

# miR-373 靶向 VEGFA 对糖尿病视网膜病变大鼠的作用

郭 宁, 阿依努·努拉厚, 卜 倩, 浏 梦, 王 雁

引用: 郭宁, 阿依努·努拉厚, 卜倩, 等. miR-373 靶向 VEGFA 对糖尿病视网膜病变大鼠的作用. 国际眼科杂志 2021;21(8): 1339-1344

作者单位: (830000) 中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆维吾尔自治区中医医院眼科

作者简介: 郭宁, 本科, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 阿依努·努拉厚, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病. 1655404893@qq.com

收稿日期: 2020-11-30 修回日期: 2021-06-24

## 摘要

**目的:** 探讨 miR-373 靶向血管内皮生长因子 A (VEGFA) 对糖尿病视网膜病变 (DR) 大鼠的作用。

**方法:** 将 40 只大鼠随机分为对照组 ( $n=10$ ) 和 DR 组 ( $n=30$ ), 造模成功后的 DR 组大鼠分为模型组 ( $n=10$ )、miR-373 agomir 组 ( $n=10$ )、agomir-NC 组 ( $n=10$ ), 右眼玻璃体腔分别注射 200 $\mu$ L 生理盐水、miR-373 agomir (200nmol)、agomir-NC (200nmol), 每周 1 次, 共处理 12wk。通过 RT-qPCR 检测各组大鼠视网膜组织中 miR-373 和 VEGFA mRNA 表达水平, 双荧光素酶实验验证 miR-373 与 VEGFA 靶向关系, Western-blot 检测各组大鼠视网膜组织中 VEGFA、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、磷酸化-磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-PI3K)、丝苏氨酸蛋白激酶 (AKT)、磷酸化-丝苏氨酸蛋白激酶 (p-AKT) 蛋白表达水平。

**结果:** 与对照组比, 模型组和 agomir-NC 组大鼠视网膜组织 miR-373 及 Bcl-2 蛋白表达水平显著下降, VEGFA mRNA、Bax、p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达量显著升高 (均  $P<0.05$ )。与 agomir-NC 组比, miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 miR-373 及 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高, VEGFA mRNA 及蛋白、Bax、p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达量显著下降 (均  $P<0.05$ )。双荧光素酶实验证实 VEGFA 是 miR-373 的靶基因。

**结论:** miR-373 通过靶向 VEGFA 抑制糖尿病视网膜病变, 其机制可能与 miR-373 抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

**关键词:** 糖尿病视网膜病变; miR-373; 血管内皮生长因子 A; PI3K/AKT; 细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.06

## Effect of miR-373 on rats with diabetic retinopathy by targeting VEGFA

Ning Guo, Aiyinu · Nulahou, Qian Bu, Meng Liu, Yan Wang

The First Department of Ophthalmology, Traditional Chinese Medicine in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000,

Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Aiyinu · Nulahou. The First Department of Ophthalmology, Traditional Chinese Medicine in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. 1655404893@qq.com

Received:2020-11-30 Accepted:2021-06-24

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of microRNA-373 (miR-373) by targeting vascular endothelial growth factor A (VEGFA) on diabetic retinopathy (DR) rats.

• **METHODS:** Totally 40 rats were randomly divided into control group ( $n=10$ ) and DR group ( $n=30$ ). The rats after successful modeling in DR group were divided into model group ( $n=10$ ), miR-373 agomir group ( $n=10$ ), and agomir-NC group ( $n=10$ ). The right eyes vitreous cavity separately were injected with 200 $\mu$ L normal saline, miR-373 agomir (200nmol) and agomir-NC (200nmol) were treated once a week for 12wk. The expression levels of miR-373 and VEGFA mRNA in each group were detected by RT-qPCR. Dual luciferase experiment was used to verify the targeting relationship between miR-373 and VEGFA. Western-blot was used to detect VEGFA, Bcl-2 related X protein (Bax), b-cell lymphoma-2 (Bcl-2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phospho phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K), serine threonine protein kinase (AKT), phospho serine protein kinase (p-AKT) protein expression levels.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the expression levels of miR-373 and Bcl-2 protein in the retina tissue of model group and agomir-NC group were significantly decreased, and the expression levels of VEGFA mRNA, Bax, p-PI3K and p-AKT protein were significantly increased. Compared with the agomir-NC group, the expression levels of miR-373 and Bcl-2 protein in the retina tissue of miR-373 agomir group were significantly increased (all  $P<0.05$ ), while the expression levels of VEGFA mRNA and protein, the Bax, p-PI3K, p-AKT protein in the retina tissue of miR-373 agomir group were significantly decreased (all  $P<0.05$ ). Dual luciferase assay confirmed that VEGFA is the target gene of miR-373.

• **CONCLUSION:** miR-373 can inhibit diabetic retinopathy by targeting VEGFA, which may be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway by miR-373.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; miR-373; vascular endothelial growth factor A; PI3K/AKT; apoptosis

**Citation:** Guo N, Nulahou A, Bu Q, et al. Effect of miR-373 on rats with diabetic retinopathy by targeting VEGFA. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(8):1339-1344

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病微血管常见并发症之一,导致患者视力受损。DR的特征是毛细血管周细胞早期丢失和基底膜增厚,导致内皮细胞过度增殖和血管生成,而血管内皮生长因子A(VEGFA)能够促进血管生成,VEGFA的异常表达水平可加重病理性血管生成和DR的发生<sup>[1]</sup>。目前DR的主要治疗手段有玻璃体腔注射抗VEGF药物、激光治疗、类固醇疗法及玻璃体切除术等<sup>[2]</sup>。但实践证明这些治疗手段仅可预防或暂时缓解视力丧失。因此,亟需探究DR治疗的新的治疗靶标和方法。微小RNA(miRNA)是一类小的非编码RNA,通过降解或阻断信使RNA翻译,在转录后水平调控靶基因的表达。研究表明,miRNA通过抑制炎症反应、视网膜新生血管形成及神经元凋亡和变性对DR的早期治疗具有一定作用<sup>[3-4]</sup>。另有研究发现miR-373与眼底疾病具有一定的相关性<sup>[5-6]</sup>。然而,miR-373是否参与DR发生发展目前罕见报道。此外,通过Mirtarbase网站预测到miR-373与VEGFA 3'UTR存在结合位点,因此,本研究主要探讨miR-373在DR视网膜组织中的表达及其靶向VEGFA对DR的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠40只,体质量180~220g,7周龄,购买且饲养于新疆医科大学北校区动物实验中心[许可证号:SCXK(新)2018-0002,SYXK(新)2018-0003]。本研究符合动物实验伦理要求,经伦理委员会审批通过。

1.1.2 主要试剂和仪器设备 293T细胞购于无锡欣润生物科技有限公司;RPMI-1640、胎牛血清购于Gibco公司;苏木精伊红(HE)染色试剂盒、BCA试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京索莱宝生物科技;miR-373 agomir、agomir-NC、miR-373 mimic、mimic-NC购于上海艾博思生物科技有限公司;突变型VEGFA 3'UTR、野生型VEGFA 3'UTR购于广州辉骏生物科技股份有限公司;Bcl-2相关X蛋白(Bax)、 $\beta$ 肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔抗大鼠单克隆抗体(ab32503、ab115777)、VEGFA、B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)兔抗鼠多克隆抗体(ab46154、ab194583)购于美国Abcam公司;磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、磷酸化-磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)、丝苏氨酸蛋白激酶(AKT)、磷酸化-丝苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)兔抗大鼠多克隆抗体(GTX100462、GTX132597、GTX121937、GTX128414)、山羊抗兔HRP标记二抗(GTX213110-01)购于GeneTex公司;Dual-Luciferase Reporter System购于Promega公司;Lipofectamine 2000、TRIzol<sup>TM</sup>、SuperScript IV反转录酶、PowerUp SYBR Green预混液购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。主要仪器:血糖仪(上海罗氏制药有限公司);切片机(上海莱卡仪器有限公司);全自动酶标仪、ABI实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);正立金相显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 造模、分组与给药 将40只大鼠随机分为对照组(10只)和DR组(30只),DR组大鼠腹腔注射60mg/kg链脲霉素(STZ,10g/L)诱导糖尿病;对照组注射等量柠檬酸盐缓冲液。注射STZ 72h后,尾静脉取血检测血糖,血

糖值 $\geq 16.7$ mmol/L提示糖尿病大鼠建模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组(10只)、miR-373 agomir组(10只)、agomir-NC组(10只),miR-373 agomir组和agomir-NC组大鼠分别于右眼玻璃体腔注射200 $\mu$ L miR-373 agomir(200nmol)和agomir-NC(200nmol),每周1次,共处理12wk;模型组大鼠右眼采用玻璃体腔注射200 $\mu$ L生理盐水,每周1次,共处理12wk。每月记录各组大鼠体质量,并通过血糖仪检测各组大鼠血糖值。

1.2.2 HE染色观察视网膜病变情况 处理12wk后,每组大鼠用30mg/kg戊巴比妥钠麻醉,摘取右眼眼球,并迅速剥离视网膜组织进行冷冻储存备用。经固定,常规石蜡包埋,切片,苏木精伊红染色,脱水,透明,中性树脂封固,镜下观察。

1.2.3 RT-qPCR检测视网膜组织中相关mRNA表达水平 处理12wk后,取每组大鼠视网膜组织100mg加入1mL TRIzol<sup>TM</sup>试剂,提取总RNA,合成cDNA,进行PCR反应。反应体系:cDNA 200ng;正向引物(10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L;反向引物(10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L;10 $\times$ HA Buffer 2.0 $\mu$ L;2 $\times$ PowerUp SYBR Green Master Mix 10 $\mu$ L;加入ddH<sub>2</sub>O至20 $\mu$ L。反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 5min 1个循环;变性94 $^{\circ}$ C 15s,退火58 $^{\circ}$ C 20s,延伸72 $^{\circ}$ C 1min,共40个循环;补充延伸72 $^{\circ}$ C 5min 1个循环。以U6和 $\beta$ -actin为内参,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>进行相对定量分析。引物序列:miR-373上游引物5'-GCCAGAAGTGCTTCGATTTTG-3',下游引物5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6上游引物5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',下游引物5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';VEGFA上游引物5'-TGGCTCACTGGCTTGCTCTA-3',下游引物5'-ATCCAAGTGCACCGTCACAG-3'; $\beta$ -actin上游引物5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',下游引物5'-ACTAAGTCATAGTCCGCCTAGA-3'。

1.2.4 双荧光素酶实验验证miR-373与VEGFA靶向关系 将293T细胞接种到24孔板中,并使用Lipofectamine 2000将野生型VEGFA 3'UTR或突变型VEGFA 3'UTR与miR-373 mimic共转染至293T细胞,同时转染mimic-NC与野生型VEGFA 3'UTR或突变型VEGFA 3'UTR为对照,转染48h后,收集各组细胞裂解,并根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒测量荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=海肾荧光素酶活性/萤火虫荧光素酶活性。

1.2.5 Western-blot检测视网膜组织中相关蛋白表达水平 处理12wk后,取各组大鼠视网膜组织100mg,分别加入RIPA裂解液,离心,收集上清,采用BCA试剂盒测定蛋白含量。取50 $\mu$ g蛋白液进行SDS-PAGE电泳,PVDF转膜,封闭,分别加入一抗VEGFA(1:500)、Bax(1:2000)、Bcl-2(1:2000)、PI3K(1:2000)、p-PI3K(1:2000)、AKT(1:2000)、p-AKT(1:2000)、 $\beta$ -actin(1:10000)4 $^{\circ}$ C过夜,加入二抗(1:10000)室温孵育1h。ECL曝光成像,凝胶成像系统观察拍照,以Image J图像分析系统分析条带灰度值。以 $\beta$ -actin为内参,目的蛋白相对表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin条带灰度值。

统计学分析:采用GraphPad Prism 7软件进行数据分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析和重复测量数据的方差分析,两组间比较采用独立样本t检验,多组间或组内两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

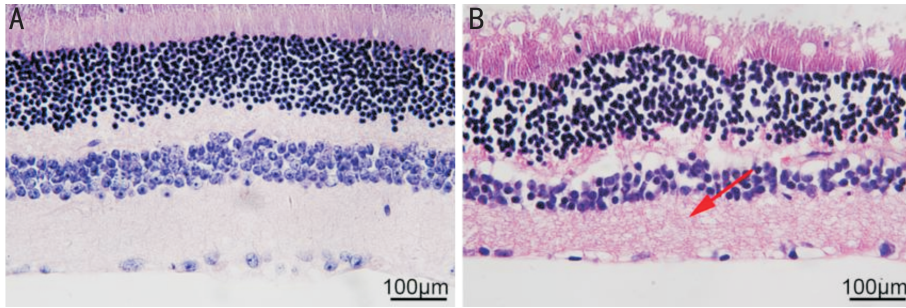


图1 两组大鼠视网膜病理切片结果 A:对照组;B:DR组,箭头表示细胞核固缩及组织排列紊乱。

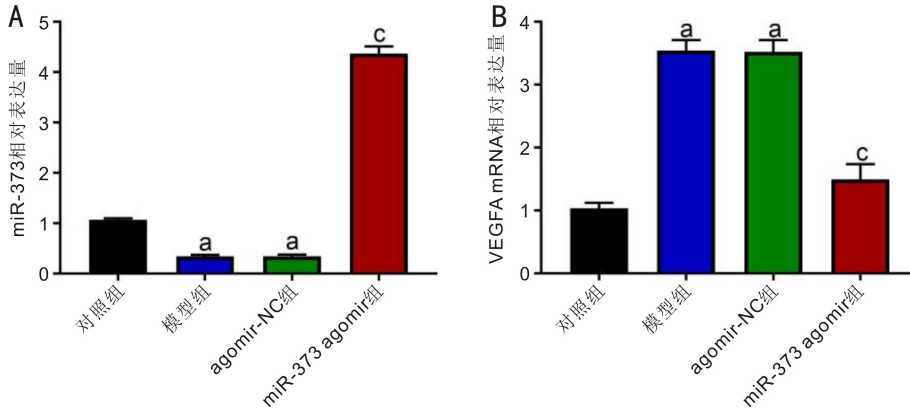


图2 各组大鼠视网膜组织中 miR-373 和 VEGFA mRNA 表达水平 A:miR-373 表达水平;B:VEGFA mRNA 表达水平。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs agomir-NC 组。

表1 两组大鼠造模前后体质量及血糖浓度

组别	数量(只)	体质量(g)			
		造模前	造模 4wk	造模 8wk	造模 12wk
对照组	10	198.93±6.83	229.11±14.08	281.05±18.81	318.78±17.43
DR 组	30	198.14±7.06	185.56±12.98	179.67±12.29	166.32±17.62
<i>t</i>		0.306	9.001	19.676	22.954
<i>P</i>		0.761	<0.001	<0.001	<0.001

组别	数量(只)	血糖浓度(mmol/L)			
		造模前	造模 4wk	造模 8wk	造模 12wk
对照组	10	5.48±0.58	5.45±0.74	5.15±0.25	5.27±0.36
DR 组	30	5.46±0.36	22.91±4.14	22.36±3.08	21.87±2.92
<i>t</i>		0.089	22.072	30.325	30.407
<i>P</i>		0.931	<0.001	<0.001	<0.001

## 2 结果

**2.1 DR 大鼠模型评价** 造模前后,两组大鼠体质量和血糖浓度比较,差异均有统计学意义(体质量:  $F_{\text{时间}} = 56.147, P_{\text{时间}} < 0.001; F_{\text{组间}} = 1385.833, P_{\text{组间}} < 0.001; F_{\text{交互}} = 81.619, P_{\text{交互}} < 0.001$ ; 血糖浓度:  $F_{\text{时间}} = 99.852, P_{\text{时间}} < 0.001; F_{\text{组间}} = 760.987, P_{\text{组间}} < 0.001; F_{\text{交互}} = 119.360, P_{\text{交互}} < 0.001$ )。造模前,对照组大鼠体质量和血糖浓度与 DR 组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );造模 4、8、12wk 后大鼠无死亡,DR 组大鼠体质量显著低于对照组( $P < 0.001$ ),血糖浓度显著高于对照组( $P < 0.001$ ),见表 1。HE 病理切片结果显示,对照组大鼠视网膜组织细胞排列整齐,结构清晰,无病理性变化,DR 组大鼠视网膜水肿,细胞分层模糊且排列紊乱,提示 DR 大鼠模型建立成功,见图 1。

**2.2 各组大鼠视网膜组织中 miR-373 和 VEGFA mRNA 表达水平** 对照组、模型组、agomir-NC 组和 miR-373

agomir 组大鼠视网膜组织中 miR-373 表达水平(1.00±0.06、0.34±0.03、0.34±0.03、4.37±0.15)和 VEGFA mRNA 表达水平(1.00±0.09、3.54±0.17、3.52±0.19、1.50±0.24)比较,差异有统计学意义( $F = 5513.582、536.590$ ,均  $P < 0.001$ )。与对照组比,模型组和 agomir-NC 组大鼠视网膜组织 miR-373 表达水平显著下降,VEGFA mRNA 含量显著升高( $P < 0.05$ );与 agomir-NC 组比,miR-373 agomir 组视网膜组织 miR-373 表达水平显著升高,VEGFA mRNA 含量显著下降( $P < 0.05$ ),见图 2。

**2.3 miR-373 对大鼠体质量和血糖浓度及视网膜组织病理变化的影响** 处理 12wk 后,agomir-NC 组大鼠体质量为 171.29±15.16g,血糖浓度为 21.41±2.67mmol/L,miR-373 agomir 组大鼠体质量为 264.62±14.02g,血糖浓度为 17.22±0.30mmol/L,与 agomir-NC 组比,miR-373 agomir 组大鼠体质量显著升高( $t = 14.292, P < 0.001$ ),血糖浓度

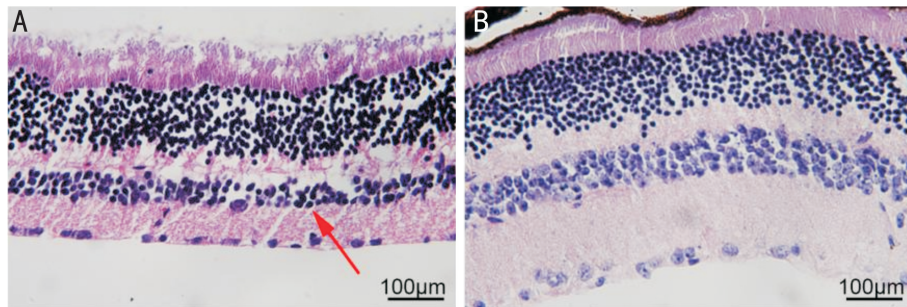


图3 miR-373 agomir 对大鼠视网膜组织病理变化的影响 A: agomir-NC 组, 箭头表示细胞核固缩及组织排列紊乱; B: miR-373 agomir 组。

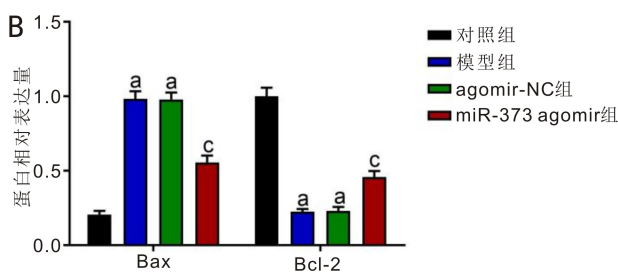
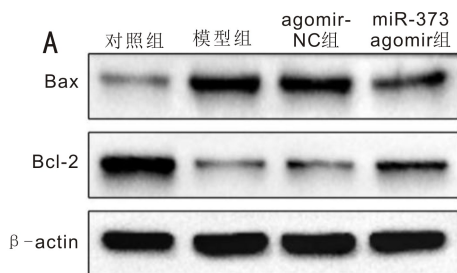


图4 各组大鼠视网膜组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况 对照组; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs agomir-NC 组。

A: Western-blot 检测结果; B: Western-blot 检测结果量化分析。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs

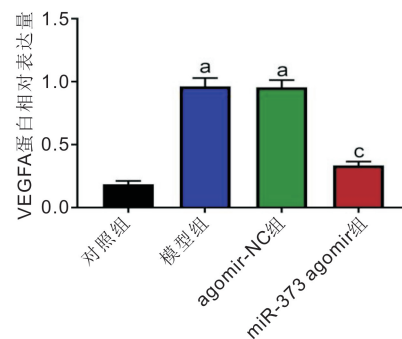
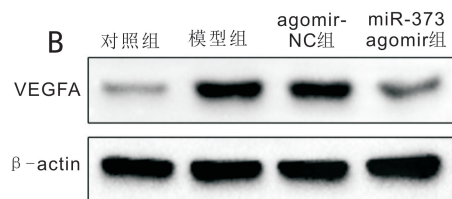
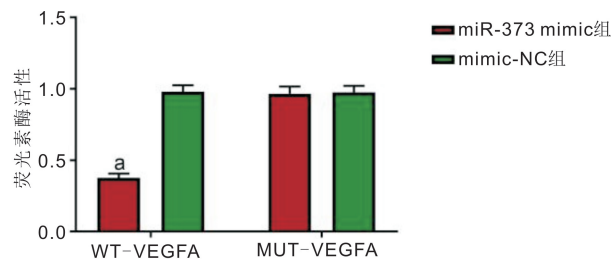
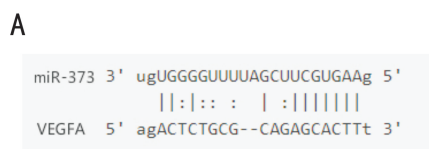


图5 miR-373 靶向 VEGFA A: 双荧光素酶实验检测结果, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs mimic-NC 组; B: Western-blot 检测结果, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs agomir-NC 组。

显著下降( $t = 4.927, P < 0.001$ )。HE 病理切片结果显示, 视网膜组织水肿情况得到缓解, 细胞分层较为清晰, 且排列较为整齐, 见图3。

#### 2.4 各组大鼠视网膜组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况

对照组、模型组、agomir-NC 组和 miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 Bax 蛋白表达量 ( $0.20 \pm 0.03$ 、 $0.97 \pm 0.05$ 、 $0.98 \pm 0.05$ 、 $0.55 \pm 0.05$ ) 和 Bcl-2 蛋白表达量 ( $1.00 \pm 0.06$ 、 $0.22 \pm 0.02$ 、 $0.23 \pm 0.03$ 、 $0.46 \pm 0.04$ ) 比较, 差异有统计学意义 ( $F = 197.155, 243.227$ , 均  $P < 0.001$ )。与对照组比, 模型组和 agomir-NC 组大鼠视网膜组织 Bax 蛋白表达量显著升高, Bcl-2 蛋白表达量显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与 agomir-NC 组比, miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 Bax 蛋白表达量显著下降, Bcl-2 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图4。

#### 2.5 miR-373 靶向 VEGFA 通过 Mirtarbase 网站

(<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php>) 预测到 miR-373 与 VEGFA 3'UTR 存在结合位点。双荧光素酶实验显示, miR-373 mimic 显著抑制野生型 VEGFA 3'UTR 荧光素酶活性, 对突变型 VEGFA 3'UTR 荧光素酶活性无影响 (图5A)。Western-blot 结果显示, 对照组、模型组、agomir-NC 组和 miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 VEGFA 蛋白表达量 ( $0.19 \pm 0.03$ 、 $0.96 \pm 0.07$ 、 $0.96 \pm 0.06$ 、 $0.34 \pm 0.04$ ) 比较, 差异有统计学意义 ( $F = 205.045, P < 0.001$ ), 与 agomir-NC 组比, miR-373 agomir 组 VEGFA 蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图5B。

#### 2.6 miR-373 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

对照组、模型组、agomir-NC 组和 miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 PI3K 蛋白表达量 ( $1.12 \pm 0.04$ 、 $1.03 \pm 0.11$ 、 $1.02 \pm 0.11$ 、

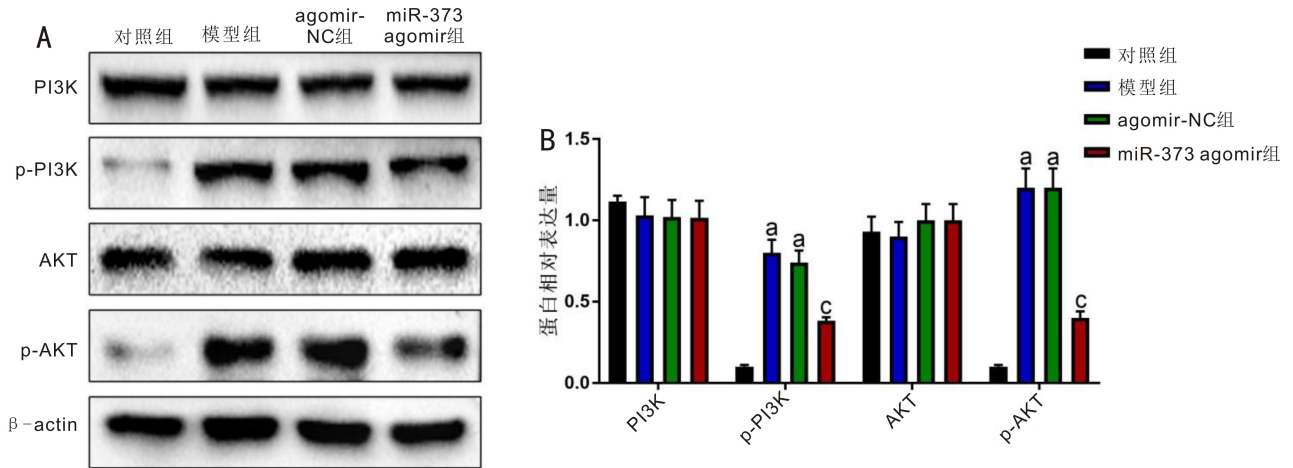


图6 miR-373对PI3K/AKT信号通路的影响 A: Western-blot 检测结果; B: Western-blot 检测结果量化分析。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs agomir-NC组。

和 AKT 蛋白表达量 ( $0.93 \pm 0.09$ 、 $0.90 \pm 0.10$ 、 $1.00 \pm 0.10$ 、 $1.00 \pm 0.10$ ) 差异无统计学意义 ( $F = 0.755$ 、 $0.806$ , 均  $P > 0.05$ ), p-PI3K 蛋白表达量 ( $0.10 \pm 0.01$ 、 $0.80 \pm 0.10$ 、 $0.74 \pm 0.07$ 、 $0.38 \pm 0.02$ ) 和 p-AKT 蛋白表达量 ( $0.10 \pm 0.01$ 、 $1.20 \pm 0.10$ 、 $1.20 \pm 0.12$ 、 $0.40 \pm 0.04$ ) 差异有统计学意义 ( $F = 83.216$ 、 $145.211$ , 均  $P < 0.001$ )。与对照组比,模型组和 agomir-NC 组大鼠视网膜组织 PI3K、AKT 蛋白表达水平无显著变化, p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著升高 (均  $P < 0.05$ ); 与 agomir-NC 组比,miR-373 agomir 组大鼠视网膜组织 PI3K、AKT 蛋白表达水平无显著变化, p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著下降 (均  $P < 0.05$ ), 见图 6。

### 3 讨论

在我国,DR 的发病率和患病率逐年上升,以毛细血管周细胞减少、内皮细胞/基底膜增厚及血管新生为主要临床特征,可分为增殖性和非增殖性糖尿病视网膜病变,其中增殖性糖尿病视网膜病变是导致 25~65 岁人群失明和视力损害的主要诱因<sup>[2]</sup>。目前研究表明 DR 的发病机制极为复杂,涉及炎症、神经元凋亡、细胞增殖、分化等多种病理过程,其具体机制仍需进一步阐明<sup>[7]</sup>。目前,许多研究证实 miRNA 参与 DR 发生与发展,且可能成为 DR 的新生物标志物<sup>[8-11]</sup>。如 miR-204 通过调节沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 的表达,抑制 DR 大鼠的炎症反应和细胞凋亡<sup>[8]</sup>。在 DR 体外模型中,miR-199a-3p 通过靶向 VEGF/PI3K/AKT 信号通路抑制血管生成,miR-590-3p 通过靶向 NLRP1 抑制 NADPH 氧化酶 (NOX4) 信号通路的激活,减少细胞焦亡<sup>[9-10]</sup>。Liu 等<sup>[11]</sup>研究表明 2 型糖尿病 (T2DM) 诱发的 DR 患者血清中 miR-221 的表达明显升高,与糖化血红蛋白等代谢参数显著正相关,且对 DR 的诊断准确性高于血管紧张素 II (Ang II) 和 VEGF。

miR-373 位于染色体 19q13.4.21,属于 miR-520/miR-373 家族,该家族由 3 个不同的 miRNA 簇组成,分别是 miR-302/miR-367、miR-371/miR-372/miR-373 和 miR-520<sup>[12]</sup>。越来越多的证据表明,miR-373 可以通过调控特定基因在人类癌症中发挥癌基因或抑癌基因的作用<sup>[13-14]</sup>。糖尿病视网膜细胞凋亡的分子基础涉及促凋亡

和抗凋亡的基因,Bax 是视网膜神经元凋亡的关键因素,也是保护受损视网膜神经元的治疗性基因策略的靶点之一。Bcl-2 与视网膜神经细胞凋亡有关,Bcl-2 与 Bax 的表达比例对决定细胞寿命至关重要<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,miR-373 在 DR 大鼠视网膜组织中表达量下调,视网膜组织 Bax 蛋白表达显著增加,Bcl-2 蛋白表达显著减少;过表达 miR-373 后,可以明显降低 DR 大鼠血糖,抑制视网膜组织 Bax 蛋白表达并促进 Bcl-2 蛋白表达,抑制视网膜细胞凋亡,改善 DR。与 Teng 等<sup>[16]</sup>研究结果相同,该研究报道过表达 miR-373 可抑制细胞凋亡。结合 Yang 等<sup>[5]</sup>和 Tian 等<sup>[6]</sup>研究结果,我们推测 miR-373 可能参与 DR 的发病过程,上调 miR-373 表达可改善 DR。VEGFA 属于 VEGF 家族,在血管生成、肿瘤生长及缺血性疾病中扮演着重要角色,与其受体结合,激活 PKC、NOS、AKT、MAPK 等途径诱导血管生成。同时,也有研究表明 VEGFA 在 DR 视网膜组织中可以通过促进新生血管形成,从而促使 DR 发生发展<sup>[17]</sup>。VEGF 抑制剂如雷珠单抗、阿柏西普、康柏西普等因具备促使视网膜新生血管萎缩,改善视功能预后等功能,目前在临床上被广泛应用。本研究通过生物信息学网站预测到 miR-373 可以与 VEGFA 的 3'UTR 区互补结合,并且应用双荧光素酶实验验证了 VEGFA 是 miR-373 的直接靶点。提示 miR-373 可能通过下调 VEGFA 表达阻碍 DR 发生发展。结合 Oltra 等<sup>[18]</sup>研究结果表明采用 miRNA 降低 VEGF 可以作为治疗 DR 的一种方法。

PI3K/AKT 信号通路参与细胞的增殖、凋亡和分化,是体内重要的细胞信号通路,同时在葡萄糖转运、糖原合成、糖酵解和糖异生的调节中也发挥重要作用。Fang 等<sup>[19]</sup>研究指出根据 KEGG 通路数据库的预测可知,VEGF 位于 PI3K/AKT 通路的下游,且 Simó 等<sup>[20]</sup>研究表明胰岛素通过激活 PI3K/AKT 通路诱导小鼠主动脉平滑肌细胞内 VEGF 转录和表达,从而引起 DR 恶化。本研究发现 DR 大鼠过表达 miR-373 后,p-PI3K、p-AKT 及 VEGFA 蛋白表达水平显著下调。上述结果提示,miR-373 通过下调 VEGFA 的表达并抑制 PI3K/AKT 通路蛋白的表达,从而改善 DR。这与 Wang 等<sup>[9]</sup>研究结果一致。

综上所述,本研究在动物水平上表明 miR-373 通过

靶向 VEGFA 参与 DR 的病理生理过程,其机制可能与 miR-373 抑制 PI3K/AKT 信号通路有关,提示 miR-373 可能成为治疗 DR 的一个潜在的新靶点。

#### 参考文献

- 1 李博, 陈金鹏, 胡璇, 等. miR-152-3p 靶向 IGF1 基因对高糖诱导的 ARPE-19 细胞活性和凋亡的影响. *国际眼科杂志* 2019; 19(5): 729-733
- 2 Ebneter A, Zinkernagel MS. Novelities in Diabetic Retinopathy. *Endocr Dev* 2016; 31: 84-96
- 3 Wang J, Zhang J, Chen X, et al. miR-365 promotes diabetic retinopathy through inhibiting Timp3 and increasing oxidative stress. *Exp Eye Res* 2018; 168: 89-99
- 4 Chen Q, Qiu F, Zhou K, et al. Pathogenic role of microRNA-21 in diabetic retinopathy through downregulation of PPAR $\alpha$ . *Diabetes* 2017; 66(6): 1671-1682
- 5 Yang Y, Mei Q. miRNA signature identification of retinoblastoma and the correlations between differentially expressed miRNAs during retinoblastoma progression. *Mol Vis* 2015; 21: 1307-1317
- 6 Tian R, Zou H, Wang LF, et al. Identification of microRNA-mRNA regulatory networks and pathways related to retinoblastoma across human and mouse. *Int J Ophthalmol* 2020; 13(4): 535-544
- 7 Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res* 2017; 139: 7-14
- 8 Qi F, Jiang X, Tong T, et al. MiR-204 inhibits inflammation and cell apoptosis in retinopathy rats with diabetic retinopathy by regulating Bcl-2 and SIRT1 expressions. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24(12): 6486-6493
- 9 Wang L, Liu WX, Huang XG. MicroRNA-199a-3p inhibits angiogenesis by targeting the VEGF/PI3K/AKT signalling pathway in an *in vitro* model of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol* 2020; 116: 104488
- 10 Gu CF, Draga D, Zhou CD, et al. miR-590-3p inhibits pyroptosis in diabetic retinopathy by targeting NLRP1 and inactivating the NOX4

- signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(13): 4215-4223
- 11 Liu HN, Li X, Wu N, et al. Serum microRNA-221 as a biomarker for diabetic retinopathy in patients associated with type 2 diabetes. *Int J Ophthalmol* 2018; 11(12): 1889-1894
- 12 Rosas Plaza X, van Aghoven T, Meijer C, et al. miR-371a-3p, miR-373-3p and miR-367-3p as serum biomarkers in metastatic testicular germ cell cancers before, during and after chemotherapy. *Cells* 2019; 8(10): 1221
- 13 Huang ZH, Zhang SX, Wang J, et al. miR-373 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell migration and invasion by targeting MARCH5. *Int J Clin Exp Pathol* 2019; 12(7): 2646-2652
- 14 Hu WJ, Liu QL, Pan J, et al. MiR-373-3p enhances the chemosensitivity of gemcitabine through cell cycle pathway by targeting CCND2 in pancreatic carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 105: 887-898
- 15 Yang F, Yu JQ, Ke F, et al. Curcumin alleviates diabetic retinopathy in experimental diabetic rats. *Ophthalmic Res* 2018; 60(1): 43-54
- 16 Teng LL, Liu PP, Song X, et al. Long non-coding RNA Nuclear-Enriched Abundant Transcript 1 (NEAT1) represses proliferation of trophoblast cells in rats with preeclampsia via the MicroRNA-373/FLT1 axis. *Med Sci Monit* 2020; 26: e927305
- 17 Avitabile T, Azzolini C, Bandello F, et al. Aflibercept in the treatment of diabetic macular edema: a review and consensus paper. *Eur J Ophthalmol* 2017; 27(6): 627-639
- 18 Oltra M, Vidal-Gil L, Maisto R, et al. Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p. *J Cell Mol Med* 2020; 24(2): 1428-1436
- 19 Fang S, Ma X, Guo S, et al. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1. *Oncol Lett* 2017; 14(4): 4311-4318
- 20 Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2014; 37(4): 893-899