

长链非编码 RNA Neat1 通过 RD3 导致氧诱导视网膜病感光细胞变性

孙晓凤,王婕,刘今,洪泽,刘娟,周文娣*

(南京医科大学附属淮安第一医院儿科,江苏 淮安 223300)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA) Neat1 导致氧诱导视网膜病(OIR)感光细胞变性的机制,以期对早产儿视网膜病(ROP)的防治提供新的思路。**方法** 高氧环境下制造 ROP 模型 OIR 小鼠,以同日龄正常 SPF 新生小鼠作为对照。应用二代测序技术(NGS)及分析软件,筛选与 OIR 小鼠视网膜发育异常相关的差异 lncRNA。对芯片检测到的差异表达基因及同时又被预测为可能是调控靶标的编码基因,取交集进行 GO 分析、Pathway 分析。采用 qPCR 法对差异表达的靶基因进行验证。通过 UCSC 基因组浏览工具分析 Neat1 基因。采用 qPCR 法检测 ROP 患儿血液、OIR 小鼠视网膜组织中 Neat1、视网膜变性蛋白 3(RD3)的表达水平。采用放射免疫法测定 ROP 患儿血液、OIR 小鼠视网膜组织中环磷酸鸟苷(cGMP)含量。**结果** NGS 结果显示,OIR 小鼠视网膜中 Neat1 呈差异性表达。qPCR 验证结果与 NGS 结果一致。生物信息学预测 RD3 可能为 Neat1 调控靶标,在小鼠 Neat1 序列下游发现 RD3 基因。与对照组相比,ROP 患儿血液和 OIR 小鼠视网膜组织中 Neat1 的 mRNA 水平升高,RD3 低表达,cGMP 高表达。**结论** lncRNA Neat1 可能在 RD3 介导下通过 Neat1/RD3/cGMP 通路导致视网膜感光细胞发生变性。

关键词:长链非编码 RNA;Neat1;视网膜变性蛋白 3;氧诱导视网膜病;感光细胞变性

中图分类号:R774 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-3882(2023)06-0453-06

DOI:10.3969/j.issn.2096-3882.2023.06.011

Long non-coding RNA Neat1 induces the degeneration of retinal photoreceptor cells via RD3

SUN Xiaofeng, WANG Jie, LIU Jin, HONG Ze, LIU Juan, ZHOU Wendi*

(Department of Pediatrics, Huai'an First People's Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism by which long non-coding RNA (lncRNA) Neat1 causes the degeneration of oxygen-induced retinopathy (OIR) in photoreceptor cells, in order to provide new ideas for the prevention and treatment of retinopathy of prematurity (ROP). **Methods** A mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR) was established under the hyperoxia environment. Meanwhile, normal mice at the same age were used as a control group. Through the next-generation sequencing (NGS), the differential lncRNAs related to the abnormal development of the retina in OIR mice were screened out. The differentially expressed genes detected by the chip and the coding genes that were predicted to be the targets of differential lncRNAs were intersected for GO analysis and pathway analysis. Then, qPCR method was used to validate the differentially expressed target genes. LncRNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (Neat1) was analyzed by the UCSC genome browsing tool. The levels of Neat1 and retinal degeneration protein 3 (RD3) in the retina of OIR mice, and in the blood of ROP children were detected with qPCR. The content of cyclic GMP (cGMP) in the blood of ROP children and the retina of OIR mice were measured by radioimmunoassay. **Results** According to NGS results, Neat1 was differentially expressed in the retina of OIR mice, which was consistent with the results of qPCR validation. Bioinformatic results predicted that RD3 might be a regulatory target of Neat1, and RD3 gene was found at the downstream of mouse Neat1 sequence. Compared with those in the control groups, increased Neat1 levels were seen, while cGMP were highly expressed but RD3 was lowly expressed in the blood of ROP children, and the retina of OIR mice. **Conclusions** lncRNA Neat1 may cause the degeneration of retinal photoreceptor cells through the Neat1/RD3/cGMP pathway under the mediation of RD3.

基金项目:淮安市自然科学研究计划项目(HAB201807)

* 通信作者, E-mail: wen103@sina.com

Key words: long non-coding RNA; Neat1; retinal degeneration protein 3; oxygen-induced retinopathy; photoreceptor cell degeneration

早产儿视网膜病 (retinopathy of prematurity, ROP) 是早产儿最常见的并发症之一。近年来随着呼吸机和肺泡表面活性物质的广泛应用, 早产儿的存活率明显提高, ROP 发生率显著增加^[1-2]。在世界范围内, ROP 已成为小儿失明的主要原因^[3]。研究显示, ROP 的视觉损害不仅与视网膜血管的异常增生有关, 而且与感光细胞的变性有关^[4]。但在 ROP 的治疗领域, 针对视网膜感光细胞变性的研究目前少有报道。本研究拟通过二代测序技术 (next-generation sequencing, NGS), 筛选出氧诱导视网膜病 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 感光细胞变性差异表达的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), 探讨 lncRNA Neat1 导致 OIR 感光细胞变性的分子机制, 以期对 ROP 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物和分组 60 只 C57BL/6J SPF 新生小鼠, 雌雄不限, 购自南京医科大学医药实验动物中心。将上述小鼠随机分为 OIR 组和对照组 (Control), 每组 30 只。根据课题组既往研究采集视网膜标本, 构建 OIR 模型^[5]。相关动物实验操作经南京医科大学实验动物福利伦理委员会审查批准。

1.2 血液样本收集 回顾性选取 2019 年 7 月—2020 年 6 月南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科住院的 5 例 ROP 患儿作为 ROP 组, 其中女 2 例, 男 3 例, 纠正月龄 30~37 周, 平均胎龄 (33±4) 周。此外, 选取同期 5 例住院的非 ROP 患儿作为对照 (Control) 组。纳入标准: ①早产儿, 胎龄 27~34 周, 适于胎龄儿, 符合 ROP 诊断标准^[3]; ②早产儿母亲无高血压、糖尿病、肾脏疾病等慢性病, 无妊娠合并症, 无吸烟、酗酒、吸毒或药物滥用史。排除标准: 患有颅内出血、缺血缺氧性脑病、新生儿坏死性小肠结肠炎、先天性发育畸形、染色体异常、遗传代谢性疾病等严重疾病。

1.3 lncRNA 筛选与分析 OIR 组和 Control 组小鼠各取至少 30 个视网膜, 应用 NGS, 筛选出与 OIR 小鼠视网膜发育异常相关的差异 lncRNA, 并将其与临近的 mRNA 取交集进行 GO 分析、Pathway 分析。随后进行 lncRNA 与蛋白编码基因的位置关系和表达相关性分析, 预测 lncRNA 的靶基因。利用 qPCR

法对差异表达的 lncRNA Neat1 进行验证^[6]。通过 UCSC 基因组浏览工具分析 lncRNA 靶基因的特征 (测序公司: 北京诺禾致源科技股份有限公司; 平台名称: illumina novaseq6000, 测序方式 PE150, 数据量是 12G)。

1.4 qRT-PCR 使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA, 并使用无 RNase 的 DNase 试剂盒 (Qiagen) 去除可能存在的 DNA。按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 随后按照 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒说明书进行扩增。相关引物序列如下: Neat1, 5'-TGGAGATTGAAGGCGCAAGT-3' 和 5'-ACCACA-GAAGAGGAAGCACG-3'; GAPDH, 5'-AAGAGG-GATGCTGCCCTTAC-3' 和 5'-TACGGCCAAATC-CGTTCACA-3'; RD3, 5'-CCTCAGAACTTTGTCCCT-GTCAGCCA-3' 和 5'-GGTGATTGCCCTGGGTGGT-CAGT-3'。

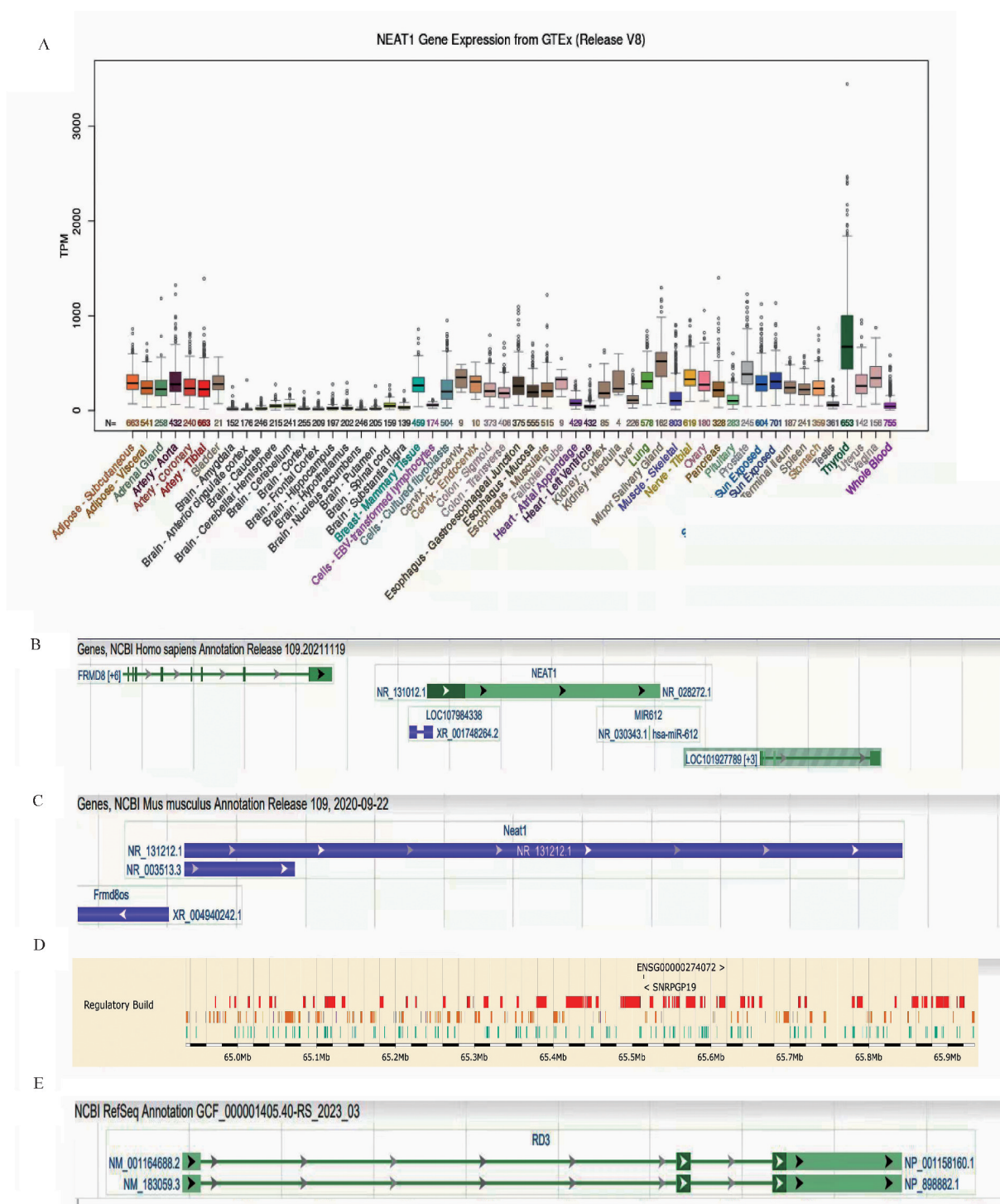
1.5 放射免疫法 取 ROP 患儿血液样本和 OIR 小鼠视网膜组织, 按照鸟苷酸环化酶 (Gucy) 试剂盒 (北京华英生物技术研究所) 说明书采用放射免疫法检测环磷酸鸟苷 (cGMP) 含量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用 *t* 检验或方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

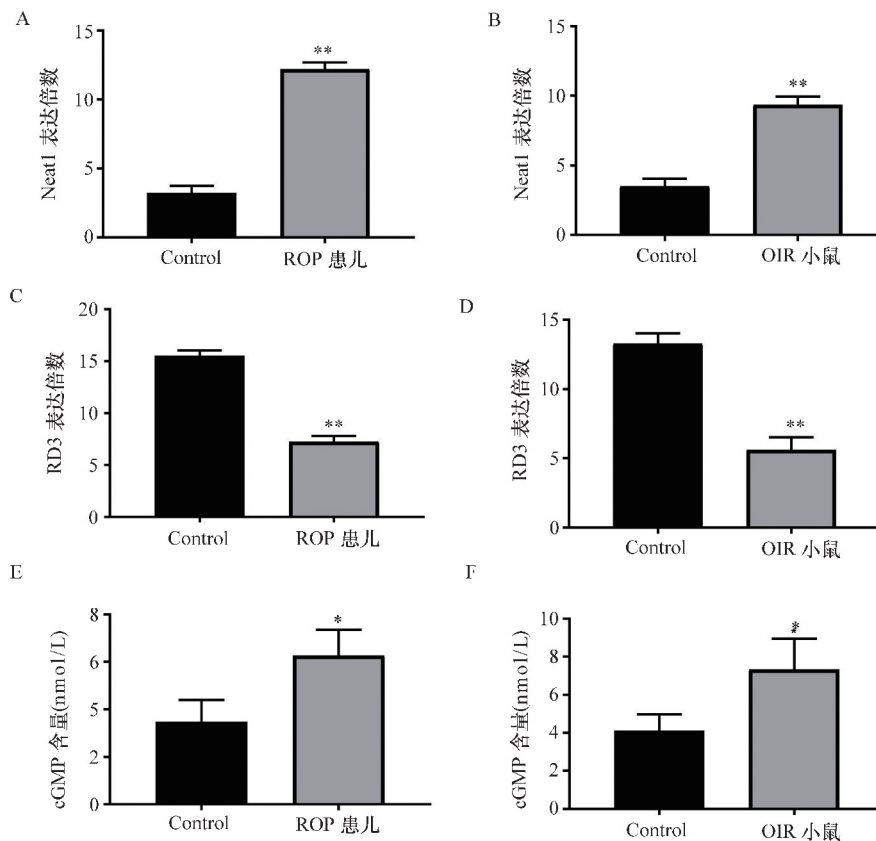
2.1 OIR 相关差异 lncRNA 的筛选和验证 OIR 组小鼠视网膜组织中的 lncRNA 表达与 Control 组存在较大差异 (图 1A、1B)。我们对差异倍数较大、组内差异较小的 lncRNA Neat1 进行 qPCR 验证, 结果与 NGS 结果一致 (图 1C)。为了证实 lncRNA 验证芯片结果的可靠性, 我们采用 qPCR 法对其他差异表达的 lncRNA 进行验证, 结果见图 1D。

2.2 OIR 相关差异 lncRNA 潜在靶标基因的 GO 和 Pathway 分析 对芯片检测到的差异表达基因及同时又被预测为差异 lncRNA 可能调控靶标的编码基因, 取交集进行 GO 分析和 Pathway 分析。结果显示, 差异 lncRNA 潜在靶标基因与光信号转导、神经细胞变性密切相关, 并涉及 Gucy/cGMP/CNG (环化核苷酸阳离子门控通道) 等多条与感光细胞变性相关的信号通路, 与所检样本的疾病性质相吻合。



A. Neat1 在各器官组织中的分布情况; B. 人 Neat1 序列; C. 小鼠 Neat1 序列; D. Neat1 所在染色体区域顺时作用元件结合位置; E. Neat1 基因下游 RD3 基因序列

图 2 Neat1 生物信息学分析



A、B. ROP 患儿血液和 OIR 小鼠视网膜组织中 Neat1 的 mRNA 水平; C、D. ROP 患儿血液和 OIR 小鼠视网膜组织中 RD3 表达; E、F. ROP 患儿血液和小鼠视网膜组织中 cGMP 表达, 与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 ROP 患儿血液和 OIR 小鼠视网膜组织中 Neat1、RD3、cGMP 表达情况

3 讨论

目前,针对 ROP 治疗的研究主要集中于视网膜血管的异常增生^[7]。抗血管内皮细胞生长因子等药物不能改善或逆转感光细胞的变性,无法从根本上解决视觉受损。研究表明,lncRNA 能在表观遗传、转录及转录后水平调控基因表达,与人类疾病的发生、发展和防治密切相关^[8]。lncRNA 功能失调与肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病等多种疾病的发生和发展有关^[9-10]。小鼠视网膜存在 18 种高度保守的 lncRNA,其中 ENSMUST00000052354 等共 16 种在人与小鼠中共表达,在视网膜黄斑区存在 14 种^[11],这为研究 ROP 患儿 lncRNA 的差异表达奠定了理论基础^[12]。研究显示,lncRNA Six3OS 参与小鼠视网膜的定向分化^[13],lncRNA Vax2os1 参与调节小鼠视网膜感光细胞的细胞周期^[14]。Huang 等^[15]研究发现,NR_033585 和 lincRNA:chr8:129102060-129109035 在有无血管浸润的眼角膜之间存在差异

表达。而 ROP 的病理机制恰与视网膜组织新生血管密切相关。本研究中,我们通过 NGS 分析发现,OIR 小鼠视网膜中 lncRNA Neat1 差异表达。Neat1 定位于细胞核,其表达受氧浓度等多种因素影响,参与神经变性、肿瘤、感染等过程。Neat1 与多种肿瘤的侵袭性及预后密切相关^[16],可作为一种新型炎症调节因子通过 MAPK 途径在人狼疮中发挥作用^[17],在病毒感染、免疫调节等方面均发挥重要的作用^[18]。近年来发现,Neat1 与神经细胞变性密切相关^[19],但目前少有关于 Neat1 与 ROP 相关性的研究。cGMP 是负责脊椎动物视网膜的视杆细胞、视锥细胞光转导的第二信使,由 Gucy 以及颗粒酶等合成^[20]。而 RD3 是 Gucy 运输感光细胞所必需的。正常情况下,黑暗条件下视杆细胞(或视锥细胞)中 cGMP 浓度较高,CNG 开放,钙离子内流,引起膜去极化,突触持续向次级神经元释放递质。视紫红质(rhodopsin, Rh)是一种 7 次跨膜蛋白,含 1 个 11 顺-视黄醛,是视觉感受器中的 G 蛋白偶联型受体。

光照使 Rh 的构象变为反式, Rh 分解为视黄醛和视蛋白 (opsin), 视蛋白构象改变后激活转导蛋白 (transducin, Gt), Gt 蛋白激活 cGMP 磷酸二酯酶, 将细胞中的 cGMP 水解, 从而关闭钠通道, 引起细胞超极化, 产生视觉^[21]; 胞内 cGMP 水平下降的负效应信号起传递光刺激的作用。当感光细胞外节段 cGMP 蓄积, CNG 持续开放, 阳离子过度内流, 可致感光细胞变性^[22]。生物信息学预测, RD3 可能是 Neat1 的靶基因。RD3 在感光细胞中结合至 Gucy 的 C'末端, 介导 Gucy 从感光细胞的内质网输出到内涵体囊泡, 通过 Gucy/cGMP/CNG 信号通路调节感光细胞的变性与存活^[23]。本研究结果显示, ROP 患儿血液、OIR 小鼠视网膜中 Neat1 表达均显著提高, RD3 表达下降, cGMP 表达增加。因此, 我们推测 Neat1 可致感光细胞发生变性, 并通过 RD3/Gucy/cGMP/CNG 信号通路发挥效应, 有待进一步验证。综上, lncRNA Neat1 可致 OIR 感光细胞发生变性, 相关结果将为 ROP 的治疗提供新的思路及理论依据。

参考文献:

- [1] Hellström A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity [J]. *Lancet*, 2013, 382(9902): 1445-1457.
- [2] Shrestha JB, Bajimaya S, Sharma A, et al. Incidence of retinopathy of prematurity in a neonatal intensive care unit in Nepal [J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2010, 47: 297-300.
- [3] Fierston WM, American Academy of Pediatrics Section on Ophthalmology, American Academy of Ophthalmology, et al. Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity [J/OL]. *Pediatrics*, 2018, 142(6): e20183061.
- [4] Narayanan SP, Xu Z, Putluri N, et al. Arginase 2 deficiency reduces hyperoxia-mediated retinal neurodegeneration through the regulation of polyamine metabolism [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 20(5): e1075.
- [5] Zhou WD, Wang LL, Zhou LB, et al. All-trans retinoic acid upregulates the expression of ciliary neurotrophic factor in retinal pigment epithelial cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35(4): 202-208.
- [6] Zhong W, Yang J, Li M, et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes the growth of human retinoblastoma cells via regulation of miR-204/CXCR4 axis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11567-11576.
- [7] Hansen RM, Moskowitz A, Akula JD, et al. The neural retina in retinopathy of prematurity [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017(1): 56: 32-57.
- [8] Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: Past, present, and future [J]. *Genetics*, 2013, 193(3): 651-669.
- [9] Ulitsky I, Bartel DP. LincRNAs: Genomics, evolution, and mechanisms [J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46.
- [10] Jaé N, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in diabetic retinopathy [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1104-1106.
- [11] Luo H, Sun S, Li P, et al. Comprehensive characterization of 10,571 mouse large intergenic noncoding RNAs from whole transcriptome sequencing [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70835.
- [12] Lin S, Lin Y, Nery JR, et al. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(48): 17224-17229.
- [13] Tan JY, Vance KW, Varela MA, et al. Cross-talking noncoding RNAs contribute to cell-specific neurodegeneration in SCA7 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(11): 955-961.
- [14] Meola N, Pizzo M, Alfano G, et al. The long noncoding RNA Vax2os1 controls the cell cycle progression of photoreceptor progenitors in the mouse retina [J]. *RNA*, 2012, 18(1): 111-123.
- [15] Huang J, Li YJ, Liu JY, et al. Identification of corneal neovascularization-related long noncoding RNAs through microarray analysis [J]. *Cornea*, 2015, 34(5): 580-587.
- [16] Zhang P, Cao L, Zhou R, et al. The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages [J/OL]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1495.
- [17] Zhang F, Wu L, Qian J, et al. Identification of the long noncoding RNA NEAT1 as a novel inflammatory regulator acting through MAPK pathway in human lupus [J]. *J Autoimmun*, 2016, 75: 96-104.
- [18] Wei S, Du M, Jiang Z, et al. Long noncoding RNAs in regulating adipogenesis: New RNAs shed lights on obesity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(10): 2079-2087.
- [19] Sunwoo JS, Lee ST, Im W, et al. Altered expression of the long noncoding RNA NEAT1 in Huntington's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(2): 1577-1586.
- [20] Baehr W, Karan S, Maeda T, et al. The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 8837-8847.
- [21] Xu J, Morris L, Thapa A, et al. cGMP accumulation causes photoreceptor degeneration in CNG channel deficiency: Evidence of cGMP cytotoxicity independently of enhanced CNG channel function [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(37): 14939-14948.
- [22] Tosi J, Davis RJ, Wang NK, et al. shRNA knockdown of guanylate cyclase 2e or cyclic nucleotide gated channel alpha 1 increases photoreceptor survival in a cGMP phosphodiesterase mouse model of retinitis pigmentosa [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(8): 1778-1787.
- [23] 刘敏, 刘苏, 王志刚, 等. 超声微泡介导 CNTF 基因眼内转染对视神经损伤大鼠作用的研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29(4): 303-307.

收稿日期: 2022-09-22 修回日期: 2023-06-10

本文编辑: 郭昊