

引文格式:张帆,吴京,陈林江,马明,于健,卢晓丽,等.雷珠单抗对角膜新生血管的抑制作用以及对血管生成相关 miRNAs 表达的影响[J].眼科新进展,2020,40(11):1010-1014. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0226

【实验研究】

雷珠单抗对角膜新生血管的抑制作用以及对血管生成相关 miRNAs 表达的影响[△]

张帆 吴京 陈林江 马明 于健 卢晓丽 王涵菁

作者简介:张帆(ORCID: 0000-0001-6053-7588),女,1992年6月出生,陕西汉中,硕士。主要研究方向:角膜病。E-mail: zhangfan614@163.com
通信作者:吴京(ORCID: 0000-0001-9861-4323),女,教授,主任医师。主要研究方向:角膜病。E-mail: wujingsci@126.com
收稿日期:2019-10-22
修回日期:2019-12-13
本文编辑:董建军
△基金项目:广东省科技计划项目(编号:2017A020211005);广州市科技计划项目(编号:201607010386);南方医院院长基金(编号:2017C035,2016B009)
作者单位:510515 广东省广州市,南方医科大学南方医院眼科(张帆,陈林江,马明,于健,卢晓丽);510515 广东省广州市,南方医科大学南方医院惠侨科(吴京,王涵菁)

【摘要】 目的 探讨雷珠单抗对角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的抑制作用以及对血管生成相关 miRNAs 表达的影响。方法 取24只SD大鼠随机分为3组,左眼角膜缝线法制备CNV模型后分为模型组和治疗组(结膜下注射10 g · L⁻¹雷珠单抗注射液),每组各8只,剩余8只作为空白组。术后第8天评估大鼠CNV长度及面积,行组织病理学检查及CD31免疫荧光染色。检索基因芯片与生物信息学数据库,选择血管生成相关的miRNAs,实时荧光定量PCR验证各组VEGF-A及miRNAs的表达。采用生物信息学方法分析miRNA靶基因富集通路。结果 治疗组大鼠CNV长度、面积均小于模型组,差异均有统计学意义(均为P<0.01)。HE染色显示,治疗组大鼠角膜仅有少量新生血管及炎症细胞,模型组大鼠角膜中出现大量新生血管且各层均可见炎症细胞。CD31免疫荧光染色显示,模型组及治疗组中角膜均可见DAPI阳性染色,CD31主要在基质层表达,形成环形管腔结构。模型组CD31染色阳性的每个视野微血管数为(9.83±1.85)个(400倍),治疗组中每个视野微血管数为(4.58±1.38)个,3组角膜微血管数差异有统计学意义(F=163.65, P<0.01)。治疗组VEGF-A mRNA表达水平低于模型组,miR-15b、miR-16、miR-29c表达水平均高于模型组,差异均有统计学意义(均为P<0.01)。差异miRNAs的靶基因主要富集于血管生成、蛋白结合等通路。结论 结膜下注射雷珠单抗能抑制大鼠CNV,降低VEGF-A表达并改变相关miRNAs表达水平。
【关键词】 角膜新生血管;雷珠单抗;microRNA
【中图分类号】 R772.2

角膜透明是屈光及视路通畅的关键。角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)可破坏角膜正常结构,促进炎症反应,增强移植物与受体免疫系统的联系,并能诱导严重免疫反应^[1]。VEGF是一种促血管生成因子,VEGF-A是其最重要的亚型,与CNV发生发展密切相关^[2]。雷珠单抗是第二代抗VEGF药物,亲和力强并能结合VEGF-A所有异构体,在眼底新生血管疾病的治疗中效果显著,安全稳定^[3]。尽管研究表明雷珠单抗可用于治疗CNV,但尚未大规模用于临床。miRNAs是转录后调节因子,通过调节靶基因的表达,驱动或抑制血管新生、氧化应激、免疫应答等级联反应^[4]。近年来多项研究发现,CNV形成后,其组织内多个miRNAs及其靶基因的表达发生改变^[5-6]。本研究探讨雷珠单抗对CNV的

抑制作用以及对VEGF-A和血管生成相关miRNAs表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取24只SPF级SD大鼠(南方医科大学动物实验中心),雄性,8~10周龄,体质量(210±10)g,可自由摄食、饮水。实验前检查双眼,排除眼部结构异常的动物。采用随机数字表法分为3组;取16只大鼠用左眼角膜缝线法制备CNV模型后分为模型组和治疗组(结膜下注射10 g · L⁻¹雷珠单抗注射液),每组各8只,剩余8只作为空白组。本实验遵循广东省实验动物管理条例,并取得南方医科大学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器 雷珠单抗注射液(瑞士诺华

minutes after injection. The fluorescence intensity of PEI-NHAc-FS NPs group basically disappeared at 60 minutes, while the free fluorescein sodium groups treated with the same FS concentration maintained stronger fluorescence intensity. The FFA was conducted in 10 g · L⁻¹ free FS group or 10 g · L⁻¹ PEI-NHAc-FS NPs group, respectively. The results showed that fluorescence imaging was observed in retinal vessels after contrast agents were injected into the tail vein, and fluorescence leakage was observed in the lesion site. Free fluorescein sodium showed strong adsorption and permeation to the retinal layers with evident fluorescence, while PEI-NHAc-FS NPs exhibited minimal fluorescence in the retinal tissues. *In vivo* biosafety analysis of the contrast agent by HE staining and electroretinogram showed that PEI-NHAc-FS NPs was safe. **Conclusion** PEI-NHAc-FS NPs can be used safely and effectively in FFA.

【Key words】 fluorescein sodium; fundus fluorescein angiography; polyethyleneimine; contrast agents

制药公司),左氧氟沙星滴眼液(日本 Santen 公司),10-0 尼龙线(美国 Alcon 公司),免疫荧光抗体(英国 Abcam 公司),总 RNA 抽提试剂、RNA 逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司),苏木素-伊红染色试剂(中国碧云天生物公司)。手术显微镜及共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。本研究引物由广州擎科生物公司设计合成。

1.3 手术方法 所有动物适应性喂养 1 周,术前 3 d 以左氧氟沙星滴眼液每天滴眼 3 次,用戊巴比妥钠按 $1.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射诱导全身麻醉,盐酸丁卡因滴眼液滴眼 3 次进行表面麻醉,络合碘消毒眼周,生理盐水冲洗术眼。在显微镜直视下用 3.0 mm 环钻在角膜中央做轻压迹,10-0 无损伤缝线自压痕处向角膜缘方向进针,穿过角膜基质层,跨度约 1.0 mm,等距间断缝合 3 处(11:00、12:00 和 1:00 钟位),打双结后留置 1.0 mm 不包埋线头。模型组建模后除每天用抗生素滴眼外不予任何处理。治疗组于建模后第 1、3、5、7 天结膜下注射 0.05 mL 雷珠单抗注射液,注射位置为 12:00 钟位近角膜缘处,术后滴抗生素眼液预防感染。术后每天在裂隙灯下检查缝线在位情况,如果发现脱落,及时补针,若缝线再次脱落,或出现角膜感染、穿孔则剔除并及时补充动物。

1.4 CNV 长度及面积的测量 术后 8 d 随机抽取 6 只大鼠用裂隙灯显微镜数字图像处理系统散瞳后对左眼进行照相,用游标卡尺测量与角膜缘垂直生长的最长新生血管及分布的范围,应用 Robert 公式 $S=C\times 3.141\,6[r^2-(r-l)^2]/12$,求出大鼠 CNV 面积^[7]。 C 、 r 、 l 分别代表新生血管侵及角膜圆周钟点数、大鼠角膜半径、角膜最长垂直血管的长度。

1.5 角膜组织病理学检查 各组随机抽取 3 只大鼠,采用过量麻醉剂处死后摘除眼球, $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液固定 24 h,梯度酒精脱水处理,浸蜡,制成石蜡组织块后垂直于眼轴方向切片,厚度 $5\text{ }\mu\text{m}$,进行 HE 染色,镜检照相。

1.6 CD31 免疫荧光染色 将切片脱蜡后进行抗原修复,用体积分数 10% 驴血清室温孵育 30 min 后移去血清,滴加稀释后的兔抗大鼠 CD31 一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 反复冲洗 3 次,每次 3 min。随后滴加 FITC 标记的驴抗兔 IgG,室温避光孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, DAPI 避光孵育 30 min。TBST 洗 3 次,每次 5 min,以防荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下扫描后观察及拍照。参照文献^[8],随机选取各组 400 倍镜下 4 个视野,计算血管数、血管密度平均值。

1.7 目标 miRNA 选择与靶基因预测及生物信息学分析 检索大鼠 CNV 芯片相关文献^[9],应用 4 个基于不同算法的生物信息学数据库 miRWalk、TargetScan、miRDB、miRTarBase,选出与血管生成通路关系密切的 8 个 miRNAs 纳入研究。通过数据库预测

其靶基因,选取 3 个及以上数据库中能预测到的靶基因行 GO 和 KEGG Pathway 分析。

1.8 实时定量 PCR 检测 各组用过量麻醉剂处死 5 只大鼠,沿角膜缘完整取下带 1.0 mm 巩膜的角膜,分离虹膜,修剪边缘并用生理盐水冲洗。按 Trizol 法提取总 RNA,测定浓度和纯度,取 450 ng RNA 分别按照 miRNA 及 mRNA 逆转录试剂盒说明书获得 cDNA。使用 SYBR GREEN 法进行 cDNA 扩增: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 32 s,总计 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。PCR 引物序列: miR-15b: 3'-CCGCGCGTAGCAGCACATCATGTTTACA-5', miR-16: 3'-GCGCGTAGCAGCACGTAATATTGGCG-5', miR-29c: 3'-CGCGCGTAGCACCATTTGAAATCGGTTA-5', miR-126: 3'-ATTATTACTTTTGGTACGCG-5', miR-195: 3'-CGCGCGTAGCAGCACAGAAATATTGGC-5', miR-210: 3'-CTGTGCGTGTGACAGCGG-5', miR-322: 3'-CAGCAGCAATTCATGTTTTGG-5', miR-497: 3'-CAGCACACTGTGTTTGTGA-5', VEGF-A 上游引物为 3'-CCAGGACTACCCCGATGAGAT-5'、下游引物为 3'-TCCAGGGCTTCATCATTGC-5', GAPDH 上游引物为 3'-TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA-5'、下游引物为 3'-AAGAGAAGGCAGCCCTGGTAA-5', U6 上游引物为 3'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-5'、下游引物为 3'-TGAACGCTTCACGAATTTGCG-5'。VEGF-A 内参选用 GAPDH, miRNA 内参选用 U6 校正。

1.9 统计学分析 本研究数据采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计与分析。采用单因素方差分析比较各组 CNV 长度、面积和 mRNA 及 miRNA 相对表达量,组间两两比较采用 LSD 检验。方差不齐时进行 Welch 法校正, DunnettT3 法进行比较。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 术后各组大鼠 CNV 形态和 CNV 长度、面积检测结果 术后第 8 天,空白组大鼠角膜缘血管无充血扩张,未见新生血管生长(图 1A);模型组术后第 2 天角膜缝线周围轻度水肿,角膜缘血管变粗,术后第 4~5 天向心性蔓延,生长快速,至术后第 8 天时见大鼠角膜血管粗大密集,交汇成血管网,大部分超过缝线处,范围集中在 4 个钟点位(图 1B);治疗组大鼠角膜术后第 3 天缝线处水肿,角膜缘血管芽状生长,术后第 8 天少量血管超过缝线,分布范围局限在 3 个钟点位(图 1C)。治疗组大鼠 CNV 长度为 $(1.82\pm 0.16)\text{ mm}$,明显小于模型组 CNV 长度 $(2.24\pm 0.21)\text{ mm}$;治疗组 CNV 面积为 $(7.41\pm 0.58)\text{ mm}^2$,明显小于模型组 CNV 面积 $(9.52\pm 0.45)\text{ mm}^2$;两组 CNV 长度以及 CNV 面积差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$)。

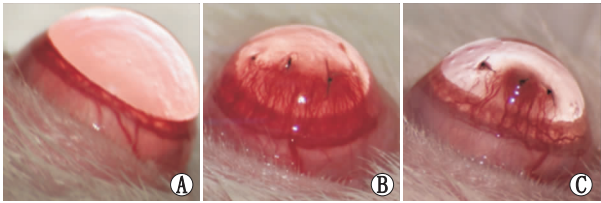


图1 术后第8天各组大鼠 CNV 形态 A:空白组; B:模型组;C:治疗组

2.2 术后第8天各组大鼠角膜组织 HE 染色 空白组大鼠角膜无水肿,结构正常,未见新生血管及炎症细胞(图2A)。模型组大鼠角膜水肿,各层均可见炎症细胞,大量新生血管和空泡集中于基质层,其内可见大量红细胞,结构紊乱(图2B)。治疗组大鼠角膜轻度水肿,基质层血管、空泡较模型组稀疏,仅见少量炎症细胞浸润(图2C)。

2.3 术后第8天各组大鼠角膜 CD31 免疫荧光染色结果 空白组角膜中可见 DAPI 阳性染色(蓝色荧

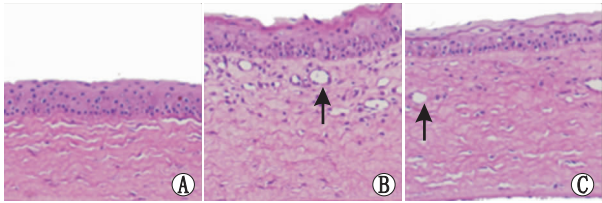


图2 术后第8天各组大鼠角膜组织 HE 染色(×200) A:空白组;B:模型组;C:治疗组;箭头示新生血管管腔内出现红细胞

光),未见 CD31 信号。模型组及治疗组中角膜均可见 DAPI 阳性染色,CD31(绿色荧光)主要在基质层表达,形成环形管腔结构。模型组 CD31 染色阳性的每个视野微血管数为(9.83 ± 1.85)个(400 倍),治疗组中每个视野微血管数为(4.58 ± 1.38)个,3 组角膜微血管数差异有统计学意义($F = 163.65, P < 0.01$)(见图3)。

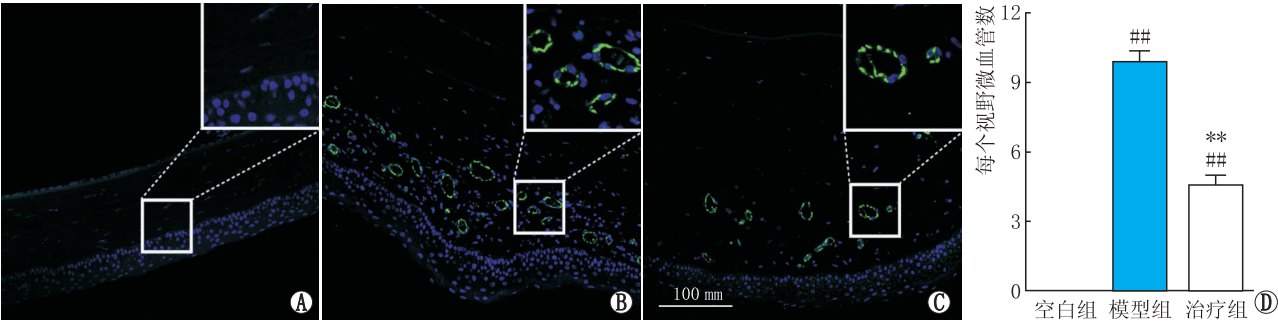


图3 术后第8天各组大鼠角膜 CD31 免疫荧光染色结果(×400) A:空白组;B:模型组;C:治疗组;D:各组微血管数,与模型组相比, ** $P < 0.01$;与空白组相比, ## $P < 0.01$

2.4 术后第8天各组大鼠角膜血管生成相关基因相对表达量 术后第8天,治疗组大鼠角膜中 miR-15b、miR-16、miR-29c mRNA 的相对表达量高于模型组,VEGF-A mRNA 相对表达量低于模型组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);与空白组相比,模型组及治疗组中 miR-126、miR-210、miR-322 的表达显著上调,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),而模型组及治疗组组间差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。三组间 miR-195、miR-497 的相对表达量比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)(见图4)。

2.5 miRNA 靶基因预测和功能分析 为进一步了解以上差异表达 miRNAs 潜在的生物学功能,利用数据库对差异 miRNAs 的靶基因进行生物信息学分析。3 个及以上数据库均能预测到 miR-15b、miR-16、miR-29c 的靶基因分别有 187 个、120 个和 1 个。GO 分析结果显示,其靶基因富集于细胞代谢过程、蛋白质结合、酶结合等。与血管生成有关的条目有 MAPK 级联激活、血管重构等。KEGG 通路富集分析结果显示,靶基因富集于黏着斑通路、mTOR 信号通

路、TNF 信号通路等。与血管生成相关的通路呈现明显富集,如 mTOR 信号通路、VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。

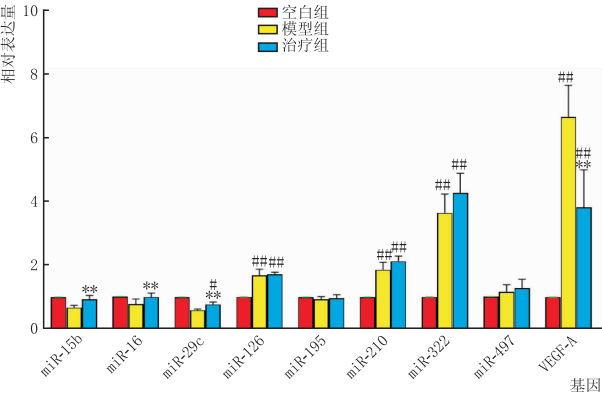


图4 术后第8天各组大鼠角膜 VEGF 及血管生成相关 miRNAs 相对表达量 与模型组相比, ** $P < 0.01$;与空白组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

CNV 严重威胁视力,如不及时治疗,会导致角膜水肿、瘢痕形成、脂质及蛋白质沉积,破坏角膜正常的结构。目前,我国有大约 400 万因角膜病而致盲的患者^[10]。尽管有许多抑制 CNV 的策略,而彻底治愈角膜盲的方法仅有角膜移植,但是 CNV 会抑制角膜“免疫赦免”状态,极大地降低角膜移植术后植片的存活率及视力预后^[11]。因此,抑制 CNV 生长是预防角膜盲的重要策略。目前研究认为 VEGF 是 CNV 形成的关键因素。角膜基质内置线可引起角膜炎症、缺氧,触发 VEGF 释放,引起病理性 CNV。大鼠角膜基质置线后第 5~7 天血管生长速率最快,术后 10 d 左右开始出现消退,与碱烧伤诱导的 CNV 相比,生长范围更稳定,重复性好。本研究选择缝线法建立 CNV 模型,术后第 8 天评价药物治疗效果。此外,CD31 高表达于血管内皮细胞膜,通过分泌活性物质参与血管生成,能可靠直观地显示新生血管的数量和密度^[12]。本研究通过对比 CD31 表达发现治疗组角膜微血管数明显低于模型组,表明结膜下注射雷珠单抗对大鼠 CNV 生长的进程具有减缓和抑制作用。Joachim 等^[13]对人、鼠 VEGF 蛋白进行斑点印迹杂交证明,雷珠单抗对大鼠的 VEGF-A 具有亲和力。另有研究发现,雷珠单抗能抑制人淋巴内皮细胞及血管内皮细胞增殖,减少角膜血管及淋巴管生成,调控小鼠 CNV 的生成^[14]。

基因表达异常能导致新生血管发生发展,miRNAs 通过介导 VEGF 等关键蛋白来调节血管内皮细胞生理病理过程,参与血管生成级联反应^[15]。研究发现,药物可通 miRNA-mRNA 网络来调控其靶基因表达水平^[16]。近期研究表明,雷珠单抗能改变视网膜血管内皮细胞 miRNA 的表达谱^[17],但尚不清楚雷珠单抗是否可以通过调控 miRNA 来影响 CNV 的生成。因此,我们选取 8 个与血管生成相关的 miRNAs 进行实时定量 PCR,结果显示治疗组与模型组相比,VEGF 的表达降低且部分 miRNAs 的表达水平也发生改变。由此推测,雷珠单抗可能通过调节 miRNAs 表达来调控 VEGF 表达,从而影响 CNV 的形成。

研究发现,过表达 miR-15b 能抑制小鼠的动脉发生和血管生成,荧光素酶实验证实蛋白激酶是 miR-15b-5p 的靶基因^[18]。miR-29c 在心血管疾病和肿瘤中具有重要作用,如鼻咽癌^[19]、胃癌^[20]及宫颈癌^[21]等。miR-126 有双向血管调节作用,可促进内皮祖细胞迁移并形成血管,从而提高内皮祖细胞存活率并增加毛细血管密度^[22],而在视网膜组织中,其类似物通过下调早产小鼠视网膜病变模型中视网膜 p38 MAPK 和细胞外调节蛋白激酶,减少视网膜新生血管^[23]。miR-210 是“缺氧敏感型”miRNA,过表达 miR-210 可减少小鼠心肌梗死后心肌细胞死亡,促进梗死灶血管再生^[24]。

为进一步明确差异 miRNAs 的作用,我们对差异 miRNAs 的靶基因进行生物信息学分析,结果显示其靶基因富集于多条与新生血管及炎症相关的通路。在此基础上我们推测,其可能通过改变 miRNA 生物学功能影响多条血管生成相关通路从而抑制缝线诱导的 CNV 的形成。

综上所述,结膜下注射雷珠单抗能抑制大鼠 CNV,降低 VEGF-A 表达并改变相关 miRNAs 表达水平。

参考文献

- [1] NIEDERKORN J Y. High-risk corneal allografts and why they lose their immune privilege[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010, 10(5): 493-497.
- [2] VOICULESCU O B, VOINEA L M, ALEXANDRESCU C. Corneal neovascularization and biological therapy[J]. *J Med Life*, 2015, 8(4): 444.
- [3] STEVENSON W, CHENG S, DASTJERDI M H, FERRARI G, DANA R. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: Ranibizumab (Lucentis) vs Bevacizumab (Avastin)[J]. *Ocul Surf*, 2012, 10(2): 67-83.
- [4] IWAKAWA H, TOMARI Y. The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(11): 651-665.
- [5] ZHANG X, DI G, DONG M, QU M L, ZHAO X W, DUAN H, et al. Epithelium-derived miR-204 inhibits corneal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 167: 122-127.
- [6] PARK J K, PENG H, YANG W, KATSNELSON J, VOLPERT O, LAVKER R M. miR-184 exhibits angiostatic properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways[J]. *Faseb J*, 2017, 31(1): 256-265.
- [7] D'AMATO R J, LOUGHNAN M S, FLYNN E, FOLKMAN J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(9): 4082-4085.
- [8] WEIDNER N, FOLKMAN J, POZZA F, BEVILACQUA P, ALLRED E N, MOORE D H, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [9] 毛旖旎, 胡雁, 侯胜平, 周善璧. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(8): 1090-1094.
- [10] MAO Y N, HU Y, HOU S P, ZHOU S B. Correlation between microRNA expression profiles and VEGF of corneal neovascularization in rats[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2014, 39(8): 1090-1094.
- [11] GUO C, WANG Z, HE P, CHEN G, ZHENG X. Prevalence, causes and social factors of visual impairment among chinese adults: based on a national survey[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(9): 1034.
- [12] YU T, RAJENDRAN V, GRIFFITH M, FORRESTER J V, KUFFOVÁ L. High-risk corneal allografts: A therapeutic challenge[J]. *World J Transplant*, 2016, 6(1): 10-27.
- [13] LERTKIATMONGKOL P, LIAO D, MEI H, HU Y, NEWMAN P J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 23(3): 253-259.
- [14] JOACHIM S C, RENNER M, REINHARD J, THEISS C, MAY C, LOHMANN S, et al. Protective effects on the retina after ranibizumab treatment in an ischemia model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e182407.
- [15] BUCHER F, PARTHASARATHY A, BERGUA A, ONDERKA J, REGENFUSS B, CURSIEFEN C, et al. Topical Ranibizumab inhibits inflammatory corneal hem- and lymphangiogenesis[J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92(2): 143-148.
- [16] ZHANG Y, CAI S, JIA Y, QI C, SUN J, ZHANG H, et al. Decoding noncoding RNAs: role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in ocular neovascularization[J]. *Theranostics*, 2017, 7(12): 3155-3167.
- [17] ALIEVA A K, FILATOVA E V, KARABANOV A V, ILLARI-

OSHKIN S N, LIMBORS-KA S A, SHADRINA M I, *et al.* miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015, 21 (1): 72-74.

[17] JOHANNA M W, THOMAS W, ZHANG P P, BERTAN C, BJORN G, HANSJUERGEN A, *et al.* Impact of angiogenic activation and inhibition on miRNA profiles of human retinal endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 181: 98-104.

[18] ZHU L, ZHOU J, ZHANG J, WANG J Y, WANG Z Y, PAN M, *et al.* MiR-15b-5p regulates collateral artery formation by targeting AKT3 (Protein Kinase B-3) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37 (5): 957-968.

[19] SENGUPTA S, DENBOON J A, CHEN I H, NEWTON M A, STANHOPE S A, CHENG Y J, *et al.* MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (15): 5874-5878.

[20] MATSUO M, NAKADA C, TSUKAMOTO Y, NEWTON M A, STANHOPE S A, CHENG Y J, *et al.* MiR-29c is downregulat-

ed in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2 [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12 (1): 15.

[21] LI Y, WANG F, XU J, YE F, SHEN Y, ZHOU J, *et al.* Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29 [J]. *J Pathol*, 2011, 224 (4): 484-495.

[22] LI H, LIU Q, WANG N, XU Y, KANG L, REN Y, *et al.* Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing miR-126-3p improves heart function in ischemic cardiomyopathy [J]. *Circ J*, 2018, 82 (9): 2332-2341.

[23] BAI Y, BAI X, WANG Z, ZHANG X, RUAN C, MIAO J. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91 (1): 471-477.

[24] ARIF M, PANDEY R, ALAM P, JIANG S, SADAYAPPAN S, PAUL A, *et al.* MicroRNA-210 mediated proliferation, survival, and angiogenesis promote cardiac repair post myocardial infarction in rodents [J]. *J Mol Med*, 2017, 95 (12): 1369-1385.

Effects of ranibizumab on corneal neovascularization and angiogenesis-related miRNAs expression in rats

ZHANG Fan¹, WU Jing², CHEN Linjiang¹, MA Ming¹, YU Jian¹, LU Xiaoli¹, WANG Hanjing²

1. Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
2. Huigiao Medical Center, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: WU Jing, E-mail: wujingsci@126.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of ranibizumab on corneal neovascularization (CNV) and angiogenesis-related miRNAs expression in rats. **Methods** A total of 24 SD rats were randomly divided into three groups, and corneal suture was conducted on the left eyes of 16 rats in order to induce the development of corneal neovascularization and later these rats were divided into model group and treatment group (subconjunctival injection of 10 g · L⁻¹ ranibizumab), and the remaining 8 rats were classified as the blank group. The length and area of CNV of rats were calculated on the 8th day after surgery. Then the morphological structure of corneal was observed by HE staining and the expression levels of CD31 were detected by using immunofluorescence staining. Expression levels of VEGF-A and miRNAs were detected by RT-PCR. The target genes of miRNA were analyzed by bioinformatics methods. **Results** On the 8th day after surgery, the length and area of CNV in the treatment group were significantly smaller than those in the model group (both $P < 0.01$). Histopathological examination showed the presence of a large number of inflammatory cells and neovascularization in the corneal tissue of the model group whereas only a small number could be detected in the treatment group. CD31 immunofluorescence staining showed that DAPI-positive staining was seen in the cornea in the model group and the treatment group, and CD31 was mainly expressed in the stroma, forming a circular lumen structure. Immunofluorescence showed that the number of CD31-positive microvessels in the treatment group (4.58 ± 1.38) was lower than that in the model group (9.83 ± 1.85) ($F = 163.65$, $P < 0.01$). The expression of VEGF-A mRNA in the treatment group was down-regulated compared with the model group, while the expression levels of miR-15b, miR-16, and miR-29c were up-regulated (all $P < 0.01$). Target genes of differently expressed miRNAs were mainly enriched in angiogenesis, protein binding items. **Conclusion** Subconjunctival injection of ranibizumab can reduce the formation of CNV, decrease the level of VEGF-A and change the level of related miRNAs.

[Key words] corneal neovascularization; ranibizumab; microRNA