

胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著高于 NC 组 ($P < 0.05$)。正常对照组大鼠靠近视乳头处的视网膜血管整体呈“树状结构”,内极部毛细血管分布较致密,外极部毛细血管分布较疏松,血管壁均匀。糖尿病模型组大鼠视网膜血管的“树状结构”被破坏,毛细血管分布不均匀,毛细血管瘤形成。糖尿病 + NC 组大鼠视网膜血管损伤与糖尿病模型组相当。糖尿病 + miR-140-5p 组大鼠视网膜血管的损伤情况有所好转,毛细血管瘤减少。**结论** miR-140-5p 可以抑制 hRECs 在高糖条件下的增殖、迁移及成管能力,缓解糖尿病大鼠视网膜血管病变,其作用可能是通过 miR-140-5p 靶向调控 VEGF 的表达而实现。

关键词: 微 RNA-140-5p;血管内皮生长因子;视网膜血管病变;人视网膜血管内皮细胞

中图分类号: R587.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2023)10-0917-09

Effect of microRNA-140-5p targeted regulating vascular endothelial growth factor expression on proliferation,migration and lumen formation of human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose

ZHENG Hongxiang¹, LI Qinghang¹, LI Yanan¹, JIANG Xixi¹, LYU Jianping¹, ZHANG Tingping¹, WANG Miao^{1,2}

(1. Department of Ophthalmology, Jining NO. 2 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China; 2. Department of Ophthalmology, Yingjisha County People's Hospital, Yingjisha 834800, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microRNA (miR)-140-5p targeted regulating vascular endothelial growth factor expression on proliferation,migration and lumen formation of human retinal vascular endothelial cells (hRECs) induced by the high glucose. **Methods** The hRECs at logarithmic growth phase were divided into the normal control group, high glucose group,miR-140-5p group,negative control (NC) group and high glucose + miR-140-5p group. The cells in the normal control group and high glucose group did not receive any transfection. The cells in the miR-140-5p group and high glucose + miR-140-5p group were transfected with miR-140-5p mimics. The cells in the NC group were transfected with negative control mimics (mimics NC). The cells in high glucose group and high glucose + miR-140-5p group were used to prepare high glucose models by using a culture medium containing 30 mmol · L⁻¹ glucose. The expression level of miR-140-5p in cells in each group was detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The proliferation ability of cells in each group was detected by thiazole blue method. The migration ability of cells in each group was detected by Transwell method. The tubular ability of cells in each group was detected by lumen formation experiment. The expression of VEGF in the cells in each group was detected by Western blot method. Forty Sprague Dawley rats were randomly divided into the normal control group,diabetes model group,diabetes + NC group,diabetes + miR-140-5p group,with 10 rats in each group. Except for the normal control group,rats in the other groups were intraperitoneally injected with 65 mg · kg⁻¹ streptozotocin to prepare the diabetes model,and rats in the normal control group and the diabetes model group were injected with 200 μL normal saline through the tail vein,the rats in the diabetes + miR-140-5p group were injected with 200 μL miR-140-5p through the tail vein, the rats in the diabetes + NC group were injected with 200 μL mimics NC,once a day for 7 days,and then continued to be fed for 8 weeks. After anesthesia,the retina of rats was taken and stained with hematoxylin-eosin to observe the effect of miR-140-5p on retinal angiogenesis in diabetes model rats. **Results** The relative expression of miR-140-5p in the cells in the high glucose group and the high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the normal control group,while the relative expression of miR-140-5p in the cells in the miR-140-5p group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$);there was no significant difference in the relative expression of miR-140-5p between the NC group and the normal control group ($P > 0.05$);the relative expression of miR-140-5p in the cells in the miR-140-5p group,NC group and high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the high glucose group ($P < 0.01$);the relative expression of miR-140-5p in the cells in the NC group and high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the miR-140-5p group ($P < 0.01$);the relative expression of miR-140-5p in the cells in the high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the NC group ($P < 0.05$). At 24,48 and 72 hours of cultivation,the cell proliferation rate of cells in the high glucose group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$);there was no significant difference in cell proliferation rate between the miR-140-5p group,NC group and the normal control group ($P > 0.05$);at 24 hours of cultivation,there was no significant difference in cell proliferation rate between the high glucose + miR-140-5p group and the normal control group ($P > 0.05$);at 48 and 72 hours of cultivation,the cell proliferation rate in the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$);at 24,48 and 72 hours of cultivation,the cell proliferation rates in the miR-140-5p group,NC group, and high glucose + miR-140-5p group were significantly lower than those in the high glucose group ($P < 0.05$);at 24,48 and 72 hours of cultivation,there was no

significant difference in cell proliferation rate between the NC group and the miR-140-5p group ($P > 0.05$); at 24 hours of cultivation, there was no significant difference in cell proliferation rate between the high glucose + miR-140-5p group and the miR-140-5p group, NC group ($P > 0.05$); at 48 and 72 hours of cultivation, the cell proliferation rate in the high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the miR-140-5p group and NC group ($P < 0.01$). The number of migrated cells in the high glucose group was significantly higher than that in the normal control group, while the number of migrated cells in the miR-140-5p group and NC group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the number of migrated cells between the high glucose + miR-140-5p group and the normal control group ($P > 0.05$); the number of migrated cells in the miR-140-5p group, NC group and high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the high glucose group ($P < 0.01$); the number of migrated cells in the NC group and the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the miR-140-5p group ($P < 0.01$); the number of migrated cells in the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the NC group ($P < 0.01$). The number of lumen formation in the high glucose group was significantly higher than that in the normal control group, while the number of lumen formation in the miR-140-5p group and NC group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the number of cell lumen formation between the high glucose + miR-140-5p group and the normal control group ($P > 0.05$); the number of cell lumen formation in the miR-140-5p group, NC group, and high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the high glucose group ($P < 0.01$); the number of cell lumen formation in the NC group and the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the miR-140-5p group ($P < 0.05$); the number of cell lumen formation in the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the NC group ($P < 0.05$). The relative expression of VEGF protein in the cells in the high glucose group and the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the normal control group, while the relative expression of VEGF protein in the cells in the miR-140-5p group was significantly lower than that in the normal control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the relative expression of VEGF protein between the NC group and the normal control group ($P > 0.05$); the relative expression of VEGF protein in the cells in the miR-140-5p group, NC group and high glucose + miR-140-5p group was significantly lower than that in the high glucose group ($P < 0.01$); the relative expression of VEGF protein in the cells in the NC group and high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the miR-140-5p group ($P < 0.01$); the relative expression of VEGF protein in the cells in the high glucose + miR-140-5p group was significantly higher than that in the NC group ($P < 0.05$). The retinal blood vessels of rats in the normal control group near the myopic nipple were generally in a "tree-like structure"; the distribution of capillaries in the inner pole was relatively dense, while the distribution of capillaries in the outer pole was relatively loose, and the blood vessel wall was uniform. The "dendriform structure" of retinal blood vessels of rats in the diabetes model group was destroyed, the distribution of capillaries was uneven, and capillary hemangiomas were formed. The retinal vascular injury of rats in the diabetes + NC group was equivalent to that in the diabetes model group. In the diabetes + miR-140-5p group, the damage of retinal blood vessels of rats was improved, and the capillary hemangioma was reduced. **Conclusion** The miR-140-5p can inhibit the proliferation, migration and tube formation of hRECs under high glucose conditions, and alleviate retinal angiopathy in diabetes rats. Its mechanism may be through miR-140-5p targeting the regulation of VEGF expression.

Key words: microRNA-140-5p; vascular endothelial growth factor; pathology of retinal vessels; human retinal vascular endothelial cells

糖尿病视网膜病变是慢性高血糖引起的视网膜微血管并发症,其病变发生率较高,是造成视力丧失的重要因素^[1-2]。糖尿病视网膜病变早期毛细血管周细胞丢失和基底膜增厚,进而导致内皮细胞过度增殖,最终诱发视网膜血管异常生成,形成糖尿病视网膜病变^[3]。研究表明,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)高表达会使血管异常生长,导致糖尿病视网膜病变的恶化^[4];而抗 VEGF 药物可抑制眼底新生血管,阻止糖尿病性黄斑水肿,提高糖尿病视网膜病变远期预后^[5]。微 RNA (microRNA, miRNA) 是小型、高度保守的非编

码 RNA,可结合并降解靶 mRNA,或抑制其翻译,进而调节转录后基因表达。miR-140-5p 是由多个核苷酸组成的非编码 RNA,参与胚胎发育、骨骼代谢、心脏重构、细胞分化等生物学过程,且与多种疾病的发生发展密切相关。研究发现,miR-140-5p 可以靶向 VEGF 调节血管生成,进而保护缺血性脑损伤及抑制乳腺癌细胞的扩散^[6-7]。糖尿病视网膜病变为视网膜处的微血管异常生成导致的疾病,miR-140-5p 是否通过 VEGF 调节糖尿病视网膜微血管的增生尚有待研究。本课题组前期实验验证了 miR-140-5p 和 VEGF 可靶向结合,本研究采用高糖培养人视网膜

血管内皮细胞 (human retinal vascular endothelial cells, hRECs) 模拟高血糖诱发视网膜病变, 探讨 miR-140-5p 对高糖诱导的 hRECs 增殖、迁移和成管能力的影响及其靶向 VEGF 机制, 旨在为 miR-140-5p 治疗糖尿病视网膜病变提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

7 周龄雄性无特定病原体级 Sprague Dawley 大鼠 40 只, 体质量 190 ~ 210 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2016-0006]。本研究符合实验动物伦理, 经济宁市第二人民医院伦理委员会审核批准。

1.2 细胞、主要试剂与仪器

hRECs 购自中国科学院上海细胞研究所; 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)、青链双抗和总 RNA 抽提试剂均购自上海白鲨生物科技有限公司, 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, miR-140-5p 模拟物 (miR-140-5p mimics)、阴性对照模拟物 (mimics negative control, mimics NC)、VEGF-3' UTR WT 序列、VEGF-3' UTR MUT 序列由上海亚载生物科技有限公司合成, pmigLO 载体购自上海泽叶生物科技有限公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、二喹啉甲酸法蛋白定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 基质胶购自美国 BD 公司, 硝酸纤维素膜购自美国 millipore 公司, VEGF- β -actin 一抗及二抗购自北京博奥森生物技术有限公司, 噻唑蓝、链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司, 多聚甲醛、无菌无酶处理水购自上海碧云天生物技术有限公司, 二甲基亚砜、氯仿、异丙醇、无水乙醇、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠购自国药集团化学试剂上海有限公司; 8 孔腔室载玻片购自美国 BD 公司, 96 孔板、6 孔板和 Transwell 小室购自美国 Corning 公司, Scientific 8000 细胞培养箱和 VARIOSKAN LUX 型全波长酶标仪购自美国 Thermo 公司, DMI3000B 倒置拍照显微镜购自德国 Leica 公司, 3K15 低温冷冻离心机购自美国 Sigma 公司, LightCycler® 480II 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司, 一体式化学发光成像仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将 hRECs 加入含体积分数 10% 胎牛血清和体

积分数 1% 青链双抗的 DMEM 中, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养, 隔日换 1 次培养基, 融合度达 90% 左右时传代。

1.3.2 细胞转染

取对数生长期 hRECs, 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 分别接种至 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后, 待细胞生长至融合度 80% ~ 90% 时进行转染: 将 6 孔板中的培养液吸弃, PBS 清洗, 按照 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒说明书混合工作液后, 用无血清 DMEM 培养基稀释, 每孔加入 2 mL 工作液后, 再加入 50 μL miR-140-5p mimics 或 mimics NC, 混合均匀, 放入细胞培养箱中转染 24 h 后进行后续实验。

1.3.3 细胞分组及处理

(1) 取对数生长期 hRECs, 分为正常对照组、高糖组; 正常对照组细胞调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 取 2 mL 接种于 6 孔板中, 给予 DMEM 完全培养基, 置于细胞培养箱中继续培养 24 h; 高糖组细胞调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 取 2 mL 接种于 6 孔板中, 给予含 30 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 DMEM 完全培养基, 置于细胞培养箱中继续培养 24 h。(2) 另取“1.3.2”项中转染 miR-140-5p mimics 或 mimics NC 的 hRECs 2 mL, 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 分别设为 miR-140-5p 组、阴性对照 (negative control, NC) 组, 给予 DMEM 完全培养基, 置于细胞培养箱中继续培养 24 h。(3) 取“1.3.2”项中转染 miR-140-5p mimics 的 hRECs 2 mL, 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 设为高糖 + miR-140-5p 组, 给予含 30 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 DMEM 完全培养基, 置于细胞培养箱中继续培养 24 h。

1.3.4 RT-PCR 法检测各组细胞中 miR-140-5p 的表达

取“1.3.3”项中培养的各組细胞, 胰蛋白酶消化, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集细胞, 用总 RNA 抽提试剂提取总 RNA, 并使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 严格按照试剂盒说明书进行操作。将 cDNA 作为模板, 以 U6 为内参基因, 应用 RT-PCR 技术检测 miR-140-5p 的 Ct 值。反应体系: cDNA 2.0 μL , 2 \times SYBR Premix Ex TaqII 5.0 μL , 上下游引物各 0.4 μL , 无酶水 2.2 μL 。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 65 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, miR-140-5p 上游引物序列为 5'-CGGACAGTGGTTT-TACCC-3', 下游引物序列为 5'-CTCAACTGGTGTCTGTG-GA-3'; U6 上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3', 下游引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-140-5p 的相对表

达量。实验重复 3 次,取均值。

1.3.5 噻唑蓝法测定各组细胞增殖能力

取“1.3.3”项中培养的各组细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$,每孔 200 μL 接种于 96 孔板,每组设 8 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的饱和湿度培养箱内培养 24、48、72 h,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 噻唑蓝溶液 20 μL ,继续孵育 4 h 后,弃去孔内上清液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷,室温振荡 5 min,结晶物充分溶解后,用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔吸光度值,以吸光度值代表细胞增殖能力,吸光度值越高代表增殖能力越高,计算细胞增殖率(细胞增殖率 = 处理组吸光度值/正常对照组吸光度值 \times 100%)。实验重复 3 次,取均值。

1.3.6 Transwell 法测定各组细胞迁移能力

取“1.3.3”项中培养的各组细胞,更换为无血清培养基继续培养 24 h,胰蛋白酶消化细胞后用无血清培养液重悬,于 Transwell 小室中加入 300 μL 浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的无血清细胞悬液后,将 Transwell 小室置于 24 孔板上,再向 24 孔板中每孔加入 600 μL 完全培养基,每组设 3 个复孔,继续培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,弃去 Transwell 小室内液体,PBS 漂洗 2 次,用棉签擦拭掉 Transwell 小室底膜上层细胞,对 Transwell 小室底膜下层细胞用预冷的 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 10 min,随机选取 5 个视野进行显微镜拍照并计数迁移细胞数,取均值。迁移细胞数越多表示细胞迁移能力越强。

1.3.7 管腔形成实验测定各组细胞成管能力

4 $^{\circ}\text{C}$ 下融化基质胶,于 8 孔腔室载玻片中每孔加入 10 μL 基质胶,然后将 8 孔腔室载玻片置于含少量水的培养皿中,将培养皿放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 30 min,使基质胶凝固。将“1.3.3”项中培养 24 h 的各组细胞,更换为无血清培养基继续培养 24 h,胰蛋白酶消化细胞后用无血清培养液重悬至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,加入到铺好基质胶的 8 孔腔室载玻片中,每孔 50 μL ,每组设 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的饱和湿度培养箱内培养 8 h 后,显微镜下观察,随机选取 5 个视野拍照并计数形成管腔数,取均值。以管腔数量表示细胞的成管能力,管腔数越多表示细胞成管能力越强。

1.3.8 Western blot 法检测各组细胞中 VEGF 蛋白的表达

取“1.3.3”项中培养 24 h 的各组细胞,用预冷 PBS 漂洗 3 遍,加入含蛋白酶抑制剂的预冷裂解液,充分震荡,置于冰上静置 30 min,细胞刮收取细胞后,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,使用二喹啉甲酸法测定上清液蛋白浓度,沸水浴 10 min 使蛋白充分变性。取每组蛋白样品 30 μg ,用体积分数 12% 分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳电压为恒压 60 V,之后将蛋白采用

350 mA 恒电流转移 2 h 至硝酸纤维素膜上,取出硝酸纤维素膜,使用 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗(VEGF、 β -actin;滴度为 1 : 1 000)孵育 12 h,缓冲液洗膜后加二抗(滴度为 1 : 2 000)室温孵育 1 h,缓冲液冲洗后进行电化学发光,用一体式化学发光成像仪拍照并分析灰度值,VEGF 蛋白相对表达量以 VEGF 条带灰度值与内参(β -actin)灰度值的比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.3.9 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察 miR-140-5p 对糖尿病模型大鼠视网膜血管生成的影响

按随机数字表法将 40 只 SD 大鼠分为正常对照组、糖尿病模型组、糖尿病 + NC 组和糖尿病 + miR-140-5p 组,每组 10 只。正常对照组大鼠腹腔注射生理盐水($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$);糖尿病模型组、糖尿病 + miR-140-5p 组和糖尿病 + NC 组大鼠腹腔注射 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链脲佐菌素($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),7 d 后大鼠血糖值 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为造模成功。第 8 天,正常对照组和糖尿病模型组大鼠经尾静脉注射 200 μL 生理盐水,糖尿病 + NC 组大鼠经尾静脉注射 200 μL mimics NC ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),糖尿病 + miR-140-5p 组大鼠经尾静脉注射 200 μL miR-140-5p mimics ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),每日 1 次,持续给药 7 d。大鼠继续饲养 8 周后,腹腔注射 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,快速完整摘除右眼球,置于多聚甲醛固定液中,3 d 后用 PBS 洗涤 3 次,用尖头镊子去除前眼角膜和晶状体,PBS 溶液冲洗掉玻璃体,剥离出内壁的视网膜层,胰蛋白酶消化,再用生理盐水反复冲洗视网膜,以去除黏附在视网膜血管网上的细胞,直至视网膜中的血管网呈现透明状,将视网膜转移至石蜡防脱玻片上,使视网膜完全展开,自然晾干后,HE 染色,脱水,透明,中性树脂封固,镜下观察比较各组大鼠视网膜毛细血管病变情况。当大鼠视网膜血管整体呈“树状结构”,视盘处毛细血管分布较致密均匀,外极部毛细血管分布较疏松,为正常视网膜血管形态;当大鼠视网膜血管整体“树状结构”被破坏,毛细血管分布不均匀,出现毛细血管瘤,为糖尿病视网膜病变。

1.4 统计学处理

应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计与分析。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量比较

正常对照组、高糖组、miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量分别为 1.00 ± 0.05 、 0.49 ± 0.09 、 3.70 ± 0.21 、 $1.04 \pm$

0.08、0.83 ± 0.06。5 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 389.100, P < 0.01$)。高糖组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著低于正常对照组, miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); NC 组与正常对照组细胞中 miR-140-5p 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著高于高糖组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著低于 miR-140-5p 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。高糖 + miR-140-5p 组细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著低于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 5 组细胞增殖能力比较

培养 24、48、72 h 时, 5 组细胞增殖能力比较差异有统计学意义 ($F = 5.629, 32.410, 55.430, P < 0.01$)。培养 24、48、72 h 时, 高糖组细胞增殖率均显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); miR-140-5p 组、NC 组与正常对照组细胞增殖率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 24 h 时, 高糖 + miR-140-5p 组与正常对照组细胞增殖率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培养 48、72 h 时, 高糖 + miR-140-5p 组细胞增殖率显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。培养 24、48、72 h 时, miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞增殖率均显著低于高糖组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。培养 24、48、72 h 时, NC 组与 miR-140-5p 组细胞增殖率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 24 h 时, 高糖 + miR-140-5p 组与 miR-140-5p 组、NC 组细胞增殖率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培养 48、

72 h 时, 高糖 + miR-140-5p 组细胞增殖率显著高于 miR-140-5p 组和 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

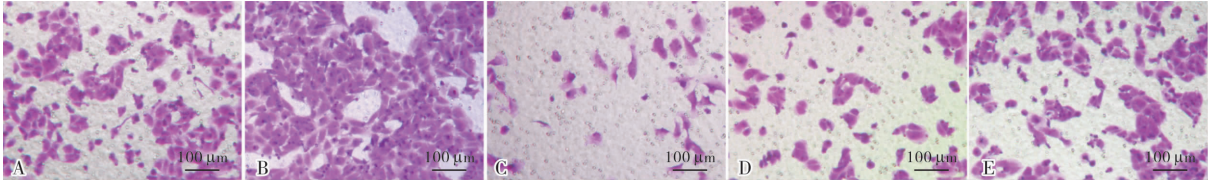
表 1 5 组细胞增殖能力比较
Tab. 1 Comparison of cell proliferation ability among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖率/%		
		24 h	48 h	72 h
正常对照组	8	100.00 ± 7.47	100.00 ± 5.69	100.00 ± 6.15
高糖组	8	113.70 ± 7.43 ^a	124.53 ± 6.86 ^a	130.12 ± 5.66 ^a
miR-140-5p 组	8	99.21 ± 8.43 ^b	96.11 ± 5.82 ^b	94.46 ± 6.70 ^b
NC 组	8	98.55 ± 6.35 ^b	97.20 ± 7.41 ^b	95.09 ± 6.45 ^b
高糖 + miR-140-5p 组	8	104.67 ± 7.89 ^b	116.02 ± 5.74 ^{abcd}	120.28 ± 5.82 ^{abcd}
F		5.629	32.410	55.430
P		0.001	0.000	0.000

注: 与正常对照组比较^a $P < 0.01$; 与高糖组比较^b $P < 0.05$; 与 miR-140-5p 组比较^c $P < 0.01$; 与 NC 组比较^d $P < 0.01$ 。

2.3 5 组细胞迁移能力比较

正常对照组、高糖组、miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组迁移细胞数分别为 83.00 ± 9.17、175.00 ± 8.00、29.33 ± 4.04、62.67 ± 5.03、82.00 ± 6.00。5 组迁移细胞数比较差异有统计学意义 ($F = 194.400, P < 0.01$)。高糖组迁移细胞数显著高于正常对照组, miR-140-5p 组、NC 组迁移细胞数显著低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。高糖 + miR-140-5p 组与正常对照组迁移细胞数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组迁移细胞数显著低于高糖组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。NC 组、高糖 + miR-140-5p 组迁移细胞数均显著高于 miR-140-5p 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。高糖 + miR-140-5p 组迁移细胞数显著高于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 1。



A: 正常对照组; B: 高糖组; C: miR-140-5p 组; D: NC 组; E: 高糖 + miR-140-5p 组。

图 1 5 组细胞迁移情况 (结晶紫染色)

Fig. 1 Migration of cells in the five groups (crystal violet staining)

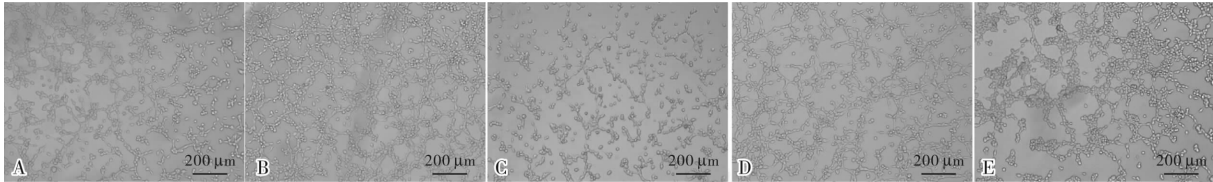
2.4 5 组细胞成管能力比较

正常对照组、高糖组、miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞管腔形成数量分别为 102.70 ± 7.64、165.70 ± 9.45、61.33 ± 6.03、77.33 ± 5.69、102.00 ± 9.54。5 组细胞管腔形成数量比较差

异有统计学意义 ($F = 75.520, P < 0.01$)。高糖组管腔形成数量显著高于正常对照组, miR-140-5p 组、NC 组细胞管腔形成数量显著低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 高糖 + miR-140-5p 组与正常对照组细胞管腔形成数量比较差异无统计学意义

($P>0.05$)。miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞管腔形成数量均显著低于高糖组,差异有统计学意义($P<0.01$)。NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞管腔形成数量均显著高于 miR-140-5p 组,差异有

统计学意义($P<0.05$)。高糖 + miR-140-5p 组细胞管腔形成数量显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 2。



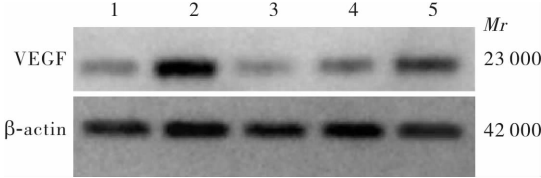
A: 正常对照组;B: 高糖组;C: miR-140-5p 组;D: NC 组;E: 高糖 + miR-140-5p 组。

图 2 5 组细胞管腔形成情况

Fig. 2 Tube formation of cells in the five groups

2.5 5 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量比较

正常对照组、高糖组、miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.09 、 2.34 ± 0.17 、 0.46 ± 0.04 、 1.10 ± 0.11 、 1.47 ± 0.27 。5 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F = 58.080, P < 0.01$)。高糖组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著高于正常对照组,miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);NC 组与正常对照组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-140-5p 组、NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著低于高糖组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。NC 组、高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量均显著高于 miR-140-5p 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 3。



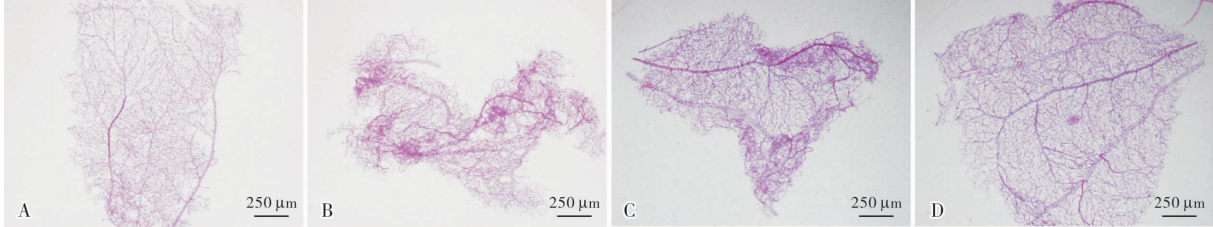
1: 正常对照组;2: 高糖组;3: miR-140-5p 组;4: NC 组;
5: 高糖 + miR-140-5p 组。

图 3 5 组细胞中 VEGF 蛋白表达

Fig. 3 Expression of VEGF protein in cells in the five groups

2.6 miR-140-5p 对糖尿病模型大鼠视网膜血管生成的影响

正常对照组大鼠靠近视乳头处的视网膜血管整体呈“树状结构”,内极部毛细血管分布较致密,外极部毛细血管分布较疏松,血管壁均匀(图 4A)。糖尿病模型组大鼠视网膜血管的“树状结构”被破坏,毛细血管分布不均匀,毛细血管瘤形成(图 4B)。糖尿病 + NC 组大鼠视网膜血管损伤与糖尿病模型组相当(图 4C)。糖尿病 + miR-140-5p 组大鼠视网膜血管的损伤情况有所好转,毛细血管分布较均匀,毛细血管瘤减少(图 4D)。



A: 正常对照组;B: 糖尿病模型组;C: 糖尿病 + NC 组;D: 糖尿病 + miR-140-5p 组。

图 4 4 组大鼠视网膜血管生成情况 (HE 染色)

Fig. 4 Retinal angiogenesis of rats in the four groups (HE staining)

3 讨论

2020 年糖尿病视网膜病变患者约为 1.03 亿人,预计到 2045 年其将增加至约 1.61 亿人^[8]。但糖尿病视网膜病变的发病机制和诊疗措施仍不十分明确,有待继续研究^[9]。多种 miRNA 和细胞因子参

与视网膜血管内皮细胞的病变,选择有效靶点成为治疗糖尿病视网膜病变的关键。

高糖培养视网膜血管内皮细胞是目前糖尿病视网膜病变研究的重要模型之一^[10]。高血糖条件下多种 miRNA 表达异常,是诱发糖尿病视网膜病变的基础^[11-12]。miR-140-5p 对多种疾病具有调控作用,

如 GUO 等^[13]研究发现,敲除 miR-140-5p 可以促进大鼠骨髓干细胞的成骨作用;TOURY 等^[14]研究发现,miR-140-5p 在抗衰老中具有重要作用;ZHANG 等^[15]研究显示,上调 miR-140-5p 可减轻小鼠关节炎的发生。本研究采用高糖培养条件诱导 hRECs 损伤,并探讨 miR-140-5p 在糖尿病视网膜病变中的作用,结果显示,高糖组 hRECs 细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著低于正常对照组,提示高糖培养会降低 hRECs 细胞中 miR-140-5p 的表达;miR-140-5p 组 hRECs 细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著高于正常对照组,而 NC 组 hRECs 细胞中 miR-140-5p 相对表达量与正常对照组相比无显著变化,说明 hRECs 细胞转染 miR-140-5p 成功;此外,高糖 + miR-140-5p 组 hRECs 细胞中 miR-140-5p 相对表达量显著高于高糖组,提示转染 miR-140-5p 后的 hRECs 细胞在高糖培养条件下仍然高表达 miR-140-5p。

有研究显示,高糖环境下 hRECs 的增殖、迁移和成管能力增加^[16-17],这可能是糖尿病视网膜血管病变的细胞学基础。机体内的血糖水平会随着饮食和昼夜节律变化而波动,当机体糖代谢系统出现紊乱时,体内血糖处于持续高水平状态,会对视网膜等血管内皮细胞的生长产生促进作用^[18],这可能是 hRECs 细胞在高糖培养条件下增殖、迁移和成管能力增强的原因。因此,抑制高糖环境下 hRECs 生物学特性的异常改变,将对治疗糖尿病视网膜病变产生积极作用。本研究进一步观察了高糖培养及 miR-140-5p 对 hRECs 细胞增殖、迁移和管腔形成的影响,结果显示,高糖组 hRECs 细胞的增殖、迁移和成管能力均显著高于正常对照组;而高糖 + miR-140-5p 组 hRECs 细胞的增殖能力、迁移能力和成管能力则均显著低于高糖组,说明 hRECs 细胞转染 miR-140-5p 后可以缓解高糖造成的细胞损伤,提示 miR-140-5p 可能具有调节视网膜血管的作用,这为开发基于 miR-140-5p 治疗糖尿病视网膜病变的药物提供了参考。

VEGF 过表达是糖尿病视网膜微血管病理性增生的重要原因之一。研究显示,糖尿病视网膜病变患者的视网膜色素上皮细胞中 VEGF 蛋白水平显著增加^[19]。而 VEGF 高表达可进一步促进血管的异常生长,导致糖尿病视网膜病变的发生^[20]。抗 VEGF 药物治疗可显著提高视网膜病变患者视力^[21]。本研究结果显示,高糖组 hRECs 细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著高于正常对照组,而高糖 + miR-140-5p 组细胞中 VEGF 蛋白相对表达量显著低于高糖组;提示高糖诱导会导致 VEGF 的表达增高,而 miR-140-5p 水平的增高会抑制 VEGF 的表达,miR-140-5p 可能是通过靶向 VEGF 调控 hRECs 细胞免受高糖损伤。以上结果初步提示,miR-140-5p

是通过靶向减少 VEGF 表达来调控 hRECs 的增殖、迁移和成管能力。

糖尿病视网膜病变早期特征为视网膜血管内皮细胞损伤,晚期病理改变为微血管瘤以及新生血管的形成^[22]。PARK 等^[23]研究发现,链脲佐菌素选择性破坏大鼠胰岛 β 细胞,使大鼠持续高血糖,8 周后会产生早期的视网膜病变。TROST 等^[24]报道,糖尿病大鼠视网膜血管结构损伤、毛细血管分布改变、毛细血管瘤形成的可能因为长期高血糖造成视网膜毛细血管的周细胞减少及内皮细胞增生所致。为验证 miR-140-5p 对糖尿病视网膜病变的治疗作用,本研究构建了链脲佐菌素诱导的大鼠糖尿病模型,结果显示,正常对照组大鼠靠近视乳头处的视网膜血管整体呈“树状结构”,内极部毛细血管分布较致密,外极部毛细血管分布较疏松,血管壁均匀;糖尿病模型组大鼠视网膜血管的“树状结构”被破坏,毛细血管分布不均匀,毛细血管瘤形成;糖尿病 + NC 组大鼠视网膜血管损伤与糖尿病模型组相当;糖尿病 + miR-140-5p 组大鼠视网膜血管的损伤情况有所好转,毛细血管分布较均匀,毛细血管瘤减少。给予 miR-140-5p 干预后,大鼠视网膜血管的损伤好转。以上结果说明,高糖会造成 hRECs 增殖、迁移和成管能力增加,这可能是糖尿病大鼠视网膜血管病理改变的细胞学基础;而 miR-140-5p 干预后,会显著抑制高糖诱导的 hRECs 增殖、迁移和成管能力,使大鼠视网膜血管免受高糖的损伤。

4 结论

miR-140-5p 可以抑制 hRECs 在高糖条件下的增殖、迁移及成管能力,缓解糖尿病大鼠视网膜血管病变,其作用可能是通过 miR-140-5p 靶向调控 VEGF 的表达而实现。

参考文献:

- [1] LIN K Y, HSIH W H, LIN Y B, et al. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy[J]. *J Diabetes Invest*, 2021, 12(8): 1322-1325.
- [2] 张睿, 杨泽敏. 2 型糖尿病视网膜病变患病情况及其危险因素[J]. *慢性病学杂志*, 2021, 22(7): 989-992.
ZHANG R, YANG Z M. Prevalence and risk factors of type 2 diabetic retinopathy[J]. *Chronic Pathematol J*, 2021, 22(7): 989-992.
- [3] WANG W, LO A C Y. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1816.
- [4] THOMAS A A, FENG B, CHAKRABARTI S. ANRIL: a regulator of vegf in diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(1): 470-480.
- [5] 邓玲, 潘颖喆, 王慧. 糖尿病性视网膜病变的治疗进展[J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(3): 489-491.
DENG L, PAN Y Z, WANG H. Progress in the treatment of diabetic

retinopathy[J]. *Int Eye Sci*,2020,20(3):489-491.

[6] SUN J J,TAO S X,LIU L F,*et al.* miR-140-5p regulates angiogenesis following ischemic stroke by targeting VEGFA[J]. *Mol Med Rep*,2016,13(5):4499-4505.

[7] LU Y,QIN T,LI J,*et al.* MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer[J]. *Cancer Gene Ther*,2017,24(9):386-392.

[8] TEO Z L,THAM Y C,YU M,*et al.* Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045:systematic review and meta-analysis[J]. *Ophthalmology*,2021,128(11):1580-1591.

[9] TAN T E,WONG T Y. Diabetic retinopathy:looking forward to 2030[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*,2023,13:1077669.

[10] 袁晨,张梅,谢学军. 血-视网膜内屏障体外模型构建研究进展[J]. 国际眼科杂志,2021,21(6):991-995.

YUAN C,ZHANG M,XIE X J. Progress in the construction of inner blood retinal barrier model *in vitro*[J]. *Int Eye Sci*,2021,21(6):991-995.

[11] GUI F,YOU Z,FU S,*et al.* Endothelial dysfunction in diabetic retinopathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*,2020,11:591.

[12] WANG H,SU X,ZHANG Q Q,*et al.* MicroRNA-93-5p participates in type 2 diabetic retinopathy through targeting sirT1[J]. *Int Ophthalmol*,2021,41(11):3837-3848.

[13] GUO P Y,WU L F,XIAO Z Y,*et al.* Knockdown of miR-140-5 promotes osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting TLR4 and BMP2 and promoting fracture healing in the atrophic nonunion rat model[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2019,23(5):2112-2124.

[14] TOURY L,FRANKEL D,AIRAULT C,*et al.* miR-140-5p and miR-140-3p:key actors in aging-related diseases? [J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(19):11439.

[15] ZHANG L,QIU J,SHI J,*et al.* MicroRNA-140-5p represses chondrocyte pyroptosis and relieves cartilage injury in osteoarthritis by inhibiting cathepsin B/Nod-like receptor protein 3[J]. *Bioengineered*,2021,12(2):9949-9964.

[16] 焦军杰,姚文艳,张前辉,等. 转甲状腺素蛋白介导 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 通路对高糖诱导的人视网膜内皮细胞新生血管生成的影响[J]. 眼科新进展,2023,43(2):99-104.

JIAO J J,YAO W Y,ZHANG Q H,*et al.* Effect of the transthyretin on high glucose-induced angiogenesis of human retinal endothelial cells via mediating the signal transducer and activator of transcription 4/miR-223-3p/F-box and WD repeat domain containing 7 pathway[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2023,43(2):99-104.

[17] 邵琨,王杨宁致,詹鹏飞. 高糖环境下 lnc RNA MEG3 对人视网膜血管内皮细胞增殖和迁移的作用及其机制[J]. 眼科新进展,2021,41(7):621-627.

SHAO J,WANGYANG N Z,ZHAN P F. Effects of lncRNA MEG3 on the growth and migration of human retinal microvascular endothelial cells under high glucose environment and its mechanisms[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2021,41(7):621-627.

[18] MASON I C,QIAN J,ADLER G K,*et al.* Impact of circadian disruption on glucose metabolism:implications for type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*,2020,63(3):462-472.

[19] AMATO R,BIAGIONI M,CAMMALLERI M,*et al.* VEGF as a survival factor in *ex vivo* models of early diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2016,57(7):3066-3076.

[20] KEEGAN G,PARDHAN S,CHICHGER H. Lutein and zeaxanthin attenuates VEGF-induced neovascularisation in human retinal microvascular endothelial cells through a Nox4-dependent pathway[J]. *Exp Eye Res*,2020,197:108104.

[21] TAN Y,FUKUTOMI A,SUN M T,*et al.* Anti-VEGF crunch syndrome in proliferative diabetic retinopathy:a review [J]. *Surv Ophthalmol*,2021,66(6):926-932.

[22] EBNETER A,ZINKERNAGEL M S. Novelities in diabetic retinopathy[J]. *Endocr Dev*,2016,31:84-96.

[23] PARK Y G,LEE J Y,KIM C,*et al.* Early microglial changes associated with diabetic retinopathy in rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. *J Diabetes Res*,2021,2021:4920937.

[24] TROST A,BRUCKNER D,RIVERA F J,*et al.* Pericytes in the Retina[J]. *Adv Exp Med Biol*,2019,1122:1-26.

(本文编辑:李胜利)

《新乡医学院学报》被 Scopus 数据库收录

近日,接 Elsevier 出版集团邮件通知,经严格评审遴选,《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University) 正式被 Scopus 数据库收录。《新乡医学院学报》是新乡医学院主管主办的综合性医药卫生类学术期刊,被 Scopus 数据库收录,标志着国际权威数据库对该刊的高度认可,这对提升该刊学术影响力、传播力和显示度有重要意义。

Scopus 数据库是由 Elsevier 出版集团推出的具有科研管理、学术评价功能的数据库,是全球规模最大的同行评议文献(科学期刊、书籍和会议记录)的文摘和引文数据库,覆盖 100% 的 Medline 期刊、100% 的 EI 期刊和约 97% 的 Web of Science 期刊,其学术影响力仅次于 Web of Science(包括 SCI、SSCI 和 A&HCI),被全球诸多重要学术排名机构(如 QS、THE 世界大学排名)作为学科产出及学科发展评估的主要数据来源。

《新乡医学院学报》编辑部衷心感谢各位编委、审稿专家、作者、读者的关心和支持,我们将再接再厉,努力提升办刊水平,积极宣传党和国家的科技政策,推动医学科学研究,促进医学信息交流,为我国医学事业的发展及全人类的健康作出积极贡献。