

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.08.006

miR-135a-5p 通过调控 Bcl-2/Bax 通路对青光眼视网膜神经节细胞凋亡的作用机制^{*}

谢九冰,杨杉杉[△],陈喜月,岳向东
(河北省唐山市眼科医院青光眼科 063000)

[摘要] **目的** 探讨 miR-135a-5p 与 Bcl-2/Bax 间的关系及其对青光眼视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡的作用和机制。**方法** 建立 BALB/C 小鼠青光眼模型,检测眼压和视网膜 RGCs 数量及 miR-135a-5p 表达。实验用 RGCs 细胞分为 miR-135a-5p 组、空白组、miR-135a-5p 抑制组,miR-135a-5p 组转染 miR-135a-5p mimic,空白组转染无意义序列 miRNA-NC,miR-135a-5p 抑制组转染 si-miR-135a-5p。qRT-PCR 检测 miR-135a-5p 表达水平,流式细胞术检测各组 RGCs 细胞凋亡率,CCK-8 检测各组 RGCs 细胞活性,Western blot 测定各组 RGCs 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 随着小鼠青光眼模型作用时间增加,小鼠视网膜内 miR-135a-5p 表达逐渐降低,RGCs 活细胞数量逐渐降低($P<0.05$);miR-135a-5p 组 miR-135a-5p 表达水平及 RGCs 活性均高于空白组,空白组高于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$);miR-135a-5p 组 RGCs Bcl-2 蛋白表达高于空白组,空白组高于 miR-93-5p 抑制剂组($P<0.05$);miR-135a-5p 组 RGCs Bax 蛋白表达水平低于空白组,空白组低于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$);miR-135a-5p 组 RGCs 凋亡率低于空白组,空白组低于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$)。**结论** miR-135a-5p 在青光眼 RGCs 中呈低表达,miR-135a-5p 高表达能降低青光眼 RGCs 的凋亡,其机制可能是通过调控 miR-135a-5p/Bcl-2/Bax 轴实现。

[关键词] 青光眼;神经节细胞;miR-135a-5p;Bcl-2;Bax;细胞凋亡
[中图法分类号] R775 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)08-1290-07

Mechanism of miR-135a-5p on apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma by regulating Bcl-2/Bax pathway^{*}

XIE Jiubing,YANG Shanshan[△],CHEN Xiyue,YUE Xiangdong

(Department of Glaucoma,Tangshan Eye Hospital,Tangshan,Hebei 063000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between miR-135a-5p and Bcl-2/Bax and its effect and mechanism of miR-135a-5p on apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) in glaucoma. **Methods** Glaucoma in BALB/C rats' models were established, and the intraocular pressure, RGCs quantity and miR-135a-5p expression level were measured. RGCs cells were divided into the miR-135a-5p group, the blank group and the miR-135a-5p inhibition group. The miR-135a-5p group was transfected with miR-135a-5p mimic, the blank group was transfected with meaningless sequence (miRNA-NC), and the miR-135a-5p inhibition group was transfected with si-miR-135a-5p. The expression level of miR-135a-5p was detected by qRT-PCR, the apoptosis rate of RGCs cells in each group was detected by flow cytometry, CCK-8 was used to detect the cell activity, and Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax protein in RGCs. **Results** The expression level of miR-135a-5p gradually decreased and the number in living cells decreased with the increase of the time of glaucoma in rats' models ($P<0.05$). The expression of miR-135a-5p and the amount of RGCs in the miR-135a-5p group were higher than those in the blank group, and those in the blank group were higher than those in the miR-135a-5p inhibitor group ($P<0.05$). The expression of Bcl-2 protein in RGCs in the miR-135a-5p group was higher than that in the blank group, and that in the blank group was higher than that in the miR-93-5p inhibitor group ($P<0.05$). The expression of Bax protein in the miR-135a-5p group was lower than that in the blank group, and that in the blank group was lower than that in the miR-135a-5p inhibitor group ($P<0.05$). The apoptosis rate of RGCs in the miR-135a-5p group was lower than that in the blank group, and that in the blank group was lower than that in the miR-135a-5p inhibitor group ($P<0.05$). **Conclusion** The

^{*} 基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20201548)。 作者简介:谢九冰(1975—),副主任医师,本科,主要从事青光眼专业相关疾病研究。 [△] 通信作者,E-mail: xiejiub555@sina.com。

expression of miR-135a-5p is decreased in RGCs of glaucoma, and the high expression of miR-135a-5pp can reduce the apoptosis of RGCs of glaucoma, which may be realized by regulating miR-135a-5p/Bcl-2/Bax axis.

[Key words] glaucoma; ganglion cells; miR-135a-5p; Bcl-2; Bax; apoptosis

青光眼是当今世界范围内的主要致盲性眼病之一,主要表现为视神经生理凹陷扩大、视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)进行性缺损,其中 RGCs 凋亡和视神经纤维丢失是青光眼致盲的病理基础^[1-2]。研究认为,眼压升高是青光眼的主要致病因素,临床治疗以降眼压为主,青光眼致病原因复杂,除与高血压有关外,单纯降眼压不能完全阻止青光眼病情发展。有研究认为 RGCs 凋亡与青光眼的发病有密切关系,研究影响青光眼发病过程中的 RGCs 凋亡特点成为新的方向^[3]。RGCs 凋亡受多种因素影响,已经证实与营养因子中断、血液供应异常、谷氨酸及一氧化氮增多、基因突变等因素有关^[4]。研究表明微 RNA(microRNA, miRNAs)对轴突生长具有较强的影响,miRNAs 的表达在神经系统损伤后发生变化^[5]。miR-135 家族成员如 miR-135a、miR-135b、miR-135s 的表达在特定类型的细胞中通过不同方式影响细胞增殖、分化和形成。研究证实 miR-135a 和 miR-135b 在体内和体外均能刺激雄性和雌性小鼠轴突生长和皮质神经元迁移,而 miR-135s 对损伤后轴突再生具有一定影响^[6]。玻璃体内应用 miR-135s 可通过抑制 Krüppel 样因子 4(KLF4)促进成年小鼠视神经损伤后 RGCs 轴突再生,相反,miR-135s 的缺失降低了 RGCs 轴突的再生^[7-8]。miR-135a-5p 被证明是转化生长因子- β 受体 I (transforming growth factor- β I, TGFBR1)/转化生长因子- β 激活激酶 1 (TGF- β activated kinase-1, TAK1) 通路的关键调节因子,乙醇诱导的 miR-135a 下调可能通过上调 Siah1 和激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/p53 通路而致使神经嵴细胞(NCCs)凋亡^[9]。但 miR-135a-5p 对青光眼 RGCs 是否也有影响还不清楚。本研究将重点探究 miR-135a-5p 对青光眼 RGCs 凋亡的影响机制,希望为治疗青光眼提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器

BALB/C 雄性小鼠购自北京永欣康泰科技发展有限公司,实验用 RGCs 购自上海斯信生物科技有限公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自北京天恩泽生物技术有限公司;重组腺病毒 miR-135a-5p 模拟物、重组腺病毒 miR-135a-5p 抑制物、重组腺病毒空白载体购自上海博邦医药科技有限公司;LipofectamineTM2000、miRNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测试剂盒及兔抗鼠 Bcl-2、Bax 蛋白多克隆抗体、Cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自北京百奥莱博科技有限公司,CKK-8 细胞计数及细胞凋亡相关试剂盒购自上海碧云天生物公司,流式细胞仪和基因扩增仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 青光眼 RGCs 模型建立

选取 60 只小鼠,将小鼠随机分为对照组 20 只、模型 1 组 20 只、模型 2 组 20 只。对照组小鼠不做任何处理,模型 1、2 组小鼠采用 532 nm 氩激光光凝小鼠小梁网组织建立小鼠青光眼模型^[7]:采用 5 mg/kg 甲苯噻嗪混合液和 80 mg/kg 盐酸氯胺酮行腹腔内注射麻醉小鼠,用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼进行局部麻醉,532 nm 氩激光击射小鼠角膜缘周围的小梁网组织,光斑为 60~100 个,直径 50 μ m,激光能量为 300 mW,发射时间 0.5 s,分别于术前、术后 7、14 d 使用 TonoLab 回弹式眼压计测量眼压,分别于造模第 7 天处死模型 1 组,造模第 14 天时处死模型 2 组及对照组小鼠获取视网膜标本用于检测 RGCs 凋亡率和 miR-135a-5p 表达水平。模型 1、2 组共成功建立青光眼 RGCs 模型小鼠 36 只,每组 18 只。

1.3 荧光金逆行标记检测模型鼠视网膜中 RGCs 数量

造模前 4 d 行 RGCs 荧光金逆行标记,小鼠麻醉后固定于立体定位仪,沿颅顶正中中线切开皮肤,以后囟中心为原点前移 2 mm 并旁开 1.2 mm,用电钻凿直径约 1 mm 的骨孔,孔内缓慢注入 2% 荧光金,止血,缝合皮肤。取于造模第 14 天处死的对照组和模型 2 组小鼠,取出眼球并置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 1.5 h,于生理盐水中剥离视网膜,以视盘为中心行十字状剪开,将内层朝向盖玻片平铺视网膜,抗淬灭剂封片。用激光扫描共聚焦显微镜采集全视网膜图像,采用 Image J 软件分别计数距视盘 1~2、>2~3 和 >3~4 mm 处荧光金标记的 RGCs。计算每平方毫米面积内 RGCs 数量。

1.4 RT-qPCR 检测小鼠视网膜 miR-135a-5p 表达水平

提取建模小鼠视网膜细胞总 RNA,经反转录获得 cDNA。所有样品均重复测定 3 次。引物序列 miR-135a-5p 正向 5'-GGC AGC AAA GTT CTG AGA CAC-3',反向 5'-GTG CAG GGT CCG AGG TAT TC-3';U6 正向 5'-CTC GCG CAG CCT TGA CA-3';反向 5'-AAC TTC GGA ATT GCA CTC GT-3'。取模板 cDNA 2 μ L 进行 RT-qPCR 反应,反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环。以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-135a-5p 表达水平。

1.5 细胞转染及分组

复苏 RGCs,于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基[培养基添加青、链霉素和非必需氨基酸(1:1 000)混合液]进行培养。将细胞分为 3 组,miR-

135a-5p 组转染 miR-135a-5p mimic(序列为 5'-UAU GGC UUU UUA UUC CUA UGU GA-3'),空白组转染无意义序列 miRNA-NC(序列为 5-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'),miR-135a-5p 抑制组转染 si-miR-135a-5p(序列为 5'-GGU UGG UAG ACA UGU UAA AdTdT-3'),按照 Lipo-fectamin2000 转染说明书进行转染。

1.6 流式细胞术检测细胞周期及凋亡

取各组细胞,胰蛋白酶消化收集细胞,离心,弃上清液,重悬细胞,加入 2~3 mL 预冷的 70% 冰乙醇,吹打均匀,置 4℃ 冰箱中固定 48 h,经 1 000 r/min 离心 5 min 弃乙醇,重悬后加入碘化丙啶(PI,100 mg/L)染液,在室温条件下避光混合 30 min,采用流式细胞仪(美国 Beckman 公司),激发光源为 15 mW 氩离子激发器,激发波长 488 nm,应用 Expo3.2 ADC 分析软件进行数据分析,利用 Muticycle AV 软件对细胞周期及凋亡进行分析。

1.7 CCK-8 检测 RGCs 活性

取各组细胞,并增设 1 个不含细胞的空白组和有细胞但不转染对照组,每组设 3 个平行组,以 1.5×10³/孔细胞浓度接种细胞至 96 孔板,进行细胞转染并培养 24 h,加入 10 μL CCK-8 培养液,培养 2 h 后,用酶标仪测定各孔波长 450 nm 处的吸光(A)值,计算细胞活性,各转染组细胞活性=[转染组 A 值-空白组 A 值]/[对照组 A 值-空白组 A 值]×100%。

1.8 Western blot 测定 RGCs 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

冰上加 RPMI 裂解液裂解各组细胞,取上清液,经 BCA 法测定蛋白浓度,取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。在 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入兔抗鼠 Bcl-2、Bax、GAPDH 蛋白一抗(1:2 000),GAPDH 为参照,4℃ 孵育过夜。加入羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h。加入 ECL 发光液,凝胶成像系统检测蛋白条带,Image J 软件分析蛋白条带灰度。

1.9 EdU 检测 miR-135a-5p 对 RGCs 增殖的影响

取各组细胞接种至 12 孔板,5×10⁴/孔,48 h 后更换 10 μmol/L Edu 培养基(上海碧云天生物技术有限公司),孵育 2 h,4',6'-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染,去除培养基,PBS 清洗。严格按照产品说明书进行实验步骤操作后,荧光显微镜拍照,Edu 阳性细胞为红色代表增殖细胞数,DAPI 阳性细胞为蓝色代表细胞总数,细胞增值率=Edu 阳性细胞数/DAPI 阳性细胞数×100%。

1.10 双荧光素酶报告实验检测 miR-135a-5p 与 Bcl-2、Bax 的相互作用关系

在 http://www.targetscan.org/vert_72/ 网站对 miR-135a-5p 的靶基因进行预测,筛选出 Bcl-2 的 3' 非编码区(3' UTR)与 miR-135a-5p 存在连续互补核

苷酸序列。构建 Bcl-2-3' UTR 野生型(WT)质粒、Bcl-2-3' UTR 突变型(MUT)质粒。将 Bcl-2-3' UTR 的 WT、MUT 质粒与 miR-NC、miR-135a-5p mimics 共转染入 RGCs,分为 WT+miR-NC 组、WT+miR-135a-5p mimics 组、MUT+miR-NC 组、MUT+miR-135a-5p mimics 组,继续培养 24 h 收集细胞。按双荧光素酶活性检测试剂盒说明书步骤检测荧光素酶活性。相同方法检测 Bax。

1.11 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。计数资料以百分率(%)表示,比较采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-135a-5p 在青光眼小鼠模型 RGCs 中的表达变化

采用氩激光光凝小梁网建立青光眼小鼠模型,随着模型处理时间增加,miR-135a-5p 表达逐渐降低,RGCs 活细胞数量减少。对照组、模型 1 组、模型 2 组间 miR-135a-5p、RGCs 活细胞数量比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 miR-135a-5p 在小鼠青光眼视网膜 RGCs 中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	眼压(mm Hg)	miR-135a-5p 表达	RGCs(×10 ³ /mm ²)
对照组	11.28±1.26	2.334±0.341	2.363±0.252
模型 1 组	24.28±5.13	1.645±0.214	1.947±0.218
模型 2 组	31.27±7.26	1.157±0.186	1.345±0.176
<i>F</i>	39.271	115.884	37.239
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 各组 RGCs miR-135a-5p 的表达水平变化及其对 RGCs 活性的影响

PCR 结果表明,miR-135a-5p 组中 miR-135a-5p 高于空白组,而空白组高于 miR-135a-5p 抑制剂组(*P*<0.05)。CCK-8 实验结果表明 miR-135a-5p 组 RGCs 活性高于空白组,空白组高于 miR-135a-5p 抑制剂组(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 miR-135a-5p 对 RGCs 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-135a-5p 表达	RGCs 活性(%)
miR-135a-5p 组	6.384±0.835	69.583±6.152
空白组	2.427±0.546	46.806±4.871
miR-135a-5p 抑制剂组	0.981±0.128	31.255±4.363
<i>F</i>	254.044	227.418
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.3 miR-135a-5p 对 RGCs 凋亡率的影响

流式细胞术结果表明,与空白组[(24.647±5.924)%]比较,miR-135a-5p 组[(11.244±3.537)%]细胞凋亡率降低(*F*=67.251,*P*<0.05),miR-135a-

5p 抑制剂组 $[(31.752\pm8.068)\%]$ 细胞凋亡率增加($F=60.460,P<0.05$),见图1。

2.4 miR-135a-5p 对 RGCs 增殖的影响

EdU 实验结果表明,与空白组比较,miR-135a-5p 组细胞增殖显著增加,miR-135a-5p 抑制剂组显著降低($P<0.05$),见图2。

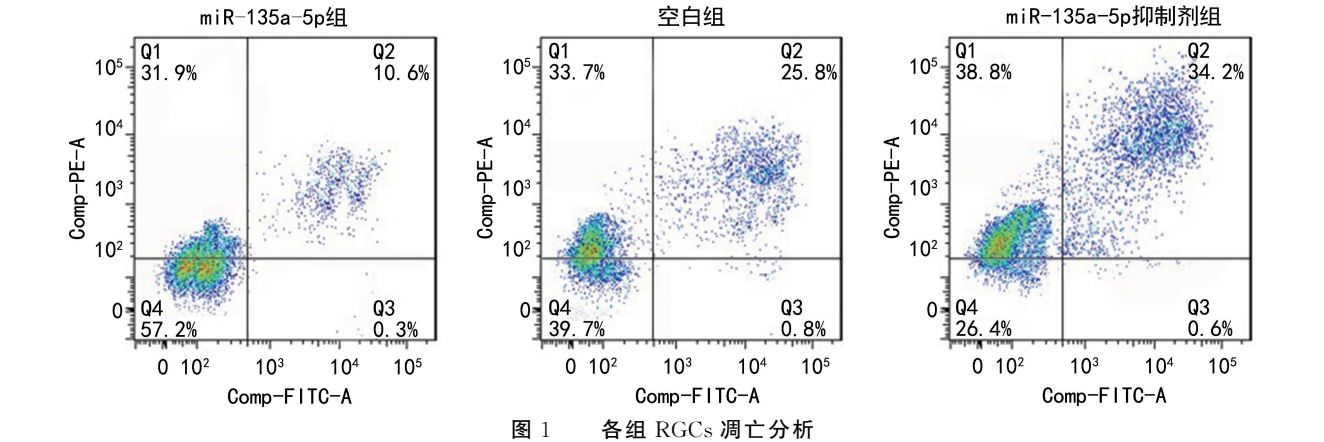
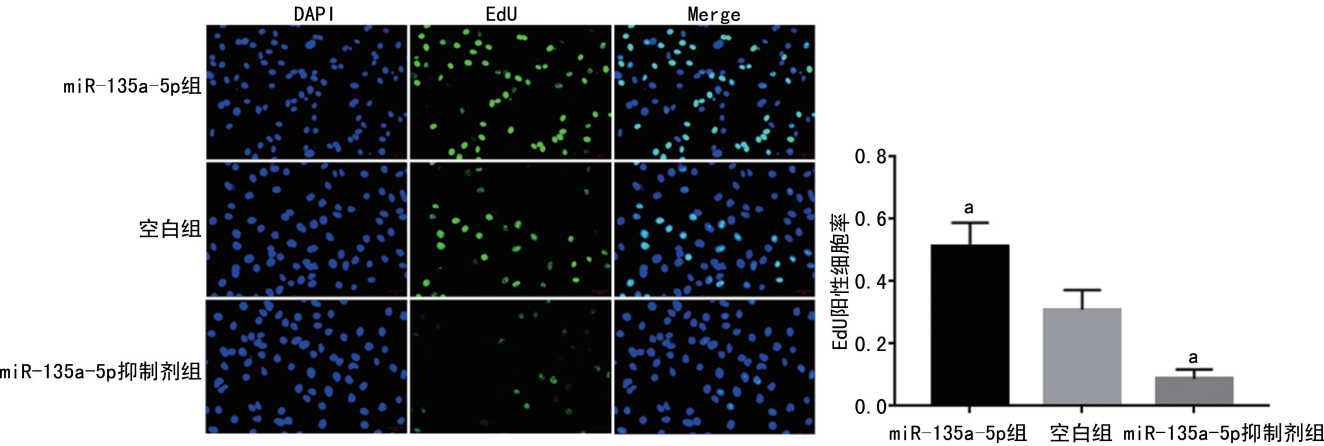


图1 各组 RGCs 凋亡分析



A:EdU 显微荧光图(100×);B:EdU 实验统计分析图;^a: $P<0.05$,与空白组比较。

图2 各组 RGCs 细胞增殖情况 (EdU)

2.5 miR-135a-5p 对 RGCs 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,miR-135a-5p 组 RGCs 中 Bcl-2 蛋白表达水平高于空白组,空白组高于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$);miR-135a-5p 组 Bax 蛋白表达水平低于空白组,空白组低于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$);miR-135a-5p 组 Bcl-2/Bax 值高于空白组,空白组高于 miR-135a-5p 抑制剂组($P<0.05$)。见图3、表3。Pearson 相关性分析显示,miR-135a-5p 表达水平与 Bcl-2 呈正相关($r=0.523,P=0.000$),与 Bax 呈负相关($r=-0.632,P<0.001$)。

表3 各组 RGCs 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
miR-135a-5p 组	0.583 ± 0.041	0.128 ± 0.042	4.363 ± 0.437
空白组	0.325 ± 0.038	0.269 ± 0.055	1.472 ± 0.329
miR-135a-5p 抑制剂组	0.146 ± 0.034	0.433 ± 0.064	0.326 ± 0.105
F	672.703	157.604	837.140
P	<0.001	0.001	<0.001

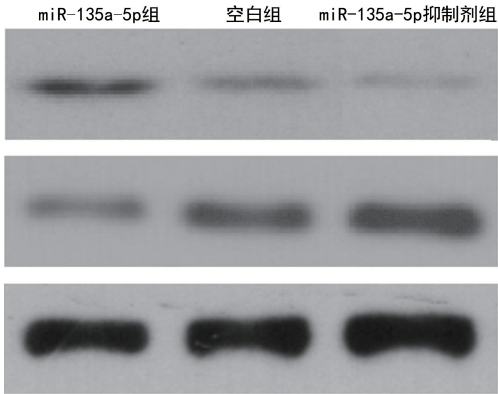
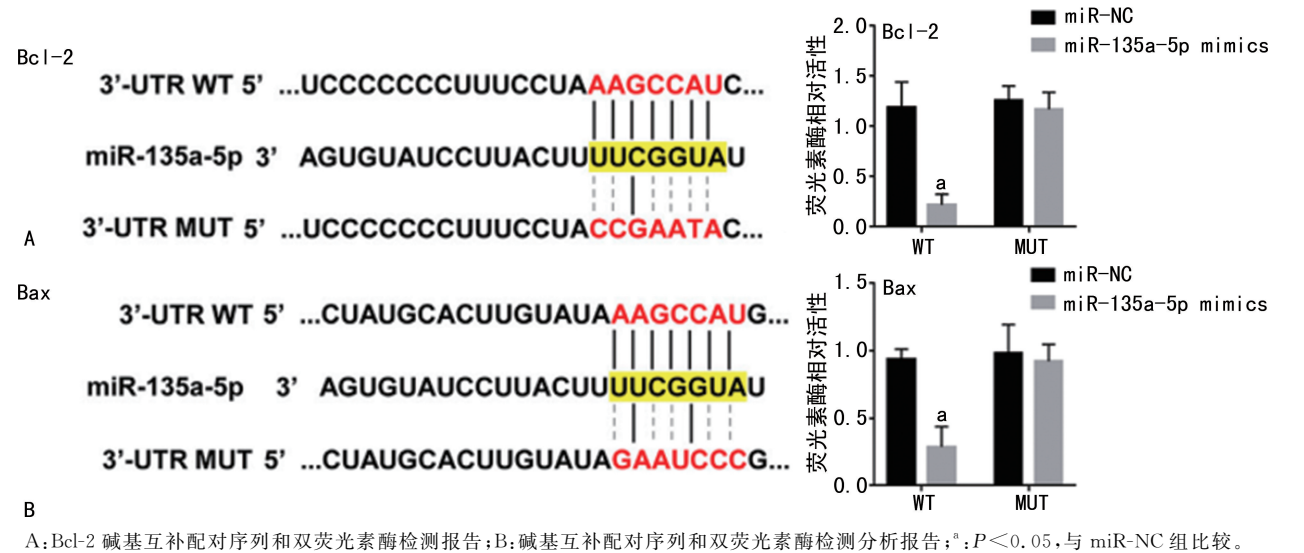


图3 RGCs 中 Bcl-2、Bax 蛋白表达

2.6 miR-135a-5p 靶向调控 Bcl-2/Bax 表达

TargetsCan 预测显示,Bcl-2、Bax 的 3' UTR 部分碱基与 miR-135a-5p 存在连续互补配对序列。双荧光素酶报告实验结果显示,Bcl-2、Bax 对应的 MUT+miR-135a-5p mimics 组与 MUT+miR-NC 组荧光素酶活性差异无统计学意义,WT+miR-135a-5p mimics 组较 WT+miR-NC 组荧光素酶活性显著降低,见图4。



A: Bcl-2 碱基互补配对序列和双荧光素酶检测报告; B: 碱基互补配对序列和双荧光素酶检测分析报告; ^a: $P < 0.05$, 与 miR-NC 组比较。

3 讨论

青光眼的共同特征是视神经的进行性退化,形态学特征可检测到 RGCs 丧失,小梁网结构损伤,视网膜神经纤维层变薄等^[10]。青光眼致病可能与免疫反应相关的多个基因或途径的变化相关,以及视神经乳头(OH)的结构和炎症变化有关。而大量证据表明,在人类和实验性青光眼模型中,RGCs 凋亡是最终的共同途径^[11],当前对于视网膜神经保护的研究集中在阻止 RGCs 凋亡的思路,如以神经保护治疗为目的的基因治疗,即通过转染腺病毒载体引入 DNA 分子转移至视网膜 RGCs 内,抑制其凋亡^[12]。因此寻找可以影响 RGCs 凋亡的靶基因是探索治疗青光眼方法的重要研究方向。

miRNA 涉及所有的生物进程,可以通过其表达变化,参与调控个体发育和细胞凋亡、增殖等活动^[13]。研究显示,人眼中 miRNA 在神经视网膜、神经膜色素上皮和脉络膜中表现出高度选择性,发挥独特功能。在常见眼部疾病如糖尿病视网膜病变、视网膜色素变性、青光眼中均有相关报道表明 miRNA 参与其中^[14]。研究发现,miRNA 在眼压波动、小梁网结构重塑、促进神经再生等青光眼发病和治疗过程中有重要的调控作用,如 miR-29b 可负向调节小梁网细胞的外基质合成,miRNA-200c 在青光眼眼压调节中发挥作用,可降低眼压^[15]。视网膜中 miR-135 水平的降低进一步降低了 RGCs 轴突的再生。在神经元细胞中 miR-135b 和 miR-135a 可发挥轴突生长和神经元迁移促进因子的作用^[16]。此外,玻璃体内应用 miR-135s 有助于成年小鼠视神经损伤后 RGCs 轴突的再生^[17]。本研究中采用氩激光光凝小梁网建立小鼠青光眼模型,随着处理作用时间增加,miR-135a-5p 表达水平逐渐降低,14 d 时 miR-135a-5p 表达水平最低,提示 miR-135a-5p 在青光眼 RGCs 中呈低表达,动物模型结果显示在处理后的 RGCs 中 miR-135a-5p 表达水平及 RGCs 凋亡率均随着模型建立时间的延长

而降低,说明青光眼可造成 miR-135a-5p 表达降低,RGCs 凋亡增加,而已有研究表明 RGCs 凋亡是青光眼的病理特征之一,并证实青光眼患者 RGCs 凋亡是增加的^[18],这与以往研究结果一致。

RGCs 凋亡是引起大部分视觉神经损伤的主要原因,因此研究青光眼环境对 RGCs 凋亡的影响很有意义^[19]。miRNAs 可参与青光眼的发病过程,多种 miRNA 如 miR-29b、miRNA-200c 已经被证实参与调控青光眼的发生发展^[20]。miR-135b 和 miR-135a 可通过抑制锌指样核转录因子 4(KLF4)促进轴突生长,来刺激中枢神经系统损伤后轴突的再生,KLF4 是 miR-135a 和 miR-135b 在神经元中的靶点^[21]。另外 KLF4 还具有调节神经元的固有轴突生长能力,视神经挤压实验表明,KLF4 的下调和 JAK-STAT3 信号的激活可显著诱导中枢神经系统环境中再生轴突的生长^[22]。本研究体外细胞实验显示 RGCs 内 miR-135a-5p 表达水平明显降低,同时 RGCs 凋亡率增加,可以推测 miR-135a-5p 可能参与了 RGCs 凋亡的调节。当 miR-135a-5p 表达水平被抑制后,RGCs 的细胞活性明显降低,增加 miR-135a-5p 表达水平后 RGCs 的细胞活性增加,提示 miR-135a-5p 可能在 RGCs 的生长过程中发挥了重要作用,通过对 RGCs 凋亡率和增殖的进一步研究显示,miR-135a-5p 抑制剂组在抑制 miR-135a-5p 后 RGCs 凋亡率较空白组增加,而在增加 miR-135a-5p 表达水平后 RGCs 凋亡率较空白组减少,同时通过 EdU 实验检测发现,miR-135a-5p 表达水平上调后,RGCs 增殖显著增加,miR-135a-5p 表达水平下调后,RGCs 增殖显著降低,说明 miR-135a-5p 在 RGCs 的凋亡中发挥抑制作用,并能促进细胞增殖。

青光眼中 RGCs 死亡机制尚不明确,但已经有较多研究证实是通过细胞凋亡途径实现的^[23]。大量研究证实凋亡相关基因 Bcl-2 可抑制细胞凋亡。线粒体 Bax 是促凋亡基因,是细胞凋亡过程的关键节点处的

单通道,是不同凋亡过程不可绕过的共有环节^[24-25]。也有研究发现正常情况下,Bcl-2 与 Bax 比值处于动态平衡,当 Bcl-2 表达高于 Bax 表达时,细胞趋向存活,反之则趋向凋亡^[26]。本研究中共双荧光素酶报告基因实验结果显示 miR-135a-5p 可靶向调控 Bcl-2、Bax 表达,抑制 miR-135a-5p 后 RGCs 中 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Bax 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2/Bax 降低,但上调 miR-135a-5p 表达后,Bcl-2、Bax 蛋白具有相反的表达情况,说明 miR-135a-5p 可影响 RGCs 内 Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平,进而对 RGCs 凋亡产生影响。提示 miR-135a-5p 可能通过调控 Bcl-2/Bax 影响 RGCs 的凋亡。

综上,miR-135a-5p 在 RGCs 中表达降低,miR-135a-5p 高表达能降低 RGCs 的凋亡,其机制可能是通过调节 Bcl-2、Bax 来实现的。因此,可通过调控 miR-135a-5p 表达实现调控青光眼 RGCs 的凋亡。这为青光眼的预防、治疗及预后分析提供理论基础。但本研究也有一定不足,本研究并未针对其机制和调控通路做深入研究,本课题组将在后续工作中继续探究。

参考文献

- [1] HAO Y,ZHOU Q,MA J,et al. MiR-146a is Upregulated during retinal pigment epithelium (rpe)/choroid aging in mice and represses IL-6 and VEGF-A expression in RPE cells[J]. J Clin Exp Ophthalmol,2016,7(3):562.
- [2] ROMANO G L,PLATANIA C B,FORTE S,et al. MicroRNA target prediction in glaucoma [J]. Progress Brain Res,2015,220:217-240.
- [3] DAI M,ZHANG Q,ZHENG Z,et al. Retinal ganglion cell-conditioned medium and surrounding pressure alters gene expression and differentiation of rat retinal progenitor cells [J]. Mol Med Rep,2018,17(5):7177-7183.
- [4] KAMEL K,O'BRIEN C J,ZHDANOV A V,et al. Reduced oxidative phosphorylation and increased glycolysis in human glaucoma lamina cribrosa cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2020,61(13):4.
- [5] GAUDET A D,MANDREKAR-COLUCCI S,HALL J C,et al. MiR-155 deletion in mice overcomes neuron-intrinsic and neuron-extrinsic barriers to spinal cord repair[J]. J Neurosci,2016,36(32):8516-8532.
- [6] HU Y W,JIANG J J,GAO Y,et al. MicroRNA-210 promotes sensory axon regeneration of adult mice in vivo and in vitro [J]. Neurosci Lett,2016,622:61-66.
- [7] LEVKOVITCHVERBIN H,QUIGLEY H A,MARTIN K,et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis,2002,43(2):402-410.
- [8] LIN L,HE Y,XI B L,et al. MiR-135a suppresses calcification in senescent VSMCs by regulating KLF4/STAT3 pathway [J]. Curr Vasc Pharmacol[J]. Curr Vasc Pharmacol,2016,14(2):211-218.
- [9] KHATRI R,SUBRAMANIAN S. MicroRNA-135b and its circuitry networks as potential therapeutic targets in colon cancer [J]. Front Oncol,2013,3:268.
- [10] ESFANDIARI H,HASSANPOUR K,KNOWLTON P,et al. Combining baerveldt implant with trabectome negates tube fenestration;a coarsened-matched comparison[J]. J Ophthalmic Vis Res,2020,15(4):509-516.
- [11] MONIRITILAKI M,BADAKHSH M,EHS AEI A,et al. The Effect of contact lens-spectacle reversed galilean telescope on the visual field of patients with open-angle glaucoma[J]. J Ophthalmic Vis Res,2020,15(4):502-508.
- [12] PERAKA R P,MURTHY S I,REDDY S,et al. Tale of two complications following phakic intraocular lens implantation:secondary glaucoma and central serous retinopathy in one eye and inverted phakic IOL with cataract in the other eye [J]. BMJ Case Rep,2020,13(10):e238300.
- [13] HAO Y,ZHOU Q B. MiR-146a is upregulated during retinal pigment epithelium (RPE)/choroid aging in mice and represses IL-6 and vegf-a expression in rpe cells[J]. J Clin Exp Ophthalmol,2016,7(3):212-214.
- [14] KARKHUR S,SONI D,SHARMA B,et al. Transitory outward pupillary curling in a case of HSV associated acute anterior uveitis: a hitherto unreported sign [J]. BMJ Case Rep,2020,13(10):e237384.
- [15] YOU L,WANG Y,GAO Y,et al. The role of microRNA-23b-5p in regulating brown adipogenesis and thermogenic program [J]. Endocr Connect,2020,9(5):457-470.
- [16] ZHANG Y K,SUN B,SUI G,et al. Serum microRNA-135a downregulation as a prognostic marker of non-small cell lung cancer [J]. Genet

- Mol Res, 2016, 15(3):25038252.
- [17] VAN BATTUM E Y, VERHAGEN M G, VAN-GOOR V R, et al. An Image-based mirna screen identifies mirna-135s as regulators of cns axon growth and regeneration by targeting krüppel-like factor 4[J]. J Neurosci, 2018, 38(3):613-630.
- [18] KARKHUR S, SONI D, SHARMA B, et al. Transitory outward pupillary curling in a case of HSV associated acute anterior uveitis: a hitherto unreported sign[J]. BMJ Case Rep, 2020, 13(10):e237384.
- [19] BRANISTEANU D C, MORARU A D, MARRANDUCA M A, et al. Intraocular pressure changes during and after silicone oil endotamponade (Review)[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6):204.
- [20] SHI H, JI Y, ZHANG D, et al. MiR-135a inhibits migration and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting KLF8 in lung cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(1):125-130.
- [21] YANG X, WANG X, NIE F, et al. MiR-135 family members mediate podocyte injury through the activation of Wnt/ β -catenin signaling[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(3):669-677.
- [22] GUO L M, DING G F, XU W C, et al. MiR-135a-5p represses proliferation of HNSCC by targeting HOXA10 [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(11):973-983.
- [23] NOMA H, YASUDA K, SHIMURA M, et al. Cytokines and pathogenesis of central retinal vein occlusion[J]. J Clin Med, 2020, 9(11):E3457.
- [24] KUMAR M, VARSHNEY A. A Suspected detached pars plana cyst in the vitreous cavity [J]. J Ophthalmic Vis Res, 2020, 15(4):579-580.
- [25] GILLMANN K, MANSOURI K. Minimally invasive surgery, implantable sensors, and personalized therapies[J]. J Ophthalmic Vis Res, 2020, 15(4):531-546.
- [26] YAO S, TIAN C, DING Y, et al. Down-regulation of Krüppel-like factor-4 by microRNA-135a-5p promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by transforming growth factor- β 1[J]. Oncotarget, 2016, 7(27):42566-42578.

(收稿日期:2021-12-16 修回日期:2022-02-05)

(上接第 1289 页)

- [24] ROMAN J A, MEDIERO A, TARDIO L, et al. The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 794:8-14.
- [25] BURR D. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of articular cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(3):20-30.
- [26] 殷松江, 张力, 徐波, 等. 基于 TRPV4 离子通道浅谈“久行伤筋, 久立伤骨”在膝骨关节炎(骨痹)中的致病作用[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12):2976-2979.
- [27] 张立智, 张世民. 软骨下骨与骨性关节炎病变的发生发展:从基础研究到临床治疗[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014, 7(4):362-368.
- [28] 马驹. 软骨下骨在 Hartley 豚鼠自发性骨性关节炎的发生与发展中属性变化的基础研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2018.
- [29] 潘其勇. 关节软骨和软骨下骨在骨关节炎中相互作用机制的初步研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2018.
- [30] 王永成, 孟昊业, 袁雪凌, 等. 兔骨软骨缺损自发性修复模型中软骨下骨重塑与软骨再生的关系 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(6):681-686.
- [31] 敖戡农, 李忠, 张成昌, 等. 关节软骨钙化层相关研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(8):722-725.

(收稿日期:2021-11-18 修回日期:2022-02-16)