

· 实验研究 ·

微小 RNA-133b 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞凋亡的抑制作用及其调控机制

李晓彤 秦宇 赵江月 闵锐 张劲松

110005 沈阳,中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体学重点实验室

通信作者:张劲松,Email:cmu4h-zjs@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.005

【摘要】 背景 研究证实紫外线 B 照射是白内障发生的主要原因之一,其机制与晶状体上皮细胞(LECs)凋亡有关。微小 RNA-133b(miR-133b)参与氧化应激诱导的 LECs 凋亡的调控过程,但其是否参与紫外线诱导白内障的发病过程及其机制尚未阐明。目的 观察 miR-133b 对紫外线诱导白内障 LECs 凋亡的抑制作用及其调控机制。方法 将 20 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为白内障模型组和正常对照组,其中白内障模型组小鼠用波长 302 nm 的紫外线直接照射眼部 5 min,照射强度为 300 W/cm²,每天照射 1 次,共照射 1 周;正常对照组小鼠不给予任何干预。于末次照射后 24 h 处死各组小鼠并摘出 10 只眼球以制备全眼球切片。取人 LECs 细胞系(SRA01/04)紫外线照射 25 min,并继续培养 4 h 作为紫外线照射组,正常对照组细胞不作任何干预。取紫外线照射模型组细胞接种于 96 孔板并分为 miR-133b 模拟物组、模拟物阴性对照组、miR-133b 抑制物组和抑制物对照组,分别用 lipofectamine2000 联合 50 nmol/L miR-133b 模拟物、miR-133b 模拟物对照剂、100 nmol/L miR-133b 抑制物或 miR-133b 抑制物对照剂瞬时转染细胞。采用实时荧光定量 PCR 法检测小鼠晶状体组织和不同转染组人 LECs 中 miR-133b mRNA 及其预测靶基因 BCL2L2 mRNA 的表达以评估转染效率;采用 TUNEL 凋亡检测试剂盒检测小鼠晶状体组织中 LECs 和不同转染组人 LECs 的凋亡情况。结果 正常对照组小鼠晶状体前囊膜 LECs 排列规则,未发现 TUNEL 染色阳性细胞,白内障模型组小鼠 LECs 排列稀疏,可见凋亡细胞呈红色荧光。紫外线照射组细胞凋亡率为(43.90±9.30)%,明显高于正常对照组的(1.08±0.49)%,差异有统计学意义($t=-7.963, P=0.015$)。白内障模型组小鼠晶状体组织和紫外线照射组细胞中 miR-133b mRNA 的相对表达量分别低于正常对照组小鼠和正常人 LECs,差异均有统计学意义($t=-2.958, P=0.042; t=-6.195, P=0.003$)。白内障模型组小鼠晶状体组织和紫外线照射组细胞中 BCL2L2 mRNA 的相对表达量分别高于正常对照组小鼠和正常人 LECs,差异均有统计学意义($t=3.761, P=0.020; t=12.437, P=0.000$)。miR-133b 模拟物组人 LECs 中 miR-133b mRNA 的相对表达量明显高于 miR-133b 模拟物对照组,而 BCL2L2 mRNA 的相对表达量明显低于 miR-133b 模拟物对照组,差异均有统计学意义($t=10.883, -5.927.617, 均 P<0.01$);miR-133b 抑制物组人 LECs 中 miR-133b mRNA 的相对表达量明显低于 miR-133b 抑制物对照组,而 BCL2L2 mRNA 的相对表达量明显高于 miR-133b 抑制物对照组,差异均有统计学意义($t=-1.606.622, 17.556, 均 P<0.01$)。miR-133b 模拟物组 LECs 凋亡率明显低于 miR-133b 模拟物对照组[(17.55±4.24)%与(43.62±9.19)%],miR-133b 抑制物组 LECs 凋亡率为(78.23±12.42)%,明显高于 miR-133b 抑制物对照组的(48.01±9.68)%,差异均有统计学意义($t=-4.462, P=0.011; t=3.324, P=0.029$)。结论 miR-133b 可防止紫外线照射所致的白内障的形成,其机制可能与靶向负性调控 BCL2L2 基因从而调控 LECs 的凋亡过程有关。

【关键词】 微小 RNA; 紫外线/不良作用; 辐射损伤/病理; 白内障/防控; 晶状体上皮细胞; 近交系 C57BL 小鼠; 微小 RNA-133b

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81470617、81270988、81371003); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81600717); 辽宁省自然科学基金项目(201602851)

Inhibitory effects of microRNA-133b on ultraviolet-induced apoptosis of lens epithelial cells and its mechanism Li Xiaotong, Qin Yu, Zhao Jiangyue, Min Rui, Zhang Jinsong

Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Eye Hospital of China Medical University, Key Lens Research Laboratory of Liaoning Province, Shenyang 110005, China

Corresponding author: Zhang Jinsong, Email: cmu4h-zjs@126.com

[Abstract] Background Ultraviolet B (UVB) is one of the main causes of cataract formation, and its mechanism is associated with the apoptosis of lens epithelial cells (LECs). MicroRNA-133b (miR-133b) can regulate oxidative stress-induced LECs apoptosis. However, whether miR-133b is associated with UVB-induced cataract is not elucidated. **Objective** This study was to observe the inhibitory effects of miR-133b on UVB-induced cataract and its regulating mechanism. **Methods** Twenty 8-week-old C57BL/6 mice were randomized into cataract model group and normal control group. The mouse eyes in the cataract model group exposed to 302 nm UVB for 5 minutes once per day for consecutive 1 week, with the irradiation intensity of 300 W/cm^2 , and the mice in the normal control group did not receive any intervention. Five mice in each group were sacrificed and 10 eyeball sections were prepared. Human LECs (SRA01/04) were exposed to UVB for 25 minutes and served as UVB-induced group, the cells in the normal control group did not receive any intervention. The UVB-induced cells were inoculated to 96-well plate and divided into 4 groups, and 50 nmol/L miR-133b mimic, miR-133b mimic control agent, miR-133b inhibitor and miR-133b inhibitor control agent were transfected into the cells with lipofectamine2000. The expression of miR-133b mRNA and a target gene *BCL2L2*, which was identified by online miRNA database (www.mirab.org) in the cells were detected by real-time quantitative PCR to evaluate the transfected efficacy, and the apoptosis of the cells in mouse lens tissue and different transfected groups were assayed by TUNEL. The use and care of the mice followed ARVO Statement.

Results The arrangement of LECs was regular and no apoptotic cell was seen in the normal control group, and the apoptotic cells showed the red fluorescence in the cataract model group. The apoptotic rate of human LECs was $(43.90 \pm 9.30)\%$ in the UVB-induced group, and that in the normal control group was $(1.08 \pm 0.49)\%$, showing a significant difference between the two groups ($t = -7.963, P = 0.015$). The relative expression levels of miR-133b mRNA in the model mouse lens and UVB-induced human LECs were evidently lower and relative expression levels of *BCL2L2* mRNA were higher than those in normal mice and normal LECs (miR-133b mRNA: $t = -2.958, P = 0.042$; $t = -6.195, P = 0.003$; *BCL2L2* mRNA: $t = 3.761, P = 0.020$; $t = 12.437, P = 0.000$). The relative expression level of miR-133b mRNA was significantly increased and the relative expression level of *BCL2L2* mRNA was reduced in the miR-133b mimic group in comparison with the miR-133b mimic control group ($t = 10.883, -5.927.617$; both at $P < 0.01$); compared with the miR-133b inhibitor control group, the relative expression level of miR-133b mRNA was significantly decreased and that of *BCL2L2* mRNA was evidently increased in the miR-133b inhibitor group ($t = -1.606.622, 17.556$; both at $P < 0.01$). The apoptotic rate of human LECs was $(43.62 \pm 9.19)\%$ and $(17.55 \pm 4.24)\%$ in the miR-133b mimic control group and miR-133b mimic group, with a significant difference between them ($t = -4.462, P = 0.011$), and the apoptotic rate in the miR-133b inhibitor group was $(78.23 \pm 12.42)\%$, which was significantly higher than $(48.01 \pm 9.68)\%$ in the miR-133b inhibitor control group ($t = 3.324, P = 0.029$).

Conclusions miR-133b can prevent UVB-induced cataract probably by negatively targeting the *BCL2L2* expression to regulate the apoptosis of LECs.

[Key words] MicroRNAs; Ultraviolet rays/adverse effects; Radiation injuries/pathology; Cataract/prevention & control; Epithelial cells, lens; Mice, inbred C57BL; MicroRNA-133b

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470617, 81270988, 81371003); Youth Project of National Natural Science Foundation of China (81600717); Natural Science Foundation of Liaoning Province (201602851)

白内障是目前世界上主要的致盲眼病。研究表明紫外线 B 照射是白内障发生的重要因素之一^[1], 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 代谢活跃, 易受紫外线损伤, 导致 LECs 凋亡, 从而导致白内障的发生^[2-3]。但目前紫外线导致 LECs 凋亡的机制仍不明确。因此, 研究紫外线导致 LECs 凋亡的机制, 特别是

基因表达的调控机制对白内障防治新方法的探索具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码小分子, 作为基因转录后水平的调节者, miRNA 可通过与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区不完全碱基配对负性调节靶基因的表达与功能, 从而参与生命活动的调节以及疾病的发生和发展过程^[4-5]。miR-133b 是人

类细胞中存在较为广泛的一种 miRNA^[6],参与氧化应激诱导的 LECs 凋亡的基因调控过程^[7],可能与凋亡相关蛋白中 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, BCL-2) 家族成员 *BCL2L2* 基因存在结合位点,参与细胞凋亡的调控过程。研究表明, *BCL2L2* 参与 LECs 的凋亡过程,在白内障的发病过程中发挥作用^[8-11]。miR-133b 在紫外线诱导的 LECs 凋亡中的具体作用仍不清楚,其调控机制尚未明确。本研究拟观察 miR-133b 在紫外线所致白内障晶状体组织中的表达及其对 LECs 凋亡的影响,探讨 miR-133b 能否成为防治白内障的新靶点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及细胞 C57BL/6 小鼠由中国医科大学实验动物部提供,小鼠的喂养和使用参照 ARVO 声明;人 LECs 细胞系 (SRA01/04) 由中国医科大学附属第四医院眼科晶状体实验室提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 miR-133b 模拟物、miR-133b 模拟物对照剂、miR-133b 抑制物、miR-133b 抑制物对照剂 (广州市锐博生物公司); RNAiso (美国 Invitrogen 公司); PrimerScript™ RT 5 酶混合液、SYBR Premix Ex Taq II (日本 Takara 公司); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Roche 公司)。XX-15B 型紫外线灯、紫外线能量测试仪 (美国 Spectroline Westbury 公司); 组织包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica 公司); ABI 7500 real-time PCR 系统 (美国 Applied Biosystems 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 紫外线诱导小鼠白内障模型的建立 将 20 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分成白内障模型组和正常对照组。白内障模型组小鼠于紫外线照射前 5 min 采用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。非麻醉条件下用波长为 302 nm 的紫外线直接照射眼部,照射强度为 300 W/cm²,每天照射 1 次,每次 5 min,共照射 1 周,照射总能量为 1.75 J/cm²。正常对照组小鼠不给予任何干预。本研究经中国医科大学附属第四医院伦理委员会批准,实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

1.2.2 细胞培养 用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml (商品单位) 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基培养 SRA01/04 细胞,培养箱温度为 37 ℃,在体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养。

1.2.3 建立紫外线诱导的人 LECs 凋亡模型 取对数

生长期的 SRA01/04 细胞,洗净培养液, PBS 冲洗 2 次,然后置于紫外光源下照射,照射强度为 360 μW/cm²,照射时间为 25 min,照射时在培养皿中加入 0.5 ml PBS,打开培养皿盖。照射后将细胞置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下继续培养 4 h,作为紫外线照射组。正常对照组细胞置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,但不进行紫外线照射。

1.2.4 TUNEL 法检测小鼠 LECs 的凋亡 于白内障模型小鼠末次照射后 24 h 分别从白内障模型组和正常对照组各取 5 只小鼠,采用颈椎脱臼法处死小鼠,摘取 10 只眼球,用质量分数 4% 多聚甲醛在 4 ℃ 固定 24 h,梯度脱水,透明,石蜡包埋。行 4 μm 厚全眼球切片,60 ℃ 烤片 1 h。采用 TUNEL 凋亡试剂盒检测 2 个组小鼠 LECs 的凋亡情况, PBS 浸洗切片 3 次,68 ℃ 二甲苯脱蜡 2 次,梯度乙醇 (体积分数 100%、95%、75% 和 50% 乙醇) 及 ddH₂O 复水,各级 2 min; PBS 浸洗切片 3 次,破膜剂 (体积分数 0.1% Triton X-100, 质量分数 0.1% 枸橼酸钠) 室温下作用 8 min, PBS 浸洗切片 3 次, TdT+ 荧光素标记的 dUTP 覆盖组织 37 ℃ 孵育 1 h, DAPI 复染 1 min, 防淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 LECs 分组和转染 将紫外线照射组细胞接种于 96 孔板中并分为 4 个组进行培养,当细胞密度达到 30% ~ 50% 时进行转染。miR-133b 模拟物组细胞培养液中添加 5 μl 稀释 lipofectamine2000 和 50 nmol/L 的 miR-133b 模拟物; 模拟物阴性对照组细胞培养液中给予 5 μl 稀释 lipofectamine2000 和 50 nmol/L 的 miR-133b 模拟物对照剂; miR-133b 抑制物组细胞培养液中给予 5 μl 稀释 lipofectamine2000 和 100 nmol/L 的 miR-133b 抑制物; 抑制物对照组细胞培养液中给予 5 μl 稀释 lipofectamine2000 和 100 nmol/L 的 miR-133b 抑制物对照剂,各组细胞继续培养 48 h。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠 LECs 和培养的人 LECs 中 miR-133b 和 BCL2L2 mRNA 的表达 利用 RNAiso 分别提取各组总 RNA,用 RT 5 酶混合液将各组 RNA 逆转录为 cDNA。miR-133b、RNU6B 的逆转录反应引物、特异性上游引物和通用下游引物由 Ribobio 公司合成; BCL2L2 和 β-actin 的特异性上下游引物由上海生工生物工程公司合成, BCL2L2 上游引物为 5'-TGGGACAAGTGCAGGAGTGG-3', 下游引物为 5'-GAGCTGTGAACTCCGCCAG-3'; β-actin 上游引物为 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', 下游引物为 5'-GCTGTCACCTTCACCGTCC-3', 反应体系为 20 μl, 反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火

34 s,共 40 个循环。循环结束后用作溶解曲线,保证产物的特异性。用 SYBR Premix Ex Taq II 检测各组细胞中 miR-133b mRNA 的相对表达量,以 RNU6B 为内参照,BCL2L2 表达量的检测以 β -actin 作为内参照。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据资料进行分析。

1.2.7 TUNEL 法检测各组人 LECs 的凋亡率 分别取紫外线照射组、正常对照组、miR-133b 模拟物组、模拟物阴性对照组、miR-133b 抑制物组及抑制物阴性对照组细胞,PBS 洗涤 3 次,每次 1 min;用破膜剂(0.1% Triton X-100,0.1% 枸橼酸钠)室温下处理细胞 8 min,PBS 浸洗 3 次,每次 1 min;然后用 TdT+荧光素标记的 dUTP 覆盖,37 °C 孵育 1 h,DAPI 复染 1 min,PBS 浸洗 3 次,每次 1 min;防淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察,采用计算机图像分析软件对检测结果进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布(均 $P>0.05$),以 $\bar{x}\pm s$ 表达。采用完全随机或均衡分组单因素干预两水平研究设计,白内障模型组与正常对照组间小鼠晶状体中 miR-133b mRNA 和 BCL2L2 mRNA 相对表达量及紫外线照射组与正常对照组人 LECs 中 miR-133b mRNA 和 BCL2L2 mRNA 相对表达量以及细胞凋亡率的差异比较、miR-133b 模拟物组与 miR-133b 模拟物对照组间和 miR-133b 抑制物组与 miR-133b 抑制物对照组间人 LECs 中 miR-133b mRNA 和 BCL2L2 mRNA 相对表达量和细胞凋亡率的差异比较均采用独立样本 t 检验。采用双尾检测法,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 白内障模型小鼠 LECs 凋亡情况

正常对照组小鼠晶状体透明,紫外线照射小鼠后 7 d,小鼠晶状体明显混浊。TUNEL 检测可见,正常对照组小鼠晶状体前囊膜 LECs 排列规则,可见 DAPI 蓝染的细胞核,TUNEL 染色呈阴性。白内障模型组小鼠 LECs 排列稀疏,可见 DAPI 蓝染的细胞核减少,部分 LECs 丢失,TUNEL 染色可见凋亡细胞,呈红色荧光(图 1)。

2.2 紫外线照射人 LECs 凋亡情况

正常对照组人 LECs 呈类圆形,细胞数量多,细胞排列致密且规则,未发现 TUNEL 阳性染色细胞,紫外线照射组可见细胞数量减少,细胞间排列稀疏,TUNEL 阳性染色细胞呈红色荧光(图 2)。紫外线照射组细胞凋亡率为 $(43.90\pm 9.30)\%$,明显高于正常对照组的 $(1.08\pm 0.49)\%$,差异有统计学意义($t=-7.963,P=0.015$)。

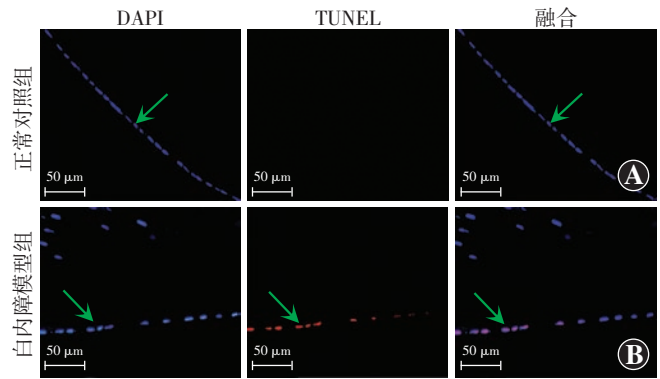


图 1 各组小鼠 LECs 的 TUNEL 染色($\times 200$,标尺=50 μm) A:正常对照组小鼠晶状体前囊膜仅见蓝染的 LECs 细胞核(DAPI)(箭头),细胞排列整齐,未见红色荧光的 TUNEL 阳性细胞 B:白内障模型组小鼠晶状体前囊膜可见较多 TUNEL 阳性细胞,呈红色荧光(DAB)(箭头)

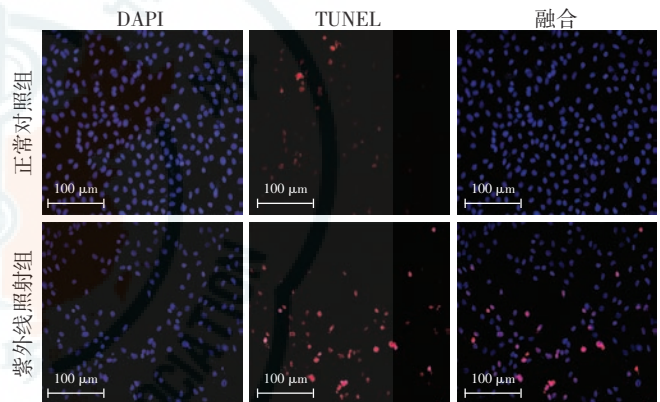


图 2 各组人 LECs 的 TUNEL 染色(标尺=100 μm) 正常对照组可见蓝染的细胞核数量多,排列致密规则(DAPI);紫外线照射组可见蓝染的细胞核数量少,排列稀疏(DAPI),并可见到较多的 TUNEL 染色阳性细胞,呈红色荧光(DAB)

2.3 各组小鼠晶状体组织中 miR-133b mRNA 和 BCL2L2 mRNA 的表达

白内障模型组小鼠晶状体组织中 miR-133b mRNA 的相对表达量为 0.877 ± 0.072 ,明显低于正常对照组的 1.000 ± 0.002 ,差异有统计学意义($t=-2.958,P=0.042$)。白内障模型组小鼠晶状体组织中 BCL2L2 mRNA 的相对表达量为 1.409 ± 0.188 ,明显高于正常对照组的 1.000 ± 0.002 ,差异有统计学意义($t=3.761,P=0.020$)(图 3)。

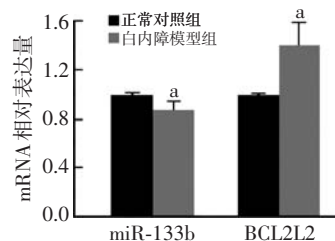


图 3 各组小鼠晶状体中 miR-133b mRNA 和 BCL2L2 mRNA 表达量的比较 与各自的正常对照组比较,^a $P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) miR-133b:微小 RNA-133b

2.4 各组培养的人 LECs 中 miR-133b 和 BCL2L2 mRNA 的表达

紫外线照射组人 LECs 中 miR-133b mRNA 的相对表达量为 0.830 ± 0.047 , 明显低于正常对照组的 1.000 ± 0.010 , 差异有统计学意义 ($t = -6.195, P = 0.003$)。紫外线照射组人 LECs 中 BCL2L2 mRNA 的相对表达量为 1.447 ± 0.062 , 明显高于正常对照组的 1.000 ± 0.010 , 差异有统计学意义 ($t = 12.437, P = 0.000$) (图 4)。

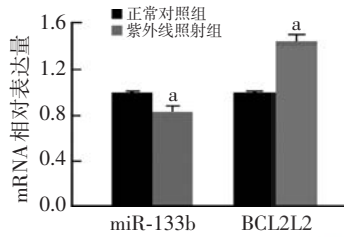


图 4 各组人 LECs 中 miR-133b 和 BCL2L2 mRNA 表达量的比较 与各自的正常对照组比较, * $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) miR-133b: 微小 RNA-133b

2.5 不同转染组细胞 miR-133b 和 BCL2L2 mRNA 的表达量比较

miR-133b 模拟物组人 LECs 中 miR-133b mRNA 的相对表达量为 2694.691 ± 428.704 , 明显高于 miR-133b 模拟物对照组的 1.000 ± 0.001 , 差异有统计学意义 ($t = 10.883, P = 0.008$); miR-133b 模拟物组人 LECs 中 BCL2L2 mRNA 的相对表达量为 0.022 ± 0.000 , 明显低于 miR-133b 模拟物对照组的 1.000 ± 0.001 , 差异有统计学意义 ($t = -5927.617, P = 0.000$)。miR-133b 抑制物组人 LECs 中 miR-133b mRNA 的相对表达量为 0.007 ± 0.001 , 明显低于 miR-133b 抑制物对照组的 1.000 ± 0.012 ; miR-133b 抑制物组人 LECs 中 BCL2L2 mRNA 的相对表达量为 211.673 ± 20.779 , 明显高于 miR-133b 抑制物对照组的 1.000 ± 0.003 , 差异均有统计学意义 ($t = -1606.622, 17.556$, 均 $P = 0.000$) (图 5)。

2.6 不同转染组人 LECs 的凋亡

TUNEL 法检测结果显示, miR-133b 模拟物对照组可见较多凋亡细胞, 呈红色荧光, miR-133b 模拟物组仅见散在凋亡细胞, miR-133b 抑制物对照组凋亡细胞数目明显多于 miR-133b 模拟物组, miR-133b 抑制物组可见大量呈红色荧光标记的凋亡细胞 (图 6)。miR-133b 模拟物组细胞凋亡率为 $(17.55 \pm 4.24)\%$, 明显低于 miR-133b 模拟物对照组的 $(43.62 \pm 9.19)\%$, 差异有统计学意义 ($t = -4.462, P = 0.011$); miR-133b 抑制物组细胞凋亡率为 $(78.23 \pm 12.42)\%$, 明显高于 miR-133b 抑制物对照组的 $(48.01 \pm 9.68)\%$, 差异有统计学意义 ($t = 3.324, P = 0.029$) (图 7)。

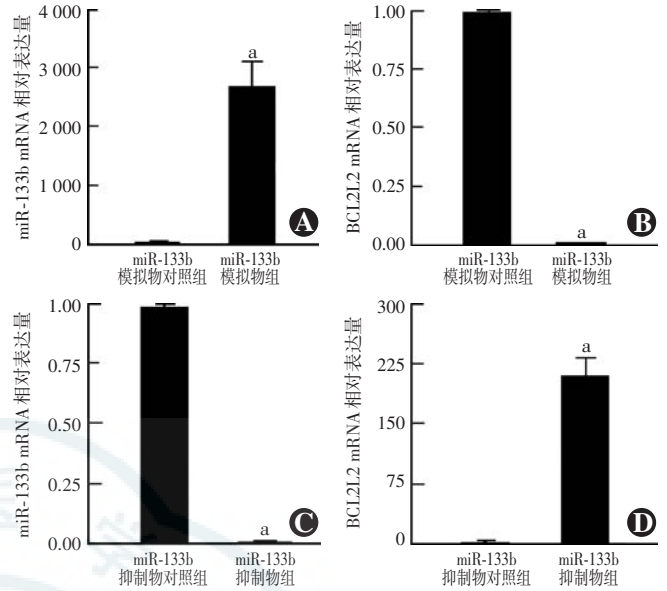


图 5 不同转染组细胞 miR-133b 和 BCL2L2 mRNA 的表达量比较 A: miR-133b 模拟物对照组与 miR-133b 模拟物组 miR-133b mRNA 的相对表达量比较 与 miR-133b 模拟物对照组比较, * $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) B: miR-133b 模拟物对照组与 miR-133b 模拟物组 BCL2L2 mRNA 的相对表达量比较 与 miR-133b 模拟物对照组比较, * $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) C: miR-133b 抑制物对照组与 miR-133b 抑制物组 miR-133b mRNA 的相对表达量比较 与 miR-133b 抑制物对照组比较, * $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) D: miR-133b 抑制物对照组与 miR-133b 抑制物组 BCL2L2 mRNA 的相对表达量比较 与 miR-133b 抑制物对照组比较, * $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) miR-133b: 微小 RNA-133b

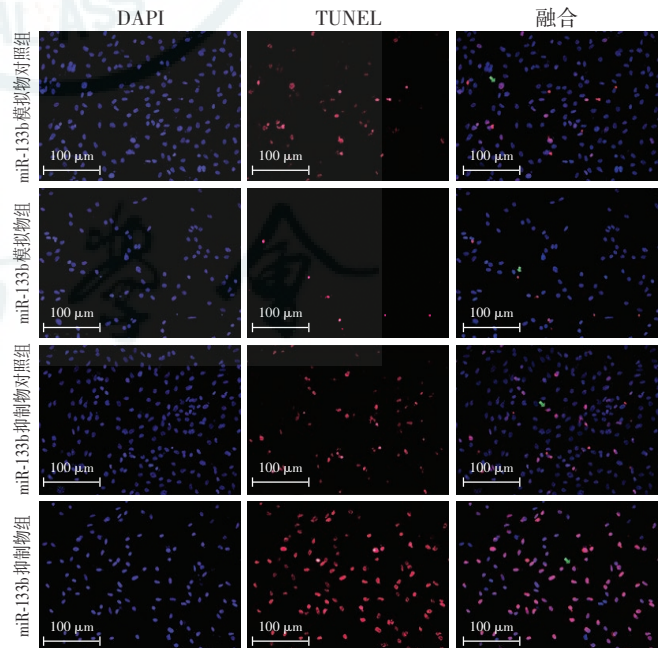


图 6 不同转染组 TUNEL 检测细胞凋亡情况 (标尺 = 100 μm) 人 LECs 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI), TUNEL 检测的凋亡细胞呈红色荧光 (DAB). miR-133b 模拟物对照组可见较多凋亡细胞, miR-133b 模拟物组仅见散在凋亡细胞, miR-133b 抑制物组凋亡细胞数目明显多于 miR-133b 抑制物对照组 miR-133b: 微小 RNA-133b

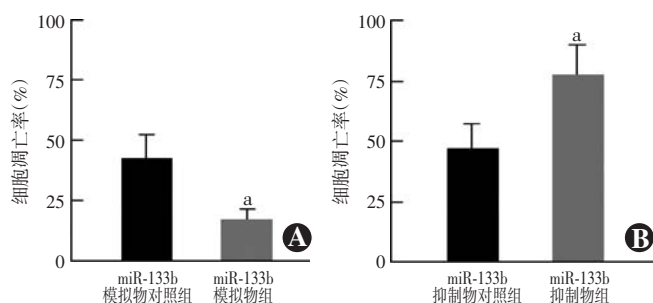


图7 不同转染组人 LECs 凋亡率量化比较 A: 与 miR-133b 模拟物对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n=3$) B: 与 miR-133b 抑制物对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n=3$) miR-133b: 微小 RNA-133b

3 讨论

紫外线按照波长的不同分为紫外线 A (波长为 315 ~ 400 nm)、紫外线 B (波长为 280 ~ 315 nm) 和紫外线 C (波长为 100 ~ 280 nm), 部分紫外线 B 可被角膜吸收, 部分紫外线 B 和紫外线 A 可穿过角膜和房水而被晶状体吸收^[3]。紫外线辐射与白内障的发生和发展关系密切, Li 等^[12]用紫外线照射 SD 大鼠可导致晶状体赤道部 LECs 凋亡, 然后晶状体中央区 LECs 出现凋亡, 从而诱发白内障的发生。本研究中采用波长为 302 nm 的紫外线 B 成功建立了小鼠白内障模型, 证实紫外线照射可导致 LECs 损伤, 并诱发 LECs 凋亡。紫外线导致 LECs 凋亡的机制尚未完全明确, Knezevic 等^[8]研究认为, 紫外线 B 在细胞的多个部位启动了细胞内信号转导通路, 导致细胞凋亡, bcl-2 家族是多个紫外线致细胞凋亡前信号的整合器。BCL2L2 是 bcl-2 家族成员之一, 其过度表达在紫外线易感细胞的凋亡中可阻止 bax 的易位和细胞死亡, bcl-2 家族各成员间及与其他凋亡调控基因间形成精细的凋亡调节信号通路, 共同调控细胞的存亡^[9-10, 12-13]。

miRNA 是一类非编码的小分子, 在眼部的生长、发育及功能调节等方面发挥重要作用^[14-17]。研究发现, miRNA 在白内障的发生和发展过程中发挥调节作用^[16], 其中 miR-125b、miR-204 和 miR-181 可调控 LECs 凋亡, 从而影响白内障的发病过程^[18-19], let-7b 的表达水平与白内障患者的年龄相关^[20], miR-184 的突变会导致前极性白内障的发生^[21], miR-106 和 miR-24 在晶状体氧化性损伤的发生机制中可能具有重要作用^[11]。

miR-133b 是一种较为广泛存在的 miRNA^[9], 其在人细胞中参与细胞凋亡调控的机制受到广泛关注^[22-23]。Crawford 等^[24]提出, 在肺腺癌 H2009 细胞中, miR-133b 通过 bcl-2 家族中的骨髓细胞白血病蛋

白-1 和 BCL2L2 来调控细胞凋亡。对食管鳞状细胞癌、胃癌、卵巢癌等多种疾病的研究也发现, miR-133b 与细胞的凋亡密切相关^[12, 25-26]。

本研究中拟观察 miR-133b 对 LECs 凋亡的调控作用, 通过 miRanda、TargetScan 等在线 miRNA 靶基因预测工具预测 miR-133b 可能与 BCL2L2 存在的潜在结合位点, 发现在紫外线诱导的小鼠白内障模型和人 LECs 紫外线凋亡模型中 miR-133b 均呈低表达。之后, 在人 LECs 紫外线凋亡模型中调节 miR-133b 的表达量, 观察 BCL2L2 表达和细胞凋亡率的变化, 发现当 miR-133b 表达下降时, BCL2L2 的表达量升高, 细胞凋亡率升高, 而当 miR-133b 表达量升高时, BCL2L2 的表达量下降, 细胞凋亡率下降, 提示 miR-133b 可能通过调节 BCL2L2 的表达而调控 LECs 的凋亡。然而, miRNA 调节网络的构成和功能非常复杂, 且 miR-133b 是以抗凋亡和促凋亡蛋白基因为靶点控制着细胞的凋亡过程^[11], 因此我们还需进一步探究紫外线诱发白内障过程中 miR-133b 影响 LECs 凋亡的具体机制。总之, 在紫外线辐射所致 LECs 凋亡的基因调控过程中, miR-133b 可能通过靶向负性调控 BCL2L2 而发挥一定作用, 提示 miR-133b 可能成为白内障非手术治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Roberts JE. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration [J]. Eye Contact Lens, 2011, 37 (4) : 246-249. DOI: 10.1097/ICL.0b013e31821cbcc9.
- [2] Vrensen GF. UV-B and early cortical and nuclear changes in the human lens [J]. Doc Ophthalmol, 1994, 88 (3-4) : 255-261.
- [3] Löfgren S. Solar ultraviolet radiation cataract [J]. Exp Eye Res, 2017, 156 : 112-116. DOI: 10.1016/j.exer.2016.05.026.
- [4] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12 (2) : 99-110. DOI: 10.1038/nrg2936.
- [5] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418 (6894) : 244-251. DOI: 10.1038/418244a.
- [6] Wang Y, Li M, Xu L, et al. Expression of Bcl-2 and microRNAs in cardiac tissues of patients with dilated cardiomyopathy [J]. Mol Med Rep, 2017, 15 (1) : 359-365. DOI: 10.3892/mmr.2016.5977.
- [7] 柏凌, 李鹏, 陈凌, 等. MicroRNA 在氧化应激诱导晶状体上皮细胞凋亡中作用的初步研究 [J]. 国际眼科杂志, 2014, 14 (10) : 1770-1772. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.07.
- [8] Knezevic D, Zhang W, Rochette PJ, et al. Bcl-2 is the target of a UV-inducible apoptosis switch and a node for UV signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104 (27) : 11286-11291. DOI: 10.1073/pnas.0701318104.
- [9] Shamas-Din A, Kale J, Leber B, et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5 (4) : a008714 [2016-06-17]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683897/. DOI: 10.1101/cshperspect.a008714.
- [10] 吴明星, 吴开力, 卞庆宁, 等. 年龄相关性白内障晶体上皮细胞的基因表达谱变化的初步分析 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (7) :

- 1429-1434.
Wu MX, Wu KL, Bian QN, et al. Changes of global gene expression in lens epithelial cells of human age related cataract [J]. Chin J Pathophysiol, 2006, 22(7): 1429-1434.
- [11] Patron JP, Fendler A, Bild M, et al. MiR-133b targets antiapoptotic genes and enhances death receptor-induced apoptosis [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(4): e35345 [2016-10-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035345>. DOI: 10.1371/journal.pone.0035345.
- [12] Li WC, Spector A. Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract [J]. Free Radic Biol Med, 1996, 20(3): 301-311.
- [13] Asher V, Warren A, Shaw R, et al. The role of Eag and HERG channels in cell proliferation and apoptotic cell death in SK-OV-3 ovarian cancer cell line [J/OL]. Cancer Cell Int, 2011, 11: 6 [2017-01-06]. <http://www.biomedsearch.com/nih/role-Eag-HERG-channels-in/21392380.html>. DOI: 10.1186/1475-2867-11-6.
- [14] Toyono T, Usui T, Villarreal G, et al. MicroRNA-29b overexpression decreases extracellular matrix mRNA and protein production in human corneal endothelial cells [J]. Cornea, 2016, 35(11): 1466-1470. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000954.
- [15] Jiang B, Huo Y, Gu Y, et al. The role of microRNAs in myopia [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255(1): 7-13. DOI: 10.1007/s00417-016-3532-6.
- [16] Wang Y, Guan H. The role of DNA methylation in lens development and cataract formation [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(6): 979-984. DOI: 10.1007/s10571-016-0447-z.
- [17] Sundermeier TR, Palczewski K. The impact of microRNA gene regulation on the survival and function of mature cell types in the eye [J]. FASEB J, 2016, 30(1): 23-33. DOI: 10.1096/fj.15-279745.
- [18] Qin Y, Zhao J, Min X, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(12 Pt A): 2439-2447. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.10.002.
- [19] 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 [J]. Mol Med, 2012, 18: 528-538. DOI: 10.2119/molmed.2011.00463.
- [20] Peng CH, Liu JH, Woung LC, et al. MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96(5): 747-751. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300585.
- [21] Hughes AE, Bradley DT, Campbell M, et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract [J]. Am J Hum Genet, 2011, 89(5): 628-633. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.09.014.
- [22] Chen XN, Wang KF, Xu ZQ, et al. MiR-133b regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis by targeting Bcl-w and Akt1 [J/OL]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 70 [2017-01-13]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000292971100406>. DOI: 10.1186/s12935-014-0070-3.
- [23] Wang J, Li Y, Jiang C. MiR-133b contributes to arsenic-induced apoptosis in U251 glioma cells by targeting the hERG channel [J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(4): 985-994. DOI: 10.1007/s12031-014-0455-8.
- [24] Crawford M, Batte K, Yu L, et al. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(3): 483-489. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.143.
- [25] Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b: tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2804-2814. DOI: 10.1002/ijc.25284.
- [26] Guo L, Bai H, Zou D, et al. The role of microRNA-133b and its target gene FSCN1 in gastric cancer [J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33: 99 [2017-01-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4272783>. DOI: 10.1186/s13046-014-0099-0.

(收稿日期:2017-01-21 修回日期:2017-09-28)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊,月刊,96面,每月10日出版,每期定价16元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-65580157。

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或1975年赫尔辛基宣言(2005年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)