

【实验研究】

刘亚军 闫峰 叶巍 朱欣悦 黄振平

【摘要】 目的 探究转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2) 诱导人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 层细胞上皮-间质转分化中 miRNA-29b 的表达变化及意义。方法 使用不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞上皮-间质转分化后, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化, Western blot、RT-PCR 检测成纤维化相关分子纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、神经钙粘蛋白 (nerve calcium adhesion protein, N-Cadherin) 的表达。采用 RT-PCR 检测不同浓度 TGF- β , 及不同时间 TGF- β , (5

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)刺激 RPE 细胞后 miRNA-29b 的表达。结果 TGF- β_2 刺激后的 RPE 细胞形态呈纤维化改变。在一定浓度范围内($1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)，随着 TGF- β_2 浓度的增加 FN、N-Cadherin 及相应 mRNA 随之增加， $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与对照组($0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比，差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。TGF- β_2 在一定浓度范围内($0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)以剂量依赖的方式诱导 RPE 细胞 miRNA-29b 表达的降低， $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与对照组($0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比，差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$)，在 TGF- β_2 浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 miRNA-29b 表达量最低。TGF- β_2 在一定时间范围内(0 h 、 3 h 、 6 h 、 12 h)以时间依赖的方式诱导 RPE 细胞 miRNA-29b 表达的降低， 3 h 、 6 h 、 12 h 、 24 h 、 48 h 组与 0 h 相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。结论 一定范围内 TGF- β_2 以剂量和时间依赖的方式诱导 RPE 细胞 miRNA-29b 的表达，为进一步研究 miRNA-29b 与 TGF- β_2 在 RPE 细胞上皮-间质转分化过程中的相互作用提供理论基础。

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)常见于孔源性视网膜脱离长期未复位或视网膜脱离复位术后，会造成严重视功能损害和视网膜脱离复位手术失败，其本质是玻璃体视网膜损伤的过度修复反应^[1-2]。尽管目前 PVR 的发病机制仍未明确，但越来越多证据表明视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞发生上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是 PVR 的主要病理过程^[3-4]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)被证明是一种多功能的细胞因子，可在胚胎发育、伤口愈合、成纤维化疾病、癌症转移中诱导细胞发生 EMT^[5-6]。TGF- β_2 是 RPE 细胞分泌的 TGF- β 主要亚型，此前曾有研究表明在 PVR 患者的玻璃体内和增殖膜中 TGF- β_2 过量表达^[7-8]。miRNA 是一类进化中高度保守的非编码小分子单链 RNA 分子，可调节转录后基因表达^[9]，miRNA-29b 在多种器官纤维化的调控中发挥着重要的作用，包括心、肝、肺纤维化等^[10]，但目前国内关于 miRNA-29b 在 RPE 细胞 EMT 中报道甚少。本研究通过 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT，探究 miRNA-29b 的相应表达，为进一步研究 miRNA-29b 与 TGF- β_2 在 RPE 细胞 EMT 过程中的相互作用提供理论基础，更为 PVR 防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 人 RPE 细胞株(美国 ATCC 公司)；胎牛血清、DMEM/F12 高糖培养基、胰蛋白酶消化液(美国 Gibco 公司)；TGF- β_2 (美国 Peprotech 公司)；总 RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司)；抗 GAPDH 抗体、抗神经钙粘连蛋白(nerve calcium adhesion protein, N-Cadherin)抗体(美国 CST 公司)；抗纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体(英国 Abcam 公司)；RIPA 蛋白裂解液(江苏碧云天公司)；BCA 蛋白定量试剂盒(江苏凯基生物科技股份有限公司)；cDNA 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)；miRNA 反转录试剂盒(广州易锦生物技术有限公司)；化学发光凝胶成像系统(上海天能公司)；倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司)；超微量分光光度计(美国 GE 公司)；PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司)；荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.1.2 引物设计与合成 从 NCBI 上查找已报道的

FN、N-Cadherin、GAPDH 基因序列，然后交由上海生工生物技术公司进行引物设计与合成。开盖前 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ，使用 DEPC 水进行稀释，使终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。FN 上游引物：5'-ATCACCCTCAACCTCAC-3'，下游引物：5'-TCCCTCGGAACATCAGAAAC-3'；N-Cadherin 上游引物：5'-AGCTTCTCACGGCATAACCC-3'，下游引物：5'-GTG-CATGAAGGACAGCCTCT-3'；GAPDH 上游引物：5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'，下游引物：5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。

1.2 方法

1.2.1 ARPE-19 细胞株的培养 ARPE-19 细胞使用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基，在 37°C 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内培养。平均每 3 d 进行 1:3 常规传代培养，取生长状态良好的处于同一代次对数期 RPE 细胞用于实验。

1.2.2 细胞形态学观察 将 RPE 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中，待细胞生长至 70% 的融合状态时，换用无血清培养液继续孵育 12 h，然后分别加入浓度为 $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TGF- β_2 培养 48 h，使用倒置相差显微镜观察细胞形态的变化。

1.2.3 Western blot、RT-PCR 检测 FN、N-Cadherin 蛋白及 mRNA 的表达 为验证 RPE 细胞在 TGF- β_2 的诱导下发生 EMT 的机制，在实验中我们使用 Western blot、RT-PCR 检测间质标志分子 FN、N-Cadherin 蛋白及 mRNA 的表达。取 RPE 细胞接种于 6 孔板中，待细胞贴壁融合至 70% 时，换用无血清培养基培养 12 h 进行饥饿处理，使细胞周期同步化，然后分别加入浓度为 $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TGF- β_2 培养 48 h。将细胞分为两组：第一组加入 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白，使用 BCA 法进行蛋白定量检测，蛋白加样 $20 \mu\text{g}$ 进行凝胶电泳，转膜后使用 BSA 液封闭 2 h，分别加入一抗 GAPDH(1:1000)、N-Cadherin(1:1000)、FN(1:1000) 4°C 过夜。使用 TBST 洗膜 3 次后加入二抗室温孵育 1 h，加入 ECL 发光液后在化学发光凝胶成像系统中进行曝光。使用 Image J 软件分析灰度值，以目的条带与内参条带灰度值的比值为相对表达量。第二组使用总 RNA 提取试剂提取总 RNA，并测 RNA 浓度。使用 TaKaRa 反转录试剂盒逆转录 cDNA，再使用荧光定量 PCR 仪进行检测， 95°C 预变性 30 s，

95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。检测结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法计算。

1.2.4 RT-PCR 检测不同浓度及不同时间 TGF- β_2 刺激后 miRNA-29b 的表达 分别使用不同浓度(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) TGF- β_2 刺激 RPE 细胞 24 h 及 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_2 刺激 RPE 细胞不同时间(0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h)然后分别提取总 RNA,RNA 浓度测定后按照 miRNA 反转录试剂盒说明书进行逆转录,使用荧光定量 PCR 仪进行检测,95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 20 s,70 ℃ 延伸 10 s,共 45 个循环,采用 U6 做内参。检测结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法计算。

1.3 统计学方法 所有实验均重复 3 次。采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way-ANOVA),组间两两比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β_2 对 RPE 细胞形态学的影响 正常培养的 RPE 细胞为排列整齐的单层六角形,边界清晰,细胞质透明,细胞浆内有色素,即脂褐质,细胞核呈卵圆形;不同浓度(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) TGF- β_2 刺激后,RPE 细胞排列紊乱,细胞形态变长、呈梭形,逐渐向 EMT 方向转变,并且在 0 ~ 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内随着 TGF- β_2 浓度的增加,

这种表现更加明显(图 1)。

2.2 TGF- β_2 对 RPE 细胞 FN、N-Cadherin 蛋白表达的剂量效应 Western blot 检测结果显示:TGF- β_2 浓度在 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着浓度的增加,FN 蛋白表达量增加,各浓度组间差异具有统计学意义($F = 181.399, P < 0.05$),实验组(1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$);TGF- β_2 浓度在 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着浓度的增加,N-Cadherin 蛋白表达量增加,各浓度组间差异具有统计学意义($F = 67.252, P < 0.05$),实验组(1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与空白对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$,图 2-图 4)。

2.3 TGF- β_2 对 RPE 细胞 FN mRNA 及 N-Cadherin mRNA 表达的剂量效应 RT-PCR 检测结果显示,随着 TGF- β_2 浓度的增加(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),FN mRNA 的表达增加,各浓度组间差异具有统计学意义($F = 228.873, P < 0.05$),实验组(1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.05$);随着 TGF- β_2 浓度的增加 N-Cadherin mRNA 增加,各浓度组间差异有统计学意义($F = 63.370, P < 0.05$),实验组(1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与空白对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,图 5-图 6)。

图 1 不同浓度 TGF- β_2 刺激 48 h 后 RPE 细胞形态改变($\times 100$)。A:0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;B:1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;C:5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;D:10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 Western blot 检测不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 FN 和 N-Cadherin 蛋白表达变化。图 3 不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 FN 蛋白的相对表达量变化。与对照组相比,** $P < 0.01$ 。图 4 不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 N-Cadherin 蛋白的相对表达量变化。与对照组相比,** $P < 0.01$

2.4 TGF- β_2 对 RPE 细胞 miRNA-29b 表达的影响 随着 TGF- β_2 浓度的增高(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),miRNA-29b 表达逐渐降低,各浓度组间 miRNA-29b 表达差异具有统计学意义($F = 172.329,$

$P < 0.01$),实验组(1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。TGF- β_2 浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,miRNA-29b 表达增加,显示 TGF- β_2 对 miRNA-

29b 表达有双向作用(图7)。

图5 RT-PCR 检测不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 FN mRNA 的相对表达量变化。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。图6 RT-PCR 检测不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 N-Cadherin mRNA 的相对表达量变化。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图7 RT-PCR 检测不同浓度 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞后 miRNA-29b 的表达变化。与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_2 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.5 TGF- β_2 不同诱导时间对 RPE 细胞 miRNA-29b 表达的影响 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_2 刺激 RPE 细胞,在 0 h、3 h、6 h、12 h 时随着时间的增加,miRNA-29b 表达减少,在 12 h 达到最低。各时间点间 miRNA-29b 表达差异具有统计学意义 ($F = 34.243, P < 0.01$),实验组各时间点(3 h、6 h、12 h、24 h、48 h)与对照组(0 h)相比差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.05$),在 24 h 时 miRNA-29b 表达开始增加(图8)。

图8 RT-PCR 检测 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β_2 刺激不同时间后 miRNA-29b 的表达变化。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 12 h 相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

PVR 患眼中,离开原位的 RPE 细胞增生、移行并发生形态和功能变化,RPE 细胞失去上皮细胞的表型而获得间充质、肌成纤维细胞样的特性和表型^[1,11],转化为巨噬细胞样或成纤维细胞样细胞,分泌细胞外基质,与神经胶质细胞、成纤维细胞等细胞成份在玻璃体内和(或)视网膜周围形成收缩膜,牵拉视网膜。此时的 RPE 细胞逐渐失去上皮细胞的表型特征,而获得间充质细胞表型特征,如 FN、N-Cadherin,这种 EMT 是 PVR 的主要病理过程。TGF- β_2 是调控 RPE 细胞 EMT 过程的关键炎症因子,在 PVR 患者和实验模型的玻璃体中,TGF- β_2 的表达水平与 PVR 的严重程度呈正相关^[12-13]。FN 是一种高分子糖蛋白,具有多种生物学功能,主要功能是介导细胞黏着,可以调控细胞的迁移、增生及分化。HISCOTT 等^[14-15]研究表明,正常视网膜中未检测出 FN,而在 PVR 患者视网膜前膜及视网膜下膜中的 RPE 细胞上有 FN 的表达。N-Cadherin 是一种 Ca^{2+} 依赖的细胞黏着糖蛋白,介导同种细胞间的识别和黏附。CHEN 等^[16]研究表明 TGF- β_2 刺激下 RPE 细胞 EMT 中 N-Cadherin 表达上调,U0126 可通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路抑制 N-Cadherin 的表达。本研究中使用 TGF- β_2 刺激 RPE 细胞,通过倒置相差显微镜观察发现 RPE 细胞形态转变为梭形,呈现间充质细胞形态,并且随 TGF- β_2 浓度的增加形态改变更加明显。Western blot、RT-PCR 检测结果显示在一定浓度范围内 TGF- β_2 以剂量依赖的方式诱导 FN、N-Cadherin 蛋白及 mRNA 的表达上调,说明外源性 TGF- β_2 诱导后,RPE 细胞发生了 EMT。因此,TGF- β_2 在 RPE 细胞 EMT 中发挥重要作用,参与了 PVR 的形成过程。

miRNAs 在基因表达调控方面发挥着极其重要的作用,它们的调节异常已被证实参与了细胞的分化^[17-18]、增殖^[19]、代谢^[20]和细胞凋亡^[21]。CHEN 等^[22]发现 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT 后,共有 304 个 miRNA 表达发生变化,185 个 miRNA 表达下调,119 个 miRNA 表达上调。下调 C57BL/6 小鼠心肌组织 miRNA-29b 的表达会导致 COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 miRNA 的过表达^[23]。LUNA 等^[24]在青光眼小梁细胞的研究中发现 TGF- β_2 下调 miRNA-29b 家族的表达,同时 miRNA-29b 过表达拮抗 TGF- β_2 的作用,从而导致细胞外基质成份的改变,认为 miRNA-29 家族与 TGF- β 家族存在交互作用,这种交互作用是复杂的,而对其研究是非常有限的。本实验使用不同浓度 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT 后,使用 RT-PCR 检测 miRNA-29b 的表达,发现在 $0 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 随着 TGF- β_2 浓度的增加,miRNA-29b 的表达不断减少,说明 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT 过程中 miRNA-29b 表达随 TGF- β_2 浓度增加而下调,TGF- β_2

浓度为 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, miRNA-29b 表达增加, 显示 TGF- β_2 对 miRNA-29b 表达有双向作用。另外, 随着 TGF- β_2 ($5\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 刺激时间的延长 miRNA-29b 逐步降低, 在 12 h 时达到最低, 显示时间依赖性。上述结果表明, miRNA-29b 可能参与了 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT 过程。

本研究初步证实了在 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞 EMT 过程中 miRNA-29b 表达的降低具有浓度和时间依赖性, 提示 miRNA-29b 可能在 TGF- β_2 诱导 RPE 细胞向间质细胞分化的过程中发挥重要作用。对 miRNA-29b 在 PVR 发病过程中作用机制的深入研究, 有助于对 PVR 疾病的预防和治疗。

参考文献

[1] YANG S, LI H, LI M, WANG F. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy [J]. *Discov Med*, 2015, 20(110): 207-217.

[2] KWON OW, SONG JH, ROH MI. Retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 55: 154-162.

[3] FRIEDLANDER M. Fibrosis and diseases of the eye [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 576-586.

[4] PASTOR JC, DE LA RUA ER, MARTIN F. Proliferative vitreoretinopathy; risk factors and pathobiology [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21(1): 127-144.

[5] BARTEL DP. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

[6] HE Y, HUANG C, LIN X, LI J. MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases [J]. *Biochimie*, 2013, 95(7): 1355.

[7] KITA T, HATA Y, ARITA R, KAWAHARA S, MIURA M, NAKAO S, et al. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17504-17509.

[8] KITA T, HATA Y, KANO K, MIURA M, NAKAO S, NODA Y, et al. Transforming growth factor-beta2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases; possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor [J]. *Diabetes*, 2007, 56(1): 231-238.

[9] BORDER WA, NOBLE NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(19): 1286-1292.

[10] AKHURST RJ, HATA A. Targeting the TGF beta signalling pathway in disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(10): 790-811.

[11] CHEN Z, SHAO Y, LI X. The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR [J]. *Mol Vis*, 2015, 21: 706-710.

[12] HOERSTER R, MUETHER PS, VIERKOTTEN S, HERMANN MM, KIRCHHOF B, FAUSER S. Upregulation of TGF-ss1 in experimental proliferative vitreoretinopathy is accompanied by epithelial to mesenchymal transition [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(1): 11-16.

[13] CONNOR TB JR, ROBERTS AB, SPORN MB, DANIELPOUR D, DART LL, MICHELS RG, et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye [J]. *J Clin Invest*, 1989, 83(5): 1661-1666.

[14] HISCOTT P, WALLER HA, GRIWESON I, BUTLER MG, SCOTTD. Local production of fibronectin by ectopic human retinal cell [J]. *Cell Tissue Res*, 1992, 267(1): 185-192.

[15] HISCOTT P, WALLER HA, GRIERSON I, BUTLER MG, SCOTT DL, GREGOR Z, et al. Fibronectin synthesis in subretinal membranes of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 1992, 76(8): 486-490.

[16] CHEN X, XIAO W, WANG W, LUO L, YE S, LIU Y. The complex interplay between ERK1/2, TGFb/Smad, and Jagged/Notch signaling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96365.

[17] JACKSON SJ, ZHANG Z, FENG D, FLAGG M, O'LOUGHLIN E, WANG D, et al. Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation [J]. *Development*, 2013, 140(9): 1882-1891.

[18] LUNINGSSHROR P, HAUSER S, KALTSCHMIDT B, KALTSCHMIDT C. MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(3): 1894-1903.

[19] KHAN AA, PENNY LA, YUZEFPOLSKIY Y, SARKAR S, KALLIA V. MicroRNA-17 ~ 92 regulates effector and memory CD8 T-cell fates by modulating proliferation in response to infections [J]. *Blood*, 2013, 121(22): 4473-4483.

[20] LIN XZ, LUO J, ZHANG LP, WANG W, SHI HB, ZHU JJ. MiR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells [J]. *Gene*, 2013, 521(1): 15-23.

[21] QIU J, ZHOU XY, ZHOU XG, CHENG R, LIU HY, LI Y. Neuroprotective effects of microRNA-210 against oxygenglucose deprivation through inhibition of apoptosis in PC12 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1955-1959.

[22] CHEN X, YE S, XIAO W, LUO L, LIU Y. Differentially expressed microRNAs in TGF- β_2 induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(5): 1195-200.

[23] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, THATCHER JE, DIMAIO JM, NASEEM RH, MARSHALL WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 13027-13032.

[24] LUNA C, LI G, QIU J, EPSTEIN DL, GONZALEZ P. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3567-3572.