

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.05.06

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2018.05.06>

微小RNA-145-5p调控视网膜 β -catenin对小鼠眼轴的影响

马明明, 冯竞仰

(上海市眼底病重点实验室, 上海市第一人民医院, 上海眼视觉与光医学工程技术研究中心, 上海 200080)

[摘要] 目的: 探讨miR-145-5p调控视网膜 β -catenin表达对小鼠眼轴的影响。方法: 取18只雄性3周龄C57BL/6小鼠按照随机数字表法随机分成对照组, miR-145-5p mimics组和miR-145-5p对照组。分组第2, 5, 8天双眼玻璃体腔注射1次药物, 共注射3次: 对照组小鼠玻璃体腔内注射3 μ L枸橼酸盐缓冲液, miR-145-5p mimics组小鼠玻璃体腔内注射3 μ L含有3 μ g miR-145-5p mimics的枸橼酸盐缓冲液, miR-145-5p对照组采取同样方法注射3 μ g miR-145-5p对照载体。最后一次注射完成3 d后A超测量小鼠眼轴长度, 之后取小鼠视网膜组织, 采用RT-PCR技术检测视网膜中miR-145-5p和 β -catenin的表达, 采用Western印迹法检测视网膜组织中 β -catenin的含量。取6只成年雄性C57BL/6小鼠, 构建 β -catenin mRNA 3'UTR荧光素酶过表达载体, 将 β -catenin mRNA 3'UTR荧光素酶过表达载体与miR-145-5p mimics共同转染小鼠视网膜组织, 3 d后取视网膜组织, 应用荧光素酶报告基因技术检测和验证miR-145-5p与 β -catenin的相关性。结果: 视网膜转染miR-145-5p mimics后, 小鼠眼轴长度降低, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$), 视网膜组织中miR-145-5p表达上升, β -catenin在mRNA和蛋白水平表达均下降($P < 0.05$)。视网膜转染miR-145-5p对照后, 视网膜组织中miR-145-5p表达以及 β -catenin的蛋白含量未见明显变化($P > 0.05$); 荧光素酶报告基因结果显示转染miR-145-5p和 β -catenin mRNA 3'UTR荧光素酶过表达载体后, 视网膜组织中荧光活性显著降低($P < 0.001$)。结论: miR-145-5p能够下调视网膜 β -catenin的表达, 进而控制眼轴增长。

[关键词] 微小RNA-145-5p; 眼轴; Wnt/ β -catenin通路; 荧光素酶报告基因技术

Effect of microRNA-145-5p on the mouse axial length by regulating β -catenin in retina

MA Mingming, FENG Jingyang

(Shanghai Engineering Center for Visual Science and Photomedicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases, Shanghai 200080, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of miR-145-5p on mouse axial length by regulating the expression of β -catenin.

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-05

通信作者 (Corresponding author): 冯竞仰, Email: ophthalmol_fjy@foxmail.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金青年项目 (81500732); 上海交通大学附属第一人民医院优青前计划 (06N1503001)。This work was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars (81500732) and the Early Training Plan for Excellent Young Doctors of Shanghai First People's Hospital (06N1503001), China.

Methods: Eighteen 3-week-old C57BL/6 mice were divided to the control, miR-145-5p mimics and miR-145-5p control groups according to the random number table. Both eyes received intravitreal injection once every 3 days, for 3 injections in total (2nd, 5th and 8th days). Patients in the control group received intravitreal injection of 3 μ L citrate buffer, those in the miR-145-5p mimic group received intravitreal injection of 3 μ L citrate buffer with 3 μ g miR-145-5p mimics, and patients in the miR-145-5p control group received 3 μ g miR-145-5p control. Axial length was measured by A-scan ultrasonography 3 days after the last intravitreal injection, then the expression of miR-145-5p and β -catenin in retinas was analyzed by RT-PCR or Western blot. After the over-expressed luciferase vector of β -catenin mRNA 3'UTR was constructed, the mRNA 3'UTR and miR-145-5p mimics were transfected to the retina of 6 male adult C57BL/6 mice. Luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between miR-145-5p and β -catenin in the retina. **Results:** After the transfection of miR-145-5p mimics in the retina, the expression of miR-145-5p in the retina was significantly up-regulated ($P < 0.05$), but the axial length and expression of β -catenin decreased significantly compared to those in the control group (both $P < 0.05$). There were no significant differences in the axial length, miR-145-5p and β -catenin expression after the transfection of miR-145-5p control. The results of luciferase reporter gene assay showed that the fluorescence activities in the retina were decreased significantly after the transfection of over-expressed luciferase vectors of β -catenin mRNA 3'UTR. **Conclusion:** miR-145-5p may regulate the axial length growth by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway in the mouse retina.

Keywords micro RNA-145-5p; axial length; Wnt/ β -catenin pathway; luciferase reporter gene assay

近视是全球性的公共卫生问题和社会问题, 是影响我国青少年体质健康的第2大问题。我国人群近视发病率超过30%, 居世界第2位, 近视总人数列全球第一, 并呈现逐年递增的趋势^[1]。近视的发病机制尚不明确。因近视的发病机制未完全明确, 目前尚无有效的办法阻止其发生发展。近视发展过程中主要表现为眼轴的增长, 前期研究^[2]发现: 经典Wnt/ β -catenin通路与眼轴增长呈正相关, 通过干预该通路可以达到控制眼轴增长的作用。前期研究^[2]发现微小RNA-145-5p(miR-145-5p)能够调控 β -catenin的表达, 进而可能影响Wnt/ β -catenin通路, 但是能否调控眼轴增长目前尚不明确。因此, 本研究将探讨miR-145-5p调控眼轴增长可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

垂直电泳槽及凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司, 实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司, 紫外分光光度计购自美国Thermo公司, Lipofectamine 3000和质粒提取试剂盒购自美国Thermo公司, PCR引物、miR-145-5p mimics

以及对照载体购自上海吉码生物科技有限公司, RT-PCR试剂盒、Trizol试剂盒购自德国Qiagen公司。兔抗鼠anti- β -catenin抗体以及HRP标记羊抗兔二抗均购自美国Abcam公司。

1.2 实验动物与眼球参数测量

3周龄雄性C57BL/6小鼠购自上海实验动物中心, 均为SPF级实验动物, 饲养于上海市第一人民医院动物实验中心, 饲养条件为12h明暗循环的屏障系统内。眼轴测量前常规腹腔麻醉小鼠, 眼部滴盐酸奥布卡因滴眼液局部麻醉, 眼轴测量使用A超测量仪(型号KN-1800), 探头频率10 MHz, 测量时保证探头自角膜中央区垂直于眼球表面, 避免压迫角膜, 每只眼睛测量10次后取平均值, 所有操作由1位经验丰富的医师完成。

1.3 玻璃体腔注射药物

常规腹腔麻醉小鼠, 注射眼滴用左氧氟沙星滴眼液和盐酸奥布卡因滴眼液(购自日本参天公司)各1次, 两种药水间隔3 min, 5 min后使用微量注射器, 自颞侧距离角巩缘0.5 mm处垂直于球壁穿刺进入眼球, 当自瞳孔处看到针头位于玻璃体腔内后停止进针, 将3 μ L液体注入玻璃体腔内, 停留

10 s使药物弥散后拔出针头, 氧氟沙星眼膏涂眼预防感染。

1.4 实验分组及转染

取18只成年雄性C57BL/6小鼠, 随机数字表方法随机分成3组: 对照组, miR-145-5p mimics组和miR-145-5p对照组。采用Lipofectamine3000转染试剂盒按照组别分别将miR-145-5p mimics(miR-145-5p mimics组)或其对照载体(miR-145-5p对照组)注射入小鼠玻璃体腔内, 对照组不作处理。

1.5 实时荧光定量 PCR

将视网膜组织剪碎, 加入TRIzol试剂进行裂解, 采用氯仿、异丙醇法提取RNA。经过75%乙醇溶液洗涤2次后, 取DEPC水溶解RNA, 采用RT-PCR试剂盒在仪器上按照说明书进行操作, 反应条件如下: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共40个循环。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 其中目的基因miR-145-5p和 β -catenin的表达以GAPDH为内参。

1.6. Western 印迹检测

将视网膜组织剪碎, 加入裂解液后超声粉碎, 冰上裂解30 min, 然后以12 000 r/min离心10 min, BCA方法测定上清中的蛋白浓度为64 μ g/mL, 每组蛋白样品中加入上样缓冲液煮沸5 min, 每孔加入样本20 μ L, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h后一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜后加入二抗室温孵育1 h, ECL化学发光法显色, 使用凝胶成像系统进行观察。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

生物信息软件预测 β -catenin是miR-145-5p的作用靶基因, 构建野生型及突变型 β -catenin-3'非翻译区(3'UTR)的报告基因质粒, 将报告基因质粒、miR-145-5p mimics及其阴性对照质粒转染小鼠视网膜, 1 d后按照双荧光素酶检测说明书进行实验操作。

1.8 统计学处理

采用SPSS 18.0软件进行统计处理。数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示, 两组间采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 miR-145-5p mimics 后视网膜组织中 miR-145-5p 表达变化

小鼠转染后, 各组miR-145-5p表达量出现变化(每组3只小鼠), miR-145-5p对照组视网膜组织中miR-145-5p的表达量是对照组(1.18 \pm 0.13)倍, miR-145-5p mimics组表达量为对照组(2.7 \pm 0.39)倍, 表明小鼠转染miR-145-5p mimics后, 视网膜组织中miR-145-5p的表达显著上升(重复3次实验), 与对照组比较有统计学意义($P<0.05$); miR-145-5p对照组与对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$, 图1)。

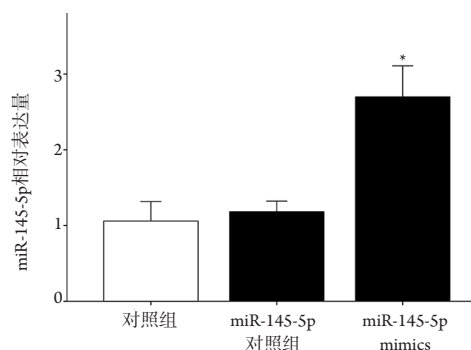


图1 转染miR-145-5p mimics对视网膜miR-145-5p表达的影响
Figure 1 Expression of miR-145-5p in retina after transfection of miR-145-5p mimics

与对照组相比, * $P<0.05$ 。

Compared with the control group, * $P<0.05$.

2.2 miR-145-5p 过表达对视网膜 β -catenin mRNA 和蛋白表达的影响

小鼠视网膜转染miR-145-5p后, 与对照组相比, 转染miR-145-5p组 β -catenin在mRNA和蛋白水平的表达量均显著降低(重复3次实验), 差异具有统计学意义($P<0.05$; 图2, 3)。

2.3 miR-145-5p 过表达对眼轴长度的影响

采用miR-145-5p mimics转染小鼠视网膜, 通过A超检测眼轴长度(每组3只小鼠), 对照组眼轴长度(2.92 \pm 0.01) mm, miR-145-5p对照组(2.89 \pm 0.02) mm, miR-145-5p转染组(2.83 \pm 0.02) mm, 结果显示miR-145-5p转染组眼轴长度与对照组相比显著减少, 差异具有统计学意义($P=0.02$); miR-145-5p对照组与对照组相比, 差异无统计学意义($P=0.31$, 图4)。

2.4 miR-145-5p 对 β -catenin 的靶向调控作用验证

将含有野生型或突变型 β -catenin mRNA 3'UTR 的荧光素酶过表达载体, 与 miR-145-5p mimics 共同转染小鼠视网膜组织(每组3只小鼠), 应用荧光素酶报告基因技术检测(重复3次实验), 结果显示转染了 miR-145-5p 和 β -catenin mRNA 3'UTR 荧光素酶过表达载体的视网膜组织中荧光活性显著降低, 说明 miR-145-5p mimics 能够特异性结合 β -catenin mRNA 3'UTR, 抑制荧光素酶表达载体的活性, 而突变型转染组的荧光素酶活性并无影响(图5)。

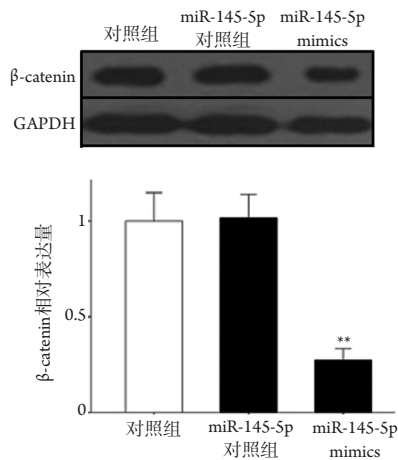


图2 转染miR-145-5p mimics对视网膜 β -catenin蛋白含量的影响
Figure 2 Expression level of β -catenin protein in the retina after transfection of miR-145-5p mimics

与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

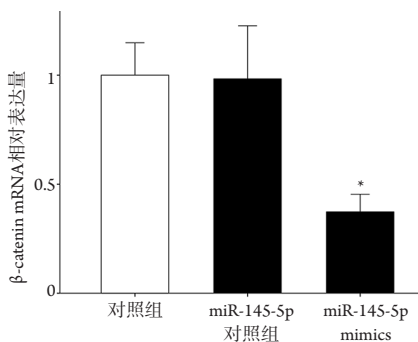


图3 转染miR-145-5p mimics对视网膜 β -catenin mRNA表达的影响
Figure 3 Expression level of β -catenin mRNA in the retina after transfection of miR-145-5p mimics

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$.

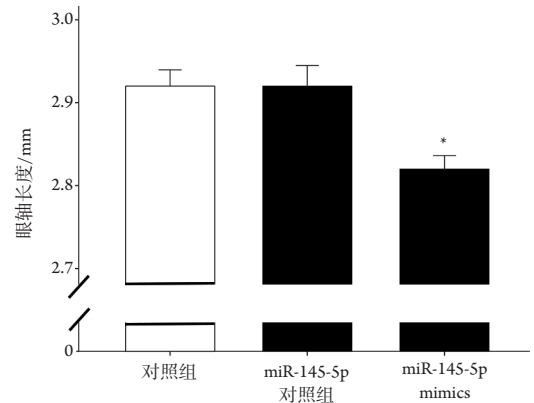


图4 转染miR-145-5p mimics对小鼠眼轴长度的影响

Figure 4 Change of mouse axial length after transfection of miR-145-5p mimics

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$.

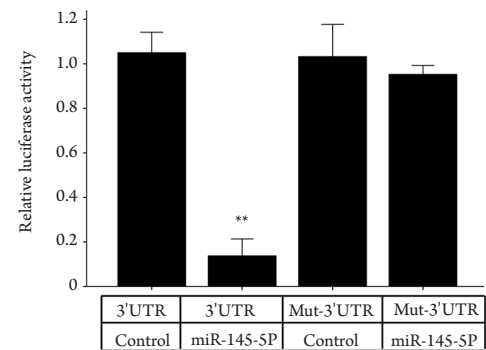
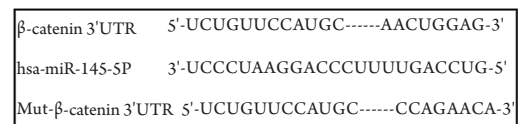


图5 荧光素酶报告基因实验结果

Figure 5 Results of luciferase reporter gene assay

与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

3 讨论

近视是一种发育性疾病, 通常表现为眼轴增长。经典Wnt信号通路又称为Wnt/ β -catenin通路, 既往研究^[3]发现该通路在眼球发育的不同阶段均发挥十分重要的作用, 包括视网膜血管发生、视网膜干细胞分化、角膜和晶状体发育以及睫状体的形成等。前期研究^[2]发现: Wnt/ β -catenin信号

通路能够调控眼轴的增长, 下调Wnt/ β -catenin通路能够减缓眼轴的增长, 上调该通路可以加速眼轴的增长。 β -catenin是Wnt/ β -catenin通路中一个非常关键的因子, 因此能够成为调控眼轴增长的靶点。

MicroRNA(miRNA)是一种长度21~25个核苷酸的RNA, 普遍存在于多细胞生物中, 通过与靶基因mRNA互补结合, 在转录水平抑制靶基因的表达。据文献[4]报道: 1/3以上的人类基因受到miRNA的调控。既往研究^[5]发现miRNA在生物进化过程中高度保守, 参与细胞生长、发育、分化、死亡等生物过程, 被公认具有非常广阔的研究和应用前景。miRNA与眼球的发育和疾病也密切相关, miRNA-96, miRNA-183, miRNA-1以及MiRNA-133与视网膜色素变性有关^[6]; 脉络膜新生血管以及糖尿病的发生与miRNA-31, miRNA-150以及miRNA-184有相关性^[7]。在屈光研究领域, Andrei等^[8]通过miRNA芯片技术在正常和形觉剥夺近视(form-deprivation myopia, FDM)C57BL/6小鼠视网膜中筛选出53种有显著差异性的miRNA, 表明视网膜组织中这些miRNA可能参与了近视的发病过程。据文献[9]报道: PAX6基因与近视的发生密切相关, miRNA-328能够通过调控PAX6基因达到控制近视的作用。诸多证据表明近视的发生与miRNA可能存在一些相关性, 但是目前微小RNA与近视的相关性研究还不多。

本组前期通过生物信息学分析预测靶基因及双荧光素酶报告基因实验进一步验证miR-145-5p对 β -catenin的靶向调控作用。本研究将miR-145-5p mimics转染至视网膜组织中, β -catenin的mRNA表达显著降低($P < 0.05$), β -catenin的蛋白含量也显著下降, 表明miR-145-5p对 β -catenin具有负调控作用。

近视的主要表现以及危害是眼轴的过度增长, 因此, 控制眼轴增长是近视防控过程中非常重要的一个目标。本研究通过转染, 提高视网膜组织中miR-145-5p的表达, 小鼠眼轴的生长速度显著降低, 表明miR-145-5p具有调控眼轴增长的作用。

本研究主要聚焦于视网膜信号通路变化对眼轴的影响, 但是由于眼轴增长主要由巩膜重塑引起, 而视网膜与巩膜之间有脉络膜存在, 因此, 视网膜Wnt/ β -catenin信号通路变化如何通过脉络膜转导至巩膜目前还未明确。不过研究^[10]已经证实, 巩膜的改变受视网膜调控, 但其机制尚待进一步的研究, 这可能也是近视发病机制至今尚未

被揭示的原因之一。

综上所述, Wnt/ β -catenin通路在近视发病中起重要的作用, β -catenin是该通路的关键分子。MiR-145-5p能够通过调控 β -catenin的表达, 控制Wnt/ β -catenin通路, 进而影响眼轴的增长, 可能为近视防治提供可能的有效靶点。

参考文献

1. Pan CW, Ramamurthy D, Saw SM. Worldwide prevalence and risk factors for myopia[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2012, 32(1): 3-16.
2. Ma M, Zhang Z, Du E, et al. Wnt signaling in form deprivation myopia of the mice retina[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e91086.
3. Liu H, Mohamed O, Dufort D, et al. Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina[J]. *Dev Dynam*, 2003, 227(3): 323-334.
4. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals[J]. *Nature*, 2005, 434(7031): 338-345.
5. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 226-230.
6. Loscher CJ, Hokamp K, Kenna PF, et al. Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(11): R248.
7. Shen J, Yang X, Xie B, et al. MicroRNAs regulate ocular neovascularization[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1208-1216.
8. Tkatchenko AV, Luo X, Tkatchenko TV, et al. Large-scale microRNA expression profiling identifies putative retinal miRNA-mRNA signaling pathways underlying form- deprivation myopia in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162541.
9. Chen KC, Hsi E, Hu CY, et al. MicroRNA-328 may influence myopia development by mediating the PAX6 gene[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(6): 2732-2739.
10. Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Scleral cell growth is influenced by retinal pigment epithelium in vitro[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1994, 232(9): 545-552.

本文引用: 马明明, 冯竞仰. 微小RNA-145-5p调控视网膜 β -catenin对小鼠眼轴的影响[J]. *眼科学报*, 2018, 33(3): 149-153. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.05.06

Cite this article as: MA Mingming, FENG Jingyang. Effect of microRNA-145-5p on the mouse axial length by regulating β -catenin in retina[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2018, 33(3): 149-153. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2018.05.06