

引文格式:车选义,赵清侠,李迪. siRNA 靶向沉默载脂蛋白2(Lcn 2)对缺氧诱导视网膜神经节细胞-5 细胞凋亡的作用及机制[J]. 眼科新进展,2017,37(11):1027-1031. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0260

【实验研究】

siRNA 靶向沉默载脂蛋白2(Lcn 2)对缺氧诱导视网膜神经节细胞-5 细胞凋亡的作用及机制

车选义 赵清侠 李迪

作者简介:车选义,男,1972年12月出生,硕士,副主任医师。研究方向:白内障、青光眼、眼眶整形;联系电话:18629304989;E-mail: xuanyiella@163.com; ORCID: 0000-0001-8057-0895

About CHE Xuan-Yi: Male, born in December, 1972. Master degree. Tel: 18629304989; E-mail: xuanyiella@163.com; ORCID: 0000-0001-8057-0895

收稿日期:2017-05-11

修回日期:2017-07-06

本文编辑:付中静

作者单位:710068 陕西省西安市,陕西省人民医院眼科,西安医学院(车选义);710068 陕西省西安市,陕西省人民医院手术室二部(赵清侠);710068 陕西省西安市,陕西省人民医院眼科(李迪)

Received date: May 11, 2017

Accepted date: Jul 6, 2017

From the Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Medical University (CHE Xuan-Yi), Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; Department of Second Operating Room, Shaanxi Provincial People's Hospital (ZHAO Qing-Xia), Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital (LI Di), Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

hypoxia group (all $P < 0.05$). Moreover, the fluorescence intensity of ROS in the hypoxia group (4.26 ± 0.63) was more enhanced than that in the control group (1.03 ± 0.11) ($P < 0.05$), and the siLcn2 + hypoxia group (3.10 ± 0.24) was lower than siNC + hypoxia group (4.73 ± 0.26) ($P < 0.05$). Furthermore, mitochondrial membrane potential, Cyto C expression and the relative ratio of Bax to Bcl-2 in the siLcn2 + hypoxia group was lower than those in the siNC + hypoxia group. **Conclusion** Lcn 2 gene silencing can inhibit cell apoptosis and ROS production induced by hypoxia, which may be achieved by suppressing mitochondrial apoptosis signaling pathway.

【中图分类号】 R774.1

【关键词】 载脂蛋白2;细胞凋亡;视网膜神经节细胞-5;线粒体凋亡通路

【摘要】 **目的** 研究载脂蛋白2(lipopalin 2, Lcn 2)对缺氧诱导视网膜神经节细胞-5(retinal ganglion cells, RGC-5)损伤的抑制作用及可能机制。**方法** 将RGC-5细胞置于缺氧环境下处理(0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h),采用实时定量PCR和Western blot法检测Lcn 2的表达水平。将细胞分为4组:对照组、缺氧组、siNC + 缺氧组(转染siRNA阴性对照后进行缺氧处理24 h)和siLcn 2 + 缺氧组(细胞转染Lcn 2 siRNA后进行缺氧处理24 h)。ELISA检测细胞凋亡率和Caspase-3活性,DCFH-DA试剂盒检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生情况,线粒体膜电位检测试剂盒评价线粒体膜电势,Western blot检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved-Caspase-3, c-Caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved-PARP, c-PARP)、Bax、Bcl-2和细胞色素C(cytochrome C, Cyto C)蛋白表达。**结果** 与0 h组相比,缺氧组(4 h, 8 h, 12 h, 24 h和48 h)Lcn 2 mRNA表达水平均升高(均为 $P <$

Effects of siRNA targeted Lcn2 gene silencing on cell apoptosis induced by hypoxia in RGC-5 cells and its mechanisms

CHE Xuan-Yi, ZHAO Qing-Xia, LI Di

【Key words】 lipocalin 2; cell apoptosis; retinal ganglion cells; mitochondrial apoptosis signaling pathway

【Abstract】 **Objective** To investigate the roles and mechanisms of siRNA targeted lipocalin 2 (Lcn 2) gene silencing on hypoxia-induced cell apoptosis in retinal ganglion cells (RGC-5). **Methods** RGC-5 cells were subjected to hypoxic condition for various time duration (0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h), and quantitative real-time PCR and Western blot were used to evaluate the expression of Lcn 2 in mRNA and protein levels.

Cells were divided into 4 groups: control group, hypoxia group, siNC + hypoxia group, in which cells were transfected with negative control for siRNA, and then subjected to hypoxic condition for 24 h, and siLcn 2 + hypoxia group, in which cells were transfected with Lcn 2 siRNA, and then subjected to hypoxic condition for 24 h). Next, cell apoptotic rate and Caspase-3 activity were detected using ELISA. The fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) was assayed using DCFH-DA kit, and mitochondrial membrane potential assay kit was used to evaluate the mitochondrial membrane potential. Finally, the expression levels of cleaved-Caspase-3 (c-Caspase-3), cleaved-PARP (c-PARP), Bax, Bcl-2 and cytochrome C (Cyto C) were detected using Western blot.

Results In the hypoxia group, Lcn 2 mRNA level at 4 h, 8 h, 12 h, 24 h and 48 h was higher than that at 0 h (all $P < 0.05$). Meanwhile, Lcn 2 protein level at 12 h, 24 h and 48 h was also higher than that at 0 h (all $P < 0.05$). Cell apoptotic rate in the hypoxia group ($138.33\% \pm 13.76\%$) was significantly higher than that in the control group ($99.66\% \pm 2.86\%$) ($P < 0.05$), and siLcn 2 + hypoxia group ($105.02\% \pm 8.60\%$) was lower than siNC + hypoxia group ($142.33\% \pm 6.54\%$) ($P < 0.05$). In addition, compared with the control group, the relative activity of Caspase-3 and the relative expression of c-Caspase-3 and c-PARP in the hypoxia group were all upregulated (all $P < 0.05$); whereas the relative activity of Caspase-3 and the relative expression of c-Caspase-3 and c-PARP in the siLcn2 + hypoxia group were downregulated compared with the siNC +

0.05),同时缺氧组(12 h、24 h和48 h)的Lcn 2蛋白表达水平均较0 h组升高(均为 $P < 0.05$)。与对照组细胞凋亡率(99.66% ± 2.86%)比较,缺氧组(138.33% ± 13.76%)显著升高($P < 0.05$);siLcn 2 + 缺氧组细胞凋亡率(105.02% ± 8.60%)较siNC + 缺氧组(142.33% ± 6.54%)显著下降($P < 0.05$)。此外,缺氧组较对照组Caspase-3相对活性增强、c-Caspase-3和c-PARP表达均上调(均为 $P < 0.05$),与siNC + 缺氧组比较,siLcn 2 + 缺氧组Caspase-3相对活性水平、c-Caspase-3和c-PARP相对表达水平均降低(均为 $P < 0.05$)。与对照组ROS相对荧光强度(1.03 ± 0.11)比较,缺氧组(4.26 ± 0.63)增强($P < 0.05$),siLcn 2 + 缺氧组ROS相对荧光强度(3.10 ± 0.24)较siNC + 缺氧组(4.73 ± 0.26)显著减弱($P < 0.05$)。且siLcn 2 + 缺氧组较siNC + 缺氧组线粒体膜电势增加、Cyto C蛋白表达水平及Bax和Bcl-2相对比率减少(均为 $P < 0.05$)。结论 沉默Lcn 2抑制缺氧诱导的细胞凋亡及ROS产生,可能是通过抑制线粒体凋亡信号通路实现的。

青光眼已经被世界卫生组织列为第二位致盲眼病^[1]。2013年,全球青光眼患者人数约为6430万,预计在2020年将增加至7600万,2040年估计增加至1亿^[2]。目前临床上对青光眼的治疗普遍以降低眼压为主,多采用手术和药物保守治疗^[3],但对有些患者手术治疗的效果仍不理想^[4],因此,积极寻找防治青光眼的分子或者技术很有必要。

载脂蛋白2(lipocalin 2,Lcn 2)是lipocalin超家族的一个小分子蛋白,也称中性粒细胞明胶Lcn 2^[5]。研究显示,Lcn 2在青光眼小鼠视网膜及视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGC)层中表达显著升高^[6-7],但Lcn 2对缺氧诱导RGC-5凋亡的作用尚未见报道。本研究采用siRNA沉默Lcn 2探讨其对缺氧诱导的RGC-5细胞凋亡的作用及可能机制,为Lcn 2在眼科疾病中的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RGC-5细胞(ATCC公司,美国);DMEM培养基及胎牛血清(Hyclone公司,美国);细胞凋亡检测试剂盒Cell Death Detection ELISA试剂盒(罗氏,德国);Caspase-3活性检测试剂盒Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit(BioVision,美国);反转录试剂盒(Promega,美国);SYBR Green PCR Master Mix试剂盒(Qiagen,德国);Lcn 2抗体(RD公司,美国)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved-Caspase-3,c-Caspase-3)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved-PARP,c-PARP)、Bax、Bcl-2、细胞色素C(cytochrome C,Cyto C)抗体(CST公司,美国);BCA蛋白浓度检测和线粒体膜电势检测(JC-1)试剂盒(碧云天,中国);Rizol试剂盒和DCFH-DA试剂盒(Invitrogen公司,美国);蛋白印迹二抗(中杉金桥,中国);Lcn 2 siRNA及阴性对照(ABI公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

RGC-5细胞使用DMEM培养基培养(加体积分数10%胎牛血清、10 g · L⁻¹青霉素和链霉素),置体积分数5% CO₂、37 °C细胞培养箱中培养。每3~4 d胰蛋白酶消化传代。RGC-5细胞首先置于体积分数5% O₂、5% CO₂、90% N₂、37 °C分别培养4 h、8 h、12 h、24 h和48 h,检测Lcn 2的表达水平。以缺氧环境下培养24 h为诱导条件,RGC-5细胞分为4组:(1)对照组:不做任何处理的空白对照组;(2)缺氧组:细胞于缺氧环境下培养24 h;(3)siNC +

缺氧组:细胞经转染siRNA阴性对照48 h后于缺氧环境下培养24 h;(4)siLcn 2 + 缺氧组:细胞经转染Lcn 2 siRNA 48 h后于缺氧环境下培养24 h。

1.2.2 细胞凋亡的检测

细胞接种于96孔板中,采用Lipofactamine™ 2000将siNC和siLcn 2转染至细胞中48 h,然后于缺氧环境下继续培养24 h。严格按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,检测细胞的凋亡率。将对照组凋亡率设为100%,其他组别均为相对值。

1.2.3 Caspase-3活性检测

待各组细胞处理结束后,收集细胞,严格按照Caspase-3活性检测试剂盒说明书检测细胞中Caspase-3活性。实验结束时,用50 μL裂解液裂解细胞10 min,加入2 × 反应缓冲液(50 μL)和5 μL反应底物,于37 °C孵育1.5 h。设置多功能酶标仪的发射波长为400 nm,激发波长为505 nm,采集各组细胞荧光强度数值。

1.2.4 ROS的检测

细胞接种于6孔板中,待各组细胞处理结束后,弃培养基,采用PBS缓冲液清洗细胞3次,加入10 μmol · L⁻¹ DCFH-DA于37 °C孵育30 min,于倒置荧光显微镜下观察细胞ROS的产生,最后采用IPP软件对相对荧光强度进行统计分析。

1.2.5 线粒体膜电势的检测

细胞接种于6孔板中,待各组细胞处理结束后,弃培养基,加入1 mL染色工作液,于37 °C孵育箱中孵育20 min,反应结束后,用现配的染色缓冲液洗涤2次,加入2 mL细胞培养液,荧光显微镜下观察并统计线粒体膜电势的变化。

1.2.6 实时定量PCR检测

采用Trizol试剂按照说明书操作提取细胞总RNA,并测定浓度,5 μg反转录合并cDNA,采用SYBR Green试剂盒检测Lcn 2的mRNA水平,反应条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,72 °C 10 min,循环30次。每组设3个复孔。Lcn 2的引物序列为:正向:5'-GACTCAACT-CAGAACTTGATCCCT-3',反向:5'-AGCTCTGTATCT-GAGGGTAGCTGT-3';β-actin的引物序列为:正向:5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3',反向:5'-AAA-GAAAGGGTGTAAAACGCA-3'。

1.2.7 Western blot测定Lcn 2等蛋白表达

提取各组细胞总蛋白,采用BCA试剂盒检测蛋白浓度,各孔50 μg上样量进行SDS-PAGE电泳,转膜。50 g · L⁻¹脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗后,于4 °C孵育过夜。洗涤后加入二抗室温孵育1 h,漂洗后显色,在暗室进行显影和定影,扫描后采用ImageJ

分析各个条带的光密度值。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0统计学软件处理数据,数据以均数±标准差表示,多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧诱导 Lcn 2 表达上调 Lcn 2 mRNA 表达水平见图 1,缺氧组 4 h (2.59 ± 0.34)、8 h (2.64 ± 0.47)、12 h (3.44 ± 0.37)、24 h (4.26 ± 0.29) 和 48 h (4.35 ± 0.39) 与 0 h 组 (0.97 ± 0.10) 相比,Lcn 2 mRNA 水平随着缺氧时间的延长逐渐升高(均为 $P < 0.05$;图 1A)。此外,Western blot 检测结果表明,缺氧组 12 h (2.73 ± 0.38)、24 h (3.16 ± 0.28) 和 48 h (3.66 ± 0.30) 与 0 h (1.01 ± 0.10) 相比,Lcn 2 蛋白表达水平均显著上调(均为 $P < 0.05$;图 1B),说明缺氧诱导 Lcn 2 表达上调。

2.2 沉默 Lcn 2 抑制细胞凋亡 四组间细胞凋亡率差异有统计学意义($F = 12.43, P = 0.002$;图 2A);两两比较结果表明:与对照组($99.66\% \pm 2.86\%$)比较,缺氧组($138.33\% \pm 13.76\%$)显著升高($P < 0.05$),siLcn 2 + 缺氧组($105.02\% \pm 8.60\%$)较 siNC + 缺氧组($142.33\% \pm 6.54\%$)显著下降($P < 0.05$)。四组间 Caspase-3 相对活性差异具有统计学意义($F = 42.81, P = 0.000$;图 2B);两两比较结果表明:与对照组(1.03 ± 0.06)比,缺氧组(3.59 ± 0.41)增强($P < 0.05$),siLcn 2 + 缺氧组(2.01 ± 0.21)较 siNC + 缺氧组(3.56 ± 0.26)减弱($P < 0.05$)。四组间 c-PARP 相对蛋白表达差异有统计学意义($F = 45.68, P = 0.000$;图 2C);两两比较结果显示:与对照组(1.22 ± 0.05)比较,缺氧组(2.83 ± 0.16)显著

升高($P < 0.05$),siLcn 2 + 缺氧组(2.19 ± 0.11)较 siNC + 缺氧组(3.15 ± 0.28)降低($P < 0.05$)。四组间 c-Caspase-3 蛋白相对表达差异具有统计学意义($F = 42.81, P = 0.000$;图 2C);两两比较结果表明:与对照组(1.03 ± 0.03)比较,缺氧组(4.20 ± 0.45)升高($P < 0.05$),siLcn 2 + 缺氧组(2.52 ± 0.27)较 siNC + 缺氧组(3.93 ± 0.35)降低($P < 0.05$)。

2.3 沉默 Lcn 2 抑制 ROS 产生 四组间 ROS 相对荧光强度差异具有统计学意义($F = 39.92, P = 0.000$;图 3);两两比较结果表明:与对照组(1.03 ± 0.11)比较,缺氧组(4.26 ± 0.63)增强($P < 0.05$),siNC + 缺氧组(4.73 ± 0.26)与缺氧组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。siLcn 2 + 缺氧组(3.10 ± 0.24)较 siNC + 缺氧组 ROS 显著减弱($P < 0.05$)。

图 1 Lcn 2 的 mRNA 和蛋白表达。A:实时定量 PCR 检测 Lcn 2 mRNA 水平的表达;B:Western blot 法检测 Lcn 2 蛋白水平的表达;与 0 h 组相比,* $P < 0.05$

图 2 Lcn 2 对 RGC-5 细胞凋亡的作用。A:ELISA 检测细胞凋亡率;B:ELISA 检测 Caspase-3 活性;C:Western blot 法检测 c-Caspase-3 和 c-PARP 表达水平。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 siNC + 缺氧组比较,# $P < 0.05$

2.4 Lcn 2 对线粒体凋亡通路的作用 四组间线粒体膜电势差异具有统计学意义($F = 35.30, P = 0.000$;图 4A);两两比较结果表明:与对照组(99.35 ± 2.94)相比,缺氧组(46.21 ± 6.16)减少($P < 0.05$);siNC + 缺氧组(38.05 ± 9.41)与缺氧组相比,线粒体膜电势差异无统计学意义($P > 0.05$);

siLcn 2 + 缺氧组(75.67 ± 6.54)较 siNC + 缺氧组增加($P < 0.05$)。四组间 Cyto C 蛋白相对表达差异具有统计学意义($F = 25.42, P = 0.000$;图 4B-4C);两两比较结果表明:与对照组(1.01 ± 0.14)比较,缺氧组(3.13 ± 0.57)表达水平显著增加($P < 0.05$);siNC + 缺氧组(3.80 ± 0.21)与缺氧组差异无统计学

意义($P > 0.05$); siLcn 2 + 缺氧组(2.16 ± 0.26)较 siNC + 缺氧组减少($P < 0.05$)。四组间 Bax/Bcl-2 相对比率差异具有统计学意义($F = 23.69, P = 0.000$;图 4D); 两两比较结果表明:与对照组(0.95 ± 0.12)比较,缺氧组(4.86 ± 0.97)升高($P < 0.05$); siNC + 缺氧组(5.50 ± 0.61)与缺氧组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); siLcn 2 + 缺氧组(2.76 ± 0.32)较 siNC + 缺氧组降低($P < 0.05$)。

图3 Lcn 2 对 ROS 的作用。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 siNC + 缺氧组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

本研究发现,Lcn 2 随着缺氧时间的延长其 mRNA 和蛋白表达逐渐升高,表明 Lcn 2 在 RGC-5 细胞缺氧介导细胞损伤中可能发挥重要作用。有学者发现 Lcn 2 在青光眼小鼠视网膜中表达上调^[6],且在急性缺血及缺氧条件下,Lcn 2 表达显著上调^[8],本研究结果与其一致,即缺氧激活 Lcn 2 表达。

Lcn 2 在细胞凋亡中有重要作用,有文献报道 Lcn 2 促进人体皮脂腺细胞^[9]、心肌细胞^[10]、肝癌细胞^[11]凋亡。过表达 Lcn 2 促进神经元细胞和神经母细胞瘤细胞死亡^[12]。本研究发现沉默 Lcn 2 缺氧诱导的细胞凋亡率下降。但是也有文献报道,Lcn 2 缺失促进肝脏细胞凋亡^[13],Lcn 2 抑制氧化应激介导的肺动脉平滑肌细胞凋亡^[14],表明 Lcn 2 在细胞凋亡中的作用取决于细胞的种类及损伤模型,这种差异可能因为 Lcn 2 在不同的病理条件下调控不同信号通路引起的。Caspase-3 是细胞凋亡过程中早期关键的执行分子,激活的 Caspase-3 能够剪切细胞凋亡过程中的多种关键蛋白,其中 PARP 是最早鉴定出的 Caspase-3 的底物^[15]。本研究发现,沉默 Lcn 2 使

图4 Lcn 2 对线粒体凋亡信号通路作用。A:线粒体膜电势试剂盒检测线粒体膜电势;B、C:Western blot 法检测 Cyto C 蛋白表达;B、D: Western blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达,并计算 Bax/Bcl-2 比率。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 siNC + 缺氧组比较, # $P < 0.05$

Caspase-3 活性减弱、c-Caspase-3 和 c-PARP 蛋白表达减少。这些结果进一步证实 Lcn 2 缺失抑制缺氧诱导 RGC-5 细胞凋亡。

ROS 是生物体需氧细胞在代谢过程中产生的一系列衍生物,包括氧离子、过氧化氢和含氧自由基等,在线粒体凋亡通路中有重要作用^[16]。过量的 ROS 引起脂质过氧化,导致线粒体通透性转换孔打开,释放 Cyto C,启动凋亡信号通路^[17]。本研究发现 Lcn 2 缺失导致细胞中 ROS 显著减少,本研究结果与 Wu 等^[18]报道一致,即 Lcn 2 促进 ROS 产生。

Bcl-2 蛋白家族在调控细胞凋亡中发挥重要作用,促凋亡蛋白 Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的比例是调控凋亡的关键分子。在肝癌细胞中 Lcn 2 通过激活线粒体凋亡通路、上调 Bax/Bcl-2 诱导细胞凋亡^[11],且有研究表明,在心肌细胞中 Lcn 2 促进 Bax 向线粒

体膜上转移^[11]。与这些研究结果一致,本实验证实 Lcn 2 缺失阻碍线粒体膜电势去极化、下调 Cyto C 和 Bax 表达、上调 Bcl-2 表达,表明沉默 Lcn 2 抑制 RGC-5 细胞线粒体凋亡信号通路。

综上,Lcn 2 缺失抑制缺氧诱导 RGC-5 细胞凋亡及 ROS 产生,可能通过抑制线粒体凋亡信号通路实现,这一结果为 Lcn 2 在眼科疾病防治中奠定理论基础并为青光眼等眼科疾病的基因治疗提供新的思路。

参考文献

[1] 葛坚. 我国近五年青光眼临床与基础研究进展[J]. 中华眼科杂志,2005,41(8):710-716.
GE J. Recent advances of clinical and basic studies in glaucoma in China in the last five years[J]. Chin J Ophthalmol, 2005,41(8):710-716.
[2] THAM YC, LI X, WONG TY, QUIGLEY HA, AUNG T, CHENG

- CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11):2081.
- [3] 李晓鹏, 高建伟, 王爽, 李彦, 刘静. 白内障超声乳化联合人工晶状体植入术治疗原发性闭角型青光眼合并白内障临床疗效观察[J]. *新乡医学院学报*, 2015, 35(2):169-170.
- LI XP, GAO JW, WANG S, LI Y, LIU J. Clinical effect of phacoemulsification combined with intraocular lens implantation in management of primary angle-closure glaucoma with cataract[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2015, 35(2):169-170.
- [4] 任朋亮, 范雪娇, 杨晓龙, 刘明佳, 刘戟, 黄晶晶. SIRT1 增强青光眼小梁网细胞 DSBs 修复能力及抗细胞衰老的研究[J]. *四川大学学报医学版*, 2014, 45(4):572-577.
- REN PL, FAN XJ, YANG XL, LIU MJ, LIU J, HUANG JJ. SIRT1 promote GTM cell DSBs repair and resist cellular senescence [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, 2014, 45(4):572-577.
- [5] MOSCHEN AR, ADOLPH TE, GERNER RR, WIESER V, TILG H. Lipocalin-2; a master mediator of intestinal and metabolic inflammation[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(5):388-397.
- [6] STEELE MR, INMAN DM, CALKINS DJ, HORNER PJ, VETTER ML. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3):977-985.
- [7] GUO Y, JOHNSON EC, CEPURNA WO, DYCK JA, DOSER T, MORRISON JC. Early gene expression changes in the retinal ganglion cell layer of a rat glaucoma model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3):1460-1473.
- [8] JIANG W, CONSTANTE M, SANTOS MM. Anemia upregulates lipocalin 2 in the liver and serum[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 41(2):169-174.
- [9] NELSON AM, ZHAO W, GILLILAND KL, ZAENGLEIN AL, LIU W, THIBOUTOT DM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin mediates 13-cis retinoic acid-induced apoptosis of human sebaceous gland cells[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4):1468-1478.
- [10] XU G, AHN J, CHANG S, EGUCHI M, OGIER A, HAN S, et al. Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7):4808-4817.
- [11] CHIEN MH, YING TH, YANG SF. Lipocalin-2 induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through activation of mitochondria pathways[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 64(3):177-186.
- [12] LEE S, LEE WH, LEE MS, MORI K, SUK K. Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell death, migration, and morphology[J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(3):540-550.
- [13] ERAWAN BK, EDDY VDL, ZIMMERMANN HW, KARLIN RAJA K, LIDIA T, UTE H, et al. Protective effects of lipocalin-2 (Lcn 2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(5):660-673.
- [14] GUOLIANG WANG XL, LIUKUN MENG, SHENGHUA LIU, LI WANG, JUN LI, CHUANJUE CUI, et al. Up-Regulated Lipocalin-2 in Pulmonary Hypertension Involving in Pulmonary Artery SMC Resistance to Apoptosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(7):798-806.
- [15] 王玲, 单保恩, 桑梅香, 连易水, 王彬, 丁春艳. 靶向沉默 p65 基因对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖及凋亡的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(10):1742-1747.
- WANG L, SHAN BE, SANG MX, LIAN YS, WANG B, DING CY. Effect of micro RNA-mediated p65 gene silencing on the proliferation and apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *J South Med Univ*, 2011, 31(10):1742-1747.
- [16] 吕娟娟, 陈志江, 郑贵浪, 王斌, 陶少华, 项丹, 等. 脓毒症相关性脑病远期脑线粒体损伤与氧化应激的关系[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(11):860-862.
- LV JJ, CHEN ZJ, ZHEGN GL, WANG B, TAO SH, XIANG D, et al. Study of long-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a sepsis-associated encephalopathy model [J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2015, 30(11):860-862.
- [17] 易健, 舒徐. 活性氧对细胞凋亡和增殖的调控作用[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(10):1341-1344.
- YI J, SHU X. The regulation of cell apoptosis and proliferation by reactive oxygen species[J]. *Bas & Clin Med*, 2013, 33(10):1341-1344.
- [18] WU L, DU Y, LOK J, LO EH, XING C. Lipocalin-2 enhances angiogenesis in rat brain endothelial cells via reactive oxygen species and iron-dependent mechanisms[J]. *J Neurochem*, 2015, 132(6):622-628.

《眼科新进展》杂志征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于1980年,大16开,100页,国内外公开发行。1999年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000年被美国《化学文摘》收录,2001年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自2002年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自2008年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009年入选WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为RCCSE中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价10.00元,全年定价120.00元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道601号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404;E-mail:ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com;网址:http://www.ykxjz.com