-视网膜屏障损伤机制及药物治疗的研究进展[J].中华临床医师杂志:电子版,2014,8(7):1347-1350 [2015-10-23]. <http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical/zhlcyszz201407032>. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1674-0785.2014.07.032.
Zhang FL, Li YB. Current research of hypoxic-ischemic blood-retinal barrier inflammatory breakdown [J]. Chin J Clinicians; Electronic Edition, 2014, 8(7): 1347-1350. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1674-0785.2014.07.032.
- [4] Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, et al. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro [J]. Neuroscience, 1995, 68(3): 615-619.
- [5] Pocock R. Invited review: decoding the microRNA response to hypoxia [J]. Pflugers Arch, 2011, 461(3): 307-315. DOI: 10.1007/s00424-010-0910-5.
- [6] Han F, Huo Y, Huang CJ, et al. MicroRNA-30b promotes axon outgrowth of retinal ganglion cells by inhibiting Semaphorin3A expression [J]. Brain Res, 2015, 1611: 65-73. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.014.
- [7] Haque R, Chun E, Howell JC, et al. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(8): e42542 [2015-09-18]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042542>. DOI: 10.1371/journal.pone.0042542.
- [8] Liu SJ, Lachamp P. The activation of excitatory glutamate receptors evokes a long-lasting increase in the release of GABA from cerebellar stellate cells [J]. J Neurosci, 2006, 26(36): 9332-9339. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2929-06.2006.
- [9] 任历,于洪儒,王洪新.几种体外培养神经细胞缺氧模型效果的对比[J].辽宁医学院学报,2007,28(1):20-22. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0424.2007.01.007.
Ren L, Yu HR, Wang HX. Comparison of hypoxic effects of several models of in-vitro cultured neurons [J]. J Liaoning Med University, 2007, 28(1): 20-22. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0424.2007.01.007.
- [10] 万李,谢学军,马荣.补肾活血中药血清对缺氧条件下纯化培养视网膜神经节细胞的保护作用及其机制[J].中华实验眼科杂志,2014,32(3):211-215. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.03.006.
Wan L, Xie XJ, Ma R. Protection and mechanism of bushenhuoxue on retinal ganglion cells under the hypoxic condition in vitro [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(3): 211-215. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.03.006.
- [11] 杨秀丽,邓宗勇,李平华.二氢睾酮对大鼠视网膜神经节细胞-5神经突起再生及 RhoA 和神经突蛋白表达的影响[J].中国生物制品学杂志,2014,27(2):207-211.
Yang XL, Deng ZY, Li PH. Effect of dihydrotestosterone on neurite regeneration and expressions of RhoA and neuritin in rat retinal ganglion cells-5 [J]. Chin J Biolog, 2014, 27(2): 207-211.
- [12] Lobner D. Saturation of neuroprotective effects of adenosine in cortical culture [J]. Neuroreport, 2002, 13(16): 2075-2078.
- [13] Shen Y, Shen Z, Miao L, et al. miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine-gamma-lyase expression [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(3): 224-240. DOI: 10.1089/ars.2014.5909.
- [14] David P, Lusky M, Teichberg VI. Involvement of excitatory neurotransmitters in the damage produced in chick embryo retinas by anoxia and extracellular high potassium [J]. Exp Eye Res, 1988, 46(5): 657-662.
- [15] Caprara C, Grimm C. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(1): 89-119. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.003.

(收稿日期:2015-12-05)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

本刊关于医学研究中对人体临床试验伦理描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或1975年赫尔辛基宣言(2005年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和和使用指南。

(本刊编辑部)