

活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜组织中 microRNA 表达的影响

王宏亮 吕甜甜 邢玮 韩静 吴晏 张子剑 王伟

【摘要】 目的 观察活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜组织中 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达的影响,探讨其改善糖尿病视网膜病变的机制。**方法** 选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只。一次性腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病模型大鼠 10 只,随机分为模型组和活血解毒方组,另设 5 只为正常对照组。造模成功后第 20 周开始给药,给药 12 周后摘取眼球,提取视网膜组织中的总 RNA。采用 Real-time PCR 技术检测 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 的表达。**结果** 与正常对照组相比,模型组 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P>0.05$), microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达升高 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组相比,活血解毒方组 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 表达升高 ($P>0.05$, $P<0.05$, $P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达降低 ($P<0.01$, $P<0.01$)。**结论** 推测活血解毒方是通过上调糖尿病大鼠视网膜组织中 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 的表达,下调 microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 的表达来起到延缓糖尿病视网膜病变的发生和发展进程的作用。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 活血解毒方; MicroRNA

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.001

Effect of Huoxue Jiedu recipe on the expressions of microRNA in the retina of diabetic rats WANG

Hongliang, LV Tiantian, XING Wei, et al. College of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: WANG Wei, E-mail: wangwei26960@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Huoxue Jiedu recipe (HJR) on microRNA-125a-3p, microRNA-212-3p, microRNA-290, microRNA-129-5p, microRNA-30c-5p, microRNA-153-3p and microRNA-423-5p in diabetic rats with retina to explore the mechanism of HJR in improving diabetic retinopathy. **Methods** 15 SPF male SD rats were enrolled in this study. Single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) was used to induce diabetic models. The diabetic rats were randomly divided into model and HJR. The rest 5 normal rats were treated as control group. After 20 weeks, the HJR group given HJR. The rats' retina was removed after 12 weeks of treatment, total RNA was extracted from the retina. Real-time PCR method was used to determine the expressions of microRNA-125a-3p, microRNA-212-3p, microRNA-290,

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”专项(2009ZX09103-320)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院[王宏亮(硕士研究生)、吕甜甜(硕士研究生)、邢玮(硕士研究生)、韩静、吴晏、张子剑、王伟]

作者简介: 王宏亮(1989-),女,2014级在读硕士研究生。研究方向: 中西医结合药理学研究。E-mail: 17801084715@163.com

通信作者: 王伟(1964-),博士,教授,博士生导师。研究方向: 中西医结合药理学研究。E-mail: wangwei26960@126.com

microRNA-129-5p, microRNA-30c-5p, microRNA-153-3p and microRNA-423-5p. **Results** Compared with the control group, the expressions of microRNA-125a-3p, microRNA-212-3p, microRNA-290, microRNA-129-5p and microRNA-30c-5p in model group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P > 0.05$), the expressions of microRNA-153-3p and microRNA-423-5p were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, the expressions of microRNA-125a-3p, microRNA-212-3p, microRNA-290, microRNA-129-5p and microRNA-30c-5p in HJR group increased ($P > 0.05$, $P < 0.05$, $P > 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), the expressions of microRNA-153-3p and microRNA-423-5p were decreased ($P < 0.01$, $P < 0.01$). **Conclusion** HJR may up-regulating the expressions of microRNA-125a-3p, microRNA-212-3p, microRNA-290, microRNA-129-5p, microRNA-30c-5p and down-regulating the expressions of microRNA-153-3p, microRNA-423-5p.

【Key words】 Diabetic retinopathy; Huoxue jiedu recipe; MicroRNA

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是目前最常见、最严重的糖尿病微血管并发症之一^[1],具有高致残率和严重危害个人生存质量的特点。在发达国家,DR是成年人致盲的首位原因^[2]。DR的发病机制比较复杂,主要包括新生血管形成、血管内皮系统功能异常和细胞凋亡等,但其确切机制尚未完全阐明。MicroRNA(miRNA)是一种具有调控功能的非编码小分子RNA,长约21~24个核苷酸^[3],可通过降解或抑制靶mRNA的翻译,在转录后水平调控基因的表达^[4]。近年来,越来越多的研究表明,miRNA参与调控机体内多个与DR有关的病理和生理环节。它可以促进内皮祖细胞的增殖、迁移及血管形成^[5],减少人脐静脉内皮细胞形成微血管^[6],进而促进经氧化应激处理的神经元的凋亡^[7]。另外,有实验研究表明,在DR中发挥重要作用的缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等基因的表达均受到miRNA的调控^[6,8]。以上研究提示,miRNA可能参与调控DR的发生和发展进程。

活血解毒方是临床经验方,主要由三七、黄连、鬼箭羽及天花粉组成,具有滋阴清热、活血通络的功效。经前期药效学实验证实,本方可保护视网膜神经细胞、改善血流动力学和抑制毛细血管内皮细胞的增生^[9-11],从而缓解DR的症状;分子生物学实验表明,本方能通过干预与DR有关的多条信号转导通路,调控相关基因的表达,从而改善DR的症状^[12-13]。但是活血解毒方对miRNA的影响机制尚未探讨过,因此,本实验拟通过观察microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p和microRNA-423-5p在糖尿病大鼠视网膜组织中的表达变化,阐明miRNA在DR中

的作用机理,并探讨活血解毒方通过调控miRNA的表达从而了解治疗DR的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠15只,7周龄,体质量160~190g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。大鼠在北京中医药大学实验动物中心SPF实验室饲养,室内温度20~25℃、相对湿度50%~60%、换气次数10~15次/小时,12小时/天光照维持、昼夜循环。

1.2 药物与试剂

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ), Sigma S0130, 由北京创信生物公司分装;活血解毒方由北京中医药大学药学院提供、制备。Total RNA提取试剂盒(05060810)、Quanto-miR cDNA合成试剂盒(07060301)、Quanto-miR参照试剂盒(05102816)均购自北京旷博生物技术有限公司;Quanto-miR qPCR引物由北京旷博生物技术有限公司设计并合成;荧光定量试剂盒(10802200), 购自Roche。

1.3 实验仪器

Optium Xceed“安妥超越”血糖仪与Optium试纸, 购自雅培糖尿病护理有限公司;NanoDrop 2000分光光度计, 购自Thermo scientific;反转录仪, 购自Bio-Rad C1000;StepOnePlus Real-time PCR仪, 购自Applied Biosystems。

1.4 方法

1.4.1 造模 随机选取10只大鼠,禁食12小时,给予STZ(65 mg/kg)一次性腹腔注射,其余5只作为正常对照组,注射等量的柠檬酸钠溶液(0.1 mmol/L)。1周后尾静脉采血检测血糖,以禁

食 6 小时血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病模型造模成功的标准。

1.4.2 分组与给药 将 10 只糖尿病大鼠随机平均分为模型组和活血解毒方组,每组 5 只。造模成功后第 20 周开始给药。活血解毒方由鬼箭羽、三七、天花粉和黄连按 1:1:1:1 的比例配比而成。鬼箭羽用 60% 乙醇提取后 AB-8 树脂上样,然后以 50% 乙醇解吸附;三七以 70% 乙醇提取后 HPD-300 树脂上样,60% 乙醇解吸附;天花粉与黄连混合水提、浓缩,60% 乙醇醇沉静置 24 小时,取上清液。各提取物混匀后浓缩干燥成粉末,配成 1.54 g/mL 的水溶液,给予 15.4 g/kg(相当于临床用药量的 14 倍)灌胃,1 次/天;正常对照组和模型组给予等体积的纯净水灌胃,1 次/天。每月检测 1 次血糖。32 周后摘取大鼠眼球,提取视网膜组织中的总 RNA。

1.5 检测指标

Real-time PCR 法检测 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 的表达。

反转录反应体系:(1)总 RNA 1 μ g,10 \times buffer 2 μ L,10 μ M ATP 2 μ L,RNA 酶抑制剂 0.5 μ L,聚合酶 1 μ L,Quanto-EC3 外参 1 μ L,加 DEPC 水至 20 μ L,将此 mix 离心 15 秒,再置于 PCR 仪 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;(2)5 \times buffer 8 μ L,10 mM dNTP 2 μ L,RNA 酶抑制剂 1 μ L,DEPC 水 8 μ L,反转录酶 1 μ L,与第(1)步反应产物 20 μ L 合并,共计 40 μ L。

反应条件:50 $^{\circ}$ C 反应 50 分钟,70 $^{\circ}$ C 15 分钟终止反应。反应结束后,放-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。以 IC1 作为内参进行 Real-time PCR 反应。反应体系:cDNA 1 ng,2 \times PCR Mix 10 μ L,10 \times UPM 2 μ L,miRNA 及 IC1 引物 2 μ L,加 DEPC 水至 20 μ L。反应条件:50 $^{\circ}$ C 预热 2 分钟,95 $^{\circ}$ C 变性 10 分钟,95 $^{\circ}$ C 退火 15 秒钟,50 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,共 40 个循环。反应结束后,得到每份样品中 miRNA 以及 IC1 的 CT 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算每份样品 miRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

与正常对照组相比,模型组 microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达升高($P<0.05$, $P<0.05$),microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 表达降低($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P>0.05$);与模型组相比,活血解毒方组 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 表达升高($P>0.05$, $P>0.05$, $P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$),microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达降低($P<0.05$, $P<0.05$)。见表 1~2。

表 1 各组大鼠视网膜中 microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	microRNA-153-3p	microRNA-423-5p
正常对照组	5	0.511 \pm 0.302	1.083 \pm 0.746
模型组	5	2.128 \pm 1.243 ^a	2.029 \pm 0.655 ^a
活血解毒方组	5	0.382 \pm 0.348 ^b	0.549 \pm 0.347 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

研究显示,miRNA 参与多种调节途径,包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖与凋亡及脂肪代谢等,能调控上百个靶基因的表达^[14],它与 DR 的关系已成为国内外的研究热点。近年来,一些研究表明,某些特异性的 miRNA 在 DR 的发生和发展进程中发挥不同的作用,其中 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、

表 2 各组大鼠视网膜中 microRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	microRNA-125a-3p	microRNA-212-3p	microRNA-290	microRNA-129-5p	microRNA-30c-5p
正常对照组	5	0.913 \pm 0.522	1.101 \pm 0.157	1.315 \pm 0.964	0.700 \pm 0.234	0.584 \pm 0.262
模型组	5	0.292 \pm 0.124 ^a	0.400 \pm 0.179 ^a	0.345 \pm 0.265 ^a	0.354 \pm 0.103 ^a	0.335 \pm 0.156
活血解毒方组	5	0.476 \pm 0.227	0.644 \pm 0.131	0.539 \pm 0.276	0.783 \pm 0.251 ^b	1.019 \pm 0.624 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 的表达可能与新生血管形成或细胞凋亡的机制相关^[15-22]。活血解毒方是临床经验方,全方具有滋阴清热、活血通络的功效,主要针对 DR 阴虚内热、络脉瘀阻之病机进行治疗。前期研究发现,本方可降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF 的表达,并促进色素上皮衍生因子的表达^[23],还能够保护视网膜神经细胞、改善血流动力学和抑制毛细血管内皮细胞的增生^[9-11],对 DR 症状有明显的改善作用。

本实验采用 Real-time PCR 技术检测发现:与正常对照组相比,模型组大鼠视网膜组织中 microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p 和 microRNA-30c-5p 表达降低,在应用了活血解毒方治疗后,上述 miRNA 表达均有所升高;与正常对照组相比,模型组 microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 表达升高,在应用了活血解毒方治疗后,二者表达均降低。以上研究结果提示, microRNA-125a-3p、microRNA-212-3p、microRNA-290、microRNA-129-5p、microRNA-30c-5p、microRNA-153-3p 和 microRNA-423-5p 可能通过影响 DR 中新生血管形成或细胞凋亡的基本病理改变,参与 DR 发生和发展过程,推测活血解毒方是通过调控上述 miRNA 的表达,进而影响细胞和血管功能,从而改善 DR 症状。

本实验不仅表明 miRNA 在 DR 进程中发挥重要作用,可能成为未来治疗 DR 的新靶点;而且证明活血解毒方可能通过调控某些 miRNA 的表达干预 DR 的发展,改善 DR 症状,为进一步揭示活血解毒方防治 DR 的分子机制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Michael TJ, Anistidis V. 糖尿病与心血管疾病[M]. 孙丰雷,主译. 2 版. 济南:山东科学技术出版社, 2008.
- [2] 张俊,周琦,吕红彬. MicroRNA 及其在糖尿病视网膜病变中的研究进展[J]. 眼科新进展,2012,32(2):192-195.
- [3] Wu X, Shao X, Meng X, et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin-resistant gastric cancer cells [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2011, 32(2):259-269.
- [4] Mastropasqua R, Toto L, Cipollone F, et al. Role of microRNAs in the modulation of diabetic retinopathy [J]. Progress in retinal and eye research, 2014, 43:92-107.
- [5] 马晓璐,潘群文,何彩霞,等. MicroRNA125a 对缺血性脑卒中小鼠内皮祖细胞功能的调节作用[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(8):702-706.
- [6] Chen S, Zhao G, Miao H, et al. MicroRNA-494 inhibits the growth and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells [J]. FEBS letters, 2015, 589(6):710-717.
- [7] Murray AR, Chen Q, Takahashi Y, et al. MicroRNA-200b downregulates oxidation resistance 1 (Oxrl) expression in the retina of type 1 diabetes model Oxrl expression in type 1 diabetes model [J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2013, 54(3):1689-1697.
- [8] Intine RV, Sarrajs Jr MPS. Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms [J]. Current diabetes reports, 2012, 12(5):551-559.
- [9] 姚青,韩静,黄黎明,等. 活血解毒方对糖尿病早期大鼠视网膜功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(9):1271-1274.
- [10] 姚青,韩静,黄黎明,等. 活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜病变内皮素-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):169-172.
- [11] 姚青,韩静,余俊达,等. 活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜病变的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3):362-366.
- [12] 何洁,郝改梅,武志黔,等. 活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜病变的影响研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(5):507-512.
- [13] 郝改梅,何洁,韩静,等. 基于 Ras/Raf-1/ERK 信号转导通路调控 VEGF 的表达探讨活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜的影响[J]. 世界中医药, 2015, (5):757-761.
- [14] Yu J, Liu F, Yin P, et al. Integrating miRNA and mRNA expression profiles in response to heat stress-induced injury in rat small intestine [J]. Functional & integrative genomics, 2011, 11(2):203-213.
- [15] Che P, Liu J, Shan Z, et al. MicroRNA-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation [J]. Aging cell, 2014, 13(5):926-934.
- [16] Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, et al. MicroRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn [J]. J Cell Sci, 2013, 126(13):2867-2876.
- [17] Kumarswamy R, Volkmann I, Beermann J, et al. Vascular importance of the miRNA-212/132 cluster [J]. European heart journal, 2014, 35(45):3224-3231.
- [18] Chang HM, Martinez NJ, Thornton JE, et al. Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation [J]. Nature communications, 2012, 3(2):923.
- [19] Tan G, Cao X, Dai Q, et al. A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ [J]. Oncotarget, 2015, 6(11):8676.
- [20] Liu Q, Du GQ, Zhu ZT, et al. Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts [J]. Journal of translational medicine, 2015, 13(1):270.
- [21] 梁春联,朱华,黄澜,等. MicroRNA-153 对靶基因下游信号分子 GSK-3 β 表达水平及细胞抗损伤能力的影响[J]. 中国

- 比较医学杂志,2011,21(8):15-19.
- [22] Wu LM, Ji JS, Yang Z, et al. Oncogenic role of microRNA-423-5p in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International,2015,14(6):613-618.
- [23] 姚青,韩静,黄黎明,等. 活血解毒方对糖尿病大鼠视网膜

PEDF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):162-165.

(收稿日期:2016-03-11)
(本文编辑:韩虹娟)