

【文献综述】

吕洋 侯慧媛 王雨生

不同的 miRNA 在眼部的分布也不同。人眼中的 miRNA 大约有 90% 在视网膜和脉络膜中表达,且

表现出高度选择性^[6]。miRNA-184 在角膜和晶状体中表达较高^[7],主要表达于角膜上皮细胞的基底层,参与角膜上皮损伤后的再生,其机制可能是通过对靶基因的调控来维持必要糖原的合成。晶状体中的 miRNA 可能与白内障的发生相关。大鼠晶状体及其上皮细胞经环格列酮或 ZD2138 处理后,至少 3 种 miRNA,即 miRNA-31、miRNA-99a 和 miRNA-99b 的表达下调。靶点预测的结果提示,miRNA-31 可能调节晶状体上皮细胞的细胞周期和增殖,miRNA-99a 和 miRNA-99b 可能调节肌动蛋白细胞骨架与整合素的信号转导通路^[8]。Karali 等^[9]发现 106 个 miRNA 在小鼠眼组织中表达,其中 89 个在视网膜组织中表达。miRNA-182、miRNA-183、miRNA-96 在光感受器细胞和内核层中间神经元的表达模式相同,其表达量随着生长发育而逐渐增加,在成年鼠中达到峰值。miRNA-9 表达于神经节细胞层中的 Müller 细胞,miRNA-182 则在光感受器内呈专一表达。在成年小鼠脉络膜中,miRNA-23/27/24 簇^[10]、miRNA-126、miRNA-210、miRNA-221/222、miRNA-31、miRNA-150、miRNA-184 均有不同程度表达。在激光诱导小鼠 CNV 模型中,miRNA-23/27/24 簇、miRNA-126、miRNA-210 表达升高,miRNA-221/222、miRNA-31、miRNA-150、miRNA-184 表达下降。miRNA 在眼部表达的发育阶段特异性和组织特异性高度提示它们在眼部组织的独特功能。

3 miRNA 在 CNV 发生发展中的作用及可能机制

3.1 miRNA 参与调控氧化应激反应、免疫反应和炎症反应 大量研究表明,CNV 的发生涉及氧化应激反应、免疫反应和炎症反应。在脉络膜氧化应激中 miRNA 起着重要的调节作用。视网膜特别容易受到氧化损伤,密集的氧代谢、持续暴露于光照下、加之高浓度的多不饱和脂肪酸产生光敏剂促使视网膜中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加^[11]。ROS 过载可导致 DNA 损伤、视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞的死亡和慢性炎症。最近的一项研究提示氧化应激诱导表达的 miRNA-23A 对 RPE 细胞的凋亡具有保护作用,在 CNV 患者 RPE 中 miRNA-23A 表达下调^[12]。体外实验证明在 RPE 细胞中,经低浓度的 H₂O₂ 处理后 miRNA-23A 表达上调,相反,高浓度的 H₂O₂ 处理后 miRNA-23A 表达下调。提示过表达 miRNA-23A 可能通过减少 H₂O₂ 的表达引起氧化应激反应中 ROS 下降从而减少细胞凋亡。Shilo 等^[13]应用抑制人微血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 中 Dicer 酶的方法阻断 miRNA 的成熟,观察 miRNA 对人微血管 ECs 氧化还原反应的调节作用。发现阻断 miRNA 的成熟后,可以降低人微血管 ECs 在氧化应激状态下产生的活性产物,其主要的作用机制是 miRNA 可对烟酰胺腺嘌呤二核

苷酸磷酸氧化酶亚基 p47phox 的抑制性转录因子产生负性调控作用,增加 p47phox 的表达,从而使入微血管 ECs 在氧化应激状态下产生的活性因子表达增加,进一步诱导人微血管 ECs 的增生、迁移和管腔形成。证明了 miRNA 可以调节人微血管 ECs 内的氧化应激信号转导通路。

越来越多的 miRNA 被证明参与调节脉络膜组织的免疫反应和炎症反应。miRNA 可能参与湿性年龄相关性黄斑变性患者 RPE 下方玻璃膜疣的产生^[14]。其中补体系统的激活导致膜复合物的形成,引起细胞裂解,释放趋化因子,促进炎症反应。RPE 是维护视网膜稳态必不可少的一层细胞,其完整性的破坏引起氧化应激诱导的细胞死亡,导致补体系统活化和慢性炎症^[15]。多种 miRNA 参与炎症反应,包括 miRNA-10、miRNA-21、miRNA-124、miRNA-214、miRNA-223、miRNA-224、miRNA-513 和 miRNA-1224^[16-19]。最近的一项研究发现,miRNA-23/27/24 成员中 miRNA-27B 通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 调控脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞 (macrophage, M ϕ) 炎症反应^[20],从而促进血管生成。此外,miRNA-146a 可负向调控 LPS 和多种炎性细胞因子 (包括 IL-6 和 IL-8) 以及补体因子 H 和 TOLL 样受体 4。

3.2 miRNA 对 CNV 中细胞的调控

3.2.1 miRNA 对 CNV 中 ECs 的调控 ECs 是 CNV 形成最重要的效应细胞。miRNA-126 是目前唯一发现的 ECs 特异表达的 miRNA^[21]。在小鼠和斑马鱼模型的研究中发现,miRNA-126 的表达下调激活了血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)/PI3K/AKT 通路,从而促进血管新生、肿瘤的增殖和转移^[22]。Poliseno 等^[23]通过芯片技术确认了在人脐静脉 ECs 中 27 个高表达的 miRNA,发现其中 miRNA-221/222 能够抑制靶基因 c-kit 的表达从而抑制 ECs 管腔形成和迁移。此外,一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 对于 ECs 的功能起一定的作用,miRNA-221 和 miRNA-222 可通过负调控 ECs 的 eNOS 蛋白表达,从而抑制管壁形成、ECs 移行以及 ECs 的增生等^[23-24]。

3.2.2 miRNA 对 CNV 中 RPE 细胞的调控 在尸眼及手术标本中,RPE 细胞是 CNV 的主要成分。实验性 CNV 中,RPE 细胞可以产生 VEGF、血管生成素、血管内皮受体 Tie1 和 Tie2。另外,基质金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制剂也可由 RPE 细胞产生^[25]。Kutty 等^[26]通过对炎症因子混合物处理的人视网膜色素上皮 (human retinal pigment epithelial, HRPE) 细胞的研究发现,HRPE 细胞中 miRNA-155 表达显著升高,同时检测到信号转导与转录活化因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT)1 的激活;而 Janus 家族激酶 (Janus family kinases, JAK) 抑制剂能抑制上述过程,提示这些炎性

细胞因子可能通过 JAK/STAT 途径来促进 miRNA-155 的表达,而 miRNA-155 可通过 JAK/STAT 通路介导 HRPE 细胞的炎症反应从而影响 CNV 的严重程度。此外,Zhong 等^[27]成功获得正常氧浓度及缺氧处理的 RPE 细胞株 ARPE-19 细胞的 miRNA 表达谱,发现 miRNA-155 转染 ARPE-19 细胞后,细胞抗缺氧能力明显提高,但其发挥抗缺氧的作用途径以及其对一些与新生血管的生成密切相关的细胞因子例如 VEGF、色素上皮衍生因子等的影响尚未见报道。

3.2.3 miRNA 对 CNV 中骨髓来源细胞的调控

骨髓来源细胞(bone marrow derived cells, BMCs)可特异性在 CNV 形成区富集,并参与血管的形成。Hou 等^[28]发现,在 CNV 中 BMCs 分化的血管细胞沿新生血管的管腔分布。其中骨髓来源的 M ϕ 在调节眼部新生血管严重性中发挥重要作用。这类细胞被证明可分泌大量促进血管生成因子,并促进 RPE 细胞分泌基质细胞衍生因子 1 刺激 BMCs 迁移和黏附。在激光诱导小鼠 CNV 造模后第 7 天起就持续存在于病损区及眼部其他部位^[29]。miRNA 可以调节骨髓细胞的生理功能,在骨髓干细胞中特异性表达^[30],调控造血干细胞、基质干细胞和内皮祖细胞干细胞的增殖和分化^[31-32]。改变干/祖细胞的性质或者分化水平可以造成 miRNA 表达水平的改变^[33]。项阳等^[34]利用年轻及衰老小鼠模型在正常及 LPS 诱导炎症状态下,筛选出一系列与免疫、衰老相关的 miRNA,证实年龄相关性的 miRNA-146a 表达失常导致 M ϕ 功能紊乱。因此,miRNA 可能通过调控 CNV 形成中的血管 ECs、RPE 细胞、BMCs、M ϕ 的功能状态和相互作用,以调控 CNV 的发生和发展。在细胞上特异性改变 miRNA 的表达,对逐一明确 miRNA 在 CNV 形成中各类重要细胞的功能调控研究具有重要意义。

3.3 miRNA 对 CNV 中细胞因子的调控

既往研究表明,VEGF 及其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 等与眼内新生血管的发生发展有密切关系,是导致新生血管形成的主要因子,它们可以通过改变微血管 ECs 生物学行为和血管生成能力来调控新生血管的形成。VEGF 作为血管生成的正性调节因子,在 CNV 中的作用已被证实且已被应用于临床。近期大量研究表明,miRNA 与 VEGF 之间存在密切的相互作用。miRNA-351 通过调控 VEGF 和促血管生成素(angiotensin, Ang)-2 的表达,在治疗小鼠新生血管性视网膜病变中起到良好的效果^[35]。体内体外实验均表明,过表达 miRNA-351 可导致 VEGF 和 Ang-2 的表达显著下降^[35]。但其具体调控机制有待进一步研究。miRNA-23 和 miRNA-27 通过抑制其靶 mRNA 编码的同源蛋白 2 (Sprouty2)和信号素 6A 蛋白(se-ma6A)负性调节促

分裂原活化蛋白激酶和 VEGFR2 信号通路,从而减少 CNV 生成^[10]。miRNA-126 可能通过调控 VEGF/PI3K/ATK 通路的活性,控制血管炎性反应、调节血管新生从而达到稳定内皮系统功能的目的^[21]。此外,miRNA-126 还可以通过抑制细胞内新生血管信号抑制剂 Spred-1 的表达加强 VEGF 和成纤维细胞生长因子的作用,从而促进血管形成。在激光光凝诱导的 CNV 模型中,miRNA-31、miRNA-150 和 miRNA-184 下调^[36]。向缺血眼球内注射 miRNA-31 的前体可造成 VEGF 的显著减少。miRNA-31 可能靶向下调缺氧诱导因子-1a 及血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)- β 的表达;miRNA-150 可能靶向下调 PDGF- β 以及 VEGF。球内注射 miRNA-31、miRNA-150、miRNA-184 或三者的混合液,可导致 VEGF 下调,明显抑制 CNV。

目前有研究表明,miRNA 对 TGF- β 信号通路具有一定的调控作用,同时 TGF- β 也可以影响 miRNA 的表达。Kong 等^[37]发现在无胆固醇和限制氨基酸饲料喂养所导致的小鼠肝癌模型中,miRNA-181b 和 miRNA-181d 表达升高,体外用 TGF- β 处理肝细胞可诱导 miRNA-181b 的表达。在肺成纤维细胞中 TGF- β 可抑制 miRNA-155 的表达,miRNA-155 可通过靶向抑制角质细胞生长因子介导 TGF- β 促进肺成纤维细胞迁移的作用。Shan 等^[38]发现在尼古丁的作用下,TGF- β 1 受体和 TGF- β 2 受体表达量上调,而 miRNA-133 的表达量却下降 60%~70%,过表达 miRNA-133 可降低 TGF- β 1 受体和 TGF- β 2 受体的表达水平。正常小鼠视网膜组织中也可检测到 miRNA-133 的表达,对有色素变性的小鼠及正常小鼠眼球组织进行对比检测发现,患病小鼠的 miRNA-133 表达减少超过 2.5 倍,推测 miRNA-133 的下调与视网膜变性的发生有着密切的关系。最近 Kato 等^[39]研究报道,在糖尿病性肾病中 miRNA-192 可以通过抑制 E-box 受体从而调控 TGF- β 诱导的胶原的表达。初步研究表明 miRNA 在糖尿病性肾病的发生发展过程中发挥着重要的调控作用。因而,有学者推测 miRNA 在 CNV 中也对 TGF- β 的表达发挥着一定的调控作用。

4 前景与展望

随着对 CNV 发病机制的长期探索,miRNA 作为重要的特异性调控多种靶蛋白的非编码 RNA 分子参与 CNV 生成的事实逐步被揭示。然而,这一领域的研究尚处于早期阶段,很多问题仍待解决。如:这些特异性表达的 miRNA,怎样在 CNV 微环境中作用于各类细胞发挥一对多的调控作用,并与其他信号通路发生相互作用?怎样才能在不影响眼部血管稳态的前提下通过改变 miRNA 抑制眼内病理性新生血管的生长?目前国外已有报道,使用 miRNA 的抑制剂或拟似剂上调或下调 miRNA 在眼组织中的表

达,以调控蛋白编码基因的表达来达到治疗疾病的目的,这也是未来研究的重要方向。随着研究的深入,miRNA 作用机制的阐明可为眼内新生血管的靶向治疗提供新的突破口。

参考文献

- 1 Li CS, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPCs and pathological angiogenesis; when good cells go bad[J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3):207-216.
- 2 Hou HY, Liang HL, Wang YS. Bone marrow-derived cells in neovascular age-related macular degeneration: contribution and potential application[J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 45(1):1-4.
- 3 窦国瑞,王雨生. 生长因子在脉络膜新生血管生成的微环境中的多重作用[J]. *眼科新进展*, 2006, 26(9):706-709.
- 4 Hu CB, Li QL, Hu JF, Zhang Q, Xie JP, Deng L. MiR-124 inhibits growth and invasion of gastric cancer by targeting ROCK1[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16):6543-6546.
- 5 Stappert L, Roese-Koerner B, Brüstle O. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification[J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 359(1):47-64.
- 6 Wang FE, Zhang C, Maminishkis A, Dong L, Zhi C, Li R, et al. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology[J]. *FASEB J*, 2010, 24(5):1552-1571.
- 7 Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity[J]. *Mol Vis*, 2006, 12(10):1175-1184.
- 8 Xu S. microRNA expression in the eyes and their significance in relation to function[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28(2):87-116.
- 9 Karali M, Peluso I, Gennarino VA, Bilio M, Verde R, Lago G, et al. miRNeYE: a microRNA expression atlas of the mouse eye[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(6):715.
- 10 Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23/27/24 clusters[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(20):8287-8292.
- 11 Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration[J]. *Surv Ophthalmol*, 2000, 45(2):115-134.
- 12 Lin H, Qian J, Castillo AC, Long B, Keyes KT, Chen G, et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(9):6308-6314.
- 13 Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3):471-477.
- 14 Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(24):2606-2617.
- 15 Walport MJ. Complement. Second of two parts[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(15):1140-1144.
- 16 Moschos SA, Williams AE, Perry MM, Birrell MA, Belvisi MG, Lindsay MA. Expression profiling *in vivo* demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1):240-245.
- 17 Gong AY, Zhou R, Hu G, Li X, Splinter PL, O'Hara SP, et al. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3):1325-1333.
- 18 Niu Y, Mo D, Qin L, Wang C, Li A, Zhao X, et al. Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumour necrosis factor-alpha gene expression by modulating Sp1[J]. *Immunology*, 2011, 133(1):8-20.
- 19 Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-Pu.1 pathway[J]. *Nat Med*, 2011, 17(1):64-70.
- 20 Jennewein C, Von Knethen A, Schmid T, Brune B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)mRNA destabilization[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16):11846-11853.
- 21 Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egr1 locus to the microRNA miR-126[J]. *Development*, 2008, 135(24):3989-3993.
- 22 Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2):272-284.
- 23 Polisenio L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HU-VECs[J]. *Blood*, 2006, 108(9):3068-3071.
- 24 Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(1):81-83.
- 25 Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, et al. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization[J]. *Mol Vis*, 2002, 8(2):119-126.
- 26 Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasathya C, Hooks JJ, Redmond TM. Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(2):390-395.
- 27 Zhong H, Lv Q, Ye WB. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia[J]. *PloS One*, 2006, 1(1):e116.
- 28 Hou HY, Wang YS, Xu JF, Wang YC, Liu JP. The dynamic conduct of bone marrow-derived cells in the choroidal neovascularization microenvironment[J]. *Curr Eye Res*, 2006, 31(12):1051-1061.
- 29 Li H, Wang Y, Cao F. *In vivo* bioluminescence imaging monitoring of stem cells' participation in choroidal neovascularization[J]. *Ophthalmic Res*, 2013, 50(1):19-26.
- 30 Attar R, Sajjad F, Qureshi MZ, Tahir F, Hussain E, Fayyaz S, et al. TRAIL based therapy: Overview of mesenchymal stem cell based delivery and miRNA controlled expression of TRAIL[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16):6495-6497.
- 31 Laine SK, Hentunen T, Laitala-Leinonen T. Do microRNAs regulate bone marrow stem cell niche physiology[J]. *Gene*, 2012, 497(1):1-9.
- 32 Laine SK, Alm JJ, Virtanen SP, Aro HT, Laitala-Leinonen TK. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(8):2687-2695.
- 33 Ibrahim SA, Hassan H, Götte M. microRNA regulation of proteoglycan function in cancer[J]. *FEBS J*, 2014, 281(22):5009-5022.
- 34 项阳,姜明红. miR-146a 对小鼠巨噬细胞 Th1/Th2 型炎症因子表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(5):477-479.
- 35 Zhao R, Qian L, Jiang L. miRNA-dependent cross-talk between VEGF and Ang-2 in hypoxia-induced microvascular dysfunction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3):428-435.
- 36 Shen J, Yang X, Xie B, Chen Y, Swaim M, Hackett SF. MicroRNAs regulate ocular neovascularization[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7):1208-1216.
- 37 Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(22):6773-6784.
- 38 Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(3):465-472.
- 39 Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9):3432-3437.