

microRNAs 与晶状体疾病的相关性研究进展

陈 阳, 丁芝祥

基金项目: 桂林市科学研究与技术开发计划项目(No. 20130120-4)

作者单位: (541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科

作者简介: 陈阳, 毕业于新乡医学院三全学院, 桂林医学院在读硕士研究生, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 丁芝祥, 毕业于中南大学湘雅医学院, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障。Zxding99@163.com

收稿日期: 2013-07-12 修回日期: 2013-09-10

Research advances in the relevance of microRNAs and lens diseases

Yang Chen, Zhi-Xiang Ding

Foundation item: Guilin Scientific Research and Technological Development Projects (No. 20130120-4)

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Zhi-Xiang Ding, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. Zxding99@163.com

Received: 2013-07-12 Accepted: 2013-09-10

Abstract

• microRNAs are a class of endogenous non-protein-coding micromolecule RNAs with 22 nucleotides long, and are widely presented in the eukaryotic cells, which play a critical role in a series of life process, including cell proliferation, apoptosis, differentiation, tumorigenesis and individual metabolism. It has become a focus for gene regulation research in recent years. Most of microRNAs are widely expressed in various ocular tissues in the tissue specificity and time specificity mode, and may be closely involved in ocular tissue growth, development, functional regulation and diseases onset. To study the functions of microRNAs in lens development and pathophysiological process is to provide a new idea for further clarifying the mechanisms of lens diseases, exploring the diagnoses and treatments of the diseases.

• **KEYWORDS:** microRNAs; gene expression; lens diseases

Citation: Chen Y, Ding ZX. Research advances in the relevance of microRNAs and lens diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):2001-2003

摘要

microRNAs 是一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码小

RNA 分子, 广泛存在于真核细胞中, 在细胞增殖、凋亡、分化、肿瘤发生以及机体代谢等一系列生命过程中扮演了重要角色, 是近年来基因调控研究的热点。许多 microRNAs 广泛表达于眼部多种组织, 并具有组织特异性和时序特异性, 可能与眼部组织的生长、发育、功能调节、疾病发生等方面密切相关。研究 microRNAs 在晶状体发育和病理生理过程中的作用为进一步阐明晶状体疾病的发生机制、探索相关疾病的诊断和治疗方法提供了一种新思路。

关键词: microRNAs; 基因表达; 晶状体疾病

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.15

引用: 陈阳, 丁芝祥. microRNAs 与晶状体疾病的相关性研究进展. *国际眼科杂志* 2013;13(10):2001-2003

0 引言

microRNAs(miRNA, 微小 RNA) 是一类 21~25 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA, 通过特异性结合目的 mRNA 3'端非编码区(3'UTR), 在转录后水平和翻译水平调控靶基因表达, 直接或间接调控着 90% 以上人类基因的表达^[1], 比蛋白质水平调节能量更省, 效果更快。目前组织特异性 miRNA 已被用来作为非侵入性的生物标记物诊断肿瘤、心脏疾病、糖尿病等疾病^[2-4]。miRNA 在眼部组织包括角膜、晶状体、视网膜中均有特异性的表达, 说明 miRNA 可能在眼部的生长、发育、功能调节等方面同样发挥着重要作用, 并推测 miRNA 的异常表达与眼部疾病的发生、发展、预后可能也存在着密不可分的关系^[5]。近几年的研究表明, miRNA 依赖转录后调节相关基因而在晶状体再生、晶状体上皮细胞转分化和晶状体相关疾病等病理生理过程中发挥重要调控作用^[6,7]。本文就 miRNA 与晶状体疾病的相关研究进展作一综述。

1 miRNA 的分子生物学

1.1 miRNA 的发现 miRNA 最先是在 1993 年 Lee 等^[8]在秀丽小杆线虫发育过程中观察到的与靶转录的 3'UTR 互补的、长 18~23nt 的 RNA 分子:lin-4;7a 后, Reinhart 等^[9]对线虫研究过程中发现了第二个 miRNA:let-7, 线虫的发育由这些小 RNA 基因所调控。随后从线虫到果蝇以及人的多种组织中均发现 miRNA 的存在。目前已有超过 1000 个 miRNA 在人体内被确定, 并且经生物信息学方法预测大约有 1/3 的人类基因是 miRNA 的靶基因。

1.2 miRNA 生物合成及作用机制 首先, miRNA 被 RNA 聚合酶 II 或 III 转录为一个初始转录物, 它是含有至少一个发夹样结构 miRNA 前体(pre-miRNA)的长 RNA 转录本。经典通路中, pri-miRNA 在细胞核内被核酸酶 Drosha 加工成 pre-miRNA^[10], 此时 pre-miRNA 经 Exportin-5 转运出细胞核至细胞质内^[11]。随后, Dicer 酶将 pre-miRNA 从发夹结构状的 miRNA 前体的茎区域中剪切出来, 并加工成 miRNA:miRNA 双链。最终, 双链中的一条序列装进

miRNA 诱导的沉默复合体,通过碱基互补配对方式识别靶 mRNA,根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻止靶 mRNA 的翻译。miRNA 5'末端大约 6 到 7 个短的核苷酸序列(第 2-8nt)被称为“种子区域”,该区域通过碱基互补配对原则与靶 mRNA 序列结合,尤其是与 3'UTR 的碱基配对,抑制靶 mRNA 翻译或者诱导其降解,从而参与调节一系列重要的生命过程。

2 miRNA 在全眼组织的表达

研究表明,许多 miRNA 广泛表达于眼部多种组织,并具有组织特异性和不同发育阶段的时序特异性。Lagos-Quintana 等^[12]从小鼠全眼组织内分离出 7 种 miRNA(miR-129b, -181, -182, -183, -184, -185, -186),同时注意到有些 miRNA 在特定的组织内高表达,且眼组织和脊髓 miRNA 表达谱与已发现的脑组织 miRNA 具有一定的相似性。而 Bak 等^[13]用微阵列联合使用 RT-PCR 和原位杂交方法检测到成年小鼠全眼组织有 10 种 miRNA(miR-96, -205, -182, -211, -204, -183, -31, -199a, -184, -210)表达丰富。为了进一步了解 miRNA 在哺乳动物眼部的作用,Karali 等^[14]选择了已证实在全眼组织内表达的 13 种 miRNA(miR-9, -29c, -96, -124a, -181a, -181b, -182, -183, -184, -204, -213, -216, -217),用 LNA-修饰的探针原位杂交方法对胚胎期小鼠 Embryo 10.5d 及 Embryo 14.5d/生后 0d(P0)及生后 8d(P8)幼鼠以及成年小鼠视网膜进行检测,发现有 6 种 miRNA(miR-96, -183, -181b, -213, -216 和 -217)在小鼠眼球发育的任何阶段都不能检测到,而存在于小鼠视网膜的其余 7 种 miRNA 有不同的表达模式。Ryan 等^[15]用微阵列方法探测到成年小鼠的角膜至少有 31 种 miRNA 表达,通过对比角膜上皮细胞和足垫上皮细胞,发现 miRNA-184, miRNA-31 和 miRNA-204 在角膜上皮细胞内的表达更加丰富。

3 miRNA 在晶状体的表达

研究者使用微阵列表达谱检测到至少 17 种 miRNA(miR-184, -125a, -125b, -31, -204, -26a, -26b, -181a, -181b, -30a, -30b, -30c, -30d, -23a, -23b, -450, let-7f)在成年小鼠晶状体、睫状体中都有表达。通过 Northern blot 和 ISH 方法证实 miR-181, miR-184 和 miR-204 在眼内表达,其中 miR-184 被定位于晶状体上皮细胞,且均匀高表达于晶状体生发区上皮细胞,在晶状体前区低表达或者减弱表达;而 miR-204 则均匀的表达于晶状体前区的上皮^[15]。有趣的是,大部分晶状体内高表达的 miRNA 在视网膜和角膜内也表达,例如在视网膜和角膜内特异性表达的 miR-184,表明眼组织可能有共同的 miRNA 标记^[16]。

眼的发育与神经系统特别是中枢神经系统的发育密切相关。Frederikse 等^[17]用 Northern blot 方法确定了小鼠大脑特异性的 miR-124, miR-7 及 miR-125b 和 let-7a 也存在于晶状体内,但是用 ISH 方法不能检测到这些 miRNA 在晶状体内表达。同时还证明了肌肉组织内特异性的 miR-1 在成年和刚出生的小鼠发育期晶状体内不能被表达。

4 microRNA 表达与晶状体疾病的相关性

4.1 microRNA 与先天性白内障 在眼内,miRNA-184 在中心角膜上皮基底层及基质层细胞和晶状体上皮细胞都有表达,且是这两个组织中含量最丰富的一种 miRNA。Hughes 等^[18]研究了三代人中 18 例有常染色体显性遗传的圆锥角膜合并白内障的患者,结果发现角膜内表达的

miRNA-184 发生碱基置换与此遗传家系有关。眼前节发育不良综合征是包括内皮营养不良、虹膜发育不良、先天性白内障和基质变薄为特点的常染色体显性遗传综合征。Iliif 等^[19]对一大家族中 8 个有眼前节发育不良综合征患者和 2 个无症状的个体分别提取血液 DNA,并对 24 个候选基因和 4 个关键部位的 miRNA 进行双向测序,证实该综合征是由于 miRNA-184 的种子区域单个碱基配对变异导致的。这些研究提示某些特异性 miRNA 可以应用到遗传性眼病的早期诊断中,并为这些疾病的治疗研究提供了新的靶基因。

4.2 miRNA 与年龄相关性白内障 透明的人晶状体上皮细胞 miRNA 表达谱中含量前八位的是 miR-184, let-7b, miR-923, miR-1826, miR-125b, miR-1308, miR-26a 和 miR-638,而白内障的晶状体上皮细胞 miRNA 表达谱中含量前八位的是 miR-184, miR-1826, let-7b/c, miR-24, miR-23b, miR-923 和 miR-23a。透明晶状体和白内障晶状体上皮细胞 miRNA 表达谱的不同,表明 miRNA 在晶状体发育和白内障形成中起不同的调控作用。用微阵列技术对 206 种 miRNA 探测,4 种 miRNA(miR-184, let-7b, miR-923 和 miR-1826)在两种晶状体中都高丰度存在,但是其表达水平不同;有 32 种 miRNA 明显改变,其中透明晶状体有 20 种 miRNA 上调,最显著的是 miR-933;12 种 miRNA 下调,最显著的是 miR-34a^[20]。Let-7 是调节细胞和组织衰老过程的一种重要 miRNA,为了评价 let-7a/let-7b/let-7c 在年龄相关白内障中的表达和与晶状体混浊严重性之间的关系,Peng 等^[21]用 174 只年龄相关白内障的眼球观察 let-7a/let-7b/let-7c 在晶状体上皮细胞内 mRNA 表达水平,结果发现 Let-7b 表达与患者的年龄成正相关,但是 let-7a 和 let-7c 的表达水平和晶状体混浊及患者年龄都无相关性,表明 miRNA 可能在年龄相关性白内障发生中起关键作用,Let-7b 是增加年龄相关白内障风险的一个重要因素。这些研究表明,miRNA 是参与调节白内障病理生理过程的重要分子,深入研究其在白内障发病机制中的作用,可能为有效预防白内障的发生提供新的思路。

4.3 miRNA 与糖尿病性白内障 目前普遍认为糖尿病性白内障与氧化应激伴随的各种活性氧产生有关,而氧化应激和持续的细胞凋亡可能与某些 miRNA 的转录提高有关。以 CD-1 小鼠半乳糖性白内障晶状体为样本,通过 PCR 和 Microarray 发现半乳糖的晶状体内至少 24 种与凋亡相关的 miRNA 表达是上调的,尤其有 7 种 miRNA(miR-16, -30a, -27b, -125b, -30c, -1, -218)上调明显;另外 6 种凋亡相关的 miRNA(miR142-3P, -15a, -29b, -22, -32, -34c)表达是下调的^[22],推测这种半乳糖情况下造成的 miRNA 下调可能代表一种保护性反应,以拮抗凋亡的发生,研究证实凋亡发生前 miRNA 转录表达更明显,为某些活性氧清除物通过抑制凋亡进而抑制白内障发生提供依据。

4.4 miRNA 与后发性白内障 后发性白内障即后囊膜混浊,是目前白内障摘除联合人工晶状体植入术后影响视力恢复的主要并发症。研究已证实,白内障术后前囊膜周边部和赤道部(即晶状体上皮生发区)残留的晶状体上皮细胞过度增殖、迁移、上皮-间质转分化并分泌胶原与细胞外基质是后囊膜混浊发生的主要生物学基础^[23,24],但其具体的分子机制尤其是基因表达的调控机制尚不十分清

楚。Hoffmann 等^[7]通过微阵列技术研究了小鼠白内障术后晶状体囊膜 miRNA 表达谱的变化,并且选择具有竞争性拮抗作用的 miR-184 和 miR-204 作为进一步的研究对象,通过 miR-184 的抑制剂 anti-miR-184 和 miR-204 的促进剂 pre-miR-204 来调控 miRNA 的表达,发现可以降低与后发性白内障有关的晶状体上皮细胞迁移扩散,同时上皮细胞转分化标志物 α -SMA 和后发性白内障相关的转录因子 MEIS2 的表达下调,表明 miR-184 和 miR-204 在小鼠后发性白内障形成过程中发挥重要调控作用。但是,在晶状体摘除术后,有 35 种 miRNA 表达都发生变化,而在 mi-184 和 mi-204 又各自受多种 miRNA 的互相影响,所以它们对后发性白内障调控可能是通过一个复杂的互相协调拮抗的 RNA 网络来实现的。国内亦有学者利用携带 miRNA-184 的重组腺病毒成功转染体外培养人晶状体上皮细胞,证明细胞内 miRNA-184 高表达可以抑制细胞的移行,表明 miRNA 可能参与后发性白内障的形成过程^[25]。最近,Wang 等^[26]比较了人后囊膜混浊组织和正常人晶状体囊膜组织 miRNA 表达谱差异,发现在后囊膜组织中 miR-31,miR-184 和 miR-204-5p 的表达量有明显的下调,而 miR-498,miR-4279 和 miR-1469 的表达则明显上调,过表达的 miR-204-5P 增加了人晶状体上皮细胞钙粘素 E 表达,同时减少了波形蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白的表达,进而证实 miR-204-5P 通过作用下游靶基因 SMAD4 而参与 TGF- β /Smad 信号通路发挥对晶状体上皮细胞转分化的调控作用,认为 miR-204-5P 可能是预防后囊膜混浊发生的新靶标。

5 展望

晶状体内 miRNA 表达谱及功能的研究很大程度上丰富和拓展了我们对晶状体的发育、代谢和晶状体疾病的了解,但是由于一个 miRNA 可调控多个 mRNA,或者一个靶基因受多个 miRNA 的调控,因此 miRNA 对靶基因的调控呈现出如网络般一对多和多对一的错综复杂性,这种关系极大增加了 miRNA 靶位点预测的难度。未来仍需继续探索和验证各种 miRNA 表达对晶状体的影响,从而更全面深入的了解晶状体内 miRNA 的生物学功能,进一步明确其在晶状体疾病发生、发展中的作用,对于从分子机制角度研究晶状体相关疾病的发病原因以及诊断和治疗措施均具有重大意义。

参考文献

- Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR - 21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 2009;82(1):21-29
- Feng Y, Yu X. Cardinal roles of miRNA in cardiac development and disease. *Sci China Life Sci* 2011;54(12):1113-1120
- Ryan P, Atreya C. Blood cell microRNAs: what are they and what future do they hold? *Transfus Med Rev* 2011;25(3):247-251
- Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6(8):e23925
- Karali M, Peluso I, Gennarino VA, et al. miRNeve: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 2010;11:715

- Nakamura K, Maki N, Trinh A, et al. miRNAs in newt lens regeneration: specific control of proliferation and evidence for miRNA networking. *PLoS One* 2010;5(8):e12058
- Hoffmann A, Huang Y, Suetsugu-Maki R, et al. Implication of the miR-184 and miR-204 Competitive RNA Network in Control of Mouse Secondary Cataract. *Mol Med* 2012;18(1):528-538
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-854
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403(6772):901-906
- Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-419
- Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303(5654):95-98
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003;9(2):175-179
- Bak M, Silahatoglu A, Moller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 2008;14(3):432-444
- Karali M, Peluso I, Marigo V, et al. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):509-515
- Ryan DG, Oliveira-Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol Vis* 2006;12:1175-1184
- Xu S, Witmer PD, Lumayag S, et al. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem* 2007;282(34):25053-25066
- Frederickse PH, Donnelly R, Partyka LM. miRNAs and Dicer in the mammalian lens: expressing of brain specific miRNAs in the lens. *Histochem Cell Biol* 2006;126(1):1-8
- Hughes AE, Bradley DT, Campbell M, et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *Am J Hum Genet* 2011;89(5):628-633
- Illif BW, Riazuddin SA, Gottsch JD. A Single-Base Substitution in the Seed Region of miR-184 Causes EDICT Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(1):348-353
- Wu C, Lin H, Wang Q, et al. Discrepant Expression of MicroRNAs in Transparent and Cataractous Human Lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3906-3912
- Peng CH, Liu JH, Woung LC, et al. MicroRNAs and cataracts: correlation among *let-7* expression, age and the severity of lens opacity. *Br J Ophthalmol* 2012;96(5):747-751
- Varma SD, Kovtun S, Hegde K, et al. Effect of high sugar levels on miRNA expression. Studies with galactosemic mice lenses. *Mol Vis* 2012; 18:1609-1618
- Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective. *Exp Eye Res* 2002;74(3):337-347
- Wormstone IM, Wang LX, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res* 2009;88(2):257-269
- 王晓媛,曹文萍,滕旭,等. ADV-miR-184 体外转染对人晶状体上皮细胞移行的影响. *国际遗传学杂志* 2009;32(5):321-323
- Wang Y, Li W, Zang X, et al. MicroRNA-204-5p Regulates epithelial-to-mesenchymal transition during human posterior capsule opacification by targeting SMAD4. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(1):323-332