DOI:10.16016/j.1000-5404.202103108

miRNA-424(322)-5p 通过激活 Raf/MEK/ERK 通路促进大鼠角膜新生血管形成

曹 浪[1],李 雪[2],周善璧[3],王 豪[4] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,眼科学重庆市重点实验室[1];550002 贵阳,贵州省人民医院眼科[2];401331 重庆,重庆医科大学附属大学城医院眼科[3];408000 重庆,重庆市涪陵中心医院眼科[4]

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-424(322)-5p[miR-424(322)-5p]在大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, Cor NV)形成中的作用及其可能机制。**方法** 20 只雌性 SD 大鼠通过缝线法诱导构建大鼠 Cor NV 模型,左眼为实验组,右眼为正常对照组,收集建模第 0、4、7、14 天的角膜组织,通过 HE 染色、免疫组化(IHC)观察角膜结构、血管形成及蛋白表达;通过 RT-PCR 检测建模第 4 天的大鼠角膜组织中的 miR-424(322)-5p 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 的表达。通过脂质体转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),分为 miR-424(322)-5p 模拟物[miR-424(322)-5p mimic]组、阴性对照[miR-424(322)-5p NC]组、正常空白(CON)组,用 RT-PCR 检测 miR-424(322)-5p 转染效率,CCK-8、划痕实验、Transwell 实验、Matrigel 胶成管实验,分别检测各组 HUVECs 的增殖、迁移、成管能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路的蛋白相对表达量。**结果** 成功构建了大鼠 Cor NV 模型,HE 染色切片显示:与正常对照组比较,建模后实验组第 4、7、14 天的大鼠角膜组织结构紊乱,角膜水肿增厚,新生血管形成,炎性细胞浸润;免疫组化(IHC)结果显示:与正常对照组比较,实验组 VEGF 的表达量明显增加,呈棕黄色;RT-PCR 结果显示建模第 4 天后的大鼠角膜组织中 miR-424(322)-5p 及 VEGF mRNA 的表达显著增高($P<0.01$)。通过脂质体转染 HUVECs 后的 miR-424(322)-5p mimic 组 miR-424(322)-5p 的表达量显著高于 NC 组和 CON 组($P<0.01$),CCK-8、划痕实验、Transwell 实验及 Matrigel 胶成管实验结果表明 miR-424(322)-5p 促进 HUVECs 的增殖、迁移及成管能力($P<0.01$);Western blot 结果显示 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路的蛋白相对表达量明显上调($P<0.01$)。**结论** miR-424(322)-5p 可能通过激活 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路,促进 HUVECs 的迁移、增殖及成管能力,从而参与 Cor NV 的形成。

[关键词] miR-424(322)-5p;角膜新生血管;Raf/MEK/ERK 通路;人脐静脉内皮细胞
[中图法分类号] R363.21; R394.3; R772.23 [文献标志码] A

MiRNA-424(322)-5p promotes corneal neovascularization in rats *via* activating Raf/MEK/ERK pathways

CAO Lang[1], LI Xue[2], ZHOU Shanbi[3], WANG Hao[4] [1]Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Ophthalmology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 550002; [3]Department of Ophthalmology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401331; [4]Department of Ophthalmology, Fuling Central Hospital of Chongqing, Chongqing, 408000, China

[**Abstract**] Objective To explore the role and possible mechanism of microRNA-424(322)-5p (miR-424(322)-5p) in the formation of corneal neovascularization (Cor NV) in rats. Methods Corneal neovascularization model was established in 20 female rats by suturing. Their left eye was used as the experimental group and the right eye was used as the normal control group. On the 0th, 4th, 7th, 14th days after modeling, corneal structure, blood vessel formation and protein expression in the corneal tissues were observed by HE staining and immunohistochemistry (IHC). On the 4th day after modeling, the mRNA expression of miR-424(322)-5p and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the corneal tissue was

[通信作者] 周善璧,E-mail:zhoushanbi@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

detected by RT-PCR. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected with liposomes and divided into miR-424(322)-5p mimic group, negative control (miR-424(322)-5p NC) group and blank control (CON) group, respectively. The transfection efficiency of miR-424(322)-5p was tested by RT-PCR. CCK-8 assay, scratch assay, Transwell assay and Matrigel tube assay were performed to measure the proliferation, migration, and tube forming ability of HUVECs in each group, respectively. The levels of VEGF and Raf/MEK/ERK pathway proteins were detected by Western blotting. **Results** The rat Cor NV model was successfully established. HE staining showed that the rat corneal tissues of the experimental group were in disordered arrangement, corneal edema and thickening, neovascularization, and inflammatory cell infiltration on the 4th, 7th and 14th day after modeling. The results of IHC indicated that the expression of VEGF was enhanced significantly after modeling when compared with the normal control group. RT-PCR displayed that the expression of miR-424(322)-5p and VEGF mRNA in rat cornea tissues was significantly enhanced on the 4th day after modeling ($P<0.01$). The expression level of miR-424(322)-5p in the mimic group after HUVECs transfected with liposomes was significantly higher than that in the NC group and the CON group ($P<0.01$). The results of CCK-8 assay, scratch assay, migration assay and Matrigel tube assay displayed that miR-424(322)-5p promoted the migration, proliferation and tube forming ability of HUVECs ($P<0.01$). Western blotting showed that the protein levels of VEGF and Raf/MEK/ERK pathway proteins were significantly up-regulated ($P<0.01$). **Conclusion** Overexpression of miR-424(322)-5p promotes the migration, proliferation and tube formation of HUVECs by activating VEGF and Raf/MEK/ERK pathways, and thereby participates in the formation of Cor NV.

[**Key words**] miR-424(322)-5p; corneal neovascularization; human umbilical vein endothelial cells; Raf/MEK/ERK pathway

Corresponding author: ZHOU Shanbi, E-mail: zhoushanbi@aliyun.com

角膜新生血管是一种可致盲的眼表病变,已成为公共卫生关注的焦点。有研究报道:每年估计有140万人发病,其中12%的患者随后丧失了视力[1]。眼部毛细血管网沿角膜缘侵入正常角膜形成新生血管,从而引起视力下降甚至失明,其与感染、碱烧伤、同种异体移植排斥和角膜缝合线放置等有关[2-3]。目前,microRNA(miRNA)已成为生物学研究重点,并在疾病进程中起着重要的作用[4]。

MiRNA是一类非编码的小分子RNA,由单链RNA前体(pre-miRNA)经过Dicer酶剪切后生成,并通过与靶基因mRNA分子的3′端非编码区域(3′-untranslated region, 3′UTR)互补配对,引起靶mRNA的降解或者抑制其翻译,从而发挥调控作用。研究表明,miRNA与眼部血管疾病紧密相关[5-6],如视网膜疾病、黄斑变性等,并通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其下游Raf蛋白激酶(rapidly accelerated fibrosarcoma, Raf)/丝裂原活化细胞外信号调节激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路发挥生物学效应[7]。本课题组前期研究利用缝线法构建SD大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, Cor NV)模型,通过微阵列分析筛选出与VEGF通路相关的具有显著差异的miRNA,其中包括miRNA-424(322)-5p[8](人miR-424-5p是啮齿动物miR-322-5p的同源基因)。故猜测miRNA-424(322)-5p是否可能通过激活VEGF及下游Raf/MEK/ERK通路来调控角膜新生血管的生成。同时,miRNA-424(322)-5p在角膜新生血管方面也尚未见报道。本研究利用缝线法构建动物模型,检测miR-424(322)-5p及VEGF mRNA的相对表达量;同时,利用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)构建体外Cor NV模型,进一步研究miRNA-424(322)-5p的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 健康雌性SPF级SD大鼠20只,体质量200~250 g,重庆医科大学动物实验中心饲养并提供合格号[SYXK(渝)2018-0003]。实验前通过裂隙灯观察排除新生血管、瘢痕、穿孔、角膜损伤等疾病。HUVECs细胞系购自莱博斯生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 胎牛血清(FBS)、RPMI1640培养基及胰蛋白酶(HyClone,美国),miR-424(322)-5p mimic、miR-424(322)-5p NC(上海吉玛生物公司,中国),Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国),RNAiso Plus、Mir-X miRNA First Strand Synthesis、Prime Script TM RT reagent Kit with gDNA Eraser及SYBR Premix Ex Taq TM Ⅱ(TaKaRa公司,日本),

CCK-8 试剂盒(Bryotime,中国),BCA 试剂盒(碧云天,中国),兔抗人多克隆抗体 Raf1、VEGF(Proteintech,美国),兔抗人单克隆抗体 MEK1、p-MEK1(Abcam,英国),兔抗人单克隆抗体 ERK1/2、p-ERK1/2(Cell Signaling Technology,美国)。酶联免疫检测仪(Thermo 公司,美国),Real-time RT-PCR 仪(Applied Biosystems,美国),细胞培养箱(Thermo forma,美国)等。

1.2 *实验方法*

1.2.1 动物模型 20 只健康 SD 大鼠(SPF 级)经腹腔注射戊巴比妥钠注射液(0.2 mL/100 g)进行麻醉,左眼作为实验组,采用 0.04%盐酸奥布卡因滴眼进行表面麻醉后,于角膜 3、6、9、12 点方向用 10-0 尼龙线进行缝线建模;右眼作为正常对照组不缝线。建模后每日盐酸林可霉素滴眼,3 次/d,2~3 滴/次。建模第 0、4、7、14 天通过裂隙灯观察角膜新生血管。

1.2.2 HE 染色观察角膜血管形成及炎性细胞浸润 建模第 0、4、7、14 天,大鼠经腹腔注射过量麻醉剂量处死后,收集角膜组织,将组织常规固定、脱水、包埋、切片(5 μm),经脱蜡、苏木精-伊红染色后,于显微镜下观察拍照。

1.2.3 免疫组化(IHC)检测角膜组织中 VEGF 蛋白的表达 角膜组织常规固定、脱水、包埋、切片(5 μm),经脱蜡、水化;抗原修复、封闭;一抗结合、二抗结合;DAB 显色;苏木精复染;脱水、透明、中性树脂封片。于显微镜下观察拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测大鼠角膜组织 miRNA-424(322)-5p、VEGF mRNA 的表达 收集建模第 4 天的大鼠角膜组织,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA,Mir-X miRNA First Strand Synthesis 法检测 miR-424(322)-5p 和 VEGF mRNA 的表达,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.5 细胞转染及转染效率检测 在 37 ℃ 5% CO_2 的条件下,采用 10% FBS RPMI1640 培养基培养 HUVECs,待细胞生长至 80%~90%时进行转染。实验分为 3 组:miR-424(322)-5p mimic(mimic 组)、miRNA-424(322)-5p NC(NC 组)、正常空白组(CON 组)。在最佳转染浓度 100 nmol/L 下进行转染,6 h 后更换新培养基,继续培养 24 h 后收集细胞,用 TRIzol 法提取总的 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA,荧光实时定量试剂盒进行 PCR,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 96 孔板中接种 HUVECs(5 000/孔),待细胞贴壁后进行转染(n=6),6 h 后更换培养基继续培养,24 h 后加入 CCK-8 试剂(10 μL/孔),孵育 1~2 h,用酶标仪测量波长 450 nm 处的光密度值[D(450)]。

1.2.7 划痕实验、Transwell 实验检测细胞的迁移能力 6 孔板中接种 HUVECs(1.5×10^5/孔),待细胞生长至 80%~90%时,用 100 μL 枪头作垂直线,PBS 冲洗 3 次后进行转染,于 0、24 h 在倒置显微镜下观察拍照,评估细胞迁移情况。

6 孔板中接种 HUVECs,待细胞生长至 80%~90%进行转染,24 h 后胰酶消化细胞并用无血清培养基重悬细胞,并接种到无血清培养基的 6 孔板型上室(1×10^5/孔),下室加入 15%FBS 完全培养基,24 h 后取出上室擦去上室内细胞,经多聚甲醛固定、结晶紫染色后,PBS 冲洗 3 次,在倒置显微镜下观察、拍照、计数,评估细胞迁移情况。

1.2.8 Matrigel 胶成管实验检测细胞的成管能力 96 孔板中加入 50 μL/孔 Matrigel 胶均匀铺在底部,37 ℃ 孵育 1 h 使其凝固,将转染 24 h 后的各组 HUVECs 按 1.5×10^4/孔接种到已铺基质胶的 96 孔板中,继续培养 4~6 h 后,在倒置显微镜下观察管腔形成情况并计数。

1.2.9 Western blot 检测 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路的蛋白表达水平 HUVECs 转染 48 h 后,通过 1%PMSF 的 RIPA 裂解液提取蛋白质,BCA 试剂盒测量蛋白浓度。12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,电转,用 5%脱脂奶粉在室温摇床上封闭 1.5 h,将 PVDF 膜置于稀释后的一抗(GAPDH 1∶1 000,VEGF 1∶800,Raf1 1∶500,MEK1 1∶2 500,p-MEK1 1∶2 500,ERK1/2 1∶1 000,p-ERK1/2 1∶1 000)中,4 ℃ 孵育过夜,次日用 TBST 液洗涤 PVDF 膜 3 次,于室温条件下孵育二抗 1.5 h,TBST 洗涤 3 次,配制 ECL 显影液,凝胶成像系统成像,采用 Image J 测量蛋白条带的灰度值。

1.3 *统计学分析*

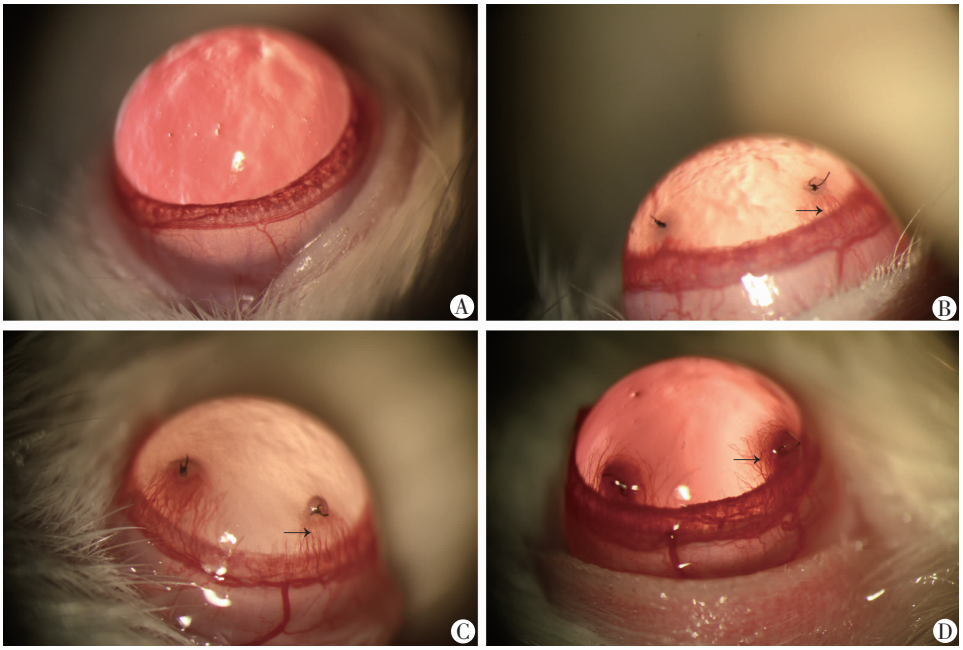
采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间用独立样本 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 *大鼠 Cor NV 模型构建及角膜组织形态、血管生成情况*

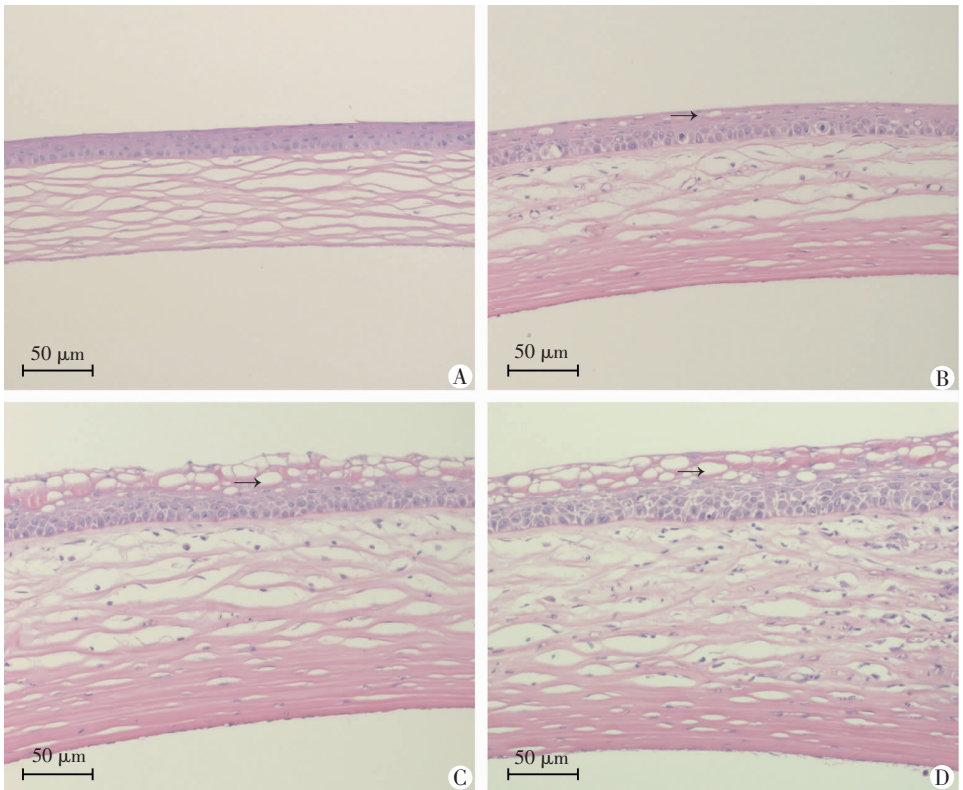
正常对照组 SD 大鼠角膜缘血管清晰可见,角膜透明无血管浸润。通过缝线法成功构建角膜 Cor NV 模型,实验组第 4 天的角膜缘血管向缝线点呈刷状生长,缝线处角膜轻度水肿;第 7 天的角膜新生血管浓密,血管继续向缝线点延伸,角膜水肿加重;第 14 天的角膜新生血管超过缝线点,在缝线点聚集生长,血管粗大,水肿明显加重(图 1)。HE 染色显示:正常对照组角膜无血管,各层结构排列整齐,层次分明,基质层无炎性细胞浸润;实验组第 4 天的角膜上皮细胞层处新生血管形成,血管腔稀疏细小,角膜增厚,基质层可见少量炎性细胞浸润;第 7 天的角膜上皮细胞层处新生血管管腔浓密粗大,角膜增厚,基质层结构紊乱,可见

较多炎性细胞;第 14 天的角膜上皮细胞层处新生血管管腔密集粗大,角膜增厚,基质层结构紊乱,大量炎性细胞浸润(图 2)。免疫组化(IHC)结果显示:正常对照组角膜上皮细胞层处无 VEGF 蛋白阳性染色,实验组第 4、7、14 天角膜上皮细胞层处均有 VEGF 蛋白阳性染色,呈棕黄色(图 3)。



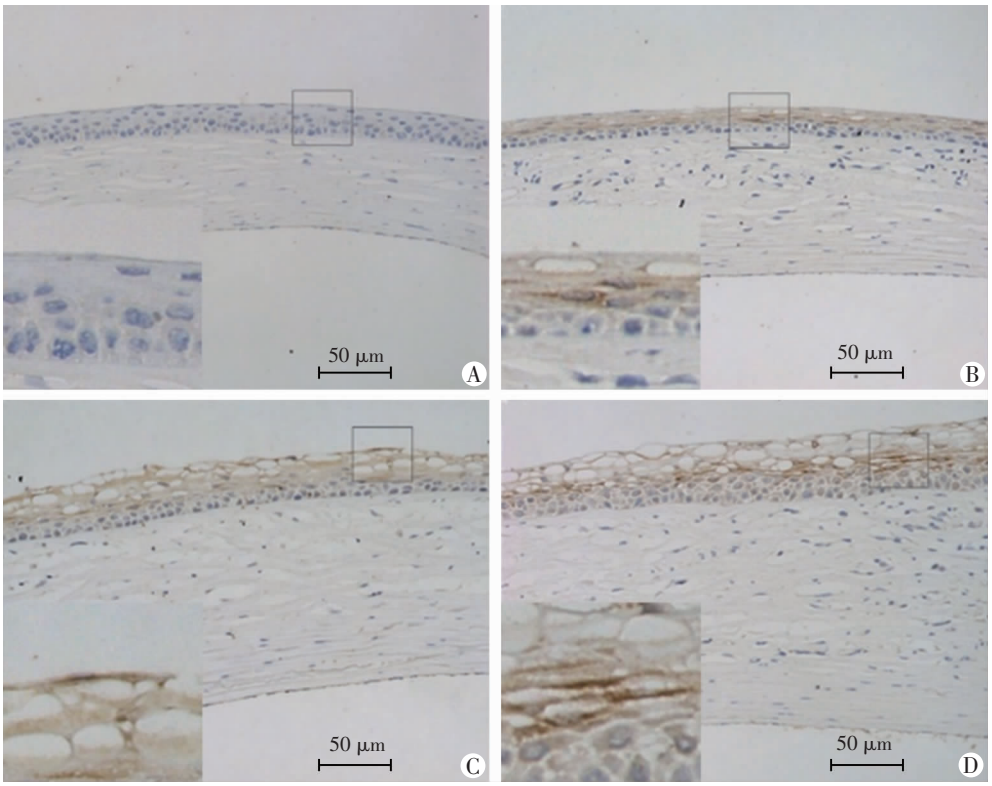
A:正常对照组的无血管透明角膜;B:实验组第 4 天的角膜;C:实验组第 7 天的角膜;D:实验组第 14 天的角膜 ↑:角膜新生血管

图 1　大鼠角膜新生血管(Cor NV)模型



A:正常对照组的无血管角膜组织;B:实验组第 4 天;C:实验组第 7 天;D:实验组第 14 天　↑:示新生血管管腔

图 2　HE 染色观察各组角膜组织新生血管形成及炎性细胞浸润

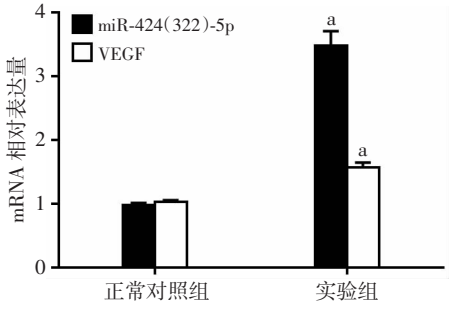


A:正常对照组的无血管角膜组织;B:实验组第4天;C:实验组第7天;D:实验组第14天

图3 免疫组化检测角膜组织新生血管中VEGF的表达

2.2 大鼠Cor NV模型中miR-424(322)-5p和VEGF mRNA的相对表达量

收集正常和建模第4天的角膜组织,RT-PCR检测miR-424(322)-5p、VEGF mRNA的相对表达量。结果显示:建模第4天实验组miR-424(322)-5p、VEGF的表达均高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$,图4)。



a:$P<0.01$,与正常对照组比较

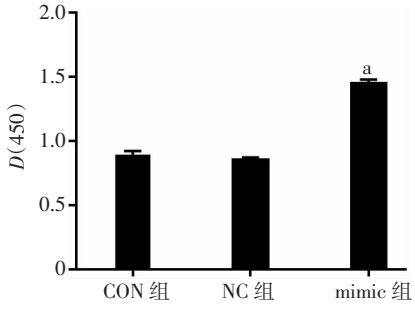
图4 大鼠Cor NV模型角膜组织中miR-424(322)-5p和VEGF mRNA的表达

2.3 miRNA-424(322)-5p在HUVECs的表达

脂质体转染HUVECs 24 h后检测各组miRNA-424(322)-5p的表达。与NC组和CON组比较,mimic组miRNA-424(322)-5p的表达显著升高($P<0.01$),NC组和CON组比较差异无统计学意义。

2.4 miR-424(322)-5p对HUVECs增殖能力的影响

HUVECs转染24 h后更换成含有CCK-8试剂的培养基继续培养,并在450 nm波长下测量光密度值。与NC组和CON组比较,mimic组光密度值显著升高($P<0.01$),而NC组和CON组比较差异无统计学意义(图5)。



a:$P<0.01$,与NC组和CON组比较

图5 CCK-8检测miR-424(322)-5p对HUVECS增殖能力的影响

2.5 miRNA-424(322)-5p对HUVECs迁移能力的影响

划痕实验检测细胞迁移能力,结果显示与NC组和CON组比较,mimic组迁移能力显著增加($P<0.01$),而NC组和CON组比较差异无统计学意义(图6)。

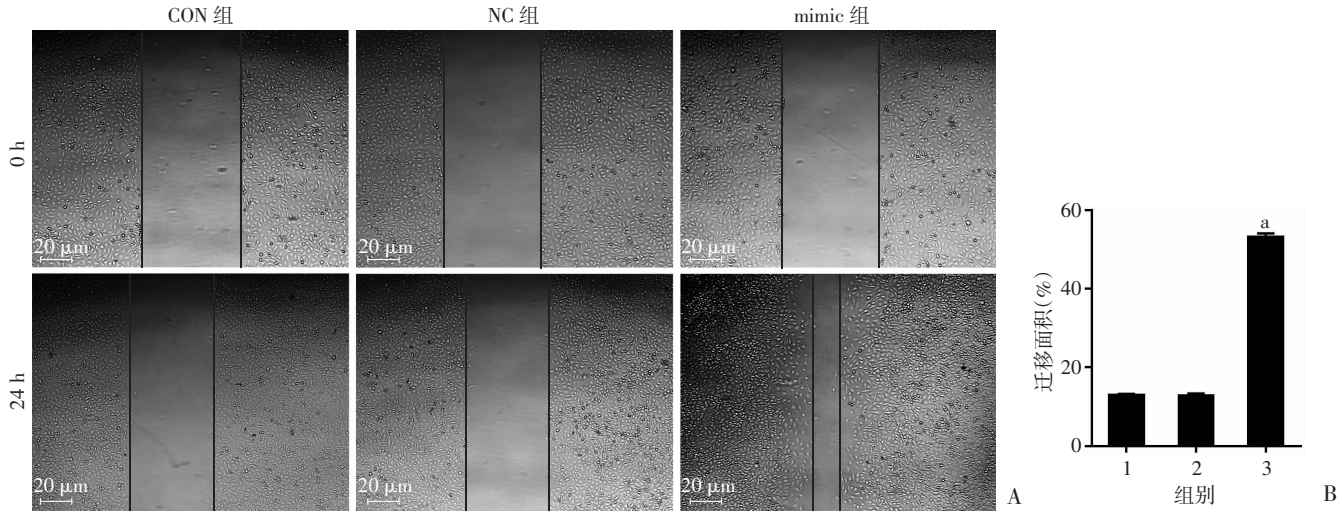
Transwell 实验检测细胞迁移能力,结果显示与 NC 组和 CON 组比较,mimic 组从上室穿入到下室的细胞数显著增加($P<0.01$),而 NC 组和 CON 组比较无显著增加($P>0.05$,图 7)。

2.6　miRNA-424(322)-5p 对 HUVECs 成管能力的影响

Matrigel 基质胶成管实验结果显示,与 NC 组和 CON 组比较,mimic 组管腔数明显增加($P<0.01$),而 NC 组和 CON 组比较无明显差异(图 8)。

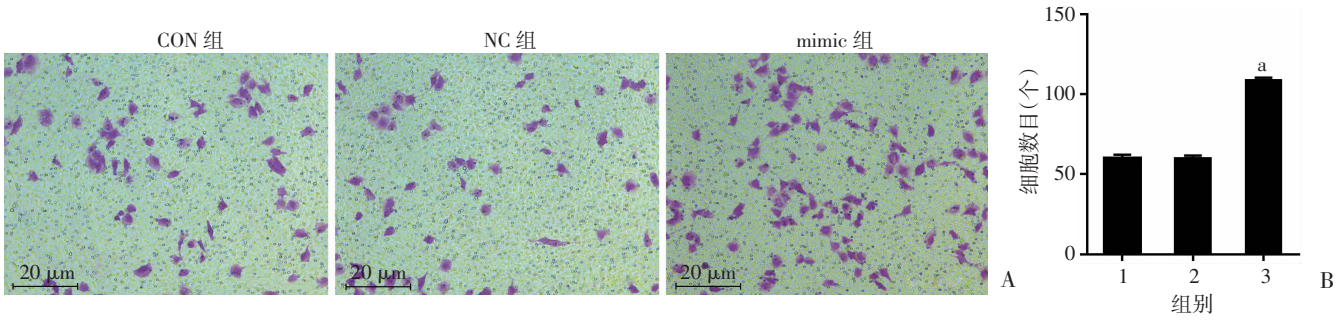
2.7　miRNA-424(322)-5p 对 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与 NC 组和 CON 组比较,miR-424(322)-5p mimic 组 VEGF、Raf1、p-MEK1 及 p-ERK1/2 蛋白表达显著增加($P<0.01$);而 NC 组和 CON 组比较无明显差异(图 9)。



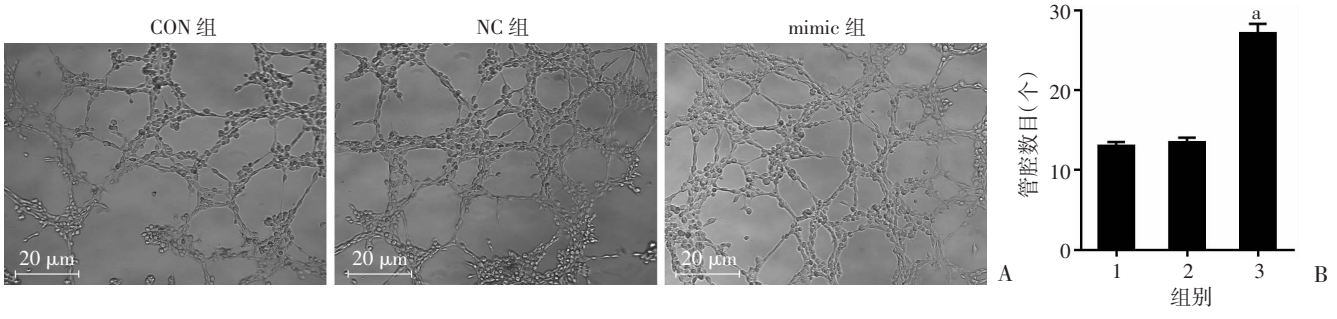
A:划痕实验结果;B:迁移面积统计分析;1:CON 组;2: NC 组;3: mimic 组;a:$P<0.01$,与 NC 组和 CON 组比较

图 6　miR-424-(322)-5p 对 HUVECs 迁移能力的影响



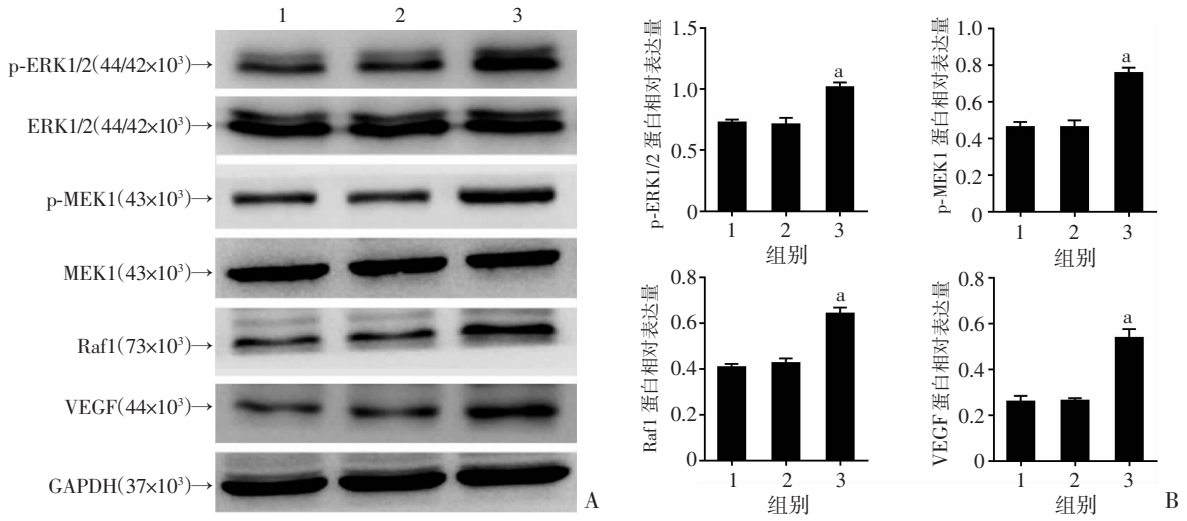
A:Transwell 实验结果;B:细胞数目统计分析;1:CON 组;2: NC 组;3: mimic 组;a:$P<0.01$,与 NC 组和 CON 组比较

图 7　miR-424(322)-5p 对 HUVECs 迁移能力的影响



A:成管实验结果;B:管腔数目统计分析;1:CON 组;2: NC 组;3: mimic 组;a:$P<0.01$,与 NC 组和 CON 组比较

图 8　miR-424(322)-5p 对 HUVECs 成管能力的影响



A:Western blot 实验结果;B:各蛋白相对表达量统计;1:CON 组;2: NC 组;3: mimic 组;a:$P<0.01$,与 NC 组和 CON 组比较

图 9 miR-424(322)-5p 对 VEGF 及 Raf/MER/ERK 通路蛋白表达的影响

3 讨论

眼表角膜新生血管病变对视力的影响日益增加,已逐渐成为人们重点关注的健康问题。它是由于缺氧及眼部损伤所致的血管生成和抗血管因子之间的不平衡使血管侵入角膜所致[9]。近年来,miRNA 与血管存在密切联系,给我们提供了解决角膜新生血管问题的新思路。如在缺血性视网膜中,miRNA-126 通过下调 p38/ERK 来抑制促血管生成基因(如 VEGF)的表达以减少新血管的形成[10];在人视网膜微血管内皮细胞中,miRNA-132 被证明通过上调 VEGFA 和 ERK2 来促进血管生成[11];在角膜新血管形成中,miRNA-184 通过靶向 VEGF 和 AKT 抑制体内血管生成等[12]。本课题组以此为基础进行研究,前期基因芯片筛选结果显示,miRNA-424(322)-5P 在大鼠角膜新生血管模型中显著上调[8]。同时,研究表明在缺氧环境下,miR-424 靶向 cullin2(CUL2)使 VCBCR U3-连接酶复合物不稳定,并增加 HIF-1α 和 HIF-2α 的水平,从而促进血管形成[13]。故推测 miRNA-424(322)-5p 可能参与调控角膜新生血管形成。目前为止,HUVECs 已被广泛作为体外模拟角膜新生血管形成的模型[14-15]。为此,本研究通过体外实验进行验证,用脂质体转染技术将 miRNA-424(322)-5p mimic、NC 转染到 HUVECs 中构建实验模型,其增殖、成管、迁移实验结果表明,miR-424(322)-5p 能促进血管形成。而 miR-424(322)-5p 对角膜新生血管的调控是一个极其复杂的过程,因此,本研究进一步探讨了该基因的可能作用机制。

VEGF 在血管形成过程中起重要作用,直接刺激内皮细胞增殖、迁移,促进血管管腔形成[16-17]。同时,VEGF 可通过激活下游 Raf1/MEK1/ERK1/2 参与调控血管形成[18]。研究表明,目前已发现多种 microRNA 通过激活 VEGF 及其下游 Raf1、MEK1、ERK1/2 来影响细胞的增殖、迁移等过程,如 miR-429[19]、miR-195[7]、miR-143[20]、miR-101[21] 等。因此,我们推测 miR-424(322)-5p 是否也可以通过激活 VEGF 及其下游 Raf/MEK/ERK 通路来调控角膜新生血管的形成? 为进一步求证,本研究检测了 VEGF 及其下游 Raf1、p-MEK1/MEK1 和 p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白的相对表达量。结果显示,与 CON 组和 NC 组比较,mimic 组的 VEGF、Raf1、p-MEK1 和 p-ERK1/2 的蛋白表达量明显上调。因此,我们推断 miR-424(322)-5p 可通过激活 VEGF 及其下游 Raf/MEK/ERK 通路促进 HUVECs 增殖、迁移、成管能力,从而促进 Cor NV 形成。

总之,本研究在大鼠新生血管模型中,miRNA-424(322)-5p 及 VEGF 上调,推断 miRNA-424(322)-5p 可能参与角膜新生血管的发生、发展。在细胞模型中,miRNA-424(322)-5p 可通过上调 VEGF 及其下游 Raf/MEK/ERK 通路蛋白的表达,促进 HUVECs 的迁移、增殖及管腔形成能力。因此,结合体内、体外实验结果,我们推断 miR-322(424)-5P 可能通过激活 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路促进角膜新生血管的形成。本研究初步验证了 miR-424(322)-5p 对角膜新生血管形成的影响,并探讨了部分可能机制,为临床预防和治疗角膜新生血管的形成提供新的策略。关于 miR-424(322)-5p 到底是通过何种机制调控 VEGF 及其下游 Raf/MEK/ERK 通路,仍需后续进一步探究。

参考文献:

[1] LEE P, WANG C C, ADAMIS A P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review[J]. Surv Ophthalmol, 1998, 43(3): 245-269. DOI:10.1016/s0039-6257(98)00035-6.

[2] LI Z R, LI Y P, LIN M L, *et al*. Activated macrophages induce neovascularization through upregulation of MMP-9 and VEGF in rat corneas[J]. Cornea, 2012, 31(9): 1028-1035. DOI:10.1097/ico.0b013e31823f8b40.

[3] EBRAHEM Q, CHAURASIA S S, VASANJI A, *et al*. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization *in vivo*[J]. Am J Pathol, 2010, 176(1): 496-503. DOI:10.2353/ajpath.2010.080642.

[4] MATSUYAMA H, SUZUKI H I. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 132. DOI:10.3390/ijms21010132.

[5] LIU C H, HUANG S, BRITTON W R, *et al*. MicroRNAs in vascular eye diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2):649. DOI:10.3390/ijms21020649.

[6] MUKWAYA A, JENSEN L, PEEBO B, *et al*. MicroRNAs in the cornea: Role and implications for treatment of corneal neovascularization[J]. Ocul Surf, 2019, 17(3): 400-411. DOI:10.1016/j.jtos.2019.04.002.

[7] SUN P C, WANG L, LU Y H, *et al*. MicroRNA-195 targets VEGFR2 and has a tumor suppressive role in ACHN cells *via* PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK signaling pathways[J]. Int J Oncol, 2016, 49(3): 1155-1163. DOI:10.3892/ijo.2016.3608.

[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. 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.

[9] SHARIF Z, SHARIF W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management[J]. Rom J Ophthalmol, 2019, 63(1): 15-22.

[10] BAI Y, BAI X, WANG Z, *et al*. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization *via* regulating angiogenic growth factors[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(1): 471-477. DOI:10.1016/j.yexmp.2011.04.016.

[11] ZHANG L X, TAO L J. miR-132 promotes retinal neovascularization under anoxia and reoxygenation conditions through up-regulating Egr1, ERK2, MMP2, VEGFA and VEGFC expression[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(8): 8845-8857.

[12] PARK J K, PENG H, YANG W D, *et al*. miR-184 exhibits angiostatic properties *via* regulation of Akt and VEGF signaling pathways[J]. FASEB J, 2017, 31(1): 256-265. DOI:10.1096/fj.201600746R.

[13] GHOSH G, SUBRAMANIAN I V, ADHIKARI N, *et al*. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-α isoforms and promotes angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2010, 120(11): 4141-4154. DOI:10.1172/jci42980.

[14] SOUFI-ZOMORROD M, HAJIFATHALI A, KOUHKAN F, *et al*. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angio-miR in HUVECs[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 9527-9534. DOI:10.1007/s13277-016-4845-0.

[15] 李雪, 曹浪, 甘敏, 等. MiR-200b通过调控PIK3CA/AKT通路抑制大鼠角膜血管新生[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(4): 407-413. DOI:10.16016/j.1000-5404.201909141.
LI X, CAO L, GAN M, *et al*. MiR-200b inhibits corneal angiogenesis in rats by regulating PIK3CA/AKT pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(4): 407-413. DOI:10.16016/j.1000-5404.201909141.

[16] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264. DOI:10.1016/j.cell.2019.01.021.

[17] POTENTE M, CARMELIET P. The link between angiogenesis and endothelial metabolism[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 43-66. DOI:10.1146/annurev-physiol-021115-105134.

[18] ZHU S, WANG H, ZHANG Z, *et al*. IGFBP-rP1-silencing promotes hypoxia-induced angiogenic potential of choroidal endothelial cells *via* the RAF/MEK/ERK signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 4837-4847. DOI:10.3892/mmr.2020.11578.

[19] GUO C M, ZHAO D T, ZHANG Q L, *et al*. MiR-429 suppresses tumor migration and invasion by targeting CRKL in hepatocellular carcinoma *via* inhibiting Raf/MEK/ERK pathway and epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2375. DOI:10.1038/s41598-018-20258-8.

[20] ZHANG F, CAO H. MicroRNA-143-3p suppresses cell growth and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma *via* targeting the k-Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2019, 54(2): 689-701. DOI:10.3892/ijo.2018.4655.

[21] WU R S, QIU E H, ZHU J J, *et al*. MiR-101 promotes nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis through inhibiting Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(16): 8240. DOI:10.26355/eurrev_202008_22580.

(收稿:2021-03-12;修回:2021-04-05)
(编辑 张 维)