

MiR-497 对角膜新生血管的抑制作用及其靶向 STAT3 调控机制

王杨 杨燕宁 潘玉苗 黄钰清 周奕文

武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060

通信作者: 杨燕宁, Email: ophyyn@163.com

【摘要】 目的 探讨 miR-497 在碱烧伤诱导的角膜新生血管 (CNV) 形成过程中的作用及其机制。方法 选用健康清洁级 6~8 周龄野生型 (WT) C57BL/6 小鼠 42 只以及成功鉴定为 CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 敲除 (KO) 和过表达转基因 (TG) 小鼠各 42 只, 分别作为 WT 组、KO 组和 TG 组。构建角膜碱烧伤模型, 分别于造模后第 3、7、14、21 天行裂隙灯显微镜检查并进行角膜上皮损伤评分和角膜基质混浊评分, 测量 CNV 面积; 采用组织病理染色法观察角膜结构变化和炎症细胞的表达; 采用免疫组织化学染色法检测角膜组织中 CD31 的表达; 采用荧光素酶报告基因检测 miR-497 与信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 之间的靶向结合关系; 采用实时荧光定量 PCR 法检测各时间点小鼠角膜组织中 miR-497 以及血管内皮生长因子 A (VEGFA)、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白 (MCP)-1 mRNA 的相对表达量变化; 采用 Western blot 法检测各组造模后 14 d 角膜组织中 STAT3、p-STAT3 蛋白的表达。结果 小鼠角膜碱烧伤后出现角膜损伤和炎症细胞浸润, 同时出现 CNV。角膜上皮损伤评分、角膜基质混浊评分和 CNV 面积呈现先升高后降低的趋势, 并在造模后第 14 天时达峰值。各组造模后不同时间点角膜上皮损伤评分、角膜基质混浊评分、CNV 面积和 CD31 阳性细胞数总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 49.19, 34.56, 44.56, 77.56$, 均 $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 51.62, 65.62, 71.32, 46.12$, 均 $P < 0.01$); 其中 KO 组各时间点角膜上皮损伤评分、角膜基质混浊评分、CNV 面积和 CD31 阳性细胞数均高于 WT 组和 TG 组, TG 组各指标均低于 WT 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。在野生型 STAT3 共转染细胞中, miR-497 组荧光素酶活性明显低于 miR-阴性对照组和正常对照组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 在突变型 STAT3 转染细胞中, 各组间荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.69, P = 0.56$)。WT 组、KO 组、TG 组造模后 14 d 角膜组织中 miR-497 的相对表达量分别为 $0.68 \pm 0.11, 0.41 \pm 0.06, 1.05 \pm 0.14$, 均明显低于造模前的 $1.00 \pm 0.04, 0.56 \pm 0.07, 1.34 \pm 0.11$, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。造模后第 14 天, KO 组 STAT3 及 p-STAT3 蛋白相对表达量均明显高于 WT 组和 TG 组, TG 组各蛋白相对表达量低于 WT 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。各组造模后各时间点 VEGFA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 mRNA 相对表达量均明显高于造模前, KO 组各 mRNA 相对表达量明显高于同时时间点 WT 组和 TG 组, TG 组各 mRNA 相对表达量明显低于同时时间点 WT 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 MiR-497 可抑制碱烧伤诱导的角膜炎症反应及 CNV 形成, 其可能通过靶向 STAT3 抑制炎症信号通路的激活。

【关键词】 角膜新生血管; 微小 RNA; 炎症因子; STAT3; 碱烧伤

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81770899)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210201-00084

Inhibitory effect of miR-497 on corneal neovascularization and its regulation mechanism targeting STAT3

Wang Yang, Yang Yanning, Pan Yumiao, Huang Yuqing, Zhou Yiwen

Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Yang Yanning, Email: ophyyn@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of microRNA (miR)-497 in the formation of corneal neovascularization (CNV) induced by alkali burn and its mechanism. **Methods** Forty-two wild type (WT) C57BL/6 mice aged 6 to 8 weeks, 42 CRISPR/Cas9 mediated miR-497 knockout (KO) and 42 CRISPR/Cas9 mediated overexpression transgenic (TG) C57BL/6 mice were selected and assigned as WT group, KO group and TG group, respectively. The corneal alkali burn model was established. At 3, 7, 14 and 21 days after modeling, corneal epithelium damage and stromal turbidity were scored according to slit lamp microscopy. The area of neovascularization was measured. Corneal structural changes and expression of inflammatory cells were observed by histopathological staining. The expression of CD31 in corneal tissues was detected by immunohistochemistry staining. The targeted

binding relationship between miR-497 and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was detected by luciferase reporter assay. The relative expressions of miR-497, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β and macrophage inflammatory protein (MCP)-1 mRNA were detected by real-time quantitative PCR. At 14 days following modeling, the expression of STAT3 and p-STAT3 proteins in mice corneal tissues was detected by Western blot. The use and care of animals complied with the ARVO statement. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Renmin Hospital of Wuhan University (No. 2019K-K010). **Results** Corneal injury, inflammatory cell infiltration and CNV occurred in mice cornea after alkali burn. Corneal epithelial injury score, corneal stromal turbidity score and CNV area increased first and reached the peak on the 14th day after modeling, and then decreased. There were significant differences in corneal epithelial injury score, corneal stromal turbidity score, CNV area and number of CD31-positive cells among various time points after alkali burn ($F_{\text{group}} = 49.19, 34.56, 44.56, 77.56$; all at $P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 51.62, 65.62, 71.32, 46.12$; all at $P < 0.01$). Corneal epithelial injury score, corneal stromal turbidity score, CNV area and the number of CD31-positive cells were greater in KO group at various time points than in WT and TG groups, and those in WT group were greater than in TG group (all at $P < 0.05$). In WT STAT3 co-transfected cells, the luciferase activity of the miR-497 group was significantly lower than that of the miR-negative control group and normal control group (both at $P < 0.05$). In mutant STAT3-transfected cells, there was no significant difference in luciferase activity among all groups ($F = 0.69$, $P = 0.56$). On the 14th day after modeling, the relative expression levels of miR-497 in corneal tissue of WT, KO and TG groups were 0.68 ± 0.11 , 0.41 ± 0.06 and 1.05 ± 0.14 , respectively, which were significantly lower than 1.00 ± 0.04 , 0.56 ± 0.07 and 1.34 ± 0.11 before modeling (all at $P < 0.01$). The relative expressions of STAT3 and p-STAT3 were higher in KO group than in WT and TG groups, and were lower in TG group than in WT group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The expressions of VEGFA, TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1 mRNA at various time points after modeling in various groups were significantly higher than before modeling, which were higher in KO group than in WT and TG groups and were lower in TG group than in WT group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.01$). **Conclusions** MiR-497 inhibits corneal inflammation and CNV formation induced by alkali burn. It might inhibit the activation of the inflammation signal pathway via targeting STAT3.

[Key words] Corneal neovascularization; MicroRNAs; Inflammatory cytokines; STAT3; Alkali burn

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770899)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210201-00084

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是一种威胁视力的疾病, 每年患病人群达 140 多万人, 若不及时治疗, 会导致组织瘢痕、水肿、脂质沉积和持续性炎症, 严重影响患者视力和生活质量^[1]。目前 CNV 的治疗方案包括局部应用类固醇、手术干预、激光消融、光动力治疗和细针透热疗法, 但因设备成本高、易诱发微穿孔和出血等未得到广泛推广。目前主流的抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抑制剂注射疗法存在部分患者不耐受和易复发等问题, 且需多次注射, 医疗成本较高^[2-6]。研究表明, 炎症是 CNV 的重要始动因素和调控因素, 与 VEGF 之间存在相互作用, 与眼部新生血管的形成密切相关^[7-8]。信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 在免疫调节中发挥重要作用, 其在激活状态下可进一步释放炎症因子, 调节免疫炎症反应, 影响 CNV 形成和发展^[9-10]。据报道, 微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与病理性和发育性血管生成, 部分 miRNA 在角膜上皮中优先表达, 调节细胞增生、迁移等功能, 其中 miR-497 是预后良好的标志物, 其可抑制肿瘤细胞的增生、迁徙

并有负向调控血管形成的作用^[11-13]。MiR-497 与 STAT3 的 3' 非翻译区存在互补结合位点, 推测 miR-497 可能靶向调控 STAT3。本研究拟对野生型 (wild type, WT) C57BL/6 小鼠、CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 敲除 (knockout, KO) 和过表达转基因 (transgenic, TG) C57BL/6 小鼠进行碱烧伤 CNV 造模, 探讨 miR-497 对 CNV 发生和发展的影响及其可能的免疫调控机制, 希望为 CNV 临床诊疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞 健康清洁级 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 42 只, 体质量 18~25 g, 雌雄不限, 由武汉大学动物实验中心提供, 小鼠生产许可证号: SYXK (鄂) 2015-0027。同周龄健康 CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 KO 和 TG 小鼠各 42 只, 由武汉大学消化实验室惠赠, 小鼠许可证号: SYXK (鄂) 2020-0027。实验前, 裂隙灯显微镜下检查所有小鼠以排除角膜瘢痕、CNV 等疾病。人胚胎肾细胞 (HEK293) 为本实验室冻存。实验流程遵循视觉与眼科研究协会相关规定, 并经

武汉大学人民医院伦理委员会审核批准(批文号:2019K-K010)。

1.1.2 主要试剂及仪器 盐酸丙美卡因滴眼液(美国 Alcon 公司);兔抗小鼠 STAT3 单克隆抗体(sc-293151)、鼠抗小鼠 p-STAT3 抗体(结合位点 Tyr-705)单克隆抗体(sc-81523)(美国 Santa Cruz 公司);兔抗血小板-内皮细胞黏附分子(platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1/CD31)抗体(66065)(中国三鹰公司);辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗(AS1106, 美国 ASPEN 公司);Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG027, 上海碧云天生物技术有限公司)。NanoDrop 分光光度计(美国 Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 角膜碱烧伤模型的建立及分组 实验前连续 3 d 每晚给予红霉素眼膏点眼,体积分数 10% 水合氯醛(5 mg/kg)腹腔注射麻醉后,盐酸丙美卡因滴眼液点右眼行表面麻醉,棉签蘸去眼表多余水分;将直径 2 mm 的滤纸片浸入 1 mol/L 氢氧化钠溶液中 10 s 达到饱和,取出滤纸片,用吸水纸吸除周边多余的溶液,将滤纸片置于小鼠角膜中央 15 s,移除滤纸片后立即用质量分数 0.9% 氯化钠溶液充分冲洗角膜及结膜囊约 30 s,术后使用左氧氟沙星滴眼液(日本 Santen 公司)点眼预防感染,若有角膜穿孔或前房积血者视为 CNV 造模失败并及时剔除。WT 小鼠、miR-497 KO 和 TG 小鼠均按此法造模,作为 WT 组、KO 组和 TG 组。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜病变 于碱烧伤后 3、7、14、21 d 行小鼠角膜照相,并进行角膜上皮损伤和基质混浊评分(表 1),并通过 ImageJ 图像分析软件测量自角膜缘向中央长入的最长、弯曲度最小的 CNV 长度,计算 CNV 面积(A): $A = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$,其中 C 为 CNV 累及的角膜圆周钟点数,小鼠角膜半径 r 设置为 1.5 mm, l 为 CNV 长度。CNV

评分标准:0 分为无新生血管长入角膜;1 分为新生血管向心性生长,但未达到瞳孔中央或未超过角膜半径;2 分为新生血管达到瞳孔中央或越过角膜半径。

1.2.3 苏木精-伊红染色法检测角膜组织变化 任意选取碱烧伤后 3、7、14、21 d 小鼠各 3 只,颈椎脱臼法处死小鼠后立即摘除眼球,质量分数 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,平行角膜至视盘矢状位,自角膜缘向角膜中央行 4 μ m 厚连续切片。常规脱蜡置于苏木精染液中 5 min,流水冲洗后再置于伊红染液,最后脱水封片。于光学显微镜下观察各组角膜组织变化。

1.2.4 免疫组织化学染色法检测角膜组织中 CD31 的表达 取各组碱烧伤后 3、7、14、21 d 眼球石蜡切片,经常规脱蜡、水化、抗原修复阻断内源性过氧化物酶、封闭后滴加兔抗 CD31 抗体(1:100 稀释)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 冲洗后加山羊抗兔 IgG 抗体(1:200 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, DAB 显色,苏木精复染细胞核,脱水封片。400 倍光学显微镜下随机选取 3 个不重复视野对棕黄色细胞进行计数,取其平均数衡量新生血管化程度。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测角膜组织中 VEGFA 和炎症因子 mRNA 以及 miR-497 表达 任取各组碱烧伤后 3、7、14、21 d 小鼠 3 只,颈椎脱臼法处死小鼠后立即摘除眼球,按 Trizol 说明书提取角膜组织总 RNA,测定总 RNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.1)后,逆转录获得 cDNA。VEGFA、miR-497、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、U6 基因引物序列由上海吉玛制药技术有限公司合成(表 2)。以 cDNA 为模板,分别加入基因引物序列进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min 梯度降温至 4 $^{\circ}$ C。以 U6 作为 miR-497 内参,GAPDH 作为其他基因内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各目的基因相对表达量。实验重复 3 次,取其平均值。

表 1 角膜评分标准
Table 1 Corneal scoring criteria

分类	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
角膜上皮损伤评分	无上皮损伤	上皮损伤面积 < 25%	上皮损伤面积 25% ~ 50%	上皮损伤面积 50% ~ 75%	上皮损伤面积 75% ~ 100%
角膜基质混浊评分	基质透明	基质稍混浊	基质中度混浊, 可透见后部虹膜特征	基质重度混浊, 但仍可判断瞳孔缘位置	基质完全混浊, 后部虹膜无法透见

表 2 PCR 引物序列
Table 2 PCR primer sequence

基因	引物序列
VEGFA	正向: 5'-TTGCTGCTCTACCTCCACCAT-3' 反向: 5'-GGTATGTTGGACTCCTCAGTG-3'
TNF- α	正向: 5'-AGGACTCAAATGGGCTTTCC-3' 反向: 5'-CAGAGGCAACCTGACCACTC-3'
IL-6	正向: 5'-ACCACTCCCAACAGACCTGTCT-3' 反向: 5'-CAGATTGTTTTCTGCAAGTGCAT-3'
IL-1 β	正向: 5'-GTCCTGTGTAATGAAAGACGGC-3' 反向: 5'-CTGCTTGTGAGGTGCTGATGTA-3'
MCP-1	正向: 5'-GATCTCAGTCAGAGGCTCG-3' 反向: 5'-TGCTTGTCCAGGTGGTCCAT-3'
GAPDH	正向: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' 反向: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'
miR-497	正向: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' 反向: 5'-TAGCTGCAGCACACTGTGGT-3'
U6	正向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' 反向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'

注: VEGFA: 血管内皮生长因子 A; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; MCP: 单核细胞趋化蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; miR: 微小 RNA

Note: VEGFA: vascular endothelial growth factor A; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; miR: microRNA

1.2.6 Western blot 法检测 STAT3、p-STAT3 的蛋白表达 任取每组碱烧伤 14 d 小鼠各 3 只, 颈椎脱臼法处死并剖取角膜组织, 加入裂解液进行消化, 收集蛋白样本检测浓度, 行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜, 体积分数 5% 牛血清白蛋白室温下封闭 1 h, 加入 STAT3 (1:1 000 稀释) 和 p-STAT3 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (1:3 000) 室温下孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 滴加新鲜配制的 ECL 发光液, 避光孵育 10 min, 使用化学发光凝胶成像仪采集图像, 并采用 ImageJ 图像分析软件分析条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算各目的蛋白相对表达量。每个实验独立重复 3 次, 取平均值。

1.2.7 细胞分组及双荧光素酶活性检测 取对数生长期、生长状态良好的 HEK293 细胞, 分别将 WT 或突变型 (mutant type, MUT) STAT3 载体与 miR-497 拟似物、miR 阴性对照和正常对照组共转染, 培养 48 h。采用双荧光素酶报告基因检测系统检测萤火虫和海肾荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶为内参, 测定 WT STAT3 和 MUT STAT3 荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组两因素或单因素干预多水平实验设计, 各组不同时间点角膜上皮损伤评分、基质混浊评分、新生血管面积、CD31 阳性细胞计数、miR-497 及各因子 mRNA 相对表达量总体差异比较采用两因素方差分析, 各组间 STAT3 和 p-STAT3 蛋白相对表达量总体差异比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠造模后不同时间点角膜的变化

各组造模后 3 d 出现角膜上皮炎症, 角膜中央出现基质水肿、呈灰白色混浊, 角膜缘血管逐渐充血扩张, 开始伸出新生血管芽; 造模后 7 d 时 CNV 进一步扩张, 延伸至角膜中央, 并相互之间融合形成吻合支; 造模后 14 d 时 CNV 生长迅速, 血管网密集、粗大、顶端分叉明显, 且覆盖于大部分角膜区域, 甚至发生角膜溃疡、穿孔; 造模后 21 d, 角膜炎症减轻, CNV 变粗变暗, 少数新生血管仍向角膜中央生长, 但大部分血管消退、稀疏 (图 1)。

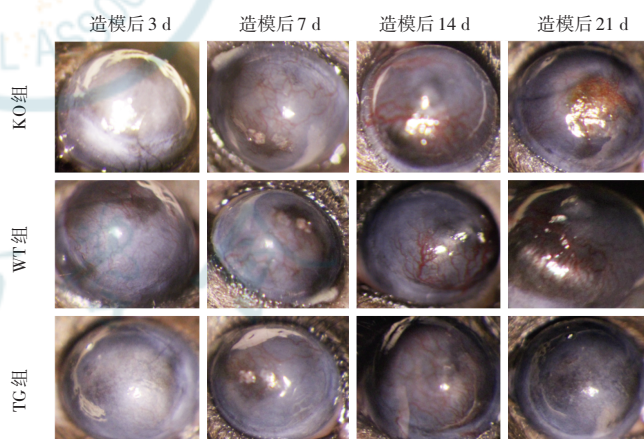


图 1 各组小鼠造模后角膜照相 造模后 3 d 各组角膜开始出现新生血管, 并于造模后 14 d 达到峰值, 之后逐渐消退。WT 组各时间点角膜上皮损伤程度与角膜基质混浊程度较 KO 组轻, 较 TG 组严重。WT 组 CNV 面积较 KO 组小, 较 TG 组大 WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因

Figure 1 Anterior segments photographs of mice after corneal alkali burn Corneal neovascularization appeared on the 3rd day after alkali burn, reached the peak on the 14th day, then gradually increased in WT, KO and TG groups. The corneal epithelial injury and corneal stromal turbidity were lighter in WT group in comparison with KO group, and severer in comparison with TG group at each time point after alkali burn. The CNV area was smaller in WT group compared with KO group, but larger compared with TG group WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

WT 组、KO 组和 TG 组不同时间点角膜上皮损伤评分、角膜基质混浊评分以及 CNV 面积总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 49.19, 34.56, 44.56$, 均 $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 51.62, 65.62, 71.32$, 均 $P < 0.01$); 其中 WT 组各时间点角膜上皮损伤评分、角膜基质混浊评分以及 CNV 面积总体明显低于 KO 组, 但高于 TG 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3~5)。

2.2 各组小鼠造模后角膜组织炎性细胞的观察

造模后 3 d, 各组角膜上皮及基质层出现不同程度的水肿, 基质内胶原纤维排列紊乱, 开始出现大小不一的新生血管管腔, 少量炎性细胞浸润于管腔周围; 造模后 7 d, 炎性细胞进一步增多; 造模后 14 d, 角膜组织和基质层胶原纤维结构紊乱, 可见大量新生血管管腔分布密集且管腔较大, 管腔内可见红细胞充盈, 管腔周围可见大量炎性细胞浸润; 造模后 21 d, 新生血管腔数量轻度减少, 炎症细胞浸润程度逐渐减轻。各时间点 WT 组角膜结构的紊乱程度、新生血管管腔密度、炎症细胞浸润程度较 KO 组减轻, 但较 TG 组显著增强 (图 2)。

2.3 各组小鼠造模后 CD31 阳性细胞分布情况和数量比较

各组小鼠造模后 3 d 开始出现少量 CD31 阳性细胞, 弥散表达在角膜上皮层和基质层; 造模后 7 d, CD31 阳性细胞明显增多, 主要分布于角膜缘区域; 造模后 14 d, CD31 阳性细胞数量达峰值, 且覆盖区域进一步由角膜缘向角膜中央扩展延伸; 造模后 21 d, CD31 阳性细胞减少, 呈逐渐消退趋势 (图 3)。各组不同时间点 CD31 阳性细胞数总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 77.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 46.12$, $P < 0.01$), WT 组各时间点 CD31 阳性细胞数量明显少于 KO 组, 但多于 TG 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 6)。

2.4 各组小鼠造模前后角膜组织 miR-497 表达比较

各组造模前后角膜组织 miR-497 相对表达量总体比较, 差异有统计学意义

($F_{\text{分组}} = 67.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 36.12$, $P < 0.01$)。相较于造模前, 各组造模后 14 d miR-497 相对表达量均明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。WT 组造模前后 miR-497 相对表达量显著高于 KO 组, 而低于 TG 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 7)。

表 3 各组小鼠造模后不同时间点角膜上皮损伤评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)
Table 3 Comparison of corneal epithelial injury score at different time points after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	眼数	造模后不同时间点角膜上皮损伤评分			
		3 d	7 d	14 d	21 d
WT 组	3	1.56±0.22	1.78±0.26	2.89±0.31	1.98±0.27
KO 组	3	2.34±0.24 ^a	2.67±0.31 ^a	3.67±0.42 ^a	2.51±0.35 ^a
TG 组	3	1.21±0.18 ^{ab}	1.45±0.21 ^{ab}	2.33±0.25 ^{ab}	1.56±0.16 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 49.19$, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 51.62$, $P < 0.01$ 。与同时时间点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因

Note: $F_{\text{group}} = 49.19$, $P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 51.62$, $P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 4 各组小鼠造模后不同时间点角膜基质混浊评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)
Table 4 Comparison of corneal stromal turbidity score at different time points after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	眼数	造模后不同时间点角膜基质混浊评分			
		3 d	7 d	14 d	21 d
WT 组	3	1.11±0.11	1.67±0.21	2.79±0.34	1.87±0.23
KO 组	3	1.65±0.23 ^a	2.41±0.31 ^a	3.87±0.33 ^a	2.56±0.24 ^a
TG 组	3	0.87±0.09 ^{ab}	1.45±0.18 ^{ab}	2.11±0.19 ^{ab}	1.36±0.16 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 34.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 65.62$, $P < 0.01$ 。与同时时间点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因

Note: $F_{\text{group}} = 34.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 65.62$, $P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 5 各组小鼠造模后不同时间点 CNV 面积比较 ($\bar{x} \pm s$, mm²)
Table 5 Comparison of CNV area at different time points after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$, mm²)

组别	眼数	造模后不同时间点 CNV 面积			
		3 d	7 d	14 d	21 d
WT 组	3	0.52±0.11	1.15±0.17	2.05±0.31	1.15±0.16
KO 组	3	0.96±0.07 ^a	1.76±0.17 ^a	3.56±0.47 ^a	2.05±0.39 ^a
TG 组	3	0.34±0.11 ^{ab}	0.88±0.16 ^{ab}	1.29±0.30 ^{ab}	0.79±0.23 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 44.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 71.32$, $P < 0.01$ 。与同时时间点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) CNV: 角膜新生血管; WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因

Note: $F_{\text{group}} = 44.56$, $P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 71.32$, $P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) CNV: corneal neovascularization; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

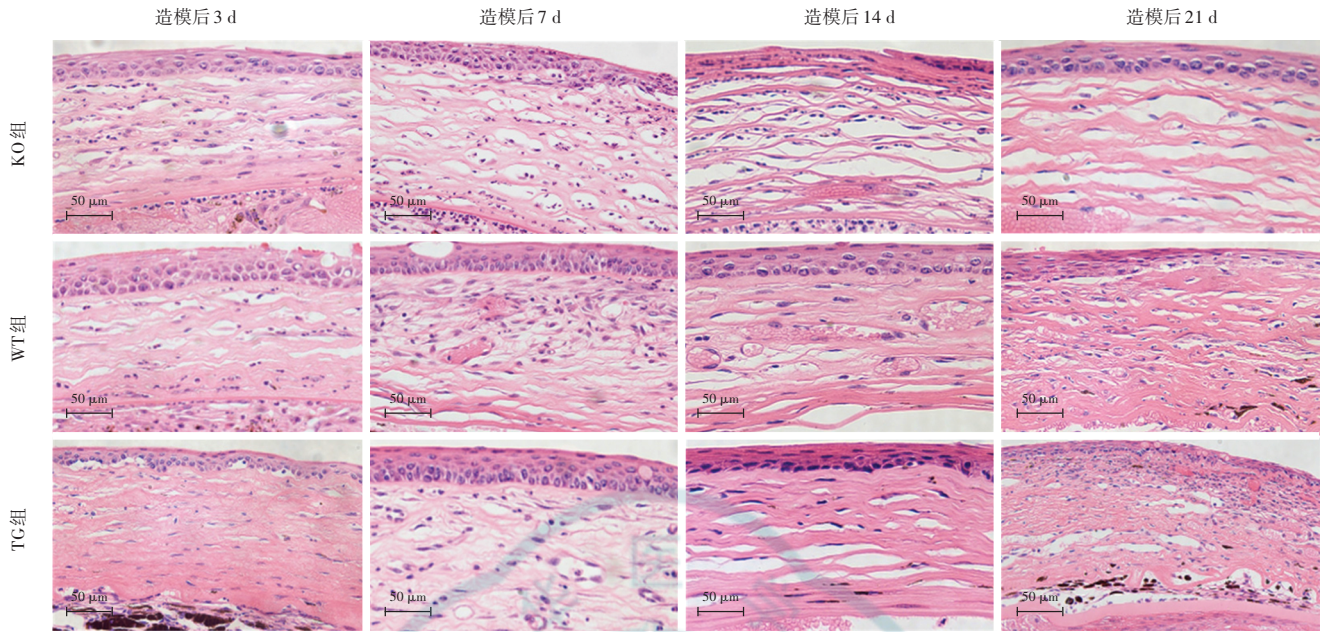


图 2 各组小鼠造模后不同时间点角膜组织病理染色(HE ×400, 标尺 = 50 μm) 各组角膜组织炎症细胞在造模后 3 d 显著增多,在造模后 7 d 短暂下降后再次上升,在造模后 14 d 达到峰值,造模后 21 d 呈现逐渐消退趋势;各时间点角膜结构的紊乱程度、新生血管管腔数量、炎症细胞浸润程度以 KO 组最严重,其次为 WT 组和 TG 组 WT:野生型;KO:敲除;TG:转基因

Figure 2 Histopathological staining of mice cornea at different time points after alkali burn(HE ×400, bar = 50 μm) The inflammatory cells in corneal tissues significantly increased on the 3rd day after alkali burn, increased again on the 7th day after a short decline, reached the peak on the 14th day, and then showed a gradual regression trend in WT, KO and TG groups. The degree of the corneal structure disorder, the number and density of neovascular lumens, and the degree of inflammatory cell infiltration at different time points after alkali burn were most severe in KO group, followed by WT and TG groups WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

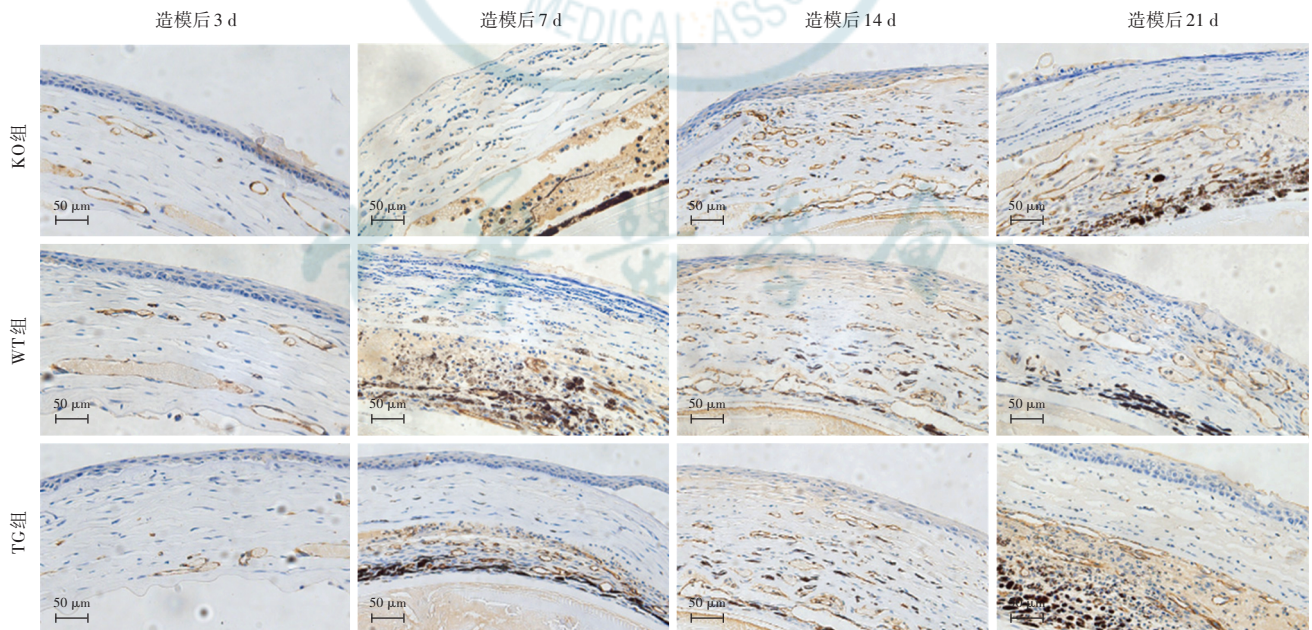


图 3 各组小鼠造模后不同时间点 CD31 免疫组织化学染色图(DAB ×400, 标尺 = 50 μm) 各组角膜组织 CD31 阳性细胞随造模后时间的延长呈现逐渐增多趋势,并在造模后 14 d 达到峰值,之后逐渐减少,WT 组各时间点 CD31 阳性细胞数量明显少于 KO 组,但多于 TG 组 WT:野生型;KO:敲除;TG:转基因

Figure 3 Immunohistochemical staining of CD31 after alkali burn in mice cornea(DAB ×400, bar = 50 μm) After alkali burn, CD31-positive cells in corneal tissues of each group gradually increased with time, and reached the peak on the 14th day, and then gradually subsided. There were fewer CD31-positive cells in WT group than in KO group at each time point, but more than in TG group WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 6 各组小鼠造模后不同时间点 CD31 阳性细胞数比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of the number of CD31-positive cells at different time points after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	造模后不同时间点 CD31 阳性细胞数			
		3 d	7 d	14 d	21 d
WT 组	3	2.52±0.15	4.85±0.37	9.88±1.31	5.45±0.46
KO 组	3	4.96±0.27 ^a	11.76±0.77 ^a	23.56±0.97 ^a	13.75±1.39 ^a
TG 组	3	1.34±0.11 ^{ab}	2.88±0.16 ^{ab}	5.29±0.30 ^{ab}	3.59±0.23 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 77.56, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 46.12, P < 0.01$ 。与同时间点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时间点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因
Note: $F_{\text{group}} = 77.56, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 46.12, P < 0.01$ 。Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 7 各组造模前后角膜组织 miR-497 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)
Table 7 Comparison of relative expression of miR-497 in cornea between before and after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	不同时间点 miR-497 相对表达量	
		造模前	造模后 14 d
WT 组	3	1.00±0.04	0.68±0.11
KO 组	3	0.56±0.07 ^a	0.41±0.06 ^a
TG 组	3	1.34±0.11 ^{ab}	1.05±0.14 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 67.56, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 36.12, P < 0.01$ 。与同时间点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时间点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR: 微小 RNA; WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因
Note: $F_{\text{group}} = 67.56, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 36.12, P < 0.01$ 。Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) miR: microRNA; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

2.5 各组小鼠造模后 14 d 角膜组织中 STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达比较

造模后 14 d, 各组角膜组织中 STAT3 及 p-STAT3 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 27.56, 33.12$, 均 $P < 0.01$); 与 WT 组小鼠相比, KO 组小鼠角膜 p-STAT3 和 STAT3 蛋白相对表达量明显升高, TG 组角膜 p-STAT3 和 STAT3 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4, 表 8)。

2.6 miR-497 靶向结合调控 STAT3 表达

TargetScan 预测软件结果显示, STAT3 是 miR-497 的潜在靶点 (图 5)。双荧光素酶检测结果显示, 在 WT-STAT3 共转染细胞中, 各组荧光素酶活性值总体比较差异有统计学意义 ($F = 15.98, P < 0.01$), miR-497 组荧光素酶活性明显低于 miR-NC 组且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 MUT-STAT3 共转染细胞中, 各组荧光素酶

活性值总体比较差异无统计学意义 ($F = 0.69, P = 0.56$) (表 9)。即验证 STAT3 是 miR-497-5p 的靶基因。

2.7 小鼠造模前后各时间点 VEGFA 和炎症因子 mRNA 表达比较

各组角膜组织中 VEGFA mRNA 表达均在造模后升高, 并于造模后 14 d 达峰值, 随后出现下降趋势; 各组炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 mRNA 表达在造模后 3 d 出现第 1 个高峰, 随后下降并在造模后 14 d 出现第 2 个高峰, 之后炎症因子 mRNA 表达逐渐消退。各组不同时间点间 VEGFA 和炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 55.56、27.56、37.56、25.56、17.56$, 均 $P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 45.33、21.12、16.12、18.12、15.12$, 均 $P < 0.01$)。WT 组 VEGFA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 mRNA 相对表达量均低于 KO 组, 高于 TG 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 10~14)。

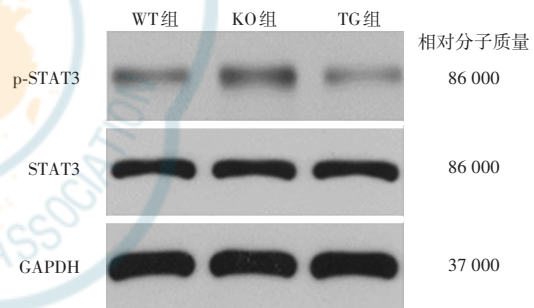


图 4 各组小鼠造模后 14 d 角膜组织 STAT3 及 p-STAT3 表达电泳图 与 WT 组比较, KO 组 STAT3 和 p-STAT3 蛋白条带灰度较强, TG 组 STAT3 和 p-STAT3 蛋白条带灰度降低 STAT3: 信号转导及转录激活蛋白 3; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因

Figure 4 Electrophoretogram of STAT3 and p-STAT3 expressions in mice cornea at 14 days after alkali burn Compared with WT group, the STAT3 and p-STAT3 protein bands were stronger in KO group and weaker in TG group STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

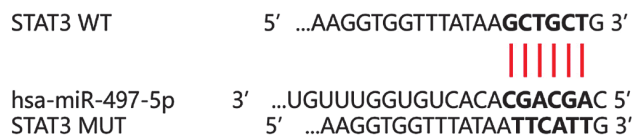


图 5 STAT3 与 miR-497 存在互补的核苷酸序列 STAT3: 信号转导与转录激活因子; WT: 野生型; MUT: 突变型

Figure 5 Complementary nucleotide sequences between STAT3 and miR-497 STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; WT: wild type; MUT: mutant type

表 8 各组造模后 14 d 角膜组织 STAT3 和 p-STAT3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Comparison of relative expression of STAT3 and p-STAT3 proteins on the 14th day after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	STAT3 蛋白相对表达量	p-STAT3 蛋白相对表达量
WT 组	3	0.87±0.04	1.09±0.11
KO 组	3	1.26±0.11 ^a	1.41±0.16 ^a
TG 组	3	0.68±0.11 ^{ab}	0.87±0.14 ^{ab}
F 值		27.56	33.12
P 值		<0.01	<0.01

注:与 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与 KO 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) STAT3:信号转导及转录激活蛋白 3; WT:野生型; KO:敲除; TG:转基因

Note: Compared with respective WT group, ^a $P < 0.05$; compared with respective KO group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 9 各组荧光素酶活性值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 9 Comparison of luciferase activity among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同类型细胞中荧光素酶相对活性值	
		WT-STAT3	MUT-STAT3
正常对照组	3	0.68±0.11	0.87±0.14
miR-NC 组	3	1.26±0.11	1.41±0.16
miR-497 组	3	0.87±0.04 ^{ab}	1.09±0.11 ^{ab}
F 值		15.98	0.69
P 值		<0.01	0.56

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 miR-NC 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA; NC:阴性对照; WT:野生型; STAT3:信号转导与转录激活因子; MUT:突变型

Note: Compared with respective normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with respective miR-NC group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR: micro RNA; NC: negative control; WT: wild type; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; MUT: mutant type

表 10 各组造模前后不同时间点 VEGFA mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 10 Comparison of relative expression of VEGFA mRNA at different time points before and after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	造模前后不同时间点 VEGFA 相对表达量				
		造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d
WT 组	3	1.00±0.11	7.41±0.95	8.85±0.43	13.75±0.61	5.15±0.11
KO 组	3	1.54±0.14 ^a	8.96±0.14 ^a	9.76±0.17 ^a	15.56±0.47 ^a	6.05±0.12 ^a
TG 组	3	0.89±0.11 ^{ab}	3.34±0.12 ^{ab}	4.28±0.16 ^{ab}	6.29±0.26 ^{ab}	2.79±0.15 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 55.56, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 45.33, P < 0.01$. 与同时时间点 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与同时时间点 KO 组比较,^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGFA:血管内皮生长因子 A; WT:野生型; KO:敲除; TG:转基因

Note: $F_{\text{group}} = 55.56, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 45.33, P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) VEGFA: vascular endothelial growth factor A; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 11 各组造模前后不同时间点 TNF- α mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 11 Comparison of relative expression of TNF- α mRNA at different time points before and after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	造模前后不同时间点 TNF- α 相对表达量				
		造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d
WT 组	3	1.00±0.11	3.41±0.15	2.85±0.13	6.75±0.31	4.15±0.11
KO 组	3	1.34±0.14 ^a	4.96±0.14 ^a	3.76±0.17 ^a	8.56±0.47 ^a	5.05±0.12 ^a
TG 组	3	0.89±0.08 ^{ab}	1.34±0.12 ^{ab}	1.28±0.16 ^{ab}	3.29±0.30 ^{ab}	2.79±0.13 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 27.56, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 21.12, P < 0.01$. 与同时时间点 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与同时时间点 KO 组比较,^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) TNF- α :肿瘤坏死因子 α ; WT:野生型; KO:敲除; TG:转基因

Note: $F_{\text{group}} = 27.56, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 21.12, P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) TNF- α : tumor necrosis factor- α ; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 12 各组造模前后不同时间点 IL-6 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 12 Comparison of relative expression of IL-6 mRNA at different time points before and after alkali burn among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	造模前后不同时间点 IL-6 相对表达量				
		造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d
WT 组	3	1.00±0.08	3.56±0.12	1.75±0.14	7.85±0.31	4.15±0.16
KO 组	3	1.11±0.07 ^a	6.96±0.13 ^a	2.76±0.17 ^a	8.96±0.47 ^a	5.85±0.19 ^a
TG 组	3	0.97±0.06 ^{ab}	2.34±0.12 ^{ab}	1.88±0.16 ^{ab}	3.29±0.31 ^{ab}	2.11±0.14 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 37.56, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 16.12, P < 0.01$. 与同时时间点 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与同时时间点 KO 组比较,^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL-6:白细胞介素 6; WT:野生型; KO:敲除; TG:转基因

Note: $F_{\text{group}} = 37.56, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 16.12, P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) IL-6: interleukin-6; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 13 各组造模前后不同时间点 IL-1 β mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 13 Comparison of relative expression of IL-1 β mRNA at different time points before and after alkali burn among three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	眼数	不同时间点 IL-1 β 相对表达量				
		造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d
WT 组	3	1.00 \pm 0.07	1.52 \pm 0.11	1.75 \pm 0.17	2.85 \pm 0.31	1.45 \pm 0.16
KO 组	3	1.23 \pm 0.12 ^a	2.96 \pm 0.07 ^a	2.06 \pm 0.17 ^a	3.56 \pm 0.47 ^a	2.05 \pm 0.19 ^a
TG 组	3	0.93 \pm 0.11 ^{ab}	1.34 \pm 0.11 ^{ab}	1.63 \pm 0.16 ^{ab}	2.29 \pm 0.30 ^{ab}	1.29 \pm 0.13 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 25.56, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 18.12, P < 0.01$ 。与同时点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因
Note: $F_{\text{group}} = 25.56, P < 0.01; F_{\text{time}} = 18.12, P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD- t test) IL-1 β : interleukin-1 β ; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

表 14 各组造模前后不同时间点 MCP-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 14 Comparison of relative expression of MCP-1 mRNA at different time points before and after alkali burn among three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	眼数	不同时间点 MCP-1 相对表达量				
		造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d
WT 组	3	1.00 \pm 0.06	2.12 \pm 0.11	1.65 \pm 0.17	2.89 \pm 0.18	1.45 \pm 0.16
KO 组	3	1.21 \pm 0.11 ^a	2.96 \pm 0.07 ^a	1.86 \pm 0.17 ^a	3.56 \pm 0.27 ^a	2.05 \pm 0.39 ^a
TG 组	3	0.87 \pm 0.08 ^{ab}	1.34 \pm 0.11 ^{ab}	1.18 \pm 0.16 ^{ab}	2.29 \pm 0.21 ^{ab}	0.99 \pm 0.23 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 17.56, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 15.12, P < 0.01$ 。与同时点 WT 组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时点 KO 组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) MCP-1: 单核细胞趋化蛋白 1; WT: 野生型; KO: 敲除; TG: 转基因
Note: $F_{\text{group}} = 17.56, P < 0.01; F_{\text{time}} = 15.12, P < 0.01$. Compared with WT group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with KO group at the same time point, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD- t test) MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; WT: wild type; KO: knockout; TG: transgenic

3 讨论

眼化学烧伤,尤其是碱烧伤,是常见的眼科急症,治疗难度大,致盲率高^[14]。CNV 是角膜碱烧伤常见的并发症,其损伤眼部相关组织的正常结构和功能,打破角膜免疫赦免,显著加剧角膜移植术后排斥反应,改变眼表炎症微环境,严重影响视力^[15-16]。本研究参考 Ormerod 等^[17]通过碱烧伤法成功建立小鼠 CNV 模型,碱烧伤角膜组织早期以局部强烈的炎症为特征,过度的炎症细胞激活、聚集、浸润和细胞因子表达,调控 CNV 的形成^[18-19]。本研究结果也显示,造模后 3 d 角膜出现炎症反应,7 d 炎症细胞进一步增多,14 d 角膜组织结构紊乱,大量炎症细胞浸润,21 d 后,炎症细胞数量减少,进入角膜修复期。据报道,免疫细胞募集和细胞因子分泌在后期(造模后 7~14 d)占主导地位,随后机体释放免疫应答,进入炎症活跃期^[20]。

目前抗炎和抗 VEGF 药物是活跃期 CNV 的主要治疗方法,基于基因的抗血管生成治疗是一种新兴的策略^[21]。研究表明,miR-497 属于 miR-15/16/195/

424/497 家族,性状高度保守,常位于染色体 17p13.1 上,参与肿瘤的发生和肿瘤血管的形成,在眼部发育、动态平衡、功能维持和疾病发生中可发挥重要调控作用^[22],结合角膜、晶状体、视网膜等眼部组织的 miRNA 表达谱,选取 miR-497 作为研究对象^[13,23]。本研究分别对 CRISPR/Cas9 介导 miR-497 KO 和 TG 小鼠以及 WT 小鼠,构建碱烧伤诱导的 CNV 模型,发现 KO 组小鼠 CNV 面积显著大于 WT 组,而 TG 组小鼠 CNV 面积显著小于 WT 组,推测 miR-497 可有效抑制新生血管生长。

STAT 蛋白家族成员定位于细胞质,可以转位到细胞核与 DNA 结合,通过信号转导和转录调控双重作用参与炎症和免疫^[24]。Janus 激酶-STAT3 信号通路不仅广泛参与细胞的增生、分化、凋亡以及免疫调节等过程,也通过影响巨噬细胞活化和趋化因子的募集在新生血管形成方面起重要作用^[25]。Kurdi 等^[26]研究发现,p-STAT3 蛋白在心肌梗死区及其边缘区域组织中表达增多,提示其可能具有诱导病理性损害的功能。Qu 等^[27]研究表明,角膜组织中 STAT3 表达水平的升

高参与干眼的发病机制,靶向抑制 STAT3 表达可有效缓解炎症所致的眼表损伤。Oladipupo 等^[28] 研究显示,STAT3 途径可调节葡萄膜炎期间 B 细胞与 T 细胞之间的相互作用,影响病情进展。本研究结果显示,角膜碱烧伤后,角膜组织中 miR-497 表达下调,且双荧光素酶检测结果显示 miR-497 靶向结合 STAT3,推测 miR-497 可通过调控 STAT3 的表达进而影响 CNV 的发生和发展过程。同时,VEGFA 是 VEGF 家族的主要成员,是一种强有力的促血管生成因子,通过促进内皮细胞生长、迁移和抑制细胞凋亡介导血管生成。本研究结果显示,miR-497 可降低 STAT3 和 VEGFA 的表达,表明 miR-497 通过直接或间接作用抑制 CNV 形成过程。一方面,在 CNV 形成过程中 STAT3 的激活可启动免疫级联放大效应,刺激 CNV 生成;另一方面,与 VEGF 发生协同作用,使角膜缘血管网通透性增高,促进纤维素外渗,加快内皮细胞的增生、迁移^[29-31]。

本研究结果显示,角膜受碱烧伤刺激后,miR-497 降低同时伴有 STAT3 的表达升高和炎症因子,如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 的 mRNA 表达增多,共同起到免疫放大效应,促进角膜炎症反应和新生血管的形成。其可能的机制为早期碱性物质招募炎症细胞趋向病灶,并促使其释放促血管生成因子,同时炎症细胞释放的各种趋化因子可进一步放大血管生成反应,再次募集炎症细胞至病灶,形成正反馈循环,反复加重血管生成反应^[32]。

综上所述,miR-497 可抑制碱烧伤诱导的角膜炎症反应,其可能通过靶向 STAT3 抑制炎症信号通路的激活,进而抑制 CNV 的发生和发展。未来 miR-497 有望成为 CNV 有效的治疗药物,可将 miR-497 制成局部眼药并联合纳米技术靶向病灶,有效应用于临床上 CNV 的治疗。本研究的局限性在于未深入探讨免疫细胞与眼部新生血管形成的关系,以及 miR-497 是否参与小鼠角膜碱烧伤后新生血管形成其他可能发生改变的信号通路,这也是我们下一步研究的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王杨:参与选题与研究设计、收集数据、资料分析和解释、论文撰写及修改;杨燕宁:参与资料分析和解释、论文修改及定稿;潘玉苗、黄钰清、周奕文:参与选题与研究设计、论文修改

参考文献

- [1] Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization [J]. *Ocul Surf*, 2018, 16(4): 398-414. DOI: 10.1016/j.jtos. 2018. 06. 004.
- [2] Gupta D, Illingworth C. Treatments for corneal neovascularization: a review [J]. *Cornea*, 2011, 30(8): 927-938. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318201405a.
- [3] Bakunowicz-Lazarczyk A, Urban B. Assessment of therapeutic options for reducing alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation [J]. *Adv Med Sci*, 2016, 61(1): 101-112. DOI: 10.1016/j.advms. 2015. 10. 003.
- [4] Liu X, Guo A, Tu Y, et al. Fruquintinib inhibits VEGF/VEGFR2 axis of choroidal endothelial cells and M1-type macrophages to protect against mouse laser-induced choroidal neovascularization [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 1016 [2022-05-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33247124>. DOI: 10.1038/s41419-020-03222-1.
- [5] Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(3): 208-248. DOI: 10.1016/j.preteyeres. 2010. 01. 002.
- [6] Song J, Lee K, Park SW, et al. Lactic acid upregulates VEGF expression in macrophages and facilitates choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(8): 3747-3754. DOI: 10.1167/iovs.18-23892.
- [7] Baradaran-Rafii A, Eslani M, Haq Z, et al. Current and upcoming therapies for ocular surface chemical injuries [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(1): 48-64. DOI: 10.1016/j.jtos. 2016. 09. 002.
- [8] Yu H, Sun L, Cui J, et al. Three kinds of corneal host cells contribute differently to corneal neovascularization [J]. *EBioMedicine*, 2019, 44: 542-553. DOI: 10.1016/j.ebiom. 2019. 05. 026.
- [9] Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, et al. STAT3 signaling in immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 1-15. DOI: 10.1016/j.cytogfr. 2016. 05. 001.
- [10] Parri E, Kuusanmäki H, van Adrichem AJ, et al. Identification of novel regulators of STAT3 activity [J/OL]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0230819 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32231398>. DOI: 10.1371/journal.pone.0230819.
- [11] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1836-1852. DOI: 10.1093/bib/bby054.
- [12] Wang W, Ren F, Wu Q, et al. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 2127-2133. DOI: 10.3892/or. 2014. 3439.
- [13] Li J, Zhang Y, Wang X, et al. microRNA-497 overexpression decreases proliferation, migration and invasion of human retinoblastoma cells via targeting vascular endothelial growth factor A [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 5021-5027. DOI: 10.3892/ol. 2017. 6083.
- [14] Di Zazzo A, Kheirkhah A, Abud TB, et al. Management of high-risk corneal transplantation [J]. *Surv Ophthalmol*, 2017, 62(6): 816-827. DOI: 10.1016/j.survophthal. 2016. 12. 010.
- [15] Zhou H, Zhang W, Bi M, et al. The molecular mechanisms of action of PPAR- γ agonists in the treatment of corneal alkali burns (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1003-1011. DOI: 10.3892/ijmm. 2016. 2699.
- [16] Liu CH, Wang Z, Sun Y, et al. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies [J]. *FASEB J*, 2017, 31(11): 4665-4681. DOI: 10.1096/fj. 201700336R.
- [17] Ormerod LD, Abelson MB, Kenyon KR. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30(10): 2148-2153.
- [18] Wu P, Zhang D, Geng Y, et al. Circular RNA-ZNF609 regulates corneal neovascularization by acting as a sponge of miR-184 [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 192: 107937 [2022-06-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31954666>. DOI: 10.1016/j.exer. 2020. 107937.
- [19] Mukwaya A, Mirabelli P, Lennikov A, et al. Repeat corneal neovascularization is characterized by more aggressive inflammation and vessel invasion than in the initial phase [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(8): 2990-3001. DOI: 10.1167/iovs. 19-27591.
- [20] Lee SH, Kim KW, Joo K, et al. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2016, 16: 57 [2022-06-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27356868>. DOI: 10.1186/s12886-016-0235-z.

- [21] Torrecilla J, Del Pozo-Rodríguez A, Vicente-Pascual M, et al. Targeting corneal inflammation by gene therapy: emerging strategies for keratitis [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 176: 130-140. DOI: 10.1016/j.exer.2018.07.006.
- [22] Jayaram H, Cepurna WO, Johnson EC, et al. MicroRNA expression in the glaucomatous retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(13): 7971-7982. DOI: 10.1167/iovs.15-18088.
- [23] Liu Z, Wu S, Wang L, et al. Prognostic value of microRNA-497 in various cancers: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 2491291 [2022-06-03]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191744>. DOI: 10.1155/2019/2491291.
- [24] Nakamura R, Sene A, Santeford A, et al. IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7847 [2022-06-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260587>. DOI: 10.1038/ncomms8847.
- [25] Zhou X, Yan T, Huang C, et al. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 242 [2022-06-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30285793>. DOI: 10.1186/s13046-018-0911-3.
- [26] Kurdi M, Zgheib C, Booz GW. Recent developments on the crosstalk between STAT3 and inflammation in heart function and disease [J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3029 [2022-06-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30619368/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03029.
- [27] Qu M, Qi X, Wang Q, et al. Therapeutic effects of STAT3 inhibition on experimental murine dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(12): 3776-3785. DOI: 10.1167/iovs.19-26928.
- [28] Oladipupo FO, Yu CR, Olumuyide E, et al. STAT3 deficiency in B cells exacerbates uveitis by promoting expansion of pathogenic lymphocytes and suppressing regulatory B cells (Bregs) and Tregs [J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16188 [2022-06-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33004854>. DOI: 10.1038/s41598-020-73093-1.
- [29] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114-127. DOI: 10.1111/joim.12019.
- [30] Wang Y, Gao Y, Huang Y, et al. The potential protective effects of miR-497 on corneal neovascularization are mediated via macrophage through the IL-6/STAT3/VEGF signaling pathway [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107745 [2023-02-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33984719>. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107745.
- [31] Shen T, Wu Y, Cai W, et al. LncRNA Meg3 knockdown reduces corneal neovascularization and VEGF-induced vascular endothelial angiogenesis via SDF-1/CXCR4 and Smad2/3 pathway [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2022, 222: 109166 [2023-02-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35820465>. DOI: 10.1016/j.exer.2022.109166.
- [32] Lee HJ, Yoon CH, Kim HJ, et al. Ocular microbiota promotes pathological angiogenesis and inflammation in sterile injury-driven corneal neovascularization [J]. *Mucosal Immunol*, 2022, 15(6): 1350-1362. DOI: 10.1038/s41385-022-00555-2.

(收稿日期: 2022-07-26 修回日期: 2023-02-07)

(本文编辑: 张宇)

读者 · 作者 · 编者

眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)
- ANOVA: 方差分析 (analysis of variance)
- BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)
- DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)
- EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)
- EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)
- ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)
- FFA: 荧光素眼底血管造影 (fluorescein fundus angiography)
- FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)
- GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)
- IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)
- IL: 白细胞介素 (interleukin)
- IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)
- IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)
- ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)
- LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)
- miRNA: 微小 RNA (microRNA)
- MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)
- mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
- MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF: 核转录因子 (nuclear factor)
- OCT: 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography)
- OR: 优势比 (odds ratio)
- PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
- PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
- RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
- POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
- RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)
- RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
- RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
- RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
- S I t: 基础泪液分泌试验 (Schirmer I test)
- shRNA: 短发夹 RNA (short hairpin RNA)
- siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
- α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
- TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
- TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
- UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
- VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)

