

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.010

## miR-939-5p 对糖尿病视性网膜病变和视网膜微血管内皮细胞的调控作用 \*

刘 轩<sup>1</sup> 程育宏<sup>1</sup> 齐 赞<sup>1</sup> 崔丽珺<sup>1</sup> 丁国龙<sup>2</sup> 杨 文<sup>3</sup> 陈 丽<sup>1</sup> 谢安明<sup>1</sup> 康前雁<sup>1</sup>

(1 西安交通大学第一附属医院眼科 陕西 西安 710061; 2 西安市第一医院眼科 陕西 西安 710002;

3 西安市第四医院眼科 陕西 西安 710004)

**摘要 目的:**探究 miR-939-5p 对糖尿病性视网膜病变和人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)的调控作用。**方法:**将 miR-939-5p 模拟物(miR-939-5p-mimic)或 miR-939-5p 抑制剂(miR-939-5p-inhibitor)转染到 HRMEC 中,并将细胞用高糖(HG 组,25 mM)或低糖(LG 组,5 mM)处理 24 h。通过细胞计数试剂盒 8(CCK-8)来检测细胞活力,EdU 法检测细胞 DNA 的复制能力,Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡,使用双荧光素酶试剂盒 E2920 验证 miR-939-5p 与 NOS2 3'-UTR 之间的结合关系。对大鼠腹腔注射 65 mg/kg 的链脲佐菌素(STZ)诱导 DR 模型,通过 RT-qPCR 检测 miR-939-5p 水平,Western Blot 检测诱导型一氧化氮合酶(NOS2)水平,苏木精伊红(HE)染色检查大鼠视网膜形态,免疫组织化学染色检测视网膜 Claudin-5 和 Occludin 的表达,伊文思蓝染色检测大鼠血视网膜屏障(BRB)通透性,ELISA 法检测大鼠房水中白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平。**结果:**与 LG 组的 HRMEC 相比,HG 组的 miR-939-5p 显著降低,而 NOS2 蛋白水平显著升高( $P<0.05$ )。荧光素酶活性测定显示,与 NC-mimic 组相比,miR-939-5p-mimic 与 pGL3-NOS2-WT 共转染组的荧光素酶活性显著降低( $P<0.05$ )。与 HG+NC-mimic 组相比,HG+miR-939-5p-mimic 组的 miR-939-5p 水平和细胞活力显著升高,而 NOS2 蛋白水平和细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ )。与 DR 组相比,miR-939-5p-AgomiR 组大鼠视网膜组织病变减轻,Claudin-5 和 Occludin 的表达水平明显升高,伊文思蓝浓度显著降低( $P<0.05$ );与 DR 组相比,miR-939-5p-AgomiR 组大鼠房水中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平均显著降低( $P<0.05$ )。**结论:**在高糖培养的 HRMEC 中和 DR 大鼠视网膜中,miR-939-5p 为低表达模式,NOS2 为高表达模式。上调 miR-939-5p 通过靶向抑制 NOS2 对 DR 大鼠视网膜和 HRMEC 提供保护作用。

**关键词:**糖尿病性视网膜病变;miR-939-5p;诱导型一氧化氮合酶;人视网膜微血管内皮细胞

中图分类号:R-33;R774.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)22-4249-07

## The Regulatory Effect of miR-939-5p on Diabetic Retinopathy and Retinal Microvascular Endothelial Cells\*

LIU Xuan<sup>1</sup>, CHENG Yu-hong<sup>1</sup>, QI Yun<sup>1</sup>, CUI Li-jun<sup>1</sup>, DING Guo-long<sup>2</sup>, YANG Wen<sup>3</sup>, CHEN Li<sup>1</sup>, XIE An-ming<sup>1</sup>, KANG Qian-yan<sup>1</sup>

(1 Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Department of Ophthalmology, Xian No.1 Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

3 Department of Ophthalmology, Xian Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the regulatory effect of miR-939-5p on diabetic retinopathy (DR) and human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC). **Methods:** miR-939-5p-mimic or miR-939-5p-inhibitor was transfected into HRMEC, and the cells were treated with high glucose (HG, 25mM) or low glucose (LG, 5mM) for 24 hours. Cell viability was detected by cell counting kit 8 (CCK-8), DNA replication ability was detected by EdU method, and apoptosis was detected by Hoechst33258 staining. The binding relationship between miR-939-5p and NOS2 3'-UTR was verified by double luciferase kit E2920. The rat model of DR was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) of 65mg/kg. The level of miR-939-5p was detected by RT-qPCR, the level of inducible nitric oxide synthase (NOS2) was detected by Western Blot, the morphology of rat retina was examined by hematoxylin-eosin (HE) staining, the expression of Claudin-5 and Occludin was detected by immunohistochemical staining, and the permeability of the blood retinal barrier (BRB) in rats was detected by Evans blue staining. The levels of interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in aqueous humor of rats were detected by ELISA. **Results:** Compared with HRMEC in LG group, miR-939-5p in HG group was significantly reduced, while NOS2 protein level was significantly increased ( $P<0.05$ ). The luciferase activity measurement showed that, compared with NC-mimic group, the luciferase activity of the miR-939-5p-mimic and pGL3-NOS2-WT co-transfected group was significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with HG+NC-mimic group, the miR-939-5p level and cell viability of HG+miR-939-5p-mimic group were significantly increased, while the NOS2 protein level and the apoptosis rate were significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with DR group, rats in miR-939-5p-AgomiR group had less retinal tissue lesions, the expression levels of Claudin-5 and Occludin were significantly

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81800824);陕西省自然科学基金研究计划项目(2020JM-400);陕西省自然科学基金项目(2020SF268)

作者简介:刘轩(1982-),男,硕士,主要研究方向:眼科临床,E-mail: MarkLiuX8@163.com

(收稿日期:2021-03-28 接受日期:2021-04-24)

increased, and the concentration of Evans blue was significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with DR group, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the aqueous humor of rats in miR-939-5p-Agomir group were significantly reduced ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** In the high glucose cultured HRMEC and DR rat retina, miR-939-5p is a low expression pattern, and NOS2 is a high expression pattern. Up-regulation of miR-939-5p provides a protective effect on the retina and HRMEC of DR rats by targeting NOS2.

**Key words:** Diabetic retinopathy; MiR-939-5p; Inducible nitric oxide synthase; Human retinal microvascular endothelial cells

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R774.1 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2021)22-4249-07

## 前言

目前,我国的糖尿病性视网膜病变(Diabetic retinitis, DR)发病率逐年上升<sup>[1]</sup>,抗新血管生成是治疗 DR 的有效策略之一,但这种方法无法有效恢复 DR 患者的视力<sup>[2]</sup>。因此,开发新的抗 DR 疗法具有重要意义。microRNA (miRNA) 在糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)发病机制中占有重要地位,提示 miRNA 可能是 DN 的诊断指标和有效的治疗靶标<sup>[3]</sup>。另外,多种 miRNA 参与视网膜细胞的增殖和凋亡以及与 DR 相关的新血管形成,并在 DR 发病中发挥促进或抑制作用<sup>[4]</sup>。其他研究报道,miR-939 在 1 型糖尿病和妊娠期糖尿病患者血清中表达水平降低<sup>[5]</sup>。还有研究报道,miR-939-5p 通过靶向诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)来调节人脐静脉内皮细胞的血管生成<sup>[6]</sup>。上述研究提示,miR-939 可能参与 DR 的发生过程。iNOS 的过度活化会导致多种炎症性疾病<sup>[6]</sup>。其他研究发现,NOS2 在 DR 患者和糖尿病大鼠模型的视网膜中异常高表达。一些研究还表明,在 DR 发病过程中,Müller 胶质细胞中 NOS2 的上调是造成 DR 血流动力学功能异常的主要原因之一<sup>[7]</sup>。并且,抑制 iNOS 通过降低 NO 水平从而改善了血管功能障碍<sup>[8]</sup>。

因此,本研究旨在揭示 miR-939-5p 在 DR 中的功能及其对视网膜微血管内皮细胞(Human retinal microvascular endothelial cells, HRMEC)的调控作用,以及验证上调 miR-939-5p 是否通过抑制 NOS2 来减轻 HRMEC 损伤,从而为 DR 的治疗提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

10%胎牛血清(FBS)、伊文思蓝购自美国 Sigma-Aldrich 公司;内皮基础培养基 2(EBM-2)购自瑞士 Lonza 公司;Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司;细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)购自日本 DOJINDO 公司;Cell-Light™ EdU 荧光显微镜检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司;Hoechst 33258 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pMIR-REPORT 荧光素酶报告载体购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;双荧光素酶试剂盒 E2920 购自美国 Promega 公司;RNAiso Plus、TRIzol LS Reagent、PrimeScript™ RT 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq 购自日本 TAKARA 公司;链脲佐菌素(STZ)、苏木精伊红(HE)染色试剂购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白酶抑制剂、NOS2 和  $\beta$ -actin 一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自瑞士 Roche 公司;Claudin-5 和 Occludin 一抗购自英国 Abcam 公司;生物素化的抗小鼠和抗兔 IgG 二抗、辣根过氧

化物酶链霉亲和素购自加拿大 Vector Laboratories 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;二氨基联苯胺(DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。从北京维通利华实验动物技术有限公司购买雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(6 周龄,178 $\pm$  11 g)。

### 1.2 方法

**1.2.1 人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)的培养** 将 HRMEC(美国 ATCC)在含有 5 mM D-葡萄糖和 10%胎牛血清(FBS)的内皮基础培养基 2(EBM-2)中进行培养,培养环境为 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub>。第 3 和第 8 代之间的 HRMEC 用于实验。

**1.2.2 细胞转染和处理** miR-939-5p 模拟物(miR-939-5p-mimic 组)或阴性对照(NC-mimic 组)、miR-939-5p 抑制剂(miR-939-5p-inhibitor 组)或阴性对照(NC-inhibitor 组)、阴性对照 siRNA(NC-siRNA 组)或 NOS2 siRNA(NOS2-siRNA 组)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将第 3 到第 8 代之间生长状况良好的 HRMEC 分别用高糖(HG, 25 mM)或低糖(LG, 5 mM)处理 24 h,然后严格按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书对细胞进行转染,将每组细胞在培养箱中培养 48 h,收集细胞用于随后的实验。

**1.2.3 细胞活力检测** 通过细胞计数试剂盒 8(CCK-8)来检测细胞活力。将细胞接种到 96 孔板上(5.0 $\times$  10<sup>4</sup> 细胞/孔),过夜培养,随后去除整个培养基,并用 100  $\mu$ L 的无血清培养基替换,该培养基中含有不同浓度的 D-葡萄糖(5 mM 或 25 mM)。与葡萄糖孵育 24 h 后,将 10  $\mu$ L WST-1 试剂添加到每个孔中。将 96 孔板在 4℃ 下孵育 1.5 h。用美国 Thermo Fisher Scientific Multiskan FC 微孔板光度计测量 450 nm 处的吸光度。按照 Cell-Light™ EdU 荧光显微镜检测试剂盒的说明检测细胞 DNA 的复制能力,在奥林巴斯 FSX100 荧光显微镜下随机选择五个视野进行拍照。

**1.2.4 Hoechst 33258 染色** 从每组中收集生长良好的细胞,然后用 4%多聚甲醛固定 20 min,在黑暗环境中用 Hoechst 33258(10  $\mu$ g/mL)染色 5 min。最后,用荧光显微镜拍照细胞。

**1.2.5 荧光素酶活性测定** 通过在线预测软件 targetscan([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/))预测 miR-939-5p 和 NOS2 的 3' 非翻译区(UTR)结合序列。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成了 NOS2 野生型(WT)和突变型(MT),然后将其插入 pGL3 荧光素酶报告载体中。严格按照试剂盒说明,使用双荧光素酶试剂盒 E2920 验证 miR-939-5p 与 NOS2 3'-UTR 之间的结合关系。

**1.2.6 大鼠 DR 模型的建立** 参考文献所述方法<sup>[9]</sup>,对大鼠腹腔注射 65 mg/kg 的链脲佐菌素(STZ,溶于 pH 5.6 的柠檬酸缓冲液中)诱导 DR 模型,对照组大鼠注射等体积的柠檬酸缓冲

液。观察大鼠的血糖变化,当血糖浓度达到 16.7 mmol/L 以上时表示糖尿病大鼠模型构建成功。将 15 只未建模的大鼠作为对照组 (Control)。将 45 只成功建模的 DR 大鼠随机分为 3 组: DR 组、DR+NC-AgomiR 组 (向 DR 大鼠玻璃体注射阴性对照 AgomiR (NC-AgomiR 组, 200 nmol/ 200  $\mu$ L)) 和 DR+miR-939-5p-AgomiR 组 (向 DR 大鼠玻璃体注射 miR-939-5p-AgomiR (200 nmol/ 200  $\mu$ L))。每 7 天注射一次, 连续注射 3 个月。NC-AgomiR 和 miR-939-5p-AgomiR 由上海吉玛制药技术有限公司合成。

**1.2.7 RT-qPCR 分析** 使用 RNAiso Plus 和 TRIzol LS Reagent 提取视网膜组织匀浆和 HRMEC 细胞中的总 RNA。严格按照说明, 使用 PrimeScript™RT 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq 进行 RT-qPCR。U6 作为内参。miR-939-5p 引物序列如下: 正向: 5'-GCCCAGTAAGGAAAGTTCTTG-3', 反向: 5'-TACTCTAGAGCCAGCATGTT-3'; U6 引物序列为: 正向: 5'-CCGC-TAATTGCGGTCAGCATCA-3', 反向: 5'-ACTTAGTTC-CCAGGCGATGAT-3'。

**1.2.8 Western Blot 分析** 将视网膜组织匀浆和 HRMEC 在含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液 (10%甘油, 2%SDS, 62mM Tris-HCl, pH 6.8) 中煮沸 5 min 进行裂解。通过 BCA 发生测定蛋白质浓度, 将蛋白 (20  $\mu$ g) 在 8-16% 的聚丙烯酰胺凝胶上分离并电转移到聚偏二氟乙烯 (PDVF) 膜上。用 5% 脱脂奶粉 (溶于含有 Tween 20 (TBST) 的 Tris 缓冲盐水中) 封闭后, 将 PVDF 膜与 NOS2 和  $\beta$ -actin (1:500) 一抗在 4℃ 过夜孵育, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 然后在 37℃ 与适当的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗再次孵育 1 h。将膜用 TBST 缓冲液洗涤并通过 ECL 化学发光试剂盒显影。 $\beta$ -actin 作为内参。

**1.2.9 组织学染色** 分离提取大鼠视网膜组织, 并在 4% 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH 7.4) 中洗涤, 然后在 4℃ 于 4% 多聚甲醛中固定 2 h, 然后用梯度乙醇脱水, 包埋在石蜡中并切成 5  $\mu$ m 厚的切片。根据试剂盒说明书, 将切片用苏木精伊红 (HE) 染色。免疫组织化学染色中, 将视网膜切片与紧密连接蛋白 Claudin-5 (1:300) 和 Occludin (1:500) 在 4℃ 下过夜孵育。然后将切片与生物素化的抗小鼠和抗兔 IgG 二抗 (1:200) 室温孵育 2 h, 然后与辣根过氧化物酶链霉素亲和素孵育 1 h。通过与二氨基联苯胺 (DAB) 一起孵育进行显色。最后将切片用苏木精复染, 使用德国 Leica DMI4000B 生物显微镜拍照。

**1.2.10 伊文思蓝染色** 处死大鼠前 2 h, 将伊文思蓝染料溶于 2% 盐水中, 通过尾静脉注入大鼠体内, 作为血视网膜屏障 (Blood retinal barrier, BRB) 通透性示踪剂, 然后在 4% 多聚甲醛中固定 2 h。接下来, 去除眼前段, 将视网膜切开, 玻璃体面朝上涂在载玻片上, 然后封片。通过日本奥林巴斯 FV1000 激光扫描共聚焦显微镜拍摄照片。

**1.2.11 ELISA 检测** 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠房水中白介素 -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的水平。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件处理数据。服从正态分布的计量数据表示为平均值  $\pm$  标准差。多组之间的比较采用单因素方差分析, 然后进行 Tukey 多重比较。P<0.05 表示差异有统计学

意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-939-5p 和 NOS2 在 HG 处理的 HRMEC 中的水平及靶向调控关系

与 LG 组的 HRMEC 相比, HG 组的 miR-939-5p 相对表达水平显著降低, 而 NOS2 蛋白表达水平显著升高。本研究通过 TargetScan 预测了 miR-939-5p 与 NOS2 的 3'UTR 区结合位点, 荧光素酶活性测定显示, 与 NC-mimic 组相比, miR-939-5p-mimic 与 pGL3-NOS2-WT 共转染组的荧光素酶活性显著降低 ( $P<0.05$ ), 证实了 miR-939-5p 与 NOS2 具有靶向结合关系。通过 RT-qPCR 验证了 miR-939-5p-mimic 和 miR-939-5p-inhibitor 的转染效率, 结果显示, 与 Control 组相比, miR-939-5p-mimic 组的 NOS2 蛋白表达水平显著降低, 而 miR-939-5p-inhibitor 组的 NOS2 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ )。见图 1 和图 2。

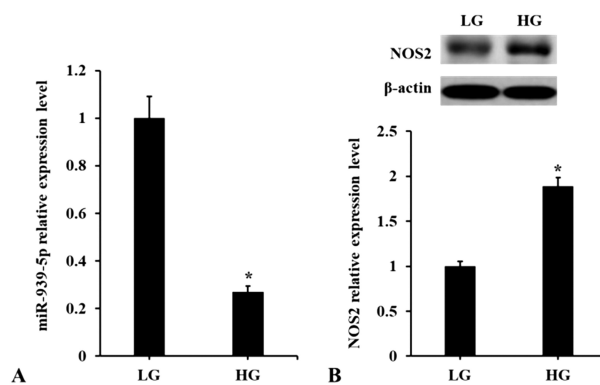


图 1 miR-939-5p 和 NOS2 在 HG 处理的 HRMEC 中的表达水平

Fig. 1 The expression levels of miR-939-5p and NOS2 in HRMEC treated with HG

Note: A: RT-qPCR detection of miR-939-5p expression level; B: Western blot detection of NOS2 protein expression level; Compared with LG group, \* $P<0.05$ .

### 2.2 miR-939-5p 对 HG 处理的 HRMEC 的 NOS2 表达、细胞活力和凋亡的影响

与 LG+NC-inhibitor 组相比, 对低糖 (LG) 处理的 HRMEC 转染 miR-939-5p-inhibitor 后的 LG+miR-939-5p-inhibitor 组 miR-939-5p 水平和细胞活力显著降低, 而 NOS2 蛋白水平和细胞凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ )。然而, 与 HG+NC-mimic 组相比, 对高糖 (HG) 的 HRMEC 转染 miR-939-5p-mimic 后的 HG+miR-939-5p-mimic 组 miR-939-5p 水平和细胞活力显著升高, 而 NOS2 蛋白水平和细胞凋亡率显著降低 ( $P<0.05$ )。见图 3。

### 2.3 NOS2 对 HG 处理的 HRMEC 的细胞活力和凋亡的影响

为了探究 NOS2 对 HRMEC 活力和凋亡的影响, 本研究对 HG 处理的 HRMEC 转染了 NOS2-siRNA, 结果显示, 与 Control 组相比, NOS2-siRNA 组的 NOS2 蛋白水平显著降低, 细胞活力显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ( $P<0.05$ )。见图 4。

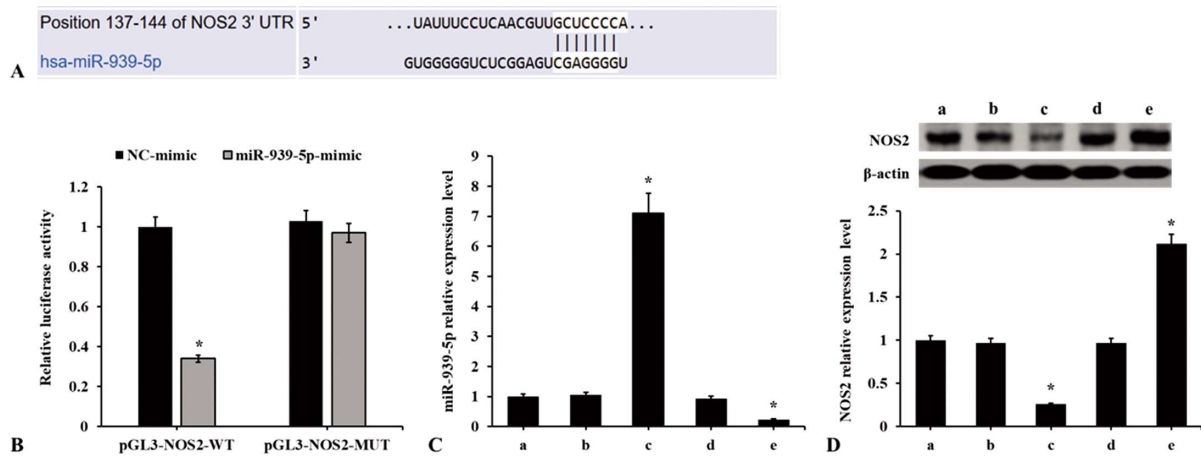


图2 miR-939-5p 和 NOS2 在 HG 处理的 HRMEC 中的靶向调控关系

Fig. 2 The target regulation relationship of miR-939-5p and NOS2 in HG-treated HRMEC

Note: A: the binding site of miR-939-5p and the 3' UTR region of NOS2; B: luciferase activity detection; C: RT-qPCR to detect the transfection efficiency of miR-939-5p-mimic and miR-939-5p-inhibitor; D: Western blot to detect the effect of miR-939-5p on NOS2 protein expression; a: Control group; b: NC-mimic group; c: miR-939-5p-mimic group; d: NC-inhibitor; e: miR-939-5p-inhibitor group; compared with Control group or NC-mimic group, \* $P < 0.05$ .

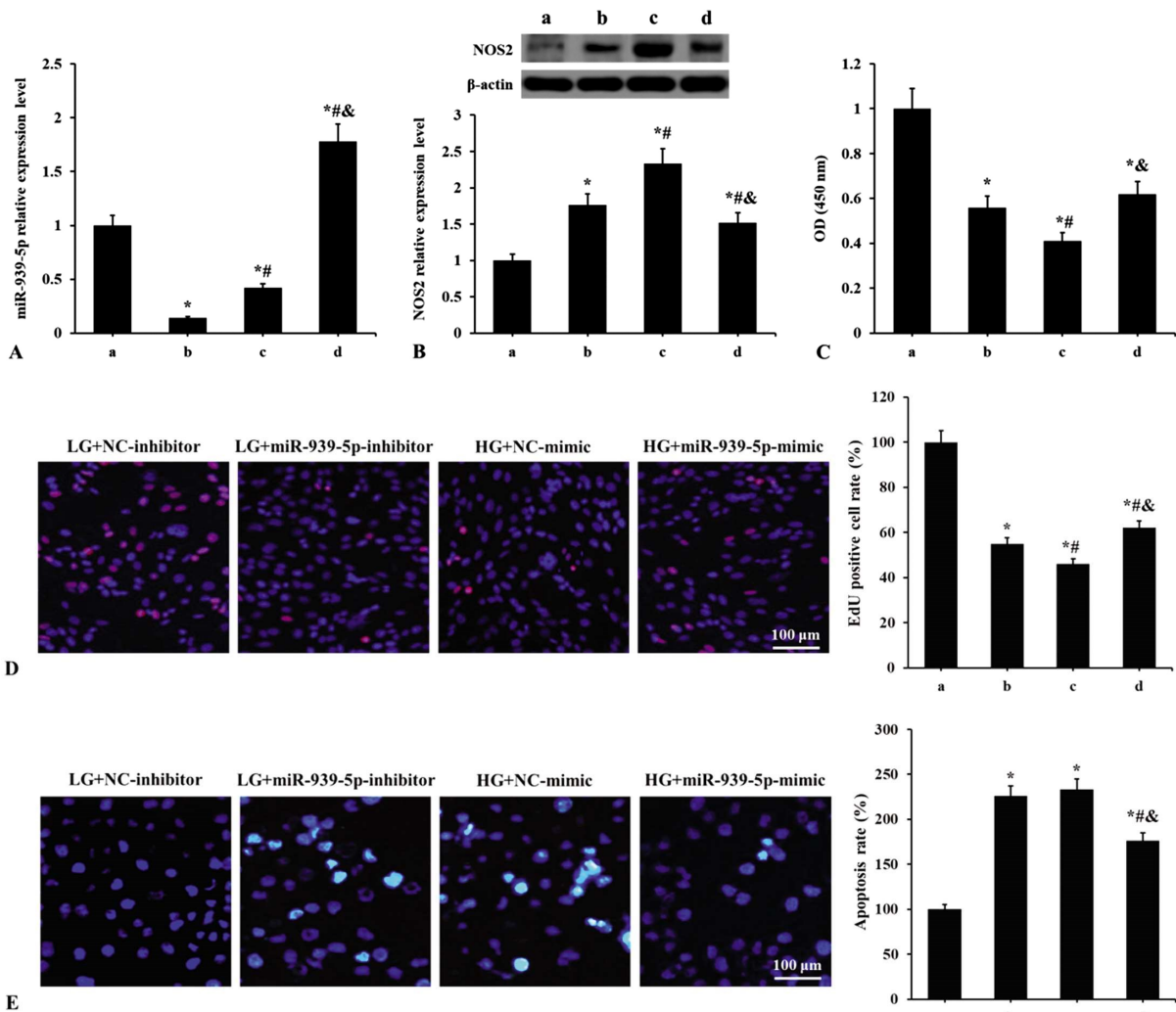


图3 miR-939-5p 对 HG 处理的 HRMEC 的 NOS2 表达、细胞活力和凋亡的影响

Fig.3 The effect of miR-939-5p on NOS2 expression, cell viability and apoptosis of HRMEC treated with HG

Note: A: relative expression level of miR-939-5p; B: protein relative expression level of NOS2; C: cell viability results by CCK-8 detection; D: cell proliferation results by EdU detection; E: cell apoptosis results by Hoechst 33258 staining; compared with LG+NC-inhibitor group, \* $P < 0.05$ ; compared with LG+miR-939-5p-inhibitor group, # $P < 0.05$ ; compared with HG+NC-mimic group, & $P < 0.05$ .

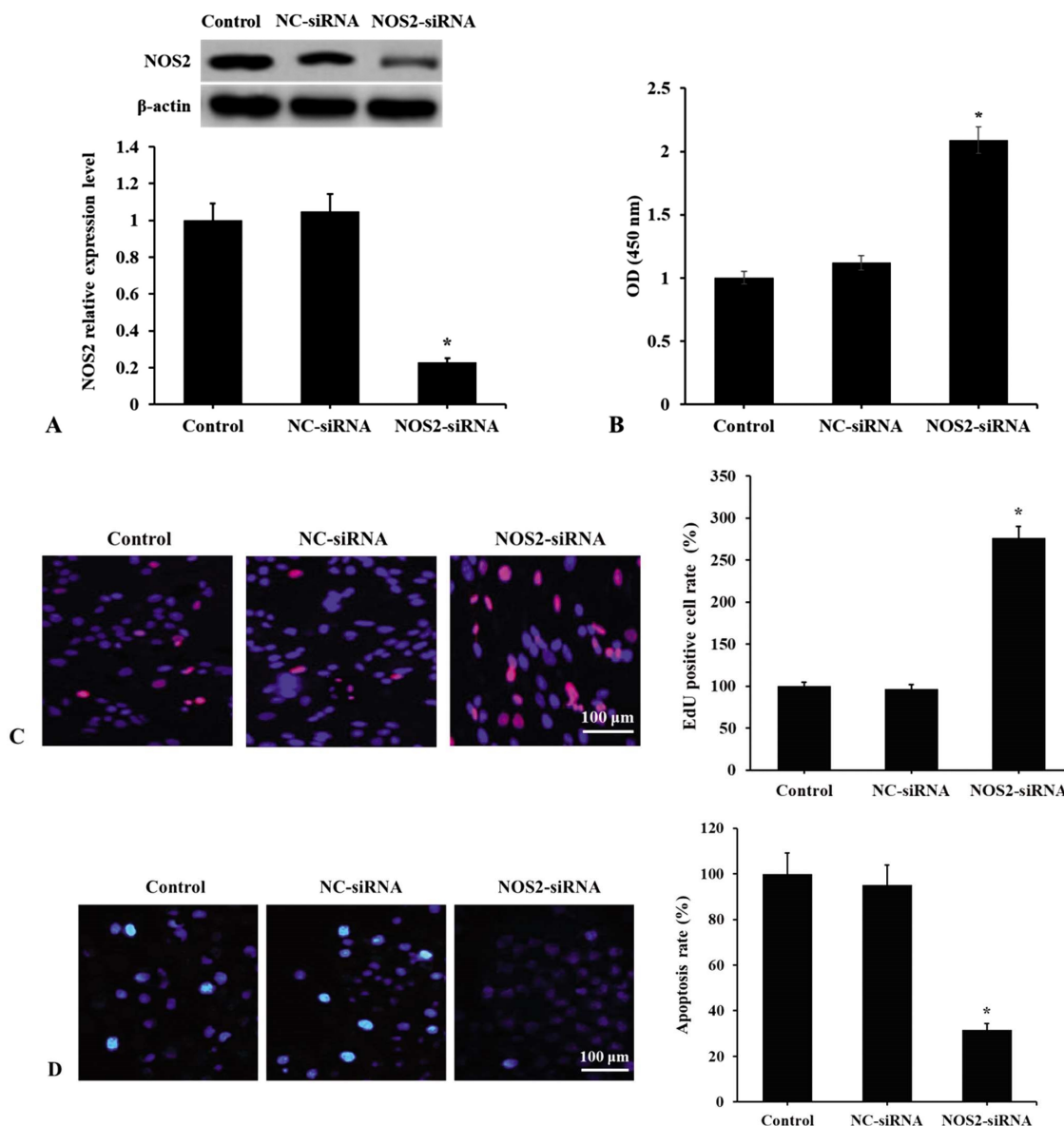


图4 NOS2对HG处理的HRMEC的细胞活力和凋亡的影响

Fig. 4 The effect of NOS2 on cell viability and apoptosis of HRMEC treated with HG

Note: A: protein relative expression level of NOS2; B: cell viability results by CCK-8 detection; C: cell proliferation results by EdU detection;

D: cell apoptosis results by Hoechst 33258 staining; compared with Control group, \* $P < 0.05$ .

#### 2.4 miR-939-5p-Agomir在DR大鼠视网膜的保护作用

建立DR大鼠模型后,对大鼠进行miR-939-5p-Agomir给药处理,RT-qPCR结果表明miR-939-5p在视网膜中成功过表达。HE染色结果显示Control组大鼠视网膜结构完整,膜结构各层紧密结合,排列整齐;DR组大鼠的视网膜细胞排列紊乱,有明显的出血、水肿和液泡;miR-939-5p-Agomir治疗组大鼠视网膜细胞排列较规则,水肿和出血明显减轻。Claudin-5和Occludin免疫组织化学染色结果显示,与DR组相比,miR-939-5p-Agomir组的Claudin-5和Occludin的表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。伊文思蓝染色检测大鼠视网膜血管的通透性结果显示,与DR组相比,miR-939-5p-Agomir组大鼠的伊文思蓝浓度显著降低( $P < 0.05$ )。见图5。

#### 2.5 miR-939-5p-Agomir通过抑制NOS2减少DR大鼠视网膜炎症

与DR组相比,miR-939-5p-Agomir组大鼠视网膜组织中

NOS2蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。ELISA方法检测各组大鼠房水中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的水平结果显示,与DR组相比,miR-939-5p-Agomir组大鼠房水中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的水平均显著降低( $P < 0.05$ )。见图6。

### 3 讨论

早期的研究已经报道miR-939在几种癌症的发生和发展中起关键作用,例如胃癌、卵巢癌和结直肠癌<sup>[10,11]</sup>。其他研究报道,miR-939在1型糖尿病和妊娠期糖尿病患者血清中表达水平降低<sup>[9]</sup>。说明miR-939可能参与DR的发病机制。Zhao等人<sup>[12]</sup>研究显示,miR-939-3p通过靶向血管内皮生长因子调节高糖诱导的人视网膜上皮细胞ARPE-19损伤。然而,miR-939-5p在DR中的功能及其对HRMEC的调控作用尚不清楚。高糖处理可引起HRMEC损伤,因此常作为DR体外研究的细胞模型。本研究结果证实,miR-939-5p在高糖处理的HRMEC中和DR

大鼠模型中发生异常,高糖培养降低了 HRMEC 中的 miR-939-5p 水平,上调 miR-939-5p 提高了高糖诱导的

HRMEC 的细胞活力并抑制了细胞凋亡。因此,miR-939-5p 可能是治疗 DR 的潜在分子靶标。

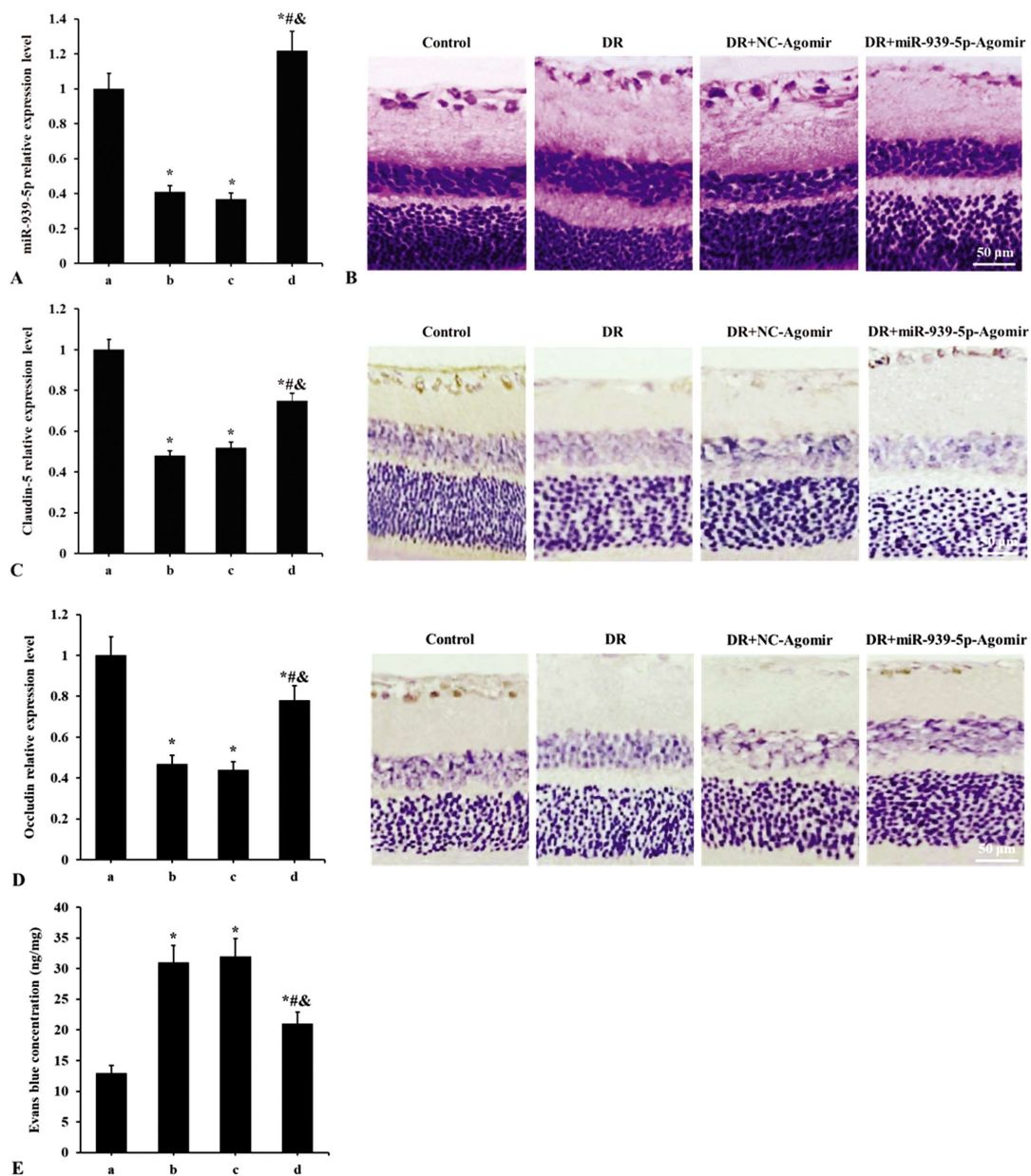


图 5 miR-939-5p-AgomiR 对 DR 大鼠视网膜的保护作用

Fig.5 The protective effect of miR-939-5p-AgomiR on the retina of DR rats

Note: A: miR-939-5p level in retinal tissue; B: HE staining of retinal tissue; C: immunohistochemical staining of Claudin-5 in retinal tissue;

D: immunohistochemical staining of Occludin in retinal tissue; E: Evans blue concentration in retinal tissue; a: Control group; b: DR group;

c: DR+NC-AgomiR group; d: DR+miR-939-5p-AgomiR group; compared with Control group, \* $P < 0.05$ ; compared with DR group, # $P < 0.05$ ; compared with DR+NC-AgomiR group, & $P < 0.05$ .

在哺乳动物中,目前已鉴定出三种不同的 NOS 亚型:神经元型 NOS(nNOS,NOS1)、诱导型 NOS(iNOS,NOS2)和内皮型 NOS(eNOS,NOS3)。其中,调节胰岛素抵抗的重要同工型是 iNOS,即 NOS2<sup>[13]</sup>。其他研究表明,NOS2 参与胰岛素脱敏,而 NOS3 参与胰岛素增敏<sup>[14]</sup>。有人提出,在肥胖动物模型中,NOS2 的表达增加可引起肌肉胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>。此外,一些研究还表明,在 DR 发病过程中 Müller 胶质细胞中 NOS2 被上调,并通过影响血管生成来参与 DR 的进展<sup>[7,8]</sup>。NOS2 的过度激活会加剧炎

症反应<sup>[6]</sup>。NOS2 在 DR 患者和糖尿病大鼠模型的视网膜中表达上调<sup>[6]</sup>。因此,NOS2 在 DR 发生过程中具有非常重要的作用。本研究显示,NOS2 在高糖处理的 HRMEC 中和 DR 大鼠模型中高表达,与前人研究结果一致。本研究还发现,抑制 NOS2 的表达可明显提高高糖诱导的 HRMEC 的细胞活力并抑制细胞凋亡。

此外,本研究通过萤光素酶报告基因检测实验证实 miR-939-5p 靶向抑制 NOS2 的表达,上调 miR-939-5p 对高糖

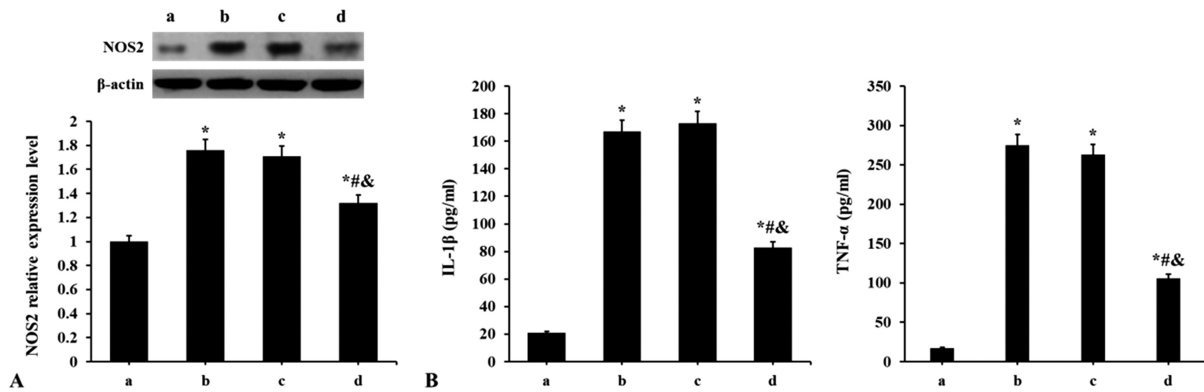


图6 miR-939-5p-Agomir对DR大鼠视网膜炎症的影响

Fig. 6 The effect of miR-939-5p-Agomir on retinal inflammation in DR rats

Note: A: NOS2 protein level in rat's retinal tissue; C and D: IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in rat's aqueous humor; compared with Control group, \* $P$ <0.05; compared with DR group, # $P$ <0.05; compared DR+NC-Agomir group, & $P$ <0.05.

诱导的 HRMEC 的细胞的保护作用部分通过抑制 NOS2 的表达来介导。因此,miR-939-5p 和 NOS2 可能是预防和治疗 DR 的潜在分子靶标。

miRNA Agomir 是经过特殊化学修饰的 miRNA 激动剂,能促进 miRNA 与其靶基因的互补配对,抑制靶基因转录后沉默和翻译抑制,miRNA Agomir 在动物体内具有很高的稳定性。其他领域已经有用 miRNA Agomir 成功治疗相关疾病的报道。本研究应用 miR-939-5p-Agomir 治疗 DR 大鼠,研究显示,miR-939-5p-Agomir 治疗后,DR 大鼠的视网膜病变和炎症明显减轻。Claudin-5 主要在内皮细胞中表达,Claudin-5 在视网膜脉管系统中的表达有助于维持血视网膜屏障(Blood retinal barrier, BRB)的完整性<sup>[17]</sup>。Occludin 可在上皮细胞和内皮细胞中表达,其含量与 BRB 的特性相关,Occludin 可促进 BRB 的形成<sup>[18]</sup>。据报道,抑制炎症因子如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达可通过增加 Claudin-5 和 Occludin 的表达来提高 BRB 的完整性<sup>[19]</sup>。本研究显示,miR-939-5p-Agomir 治疗后,DR 大鼠视网膜 BRB 的通透性明显降低。

此外,本研究也显示,miR-939-5p-Agomir 抑制了大鼠视网膜组织中 NOS2 的蛋白表达。由于 NOS2 基因多态性与 2 型糖尿病的易感性相关,并且 rs1800783 位点突变是 DR 的危险因素<sup>[20]</sup>。此外,NOS2 的高表达可通过激活其下游信号分子促进炎症反应<sup>[21]</sup>。因此,本研究推测 miR-939-5p-Agomir 对 DR 大鼠视网膜的保护作用是由 NOS2 介导的。

总之,本研究表明,在高糖培养的 HRMEC 中和 DR 大鼠视网膜中,miR-939-5p 为低表达模式,NOS2 为高表达模式。上调 miR-939-5p 通过靶向抑制 NOS2 对 DR 大鼠视网膜和 HRMEC 提供保护作用。

#### 参考文献(References)

- [1] Liu Y, Song Y, Tao L, et al. Prevalence of diabetic retinopathy among 13473 patients with diabetes mellitus in China: a cross-sectional epidemiological survey in six provinces [J]. *BMJ Open*, 2017, 7(1): e013199
- [2] Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, et al. Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(12): 1257-1270
- [3] Gong Q, Xie J, Liu Y, et al. Differentially expressed MicroRNAs in the

- development of early diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 4727942
- [4] Collares C V, Evangelista A F, Xavier D J, et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6(1): 491-504
- [5] Li H, Liao Y, Gao L, et al. Coronary serum exosomes derived from patients with myocardial ischemia regulate angiogenesis through the miR-939-mediated nitric oxide signaling pathway [J]. *Theranostics*, 2018, 8(8): 2079-2093
- [6] Buzzo C D, Medina T, Branco L M, et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 41686-41697
- [7] Mishra A, Newman E A. Aminoguanidine reverses the loss of functional hyperemia in a rat model of diabetic retinopathy[J]. *Front Neuroenergetics*, 2012, 3: 10-16
- [8] Kur J, Newman E A, Chanling T, et al. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(5): 377-406
- [9] Duan H, Huang J, Li W, et al. Protective effects of fufang xueshuan-tong on diabetic retinopathy in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 408268
- [10] Chiefari E, Ventura V, Capula C, et al. A polymorphism of HMGA1 protects against proliferative diabetic retinopathy by impairing HMGA1-induced VEGFA expression[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39429
- [11] Zhang JX, Xu Y, Gao Y, et al. Decreased expression of miR-939 contributes to chemoresistance and metastasis of gastric cancer via dysregulation of SLC34A2 and Raf/MEK/ERK pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 18
- [12] Zhao C, Fei X, Xu B, et al. Long non-coding RNA HEIH contributes to diabetic retinopathy by regulating miR-939/VEGF axis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(6): 2022-2033
- [13] Soskic S, Dobutovic B, Sudar E, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure [J]. *Open Cardiovasc Med J*, 2011, 5(1): 153-163
- [14] Sansbury B E, Hill B G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 73: 383-399

(下转第 4307 页)

- 2018, 39(9): 1414-1420
- [8] Yan L, Xie M, Lu H, et al. Anti-Apoptotic Effect of IGF1 on Schwann Exposed to Hyperglycemia is Mediated by Neuritin, a Novel Neurotrophic Factor[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(1): 495-505
- [9] 拱忠影, 程焱. 神经丝轻链在肌萎缩侧索硬化的诊断及预后中的价值[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(2): 223-224
- [10] 韩旭, 马改英, 徐瑞雪, 等. 神经丝轻链蛋白与多发性硬化研究进展[J]. *临床神经病学杂志*, 2020, 33(6): 469-471
- [11] Baudier J, Gentil BJ. The S100B Protein and Partners in Adipocyte Response to Cold Stress and Adaptive Thermogenesis: Facts, Hypotheses, and Perspectives[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 843-844
- [12] 美国脊髓损伤协会, 国际脊髓损伤学会, 李建军, 等. 脊髓损伤神经学分类国际标准 (2011 年修订)[J]. *中国康复理论与实践*, 2011, 17(10): 963-971
- [13] 杨扬震. 骨与关节创伤 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 85-86
- [14] 陈孝平, 汪建平. 外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 593
- [15] Frotzler A, Krebs J, Göhring A, et al. Osteoporosis in the lower extremities in chronic spinal cord injury [J]. *Spinal Cord*, 2020, 58(4): 441-448
- [16] 叶义清, 纪婕, 吴玉霞, 等. 低频电刺激联合间歇导尿及 Motomed 运动训练对脊髓损伤致神经源性膀胱患者膀胱内压力及膀胱容量的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(2): 321-325
- [17] Heller RA, Sperl A, Seelig J, et al. Zinc Concentration Dynamics Indicate Neurological Impairment Odds after Traumatic Spinal Cord Injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(5): 421-422
- [18] Tang X, Huang Y, He S, et al. Clinical characteristics and treatment of fracture-dislocation of thoracic spine with or without minimal spinal cord injury [J]. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 2020, 33(3): 437-442
- [19] Dan Lantsman C, Barkay G, Friedlander A, et al. Whole Spine CT Scan for the Detection of Acute Spinal Fractures in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis Patients Who Sustained Low-energy Trauma[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2020, 45(19): 1348-1353
- [20] 马晓飞, 刘鹏, 涂杨茂, 等. 活血益骨汤对脊柱骨折患者术后恢复的临床疗效及对血清中骨性标志物水平的影响 [J]. *中医药信息*, 2018, 35(3): 88-90
- [21] 周杨, 张玉良, 陆建强, 等. 脊柱爆裂性骨折伴脊髓损伤患者血清炎症指标与神经功能指标变化的研究[J]. *中国急救医学*, 2014(12): 1108-1110, 1111
- [22] 吴威, 孟德轩, 王文静, 等. 血清神经突起因子、神经元特异性烯醇化酶与脊柱骨折合并脊髓损伤神经功能的关系及预后预测[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(10): 1919-1921
- [23] 秦建英, 陈清汉. 胸椎压缩性骨折伴脊髓损伤患者血清 Fbg TNF- $\alpha$  Neuritin 水平与神经功能的关系[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23(6): 540-544
- [24] 张秀娟, 千超, 高喜松. NMOSD 患者脑脊液中神经丝蛋白轻链浓度的影响因素分析[J]. *西南国防医药*, 2019, 29(1): 11-13
- [25] 张群, 林思睿, 吴琼英, 等. 神经丝轻链蛋白与神经系统疾病[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2019, 36(4): 380-382
- [26] 钱鹏鹏, 孙浩林, 刘俭, 等. 血清神经丝轻链、胱抑素 C 水平与脊柱骨折伴急性脊髓损伤患者预后相关性分析[J]. *创伤与急危重病医学*, 2020, 8(6): 453-455
- [27] Lee SJ, Kim CW, Lee KJ, et al. Elevated serum S100B levels in acute spinal fracture without head injury [J]. *Emerg Med J*, 2010, 27(3): 209-212
- [28] 张振雨. 脊柱骨折伴急性脊髓损伤患者血清 NSE、S100B 蛋白水平变化及意义[J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(3): 332-334
- [29] 宋波, 雷蕾, 王安邦, 等. 神经节苷脂对弥漫性轴索损伤神经的保护作用及对脑脊液 NSE、S100B 和 MBP 水平的影响[J]. *河北医药*, 2018, 40(3): 332-336

(上接第 4255 页)

- [15] Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle [J]. *Nat Med*, 2001, 7(10): 1138-1143
- [16] Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, et al. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 132(4): 551-556
- [17] Fan L, Yan H. FTY720 attenuates retinal inflammation and protects blood-retinal barrier in diabetic rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(3): 1254-1263
- [18] Keil J M, Liu X, Antonetti D A, et al. Glucocorticoid induction of occludin expression and endothelial barrier requires transcription factor p54 NONO[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(6): 4007-4015
- [19] Rosales M A, Silva K C, Duarte D A, et al. Endocytosis of tight junctions caveolin nitrosylation dependent is improved by cocoa via opioid receptor on RPE cells in diabetic conditions[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(9): 6090-6100
- [20] Chen F, Li Y, Yang L, et al. Association of NOS2 and NOS3 gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in the Chinese Han population [J]. *Iubmb Life*, 2016, 68(7): 516-525
- [21] Bagchi A K, Vashisht V, Akolkar G, et al. Endoplasmic reticulum stress promotes inflammation through iNOS-Regulated Toll-Like Receptor 2 (TLR 2) in doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018, 124: 102