眼科研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000324

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

毛祷旋[1],胡 雁[2],侯胜平[3],周善璧[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属大学城医院眼科,重庆 401331;
3. 眼科学重庆市市级重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究微小 RNA(MicroRNA)在大鼠角膜缘新生血管中的表达,分析其与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)血管生成信号通路间的相关性,探讨 MicroRNA 在角膜缘新生血管中的作用。**方法**:采用缝线法建立 SD 大鼠角膜缘新生血管模型,选择 LAN MicroRNA 芯片,采用酶标记方法标记样品,将样品与芯片探针杂交,对表达谱芯片结果进行分析。**结果**:明显差异表达 MicroRNA 为 16 个,其中上调 10 个,下调 6 个。明显上调的 MicroRNA 有:miR-142、miR-146、miR-21、miR-223、miR-214、miR-199、miR-483、miR-322、miR-126 miR-1224; 明显下调的有 miR-30e、miR-101、miR-184、miR-200c、miR-200b、miR-204。其中与 VEGF 信号通路密切相关的有:miR-142、miR-146、miR-21、miR-223、miR-199、miR-322、miR-200、miR-30e、miR-204、miR-1224。通过检索,miR-142 miR-200 和 miR-322 与 VEGF 相关基因重合最多。**结论**:miR-142 miR-200 和 miR-322 在大鼠角膜缘新生血管模型中差异表达显著且与 VEGF 信号通路密切相关。

【关键词】角膜新生血管;微小 RNA;基因芯片;血管内皮生长因子

【中图分类号】R772.2 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2014-01-24

作者介绍:毛祷旋,Email:4359446@qq.com,
研究方向:角膜及眼表疾病。

通信作者:周善璧,Email:zhoushanbi@aliyun.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://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxb.000324.html

5 结 论

本文根据视网膜眼底图像的特点,首先通过高帽、低帽变换,去除背景的干扰;然后利用有限对比度自适应直方图均衡化,改善图像光照不均的现象;在此基础上,通过二维匹配滤波进一步增强血管对比度,大大改善了视网膜眼底图像的视觉效果,便于医生的临床分析和诊断。本文提出的方法相对于传统单一的增强算法而言能够获得更好的增强效果,对视盘和病变区域的增强效果同样显著。该方法不仅适用于正常眼底图像,同样适用于存在眼底病变的图像。

参 考 文 献

[1] Patton N,Aslam TM,Macgillivray T,et al.Retinal image analysis:concepts,applications and potential[J].Progress in Retinal and Eye Research,2006,25(1):99-127.

[2] Polli R,Valli G.An algorithm for real-time vessel enhancement and detection[J].Computer Methods Programs Biomedical,1997,52(1):1-22.

[3] Lin TS,Zheng YB.Adaptive image enhancement for retinal blood vessel segmentation[J].Electronics Letters,2002,38(19):1090-1091.

[4] Manniesing R,Viergever MA,Niessen WJ.Vessel enhancing diffusion:a scale space representation of vessel structures[J].Medical Image Analysis,2006,10(6):815-825.

[5] Feng P,Pan Y,Wei B,et al.Enhancing retinal image by the contourlet transform[J].Pattern Recognition Letters,2007,28(4):516-522.

[6] Chen J,Tie J,Tang Z,et al.Retinal vessel enhancement and extraction based on directional field[J].Journal of X-Ray Science and Technology,2008,16(3):189-201.

[7] 刘尚平,陈 骥.基于 Gabor 滤波与数学形态学的视网膜图像增强方法[J].光电子激光,2010,21(2):318-322.

[8] 章毓晋.图像工程(中册)图像分析[M].2 版.北京:清华大学出版社,2005:413-417.

[9] 杨 有,李 波.CLAHE 和细节放大相结合的档案图像增强方法[J].中国图象图形学报,2011,16(4):522-527.

[10] Chaudhuri S,Chatterjee S,Katz N,et al.Detection of blood vessels in retinal images using two-dimensional matched filters[J].IEEE Transactions on Medical Imaging,1989,8(3):263-269.

[11] Mohammed AR,Munib Q,Mohammed A.An improved matched filter for blood vessel detection of digital retinal images[J].Computers in Biology and Medicine,2007,37(2):262-267.

(责任编辑:关蕴良)

Correlation between microRNA expression profiles and VEGF of corneal neovascularization in rats

Mao Yini[1], *Hu Yan*[2], *Hou Shengping*[3], *Zhou Shanbi*[2]

(*1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*;
2. Department of Ophthalmology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University;
3. Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology)

【Abstract】***Objective***: To study differential microRNAs(miRNAs) expression profiles in rat corneal neovascularization(CNV) using microarrays, to establish the potential link between microRNAs and vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling pathways and to investigate the function of neovascularization in corneal limbus. ***Methods***: Corneal neovascular model in rats was constructed by corneal stitch. The LAN microarrays were selected and samples were labeled and hybridized with microarray. The results of LAN microarrays were analyzed. ***Results***: Sixteen miRNAs were predicted to target emcee of CNV including 10 miRNAs expressing as up-regulation and 6 miRNAs expressing as down-regulation. The miRNAs expressing as up-regulation included miR-142, miR-146, miR-21, miR-223, miR-214, miR-199, miR-483, miR-322, miR-126 and miR-1224. The miRNAs expressing as down-regulation included miR-30e, miR-101, miR-184, miR-200c, miR-200b and miR-204. The miRNAs correlated significantly with VEGF included miR-142, miR-146, miR-21, miR-223, miR-199, miR-322, miR-200, miR-30e, miR-204, miR-1224. miR-142 miR-200 and miR-322 correlated most with VEGF. ***Conclusion***: Differential expression of miR-142 miR-200 and miR-322 in the rat model of corneal neovascularization is closely associated with VEGF signaling pathway.

【Key words】corneal neovascularization; microRNA; gene chip; vascular endothelial growth factor

角膜新生血管破坏了正常角膜相对的“免疫赦免”状态，是角膜移植排斥反应的重要危险因素，而角膜移植排斥反应是角膜移植失败的主要原因。正常角膜透明、无血管，一旦维持角膜无血管的平衡因素被破坏（如感染性、免疫性、外伤性等疾病发生时），角膜缘的毛细血管逐渐向角膜内生长，形成角膜新生血管。虽然新生血管对感染消除、创伤愈合、抑制免疫介导的角膜溶解有一定积极作用，但其结构和功能不完善，容易发生血浆渗漏，造成角膜水肿、脂质沉着以及角膜瘢痕化，严重影响视力，也使角膜移植排斥反应的发生率大大增加。

微小 RNA（MicroRNA）是非编码的单链小分子 RNA，据推测人类 MicroRNA 具有调控人类 30%~50%基因的潜能，通过 3’端非翻译区（3’UTR）与 mRNA 相互作用，靶基因 mRNA 编码区受 MicroRNA 调控，蛋白翻译过程也受 MicroRNA 调控[1]。研究发现 MicroRNA 能够与其靶基因结合调控蛋白翻译过程，调控着发育、细胞增殖、分化、凋亡等生物学进程[2]。MicroRNA 对靶基因的调控具有“多向性”，一种 MicroRNA 可以调控多种不同基因通路中的蛋白质翻译过程[3]；有可能单个的 MicroRNA 能调控VEGF 相关的多条分子信号通路，影响角膜缘血管向透明角膜区域的生长。

本研究以“MicroRNA-血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）血管生成信号通路-角膜新生血管”为主线，通过缝线诱导的大鼠角膜缘新生血管动物模型和基因芯片技术，从新生血管化角膜缘表达的 MicroRNA 这一新的切入点，探讨MicroRNA 在角膜新生血管中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

选取健康、雌性、体质量（180±20）g SD 大鼠 3 只，重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠角膜缘新生血管模型的制作 用 1%戊巴比妥钠腹腔注射诱导全身麻醉，然后统一右眼（右眼作为实验眼；左眼为空白对照眼）滴盐酸奥布卡因滴眼液角膜表面麻醉。在手术显微镜下用 10-0 号尼龙线铲针穿过角膜基质层间断缝合 4 针（3 点、6 点、9 点、12 点 4 个钟点位置），自距离角膜缘略小于 1.0 mm（圆规定位）向瞳孔中心方向进针。另 1 眼不作处理、作为正常对照眼。术后双眼均每日滴 2 g/L 洁霉素眼液 3 次点眼同时检查（手电筒照射）缝线有无脱落，若有脱落、及时原位或原进针点旁补缝，同一位点缝线 2 次以上脱落则剔除分析。

1.2.2 术后用药及临床观察 术后术眼给予洁霉素滴眼，3 次/d，共 7 d。自术后第 1 天起观察角膜新生血管生长情况。由于手术等原因造成感染、前房出血、前房积脓、缝线局部水肿糜烂严重者、缝线脱失>2 次者视为角膜新生血管模型失败，不列为实验范围，并及时补充实验动物。

1.2.3 收集新生血管性角膜缘 7 d 后，脊髓脱臼法处死大

鼠，用角膜剪沿角膜缘外约 1 mm 距离取出角膜，沿角膜缘修建角膜，去除虹膜，用 4 mm 环钻取出中央角膜，保留角膜缘。

1.2.4 RNA 分离和定量 角膜缘组织样本被立即冻结在液氮中用于 RNA 分离。RNA 的提取使用细胞裂解液试剂（Ambion#AM1561），用于 MicroRNA 芯片分析，用琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的质量和纯度，样品溶解在无酶水中，并-80 ℃储存。

1.2.5 MicroRNA 样品的酶标记 利用 T4 RNA 连接酶标记方法进行荧光标记，然后再用无水乙醇沉淀，吹干后用于芯片杂交。

1.2.6 杂交与清洗 将 RNA 溶于 45 μg 杂交液中，于 55 ℃杂交 20 h。杂交结束后，先在 37℃左右含 Triton X-102、基因表达缓冲液的液体中过夜，玻片甩干后即可用于扫描。

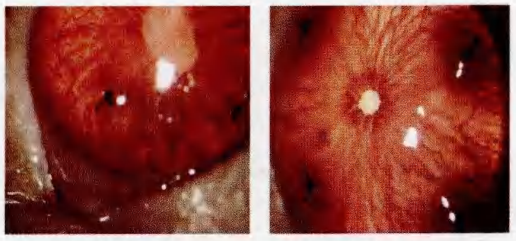
1.2.7 芯片扫描 芯片由上海伯豪公司进行扫描。

1.2.8 数据分析 采用 Agilent Feature Extraction(FE) software version 9.5.3 分析软件（上海伯豪公司）对芯片图像进行分析，把图像信号转化为数字信号。删除弱点和坏点，然后用 SAS 软件挑选差异表达基因，筛选条件是：显著性 P 值，设定阈值为 $P<0.05$，倍数差异（flod change，FC）不低于 2倍。

2 结 果

2.1 缝线法诱导新生血管模型

3 只大鼠通过缝线法均一次性造模成功（图 1）。



角膜缝线法诱导新生血管第 7 天，新生血管生长情况

图 1 角膜缘新生血管模型图（40×）

Fig.1 Models of corneal limbus neovascularization（40×）

2.2 总 RNA 提取结果

Trizol 一步法提取细胞中的总 RNA，通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA，用分光光度计定量。各组总 RNA 提取结果见表1，甲醛变性凝胶电泳 28S、18S RNA 条带比值>1.5 见图 2，表明 RNA 纯度及完整性较好。

2.3 角膜缘新生血管表达情况

从角膜缘组织提取的 50 ng/μl MicroRNA，使用安捷伦芯片 MicroRNA 标签和杂交试剂盒进行 MicroRNA 表达量分析，与对照空白组进行比对，得出 678 个 MicroRNA 在标本处理前后的表达情况。利用 Agilent Feature Extraction（FE）software version 软件对 MicroRNAs 芯片结果进行 SAS 分析处理，设定参数为 FC=2，得到诱导角膜缘新生血管的 MicroRNA 的差异表达散点图（图 3）。

表 1 RNA 检测结果

Tab.1 Results of RNA extraction

序号	样本名称	浓度（μg/μl）	体积（μl）	总量（μg）	A_{260nm}/A_{280nm}	2100 Result RIN	2100 Result 28S/18S	结果
1	A1	0.108	100	10.75	2.01	8.2	1.6	合格
2	An1	0.055	100	5.51	1.99	8.6	1.4	合格
3	A2	0.074	100	7.36	2.04	8.0	1.6	合格
4	An2	0.028	100	2.81	1.91	8.0	1.8	合格
5	A4	0.031	100	3.08	1.94	8.6	1.9	合格
6	An4	0.025	100	2.53	2.08	8.9	1.3	合格

注：采用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的 total RNA 抽提，抽提所得 total RNA 经电泳质检合格后备用，RIN 指 RNA 质量检测标准，RIN ≥6.0 并且 28S/18S≥0.7，样品合格

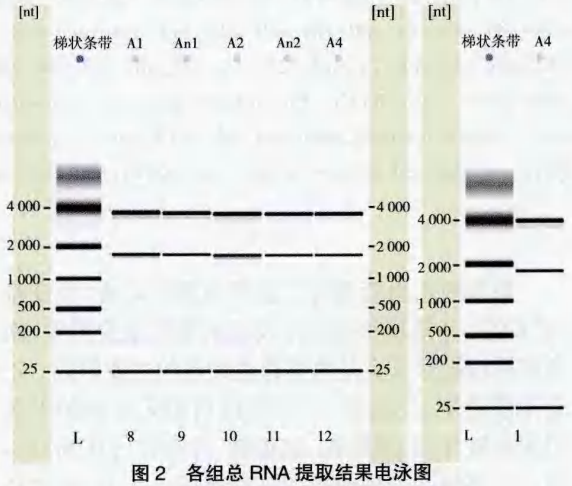
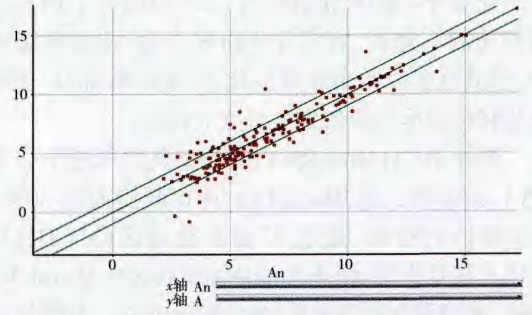


图 2 各组总 RNA 提取结果电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of total RNA



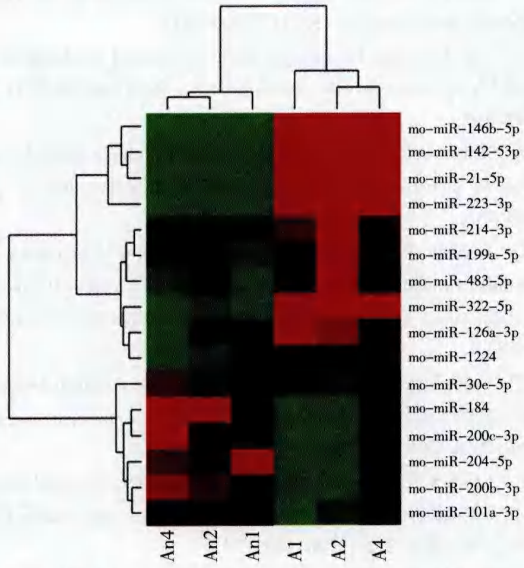
缝线法诱导角膜缘新生血管后，microRNA 的变化情况，X 轴为对照组数据；Y 轴为实验组数据；落在图形中 Y=X 直线（图上中位线）上的点，代表这个探针点在 2 张芯片中信号差异 FC=1；落在图形中位线 2 侧线外的点，其代表这个探针点在 2 张芯片中信号差异FC>2

图 3 差异基因散点图

Fig.3 Scatter plot of target gene

从图 3 可以看出，角膜缘新生血管 678 个 MicroRNA 的差异表达情况，其中上调的 MicroRNA 有 43 个，约占总体的 6%，下调的 MicroRNA 有 80 个，约占总体的 11%，无明显差异的 MicroRNA 有 555 个，约占总体的 81%。

为了进一步筛选出差异表达更明显的 MicroRNA，将参数设定为 Delta 阀值=10，FC≥2，通过软件进行统计分析得到，明显上调的基因有 10 个，明显下调的基因有 6 个。将结果进行聚类分析得到结果如图 4，从图中可以清晰的看出，新生血管组和正常对照组 3 个生物学重复标本基因差异表达量的情况。



横坐标是样品名称，纵坐标是探针号，每一行是一个探针，一个基因表达值就对应图上的一个矩形

图 4 新生血管角膜缘的 microRNA 的聚类图

Fig.4 Heatmap of microRNA

2.4 靶基因预测

通过 targetscan（www.targetscan.org）软件对以上得到的 MicroRNA 进行靶标预测筛选，从数据库资源中找出可以检索出来的 MicroRNA 的预测报表，结果如表 2。

表 2 MicroRNA 靶基因预测结果

Tab.2 Prediction of microRNA target genes

MicroRNA	靶基因
miR-142	Zfpm2、Fmr1、Hook3 等 466 个
miR-146	Nova1、Traf6、Heca 等 115 个
miR-21	Sf3a1、Ntf3、Zfp367 等 569 个
miR-223	Alcam、Acvr2a、Fbxo8 等 121 个
miR-214	Zbtb20、Naa15、Zfand3 等 265 个
miR-199	Synm、Sulf1、Vps41 等 175 个
miR-483	Sike1、Nup160、Btbd7 等 55 个
miR-322	Ccdc32、Mgat4a、Spta1 等 389 个
miR-126	LOC652956
miR-1224	Sos1、Alg2 等
miR-30e	Tnrc6a、Rapgef4、Bmp5 等 431 个
miR-204	Tnrc6b、Rbm41、Nr3c1 等 532 个
miR-184	Tpm3、Ppap2b、LOC302495 等 17 个
miR-200	Gpm6a、Zfp292 等 778 个
miR-101	Flrt3、Atxn1、Ube2d1 等 233 个

2.5 VEGF 相关的靶基因分析

通过 targetscan（www.targetscan.org）软件和 NCBI Entrez Gene 数据库分析 VEGF 相关靶基因，从数据库资源中可以检索出来的 MicroRNA-VEGF 相关的预测报表，结果如表 3。

表 3 MicroRNA-VEGF 靶基因预测结果

Tab.3 Prediction of microRNA-VEGF target genes

MicroRNA	靶基因
miR-142	Akt2、Kdr、Nfat5、Prkca
miR-146	Nfat5
miR-21	Nfatc3、Pik3ca
miR-223	Nfat5、Pik3ca
miR-199	Pik3cd
miR-322	Raf1、Vegfa、Kdr、Map2k1、Nfatc3
miR-1224	Mapk14、Prkcb
miR-30e	Nfatc3、Ppp3r1、Nfat5
miR-204	Chp2
miR-200	Pik3ca、Plcg1、Prkcb、Kdr

3 讨 论

MicroRNA 是一类广泛存在于真核生物中，大小约 19~22 个碱基的单链小分子 RNA，是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体，经过核酸内切酶加工后生成，能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对，引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译，从而对基因进行转录后表达的调控。MicroRNA 为细胞内源性小 RNA，可以干扰靶基因的表达，其表达量越高，对靶基因表达的抑制作用越强，而当其低表达时，则靶基因的表达可能越高。这就是 MicroRNAs 的下调意味着其靶基因的表达上调，MicroRNAs 的上调，可能意味着其靶基因的表达下调。

MicroRNAs 通过 VEGF 信号通路调控非角膜组织中血管新生过程。Fasanaro 等[4]发现缺氧能促进内皮细胞中 miR-210 表达逐渐增多，常氧细胞中过表达 miR-210 能促进 VEGF 诱导的细胞迁移和基质胶上管腔形成。研究表明在敲出 miR-126 基因的心机梗死细胞中，多数与血管生成、细胞黏附、炎症信号和细胞周期调控相关的基因表达上调，新生小鼠血管内皮细胞增殖、迁移受限，导致血管内膜不完整、血管形成障碍，其机制可能是 miR-126 通过增强 VEGF 下游的丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号，抑制Spred-1 表达而促进血管形成和维持血管完整[5]。保守的基因和血流机械刺激塑造了胚胎血管系统，Nicoli 等[6]在主动脉弓

发育试验中发现血流机械流动刺激保守的机械敏感锌指蛋白转录因子 kif2a，诱导内皮特异性的 MicroRNA（miR-126）的表达，进而激活 VEGF 信号，引发血管新生。

本实验杂交后，MicroRNA 芯片的扫描结果显示 2 组样品中有效杂交信号点不多（共 16 个差异表达），但检测到的有效杂交信号强度还是较高的，其原因主要与样品来源性质及个体差异有关。

本试验采用哺乳动物 MicroRNA 芯片技术首次在新生血管化角膜缘中筛选出 16 个有效的差异表达 MicroRNA，其中 10 个上调，6 个下调。通过生物信息学检索发现，这些差异表达的 MicroRNA 中，有 6 个 MicroRNA 其调节的靶基因与 VEGF 信号通路相关，这些靶基因包括参与细胞周期、增殖、分裂与迁移等[7]生命进程以及新生血管[8]发生发展过程中。实验结果提示：MicroRNA 可能通过 VEGF 信号通路参与新生血管的发病过程，某些重要 MicroRNA 表达水平的失衡可能是通过 VEGF 信号通路参与角膜缘新生血管发生、发展和演进过程中的重要分子事件。检索后发现：miR-142、miR-146、miR-21、miR-223、miR-322、miR-1224、miR-30e、miR-204、miR-200、miR-199 这 10 个差异表达的 microRNA 各自调控的靶基因达数百条，它们调节的靶基因中有部分与 VEGF 信号通路相关。特别是 miR-142、miR-200 和 miR-322，其各自调控的基因有 416 条、778 条和 389 条，其中与 VEGF 信号通路相关的有4条和 5 条。分别是：Akt2、Kdr[9]、Nfat5[10]、Prkca、Raf1[11]、Vegfa[12]、Map2k1、Nfatc3、Pik3ca、Plcg1、Prkcb。通过国内外文献检索后发现，这些靶基因在新生血管形成过程中，都发挥了重要作用。William 等[13]发现 miR-200 能阻塞人前列腺癌细胞自发转移和血管生成，Merlet 等[14]发现 miR-322 在大鼠体内调节血管平滑肌细胞表型和新生内膜形成。上述证据提示 miR-142，miR-200 和 miR-322 的表达失衡在角膜缘新生血管的发生、发展和演进过程中可能起着较为重要的作用。

本研究利用 MicroRNA 芯片技术和生物信息学的方法，筛选出角膜缘新生血管大鼠模型的差异表达谱，并初步预测了 miR-142 等 10 个差异表达的 MicroRNAs 可能通过 VEGF 信号通路参与了发病过程，为进一步研究 MicroRNA 在角膜缘新生血管中的分子机制提供了参考，而对筛选出的差异 MicroRNA 进行验证、细胞来源分析及功能学的研究将是下一步要开展的工作。

参 考 文 献

[1] Röther S, Meister G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs[J]. Biochimie, 2011, 93(11): 1905-1915.

[2] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.

[3] Smibert P, Lai EC. A view from Drosophila: Multiple biological functions for individual microRNAs[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(7): 745-753.

[4] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3[J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15878-15883.

[5] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261-271.

[6] Nicoli S, Standley C, Walker P, et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis[J]. Nature, 2010, 464(7292): 1196-1200.

[7] Lu X, Li X, He Q, et al. MiR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates[J]. Cell Res, 2013, 23(12): 1356-1368.

[8] Westenskow PD, Kurihara T, Aguilar E, et al. Ras pathway inhibition prevents neovascularization by repressing endothelial cell sprouting[J]. J Clin Invest, 2013, 123(11): 4900-4908.

[9] Ma J, Liu T, Dong X. Advanced glycation end products of bovine serum albumin-induced endothelial-to-mesenchymal transition in cultured human and monkey endothelial cells via protein kinase B signaling cascades[J]. Mol Vis, 2010(16): 2669-2679.

[10] Bruggemann LI, Mackie AR, Cribbs LL, et al. Differential?protein kinase C-dependent modulation of Kv7.4 and Kv7.5 subunits of vascular Kv7 channels[J]. J Biol Chem, 2014, 289(4): 2099-2111.

[11] Deng Y, Larrivee B, Zhuang ZW, et al. Endothelial RAF1/ERK activation regulates arterial morphogenesis[J]. Blood, 2013, 121(19): 3988-3996.

[12] Zhang Y, Qiu H, Zhang H, et al. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2013, 42(5): 344-348.

[13] Williams LV, Veiliceasa D, Vinokour E, et al. MiR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83991.

[14] Merlet E, Atassi F, Motiani RK, et al. MiR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat [J]. Cardiovasc Res, 2013, 98(3): 458-468.

（责任编辑：关蕴良）