

· 实验研究 ·

miR-655-3p 靶向 FOXC1 和 CXCR4 对缺氧诱导人脐静脉内皮细胞血管生成的作用

杨凌齐 李鉴峰 杨红霞 王雪 吕洋

中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院眼科中心 甘肃省中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000

通信作者: 吕洋, Email: 15117203811@163.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-655-3p(miR-655-3p)在缺氧条件下靶向叉头框蛋白 C1(FOXC1)和趋化因子受体 4(CXCR4)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的影响及作用机制。方法 取处于对数生长期的 HUVECs,设置常氧对照组和缺氧 6、12、24、48 h 组,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测各组 miR-655-3p 及 FOXC1 和 CXCR4 mRNA 表达,采用 Western blot 检测 FOXC1 和 CXCR4 蛋白表达。另取处于对数生长期的 HUVECs,将其分为缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组,其中缺氧 24 h 对照组仅做缺氧处理,其他各组在缺氧处理基础上转染相应慢病毒。采用 RT-qPCR 检测 miR-655-3p 表达,采用 Western blot 检测 FOXC1 和 CXCR4 蛋白表达,采用流式细胞术、EdU 细胞增殖、Transwell 及 Matrigel 成管实验分别检测细胞凋亡、增殖、迁移和成管能力。采用双荧光素酶报告实验检测 miR-655-3p 和 FOXC1/CXCR4 之间的靶向关系。结果 缺氧 24 h 组 miR-655-3p 表达量最低,CXCR4 mRNA 相对表达量最高,缺氧 12 h 组 FOXC1 mRNA 相对表达量最高;缺氧 24 h 组 FOXC1 蛋白相对表达量最高,缺氧 48 h 组 CXCR4 蛋白相对表达量最高。miR-655-3p 拟似物组 miR-655-3p 相对表达量明显高于缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组和 miR-655-3p 抑制剂组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量和细胞增殖率、迁移细胞数、管腔数明显高于 miR-655-3p 拟似物组,明显低于 miR-655-3p 抑制剂组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组细胞凋亡率分别为 $(20.44 \pm 1.07)\%$ 、 $(23.54 \pm 1.98)\%$ 、 $(32.91 \pm 1.33)\%$ 、 $(19.86 \pm 0.51)\%$ 、 $(11.25 \pm 0.46)\%$,总体比较差异有统计学意义($F = 124.80, P < 0.001$),其中 miR-655-3p 拟似物组细胞凋亡率高于 miR-655-3p 拟似物对照组,miR-655-3p 抑制剂组细胞凋亡率低于 miR-655-3p 抑制剂对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。生物信息学软件预测显示,FOXC1 和 CXCR4 的 3'非编码区存在 miR-655-3p 连续结合位点靶向序列 5'-UGUAUUA-3'。miR-655-3p 拟似物组野生型 FOXC1 和野生型 CXCR4 荧光素酶活性明显低于 miR-655-3p 拟似物对照组,差异均有统计学意义($t = 5.37, 4.05$, 均 $P < 0.05$)。结论 过表达 miR-655-3p 可能通过负调控 FOXC1/CXCR4 促进细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移及管腔形式。

【关键词】 脉络膜新生血管; 微小 RNA-655-3p; 人脐静脉内皮细胞; 叉头框蛋白 C1; 趋化因子受体 4

基金项目: 国家自然科学基金(82000926); 甘肃省卫生健康行业科研项目(GSWSKY2022-05); 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基金资助项目(2021YXKY033, 2023YXKY033); 甘肃省中医药大学导师专项(2023YXKY011); 军队课题(24BJZ41)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240715-00194

Effect of miR-655-3p targeting FOXC1 and CXCR4 on angiogenesis in hypoxic human umbilical vein endothelial cells

Yang Lingqi, Li Jianfeng, Yang Hongxia, Wang Xue, Lyu Yang

Ophthalmology Center of the 940th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, The First Clinical Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Lyu Yang, Email: 15117203811@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of microRNA-655-3p (miR-655-3p) targeting



中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究

forkhead box protein C1 (FOXC1) and chemokine receptor 4 (CXCR4) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs in the logarithmic growth phase were divided into the normoxia control group and hypoxia groups treated for 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. The expression of miR-655-3p, FOXC1 and CXCR4 mRNA was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the expression of FOXC1 and CXCR4 proteins was determined by Western blot. In addition, HUVECs in logarithmic phase were assigned into five groups: 24-hour hypoxia control group, miR-655-3p mimics control group, miR-655-3p mimics group, miR-655-3p inhibitor control group, and miR-655-3p inhibitor group. Among them, the 24-hour hypoxia control group was only treated with hypoxia, and the other groups were transfected with corresponding lentiviruses on the basis of hypoxia treatment. The expression of miR-655-3p was detected by RT-qPCR. The expression of FOXC1 and CXCR4 proteins was measured by Western blot. Cell apoptosis, proliferation, migration and tube formation ability were evaluated by flow cytometry, EdU cell proliferation assay, Transwell assay and Matrigel tube formation assay, respectively. A dual-luciferase reporter assay was adopted to verify the targeting relationship between miR-655-3p and FOXC1/CXCR4. **Results** The expression of miR-655-3p was the lowest and the relative expression of CXCR4 mRNA was the highest in the 24-hour hypoxia group. The relative expression of FOXC1 mRNA was the highest in the 12-hour hypoxia group. The relative expression of FOXC1 protein was the highest in the 24-hour hypoxia group, and the relative expression of CXCR4 protein was the highest in the 48-hour hypoxia group. The relative expression of miR-655-3p in the miR-655-3p mimics group was significantly higher than that in the 24-hour hypoxia control group, miR-655-3p mimics control group, miR-655-3p inhibitor control group and miR-655-3p inhibitor group, showing statistically significant differences (all $P < 0.001$). The relative expression of FOXC1 and CXCR4 proteins, cell proliferation rate, the number of migrating cells, and the number of tubes formed in the miR-655-3p mimics group were significantly lower than those in the 24-hour hypoxia control group, miR-655-3p mimics control group, and miR-655-3p inhibitor control group, and were significantly lower than those in the miR-655-3p inhibitor group (all $P < 0.05$). The cell apoptosis rates in the 24-hour hypoxia control group, miR-655-3p mimics control group, miR-655-3p mimics group, miR-655-3p inhibitor control group, and miR-655-3p inhibitor group were $(20.44 \pm 1.07)\%$, $(23.54 \pm 1.98)\%$, $(32.91 \pm 1.33)\%$, $(19.86 \pm 0.51)\%$ and $(11.25 \pm 0.46)\%$, respectively, with a significant overall difference ($F = 124.80$, $P < 0.001$). The cell apoptosis rate in the miR-655-3p mimics group was higher than that in the miR-655-3p mimics control group, and the apoptosis rate in the miR-655-3p inhibitor group was lower than that in the miR-655-3p inhibitor control group, showing statistically significant differences (both $P < 0.05$). Bioinformatics software predicted that the miR-655-3p continuous binding site targeting sequence 5'-UGUAUUA-3' in the 3'untranslated region of FOXC1 and CXCR4. The luciferase activities of wild-type FOXC1 and wild-type CXCR4 in the miR-655-3p mimics group were significantly lower than those in the miR-655-3p mimics control group ($t = 5.37, 4.05$; both $P < 0.05$). **Conclusions** Overexpression of miR-655-3p may enhance cell apoptosis and inhibit cell proliferation, migration and tube formation by negatively regulating FOXC1/CXCR4.

[Key words] Choroidal neovascularization; MicroRNA-655-3p; Human umbilical vein endothelial cells; Forkhead box protein C1; Chemokine receptor 4

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82000926); Gansu Province Health Commission Fund Project (GSWSKY2022-05); Scientific Foundation Program of the 940th Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army (2021YXKY033, 2023YXKY033); Tutor Foundation Project of Gansu University of Chinese Medicine (2023YXKY011); Military project (24BJZ41)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240715-00194

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是多种眼底血管性疾病的共有体征, 其发病机制极其复杂, 涉及多种细胞、细胞因子及信号通路等^[1-3]。研究证实, CNV 的形成包括血管生成和血管发生 2 种机制^[4], 而目前 CNV 的治疗局限于靶向血管生成的抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 疗法, 无法从根本上预防及解决血管发生相关问题。已有研究表明, 微小 RNA

(microRNA, miRNA) 参与基因转录后的调控活动, 对眼部新生血管的发生和发展具有重要影响^[5-7]。miR-655-3p 作为 miRNA 家族成员之一, 在癌症中已有相关研究^[8-10]。Qiao 等^[11]证明 miR-655-3p 通过靶向趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 抑制甲状腺乳头状癌的生长、侵袭和巨噬细胞 M2 极化。Wu 等^[12]发现, miR-655-3p 在肝癌组织和肝癌细胞系中表达显著下调, 过表达和敲低 miR-655-3p 分别减少和增

加肝癌细胞增殖、迁移和侵袭。然而, miR-655-3p 在眼部研究甚少, 仅有研究表明, 长链非编码 RNA MALAT1 能抑制 miR-655-3p 的表达, 并通过调节 miR-655-3p-ATAD2 轴促进视网膜母细胞瘤进展^[13]。本课题组前期研究表明, CXCR4 能促进 CNV 发生^[4,14]。同时发现, 叉头框蛋白 C1 (forkhead box protein C1, FOXC1) 是一种转录调节因子, 在胚胎、眼和心脏发育的调控中起着重要作用, 能通过调节血管生长来保持角膜透明度^[15]。不仅如此, FOXC1 通过转录激活 CXCR4 促进造血干细胞和血管内皮祖细胞迁移和分化, 还能促进三阴乳腺癌的转移^[16-17]。因此, 本研究拟建立人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 缺氧模型, 模拟体外 CNV 局部缺氧微环境, 从而探讨 miR-655-3p 靶向 FOXC1/CXCR4 对细胞的影响以及可能的作用机制, 旨在阐明 CNV 的发病机制, 为临床治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HUVECs 细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 结晶紫染色液(上海碧云天生物技术有限公司); Matrigel 基质胶(厦门模基生物技术有限公司); 4% 多聚甲醛、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒; miR-655-3p 拟似物及其对照、miR-655-3p 抑制剂及其对照(上海吉玛制药技术有限公司); EdU 细胞增殖成像分析试剂盒 (AC11L251, 上海李记生物科技有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (GM-040502A, 美国 Genmeditech 公司); 兔抗小鼠 FOXC1 抗体 (ab227977)、兔抗小鼠 CXCR4 抗体 (ab181020) (美国 Abcam 公司); 兔抗小鼠 β -actin 抗体 (AT0009, 北京和一生物科技有限公司); HRP 标记山羊抗兔二抗 (Aff-S0001, 江苏亲科生物研究中心有限公司)。CO₂ 培养箱、三气培养箱(美国 Thermo 公司); 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 系统 (ABI7500, 美国 ABI 公司); 流式细胞仪 (FALS Calibar, 美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与培养 从液氮中取出 HUVECs, 37 °C 水浴解冻并培养于含 10% 胎牛血清的 G-DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁密度达到 80% ~ 90% 时于倒置显微镜下观察

HUVECs 细胞形态, 拍照并进行后续传代。

1.2.2 细胞建模、转染及分组

1.2.2.1 细胞缺氧模型建立及分组 取对数生长期 HUVECs, 设置常氧对照组与缺氧组。常氧对照组细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 缺氧组细胞置于 CO₂ 培养箱培养 24 h, 随后置于 37 °C 三气培养箱 (3% O₂、5% CO₂、92% N₂) 分别培养 6、12、24 及 48 h。实验独立重复 3 次。

1.2.2.2 慢病毒 miR-655-3p 转染细胞及分组 取对数生长期 HUVECs, 调整细胞密度为 2×10^3 个/孔, 接种于 96 孔板 (100 μ l/孔), 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 16~24 h, 至细胞汇合度为 20% ~ 30%, 将其分为缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组, 其中缺氧 24 h 对照组细胞仅进行缺氧 24 h 处理, 其余 4 个组按试剂说明书分别加入对应的病毒、培养基及感染增强液, 总体积为 100 μ l/孔, 其中病毒体积 = 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) \times 细胞数量/病毒滴度, 选择 4 个 MOI 值加入对应的病毒体积; 转染 12 h 后用完全培养基进行换液, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后置于三气培养箱培养 24 h。随后继续置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 待细胞恢复状态后, 于荧光显微镜下观察各组细胞形态, 选择慢病毒感染效率为 80% 左右且细胞生长良好的 MOI 值作为后续感染条件。每个分组设置 3 个复孔, 实验独立重复 3 次。

1.2.2.3 嘌呤霉素工作浓度及稳定株筛选 取对数生长期 HUVECs, 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml, 接种于 24 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 至细胞汇合度为 70% 左右, 加入不同终浓度的嘌呤霉素 (设置 0、0.5、1、2、4、8 μ g/ml 浓度梯度), 继续培养 48 h, 于显微镜下观察, 将全部细胞杀死的嘌呤霉素的最低浓度作为工作液浓度。将细胞分为对照+嘌呤霉素组、miR-655-3p 拟似物对照+嘌呤霉素组、miR-655-3p 拟似物+嘌呤霉素组、miR-655-3p 抑制剂对照+嘌呤霉素组、miR-655-3p 抑制剂+嘌呤霉素组, 待细胞汇合度为 70% 左右, 根据分组转染相应慢病毒 48~72 h, 对照+嘌呤霉素组细胞全部死亡, 而慢病毒感染的 4 个组剩余细胞则为阳性细胞; 随后, 将嘌呤霉素浓度减至维持浓度 (筛选浓度的 1/2~1/4), 继续对感染后的细胞进行筛选和扩增, 同时收集 4 个组细胞进行后续 RT-qPCR 或 Western blot 鉴定, 并将鉴定结果正常的细胞传代、冻存。实验独立重复 3 次。

1.2.3 RT-qPCR 检测细胞中 miR-655-3p 和 FOXC1、

CXCR4 mRNA 相对表达量 收集各组细胞,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并反转录为模板 cDNA,进行 RT-qPCR。反应体系 20 μ l; SYBR Green Mix 10 μ l、模板 cDNA 2 μ l、上游引物 0.4 μ l、下游引物 0.4 μ l、ROX Reference Dye (4 μ m) 0.4 μ l 和无酶水 6.8 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 30 s,40 个循环。引物序列:miR-655-3p 正向引物 5'-CGCGCGATAATACATGGTTAAC-3',反向引物 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3';U6 正向引物 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGG-3',反向引物 5'-AATATGGAACGCTTCACGAATTTGC-3';FOXC1 正向引物 5'-CACAGAGGATCGGCTTGAACAAC-3',反向引物 5'-GAGACTGGCTGGAAGGGAAGG-3';CXCR4 正向引物 5'-TGCCCACCATCTACTCCATCATC-3',反向引物 5'-GTACTTGTCCGTCATGCTTCTCAG-3'; β -actin 正向引物 5'-GTGGATCAGCAAGCAGGACTATG-3',反向引物 5'-AGAAAGGGTGTAAACGCAACTAAGTC-3'。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。以 β -actin 和 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算 FOXC1、CXCR4 mRNA 和 miR-655-3p 表达量。每个样本设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测细胞 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量 收集各组细胞,采用 RIPA 细胞蛋白裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。同质量蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳、转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;分别加入 FOXC1、CXCR4 蛋白一抗(稀释比例均为 1:1 000)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日室温下二抗(稀释比例为 1:5 000)避光孵育 1.5 h。配置 ECL 显影液,凝胶成像分析系统成像,采用 ImageJ 图像处理软件分析各条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算目的蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 收集各组细胞,胰蛋白酶消化后调整细胞数量至 1×10^5 个/ml,接种于 6 孔板,培养 24 h 后胰蛋白酶消化,300 \times g、离心 5 min,弃上清,加入 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞,各加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 PI 溶液,室温避光染色 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数 \times 100%。实验独立重复 3 次。

1.2.6 EdU 细胞增殖成像分析细胞增殖率 收集各组细胞,胰蛋白酶消化后调整细胞数量至 5×10^5 个/ml,接种于 24 孔板,待细胞贴壁后加入已配制好的 EdU 工作液,培养箱孵育 2 h,弃培养基,依次经 4% 多聚甲

醛固定、甘氨酸中和、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤及 Triton X-100 通透后行 EdU 染色,避光孵育 30 min,经 PBS 洗涤、Triton X-100 通透及 PBS 洗涤后加入 Hoechst 染色液,室温避光孵育 20 min, PBS 洗涤后荧光显微镜拍照观察。采用 ImageJ 图像处理软件分析细胞增殖率。实验独立重复 3 次。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞迁移能力 收集各组细胞,胰蛋白酶消化后用无血清培养基调整细胞密度为 2.5×10^4 个/ml,Transwell 小室上室中加入 200 μ l 无血清培养基制备的细胞悬液,下室加入 600 μ l 含 20% 胎牛血清的完全培养基;培养 12~24 h 后取出上室,擦去上室内细胞,经 4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色、PBS 冲洗 3 次;倒置显微镜下观察、拍照并计数。采用 ImageJ 图像处理软件统计各组细胞迁移数量。实验独立重复 3 次。

1.2.8 Matrigel 成管实验检测细胞迁移及成管能力 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出已分装好的 Matrigel 胶,在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中融化备用。将枪头和 96 孔板置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱预冷备用;用预冷的枪头抽吸液体 Matrigel 胶,将其铺在 96 孔板中(50 μ l/孔),置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 h 使其凝固。收集各组细胞,胰蛋白酶消化后调整细胞密度为 2×10^3 个/ml,接种于已包被好基质胶的 96 孔板中(50 μ l/孔),继续培养 4~6 h;倒置显微镜下观察、拍照并计数。采用 ImageJ 图像处理软件统计各组细胞管腔形成数量。实验独立重复 3 次。

1.2.9 荧光素酶报告基因检测 miR-655-3p 与靶基因 FOXC1、CXCR4 的关系 采用 TargetScan 生物信息学软件预测 miR-655-3p 与 FOXC1、CXCR4 序列之间的结合位点,将 FOXC1、CXCR4 的 3' 非编码区(untranslated region, UTR)插入双荧光素酶报告基因 psiCHECK2 中,构建野生型(wild type, WT) FOXC1 WT/CXCR4 WT 和突变型(mutant type, MT) FOXC1 MT/CXCR4 MT 重组质粒,分别将 miR-655-3p 拟似物、miR-655-3p 拟似物对照与 FOXC1 WT/CXCR4 WT、FOXC1 MUT/CXCR4 MUT 共转染至 HUVECs,检测萤火虫和海肾荧光素酶活性,测定 WT-FOXC1、WT-CXCR4 和 MT-FOXC1、MT-CXCR4 荧光素酶活性。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Levene 检验进行组间方差齐性检验。2 个组各指标比较采用独立样本 *t* 检验,5 个组各指标

总体比较采用单因素方差分析,事后多重比较,方差齐采用 Tukey 检验,方差不齐采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧模型各组中 miR-655-3p、FOXC1、CXCR4 mRNA 相对表达量比较

RT-qPCR 检测结果显示,常氧对照组、缺氧 6 h 组、缺氧 12 h 组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组 miR-655-3p、FOXC1、CXCR4 mRNA 相对表达量组间总体比较差异均有统计学意义($F = 128.40, 13.54, 15.94$, 均 $P < 0.001$),其中各缺氧组 miR-655-3p 相对表达量明显低于常氧对照组,缺氧 12、24、48 h 组明显低于缺氧 6 h 组,缺氧 48 h 组高于缺氧 12、24 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。缺氧 12 h 组 FOXC1、CXCR4 mRNA 相对表达量明显高于常氧对照组和缺氧 6 h 组,缺氧 24 h 组 FOXC1 mRNA 相对表达量高于常氧对照组,低于缺氧 12 h 组, CXCR4 mRNA 相对表达量高于常氧对照组和缺氧 6 h 组,缺氧 48 h 组 FOXC1 mRNA 相对表达量低于缺氧 12、24 h 组, CXCR4 mRNA 相对表达量高于常氧对照组,低于缺氧 24 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组细胞 miR-655-3p、FOXC1、CXCR4 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of relative expressions of miR-655-3p, FOXC1 and CXCR4 mRNA among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-655-3p [#]	FOXC1 mRNA [#]	CXCR4 mRNA [*]
常氧对照组	3	1.00±0.08	1.02±0.22	1.03±0.30
缺氧 6 h 组	3	0.70±0.08 ^a	1.21±0.13	1.40±0.16
缺氧 12 h 组	3	0.22±0.02 ^{ab}	2.00±0.43 ^{ab}	2.30±0.45 ^{ab}
缺氧 24 h 组	3	0.13±0.01 ^{ab}	1.53±0.27 ^{ac}	3.00±0.41 ^{ab}
缺氧 48 h 组	3	0.41±0.12 ^{abcd}	1.08±0.18 ^{cd}	1.91±0.80 ^{ad}
F 值		128.40	13.54	15.94
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与常氧对照组比较,^a $P < 0.05$;与缺氧 6 h 组比较,^b $P < 0.05$;与缺氧 12 h 组比较,^c $P < 0.05$;与缺氧 24 h 组比较,^d $P < 0.05$ (#:单因素方差分析, Tukey 检验; *:单因素方差分析, Games-Howell 检验) miR:微小 RNA; FOXC1:叉头框蛋白 C1; CXCR4:趋化因子受体 4

Note: Compared with the normoxia control group, ^a $P < 0.05$; compared with the 6-hour hypoxia group, ^b $P < 0.05$; compared with the 12-hour hypoxia group, ^c $P < 0.05$; compared with the 24-hour hypoxia group, ^d $P < 0.05$ (#: One-way ANOVA, Tukey test; *: One-way ANOVA, Games-Howell test) miR: microRNA; FOXC1: forkhead box protein C1; CXCR4: chemokine receptor 4

2.2 缺氧模型各组中 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量比较

Western blot 检测结果显示,常氧对照组、缺氧 6 h 组、缺氧 12 h 组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量组间总体比较差异均有统计学意义($F = 88.22, 245.70$, 均 $P < 0.001$),其中各缺氧组 FOXC1 蛋白相对表达量明显高于常氧对照组,缺氧 24 h 组高于缺氧 6 h 组,缺氧 48 h 组低于缺氧 12、24 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。缺氧 12 h 组 CXCR4 蛋白相对表达量高于常氧对照组和缺氧 6 h 组,缺氧 24 h 组高于常氧对照组和缺氧 6、12 h 组,缺氧 48 h 组高于常氧对照组和缺氧 6、12、24 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 1, 表 2)。

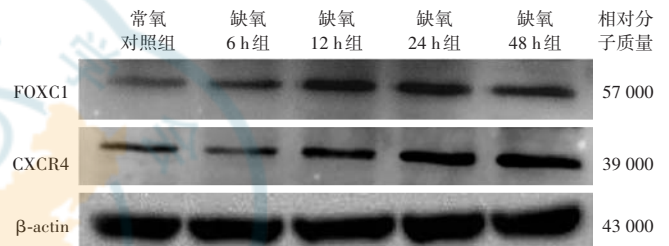


图 1 各组 FOXC1、CXCR4 蛋白表达电泳图 与常氧对照组比较,缺氧 12、24、48 h 组 FOXC1、CXCR4 蛋白条带灰度增强 FOXC1:叉头框蛋白 C1; CXCR4:趋化因子受体 4

Figure 1 Electrophoretogram of FOXC1 and CXCR4 proteins expression in different groups Compared with the normoxia control group, the gray scale of FOXC1 and CXCR4 proteins bands increased in 12-, 24-, and 48-hour hypoxia groups FOXC1: forkhead box protein C1; CXCR4: chemokine receptor 4

表 2 各组细胞 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expressions of FOXC1 and CXCR4 proteins among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	FOXC1	CXCR4
常氧对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
缺氧 6 h 组	3	1.41±0.12 ^a	1.08±0.10
缺氧 12 h 组	3	2.12±0.08 ^a	1.61±0.02 ^{ab}
缺氧 24 h 组	3	2.37±0.11 ^{ab}	2.00±0.03 ^{abc}
缺氧 48 h 组	3	1.75±0.14 ^{abcd}	2.10±0.07 ^{abcd}
F 值		88.22	245.70
P 值		<0.001	<0.001

注:与常氧对照组比较,^a $P < 0.05$;与缺氧 6 h 组比较,^b $P < 0.05$;与缺氧 12 h 组比较,^c $P < 0.05$;与缺氧 24 h 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验) FOXC1:叉头框蛋白 C1; CXCR4:趋化因子受体 4

Note: Compared with the normoxia control group, ^a $P < 0.05$; compared with the 6-hour hypoxia group, ^b $P < 0.05$; compared with the 12-hour hypoxia group, ^c $P < 0.05$; compared with the 24-hour hypoxia group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) FOXC1: forkhead box protein C1; CXCR4: chemokine receptor 4

2.3 慢病毒转染 HUVECs 形态学观察

MOI=50,慢病毒转染 48 h 且经过嘌呤霉素筛选的 HUVECs 绿色荧光蛋白表达丰度较高,感染效率约 80% 且 HUVECs 生长状态良好,用于后续实验(图 2)。

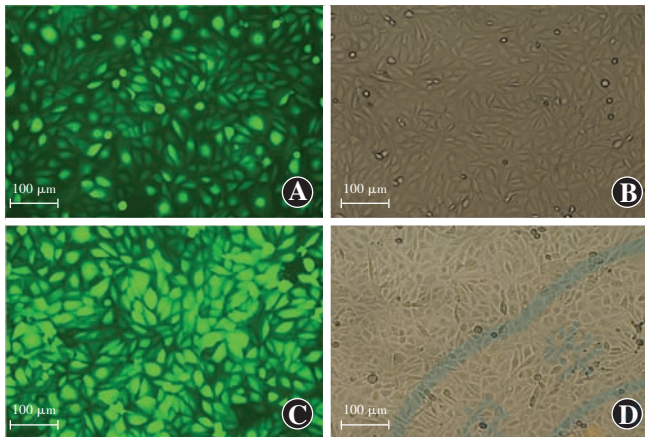


图 2 慢病毒转染 HUVECs 48 h 细胞图(×100,标尺=100 μm) A、B:miR-655-3p 拟似物组荧光照及明场照 C、D:miR-655-3p 抑制剂组荧光照及明场照 HUVECs:人脐静脉内皮细胞;miR:微小 RNA
Figure 2 Images of HUVECs transfected with lentivirus for 48 hours (×100, scale bar=100 μm) A, B: Fluorescent images and bright-field images of miR-655-3p mimics group C, D: Fluorescent images and bright-field images of miR-655-3p inhibitor group HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; miR: microRNA

2.4 慢病毒转染 HUVECs 后各组 miR-655-3p 表达量比较

RT-qPCR 结果显示,缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组 miR-655-3p 相对表达量分别为 1.04±0.36、1.30±0.09、505.80±52.79、1.20±0.08、0.01±0.01,组间总体比较有统计学意义(F=274.40, P<0.001),其中 miR-655-3p 拟似物组 miR-655-3p 相对表达量明显高于其余各组,差异均有统计学意义(均 P<0.001)(图 3)。

2.5 慢病毒转染 HUVECs 后各组 FOXC1、CXCR4 蛋白表达量比较

Western blot 检测结果显示,缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量组间总体比较差异均有统计学意义(F=58.49、31.09,均 P<0.001),其中缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组 FOXC1、CXCR4 蛋白相对表达量明显高于 miR-655-3p 拟似物组,明显低于 miR-655-3p 抑

制剂组,差异均有统计学意义(均 P<0.05)(图 4,表 3)。

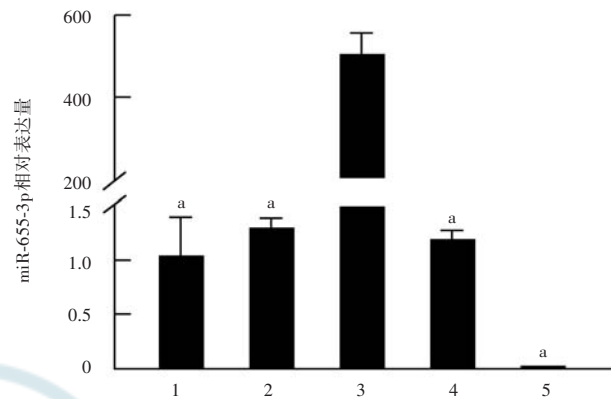


图 3 慢病毒转染 HUVECs 后各组 miR-655-3p 表达量比较 F=274.40, P<0.001. 与 miR-655-3p 拟似物组比较, *P<0.001 (单因素方差分析, Tukey 检验; n=3) 1:缺氧 24 h 对照组; 2:miR-655-3p 拟似物对照组; 3:miR-655-3p 拟似物组; 4:miR-655-3p 抑制剂对照组; 5:miR-655-3p 抑制剂组 HUVECs:人脐静脉内皮细胞; miR:微小 RNA

Figure 3 Comparison of miR-655-3p expression in HUVECs among different groups after lentiviral transfection F=274.40, P<0.001. Compared with the miR-655-3p mimics group, *P<0.001 (One-way ANOVA, Tukey test; n=3) 1: 24-hour hypoxia control group; 2: miR-655-3p mimics control group; 3: miR-655-3p mimics group; 4: miR-655-3p inhibitor control group; 5: miR-655-3p inhibitor group HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; miR: microRNA

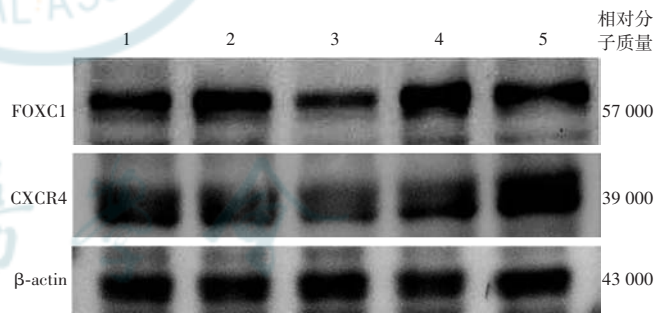


图 4 慢病毒转染后各组 FOXC1、CXCR4 蛋白表达电泳图 miR-655-3p 拟似物组 FOXC1、CXCR4 蛋白条带灰度较其他组明显减弱, miR-655-3p 抑制剂组 FOXC1、CXCR4 蛋白条带灰度较其他组明显增强 1:缺氧 24 h 对照组; 2:miR-655-3p 拟似物对照组; 3:miR-655-3p 拟似物组; 4:miR-655-3p 抑制剂对照组; 5:miR-655-3p 抑制剂组 FOXC1:叉头框蛋白 C1; CXCR4:趋化因子受体 4; miR:微小 RNA

Figure 4 Electrophoretogram of FOXC1 and CXCR4 proteins expression in different groups after lentiviral transfection The gray scale of FOXC1 and CXCR4 proteins bands in the miR-655-3p mimics group was significantly lower than that in other groups, and the gray scale of FOXC1 and CXCR4 proteins bands in the miR-655-3p inhibitor group was significantly higher than that in other groups 1: 24-hour hypoxia control group; 2: miR-655-3p mimics control group; 3: miR-655-3p mimics group; 4: miR-655-3p inhibitor control group; 5: miR-655-3p inhibitor group FOXC1: forkhead box protein C1; CXCR4: chemokine receptor 4; miR: microRNA

表 3 慢病毒转染后各组细胞 FOXC1、CXCR4

蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of FOXC1 and CXCR4 proteins among different groups after lentiviral transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	FOXC1	CXCR4
缺氧 24 h 对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
miR-655-3p 拟似物对照组	3	0.97±0.04	0.92±0.01
miR-655-3p 拟似物组	3	0.62±0.04 ^{abc}	0.56±0.13 ^{abc}
miR-655-3p 抑制剂对照组	3	1.13±0.05	1.14±0.08
miR-655-3p 抑制剂组	3	1.73±0.19 ^{abc}	1.57±0.20 ^{abc}
F 值		58.49	31.09
P 值		<0.001	<0.001

注:与缺氧 24 h 对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 miR-655-3p 拟似物对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与 miR-655-3p 抑制剂对照组比较, ^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验) FOXC1: 叉头框蛋白 C1; CXCR4: 趋化因子受体 4; miR: 微小 RNA

Note: Compared with 24-hour hypoxia control group, ^a $P < 0.01$; compared with miR-655-3p mimics control group, ^b $P < 0.05$; compared with miR-655-3p inhibitor control group, ^c $P < 0.01$ (One-way ANOVA, Tukey test) FOXC1: forkhead box protein C1; CXCR4: chemokine receptor 4; miR: microRNA

2.6 慢病毒转染 HUVECs 后各组细胞凋亡率比较

流式细胞术检测结果显示, 缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组细胞凋亡率分别为 (20.44±1.07)%、(23.54±1.98)%、(32.91±1.33)%、(19.86±0.51)%、(11.25±0.46)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 124.80, P < 0.001$) , 其中与 miR-655-3p 拟似物对照组比较, miR-655-3p 拟似物组细胞凋亡率增高, 与 miR-655-3p 抑制剂对照组比较, miR-655-3p 抑制剂组细胞凋亡率降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

2.7 慢病毒转染 HUVECs 后各组细胞增殖率比较

EdU 细胞增殖试验结果显示, 缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组细胞

增殖率分别为 0.44±0.03、0.38±0.12、0.15±0.02、0.40±0.05、0.69±0.06, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 30.19, P < 0.001$) , 其中缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组细胞增殖率明显高于 miR-655-3p 拟似物组, 明显低于 miR-655-3p 抑制剂组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6、7)。

2.8 慢病毒转染 HUVECs 后各组细胞迁移及管腔形成能力比较

Transwell 迁移实验及 Matrigel 成管实验结果显示, 缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 拟似物组、miR-655-3p 抑制剂对照组、miR-655-3p 抑制剂组迁移细胞数及管腔数组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 15.02, 58.91$, 均 $P < 0.001$) , 其中缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组迁移细胞数及管腔数明显高于 miR-655-3p 拟似物组, 明显低于 miR-655-3p 抑制剂组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 8, 表 4)。

2.9 双荧光素酶报告结果

生物信息学软件预测结果显示, FOXC1 和 CXCR4 的 3'UTR 区存在 miR-655-3p 连续结合位点靶向序列 5'-UGUAUUA-3'。miR-655-3p 拟似物对照组和 miR-655-3p 拟似物组 WT-FOXC1 荧光素酶活性分别为 12.18±2.70、3.69±0.48, MT-FOXC1 荧光素酶活性分别为 5.94±1.34、5.56±1.67, WT-CXCR4 荧光素酶活性分别为 7.87±1.23、3.46±1.43, MT-CXCR4 荧光素酶活性分别为 5.81±1.57、5.57±0.85, miR-655-3p 拟似物组 WT-FOXC1 和 WT-CXCR4 荧光素酶活性明显低于 miR-655-3p 拟似物对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 5.37, 4.05$, 均 $P < 0.05$)。2 个组 MT-FOXC1 和 MT-CXCR4 荧光素酶活性比较差异均无统计学意义 ($t = 0.30, 0.23$, 均 $P > 0.05$) (图 9)。

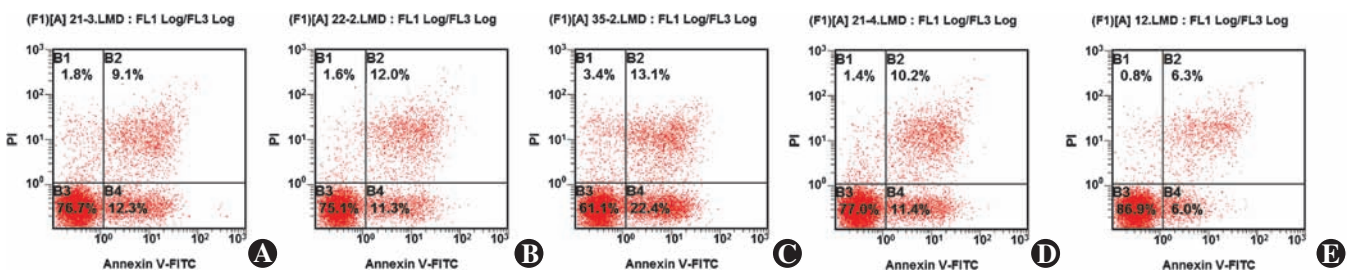


图 5 慢病毒转染后各组流式细胞图 A: 缺氧 24 h 对照组 B: miR-655-3p 拟似物对照组 C: miR-655-3p 拟似物组 D: miR-655-3p 抑制剂对照组 E: miR-655-3p 抑制剂组 PI: 碘化丙啶; FITC: 异硫氰酸荧光素; miR: 微小 RNA

Figure 5 Flow cytometry analysis of cells in different groups after lentiviral transfection A: 24-hour hypoxia control group B: miR-655-3p mimics control group C: miR-655-3p mimics group D: miR-655-3p inhibitor control group E: miR-655-3p inhibitor group PI: propidium iodide; FITC: fluorescein isothiocyanate; miR: microRNA

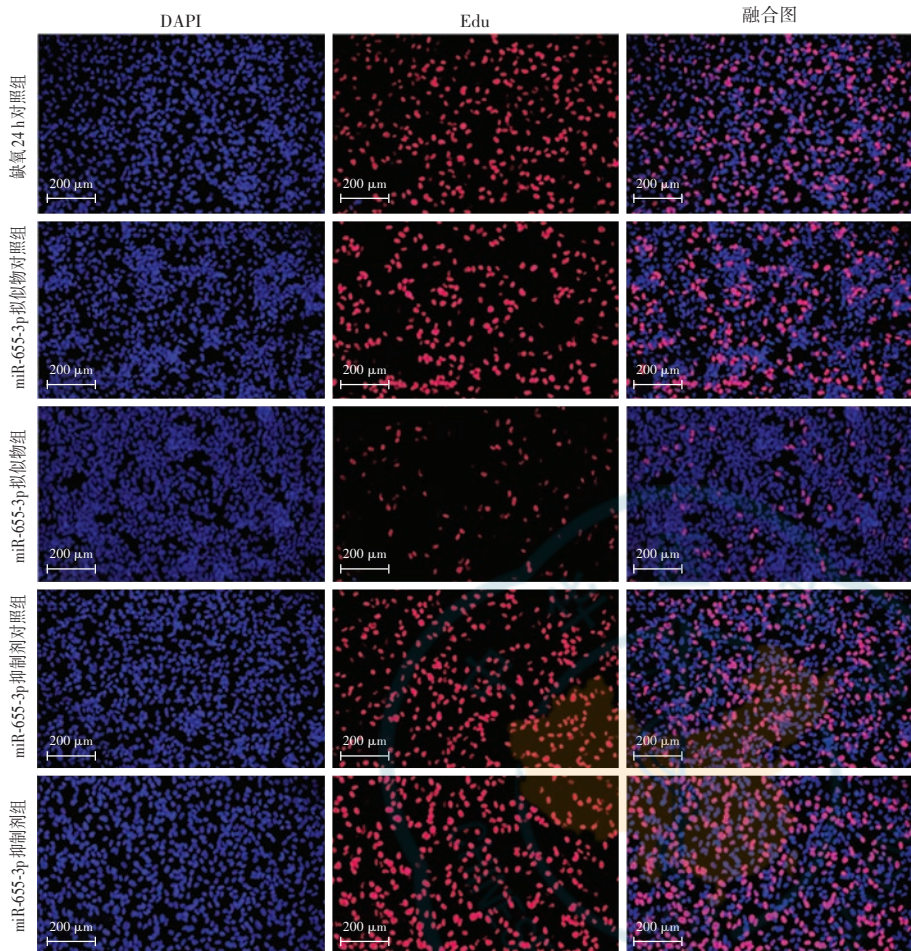


图 6 慢病毒转染后各组 EdU 细胞增殖荧光图 (×40, 标尺 = 200 μm) 细胞核呈蓝色荧光 (含 DAPI), 增殖细胞呈红色荧光 (含 EdU) Edu: 胸腺嘧啶脱氧核苷类似物; miR: 微小 RNA
Figure 6 EdU proliferation fluorescence photograph of cells in different groups after lentiviral transfection (×40, scale bar = 200 μm) The nuclei were blue fluorescence (DAPI), proliferating cells were red fluorescence (EdU) Edu: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; miR: microRNA

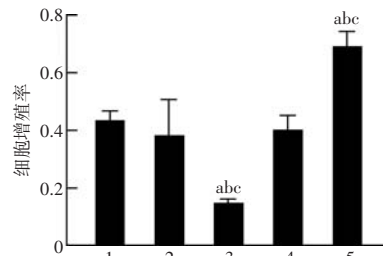


图 7 慢病毒转染 HUVECs 后各组细胞增殖率比较 $F = 30.19, P < 0.001$. 与缺氧 24 h 对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 miR-655-3p 拟似物对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与 miR-655-3p 抑制剂对照组比较, ^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n = 3$)
 1: 缺氧 24 h 对照组; 2: miR-655-3p 拟似物对照组; 3: miR-655-3p 拟似物组; 4: miR-655-3p 抑制剂对照组; 5: miR-655-3p 抑制剂组 HUVECs: 人脐静脉内皮细胞; miR: 微小 RNA

Figure 7 Comparison of HUVECs proliferation rates among different groups after lentiviral transfection $F = 30.19, P < 0.001$. Compared with the 24-hour hypoxia control group, ^a $P < 0.01$; compared with the miR-655-3p mimics control group, ^b $P < 0.05$; compared with the miR-655-3p inhibitor control group, ^c $P < 0.01$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$)
 1: 24-hour hypoxia control group; 2: miR-655-3p mimics control group; 3: miR-655-3p mimics group; 4: miR-655-3p inhibitor control group; 5: miR-655-3p inhibitor group HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; miR: microRNA

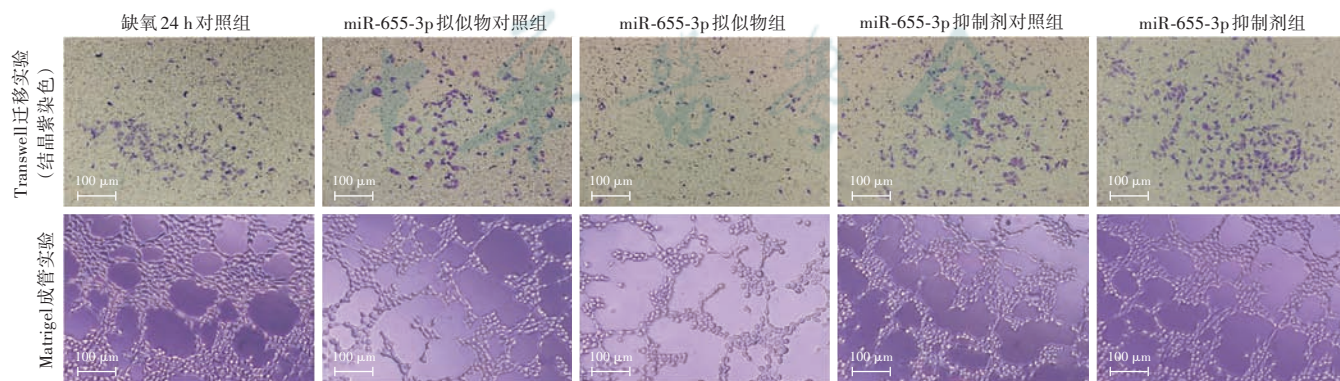


图 8 慢病毒转染后各组细胞迁移图和管腔成型图 (×100, 标尺 = 100 μm) miR: 微小 RNA
Figure 8 Migration and tube formation photographs and of cells in different groups after lentiviral transfection (×100, scale bar = 100 μm) miR: microRNA

3 讨论

血管发生是指骨髓来源的血管内皮祖细胞经动员、归巢至组织损伤或肿瘤发生的位点,再分化或整合入新生血管;血管生成是在已存在的血管床基础上,血

管内皮细胞增殖、迁移并重塑形成新的血管^[18]。HUVECs 具有干细胞潜能,建立缺氧模型模拟体外 CNV 微环境,给予不同干预手段,从而探究其凋亡、增殖、迁移、成管能力的改变是探索血管生成机制的重要途径^[19-20]。陈水龄等^[21]建立化学缺氧 HUVECs 模型

表 4 各组迁移细胞数及管腔数比较
($\bar{x} \pm s$, 个/100 倍视野)

Table 4 Comparison of the number of migrating cells and tube formation among different groups
($\bar{x} \pm s$, cells/100 \times view fields)

组别	样本量	迁移细胞数	管腔数
缺氧 24 h 对照组	3	345.3 \pm 119.1	281.7 \pm 16.80
miR-655-3p 拟似物对照组	3	351.0 \pm 132.2	239.3 \pm 16.07
miR-655-3p 拟似物组	3	86.67 \pm 13.58 ^{abc}	110.7 \pm 4.73 ^{abc}
miR-655-3p 抑制剂对照组	3	380.0 \pm 50.69	301.7 \pm 52.04
miR-655-3p 抑制剂组	3	612.0 \pm 15.00 ^{abc}	568.7 \pm 62.14 ^{abc}
F 值		15.02	58.91
P 值		<0.001	<0.001

注:与缺氧 24 h 对照组比较,^a $P < 0.01$;与 miR-655-3p 拟似物对照组比较,^b $P < 0.001$;与 miR-655-3p 抑制剂对照组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验) miR:微小 RNA

Note: Compared with hypoxia 24-hour control group, ^a $P < 0.01$; compared with miR-655-3p mimics control group, ^b $P < 0.001$; compared with miR-655-3p inhibitor control group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) miR: microRNA

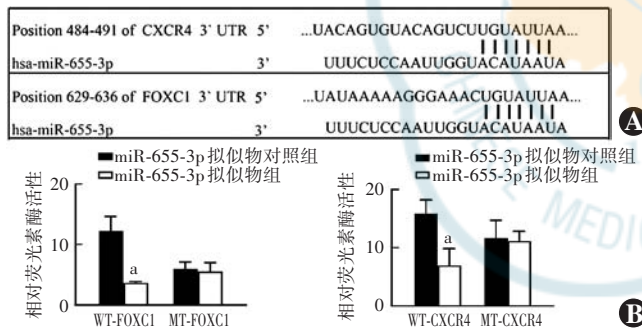


图 9 miR-655-3p 对 FOXC1 和 CXCR4 的靶向调控作用 A: miR-655-3p 与 WT-FOXC1 和 WT-CXCR4 基因靶向结合位点 B: miR-655-3p 拟似物对照组和 miR-655-3p 拟似物组 FOXC1 和 CXCR4 荧光素酶活性比较 与 miR-655-3p 拟似物对照组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) CXCR4: 趋化因子受体 4; FOXC1: 叉头框蛋白 C1; UTR: 非编码区; miR: 微小 RNA; WT: 野生型; MT: 突变型

Figure 9 Targeted regulation of FOXC1/CXCR4 by miR-655-3p A: Targeted binding sites for miR-655-3p to WT-FOXC1 and WT-CXCR4 genes B: Comparison of the luciferase activities of FOXC1 and CXCR4 between the miR-655-3p mimics control group and the miR-655-3p mimics group Compared with the miR-655-3p mimics control group, ^a $P < 0.05$ (Independent samples t -test, $n = 3$) CXCR4: chemokine receptor 4; FOXC1: forkhead box protein C1; UTR: untranslated region; miR: microRNA; WT: wild type; MT: mutant type

模拟 CNV 微环境, 给予不同浓度的姜黄素条件培养液, 发现可显著抑制 HUVECs 细胞迁移、侵袭及细胞管腔形成, 证明姜黄素可在细胞水平抑制血管生成。Zou 等^[19] 同样构建氯化钴 (CoCl₂) 缺氧模型发现, CoCl₂ 可上调原代 HUVECs 间质细胞标志物 (α -SMA、波形蛋白和 Snail) 的表达, 下调内皮细胞标志物

(CD31、闭锁小带蛋白-1) 的表达, 从而增强原代 HUVECs 增殖和迁移能力。本研究构建 HUVECs 缺氧模型, 通过慢病毒转染, 过表达/干涉 HUVECs 中 miR-655-3p 水平, 从而观察其生物学改变。

miR-655-3p 在癌症中已有相关研究, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在缺氧环境中上调促进新生血管形成。Chen 等^[22] 研究表明, 人脐带间充质干细胞来源的细胞外囊泡携带 miR-655-3p, 可通过 LMO4-HDAC2 轴灭活 HIF-1 α , 部分抑制食管癌的进展。以往研究表明 miR-655-3p 有抑制新生血管生成和癌细胞转移的作用^[8,11], 但未见 miR-655-3p 参与调控 CNV 相关研究。本实验结果显示, 缺氧 24 h 组 HUVECs 中 miR-655-3p 表达量较其他缺氧时间组低。因此, 在缺氧 24 h 的 HUVECs 中进行慢病毒转染 miR-655-3p, 探讨过表达及干涉 miR-655-3p 后对 HUVECs 细胞凋亡、增殖、迁移和成管能力的影响, 或许可以探寻到干预新生血管形成的手段。本实验结果表明, 与缺氧 24 h 对照组、miR-655-3p 拟似物对照组、miR-655-3p 抑制剂对照组比较, miR-655-3p 拟似物组细胞凋亡率明显升高, 细胞增殖、迁移、管腔形成能力明显减弱, miR-655-3p 抑制剂组结果与之相反。因此, 本研究结果表明, 过表达 miR-655-3p 可提高 HUVECs 细胞凋亡率并抑制细胞增殖、迁移与管腔形成能力, 提示其可能在新生血管形成过程中发挥抑制作用。

FOXC1 是一种转录因子, 在小鼠神经嵴来源的间充质细胞中与 FOXC2 协同发挥作用, 通过调节 Wnt 信号转导确保眼表的正常形态发生^[23]。在新生血管方面, FOXC1 在缺氧内皮细胞和急性缺血性心肌损伤后迅速上调, 加速管状结构的形成, 增加内皮细胞存活率, 从而诱导血管微环境形成, 同时在缺氧共培养下, 内皮细胞中 FOXC1 的过表达促进间充质干细胞的存活和新生血管形成^[24]。进一步研究表明, FOXC1 突变可导致角膜新生血管形成和广泛的增殖性玻璃体视网膜病变^[25]。本课题组前期已经证实, CXCR4 及其配体基质细胞衍生因子在缺氧视网膜中增加, 其配体主要位于视网膜表面附近的神经胶质细胞中, CXCR4 位于骨髓来源的细胞中, 其表达增加可促进 CNV 的形成^[4,14]。研究发现, 经脂多糖处理的大鼠模型中, CXCR4 CXCR7 mRNA 表达水平以及激光诱导的 CNV 面积明显高于未处理组^[26]。有研究揭示了一种新的 CXCR4 介导机制, 通过靶向 miR-1910-5p/MMRN2 轴, 减少血管渗漏, 并最终抑制小鼠模型中的 CNV 形成^[27]。本实验结果显示, 随缺氧时间延长, FOXC1 和

CXCR4 表达逐渐升高, FOXC1 和 CXCR4 mRNA 分别在缺氧 12、24 h 表达最高, FOXC1 和 CXCR4 蛋白分别在缺氧 24、48 h 表达最高, 因此, 不管是在基因水平还是蛋白水平, 随缺氧时间延长, miR-655-3p 表达明显降低, 而 FOXC1 和 CXCR4 表达明显升高。对 HUVECs 转染慢病毒 miR-655-3p, 结合双荧光素酶报告基因实验验证, FOXC1 和 CXCR4 的 3'UTR 区存在 miR-655-3p 连续结合位点。miR-655-3p 拟似物组 FOXC1 和 CXCR4 蛋白表达最低, miR-655-3p 抑制剂组 FOXC1 和 CXCR4 蛋白表达最高, 提示 miR-655-3p 可负性调控 FOXC1 和 CXCR4。因此, 本实验证实 miR-655-3p 通过负调控 FOXC1 和 CXCR4, 可增加细胞凋亡、减弱细胞增殖、迁移和成管能力, 从而减缓新生血管形成。

综上所述, 本研究表明 miR-655-3p 在缺氧诱导的 HUVECs 中表达降低, 而 FOXC1/CXCR4 表达上调, 过表达 miR-655-3p 可能通过负调控 FOXC1 和 CXCR4 抑制血管内皮细胞增殖、迁移及管腔形成, 从而减少新生血管形成。但本研究仅模拟体外缺氧环境对其进行探讨, 且未进一步探寻具体机制, 本课题组后续会结合体外、体内实验进一步探寻 miR-655-3p 调控 FOXC1 和 CXCR4 的可能机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨凌齐: 实施研究、分析及统计数据、撰写文章; 李鉴峰: 实施研究、图片分析; 杨红霞: 分析及统计数据; 王雪: 修改文章; 吕洋: 设计实验、修改文章及定稿

参考文献

- [1] Sheth JU, Stewart MW, Narayanan R, et al. Macular neovascularization[J]. *Surv Ophthalmol*, 2025, 70(4): 653-675. DOI: 10.1016/j.survophthal.2024.08.003.
- [2] Fu Y, Zhang Z, Webster KA, et al. Treatment strategies for anti-VEGF resistance in neovascular age-related macular degeneration by targeting arteriolar chorioidal neovascularization[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(3): 252. DOI: 10.3390/biom14030252.
- [3] Yusef YN, Kurguzova AG, Budzinskaya MV. Choroidal neovascularization in central serous chorioretinopathy[J]. *Vestn Oftalmol*, 2023, 139(6): 152-157. DOI: 10.17116/oftalma2023139061152.
- [4] Lv Y, Xu WQ, Dong WG, et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ promotes BMCs mobilization and differentiation to exacerbate choroidal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 193: 107991. DOI: 10.1016/j.exer.2020.107991.
- [5] Tsai CF, Wu JY, Hsu YW. Protective effects of rosmarinic acid against selenite-induced cataract and oxidative damage in rats[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(5): 729-740. DOI: 10.7150/ijms.32222.
- [6] Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: miRNA biology and therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(3): 266-277. DOI: 10.2174/1568009617666170630142725.
- [7] Hou H, Gao F, Liang H, et al. MicroRNA-188-5p regulates contribution of bone marrow-derived cells to choroidal neovascularization development by targeting MMP-2/13[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 175: 115-123. DOI: 10.1016/j.exer.2018.06.010.
- [8] Zhang B, Peng Y, Zhou L. Circ-LDLRAD3/miR-655-3p/MAPK1 axis enhances cell migration and invasion in papillary thyroid carcinoma[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2024, 70(2): 150-155. DOI: 10.14715/cmb/2024.70.2.21.
- [9] Zha JF, Chen DX. miR-655-3p inhibited proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RAB1A[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3627-3634. DOI: 10.26355/eurrev_201905_17786.
- [10] Wang W, Cao R, Su W, et al. miR-655-3p inhibits cell migration and invasion by targeting pituitary tumor-transforming 1 in non-small cell lung cancer[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(9): 1703-1708. DOI: 10.1080/09168451.2019.1617109.
- [11] Qiao L, Dong C, Jia W, et al. Exosomal miR-655-3p inhibits growth, and invasion and macrophage M2 polarization through targeting CXCR4 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69(4): 773-779. DOI: 10.18388/abp.2020.6027.
- [12] Wu G, Zheng K, Xia S, et al. MicroRNA-655-3p functions as a tumor suppressor by regulating ADAM10 and β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 89. DOI: 10.1186/s13046-016-0368-1.
- [13] Zhao Y, Wang Z, Gao M, et al. lncRNA MALAT1 regulated ATAD2 to facilitate retinoblastoma progression via miR-655-3p[J]. *Open Med (Wars)*, 2021, 16(1): 931-943. DOI: 10.1515/med-2021-0290.
- [14] Lyu Y, Xu WQ, Sun LJ, et al. Effect of integrin $\alpha 5\beta 1$ inhibition on SDF-1/CXCR4-mediated choroidal neovascularization[J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(5): 726-735. DOI: 10.18240/ijo.2018.05.04.
- [15] Seo S, Singh HP, Lacal PM, et al. Forkhead box transcription factor FoxC1 preserves corneal transparency by regulating vascular growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(6): 2015-2020. DOI: 10.1073/pnas.1109540109.
- [16] Omasu Y, Seike M, Sugiyama T, et al. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation[J]. *Nature*, 2014, 508(7497): 536-540. DOI: 10.1038/nature13071.
- [17] Pan H, Peng Z, Lin J, et al. Forkhead box C1 boosts triple-negative breast cancer metastasis through activating the transcription of chemokine receptor-4[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12): 3794-3804. DOI: 10.1111/cas.13823.
- [18] Schwarzer P, Kokona D, Ebnetter A, et al. Effect of inhibition of colony-stimulating factor 1 receptor on choroidal neovascularization in mice[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(2): 412-425. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.10.011.
- [19] Zou R, Feng YF, Xu YH, et al. Yes-associated protein promotes endothelial-to-mesenchymal transition of endothelial cells in choroidal neovascularization fibrosis[J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(5): 701-710. DOI: 10.18240/ijo.2022.05.03.
- [20] Wang C, Li X, Su J, et al. Crocetin inhibits choroidal neovascularization in both *in vitro* and *in vivo* models[J]. *Exp Eye Res*, 2024, 238: 109751. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109751.
- [21] 陈水龄, 亢泽峰, 褚文丽, 等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制[J]. *国际眼科杂志*, 2022, 22(4): 541-548. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.4.03.
- [22] Chen SL, Kang ZF, Chu WL, et al. Mechanism study of Curcumin on inhibiting experimental choroidal neovascularization *in vitro* by AKT/HIF-1 α /VEGF pathway[J]. *Int Eye Sci*, 2022, 22(4): 541-548. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.4.03.
- [23] Chen M, Xia Z, Deng J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miR-655-3p inhibit the development of esophageal cancer by regulating the expression of HIF-1 α via a LMO4/HDAC2-dependent mechanism[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(4): 1319-1339. DOI: 10.1007/s10565-022-09759-5.
- [24] Seo S, Chen L, Liu W, et al. Foxc1 and Foxc2 in the neural crest are required for ocular anterior segment development[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(3): 1368-1377. DOI: 10.1167/iovs.16-21217.
- [25] Ji Z, Chen S, Cui J, et al. Oct4-dependent FoxC1 activation improves the survival and neovascularization of mesenchymal stem cells under myocardial ischemia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 483. DOI: 10.1186/s13287-021-02553-w.
- [26] Kletke SN, Vincent A, Maynes JT, et al. A de novo mutation in PITX2 underlies a unique form of Axenfeld-Rieger syndrome with corneal neovascularization and extensive proliferative vitreoretinopathy[J]. *Ophthalmic Genet*, 2020, 41(4): 358-362. DOI: 10.1080/13816810.2020.1768556.
- [27] Feng YF, Guo H, Yuan F, et al. Lipopolysaccharide promotes choroidal neovascularization by up-regulation of CXCR4 and CXCR7 expression in choroid endothelial cell[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136175 [2025-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26288180/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0136175.
- [28] Wang X, Cui Z, Chen X, et al. The CXCR4/miR-1910-5p/MMRN2 axis is involved in corneal neovascularization by affecting vascular permeability[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(4): 10. DOI: 10.1167/iovs.64.4.10.

(收稿日期: 2025-09-20 修回日期: 2026-05-15)

(本文编辑: 施晓萌 骆世平)