

【文献综述】

王月 王雪 底煜

彭芬等^[10]采用高通量测序技术研究 OIR 模型视网膜 lncRNA 表达谱,结果提示 1118 条 lncRNA 与其相关,其中 950 条表达上调,168 条表达下调。进一步针对其中 6 条 lncRNA 进行研究发现,存在潜在靶基因调控新生血管的形成,具有代表性的有碱性成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、受体酪氨酸激酶样孤儿素受体 β 等。张劲松等^[11]利用 Arraystar Human LncRNA array (Version 2.0) 对人脐静脉内皮细胞、人视网膜色素上皮细胞、人成纤维细胞、人脉络膜内皮细胞以及人视网膜内皮细胞提取的 RNA 分别进行测序,筛选出在内皮细胞中表达比非内皮细胞高 2 倍的 lncRNA,发现内皮

Chen 等^[5]通过对眼组织不同部分的 lncRNA 表达进行研究发

细胞富含的 lncRNA 与胚胎发育以及血管的发育相关度更高。漆晨等^[12]通过建立 OIR 小鼠模型,针对蛋白表达谱进行分析发现,在 OIR 模型和正常组小鼠的眼组织中,细胞因子血小板因子 4(platelet factor 4,PF-4)、P 选择素(recombinant P-selectin,SELP)、血管内皮生长因子 A、CXC 趋化因子配体 16(CXCL16)、可溶性肿瘤坏死因子受体(sTNF-R) II 和血管细胞黏附因子(VCAM)-1 呈现显著差异性表达。

2 lncRNA 参与 ROP 的相关研究

lncRNA 在 RNV 形成的细胞增殖、细胞运动以及视网膜血管在视网膜的发育以及视功能的维持中均具有十分重要的作用。但是视网膜无功能血管的生长和消退会伴随缺血性疾病的发生,ROP 主要病理改变为视网膜新生血管的形成,最近一项研究结果表明,生理血管生成和病理新生血管可能遵循不同的路径^[13]。lncRNA 凋亡的过程中均有参与,在炎症免疫调节中发挥重要作用^[14-15]。另外,lncRNA 通过调控 VEGF 的表达而促进 RNV 的形成也是 ROP 的重点研究领域^[16]。

2.1 lncRNA 参与 VEGF 表达的调控 lncRNA 参与 VEGF 信号转导通路的调控已经得到证实,在视网膜内皮细胞上,lncRNA 心肌梗死相关转录本(myocardial infarction-associated transcript,MIAT)可以作为一个竞争性内源 RNA 吸附 miR-150-5p 干预 miR-150-5p 与 VEGF mRNA 的结合,最终实现 VEGF 水平的调节^[9,17]。研究发现,神经纤维网蛋白 1 具有多种功能,在新生血管的形成、轴突导向、细胞存活、迁移及侵袭等功能中均有参与,平滑肌和内皮细胞富集的迁移/分化相关的非编码长链 RNA(smooth muscle and endothelial cell-enriched migration/differentiation-associated long noncoding RNA,SENCR)在脉络膜新生血管表达的实验研究中发现,神经纤维网蛋白 1 是 VEGF 和信号素蛋白 3A 脑信号蛋白所共有的膜结合受体^[11]。在 RNV 患者的房水中检测到 lncRNA-Vax2os1 和 lncRNA-Vax2os2 表达上调,与 VEGF 上调趋势相符合,提示上述 2 种 lncRNA 在 RNV 的形成中发挥的作用与 VEGF 相似。

通过 KEGG Pathway 数据库分析,推测 PI3K-VEGF 信号通路与 ROP 相关^[18],与 CYR61-PI3K/AKT 信号促进 OIR 小鼠 RNV 形成的结论相符^[19]。沉默高半胱氨酸能够有效抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinase/serine threonine kinase,PI3K)信号通路,减少 RNV 的生成。PI3K 抑制 LY294002 通过阻断 PI3K/AKT 信号通路,能够下调视网膜 VEGF 的表达,抑制 RNV 的形成^[20]。在心肌缺血-再灌注过程中,FGF2 可通过激活胞外信号调节激酶 1/2 和 PI3K 信号通路,抑制 FGF2 内质网应激反应和线粒体损伤^[20]。研究显

示,FGF2 与 PI3K 通路相关^[6]。

2.2 lncRNA 参与早产儿视网膜细胞增殖、迁移与凋亡 牛磺酸上调基因 1(taurine up-regulated gene 1,TUG1)是一种剪接的多聚腺苷化 RNA,在发育中的视网膜和大脑以及成人组织中都有表达,参与视网膜发育及光感受器形成^[21],超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)具有清除体内过剩氧自由基的作用,有助于判断生物体抗氧化损伤。研究表明,SOD1 能够对内皮释放一氧化氮的功能进行抑制而达到保护内皮细胞的作用,若细胞内缺乏 SOD1,内皮细胞的正常功能会受到影响,促进凋亡。敲低 lncRNA-TUG1 表达能使 SOD 水平升高,降低人脐静脉内皮细胞凋亡率^[22]。

MAPK 是细胞内信号传递的主要通路,细胞的凋亡与增殖均与其激活物相关,在细胞实验中,MIAT 下调可以显著降低内皮细胞增殖和细胞活性^[23]。在研究 MIAT 表达沉默对体外内皮细胞功能影响的实验中发现,在高氧胁迫时以及低氧胁迫时,MIAT 的表达沉默均能显著降低内皮细胞活力,加速细胞凋亡,明显减少线粒体去极化,明显增加死亡细胞数量^[24]。敲除人肺腺癌转移相关转录本 1(metastasis associated in lung denocarcinoma transcript 1,MALAT1)使磷酸化水平 P38 明显降低,沉默 P39/MAPK 通路,应用 P38/MAPK 通路抑制剂能够阻断 MALAT1 诱导的细胞增殖过程。

midkine(MDK)又称神经轴突生长因子 2,是低分子量肝素结合生长因子的一种,主要参与妊娠中期视黄酸应答反应基因的发育,MDK 对于细胞增殖、迁移以及新生血管的生成均具有促进作用,在评估内皮细胞的迁移、增殖与分化情况时,通常采用纤维细胞与内皮细胞共培养的实验,实验结果表明,Si-MDK 能够显著减少血管的生成。下调 lncRNA-SENCR 后,MDK 的表达显著增强,另外,转染 siRNA 实现干扰 MDK 表达,下调 MDK 的同时,发现 SENCN 的表达明显上调,二者之间呈负相关^[11]。下调 lncRNA-SENCR 能够增加血管内皮细胞的迁移率,促进细胞的增殖,促进形成血管管腔,使毛细血管网的形成加速。

2.3 lncRNA 参与调节早产儿视网膜炎性新生血管的生成 炎症因子对于细胞的迁移以及成管能力具有不同程度的促进作用,在 lncRNA-MIAT 对细胞成管能力影响的实验研究中,MIAT 刺激组与单纯使用炎症因子刺激组相比,刺激细胞的成管能力以及细胞迁移能力明显降低^[23]。在动物实验中,通过下调 MIAT 能够减少 RNV 形成,同时减轻炎症反应和血管渗漏的情况。与正常血管的形成比较,无功能新生血管的生成为视网膜内皮细胞受到环境中细胞因子和炎症因子的刺激而发生增殖和迁移的过程^[9]。另外,lncRNA-MALAT1 能够通过与核因子 κ B(nuclear factor kappa-B,NF- κ B)的相互作用调节脂多糖

诱导的炎症反应。

位于编码同源框转录因子腹前同源框 2 (ventral anterior homeobox 2, Vax2) 基因反义链上的 lncRNA-Vax2os 主要有 5 种亚型。lncRNA-Vax2osl 以及 lncRNA-Vax2os2 在 RNV 形成的模型中呈现出异常表达,在伴有脉络膜新生血管形成的患者房水中也呈现异常表达状态。根据研究结果针对转录因子结合位点行预测检查,发现这 2 种基因亚型以顺式作用元件分别参与 NF- κ B 和转录因子 C-Rel 在细胞迁移、侵袭和血管生成过程中的致炎作用^[25]。

母系印记基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 参与 RNV 的形成,通过实验测定经过氧化损伤处理的内皮细胞中 MEG3 的表达水平,发现其明显下调,通过敲除 MEG3 基因能够使视网膜血管功能出现异常,增加炎症反应及血管的渗漏,敲除 MEG3 促进 RNV 管腔生成,这一过程主要受 PI3K/Akt 信号转导通路调控^[4]。

2.4 lncRNA 参与早产儿视网膜血管内血小板系统的激活 实验证明,在增生型糖尿病视网膜病变患者的玻璃体中 PF4 显著上调^[26]。在近期关于 OIR 模型的蛋白表达谱的研究中发现,在 OIR 小鼠眼内有血小板系统被激活,进一步证明了在 RNV 形成过程中,在受损的血管壁附近,血小板被激活,促进 PF-4 的释放^[12]。另外 PF-4 对于巨噬细胞内 NF- κ B 水平的增加有正向调节作用,促进基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP-9) 的转录。在血管重塑过程中,炎性细胞能够作为血管组织 MMP-9 的重要资源,参与调控^[27-28]。PF-4 所属半胱氨酸基元趋化因子家族,不仅具有阻止促血管生成因子与受体结合形成二聚体的作用,对于 VEGF 和单核细胞趋化蛋白-1 诱导的 MAPK-ERK 通路的活化也有一定的抑制作用,进而抑制新生血管的生成。SELP 为血小板表面黏附分子,激活血小板能使 SELP 表达显著上调,由此推断,SELP 有可能通过促进早期炎症单核细胞浸润而加重缺血,进而诱导 RNV 的生成^[12]。

3 lncRNA 在 ROP 治疗中的应用与发展

ROP 临床治疗主要采取玻璃体内注射抗 VEGF 药物以及视网膜激光光凝治疗,但大多数患者需要长期维持治疗,并且有部分患者对注射抗 VEGF 药物作用不明显。基因治疗已经被引入众多学科中,与其他器官相比,眼部免疫作用比较薄弱,加之 ROP 发生与发展的时间窗比较短,这为基因治疗提供了良好的条件。近期有研究表明,玻璃体内注射 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 拮抗剂 TAK-242 可减少非渗出区域,抑制异常血管生成,并改善 OIR 小鼠视网膜的血管密度,TLR4-MAP4K4 通路可以通过独立于血管内皮生长因子的机制调节视网膜新生血管^[29]。OIR 状态下血小板系统处于激活状态,而

促炎因子表达下调,表明 PF-4 可能成为针对 RNV 的 VEGF 非依赖型治疗策略的新靶点^[12]。此外,lncRNA-SENCR 对血管内皮细胞表型的影响^[11]、lncRNA-MIAT 对 miR-150-5p 的竞争性吸附^[17]、lncRNA-MEG3 调控 VEGFR2 的表达^[30]以及 FGF2 与 PI3K 通路之间的作用关系等都为 RNV 生成的研究提供了新视角。

目前,关于 lncRNA 在 ROP 治疗的研究中,有众多先进的治疗思路,均具有相应的参考价值,多数新靶点的提出皆需要反复实验来验证。深入研究多种基因水平表达的内源性血管生长抑制物,为 ROP 的临床治疗提供最佳治疗方案是十分必要的。

参考文献

- [1] LIANG J H, CHENG Y. Be cautious to treat retinopathy of prematurity with anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2019, 55 (4): 246-249.
- [2] BAI Y C, NIE H J, WEI S J, LU X H, KE X Y, OUYANG X J, et al. Efficacy of intravitreal conbercept injection in the treatment of retinopathy of prematurity [J]. *Br J Ophthalmol*, 2019, 103 (4): 494-498.
- [3] AICH M, CHAKRABORTY D. Role of lncRNAs in stem cell maintenance and differentiation [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 138: 73-112.
- [4] GUI Z Q, WEI T, FU H T, LI C P, LIU B. Long non-coding RNA-MEG3 is involved in diabetes mellitus-related microvascular dysfunction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471 (1): 135-141.
- [5] CHEN W W, YANG S, ZHOU Z L, ZHAO X T, ZHONG J Y, RE-INACH P S, et al. The long noncoding RNA landscape of the mouse eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (14): 6308-6317.
- [6] FANG L, BARBER A J, SHENBERGER J S. Regulation of fibroblast growth factor 2 expression in oxygen-induced retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (1): 207-215.
- [7] HUGHES C P, OFLYNN M J, GATHERER M, MICHELLE E, SCOTT J A, MACLAREN R E, et al. AAV2/8 anti-angiogenic gene therapy using single-chain antibodies inhibits murine choroidal neovascularization [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13 (1): 86-98.
- [8] SMITH L H, WESOLOIUSKI E, ANGELA M K, MCLELLAN A, KOSTYK K, DAMATO R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35 (1): 101-111.
- [9] SHAN K, XIAO Q W, YANG N, HONG Y, MU D Y, CHANG L. Role of long non-coding lA-RNCR3 in athemsclemis-related Vascular dysfunction[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 27 (6): e2248.
- [10] PENG F, WANG Y, WANG Y P, WANG B B, ZHOU X Y, WU S Y, et al. Expression profile of long non-coding RNA in newborn mice with oxygen-induced retinopathy[J]. *Chin J Perinatal Med*, 2018, 21 (1): 48-54.
- [11] LI X, ZHAO F, LI G, LUNA C, ZHOU Q, HE Y Y, et al. Regulation of intraocular pressure by microRNA cluster miR143/145[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 915.
- [12] 漆晨, 韩倩, 薄其玉, 刘勋, 王飞, 张琰, 等. 氧诱导视网膜病变小鼠模型的蛋白表达谱分析[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 12 (4): 1069-1075.
- [13] HEIDUSCHKA P, PLAGEMANN T, LI L, ALEX A F, ETER N. Different effects of various anti-angiogenic treatments in an experimental mouse model of retinopathy of prematurity [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 47 (1): 79-87.
- [14] ILOTT N E, HEWARD J A, ROUX B, TSITSIOU E, FENXICK

- P S, LENZI L, *et al.* Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes [J]. *Nat Commun*, 2014, 5 (3979): 1-13.
- [15] WANG P, XUE Y Q, LIN L, WU C, XU S, JIANG Z P, *et al.* The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation [J]. *Science*, 2014, 344 (6181): 310-313.
- [16] NIEMINEN T, SCOTT T A, LIN F M, CHEN Z, YLA H, MORRIS K V. Long non-coding RNA modulation of VEGF-A during hypoxia [J]. *Non-Coding RNA*, 2018, 4 (34): 1-16.
- [17] YAN B A, YAO J, LIU J Y, LI X M, WANG X Q, LI Y J, *et al.* lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Circ Res*, 2015, 116 (7): 1143-1156.
- [18] CHI H L, WAN Y S, JOHN P, CHEN J. Retinal expression of small non-coding RNAs in a murine model of proliferative retinopathy [J]. *SCI Rep-UK*, 2016, 6: 33947.
- [19] DI Y, ZHANG Y O, NIE Q Z, CHEN X L. CCN1/Cyr61-PI3K/AKT signaling promotes retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36 (6): 1507-1518.
- [20] DI Y, CHEN X L. Inhibition of LY294002 in retinal neovascularization via down-regulation of the PI3K/AKT-VEGF pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11 (8): 1284-1289.
- [21] YOUNG T L, MATSUDA T, CEPKO C L. The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina [J]. *Curr Bio*, 2005, 15 (29): 501-502.
- [22] WU X, ZHENG X, CHENG J, ZHANG K, MA C, CHEN D C, *et al.* lncRNA TUG1 regulates proliferation and apoptosis by regulating miR-148b/IGF2 axis in ox-LDL-stimulated VSMC and HUVEC [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117287.
- [24] JIANG Q, SHAN K, WANG X Q, ZHOU R M, YANG H, LIU C, *et al.* Long non-coding RNA-MIAT promotes neurovascular remodeling in the eye and brain [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (31): 49688-49698.
- [25] LIU P, JIA S, SHI J M, LI W J, TANG L S, ZHU X H, *et al.* lncRNA-MALAT1 promotes neovascularization in diabetic retinopathy through regulating miR-125b/VE-cadherin axis [J]. *Bioscience Rep*, 2019, 39 (5): BSR20181469.
- [26] NAWAZ M I, VANRAEMDONCK K, MOHAMMAD G, KANGAVE D, ABUEL A M. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 109 (1): 67-76.
- [27] PISTOL G C, MARIN D E, ROTAR M C, ROPOTA M. Bioactive compounds from dietary whole grape seed meal improved colonic inflammation via inhibition of maps and NF- κ B signaling in pigs with DSS induced colitis [J]. *J Funct Foods*, 2020, 66: 103708.
- [28] ASANO D, MORITA A, MORI A, SAKAMOTO K, ISHII K, NAKAHARA T. Involvement of matrix metalloproteinases in capillary degeneration following NMDA-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 182: 101-108.
- [29] CEHN W W, ZHANG J, ZHANG P J, HU F Y, JIANG T T, GU J X, *et al.* Role of TLR4-MAP4K4 signaling pathway in models of oxygen-induced retinopathy [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (3): 3451-3464.
- [30] RUAN W C, ZHAO F, ZHAO S Y, ZHANG L Y, SHI L, PANG T. Knockdown of long noncoding RNA MEG3 impairs VEGF-stimulated endothelial sprouting angiogenesis via modulating VEGFR2 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Gene*, 2018, 649 (1): 32-39.

Research progress of long non-coding RNA in retinopathy of prematurity

WANG Yue, WANG Xue, DI Yu

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110134, Liaoning Province, China

Corresponding author: DI Yu, E-mail: diyu81@126.com

[Abstract] With the continuous improvement of perinatal medicine, there is a significant rise in premature infant survival rate. In addition to the implement of two-child policy and the advancement of assisted reproductive technology, the proportion of elderly parturient and multiple pregnancy has relatively increased. Retinopathy of prematurity, as a common hypoxic disease of premature infants, also presents a high incidence trend. Currently, it has been generally believed that ischemia and hypoxia are the basic pathogenesis of premature infants, but the mechanism of its generative and developmental mechanism still needs to be studied further. Related research on long non-coding RNA provides a new direction for that. In recent years, a number of experimental researches on long non-coding RNA in premature retinopathy and other retinal neovascular diseases have been carried out. The purpose of this paper is to review the expression and regulation of lncRNA, and its influence in the occurrence and development of ROP, which will provide theoretical basis for clinical control and treatment of ROP.

[Key words] long non-coding RNA; retinopathy of prematurity; vascular endothelial growth factor; retinal neovascularization