

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.22.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220909.0936.002.html\(2022-09-09\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220909.0936.002.html(2022-09-09))

miR-148-3p 抑制剂下调 Akt2 调控 HUVECs 细胞增殖及凋亡机制研究*

李汭澧¹, 齐晓娅¹, 武明星², 梅英^{1△}

(重庆医科大学附属第二医院 1. 健康管理(体检)中心; 2. 眼科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 探究微 RNA(miR)-148-3p 对模拟角膜新生血管形成常见体外细胞模型人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的增殖及凋亡的影响。**方法** 实验分 2 个阶段,第 1 阶段, HUVECs 分为:空白对照组(以 HUVECs 不作任何处理)、NC inhibitor 组(转染 NC inhibitor)、miR-148-3p inhibitor 组(转染 miR-148-3p inhibitor)。采用 CCK-8 法检测抑制 miR-148-3p 表达对 HUVECs 增殖能力的影响;TargetScan 筛选 miR-148-3p 潜在靶基因,双荧光素酶报告基因实验进行验证;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Akt2 表达水平变化;第 2 阶段, HUVECs 分为:NC 组(转染过表达质粒 Akt2 的阴性对照)、Akt2 组(转染过表达 Akt2 质粒);NC inhibitor 组、miR-148-3p inhibitor 组、miR-148-3p inhibitor + Akt2 组(共转染 miR-148-3p inhibitor 和过表达 Akt2 质粒),采用 CCK-8 法检测 miR-148-3p inhibitor 和 Akt2 对 HUVECs 增殖能力的影响;采用末端 DNA 转移酶 dUPT 缺口末端标记(TUNEL)法检测各组细胞凋亡情况。**结果** 常规培养 48、72、96 h, miR-148-3p inhibitor 组中 HUVECs 增殖能力低于 NC inhibitor 组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-148-3p inhibitor 组 pMIR-Akt2-wt 及 pMIR-Akt2-Mut 质粒荧光素酶活性与 NC inhibitor 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-148-3p inhibitor 组 Akt2 表达水平低于 NC inhibitor 组($P < 0.05$);与 NC 组比较, Akt2 组细胞增殖能力升高,凋亡指数(AI)值降低;常规培养 48、72、96 h,与 NC inhibitor 组比较,miR-148-3p inhibitor 组增殖能力降低,AI 值升高;与 miR-148-3p inhibitor 组比较,miR-148-3p inhibitor + Akt2 组增殖能力升高,AI 值降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** miR-148-3p 抑制剂可能通过下调 Akt2 抑制 HUVECs 增殖并促进凋亡。

[关键词] miR-148-3p 抑制剂;Akt2;人脐静脉内皮细胞;增殖;细胞凋亡**[中图法分类号]** R772.23**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)22-3797-06

Mechanism of miR-148-3p inhibitor in down-regulating Akt2 and regulating HUVECs cell proliferation and apoptosis*

LI Ruili¹, QI Xiaoya¹, WU Mingxing², MEI Ying^{1△}

(1. Health Management (Physical Examination) Center; 2. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miR-148-3p on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) which was the common in vitro cell model simulating corneal neovascularization. **Methods** The experiment was divided into the two stages, in the first stage, HUVECs cells were divided into the blank control group (HUVECs cells without any modification), the NC inhibitor group (transfected with NC inhibitor), and the miR-148-3p inhibitor group (transfected with miR-148-3p inhibitor). The effect of inhibiting miR-148-3p expression on the proliferation of HUVECs was detected by CCK-8 assay. TargetScan was used to screen the miR-148-3p potential target genes. Double luciferase reporter assay used to validate. Western blot was used to detect the change of expression level of Akt2 protein. In the second stage, HUVECs were divided into the NC group (transfected with negative control of over-expression plasmid of Akt2), the Akt2 group (transfected with overexpression plasmid of Akt2), the NC inhibitor group, miR-148-3p inhibitor group, miR-148-3p inhibitor + Akt2 group (co-transfected with miR-148-3p inhibitor and overexpression Akt2 plasmid of Akt2). The effect of miR-148-3p inhibitor and Akt2 on the HUVECs proliferation and apoptosis was detected by CCK-8 assay and TUNEL assay.

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81901765)。 作者简介:李汭澧(1990—),住院医师,硕士,主要从事角膜疾病、白内障疾病研究。 △ 通信作者, E-mail: 2437668114@qq.com。

eration ability were detected by the CCK-8 assay. The apoptosis ability of each group was detected by TUNEL assay. **Results** After 48, 72, 96 h of common culture, The HUVECs cell proliferation ability in the miR-148-3p inhibitor group was lower than that in the NC inhibitor group and blank control group, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the luciferase activity of pMIR-Akt2-WT plasmid between the miR-148-3p inhibitor group and the NC inhibitor group ($P > 0.05$). The protein expression level of Akt2 in the miR-148-3p inhibitor group was lower than that of the NC inhibitor group ($P < 0.01$). Compared with the NC group, the cellular proliferation ability in the Akt2 group was increased and the AI value was decreased. Compared with the NC inhibitor group, the proliferation ability in the miR-148-3p inhibitor group was decreased and the apoptosis index (AI) value was increased. Compared with the miR-148-3p inhibitor group, the proliferation ability in the miR-148-3p inhibitor + Akt2 group was increased and the AI value was decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The miR-148-3p inhibitor may inhibit the proliferation and promote apoptosis in HUVECs cell lines by regulating Akt2.

[Key words] miR-148-3p inhibitor; Akt2; human umbilical vein endothelial cells; proliferation; apoptosis

健康的角膜是透明且无血管的,如果出现由新生血管发展导致的病理变化即为角膜新生血管(corneal neovascularization, CRNV)^[1-2], CRNV 发生通常由外伤、缺氧、炎症等引起^[3], 尽管近年来 CRNV 治疗取得了较大进展,但现阶段尚无安全有效的治疗方案,因此,探索 CRNV 的可能发病机制对其进一步诊断和治疗至关重要。

蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 是调节细胞增殖、分化的常见信号转导蛋白,参与了血管生成的生理和病理过程^[4], SHEN 等^[5]研究发现磷脂酰肌醇肌酶 (PI3K)/Akt 信号通路与 CRNV 发生发展有关。

微 RNA (microRNA, miR) 是一类内源性非编码 RNA,通过转录后调节基因表达,从而参与多种病理进程。已有研究证实 miRNA 在新生血管性眼病发病机制中扮演重要角色。如在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 株中, miR-1275 和 miR-1246 可以通过抑制血管内皮生长因子 B (vascular endothelial growth factor B, VEGF-B) 和核因子- κ B 激活蛋白 (NKAP) 来调节与血管生成相关的因子活性^[6]。本研究前期通过 TargetScan 软件预测发现 Akt2 的 3'-UTR 与 miR-148-3p 存在结合位点。虽有研究证明多种 miR 与新生血管性眼病相关,但 miR-148-3p 作用尚未明确。本研究旨在观察 miR-148-3p 抑制剂 (inhibitor) 在调节模拟角膜新生血管形成常见体外细胞模型 HUVECs^[7] 的增殖机制,分析 miR-148-3p inhibitor 可能通过调控 Akt2 的表达对 HUVECs 增殖能力影响,进而揭示 miR-148-3p 在 CRNV 中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

HUVECs 购自中国科学院上海细胞库, DMEM 培养基、miR-148-3p inhibitor、过表达 Akt2 质粒载体及各自阴性对照、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒、电化学发光 (ECL) 发生液、TRIzol[®] 试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公

司。CCK-8 试剂盒、Akt2 及 GAPDH 一抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔二抗购自美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组

HUVECs 置于 37 °C 含 95% N₂ 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中,使用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基培养。待细胞生长融合度至 70% 时,按照转染试剂 Lipofectamine[™] 2000 试剂盒说明书对细胞进行转染。为了探究 miR-148-3p 对 HUVECs 增殖能力的影响,将 HUVECs 分为:空白对照组 (HUVECs 不作任何处理)、NC inhibitor 组 (转染 NC inhibitor)、miR-148-3p inhibitor 组 (转染 miR-148-3p inhibitor)。为了探究 miR-148-3p 和 Akt2 对 HUVECs 增殖能力的影响,将 HUVECs 分为:NC 组 (转染过表达质粒 Akt2 的阴性对照)、Akt2 组 (转染过表达 Akt2 质粒)、NC inhibitor 组、miR-148-3p inhibitor 组、miR-148-3p inhibitor + Akt2 组 (共转染 miR-148-3p inhibitor 和过表达 Akt2 质粒)。

1.2.2 qRT-PCR 实验

使用 TRIzol 从各组细胞中提取总 RNA,反转录合成 cDNA,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应, U6 作为 miR-148-3p 的表达内参, GAPDH 作为 Akt2 mRNA 的表达内参。实验重复 3 次。扩增基因及引物序列见表 1。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次。反应体系为 20 μ L: 2 $\times$ SYBR Mix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 10 $\times$ cDNA 模板 1 μ L, H₂O 8 μ L。

1.2.3 CCK-8 实验

HUVECs 接种于 96 孔板,调整密度为 1 $\times$ 10⁵/mL,常规培养 24、48、72、96 h 后检测细胞增殖情况,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,室温 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h 后,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

1.2.4 末端 DNA 转移酶 dUPT 缺口末端标记 (TUNEL) 实验

收集细胞,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30~60 min,加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 冰浴 2 min。在用甲醇配制的 0.3% 过氧化氢溶液室温孵育 20 min。在样品上加 50 μ L 生物素标记液,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。滴加 0.1~0.3 mL 反应终止液,室温孵育 10 min。在样品上加 50 μ L Streptavidin-HRP 工作液,室温孵育 30 min。滴加 0.2~0.5 mL DAB 显色液,室温孵育 5~30 min 或根据显色情况孵育适当时间。用苏木素染液进行细胞核染色。95% 乙醇脱水 5 min,再用 100% 乙醇脱水 2 次,每次约 3 min,再用二甲苯透明 2 次,每次 5 min,随后封片观察。TUNEL 染色标本根据阳性细胞分布情况,选择 2 个阳性视野,计数 200 个细胞中阳性细胞数占比作为凋亡指数(AI)并进行统计。实验重复 3 次。

表 1 扩增基因及引物序列

基因	方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
U6	正向	GCTCGCTTCGGCAGCACA	94
	反向	GAGGTATTTCGCACCAGAGGA	
GAPDH	正向	CCAACCGCGAGAAGATGA	119
	反向	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	
miR-148-3p	正向	AGCAGTTTCAGTGCCTACAG	87
	反向	GCAGGGTCCGAGGTATTC	
Akt2	正向	TCCGAGGTCGACACAAGGTA	176
	反向	CTGGTCCAGCTCCAGTAAGC	

1.2.5 miR-148-3p 和 Akt2 的结合位点预测及双荧光素酶报告基因实验验证

使用 TargetScan 数据库预测 miR-148-3p 和 Akt2 的结合位点 (http://www.targetscan.org/vert_71/)。构建 Akt2 野生型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 pMIR-Akt2-wt 和突变型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 pMIR-Akt2-Mut。将 pMIR-Akt2-wt 或 pMIR-Akt2-Mut 与 NC-inhibitor 或 miR-148-3p inhibitor 共转染进 HUVECs。转染 24 h 后,使用双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性,实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)实验

采用 RIPA 裂解液提取 HUVECs 总蛋白,遵照 BCA 法测定蛋白浓度,变性蛋白。每泳道加入 50 μ g 总蛋白,用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,然后将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。加入一抗 Akt2 抗体(1:500),GAPDH 抗体(1:1000),GAPDH 为内参。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入 HRP 标记的兔二抗(1:1000),室温孵育 1 h。ECL 液暗室发光显影,采集图像并分析。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,3 组或以上的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-148-3p inhibitor 抑制 HUVECs 的增殖能力

CCK-8 实验结果显示,常规培养 24 h 时,空白对照组、NC inhibitor 组、miR-148-3p inhibitor 组的细胞增殖能力(A 值)差异无统计学意义($P>0.05$);常规培养 48、72、96 h 时,miR-148-3p inhibitor 组的细胞增殖能力(A 值)明显低于空白对照组、NC inhibitor 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

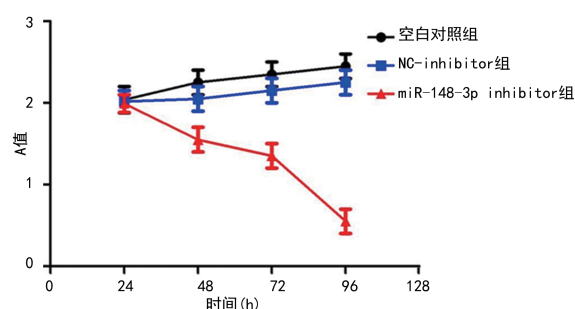


图 1 miR-148-3p inhibitor 对 HUVECs 增殖能力的影响

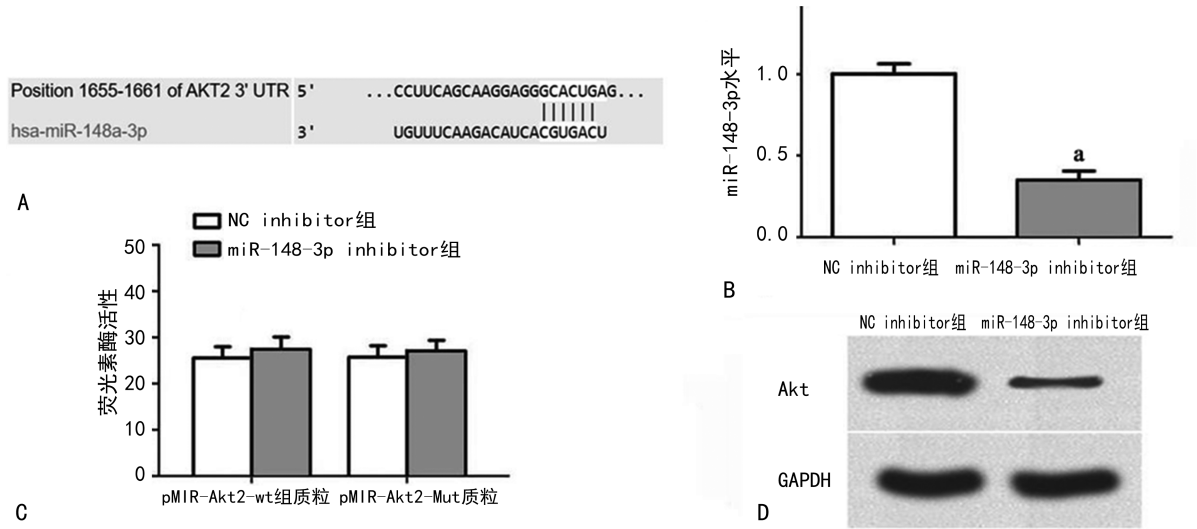
2.2 miR-148-3p inhibitor 下调 HUVECs 中 Akt2 表达

TargetScan 筛选结果显示,miR-148-3p 在 Akt2 的 3'-UTR 上具有潜在的结合位点(图 2A),qRT-PCR 结果显示,转染 miR-148-3p inhibitor 后,细胞中 miR-148-3p 的表达(0.29 ± 0.03)明显低于 NC inhibitor 组的 (1.00 ± 0.05),差异有统计学意义($t = 21.090, P<0.001$),见图 2B,证明转染成功。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-148-3p inhibitor 组 pMIR-Akt2-wt 质粒荧光素酶活性(26.41 ± 3.01)与 NC inhibitor 组(25.37 ± 2.41)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),miR-148-3p inhibitor 组 pMIR-Akt2-Mut 质粒荧光素酶活性为(26.45 ± 2.03),NC inhibitor 组荧光素酶活性为(25.13 ± 2.31),2 组荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2C。因此 Akt2 非 miR-148-3p 直接靶基因。但 Western blot 检测结果表明,miR-148-3p inhibitor 组 Akt2 表达水平为(0.14 ± 0.03),明显低于 NC inhibitor 组的 0.87 ± 0.12 ($t = 10.222, P<0.05$),见图 2D,提示 miR-148-3p 抑制剂可负调控 Akt2 表达。

2.3 过表达 Akt2 促进 HUVECs 增殖并抑制凋亡

采用 CCK-8 法检测 Akt2 对细胞增殖能力的影响,结果显示,Akt2 组除 24 h 外,其余各时间点的细胞增殖能力(A 值)均明显高于 NC 组($P<0.05$),见表 1。TUNEL 实验结果显示,与 NC 组(0.72 ± 0.14)比较,Akt2 组(0.41 ± 0.08)HUVECs 的 AI 值

减少($P<0.01$),见表 1、图 3。



A: TargetScan 生信图;B: 转染实验;C: 双荧光素酶报告基因实验;D: Western blot;^a: $P<0.01$,与 NC inhibitor 组比较。

图 2 miR-148-3p 与 Akt2 的调控关系

表 1 各组 HUVECs 细胞增殖能力(A 值)、AI 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	A 值				AI 值
	24 h	48 h	72 h	96 h	
NC 组	135.53±2.17	239.72±13.21	441.58±28.52	863.92±54.64	0.72±0.14
Akt2 组	142.15±1.76	452.53±25.14	953.36±41.28	1 754.32±20.58	0.41±0.08
P	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

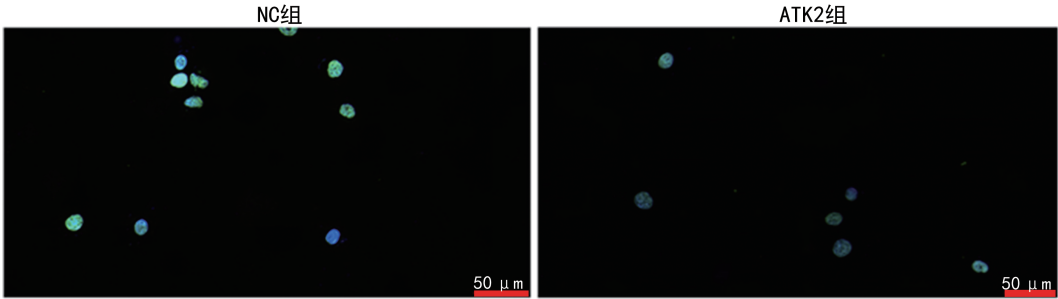


图 3 过表达 Akt2 抑制 HUVECs 凋亡

2.4 miR-148-3p inhibitor 通过下调 Akt2 表达,抑制 HUVECs 增殖并促进凋亡

采用 CCK-8 法检测 miR-148-3p inhibitor 和 Akt2 对细胞增殖能力(A 值)的影响,结果显示,与 NC inhibitor 组比较,miR-148-3p inhibitor 组 24、48、72、96 h 时增殖能力降低;而 miR-148-3p inhibitor +

Akt2 组各个时间节点的 HUVECs 增殖能力均不同程度高于 miR-148-3p inhibitor 组,见表 2。TUNEL 实验结果显示,与 NC inhibitor 组比较,miR-148-3p inhibitor 组 HUVECs 的 AI 值增加($P<0.01$),miR-148-3p inhibitor + Akt2 组的 AI 值明显低于 miR-148-3p inhibitor 组($P<0.01$),见表 2、图 4。

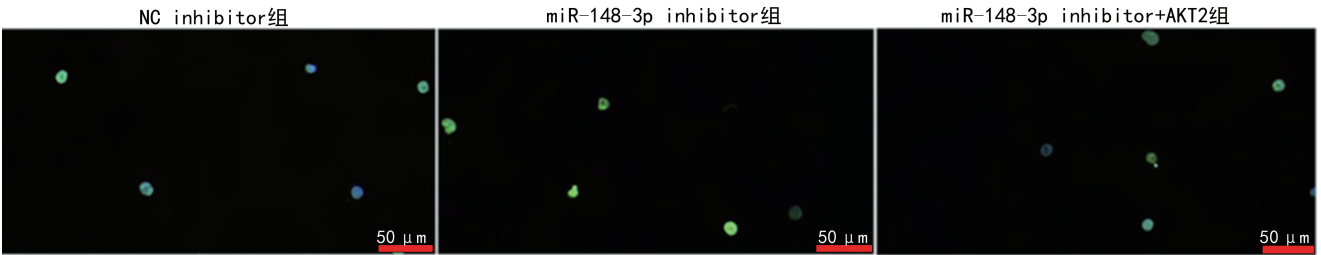


图 4 miR-148-3p 调控 Akt2 影响 HUVECs 凋亡能力

表 2 各组 HUVECs 细胞增殖能力(A 值)、AI 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值				AI 值
	24 h	48 h	72 h	96 h	
NC inhibitor 组	132.32 $\pm$ 10.96	241.29 $\pm$ 12.63	430.15 $\pm$ 25.34	852.37 $\pm$ 48.25	0.68 $\pm$ 0.11
miR-148-3p inhibitor 组	131.48 $\pm$ 10.27	146.04 $\pm$ 11.98 ^a	221.22 $\pm$ 19.41 ^a	429.37 $\pm$ 28.44 ^a	0.93 $\pm$ 0.12 ^b
miR-148-3p inhibitor + Akt2 组	131.57 $\pm$ 1.26	236.12 $\pm$ 10.08 ^c	413.52 $\pm$ 16.14 ^c	831.25 $\pm$ 40.45 ^c	0.71 $\pm$ 0.04 ^d
P	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P<0.05$; ^b: $P<0.01$,与 NC inhibitor 组比较; ^c: $P<0.05$; ^d: $P<0.01$,与 miR-148-3p inhibitor 组比较。

3 讨 论

CRNV 作为常见的眼部疾病,近年越来越多的研究集中在新生血管形成的机制上^[8]。HUVECs 可用于模拟 CRNV 形成,徐萌等^[9]使用 HUVECs 探究马钱子碱对血管形成活性物质的抑制作用;BAI 等^[10]用 VEGF 刺激人脐 HUVECs 体外诱导 CRNV 细胞,从而探究长链非编码 RNA(lncRNA) MIAT 在抑制角膜血管生成的作用。

近年,miR 被证实参与了眼部疾病的发生发展,尤其是与血管新生相关,既往研究显示 miR-148-3p 与炎症、免疫、血管生成等生理病理过程相关^[11-12],但 miR-148-3p 在 CRNV 中的具体作用效果和相关机制却鲜有报道。本研究利用 CRNV 形成常见体外细胞模型 HUVECs,分析 miR-148-3p 的差异表达对 CRNV 的作用机制,即 miR-148-3p 对 CRNV 是否具有重要调控作用。本研究结果显示,下调 miR-148-3p 能抑制 HUVECs 的增殖能力,同时能促进细胞凋亡。

Akt 作为常见信号转导蛋白,参与调节细胞增殖、分化、血管生成等生理和病理过程。SAMAKOVA 等^[13]研究发现,缺血时 PI3K/Akt 通路参与血管生成、氧化应激及间充质干细胞存活相关;有研究发现,miR-21 通过 PI3K/Akt/VEGF 通路抑制糖尿病视网膜病变的视网膜血管内皮细胞生长和血管生成^[14]。与以往高质量研究结果类似,本研究发现过表达 Akt2 明显促进了 HUVECs 增殖,同时抑制了 HUVECs 的凋亡。

为了进一步探究 miR-148-3p 对 Akt2 的调控机制^[15],生物信息学分析发现 Akt2 可能是 miR-148-3p 潜在靶点,但 miR-148-3p 抑制剂对 Akt2 的双荧光素酶强度无明显影响,因此说明 Akt2 可能不是 miR-148-3p 的直接靶点,但 Western blot 初步证实 miR-148-3p 抑制剂可负调控 Akt2 表达。

本文利用 CRNV 形成常见体外细胞模型 HUVECs 进一步探究 miR-148-3p 和 Akt2 对 HUVECs 增殖和凋亡的影响,初步证实 miR-148-3p inhibitor 可通过下调 Akt2 的表达抑制 HUVECs 增殖,随后采用 TUNEL 实验进行验证,发现 miR-148-3p inhibitor 可以促进 HUVECs 凋亡,Akt2 组明显抑制了 HUVECs 的凋亡,而 Akt2 抑制了 miR-148-3p inhibitor 促进 HUVECs 凋亡的能力。

综上,此次研究利用 CRNV 形成常见体外细胞模型 HUVECs,分析了 miR-148-3p 对 CRNV 的影响,在体外验证了 miR-148-3p inhibitor 通过下调 Akt2 的表达对 CRNV 形成有抑制作用。目前,临床治疗 CRNV 的药物较多,部分药物可通过调控某些 miR 来实现对 CRNV 的抑制。本研究结论为 CRNV 的治疗靶点选择提供了新的参考和客观依据。然而,本研究为体外实验研究,人体内源性 miR-148-3p 在角膜血管化中的具体作用过程较为复杂,涉及多条信号传导通路,且各种 miR 间可能存在相互影响,一种 miR 有可能通过调节另外一种 miR 的表达而发挥相关的调节作用。由于客观条件的限制,本研究仅探索了 miR-148-3p 这一单一 miR 对 HUVECs 增殖、凋亡的影响,在后续的研究中将拓展研究范围和深度,进一步分析 miR 在 CRNV 中的作用效果及相关机制。

参考文献

- [1] SHARIF Z,SHARIF W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management[J]. Rom J Ophthalmol, 2019,63(1):15-22.
- [2] BARBARIGA M,FONTEYNE P,OSTAD REZA M,et al. Substance P modulation of human and murine corneal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(3): 1305-1312.
- [3] LIU S,ROMANO V,STEGER B,et al. Gene-based antiangiogenic applications for corneal neovascularization[J]. Surv Ophthalmol, 2018, 63(2):193-213.
- [4] WANG C,CHEN Y,WANG Y,et al. Inhibition of COX-2, mPGES-1 and CYP4A by isoliquiritigenin blocks the angiogenic Akt signaling in glioma through ceRNA effect of miR-194-5p and lncRNA NEAT1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019,38(1):371.
- [5] SHEN M,ZHOU X Z, YE L, et al. Xanthatin inhibits corneal neovascularization by inhibiting the VEGFR2-mediated STAT3/PI3K/Akt sig-

- naling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2):769-778.
- [6] BAI Y, WANG W, SUN G, et al. Curcumin inhibits angiogenesis by up-regulation of microRNA-1275 and microRNA-1246: a promising therapy for treatment of corneal neovascularization [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(6):751-762.
- [7] BAI Y, WANG W, SUN G, et al. Curcumin inhibits angiogenesis by up-regulation of microRNA-1275 and microRNA-1246: a promising therapy for treatment of corneal neovascularization[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(6):751-762.
- [8] LATTA L, LUDWING N, KRAMMES L, et al. Abnormal neovascular and proliferative conjunctival phenotype in limbal stem cell deficiency is associated with altered microRNA and gene expression modulated by PAX6 mutational status in congenital aniridia[J]. *Ocul Surf*, 2020, 19:115-127.
- [9] 徐萌, 李平. 马钱子碱诱导人脐静脉内皮细胞凋亡过程中血管内皮生长因子和上皮细胞激酶 A2 的表达变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(2):195-199.
- [10] BAI Y, WANG W, ZHANG Y, et al. lncRNA MIAT suppression alleviates corneal angiogenesis through regulating miR-1246/ACE [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(6-7):661-669.
- [11] WANG X X, ZHANG H. Preliminary study on the role of miR-148a and DNMT1 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4):2943-2952.
- [12] 王晓雪, 王玥, 王萍萍, 等. MicroRNA-148/152 家族在血液恶性肿瘤中的表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(4):1173-1178.
- [13] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, et al. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia [J]. *Physiol Res*, 2019, 68(Suppl 2):S131-138.
- [14] LU J, ZHANG Z Z, MA X, et al. Repression of microRNA-21 inhibits retinal vascular endothelial cell growth and angiogenesis via PTEN dependent-PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in diabetic retinopathy[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 190:10.
- [15] VASURI F, CIAVARELLA C, FITTIPALDI S, et al. Different histological types of active intra-plaque calcification underlie alternative miRNA-mRNA axes in carotid atherosclerotic disease[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 476(2):307-316.
- (收稿日期:2022-05-18 修回日期:2022-08-08)
-
- (上接第 3796 页)
- [20] QIAN J, CHEN Y, MENG T, et al. Molecular regulation of apoptotic machinery and lipid metabolism by mTORC1/mTORC2 dual inhibitors in preclinical models of HER2⁺/PIK3CA mut breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41):67071-67086.
- [21] WU F, LIN Y, CUI P, et al. Cdc20/p53 mediates the resistance to docetaxel in castration-resistant prostate cancer in a Bim-dependent manner [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 81(6):999-1006.
- [22] AKA Y, KARAKAS B, ACIKBAS U, et al. Kinome-wide RNAi screening for mediators of ABT-199 resistance in breast cancer cells identifies weel as a novel therapeutic target[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 137:106028.
- [23] CHEN S, HAN Q, WANG X, et al. IBP-mediated suppression of autophagy promotes growth and metastasis of breast cancer cells via activating mTORC2/Akt/FOXO3a signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(10):e842.
- [24] XUE M, JOO Y A, LI S, NIU C, et al. Metallothionein protects the heart against myocardial infarction via the mTORC2/FoxO3a/bim pathway[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(5):403-419.
- (收稿日期:2022-06-11 修回日期:2022-08-12)