

【实验研究】

赵昆 黄敏丽 王森 刘欣

Protective effects of raamycin on retinal ischemia-reperfusion injury of rats

[Key words] rapamycin; wistar rat; hypoxia-inducible factor 1 α ; retinal ischemia-reperfusion injury; cell apoptosis

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

【Abstract】 Objective To study the protective effects and its mechanism of rapa-

- and antiapoptotic effects of ZnCl_2 in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10): e46831.
- 12 吴秋欣, 毕宏生, 郭大东. 紫外线照射致晶状体上皮细胞凋亡机制的研究进展[J]. 眼科新进展, 2011, 31 (12): 1186-1189.
- 13 Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6 (6): 495-496.
- 14 何娜, 孙鸿燕, 董文斌, 李清平, 罗鹏, 卢美燕, 等. 高温相关丝氨酸蛋白酶 A2 抑制剂 I 对早产鼠高体积分数氧肺损伤的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27 (20): 1585-1588.
- 15 莫镜, 崔其亮, 姚君, 张费通, 谭小华. 重组人白细胞介素-10 对缺氧条件下人肺微血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27 (14): 1107-1110.
- 16 Park YK, Jang BC. UVB-induced anti-survival and pro-apoptotic effects on HaCaT human keratinocytes via caspase- and PKC-dependent downregulation of PKB, HIAP-1, McL^{-1} , XIAP and ER stress [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33 (3): 695-702.

【关键词】雷帕霉素;Wistar 大鼠;缺氧诱导因子 1 α ;视网膜缺血-再灌注损伤;细胞凋亡

【摘要】目的 探讨雷帕霉素对视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)的保护作用和机制。方法 75 只 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:空白对照组、实验对照组、实验组,每组 25 只。实验对照组和实验组行前房灌注建立 RIRI 模型。实验组在前房灌注前 2 h 按 2 mg · kg⁻¹ 剂量腹腔注射雷帕霉素,实验对照组大鼠腹腔注射等量的生理盐水和 DMSO。分别在再灌注后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 取 3 组视网膜标本,HE 染色法观察视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)形态及测量视网膜内层厚度;TUNEL 法检测视网膜组织中凋亡细胞的表达;Real-time PCR 检测缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) mRNA 在视网膜组织的表达水平。结果 再灌注后 0 h,实验组视网膜内层厚度为 (137.55 ± 7.76) μ m,视网膜水肿较实验对照组轻,实验对照组视网膜内层厚度为 (162.26 ± 6.41) μ m,且实验组 RGC 空泡化现象较少;再灌注 6 h 以后实验组视网膜内层厚度均较实验对照组厚(均为 $P < 0.05$)。实验组再灌注后 12 h、24 h、48 h 的细胞凋亡情况明显低于实验对照组(均为 $P < 0.05$)。再灌注后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 实验组视网膜组织中 HIF-1 α mRNA 表达水平较实验对照组降低(均为 $P < 0.05$)。结论 雷帕霉素对 RIRI 具有保护作用,HIF-1 α 表达水平的下调可能与该作用有关。

【眼科新进展,2014,34(5):409-413】

视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)是指视网膜组织缺血、缺氧后恢复血液循环所致的损伤,如视网膜中央动脉阻塞、糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变等均可导致视网膜血管的阻塞,视网膜缺血和循环障碍均可以导致视网膜的严重损伤^[1]。因此积极探索其发病机理、寻找有效的治疗方法防止视网膜缺血再灌注所导致的视神经损害具有重要意义。缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,能与靶基因结合并通过转录和转录后调控产生相应的生物学效应,使机体在缺氧时产生适应性反应,是哺乳动物和人在缺氧条件下维持氧稳态的关键性物质。大量的研究表明,HIF-1 在 RIRI 中占有重要作用^[2]。雷帕霉素是一种新型大环内酯类免疫抑制药物,在中枢神经系统疾病方面可抑制脑细胞凋亡并促进神经细胞的存活,具有明显的神经保护作用^[3]。本实验旨在采用雷帕霉素作为保护剂,通过观察 RIRI 后视网膜组织形态、检测细胞凋亡、HIF-1 α mRNA 表达情况,探讨其可能的保护作用及机理,为临床应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型及分组 广西医科大学动物中心提供的 SPF 级健康成年雄性 Wistar 大鼠 75 只,体重 200 ~ 250 g。随机分为空白对照组、实验对照组和实验组,每组 25 只大鼠。实验组在前房灌注前 2 h 腹腔注射雷帕霉素(2 mg · kg⁻¹),实验对照组给予等量 DMSO 和生理盐水腹腔注射。实验组及实验对照组根据缺血后再灌注时间的不同,又分为再灌注后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 5 个时间点。

1.1.2 主要试剂及仪器 雷帕霉素(美国 Gene Operation 公司),TUNEL 试剂盒(德国 Roche 公司),DAB 显色试剂盒(北京中衫金桥生物技术开发有限公司),光学显微镜(Olympus 公司),病理图像分析系统(德国 LEICA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RIRI 模型的建立 按 3 mL · kg⁻¹ 的剂量将

100 g · L⁻¹ 水合氯醛腹腔注射对大鼠进行全身麻醉,使用盐酸丁卡因滴眼液对角膜行表面麻醉,复方托吡卡胺滴眼液滴眼散瞳。输液器连接 4.5 号针头行右眼前房穿刺,注意不要伤及虹膜和晶状体,生理盐水瓶连接输液器,瓶内液面高度调整在 150 cm,检查穿刺口无漏水,此时眼压达到 110 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg)左右,可观察到眼底血管断流、视网膜苍白。持续 60 min 后缓慢降低输液瓶的高度,可见视网膜变红,拔出穿刺针头^[4]。

1.2.2 标本采集和处理 分别于再灌注后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 采用腹腔注射过量麻醉处死大鼠,迅速摘除眼球。每组 5 个时间点各 5 只眼球以 40 g · L⁻¹ 中性多聚甲醛固定 24 h 后,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。将包埋好的眼球标本前端以角膜中央定位,后端以视神经根定位,前后方位视网膜全层连续切片,切片厚度 4 μ m。HE 染色,倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.3 大鼠视网膜内层厚度的测量 每只眼球取 3 张切片进行分析,视网膜内层厚度(指视网膜内界膜到外网状层内缘的距离)为距视盘边缘 200 μ m 处 100 μ m 长度内随机取 4 点的平均厚度。应用美国 Image Pro plus 6.0 专业图像分析软件系统进行测定。

1.2.4 原位凋亡(TUNEL 法)的检测 常规二甲苯脱蜡;梯度酒精脱水;体积分数 3% H₂O₂ 室温封闭 10 min;蛋白酶 K 消化 10 min,TUNEL 反应液(TdT 反应液 + 标记液)50 μ L 湿盒 37℃ 孵育 60 min,转化剂-POD 混合液 50 μ L 湿盒 37℃ 孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,体积分数 1% 盐酸酒精分化,烘干,封片。普通光学显微镜下随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),计算视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)层及内核层凋亡细胞的光密度值(凋亡细胞呈棕黄色),即光密度值 = 总光密度值/总面积。

1.2.5 Real-time PCR 检测视网膜中 HIF-1 α mRNA 表达 将每组 5 个时间点 5 只眼球视网膜取下,置于装有 Trizol 试剂的 EP 管中。用超声波粉碎视网膜组织,提取视网膜中的总 RNA,用紫外分光光度计测量其浓度及纯度。取 2 μ g mRNA 逆转录为 cDNA,再行扩增。Real time PCR 反应在 LightCycler480 II 系统中进行,反应条件:95℃ 预变性 10 min;然后

进行40个循环反应(95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸20 s)。HIF-1α mRNA表达量的多少通过与内参β-actin比较来反映。β-actin上游引物:5'-GTACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3',下游引物:5'-ACCCATACCCACCATCACACC-3',扩增片段为199 bp;HIF-1α上游引物:5'-CCAGATTCAAGATCAGC-CAGCA-3',下游引物:5' GCTGTCCACATCAAAG-CAGTACTCA3',扩增片段为100 bp。

1.3 统计学处理 应用SPSS13.0进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组设计t检验进行两组之间的差异分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠视网膜组织学改变 空白对照组大鼠视网

膜层次清晰,各层细胞排列整齐密集,结构完整。实验对照组:缺血再灌注后0 h,视网膜组织水肿,其中神经纤维层与内网状层明显水肿、厚度显著增加,RGC可见空泡、变性;再灌注后6 h视网膜各层明显疏松,排列紊乱,RGC数目减少;再灌注后12 h视网膜水肿已显著减轻,神经纤维层扁平,内核层厚度变薄,RGC排列较稀疏;再灌注后24 h视网膜水肿基本消失,主要表现为RGC数目减少,细胞变性,神经纤维层明显变薄,内核层排列紊乱、轻度变薄,外核层没有明显的变化;再灌后48 h,视网膜内层变薄,可见RGC有较多的缺失。实验组再灌注后0 h视网膜水肿较实验对照组轻,视网膜内层厚度小于实验对照组;再灌后6 h、12 h、24 h、48 h实验组视网膜内层厚度均超过实验对照组,RGC排列较规整(图1)。

Figure 1 Retinal HE staining (×400). A:Experimental control group at 12 hours after reperfusion;B:Experimental group at 12 hours after reperfusion;C:Experimental control group at 24 hours after reperfusion;D:Experimental group at 24 hours after reperfusion;E:Blank control group 视网膜HE染色结果(×400)。A:再灌注后12 h实验对照组;B:再灌注后12 h实验组;C:再灌注后24 h实验对照组;D:再灌注后24 h实验组;E:空白对照组

2.2 大鼠视网膜内层厚度的比较 空白对照组大鼠视网膜内层厚度为(104.00±2.78)μm,实验对照组与实验组大鼠再灌后不同时间视网膜内层厚度的比较见表1,由表1可见:再灌后不同时间实验对照组与实验组大鼠视网膜内层厚度比较,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。

表1 实验组与实验对照组视网膜内层厚度比较
Table 1 Comparison of inner retinal layer thickness between experimental group and experimental control group ($\bar{x} \pm s, n = 5, l/\mu m$)

Group	0 hour	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours
Experimental control	162.26±6.41	73.08±4.01	71.22±1.49	65.56±1.84	75.27±2.40
Experimental	137.55±7.76	85.08±2.65	81.96±1.85	87.51±1.31	88.61±3.06
t	5.487	5.572	10.095	21.664	7.660
P	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000

2.3 TUNEL检测凋亡细胞的表达情况 空白对照组TUNEL染色未见明显阳性细胞,再灌注后0 h实验对照组与实验组视网膜凋亡细胞表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验对照组再灌注后6 h可见视网膜中出现细胞凋亡,大多位于神经节细胞层;12 h后凋亡细胞阳性表达明显增多;24 h后凋亡细胞阳性表达达顶峰,多见于神经节细胞层和内核

层;48 h后凋亡细胞阳性染色开始减少,主要见于RGC层。实验组凋亡改变出现同实验对照组有相似的趋势,再灌注12 h、24 h、48 h凋亡细胞阳性表达明显少于实验对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$;见表2、图2)。

表2 实验组与实验对照组视网膜细胞凋亡比较
Table 2 Comparison of positive expression of RGC apoptosis between experimental group and experimental control group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Group	0 hour	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours
Experiment control	0.28±0.02	0.37±0.03	0.51±0.22	0.62±0.03	0.48±0.03
Experimental	0.24±0.03	0.32±0.02	0.40±0.01	0.52±0.02	0.41±0.04
t	2.125	2.110	9.322	5.143	3.273
P	0.066	0.073	0.000	0.001	0.011

2.4 Real-time PCR测定视网膜中HIF-1α mRNA的表达 在RIRI后,HIF-1α mRNA表达迅速增加,在再灌注后12 h达到高峰,一直持续到再灌注后48 h表达量仍较高。与实验对照组相比,提前给予雷帕霉素(2 mg·kg⁻¹)能够明显抑制HIF-1α mRNA的表达,2组再灌注后0 h、6 h、12 h、24 h及48 h比较,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,见表3)。

Figure 2 Retinal TUNEL staining at 24 hours after reperfusion (×400). A: Blank control group; B: Experimental control group at 24 hours after reperfusion; C: Experimental group at 24 hours after reperfusion 大鼠再灌注后 24 h 视网膜 TUNEL 染色图像(×400)。A:空白对照组;B:实验对照组再灌注后 24 h;C:实验组再灌注后 24 h

表 3 视网膜缺血再灌注后不同时间 HIF-1α mRNA 表达变化

Table 3 Comparison of HIF-1α mRNA expression at different time points after reperfusion between experimental group and experimental control group

($\bar{x} \pm s, n = 5$)					
Group	0 hour	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours
Experimental group	0.47 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.89 ± 0.44	0.41 ± 0.02	0.26 ± 0.07
Experimental	0.29 ± 0.09	0.21 ± 0.05	0.35 ± 0.19	0.26 ± 0.03	0.11 ± 0.05
<i>t</i>	3.345	6.121	2.487	3.564	7.385
<i>P</i>	0.010	0.000	0.038	0.007	0.000

3 讨论

RIRI 可引起自由基、刺激性氨基酸毒性、细胞内钙超载等^[5],导致 RGC 及内核层细胞的凋亡。已有研究观察到升高眼压可引起大鼠 RIRI 模型中超微形态学变化,表明 RGC 层和内核层中存在细胞凋亡^[6]。本实验中我们应用 TUNEL 法观察 RIRI 细胞凋亡发生的情况,再灌注后 6 h 可见视网膜中出现细胞凋亡,大多位于 RGC 层;再灌注后 12 h 视网膜细胞凋亡开始增多,24 h 后凋亡细胞阳性表达达顶峰,多见于 RGC 层和内核层;48 h 后凋亡细胞阳性染色开始减少,主要见于 RGC 层;这与其他学者的研究结果相似^[7]。因此,抑制 RGC 的凋亡、促进 RGC 的存活是 RIRI 发生后要解决的关键问题。本实验也表明,RIRI 后大鼠 RGC 大量丢失。

HIF-1 是低氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的转录因子,HIF-1 由 HIF-1α 和 HIF-1β 两亚单位组成,HIF-1 的调节受到多种因素的影响,HIF-1 的稳定和活性主要是由 HIF-1α 决定的,且 HIF-1α 是专一受氧调节的亚基,调控着下游众多基因,其靶基因主要包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、糖酵解酶、环氧合酶(cyclooxygenasa, COX),影响细胞凋亡因子 p53 等的转录和表达^[8],HIF-1 调控的基因以不同的方式参与细胞对缺氧的适应过程,从而增加了细胞在缺氧环境下的生存能

力。视网膜细胞代谢的最大特点是耗氧量大,对缺氧特别敏感,在正常氧条件下,HIF-1α 在视网膜中表达极低。Kaur 等^[9]观察发现大鼠视网膜缺氧之后,视网膜神经胶质细胞中 HIF-1α mRNA 表达增加。此外,HIF-1 还参与热休克蛋白的表达调节,研究发现缺氧可明显增加大鼠视网膜神经中细胞 HIF-1 蛋白的表达^[10],并调控其下游基因 p53 的表达,缺氧是 p53 最强的生理性诱导剂,在缺氧情况下,去磷酸化的 HIF-1α 通过与 p53 结合介导缺氧情况下 p53 依赖的凋亡。HIF-1 和 p53 在缺氧诱导性的迟发性神经元死亡中起着关键作用,两者共同控制着缺氧诱导性神经元死亡^[11],HIF-1α 在缺血性视网膜病变中对视网膜神经细胞可能起着相似的作用。袁海虹等^[12]在大鼠 RIRI 模型研究中采用免疫组织化学及 RT-PCR 发现,HIF-1α 的表达增加与损伤后的视网膜细胞凋亡率呈正相关,推测其表达可能与视网膜细胞的凋亡有密切关系。最近新的研究证明,以 HIF-1α 作为靶点治疗缺氧性视网膜疾病取得了相应的成果^[13]。本实验通过建立 RIRI 的模型初步证明,雷帕霉素发挥抗凋亡作用是通过减少 HIF-1α 表达来完成的。

雷帕霉素是 20 世纪 70 年代初由加拿大 Ayerst 研究所从放线菌培养液中分离出来的大环内酯类抗生素。雷帕霉素有特异性抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的作用^[14]。mTOR 是一种重要的信号转导分子,参与多种生理及病理过程,其通过调控多种靶向分子达到促进蛋白质合成的作用,主要靶向点在翻译及转录这两个关键环节,以实现细胞生长、增殖及分化、凋亡的调控^[15-18]。mTOR 下游靶点 p70S6K 及 4E-BP1 均与蛋白合成速率密切相关,提示 mTOR 可能影响应激下的蛋白合成。由于神经修复过程中神经细胞存活与正常蛋白合成速率有关,mTOR 可感受细胞外应激,从而通过补偿减少的蛋白合成来参与神经修复机制。由于 mTOR 自噬的负性调控,抑制 mTOR 信号通路后会导致自噬性细胞死亡^[19]。Srin-

ivas 等^[20]假设自噬是由 AMPK 及 mTOR 的活化调节的,并且是依赖于 HIF-1 α 的方式,并提供了实验证据。雷帕霉素可以抑制细胞周期蛋白依赖性激酶的活化和抑制细胞周期进展,使细胞停止增殖并最终凋亡。Zhao 等^[21]研究表明,通过减弱 mTOR 介导的应激性视网膜色素细胞功能缺失,雷帕霉素提高和促进了视网膜退行性疾病模型中光感受器数量及功能。Chen 等^[3]通过建立大鼠脑缺氧缺血模型,证实腹腔注射雷帕霉素可以阻断 mTOR 信号通路,调节 HIF-1 α 和 VEGF 表达来抑制神经细胞凋亡。mTOR 信号通路可能通过影响 HIF-1 α 的表达,进而调节细胞的凋亡及细胞自噬等生物过程。

本实验选择雷帕霉素作用于 RIRI 模型,HE 染色法观察 RGC 形态,TUNEL 法检测细胞凋亡情况及 PCR 法测定 HIF-1 α mRNA 的表达,依此来研究雷帕霉素对 RIRI 后 RGC 存活的影响,并初步探讨产生这一作用的机制。本实验 HE 染色结果显示,实验对照组 RIRI 后 0 h 即可见视网膜组织水肿、疏松,24 h 时可见视网膜有明显的病理改变。而实验组中再灌注后 0 h 视网膜水肿明显减轻,TUNEL 阳性细胞明显减少。另外,从 Real time-PCR 检测结果中可见,RIRI 后大鼠 HIF-1 α mRNA 表达增加,雷帕霉素能够通过抑制 HIF-1 α mRNA 的表达而促进 RGC 的存活。

综上所述,雷帕霉素对 RIRI 具有保护作用,可能与其下调 HIF-1 α mRNA 表达及抗凋亡作用相关。但因 RIRI 后细胞凋亡反应机制复杂,而雷帕霉素能通过多条途径抑制视网膜细胞的凋亡,其具体机制有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, Chang CJ, Lam TT, Tso MO. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia[J]. *Curr Eye Res*, 1996, 15(6): 589-596.
- 2 Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, et al. Coordinate activation of HIF-1 and NF- κ B DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44(10): 4163-4170.
- 3 Chen H, Xiong T, Qu Y, Zhao F, Ferriero D, Mu D. mTOR activates hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia[J]. *Neuroscience Letters*, 2012, 507(2): 118-123.
- 4 代艳,陈晓明,陈小虎. 雌激素对鼠视网膜缺血再灌注所致视网膜损伤的保护作用[J]. 中华眼底病杂志, 2005, 21(3): 177-179.
- 5 Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, Zhang S, Kashii S, Honda Y, et al. Lomerizine, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina[J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(4): 475-484.
- 6 Buchi ER. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer[J]. *Exp Eye Res*, 1992, 55(4): 605-613.
- 7 李艳,李贵仁,康凤英. 缺血再灌注大鼠视网膜诱导型一氧化氮合酶与细胞凋亡的研究[J]. 眼科新进展, 2005, 25(6): 452-454.
- 8 Greijer A, Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(10): 1009-1014.
- 9 Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 1126-1141.
- 10 张薇,李若溪,许建华,刘哲丽. 低氧条件下大鼠视网膜 HIF-1 α 及 P53 的表达及相关分析[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(4): 795-797.
- 11 Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(16): 6818-6824.
- 12 袁海虹,周薇,包辉英,谭攀攀,祝肇荣,吴国忠. 缺血再灌注损伤后大鼠视网膜细胞凋亡与低氧诱导因子 1 α 表达的关系[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2012, 31(12): 1697-1701.
- 13 Xin X, Rodrigues M, Umapathi M, Kashiwabuchi F, Ma T, Babapoor-Farrokhran S, et al. Hypoxic retinal Müller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(36): 3425-3434.
- 14 Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling[J]. *Cell Res*, 2007, 17(8): 666-681.
- 15 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- 16 Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(8): 353-361.
- 17 牛慧彦,王鑫,张萌,王佳贺,何平. 雷帕霉素联合多西紫杉醇对肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(1): 23-25.
- 18 竺红宇,李军川,陈廷煊,邹兰英,王晓艳,赵会传,等. 胃肠间质瘤危险性分级与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白表达的关系[J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(2): 98-100.
- 19 Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003.
- 20 Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase[J]. *Cells Tissues Organs*, 2008, 189(1-4): 88-92.
- 21 Zhao C, Yasumura D, Li X, Matthes M, Lloyd M, Nielsen G, et al. mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 369-383.