

# miRNA-147 靶向调控 VEGF 对人视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡及迁移的影响

陈方, 李恒, 游慧, 邱煜焱, 王宁, 陈微

引用: 陈方, 李恒, 游慧, 等. miRNA-147 靶向调控 VEGF 对人视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡及迁移的影响. 国际眼科杂志 2021; 21(11): 1855-1860

基金项目: 遂宁市中心医院科研课题项目 (No.2019y44)

作者单位: (629000) 中国四川省遂宁市中心医院眼科

作者简介: 陈方, 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 李恒, 男, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 斜视及玻璃体视网膜疾病. Liheng1-1@163.com

收稿日期: 2021-01-13 修回日期: 2021-09-30

## 摘要

**目的:** 探讨 miRNA-147 靶向调控 VEGF 对人视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡及迁移的影响, 并初步研究其分子机制。

**方法:** 选择人视网膜色素上皮细胞株 (ARPE-19 细胞), 将细胞分为 7 组: 空白对照组 (不处理)、无义 miRNA 组 (转染 mimic NC)、miRNA-147 模拟物组 (转染 miRNA-147 模拟物)、抑制剂阴性对照组 (转染 shRNA NC)、VEGF 抑制剂组 (转染 VEGF 抑制剂)、miRNA-147 模拟物+空载病毒载体组 (转染 miRNA-147 模拟物和空载体) 和 miRNA-147 模拟物+VEGF 过表达组 (转染 miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达)。使用 RT-qPCR 检测各组细胞 miRNA-147 及 VEGF mRNA 表达水平; 双荧光素酶实验验证 miRNA-147 与 VEGF 靶向关系; Western blot 检测 VEGF 蛋白表达水平; MTT 法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡水平及细胞周期的改变; 细胞划痕实验检测细胞迁移。

**结果:** 与空白对照组和无义 miRNA 组相比, miRNA-147 模拟物组 miRNA-147 表达水平显著升高, VEGF mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与抑制剂阴性对照组相比, VEGF 抑制剂组 VEGF mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 miRNA-147 模拟物+空载病毒载体组相比, miRNA-147 模拟物+VEGF 过表达组 VEGF mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告显示 VEGF 是 miRNA-147 的靶基因。转染 miRNA-147 模拟物和 VEGF 抑制剂均可降低 ARPE-19 细胞增殖和迁移水平, 促进细胞凋亡 ( $P < 0.05$ )。转染 VEGF 过表达可逆转 miRNA-147 mimic 对 ARPE-19 细胞增殖、迁移和凋亡的影响 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** miRNA-147 可通过靶向 VEGF 抑制 ARPE-19 细胞增殖和迁移, 促进细胞凋亡。

**关键词:** miRNA-147; 血管内皮生长因子 (VEGF); 人视网膜色素上皮细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.04

## Effect of miRNA - 147 regulates proliferation, apoptosis and migration via targeting VEGF in human retinal pigment epithelial cells

Fang Chen, Heng Li, Hui You, Yu-Yan Qiu, Ning Wang, Wei Chen

**Foundation item:** Scientific Research Project of Suining Central Hospital (No.2019y44)

Department of Ophthalmology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China

**Correspondence to:** Heng Li. Department of Ophthalmology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China. Liheng1-1@163.com

Received: 2021-01-13 Accepted: 2021-09-30

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of miRNA-147 targeted regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the proliferation, apoptosis and migration of human retinal pigment epithelial cells, and to explore its molecular mechanism.

• **METHODS:** Human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells were selected and divided into 7 groups: blank control group (untreated), nonsense miRNA group (transfected with mimic NC), miRNA-147 simulant group (transfected with miRNA-147 mimic), inhibitor negative control group (transfected with shRNA NC), VEGF inhibitor group (transfected with shRNA VEGF), miRNA-147 simulant+empty viral vector group (transfected with miRNA-147 mimic and pcDNA3.1) and miRNA-147 simulant+VEGF overexpression group (transfected with miRNA-147 mimic and pcDNA3.1 VEGF). RT-qPCR was used to detect the expression of miRNA-147 and VEGF mRNA. Dual luciferase experiments were used to verify the targeting relationship between miRNA-147 and VEGF. Western blot was used to detect the expression of VEGF protein. MTT method was used to detect the proliferation. Flow cytometry to detect the apoptosis level and cell cycle changes. Cell scratch test to detect the level of cell migration.

• **RESULTS:** Compared with the blank control group and the nonsense miRNA group, the expression level of miRNA-147 in miRNA-147 simulant group was significantly increased, while the expression levels of VEGF mRNA and protein were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the inhibitor negative control

group, the expression levels of VEGF mRNA and protein in the VEGF inhibitor group were significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the miRNA-147 simulant+empty viral vector group, the expression level of VEGF mRNA in the miRNA-147 simulant+VEGF overexpression group was significantly increased ( $P<0.05$ ). The dual luciferase report shows that VEGF is the target gene of miRNA-147. Transfection of miRNA-147 mimic and shRNA VEGF can reduce the proliferation and migration of ARPE-19 cells and promote apoptosis can reduce the proliferation and migration of ARPE-19 cells and promote apoptosis ( $P<0.05$ ). Transfection VEGF overexpression reverses the effect of miRNA-147 mimics on proliferation, migration and apoptosis of ARPE-19 cells ( $P<0.05$ ).

• CONCLUSION: miRNA-147 can inhibit ARPE-19 cell proliferation, migration and promote cell apoptosis by targeting VEGF.

• KEYWORDS: miRNA-147; vascular endothelial growth factor (VEGF); human retinal pigment epithelial cells; proliferation; apoptosis; migration

**Citation:** Chen F, Li H, You H, *et al.* Effect of miRNA-147 regulates proliferation, apoptosis and migration via targeting VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(11):1855-1860

## 0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是一种致盲性疾病,是导致孔源性视网膜脱离手术修复失败的主要原因。一旦形成, PVR 就很难治疗。因此,开发预防 PVR 的方法非常重要。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因是一种人体内自然生成的细胞因子,目前已有研究表明抗 VEGF 治疗可以减轻玻璃体的生物活性预防临床 PVR 的形成<sup>[1]</sup>。

目前越来越多的研究表明人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的增殖和上皮-间质转化参与增殖膜的形成在 PVR 的发生和发展过程中起重要作用<sup>[2-3]</sup>。miRNA 是新发现通过调控转录后基因表达来影响机体功能的一类小分子非编码 RNA,已有证据表明,许多 miRNA 分子通过 RPE 增殖、迁移以及凋亡参与 PVR 的形成,如 miRNA-146a 和 miR-194 等<sup>[4-5]</sup>。miRNA-147 是研究报道较多的一种小 RNA,在类风湿性关节炎、恶性肿瘤等疾病发生发展中发挥了重要作用<sup>[6-7]</sup>。但 miRNA-147 与 PVR 相关性尚未见报道。本研究前期生物信息学筛查发现, VEGF 可能是 miRNA-147 的靶基因。miRNA-147 与 VEGF 在 PVR 发生发展过程中是否具有调控作用,有待于进一步探究。因此,以 ARPE-19 细胞为研究对象,初步探讨了 miRNA-147 靶向调控 VEGF 对 ARPE-19 细胞的生物学行为的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 主要试剂: ARPE-19 细胞系购于上海佰晔生物科技有限公司。DAB 显色试剂盒、MTT 试剂盒、Lipofectamine 2000 转染试剂、Trizol 购自北京索莱宝科技有限公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国 Promega 公司。野生型和突变型的 VEGF 3'-UTR 双荧光

报告质粒购自苏州吉玛基因股份有限公司。DMEM、胎牛血清购于美国 Gibco 公司。miRNA-147 模拟物 (ATCGTCTTCGTAAGGCCGTGTG) 及其对照 (AGTTCCTG CACGGAACGTACG)、VEGF 抑制剂 (GTCATGAAGTTC ATGGATG) 以及对照 (GTGTGGATGAAAGTATGTC)、VEGF 过表达 (上游: 5'-AAGCTTATGAACTTTCTGCTGTCTTGG GTGC-3'; 下游: 5'-AAGCTTATGAACTTTCTGCTGTCT TGGGTGC-3') 及空载体 (上游: 5'-TTTATCTCCGTCG GCCTTCT-3'; 下游: 5'-TTTCCTTTCTCCCCATCTTTG-3') 均由 Biomics 公司设计合成。兔抗人 VEGF 单克隆抗体、兔抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体及 HRP 标记羊抗兔二抗购于美国 Abcam 公司。一步法反转录荧光定量试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和转染及分组** 将生长状态良好的对数生长期 ARPE-19 细胞按照每孔  $2 \times 10^5$  个接种至 6 孔细胞板上,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的培养箱中常规培养。根据转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书步骤进行转染,取 miRNA-147 模拟物及其对照、VEGF 抑制剂以及对照组、VEGF 过表达及空载体,分别用无血清培养液稀释至 100nmol/L,每孔 2mL 含有脂质体 Lipofectamine 2000 转染液进行转染,转染 6h 后更换培养液,继续培养 48h。实验分为空白对照组 (不处理)、无义 miRNA 组 (转染 mimic NC)、miRNA-147 模拟物组 (转染 miRNA-147 模拟物)、抑制剂阴性对照组 (转染 shRNA NC)、VEGF 抑制剂组 (转染 VEGF 抑制剂)、miRNA-147 模拟物+空载体病毒载体组 (miRNA-147 模拟物 and 空载体) 和 miRNA-147 模拟物+VEGF 过表达组 (转染 miRNA-147 模拟物 and VEGF 过表达)。

**1.2.2 RT-qPCR 实验检测各组 miRNA-147 和 VEGF mRNA 的表达** 收集各组转染 48h 后的 ARPE-19 细胞,分别加入 TRIzol 提取 RNA,再参照一步法反转录荧光定量试剂盒检测 miRNA-147 和 VEGF mRNA 的表达,以 U6 和 GAPDH 为内参。miRNA-147 正向: 5'-GGGCTGTCTG GAAAT-3', 反向: 5'-AACTGCTGCTCGTGGAGTCCGC-3'; U6 正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', 反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。VEGF 正向 5'-TCGGG CCTCCGAAACCATGA-3', 反向: 5'-CCTGCTGAGATCTG GTTC-3'; GAPDH 正向: 5'-CCACCCATGGCAAATT CCATGGCA-3', 反向: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGT CCACC-3'。RT-qPCR 反应程序和反应体系参照说明书。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法进行相对定量分析。

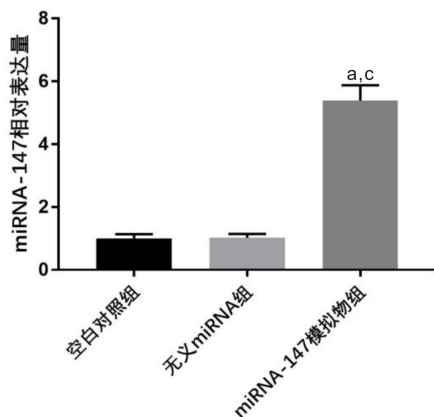
**1.2.3 荧光素酶报告基因检测 miRNA-147 和 VEGF 靶向关系** 将对数生长期的 ARPE-19 细胞以每孔  $10^5$  个接种至 12 孔细胞板上,将 WT-3'UTR、MUT-3'UTR 与 miRNA-147 模拟物或无义 miRNA 共转染至 ARPE-19 细胞。每组实验设置 3 个重复。培养箱内培养 48h 后,参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒步骤检测荧光素酶活性。

**1.2.4 Western blot 实验检测各组 VEGF 蛋白的表达** 收集各组转染 48h 后的 ARPE-19 细胞,分别加入 RIPA 裂解液并在冰上放置 20min, 4℃ 13000r/min 离心 20min,采用 BCA 试剂盒测定上清的蛋白含量。取 35 $\mu$ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转 PVDF 膜,用 2% BSA 封闭液封闭,分别加入一抗 (1:1 000) 4℃ 过夜,以  $\beta$ -actin 抗体 (1:10000) 为参照,再

表 1 各组 ARPE-19 细胞各项指标比较

(n=3,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	VEGF mRNA 表达水平	VEGF 蛋白表达	OD <sub>570</sub>	相对划痕宽度
空白对照组	1.00±0.10	0.70±0.06	0.76±0.09	1.03±0.12
无义 miRNA 组	0.99±0.12	0.73±0.05	0.74±0.10	0.96±0.08
miRNA-147 模拟物组	0.48±0.03 <sup>a,c</sup>	0.35±0.02 <sup>a,c</sup>	0.42±0.10 <sup>a,c</sup>	1.76±0.06 <sup>a,c</sup>
抑制剂阴性对照组	1.03±0.11	0.72±0.04	0.72±0.15	1.01±0.07
VEGF 抑制剂组	0.29±0.03 <sup>a,c</sup>	0.12±0.01 <sup>a,c</sup>	0.33±0.10 <sup>a,c</sup>	1.77±0.070 <sup>a,c</sup>
miRNA-147 模拟物和空载体组	0.46±0.05	0.33±0.02	0.44±0.06	1.81±0.06
miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组	1.92±0.20 <sup>a,g</sup>	1.01±0.06 <sup>a,g</sup>	1.15±0.08 <sup>a,g</sup>	0.26±0.04 <sup>a,g</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs 无义 miRNA 组;<sup>e</sup>P<0.05 vs 抑制剂阴性对照组;<sup>g</sup>P<0.05 vs miRNA-147 模拟物和空载体组。图 1 各组 ARPE-19 细胞 miRNA-147 表达水平比较 <sup>a</sup>P<0.05 vs 空白对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs 无义 miRNA 组。

加入二抗 (1:10000) 室温孵育 1h。ECL 曝光成像, 采用 Alpha Imager HP 凝胶成像系统分析结果。

**1.2.5 MTT 实验** 各组细胞培养 48h 后, 每孔加入终浓度为 0.5mg/mL MTT。孵育 4h 后每孔加入 150 $\mu$ L 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10min, 放置酶标仪上波长为 570nm 下测定吸光度 OD 值。

**1.2.6 流式细胞术检测实验** 各组细胞培养 48h 后, 弃细胞培养液。各组取 10 万个的细胞加入 195 $\mu$ L 结合液和 Annexin V-FITC 5 $\mu$ L, 避光孵育 10min, 1000r/min 离心 5min 弃上清, 再加入 190 $\mu$ L 结合液和 10 $\mu$ L 碘化丙啶染色液, 低温避光放置 10min 后进行流式细胞仪检测。

**1.2.7 细胞划痕实验** 取各组细胞加入孔板中, 每孔背后含有 5 条横线并含有 5 $\times 10^5$  个细胞。过夜培养后, 用 200 $\mu$ L 的枪头垂直于背后的横线划痕, 洗去划下的细胞。处理 24h 后, 取样拍照。

统计学分析: 所有的数据均采用 SPSS 21.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料用 (%) 表示, 组间率的比较采用  $\chi^2$ /Fisher 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 ARPE-19 细胞 miRNA-147 表达水平比较** 空白对照组、无义 miRNA 组和 miRNA-147 模拟物组 miRNA-147 表达水平分别为: 1.00±0.14、1.02±0.12、5.39±0.49, 各组细胞 miRNA-147 表达水平比较差异有统计学意义 (*F*=213.102, *P*<0.05)。与空白对照组和无义 miRNA 组相比, miRNA-147 模拟物组 miRNA-147 表达水平显著

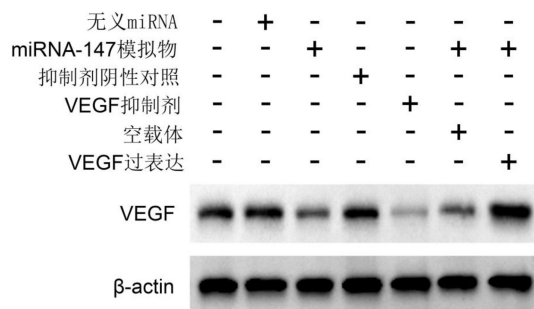


图 2 各组 ARPE-19 细胞 VEGF 蛋白表达水平比较。

升高, 差异均有统计学意义 (*t* = 17.919、17.838, 均 *P* < 0.05), 提示 ARPE-19 细胞 miRNA-147 转染成功, 见图 1。

**2.2 各组 ARPE-19 细胞 VEGF mRNA 表达水平比较** 各组细胞 VEGF mRNA 表达水平比较差异有统计学意义 (*F* = 82.445, *P* < 0.05)。与无义 miRNA 组相比, miRNA-147 模拟物组 VEGF mRNA 表达水平显著降低, 差异有统计学意义 (*t* = 5.980, *P* < 0.05); 与抑制剂阴性对照组相比, VEGF 抑制剂组 VEGF mRNA 表达水平显著降低, 差异有统计学意义 (*t* = 8.582, *P* < 0.05); 与 miRNA-147 模拟物和空载体组相比, miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组 VEGF mRNA 表达水平显著升高, 差异有统计学意义 (*t* = 17.086, *P* < 0.05), 见表 1。

**2.3 各组 ARPE-19 细胞 VEGF 蛋白表达水平比较** 各组细胞 VEGF 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 (*F* = 163.719, *P* < 0.05)。与无义 miRNA 组相比, miRNA-147 模拟物组 VEGF 蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义 (*t* = 11.073, *P* < 0.05); 与抑制剂阴性对照组相比, VEGF 抑制剂组 VEGF 蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义 (*t* = 17.577, *P* < 0.05); 与 miRNA-147 模拟物和空载体组相比, miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组 VEGF 蛋白表达水平显著升高, 差异有统计学意义 (*t* = 20.100, *P* < 0.05), 见表 1、图 2。

**2.4 双荧光素酶实验验证 miRNA-147 与 VEGF 靶向关系** 双荧光素酶报告实验结果发现, miRNA-147 和 VEGF 能够靶向结合。miRNA-147 模拟物能够显著抑制 VEGF-WT 报告载体的荧光素酶活性, 差异有统计学意义 (*t* = 10.256, *P* < 0.05); 而 miRNA-147 模拟物对 VEGF-MUT 报告载体的荧光素酶活性没有明显影响, 差异无统计学意义 (*t* = 0.736, *P* > 0.05), 见图 3。

**2.5 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞增殖水平的影响** 48h 后各组细胞增殖水平比较差异有



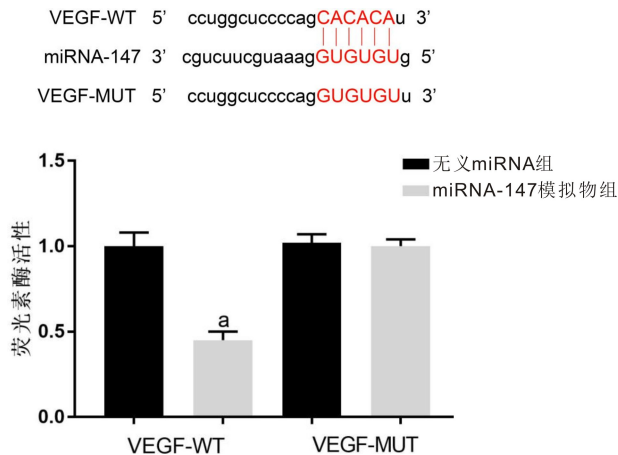


图3 miRNA-147 靶向调控 VEGF 的表达 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 无义 miRNA 组。

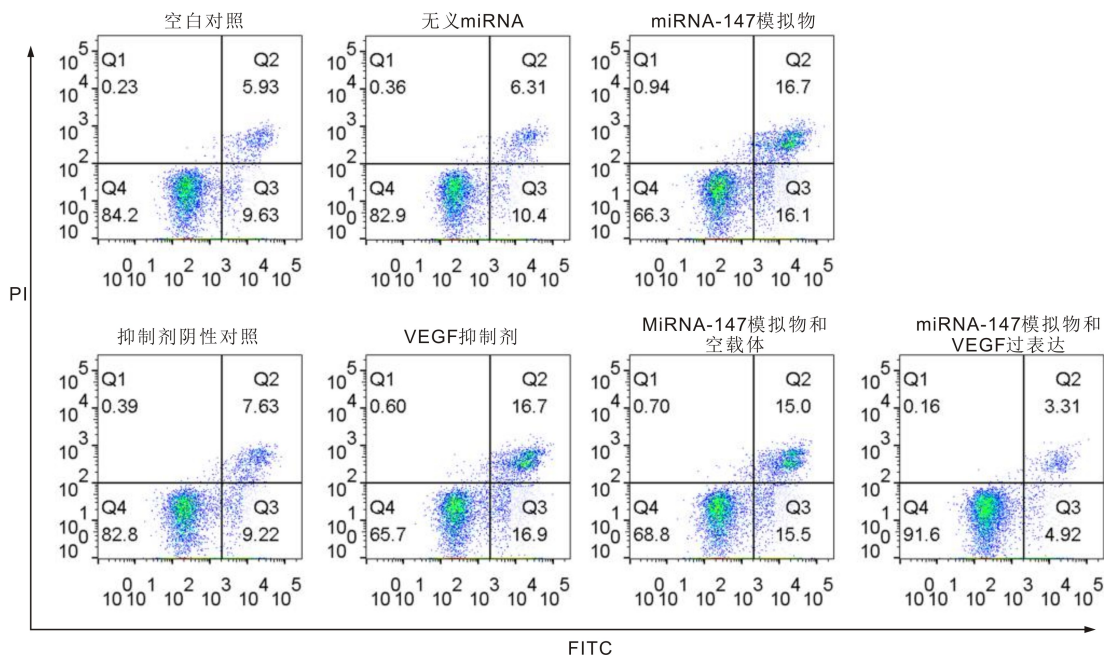


图4 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞凋亡水平的影响。

统计学意义 ( $F = 23.267, P < 0.05$ )。miRNA-147 模拟物组细胞增殖水平与无义 miRNA 组相比显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 3.920, P < 0.05$ ); 与抑制剂阴性对照组相比, VEGF 抑制剂组增殖水平水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 4.728, P < 0.05$ ); 与 miRNA-147 模拟物和空载体组相比, miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组增殖水平显著升高, 差异有统计学意义 ( $t = 8.608, P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.6 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞凋亡水平及细胞周期的改变** 流式细胞仪检测结果发现, 各组细胞凋亡率、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数、S 期和 G<sub>2</sub> 期细胞数比较差异均有统计学意义 ( $F = 128.468, F = 140.761, F = 24.485, F = 25.736$ , 均  $P < 0.05$ )。与无义 miRNA 组相比, miRNA-147 模拟物组细胞凋亡率、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数显著增加; 而 S 期、G<sub>2</sub> 期细胞数明显减少, 差异均有统计学意义 ( $t = 12.446, 9.956, 3.908, 4.007$ , 均  $P < 0.05$ ); 与抑制剂阴性对照组相比, VEGF 抑制剂组细胞凋亡率及 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数为明显增加, 而 S 期、G<sub>2</sub> 期细胞数明显减少, 差异均有统计学意义 ( $t = 13.279, 15.089, 9.298, 4.810$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 miRNA-147 模拟物和空载体组相比, miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组细胞凋亡率、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞

数减少, 而 S 期、G<sub>2</sub> 期细胞数明显增加, 差异均有统计学意义 ( $t = 18.174, 19.731, 4.815, 9.455$ , 均  $P < 0.05$ ), 见表 2, 图 4、5。

**2.7 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞迁移能力的影响** 各组细胞相对划痕宽度比较差异有统计学意义 ( $F = 188.141, P < 0.05$ )。转染 miRNA-147 模拟物或转染 VEGF 抑制剂后细胞相对划痕宽度与各自阴性对照组比较均显著增加, 差异均有统计学意义 ( $t = 13.388, 12.732$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 miRNA-147 模拟物和空载体组相比, miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组细胞相对划痕宽度显著减小, 差异有统计学意义 ( $t = 25.961, P < 0.05$ ), 见表 1、图 6。

### 3 讨论

RPE 细胞位于神经视网膜光感受器的最外层, 其功能异常、退化或死亡等通常会引起包括 PVR 在内的多种严重视网膜疾病。值得一提的是, RPE 细胞的增殖和迁移是 PVR 形成的主要原因。目前研究表明在人类视网膜、角膜、晶状体等眼部组织中已发现上百种 miRNA 表达, miRNA 通过调控下游靶基因, 维持眼部组织的正常功能<sup>[8]</sup>。近年来, miRNA 与 RPE 细胞的关联成为眼科的研

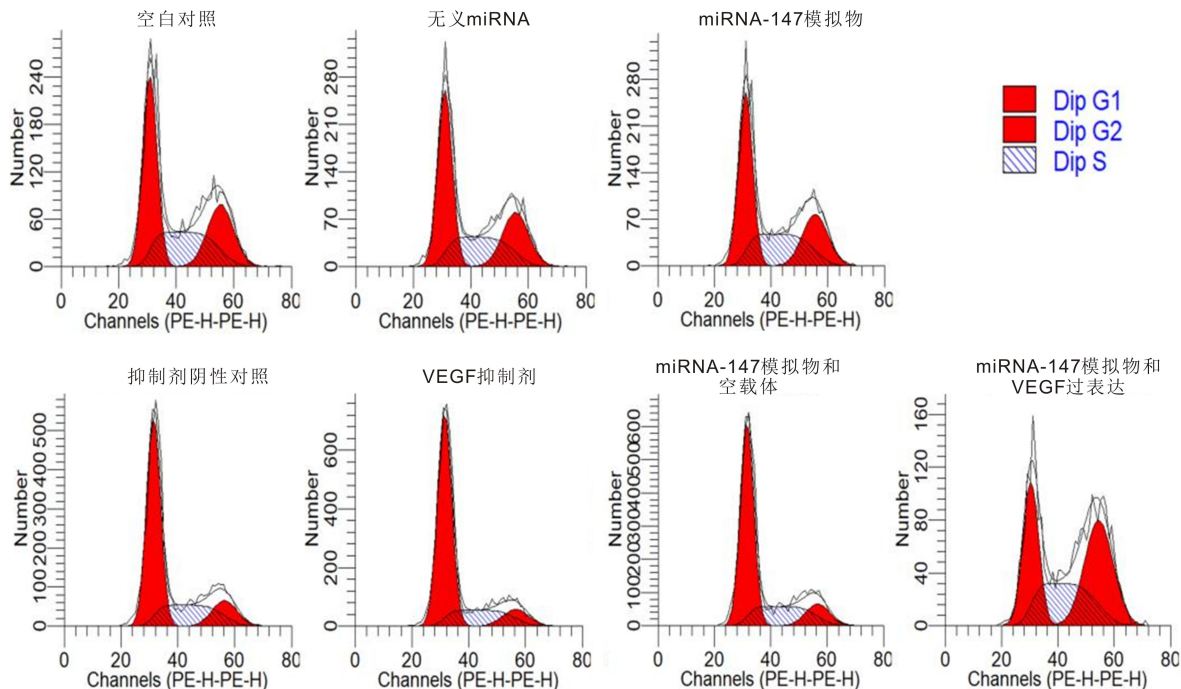


图5 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞周期的影响。

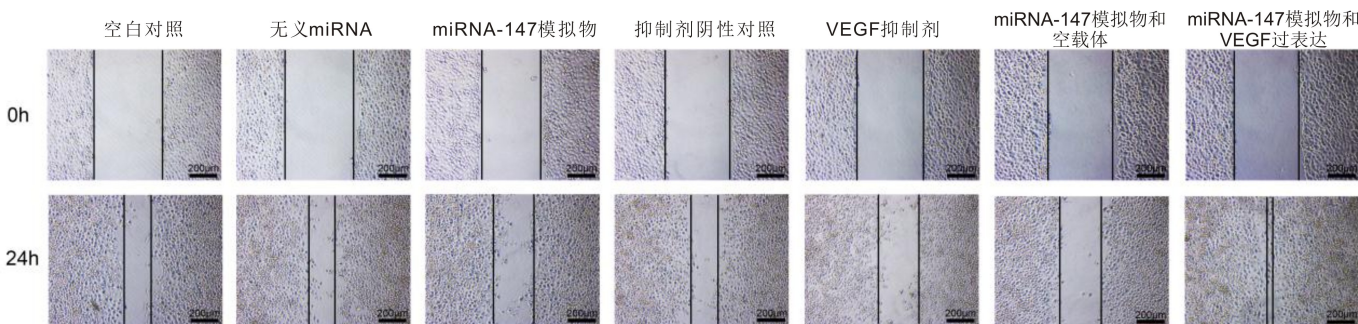


图6 过表达 miRNA-147 或抑制 VEGF 对 ARPE-19 细胞迁移能力的影响。

表2 各组 ARPE-19 细胞凋亡率和细胞周期比例比较

(n = 3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	细胞凋亡率	细胞周期		
		G0/G1 期	S 期	G2 期
空白对照组	15.48±1.40	43.30±1.89	31.13±1.41	25.57±3.27
无义 miRNA 组	16.81±1.64	45.03±2.48	29.89±1.73	25.08±4.04
miRNA-147 模拟物组	32.49±1.81 <sup>a,c</sup>	61.55±1.65 <sup>a,c</sup>	25.11±0.79 <sup>a,c</sup>	13.34±2.44 <sup>a,c</sup>
抑制剂阴性对照组	16.55±1.47	44.55±2.07	31.87±1.82	23.57±3.86
VEGF 抑制剂组	33.28±1.40 <sup>a,c</sup>	69.58±1.85 <sup>a,c</sup>	20.49±1.62 <sup>a,c</sup>	9.93±3.44 <sup>a,c</sup>
miRNA-147 模拟物和空载体组	30.88±1.64	63.27±1.91	24.87±1.31	11.86±3.22
miRNA-147 模拟物和 VEGF 过表达组	7.98±1.39 <sup>a,g</sup>	30.53±2.26 <sup>a,g</sup>	30.76±1.57 <sup>a,g</sup>	38.71±3.82 <sup>a,g</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs 无义 miRNA 组;<sup>b</sup>P<0.05 vs 抑制剂阴性对照组;<sup>g</sup>P<0.05 vs miRNA-147 模拟物和空载体组。

究热点。如 Zhao 等<sup>[9]</sup> 研究表明 miR-145 可以抑制 RPE 细胞的增殖,诱导其凋亡率。Wang 等<sup>[10]</sup> 研究表明 miR-182 通过靶向间质表皮转化因子 (c-Met) 抑制肝细胞生长因子/分散因子 (HGF/SF) 诱导的 RPE 细胞增殖和迁移增加,改善 PVR 及其引起的并发症。Jun 等<sup>[11]</sup> 研究表明 miR-124 可能通过 Ras 同源家族成员 G (RHOG) 抑制 RPE 细胞增殖和迁移,减轻视网膜疾病中纤维血管增生。这提示 miRNA 可通过抑制 RPE 细胞的增殖和迁移作为预防 PVR 疾病发生的靶点。

如今关于 miRNA-147 的研究大多是关于各类肿瘤细胞,经证实,miRNA-147 过表达抑制乳腺癌、肺癌、胶质瘤

等肿瘤细胞增殖发挥抑癌作用,而促进食道癌细胞增殖发挥致癌作用<sup>[7,12-14]</sup>。由此可知,miRNA-147 在不同的癌组织中发挥着完全不同的作用。除此之外,Sui 等<sup>[15]</sup> 研究表明 MicroRNA-147 通过抑制同源盒蛋白 C6 (HOXC6) 抑制人肝细胞癌增殖迁移。由此推测 miRNA-147 有可能参与 RPE 细胞增殖和迁移。本研究通过脂质体法向 RPE 细胞中转染 miRNA-147 模拟物,结果表明转染 miRNA-147 模拟物后 RPE 细胞凋亡水平显著增加,而细胞增殖和迁移能力降低。这与推测结论一致,提示 miRNA-147 在 RPE 细胞增殖、凋亡和迁移过程中发挥着重要作用,miRNA-147 可通过抑制 RPE 细胞的增殖和迁移作为抑制 PVR 疾



病发展的靶点之一,但其具体的调控机制有待于进一步探究。

VEGF是近年来新发现的一种与血管增殖有关的生长因子,基因位于6号染色体的P12~P21区域,8个外显子和7个内含子组成,转录时可剪接成VEGF121、VEGF165、VEGF145、VEGF206、VEGF189 5种异构体<sup>[16]</sup>。VEGF在含有血管结构如结膜、虹膜、脉络膜及视网膜的正常眼组织中表达较低,VEGF与VEGF受体(VEGFRs)结合参与视网膜血管形成,并维持血管内皮细胞活性<sup>[17]</sup>。VEGF水平升高是许多眼部血管疾病已知的主要原因之一,同时,抗VEGF疗法已被常规应用于治疗眼血管疾病。Pennock等<sup>[1]</sup>研究表明VEGF主要通过间接激活血小板来源的生长因子受体的活性,促进玻璃体视网膜病变的增殖,且在兔玻璃体内注射VEGF抑制剂可以预防PVR发生。本研究结果表明,转染VEGF抑制剂可抑制RPE细胞增殖、迁移,并促进细胞凋亡。这与雷祥等<sup>[18]</sup>研究结果一致,其研究表明丹参酮IIA在缺氧条件下通过抑制VEGF的表达抑制RPE细胞增殖,将细胞阻滞在G0/G1期,促进细胞凋亡。

近年来越来越多的证据表明,miRNA可影响VEGF信号通路转导过程。陈云霞等<sup>[19]</sup>研究表明,miR-27可能通过调节糖代谢、VEGF过程介导糖尿病视网膜病变的发病及进展。本研究在TargetsCan数据查询发现,VEGF 3'-UTR中存在miRNA-147的目标碱基序列,且RT-qPCR和Western blot分析结果显示,VEGF在miRNA-147模拟物转染后下调,由此我们推测miRNA-147对VEGF有靶向调控作用。此外,本研究通过单独抑制VEGF基因表达实验显示,下调VEGF抑制RPE细胞的增殖、迁移,促进细胞凋亡;过表达VEGF可逆转miRNA-147模拟物对RPE细胞增殖、迁移和凋亡的抑制作用,提示miRNA-147通过靶向VEGF抑制RPE细胞增殖、迁移,并促进细胞凋亡,对PVR的进展发挥重要作用。这与Hu等<sup>[20]</sup>和Linetsky等<sup>[21]</sup>研究结果一致。

综上所述,miRNA-147在RPE细胞增殖、凋亡和迁移过程中发挥着重要作用,其作用机制可能与靶向抑制VEGF表达有关,提示miRNA-147有望成为预防PVR新靶点。

#### 参考文献

- 1 Pennock S, Haddock LJ, Mukai S, et al. Vascular endothelial growth factor Acts primarily via platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  to promote proliferative vitreoretinopathy. *Am J Pathol* 2014; 184(11): 3052-3068
- 2 Zhang Y, Li M, Han X. Icaritin affects cell cycle progression and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via enhancing expression of H19. *PeerJ* 2020;8:e8830
- 3 Ozal SA, Gurlu V, Turkecul K, et al. Neferine inhibits epidermal growth factor-induced proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells through downregulating p38 MAPK and PI3K/AKT signalling. *Cutan Ocul Toxicol* 2020;39(2):97-105

- 4 Cui L, Lyu Y, Jin X, et al. miR-194 suppresses epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by directly targeting ZEB1. *Ann Transl Med* 2019;7(23):751
- 5 Hao Y, Zhou QB. miR-146a is upregulated during retinal pigment epithelium (RPE)/choroid aging in mice and represses IL-6 and VEGF-A expression in RPE cells. *J Clin Exp Ophthalmol* 2016;7(3):562
- 6 Kim SJ, Chen Z, Essani AB, et al. Identification of a novel toll-like receptor 7 endogenous ligand in rheumatoid arthritis synovial fluid that can provoke arthritic joint inflammation. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68(5):1099-1110
- 7 Tang Y, Li Z, Shi ZX. Mechanisms of the suppression of proliferation and invasion ability mediated by microRNA-147b in esophageal squamous cell carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2018; 98(26): 2092-2098
- 8 Kaneko H, Terasaki H. Biological involvement of MicroRNAs in proliferative vitreoretinopathy. *Transl Vis Sci Technol* 2017;6(4):5
- 9 Zhao K, Chen Z, Lv XD, et al. Inhibitory effect of miR-145 on RPE cell proliferation. *Am J Transl Res* 2016;8(12):5723-5728
- 10 Wang L, Dong F, Reinach PS, et al. MicroRNA-182 suppresses HGF/SF-induced increases in retinal pigment epithelial cell proliferation and migration through targeting c-met. *PLoS One* 2016; 11(12):e0167684
- 11 Jun JH, Son MJ, Lee HG, et al. Regulation of Ras homolog family member G by microRNA-124 regulates proliferation and migration of human retinal pigment epithelial cells. *Sci Rep* 2020;10(1):15420
- 12 Zhang Y, Zhang HE, Liu Z. MicroRNA-147 suppresses proliferation, invasion and migration through the AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Oncol Lett* 2016;11(1):405-410
- 13 Chu G, Zhang J, Chen X. Serum level of microRNA-147 as diagnostic biomarker in human non-small cell lung cancer. *J Drug Target* 2016;24(7):613-617
- 14 许小斌, 武伟男, 马宁, 等. miR-147对胶质瘤U87细胞增殖、凋亡和侵袭的影响. *现代肿瘤医学* 2020;28(3):360-363
- 15 Sui CJ, Xu F, Shen WF, et al. MicroRNA-147 suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation migration and chemosensitivity by inhibiting HOXC6. *Am J Cancer Res* 2016;6(12):2787-2798
- 16 Kipryushina YO, Yakovlev KV, Odintsova NA. Vascular endothelial growth factors: a comparison between invertebrates and vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;26(6):687-695
- 17 Tsotridou E, Loukovitis E, Zapsalis K, et al. A review of last decade developments on epiretinal membrane pathogenesis. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 2020;9(2):91-110
- 18 雷祥, 栗占荣, 范珂. 丹参酮IIA对缺氧状态下视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用及其机制. *中华实验眼科杂志* 2019;37(5):342-347
- 19 陈云霞, 司徒, 高倩, 等. 血浆miR-27在糖尿病视网膜病变患者中的表达及其临床价值. *国际眼科杂志* 2021;21(1):42-46
- 20 Hu H, Li S, Li J, et al. Knockdown of fibromodulin inhibits proliferation and migration of RPE cell via the VEGFR2-AKT pathway. *J Ophthalmol* 2018;2018:5708537
- 21 Linetsky M, Guo J, Udeigwe E, et al. 4-Hydroxy-7-oxo-5-heptenoic acid (HOHA) lactone induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2020;152:280-294