DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909141

MiR-200b 通过调控 PIK3CA/AKT 通路抑制大鼠角膜血管新生

李 雪[1],曹 浪[1],甘 敏[1],周善璧[2] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆市眼科重点实验室[1];401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院眼科[2]

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-200b(miR-200b)在大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)形成中的作用及其调节机制。**方法** 24 只雌性 SD 大鼠采用一眼经缝线法构建 CNV 模型(实验组),另一眼作为正常对照组,于裂隙灯下观察建模后第 4、7、14 天角膜新生血管情况,采用 HE 染色观察角膜组织结构改变及炎性细胞浸润情况,RT-PCR 检测造模后第 14 天各组大鼠角膜组织中 miR-200b 以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。利用脂质体转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),分为 miR-200b 模拟物(miR-200b mimic)组、阴性对照(miR-NC)组、空白对照(CON)组,利用 RT-PCR 验证转染效果,分别采用 CCK-8 检测 HUVECs 增殖能力,划痕实验检测 HUVECs 迁移能力,Matrigel 胶成管实验检测 HUVECs 管腔形成能力。并通过 Western blot 检测 VEGF 及 PIK3CA、AKT 蛋白的表达。**结果** 成功构建大鼠 CNV 模型,HE 染色显示与正常组相比,缝线后第 4、7、14 天,大鼠角膜组织排列紊乱,炎性细胞浸润逐渐加重($P<0.05$),RT-PCR 结果显示缝线后第 14 天角膜组织中 miR-200b 表达明显降低,而 VEGF 表达明显升高($P<0.01$)。与 CON 组和 miR-NC 组相比, miR-200b mimic 组中 miR-200b 相对表达量显著升高($P<0.01$),而增殖、迁移及管腔形成能力显著下降($P<0.05$),转染 miR-200b mimic 后,HUVECs 中 VEGF、PIK3CA、p-AKT 蛋白表达均明显下降($P<0.05$)。**结论** miRNA-200b 可显著抑制 HUVECs 的增殖、迁移及成管能力,可能通过抑制 PIK3CA/AKT 通路参与 CNV 的发生和发展。

[关键词] 角膜新生血管;miR-200b;PIK3CA/AKT 通路;人脐静脉内皮细胞
[中图法分类号] R394.6;R364.33;R772.2 [文献标志码] A

MiR-200b inhibits corneal angiogenesis in rats by regulating PIK3CA/AKT pathway

LI Xue[1], CAO Lang[1], GAN Min[1], ZHOU Shanbi[2] [1]Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing, 400016; [2]Department of Ophthalmology, University Town Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of microRNA-200b (miR-200b) in corneal neovascularization (CNV) in rats and explore the possible mechanisms. **Methods** Twenty-four female SD rats were subjected to corneal suture to induce CNV in one eye, with the other eye as the normal control. On the 4th, 7th and 14th days after the suture, CNV was observed under a slit lamp, and the structure and inflammatory cell infiltration in the corneal tissue were observed using HE staining. On day 14 after the suture, the expression levels of miR-200b and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in the cornea were detected using qRT-PCR. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected *via* liposome with a miR-200b mimic or a negative control sequence (miR-NC), and the cell proliferation, migration and tube formation abilities were evaluated using CCK-8 assay, Transwell chamber assay and Matrigel assay, respectively. The expression levels of VEGF and PIK3CA/AKT proteins in the cells were detected by Western blotting. **Results** CNV models were successfully established by corneal suture in the

[基金项目] 重庆市医学科研计划资助项目(2013-1-033)
[通信作者] 周善璧,E-mail:zhoushanbi@aliyun.com

rats. HE staining showed that corneal suture resulted in disordered alignment of the corneal tissue and progressively increased inflammatory cell infiltration on days 4, 7 and 14 after the suture ($P<0.05$). RT-PCR showed that miR-200b expression decreased and VEGF expression increased significantly in the corneal tissue on day 14 after the suture ($P<0.01$). Compared with the cells without transfection or transfected with miR-NC, the HUVECs transfected with the miR-200b mimic exhibited significantly attenuated proliferation, migration and lumen formation abilities ($P<0.05$) with also significantly lowered expression of VEGF, PIK3CA and p-AKT proteins ($P<0.05$). **Conclusion** miRNA-200b can significantly inhibit the proliferation, migration and tube formation of HUVECs, and may participate in the occurrence and development of CNV by inhibiting the PIK3CA/AKT pathway.

[**Key words**] corneal neovascularization; miR-200b; PIK3CA/AKT pathway; human umbilical vein endothelial cells

Supported by the Project of Chongqing Medical Research(2013-1-033). Corresponding author: ZHOU Shanbi, E-mail: zhoushanbi@aliyun.com

正常角膜处于无血管状态,角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)由内皮细胞、周细胞和基底膜构成,是在炎症、感染和外伤等条件下引起的严重并发症,也是角膜移植成功与否和术后发生排斥反应的关键因素[1]。miRNAs 是一类非编码小分子 RNA,通过与其靶 mRNAs 3′非编码区结合后,抑制 mRNA 翻译或促进其降解,从而影响靶基因的表达,调节多种生物过程。血管新生是一个由多种促血管 miRNAs 和抗血管 miRNAs 共同作用,引起血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)异常表达的复杂过程,研究表明,miRNAs 通过靶向 VEGF 调节肿瘤血管生成[2]。此外,也通过调控微血管内皮细胞增殖、迁移以及管腔形成,从而促进或者抑制血管反应[3-4]。MiRNA-200 家族包括 5 个成员(miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-141, miRNA-429),其中 miR-200b 在不同肿瘤组织中表达异常,通过转录后调节蛋白质的表达以及细胞信号传导,影响肿瘤的增殖、凋亡、侵袭过程[5-8],但其在角膜新生血管形成中的作用和机制鲜有报道。

本课题组之前采用缝线法建立 SD 大鼠 CNV 模型,对正常和缝线后角膜进行表达谱微阵列分析,发现 miR-200b 差异表达显著[9],提示 miR-200b 可能是影响大鼠 CNV 形成的重要调控因子。因此,进一步了解 miR-200b 在大鼠 CNV 中的表达及作用机制,可能为 CNV 的临床治疗提供新的方向和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 24 只健康、雌性、体质量 180~220 g 的成年 SD 大鼠,饲养于重庆医科大学实验动物中心,实验前均需排除角膜新生血管、前房穿孔、出血、晶状体虹膜损伤等疾患。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)从莱博斯生物技术有限公司购买。

1.1.2 主要试剂与仪器 miRNA-200b mimic、miR-200b NC 购自上海吉玛公司;RNAiso Plus、Mir-X miRNA First Strand Synthesis、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 及 SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ购自 TaKaRa 公司;RPMI1640 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司;CCK-8 试剂盒购自美国 Bryotime 公司,Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;BCA 试剂盒购自碧云天公司;兔抗人单克隆抗体 PI3KCA、AKT、p-AKT 购自英国 Abcam 公司;VEGF 及二抗购自美国 Proteintech 公司。主要仪器:酶联免疫检测仪(Thermo 公司, 美国), Real-time RT-PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型制作 24 只 SD 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠注射液(0.2 mL/100 g)进行麻醉,选取一眼作为实验组,滴 0.04%盐酸奥布卡因眼液后,参照毛旖旎等[9]构建模型的方法诱导 CNV,另一眼(对照组)不作处理。术后双眼均滴盐酸林可霉素眼液 3 次/d。于建模后第 4、7、14 天在裂隙灯显微镜下观察角膜新生血管的情况。

1.2.2 HE 染色观察角膜组织形态学改变及炎性细胞浸润情况 于造模后不同时间点(4、7、14 d)各取 6 只造模成功的 SD 大鼠,经腹腔注射过量戊巴比妥钠麻醉致死后摘除眼球,将角膜组织常规固定、脱水、包埋后做成 5 μm 连续切片,脱蜡后行苏木精-伊红染色,各时间点随机选取 4 个视野倒置荧光显微镜下拍照,对每个视野进行角膜炎症细胞计数分析。

1.2.3 RT-PCR 检测各组大鼠角膜组织 miRNA-200b、VEGF mRNA 的表达 建立大鼠 CNV 模型后第 14 天,用 TRIzol 收取实验组和对照组角膜($n=6$),

超声裂解后提取总 RNA,分别用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒和 Mir-X miRNA First Strand Synthesis 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA 后,行 RT-PCR 检测 miR-200b 和 VEGF 的表达。$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计和表示相对表达量。

1.2.4 HUVECs 的转染及分组 HUVECs 用含 1%双抗+10%胎牛血清的 1640 培养基培养,条件为 37 ℃、5% CO_2。按照 Lipofectamine2000 试剂说明书。将实验分为 3 组:miRNA-200b mimic 组、miR-200b NC 组、CON 组。待 HUVECs 汇合度达 60%~70%时按 100 nmol/L 浓度进行脂质体转染,6 h 后吸出旧培养基,换为 10%的新鲜培养基,继续培养 24~48 h 后,收集细胞进行下一步实验。

1.2.5 RT-PCR 检测 miRNA-200b 在 HUVECs 的表达 转染后 24 h,根据 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,按照 Mir-X miRNA First Strand Synthesis 逆转录试剂盒一步法逆转录为 cDNA,反转录反应条件:37 ℃ 1 h;85 ℃ 5 min;稀释 10 倍后行 RT-PCR,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算和统计 miR-200b 的表达量。实验重复 3 次。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将处于对数生长期的 HUVECs 按 3 000/孔接种于 96 孔板。待细胞汇合度达到 50%~60%时按上述分组进行干预(n=5),24 h 后更换为 10%的 CCK-8 溶液,37 ℃继续培养 2 h,酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度值 D(450),观察细胞增殖能力。

1.2.7 划痕实验检测 HUVECs 的迁移能力 以 50 000/孔接种 HUVECs 于 6 孔板,待细胞汇合度达到 80%~90%时,用 200 μL 枪头比着直尺垂直画线,并用 PBS 冲洗细胞 3 次,按上述分组进行转染,于 0、24 h 分别在倒置显微镜下拍照记录划痕面积的变化,观察细胞迁移情况。

1.2.8 成管实验观察 HUVECs 的成管能力 将 96 孔板和 200 μL 枪头提前预冷。取 70 μL/孔 Matrigel 基质胶(提前 4 ℃融化),使其均匀铺在 96 孔板底部,此过程不要产生气泡,37 ℃孵育 1 h。将转染 24 h 后的各组细胞 1×10^4/孔接种至铺有 Matrigel 基质胶的 96 孔板内。37 ℃继续培养 6 h 后在显微镜下拍照,观察形成管腔的个数。

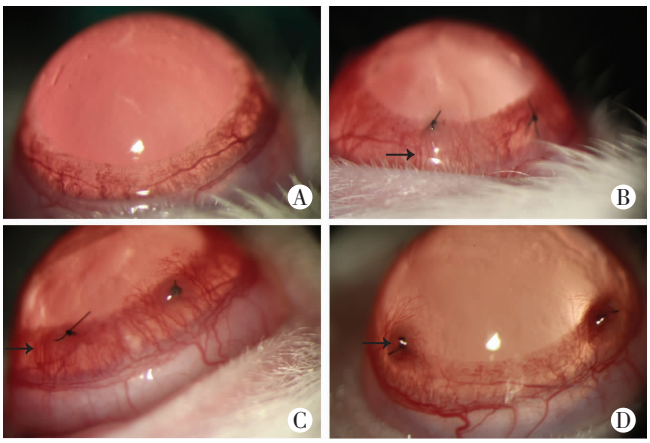
1.2.9 Western blot 检测 VEGF、PIK3CA、AKT 蛋白的表达 裂解液收集转染 48 h 后的各组细胞,离心后吸取上清,每组取 2 μL 按 BCA 试剂盒绘制标准曲线后测定浓度,其余加入上样缓冲液,沸水煮 5~10 min,-20 ℃冰箱储存。将蛋白样品 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉 37 ℃封闭 1.5 h,兔单克隆抗体 4 ℃孵育过夜(GAPDH/AKT/p-AKT 1∶1 000,VEGF 1∶800,PIK3CA 1∶500)。TBST 清洗条带 3 次,室温下孵育二抗 1 h,TBST 洗 3 次,凝胶成像系统检测。以目的条带与 GAPDH 的灰度比值表示所测蛋白的表达水平,实验重复 3 次。

1.2.10 统计学分析 采用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验比较两组间数据,3 组比较用单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 大鼠 CNV 模型构建及角膜组织形态、炎性细胞浸润情况

正常大鼠的角膜透明,无 CNV 生长;造模后第 4 天可见新生血管长入,稀少细小,垂直于角膜缘切线方向生长;第 7 天可见血管浓密,管径增粗,分支增多,已达缝线处;第 14 天时 CNV 超过缝线末端继续生长,角膜水肿明显(图 1)。HE 染色结果显示:正常对照组角膜组织排列整齐,无炎性细胞浸润,造模后第 4、7、14 天可见角膜组织排列紊乱,不规则,炎症细胞浸润数在造模后第 4 天(123.00±14.49)、7 天(170.75±29.06)、14 天(223.50±26.15)逐渐增多,两组间差异均具有统计学意义(P<0.05,图 2)。



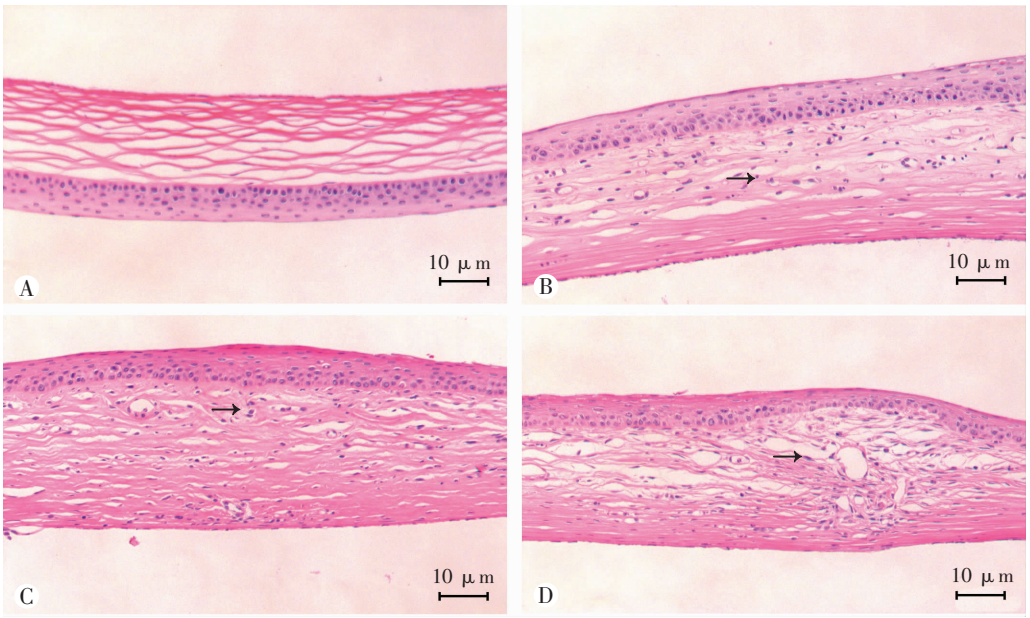
箭头示新生血管

A:正常大鼠的角膜透明,无 CNV 生长;B:造模后第 4 天可见新生血管长入,稀少细小,垂直于角膜缘切线方向生长;C:第 7 天可见血管浓密、管径增粗、分支增多,已达缝线处;D:第 14 天时 CNV 超过缝线末端继续生长,角膜水肿明显

图 1 缝线法构建大鼠 CNV 模型 (×20)

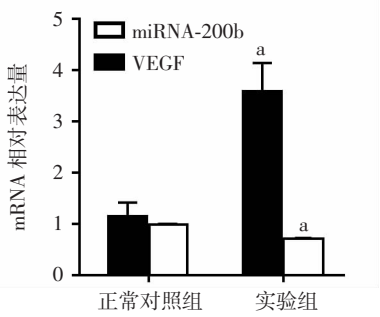
2.2 miRNA-200b、VEGF 在大鼠 CNV 中的表达

取正常和缝线后第 14 天角膜组织,采用 RT-PCR 检测 miR-200b/VEGF 的表达,结果显示:缝线后第 14 天,角膜组织中 miR-200b 表达明显降低,而 VEGF 表达明显升高,差异有统计学意义(P<0.01,图 3)。



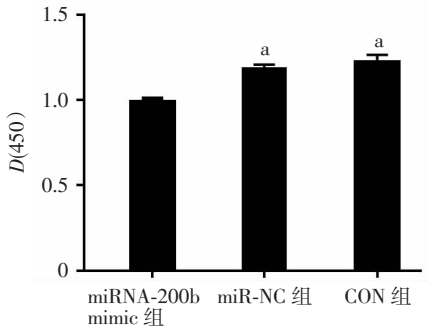
A:正常对照组角膜组织,排列整齐,无炎症细胞浸润;B~D:分别为造模后第4、7、14天角膜组织 箭头示结构排列紊乱,不规则,炎症细胞浸润逐渐加重

图2 HE染色观察角膜组织形态学及炎性细胞浸润情况 (×20)



a:$P<0.01$,与正常对照组比较

图3 RT-PCR检测miRNA-200b、VEGF在两组大鼠CNV中的表达



a:$P<0.05$,与miRNA-200b mimic组比较

图4 CCK-8检测miRNA-200b对HUVECs的增殖能力的影响

2.3 miRNA-200b在各组细胞中的表达

与miR-NC组(1.216 1±0.811 2)、CON组(3.125 6±0.884 5)相比,miR-200b mimic组(71.759 7±15.622 1)miR-200b的表达量显著升高($P<0.01$),而miR-NC组、CON组间无明显差异。

2.4 miRNA-200b对HUVECs增殖能力的影响

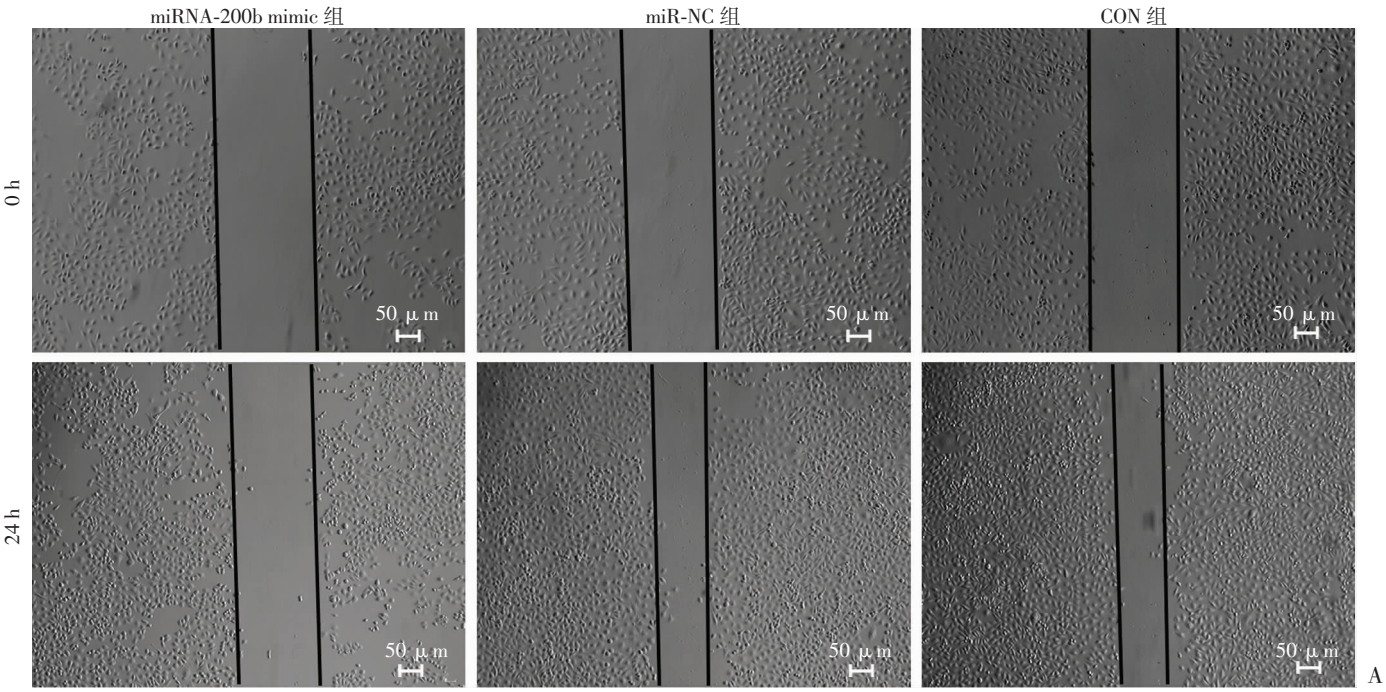
转染后24 h,与miR-NC组、CON组相比,miR-200b mimic组的光密度值显著降低($P<0.05$),而miR-NC组、CON组间无明显差异(图4)。提示miR-200b mimic组HUVECs增殖能力被显著抑制。

2.5 miRNA-200b对HUVECs迁移能力的影响

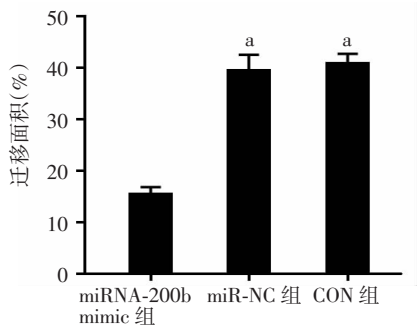
划痕实验结果显示:与miR-NC组、CON组相比,miR-200b mimic组细胞迁移率明显下降($P<0.05$),而miR-NC组、CON组间无明显差异(图5)。提示miR-200b mimic组细胞迁移能力被显著抑制。

2.6 miRNA-200b对HUVECs成管能力的影响

Matrigel胶成管实验结果显示:与miR-NC组、CON组相比,miR-200b mimic组细胞管腔形成数明显减少($P<0.05$),而miR-NC组、CON组间无明显差异(图6)。提示miR-200b mimic组细胞成管能力被显著抑制。



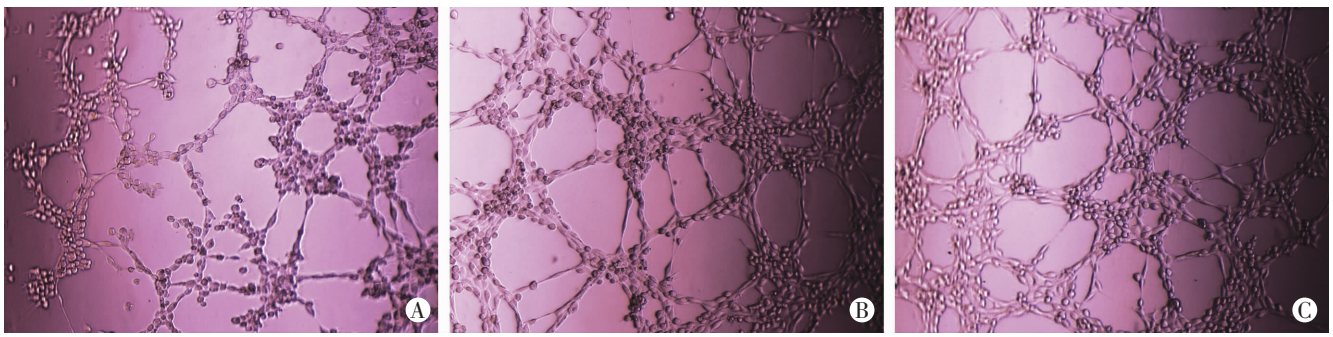
A

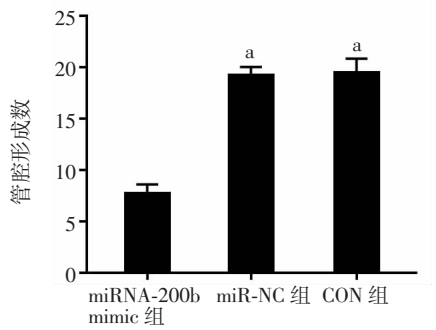


B

A:划痕实验检测 HUVECs 的迁移能力(×10);B:各组迁移面积 a:$P<0.05$,与 miR-200b mimic 组比较

图 5 miR-200b 对 HUVECs 迁移能力的影响

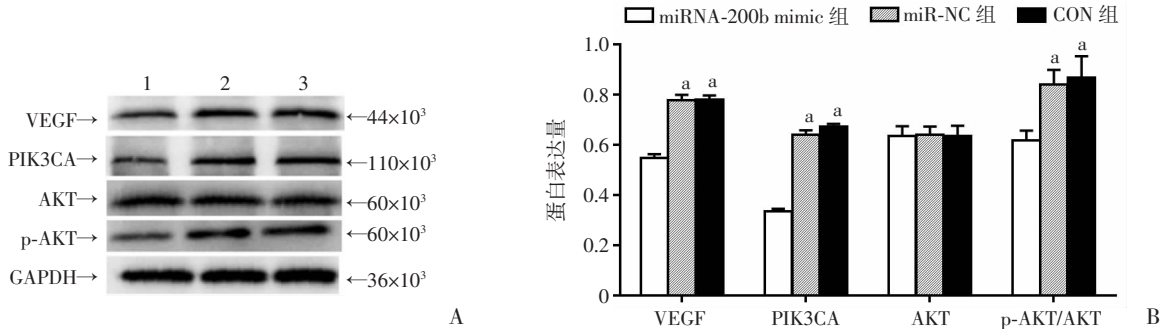




D

A~C:分别为 miR-200b mimic、miR-NC、CON 组成管观察(×20);D:管腔形成数量分析 a:$P<0.05$,与 miR-200b mimic 组比较

图 6 Matrigel 胶成管实验检测 miR-200b 对 HUVECs 成管能力的影响



A: Western blot 检测各通路蛋白表达 1~3:分别为 miR-200b mimic 组、miR-NC 组、CON 组;B:蛋白相对表达量分析 a:$P<0.05$,与 miR-200b mimic 组比较

图 7 Western blot 检测 miRNA-200b 对各组细胞 VEGF、PIK3CA、AKT 及 p-AKT 蛋白表达的影响

2.7 miRNA-200b 对 VEGF、PIK3CA、AKT 及 p-AKT 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示:与 miR-NC 组、CON 组相比,miR-200b mimic 组中 VEGF、PIK3CA 及 p-AKT 蛋白表达显著降低($P<0.05$),而 miR-NC 组、CON 组间无明显差异(图 7)。

3 讨论

缝线法是目前构建大鼠 CNV 模型的主要方法,相对于碱烧伤、热烧伤等具有廉价、方便、易操作、易控制等优点[10]。大量文献报道 miRNAs 参与调节眼部新生血管,如 miR-184 在缝线诱导的 CNV[11]及缺血诱导的视网膜新生血管中表达下调[12],且通过抑制内皮细胞的增殖、迁移及管腔形成从而改善眼部新生血管,而 miR-142[13]、miR-145[14]起着相反的作用。本研究发现 miRNA-200b 在大鼠 CNV 模型中明显下调,这验证了前期基因芯片筛选结果,表明 miR-200b 可能参与大鼠 CNV 的形成。目前,HUVECs 被广泛作为眼部新生血管的研究对象[11,13]。为了进一步研究 miR-200b 在 HUVECs 中的作用,本研究利用脂质体技术成功转染 miR-200b mimic,为后续实验奠定了基础。

近几年研究表明:miR-200b 是糖尿病视网膜病变中的关键调节因子,通过直接抑制 VEGF 信号传导,影响视网膜血管内皮细胞的生长和增殖,从而改善糖尿病视网膜病变的进展[15-16];此外,在缺氧条件下,miR-200b 通过靶向 Ets-1 调控人微血管内皮细胞的结构和功能[17]。同样,本研究发现:与阴性对照组、空白对照组相比,转染后 miR-200b mimic 组中 HUVECs 的增殖效率、迁移面积及管腔形成个数显著下降。因此,我们推测 miR-200b 通过影响内皮细胞增殖、迁移及管腔形成能力调控血管新生。然而,有文献报道 miR-200b 抑制剂能显著减弱血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力[18],表明 miR-200b 对大血管的调控具有细胞特异性,相反的细胞效应表明这其中可能存在不同的分子机制,是一个错综复杂的过程。

VEGF 作为血管调控的关键因子,在血管新生中起着举足轻重的作用,临床上抗 VEGF 药物用于治疗新生血管成效显著。VEGF 通过激活下游 PI3K/AKT 通路调控肿瘤血管的形成及通透性[19]。PI3K 主要由 p110 和 p85 两个亚基组成,PIK3CA 即表示 p110α 亚基,激活后与 p85 结合形成异二聚体,从而促进 Akt 磷酸化驱动肿瘤的形成,进而影响细胞的增殖、凋亡、迁移和生长过程。如在非小细胞性肺癌[20]、宫颈癌[21]、乳腺癌[22]中,PIK3CA 参与 PI3K/AKT 信号传导途径。研究证明 miR-200b 可通过抑制 VEGF 表达以及 PI3K/AKT 信号通路,实现对人宫颈癌细胞血管生成的抑制[23],这与本研究结果一致,进一步证实了 miR-200b 在调节新生血管形成中的分子机制。

本课题组通过 Targetscan 软件和 NCBI Entrez Gene 数据库分析得出:PIK3CA 可能是 miR-200b 的靶基因[9],从蛋白水平得到了验证。下一步实验可通过沉默 PIK3CA 基因,检测加入抑制剂前后,参与 PI3K/AKT 信号通路的相应蛋白的表达以及磷酸化水平是否有改变;同时也可在体内实验中验证我们的观点;此外,研究大鼠 CNV 模型中 miRNAs 之间的相互调控作用也是下一步实验的切入点。

总之,本研究发现 miR-200b 在大鼠 CNV 模型中表达下调,而 VEGF 表达上调。miR-200b 的上调能显著抑制 HUVECs 的增殖、迁移和成管能力,miR-200b 可能通过抑制 PIK3CA/AKT 信号通路而成为 CNV 的潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] BACHMANN B, TAYLOR R S, CURSIEFENV C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis[J].

Ophthalmology, 2010,117(7): 1300-5.e7. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.01.039.

[2] HOU P F, LI H L, YONG H M, *et al*. PinX1 represses renal cancer angiogenesis *via* the mir-125a-3p/VEGF signaling pathway[J]. Angiogenesis, 2019, 22(4): 507-519. DOI: 10.1007/s10456-019-09675-z.

[3] ZHUANG Z, XIAO-QIN, HU H, *et al*. Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization *via* the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Vis, 2015, 21: 1173-1184.

[4] HOU J Y, LIU L, ZHU Q, *et al*. MicroRNA-185 inhibits angiogenesis in humanmicrovascular endothelial cells through targeting stromal interaction molecule 1[J]. Cell Biol Int, 2016, 40(3): 318-328. DOI: 10.1002/cbin.10572.

[5] LEWIS A, FELICE C, KUMAGAI T, *et al*. The miR-200 family is increased in dysplastic lesions in ulcerative colitis patients[J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173664. DOI: 10.1371/journal.pone.0173664.

[6] FU Y X, LIU X H, ZHOU N T, *et al*. MicroRNA-200b stimulatestumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1[J]. J Cell Physiol,2014,229(6): 772-782. DOI: 10.1002/jcp.24497.

[7] WANG Y C, YIN X H, ZHAO L, *et al*. MicroRNA-200b inhibits pituitary tumor cell proliferation and invasion by targeting PKCα[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 1706-1714. DOI: 10.3892/etm.2017.4681.

[8] LI D F, WANG H, SONG H M, *et al*. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85276-85289. DOI: 10.18632/oncotarget.19205.

[9] 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. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.000324.
MAO Y N, HU Y, HOU S P, *et al*. Correlation between microRNA expression profiles and VEGF of corneal neovascularization in rats[J]. J Chongqing Med Univ, 2014, 39(8): 1090-1094. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.000324.

[10] 周小军. DATS对缝线诱导的大鼠角膜新生血管的影响及机制研究[J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(11): 2015-2018.
ZHOU X J. Effect of DATS on experimental corneal neovascularization induced by corneal suture in rats cornea[J]. Int Eye Sci, 2017, 17(11): 2015-2018.

[11] ZONG R R, ZHOU T, LIN Z R, *et al*. Down-regulation of MicroRNA-184 is associated with corneal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(3): 1398-1407. DOI: 10.1167/iovs.15-17417.

[12] SHEN J K, YANG X R, XIE B, *et al*. MicroRNAs regulate ocular neovascularization[J]. Mol Ther, 2008, 16(7): 1208-1216. DOI: 10.1038/mt.2008.104.

[13] 李化, 李彦, 周善璧. MiRNA-142-5p在大鼠角膜新生血管中的作用及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(8): 699-704. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201711061.
LI H, LI Y, ZHOU S B. Role of miRNA-142-5p in regulation of rat corneal neovascularization and related pathways[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(8): 699-704. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201711061.

[14] LIU C H, WANG Z X, HUANG S, *et al*. MicroRNA-145 regulates pathological retinal angiogenesis by suppression of TMOD3[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 16: 335-347. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.03.001.

[15] CHOI Y, YOON S, JEONG Y, *et al*. Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b[J]. Mol Cells, 2011, 32(1): 77-82. DOI: 10.1007/s10059-011-1042-2.

[16] MCARTHUR K, FENG B, WU Y X, *et al*. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy[J]. Diabetes, 2011, 60(4): 1314-1323. DOI: 10.2337/db10-1557.

[17] CHAN Y C, KHANNA S, ROY S, *et al*. MiR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induceangiogenic response of endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 2047-2056. DOI: 10.1074/jbc.M110.158790.

[18] LIANG D L, WANG Z X, YAN Z Q, *et al*. Nicotine facilitates VSMC dysfunction through a miR-200b/RhoGDIA/cytoskeleton module[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43798. DOI: 10.1038/srep43798.

[19] CLAESSON-WELSH L, WELSH M. VEGFA andtumour angiogenesis[J]. J Intern Med, 2013, 273(2): 114-127. DOI: 10.1111/joim.12019.

[20] YU Q Q, WU H, HUANG X, *et al*. MiR-1 targets PIK3CA and inhibits tumorigenic properties of A549 cells[J]. Biomedecine Pharmacother, 2014, 68(2): 155-161. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.01.005.

[21] MA Y, WEI S, LIN Y C, *et al*. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(23): 2739-2744. DOI: 10.1038/sj.onc.1203597.

[22] ISAKOFF S J, ENGELMAN J A, IRIE H Y, *et al*. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10992-11000. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2612.

[23] 朱晓志, 王冬梅, 王丽蓉. miR-200b-5p靶向ATAD2调控P13K/AKT信号通路参与宫颈癌血管生成的作用机制[J]. 中国性科学, 2019, 28(7): 42-46. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1993.07.010.
ZHU X Z, WANG D M, WANG L R. The role of mir-200b-5p targeting ATAD2 in the regulation of P13K/Akt signaling pathway in the angiogenesis of cervical cancer[J]. Chin J Human Sexual, 2019, 28(7): 42-46. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1993.07.010.

(**收稿**:2019-09-18;**修回**:2019-12-03)

(编辑 张 维)