

· 实验研究 ·

长链非编码 RNA-MIAT 在转化生长因子 β_2 诱导的晶状体上皮-间质转化中的作用

岳秀娟 苏胜 王丽媛 吕嘉 王林 刘平

150001 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院

通信作者:刘平, Email: pingliu53@126. com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 07. 005

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA (lncRNA)-心肌梗死相关转录物 (MIAT) 在转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 诱导的晶状体上皮细胞 (LECs) 纤维化过程中的作用及其对后发性白内障形成的影响。**方法** 对 LECs 永生系 SRA01/04 细胞进行培养, 将培养的细胞分为正常对照组和 TGF- β_2 组, 分别用 DMEM 培养液和含 10 ng/ml TGF- β_2 DMEM 培养液培养 48 h, 光学显微镜下观察 TGF- β_2 诱导的各组细胞形态学变化, 采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测细胞中 MIAT 及上皮-间质转化 (EMT) 相关标志物 E-钙黏素 (E-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和胶原蛋白 I (Coll I) 蛋白及其 mRNA 相对表达量变化; 分别用 siRNA 空载体和 siRNA-MIAT 转染 DMEM 培养的 (siRNA 空载体组、siRNA-MIAT 转染组) 或用含 10 ng/ml TGF- β_2 DMEM 培养的 (siRNA+TGF- β_2 组、siRNA-MIAT+TGF- β_2 组) SRA01/04 细胞 48 h, 光学显微镜下观察各组细胞形态学变化, 采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法分别检测细胞中 MIAT、E-cad、 α -SMA、Coll I 蛋白及其 mRNA 的表达变化。**结果** 正常对照组培养细胞呈圆形和多角形, TGF- β_2 诱导组细胞呈长梭形。与正常对照组比较, TGF- β_2 诱导组细胞中 MIAT mRNA、 α -SMA mRNA 和 Coll I mRNA 相对表达量明显升高 (2.497 $\pm$ 0.644 vs. 0.827 $\pm$ 0.062; 2.951 $\pm$ 0.146 vs. 1.085 $\pm$ 0.517; 2.115 $\pm$ 0.090 vs. 1.002 $\pm$ 0.088), 而 E-Cad mRNA 相对表达量明显下降 (0.102 $\pm$ 0.027 vs. 1.020 $\pm$ 0.262), 差异均有统计学意义 ($P=0.045, 0.004, 0.000, 0.025$), 上述因子的蛋白水平表达趋势与 mRNA 相同。与 siRNA 空载体组比较, siRNA-MIAT 转染组均能明显下降细胞内 MIAT 含量, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 siRNA+TGF- β_2 组比较, siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞中 α -SMA、Coll I 蛋白及其 mRNA 相对表达量均明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$), E-cad 蛋白及其 mRNA 相对表达量明显增加, 差异有统计学意义 ($P=0.008, 0.000$)。**结论** MIAT 参与 TGF- β_2 诱导的 SRA01/04 细胞 EMT 过程, 下调 MIAT 可抑制晶状体上皮-间质转化的发生。

【关键词】 心肌梗死相关转录物; 长链非编码 RNA; 晶状体上皮细胞; 上皮-间质转分化; 后发性白内障

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81470618); 黑龙江省自然科学基金项目 (H2016038); 黑龙江省博士后科研启动金项目 (LBH-Q15102)

Effects of long noncoding RNA-MIAT on lens epithelial to mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β_2 Yue Xiujian, Su Sheng, Wang Liyuan, Lyu Jia, Wang Lin, Liu Ping

Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: Liu Ping, Email: pingliu53@126. com

【Abstract】 Objective To investigate the roles of long noncoding RNA-myocardial infarction-associated transcript (MIAT) on lens epithelial cells (LECs) fibrosis induced by transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2).

Methods LECs line (SRA01/04) was cultured in conventional DMEM (normal control group) and DMEM containing 10 ng/ml TGF- β_2 (TGF- β_2 induced group) for 48 hours. The morphology of the cells was observed under the optical microscope, and the relative expression levels of MIAT, E-cadherin (E-cad), α -smooth muscle action (α -SMA), collagen I (Coll I) in protein level and mRNA level were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot, respectively. The cells cultured in DMEM or DMEM containing 10 ng/ml TGF- β_2 were transfected by siRNA empty carrier (siRNA group, siRNA+TGF- β_2 group) and siRNA-MIAT (siRNA-MIAT group, siRNA-MIAT+TGF- β_2 group) for 48 hours, and the morphology of the cells was observed under the optical microscope, and the relative expression levels of MIAT, E-cadherin (E-cad), α -smooth muscle action (α -SMA), collagen I (Coll I) in protein level and mRNA level were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot.

Results The cells in the normal control group showed the round and polygon in shape, and those in the TGF- β_2 induced group showed the spindle-like. Compared with the normal control group, the relative expression levels of MIAT mRNA, α -SMA mRNA and Coll I mRNA were significantly elevated (2.497 $\pm$ 0.644 vs. 0.827 $\pm$ 0.062; 2.951 $\pm$ 0.146 vs. 1.085 $\pm$ 0.517; 2.115 $\pm$ 0.090 vs. 1.002 $\pm$ 0.088), and the expression of E-Cad mRNA was

significantly reduced (0.102 ± 0.027 vs. 1.020 ± 0.262) in the TGF- β_2 induced group ($P = 0.045, 0.004, 0.000, 0.025$). The expressions of MIAT, α -SMA, Coll I and E-Cad showed a similar trend between two groups. The relative expressions of MIAT protein and mRNA were evidently reduced in the siRNA-MIAT group compared with the siRNA empty vector group (all at $P < 0.05$). Compared with the siRNA+TGF- β_2 group, the relative expressions of α -SMA and Coll I in protein and mRNA levels were significantly reduced, and the expressions of E-cad protwin and mRNA were elevated in the siRNA-MIAT+TGF- β_2 group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** MIAT might participate in TGF- β_2 -induced LECs-EMT. The down-regulation of MIAT in the LECs inhibits the fibrosis of LECs.

[Key words] Myocardial infarction-associated transcript; Long non-coding RNA; Lens epithelial cells; Epithelial to mesenchymal transition; Posterior capsule opacification

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470618); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (2016038); Heilongjiang Postdoctoral Scientific Research Developmental Fund (15102)

人晶状体囊膜是由晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 分泌形成的蛋白基底膜, 主要由层黏连蛋白和 IV 型胶原蛋白相互交错而成^[1]。目前囊外摘除术联合人工晶状体植入术是白内障的主流治疗方法, 术后残留在晶状体前囊膜下及赤道部的 LECs 在外界刺激下发生上皮-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 即残留 LECs 异常增生并转分化为成纤维细胞, 导致后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO), 引起视力再次下降^[2]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一种促纤维细胞活化因子, 可诱导 LECs 中纤维化相关标志物的高表达^[3]。TGF- β_2 可通过 Smads、PI3K/AKT 等多种生物学途径诱导 LECs 的纤维化, 在 LECs 的 EMT 过程中发挥重要作用^[4-7], 因此采用 TGF- β_2 诱导的 LECs-EMT 是研究 PCO 病理机制的合适模型^[8], 探究 LECs 内参与调节 TGF- β_2 信号通路的分子机制可预防和治疗 EMT 相关疾病的发生及发展^[9]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸且不参与蛋白质编码过程的转录产物, 多种 LncRNA 参与眼部常见疾病的病理机制并参与调控视网膜组织发育和晶状体老化过程^[10-13]。研究发现心肌梗死相关转录物 (myocardial infarction-associated transcript, MIAT) 在胎盘哺乳动物中高度保守, 但其可表达于有丝分裂细胞和有丝分裂后视网膜前体细胞中, 并且 LncRNA-MIAT 参与调节乳腺癌细胞 EMT 过程^[14], 但 LncRNA-MIAT 在 LECs-EMT 中的作用尚不清楚。EMT 以上皮细胞标志物 E-钙黏素 (E-cadherin, E-cad) 的减少及间质细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白 (collagen, Coll) I、Coll III、纤连蛋白 (fibronectin, Fn)、结缔组织生长因子表达增加为主要特征。本研究以 LECs 永生系 SRA01/04 细胞为研究对象, 选取 E-cad、 α -SMA、Coll I 作为观察指标, 研究 LncRNA-MIAT 在 TGF- β_2 诱导的 LECs-EMT 过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

永生系 SRA01/04 细胞 [购于美国细胞库 (ATCC)]; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、opti-DMEM 培养液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、青链霉素 (澳洲 HyClone 公司); TGF- β_2 (美国 PeproTech 公司); siRNA (上海吉玛公司); TRIZOL 试剂、lipofectamine 2000、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、引物序列 (哈尔滨新海基因检测公司); 兔抗人 E-cadherin (24E10)、Coll I 抗体 (AB745, 美国 CST 公司); 小鼠抗人 α -SMA 抗体 (1A4)、小鼠抗人 β -Actin 抗体、碱性磷酸酯酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、碱性磷酸酯酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (TA-09) (北京中山金桥公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (上海碧云天试剂公司)。PCR 仪 (美国 Life 公司); ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 电泳仪、酶标仪 (美国 Bio Rad 公司); EVOS 倒置荧光显微镜 (美国 AMG 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SRA01/04 细胞培养 将细胞培养于含体积分数 10% FBS 和质量分数 1% 青链霉素的 opti-DMEM 高糖培养基中, 接种于 25 cm² 培养皿, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 隔日换液, 待细胞达到约 80% 融合时弃培养液, PBS 液洗 3 次, 加入胰蛋白酶 1 ml 消化约 1 min, 弃胰蛋白酶, 光学显微镜下观察。待细胞变圆、漂浮后, 加入 10% FBS-DMEM 培养液终止消化, 轻轻吹打细胞, 使细胞全部单个脱落。将细胞悬液转移至 15 ml 离心管中, 离心半径为 15 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 向离心管中加入全培养液 3 ~ 4 ml, 吹打、重悬细胞, 用细胞计数板计数后接种于 6 孔板中, 细胞密度约 1×10^5 /ml, 饥饿 16 h 用于后续试验。

1.2.2 实验分组及干预 将培养细胞分为正常对照组和 TGF- β_2 诱导组, 正常对照组细胞采用无血清 opti-

DMEM 高糖培养基进行培养, TGF- β_2 诱导组细胞在含终浓度为 10 ng/ml TGF- β_2 的 opti-DMEM 高糖培养基中培养 48 h, 光学显微镜下观察各组细胞的形态变化; 分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测各组细胞中 EMT 相关标志物蛋白及其 mRNA 表达变化。将培养细胞分为 siRNA 空载体组、siRNA-MIAT 转染组、siRNA+TGF- β_2 组和 siRNA-MIAT+TGF- β_2 组, 其中 siRNA 空载体组在 opti-DMEM 高糖培养基中添加 siRNA 空载体以转染细胞, siRNA-MIAT 转染组细胞转染 siRNA-MIAT, 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 MIAT 表达变化, siRNA+TGF- β_2 组和 siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞分别在相应培养基中添加 10 ng/ml TGF- β_2 液培养 48 h。分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测各组细胞中 EMT 相关因子在蛋白水平和 mRNA 水平的表达变化。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法测定细胞中 EMT 相关标志物基因表达量 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 测定总 RNA 的浓度及纯度, 按照逆转录试剂盒说明书的步骤逆转录成 cDNA。按照 SYBR Green I Master 试剂盒配置荧光反应体系, 加入 ABI 八联管中。反应程序: 50 °C 反应 2 min, 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 55 °C 反应 30 s, 共 40 个循环。通过 QuantityOne 程序得到各组 EMT 相关标志物 mRNA 表达的荧光强度 (Ct 值), 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。目标基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	引物序列
β -Actin	F: 5' -TCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' R: 5' -GTTGAAGGTAGTTTCGTGGATGC-3'
E-cad	F: 5' -TGGCTTCCCTCTTTCATCTCC-3' R: 5' -CATAGTTCCGCTCTGTCTTTGG-3'
α -SMA	F: 5' -GATTCTCTTGATGATGCTGATGC-3' R: 5' -ATCTTCTATAACGCTTCACATTCC-3'
Coll I	F: 5' -TCGGAGGAGAGTCAGGAAGG-3' R: 5' -TCAGCAACACAGTTACACAAGG-3'
MIAT	F: 5' -GGCTGACCACTAACAACCAAC-3' R: 5' -AAGGAACAGACCAGGAAGGC-3'

注: E-Cad: E-钙黏素; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; Coll I: 胶原蛋白 I; TGF: 转化生长因子

1.2.4 Western blot 法检测细胞内 E-cad、 α -SMA 和 Coll I 蛋白表达 培养细胞用 4 °C 预冷的 1 倍 PBS 洗涤 3 次, 加入适量 RIPA 裂解液, 蛋白酶抑制剂 (100:1) 混合液于冰上充分裂解细胞 30 min。离心半径为 10 cm, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, BCA 法测定蛋白浓度配平后, 加入 SDS-PAGE 蛋白上

样缓冲液, 煮沸 5 min 蛋白变性后分装于 EP 管中。将相应蛋白加入聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 根据相对分子质量切取所需的凝胶在冰上湿转膜 3 h 至硝酸纤维素膜上, 质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 5% 脱脂奶粉稀释小鼠抗人 α -SMA 抗体 (1:500)、兔抗人 E-cad 抗体 (1:1 000)、兔抗人 Coll I 抗体 (1:200) 和小鼠抗人 β -Actin 抗体 (1:1 000) 后添加至培养液, 4 °C 孵育过夜。次日取出条带, 室温摇床孵育 2 h, 1 倍 PBS-T 洗涤, 每次 10 min, 共 3 次。分别添加碱性磷酸酯酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000)、碱性磷酸酯酶标记山羊抗小鼠 IgG (1:1 000) 室温孵育 1 h。1 倍 PBS-T 洗涤, 每次 10 min, 共 3 次。碱性磷酸酶显色试剂盒显色, 凝胶成像系统照相, β -actin 作为内参照。采用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值, 相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.5 siRNA-MIAT 及 siRNA 的细胞内转染 转染前 24 h 将培养的细胞接种于 6 孔板并用全培养基进行培养, 细胞密度约为 1×10^5 个, 待细胞融合达约 90% 时根据 lipo2000 说明书进行转染。转染前 2 h 细胞换取新鲜无血清 opti-MEM, 各无 RNA 酶的 EP 管中分别加入 10 μ l (20 μ mmol/L) siRNA-MIAT + 250 μ l opti-MEM 及 siRNA+250 μ l opti-MEM, 轻轻混匀, 制备成溶液 A, 室温静置 5 min; 各 EP 管加入 10 μ l lipo2000 + 250 μ l opti-MEM, 轻轻混匀, 室温静置 5 min, 制备成溶液 B; 将溶液 A 和 B 混匀, 室温下静置 20 min。将上述混合溶液加入待转染细胞中, 用含终浓度为 10 ng/ml TGF- β_2 的 DMEM 继续培养 48 h, 提取总 RNA 和总蛋白, 分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测细胞中目标蛋白及其 mRNA 表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 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 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组两水平研究设计, 组间各检测指标的差异比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β_2 诱导组与正常对照组培养细胞的形态

光学显微镜下可见正常对照组培养的 SRA01/04 细胞呈圆形或多角形, 单层排列, TGF- β_2 诱导组细胞呈长梭状或纺锤形, 细胞间相互黏连 (图 1)。

2.2 TGF- β_2 诱导与否细胞内 EMT 相关标志物 mRNA 及 MIAT mRNA 相对表达量变化

与正常对照组比较, TGF- β_2 诱导组细胞中 MIAT

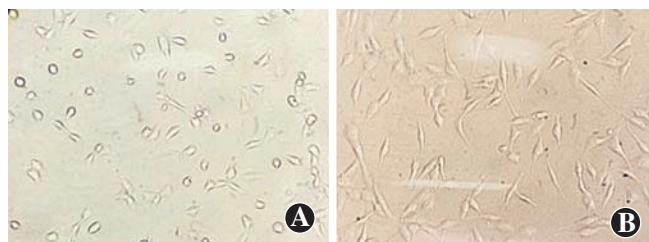


图 1 光学显微镜下培养细胞的形态($\times 100$) A:正常对照组细胞呈圆形或多角形 B:TGF- β_2 诱导组细胞呈长梭形或纺锤形

mRNA 相对表达量明显增加,E-Cad mRNA 相对表达量明显下降, α -SMA mRNA 及 Coll I mRNA 相对表达量明显增加,差异均有统计学意义($t = -4.472, P = 0.045; t = 6.034, P = 0.025; t = -6.020, P = 0.004; t = -15.265, P = 0.000$)(表 2)。

表 2 各组细胞内 EMT 相关标志物 mRNA 及 MIAT mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad mRNA	α -SMA mRNA	Coll I mRNA	MIAT mRNA
正常对照组	3	1.020 $\pm$ 0.262	1.085 $\pm$ 0.517	1.002 $\pm$ 0.088	0.827 $\pm$ 0.062
TGF- β_2 诱导组	3	0.102 $\pm$ 0.027	2.951 $\pm$ 0.146	2.115 $\pm$ 0.090	2.497 $\pm$ 0.644
t 值		6.034	-6.020	-15.265	-4.472
P 值		0.025	0.004	0.000	0.045

注:(独立样本 t 检验) MIAT:心肌梗死相关转录物;E-Cad:E-钙黏素;SMA:平滑肌肌动蛋白;Coll:胶原蛋白;TGF:转化生长因子

2.3 TGF- β_2 诱导与否细胞中 EMT 相关标志物蛋白相对表达量变化

Western blot 法检测可见,与正常对照组比较,TGF- β_2 诱导组细胞中 E-Cad 蛋白表达条带变细,条带表达强度较弱, α -SMA 及 Coll I 蛋白表达条带明显增宽且表达条带较强(图 2)。与正常对照组比较,TGF- β_2 诱导组 E-Cad 蛋白相对表达量明显下降, α -SMA 蛋白及 Coll I 蛋白相对表达量明显增加,差异均有统计学意义($t = 30.075, P = 0.000; t = -25.481, P = 0.000; t = -19.716, P = 0.000$)(表 3)。

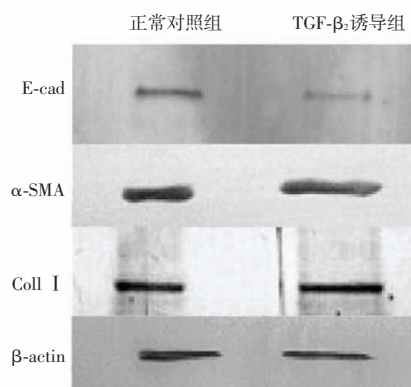


图 2 Western blot 法检测的细胞中 E-Cad、 α -SMA、Coll I 蛋白表达变化 E-Cad:E-钙黏素;SMA:平滑肌肌动蛋白;Coll:胶原蛋白;TGF:转化生长因子

表 3 各组细胞内 EMT 相关标志物蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad	α -SMA	Coll I
正常对照组	3	0.383 $\pm$ 0.017	1.063 $\pm$ 0.032	1.025 $\pm$ 0.019
TGF- β_2 诱导组	3	0.087 $\pm$ 0.002	1.562 $\pm$ 0.012	1.352 $\pm$ 0.021
t 值		30.075	-25.481	-19.716
P 值		0.000	0.000	0.000

注:(独立样本 t 检验) E-Cad:E-钙黏素;SMA:平滑肌肌动蛋白;Coll:胶原蛋白;TGF:转化生长因子

2.4 不同细胞转染组细胞形态学变化

光学显微镜下可见 siRNA 空载体组 SRA01/04 细胞呈圆形或者多角形,单层排列;siRNA-MIAT 转染组细胞形态未发生明显改变,siRNA+TGF- β_2 组细胞呈长梭形和纺锤形,siRNA-MIAT+TGF- β_2 组部分细胞接近圆形或椭圆形,长梭形和纺锤形细胞减少(图 3)。

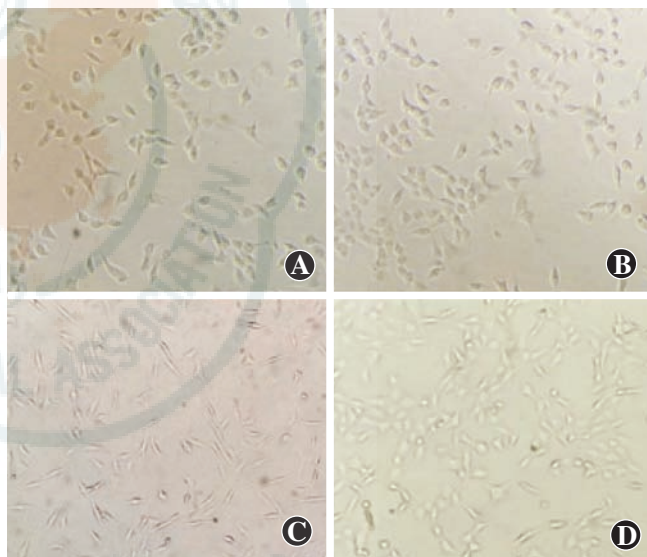


图 3 不同转染组光学显微镜下 SRA01/04 细胞形态变化($\times 100$)

A:siRNA 空载体组细胞呈圆形或者多角形 B:siRNA-MIAT 转染组细胞形态未发生明显改变 C:siRNA+TGF- β_2 组细胞呈长梭形和纺锤形 D:siRNA-MIAT+TGF- β_2 组部分细胞接近圆形或椭圆形

2.5 不同转染组细胞中 EMT 相关标志物 mRNA 及 MIAT mRNA 相对表达量

与 siRNA 空载体组比较,siRNA-MIAT 转染组和 siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞中 MIAT mRNA 相对表达量明显下降,差异有统计学意义($t = 20.570, P = 0.002; t = 46.493, P = 0.000$)。siRNA-MIAT 转染组与 siRNA 空载体组细胞中 E-Cad mRNA、 α -SMA mRNA 和 Coll I mRNA 相对表达量的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与 siRNA+TGF- β_2 组比较,siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞内 E-Cad mRNA 相对表达量明显增加, α -SMA mRNA 和 Coll I mRNA 相对表达量明显下降,

差异均有统计学意义 ($t = -10.299, P = 0.008; t = 7.159, P = 0.003; t = 46.149, P = 0.000$) (表 4, 5)。

表 4 不同转染组细胞中 EMT 相关标志物 mRNA 和 MIAT mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad mRNA	α -SMA mRNA	Coll I mRNA	MIAT mRNA
siRNA 空载体组	3	1.011 $\pm$ 0.184	0.953 $\pm$ 0.240	0.703 $\pm$ 0.072	0.924 $\pm$ 0.054
siRNA-MIAT 转染组	3	0.778 $\pm$ 0.124	0.803 $\pm$ 0.223	0.633 $\pm$ 0.076	0.281 $\pm$ 0.004
t 值		1.812	0.782	1.177	20.570
P 值		0.144	0.478	0.304	0.002

注: (独立样本 t 检验) E-Cad: E-钙黏素; SMA: 平滑肌肌动蛋白; Coll: 胶原蛋白; TGF: 转化生长因子

表 5 TGF- β_2 诱导后不同转染组细胞中 EMT 相关标志物 mRNA 和 MIAT mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad mRNA	α -SMA mRNA	Coll I mRNA	MIAT mRNA
siRNA+TGF- β_2 组	3	0.564 $\pm$ 0.044	2.607 $\pm$ 0.320	1.935 $\pm$ 0.036	2.142 $\pm$ 0.049
siRNA-MIAT+TGF- β_2 组	3	2.726 $\pm$ 0.361	0.997 $\pm$ 0.222	0.196 $\pm$ 0.054	0.731 $\pm$ 0.020
t 值		-10.299	7.159	46.149	46.493
P 值		0.008	0.003	0.000	0.000

注: (独立样本 t 检验) E-Cad: E-钙黏素; SMA: 平滑肌肌动蛋白; Coll: 胶原蛋白; TGF: 转化生长因子

2.6 不同转染组细胞 EMT 相关标志物蛋白相对表达量

Western blot 法检测发现, 与 siRNA+TGF- β_2 组比较, siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞内 E-Cad 蛋白表达条带较强, α -SMA 及 Coll I 蛋白表达条带较窄, 强度较弱。siRNA 空载体组与 siRNA-MIAT 转染组各蛋白条带表达强度接近 (图 4)。siRNA-MIAT 转染组与 siRNA 空载体组细胞中 E-Cad、 α -SMA、Coll I 蛋白相对表达量的差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 6)。与 siRNA+TGF- β_2 组比较, siRNA-MIAT+TGF- β_2 组细胞中 E-Cad 蛋白相对表达量明显增加, α -SMA 及 Coll I 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 ($t = -20.604, P = 0.000; t = 41.963, P = 0.000; t = 19.812, P = 0.000$) (表 7)。

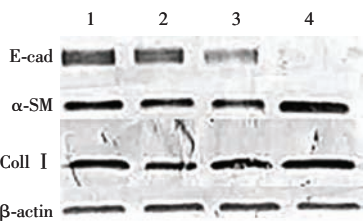


图 4 Western-blot 法检测不同转染组细胞中 E-Cad、 α -SMA 和 Coll I 蛋白表达电泳图 1: siRNA-MIAT 转染组 2: siRNA 空载体组 3: siRNA-MIAT + TGF- β_2 组 4: siRNA+TGF- β_2 组

E-Cad: E-钙黏素; SMA: 平滑肌肌动蛋白; Coll: 胶原蛋白; TGF: 转化生长因子

表 6 不同转染组细胞中 EMT 相关标志物蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad	α -SMA	Coll I
siRNA+对照组	3	1.637 $\pm$ 0.013	2.102 $\pm$ 0.019	1.746 $\pm$ 0.068
siRNA-MIAT+对照组	3	1.649 $\pm$ 0.027	2.072 $\pm$ 0.048	1.755 $\pm$ 0.037
t 值		-0.689	0.988	-0.201
P 值		0.528	0.379	0.851

注: (独立样本 t 检验) E-Cad: E-钙黏素; SMA: 平滑肌肌动蛋白; Coll: 胶原蛋白; TGF: 转化生长因子

表 7 TGF- β_2 诱导后不同转染组细胞中 EMT 相关标志物蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	E-Cad	α -SMA	Coll I
siRNA+TGF- β_2 组	3	0.089 $\pm$ 0.004	2.840 $\pm$ 0.047	2.393 $\pm$ 0.045
siRNA-MIAT+TGF- β_2 组	3	1.018 $\pm$ 0.078	1.257 $\pm$ 0.046	1.833 $\pm$ 0.020
t 值		-20.604	41.963	19.812
P 值		0.000	0.000	0.000

注: (独立样本 t 检验) E-Cad: E-钙黏素; SMA: 平滑肌肌动蛋白; Coll: 胶原蛋白; TGF: 转化生长因子

3 讨论

EMT 是一种生理或病理过程, 即完全极化的细胞锚到基底膜的基底表面而发生形态和功能变化, 从而获得间质表型。EMT 过程中细胞形态学发生改变, 表现为原细胞形态变成为细长的纺锤状以及上皮标志物表达的降低及细胞外基质成分增加, EMT 是胚胎发育、肿瘤转移和器官组织纤维化的标志^[15-16]。由 TGF- β 介导的 Smad 信号通路是 LECs 发生 EMT 的重要生物过程^[17], EMT 也是 PCO 形成的主要病理机制。白内障手术创伤或术后的炎症刺激可加快 TGF- β 的产生, 加速 PCO 的发生及发展。然而在 PCO 进展过程中 LECs-EMT 机制尚不完全清楚。研究证实, LncRNAs 参与癌症细胞、腹膜间皮细胞的 EMT 过程^[18-19]。Shen 等^[20]研究发现, LncRNA-MIAT 在白内障患者 LECs、房水和血浆中表达水平均显著上调, MIAT 基因敲除可抑制肿瘤坏死因子诱导的 LECs 异常增生和迁移, 提示 MIAT 在 PCO 相关病理过程中可能发挥作用。本研究探讨 LncRNA-MIAT 在 TGF- β_2 诱导的 SRA01/04 细胞 EMT 过程中的作用, 发现 TGF- β_2 刺激细胞发生 EMT 后细胞内 MIAT 表达上调, 表明 MIAT 在 SRA01/04 细胞纤维化过程中起重要作用, 此过程可能是 PCO 进展的重要标志, 进而我们用 siRNA 质粒转染细胞, 发现无论是在正常 LECs 或是经 TGF- β_2 诱导纤维化的 LECs 内, 转染特异性 siRNA-MIAT 均能下调细胞内 MIAT 表达, 但是 MIAT 表达的下调并不影响正常培养的细胞中 EMT 表型蛋白

的表达,而 TGF- β_2 组细胞内 MIAT 的下调则抑制由 TGF- β_2 诱导的 SRA01/04 细胞 EMT 变化,包括细胞形态的改变、E-Cad 表达上调以及 α -SMA 和 Col1I 蛋白表达的下调。这些结果初步揭示 lncRNA-MIAT 与 LECs 表型转换及纤维化之间存在一定的关系,MIAT 表达的下调抑制由 TGF- β_2 诱导的 SRA01/04 细胞纤维化过程,从而为 LECs-EMT 提供新的研究思路。

lncRNA/mRNA 共表达网络参与轴突导向、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路、补体和凝血级联反应、趋化因子信号转导通路和丙酮酸代谢过程,参与炎症、免疫、应激调节等生理病理过程^[21]。竞争性内源性 RNA (competing endogenous RNA, CeRNA) 假说认为, lncRNA 和 mRNA 转录物通过竞争性结合共享的微小 RNA (microRNA, miRNA) 而相互作用,即 lncRNA 可作为 miRNA 海绵体,调节 miRNA 对其靶 mRNAs 的绑定活性^[22]。研究表明,作为 CeRNA, lncRNA-MIAT 隔绝 miR-150-5p 对目标基因血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的生物学作用,从而减轻对 VEGF 表达的抑制^[23]。本研究结果显示, lncRNA-MIAT 参与 LECs 纤维化过程的调控,改变 MIAT 的表达或许可以转变 LECs 转分化的方向和纤维化发生的进程,进而延缓或阻止 PCO 形成。未来的研究将进一步探究 MIAT 是否与某种特异 mRNA 构成具体的调控网络,或者作用于其他细胞因子参与 PCO 的病理过程,为预防或逆转 LECs 纤维化寻找新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Danysh BP, Duncan MK. The lens capsule [J]. Exp Eye Res, 2009, 88 (2) : 151-164.
- [2] Wertheimer C, Kueres A, Siedlecki J, et al. The intraocular lens as a drug delivery device for an epidermal growth factor-Receptor inhibitor for prophylaxis of posterior capsule opacification [J]. Acta Ophthalmol, 2018, DOI:10.1111/aos.13759.
- [3] Dawes LJ, Elliott RM, Reddan JR, et al. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: TGFbeta regulated gene expression [J]. Mol Vis, 2007, 13 : 1181-1197.
- [4] Dawes LJ, Sleeman MA, Anderson IK, et al. TGFbeta/Smad4-dependent and-independent regulation of human lens epithelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50 (11) : 5318-5327. DOI:10.1167/iov.08-3223.
- [5] Yao K, Ye PP, Tan J, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in TGF-beta2-mediated epithelial mesenchymal transition in human lens epithelial cells [J]. Ophthalmic Res, 2008, 40 (2) : 69-76. DOI:10.1159/000113884.
- [6] Banh A, Deschamps PA, Gaudie J, et al. Lens-specific expression of TGF-beta induces anterior subcapsular cataract formation in the absence of Smad3 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47 (8) : 3450-3460. DOI:10.1167/iov.05-1208.
- [7] Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, et al. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury [J]. Am J Pathol, 2004, 164 (2) : 651-663. DOI:10.1016/S0002-9440 (10) 63153-7.
- [8] de Jongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, et al. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation [J]. Cells Tissues Organs, 2005, 179 (1-2) : 43-55. DOI:10.1159/000084508.
- [9] 陈晓云, 刘奕志. 转化生长因子- β 信号通路在后发性白内障发生发展中的作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (4) : 408-413. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.04.024.
- [10] Chen XY, Liu YZ. The role of the transforming growth factor- β pathway in the development of posterior capsule opacification [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31 (4) : 408-413. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.04.024.
- [11] Pasquale LR, Loomis SJ, Kang JH, et al. CDKN2B-AS1 genotype-glaucoma feature correlations in primary open-angle glaucoma patients from the United States [J]. Am J Ophthalmol, 2013, 155 (2) : 342-353. DOI:10.1016/j.ajo.2012.07.023.
- [12] Qiu GZ, Tian W, Fu HT, et al. Long noncoding RNA-MEG3 is involved in diabetes mellitus-related microvascular dysfunction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471 (1) : 135-141. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.164.
- [13] Gao Y, Lu X. Erratum to: Decreased expression of MEG3 contributes to retinoblastoma progression and affects retinoblastoma cell growth by regulating the activity of Wnt/ β -catenin pathway [J/OL]. Tumour Biol, 2016, 37 (4) : 5655 [2017-11-03]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26815501. DOI:10.1007/s13277-016-4831-6.
- [14] 黄晓波, 邹海东. 长链非编码 RNA 与眼部增生性疾病 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35 (12) : 1135-1138. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.017.
- [15] Huang XB, Zou HD. Research progress of long noncoding RNAs in ocular proliferative diseases [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (12) : 1135-1138. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.017.
- [16] Luan T, Zhang X, Wang S, et al. Long non-coding RNA MIAT promotes breast cancer progression and functions as ceRNA to regulate DUSP7 expression by sponging miR-155-5p [J]. Oncotarget, 2017, 8 (44) : 76153-76164. DOI:10.18632/oncotarget.19190.
- [17] Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, et al. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? [J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 40 : 16-34. DOI:10.1016/j.preteyeres.2013.12.006.
- [18] Yang S, Li H, Li M, et al. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy [J]. Discov Med, 2015, 20 : 207-217.
- [19] Eldred JA, Dawes LJ, Wormstone IM. The lens as a model for fibrotic disease [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366 (1568) : 1301-1319.
- [20] Pádúa AC, Fonseca AS, Muys BR, et al. Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines [J]. Stem Cells, 2013, 31 (12) : 2827-2832. DOI:10.1002/stem.1547.
- [21] 石田田, 何丽洁, 孙世仁, 等. 长链非编码 RNA-MALAT1 在高糖诱导的人腹膜间皮细胞纤维化过程中的作用 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2016, 5 (3) : 128-134. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-3216.2016.03.008.
- [22] Shin TT, He LJ, Sun SR, et al. Role of long noncoding RNA-MALAT1 in human peritoneal mesothelial cells fibrosis induced with high glucose [J]. 2016, 5 (3) : 128-134. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-3216.2016.03.008.
- [23] Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20 (3) : 537-548. DOI:10.1111/jcmm.12755.
- [24] Yan B, Tao ZF, Li XM, et al. Aberrant expression of long noncoding RNAs in early diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (2) : 941-951. DOI:10.1167/iov.13-13221.
- [25] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. Nature, 2014, 505 (7483) : 344-352. DOI:10.1038/nature12986.
- [26] Biao Y, Jin Y, Liu JY, et al. LncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA [J]. Circ Res, 2015, 116 (7) : 1143-1156.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-06-02)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)