

miR-373-3p 在糖尿病视网膜病变中的作用及其机制

贾佳, 张林昌*, 张海霞

天津市第五中心医院/北京大学滨海医院眼科, 天津 300450

[中图分类号] R587.2; R774.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0422.2024.0104

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 贾佳, 张林昌, 张海霞. miR-373-3p 在糖尿病视网膜病变中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(1): 76-82.

[收稿日期] 2023-03-21 [录用日期] 2023-11-16 [上线日期] 2024-01-04

[摘要] **目的** 探讨 miR-373-3p 在糖尿病视网膜病变(DR)中的作用及其机制。**方法** 收集2021年2月—2022年2月在天津市第五中心医院就诊的35例DR患者及35例非DR患者的血清, qRT-PCR检测 miR-373-3p 和血管内皮生长因子A (VEGFA) mRNA 的表达情况。采用高糖(HG)处理人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)构建体外DR模型。将HRMEC分为对照组(5 mmol/L葡萄糖和25 mmol/L甘露醇处理)、HG组(30 mmol/L葡萄糖处理)、HG+miR-373-3p 模拟物阴性对照(miR-con)组(转染 miR-con 后用30 mmol/L葡萄糖处理)、HG+miR-373-3p 组(转染 miR-373-3p 后用30 mmol/L葡萄糖处理)、HG+miR-373-3p+vector 组(转染 miR-373-3p 和 vector 后用30 mmol/L的葡萄糖处理)和HG+miR-373-3p+VEGFA 组(转染 miR-373-3p 和 VEGFA 后用30 mmol/L葡萄糖处理)。采用qRT-PCR和Western blotting分析各组 miR-373-3p 和 VEGFA mRNA 及蛋白表达水平。采用CCK-8法、免疫荧光、Transwell实验、血管形成实验和Western blotting检测HRMEC的增殖、迁移及血管生成能力。采用双荧光素酶测定 miR-373-3p 与 VEGFA 之间的关系。**结果** 与非DR患者比较, DR患者血清中 miR-373-3p 表达水平明显降低($P<0.05$), VEGFA mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$)。与对照组比较, HG组HRMEC miR-373-3p 表达水平明显降低($P<0.05$), VEGFA mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 细胞活力、细胞增殖率以及增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)水平均增高($P<0.05$), 迁移细胞数量和血管形成能力上升($P<0.05$)。与HG+miR-con组比较, HG+miR-373-3p组HRMEC中 miR-373-3p 表达水平升高($P<0.05$), VEGFA 表达水平降低($P<0.05$), 细胞活力、细胞增殖率以及PCNA、Cyclin D1蛋白水平降低($P<0.05$), 迁移细胞数量和血管形成能力下降($P<0.05$)。与HG+miR-373-3p+vector组比较, HG+miR-373-3p+VEGFA组HRMEC VEGFA 表达水平升高($P<0.05$), 细胞活力、细胞增殖率以及PCNA、Cyclin D1蛋白水平均增高($P<0.05$), 迁移细胞数量和血管形成能力上升($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-373-3p 和 VEGFA 序列共转染后, HRMEC中荧光素酶活性降低($P<0.05$)。**结论** miR-373-3p 在DR患者血清中低表达, 其可能的机制是通过靶向 VEGFA 抑制HG诱导的HRMEC功能障碍。

[关键词] miR-373-3p; 糖尿病视网膜病变; 血管内皮生长因子A; 高糖; 人视网膜微血管内皮细胞

Effect and mechanism of miR-373-3p in diabetic retinopathy

Jia Jia, Zhang Lin-Chang, Zhang Hai-Xia

Department of Ophthalmology, Tianjin Fifth Central Hospital/Peking University Binhai Hospital, Tianjin 300450, China

*Corresponding author, E-mail: zyzlc686868@sina.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miR-373-3p in diabetic retinopathy (DR), as well as the underlying mechanisms. **Methods** Serum samples from 35 DR patients and 35 non-DR patients visiting Tianjin Fifth Central Hospital from February 2021 to February 2022 were collected, and expression levels of miR-373-3p and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) mRNA were detected using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). An *in vitro* DR model was constructed using high glucose (HG)-treated human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC). HRMECs were divided into control group (5 mmol/L glucose and 25 mmol/L mannitol treatment), HG group (30 mmol/L glucose treatment), HG+miR-373-3p mimic-negative control (miR-con) group (30 mmol/L glucose treatment after transfection with miR-con), HG+miR-373-3p mimic group (30 mmol/L glucose treatment after transfection with miR-373-3p), HG+miR-373-3p+vector group (30 mmol/L glucose

[作者简介] 贾佳, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事眼科学方面的研究

[通信作者] 张林昌, E-mail: zyzlc686868@sina.com

treatment after co-transfection with miR-373-3p and vector), and HG+miR-373-3p+vascular endothelial growth factor A (VEGFA) group (30 mmol/L glucose treatment after co-transfection with miR-373-3p and VEGFA). The expression levels of miR-373-3p, VEGFA mRNA and protein were analyzed by qRT-PCR and Western blotting. CCK-8, immunofluorescence, Transwell assay, angiogenesis assay, and Western blotting were used to evaluate HRMEC proliferation, migration and angiogenesis abilities. The relationship between miR-373-3p and VEGFA was determined by dual luciferase reporter assay. **Results** Compared with non-DR patients, DR patients exhibited significantly lower expression levels of miR-373-3p ($P<0.05$) and higher expression levels of VEGFA mRNA ($P<0.05$) in serum. Compared with control group, HG group showed decreased expression of miR-373-3p ($P<0.05$), increased expressions of the mRNA and protein of VEGFA ($P<0.05$), higher cell viability, proliferation rate, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cylin D1 protein, and numbers of migrating cells and angiogenesis ability ($P<0.05$) in HRMECs. Compared with HG+miR-con group, HG+miR-373-3p group showed increased expression of miR-373-3p ($P<0.05$), decreased expressions of VEGFA ($P<0.05$), lower cell viability, proliferation rate, PCNA and Cylin D1 protein ($P<0.05$), and lower numbers of migrating cells and angiogenesis ability ($P<0.05$) in HRMECs. Compared with HG+miR-373-3p+vector group, HG+miR-373-3p+VEGFA group showed increased expression of VEGFA ($P<0.05$), higher cell viability, proliferation rate, PCNA and Cylin D1 protein, and numbers of migrating cells and angiogenesis ability ($P<0.05$) in HRMECs. The results of dual luciferase reporter assay showed decreased enzymatic activity of luciferase after cotransfection of miR-373-3p and VEGFA sequence ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-373-3p is lowly expressed in the serum of DR patients, and its potential mechanism may involve targeting VEGFA to inhibit HG-induced HRMEC dysfunction.

[Key words] miR-373-3p; diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor A; high glucose; retinal microvascular endothelial cells

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见并发症,也是糖尿病患者视力障碍和失明的重要病因^[1]。DR的早期特征包括血-视网膜屏障(blood-retina barrier, BRB)破坏、毛细血管无细胞性和周细胞丢失,高糖是导致DR进展的主要因素之一^[2-3]。近年来DR的诊断和治疗取得了重要进展,但仍是视力丧失的主要病因之一。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类小而短的非编码RNA,可与信使RNA(mRNA)的3'-UTR结合,参与各种生理和病理过程的调控^[4]。血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)是血管生成的主要驱动力^[5], VEGFA高表达会促进DR发展^[6]。我们采用生物信息学(Targetscan, https://www.targetscan.org/vert_72/)分析结果显示VEGFA为miR-373-3p的潜在靶基因,据此推测miR-373-3p可能通过靶向VEGFA抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)损伤。本研究选择高糖诱导的HRMEC作为DR的体外细胞模型,探究miR-373-3p在DR发展中的作用及其潜在机制,以期对DR的靶向治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选取2021年2月—2022年2月在天津市第五中心医院就诊并被诊断为DR的35例患者,收集其血清样本。排除年龄<18岁、从其他医院转院、患有癌症、患有血液系统恶性肿瘤、怀孕或哺乳期的患者。另外,采集同一时期在本院健康体检的非DR患者($n=35$)的血清样本作为对照。本研

究方案获天津市第五中心医院伦理委员会的批准(20210103),所有研究对象均知情同意。

1.1.2 细胞与主要试剂 HRMEC(ACBRI 181)购自美国Cell System; TRIZOL(R401-01)、CCK-8细胞增殖检测试剂盒(A311-01)购自南京Vazyme; SuperSYBR One Step qRT-PCR检测试剂盒购自北京百奥莱博科技公司;青霉素-链霉素混合溶液(GD-Y1033)购自上海古朵生物公司;DMEM培养基(QSRAS497)购自上海钦诚生物科技有限公司;miR-373-3p模拟物(miR-373-3p)与其阴性对照(miR-con)、pcDNA3.1-VEGFA过表达(VEGFA)与其空白载体质粒pcDNA3.1(vector)均由上海GenePharma制备合成;RIPA裂解液(89900)、电化学发光(electrochemical luminescent, ECL)试剂盒(WP20005)购自美国ThermoFisher公司;兔抗VEGFA多克隆抗体(ab46154)、兔抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(ab92552)、兔抗细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)单克隆抗体(ab16663)、兔抗 β -actin多克隆抗体(ab8227)、兔抗转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)单克隆抗体(ab215715)、兔抗血管生成素1(angiotensin 1, Ang-1)单克隆抗体(ab183701)、兔抗 β -tubulin多克隆抗体(ab6046)、兔抗Ki-67多克隆抗体(ab15580)均购自英国Abcam公司;基质胶(356234)、Transwell(3421)均购自美国Corning公司;双荧光素酶报告基因分析系统(GM-040502A)购自上海泽叶生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 HRMEC细胞于37℃, 5% CO₂环境在含有10%胎牛血清、1%抗生素的DMEM

培养基中培养。将HRMEC细胞分为对照组(5 mmol/L葡萄糖和25 mmol/L甘露醇处理)^[7]、高糖(HG)组(30 mmol/L葡萄糖处理)^[8]、HG+miR-con组(转染miR-con后30 mmol/L葡萄糖处理)、HG+miR-373-3p组(转染miR-373-3p后30 mmol/L葡萄糖处理)、HG+miR-373-3p+vector组(转染miR-373-3p和vector后30 mmol/L葡萄糖处理)和HG+miR-373-3p+VEGFA组(转染miR-373-3p和VEGFA后30 mmol/L葡萄糖处理),所有细胞均处理48 h。

1.2.2 qRT-PCR检测miR-373-3p和VEGFA mRNA表达 用TRIzol试剂提取总RNA,将RNA经反转录获得cDNA;使用ProFlex PCR系统(美国Thermo Fisher公司)按照SuperSYBR One Step试剂盒通过特异性引物、cDNA进行qRT-PCR检测。用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析mRNA和miRNA的表达水平。GAPDH和U6分别用作mRNA或miRNA的内参照。引物序列如下:miR-373-3p(5'-3'):正向GGCGGAAGTGCTTCGATTTT,反向GTGCAGGGTCCGAGGTATTC;VEGFA(5'-3'):正向AGGGCAGAATCATCACGAAGT,反向AGGGTCTCGATTGGATGGCA;GAPDH(5'-3'):正向CCGTGGAATTTGCCGTGA,反向TGATGACCCTTTTGGCTCCC;U6(5'-3'):正向CTCGCTTCGGCAGCACA,反向AACGCTTCACGAATTTGCGT。

1.2.3 Western blotting检测VEGFA、PCNA、Cyclin D1、TGF- β_1 、Ang-1蛋白水平 使用RIPA裂解液收集细胞裂解物,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并将蛋白质转移到膜上。将膜与VEGFA(1:1000)、PCNA(1:1000)、Cyclin D1(1:500)、 β -actin(1:1000)、TGF- β_1 (1:1000)、Ang-1(1:1000)和 β -tubulin(1:500)的一抗在4℃下孵育过夜。随后将膜与二抗(1:5000)在室温下孵育2 h。 β -actin和 β -tubulin分别用作内参照。最后通过ECL法对蛋白质进行可视化,采用ImageJ软件进行定量分析。

1.2.4 CCK-8法测定细胞活力 将各组HRMEC细胞接种于96孔板(5×10^3 个/孔),孵育24 h后在每孔中添加10 μ l CCK-8溶液,孵育4 h后在450 nm处检测各孔细胞的吸光度(OD)值,用于表示细胞活力。

1.2.5 免疫荧光分析细胞增殖情况 将各组HRMEC细胞接种于24孔板(1×10^4 个/孔),24 h后4%多聚甲醛溶液固定15 min,5%胎牛血清封闭1 h。将细胞与兔抗Ki-67一抗(1:500)在4℃下孵育过夜。添加山羊抗兔IgG二抗(1:200),在室温下孵育1 h。最后,经DAPI染色5 min后用甘油固定。采用荧光显微镜分析细胞增殖情况。细胞增殖率(%)=Ki-67染色细胞/DAPI染色总细胞 $\times 100\%$ 。

1.2.6 Transwell实验检测细胞迁移情况 将各组HRMEC细胞数通过无血清培养基调整为 1×10^5 个/ml。

吸取200 μ l接种到Transwell小室上室中,并在下室中添加500 μ l正常培养基,48 h后将进入下室的细胞经甲醇固定,用结晶紫染色。最后在Eclipse Ti倒置显微镜(日本Nikon公司)下观察并统计视野中迁移的细胞数。

1.2.7 血管形成实验检测血管形成能力 将300 μ l基质胶置于24孔板底部,并将按照上述处理的各组HRMEC(2×10^4 个/孔)细胞接种到孔中。20 h后,在倒置显微镜下观察毛细血管样的结构。最后采用ImageJ软件评估毛细管状结构的分支长度。

1.2.8 双荧光素酶报告基因检测miR-373-3p和VEGFA的相互作用 将经过Targetscan预测含有miR-373-3p结合位点(WT)或突变位点(MUT)的VEGFA序列分别克隆到psiCHECK2载体中,构建VEGFA-WT或VEGFA-MUT。将这些构建的载体分别与miR-373-3p或miR-con共同转染至HRMEC中48 h,最后通过双荧光素酶报告基因分析系统检测荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料及血清miR-373-3p、VEGFA mRNA表达水平比较 DR组糖尿病病程、空腹血糖、糖化血红蛋白均明显高于非DR组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。qRT-PCR检测结果显示,与非DR患者比较,DR患者血清miR-373-3p表达水平明显降低(0.48 ± 0.09 vs. 1.05 ± 0.12 , $P < 0.05$),VEGFA mRNA表达水平明显升高(1.64 ± 0.18 vs. 1.02 ± 0.13 , $P < 0.05$)。

2.2 各组HRMEC细胞转染效率分析 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示,与对照组比较,HG组HRMEC中miR-373-3p表达水平降低,VEGFA表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与HG+miR-con组比较,HG+miR-373-3p组HRMEC中miR-373-3p表达水平升高,VEGFA表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与HG+miR-373-3p+vector组比较,HG+miR-373-3p+VEGFA组HRMEC中miR-373-3p表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),VEGFA表达水平升高($P < 0.05$,图1)。

2.3 miR-373-3p抑制HRMEC中HG诱导的细胞增殖 结果显示,与对照组比较,HG组HRMEC细胞活力、细胞增殖率以及PCNA、Cyclin D1蛋白水平均明显上调($P < 0.05$);与HG+miR-con组比较,HG+

表1 两组患者临床资料比较

Tab.1 Comparison of clinical data between two groups of patients

| 项目 | 非DR组 (n=35) | DR组 (n=35) | P |
|---|----------------|---------------|--------|
| 性别[例(%)] | | | 0.631 |
| 男 | 18(51.4) | 20(57.1) | |
| 女 | 17(48.6) | 15(42.9) | |
| 年龄(岁, $\bar{x}\pm s$) | 58.84±8.92 | 59.02±9.16 | 0.934 |
| 糖尿病病程(年, $\bar{x}\pm s$) | 0 | 3.10±1.25 | <0.001 |
| BMI(kg/cm ² , $\bar{x}\pm s$) | 25.13±2.70 | 24.98±2.81 | 0.821 |
| 空腹血糖(mmol/L, $\bar{x}\pm s$) | 5.54±0.68 | 9.67±1.14 | <0.001 |
| 糖化血红蛋白(% , $\bar{x}\pm s$) | 5.39±0.58 | 9.54±0.92 | <0.001 |
| 血肌酐(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$) | 67.46±8.12 | 65.73±9.05 | 0.403 |
| 血尿素氮(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$) | 5.58±0.63 | 5.82±0.85 | 0.184 |
| 三酰甘油(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$) | 1.50±1.25 | 1.71±1.36 | 0.504 |
| 高密度脂蛋白(mmol/L, $\bar{x}\pm s$) | 1.64±0.58 | 1.80±0.87 | 0.369 |
| 低密度脂蛋白(mmol/L, $\bar{x}\pm s$) | 2.79±0.62 | 2.85±0.79 | 0.725 |

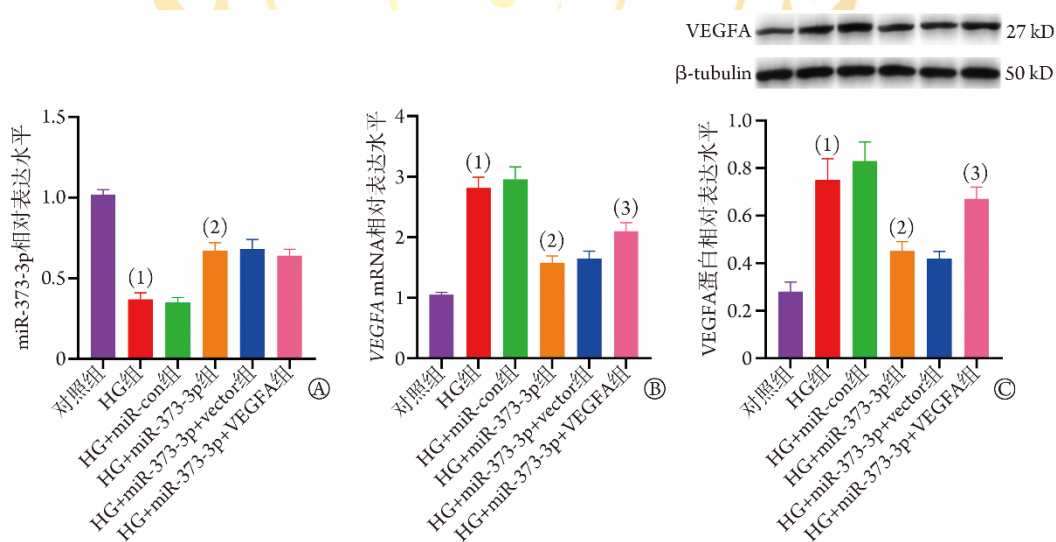
DR. 糖尿病视网膜病变; BMI. 体重指数

miR-373-3p 组 HRMEC 细胞活力、细胞增殖率以及 PCNA、Cyclin D1 蛋白水平均明显下调($P<0.05$); 与 HG+miR-373-3p+vector 组比较, HG+miR-373-3p+

VEGFA 组 HRMEC 细胞活力、细胞增殖率以及 PCNA、Cyclin D1 蛋白水平均明显上调($P<0.05$, 图2)。

2.4 miR-373-3p 对 HRMEC 中 HG 诱导的细胞迁移和血管生成的影响 Transwell 实验、血管形成实验和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, HG 组 HRMEC 迁移细胞数量、血管形成能力及 TGF- β_1 、Ang-1 蛋白水平均明显上调($P<0.05$); 与 HG+miR-con 组比较, HG+miR-373-3p 组 HRMEC 迁移细胞数量、血管形成能力以及 TGF- β_1 、Ang-1 蛋白水平均明显下调($P<0.05$); 与 HG+miR-373-3p+vector 组比较, HG+miR-373-3p+VEGFA 组 HRMEC 迁移细胞数量、血管形成能力以及 TGF- β_1 、Ang-1 蛋白水平均明显上调($P<0.05$, 图3)。

2.5 miR-373-3p 与 VEGFA 表达的关系 Targetscan 软件的预测结果显示, miR-373-3p 与 VEGFA 3'-UTR 存在结合位点(图4)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, 与 miR-con 组比较, miR-373-3p 组 HRMEC 中共转染 VEGFA-WT 后荧光素酶相对活性明显降低(0.34 ± 0.05 vs. 1.05 ± 0.04 , $P<0.05$); 而共转染 VEGFA-MUT 后荧光素酶活性变化无统计学意义(0.95 ± 0.08 vs. 0.98 ± 0.07 , $P>0.05$)。



HRMEC. 人视网膜微血管内皮细胞; HG. 高糖; VEGFA. 血管内皮生长因子A; A. miR-373-3p 表达水平(qRT-PCR); B. VEGFA mRNA 表达水平(qRT-PCR); C. VEGFA 蛋白表达水平(Western blotting); 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 HG+miR-con 组比较, (2) $P<0.05$; 与 HG+miR-373-3p+vector 组比较, (3) $P<0.05$

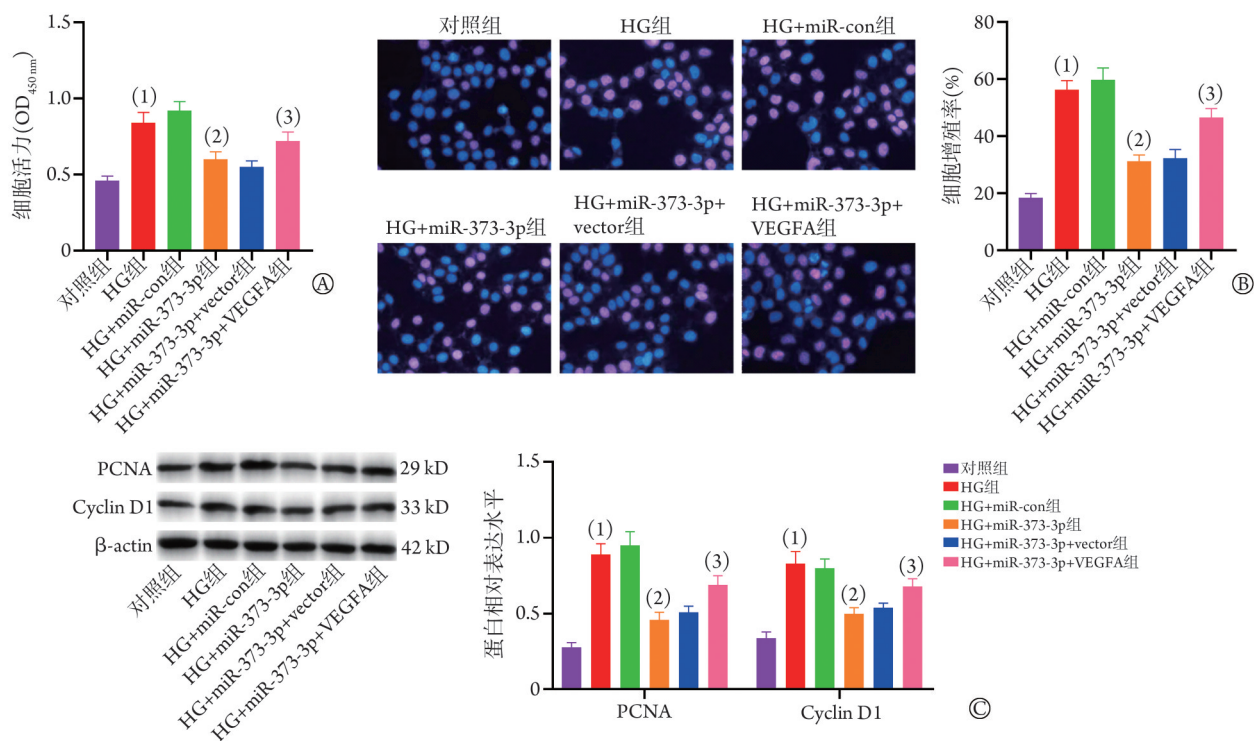
图1 各组 HRMEC 细胞中 miR-373-3p 和 VEGFA 表达水平比较

Fig.1 Expression levels of miR-373-3p and VEGFA in each group of HRMECs

3 讨 论

DR 可发生于大多数糖尿病患者, 是成人失明的重要病因^[2]。目前可用于减缓 DR 发展的临床治疗方法选择很少, 因此迫切需要了解 DR 的调控机制, 开发新的延缓 DR 进展的治疗方法。在 DR 早期, 在高糖的不利影响下 HRMEC 受损后可导致 BRB 功能障

碍并加速 DR 进展^[9]。因此, 高糖处理的 HRMEC 被用作 DR 的体外模型来探索特定基因对 DR 的影响^[10]。miRNA 在 DR 的发生和发展中可发挥关键作用。例如, miR-124-3p 可靶向 GTP 酶激活蛋白 SH3 功能区结合蛋白 2(GTPase activating protein SH3 binding protein 2, G3BP2)抑制高糖诱导的 HRMEC 功能障碍^[10]。既往研究发现, miR-373-3p 可在宫颈癌



HRMEC. 人视网膜微血管内皮细胞; HG. 高糖; PCNA. 增殖细胞核抗原; Cyclin D1. 细胞周期蛋白D1; A. 各组细胞活力比较; B. 各组 Ki-67 标记的细胞增殖情况 (免疫荧光染色, $\times 200$); C. 各组 PCNA、Cyclin D1 蛋白表达水平比较 (Western blotting); 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与 HG+miR-con 组比较, (2) $P < 0.05$; 与 HG+miR-373-3p+vector 组比较, (3) $P < 0.05$

图2 miR-373-3p 对 HRMEC 中 HG 诱导的细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of miR-373-3p on proliferation of HRMECs induced by high glucose

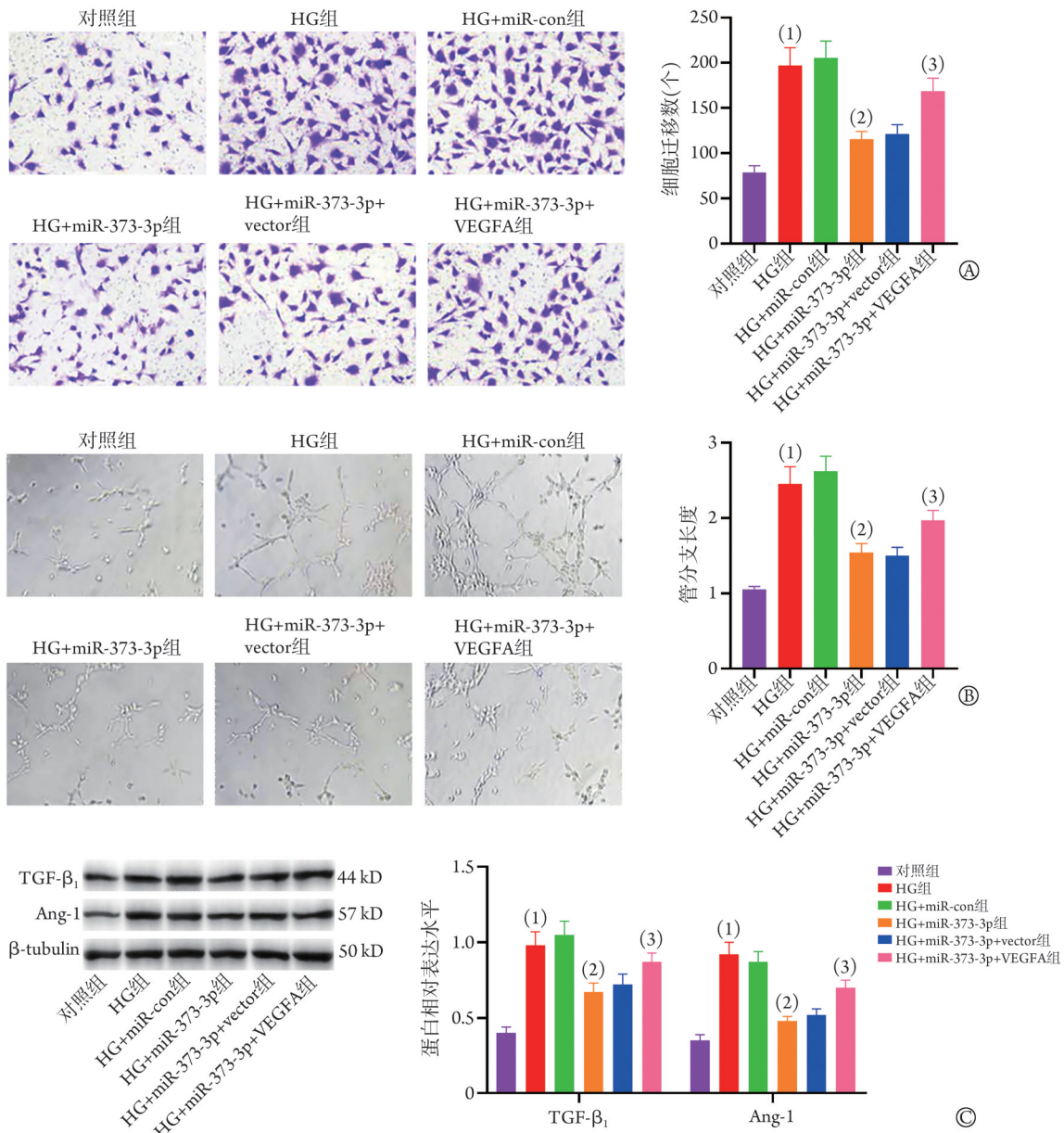
等多种人类癌症中发挥抗肿瘤基因的作用^[11]; miR-373-3p 在糖尿病患者中的差异性表达与血管生成有关^[12]。miR-138-5p 通过调节核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路对 DR 大鼠发挥保护作用^[13]。循环 miR-3197 和 miR-2116-5p 与 DR 相关^[14]。miR-181 通过靶向 Krüppel 样因子 6 增强视网膜内皮细胞的增殖和迁移能力, 进而促进 DR 的发展^[15]。近期研究报道 miR-373-3p 可参与多种疾病的调控, 如癌症和骨关节炎等^[11,16]。

本研究检测 miR-373-3p 在 DR 患者及高糖诱导的 HRMEC (一种 DR 的体外模型) 中的表达, 观察 miR-373-3p 对 HRMEC 增殖、迁移和血管生成的影响, 并试图揭示这些现象背后的调控机制。结果显示, miR-373-3p 在 DR 患者血清及高糖处理的 HRMEC 中下调; 细胞功能实验结果显示, miR-373-3p 过表达可抑制 HRMEC 细胞增殖、迁移和血管形成, 同时抑制细胞增殖相关蛋白 (PCNA、Cyclin D1)^[11] 和血管生成相关蛋白 (TGF- β_1 和 Ang-1)^[9] 的表达, 从而减轻高糖诱导的 HRMEC 损伤。既往研究显示, miR-373-3p 在多种疾病中具有抑制细胞损伤的作用, 与本研究结果一致。例如, miR-373-3p 的过表达可降低滋养层细胞的迁移和侵袭能力^[17]; 上调 miR-373-3p 可减轻脓毒症诱导的急性肝细胞损伤^[18]。以上结果提示

miR-373-3p 可减轻高糖诱导的 HRMEC 损伤, 可能成为 DR 的潜在干预靶点。

miRNA 通过与靶基因的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 结合, 可引起靶基因表达水平的改变, 调节多种细胞过程。本研究通过在线生物信息学数据库对 miR-373-3p 的靶基因进行预测, 结果显示 VEGFA 的 3'-UTR 与 miR-373-3p 存在互补的结合位点, VEGFA 被鉴定为 HRMEC 中 miR-373-3p 的下游靶标。VEGFA 是 VEGF 家族中分布广泛的成员, 是一种促血管生成的糖蛋白, 可参与内皮细胞的增殖、迁移^[9]。在增殖性 DR 中, VEGFA 可作为 miR-203a-3p 的靶基因参与视网膜血管生成^[19]。此外, VEGFA 在 DR 患者及高糖处理的 HRMEC 中明显高表达, 介导糖尿病视网膜微血管病变的恶化^[20], 与本研究结果一致。本研究结果还显示, VEGFA 可调控 PCNA、Cyclin D1、TGF- β_1 和 Ang-1 蛋白水平, 促进 HRMEC 增殖、迁移和血管生成, 进而削弱 miR-373-3p 对高糖诱导的 HRMEC 损伤的保护作用。上述结果提示 miR-373-3p 可能通过靶向 VEGFA 来减轻高糖诱导的 HRMEC 损伤。

本研究采用高糖处理 HRMEC 48 h 作为 DR 模型, 考虑到 DR 的进展涉及长期的高血糖, 这一模型可能难以全面反映 DR 的相关机制, 故而这种 DR 细胞模型虽被广泛使用和接受, 仍存在局限性^[21]。因此,



HRMEC. 人视网膜微血管内皮细胞; HG. 高糖; TGF-β₁. 转化生长因子-β₁; Ang-1. 血管生成素 1; A. Transwell 评估细胞迁移(×200); B. 血管形成实验评估血管生成的管状结构与管分支长度(×200); C. TGF-β₁、Ang-1 蛋白表达水平(Western blotting); 与对照组比较, (1)*P*<0.05; 与HG+miR-con组比较, (2)*P*<0.05; 与HG+miR-373-3p+vector组比较, (3)*P*<0.05

图3 miR-373-3p 对 HRMEC 中 HG 诱导的细胞迁移和血管生成的影响

Fig.3 Effects of miR-373-3p on cell migration and angiogenesis of HRMEC induced by high glucose

| Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom) | Site type | Context++ score | Context++ score percentile | Weighted context++ score | Conserved branch length | P _{CT} |
|---|-----------|-----------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| 176-182 VEGFA 3'-UTR 5'...GGAGACUCUGCAGAGCACUUU... hsa-miR-373-3p 3'...UGUGGGUUUAGCUUCGUGAAG | 7mer-m8 | -0.06 | 82 | -0.06 | 4.122 | 0.66 |

VEGFA. 血管内皮生长因子A

图4 Targetscan 软件预测 VEGFA 3'-UTR 与 miR-373-3p 的结合位点

Fig.4 The binding sites of VEGFA 3'-UTR and miR-373-3p predicted by Targetscan software

未来的DR细胞模型有必要采用长时间(甚至可能超过10年)、高水平(波动水平)的葡萄糖处理,但目前尚难以实现。

综上所述,本研究结果显示,miR-373-3p可通

过靶向VEGFA来减轻高糖处理的HRMEC细胞损伤,具有开发DR新疗法的潜力。然而,由于DR的发展涉及多基因、多靶点、多途径,仍需要更多的相关研究以进一步探究和验证。

【参考文献】

- [1] 王卫东, 陈佳, 何娅妮, 等. 糖尿病肾小管病的病理特征及 IFTA 评分与不良预后的关系[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(6): 702-707.
- [2] Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(4): 195-206.
- [3] Seewoodhary M. An overview of diabetic retinopathy and other ocular complications of diabetes mellitus[J]. Nurs Stand, 2021, 36(7): 71-76.
- [4] Zhang XL, Zhang G, Bai ZH. miR-34a attenuates myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy mice *via* targeting Pin-1[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(3): 642-653.
- [5] Wang R, Ma Y, Zhan S, *et al.* B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF- κ B pathway to induce VEGFA expression[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1):55-64.
- [6] Pan Q, Gao Z, Zhu C, *et al.* Overexpression of histone deacetylase SIRT1 exerts an antiangiogenic role in diabetic retinopathy *via* miR-20a elevation and YAP/HIF1 α /VEGFA depletion[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 319(5): E932-E943.
- [7] Zhao H, He Y. MiR-124-3p suppresses the dysfunction of high glucose-stimulated endothelial cells by targeting G3BP2[J]. Front Genet, 2021, 8(12):723625-723634.
- [8] Zhang J, Zeng Y, Chen J, *et al.* miR-29a/b cluster suppresses high glucose-induced endothelial-mesenchymal transition in human retinal microvascular endothelial cells by targeting Notch2[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4): 3108-3116.
- [9] Li J, Lu X, Wei L, *et al.* PHD2 attenuates high-glucose-induced blood retinal barrier breakdown in human retinal microvascular endothelial cells by regulating the Hif-1 α /VEGF pathway[J]. Inflamm Res, 2022, 71(1): 69-79.
- [10] Zhao H, He Y. MiR-124-3p suppresses the dysfunction of high glucose-stimulated endothelial cells by targeting G3BP2[J]. Front Genet, 2021, 12(12): 723625-723639.
- [11] Yu MM, Wang GJ, Wu KH, *et al.* MicroRNA-373-3p inhibits the growth of cervical cancer by targeting AKT1 both *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Biochim Pol, 2021, 68(4): 611-617.
- [12] Dai Y, Guo M, Jiang L, *et al.* Network pharmacology-based identification of miRNA expression of Astragalus membranaceus in the treatment of diabetic nephropathy[J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(5): e28747-e28756.
- [13] Li R, Yuan H, Zhao T, *et al.* miR-874 ameliorates retinopathy in diabetic rats by NF- κ B signaling pathway[J]. Adv Clin Exp Med, 2021, 30(4): 421-430.
- [14] Ji H, Yi Q, Chen L, *et al.* Circulating miR-3197 and miR-2116-5p as novel biomarkers for diabetic retinopathy[J]. Clin Chim Acta, 2020, 501(20): 147-153.
- [15] Cao J, Zhao C, Gong L, *et al.* MiR-181 enhances proliferative and migratory potentials of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy by targeting KLF6[J]. Curr Eye Res, 2022, 47(6): 882-888.
- [16] Fan H, Ding L, Yang Y. lncRNA SNHG16 promotes the occurrence of osteoarthritis by sponging miR-373-3p[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 117-129.
- [17] Lee HJ, Lim SM, Jang HY, *et al.* miR-373-3p regulates invasion and migration abilities of trophoblast cells *via* targeted CD44 and radixin [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6260-6285.
- [18] Li L, He Y, He XJ, *et al.* Down-regulation of long noncoding RNA LINC00472 alleviates sepsis-induced acute hepatic injury by regulating miR-373-3p/TRIM8 axis[J]. Exp Mol Pathol, 2020, 117(29): 104562-104579.
- [19] Han N, Xu H, Yu N, *et al.* MiR-203a-3p inhibits retinal angiogenesis and alleviates proliferative diabetic retinopathy in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model *via* targeting VEGFA and HIF-1 α [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(1): 85-94.
- [20] 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(11): 1175-1183.
- [21] Liu G, Zhou S, Li X, *et al.* Inhibition of hsa_circ_0002570 suppresses high-glucose-induced angiogenesis and inflammation in retinal microvascular endothelial cells through miR-1243/angiomin axis[J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(5): 767-777.