

# microRNA 在角膜新生血管中的研究进展

岑超,周善璧

基金项目:重庆市医学科研计划项目(No. 2013-1-033)

作者单位:(400016) 中国重庆市,重庆医科大学附属第一医院眼科

作者简介:岑超,在读硕士研究生,研究方向:角膜病及眼表疾病。

通讯作者:周善璧,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜病及眼表疾病。1021159084@qq.com

收稿日期:2014-11-13 修回日期:2015-02-10

## Research advances of microRNA in corneal neovascularization

Chao Cen, Shan-Bi Zhou

Foundation item: Chongqing Medical Scientific Research Program (No. 2013-1-033)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Shan-Bi Zhou. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. 1021159084@qq.com

Received: 2014-11-13 Accepted: 2015-02-10

### Abstract

• Corneal neovascularization (CNV) is one of the most important causes that affecting corneal transparency, and it is a high risk factor of allogeneic corneal graft rejection. It has become a research focus for the regulation of CNV. microRNAs are a class of endogenous non-protein-coding micromolecule RNAs which play a critical role in regulating a series of life process. Researches in recent years show a close correlation between microRNA and CNV. In this article we reviewed the recent advances in these researches.

• KEYWORDS: microRNA; corneal neovascularization; gene regulation

Citation: Cen C, Zhou SB. Research advances of microRNA in corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(3):445-447

### 摘要

角膜新生血管(corneal neovascularization)是影响角膜透明度的主要因素之一,也是同种异体角膜移植术后发生排斥反应的高危因素,因此角膜新生血管形成的调控已成为研究热点。microRNA是一组内源性非编码小分子RNA,在调控多种生物进程中起重要作用。近年来研究表明,microRNA与角膜新生血管形成有着紧密联系,本文将对目前的研究情况进行综述。

关键词: microRNA; 角膜新生血管; 基因调控

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.17

引用:岑超,周善璧. microRNA 在角膜新生血管中的研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(3):445-447

### 0 引言

正常角膜组织无血管,这一特性可保持角膜的高度透明度,当角膜遇到外伤、缺氧、炎症等多种有害刺激时,可表现出异常的血管新生即角膜新生血管(CNV),CNV都伴有角膜透明度的减退或丧失,引起视力下降甚至失明,这也是最常见的致盲原因之一。新生血管的形成可能与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、血小板衍生因子、转化生长因子、胰岛素样生长因子等多种因子有关。最新研究表明,一些microRNA(miRNA)参与角膜新生血管的调控,其中一部分miRNA对新生血管有促进作用,一部分抑制血管新生。本文对促进血管新生及抑制血管新生的miRNA分别进行综述,这可能成为治疗角膜新生血管的新的突破口。

### 1 microRNA

microRNA(miRNA)是一组平均由20~22个核苷酸(NTS)组成的小的单链RNA。到目前为止,已有超过1400个人类miRNA序列被发现。microRNA对靶基因的调控具有“多向性”,一种microRNA可以调控多种不同基因通路中的蛋白质翻译过程<sup>[1]</sup>。其工作原理是通过诱导降解或翻译抑制从而导致基因沉默的特定mRNA的转录后调节。在大多数真核生物中,miRNA是在细胞核内进行编码并在RNA聚合酶II的作用形成初级miRNA,然后再经Drosha-DGCR8复合体的作用下形成含有60~70个核苷酸的发夹状结构的前体miRNA。前体miRNA通过Exportin5复合物。近年来发现在基因调控中microRNA发挥重要作用,在许多种类的哺乳动物的组织和器官均有不同程度表达,且它的异常表达已被证实与多种疾病密切相关<sup>[2]</sup>。miRNA在血管系统的存在尤其丰富,这可能是与新生血管生成相关的疾病发生发展的重要介质。所以对miRNA的研究可能成为治疗角膜新生血管的新策略<sup>[1]</sup>。

### 2 microRNA 在血管生成中的作用

2005年Yang等<sup>[3]</sup>通过分析纯合子小鼠Dicer亚等位基因(一种micro成熟所必需的酶)首次证实microRNA与血管的生成有着密不可分的关系。研究发现,Dicer缺陷的小鼠血管生成减少,并且这些小鼠在胚胎第12.5~14.5d死亡。2008年,Suarez等<sup>[4]</sup>进一步运用2只内皮细胞特异性的Dicer基因敲除小鼠的模型发现Dicer敲除小鼠的血管表型与同系正常小鼠相比并无显著差异,但将血管内皮生长因子A注射到小鼠耳朵或缺肢肢体时,Dicer缺陷小鼠的血管生成明显减少。

在调控血管生成中起作用的,主要包括促进血管新生的 miRNAs 和抑制血管新生的 miRNAs。例如:miR-126<sup>[5,6]</sup>,microRNA-210<sup>[7]</sup>,microRNA-424<sup>[8]</sup>等具有促新生血管生成作用。而 miR-31<sup>[9]</sup>,miR-150<sup>[9]</sup>,miR-221/222<sup>[10]</sup>等具有抑制新生血管形成的作用。2006年,Poliseno等在血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的刺激下,miRNA-126主要通过作用于多种功能蛋白(如与血管新生密切相关的软脂酰化磷蛋白-Sprouty相关蛋白家族),调节血管新生和维持血管的完整性。Wang等<sup>[5]</sup>敲除小鼠体内目标 microRNA-126,可致小鼠血管完整性破坏,血管劈裂,甚至胚胎死亡。而 Nicoli等<sup>[6]</sup>在主动脉弓发育试验中发现血流机械流动刺激保守的机械敏感锌指蛋白转录因子 kif2a,诱导内皮特异性的 microRNA(miR-126)的表达,进而激活 VEGF 信号,引发血管新生。表明 microRNA-126 有促进血管新生作用。同样,在组织细胞缺氧情况下,内皮细胞中 microRNA-210 以及 microRNA-424 表达显著增高,Fasanaro等<sup>[7]</sup>发现缺氧能促进内皮细胞中 miR-210 表达逐渐增多,常氧细胞中过表达 miR-210 能促进 VEGF 诱导的细胞迁移和基质胶上管腔形成。在缺氧状态下 microRNA-424 主要通过 Cullin-2 基因的 3'-UTR 端结合,抑制 Cullin-2 蛋白表达,降低 E3 连接酶的合成,从而稳定和促进 HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$  在内皮细胞的表达。而 HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$  是缺氧组织形成新生血管不可或缺的细胞调节因子<sup>[8]</sup>。而与此相反,过表达的 miR-221/222 可抑制干细胞因子(SCF)与其受体 c-kit 从而抑制血管新生。将 miR-221/222 转染血管内皮细胞致高表达,其小管形成、迁移等能力明显被抑制<sup>[10]</sup>。相反,在敲除斑马鱼体内 miR-221 可促进血管新生<sup>[6]</sup>。2011年,Kovacs等<sup>[11]</sup>用实时定量 RT-PCR 方法证明了早期糖尿病大鼠视网膜及视网膜内皮细胞 miR-31 表达增加。Shen等<sup>[9]</sup>将 miR-31,miR-150 前体及 miR-31 前体注入氧诱导视网膜病变小鼠(OIR小鼠)模型中,其视网膜血管新生减少。证明 miR-31 和 miR-150 对视网膜新生血管的形成具有显著调节作用,其机制可能分别通过与其靶标 PDGF-B,HIF-1 $\alpha$  和 VEGF,PDGF-B 结合,抑制其表达,从而减少血管新生。

### 3 microRNA 与角膜新生血管

角膜新生血管是影响角膜透明度的主要因素之一,是外伤、缺氧、炎症或多种有害刺激后的一种常见反应。许多 miRNA 被证明有调节角膜血管新生的作用。Ryan等<sup>[12]</sup>用 NCodeTM 多物种 miRNA 芯片证明至少有 30 种 miRNA 在成年鼠角膜中表达,角膜上皮中表达最高的是 miR-184。毛旖旎等<sup>[13]</sup>运用缝线法诱导大鼠角膜血管新生,利用 microRNA 芯片技术和生物信息学的方法,筛选出角膜缘新生血管大鼠模型的差异表达谱。明显差异表达 microRNA 为 16 个,其中上调 10 个,下调 6 个。明显上调的 microRNA 有:miR-142,miR-146,miR-21,miR-223,miR-214,miR-199,miR-483,miR-322,miR-126,miR-1224;明显下调的有 miR-30e,miR-101,miR-184,miR-200c,miR-200b,miR-204。其中与 VEGF 信号通路密切相关的有 10 个,特别是 miR-142,miR-200 和 miR-322 表达差异在角膜缘新生血管的发生过程中可能起着较为重要的作用。此外,国内外研究发现,microRNA-132<sup>[14]</sup>,microRNA-184,microRNA-204 等与角膜新生血管有着密切联系。

**3.1 microRNA-132 与角膜新生血管** Mulik 等<sup>[14]</sup>建立 HSV-1 感染大鼠角膜后形成角膜新生血管模型,在不同时间段收集组织进行检测,运用实时荧光定量核酸扩增检测系统量化 miRNAs 来检测在 HSV 感染角膜后的 microRNA-132 的表达水平,miR-132 水平在感染第 2d 明显增加,并在第 7d 和第 14d 达到峰值。未感染组在同一时间段的 miR-132 水平并无明显变化,结果表明在 HSV 感染后,miR-132 的表达上升存在不同时间点。研究表明,在炎症感染后,VEGF-A 水平上调并且贯穿整个疾病过程<sup>[15]</sup>,所以 VEGF-A 曾被认为是 miR-132 上调的激动剂。此外,在体外实验中,VEGF-A 可诱导人脐静脉内皮细胞中 miR-132 的表达<sup>[16]</sup>。在感染后第 2~12d,运用 VEGF trap(可溶性的 VEGF 受体 1)处理实验组,这种情况下在之前的研究中已证明可明显抑制 VEGF-A 蛋白活性,从而显著抑制角膜新生血管<sup>[15]</sup>。收集第 7~14d 角膜进行检测,结果表明,在经过 VEGF trap 处理过的大鼠角膜中,miR-132 表达较正常处理组少 4 倍。证明在 HSV 感染后,VEGF-A 引起 miR-132 上调从而诱发角膜新生血管的产生。另外,Mulik 等采用结膜下注射具有拮抗 miR-132 的 Antagomir-132 纳米粒子,在感染 HSV-1 后的将 HSV-1 感染后的大鼠分为两组,一组在第 2d 开始进行注射处理,直到感染后的第 13d。另一组注射 antagomir-132 在第 7d 或者第 10d 进行,直到感染后第 13d。并分别设置实验对照组。结果表明 Antagomir-132 可降低血管生成素-1 活性,同时不影响 VEGF-A 水平。研究表明,在大鼠角膜感染单纯疱疹病毒(HSV)后,microRNA-132 表达上调,参与角膜新生血管的形成<sup>[17]</sup>。

**3.2 microRNA-184 与角膜新生血管** 早期有研究显示,microRNA-184 在角膜中特异性强表达,在角膜和晶状体两种透明组织中高表达<sup>[18]</sup>,在富含血管组织的角膜缘表达量减少<sup>[12]</sup>。而在缺氧诱导的视网膜新生血管中显著下调<sup>[19]</sup>,过表达 miR-184 能抑制缺血引起的视网膜新生血管生长。提示 miR-184 可能在维持角膜透明、无血管状态中发挥重要作用。刘成刚等<sup>[20]</sup>通过对碱烧伤诱导大鼠角膜新生血管的生成,采用实时定量 PCR 技术检测了正常组织和碱烧伤角膜新生血管模型中 miR-184 的表达,发现 miR-184 在透明角膜和新生血管角膜中的表达差异显著,miR-184 在形成新生血管过程中表达显著下降,而在正常的血管内皮细胞质低量表达。建立起的血管新生的体内外研究模型中,利用脂质体转染技术上调 miR-184 在人脐静脉血管内皮细胞中表达,发现 miR-184 对内皮细胞增殖、迁移以及基质胶上管腔形成能力有一定的抑制作用。miR-184 在碱烧伤大鼠角膜新生血管角膜中的表达(0.145 $\pm$ 0.013)较正常角膜(1.015 $\pm$ 0.189)显著下降( $P<0.01$ ),而在人脐静脉血管内皮细胞中相对表达量极少(0.0074-0.004)( $P<0.05$ )。同时,新生血管进程中伴随着 miR-184 表达量降低,提示其与血管新生密切相关,其机制可能通过 VEGF 信号通路参与碱烧伤角膜新生血管形成。

**3.3 microRNA-204 与角膜新生血管** Kather 等<sup>[21]</sup>通过敲除小鼠 Kelch 样 Ect2-相互作用蛋白(KLEIP/KLHL20)基因建立自发营养障碍性角膜新生血管模型。采用免疫组化对角膜新生血管进行评估,在注射抑制性抗体后,血管内皮细胞生长因子(VEGF)信号被抑制。利用基因芯片测量 miRNA 在营养障碍角膜中的表达情况,通过免疫

组化及蛋白印迹对结果进行验证。结果显示,在 KLEIP<sup>-/-</sup>小鼠中,血管及淋巴管从角膜缘向营养障碍的上皮生长。但抑制 VEGF 信号不能减少其进程。相应地,微阵列分析揭示了在这种营养障碍角膜中,并没有典型的 VEGF 上调。而在 miRNA-204 表达减少时血管生成素-1 的表达增加。通过生物信息学分析识别出在血管生成素-1 中与 miRNA-184 的结合位点。并在体外实验中证实 miRNA-204 对血管生成素-1 具有调控作用。所以,血管内皮细胞生长因子(VEGF)在 KLEIP<sup>-/-</sup>小鼠的角膜新生血管形成中并不是主要的参与者。但是,在 miRNA-204 表达缺失时,促血管新生因子(血管生成素-1)表达显著上调。同时,他们通过体外实验也证实了这一点。实验表明,miRNA-204 可通过影响血管生成素-1 的表达参与 KLEIP<sup>-/-</sup>小鼠角膜新生血管形成的调控。

#### 4 miRNA 治疗角膜新生血管的应用前景

目前用于治疗新生血管药物主要通过抗 VEGF 来抑制血管新生,如美国 FDA 批准的 bevacizumab<sup>[22]</sup>、ranibizumab<sup>[23-25]</sup>、pegaptanib sodium<sup>[26]</sup> 等。但针对眼部新生血管的治疗尚处于研究阶段。基于以上实验表明,microRNA 是重要的调控元素,可能在角膜生理病理过程中,特别是角膜新生血管中发挥着重要的作用。所以通过抗 VEGF 治疗角膜新生血管并不是唯一出路。miRNAs 治疗策略主要通过 miRNAs 拮抗(anti-miR)<sup>[27]</sup> 和 miRNAs 模拟(miRNA mimic)<sup>[28]</sup> 的方式,抑制或促进靶 miRNAs 的表达以改变疾病的进程。故 miRNA mimic 或 anti-miR 将成为调控角膜新生血管的新一类药物<sup>[29]</sup>。目前 microRNA 在角膜新生血管形成中的作用和机制仍不清楚,需要进一步研究和探索。

#### 参考文献

- Kozomara A, Griffiths - Jones D. miRBase: integrating microRNA annotation and deep - sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; 39 (Database issue): D152-157
- Kim VN. MicroRNA precursors in motion; exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004;14(4):156-159
- Yang WJ, Yang DD, Na S, et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *Biol Chem* 2005;280(10):9330-9335
- Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007;100(8):1164-1173
- Wang S, Aurora AB, John BA, et al. The endothelial-specific microRNA-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008;15(2):261-271
- Nicoli S, Standley C, Walker P, et al. MicroRNA - mediated integration of haemodynamics and VEGF signalling during angiogenesis. *Nature* 2010;464(7292):1196-1200
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA - 210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *Biol Chem* 2008;283(23):15878-15883
- Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia - induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF - alpha isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest* 2010;120(11):4141-4154

- Shen J, Yang X, Xie B, et al. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Mol Ther* 2008;16(7):1208-1216
- Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 2006;108(9):3068-3071
- Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, et al. microRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4402-4410
- Ryan DG, Oliveira - Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol Vis* 2006;12:1175-1184
- 毛旖旎,胡雁,侯胜平,等.大鼠角膜缘新生血管微小 RNA 与血管内皮生长因子相关性分析. *重庆医科大学学报* 2014;39(8):1090-1094
- Mulik S, Xu J, Reddy PB, et al. Role of microRNA - 132 in angiogenesis after ocular infection with herpes simplex virus. *Am J Pathol* 2012;181(2):525-534
- Suryawanshi A, Mulik S, Sharma S, et al. Ocular neovascularization caused by herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor. *J Immunol* 2011;186(6):3653-3665
- Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, et al. MicroRNA - 132 - mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med* 2010;16(8):909-914
- Vishvas MS. Contribution of microRNAs and Robo4 signaling after herpes simplex virus infection: role for regulatory mechanisms. PhD diss. *University of Tennessee* 2013;5:1764
- Karali M, Peluso I, Gennarino VA, et al. miRNeYE: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 2010;11:715
- Shen J, Yang X, Xie B, et al. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Mol Ther* 2008;16(7):1208-1216
- 刘成刚,周善璧. miR-184 在碱烧伤大鼠角膜新生血管中的表达及靶基因预测分析. *基础医学与临床* 2013;33(5):588-592
- Kather JN, Friedrich J, Woik N, et al. Angiotensin-1 is regulated by miR-204 and contributes to corneal neovascularization in KLEIP - deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(7):4295-4303
- Jardeleza MS, Miller JW. Review of anti - VEGF therapy in proliferative diabetic retinopathy. *Semi Ophthalmol* 2009;24(2):87-92
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 2007;39(10):1278-1284.
- Wang X, Naqa IME. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* 2008;24(3):325-332
- Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *RNA* 2008;14(6):1012-1017
- Chaudhry GR, Fecek C, Lai MM, et al. Fate of embryonic stem cell derivatives implanted into the vitreous of a slow retinal degenerative mouse model. *Stem Cells Dev* 2009;18(2):247-258
- Jamaluddin MS, Weakley SM, Zhang L, et al. miRNAs: roles and clinical applications in vascular disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11(1):79-89
- Chan YC, Roy S, Khanna S, et al. Downregulation of microRNA-200b supports cutaneous wound angiogenesis by desilencing GATA binding protein 2 and vascular endothelial growth factor receptor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(6):1372-1382
- Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, et al. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today* 2013;18(5-6):282-289