

引文格式:孙园园,郭大东,陈美清,李少玉,刘滨,唐凯,等. rno-miR-30b-5p 在葡萄膜炎发病过程中对白细胞介素-10 和 Toll 样受体 4 表达的调控作用[J]. 眼科新进展,2017,37(4):330-334. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0083

【实验研究】

# rno-miR-30b-5p 在葡萄膜炎发病过程中对白细胞介素-10 和 Toll 样受体 4 表达的调控作用<sup>△</sup>

孙园园 郭大东 陈美清 李少玉 刘滨 唐凯 毕宏生

作者简介:孙园园,女,1992 年 2 月出生,山东潍坊人,2015 级硕士研究生。研究方向:屈光不正及白内障。联系电话:18363081891; E-mail: yankesyys@163.com; ORCID:0000-0002-5182-5921

About SUN Yuan-Yuan: Female, born in February, 1992. Postgraduate student. Tel: 18363081891; E-mail: yankesyys@163.com; ORCID:0000-0002-5182-5921

收稿日期:2016-09-02

修回日期:2016-12-28

本文编辑:付中静

△基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133731110004);山东中医药科技发展计划(编号:2015-145);山东省自然科学基金(编号:ZR2016HP27)作者单位:250014 山东省济南市,山东中医药大学[孙园园、陈美清、李少玉(2015 级硕士研究生)],刘滨(2016 级硕士研究生)];250002 山东省济南市,山东中医药大学眼科研究所(郭大东,唐凯,毕宏生)通讯作者:毕宏生, E-mail: hongshengbil@163.com; ORCID: 0000-0002-6965-9626

Received date: Sep 2, 2016

Accepted date: Dec 28, 2016

Foundation item: Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No: 20133731110004); Development Project of Science and Technology of Traditional Chinese Medicine of Shandong Province (No:2015-145); Natural Science Foundation of Shandong Province (No: ZR2016HP27)

From the Shandong University of Traditional Chinese Medicine(SUN Yuan-Yuan, CHEN Mei-Qing, LI Shao-Yu, LIU Bin), Jinan 250014, Shandong Province, China; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine( GUO Da-Dong, TANG Kai, BI Hong-Sheng), Jinan 250002, Shandong Province, China

Responsible author: BI Hong-Sheng, E-mail: hongshengbil@163.com; ORCID:0000-0002-6965-9626

## Regulatory roles of rno-miR-30b-5p in expressions of IL-10 and TLR4 in rats with experimental autoimmune uveitis

SUN Yuan-Yuan, GUO Da-Dong, CHEN Mei-Qing, LI Shao-Yu, LIU Bin, TANG Kai, BI Hong-Sheng

【Key words】 rno-miR-30b-5p; luciferase plasmid vector; IL-10; TLR4; uveitis

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory role of rno-miR-30b-5p in the expressions of interleukin-10 (IL-10) and toll-like receptor 4 (TLR4) in uveitis. **Methods** Both IL-10 and TLR4 gene 3' UTR luciferase vectors and relevant binding site mutant vectors were constructed. Further, both rno-miR-30b-5p mimics and reporter gene vector were co-transferred into 293 T cells to validate the fluorescent alterations of the reporter gene expression to detect the interactions between rno-miR-30b-5p and the related target genes. Moreover, an experimental autoimmune uveitis (EAU) model was induced with IRBP peptide emulsion in rats, and both lymph node and spleen were isolated on day 12 after EAU induction. In order to measure rno-miR-30b-5p levels and IL-10, TLR4 expressions in spleen and lymph node, quantitative PCR and ELISA techniques were applied. **Results** The results of double luciferase reporter gene expression analysis showed rno-miR-30b-5p mimic apparently down-regulated the fluorescence intensity of both IL-10 and TLR4 in wild type cells. After the mutation of the target site, the fluorescence intensity of the mutant vector was significantly reduced, accompanied by a significantly statistical difference (all  $P < 0.01$ ). Moreover, animal results revealed the expressions of rno-miR-30b-5p were apparently decreased, whereas IL-10 and TLR4 were markedly increased in both lymph node and spleen (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Target identification shows that rno-miR-30b-5p can obviously regulate the expressions of 3' UTR gene with either IL-10 or TLR4 gene fragment, though its regulation might not be through the predicted site. The down-regulated expression of rno-miR-30b-5p in both spleen and lymph node in EAU rats result in the up-regulated expressions of both IL-10 and TLR4, further influence the development of uveitis. This study paves a way for the modulation of microRNA on the occurrence and development of uveitis, and will provide a new insight on treating uveitis.

【中图分类号】 R774.1

【关键词】 rno-miR-30b-5p; 荧光素酶质粒载体; 白细胞介素-10; Toll 样受体 4; 葡萄膜炎

【摘要】 **目的** 探讨 rno-miR-30b-5p 在葡萄膜炎中对白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 表达的调控作用。 **方法** 构建 IL-10、TLR4 基因的 3' 端非编码区域 (3' UTR) 荧光素酶质粒载体以及结合位点突变质粒载体, 将 rno-miR-30b-5p 模拟物 (mimic) 与构建好的报告基因载体共转染 293T 细胞, 通过报告基因相对荧光值的表达改变检测 rno-miR-30b-5p 对 IL-10、TLR4 表达的调控作用; 制备实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 模型, 通过注射视网膜光感受器间维生素 A 类结合蛋白乳糜液, 在造模后 12 d 分离 EAU 大鼠的脾脏和淋巴结, 实时荧光定量 PCR 检测 rno-miR-30b-5p 和 IL-10、TLR4 基因的表达情况; ELISA 检测 IL-10 和 TLR4 蛋白的表达情况。 **结果** 双荧光素酶报告基因表达结果表明, 经 rno-miR-30b-5p mimic 干预后 IL-10、TLR4 野生型的报告荧光有明显的下调作用, 对其预测靶位点进行突变后, 突变型载体中的报告荧光也存在明显的下调作用, 与阴性对照相比, 差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.01$ )。实时荧光定量 PCR 检测结果发现 rno-miR-30b-5p 在 EAU 大鼠脾脏和淋

巴结中的表达均较对照组明显降低(均为  $P < 0.01$ ),而 IL-10 mRNA、TLR4 mRNA 表达明显升高(均为  $P < 0.01$ );ELISA 检测发现 IL-10、TLR4 蛋白表达升高,与对照组相比,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。结论 rno-miR-30b-5p 对带有 IL-10、TLR4 基因片段 3' UTR 基因表达的调控作用可能不是通过预测到的位点起作用而是通过其他的调控结合位点发挥作用;rno-miR-30b-5p 在 EAU 大鼠脾脏和淋巴结的下调表达导致 IL-10 和 TLR4 的表达水平升高,进而调控葡萄膜炎的发展。本研究为进一步探索 microRNA 在葡萄膜炎发生发展进程中的调控作用、治疗葡萄膜炎奠定了基础。

葡萄膜炎是一类眼科常见的致盲性眼病,通常是由免疫因素引起,但确切的致病机制尚未完全明确。Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 作为一种模式识别受体可通过胞外段识别配体和信号转导介导多种细胞因子的产生,参与葡萄膜炎的发生发展<sup>[1]</sup>;白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 是一种强有力的抗炎物质,它可抑制辅助性 T 细胞产生细胞因子及其活性,能够在多种炎症中发挥重要的免疫保护作用<sup>[2]</sup>。

MicroRNAs (miRNAs) 是一种长度约为 22 个核苷酸的高度保守的非编码单链 RNA,主要通过目标 mRNA 基因的 3' 端非编码区域(3' UTR) 完全或不完全互补配对,进而调控靶基因的表达。我们前期研究发现<sup>[3]</sup>, rno-miR-30b-5p 可调控包括 IL-10、TLR 等多个基因的表达,从而在葡萄膜炎的发生发展中发挥重要作用。本研究拟通过构建 IL-10、TLR4 基因的 3' UTR 荧光素酶质粒载体和动物实验,鉴定 rno-miR-30b-5p 对 IL-10、TLR4 表达水平的影响,进而探讨 miRNA 在葡萄膜炎的发病过程中对相关炎症细胞因子的调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 随机选择 12 只雌性 Lewis 大鼠(6~8 周,体质量 160~180 g,北京维通利华实验动物有限公司)分别在 6 只大鼠后肢足垫、两侧腹壁及躯干上皮下注射含有光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein, IRBP)(每只 100  $\mu\text{g}$ )、完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)(每只 150  $\mu\text{L}$ )、结核分枝杆菌 H37RA(TB)(每只 100  $\mu\text{g}$ )和无菌 PBS(每只 150  $\mu\text{L}$ )混合的乳糜液制备实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠模型;另外 6 只大鼠在相同的部位注射等量只含 CFA、TB 和无菌 PBS 的乳糜液作为对照组。在免疫后 12 d,两组静脉注射过量 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  水合氯醛溶液处死大鼠,无菌条件下分离淋巴结和脾脏组织。

**1.2 主要试剂和仪器** XhoI、NotI 限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶(赛默飞世尔科技公司 Thermo 公司),质粒抽提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、DH5 $\alpha$  感受态细胞(天根生化科技有限公司),IRBP(1177-1191;氨基酸序列,ADGSSWEGVGVVPDV,上海生工生物工程股份有限公司合成),CFA(美国 Sigma 公司),TB(美国 Difco 公司),microRNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司);cDNA 逆转录试剂盒、ZX-SYBR Green 试剂盒、实时荧光定量 PCR

仪(RT-PCR 仪,美国 Roche 公司),IL-10、TLR4 大鼠 ELISA 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司)。

### 1.3 IL-10、TLR4 基因的 3' UTR 荧光素酶质粒载体和突变质粒载体的构建及靶点鉴定

**1.3.1 引物合成及目的基因片段获取** 对 IL-10、TLR4 基因序列及载体序列进行分析,用 XhoI、NotI 两个限制性核酸内切酶和 RT-PCR 获得 IL-10、TLR4 基因的 3' UTR 序列。IL-10 上游引物:5'-GGCG-GCTCGAGTAGAAGCCTACGTGACACT-3',下游引物:5'-AATGCGGCCGCACAACAGACACCACAAAGT-3';TLR4 上游引物:5'-GCGCTCGAGGGAGTACAAACTCTGCGCC-3',下游引物:5'-AATGCGGCCGCAGTTTATAGTCAAGGCAAGG-3'。以 IL-10、TLR4 基因的 3' UTR 序列为模板,利用 PCR 定点突变在引物上引入突变碱基。其中 IL-10 上游突变引物:5'-TGCAGAGCACAAATGCAATGCTGTCCTTTCACT-3',下游突变引物:5'-CACCATTGCATTTGTGCTCTGCAGCTCTTAAGT-3';TLR 上游突变引物:5'-GCGCTCGAGGGAGTACAAACTCTGCGCCTAAACCCATTAACAAATGTATTTCCGAATGCTACACT-3',下游突变引物:5'-GCGCTCGAGGGAGTACAAACTCTGCGCC-3'。PCR 反应条件:98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,循环内 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,从 65  $^{\circ}\text{C}$  每个循环降 1  $^{\circ}\text{C}$  退火,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,10 个循环;98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,15 个循环;PCR 反应循环后 72  $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 3 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.3.2 质粒载体的构建与鉴定** 构建 IL-10、TLR4 基因 3' UTR 荧光素酶质粒载体和突变质粒载体,先将 IL-10、TLR4 基因的 3' UTR 区用 XhoI、NotI 两个限制性核酸内切酶分别克隆至载体海肾荧光素酶基因下游位点,以海肾荧光素酶基因作为报告基因,以萤火虫荧光素酶基因作为内参基因,由于 miRNA 是通过 3' UTR 区作用于靶基因,因此通过检测海肾荧光素酶活性的相对变化来验证 miRNA 对该靶标是否有调控作用。将构建好的载体产物转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中混匀,涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基的平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12~16 h,挑取 2 个单菌落,先进行菌落的 PCR 鉴定,反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,循环内 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,20 个循环;PCR 反应循环后 72  $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 3 min,然后 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。通过 PCR 鉴定为阳性的菌落进行测序和比对分析,鉴定正确后大量扩增重组质粒。

**1.3.3 293T 细胞转染** 293T 细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱常规培养。上述质粒构建完成后分别与 rno-miR-30b-5p 模拟物(mimic)在含有 293T

细胞的96孔板中培养24 h(初始浓度为每孔 $10 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ 个悬浮细胞),使转染时的细胞密度达到50%~80%,按照Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染试剂盒说明书进行转染。实验设置:将野生型和突变型质粒载体分别与rno-miR-30b-5p mimic共转染,加入miRNA作为阴性对照组,定量检测双荧光素酶催化产生的荧光值,以鉴定miRNA作用靶点。

**1.3.4 双荧光素酶鉴定 miRNA 作用靶点** 将rno-miR-30b-5p mimic与IL-10、TLR4基因的3' UTR荧光素酶质粒载体和突变质粒载体共转染48 h后吸出培养基,加入PBS和荧光素酶底物,振荡,用荧光光度计测定荧光数值。将各孔报告基因和内参基因的荧光值比值与对照孔的比值进行统计分析。相对荧光值 =  $(A_{\text{实验组报告基因}}/A_{\text{实验组内参基因}})/(A_{\text{对照组报告基因}}/A_{\text{对照组内参基因}})$ , A代表荧光值。实验重复三次,结果用均值±标准差表示。

## 1.4 检测方法

**1.4.1 RT-PCR 检测 rno-miR-30b-5p 和 IL-10、TLR4 mRNA 的表达** 为了进一步探讨rno-miR-30b-5p、IL-10、TLR4在EAU大鼠中的作用机制,通过RT-PCR检测EAU大鼠脾脏和淋巴结中rno-miR-30b-5p、IL-10和TLR4 mRNA的表达水平。分别取对照组和EAU大鼠的脾脏和淋巴结,按micro-RNA提取试剂盒说明书提取脾脏和淋巴结组织中的miRNA和总RNA,使用cDNA逆转录试剂盒进行cDNA的合成,用RT-PCR检测rno-miR-30b-5p和IL-10、TLR4 mRNA的表达。实时荧光定量PCR反应体系共20 μL,每个基因设3个复孔。U6反转录引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3',双向引物序列包括上游引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3',下游引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'; rno-miR-30b-5p反转录引物:5'-GTCGTATCCAGTGGGAGTGGGCAATTGCACTGGATACGACAGCTGA-3',双向引物序列包括基因特异性引物:5'-GGGCTGTAAACATCCTACAC-3',反向引物:5'-TGCCTGTCGTGGAGTC-3'; β-actin上游引物:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引

物:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'; IL-10上游引物:5'-TTCCATCCGGGTGACAATAA-3',下游引物:5'-TTCTGGGCCATGGTTCTCTGC-3'; TLR4上游引物:5'-GATGGCATATTTCTTGGCTTGAT-3',下游引物:5'-GGATGTCTCTATGCCATTGAAACT-3'。反应条件为:95℃ 5 min,循环1次;95℃ 20 s,55℃ 25 s,循环共45次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算,U6为rno-miR-30b-5p的内参,以β-actin为IL-10和TLR4的内参,反应结束后对各组rno-miR-30b-5p和IL-10、TLR4 mRNA的相对表达量进行定量分析。

## 1.4.2 ELISA 检测 IL-10 和 TLR4 蛋白的表达

将冻存在-80℃冰箱中的对照组和EAU组大鼠的淋巴结和脾脏取出,快速放入液氮中,加入400 μL裂解液(每1 mL RIPA裂解液加2 μL蛋白酶抑制剂,混匀),玻璃研磨棒研磨后超声波细胞粉碎机超声20 min,8000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心20 min,吸取上清转移到新EP管中,通过ELISA试剂盒检测IL-10和TLR4蛋白的表达水平,实验步骤严格按照IL-10和TLR4试剂盒说明书进行。

**1.5 统计学方法** 所有实验均重复三次,采用SPSS 17.0统计学软件分析数据,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组脾脏和淋巴结的rno-miR-30b-5p、IL-10、TLR4 mRNA和蛋白表达含量比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-10、TLR4 质粒载体和突变质粒载体的构建

经RT-PCR反应扩增目的基因IL-10、TLR4片段,引物扩增产物总长度分别为763 bp、628 bp,得到的PCR产物行 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,扩增目的基因片段大小分别为763 bp、628 bp(图1A、B),与理论长度一致;对挑选出的阳性单克隆菌落进行PCR反应,引物扩增条带理论大小分别为1000 bp、850 bp,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析后可见明亮的单一一条带,实际条带扩增大小分别为1000 bp、850 bp(图1C、D),与理论长度一致。

**图1** IL-10、TLR4质粒载体和突变质粒载体的构建。A:1:IL-10基因3' UTR序列的PCR产物;B:1:TLR4基因3' UTR序列的PCR产物;C:1、2:IL-10单克隆菌落PCR产物;D:1、2:TLR4单克隆菌落PCR产物

**2.2 双荧光素酶检测质粒载体与 rno-miR-30b-5p mimic 转染细胞后 IL-10、TLR4 的表达量** 双荧光素酶报告基因表达分析结果显示,与阴性对照组相比,rno-miR-30b-5p mimic 对 IL-10 和 TLR4 野生型的报告荧光均有较明显的下调作用(均为  $P < 0.01$ ,见图 2),对其预测靶点进行突变后,突变型载体中的报告荧光也存在明显的下调作用(均为  $P < 0.01$ )。

图2 rno-miR-30b-5p mimic 与质粒载体转染 293T 细胞后 IL-10、TLR4 的表达量。A:IL-10 基因与 rno-miR-30b-5p mimic;B:TLR4 基因与 rno-miR-30b-5p mimic

**2.3 rno-miR-30b-5p 在两组大鼠脾脏和淋巴结中的表达** 与对照组相比,EAU 组大鼠脾脏和淋巴结中 rno-miR-30b-5p 均有明显的下调表达(均为  $P <$

0.01,见图 3)。  
**2.4 IL-10 和 TLR4 mRNA 和蛋白表达** 与对照组相比,EAU 大鼠脾脏和淋巴结中 IL-10 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达明显升高,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ ,见图 4A、B);IL-10 蛋白和 TLR4 蛋白表达趋势和基因表达趋势一致,且与对照组相比,表达水平差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ,见图 4C、D)。

图3 rno-miR-30b-5p 在两组大鼠脾脏和淋巴结中的表达

图4 IL-10、TLR4 mRNA 和蛋白在两组大鼠脾脏和淋巴结的表达水平。A:IL-10 mRNA 表达水平;B:TLR4 mRNA 表达水平;C:IL-10 蛋白表达水平;D:TLR4 蛋白表达水平

### 3 讨论

目前研究表明,葡萄膜炎的发生发展是涉及免疫、炎症等因素在内的多基因调控表达的复杂过程。多种因子的异常表达在葡萄膜炎的发生发展中起重要作用。最近的研究表明,miRNA 参与了调节生理或疾病状态中的多个进程,包括细胞死亡或凋亡、肿瘤的发生发展以及炎症反应等<sup>[4]</sup>。作为非编码 RNA,microRNA 通过与靶 mRNA 3' UTR 结合,降解靶基因或者抑制转录后的翻译水平<sup>[5-8]</sup>,进而影响细胞的分化、增殖和凋亡,并在生物生长发育和疾病发生发展过程中发挥重要的调节作用。如 miRNA 可以结合在免疫细胞的 TLRs 上,调控肿瘤的生长和迁移、诱发炎症应答或影响机体内在的免疫水平,并可通过调节 TLR/IL-1 受体的表达水平而影响炎症因子的表达<sup>[9-10]</sup>;miR-223 通过激活 PI3K/AKT 途径阻断 TLR4 信号通路,进而抑制动脉粥样硬化的发展<sup>[11]</sup>;在 TLR4 介导的单核细胞中,IL-10 诱导的 miRNA-187 可能通过负调节方式对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-12p40 的表达水平进行精密调节<sup>[12]</sup>。本研究通

过 miRNA 芯片进一步研究发现,与正常大鼠的淋巴细胞中的 miRNA 水平相比,EAU 大鼠的淋巴细胞中有多条 miRNA 表达发生异常。对这些有表达差异的 miRNA 调控的靶基因进行信号通路分析,发现这些 miRNA 可调控包括炎症因子、TLR、MAP3K 以及自噬基因等在内的多种信号通路,而 rno-miR-30b-5p 可能同时调控 TLR4、IL-10、IL-21R 等多种基因的表达进而影响葡萄膜炎的发生发展进程<sup>[3]</sup>。  
miRNA 通过与靶基因的 3' UTR 结合可以负调控其靶基因的表达,从而影响动物机体的发育,甚至调控疾病的发展进程。我们前期研究发现<sup>[13]</sup>,在已建立的葡萄膜炎大鼠外周血中存在 IL-17 和 IL-10 的表达,并且发现与正常大鼠相比,葡萄膜炎大鼠中 IL-10 的表达水平从第 4 天开始升高,在第 16 天时达到高峰。本研究结果发现,在 EAU 大鼠中 rno-miR-30b-5p 可以负调控 IL-10、TLR4 的表达,与对照组相比,rno-miR-30b-5p 在葡萄膜炎大鼠脾脏和淋巴结中的表达下降。表达下降的 rno-miR-30b-5p 无法与表达 IL-10 和 TLR4 基因的相关位点结合,从而不能有效抑制 IL-10 和 TLR4 的表达,致使脾脏和淋巴结中 IL-10 和

TLR4 的表达升高,进而影响 EAU 的发展进程。因此,miRNA 有可能成为治疗 EAU 的新靶点。

本研究成功构建了 IL-10、TLR4 质粒载体和突变质粒载体,并将其与 rno-miR-30b-5p mimic 成功转染到 293T 细胞中,通过 RT-PCR 扩增的目的基因和筛选的阳性菌落与理论长度一致,进而通过双荧光素酶验证了 rno-miR-30b-5p 对 IL-10 和 TLR4 有较明显的下调作用,对其预测靶位点进行突变后,突变型载体中的报告荧光也存在明显的下调作用,说明 rno-miR-30b-5p 可能并不是通过该位点起作用或许存在其他的结合位点。通过动物实验进一步验证了 rno-miR-30b-5p 对 IL-10、TLR4 的调控作用,在 EAU 大鼠脾脏和淋巴结中 rno-miR-30b-5p 显著的下调表达和 IL-10、TLR4 明显的上调表达,证实 IL-10 和 TLR4 是 rno-miR-30b-5p 调控的靶基因, rno-miR-30b-5p 可以负调控 IL-10、TLR4 的表达。该结果为进一步在体内外观察 rno-miR-30b-5p 对葡萄膜炎发生发展的影响和探究其分子机制奠定了基础。

# 参考文献

- [1] 王婧,卢弘. Toll 样受体 4 及其介导的信号转导与急性前葡萄膜炎[J]. 眼科新进展,2011,31(10):987-990.  
WANG J, LU H. Toll like receptor 4 and its mediated signal transduction with acute anterior uveitis[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2011, 31(10):987-990.
- [2] 王少程. 白细胞介素-10 对大鼠内毒素诱导的实验性葡萄膜炎的治疗作用[D]. 天津医科大学,2007.
- [7] CHIASSEU M, CUEVARGAS JL, DESTROISMAISONS L, VANDE VELDE C, LECLERC N, DIPOLO A. Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in glaucoma[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(21):5785-5798.
- [8] RUSSO R, CAVALIERE F, BERLIOCCI L, NUCCI C, GLIOZZI M, MAZZEI C, et al. Modulation of pro-survival and death associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade[J]. *J Neurochem*, 2008, 107(5):1347-1357.
- [9] 石慧,向艳,陈岚,陈志祺,李贵刚,张虹. 氯化锂治疗慢性青光眼神经退行性病变的作用机制[J]. 眼科新进展,2013,33(10):922-926.  
SHI H, XIANG Y, CHENG L, CHEN ZQ, LI GG, ZHANG H. The effective mechanism of Lithium chloride on treatment of chronic glaucoma about neural degenerative diseases[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2013, 33(10):922-926.
- [10] PEINEAU S, BRADLEY C, TAGHIBIGLOU C, DOHERTY A, BORTOLOTTI ZA, WANG YT, et al. The role of GSK-3 in synaptic plasticity[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1):S428-437.
- [11] LONG ZM, ZHAO L, JIANG R, WANG KJ, LUO SF, ZHENG M, et al. Valproic acid modifies synaptic structure and accelerates neurite outgrowth via the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signaling pathway in an Alzheimer's disease model[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(11):887-897.
- [12] D'ANGELO B, EK CJ, SUN Y, ZHU C, SANDBERG M, MALLARD C. GSK3 $\beta$  inhibition protects the immature brain from hypoxic-ischaemic insult via reduced STAT3 signalling[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101:13-23.
- [13] KING TD, JOPE RS. Inhibition of GSK3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress[J]. *Neuroreport*, 2005, 16(6):597-601.
- [14] CROWDER RJ, FREEMAN RS. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity is critical for neuronal death caused by inhibiting PI 3-kinase or Akt but not for death caused by NGF withdrawal[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44):34266-34271.
- [15] PAN YY, DENG Y, XIE S, WANG ZH, WANG Y, REN J, et al.

- WANG SC. The role of interleukin-10 in the treatment of experimental endotoxin-induced uveitis in rats [D]. Tianjin Medical University, 2007.
- [3] GUO D, LI J, LIU Z, TANG K, SONG H, BI H. Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(9):683-696.
- [4] CHEN XM. MicroRNA signatures in liver diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(14):1665-1672.
- [5] AMBROS V. MicroRNAs: tiny regulators with great potential [J]. *Cell*, 2001, 107(7):823-826.
- [6] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006):350-355.
- [7] HAWKINS PG, MORRIS KV. RNA and transcriptional modulation of gene expression[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(5):602-607.
- [8] WILLIAMS AE. Functional aspects of animal microRNAs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(4):545-562.
- [9] FABBRI M, PAONE A, CALORE F, GALLI R, GAUDIO E, SANTHANAM R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(31):E2110-E2116.
- [10] VIRTUE A, WANG H, YANG XF. MicroRNAs and toll-like receptor/interleukin-1 receptor signaling [J]. *Hematol Oncol*, 2012, 5(1):66.
- [11] WANG J, BAI X, SONG Q, FAN F, HU Z, CHENG G, et al. MIR-223 inhibits lipid deposition and inflammation by suppressing toll-like receptor 4 signaling in macrophages[J]. *Int J Mol Sci*, 2015 16(10):24965-24982.
- [12] ROSSATO M, CURTALE G, TAMASSIA N, CASTELLUCCI M, MORI L, GASPERINI S, et al. IL-10-induced micro-RNA-187 negatively regulates TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(45):E3101-E3110.
- [13] TANG K, GUO D, ZHANG L, GUO J, ZHENG F, SI J, et al. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$  T cells and associated inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3):2746-2754.
- Altered wnt signaling pathway in cognitive impairment caused by chronic intermittent hypoxia: focus on glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(7):838-845.
- [16] BHOWMIK M, KHANAM R, SAINI N, VOHORA D. Activation of AKT/GSK3 $\beta$  pathway by TDZD-8 attenuates kainic acid induced neurodegeneration but not seizures in mice[J]. *Neurotoxicology*, 2015, 46:44-52.
- [17] JIN N, YIN X, YU D, CAO M, GONG CX, IQBAL K, et al. Truncation and activation of GSK3 $\beta$  by calpain I: a molecular mechanism links to tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8187.
- [18] CHEN Y, SU Y, RUN X, SUN Z, WANG T, SUN S, et al. Pre-treatment of PC12 cells with 17 $\beta$ -estradiol prevents A $\beta$ -induced down-regulation of CREB phosphorylation and prolongs inhibition of GSK3 $\beta$ [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(3):394-401.
- [19] LIN CF, TSAI CC, HUANG WC, WANG YC, TSENG PC, TSAI TT, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and caspase-3 mediate ceramide- and etoposide-induced apoptosis by regulating the lysosomal-mitochondrial axis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0145460-0145473.
- [20] JEON GS, KIM JE, AHN SW, PARK KS, HONG YH, YE IH, et al. Effect of JGK-263 as a new glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitor on extrinsic apoptosis pathway in motor neuronal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(2):309-314.
- [21] MAQBOOL M, MOBASHIR M, HODA N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 107:63-81.
- [22] SACCÀ SC, GANDOLFI S, BAGNIS A, MANNI G, DAMONTE G, TRAVERSO CE, et al. From DNA damage to functional changes of the trabecular meshwork in aging and glaucoma [J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 29:26-41.
- [23] TANITO M, KAIJZU S, TAKAI Y, OHIRA A. Association between systemic oxidative stress and visual field damage in open-angle glaucoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25792.

(上接第 329 页)