

· 实验研究 ·

miR-497 对糖尿病小鼠角膜上皮损伤修复的抑制作用及其靶向 wnt3a 调控机制

黄钰清 杨燕宁 王杨 潘玉苗 程思敏

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 对糖尿病小鼠角膜上皮愈合的抑制作用及其可能机制。方法 取 40 只健康清洁级野生型 C57BL/J6 小鼠, 采用随机数字表法平均分为空白对照组和模型对照组, 另取 CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 敲除小鼠和 miR-497 过表达小鼠各 20 只, 分别作为 miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组。对模型对照组、miR-497 敲除组、miR-497 过表达组小鼠连续腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 构建糖尿病模型, 空白对照组小鼠注射等量枸橼酸钠缓冲液, 正常饲养 8 周。糖尿病模型建立成功后通过刮除角膜中央直径 2 mm 上皮, 进一步构建角膜上皮损伤模型。采用角膜荧光素钠染色观察角膜上皮损伤后 0、12、24 和 36 h 各组小鼠角膜上皮缺损面积。采用 Western blot 法检测各组小鼠角膜组织中 wnt3a、 β -catenin 蛋白表达; 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠角膜组织 miR-497 以及细胞增生相关基因 *CyclinD1*、*c-Myc*、*Ki-67* mRNA 水平表达。采用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-497 与 wnt3a 的靶向性关系。体外培养人角膜上皮细胞 (HCEC), 通过 Lipo8000 分别转染 miR-497 mimics、miR-497 mimics 阴性对照、miR-497 inhibitor、miR-497 inhibitor 阴性对照, 作为 miR-497 mimics 组、mimics 阴性对照组、miR-497 inhibitor 组、inhibitor 阴性对照组, 并在含 25% 葡萄糖的高糖培养基中培养; 另取 2 个组 HCEC 分别置于含 5% 及 25% 葡萄糖的培养基进行培养, 作为正常对照组及高糖组。采用 CCK8 检测各组细胞增生活力。结果 注射 STZ 后 8 周, 各糖尿病模型组小鼠血糖浓度明显高于空白对照组, 体质量明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型对照组损伤角膜上皮后 12、24 和 36 h 角膜上皮缺损面积百分比明显高于相应时间点空白对照组和 miR-497 敲除组, 低于 miR-497 过表达组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型对照组角膜组织中 wnt3a、 β -catenin 蛋白相对表达量明显低于空白对照组和 miR-497 敲除组, 高于 miR-497 过表达组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型对照组 *CyclinD1*、*c-Myc* 和 *Ki-67* mRNA 相对表达量均低于 miR-497 敲除组, 高于 miR-497 过表达组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组 miR-497 相对表达量分别为 1.00 ± 0.02 、 0.63 ± 0.06 和 1.48 ± 0.03 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 19.62, P < 0.01$)。野生型 Wnt3a 转染细胞中 miR-497-5p mimics 组荧光素酶活性低于 miR-497-5p 阴性对照组和空载体组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 突变型 wnt3a 转染细胞中, 各组荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ($F = 0.73, P = 0.59$)。高糖组细胞增生 A 值为 0.59 ± 0.03 , 明显低于正常对照组的 0.59 ± 0.03 和 miR-497 inhibitor 组的 0.88 ± 0.08 , 明显高于 miR-497 mimics 组的 0.48 ± 0.11 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 沉默 miR-497 表达可能通过靶向激活 wnt/ β -catenin 通路促进糖尿病小鼠角膜上皮缺损修复。

【关键词】 微小 RNA; Wnt3a; 糖尿病; 角膜上皮; 角膜损伤

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81770899)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220108-00005

Inhibitory effect of miR-497 on the repair of diabetic mice corneal epithelial damage by targeting wnt3a

Huang Yuqing, Yang Yanning, Wang Yang, Pan Yumiao, Cheng Simin

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

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

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibitory effect of miR-497 on the corneal epithelial healing in diabetic mice and its possible mechanism. **Methods** Forty healthy clean-grade wild-type C57BL/J6 mice were randomly divided into a blank control group and a model control group, with 20 mice in each group. Another 20 CRISPR/Cas9-mediated miR-497 knockout mice and miR-497 overexpression mice were taken as miR-497 knockout

and miR-497 overexpression groups, respectively. The diabetes model was constructed by continuous intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) to the mice in model control, miR-497 knockout and miR-497 overexpression groups, and the mice in blank control group were injected with an equal amount of citrate buffer, followed by 8-week normal feeding. After the establishment of diabetes model, the corneal epithelial injury model was further constructed by scraping off part of the corneal epithelium with a central diameter of 2 mm. The corneal epithelial defect area of mice in 0, 12, 24 and 36 hours after corneal epithelial injury was observed by corneal fluorescein sodium staining. The expression of Wnt3a and β -catenin proteins in mice corneal tissues was detected by Western blot. The expression of miR-497 as well as the mRNA expression levels of cell proliferation-associated factor genes *CyclinD1*, *c-Myc*, and *Ki-67* mRNA was detected by real-time quantitative fluorescence PCR. The targeting relationship between miR-497 and wnt3a was detected by a dual luciferase reporter gene assay. Human corneal epithelial cells (HCEC) were cultured *in vitro* and transfected with miR-497 mimics, miR-497 mimics negative control, miR-497 inhibitor, and miR-497 inhibitor negative control by Lipo8000 as miR-497 mimics group, mimics negative control group, miR-497 inhibitor group, and miR-497 inhibitor negative control group, respectively, all of which were cultured in high glucose medium containing 25% glucose. Another two groups of HCEC were taken and cultured in medium containing 5% and 25% glucose as control and high glucose groups, respectively. The cell proliferation viability was determined by CCK8 method. 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 (2019K-K010).

Results Eight weeks after STZ injection, the blood glucose of mice was significantly higher and the weight was significantly lower in each diabetic model group than those of blank control group (all at $P < 0.05$). At 12, 24 and 36 hours after the corneal epithelial injury, the percentages of corneal epithelial defect area observed by slit-lamp microscopy in model control group were significantly higher than those in blank control group and miR-497 knockout group and lower than those in miR-497 overexpression group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative expressions of wnt3a and β -catenin proteins in the corneal tissues of model control group were significantly lower than those of blank control group and miR-497 knockout group, but higher than those of miR-497 overexpression group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative expressions of *CyclinD1*, *c-Myc* and *Ki-67* mRNA in model control group were lower than those in miR-497 knockout group, but higher than those in miR-497 overexpression group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative expression of miR-497 in model control group, miR-497 knockout group and miR-497 overexpression group was 1.00 ± 0.02 , 0.63 ± 0.06 and 1.48 ± 0.03 , respectively, with a statistically significant difference ($F = 19.62, P < 0.01$). The luciferase activity of miR-497-5p mimics group in wild-type wnt3a transfected cells was lower than that of miR-497-5p negative control group and empty vector group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). In the mutant wnt3a transfected cells, there was no significant difference in the luciferase activity among various groups ($F = 0.73, P = 0.59$). The cell proliferation *A* value of high glucose group was 0.59 ± 0.03 , which was significantly lower than 0.59 ± 0.03 of normal control group and 0.88 ± 0.08 of miR-497 inhibitor group, but significantly higher than 0.48 ± 0.11 of miR-497 mimics group (all at $P < 0.05$).

Conclusions The silencing of miR-497 may promote the repair of diabetic corneal epithelial defects by targeting wnt/ β -catenin pathway.

[Key words] MicroRNA; Wnt3a; Diabetes mellitus; Corneal epithelium; Corneal injuries

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

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220108-00005

据国际糖尿病联盟统计,截止到 2021 年全球约有 5.37 亿成年糖尿病患者,患病人数约占全球成年人口的 10.5%,其中中国约有 1.4 亿患者^[1]。糖尿病角膜病变(diabetic keratopathy, DK)一般表现为眼部外伤或术后持续性角膜上皮缺损、愈合延迟、浅层点状角膜炎,逐步发展为角膜溃疡,严重影响患者生活质量^[2]。微小 RNA(microRNA, miR)是一组约含 22 个核苷酸

的内源性非编码小 RNA,通过特异性识别目的 mRNA 上 3'UTR 序列介导靶基因转录后的基因沉默^[3-4]。近年来的研究证明 miR-497 是参与多种肿瘤发生和发展的关键因子之一,调控肿瘤细胞的增生、迁移以及糖代谢等^[5]。Wnt/ β -catenin 是一条经典信号通路,参与维持成人组织的稳态和促进再生。已有研究证明其通过促进表皮细胞增生以及角膜细胞分化、迁移加速伤口

修复^[6]。Yang 等^[7]研究发现胰岛素通过介导 Wnt/ β -catenin 通路促进 I 型糖尿病小鼠角膜神经修复及上皮创口愈合。通过 Targetscan 和 miRanda 等生物信息预测软件发现, miR-497 与 wnt3a 的 3'-UTR 存在互补结合位点, 推测 miR-497 可能参与 Wnt/ β -catenin 通路调控。故本研究选取野生型 (wild type, WT) C57BL/J6 小鼠、CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 敲除和过表达转基因 C57BL/6 小鼠, 通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 腹腔注射诱导 I 型糖尿病小鼠模型并刮除部分角膜上皮观察其愈合速率, 探讨 miR-497 和 wnt3a 是否参与糖尿病小鼠角膜上皮修复过程及其可能的作用机制, 希望为临床诊疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 选取 6~8 周龄健康清洁级 C57BL/J6 雄性小鼠 40 只, 体质量 18~20 g, 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] 和同周龄健康 CRISPR/Cas9 介导的 miR-497 敲除和过表达 C57BL/6 雄性小鼠各 20 只, 由武汉大学消化实验室惠赠[赛业(苏州)生物科技有限公司合成, 小鼠生产许可证号: SYXK(苏)2012-0061]。人角膜上皮细胞 (human corneal epithelial cell, HCEC) HTX2326 为本实验冻存。实验流程遵循视觉与眼科学研究协会相关规定, 并通过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); 青/链霉素双抗溶液、STZ(美国 Sigma 公司); 兔抗小鼠 wnt3a 单克隆抗体(英国 Abcam 公司); 鼠抗小鼠 β -catenin 单克隆抗体(美国 Affinity 公司); DMEM 培养基、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗(武汉塞维尔生物有限公司); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (RG027)、CCK8 试剂盒、Lipo8000 转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司); 胎牛血清(上海吉泰依科赛生物技术有限公司)。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、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病小鼠角膜上皮损伤模型建立及分组 取 40 只 WT C57BL/J6 小鼠, 按照随机数字表法平均分为空白对照组和模型对照组。取 CRISPR/Cas9 介

导 miR-497 敲除和过表达 C57BL/J6 小鼠各 20 只, 分别作为 miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组。模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组小鼠禁食 12 h 后, 根据体质量以 50 mg/kg 于左下腹腔注射 STZ, 连续注射 5 d, 此后正常饲养小鼠。于末次注射后 8 周取小鼠尾静脉血, 用血糖仪检测随机血糖, 将 3 次血糖浓度平均值 ≥ 16.7 mmol/L 的小鼠纳入糖尿病模型小鼠。空白对照组小鼠注射相同浓度、pH 值为 4.5 的枸橼酸钠缓冲液。

取模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组糖尿病模型建造成功的小鼠, 记录体质量和血糖后用 10% 水合氯醛 (5 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 盐酸丙美卡因滴眼液点右眼行表面麻醉, 棉签蘸去多余水分, 用直径 2 mm 的角膜环钻垂直角膜中央进行按压标记, 用力过程中不伤及角膜基质层, 随后用板层刀刮除角膜环钻标记范围内的角膜上皮。实验操作完毕后, 小鼠右眼点用左氧氟沙星凝胶预防感染。空白对照组小鼠给予同样方法建立角膜上皮损伤模型。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜上皮损伤后不同时间点角膜愈合情况 分别于角膜上皮损伤后 0、12、24 和 36 h 进行角膜荧光素钠染色, 在裂隙灯显微镜钴蓝灯下观察各组角膜上皮损伤修复情况, 并拍照记录。采用 ImageJ 软件自动测量计算角膜上皮缺损面积, 并计算各时间点角膜缺损面积百分比 (%) = 各时间点角膜缺损面积/造模后 0 h 角膜缺损面积 $\times 100\%$ 。

1.2.3 Western blot 法检测小鼠角膜组织中 wnt3a、 β -catenin 蛋白相对表达量 小鼠角膜上皮损伤模型建立后 36 h, 每组各任取 4 只小鼠, 颈椎脱臼法处死后剖取角膜组织加入裂解液, 收集样本检测总蛋白浓度, 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, 加入一抗 wnt3a (1:1 000 稀释)、 β -catenin (1:1 000 稀释) 和 GAPDH (1:3 000 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 (1:5 000) 室温下孵育 1 h, 用 TBST 漂洗 3 次并滴加新鲜配制的 ECL 发光液, 避光静置 5 min, 使用化学发光凝胶成像仪采集图像信息, 并采用 ImageJ 图像分析软件分析灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算各目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠角膜组织中 miR-497 和细胞增生相关基因 *CyclinD1*、*c-Myc*、*Ki-67* mRNA 表达量 小鼠角膜上皮损伤模型建立后 36 h, 每组各任取 3 只小鼠, 颈椎脱臼法处死后剖取角膜, 按 Trizol 说明书提取角膜组织总 RNA, NanoDrop 分光光

度计测定总 RNA 浓度和纯度,取 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.1 的 RNA 逆转录为 cDNA。wnt3a、 β -catenin 及细胞增生相关基因引物序列见表 1,由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s、57 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 60 s,共 32 个循环;72 °C 再延伸 5 min 至 4 °C。分别用 U6、GAPDH 作为 miR-497 和其余目的基因内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列
<i>c-Myc</i>	正向:5'-CACTCACCAGCACAACACTACG-3' 反向:5'-GTTCTCTCTGACGTTCCA-3'
<i>CyclinD1</i>	正向:5'-AGAAGTGCAGAGAGGAGGTC-3' 反向:5'-TTCTCGGCACTCAAGGGAAT-3'
<i>Ki-67</i>	正向:5'-CTTTGGGTGCGACTTGACG-3' 反向:5'-GTCGACCCCGTCTCTTTT-3'
<i>miR-497</i>	正向:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' 反向:5'-TAGCCTGCAGCACACTGTGGT-3'
<i>GAPDH</i>	正向:5'-TGGTATCCTGGAAGGACTCA-3' 反向:5'-CCACTAGAGGCAGGGATGAT-3'
<i>U6</i>	正向:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' 反向:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'

注:miR:微小 RNA;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note:miR:microRNA;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-497 对 wnt3a 的靶向性 取处于对数生长期、生长状态良好的 HCEC,分别将 WT 或突变型 (mutant type, MUT) wnt3a 载体与 miR-497-5p 拟似物、miR-497-5p 阴性对照或空载体共转染,培养 48 h 后,按照荧光素酶检测试剂盒说明书,采用双荧光素酶报告基因检测系统测定各组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 wnt3a 和 MUT wnt3a 细胞荧光素酶活性。

1.2.6 HCEC 分组及 miRNA 转染 将 HCEC 接种至 6 孔板中,置于含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素双抗的 DMEM 培养基,于 37 °C、95% 浓度 CO₂ 培养箱中培养;待细胞融合至 80%,更换为含 2% 胎牛血清、无抗生素 DMEM 培养基,并将细胞分为 miR-497 mimics 组、mimics 阴性对照组、miR-497-inhibitor 组、inhibitor 阴性对照组,分别使用 Lipo8000 转染试剂将附有荧光基团的 miR-497 mimics、miR-497-mimics 阴性对照、miR-497-inhibitor、miR-497-inhibitor 阴性对照转染至 HCEC 中,24 h 后通过荧光显微镜观察细胞,评估转染率并继续培养至细胞完全融合。

1.2.7 CCK8 法检测各转染组 HCEC 增生活力 取

各组转染成功的细胞按照 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板,并使用含 25% 葡萄糖的高糖 DMEM 培养;另设置正常对照组和高糖组 HCEC,分别使用含 5% 及 25% 葡萄糖的 DMEM 进行培养。培养 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 °C 避光孵育 4 h。使用酶标仪测量每组 450 nm 处细胞的吸光度 (absorbance, A) 值。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 Graph Pad Prism 9.3 软件进行统计分析。计量数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组两因素或单因素干预多水平实验设计,各组同一时间点各检测指标表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,不同时间点各检测指标表达量的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,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 糖尿病模型小鼠建立情况

末次腹腔注射 STZ 后,各糖尿病模型组小鼠出现持续性多饮、多尿伴血糖升高,体质量下降。注射 STZ 后 8 周,空白对照组、模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组小鼠血糖浓度分别为 (4.20 \pm 0.17)、(25.30 \pm 0.17)、(23.30 \pm 0.06) 和 (24.77 \pm 0.18) mmol/L,体质量分别为 (28.20 \pm 0.07)、(15.70 \pm 0.11)、(17.31 \pm 0.15) 和 (14.92 \pm 0.15) g,总体比较差异均有统计学意义 ($F = 17.46, 22.24$, 均 $P < 0.01$),其中模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组小鼠血糖浓度明显高于空白对照组,体质量明显低于空白对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.2 各模型组小鼠角膜上皮损伤后不同时间点愈合情况比较

角膜上皮损伤后 12 h 和 24 h,空白对照组和 miR-497 敲除组角膜荧光素钠着染面积明显小于模型对照组,miR-497 过表达组角膜荧光素钠着染面积较模型对照组大;角膜上皮损伤后 36 h,空白对照组和 miR-497 敲除组角膜荧光素钠着染几乎不可见,模型对照组和 miR-497 过表达组角膜中央仍有部分染色 (图 1)。各组不同时间点皮缺损面积百分比总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 138.53, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 22.12, P < 0.01$);其中角膜上皮损伤后 12、24 和 36 h 时模型对照组小鼠角膜上皮缺损面积百分比明显高于空白对照组和 miR-497 敲除组,但低于 miR-497 过表达组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

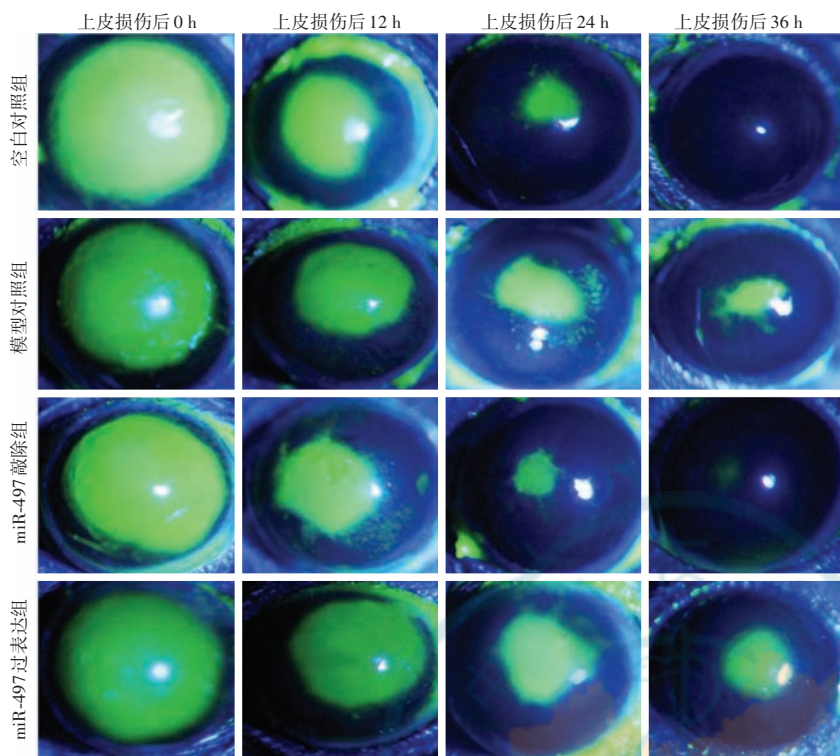


图 1 各组小鼠角膜上皮损伤后不同时间点荧光素钠染色图 角膜上皮损伤后 12、24 和 36 h 时,空白对照组和 miR-497 敲除组小鼠角膜缺损面积明显小于模型对照组,miR-497 过表达组缺损面积大于模型对照组 miR:微小 RNA

Figure 1 Fluorescein sodium staining images at different time points after corneal injury in four mouse groups At 12, 24, and 36 hours after corneal epithelial injury, the corneal defect area of blank control group and miR-497 knockout group was significantly smaller than that of model control group, and the defect area of miR-497 knockout group was larger than that of model control group miR: microRNA

2.3 各组小鼠上皮损伤后 36 h 角膜组织中 wnt3a、β-catenin 表达比较

角膜上皮损伤后 36 h,与模型对照组比较,miR-497 敲除组 wnt3a 和 β-catenin 蛋白条带灰度增强,miR-497 过表达组 wnt3a 和 β-catenin 蛋白条带灰度减弱(图 2)。各组小鼠角膜组织中 wnt3a 及 β-catenin 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学

意义($F = 23.98、36.38$,均 $P < 0.05$);其中与空白对照组比较,模型对照组小鼠角膜组织 wnt3a 及 β-catenin 蛋白相对表达量明显下降;与模型对照组相比,miR-497 敲除组小鼠角膜组织 wnt3a 及 β-catenin 蛋白相对表达量升高,miR-497 过表达组角膜组织各蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)

2.4 各组造模后 36 h 小鼠角膜组织中细胞增殖相关基因和 miR-497 表达比较

模型对照组、miR-497 敲除组和 miR-497 过表达组 CyclinD1 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.14 、

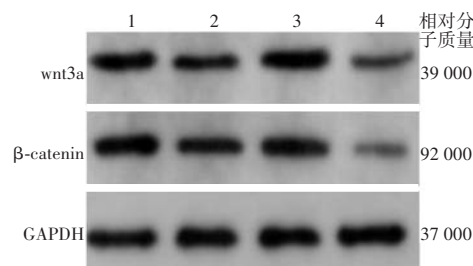


图 2 各组小鼠造模后 36 h 角膜组织 wnt3a 及 β-catenin 表达电泳图 与模型对照组比较,miR-497 敲除组 wnt3a 和 β-catenin 蛋白条带灰度增强,miR-497 过表达组 wnt3a 和 β-catenin 蛋白条带灰度减弱 1:空白对照组;2:模型对照组;3:miR-497 敲除组;4:miR-497 过表达组 GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 2 Electrophoretogram of wnt3a and β-catenin expression in four mice groups at 36 hours after modeling Compared with model control group, the greyscales of wnt3a and β-catenin proteins bands were enhanced in miR-497 knockout group, and were weakened in miR-497 overexpression group 1: blank control group; 2: model control group; 3: miR-497 knockout group; 4: miR-497 overexpression group GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组小鼠角膜上皮刮除后不同时间点角膜上皮缺损面积百分比比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Comparison of mice corneal epithelial defect area at different time points after corneal epithelial curettage among four groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	角膜上皮刮除后不同时间点缺损面积百分比			
		0 h	12 h	24 h	36 h
空白对照组	3	79.50±0.14	31.89±1.40	14.30±0.31	0.32±0.11
模型对照组	3	79.90±0.06	43.90±2.51 ^a	28.20±0.31 ^a	14.20±0.16 ^a
miR-497 敲除组	3	80.30±0.03	32.70±1.77 ^{ab}	12.50±0.47 ^{ab}	0.54±0.04 ^{ab}
miR-497 过表达组	3	79.50±0.04	49.20±2.44 ^{ab}	33.10±0.30 ^{ab}	18.70±0.31 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 138.53, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 22.12, P < 0.01$ 。与同时点空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与同时点模型对照组比较,^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析,LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA

Note: $F_{\text{group}} = 138.53, P < 0.01; F_{\text{time}} = 22.12, P < 0.01$ 。Compared with blank control group at corresponding time points,^a $P < 0.05$; compared with model control group at corresponding time points,^b $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) miR: micro RNA

1.34±0.09 和 0.79±0.11, c-Myc mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.15、1.53±0.13 和 0.75±0.04, Ki-67 mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.04、1.13±0.10 和 0.89±0.12, miR-497 相对表达量分别为 1.00±0.02、0.63±0.06 和 1.48±0.03, 总体比较差异均有统计学意义 ($F=22.53, 19.62, 25.62, 19.62$, 均 $P<0.01$); 其中模型对照组 CyclinD1、c-Myc 和 Ki-67 mRNA 相对表达量均低于 miR-497 敲除组, 高于 miR-497 过表达组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); miR-497 敲除组 miR-497 相对表达量明显低于模型对照组, miR-497 过表达组 miR-497 相对表达量明显高于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 3)

表 3 各组小鼠角膜上皮损伤后 36 h 角膜组织 wnt3a 和 β -catenin 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of relative expressions of wnt3a and β -catenin in mice corneal tissues at 36 hours after epithelial damage among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	wnt3a 蛋白 相对表达量	β -catenin 蛋白 相对表达量
空白对照组	4	1.37±0.02	1.39±0.23
模型对照组	4	0.87±0.04 ^a	1.09±0.11 ^a
miR-497 敲除组	4	1.26±0.11 ^{ab}	1.41±0.16 ^{ab}
miR-497 过表达组	4	0.68±0.11 ^{ab}	0.87±0.14 ^{ab}
F 值		23.98	36.38
P 值		<0.05	<0.05

注:与空白对照组比较, ^a $P<0.05$;与模型对照组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA

Note: Compared with blank control group, ^a $P<0.05$; compared with model control group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR: micro RNA

2.5 miR-497 靶向结合 wnt3a 后各族荧光素酶活性比较

Targetscan 软件预测发现 miR-497-5p 与 wnt3a 3'UTR 具有结合位点 (图 4)。通过双荧光素酶检测显示, WT wnt3a 共转染细胞中 miR-497-5p mimics 组荧光素酶活性低于 miR-497-5p 阴性对照组和空载体组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); MUT wnt3a 转染细胞中, 各组荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ($F=0.73, P=0.59$) (表 4)

2.6 各组 HCEC miR-497 表达量及增生活性比较

各组细胞 miR-497 表达量和增生 A 值总体比较差异均有统计学意义 ($F=29.87, 35.38$, 均 $P<0.01$), 其中 miR-497 mimics 组 miR-497 相对表达量明显高于高糖组和 mimics 阴性对照组, miR-497 inhibitor 组 miR-497 相对表达量明显低于高糖组和 inhibitor 阴性对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 5)。与正常对照组相比, 高糖组细胞增生 A 值明显降低, 差

异有统计学意义 ($P<0.05$); 与高糖组比较, miR-497 inhibitor 组细胞增生 A 值明显升高, miR-497 mimics 组细胞增生 A 值明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 6)。

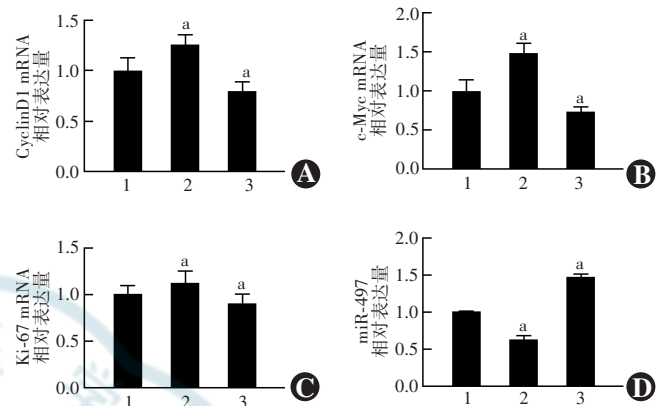


图 3 各模型组小鼠造模 36 h 后角膜组织 CyclinD1、c-Myc、Ki-67 mRNA 以及 miR-497 相对表达量比较 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) A: 各组 CyclinD1 mRNA 相对表达量比较 $F=22.53, P<0.01$ B: 各组 c-Myc mRNA 相对表达量比较 $F=19.62, P<0.01$ C: 各组 Ki-67 mRNA 相对表达量比较 $F=25.62, P<0.01$ D: 各组 miR-497 相对表达量比较 $F=19.62, P<0.01$ 与模型对照组比较, ^a $P<0.05$ 1: 模型对照组; 2: miR-497 敲除组; 3: miR-497 过表达组
Figure 3 Comparison of CyclinD1, c-Myc, Ki-67 mRNA and miR-497 relative expressions in mice corneal tissue among three model groups at 36 hours after modeling (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) A: Comparison of CyclinD1 mRNA $F=22.53, P<0.01$ B: Comparison of c-Myc mRNA $F=19.62, P<0.01$ C: Comparison of Ki-67 mRNA $F=25.62, P<0.01$ D: Comparison of miR-497 $F=19.62, P<0.01$ 1: model control group; 2: miR-497 knockout group; 3: miR-497 overexpression group

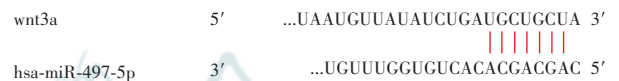


图 4 Wnt3a 与 miR-497 存在互补的核苷酸序列 miR:微小 RNA
Figure 4 Complementary nucleotide sequences between wnt3a and miR-497 miR: microRNA

表 4 各组荧光素酶活性比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 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活性	
		WT wnt3a	MUT wnt3a
miR-497-5p mimics 组	3	0.62±0.11 ^{ab}	1.06±0.11
miR-497-5p 阴性对照组	3	1.32±0.11	1.53±0.16
空载体组	3	0.76±0.03	0.83±0.14
F 值		18.98	0.73
P 值		<0.01	0.59

注:与空载体组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA; WT:野生型; MUT:突变型

Note: Compared with empty vector group, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR: micro RNA; WT: wild type; MUT: mutant type

表 5 各组细胞 miR-497 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of miR-497 relative expression among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-497 相对表达量
正常对照组	4	1.00±0.11
高糖组	4	1.17±0.03 ^a
miR-497 mimics 组	4	1.47±0.06 ^{bc}
miR-497 inhibitor 组	4	0.58±0.06 ^{bd}
mimics 阴性对照组	4	1.11±0.22
inhibitor 阴性对照组	4	1.20±0.15
F 值		29.87
P 值		<0.01

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与 mimics 阴性对照组比较,^c $P<0.05$;与 inhibitor 阴性对照组比较,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA

Note:Compared with normal control group,^a $P<0.05$;compared with high glucose group,^b $P<0.05$;compared with mimics negative control group,^c $P<0.05$;compared with inhibitor negative control group,^d $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) miR:micro RNA

表 6 各组细胞增生 A 值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Comparison of relative A values among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	增生 A 值
正常对照组	6	0.94±0.12
高糖组	6	0.62±0.23 ^a
miR-497 mimics 组	6	0.42±0.21 ^{bc}
miR-497 inhibitor 组	6	0.81±0.05 ^{bd}
mimics 阴性对照组	6	0.59±0.24
inhibitor 阴性对照组	6	0.58±0.36
F 值		35.38
P 值		<0.01

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与 mimics 阴性对照组比较,^c $P<0.05$;与 inhibitor 阴性对照组比较,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) A:吸光度

Note:Compared with normal control group,^a $P<0.05$;compared with high glucose group,^b $P<0.05$;compared with mimics negative control group,^c $P<0.05$;compared with inhibitor negative control group,^d $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) A:absorbance

3 讨论

目前有 46%~64% 的糖尿病患者罹患 DK^[8]。随着糖尿病患病率的攀升,DK 逐渐受到眼科医生的重视。目前针对 DK 的传统治疗主要包括人工泪液、促进角膜修复的自体血清、绷带镜配戴等;病情严重的患者多考虑羊膜覆盖、眼睑缝合等手术疗法,但治疗时间长且预后较差。随着现代医学的不断进步,包括基因靶向治疗在内的新型生物疗法有望为 DK 患者提供更加高效且稳定的治疗手段。

miR-497 已被证明参与多种肿瘤的发生,并参与包括心肌梗塞、脑梗死、消化道炎症反应在内的多种疾

病的发生和发展^[9-15]。Tang 等^[13]研究发现,转染了 miR-497 抑制剂的骨髓间充质干细胞可促进大鼠心肌损伤修复,且修复过程伴有 wnt3a、 β -catenin 等 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达水平的升高。

Wnt/ β -catenin 信号通路被证实在糖尿病以及眼部疾病中发挥作用^[16-23]。Ouyang 等^[19]证明了 Wnt 通路参与角膜缘干细胞分化,促进角膜修复。本实验成功构建糖尿病小鼠模型,发现模型对照组小鼠角膜上皮愈合明显较空白对照组延迟,与 DK 的临床症状相符;Western blot 检测结果显示,模型对照组小鼠角膜中 wnt3a、 β -catenin Wnt 通路相关蛋白较空白对照组表达明显下调;且荧光定量 PCR 结果提示,模型对照组小鼠角膜中 miR-497 表达较空白对照组明显上调。基于以上结果推测 miR-497 和 Wnt 通路参与调控糖尿病角膜上皮损伤修复。

为了进一步验证 miR-497 与 Wnt 通路的调控关系,本研究采用转基因小鼠,发现 miR-497 敲除组小鼠角膜上皮愈合速度优于模型对照组和 miR-497 过表达组,角膜组织中 wnt3a、 β -catenin 蛋白相对表达量也明显高于模型对照组和 miR-497 过表达组,而 miR-497 过表达组各蛋白相对表达量明显低于模型对照组,提示 miR-497 的下调可促进 wnt3a、 β -catenin 的表达,激活 Wnt 通路。同时,荧光定量 PCR 结果显示 miR-497 敲除组小鼠角膜组织中细胞增生相关基因 *CyclinD1*、*c-Myc*、*Ki-67* mRNA 相对表达量均高于模型对照组,而 miR-497 过表达组各基因相对表达量均低于模型对照组,进一步提示 miR-497 可能通过调控 Wnt3a/ β -catenin 通路影响细胞增生能力进而调控糖尿病小鼠角膜上皮损伤修复。采用体外 HCEC 转染模型进一步验证,发现抑制 miR-497 表达可有效增加高糖培养 HCEC 的增生活力。本研究还通过双荧光素酶基因报告实验证明 wnt3a 为 miR-497 的靶基因之一。

综上所述,随着屈光、白内障等手术的日益普及以及糖尿病患者数量的与日俱增,以糖尿病角膜上皮损伤修复延迟为代表的 DK 患者亟需眼科医生的密切关注。本研究发现沉默 miR-497 可明显促进糖尿病小鼠角膜上皮损伤修复,且通过靶向 wnt3a 激活 Wnt/ β -catenin 通路而上调细胞增生相关基因的表达,可加速上皮缺损愈合。miR-497 抑制剂或将成为糖尿病角膜上皮损伤修复延迟患者极具潜力的治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 黄钰清:参与选题设计、收集数据、分析和解释数据、论文撰写及修改;杨燕宁:参与资料的分析和解释、对文章知识性内容作批评性审阅;王杨、潘玉苗、程思敏:参与实验设计、论文修改

参考文献

- [1] Lemieux I. Reversing type 2 diabetes; the time for lifestyle medicine has come! [J/OL]. *Nutrients*, 2020, 12 (7) : 1974 [2022-04-16]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32635141>. DOI: 10.3390/nu12071974.
- [2] Ljubimov AV. Diabetic complications in the cornea [J]. *Vision Res*, 2017, 139: 138-152. DOI: 10.1016/j.visres.2017.03.002.
- [3] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay [J]. *Science*, 2012, 336 (6078) : 237-240. DOI: 10.1126/science.1215691.
- [4] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141 (4) : 1202-1207. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- [5] Luo G, He K, Xia Z, et al. Regulation of microRNA-497 expression in human cancer [J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 21 (1) : 23 [2022-04-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33240429>. DOI: 10.3892/ol.2020.12284.
- [6] Shi Y, Shu B, Yang R, et al. Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6 (1) : 120 [2022-04-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076648>. DOI: 10.1186/s13287-015-0103-4.
- [7] Yang S, Zhang Y, Zhang Z, et al. Insulin promotes corneal nerve repair and wound healing in type 1 diabetic mice by enhancing Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (11) : 2237-2250. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.08.006.
- [8] Misra SL, Braatvedt GD, Patel DV. Impact of diabetes mellitus on the ocular surface: a review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44 (4) : 278-288. DOI: 10.1111/ceo.12690.
- [9] 王杨, 杨燕宁, 潘玉苗, 等. MiR-497 对角膜新生血管的抑制作用及其靶向 STAT3 调控机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2023, 41 (3) : 206-216. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210201-00084. Wang Y, Yang YN, Pan YM, et al. Inhibitory effect of miR-497 on corneal neovascularization and its regulation mechanism targeting STAT3 [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2023, 41 (3) : 206-216. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210201-00084.
- [10] Yu Q, Xiu Z, Jian Y, et al. microRNA-497 prevents pancreatic cancer stem cell gemcitabine resistance, migration, and invasion by directly targeting nuclear factor kappa B 1 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14 (14) : 5908-5924. DOI: 10.18632/aging.204193.
- [11] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101 (1) : 25-33. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80620-0.
- [12] Zhang Y, Zhang Z, Li Z, et al. MicroRNA-497 inhibits the proliferation, migration and invasion of human bladder transitional cell carcinoma cells by targeting E2F3 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36 (3) : 1293-1300. DOI: 10.3892/or.2016.4923.
- [13] Tang Y, Zhong Z, Wang X, et al. microRNA-497 inhibition mitigates myocardial infarction via enhancing wingless/integrated signal pathway in bone marrow mesenchymal stem cells [J/OL]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (8) : 13403-13412 [2022-04-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30927382>. DOI: 10.1002/jcb.28615.
- [14] Zhang M, Yang D, Yu H, et al. MicroRNA-497 inhibits inflammation in DSS-induced IBD model mice and lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells via Wnt/ β -catenin pathway [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101 (PtB) : 108318 [2022-04-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34775365>. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108318.
- [15] Fujimura N. WNT/ β -catenin signaling in vertebrate eye development [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 138 [2022-04-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27965955>. DOI: 10.3389/fcell.2016.00138.
- [16] Guo X, Day TF, Jiang X, et al. Wnt/ β -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation [J]. *Genes Dev*, 2004, 18 (19) : 2404-2417. DOI: 10.1101/gad.1230704.
- [17] de longh RU, Abud HE, Hime GR. WNT/Frizzled signaling in eye development and disease [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 2442-2464. DOI: 10.2741/1982.
- [18] Holly ME, El-Hodiri HM. FoxO3 regulation of retinal progenitor cells in vertebrate eye development [J]. *Dev Biol*, 2008, 319 (2) : 496-496. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.05.103.
- [19] Ouyang H, Xue Y, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis [J]. *Nature*, 2014, 511 (7509) : 358-361. DOI: 10.1038/nature13465.
- [20] Bisevac J, Katta K, Petrovski G, et al. Wnt/ β -Catenin signaling activation induces differentiation in human limbal epithelial stem cells cultured ex vivo [J/OL]. *Biomedicines*, 2023, 11 (7) : 1829 [2023-08-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37509479>. DOI: 10.3390/biomedicines11071829.
- [21] Hu Z, Wang J, Pan T, et al. The exosome-transmitted lncRNA LOC100132249 induces endothelial dysfunction in diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2023; db220435 [2023-08-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37347724>. DOI: 10.2337/db22-0435.
- [22] Kim JM, Min KW, Kim YJ, et al. Wnt/ β -Catenin signaling pathway is necessary for the specification but not the maintenance of the mouse retinal pigment epithelium [J]. *Mol Cells*, 2023, 46 (7) : 441-450. DOI: 10.14348/molcells.2023.0029.
- [23] Liu L, Yang X, Zhang J, et al. Long non-coding RNA SNHG11 regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway through rho/ROCK in trabecular meshwork cells [J/OL]. *FASEB J*, 2023, 37 (4) : e22873 [2023-08-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36929360>. DOI: 10.1096/fj.202201733RRR.

(收稿日期:2023-01-21 修回日期:2023-08-15)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。(4)对论文的诚信负责。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)