基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001356

腺苷受体在原代培养人视网膜色素上皮细胞中的表达研究

万文娟[1]，崔冬梅[2]，曾骏文[2]，李　琦[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院眼科、眼科学重庆市市级重点实验室、重庆市眼科研究所，重庆　400016；
2. 眼科学国家重点实验室、中山大学中山眼科中心，广州　510060）

【摘　要】**目的**：验证腺苷受体（adenosine receptors，ADORs）在原代培养的人视网膜色素上皮细胞（retinal pigment epithelium cells，RPE）的表达及其分布。**方法**：体外原代培养人 RPE 细胞。通过逆转录多聚酶链反应（transcription polymerase chain reaction，RT-PCR）检测 RPE 细胞中 ADORs 信使核糖核酸（messenger ribonucleic acid，mRNA）的表达情况，通过共聚焦免疫荧光法（confocal fluorescence microscopy，CFM）验证 ADORs 蛋白的表达并检测各亚型在 RPE 细胞内的分布。**结果**：在原代培养的 RPE 细胞中，ADORs 亚型 A1（adenosine receptors A1，ADORA1），ADORs 亚型 A2a（adenosine receptors A2a，ADORA2a）和 ADORs 亚型 A2b（adenosine receptors A2b，ADORA2b）的 mRNA 及蛋白均有表达。ADORA1 在 RPE 细胞的细胞核、核周及细胞质内均有表达，ADORA2a 集中表达于 RPE 细胞核周及细胞质，ADORA2b 在细胞核、核周及细胞质中强表达。ADORs 亚型 A3（adenosine receptors A3，ADORA3）在原代培养的 RPE 细胞中无表达。**结论**：原代培养 RPE 中均有腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b 表达。腺苷受体各亚型在细胞内的不同表达位置可能提示了腺苷受体各亚型的不同功能。

【关键词】视网膜色素上皮细胞；原代培养；腺苷受体
【中图分类号】R771　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-03-16

Expression of adenosine receptors in human retinal pigment epithelium cells primary cultured *in vitro*

Wan Wenjuan[1]，*Cui Dongmei*[2]，*Zeng Junwen*[2]，*Li Qi*[1]

（*1. Ophthalmology Department，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University，Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology，Chongqing Eye Institute；2. State Key Laboratory of Ophthalmology，Zhongshan Ophthalmic Center，Sun Yat-sen University*）

【Abstract】***Objective***：To determine the distribution of adenosine receptors（ADORs）in primary cultured human retinal pigment epithelium（RPE）cells. ***Methods***：Human RPE cells were primary cultured in vitro. ADORs messenger ribonucleic acid（mRNA）in RPE was detected by reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）. Confocal fluorescence microscopy was used to confirm the protein expression and study the subcellular distribution of ADORs. ***Results***：Adenosine receptors A1，A2a and A2b（ADORA1，ADORA2a and ADORA2b）mRNA and protein were expressed in primary cultured RPE cells. The ADORs subtypes were differently distributed within the cells. ADORA1 was expressed in nucleus，perinucleus and cytoplasm of RPE. ADORA2a was concentrated mainly in perinucleus and cytoplasm. ADORA2b was strongly expressed in the nucleus，perinucleus and the cytoplasm. Adenosine receptors A3（ADORA3）was barely expressed in the primary cultured RPE cells. ***Conclusion***：ADORA1，ADORA2a，ADORA2b are expressed in human RPE cells primary cultured *in vitro*. The different distributions at the subcellular level suggests different functions of ADOR subtypes.

【Key words】human retinal pigment epithelium cells；primary culture；adenosine receptors

视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium，RPE）在视网膜与巩膜间发挥调节生物合成以及平衡细胞外基质环境的作用[1]，并在脉络膜和视网膜之间传递神经递质和细胞因子[1-2]，从而影响眼球生长相关功能[3]，最终调节包括巩膜在内的眼球生长[4]。

腺苷对维持眼的正常生理功能发挥着重要作用，其中包括调节眼内压力[5]、转运角膜内皮离子[6]，调节视网膜乙酰胆碱、多巴胺和谷氨酸的释放[7-9]，以及调节视网膜及脉络膜血流[10]，参与视网膜暗适

作者介绍：万文娟，Email：wanwenjuancqums@163.com，
研究方向：白内障，屈光不正。
通信作者：李　琦，Email：172349521@qq.com。
基金资助：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：81300794）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170630.1028.002.html（2017-06-30）

应过程[11]。腺苷受体(adenosine receptors,ADORs)属于鸟嘌呤核苷酸与 G 蛋白偶联受体家族,包括 A1、A2a、A2b 和 A3(adenosine receptors A1/A2a/A2b/A3,ADORA1/ADORA2a/ADORA2b/ADORA3)四类受体亚型[12]。腺苷通过激活并结合细胞表面的特异性 ADORs而发挥其在眼部的调节作用[13]。

本课题组推测腺苷通过 ADORs 参与 RPE 的平衡和调节功能,但目前尚无直接的证据证实ADORs 在原代培养人 RPE 细胞中的表达。本研究拟分离培养原代人 RPE 细胞,同时进行体外培养和扩增,探究人 RPE 细胞中 ADORs 各亚型的表达及其分布特点。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本研究获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。取眼库角膜移植后供体眼球(无眼部疾病)2 只,均于死后 24 h 内取材。

1.2 RPE 细胞分离及培养

将眼球用 200 IU/mL 的庆大霉素生理盐水浸泡消毒 5 min,环形剪开眼球,去除角膜等眼前节组织及视网膜和玻璃体组织,并将眼球后段制成眼杯,放于准备好的眼托(橡胶瓶塞)中固定,吸取少许无菌 PBS 液清洗眼杯 2 次后,加入 2/3 眼杯体积 0.25%胰蛋白酶放于 37 ℃细胞培养箱中消化 30 min,吸去消化液,加入培养液终止消化,吸管吹打眼球内壁,收集眼杯内细胞悬液 1 500 r/min × 5 min 离心,弃上清。加入 20%胎牛血清的培养液,重新悬浮后接种于细胞培养瓶皿。原代培养出的人 RPE 细胞培养于 10%胎牛血清的培养液中。细胞于 37 ℃,5%CO_2 培养箱中培养,培养液每 2~3 天更换 1 次。

1.3 原代培养的人 RPE 的组织化学鉴定

细胞传代时接种于消毒后的盖玻片上,待细胞爬满玻片后取出,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)漂洗 3 遍;4%多聚甲醛溶液固定 10 min;PBS 溶液漂洗 5 min × 3 次;3%H_2O_2 溶液孵育 10 min 以阻断内源性过氧化氢酶;5%山羊血清(含 0.5% Triton X-100)室温 20 min;1:100 兔抗人角蛋白抗原单克隆抗体 4 ℃过夜;阴性对照片用 PBS 代替一抗;PBS 溶液漂洗 5 min × 3 次;1:100 羊抗兔 IgG 室温 30 min;PBS 溶液漂洗 5 min × 3 次;滴 DAB 显色剂数秒,在显微镜下观察至着色后用蒸馏水终止显色;苏木素对比染色;流水充分冲洗去除多余苏木素;中性树脂封片观察。

1.4 逆转录聚合酶链式反应

逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)分析 RPE 细胞中腺苷受体信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)水平的表达。加入 1 mL TRIZol(Invitrogen,CA),按说明书提取总 RNA。所有提取的 RNA 标本的纯度及含量通过取出 1 μL 标本经紫外分光光度计测定得出。按逆转录试剂盒说明进行逆转录反应。分别对 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b、ADORA3 以及内参照 β-actin 基因进行扩增。各基因引物序列及片段长度见表 1。反应条件:94 ℃、3 min 预变性,94 ℃、30 s,引物不同解链温度不同(ADORA1、ADORA2b 受体 55 ℃、30 s,ADORA2a、ADORA3 受体 60℃、30 s),72℃、45 s,共 30 个循环,72 ℃延伸 10 min。制备 2%琼脂糖凝胶,取扩增产物 8 μL,加入溴酚蓝上样缓冲液少许,混匀后上样,水平电泳槽电压调至 100 V,电泳 30 min。采用紫外与可见分析装置观察扫描凝胶各条带。测量各条带的面积灰度值,以每例标本的目的电泳条带面积灰度值与内参照 β-actin 电泳带面积灰度值之比作为该例标本目的基因表达的相对值。

表 1 RT-PCR 中腺苷受体和 β-Actin 上下游引物序列及片段长度

Tab.1 Primer sequence and lengths of ADORs and β-Actin

基因	上下游引物序列	片段长度(bp)
ADORA1	正义链: 5'-CCTCCATCTCAGCTTTCCAG-3'	222
	反义链: 5'-AGTAGGTCTGTGGCCCAATG-3'	
ADORA2a	正义链: 5'-CCTTCATCTACGCCTACCG-3'	271
	反义链: 5'-TGGGACTCTTGGGCACTC-3'	
ADORA2b	正义链: 5'-CTCCATCTTCAGCCTTCTGG-3'	234
	反义链: 5'-ACAAGGCAGCAGCTTTCATT-3'	
ADORA3	正义链: 5'-GACACAGGGAACCAGCTCAT-3'	199
	反义链: 5'-TGCAGCTTCTGGTTTTGTTG-3'	
β-actin	正义链: 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'	186
	反义链: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAG-3'	

1.5 共聚焦荧光显微镜

共聚焦荧光显微镜(confocal fluorescence microscopy,CFM)检测 RPE 细胞中腺苷受体蛋白表达水平的表达。在 6 孔板中放入无菌盖玻片,细胞传代到以 1×10^3 密度在 6 孔板中培养至细胞密度 80%~90%。冷丙酮固定,3%H_2O_2 溶液阻断内源性过氧化物酶的活性。羊血清封闭 10 min。加一抗鼠抗人 ADORA1 抗体、ADORA2a 抗体、ADORA2b 抗体、ADORA3 抗体(1:500 PBS 稀释),阴性对照片则用 PBS 替代抗体,4 ℃冰箱湿盒内孵育过夜。1%BSA(溶于 PBS)的荧光二抗30~45 min(避光、暗室、室温)。PI 染核 10 min,吸去 PI,抗荧光衰减封片剂封片,保存在暗盒内。激光共聚焦显微镜下观察,拍照。实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 原代培养人 RPE 细胞及免疫细胞化学鉴定

原代培养的人 RPE 细胞呈扁平或多角形,细胞质内富含棕褐色色素颗粒,2~3 周细胞生长达铺满状态。细胞传 2~4 代后,色素颗粒逐渐减少,细胞呈梭形或不规则形。抗细胞角蛋白免疫化学检测,见所有培养的细胞胞浆均呈棕黄色着色,胞核由于苏木素复染,呈蓝色,阳性率达 100%,说明培养细胞为 RPE 细胞(图 1)。



图 1 原代培养人 RPE 细胞鉴定(200×)

Fig.1 Identification of primary cultured RPE cells(200×)

2.2 RT-PCR 检测原代培养人 RPE 细胞中腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b、ADORA3 的 mRNA 表达

原代培养人 RPE 细胞中均有腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2bmRNA 表达，其中 ADORA2b mRNA 强表达，未见 ADORA3 mRNA 表达(图 2，图 3)。ADORA1、ADORA2a、ADORA2b、ADORA3 产物及内参物 β-actin 片段长度分别为 222、271、234、199 和 186 bp。



图 2 RT-PCR 检测原代培养人 RPE 细胞中腺苷受体各亚型 mRNA 表达结果

Fig.2 Subtypes of ADORs mRNA expressed in primary cultured human RPE cells in RT-PCR

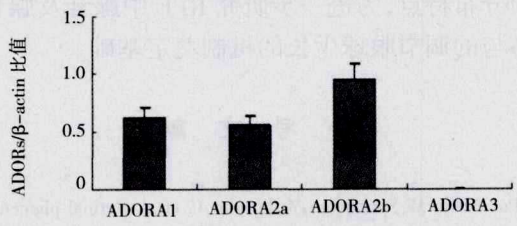


图 3 ADORs 各亚型与 β-actin 的 mRNA 表达灰度比值图

Fig.3 mRNA level revealed by gray scale ratio between ADORs subtypes and β-actin

2.3 荧光免疫细胞化学检测原代培养人 RPE 细胞中腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b、ADORA3 的蛋白表达及分布

用荧光免疫细胞化学法进一步证实腺苷受体各亚型在原代培养人 RPE 细胞中的表达及分布特点。原代培养人 RPE 细胞中均有腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b 蛋白表达，其中 ADORA2b 蛋白强表达，未见 ADORA3 蛋白表达。ADORA1 分布于细胞核、核周及细胞质，ADORA2a 主要分布于细胞核及细胞质，ADORA2b 强表达于细胞核、核周和细胞质(图 4)。

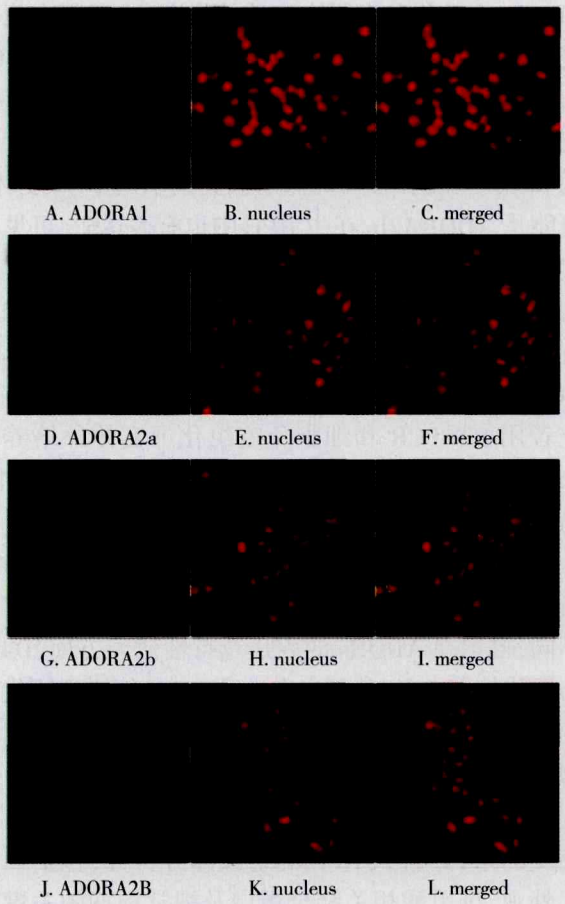


图 4 CFM 检测原代培养人 RPE 细胞中腺苷受体各亚型蛋白表达及分布特点(400×)

Fig.4 Expression and distribution characteristics of ADORs protein in human RPE cells revealed by CFM(400×)

3 讨 论

RPE 细胞参与合成、分泌多种细胞因子，同时表达大多数细胞因子受体[14]，在促进眼球的生长和发育、保护神经细胞以及维持眼内的免疫状态方面均发挥作用。在 RPE 细胞中，腺苷参与了一系列生理和病理活动，如调节光感受器-视锥杆细胞外节吞噬作用、Ca^{2+}离子流动及跨 RPE 的液体流动[15-16]，调节基底膜电位和光诱发反应[17]以及促进血管内皮生长因子的合成[18]等。本研究验证了 ADORs 各亚型在原代培养人 RPE 中的表达和分布特点，提示ADORs 可能参与 RPE 的调节作用。

本研究发现腺苷受体 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b 在原代培养的人 RPE 细胞中表达，而 ADORA3 未见表达，给 ADORs 在原代培养人 PRE 细胞中的表达提供了全面直接的证据。之前也有过 ADORs 在动物和人眼内表达的报道。大鼠眼内睫状突和视网膜上均有 ADORA1、ADORA2a 和 ADORA2b 的 mRNA 表达，但无 ADORA3 表达[19]。也有研究发现大鼠视网膜神经节细胞中有微弱 ADORA3 的 mRNA 表达[20]。一种低亲和力的 ADORA2 受体，可能是 ADORA2b，在牛 RPE 中也有表达[21]。可见原代培养的人 RPE 细胞中的 ADORs 表达特点与其在动物眼内的表达不尽相同。早期对腺苷激动剂和拮抗剂的研究间接证实了 ADORA2 在体外培养的 RPE 细胞中有表达，但无 ADORA1 表达[22]。也有研究者用 RT-PCR 和细胞免疫组化证实体外培养的人 RPE 细胞中有 ADORA2a 表达[23]。在人 RPE 中，尚无有关所有 ADORs 表达的直接研究。

本研究结果与本课题组前期所发现的 ADORs 所有亚型在人 RPE 细胞系 D407 中均有表达[24]有所不同，提示在 ADORs 的表达及特性研究方面，D407 与原代培养 RPE 并不完全一致。RPE 细胞的原代培养过程较难，到 6 代左右即呈现变性趋势。因此细胞系的出现可起到替代原代培养 RPE 易化实验过程作用，细胞系 D407 是由原代培养的人 RPE 自然突变而来，具有人 RPE 的绝大部分特性，包括卵圆状外观、维甲酸相关结合蛋白及视觉周期中关键酶的表达等[25]，近年来成为成熟 RPE 模型，在 RPE 体外研究中得以广泛应用。但亦有学者发现 D407 部分特性，如成纤维细胞生长因子对其细胞增殖的影响与原代培养 RPE 不尽相同[26]。在本研究中，原代培养人 RPE 细胞中无 ADORA3 受体表达，而 ADORA3 受体在人 RPE 细胞系 D407 中却有微弱表达，也支持 D407 与原代培养 RPE 细胞生物特性存在不同，从而提示虽然细胞系细胞更容易培养，但在进一步进行的 ADORs 及相关药物机制研究中，最好仍使用原代培养 RPE 细胞观测相应生物化学指标。

ADORs 所属的 G 蛋白偶联受体超家族在细胞内分布多样，ADORA1、ADORA2a 和 ADORA2b 不同的分布特点可能与其行使的不同细胞功能有关，且受不同细胞功能状态影响。与 ADORs 在人巩膜成纤维细胞（human scleral fibroblasts，HSF）中的分布特点相似[26]，原代培养人 RPE 细胞中 ADORA1 分布于细胞核、核周及细胞质，ADORA2a 主要分布于细胞核及细胞质，ADORA2b 强表达于细胞核、核周和细胞质。在神经系统中，ADORs 各亚型的不同分布特点提示其发挥不同作用。超微结构分析证实 ADORA2a 分布于大鼠纹状体神经元树突与轴突的胞浆膜内、细胞质中及细胞内膜相结构周围，此结构特点与 γ-氨基丁酸能信号传导通路的调节密切相关[27]。在大鼠海马，ADORA2a 聚集于突触内，可能是由于海马神经元中 ADORA2a 参与调节突触后苍白体神经元信号处理、而不是调节突触前海马神经元中神经递质的释放[28]，而 ADORA1 则聚集于突触胞浆膜[29]，提示其参与调节神经传递。同时，细胞内 ADORs 各亚型的不同分布特点受不同的细胞功能状态影响。当大鼠停止持续可卡因干预后，ADORA1 激发相关的伏核作用减弱，ADORA1 合成增加，亚细胞结构分析表明这是由于 ADORA1 在细胞胞浆网状质/高尔基体中潴留，胞浆膜中功能性受体所占比例降低引起[30]。

腺苷通过 ADORs 调节细胞代谢，保持内环境稳定。在神经系统中通过 ADORA1 受体抑制神经运动功能，通过 ADORA2 受体促进神经递质的释放[31]。在心血管系统，腺苷可由 ADORA3 介导抵抗缺血-再灌注引起的损伤，减少梗死面积，增加冠状血管血供[32]。还有研究表明腺苷可通过激活 ADORA2a、ADORA2b 抑制肿瘤坏死因子-α 的释放[33]。同时，在豚鼠形觉剥夺近视模型视网膜和巩膜中，腺苷受体表达 ADORA1 降低，而 ADORA2a、ADORA2b 升高[34]，提示 ADORs 可能参与眼球发育。RPE 在眼球生长过程中起到关键作用[35]，本研究证实了 ADORA1、ADORA2a、ADORA2b 在人 RPE 中的表达，并具有不同的分布特点，为进一步研究 RPE 中腺苷及腺苷受体参与的调节眼球生长的机制奠定基础。

参 考 文 献

[1] Ponnalagu M，Subramani M，Jayadev C，et al. Retinal pigment epithelium-secretome：a diabetic retinopathy perspective[J]. Cytokine，2017，95(7)：126-135.

[2] Koh SM. VIP enhances the differentiation of retinal pigment epithelium in culture：from cAMP and pp60(c-src) to melanogenesis and development of fluid transport capacity[J]. Prog Retin Eye Res，2000，19(6)：669-688.

[3] Liang H，Crewther SG，Crewther DP，et al. Structural and elemental evidence for edema in the retina，retinal pigment epithelium，and choroid during recovery from experimentally induced myopia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2004，45(8)：2463-2474.

[4] Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Apomorphine inhibits the growth-stimulating effect of retinal pigment epithelium on scleral cells in vitro [J]. Cell Biochem Funct, 1997, 15(3): 191-196.

[5] Tian B, Gabelt BT, Crosson CE, et al. Effects of adenosine agonists on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in cynomolgus monkeys[J]. Exp Eye Res, 1997, 64(6): 979-989.

[6] Riley MV, Winkler BS, Starnes CA, et al. Adenosine promotes regulation of corneal hydration through cyclic adenosine monophosphate[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(1): 1-10.

[7] Blazynski C, Woods C, Mathews GC. Evidence for the action of endogenous adenosine in the rabbit retina: modulation of the light-evoked release of acetylcholine[J]. J Neurochem, 1992, 58(2): 761-767.

[8] Crosson CE, DeBenedetto R, Gidday JM. Functional evidence for retinal adenosine receptors[J]. J Ocul Pharmacol, 1994, 10(2): 499-507.

[9] Tella SL, Bryson EJ, Cadetti L, et al. Endogenous adenosine reduces glutamatergic output from rods through activation of A2-like adenosine receptors[J]. J Neurophysiol, 2003, 90(1): 165-174.

[10] Portellos M, Riva CE, Cranstoun SD, et al. Effects of adenosine on ocular blood flow[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(9): 1904-1909.

[11] Alfinito PD, Alli R, Townes-Anderson E. Adenosine A(2a) receptor-mediated inhibition of rod opsin mRNA expression in tiger salamander[J]. J Neurochem, 2002, 83(3): 665-672.

[12] Yaar R, Jones MR, Chen JF, et al. Animal models for the study of adenosine receptor function[J]. J Cell Physiol, 2005, 202(1): 9-20.

[13] Seltner RL, Stell WK. The effect of vasoactive intestinal peptide on development of form deprivation myopia in the chick: a pharmacological and immunocytochemical study[J]. Vision Res, 1995, 35(9): 1265-1270.

[14] Hollborn M, Kohen L, Wiedemann P, et al. The influence of pro-inflammatory cytokines on human retinal pigment epithelium cell receptors[J]. Greafes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(4): 294-301.

[15] Gregory CY, Abrams TA, Hall MO. Stimulation of A2 adenosine receptors inhibits the ingestion of photoreceptor outer segments by retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(3): 819-825.

[16] Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, et al. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca^{2+} signaling in human retinal pigment epithelial cells[J]. Sci Rep, 2017, 9(7): 44175.

[17] Maruiwa F, Naoi N, Nakazaki S, et al. Effects of adenosine on chick retinal pigment epithelium: membrane potentials and light-evoked responses[J]. Curr Eye Res, 1995, 14(8): 685-691.

[18] 鹿润霞，安建宏，陈江帆，等. 高糖下腺苷 A2A 受体对人视网膜色素上皮细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. 眼视光学杂志，2009, 11(5): 368-371.

[19] Kvanta A, Seregard S, Kull B, et al. Localization of adenosine receptor messenger RNAs in the rat eye[J]. Exp Eye Res, 1997, 65(5): 595-602.

[20] Zhang M, Budak MT, Lu W, et al. Identification of the A3 adenosine receptor in rat retinal ganglion cells[J]. Mol Vis, 2006, 16(12): 937-948.

[21] Blazynski C. Characterization of adenosine A2 receptors in bovine retinal pigment epithelial membranes[J]. Exp Eye Res, 1993, 56(5): 595-599.

[22] Liu J, Lu W, Reigada D, et al. Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4(-/-) mice: pharmacologic approaches and functional recovery[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(2): 772-780.

[23] Dong F, An JH, Ren YP, et al. Expression of dopamine receptor D2 and adenosine receptor A2A in human retinal pigment epithelium [J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2007, 43(12): 1110-1113.

[24] Wan W, Cui D, Yang X, et al. Expression of adenosine receptors in human retinal pigment epithelium cells in vitro[J]. Chin Med J(Engl), 2011, 124(8): 1139-1144.

[25] Davis AA, Bernstein PS, Bok D, et al. A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(5): 955-964.

[26] Cui D, Trier K, Chen X, et al. Distribution of adenosine receptors in human sclera fibroblasts[J]. Mol Vis, 2008, 14: 523-529.

[27] Hettinger BD, Lee A, Linden J, et al. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum[J]. J Comp Neurol, 2001, 431(3): 331-346.

[28] Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, et al. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat[J]. Neuroscience, 2005, 132(4): 893-903.

[29] Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, et al. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus[J]. Brain Res, 2003, 987(1): 49-58.

[30] Toda S, Alguacil LF, Kalivas PW. Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens[J]. J Neurochem, 2003, 87(6): 1478-1484.

[31] Lelo A, Kjellen G, Birkett DJ, et al. Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearance and effects of allopurinol and cimetidine[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1989, 248(1): 315-319.

[32] Maddock HL, Mocanu MM, Yellon DM. Adenosine A(3) receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physioy, 2002, 283(4): H307-313.

[33] Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, et al. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not A3 adenosine receptors[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(1): 172-180.

[34] Cui D, Trier K, Zeng J, et al. Adenosine receptor protein changes in guinea pigs with form deprivation myopia[J]. Acta Ophthalmol, 2010, 88(7): 759-765.

[35] Rymer J, Wildsoet CF. The role of the retinal pigment epithelium in eye growth regulation and myopia: a review[J]. Vis Neurosci, 2005, 22(3): 251-261.

（责任编辑：冉明会）