

微小 RNA-181a 与视网膜节细胞在视网膜缺血-再灌注中的关系及其作用机制探讨

刘巾男 何宇 张军军 范玮

【摘要】 背景 视网膜缺血-再灌注(RIR)损伤是眼科常见病理改变之一,但其发病机制尚未明确。目的 探讨大鼠 RIR 模型中微小 RNA-181a(miR-181a)与视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡之间的关系及可能的靶向机制。方法 构建 68 只 SD 大鼠 RIR 模型,按随机数字表法随机分为对照组和造模后即刻组、造模后 24 h 组及造模后 72 h 组,每组 17 只,根据 MiRanda、TargetsCan 和 miRBase 3 个靶基因数据库的共同预测结果,选取肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作为 miR-181a 的下游靶基因研究对象,通过免疫荧光标记法 Western blot 及实时荧光定量 PCR 法观察 miR-181a、TNF- α 在各组的表达情况及其与 RGCs 凋亡的关系。结果 RGCs 计数在造模后 24 h 和 72 h 显著减少,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。各造模组 miR-181a 表达量随造模时间明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,随 RIR 时间的延长,miR-181a 的表达量及 RGCs 的数量均逐渐减少,两者呈正相关($r = 0.995, P = 0.005$)。TNF- α 主要在内层视网膜表达,与 miR-181a 分布重叠;RIR 即刻至 24 h 之间 TNF- α 表达明显升高,与 RGCs 计数及 miR-181a 表达的变化趋势相反,但总体相关性分析无统计学意义。结论 在 RIR 模型中,miR-181a 可能参与 RGCs 凋亡的调控,TNF- α 是其可能的下游靶基因之一,RIR 24 h 前是重要的干预时机。深入研究 miR-181a 及其靶向基因有助于探索新的神经保护治疗靶点。

【关键词】 视网膜缺血-再灌注; 视网膜神经节细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 微小 RNA-181a

A pilot study on the relationship between miR-181a and RGCs in retinal ischemia-reperfusion injury model

Liu Jinnan, He Yu, Zhang Junjun, Fan Wei. Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Chengdu, Chongqing Medical University, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610031, China
Corresponding author: Fan Wei, Email: fanwei55@yahoo.com

[Abstract] **Background** Retinal ischemia-reperfusion (RIR) injury is a common pathologic change. Its mechanism has not been identified. **Objective** This study was to investigate the relationship of microRNA-181a (miR-181a), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and retinal ganglial cells (RGCs) in RIR injury. **Methods** RIR models were induced in 68 rats, then the rats were randomly divided into control group and RIR groups, including 0 hour group, 24-hour group and 72-hour group by random number table. Predicted target gene TNF- α was chosen, according to MiRanda, TargetsCan and miRBase databases. Immunofluorescent labeling, Western blot and quantitative real-time PCR were used to identify the expression levels of miR-181a, TNF- α and RGCs. Immunofluorescent labeling of RGCs in retinal flat mounts was analyzed for RGCs counts. **Results** Compared with the control group, RGCs density was obviously decreased in 24-hour and 72-hour RIR groups ($P < 0.001$). The expression level of miR-181a significantly decreased with reperfusion time in the RIR groups ($P < 0.05$). Furthermore, the expression level of miR-181a was positively correlated with RGCs numbers ($r = 0.995, P = 0.005$). TNF- α and miR-181a were mainly located in inner layers of retina. As opposed to the changes in RGCs numbers and miR-181a expression, TNF- α in 24-hour group was obviously higher than that of the 0-hour group, though there was no statistical significance in overall correlation analysis. **Conclusions** In RIR, miR-181a may be involved in regulating RGCs apoptosis. TNF- α may be a target gene of miR-181a. Interventions within 24 hours after reperfusion might be critical. Further study of miR-181a may help to explore new molecular targets for neuroprotection treatment.

[Key words] Retinal ischemia-reperfusion; Retinal ganglion cells; Tumor necrosis factor- α ; microRNA-181a

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.006

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070742/H1205); 四川省科技厅国际合作项目(2010HH0030)

作者单位: 610031 成都, 成都市第三人民医院眼科 重庆医科大学附属成都第二临床学院(刘巾男); 601141 成都, 四川大学华西医院西藏成办分院眼科(何宇); 610041 成都, 四川大学华西临床医学院眼科 四川大学华西医院(张军军、范玮)

通信作者: 范玮, Email: fanwei55@yahoo.com

视网膜缺血-再灌注 (retinal ischemia-reperfusion, RIR) 损伤是眼科较为常见的病理改变之一,可发生于高眼压、影响视网膜血流量眼科手术操作^[1]、糖尿病视网膜病变以及视网膜动静脉阻塞^[2]等多种疾病中。RIR 可导致严重的视功能损害,但其损伤机制仍有待进一步研究。视网膜神经节细胞 (retinal ganglial cells, RGCs) 凋亡是 RIR 损伤的主要表现^[3],受多种因子共同调节。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种重要的细胞因子,可促进神经元凋亡^[4]。早期研究表明, TNF- α 在视网膜瞬间缺血重新灌注前后含量明显改变^[5],但其确切机制尚未明确。MiRanda、Targetscan 和 miRBase 三大靶基因数据库提示, TNF- α 是 miR-181a 的预测靶点之一。因此,本研究中通过分析 RGCs 计数、微小 RNA-181a (microRNA-181a, miR-181a) 及其潜在下游靶基因 TNF- α 之间的关系,探讨 miR-181a 与 RGCs 之间的关系及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 68 只,体质量 200 ~ 220 g,由华西临床医学院实验动物中心提供。均取左眼为实验眼,采用随机数字表法将大鼠随机分为对照组、造模后即刻组、造模后 24 h 组及造模后 72 h 组,每组 17 只。本研究经四川大学动物实验伦理委员会批准,实验动物的使用及喂养遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 羊抗大鼠 Brn3 多克隆一抗 (德国 Santa Cruz 公司);兔抗大鼠 TNF- α 多克隆一抗 (美国 Abcam 公司);小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆一抗 (北京中杉金桥公司);驴抗羊 IgG-488 二抗、驴抗兔 IgG-568 二抗、山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗 (美国 Invitrogen 公司);2 倍 PCR master mix 试剂盒 (美国 Arraystar 公司);DAB 显色液 (美国 MILLIPORE 公司)。ViiA 7 定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司);Axio Imager Z2 正置荧光显微镜 (德国蔡司公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 RIR 模型的建立 参照文献^[2]的方法建立高眼压大鼠模型,各造模组大鼠左眼前房穿刺,将生理盐水的灌注瓶置于距眼球上方 200 cm 处行前房灌注,对照组大鼠行左眼前房穿刺后将灌注瓶置于与眼球水平处进行前房灌注,均灌注 60 min。

1.2.2 免疫荧光染色法行大鼠 RGCs 计数 各组任

意选取 4 只 SD 大鼠,分别于造模后相应时间点摘取左眼,行角膜穿刺后于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 1 h,后去除角膜、晶状体和玻璃体后,取出完整眼杯,在上方、下方、鼻侧、颞侧分别做一放射状切口,完整剥取视网膜,行视网膜铺片,置于 PBST (PBS+体积分数 0.5% Triton X-100) 中, -80 °C 静置 15 min, PBST 漂洗,驴血清封闭 1 h 后加入羊抗大鼠 Brn3 多克隆抗体 (1:100), 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入相应 IgG-488 二抗 (1:300) 于室温下避光孵育 2 h, PBS 漂洗后封片, 荧光显微镜下观察, 可见从视盘往周边沿视神经放射状分布的荧光染色细胞记为 RGCs。参照文献^[6]的方法, 分别在视网膜 4 个象限的中央区距盘沿 1、2、3 mm 处取 0.04 mm² 的正方形区域进行 RGCs 计数, 即每个视网膜选取 12 个区域, 由 3 名研究者计数, 取其平均值, 计算 RGCs 密度 (平均 RGCs 数目/0.04 mm²×25)。

1.2.3 Western blot 法检测大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白的表达 分别于造模后相应时间点任意选取各组 4 只大鼠, 视网膜分离方法同 1.2.2, 分别提取总蛋白并行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至 PVDF 膜, 以 1:500 浓度稀释 TNF- α 多克隆一抗、1:1 000 浓度稀释 β -actin 单克隆一抗, 4 °C 孵育过夜, 以 1:3 000 稀释山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记二抗、1:1 000 稀释山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗, 37 °C 孵育 1 h。以 β -actin 为内参, DAB 显色, 用 Quantity One 软件处理图片, 观察各组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白的相对表达情况。

1.2.4 免疫荧光染色法检测大鼠视网膜中 Brn3 和 TNF- α 的表达 各组任意取 1 只 SD 大鼠, 制备冰冻切片标本, 室温下复温 15 min, 用枸橼酸钠 (1:100) 行抗原修复, PBST 漂洗后, 常温下驴血清封闭 1 h, 加入羊抗大鼠 Brn3 一抗 (1:50) 及兔抗大鼠 TNF- α 一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜。次日 PBST 漂洗后分别加入驴抗羊 IgG-488 二抗及驴抗兔 IgG-568 二抗 (均为 1:300) 孵育 1 h, DAPI 染色, PBST 漂洗, 甘油封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 miR-181a 和 TNF- α mRNA 的相对表达量 各组任意选取 8 只大鼠, 采用 Trizol 法提取视网膜总 RNA。用 Primer 5.0 设计引物序列, U6 上游引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3', 下游引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGT CAT-3'; miR-181a 上游引物: 5'-GGGAACATTCAACG CTGTCG-3', 下游引物: 5'-CAGTCCGTGTCGTGGAGT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGAAAGCTGTGGCGTGAT-3', 下游引物: 5'-AAGGTGGAAGAATGGGAGTT-3';

TNF 上游引物:5'-GTCGTAGCAAACCACCAAGC-3', 下游引物:5'-CTCCTGGTATGAAATGGCAA-3'。以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算大鼠视网膜中 miR-181a 的相对表达量;以 GAPDH 作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算大鼠视网膜中 TNF- α 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,采用 Graphpad Prism 5 软件作图。采取完全随机分组单因素干预四水平实验设计,对照组、造模后即刻组、造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 RGCs 平均密度、TNF- α mRNA 相对表达量、miR-181a 表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。miR-181a 与 RGCs 平均密度、TNF- α mRNA 相对表达量之间的关系分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 RIR 造模情况

造模时可见大鼠角膜逐渐水肿、混浊,间接检眼镜下可见血流中断,视网膜苍白,拔出穿刺针头后可见大鼠眼底红润,视网膜血供重新恢复。

2.2 各组大鼠视网膜中 RGCs 的平均密度

对照组、造模后即刻组、造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 RGCs 平均密度分别为 $(2\ 031 \pm 330)$ 、 $(1\ 845 \pm 184)$ 、 $(1\ 514 \pm 270)$ 和 $(1\ 527 \pm 176)$ 个/ mm^2 ,4 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 12.374, P < 0.001$),与对照组相比,造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 RGCs 计数明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)(图 1,2)。

2.3 各组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白相对表达量

对照组、造模后即刻组、造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白的相对表达量分别为 1.00 ± 0.21 、 0.74 ± 0.22 、 1.20 ± 0.28 和 1.05 ± 0.22 ,总体比较差异无统计学意义 ($F = 0.300, P = 0.825$)(图 3)。

2.4 各组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白的表达定位

视网膜冰冻切片显示,TNF- α 主要在视网膜内层表达,包括视网膜神经纤维层、RGCs 层(围绕在 Brn3 标记的 RGCs 及 DAPI 标记的细胞核周围)和内丛状层、内核层及外丛状层(图 4)。

2.5 各组大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 的相对表达量

对照组大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 的相对表达量为 1,造模后随着 RIR 时间的延长,大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 的相对表达量逐渐下降,对照组、造

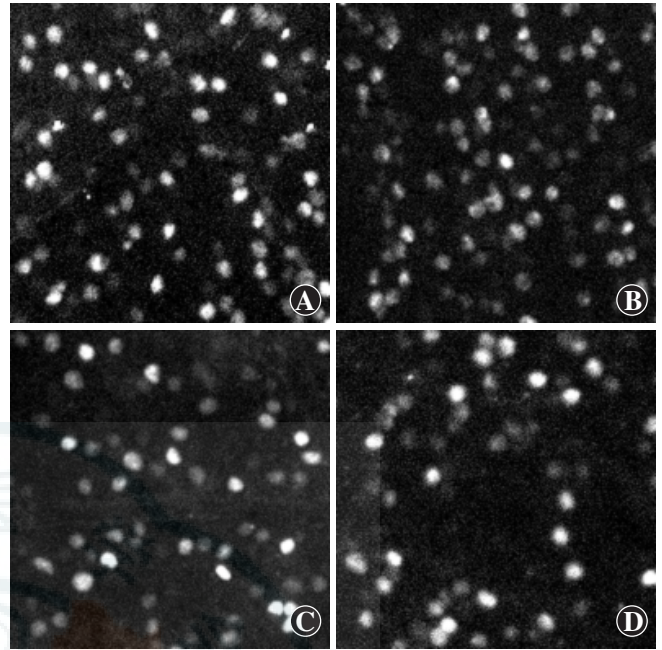


图 1 各组视网膜铺片 Brn3 免疫荧光染色 ($\times 400$) A:对照组大鼠视网膜中 RGCs 数目较多 B:造模后即刻组大鼠视网膜中 RGCs 数目与对照组比较稍减少 C:造模后 24 h 组大鼠视网膜中 RGCs 较对照组减少 D:造模后 72 h 组大鼠视网膜中 RGCs 与对照组比较明显减少

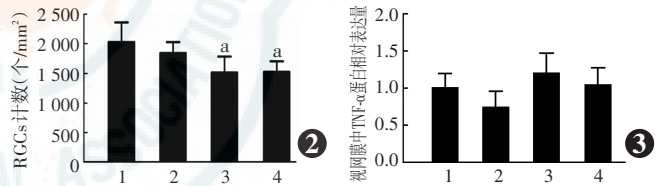


图 2 各组视网膜 RGCs 平均密度的量化比较 $F = 12.374, P < 0.001$. 与对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 4$) 1:对照组 2:造模后即刻组 3:造模后 24 h 组 4:造模后 72 h 组 RGCs:视网膜神经节细胞 图 3 各组大鼠视网膜中 TNF- α 蛋白相对表达量的比较 $F = 0.300, P = 0.825$ (单因素方差分析) 1:对照组 2:造模后即刻组 3:造模后 24 h 组 4:造模后 72 h 组 TNF:肿瘤坏死因子

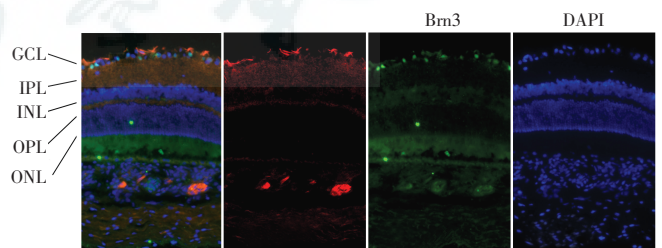


图 4 免疫荧光染色法检测造模后大鼠视网膜中 TNF- α 表达的定位 ($\times 400$) TNF- α 表达呈红色荧光,主要表达于 RGCs 层和视网膜内层 GCL:视网膜神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;TNF:肿瘤坏死因子;DAPI:二脒基苯基吡啶

模后即刻组、造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 相对表达量的总体比较差异有统计学意义 ($F = 56.215, P < 0.001$),与对照组比较,造模后即刻组大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 相对表达

量下降约 11.7% ($P=0.014$), 造模后 24 h 组下降约 38.7%, 造模后 72 h 组下降约 43.3%, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(表 1)。

表 1 各组视网膜中 miR-181a mRNA 相对表达量

组别	样本量	Ct[(miR-181a)-U6] 均值	miR-181a mRNA ($\bar{x}\pm s$)
对照组	4	3.534	1.010±0.066
造模后即刻组	4	3.723	0.883±0.032 ^a
造模后 24 h 组	4	4.257	0.613±0.064 ^b
造模后 72 h 组	4	4.376	0.567±0.015 ^b
<i>F</i>			56.215
<i>P</i>			<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miR-181a:微小 RNA-181a

2.6 各组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 的相对表达量

对照组、造模后即刻组、造模后 24 h 组和造模后 72 h 组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 的相对表达量分别为 3.00 ± 0.16 、 3.63 ± 0.33 、 2.74 ± 0.30 和 3.35 ± 1.00 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=7.931$, $P=0.009$), 与对照组比较, 造模后即刻组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P=0.012$), 而造模后 24 h 组和造模后 72 h 组与对照组比较差异均无统计学意义 ($P=0.220$ 、 0.111); 造模后 24 h 组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 相对表达量较造模后即刻组明显下降, 差异有统计学意义 ($P=0.002$); 造模后 72 h 组与造模后 24 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)(图 5)。

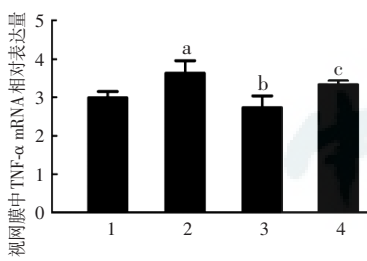


图 5 各组大鼠视网膜中 TNF-α mRNA 相对表达量的比较 (原始数据取对数后) $F=7.931$, $P=0.009$. 与对照组比较,^a $P<0.05$;与造模后即刻组比较,^b $P<0.01$;与造模后 24 h 组

比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n=8$) 1:对照组 2:造模后即刻组 3:造模后 24 h 组 4:造模后 72 h 组 TNF:肿瘤坏死因子

2.7 各造模组大鼠视网膜 miR-181a mRNA 相对表达量与 RGCs 平均密度、TNF-α 相对表达量之间的关系

各造模组大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 的表达量与 RGCs 平均密度之间呈明显正相关($r=0.995$, $P=0.005$); 大鼠视网膜中 miR-181a mRNA 相对表达量与 TNF-α 相对表达量之间无明显相关性 ($r=-0.281$, $P=0.376$)(图 6), 但造模后即刻组和造模后 24 h 组大鼠视网膜中 TNF-α 表达明显升高, 与 miR-181a mRNA 表

达和 RGCs 的变化趋势相反。

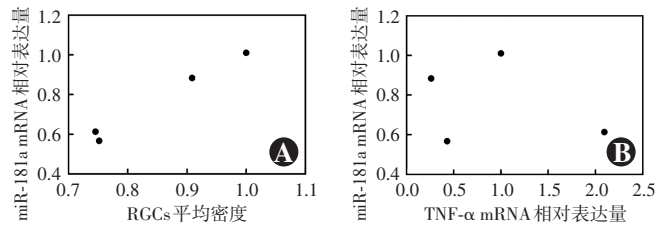


图 6 各造模组大鼠视网膜组织中 miR-181a mRNA 相对表达量与 RGCs 平均密度、TNF-α mRNA 之间的相关性 (Pearson 相关分析, $n=4$) A: miR-181a mRNA 与 RGCs 平均密度呈正相关 ($r=0.995$, $P=0.005$) B: miR-181a mRNA 相对表达量与 TNF-α mRNA 相对表达量间无相关性 ($r=-0.281$, $P=0.376$) RGC: 视网膜节细胞; TNF: 肿瘤坏死因子; miR-181a: 微小 RNA-181a

3 讨论

MiR-181 在进化中极其保守, 在小鼠胸腺、脑、肺脏等器官中呈高表达^[7]。miR-181a 是其成员之一, 主要参与细胞凋亡、分化等多个生理过程, 同时在血液系统、消化系统、神经系统、乳腺及眼部等多个系统中参与器官免疫、炎症、肿瘤及组织发育等生理和病理活动^[8-12]。

在大脑缺血模型中, miR-181a 表达上调, 参与调控多条细胞死亡/存活途径, 抑制下游靶基因 *BCL2*、*MCL1*、*GRP78* 等的表达, 加重炎症反应, 使线粒体功能减弱, 导致星形胶质细胞功能异常, 最终导致神经元的死亡^[13]。进一步研究表明, 采用 miR-181a 抑制剂治疗后可保护大脑神经胶质细胞, 大脑再灌注损伤的梗死面积明显减少^[14]。本研究中, 模型大鼠 RIR 后立即出现视网膜中 miR-181a 的表达下调, 随着再灌注时间的延长, miR-181a 的表达量进一步减少, 且 miR-181a 与 RGCs 存活数量之间呈正相关, 提示 RIR 模型中 miR-181a 可能发挥着调控 RGCs 凋亡的作用。

MiR-181a 通过调控下游靶基因发挥生物学功能。在 HeLa 细胞株和猪脂肪细胞中, miR-181a 拟似剂可降低 TNF-α 的水平, 相反 miR-181a 抑制剂可以使 TNF-α 水平升高, 研究者进一步通过生物信息学以及荧光素酶实验发现, miR-181a 可以靶向 TNF-α 的 3' 端非翻译区发挥作用, 从而确定 miR-181a 靶向 TNF-α 的作用^[15]。Rio 等^[16]证实, 在造血祖细胞中, TNF-α 也是 miR-181c 的下游靶基因。因此本研究中选择 TNF-α 作为研究对象。

TNF-α 诱导 RGCs 凋亡的途径主要包括 2 个方面: 一是直接作用, 即 TNF-α 的神经毒性作用直接影响 RGCs 及其轴突, 导致细胞凋亡及轴突变性; 二是间接作用, 即 TNF-α 可通过产生多种其他细胞毒性因子

损伤 RGCs, 包括诱导 NO, 调控离子通道、激活基质金属蛋白酶、促进内皮因子-1 的合成、加速淀粉样 β 蛋白神经毒性以及参与天然免疫和获得性免疫应答等^[17-18]。

TNF- α 有 TNF-R1 和 TNF-R2 两类受体, 在视网膜中均存在, 并且发挥双重作用, TNF- α 与 TNF-R1 结合后能释放多种促凋亡因子, 通过逐一激活 caspase-8 和 caspase-3 并产生一系列酶联反应, 直接诱导细胞凋亡或者通过线粒体途径产生活性氧簇, 造成氧化损伤, 最终导致 RGCs 凋亡^[19], 同时 caspase-3 能分解促细胞存活的蛋白激酶 Akt, 进一步促进细胞凋亡。此外, Tezel 等^[20] 研究表明, 非 caspase 依赖途径也参与了 TNF- α 的促凋亡作用, 因此 TNF-R1 主要参与细胞凋亡的介导。相反, TNF- α 与 TNF-R2 结合后可以通过磷脂酰肌醇 3 激酶途径激活蛋白激酶 Akt, 使促凋亡蛋白失活^[21-22], 从而起到保护细胞的作用, 此外, TNF-R2 还能激活核转录因子- κ B^[23], 从而促进细胞增生, 抑制细胞凋亡^[24], 并且各条通路之间亦存在复杂的相互作用。因此, RGCs 能否存活主要取决于以上各种作用之间的平衡。

在本研究中, 大鼠 RIR 模型视网膜中 TNF- α 的表达具有时间依赖性, RIR 即刻至 24 h 视网膜中 TNF- α 表达达峰值, 此后 TNF- α 表达明显降低, 可能与视网膜中存活的 RGCs 数量明显减少, TNF- α 合成降低有关, 也可能是 RIR 损伤后期激活抑制 TNF- α 的其他上游基因所致。在 RIR 损伤中, TNF- α 作用机制复杂, 可能不仅仅发挥促凋亡作用。在疾病早期, 小胶质细胞可能起着稳定组织的作用, 而随着高血压损害的加重, 包括 TNF- α 及其受体在内的多种蛋白表达增加, 小胶质细胞的损害作用更加明显^[25]。Berger 等^[26] 研究发现, 在大鼠 RIR 48 h 时注入重组 TNF- α 会明显加重视网膜的损害, 但 RIR 2 h 时却没有发现视网膜功能恶化。这些结果有待大样本量研究加以验证。

在视网膜中, 原位杂交技术显示 miR-181a 主要分布于 RGCs 和内丛状层中, 与 TNF- α 的分布重叠^[27-28]。在本研究中, 与对照组相比, 造模后 24 h 组大鼠视网膜 miR-181a 表达下调, TNF- α 变化上调, 变化趋势相反, 而在造模后即刻组和造模后 72 h 组中, 当 miR-181a 表达水平下调时, TNF- α 的表达未出现上调, 前者可能是因为 miR-181a 从表达上调到 TNF- α 表达抑制的作用过程有一定时间差, 后者可能是因为在此期 RIR 损伤中存在其他的通路共同影响 TNF- α 的表达; 总体分析显示, TNF- α 与 miR-181a 无明显负相关性, 但尚不能否认两者间存在靶向关系。此外, 由

于造模后 24 h 组中 RGCs 凋亡明显增加, 因此本研究推测 RIR 24 h 前是重要的干预时机。如果能通过 miR-181a 拟似剂降低 TNF- α 的表达, 并能有效减轻 RGCs 损伤, 这将验证我们的假设, 即 miR-181a 通过抑制其下游靶基因调控 RIR 中 RGCs 凋亡, 这需要进一步功能性研究加以证实。深入研究 miR-181a 可能有助于探寻新的视神经保护治疗靶点。

参考文献

- [1] 朱远军, 金敏. 视网膜缺血再灌注损伤机制研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1): 195-200.
- [2] 王浩, 刘索新, 鞠学红. 视网膜缺血再灌注模型的建立与观察研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(10): 1902-1903. doi: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.23.
- [3] 胡世兴, 王萧. 缺血再灌注损伤诱导大鼠视网膜细胞凋亡[J]. 中华眼底病杂志, 2002, 18(4): 296-298.
- [4] Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces cFOS and strongly potentiates glutamate-mediated cell death in the rat spinal cord[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(4): 590-599. doi: 10.1006/nbdi.2001.0414.
- [5] 周跃华, 李志辉, 孙葆忱, 等. 白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子在视网膜瞬间缺血重新灌注前后的定量分析[J]. 眼科研究, 2000, 18(5): 395-397.
- [6] Biermann J, Lagrèze WA, Dimitriu C, et al. Preconditioning with inhalative carbon monoxide protects rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3784-3791. doi: 10.1167/iovs.09-4894.
- [7] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303(5654): 83-86. doi: 10.1126/science.1091903.
- [8] Xie W, Li M, Xu N, et al. MiR-181a regulates inflammation responses in monocytes and macrophages[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(3): e58639 [2015-06-04]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058639. doi: 10.1371/journal.pone.0058639.
- [9] Brockhausen J, Tay SS, Grzelak CA, et al. miR-181a mediates TGF- β induced hepatocyte EMT and is dysregulated in cirrhosis and hepatocellular cancer[J]. Liver Int, 2015, 35(1): 240-253. doi: 10.1111/liv.12517.
- [10] Saba R, Störchel PH, Aksoy-Aksel A, et al. Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(3): 619-632. doi: 10.1128/MCB.05896-11.
- [11] Oliveras-Ferraro C, Cufí S, Vazquez-Martin A, et al. Micro(mi) RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin; induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGF β -induced oncomiR miRNA-181a[J]. Cell Cycle, 2011, 10(7): 1144-1151.
- [12] Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity[J]. Mol Vis, 2006, 17(12): 1175-1184.
- [13] Ouyang YB, Xu L, Yue S, et al. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia; importance of microRNAs[J]. Neurosci Lett, 2014, 565: 53-58. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.015.
- [14] Ouyang YB, Xu L, Yue S, et al. miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo[J]. Neurobiol Dis, 2012, 45(1): 555-563. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.012.
- [15] Li H, Chen X, Guan L, et al. MiRNA-181a regulates adipogenesis by

- targeting tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the porcine model [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (10) : e71568 [2015-07-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071568>. doi:10.1371/journal.pone.0071568.
- [16] Rio P, Agirre X, Garate L, et al. Downregulated expression of hsa-miR-181c in Fanconi anemia patients; implications in TNF α regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 2012, 119 (13) : 3042-3049. doi:10.1182/blood-2011-01-331017.
- [17] Agarwal R, Agarwal P. Glaucomatous neurodegeneration; an eye on tumor necrosis factor-alpha [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2012, 60 (4) : 255-261. doi:10.4103/0301-4738.98700.
- [18] Tezel G. TNF- α signaling in glaucomatous neurodegeneration [J]. *Prog Brain Res*, 2008, 173 : 409-421. doi:10.1016/S0079-6123(08)01128-X.
- [19] Smith L, Smith JB. Lack of constitutive activity of the free kinase domain of protein kinase C zeta. Dependence on transphosphorylation of the activation loop [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (48) : 45866-45873. doi:10.1074/jbc.M206420200.
- [20] Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (11) : 4049-4059. doi:10.1167/iovs.04-0490.
- [21] Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, et al. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia; opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2 [J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (7) : 1-7.
- [22] del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt [J]. *Science*, 1997, 278 (5338) : 687-689. doi:10.1126/science.278.5338.687.
- [23] Rothe M, Sharma V, Dixit VM, et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40 [J]. *Science*, 1995, 269 (5229) : 1424-1427. doi:10.1126/science.7544915.
- [24] Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9 (2) : 240-246.
- [25] Yuan L, Neufeld AH. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 64 (5) : 523-532.
- [26] Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, et al. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (8) : 3605-3610. doi:10.1167/iovs.07-0817.
- [27] Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity [J]. *Mol Vis*, 2006, 12 (17) : 1175-1184.
- [28] Tezel G, Li LY, Patil RV, et al. NF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42 (8) : 1787-1794.

(收稿日期:2015-08-23)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊和 CSCD 核心期刊,月刊,96 面,每月 10 日出版,每期定价 16 元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-65580157。

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括背景 (Background)、目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusions) 5 个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行的研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文题名(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册 (Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明 (Consolidated Standards of Reporting Trials) (<http://www.consort-standart.org/home>)。

(本刊编辑部)