

眼科疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001629

miR-142通过上调 AKT2 的表达促进角膜新生血管形成

沈 厉¹,周善璧¹,毛旂旒²,林天兰³,岑 超⁴,胡 雁¹,侯胜平³

(1. 重庆医科大学附属大学城医院眼科,重庆 401331;2. 成都市第六人民医院眼科,成都 610051;

3. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;4. 重庆市妇幼保健院眼科,重庆 400013)

【摘要】目的:研究 microRNA142(miR-142)对角膜新生血管形成的影响及其相关机制。**方法:**实验设置空白对照组、阴性对照组、过表达 miR-142 组以及干扰 miR-142 组,分别利用 miR-142 模拟物(mimic)和抑制物(inhibitor)过表达和干扰 miR-142;CCK-8 增殖实验检测 miR-142 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)增殖能力的影响;双荧光素酶报告基因验证 AKT2 是否为 miR-142 的直接靶基因;RT-PCR 和 Western blot 实验检测 miR-142 对 AKT2 表达水平的影响。**结果:**CCK-8 增殖实验结果显示空白对照组、阴性对照组和过表达 miR-142 组 96 h 的吸光度(absorbance,A)均值分别为 872.21 ± 44.20 、 842.16 ± 49.54 和 $1\ 407.91 \pm 16.58$,差异具有统计学意义($F=102.8$, $P=0.000$)。干扰 miR-142 后 HUVECs 增殖能力明显减弱(空白对照组= 919.69 ± 25.46 ,阴性对照组= 856.76 ± 36.22 ,干扰 miR-142 组= 602.77 ± 25.62 ; $F=72.8$, $P=0.000$)。双荧光素酶报告基因结果发现过表达 miR-142 后 AKT2 表达水平没有明显变化(对照组=0.36,过表达 miR-142 组=0.46, $P=0.147$)。RT-PCR 结果显示过表达 miR-142(0.408 ± 0.046)后 AKT2 表达水平较阴性对照组(0.173 ± 0.022)升高($P=0.018$),干扰 miR-142 组(0.16 ± 0.02)较阴性对照组(0.362 ± 0.068)明显降低($P=0.037$),差异均具有统计学意义。Western blot 实验进一步验证了 miR-142 对 AKT2 基因的调控作用。进一步研究发现,shRNA 干扰 AKT2 后 miR-142 促进 HUVECs 增殖的作用消失,对照组、过表达 miR-142 组、过表达 miR-142+shRNA-AKT2 组和 shRNA-AKT2 组的 96 h 吸光度值分别为 981.80 ± 75.40 、 $1\ 357.81 \pm 47.56$ 、 806.39 ± 49.70 和 921.59 ± 40.38 ,差异具有统计学意义($F=40.97$, $P=0.000$)。**结论:**miR-142 通过上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖,从而促进角膜新生血管形成。

【关键词】角膜新生血管;人脐静脉内皮细胞;miR-142;AKT2**【中图分类号】**R772.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-08-01

miR-142 promotes corneal neovascularization formation via up-regulating AKT2

Shen Li¹,Zhou Shanbi¹,Mao Yini²,Lin Tianlan³,Cen Chao⁴,Hu Yan¹,Hou Shengping³

(1. Department of Ophthalmology, University-town Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Ophthalmology, The Sixth People's Hospital of Chengdu; 3. Department of Ophthalmology,

The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 4. Department of Ophthalmology,

Chongqing Health Center For Women and Children)

【Abstract】Objective:To study the impact of miR-142 on corneal neovascularization formation and related mechanism. **Methods:**Control group,negative group,overexpression miR-142 group and knockdown miR-142 group were arranged. Mimic and inhibitor of miR-142 were used to overexpress or knock down miR-142,respectively. CCK-8 proliferation assay was performed to evaluate the impact of miR-142 on proliferative ability of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs). Dual-luciferase reporter gene system was used to verify whether AKT2 is the target of miR-142. RT-PCR and Western blot were used to detect effect of miR-142 on AKT2. **Results:**Results of CCK8 assay showed that absorbance(A) of control group,negative group and overexpression miR-142 group was 872.21 ± 44.20 , 842.16 ± 49.54 , $1\ 407.91 \pm 16.58$,and the results had statistical significances($F=102.8$, $P=0.000$). Knockdown miR-142 significantly weakened the proliferation rate of HUVECs(control group= 919.69 ± 25.46 ,negative group= 943.43 ± 40.53 ,knockdown miR-142 group= 602.77 ± 25.62 , $F=72.8$, $P=0.000$). Consequence of dual-luciferase report gene

作者介绍:沈 厉,Email:1170300158@qq.com,

研究方向:角膜疾病。

通信作者:周善璧,Email:1021159084@qq.com。

基金项目:重庆市医学科研计划资助项目(编号:2013-1-033)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180409.1309.002.html

(2018-04-09)

system indicated that AKT2 wasn't the target of miR-142 (control group=0.36, overexpressed miR-142 group=0.46, $P=0.147$). RT-PCR assay revealed that expression level of AKT2 was upregulated by overexpressing miR-142 (0.408 ± 0.046) than negative group (0.173 ± 0.022) ($P=0.018$); inhibition of miR-142 blocked the expression of AKT2 (negative group= 0.362 ± 0.068 , down-regulated miR-142 group= 0.160 ± 0.019 , $P=0.037$). Western blot assay verified the regulation of miR-142 on AKT2. Further study showed that the facilitation of miR-142 on proliferation of HUVECs was thoroughly blocked by shRNA-AKT2, results of control, overexpressed miR-142, overexpressed miR-142+shRNA-AKT2 and shRNA-142 were 981.80 ± 75.40 , $1\ 357.81 \pm 47.56$, 806.39 ± 49.70 , 921.59 ± 40.38 , respectively, and the results had statistical significances ($F=40.97$, $P=0.000$). **Conclusion:** miR-142 facilitates the proliferation of HUVECs via up-regulating AKT2, suggesting that miR-142 could promote the formation of corneal neovascularization. [Key words] cornea neovascularization; human umbilical vein endothelial cells; miR-142; AKT2

角膜新生血管(corneal neovascularization, CRNV)是各种疾病导致视力障碍的主要原因,包括角膜炎、角膜化学烧伤、角膜移植排斥反应等。尽管早期角膜新生血管对角膜炎症、创伤等有积极作用,但是后期角膜新生血管形成降低角膜透明度,严重影响视功能。但是,目前角膜新生血管形成的机制仍不清楚,同时也没有有效的治疗方法能够治愈角膜新生血管形成。MicroRNA(miRNA)即微小非编码RNA,其在转录水平或者蛋白质翻译中调控基因的表达。越来越多的研究证明 miRNAs 对细胞功能的维持至关重要,多项研究报道 miRNAs 参与了细胞增殖^[1]、凋亡^[2]、维持干细胞分化^[3]、肿瘤细胞的侵袭迁移^[4]等多个过程。近年的研究也发现 miRNAs 参与了眼部疾病的发生发展^[5-6],但是 miRNAs 对角膜新生血管形成的影响仍较少^[7]。本课题组前期研究发现,miR-142 在大鼠角膜缘新生血管模型中差异表达显著且与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路密切相关^[8],通过生物信息技术预测出 microRNA-VEGF 靶基因 AKT2。新近的研究报道,miR-142 可通过下调 ADAMTS-1(VEGF 抑制体)的表达促进内皮起始细胞增殖,从而促进血管生成^[9]。因此,结合本课题组前期研究以及 miR-142 的相关研究报道,设想 miR-142 能否通过调控内皮细胞的增殖影响角膜缘新生血管形成。

内皮细胞的功能是维持血管系统稳定的基础^[10]。内皮细胞也可作为血流介导的信号传导的主要传感器。在这些研究的基础上,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)已经作为常用体外模拟血管生成的模型。这些细胞在一定条件的刺激下能增殖形成管样毛细血管结构^[11]。

并且大量研究已经证明 HUVECs 可以作为体外模拟角膜新生血管的模型^[7,12]。

此次研究利用 HUVECs 模拟体外角膜新生血管,研究 miR-142 对 HUVECs 增殖能力的影响,初步探讨相关机制。此次研究通过过表达和干扰 miR-142,在体外研究其对角膜新生血管的影响,初步探讨 miR-142 调控 HUVECs 增殖的分子机制,为 microRNAs 在角膜新生血管疾病的研究提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1640 培养基、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶购自 Gibco 公司;GAPDH antibody、AKT2 antibody 购自 Santa Cruz 公司;细胞裂解液购于 Thermo Fish 公司;Western blot ECL 试剂盒购自 Bio-Rad 公司;Trizol 试剂、反转录试剂盒以及实时荧光定量 PCR 盒购自 Takara 公司;双荧光素酶试剂盒购自 Promega 公司。细胞培养孵育箱、高速离心机、倒置显微镜、Western blot 显影仪等实验室相关仪器分别购于 Thermo、Olympus 和 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs 购自美国 ATCC 细胞库(ATCC Product No.CRL-1730TM)。HUVECs 体外血管模型的建立:用含 10%的胎牛血清(FBS)的 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞每天更换 1 次培养基,定期传代培养。

1.2.2 转染 利用体外脂质体法将 miR-142 mimics 及 inhibitors 转染进 HUVECs 稳定培养。转染时细胞分为 3 组:即空白对照组(无转染试剂)、阴性对照组(由于干扰和过表达 miR-142 载体不一样,因此分别设定阴性对照组)、过表达 miR-142 组和干扰 miR-142 组。转染 24~72 h 后,待 miR-142 稳定表达再进行细胞生物学功能检测和基因蛋白功能检测。

1.2.3 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力 为了检测 miR-

142对 HUVECs 增殖能力的影响,将 HUVECs 按实验设定分组处理,采用 CCK-8 试剂盒分别检测各组细胞增殖情况。首先按照实验分组,将细胞(1×10^3)种植于 96 孔板,每组 3 个复孔,并将其置于 37°C 、5% CO_2 孵箱。24 h 后每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 含 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 试剂的 1640 培养基,并于细胞培养箱中孵育 2 h,然后用酶联免疫分析仪测定在 $450\ \text{nm}$ 处的吸光度 (absorbance, A) 值,实验分别测定 24、48、72、96 h 的 A 值,然后进行统计学分析。

1.2.4 双荧光素酶报告基因 将 miR-142 RNA oligo、报告基因 AKT2 和海参荧光素载体 (Renilla) 共转染于 HEK293 细胞中,待转染并培养 48 h 后提取细胞蛋白,测定各组中荧光素酶活性并进行分析。实验至少重复 3 次。

1.2.5 qRT-PCR 细胞总 RNA 提取方法根据 Trizol 试剂说明书进行操作,Trizol 提取细胞总 RNA,检测样本浓度、纯度以及完整性,然后为 cDNA。应用 Bio-Rad PCR 扩增仪进行 qRT-PCR 检测, $10\ \mu\text{L}$ 反应体系: $5\ \mu\text{L}$ SYBR Green+ $3.4\ \mu\text{L}$ DEPCs 水+ $0.8\ \mu\text{L}$ cDNA+ $0.4\ \mu\text{L}$ 前引物+ $0.4\ \mu\text{L}$ 后引物。PCR 扩增条件: 95°C 解链 30 s, 60°C 退火 10 s, 72°C 延伸 30 s,总共 40 个循环。引物序列:AKT2 上游:TCAAGATCACTGAC-TTTGGCC;下游:GCCCGCCATAGTCATTGTCC;GAPDH 上游:TGCCACTCAGAAGA-CTGTGG;下游:TTCAGCTCTGGG-ATGACCTT。采用 BioRad 公司的 CFX Manager 软件进行数据分析。

1.2.6 Western blot 检测相关信号通路蛋白表达水平 提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白样品浓度。将蛋白样品于 10%SDS-PAGE 凝胶充分电泳,电泳结束后进行转膜,5%脱脂牛奶中封闭 2 h,然后将第一抗体稀释滴加于 NC 膜上,在 4°C 冰箱中孵育过夜。第一抗体按如下比例稀释:GAPDH (1:1 000),AKT2 (1:800)。待第一抗体孵育结束后,用 PBS 洗涤 NC 膜,然后将相应的辣根过氧化物标记的第二抗体按照

1:5 000 的比例稀释并滴加于 NC 膜,室温 2 h。第二抗体孵育结束后,PBS 洗涤,配制显影液,采用凝胶图像分析软件 IPP (Image Pro Plus 6.0) 进行吸光度值分析。

1.2.7 转染 运用 RNAi 软件 (Mekentosj) 设计特异性干扰 AKT2 表达的 shRNA,并将设计的 shRNA 序列插入 pLKO.1 载体 (Addgene, plasmid 10878)。待转染并培养 3 d 后,利用 Western blot 实验检测干扰效率。ShRNA 序列如下:Scramble-shRNA:5'-CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGA-GAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTGG-3';AKT2-shRNA:5'-CCGGCCCTTAAACAACCTTCTCCGTACTCGAGTACGGAG-AAGTTGTTTAAGGGTTTTTGG-3'。

1.3 统计学分析

所有实验结果均采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差表示。miR-142 对 HUVECs 增殖能力的作用采用重复测量方差分析,miR-142 对 AKT2 基因的调控采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 miR-142 促进 HUVECs 增殖

首先,为了研究 miR-142 对 HUVECs 增殖能力的影响,通过构建 miR-142 mimic 及 inhibitor 分别过表达和干扰 HUVECs 中 miR-142,将实验分为空白对照组、阴性对照组、过表达 miR-142 组和干扰 miR-142 组,并于 24、48、72、96 h 测定 A 值 (表 1, 表 2)。过表达 miR-142 后 HUVECs 增殖能力明显高于空白对照组 (图 1A, $P=0.000$),同时阴性对照组与空白对照组没有统计学差异 (图 1A, $P=0.596$)。相反,干扰 miR-142 后,细胞增殖能力较空白对照组降低 (图 1B, $P=0.000$)。以上数据表明,miR-142 可以促进 HUVECs 的增殖。

表 1 过表达 miR-142 对 HUVECs 增殖能力的影响

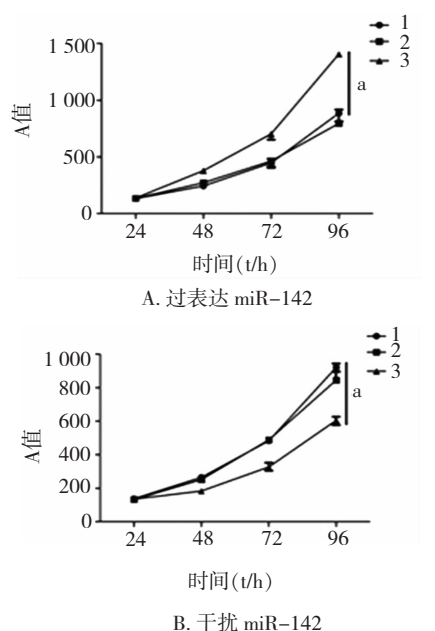
组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	134.76 ± 2.84	248.63 ± 12.94	448.65 ± 28.47	872.21 ± 44.20
阴性对照组	135.42 ± 3.50^c	267.41 ± 9.40^c	448.46 ± 32.51^c	842.16 ± 49.54^c
过表达 miR-142 组	138.93 ± 1.86^{ab}	377.35 ± 23.58^{ab}	692.97 ± 36.97^{ab}	1407.91 ± 16.58^{ab}

注: $F_{\text{组别}}=219.700$, $P_{\text{组别}}=0.000$; $F_{\text{时间}}=2\ 216.000$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{组别} \times \text{时间}}=102.800$, $P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.000$; a: 过表达 miR-142 组与空白对照组相比 $P < 0.001$; b: 过表达 miR-142 与阴性对照组相比 $P < 0.001$; c: 空白对照组与阴性对照组相比 $P > 0.05$

表 2 干扰 miR-142 对 HUVECs 增殖能力的影响

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	137.31 ± 2.25	264.85 ± 6.32	486.75 ± 9.54	919.69 ± 25.46
阴性对照组	133.86 ± 3.82^c	253.87 ± 5.62^c	486.07 ± 7.13^c	943.43 ± 40.53^c
干扰 miR-142 组	136.50 ± 2.17^{ab}	183.36 ± 12.97^{ab}	328.15 ± 24.36^{ab}	602.77 ± 25.62^{ab}

注: $F_{\text{组别}}=123.400$, $P_{\text{组别}}=0.000$; $F_{\text{时间}}=3\ 497.000$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{组别} \times \text{时间}}=72.110$, $P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.000$; a: 干扰 miR-142 组与空白对照组相比 $P < 0.001$; b: 干扰 miR-142 与阴性对照组相比 $P < 0.001$; c: 空白对照组与阴性对照组相比 $P > 0.05$



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:实验组

a:过表达 miR-142 组与空白对照组和阴性对照组相比,有统计学差异, $P < 0.001$

图 1 miR-142 促进 HUVECs 增殖

2.2 miR-142 促进 HUVECs 中 AKT2 的表达

为了研究 miR-142 调控 HUVECs 增殖的分子机制,通过生物信息学技术预测发现 miR-142 与 AKT2 关系密切。首先利用双荧光素酶报告基因系统验证 AKT2 是否是 miR-142 直接靶基因,检测结果(表 3)发现过表达 miR-142 后 AKT2 的荧光素酶活性没有明显变化(对照组=0.36,过表达 miR-142 组=0.46, $P=0.147$)。因此推测 AKT2 不是 miR-142 的直接靶基因。利用 RT-PCR 进一步研究发现,干扰 miR-142 后 AKT2 表达水平明显降低(阴性对照组=0.362 ± 0.068,干扰 miR-142 组=0.160 ± 0.019;图 2A, $P=0.037$),过表达 miR-142

后 AKT2 表达水平升高(阴性对照组=0.173 ± 0.022,过表达 miR-142 组=0.408 ± 0.046;图 2B, $P=0.018$),实验结果具有统计学意义。Western blot 进一步验证了 miR-142 对 HUVECs 中 AKT2 表达的影响。干扰 miR-142 组中 AKT2 水平较空白对照组和阴性对照组降低(图 2C);过表达 miR-142 后 AKT2 蛋白水平升高,同时阴性对照组中 AKT2 表达水平和空白对照组没有明显差异(图 2D)。因此课题组推断 miR-142 可能是通过上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖。

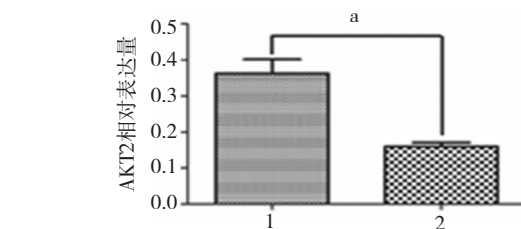
表 3 AKT2 在各组中相对表达量

组别	AKT2 相对表达量	t 值	P 值
阴性对照组	0.362 ± 0.068	5.075	0.037
干扰 miR-142	0.160 ± 0.019 ^a		
阴性对照组	0.173 ± 0.022	7.339	0.018
过表达 miR-142	0.408 ± 0.046 ^b		

注:a:干扰 miR-142 组与阴性对照组相比 $P < 0.05$;b:过表达 miR-142 组与阴性对照组相比 $P < 0.05$

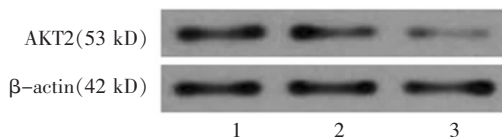
2.3 miR-142 通过上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖

为了进一步验证 AKT2 在 miR-142 调控 HUVECs 增殖过程中的重要性,通过构建 shRNA 干扰 HUVECs 中 AKT2,观察 miR-142 对 HUVECs 增殖的影响。首先,shRNA 干扰 AKT2 后 miR-142 对 HUVECs 中 AKT2 基因的调控作用减弱(图 3A)。CCK-8 增殖实验结果显示,对照组、过表达 miR-142 组、过表达 miR-142+shRNA-AKT2 组和 shRNA-AKT2 组的 96 h 的 A 值分别为 981.80 ± 75.40 、 1357.81 ± 47.56 、 806.39 ± 49.70 和 921.59 ± 40.38 ,差异具有统计学意义($P=0.000$)。过表达 miR-142 后 HUVECs 增殖能力明显增强(图 3B, $P=0.000$),shRNA 干扰 AKT2 后 HUVECs 增殖能力明显减弱(图 3B, $P=0.000$),而 shRNA 干扰 AKT2 组与对照组间没有统计学差异(图 3B, $P=0.157$)。具体数据见表 4。综合以上结果推断,miR-142 通过上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖。



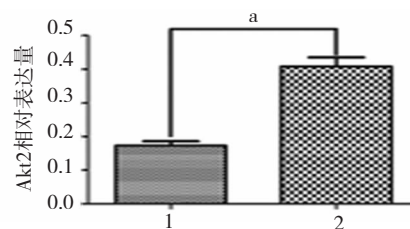
a:干扰 miR-142 组与阴性对照组相比有统计学差异, $P < 0.05$

A. 干扰 miR-142 对 AKT2 mRNA 水平的影响



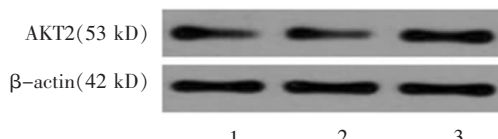
1:空白对照组;2:阴性对照组;3:干扰 miR-142 组

C. 干扰 miR-142 对 AKT2 蛋白水平的影响



a:干扰 miR-142 组与阴性对照组相比有统计学差异, $P < 0.05$

B. 过表达 miR-142 对 AKT2 mRNA 水平的影响



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:过表达 miR-142 组

D. 过表达 miR-142 对 AKT2 蛋白水平的影响

图 2 miR-142 对 AKT2 在 HUVECs 中表达水平的影响

表 4 检测各组各个时间点 HUVECs 的 A 值

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	135.54 ± 4.41	273.60 ± 19.00	510.32 ± 28.72	981.80 ± 75.40
过表达 miR-142	134.64 ± 4.50 ^a	354.37 ± 23.33 ^a	743.37 ± 23.37 ^a	1357.81 ± 47.56 ^a
过表达 miR-142+ 干扰 AKT2	134.34 ± 3.85 ^b	243.66 ± 14.19 ^b	435.74 ± 22.61 ^b	806.39 ± 49.70 ^b
干扰 AKT2	138.09 ± 2.88 ^c	262.90 ± 9.18 ^c	489.95 ± 23.32 ^c	921.59 ± 40.38 ^c

注: $F_{\text{组别}}=127.000$, $P_{\text{组别}}=0.000$; $F_{\text{时间}}=1\ 895.000$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{组别} \times \text{时间}}=40.970$, $P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.000$; a: 过表达 miR-142 组与阴性对照组相比 $P < 0.001$; b: 过表达 miR-142 与过表达 miR-142+ 干扰 AKT2 组相比 $P < 0.001$; c: 干扰 AKT2 组与阴性对照组相比 $P > 0.05$

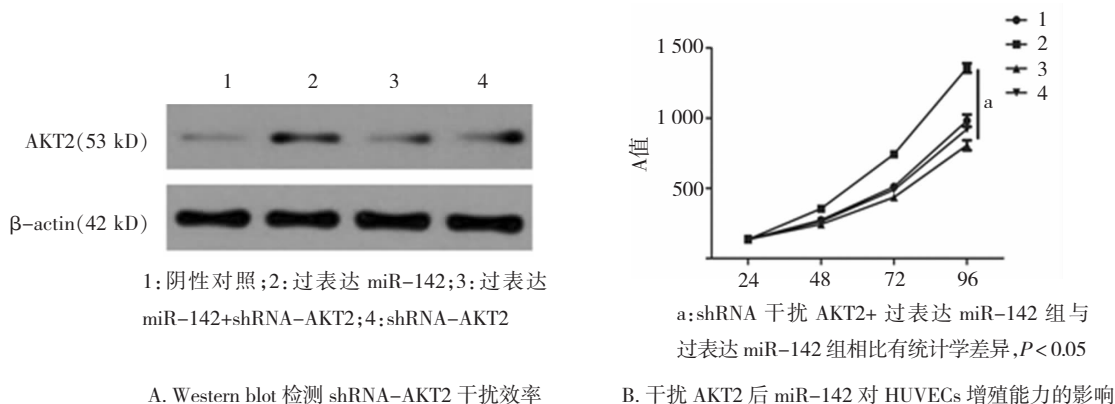


图 3 miR-142 通过上调 AKT2 促进 HUVECs 增殖

3 讨论

MicroRNAs 作为细胞内源性小 RNA, 主要在转录或翻译水平调节基因的表达。近年来, microRNA 在眼部疾病中的作用也逐渐被人们报道^[13-14]。本课题组前期研究发现, miR-142 在大鼠角膜新生血管动物模型中表达差异显著, 但 miR-142 对角膜新生血管形成的具体作用以及相关机制还不明确。此次研究利用 HUVECs 在体外模拟角膜新生血管形成, 发现过表达 miR-142 对 HUVECs 的增殖能力有明显促进作用, 而 AKT2 在此过程中扮演了重要的角色, 过表达 miR-142 通过上调 HUVECs 中 AKT2 的表达促进 HUVECs 的增殖。因此, 本课题组推断 miR-142 可能是通过调控 AKT2 的表达水平影响角膜新生血管。

miR-142 作为微小 RNA 家族中的一员, 已经被报道参与调控多种细胞功能, 包括细胞增殖^[15]、肿瘤细胞侵袭和转移^[16]、血管生成^[9]等。有研究报道 miR-142 通过调控其靶基因 SOCS1 延长 STAT6 信号通路的激活, 从而促进慢性炎症中巨噬细胞调控的纤维化^[17]; 此外, miR-142 通过抑制巨噬细胞分化

调控恶性肿瘤相关的免疫抑制^[18]。新近的研究发现, miR-142 在角膜损伤、碱烧伤^[19]以及角膜炎症^[20]模型中差异表达, 本课题组前期研究已经发现 miR-142 在大鼠角膜新生血管模型中表达差异明显。但是, miR-142 在角膜新生血管形成中的具体作用还不明确。此次研究发现, 过表达 miR-142 能够促进 HUVECs 增殖, 同时相关研究报道发现 miR-142 能够通过上调 eNOS 的表达促进血管内皮细胞增殖^[9]。因此, 本研究结果可以推断 miR-142 能够促进角膜新生血管形成。

为了进一步研究 miR-142 调控角膜新生血管形成的机制, 通过生物信息学技术分析预测发现 AKT2 可能是 miR-142 调控的下游靶基因。本研究结果发现过表达 miR-142 不能减弱 HUVECs 中 AKT2 的荧光强度, 因此 AKT2 可能不是 miR-142 的直接靶基因, 但是过表达 miR-142 后能够上调 HUVECs 中 AKT2 的表达, 并且干扰 AKT2 后, miR-142 对 HUVECs 增殖的影响减弱。有研究报道, AKT2 能够促进肺癌组织中的血管形成^[21]; miR-124 能够通过上调 AKT2 促进乳腺癌组织中的血管形成^[22]。同时, HUVECs 作为常规的在体外模拟角膜新生血管形成的模型, 因此推断 miR-142 可能是通过

上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖,从而促进角膜血管新生形成。

综上所述,此次研究利用 HUVECs 在体外模拟角膜新生血管形成,研究 miR-142 对角膜新生血管的影响,结果发现 miR-142 通过上调 AKT2 的表达促进 HUVECs 增殖。因此,根据本研究结果可以推断 miR-142 可能通过上调 AKT2 的表达促进角膜新生血管形成。此次研究在体外验证了 miR-142 对角膜新生血管形成的影响,并初步探讨了相关的分子机制,为临床预防和阻止角膜新生血管形成相关疾病提供了新的线索。

参 考 文 献

- [1] Shenoy A, Belloch RH. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(9):565-576.
- [2] Xu J, Wang Y, Tan X, et al. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis[J]. *Autophagy*, 2012, 8(6):873-882.
- [3] Ran X, Xiao CH, Xiang GM, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and differentiation by microRNAs[J]. *Cell Reprogram*, 2017, 19(3):150-158.
- [4] Wang X, Liang Z, Xu X, et al. miR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12):e2503.
- [5] Kulkarni M, Leszczynska A, Wei G, et al. Genome-wide analysis suggests a differential microRNA signature associated with normal and diabetic human corneal limbus[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3448.
- [6] Xu S. MicroRNA expression in the eyes and their significance in relation to functions[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28(2):87-116.
- [7] Zong R, Zhou T, Lin Z, et al. Down-regulation of microRNA-184 is associated with corneal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(3):1398-1407.
- [8] 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(8):1090-1094.
- [9] Zhang HW, Li H, Yan H, et al. MicroRNA-142 promotes the expression of eNOS in human peripheral blood-derived endothelial progenitor cells in vitro [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(19):4167-4175.
- [10] Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(4):581-588.
- [11] Matsui J, Wakabayashi T, Asada M, et al. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18):18600-18607.
- [12] Bian F, Zhang MC, Zhu Y. Inhibitory effect of curcumin on corneal neovascularization in vitro and in vivo[J]. *Ophthalmologica*, 2008, 222(3):178-186.
- [13] Hackler L Jr, Wan J, Swaroop A, et al. MicroRNA profile of the developing mouse retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(4):1823-1831.
- [14] Yue Y, He SZ. MicroRNA and progresses in the region of ophthalmology[J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2009, 45(3):280-284.
- [15] Tu M, Tang J, He H, et al. MiR-142-5p promotes bone repair by maintaining osteoblast activity[J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(3):255-264.
- [16] Liu L, Liu S, Duan Q, et al. MicroRNA-142-5p promotes cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting BTG3[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(5):2394-2402.
- [17] Su S, Zhao Q, He C, et al. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8523.
- [18] Sonda N, Simonato F, Peranzoni E, et al. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis[J]. *Immunity*, 2013, 38(6):1236-1249.
- [19] Zhang Y, Zhang T, Ma X, et al. Subconjunctival injection of antagomir-21 alleviates corneal neovascularization in a mouse model of alkali-burned cornea[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7):11797-11808.
- [20] Boomiraj H, Mohankumar V, Lalitha P, et al. Human corneal microRNA expression profile in fungal keratitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(13):7939-7946.
- [21] Attoub S, Arafat K, Hammadi NK, et al. Akt2 knock-down reveals its contribution to human lung cancer cell proliferation, growth, motility, invasion and endothelial cell tube formation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12759.
- [22] Jiang CF, Li DM, Shi ZM, et al. Estrogen regulates miRNA expression: implication of estrogen receptor and miR-124/AKT2 in tumor growth and angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24):36940-36955.

(责任编辑:冉明会)