

文章编号: 1001-6325(2023)07-1084-06

研究论文

miR-199-3p 通过靶向 *VegfA* 抑制大鼠糖尿病视网膜病变

周悦, 林静娜*

联勤保障部队第909医院, 福建漳州 363000

摘要:目的 探究 miR-199-3p 在糖尿病视网膜病变(DR)中的作用及其机制。方法 单次注射链脲佐菌素建立大鼠糖尿病模型, RT-qPCR 检测大鼠视网膜组织 miR-199-3p、血管内皮生长因子 A(VEGFA) 表达; 双荧光素酶实验验证 miR-199-3p 和 *VegfA* 的靶向关系; TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡; Western blot 检测 VEGFA、转化生长因子- β (TGF- β)、肝细胞生长因子(HGF)、色素上皮衍生因子(PEDF) 蛋白。结果 成功建立糖尿病模型大鼠, 且模型大鼠视网膜组织 miR-199-3p 显著下降, VEGFA 显著升高($P < 0.001$); miR-199-3p 靶向 *VegfA*。miR-199-3p 抑制显著降低视网膜神经节细胞数目, 增强视网膜细胞凋亡, 而抑制 *VegfA* 可显著减轻 miR-199-3p 抑制对视网膜细胞的损伤($P < 0.01$)。miR-199-3p 过表达后 TGF- β 1、HGF 显著降低, PEDF 升高($P < 0.001$), 而过表达 miR-199-3p 联合 VEGFA 可显著改变这种作用。结论 miR-199-3p 通过靶向 *VegfA* 抑制糖尿病大鼠视网膜病变。

关键词: miR-199-3p; VEGFA; 糖尿病视网膜病变; 视网膜神经节; 视网膜细胞

中图分类号: R587.1 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.07.1084

miR-199-3p inhibits diabetes retinopathy in rats by targeting at *VegfA*

ZHOU Yue, LIN Jingna*

909 Hospital, the Joint Logistic Support Force, Zhangzhou 363000, China

Abstract: Objective To study the role and mechanism of mir-199-3p in the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR). **Methods** The diabetic model of rats was established by injection of streptozotocin. The expression of miR-199-3p and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in the retina of rats was detected by RT-qPCR. The targeting relationship between miR-199-3p and *VegfA* in retinal cells was studied by dual luciferase assays. Apoptosis of retinal cells was evaluated by TUNEL staining. Protein of VEGFA and transforming growth factor- β (TGF- β), Hepatocyte growth factor (HGF), pigment epithelium derived factor (PEDF) were detected by Western blot. **Results** The retinal staining showed that the pathological changes such as retinal capillary dilation and vascular curvature in diabetic rats. The results of reverse transcription showed that the expression of miR-199-3p decreased and VEGFA increased in the retina of diabetic rats significantly. The targeting relationship between miR-199-3p and *VegfA* was confirmed by dual luciferase assays. The low-expression of miR-199-3p significantly reduced the number of retinal ganglion cells and enhance the apoptosis of retinal cells, while the low expression-

收稿日期: 2022-09-19 修回日期: 2022-12-31

基金项目: 福建医学科技青年培育项目(18FBQN2016017)

* 通信作者 (corresponding author): 1802069983@163.com

miR-199-3p and VEGFA significantly reversed the effects of miR-199-3p on retinal cells ($P < 0.01$). Western blot results showed that the expression of TGF- β and HGF decreased significantly after over-expression of miR-199-3p with the increased expression of PEDF ($P < 0.001$). However, over-expression of miR-199-3p combined with VEGFA expression significantly reversed the expression of these proteins. **Conclusions** miR-199-3p inhibits diabetic retinopathy by targeting at *VegfA*.

Key words: miR-199-3p; VEGFA; diabetic retinopathy; retinal ganglion; retinal cells

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是全球最常见的代谢疾病,到 2030 年,糖尿病将成为人类死亡的第七大原因^[1]。由于体内过高的血糖水平,糖尿病可引起一系列并发症,如微血管病变 (视网膜病变、肾病和神经系统疾病) 和大血管并发症 (动脉粥样硬化)^[2]。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 主要表现为血管渗透性增加和血管闭塞,是成人视力损害和失明的主要原因^[3]。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一种单链非编码 RNA,在转录后水平上负调控基因表达^[4]。新近的研究认为 miRNAs 不仅在糖尿病发生过程中起到重要作用^[5],一些 miRNAs (miRNA-146、miRNA-195) 参与了 DR 进展^[6],而 miR-199-3p 在 DR 中的作用却未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:大鼠视网膜 Muller 细胞 (美国菌种保藏中心), RNeasy 试剂盒、Taq PCR Master Mix (中国 Qiagen 公司); miR-199-3p mimic、OE-VEGFA (GenePharma 公司); Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa 公司); RIPA 裂解液 (Solarbio 公司); 二奎啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司); 右旋糖酐及其余试剂 (Sigma-Aldrich 公司)。

1.1.2 实验动物 无特征病原体 (specific pathogen free, SPF) SD 大鼠雄性,体质量 200~250 g [福建医科大学实验动物中心 (SCXK-2021-03)], 饲养在 SPF 级动物房内,温度 (23±1) °C,昼夜循环 12 h,动物均可自由进食进水。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理:大鼠被随机分为 7 组:1) 对照

(Ctrl) 组; 2) 糖尿病模型 (model) 组; 3) Ctrl + miR-199-3p 阴性对照 (miR-NC) + 过表达 VEGFR 对照 (OE-Con) (Ctrl + miR-NC + OE-Con) 组; 4) model + miR-NC + OE-Con (model + miR-NC + OE-Con) 组; 5) model + miR-199-3p-抑制剂 (miR-inhibitor) + OE-Con (model + miR-inhibitor + OE-Con) 组; 6) model + miR-199-3p 模拟物 (miR-mimic) + OE-Con (model + miR-mimic + OE-Con) 组; 7) model + miR-mimic + 过表达 VEGFA (OE-VEGFA) (model + miR-mimic + OE-VEGFA) 组, 每组 12 只。模型大鼠通过单次注射链脲佐菌素 (STZ, 65 mg/kg) 建立糖尿病模型, 对照大鼠注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。上述各组病毒 (Lentivirus) 由上海吉凯基因公司制备并在预实验中验证了相应的感染效率及效果。病毒在造模后注射至大鼠玻璃体 (5 μ L, 3 μ mol/L) 内, 6 周后重复注射并在 3 个月取材并进行相关分析。为了确定造模的成功, 在造模结束后随机选取 3 只动物, 左心室注射 50 mg/mL FITC 标记的右旋糖酐。摘取眼睛后用 4% 的多聚甲醛固定切片, 在荧光显微镜 (ZEISS) 下观察视网膜组织以确定实验动物模型血管的变化。所有动物实验都遵从动物福利 3R 原则, 本实验通过联勤保障部队第 909 医院伦理审核。阴性对照载体 (miR-NC)、miR-199-3p 模拟物 (miR-mimic; 10 pmol/L)、过表达 VEGFA 载体 (OE-VEGFA; 2 mg/mL), 经 Lipofectamine 2000 转染视网膜细胞 (Müller 细胞系)。

1.2.2 视网膜细胞的培养: 将大鼠视网膜 Müller 细胞, 在 37 °C 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中于 DMEM 培养基, 培养并添加 10% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素。

1.2.3 视网膜组织的获取: 处死大鼠后, 快速摘除眼球, 10% 甲醛浸泡 12 h, 随后获得游离视网膜组织, 用于 TUNEL 染色, Image J 软件统计。

1.2.4 RT-qPCR 检测 miR-199-3p 和 *VegfA* 的 mRNA:

用 RNeasy 试剂盒从视网膜组织中提取总 RNA 并通过 Fermentas;K1622 试剂盒反转录成 cDNA, 在 Taq PCR Master Mix 体系中将 cDNA 用作 RT-qPCR 模板进行荧光 PCR, 在 PCR 体系中添加 SYBR® Premix Ex Taq™ II, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行量化分析。

1.2.5 双荧光素酶基因报告分析靶向关系: 取对数增殖期视网膜细胞接种于 96 孔板中 (1.5×10^4), 37°C , 5% CO_2 培养 24 h。然后将 miRNA mimic 以及对照病毒通过 Lipofectamin2000 转染细胞。培养 6 h 后更换培养基, 加入 PLB 裂解液置摇床 20 ~ 30 min。将上清液转移至不透光 96 孔酶标板中, 加入 100 μL 预先混好的 Luciferase Assay Reagent II, 检测荧光素酶反应强度。

1.2.6 Western blot 检测 VEGFA、TGF- β 1、HGF、PEDF、GAPDH 蛋白: RIPA 裂解细胞后取全蛋白质并用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量, 取相同体积蛋白质样品 SDS-PAGE 分离。电泳结束后蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭。随后加入一抗 (anti-VEGFA, 稀释 1 000 倍, anti-TGF- β 1, 稀释 500 倍, anti-HGF, 稀释 200 倍, anti-PEDF, 稀释 500 倍, anti-GAPDH, 稀释 1 000 倍) 4°C 孵育过夜, 第 2 天加入 HRP 偶联的二抗 (稀释 1 000 倍) 4°C 孵育 1 h。ECL 法显影曝光, 胶片扫描后 Image J 软件扫描吸光度值。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 进行数据的统计分析。计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析 (One-way Anova)。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠视网膜病理改变以及 miR-199-3p 表达变化

糖尿病模型大鼠视网膜毛细血管扩张, 血管弯曲, 间质水肿, 视网膜直径不规则。而对照组大鼠视网膜血管分支光滑, 直径均匀 (图 1A)。相比于对照组, 糖尿病模型大鼠视网膜组织中, miR-199-3p 表达水平显著降低 ($P < 0.01$) (图 1B)。

2.2 miR-199-3p 与 Vegfa 的靶向关系

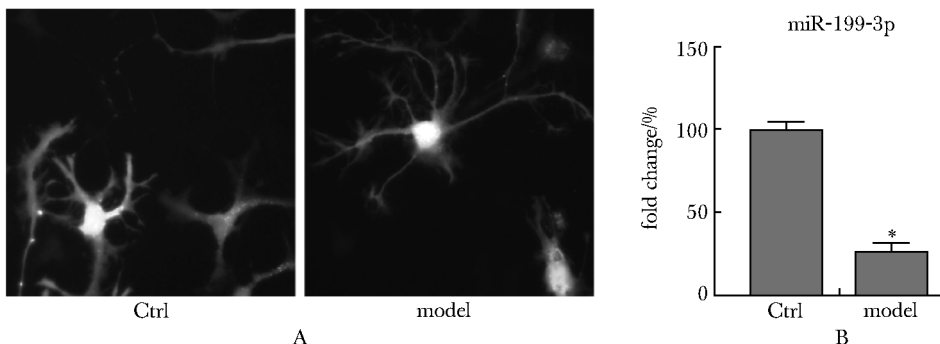
模型大鼠视网膜组织中 VEGFA 表达显著升高 ($P < 0.001$) (图 2A), TargetScan 在线软件筛选了其潜在靶点, 发现 Vegfa 为其靶点之一 (图 2B)。在 WT 组视网膜细胞中, 转染了 miR-199-3p mimic 组的 Vegfa 相对荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.001$) (图 2B)。

2.3 miR-199-3p 对糖尿病大鼠视神经的影响

糖尿病大鼠视网膜凋亡显著升高 ($P < 0.001$), 敲低 miR-199-3p 后凋亡程度进一步加重, 而过表达 miR-199-3p 后凋亡程度降低 ($P < 0.001$), 然而过表达 miR-199-3p 同时过表达 VEGFA 表达后, 糖尿病大鼠视网膜凋亡显著升高 ($P < 0.01$)。

2.4 miR-199-3p 抑制视网膜病变

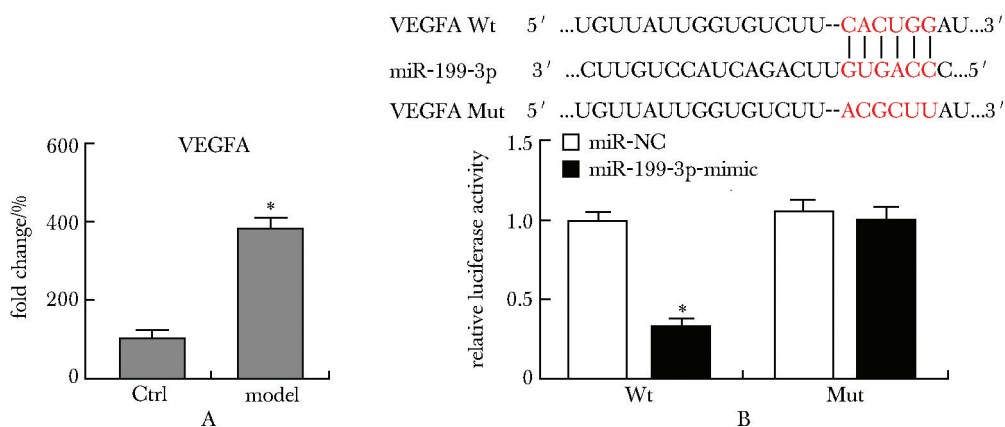
糖尿病大鼠视网膜组织中 VEGFA、TGF- β 1 和 HGF 表达显著升高 (图 4, $P < 0.001$), PEDF 表达显著下降 ($P < 0.001$) (图 4)。过表达 miR-199-3p 后, 糖尿病大鼠视网膜组织中 VEGFA、TGF- β 1 和 HGF 表达显著降低, PEDF 表达升高 ($P < 0.01$) (图 4)。



A. representative images of retina ($\times 200$); B. expression of miR-199-3p in retina; * $P < 0.01$ compared with Ctrl.

图 1 糖尿病大鼠视网膜病理改变以及 miR-199-3p 表达变化

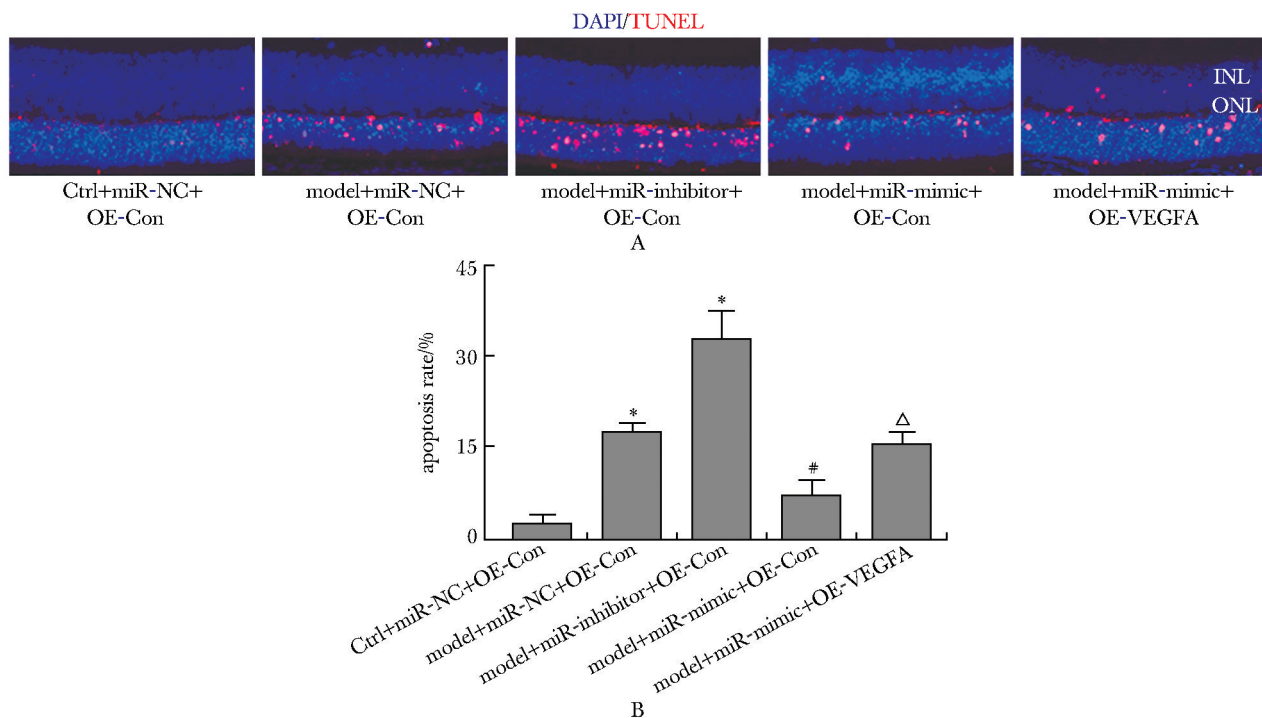
Fig 1 Morphological changed of retina and miR-199-3p expression between the model and normal control rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)



A. expression of VEGFA in retina; B. identification of *Vegfa* as potential target of miR-199-3p and relative luciferase activity of Wt and Mut; * $P < 0.001$ compared with Ctrl or miR-NC.

图2 miR-199-3p 与 *Vegfa* 的靶点验证

Fig 2 Target validation of miR-199-3p and *Vegfa* ($\bar{x} \pm s, n = 9$)



A. TUNEL results of retina cell ($\times 100$); B. statistic results of apoptosis rate of retina cell; * $P < 0.001$ compared with Ctrl+OE-Con; # $P < 0.001$ compared with model+miR-inhibitor+OE-Con; $\Delta P < 0.001$ compared with model+miR-mimic+OE-Con.

图3 miR-199-3p 和 VEGFA 对糖尿病大鼠神经节 (GCL) 细胞层细胞凋亡的影响

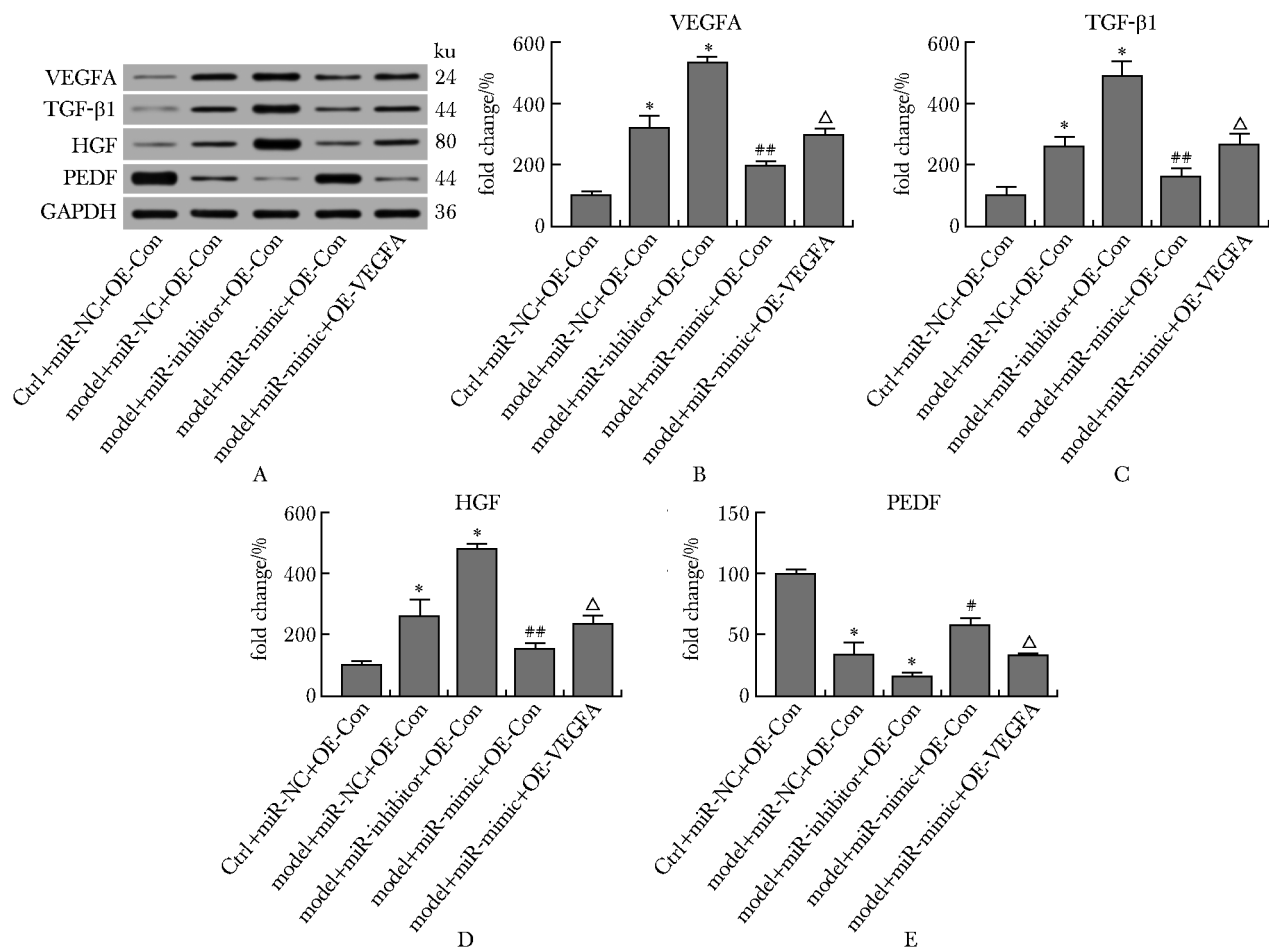
Fig 3 Effect of miR-199-3p and VEGFA on GCL cell and apoptosis of retina ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

同时过表达 miR-199-3p 和 VEGFA 后可显著减轻这些蛋白的表达变化 ($P < 0.01$)。

3 讨论

随着糖尿病在全球的流行,DR 患者也日益增多,

新的治疗手段对 DR 患者的额康复具有十分重要的意义。本研究结果发现在单次注射链脲佐菌素可引起大鼠视网膜病变,同时发现 miR-199-3p 表达降低。双荧光素实验结果显示, *Vegfa* 是 miR-199-3p 的作用靶点,干扰 VEGFA 可逆转 miR-199-3p 过表达



A. Western blot results; B. VEGFA; C. TGF-β1; D. HGF; E. PEDF; * $P < 0.001$ compared with Ctrl+OE-Con; # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$ compared with model+miR-inhibitor+OE-Con; Δ $P < 0.01$ compared with model+miR-mimic+OE-Con.

图4 miR-199-3p 通过 VEGFA 抑制视网膜病变

Fig 4 miR-199-3p inhibited retinopathy through VEGFA ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

对视网膜的损伤。

微小 RNA(miRNA)是一类小的非编码 RNA 现在的研究发现,miRNA 参与调节胰岛 β 细胞的功能,并且糖尿病状态下细胞内 miRNA 表达会发生变化^[5]。miRNA 有望成为糖尿病视网膜病变治疗的潜在靶点。miR-199-3p 在糖尿病小鼠心肌组织中表达异常^[7],在糖尿病患者尿液中低表达并可用于诊断微量白蛋白尿与大量白蛋白尿患者^[8],也有研究显示,miR-199-3p 在葡萄糖诱导的胰岛 β 细胞中上调^[9],其在糖尿病中的作用仍需深入探究。本研究实验结果显示,糖尿病模型大鼠视网膜组织中 miR-199-3p 表达显著下降,这与报道的实验结果相一致^[7-8],而与另一篇文献的实验结果相悖^[9]。与此同时还发现 VEGFA 在模型大鼠视网膜组织中表达升高,随后的双荧光素酶实验

证实了 *Vegfa* 和 miR-199-3p 的靶向关系。

血管内皮细胞主要参与血管形态、稳态和功能的调控,血管生成主要受到 VEGF 调控^[10]。新近的研究表明,VEGFA 在糖尿病微血管病变中起到重要作用。VEGFA 在糖尿病大鼠肾脏中表达显著升高^[11],同时发现糖尿病大鼠视网膜内核层及节细胞中 VEGFA 表达显著升高^[12],一些研究也表明,VEGF 基因、miR-199-3p 与 DR 的严重程度密切相关^[13]。

视网膜 GCL 细胞是视网膜中输出视觉信号到大脑视觉中心的最终神经元,神经节细胞死亡直接导致了视力损失^[14]。通过 HE 和 TUNEL 染色实验发现,miR-199-3p 过表达可显著降低 GCL 细胞数目并增强视网膜细胞凋亡。同样,蛋白质免疫印迹实验结果显示,miR-199-3p 过表达后视网

膜病变相关蛋白 TGF- β 1 和 HGF 表达显著降低, PEDF 表达升高。而过表达 miR-199-3p 同时过表达 VEGFA 表达后可逆转这些蛋白的表达。然而近期的研究结果显示, VEGFA 既可以促进血管新生也可以诱导血管退化^[15], VEGFA 在糖尿病视网

膜病变中具体是促进血管新生还是诱导其退化还需要进一步研究。

综上所述, 本研究发现 miR-199-3p 通过靶向 *VegfA* 抑制糖尿病大鼠视网膜病变, 为 DR 治疗提供了新的靶点。

参考文献:

- [1] Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, *et al.* Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127:S1-S7.
- [2] 成海梅, 张利, 陈香美. 糖尿病肾病与糖尿病视网膜病变的相关性研究进展[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8:85-90.
- [3] 刘辰, 方思尹, 顾操, 等. 抗视网膜脉络膜新生血管性疾病治疗药物靶点的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42:325-329.
- [4] Zimmermann N, Knief J, Kacprowski T, *et al.* MicroRNA analysis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases[J]. *Oncotarget*, 2018, 9:28379-28390.
- [5] 陈向武, 赵颖熙. 基因治疗与眼部纤维化疾病[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34:1289-1292.
- [6] 刺梅, 李江, 孙继红, 等. 血清 miRNA-146, miRNA-195 检测在糖尿病视网膜病变中的临床应用[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 12:113-120.
- [7] 刁雪红, 申锷, 胡兵, 等. 糖尿病小鼠心肌组织 miRNA 表达谱分析[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, 10:20-24.
- [8] Meng L, Li G, Liu X, *et al.* Decreased urine miR-199-3p may be a potential biomarker for diabetic nephropathy via targeting zinc finger e-box-binding protein 1 [J]. *Clin Lab*, 2018, 64: 1177-1182.
- [9] Joao PWC, Manuel BR, Denise HK, *et al.* Glucose stimulates microRNA-199 expression in murine pancreatic β -cells[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 1261-1270.
- [10] Wang JJ, Wu KF, Wang DD. A novel regulatory network of linc00174/miR-150-5p/VEGFA modulates pathological angiogenesis in diabetic retinopathy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99:1175-1183.
- [11] Huang X, Liang P, Jiang B, *et al.* Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118246-118269. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118246.
- [12] 宋鄂, 徐琪, 王心蕊, 等. 血管内皮生长因子在糖尿病大鼠视网膜中的表达[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 1:43-45.
- [13] Wang L, Liu WX, Huang XG. MicroRNA-199-3p inhibits angiogenesis by targeting the VEGF/PI3K/AKT signalling pathway in an *in vitro* model of diabetic retinopathy[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 116: 104488-104503. doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104488.
- [14] Wang W, Ann C, Yu Q, *et al.* Programmed cell death-1 is expressed in large retinal ganglion cells and is upregulated after optic nerve crush [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 140:1-9.
- [15] Pan W, Pham VN, Stratman AN, *et al.* CDP-diacylglycerol synthetase-controlled phosphoinositide availability limits VEGFA signaling and vascular morphogenesis [J]. *Blood*, 2019, 120:489-498.