

## miR-204 调控眼科疾病的研究进展

徐琰琰 综述 毛新帮 审校

330006 南昌大学第二附属医院眼科

通信作者:毛新帮,Email:mx730828@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.020

**【摘要】** 微小 RNA(miRNA)是一类广泛存在于真核生物体内、长度为 20~25 个核苷酸、具有调控功能的非编码单链 RNA,参与机体的各种生命进程,包括细胞的生长、分化、增生、凋亡和自噬。miRNA-204-5p(miR-204-5p)是由位于染色体 9q21.12 上的 TRPM3 大内含子 6 表达。研究发现,miR-204 在角膜损伤愈合过程中起着十分重要的作用,亦能够保持静止状态下血-视网膜屏障的稳定,并且在人小梁网细胞中,miR-204 与细胞的凋亡、生存能力以及炎症介质的表达有着重要联系。这些研究都表明 miR-204 在眼部呈多维表达,提示 miR-204 很可能是不同眼部疾病的关键 miRNA。本文从 miRNA 的生物合成,miR-204 与糖尿病性角膜病变、视网膜色素上皮细胞、人小梁网细胞、年龄相关性白内障、糖尿病视网膜病变、视网膜母细胞瘤的关系,以及 miR-204 与自噬的相关研究等几个方面,就 miR-204 调控眼科疾病的研究进展进行综述,为探寻眼部难治性疾病的防治方法寻找新的靶点。

**【关键词】** 眼科疾病;微小 RNA;自噬

**基金项目:** 江西省自然科学基金项目(20151BAB205096)

**Research progress of miR-204 in the regulation of ophthalmic diseases** Xu Yanying, Mao Xinbang

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Mao Xinbang, Email: mx730828@126.com

**【Abstract】** MicroRNAs (miRNAs) are endogenous short nucleotide non-coding RNAs which widely exist in eukaryotic organisms, involved in the body's life process, including cell growth, differentiation, proliferation, apoptosis and autophagy. MiR-204-5p is located on chromosome TRPM3 in the 9q21.12 large intron 6 expression, and miR-204 plays an important role in corneal wound healing process; and it regulates retinal pigment epithelium (RPE) tight junction integrity and maintains the blood retina barrier in a quiescent state; in human trabecular meshwork cells, miR-204 appears to play an important role in the regulation of responses to endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and production of inflammatory mediators. Identification of additional target genes will be necessary to fully understand the biological functions of miR-204. These studies found that it is a multidimensional expression in the eye, suggesting that miR-204 is likely to be the key miRNA in different eye diseases. This article reviews the biosynthesis of miRNA, the relationship between miR-204 and diabetic keratopathy, RPE cells, human trabecular meshwork cells, age-related cataract, diabetic retinopathy, retinoblastoma and autophagy, and explore the prevention of ocular refractory diseases with new targets.

**【Key words】** Ophthalmic diseases; MicroRNA; Autophagy

**Fund program:** Natural Science Foundation of Jiangxi Province of China (20151BAB205096)

眼科疾病多种多样,目前对于一些常见病、难治病仍缺乏有效的预防和治疗手段。随着对眼科病变机制的不断研究,微小 RNA(microRNA, miRNA)在眼部疾病的研究中显得尤为重要,其中 miR-204 在眼部组织的调控作用更为突出。本文就近年来 miR-204 与糖尿病性角膜病变、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞、人小梁网细胞、年龄相关性白内障、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)的关系,miR-204 与自噬的相关研究等进行综述,为眼科一些常见病、难治病的预防和治疗提供新的

思路。

### 1 miRNA 的生物合成

miRNA 是一类广泛存在于真核生物体内,长度为 20~25 个核苷酸、具有调控功能的非编码单链 RNA<sup>[1-2]</sup>。通常在 RNA 聚合酶 II 的作用下在细胞核转录,生成原始 miRNA (pri-miRNA),pri-miRNA 经过修饰、拼接和聚腺苷酸化,形成典型的发夹结构,该结构被蛋白质复合体 Drosha/DGCR8 识别并与之结合,形成长度为 70~100 个核苷酸的前体 miRNA (pre-

miRNA),这是 miRNA 典型的生物合成途径。pre-miRNA 被蛋白质 Exportin-5 识别,然后以依赖 RanGTP 的方式转移到细胞质中,在 Dicer 酶的作用下生成更短的双链 RNA,再通过细胞质中的 RNA 聚合酶加工合成前导链 miRNA 和互补链 miRNA 序列,成熟的 miRNA 与 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,诱导靶 mRNA 降解或抑制靶 mRNA 的翻译<sup>[3-4]</sup>。有研究发现,虽然一些 pre-miRNA 可在任何细胞中持续表达,但成熟 miRNA 并非如此<sup>[5]</sup>。例如,miRNA-145 和 miRNA-143 前体序列在结肠正常组织和癌组织中均能表达,而这些 miRNA 的成熟序列只在正常组织表达。据此可做出这样的假设,每种类型细胞都有独特的 miRNA。许多 miRNA 表达无所不在,而一些 miRNA 是选择性地优先或特定地在细胞表达,或只有在特定生理或病理刺激下才表达。miRNA 通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区特异性结合,诱导靶 mRNA 降解或抑制靶 mRNA 翻译,实现转录后基因调控作用。最近有研究表明,细胞内促进降解和保持稳定有 2 种蛋白质参与监管,即 XRN-2 和 PABP4<sup>[6]</sup>。特别是 5'-3' 核酸外切酶 XRN-2 被证明能催化单链成熟的 miRNA 的退化,从而促进其降解。PABP4 是一个典型的 poly(A)聚合酶,也称为 GLD-2,能够添加单个腺嘌呤残留的 3' 末端,从而使 miRNA 与 RISC 结合。有研究表明,PABP4 和 XRN-2 均在成年啮齿类动物视网膜中表达,PABP4 更多地表达在细胞质中,而 XRN-2 在细胞核中表达。此外,还观察到 PABP4 的表达受环境影响,进一步说明这种蛋白质的潜在作用是调节视网膜 miRNA 水平以适应环境<sup>[7]</sup>。研究表明,miRNA 不仅在细胞内具有生物活性,而且在其他很多体液中稳定存在,包括人类血清、血浆、尿液、唾液、泪液、房水和玻璃体<sup>[8-11]</sup>。由于其稳定性和 miR-204 在眼部呈多表达,因此很大程度上,miR-204 可作为眼部疾病的标志物诊断早期病变,为防治眼部难治疾病提供新的靶点。

## 2 miR-204

miR-204 是由位于染色体 9q21.12 上的 TRPM3 大内含子 6 表达,韩泽平等<sup>[12]</sup>指出,miR-204 在头颈部鳞状上皮细胞癌、子宫内膜腺癌、胆管癌、胃癌、大肠癌、黑色素瘤、淋巴瘤等癌组织中作为抑癌基因呈差异表达,而对前列腺癌细胞株的 RNA 和蛋白进行检测发现,miR-204 会促使前列腺癌发生。这种在不同的癌组织中,有着抑癌基因或抑癌基因的不同功能,可能与组织特异性及其所作用的靶基因密切相关。不可否认的是,miR-204 通过抑制靶 mRNA 翻译或诱导靶 mRNA 降解在转录后水平调控基因表达,在参与肿瘤的发生和发展及侵袭、转移等过程中起着十分重要的作用。随着对 miR-204 的不断探索,有研究表明,在  $\beta$ -磷酸甘油诱导的血管平滑肌钙化细胞以及肺动脉平滑肌细胞中,miR-204 起到了十分重要的调节作用<sup>[13-14]</sup>。

## 3 miR-204 与眼科疾病

### 3.1 miR-204 与糖尿病性角膜病变

Gao 等<sup>[15]</sup>研究发现,相对于非糖尿病组角膜上皮,miR-204-5p 在糖尿病角膜上皮中表达量增加了近 5 倍。SIRT1 是

miR-204-5p 的靶基因,在糖尿病性角膜病变小鼠中,干预 miR-204-5p 使其下调,可使 SIRT1 表达增强,促进角膜上皮细胞周期的循环,从而促进其损伤修复。另外,An 等<sup>[16]</sup>的研究表明,miR-204 在角膜损伤愈合过程中大幅下调,转染 miR-204 的人类角膜上皮细胞使细胞增生大幅降低并诱导细胞周期 G<sub>1</sub> 期阻滞。此外,还发现 miR-204 抑制细胞迁移,这些表明 miR-204 在角膜损伤愈合过程中起着十分重要的作用。

### 3.2 miR-204 与 RPE 细胞

Wang 等<sup>[17]</sup>研究表明,通过实时荧光定量 PCR 检测,有 8 个 miRNA(miR-184、187、200a/200b、204/211、221/222)在 RPE 细胞中显著高表达,其中,miR-204/211 表达量最高。利用双荧光素酶报告发现转化生长因子  $\beta$  受体 2(TGF- $\beta$  receptor 2, TGF- $\beta$ R2)和 SNAIL2 是 miR-204 的靶基因,miR-204 通过 TGF- $\beta$ /SNAIL2 介导的信号通路调控细胞膜紧密连接蛋白的表达和 K 离子通道相关蛋白的表达,调节 RPE 细胞紧密连接的完整性,保持静止状态下血-视网膜屏障的稳定。

### 3.3 miR-204 与人小梁网细胞

Li 等<sup>[18]</sup>研究表明,miR-204 在人小梁网细胞中可调节多种基因的表达,其中由 miR-204 直接靶向作用的基因有 12 个,包括 APIS2、Bcl2l2、BIRC2、EDEM1、EZR、FZD1、M6PR、RAB22A、RAB40B、SERP1、TCF12 和 TCF4。该研究发现,在人小梁网细胞中转染 miR-204 会使细胞凋亡水平上升,生存能力下降,以及炎症介质白细胞介素(interleukin, IL)-8、IL-11 的表达减少,但具体通过哪个基因起作用,仍有待进一步研究。

### 3.4 miR-204 与年龄相关性白内障

秦宇等<sup>[19]</sup>应用实时荧光定量 PCR 法检测年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜和正常人眼晶状体前囊膜中 miR-204 及其预测靶基因的表达,结果显示 miR-204 在年龄相关性白内障晶状体组织中呈高表达,miR-204 可能通过靶向调控 bcl-2 家族成员 bcl-2、mcl-1 的表达,在年龄相关性白内障发病过程中发挥重要作用,可能成为白内障非手术治疗的新靶点。

### 3.5 miR-204 与 DR

Kovacs 等<sup>[20]</sup>用链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠作为模型,研究发现与正常对照组相比,DR 组大鼠视网膜中有 86 种 miRNA 差异表达。Wu 等<sup>[21]</sup>同样采用链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠作为模型,采用 miRNA 基因芯片筛选表达显著差异的 miRNA。研究发现,实验组大鼠视网膜有 37 个 miRNA 的表达,较正常对照组有明显差异,其中上调 miRNA 21 个,下调 miRNA 16 个,表达显著上调的有 miR-182、miR-96、miR-183、miR-211、miR-204 等 11 个 miRNA。这表明,miR-204 亦是 DR 研究中的关键因素,但其在该病发生和发展过程中的具体机制尚有待进一步研究。

### 3.6 miR-204 与 RB

Wu 等<sup>[22]</sup>研究发现,RB 组织中 miR-204 的表达显著低于正常儿童视网膜组织,在人 RB 细胞系中也是如此。实验证明,恢复 miR-204 的表达会抑制 RB 细胞的增生和转移,并使其迁移和侵袭能力显著下降。

#### 4 miR-204 与自噬

Zhu 等<sup>[23]</sup>报道并揭示了 miRNA 与自噬之间的调节关系。近年来,随着研究的深入,多项研究结果表明 miRNA 与自噬之间有着密切联系<sup>[24-28]</sup>,在胃癌、子宫内膜癌、胰腺癌、脑胶质瘤、肾细胞癌和头颈部肿瘤的癌组织中 miR-204 水平均低于正常组织,并已证实 miR-204 与其中几种类型的癌症细胞自噬相关。然而,在眼部疾病中,自噬在干性年龄相关性黄斑变性及青光眼等神经变性疾病中也起着十分重要的调节作用<sup>[29-30]</sup>。研究发现,正常情况下,眼部组织低水平自噬是一种细胞应激的保护机制,而自噬过度会导致细胞损伤。在这种情况下,自噬是如何调节的及其是否与 miR-204 相关,目前尚不清楚,有待进一步研究。

#### 5 小结与展望

相对于目前眼科疾病治疗干预的手段,如滴眼液、眼膏的对症治疗,激光光凝术,药物玻璃体腔注射以及玻璃体切割术治疗等,随着对眼科病变机制的不断研究,利用 miRNA 调节相关基因表达为预防和治疗眼科疾病开辟新途径显得十分重要。综上所述,miR-204 在眼部组织的调控尤为重要,值得进一步研究,探索其在眼部各个组织的作用机制,包括上下游重要通路以及作用的重要靶基因,结合整个眼部结构,从基因水平探索病变的有效治疗方法,研制出相应的有效药物,是目前亟待解决的问题。寻找疾病发生和发展过程中 miRNA 调控自噬通路的特异作用位点,为其预防和治疗开辟新的途径,有望做到基因预防。

#### 参考文献

- [1] Kidner CA, Martienssen RA. Macro effects of microRNAs in plants[J]. Trends Genet, 2003, 19(1): 13-16.
- [2] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex[J]. Nature, 2004, 432(7014): 231-235. DOI: 10. 1038/nature03049.
- [3] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105. DOI: 10. 1101/gr. 082701. 108.
- [4] Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* [J]. Cell, 2007, 130(1): 89-100. DOI: 10. 1016/j. cell. 2007. 06. 028.
- [5] Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.
- [6] Kai ZS, Pasquinelli AE. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs[J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17(1): 5-10. DOI: 10. 1038/nsmb. 1762.
- [7] de Sousa É, Walter LT, Higa GS, et al. Developmental and functional expression of miRNA-stability related genes in the nervous system [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(5): e56908 [2016-06-27]. http://journals. plos. org/plosone/article? id = 10. 1371/journal. pone. 0056908. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0056908.
- [8] Andreeva K, Cooper NG. MicroRNAs in the neural retina [J/OL]. Int J Genomics, 2014, 2014: 165897 [2016-06-04]. https://www. hindawi. com/journals/ijg/2014/165897/. DOI: 10. 1155/2014/165897.
- [9] Dunmire JJ, Lagouros E, Bouhenni RA, et al. MicroRNA in aqueous humor from patients with cataract [J]. Exp Eye Res, 2013, 108: 68-71. DOI: 10. 1016/j. exer. 2012. 10. 016.
- [10] Ragusa M, Caltabiano R, Russo A, et al. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases [J]. Mol Vis, 2013, 19: 430-440.

- [11] Tuo J, Shen D, Yang HH, et al. Distinct microRNA-155 expression in the vitreous of patients with primary vitreoretinal lymphoma and uveitis [J]. Am J Ophthalmol, 2014, 157(3): 728-734. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2013. 12. 014.
- [12] 韩泽平,黎毓光,何金花. Hsa-miR-204 的生物学信息分析及研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(2): 140-143. DOI: 10. 3969/cmha. j. issn. 1673-713X. 2012. 02. 011.
- [13] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification *in vitro* and *in vivo* [J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(2): 320-329. DOI: 10. 1093/cvr/cvs258.
- [14] Courboulin A, Paulin R, Giguère NJ, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension [J]. J Exp Med, 2011, 208(3): 535-548. DOI: 10. 1084/jem. 20101812.
- [15] Gao J, Wang Y, Zhao X, et al. MicroRNA-204-5p-mediated regulation of SIRT1 contributes to the delay of epithelial cell cycle traversal in diabetic corneas [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3): 1493-1504. DOI: 10. 1167/iovs. 14-15913.
- [16] An J, Chen X, Chen W, et al. MicroRNA expression profile and the role of miR-204 in corneal wound healing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(6): 3673-3683. DOI: 10. 1167/iovs. 15-16467.
- [17] Wang FE, Zhang C, Maminishkis A, et al. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology [J]. FASEB J, 2010, 24(5): 1552-1571. DOI: 10. 1096/fj. 08-125856.
- [18] Li G, Luna C, Qiu J, et al. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 2999-3007. DOI: 10. 1167/iovs. 10-6708.
- [19] 秦宇,赵江月,闵晓洁,等. miR-204 调控 Bcl-2 家族在年龄相关性白内障发病过程中机制研究 [J]. 中国实用眼科杂志, 2015, 33(4): 387-391. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1006-4443. 2015. 04. 015.
- [20] Qin Y, Zhao JY, Min XJ, et al. Mechanism of miR-204 targeted Bcl-2 family in the pathogenesis of cataract [J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2015, 33(4): 387-391. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1006-4443. 2015. 04. 015.
- [21] Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4402-4409. DOI: 10. 1167/iovs. 10-6879.
- [22] Wu JH, Gao Y, Ren AJ, et al. Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy [J]. Ophthalmic Res, 2012, 47(4): 195-201. DOI: 10. 1159/000331992.
- [23] Wu X, Zeng Y, Wu S, et al. MiR-204, down-regulated in retinoblastoma, regulates proliferation and invasion of human retinoblastoma cells by targeting CyclinD2 and MMP-9 [J]. FEBS Lett, 2015, 589(5): 645-650. DOI: 10. 1016/j. febslet. 2015. 01. 030.
- [24] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells [J]. Autophagy, 2009, 5(6): 816-823.
- [25] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [J]. Cell, 2009, 137(6): 1062-1075. DOI: 10. 1016/j. cell. 2009. 03. 048.
- [26] de Craene B, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 97-110. DOI: 10. 1038/nrc3447.
- [27] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(2): 453-458.
- [28] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 58-68. DOI: 10. 1038/cr. 2013. 159.
- [29] Sümbül AT, Göğebakan B, Ergün S, et al. miR-204-5p expression in colorectal cancer: an autophagy-associated gene [J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12713-12719. DOI: 10. 1007/s13277-014-2596-3.
- [30] 闫泉. 自噬在干性年龄相关性黄斑变性中的作用研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(10): 949-952. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 018.
- Yan Q. Research progress in autophagy on dry age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(10): 949-952. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 018.
- [31] 许毓鹏. 自噬与青光眼视神经病变相关性研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(3): 284-288. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 03. 020.
- Xu YP. Current researches in correlation between autophagy and glaucomatous optic neuropathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(3): 284-288. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 03. 020.

(收稿日期:2017-01-09)

(本文编辑:刘艳)