

长链非编码 RNA 与眼的发育和疾病

胡丽华, 蒲琪, 李新宇

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81570819)

作者单位: (430030) 中国湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院

作者简介: 胡丽华, 毕业于武汉大学医学院, 在读博士研究生, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 李新宇, 毕业于华中科技大学同济医学院, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病. lixy07@126.com

收稿日期: 2017-09-05 修回日期: 2018-01-24

lncRNAs involved in the development and diseases of eyes

Li-Hua Hu, Qi Pu, Xin-Yu Li

Foundation item: Natural Science Foundation of China (No. 81570819)

Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-Yu Li. Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lixy07@126.com

Received: 2017-09-05 Accepted: 2018-01-24

Abstract

• Long non-coding RNAs (lncRNAs) refer to a kind of non-coding RNA which is longer than 200 nucleotides, with the characteristic of its numerous, diversity of types and modes of action. The biological functions of lncRNA involved in genomic imprinting, chromatin remodeling, translational control of mRNA, cell cycle and cell differentiation control, immune surveillance, constituting the skeleton of nuclear sub structure, etc. lncRNA plays an important role in individual development and human diseases. This paper mainly reviewed those lncRNAs that have been published, and closely related to eye development and diseases.

• KEYWORDS: long non-coding RNAs; eye development; ocular diseases; target gene

Citation: Hu LH, Pu Q, Li XY. lncRNAs involved in the development and diseases of eyes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(3):451-456

摘要

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 具有数量多、类型多、作用模式多等特点。lncRNAs 生物学功能涉及基因印记、染

色质重塑、mRNAs 的剪切降解及翻译的调控、细胞周期调控和细胞分化调控、免疫监视, 构成细胞核亚结构的骨架等, 在个体发育和人类疾病中发挥着重要的作用。本文主要对目前已发现的、与眼的发育和疾病密切相关的 lncRNAs 做一综述。

关键词: 长链非编码 RNA; 眼的发育; 眼科疾病; 靶基因

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.11

引用: 胡丽华, 蒲琪, 李新宇. 长链非编码 RNA 与眼的发育和疾病. *国际眼科杂志* 2018;18(3):451-456

0 引言

在组成人类基因组的 30 亿个碱基对中, 只有大约 1.5% 核酸序列用于蛋白质编码, 不编码蛋白质的 RNA 被称为非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs), 包括核糖体 RNA (ribosome RNAs, rRNAs)、转运 RNA (transfer RNAs, tRNAs)、小核 RNA (small nuclear RNAs, snRNAs)、小核仁 RNA (small nucleolar RNAs, snoRNAs)、微 RNA (microRNAs, miRNAs)、长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 等, 其中 lncRNAs 具有数量多、类型多、作用模式多等特点。根据 lncRNAs 与蛋白质编码基因的位置关系, 可将其分为重叠型、顺反义型、双向型和内含子型等; 而根据 lncRNAs 的功能, 则可将其分为信号分子、诱饵分子、引导分子和骨架分子等。

lncRNAs 与信使 RNA (messenger RNAs, mRNAs) 有许多相似的特征, 如选择性剪切、由 RNA 聚合酶 II 转录、有聚腺苷酸尾和 5' 帽等, 但是缺少进化保守的开放阅读框 (open reading frames, ORFs), 因此不能被翻译为蛋白质。与 mRNAs 不同的一个特征是, lncRNAs 的表达丰度一般较低, 但却具有更强的组织和细胞表达特异性, 一些 lncRNAs 还仅在真核生物发育过程的特定阶段表达。lncRNAs 存在于多种亚细胞结构中, 特殊的亚细胞定位对 lncRNAs 的生物学功能具有重要的意义。

lncRNAs 的序列保守性较低, 其序列相似性与蛋白编码基因的内含子区域相似, 在人和小鼠中均低于 70%。有些 lncRNAs 虽然序列不保守但是功能保守, 比如 Air 和 Xist。这些 lncRNAs 功能保守性的可能机制为其内部存在高度保守的区域, 或者具有相似的二级结构。另外, lncRNAs 在基因组中的定位也较为保守, 启动子区域通常要比蛋白编码基因的启动子区域具有更高的保守性, 都可能是其功能保守性的重要因素^[1]。另一些 lncRNAs 在不同物种间具有不同的功能, 例如小鼠 Hotair 基因不仅与人类的同源基因在序列保守性上较低, 它的缺失对小鼠基因的表达谱和转录水平也几乎没有任何影响, 对 HOXD 不同靶基因的第 27 位赖氨酸的三甲基化水平也没有太大影响^[2]。lncRNAs 在不同物种间保守性的差异可能是物种

进化的结果,这种快速的进化可能与其在高等物种中的重要调控作用有关。本文从 lncRNAs 对眼的发育和眼科疾病的调控角度出发,对目前已发现并有研究证实其调控功能的 lncRNAs 做一综述。

1 lncRNAs 与眼的发育

1.1 视网膜发育相关 lncRNAs

1.1.1 牛磺酸调节基因 1 牛磺酸调节基因 1 (taurine upregulated gene 1, TUG1) 在眼睛的发育过程中具有重要作用,能诱导视网膜视杆细胞生成,在新生视网膜中敲除 TUG1 将导致发育中的视杆细胞向外核层迁移障碍,细胞的形态发生改变,如外节缺失或畸形、内节变薄,以及细胞凋亡的增加。基因水平的分析表明, TUG1 敲除可以使一些与光感受器细胞相关基因的表达发生改变,如光感受器细胞标志物 cone arrestin、ROM1、Pde6b 和 Cngal 均被上调,而转录因子 Crx 和 Otx2 显著下调,以及视锥细胞特异性标记物的异位表达等。其具体机制不明,但是与 miRNA 和反义链转录因子 (opposite strand transcription factors, OSTs) 都不同。视杆和视锥细胞基因的失调,以及缺乏适当的视杆细胞外节,可能是由 TUG1 缺失所导致的下游 Crx 和 Otx2 减少造成的^[3]。

1.1.2 Six3 反义链转录本 Six3 反义链转录本 (Six3 opposite strand, Six3OS) 是第一个被定义的、与蛋白质编码基因相对应的自然反义链转录本 (natural antisense transcripts, NATs), 在小鼠和人基因中均与 Six3 外显子的序列互补。Six3 在脊椎动物的前脑和视觉系统发育中起着关键性的作用。通过系统分析视网膜上与眼的发育和功能密切相关的转录因子所对应的自然反义链转录本,包括 Six3OS、Pax6OS、Six6OS、Vax2OS、CrxOS、Otx2OS、Pax2OS、RaxOS, 发现这些反义链转录本通常与对应的蛋白编码基因共表达,在功能上密切相关,共同调控着生理和病理状态下眼的发育和功能^[4]。并且其具有更高层次的选择性剪切,提示它们功能的正常发挥有可能是通过在不同发育阶段的不同剪切亚型的表达水平改变来调控^[5]。Six3OS 调控 Six3 的机制并不是调控 Six3 蛋白的表达水平,而是通过促进 Eya 蛋白家族和染色体修饰酶复合体之间的相互作用来激活或抑制 Six3 蛋白的目的基因在发育中视网膜的表达^[6]。Six3OS 在视网膜中表达量非常丰富,敲除 Six3 不影响 Six3OS 的表达,提示 Six3OS 的表达并不依赖于 Six3。在成熟的视网膜中,不同的 Six3OS 亚型有的在视网膜神经节细胞中与 Six3 共表达,有的只单表达于 Müller 神经胶质细胞中,而不表达 Six3^[7]。过表达或者敲除 Six3OS 都将对视网膜细胞的分化造成影响^[6]。

1.1.3 Vax2 反义链转录本 Vax2 反义链转录本 (Vax2 opposite strand, Vax2OS) 与 Vax 内含子的序列互补,在小鼠视网膜中特异性表达。Alfano 等^[4]证实,在敲除 Vax 的小鼠眼球中, Vax2OS 的表达水平显著降低,并在眼的发育过程中其表达水平呈动态变化,表明 Vax2OS 和 Vax 的功能密切相关。Meola 等^[8]证实, Vax2OS 表达紊乱会影响感光祖细胞的细胞周期,尤其是出生后小鼠视网膜上过表达 Vax2OS 会使感光祖细胞延迟分化和感光细胞凋亡,但是对发育完全的成年小鼠视网膜没有影响。同样,在 661W 细胞系来源的感光细胞中过表达 Vax2OS 也会阻断细胞

进程和分化,说明 Vax2OS 参与了感光祖细胞的细胞周期调控。

1.1.4 心梗相关转录本 心梗相关转录本 (myocardial infarction associated transcript, MIAT) 也被称为视网膜非编码 RNA2 (RNCR2), 长约 9kb, 在哺乳动物中高度保守。最先被认定为心肌梗塞患者的易感基因位点。MIAT 是核定位转录本,与核基质结合。MIAT 在发育中的视网膜上高表达,大约占到小鼠胚胎第 18d 总 RNA 的 0.2%; 并且选择性地表达在有丝分裂祖细胞和有丝分裂后期视网膜前体细胞中,在不成熟的无长突细胞中表达量显著^[5]。敲除发育中视网膜的 MIAT 可以促进无长突细胞和 Müller 神经胶质细胞的发育,表明 MIAT 是一种选择性抑制视网膜细胞系分化的 lncRNA。进一步研究显示, MIAT 与 IRES-GFP 序列结合的时候能被转运到核外,过表达 MIAT-IRES-GFP 与敲除 MIAT 有相同的拟表型,提示 MIAT 位置异常可诱发显性失活的表型^[9]。

1.1.5 Sox2 反义链转录本 在一项儿童双眼无眼畸形的研究中发现, Sox2 反义链转录本 (Sox2 opposite strand, Sox2OT) 基因位于一个非编码基因的内含子,该非编码基因被命名为 Sox2OT (Sox2 overlapping transcript)^[10], 两者之间的功能联系目前还不清楚,然而 Sox2 在神经系统胚胎和出生后的发育中序贯表达, Sox2OT 也被发现在发育中的视网膜和脑部中表达丰富。

1.1.6 X 染色体失活特异转录本及其反义链 X 染色体失活特异转录本 (X-inactive specific transcript, Xist) 和 X 染色体失活特异基因反义链转录本 (Tsix) 是定位于核内的双胞胎 lncRNAs, 它们互相位于彼此的反义链,竞争表达后通过招募多梳蛋白复合物各自负责 X 染色体中一条链的异染色质化而失活。X 染色体的失活在胚胎着床前就开始,并且其模式可以稳定遗传至子代细胞。Xist 和 Tsix 在小鼠胚胎发育阶段的视网膜外侧和内侧神经母细胞层中呈动态表达。出生后大约 1wk, 表达局限于内核层,只有极少数表达在感光细胞和神经节细胞^[5], 提示可能参与了视网膜的发育。

1.1.7 长链非编码 RNA-BB283400 Krol 等^[11] 研究结果显示,长链非编码 RNA-BB283400 (lncRNA BB283400) 是一个视网膜特异性 lncRNA, 在小鼠出生后发育阶段中序贯表达,调控同样序贯表达的 pri-miR-183/96/182。在更早的发育阶段中, pri-miR-183/96/182 被 RNA 解旋酶 Ddx3x 所抑制, Rncr4 的功能为拮抗 Ddx3x 的抑制作用,使 pri-miR-183/96/182 转变为成熟的 miR-183/96/182。Rncr4 结构或功能异常会导致视网膜结构的紊乱,尤其是感光细胞层。

1.1.8 长链非编码 RNA-ENSMUST0000013486 昼夜节律变化在视网膜代谢调控中至关重要,感光细胞膜盘昼夜节律脱落后被临近视网膜色素细胞吞噬,对有丝分裂后神经元的毒性代谢物的清除和生命维持是不可缺少的。感光细胞吞噬缺陷会导致严重的视网膜病理改变。RNA 测序显示,有 16 个昼夜节律表达的 lncRNAs 对基因表达的昼夜节律非常重要。通路分析提示,昼夜节律信号包括这些差异表达的 lncRNAs, 其中长链非编码 RNA-ENSMUST0000013486 的表达差异最为显著,出生后 9.0h 和 1.5h 的表达丰度的比值为 9.8 倍^[12]。

1.2 晶状体发育相关 lncRNAs 晶状体只有两种细胞,上皮细胞和纤维细胞。上皮细胞呈单层位于晶状体前半部,能够持续增殖并分化成为纤维细胞。Thanh 等检测到 86 种在晶状体上皮细胞和纤维细胞中差异表达的 lncRNAs,32 种在上皮细胞中表达上调^[13];54 种在纤维细胞中上调。GO 分析 (gene ontology analysis) 显示上皮细胞中上调的基因富集于细胞外基质的产生、细胞分裂和迁移、蛋白激酶的活性、生长因子的结合以及钙离子的结合等方面;而在纤维细胞中上调的基因富集于蛋白体复合物、未折叠蛋白反应、磷酸酶活性、泛素结合等方面。此为晶状体的发育和晶状体纤维的分化提供了新的见解。

母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 属于 DLK1-MEG3 基因座,位于人染色体 14q32.3。MEG3 表达缺失与各种类型的人类肿瘤相关,体外实验显示过表达 MEG3 可以抑制肿瘤细胞增殖。MEG3 在许多正常组织中都有表达,其在晶状体纤维细胞中表达较上皮细胞多^[13]。Gtl2 是 MEG3 的小鼠同源基因,敲除母系来源 Gtl2 前 5 个外显子和临近启动子的小鼠导致围产期死亡和骨骼肌肉缺陷,提示其在胚胎发育中有重要的作用,但是没有眼部表型的描述^[14]。

肺腺癌转移相关转录本 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, Malat1) 是表达最丰富、最保守的 lncRNAs 之一。原位杂交显示其在包括晶状体在内的很多组织和肿瘤中表达。RNA 测序检测到晶状体上皮细胞和纤维细胞中都大量表达 Malat1。microRNA-9 在核内针对性结合 Malat1 转录产物以降解 Malat1^[15]。然而研究显示, Malat1 靶点突变并不产生任何表型的明显改变,机制尚待查明^[16]。

1.3 角膜发育相关 lncRNAs Joo 等^[17]通过研究敲除 PNN 人角膜上皮细胞或者 PNN 缺陷小鼠角膜中剪接发生改变的 lncRNAs,发现这些 lncRNAs 剪切模式具有细胞和组织特异性,与眼的分化有关,包括 Linc00085、HAS2-AS1、RP11-295B20.2、RP11-181I4.1、RP11-322M19.1、SPACA6P、RPARP-AS1 和 NUTM2a-AS1 等,但是它们对角膜结构和功能的影响还有待进一步的研究。

H19 是母系印记相关 lncRNA,在雌性小鼠眼睛比雄性小鼠眼睛表达更高 (1.9 倍, $P=0.000003$),而在其他组织中没有这种差异^[18]。在胚胎发育期丰富表达,出生后表达下调。Rachel 等研究证实,H19 负性调节角膜上皮细胞增殖,并且影响多种细胞黏附基因的表达^[19]。

2 lncRNAs 与眼部疾病

2.1 青光眼相关 lncRNAs 青光眼是主要的致盲性眼病之一。原发性开角型青光眼 (primary open-angle glaucoma, POAG) 的发生和发展与 9p21 染色体位点的基因变异相关^[20],这些基因包括 CDKN2B-AS1 (也称为 ANRIL)、CDKN2B、CDKN2A 和 SIX1/SIX6。CDKN2B-AS1 也是一些年龄相关疾病的遗传易感基因,比如冠心病、心肌梗塞、2 型糖尿病、阿尔茨海默病等,确切机制尚未阐明。

Pasquale 等^[21]研究发现,CDKN2B-AS1 可能在 POAG 中有重要的作用,其 SNPs 的等位基因会影响 POAG 的进展风险 (比如 G 等位基因 rs2157719 与风险减少有关;A 等位基因 rs3217992 与疾病风险增加有关),并且能够调

控患者视神经变性。利用敲除了 CDKN2B-AS 的转基因小鼠模型研究 CDKN2B-AS 的缺失是否会导致青光眼相关的眼部结构的可识别表型改变,结果显示 CDKN2B-AS 的缺失不会引起明显的视网膜改变,但是这些小鼠与野生型小鼠相比,在眼内压升高的情况下,更易发生视网膜神经节细胞的丢失,提示 CDKN2B-AS 在视神经变性方面的调控作用^[22]。CDKN2B-AS1 影响青光眼发生发展的相关分子机制目前还不是很明了,有可能是因为基因位点的多态性改变了目的基因的表达,从而调控细胞周期;或者通过表观遗传的机制,诱导神经节细胞的凋亡和青光眼的发生^[23]。

2.2 增殖性玻璃体视网膜病变相关 lncRNAs 增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是视网膜脱离和玻璃体视网膜手术的一个严重并发症,视网膜前膜 (ERM) 的形成严重损害视力。PVR 的形成和视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE)、成纤维细胞、胶质细胞和炎症细胞等作用有关,RPE 在 PVR 中含量最高。Zhou 等^[24]将 PVR 患者 ERM 上的 lncRNAs 进行芯片分析,发现 78 个差异表达的 lncRNAs,48 个上调,30 个下调。其中 MALAT1 上调显著,它的上调对于视网膜色素上皮细胞的增生和迁移、ERM 的形成、PVR 的许多其他病理改变都有影响。而在 PVR 患者的外周血细胞和血浆成分中 MALAT1 也表达上调,并在 PVR 手术后明显下降。因此,MALAT1 可以作为一个潜在的预后指标以及作为 PVR 患者诊断和基因治疗的靶点。另外,Yang 等^[25]证实,在 TGF- β 1 诱导产生的 RPE 间充质化模型中,下调 MALAT1 可以显著抑制 ARPE19 细胞系的迁移和增殖,进而影响上皮间充质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞迁移和 RPE 细胞增殖。MALAT1 可以激活 RPE 细胞,从而为研究 PVR 的发病机制和发现潜在的治疗靶点提供了新的方法。

2.3 糖尿病视网膜病变相关 lncRNAs 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是长期糖尿病患者的一个最常见血管并发症。患者视力的下降和视网膜炎症、视网膜新生血管、血管高渗透性、血管细胞的凋亡等密切相关。Yan 等^[26]在糖尿病视网膜病变的小鼠模型中鉴定出了 303 个差异表达的 lncRNAs,214 个下调和 89 个上调。其中 MIAT 水平在给予高糖或在氧化应激的条件下明显上调,MIAT 水平的上调与内皮细胞的增殖和迁移导致的微血管功能异常相关。MIAT 下调显著降低了内皮细胞的炎症反应。其作用机制可能为 MIAT 作为竞争性内源性 RNA (ceRNA),通过结合 miR-150-5p,减弱其对血管内皮生长因子 VEGF 的抑制效应,调控视网膜新生血管的形成^[27]。研究还显示,下调 MIAT 能阻止 VEGF、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α) 和细胞间黏附因子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 的上调,从而减少血管渗漏和炎症,表现出惊人的治疗效果^[28]。

MALAT1 高表达在高血糖症的 RF/6A 细胞模型、房水样本、糖尿病患者的纤维血管膜中^[29],在糖尿病诱导的视网膜功能异常中起着重要的作用。Liu 等^[30]研究发现,在糖尿病大鼠模型视网膜中 MALAT1 表达量明显上调,敲除 MALAT1,通过改变 MAPKs 的 p38 磷酸化水平,在体内能显著降低糖尿病诱发的微血管功能失调,在体外能阻

止内皮细胞增生、迁移和管腔形成,具有治疗价值。

在链脉佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠视网膜中,以及高糖和氧化损伤处理的内皮细胞中,MEG3的表达量显著下调。MEG3敲除加重了视网膜血管功能的异常,表现为严重的毛细血管退化、微血管渗出增加、炎症反应。在体外实验中,MEG3敲除也可以促进视网膜内皮细胞增殖、迁移和管腔形成。其功能机制与PI3K/Akt信号通路的调控相关,上调MEG3有可能成为治疗糖尿病相关微血管并发症的新方法^[31]。

2.4 眼部新生血管相关 lncRNAs 慢性缺氧或者各种炎症刺激,比如细菌性角膜炎、碱烧伤、移植排斥等,会导致角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV),引起视力损伤甚至致盲。Huang等^[32]鉴定出154种在血管化和正常角膜中差异表达的lncRNAs,60个下调,94个上调。在这些差异表达的lncRNAs中,lncRNA NR_033585在血管化的角膜中显著上调,其表达模式与促血管因子VEGF、MMP-9和Ang-2等相似。而lncRNA chr8:129102060-129109035反义链在血管化角膜中显著下调,其表达模式与抗血管因子PDGF相似。与差异lncRNAs共表达mRNAs的GO富集分析显示,这些mRNAs位于细胞外区域,分子功能为DNA结合,主要参与免疫反应。KEGG通路分析显示,最富集的信号通路是癌症相关信号通路。这些差异lncRNAs可能与角膜新生血管的形成有关,有望成为治疗角膜新生血管的靶基因。

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是新生血管性年龄相关性黄斑变性的标志物,是老年人最主要的损害视力的原因。Vax2OS1和Vax2OS2是同源框转录因子Vax2基因的反义链转录本,在脉络膜和视网膜的脉管系统中高表达。Xu等^[33]发现在CNV患者房水中,VEGF和Vax2OS1、Vax2OS2的表达水平显著上调,抗血管生成因子PEDF则显著下调。Vax2OS1和C1D以及Vax2OS2和CPNL1之间存在强烈的RNA蛋白质相互作用,而C1D和CPNL1能调控染色体结构的稳定性,提示Vax2OS1和Vax2OS2在眼部新生血管性疾病中产生和VEGF一样的促血管生成的作用。

缺血性视网膜病变,包括早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)和糖尿病视网膜病变,是致盲的主要原因。病变前期血管减少,随后发生缺氧引发的病理性视网膜新生血管。目前对调控该病理过程的相关转录因子仍然知之甚少。在ROP中,血管内皮细胞高表达保守lncRNAs-MALAT1、TUG1、MEG3、linc00657和linc00493。MALAT1在缺氧的血管内皮细胞中表达显著增高,是控制内皮细胞的一个表型开关。体外实验中敲除MALAT1使内皮细胞的表型由增殖向迁移转变,在体内实验中MALAT1缺失限制了血管的生长^[34]。

血管重构是高血压的重要病理特征,导致血管阻力增加和顺应性降低。内皮细胞(EC)和血管平滑肌细胞(VSMC)功能障碍参与血管重构,lncRNAs是EC和VSMC功能的潜在调控因子。Wang等^[35]研究发现,敲除lncRNA-GAS5会加重高血压引起的微血管功能障碍,表现为视网膜新生血管增加和毛细血管渗漏。GAS5主要在内皮细胞和血管平滑肌细胞中表达,通过 β -catenin信号通路调控细胞功能,高血压导致其表达量显著下降。

2.5 眼部肿瘤相关 lncRNAs

2.5.1 视网膜母细胞瘤 视网膜母细胞瘤(RB)是威胁儿童视力和生命的恶性肿瘤,目前已知的与之相关的lncRNAs有两个,BANCR和MEG3。BANCR(BRAF-activated non-coding RNA)是BRAF激活的非编码RNA(693bp),位于9号染色体,通过调控MAPK途径影响恶性黑色素瘤和肺癌的增殖、转移,通过调控NF- κ B1途径促进胃癌细胞的增殖,在甲状腺癌、骨肉瘤、肝癌、膀胱癌、结直肠癌等多种癌组织中表达上调。近期研究显示,在RB的组织 and 细胞系中,BANCR呈高表达,并且与肿瘤的大小、脉络膜和视神经的浸润密切相关。在体外实验中敲除BANCR能显著抑制RB细胞的增殖、迁移和侵袭,预后较好;而BANCR高表达的患者生存率低于低表达的患者,因此推测BANCR可以作为反映预后的指标^[36]。

MEG3具有阻止人类肿瘤细胞的增殖、诱导凋亡、阻止其不依赖贴壁生长的功能。在RB样本中,Gao等^[37]发现,MEG3明显下调,并且MEG3下调和RB患者较差的预后相关。MEG3抑制RB的功能可能是通过负性调节Wnt- β -catenin通路实现的^[38]。

2.5.2 葡萄膜色素瘤 葡萄膜色素瘤(uveal melanoma, UN)是成年人最常见的眼部恶性肿瘤,严重影响视力,致死率接近50%。Fan等^[39]发现,lncRNA ROR(retinoid-related orphan nuclear receptor)和它的靶基因TESC在三种眼部恶性色素瘤细胞系中和20种眼部黑色素瘤组织中高表达。在肿瘤中,抑制ROR能沉默TESC的表达,由G9A介导的TESC启动子H3K9甲基化得以保留,从而显著降低肿瘤的生长和转移。ROR可能作为一个诱饵癌基因阻断组蛋白修饰酶与组蛋白的结合,从而促进肿瘤发生。

2.6 年龄相关性白内障相关 lncRNAs 年龄相关性白内障是最常见的致盲性老年慢性疾病,为了探索白内障病理生理机制相关lncRNAs,Shen等^[40]分析了透明和白内障眼晶状体中lncRNAs的表达谱,鉴定出38个差异表达的lncRNAs。其中表达量最高的lncRNAs之一是MIAT,在白内障患者的血浆和房水中都高表达,因此推测MIAT可能作为白内障特异性生物标记。后囊混浊是白内障手术的常见并发症,由于白内障手术破坏了晶状体上皮细胞和囊膜的完整性,诱发了晶状体自身的创伤愈合反应,导致上皮细胞增生和细胞外基质重构,与炎症因子和氧化应激有关。敲除MIAT能抑制TNF- α 诱导的人晶状体上皮细胞的异常增殖和迁移。MIAT还能影响氧化应激状态下人晶状体上皮细胞的增殖、凋亡和迁移,提示MIAT在后囊混浊病理过程中的潜在作用。MIAT可能是作为内源竞争RNA(competing endogenous RNAs, ceRNA)通过形成Akt和miR-150-5p的反馈环路来调控人晶状体上皮细胞的功能。

2.7 视网膜神经退行性变相关 lncRNAs Yao等^[41]研究视神经切断大鼠的视网膜和小鼠视网膜神经退行性变模型中的MALAT1的作用。MALAT1在压力状态下的视网膜、培养的Müller细胞和原代视网膜神经节细胞中表达显著升高。在体内和体外实验中,敲除MALAT1能通过CREB信号通路减少反应性神经胶质增生、Müller细胞激

活和神经节细胞存活率,提示 MALAT1 的失调在视网膜神经退行性变的发生过程中起着关键的作用。

2.8 虹膜色素剥脱综合征相关 lncRNAs 虹膜色素剥脱综合征(exfoliation syndrome, EFS)是一个常见的年龄相关的系统性纤维蛋白异常,其特征是异常蛋白团块的累积阻塞房水的正常排泄通路,显著增加剥脱性青光眼(exfoliation glaucoma, XFG)的风险,是世界范围内一个主要的不可逆的致盲原因。在不同人群的研究中都显示 LOXL1 (lysyl oxidase-like 1) 基因编码变异和 XFS 强烈相关^[42],但是其功能尚未阐明,变异位于 LOXL1 基因 3' 端第一个外显子和临近的内含子全长 7kb 的已知区域,峰值相关区域位于 LOXL1-AS1 的上游。LOXL1-AS1 含有一个启动子,XFS 风险等位基因是显著调节启动子活性的功能变异。LOXL1-AS1 的表达在人晶状体上皮细胞受氧化应激的显著影响,在人 Schlemm 管上皮细胞受周期性机械压力的显著影响。由遗传变异风险导致的 LOXL1-AS1 表达失调在 XFS 发病机制中起着关键的作用。

2.9 其他眼部疾病相关 lncRNAs MOMO 综合征(Macrosomia, obesity, macrocephaly and ocular abnormalities)是一种非常罕见的遗传疾病,全世界只被诊断出 6 例,大约每一百万出生人口中只发生 1 例,尽管目前还没有发现相关的染色体和分子异常,Vu 等^[43]发现了一个新的 lncRNA (LINC00237),它在对照组的淋巴细胞中正常表达,而在 MOMO 患者中表达缺失,因此被推测在 MOMO 的发病机制中可能起作用,但是功能不清楚。

BPES(Blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome)是一种罕见的常染色体先天性疾病,其发病与 FOXL2 的变异有关,分子研究显示有一段会影响 FOXL2 调控的 63.2kb 的基因缺失,其中包含一个非编码 RNA (PISRT1)^[44]。

3 小结

曾经被认为是“垃圾基因”的 lncRNAs 现在越来越受到关注。lncRNAs 不仅在数量上超过 mRNAs,还参与了物种进化和多种生物过程的调控,通过与 DNAs 和蛋白质的相互作用保证生命活动的协调进行。比如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)中的 lncRNAs 通过和多种染色体蛋白质和其他蛋白复合体相互作用影响多种基因的表达模式,从而维持 ESC 的多能状态和抑制分化^[45]。然而目前只有极少部分 lncRNAs 的特征、生物学功能和作用机制得到确认,在不久的将来,随着研究的深入,lncRNAs 在细胞和组织中所扮演的角色会越来越清晰。

lncRNAs 不能简单地由序列来推断其功能,其在物种间保守性较差并且进化迅速,这些特征使得对其进行研究相对困难。而眼睛由于血-眼屏障的存在以及位置表浅易于观察和操作,成为研究 lncRNAs 较为理想的模式器官。通过对视觉系统中功能性 lncRNAs 在生理和病理状态下,在特定的时间和空间表达谱的研究和分析,期望能够发现与眼部疾病相关的有临床应用价值的 lncRNAs,作为诊断、预后、预防和治疗的靶基因。如前所述的 MIAT,在糖尿病视网膜病变和年龄相关性白内障病变的基础研究中展现出了显著的治疗效果;MALAT1 在增殖性玻璃体视网膜病变、糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变及视网膜神经退行性病变等的基础研究中也展示出诊断和治

疗的应用价值,但是其有效性和安全性还有待进一步的临床研究来证实。我们通过分析 8 份 LESC 和角膜上皮细胞样本的 lncRNAs 转录本比较的数据,共检测到 15 种差异表达最显著的 lncRNAs,聚类分析和功能注释结果显示差异 lncRNAs 可能作为 LESC 的生物标记,为 LESC 的研究提供支持。进一步研究关键 lncRNAs 在 LESC 中的生物学功能、信号通路和调控机制,将有助于开创全新的角膜缘干细胞缺乏症(limbal stem cell deficiency, LSCD)的药物治疗方法。

一些新的技术手段,尤其是高通量测序和计算机分析以及高分辨率的活体检测成像技术为 lncRNAs 的研究提供了便利,例如 MERFISH 技术^[46]能够同时检测和定位细胞中 100~1000 个 RNA 分子;catRAPID 是一种主要用于预测 RNA 与蛋白质相互作用的在线算法,避免了功能研究实验的盲目性,节约实验成本;ChIRP-seq 技术用于在全基因组范围内定位 lncRNA 的结合位点;c-KLAN 技术用于对 lncRNA 进行功能缺失研究和细胞定位。但是这些还远远不够,我们期待更强大的工具来探索 lncRNAs 的未知领域。

参考文献

- 1 Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* 2005; 309 (5740): 1559-1563
- 2 Schorderet P, Duboule D. Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human. *PLoS Genet* 2011; 7 (5): e1002071
- 3 Young TL, Matsuda T, Cepko CL. The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina. *Curr Biol* 2005; 15(6) :501-512
- 4 Alfano G, Vitiello C, Caccioppoli C, et al. Natural antisense transcripts associated with genes involved in eye development. *Hum Mol Genet* 2005; 14(7) :913-923
- 5 Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, et al. Genomic Analysis of Mouse Retinal Development. *PLoS Biol* 2004; 2(9) :E247
- 6 Rapicavoli NA, Poth EM, Zhu H, et al. The long noncoding RNA Six3OS acts in trans to regulate retinal development by modulating Six3 activity. *Neural Dev* 2011; 6(1) :32
- 7 Geng X, Lavado A, Lagutin OV, et al. Expression of Six3 Opposite Strand (Six3OS) during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 2007; 7(3) :252-257
- 8 Meola N, Pizzo M, Alfano G, et al. The long noncoding RNA Vax2os1 controls the cell cycle progression of photoreceptor progenitors in the mouse retina. *RNA* 2012; 18(1) :111-123
- 9 Rapicavoli NA, Poth EM, Blackshaw S. The long noncoding RNA RNCR2 directs mouse retinal cell specification. *BMC Dev Biol* 2010; 10:49
- 10 Fantès J, Ragge NK, Lynch SA, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 2003; 33(4) :461-463
- 11 Krol J, Krol I, Alvarez CP, et al. A network comprising short and long noncoding RNAs and RNA helicase controls mouse retina architecture. *Nat Commun* 2015; 6:7305
- 12 Mustafi D, Kevany BM, Genoud C, et al. Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *FASEB J* 2013; 27 (11): 4585-4595
- 13 Hoang TV, Kumar PK, Sutharzan S, et al. Comparative transcriptome analysis of epithelial and fiber cells in newborn mouse lenses with RNA sequencing. *Mol Vis* 2014; 20(20) :1491-1517
- 14 Zhou Y, Cheunsuchon P, Nakayama Y, et al. Activation of paternally

- expressed genes and perinatal death caused by deletion of the Gtl2 gene. *Development* 2010;137(16):2643-2652
- 15 Leucci E, Patella F, Waage J, et al. microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci Rep* 2013; 3(7464):2535
- 16 Eiβmann M, Gutschner T, Hämmerle M, et al. Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol* 2012;9(8):1076-1087
- 17 Joo JH, Ryu D, Peng Q, et al. Role of Pnn in alternative splicing of a specific subset of lncRNAs of the corneal epithelium. *Mol Vis* 2013;20(32):1629-1642
- 18 Reinius B, Kanduri C. Elevated expression of H19 and Igf2 in the female mouse eye. *PLoS One* 2013;8(2):e56611
- 19 Klein RH, Stephens DN, Ho H, et al. Cofactors of LIM Domains Associate with Estrogen Receptor α to Regulate the Expression of Noncoding RNA H19 and Corneal Epithelial Progenitor Cell Function. *J Biol Chem* 2016;291(25):13271
- 20 Burdon KP, Crawford A, Casson RJ, et al. Glaucoma risk alleles at CDKN2B-AS1 are associated with lower intraocular pressure, normal-tension glaucoma, and advanced glaucoma. *Ophthalmology* 2012; 119(8):1539-1545
- 21 Pasquale LR, Loomis SJ, Kang JH, et al. CDKN2B-AS1, Genotype-Glaucoma Feature Correlations in Primary Open-Angle Glaucoma Patients From the United States. *Am J Ophthalmol* 2013; 155(2): 342-353
- 22 Gao S, Jakobs TC. Mice Homozygous for a Deletion in the Glaucoma Susceptibility Locus INK4 Show Increased Vulnerability of Retinal Ganglion Cells to Elevated Intraocular Pressure. *Am J Pathology* 2016; 186(4):985-1005
- 23 Ada C, Kei K, Mitsuru O, et al. ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health. *Int J Mol Sci* 2013;14(1):1278-1292
- 24 Zhou RM, Wang XQ, Yao J, et al. Identification and characterization of proliferative retinopathy-related long noncoding RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;465(3):324-330
- 25 Yang S, Yao H, Li M, et al. Long Non-Coding RNA MALAT1 Mediates Transforming Growth Factor Beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* 2016;11(3):e0152687
- 26 Yan B, Yao J, Liu JY, et al. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA. *Circ Res* 2015;116:1143-1156
- 27 Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature* 2014;505(7483):344-352
- 28 Jae N, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in diabetic retinopathy. *Circ Res* 2015;116(7):1104-1106
- 29 Yan B, Tao ZF, Li XM, et al. Aberrant expression of long noncoding RNAs in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(2):941-951
- 30 Liu JY, Yao J, Li XM, et al. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis* 2014;5(10):e1506
- 31 Qiu GZ, Tian W, Fu HT, et al. Long noncoding RNA-MEG3 is involved in diabetes mellitus-related microvascular dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;471(1):135-141
- 32 Huang J, Li YJ, Liu JY, et al. Identification of corneal neovascularization-related long noncoding RNAs through microarray analysis. *Cornea* 2015;34(5):580-587
- 33 Xu XD, Li KR, Li XM, et al. Long non-coding RNAs: new players in ocular neovascularization. *Mol Biol Rep* 2014;41(7):4493-4505
- 34 Michalik KM, You X, Manavski Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res* 2014;114(9):1389-1397
- 35 Wang YN, Shan K, Yao MD, et al. Long Noncoding RNA-GASS: A Novel Regulator of Hypertension-Induced Vascular Remodeling. *Hypertension* 2016;68(3):736
- 36 Su S, Gao J, Wang T, et al. Long non-coding RNA BANCR regulates growth and metastasis and is associated with poor prognosis in retinoblastoma. *Tumour Biol* 2015;36(9):7205-7211
- 37 Gao Y, Lu X. Decreased expression of MEG3 contributes to retinoblastoma progression and affects retinoblastoma cell growth by regulating the activity of Wnt/ β -catenin pathway. *Tumor Biol* 2016;37(2):1461-1469
- 38 Hu D, Su C, Jiang M, et al. Fenofibrate inhibited pancreatic cancer cells proliferation via activation of p53 mediated by upregulation of lncRNA MEG3. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;471(2):290-295
- 39 Fan J, Xing Y, Wen X, et al. Long non-coding RNA ROR decoys gene-specific histone methylation to promote tumorigenesis. *Genome Biol* 2015;16(1):139
- 40 Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study. *J Cell Mol Med* 2016;20(3):537-548
- 41 Yao J, Wang XQ, Li YJ, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates retinal neurodegeneration through CREB signaling. *EMBO Mol Med* 2016;8(9):1113
- 42 Hauser MA, Aboobakar IF, Liu Y, et al. Genetic variants and cellular stressors associated with exfoliation syndrome modulate promoter activity of a lncRNA within the LOXL1 locus. *Hum Mol Genet* 2015;24(22): 6552-6563
- 43 Vu PY, Toutain J, Cappellen D, et al. A homozygous balanced reciprocal translocation suggests LINC00237 as a candidate gene for MOMO (macrosomia, obesity, macrocephaly, and ocular abnormalities) syndrome. *Am J Med Genet A* 2012;158A(11):2849-2856
- 44 González-González C, García-Hoyos M, Hernaez CR, et al. Microdeletion found by array-CGH in girl with blepharophimosis syndrome and apparently balanced translocation t(3;15)(q23;q25). *Ophthalmic Genet* 2012;33(2):107-110
- 45 Guttman M, Donaghey J, Carey BW, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 2011;477(7364):295-300
- 46 Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, et al. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* 2015; 348(6233):aaa6090