

【文献综述】

自从 2003 年 Lagos-Quintana 等^[11]首次从成年鼠眼中分离出 7 种 miRNA 以来,miRNA 在眼部的角色逐渐被认识。到目前已有超过 250 种 miRNA 被报道表达于视网膜中,其中至少有 78 种 miRNA 优先或特异地表达于视网膜,有 21 种很可能是视网膜所特有的^[12-14]。它们通过基因调节对视网膜发育、功能和疾病产生影响^[15]。Ryan 等^[16]检测出高度表达于视网膜中的 miRNA 有 miR-181a、-182、-183、-204、-125b、-26a 以及 -124a。在这些高度表达于视网膜中的 miRNA 中,有一个多顺反子、感觉器官特异性的 miRNA 簇群,即 miR-183/96/182 簇(miR-183/96/182 cluster, miR-183C)。除视网膜外,miR-183C 还特异地表达于内耳、嗅上皮、味蕾和

原位杂交分析显示,miR-182 的表达分布于除视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层以外的视网膜各层,而 miR-183 的表达主要定位于外核层及外界膜,在角膜内皮和晶状体板层尚有强烈表达。Jin 等^[18]研究表明:miR-182 在胚胎 14.5 d、16.5 d 以及出生后 3 d 小鼠眼部的表达均贯穿视网膜内层,尤其在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)层有强烈的表达。除此之外,大部分研究结果支持 miR-183C 在光感受器为主的视网膜细胞中的表达^[13-14,19]。如 Krol 等^[19]的研究揭示 miR-182 在视网膜光感受器细胞中表达最为丰富,在内核层有较弱的表达,而在 RGCs 层没有表达。Xu 等^[14]将 miR-183C 定位于视网膜光感受器细胞、双极细胞和无长突细胞。miR-182 在胚胎 10.5 d、14.5 d 和出生时的小鼠眼中均没有表达,而在出生后 8 d 和成年鼠视网膜光感受器细胞中则有强烈而特异性的表达,在内核层和外丛状层之间也有较弱的表达^[13]。为进一步明确 miR-182 确切的细胞定位,结合荧光原位杂交和免疫荧光技术证实:miR-182 除强烈表达于由视紫红质标记的光感受器细胞外节,在光感受器细胞延伸至双极细胞的突触中也有一定的表达,而并不表达于 PKC α 标记的双极细胞中^[14]。此外,miR-183C 在视杆细胞完全退化的 RD1 鼠视网膜中的表达较正常鼠降低数倍,说明 miR-183C 并非光感受器细胞所独有,但却在光感受器细胞中表达丰富^[20]。miR-183C 在视网膜的表达还具有昼夜变化节律,其中 miR-96 和 miR-182 在 24 h 中表达高峰和低谷期均分别在 ZT13 (Zeitgeber time 13) 和 ZT5,二者通过调节腺苷酸环化酶 VI (adenylyl cyclase VI, ADCY6) 的表达来进行昼夜节律的调控^[14]。

2 miR-183C 与视网膜的发育和生理机能

视网膜是由三级神经元组成的复杂神经结构,视觉信号被光感受器细胞接收后通过双极细胞传向 RGCs,并与高级大脑中枢相交通。由于 miRNA 在神经元中的新陈代谢比在其他大部分细胞类型中都要高,并与神经元的活性有关,因此对神经视网膜的发育和生理机能也起着重要的作用。条件性敲除前体 miRNA 的加工酶 Dicer 诱导胚胎发生期视网膜祖细胞的大量死亡,导致小眼球和出生后大部分视网膜细胞的消失^[21],从而揭示了 miRNA 在视网膜发育中的重要性。从视网膜中去除 Dicer 酶而充分灭活 miRNA 导致视网膜广泛而进行性的结构和功能异常,并进展为广泛的视网膜细胞的破坏和退变,伴随明暗 ERG 的降低;利用 Northern blot 分析发现:视网膜内 Dicer 酶灭活导致了一些视网膜特异性 miRNA 的减少,如与野生鼠相比,miR-96 的数量在出生 1 个月时无明显变化,3 个月时则减少 70%,2 a 时减少 63%^[22]。通过靶点预测分析,miR-183C 靶向诸多位于感觉器官发育和功能中具有重要作用的基因,包

括小眼相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)、Hes1、myosin1C、LMO3、TF-CP2L3 等^[14]。其中 MITF 是 RPE 细胞获得并维持其特性所必需的,小鼠 MITF 突变导致 RPE 终末分化及 RPE 前体向神经视网膜细胞分化转移的失败,产生小眼球畸形,而 MITF 正是 miR-96 和 miR-182 所共有的靶点^[14]。有学者认为 miRNA 是视网膜终末分化、成熟和建立正常功能所必需的^[23]。而 Jin 等^[18]研究发现 miR-182 基因敲除鼠在出生后 12 周和 16 周均未出现视网膜结构的明显异常,也没有出现靶基因表达的波动以及显著的转录和表型的改变,这似乎表明 miR-182 在小鼠胚胎至成年期并未影响视网膜的正常发育和分化,但是该实验并未从功能学角度进行验证,也未对出生更久的小鼠视网膜形态进行观察,不能排除视网膜功能缺陷已经存在,或有可能随时间的推移而逐渐发生。Lumayag 等^[24]发现 miR-182/183/96 失活的 miR-183C (GT/GT) 鼠表现出早期发生的进行性光感受器细胞突触缺陷和视网膜退变,从而导致明、暗适应 ERG 的进行性减退,伴随 b 波振幅下降;除此之外,miR-183C 的失活导致视网膜中大量与突触发生、突触传递、光感受器形态形成有关的基因出现表达的改变,说明 miR-183C 在出生后光感受器的功能分化和突触连通性上扮演重要的角色。miR-183C 与光感受器功能活动密切相关,它在光感受器细胞中靶向电压依赖性谷氨酸受体(solute carrier family 1 member 1, SLC1A1),SLC1A1 在不同的光适应状态下调节突触功能。而 miR-183C 在小鼠视网膜暗适应时表达下调,明适应时表达上调,其结果引起 SLC1A1 在夜间表达增加,有利于清除在夜间增多的突触间隙的谷氨酸,这种可逆性的活动不依赖昼夜节律^[19]。

3 miR-183C 与眼部疾病

3.1 视网膜光损伤 选择性灭活视网膜中 miR-183C 的转基因鼠暴露于 10 000 Lx 的光照下 30 min 后,表现出了严重的视网膜变性,组织学研究显示视网膜外核层厚度明显变薄,而野生鼠的视锥及视杆细胞在光照后 30 min 并未受到影响^[25]。Zhu 等^[25]确定了 Arrdc3、Neurod4、Caspase-2 为 miR-183C 的下游靶点。进一步研究发现光照后引起 miR-183C 和 Caspase-2 表达的增加,与野生鼠相比,miR-183C 灭活的转基因鼠视网膜 Caspase-2 在光照后增加更为显著,抑制 Caspase-2 可部分挽救由光诱导的视网膜退变,从而揭示了 miR-183C 在急性光损伤性视网膜退变中可通过抑制凋亡途径减少光感受器细胞的凋亡^[25]。

3.2 视网膜色素变性 与视紫红质(rhodopsin, RHO)突变相关的视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是最常见的遗传性视网膜变性,它以光感受器细胞进行性死亡和视力障碍为特点。Loscher

等^[26]构建了小鼠 RP 模型 RHO P374S, 分析显示 miR-183、miR-96 在 RHO P374S 突变鼠视网膜中的表达水平较野生鼠明显降低。进一步研究发现 miR-183C 在由 RHO 和 RDS/peripherin 突变诱导的小鼠 RP 模型的视网膜中下调 14.1% ~ 53.2%, 提示 miR-183C 参与了 RP 的病理过程; 而 miR-1、-133 和 -142 则上调 186.1% ~ 538.5%^[27]。靶向预测和离体功能学研究显示 MITF 是 miR-182 和 miR-96 直接的靶点, 前者是 RPE 细胞建立和维持所必须的转录因子^[15], 提示 miR-183C 可能通过基因调控在 RP 的病因和发病过程中扮演重要角色。

3.3 眼部肿瘤 miR-183C 在某些类型的肿瘤组织或细胞中表达明显上调, 提示了它潜在的致癌特性, 因而被认为是一种可用于诊断和判断癌症预后极具潜力的生物学标记^[28-29]。而它对于不同肿瘤细胞的生长、迁移和凋亡却表现出不同的调节作用^[30-36]。

miR-182 是 P53 依赖性 miRNA, 它在葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanomas, UM) 中的表达依赖于 P53 的诱导。将 miR-182 临时转染至 UM 细胞中导致瘤细胞的生长、迁移和侵袭力显著下降, 被 miR-182 转染的 UM 细胞显示出细胞周期 G₁ 的停滞以及凋亡活动增加^[37]。Yan 等^[37]运用生物信息学技术确定了 miR-182 三个靶点: MITF、BCL2 和 cyclin D2, 并通过 Western-blot 分析发现这些靶蛋白在被转染细胞中表达量减少, 而致癌基因 c-Met 以及其下游的细胞内信号通路 Akt 和 ERK1/2 受到 miR-182 调控下调。此外, miR-182 在 UM 组织样本中表达减少, 其过度表达抑制活体内 UM 细胞的生长, 进而证实 miR-182 是 UM 有效的抑制剂^[37]。

在视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 的研究中, Lau 等^[38]应用 RT-PCR 对 RB 的细胞株、组织微切片以及妊娠 12 周胚胎视网膜的 miRNA 表达进行研究, 在被检测的 157 个 miRNA 中有 5 个在 RB 瘤组织及细胞株中出现异常上调, 与其他肿瘤细胞株相比, hsa-miR-183 和 hsa-miR-181 在 RB 的视网膜组织中呈现特异性上调。然而尚无进一步的研究确定 miR-183 在 RB 发生中的确切作用机制及其基因靶点。

3.4 眼部炎症

3.4.1 交感性眼炎 miRNA 通过担任转录过程的内源性抑制剂在免疫系统中调节基因表达。Kaneko 等^[39]对人眼交感性眼炎 (sympathetic ophthalmia, SO) 样本的 miRNA 进行人类全基因组 PCR 阵列分析发现有 27 种 miRNA 显著下调, 这些下调的 miRNA 可能成为炎症信号的触发器, 导致促炎症反应细胞活素的过度表达, 最终产生由线粒体氧化损伤所介导的光感受器凋亡。这种假说解释了 SO 在未发生明显的视网膜损伤及炎性细胞浸润时同样可产生视力丧失的原因。在 27 种 miRNA 中有 4 种 (hsa-miR-1、hsa-let-7e、hsa-miR-9 和 hsa-miR-182) 被发现

与炎症信号途径相关, 并成为 SO 发病机理的重要特征之一^[39], 其中 miR-182 在 SO 眼部的表达下调 45.19 倍^[39]。Kaneko 等^[39]利用 qRT-PCR 和免疫组织化学染色确定了这些 miRNA 的靶基因, 其中叉头框转录因子被确认为 hsa-miR-182 的重要靶点, 它与线粒体凋亡途径中增加的 Fas/FasL 系统的表达有关。

3.4.2 自身免疫性葡萄膜炎 miR-182 在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) 诱导后 14 d 开始明显下调, 并一直持续到 28 d, 其动态变化与白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 的增加相平行, 而视网膜组织学结构的破坏也在 EAU 诱导后 14 d 逐渐出现。IL-17 产生的 Th17 细胞在自身免疫性疾病和 EAU 的发病中扮演重要角色。通过 TargetScan 预测, IL-17A 可能是 miR-182 的靶基因之一, 因此 miR-182 的下调与 IL-17A 的上调存在潜在的关联。与此同时, miR-96 和 miR-183 在 EAU 模型的视网膜中也显著下调, 说明 miR-182 及其家族成员可能影响了 IL-17 在视网膜中的表达, 从而调节 EAU 的发展, 并与视网膜结构的破坏相关联^[40]。

3.5 糖尿病视网膜病变 Wu 等^[41]采用 miRNA 芯片检测糖尿病大鼠视网膜 miRNA 的表达差异谱, 结果显示: 和正常对照组相比, 糖尿病造模后 10 周的大鼠视网膜中共有 168 种 miRNA 的表达出现明显变化, 筛选其中 37 种 miRNA 进行 qRT-PCR 分析发现, 包括 miR-182、-96、-183 在内的 11 种 miRNA 出现显著上调, 而 miR-10b、miR-10a、miR-219-2-3p 等 6 种 miRNA 则显著下调。经 qRT-PCR 检测发现, 大部分表达上调的 miRNA 在视网膜中的表达量随糖尿病视网膜病变病程发展逐渐上升; 而表达下调的 miRNA 的表达量亦随病程的发展逐渐下降。这些表达差异的 miRNA 可能有众多靶向与糖尿病视网膜病变发生发展密切相关的基因, 在糖尿病视网膜病变病程中起到重要的调节作用, 因而对视网膜 miR-183C 在内的 miRNA 表达水平的调控也将可能成为糖尿病视网膜病变一种有潜力的治疗策略。

3.6 青光眼 目前尚未确定 miR-183C 与青光眼的发生和病理过程是否存在明确关系。但 Li 等^[42]发现 miR-182、-183 的上调与压力诱导的小梁网细胞的早衰有关。视黄酸受体 γ (retinoic acid receptor gamma, RARG) 被确定为 miR-182 的靶点之一, 该蛋白在小梁网细胞早衰的过程中明显下调。说明 miR-182 通过调节 RARG 等靶基因的表达引起衰老小梁网细胞表型的改变。

此外, 尽管目前还没有关于 miR-183C 在眼部缺血性疾病方面的研究。但是现有的研究结果已表明: 阻滞 miR-183C 可增强体外培养的细胞对氧/葡萄糖剥夺的耐受性, 减少细胞死亡^[43-44], 提示 miR-183C 在缺血性眼病方面存在潜在的研究价值。

4 小结与展望

综上所述,作为在眼部表达量最大的 miRNA 家族之一,miR-183C 在视网膜的发育、生理以及肿瘤、炎症、退行性病变的病理过程中扮演着重要的角色,然而对于其在这些疾病病理中确切的分子调节机制,目前我们还缺乏清晰的认识。由于 miR-183C 在光感受器细胞特殊的表达定位以及其对后者存活所潜在的促进作用,使其对于某些以光感受器细胞死亡为共同特点的眼病具有特定的研究价值,如 RP、年龄相关性黄斑变性、Stargardt 病等。此外,作为一种重要的肿瘤生物学的标记,miR-183C 在不同眼部肿瘤病理过程中的基因调控机制还有待于进一步探索。基于 miRNA 的基因治疗方法可在同一路径靶向多种下游基因,从而大大地增强了基因治疗的效果,具有良好的前景。目前,利用人工合成的 miRNA Mimics、竞争性抑制 miRNA 的反义寡核苷酸以及 miRNA 编码的转基因等方式增强或抑制 miRNA 的活性已被成功地用于某些眼病的治疗研究中,我们期待 miR-183C 在眼科疾病的诊断、预防和基因治疗方面产生新的突破。

参考文献

- Ambros V. Review microRNAs; tiny regulators with great potential [J]. *Cell*, 2001, 107 (7): 823-826.
- Chen K, Rajewsky N. Review the evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8 (2): 93-103.
- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (4): 1290-1297.
- Griffiths-Jones S. Mirbase: the microRNA database [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 342: 129-138.
- 阚雄文, 张松柏, 谢雄伟, 何方, 龙跃平. 微小 RNA-100 在胃癌血浆中的表达及临床意义 [J]. 新乡医学院学报, 2013, 30 (5): 384-386.
- Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. *Development*, 2005, 132 (21): 4653-4662.
- Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15 (5): 563-568.
- 武宇辉, 李成荣, 何颜霞, 杨燕澜, 王国兵, 温鹏强, 等. 微小 RNA-223 在脓毒症患儿血浆中表达的临床意义 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (18): 1390-1392.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 (20): 7248-7259.
- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers [J]. *Mutat Res*, 2011, 717 (1): 85-90.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human [J]. *RNA*, 2003, 9 (2): 175-179.
- Arora A, McKay GJ, Simpson DAC. Prediction and verification of miRNA expression in human and rat retinas [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (9): 3962-3967.
- Karali M, Peluso I, Marigo V, Banfi S. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (2): 509-515.
- Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (34): 25053-25066.
- Sundermeier TR, Palczewski K. The physiological impact of microRNA gene regulation in the retina [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69 (16): 2739-2750.
- Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity [J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 1175-1184.
- Huang KM, Dentechev T, Stambolian D. MiRNA expression in the eye [J]. *Mamm Genome*, 2008, 19 (7-8): 510-516.
- Jin ZB, Hirokawa G, Gui L, Takahashi R, Osakada F, Hiura Y, et al. Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 523.
- Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribl S, Richter J, et al. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs [J]. *Cell*, 2010, 141 (4): 618-631.
- Rapicavoli NA, Blackshaw S. New meaning in the message: non-coding RNAs and their role in retinal development [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238 (9): 2103-2114.
- Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H, Watanabe S. Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (6): 3008-3017.
- Damiani D, Alexander JJ, O'ourke JR, McManus M, Jadhav AP, Cepko CL, et al. Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina [J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (19): 4878-4887.
- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsdottir E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein [J]. *Cell*, 1993, 74 (2): 395-404.
- Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, et al. Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, 110 (6): E507-E516.
- Zhu QB, Sun WY, Okano K, Chen Y, Zhang N, Maede T, et al. Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (36): 31749-31760.
- Loscher CJ, Hokamp K, Kenna PF, Ivens AC, Humphries P, Palfi A, et al. Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa [J]. *Genome Biol*, 2007, 8 (11): R248.
- Loscher CJ, Hokamp K, Wilson JH, Li T, Humphries P, Farrar GJ, et al. A common microRNA signature in mouse models of retinal degeneration [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 87 (6): 529-534.
- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102 (3): 522-529.
- Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (23): 9570-9580.
- Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, et al. Pleiotropic effects of miR-183 ~ 96 ~ 182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 123 (4): 539-552.
- Liu Y, Han Y, Zhang H, Nie L, Jiang Z, Fa P, et al. Synthetic miRNA-mimics targeting miR-183-96-182 cluster or miR-210 inhibit growth and migration and induce apoptosis in bladder cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e52280.
- Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10 (1): 502.
- Xu X, Dong Z, Li Y, Yang Y, Yuan Z, Qu X, et al. The upregulation of signal transducer and activator of transcription 5-dependent microRNA-182 and microRNA-96 promotes ovarian cancer cell proliferation by targeting forkhead box O3 upon leptin stimulation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45 (3): 536-545.
- Li J, Fu H, Xu C, Tie Y, Xing R, Zhu J, et al. MiR-183 inhibits TGF- β 1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10 (1): 354.

【文献综述】

王静 陈有信

- signified by microRNA profiling [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (7) :4197-4204.
- 40 Ishida W, Fukuda K, Higuchi T, Kajisako M, Sakamoto S, Fukushima A. Dynamic changes of microRNAs in the eye during the development of experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (1) :611-617.
- 41 Wu J, Gao Y, Ren A, Zhao SH, Zhong M, Peng Y J, *et al*. Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 47 (4) :195-201.
- 42 Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130 (11) :731-741.
- 43 Lee Y, Johnson KR, Hallenbeck JM, Hallenbeck JM. Global protein conjugation by ubiquitin-like-modifiers during ischemic stress is regulated by microRNAs and confers robust tolerance to ischemia [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10) :e47787.
- 44 Lee ST, Chu K, Jung KH, Yoon HJ, Jeon D, Kang KM, *et al*. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning [J]. *Stroke*, 2010, 41 (8) :1646-1651.