

黄润英,范智利,肖吉群,等. miR-20a-5p 调节 VEGF 通路在氧诱导视网膜病变小鼠模型中的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 83-88.

Huang RY, Fan ZL, Xiao JQ, et al. The mechanism of miR-20a-5p regulating VEGF pathway in the mouse model of retinopathy of prematurity [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 83-88.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 05. 014

miR-20a-5p 调节 VEGF 通路在氧诱导视网膜病变小鼠模型中的作用机制

黄润英,范智利,肖吉群,郑巍,蔡强*

(宜宾市第二人民医院儿科, 四川 宜宾 644000)

【摘要】 目的 探讨微小 RNA (miR)-20a-5p 调节血管内皮生长因子 (VEGF) 通路在氧诱导视网膜病变 (OIR) 小鼠中的作用机制。**方法** 实验分为正常组、模型组、高氧对照组、miR-20a-5p 高表达组, 每组 24 只。除正常组外, 其余组小鼠在出生后第 7 天置于氧浓度 (75.00±2.00)% 氧箱中建立 OIR 小鼠模型, 连续高氧环境 5 d 后置于常氧中饲养。高氧环境结束前 1 d, 高氧对照组玻璃体腔内注射 1 μL 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), miR-20a-5p 高表达组玻璃体腔内注射 1 μL miR-20a-5p 激动剂 (miR-20a-5p agomir) (1 μmol/L), 模型组不进行任何处理。正常组一直置于空气中正常饲养。高氧结束后各组小鼠正常空气再饲养 5 d 进行实验。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测视网膜组织 miR-20a-5p、VEGF、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)-1、VEGFR-2 表达情况; 视网膜铺片观察视网膜血管形态; 苏木精-伊红 (HE) 染色计数视网膜新生血管内皮细胞核情况; 免疫组化检测视网膜组织中 VEGF 阳性细胞情况。**结果** 模型组和高氧对照组在出生第 17 天自视盘向周围发出的放射状大血管迂回、不规则扩张, 出现大量新生血管, 且新生血管结构及分布紊乱, 周边毛细血管网闭塞; miR-20a-5p 高表达组相较模型组和高氧对照组在出生第 17 天自视盘向周围发出的放射状大血管迂回不明显, 血管不规则扩张现象减轻, 新生血管明显减少。与正常组相比, 模型组、高氧对照组视网膜组织中 miR-20a-5p 水平降低 ($P<0.05$), 视网膜血管内皮细胞核数量、VEGF 蛋白阳性面积百分比、视网膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$); 分别与模型组、高氧对照组相比, miR-20a-5p 高表达组视网膜组织中 miR-20a-5p 水平升高 ($P<0.05$), 视网膜血管内皮细胞核数量、VEGF 蛋白阳性面积百分比、视网膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$)。**结论** 升高 miR-20a-5p 可抑制 VEGF 通路从而减少 OIR 小鼠视网膜血管新生, 实现对 OIR 小鼠视网膜的保护。

【关键词】 微小 RNA-20a-5p; 血管内皮生长因子; 氧诱导视网膜病变

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0083-06

The mechanism of miR-20a-5p regulating VEGF pathway in the mouse model of retinopathy of prematurity

HUANG Runying, FAN Zhili, XIAO Jiqun, ZHENG Wei, CAI Qiang*

(Department of Paediatrics, the Second People's Hospital of Yibin City,
Yibin 644000, China)

【基金项目】 四川省计划科研课题 (150253)。

【作者简介】 黄润英 (1971—), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 新生儿专业。E-mail: pqr5tm@163.com

【通信作者】 蔡强 (1966—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 儿科血液专业。E-mail: pqk6do@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of microRNA (miR)-20a-5p in the regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in mice with oxygen-induced retinopathy (OIR). **Methods** Mice were divided into a normal group, model group, hyperoxia control group, and miR-20a-5p high expression group, with 24 mice in each group. With the exception of the normal group, the mice were placed in an oxygen tank with $(75.00 \pm 2.00)\%$ oxygen concentration beginning postnatal day 7 to establish the OIR model, and after 5 days of continuous hyperoxia environment, they were returned to normal air conditions. At 1 day before the end of the hyperoxia environment, 1 μL phosphate buffered saline was injected into the vitreous cavity of the hyperoxia control group, 1 μL miR-20a-5p agomir (1 $\mu\text{mol/L}$) was injected into the vitreous cavity of the high expression group, and the model group received nothing. The normal group was kept in normal air conditions. The experiment was carried out after the mice were exposed to normal air for 5 more days. The expressions of miR-20a-5p, VEGF, VEGF receptor (VEGFR)-1 and VEGFR-2 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, retinal vascular morphology was observed by retinal patch, hematoxylin and eosin staining was used to count the endothelial cells of retinal neovascularization, and VEGF-positive cells were detected by immunohistochemistry. **Results** In the model group and hyperoxia control group, on postnatal day 17, the large radial blood vessels extending from the optic disc were round and irregular. There were many new blood vessels; the structure and distribution of neovascularization were disordered and the capillary network was occluded. Compared with the model group and the hyperoxia control group, the miR-20a-5p high expression group had no obvious circuitous radial vasculature and had less irregular vascular expansion and neovascularization. Compared with those in the normal group, the retinal miR-20a-5p levels in the model group and hyperoxia control group were lower ($P < 0.05$), and the number of nuclei in retinal vascular endothelium, VEGF protein-positive area percentage, and expressions of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 mRNAs in retina were higher ($P < 0.05$). Compared with those in the model group and the hyperoxia control group, the retinal miR-20a-5p level in the miR-20a-5p high expression group was lower ($P < 0.05$), and the number of nuclei in retinal vascular endothelium, VEGF protein-positive area percentage, and expressions of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 mRNAs in retina were higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Increasing miR-20a-5p inhibited the VEGF pathway and decreased retinal neovascularization in OIR mice, which may protect the retina of OIR mice.

【Keywords】 microRNA-20a-5p; vascular endothelial growth factor; retinopathy of prematurity

病理性新生血管增生造成的早产儿眼部疾病,已成为当今发展中国家和发达国家儿童失明的主要原因,氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)小鼠模型是目前与新生血管增生较为类似模型,且最常见^[1];及早治疗可有效改善视功能,目前抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗已具有满意效果^[2],合适的抗 VEGF 是治疗的关键。多种促血管微小 RNA(microRNA, miRNA)和抗血管 miRNA 共同调控血管新生,引起 VEGF 异常表达^[3]。miR-20a-5p 是 miR-17-92 家族成员之一,抑制 miR-17、miR-20 可增加血管生成^[4],miR-20a-5p 表达水平影响炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡、组织修复、细胞外基质重塑、血管新生以及恶性病变等多种病理机制^[5],且在第 37 届圣安东尼奥乳腺癌研讨会上已作为抗 VEGF 因子用于治疗乳腺癌^[6],但是否可用于 OIR 治疗尚不清楚。因此,建立 OIR 模型,观察 miR-20a-5p 对 OIR 小鼠的影响并初步探讨其机制,

为 OIR 靶向治疗提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级 96 只 C57BL/6J Nifdc 新生小鼠 7 日龄,体重 $(5.2 \pm 0.5)\text{g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)-20180045],雌雄不限。所有动物在宜宾市第二人民医院动物饲养中心动物饲养[SYXK(京)-2019-0105],并经本院伦理委员会批准(IACUC-20190018),实验过程符合 3R 原则,且遵守视觉与眼科学研究会制定的关于科研动物规范。

1.2 主要试剂与仪器

miR-20a-5p agomir 购自广州锐博生物科技有限公司;引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成;实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒购自赛默飞世尔,货号:K1622;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自碧云天科技有限公司,货号:C0105;VEGF 抗体购自英

国 abcam 公司,货号:ab32152;眼科裂隙灯显微镜购自意大利 CSO 公司,型号:SL990/SL980;氧箱购自宁波华仪宁创智能科技有限公司,型号:Attendor-110pro;qRT-PCR 仪购自美国 ABI 公司,型号:ViiA7。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及 OIR 小鼠模型建立

实验前对所有小鼠在眼科裂隙灯显微镜下检查眼部,均未发现异常。实验分为正常组、模型组、高氧对照组、miR-20a-5p 高表达组,每组 24 只。除正常组外,其余各组参照文献^[7]在出生后第 7 天建立 OIR 小鼠模型,测氧仪时刻监测氧浓度,小鼠置于氧浓度(75.00±2.00)%氧箱中,12 h 光照 12 h 黑暗,高氧环境 5 d 后置于常氧中饲养,在高氧环境结束前一天(出生后第 11 天)开始,每组左眼作为阴性对照,右眼高氧对照组玻璃体腔内注射 1 μ L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS),miR-20a-5p 高表达组右眼玻璃体腔内注射 1 μ L miR-20a-5p 激动剂(miR-20a-5p agomir)(1 μ mol/L),处理完后立即置于氧箱中,模型组不进行任何处理,1 d 后所有小鼠出氧箱。正常组小鼠一直置于空气中正常饲养。高氧环境结束后各组小鼠正常空气再饲养 5 d(出生后第 17 天)进行实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测视网膜组织 miR-20a-5p、VEGF、血管内皮生长因子受体(VEGF receptor, VEGFR)-1、VEGFR-2 表达情况

每组随机取 8 只小鼠,右眼取视网膜组织,剪碎,加 TRIzol 裂解。氯仿、异丙醇法提取总 RNA,并反转录为 cDNA,参照 qRT-PCR 试剂盒说明操作进行实验。引物序列:miR-20a-5p F:5'-ATGCTAAA GTGCTTATAGT-3'、R:5'-CAGTGCAGGGTCCGAG GTATTC-3', U6 F:5'-CGCTTCGGCAGCAGCACA TATAC-3'、R:5'-AATTTGCGTGTCTATCCTTGC-3', VEGF F:5'-GCTCTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCA-3'、R:5'-GACCCTGCTGGACATCTTCCAG GAGTACCC-3', VEGFR-1 F:5'-CCACCTCCAT GTTTGAAGAC-3'、R:5'-TACCAGCAGTCTGCTG ACCTCCCC-3', VEGFR-2 F:5'-CTCCATCTTTT GGTGGGATG-3'、R:5'-AGGCCACAGACTCCCTG CTTTACTG-3', β -actin F:5'-AAGACCTCTATG CCAACACAG-3'、R:5'-GGAGGAGCAATGATCTTG ATC-3'。上样体系均为 20 μ L;cDNA 1 μ L(50 ng/ μ L),F/R(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,2×Mix 10 μ L, ddH₂O 8.0 μ L。反应条件:95℃、10 min;95℃、15 s, 62℃、30 s(miR-20a-5p)/60 s(VEGF、VEGFR-1、

VEGFR-2),40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-20a-5p、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 表达水平。

1.3.3 视网膜铺片观察视网膜血管形态

每组随机取 8 只小鼠,右眼进行视网膜铺片。1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,左心室灌注 4%多聚甲醛 5 min 立即摘除右眼并固定,去除眼前节,保留完整视网膜组织。经漂洗、孵育、显色、甘油明胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.3.4 HE 染色计数视网膜新生血管内皮细胞核情况

每组剩余 8 只小鼠立即处死并摘取右眼,经 4%多聚甲醛固定,切片后部分经脱蜡、复水、染色,再脱水、透明、封片进行 HE 染色。随机、双盲法显微镜下计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数量。且仅计数与内界膜有紧密联系的细胞核,不计数与内界膜无联系的血管内皮细胞核。

1.3.5 免疫组化检测视网膜组织中 VEGF 阳性细胞情况

1.3.4 中切片同 HE 方法脱蜡、复水步骤,热修复抗原、5%脱脂奶粉封闭后,滴加一抗 VEGF(阴性对照用同型同种鼠 IgG 代替一抗)2 h,滴加二抗 20 min 后 DAB 显色,苏木素复染核,分色、脱水、透明、封片。光学显微镜拍照。每张切片在高倍显微镜下随机选择 10 个视野,采用 MetaMorph/Evolution MP5.0/BX51 分析软件测量阳性细胞积分光密度(integrated od total, IOD)值。阳性面积百分比=IOD/总面积×100%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先采用单因素方差分析各组间总体比较,若存在差异则使用 SNK-*q* 检验行组间两两比较。 $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-20a-5p 在各组小鼠视网膜组织中表达情况

与正常组相比,模型组、高氧对照组视网膜组织中 miR-20a-5p 水平降低($P < 0.05$);分别与模型组、高氧对照组相比,miR-20a-5p 高表达组视网膜组织中 miR-20a-5p 水平升高($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 miR-20a-5p 对小鼠视网膜血管形态的影响

正常组小鼠视网膜血管基本成熟,自视盘向周围发出放射状大血管,呈均匀分布,分支状态良好

延伸至视网膜周边部位。模型组和高氧对照组自视盘向周围发出的放射状大血管迂回、不规则扩张,出现大量新生血管,新生血管结构及分布紊乱,且周边毛细血管网闭塞。miR-20a-5p 高表达组自视盘向周围发出的放射状大血管迂回不明显、不规则扩张减轻,新生血管明显减少。见图 1。

2.3 miR-20a-5p 对小鼠新生血管内皮细胞核数量的影响

与正常组相比,模型组、高氧对照组视网膜血管内皮细胞核数量升高($P < 0.05$);分别与模型组、高氧对照组相比,miR-20a-5p 高表达组视网膜血管内皮细胞核数量降低($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

表 1 4 组小鼠视网膜组织中 miR-20a-5p 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of miR-20a-5p expression in retina of mice in 4 groups

组别 Groups	miR-20a-5p
正常组 Normal group	1.01±0.14
模型组 Model group	0.42±0.06 [#]
高氧对照组 Hyperoxia control group	0.43±0.05 [#]
miR-20a-5p 高表达组 miR-20a-5p overexpression group	1.38±0.15 ^{* &}
<i>F</i>	146.368
<i>P</i>	0.000

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$;与高氧对照组相比,[&] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with hyperoxia control group, [&] $P < 0.05$.

2.4 miR-20a-5p 对小鼠视网膜组织中 VEGF 阳性细胞的影响

VEGF 阳性表达呈棕黄色,模型组和高氧对照组主要存在视网膜内界膜附近、神经节细胞层和内核层。miR-20a-5p 高表达组主要存在神经节细胞层和内核层。与正常组相比,模型组、高氧对照组视网膜中 VEGF 蛋白阳性面积百分比升高($P < 0.05$);分别与模型组、高氧对照组相比,miR-20a-5p 高表达组视网膜中 VEGF 蛋白阳性面积百分比降低($P < 0.05$)。见图 3、表 3。

表 2 4 组小鼠视网膜血管内皮细胞核数量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of nuclear number of retinal vascular endothelial cells in 4 groups

组别 Groups	血管内皮细胞核(个) Endothelial cell nucleus (<i>n</i>)
正常组 Normal group	3.16±0.16
模型组 Model group	25.35±3.15 [#]
高氧对照组 Hyperoxia control group	25.94±3.47 [#]
miR-20a-5p 高表达组 miR-20a-5p overexpression group	16.48±2.18 ^{* &}
<i>F</i>	135.347
<i>P</i>	0.000

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$;与高氧对照组相比,[&] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with hyperoxia control group, [&] $P < 0.05$.

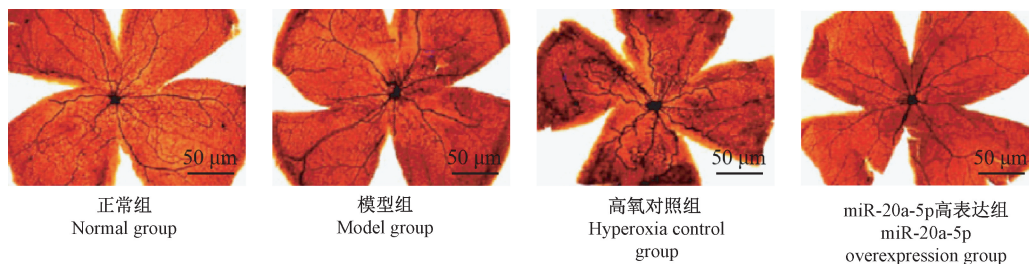


图 1 4 组小鼠视网膜血管形态情况

Figure 1 The morphology of retinal vessels in 4 groups

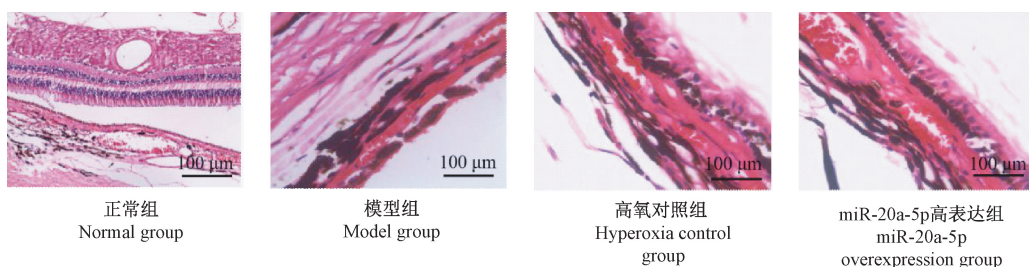


图 2 4 组小鼠视网膜形态情况(HE 染色)

Figure 2 Retinal morphology of the 4 groups of mice(HE staining)

2.5 miR-20a-5p 对小鼠视网膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 水平的影响

与正常组相比,模型组、高氧对照组视网膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$);分别与模型组、高氧对照组相比,miR-20a-5p 高表达组视网膜中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$)。见表 4。

3 讨论

OIR 表现为局部新生血管生成,会导致牵拉性视网膜脱落、并发性白内障、继发性青光眼等,还可引起斜视、弱视等并发症,影响患儿健康^[8]。本研究发现,与正常组相比,模型组小鼠视网膜组织视盘向周围发出的放射状大血管迂回、不规则扩张,

表 3 4 组小鼠视网膜中 VEGF 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Comparison of VEGF protein expression in retina of 4 groups

组别 Groups	阳性面积百分比 (%)
正常组 Normal group	3.15±0.46
模型组 Model group	63.85±13.05 [#]
高氧对照组 Hyperoxia control group	65.03±12.34 [#]
miR-20a-5p 高表达组 miR-20a-5p overexpression group	13.15±3.51 ^{*&}
<i>F</i>	102.470
<i>P</i>	0.000

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与高氧对照组相比,[&] $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with hyperoxia control group, [&] $P < 0.05$.

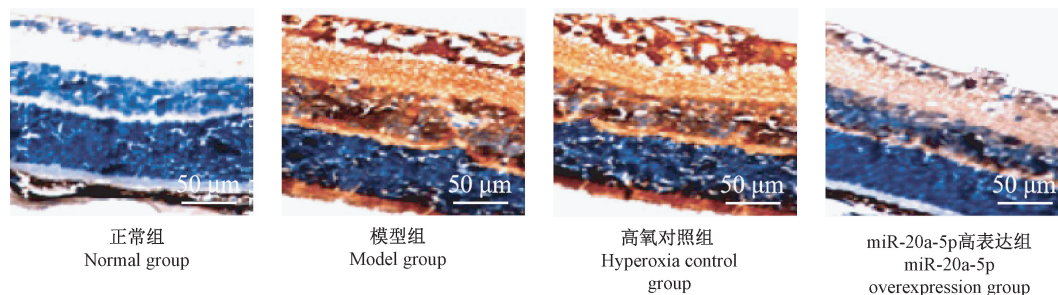


图 3 4 组小鼠视网膜 VEGF 蛋白表达情况 (免疫组化染色)

Figure 3 expression of VEGF protein in retina of 4 groups (immunohistochemical staining)

表 4 4 组小鼠视网膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Comparison of mRNA expression levels of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in retina of mice in 4 groups

组别 Groups	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2
正常组 Normal group	0.98±0.15	0.99±0.14	1.00±0.15
模型组 Model group	4.15±0.31 [#]	2.75±0.25 [#]	1.98±0.08 [#]
高氧对照组 Hyperoxia control group	4.17±0.29 [#]	2.76±0.24 [#]	1.96±0.12 [#]
miR-20a-5p 高表达组 miR-20a-5p overexpression group	1.38±0.25 ^{*&}	1.93±0.17 ^{*&}	1.32±0.09 ^{*&}
<i>F</i>	360.406	134.053	146.822
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与高氧对照组相比,[&] $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with hyperoxia control group, [&] $P < 0.05$.

大血管出现混乱,可能影响功能,促使出现大量新生血管,新生血管结构及分布紊乱,且周边毛细血管网闭塞,新生血管短暂时间内补偿大血管功能;但新生血管会破坏视网膜原有功能,诱发疾病。及时有效的治疗是减少该病致盲的主要方法。

VEGF 被认为是启动新生血管最为重要的细胞因子,可选择性地增强血管内皮细胞和淋巴管细胞的有丝分裂,促进内皮增生、迁移和分化,同时抑制内皮细胞老化和抗凋亡^[9];可增加小静脉通透性,促使血浆大分子外渗,外渗蛋白可形成纤维蛋白原,从而支持内皮细胞生长,为建立新生血管网提供可能^[10]。VEGFR 作为 VEGF 受体,属跨膜酪氨酸激酶受体,其中 VEGFR1 可介导内皮细胞迁移从而促进血管新生^[11];VEGFR2 是 VEGF 介导血管生成的主要受体,激活 VEGFR2 可促进内皮细胞分裂、增殖,进而促进血管生成^[12]。在 OIR 中抑制 VEGF 的表达可抑制 VEGFR2 的表达^[13]。本研究发现,与正常组相比,模型组 VEGF 阳性表达呈棕黄色,主要存在视网膜内界膜附近、神经节细胞层和内核层,VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA 水平升高,提示在 OIR 视网膜组织中 VEGF 及其受体均处于激活状态,VEGF 结合其受体增加小静脉通透性,促使血浆大分子外渗,外渗蛋白加速形成纤维蛋白原,加速内皮细胞迁移、生长过程,促进内皮细胞增生,加速新生血管生成,进而影响视网膜功能。

抗 VEGF 已经成为治疗 ROP 的重要靶位点之一^[14]。眼科血管疾病靶向治疗中主要策略为抗 VEGF 抑制剂和 miRNA 为核心的基因治疗^[15],其中 miRNA 作为单链小分子非编码 RNA,参与转录后基因调控,在真核生物中存在广泛,且高度保守;构建 miRNA 模拟物或抑制剂调节信号通路、靶基因等,抑制 VEGF 通路或其受体表达可达到治疗疾病目的^[16-17]。miR-17-92 基因簇在人和小鼠的多种组织中广泛表达,包括 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b-1、miR-20a、miR-92-1^[18]。miR-17 和 VEGF 在血管性痴呆中关系密切,影响血管受损后修复、神经元损伤等过程^[19]。miR-20a 与血管新生关系密切,调节 miR-20a 水平可以影响血管新生状况^[20]。本研究发现,OIR 视网膜组织中 miR-20a-5p 表达降低,升高 miR-20a-5p 后可抑制视网膜组织中 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 mRNA 水平,降低视网膜血管内皮细胞核数量,使放射状大血管迂回不明显,血管不规则扩张现象减轻,新生血管明显减少,从而改善血管状态。

综上所述,miR-20a-5p 可能抑制 VEGF 通路减少 OIR 小鼠视网膜血管新生,亦可能影响其他信号通路,从而减少 OIR 小鼠视网膜血管新生,为 OIR 靶向治疗提供一定参考。

参考文献:

- [1] 杨宁,邢怡桥.氧诱导视网膜病变动物模型[J].中华实验眼科杂志,2018,36(1):61-64.
- [2] 方思文.早产儿视网膜病变的治疗[J].中华实验眼科杂志,2020,38(1):77-80.
- [3] 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.
- [4] 齐小娟,杨万勇,李涛. miR-17-92 基因簇与肿瘤血管生成关系的研究进展 [J]. 广东医学, 2016, 37(6): 942-944.
- [5] Zhao W, Geng D, Li S, et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer [J]. Cancer Med, 2018, 7(3): 842-855.
- [6] Gampenrieder SP, Hamacher F, Rinnerthaler G, et al. Abstract P4-07-03: MicroRNAs correlating with outcome in patients treated with first-line bevacizumab for metastatic breast cancer [C]. San Antonio: 37th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2014: 9-13.
- [7] 底煜,杨颀,陈晓隆. MMP-9 在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(5): 409-413.
- [8] 何俐莹,岑超,陶雪莹,等. 新生儿中早产儿视网膜病变患病情况分析 [J]. 重庆医学, 2019, 48(6): 1029-1031.
- [9] Rao L, De Veirman K, Giannico D, et al. Targeting angiogenesis in multiple myeloma by the VEGF and HGF blocking DARPIn © protein MP0250: a preclinical study [J]. Oncotarget, 2018, 9(17): 13366-13381.
- [10] Bhatt AR, Chan RVP, Reynolds JD, et al. Management of recurrent retinopathy of prematurity following Anti-VEGF injection [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 2019, 56(2): 68-70.
- [11] Istrate M, Mihu C, Şuşman S, et al. Highlighting the R1 and R2 VEGF receptors in placentas resulting from normal development pregnancies and from pregnancies complicated by preeclampsia [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(1): 139-146.
- [12] Chen H, Cong Q, Du Z, et al. Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth *in vivo* by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling [J]. Cancer Lett, 2016, 382(1): 44-52.
- [13] Han XK, Kong J, Hartnett ME, et al. Enhancing retinal endothelial glycolysis by inhibiting UCP2 promotes physiologic retinal vascular development in a model of retinopathy of prematurity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(5): 1604-1613.
- [14] Bhatt AR, Chan RVP, Reynolds JD, et al. Management of recurrent retinopathy of prematurity following anti-VEGF injection [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 2019, 56(2): 68-70.
- [15] 林天兰. 血管内皮生长因子抑制剂在角膜新生血管治疗中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(4): 371-374.
- [16] Roesler R, Isolan GR. Letter to the Editor: MicroRNA levels and anti-VEGF therapy in glioblastoma [J]. J Neurosurg, 2016, 125(4): 1050-1051.
- [17] Askou AL, Alsing S, Benckendorff JNE, et al. Suppression of choroidal neovascularization by aav-based dual-acting antiangiogenic gene therapy [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 16(7): 38-50.
- [18] Yan T, Shen J, Chen J, et al. Differential expression of miR-17-92 cluster among varying histological stages of minor salivary gland in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 118(3): 49-54.
- [19] 李军,李星,牛犇. 血管性痴呆患者血清 miR-17 和 VEGF 表达及相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(2): 345-348.
- [20] Gines LG, Enrique GB, Alejo PHS, et al. Angiogenic role of miR-20a in breast cancer [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0194638.

[收稿日期]2020-07-29