

miR-204 对年龄相关性白内障 LECs 的抗氧化损伤作用及其机制

苏现华 王晔 黄钰森

266071 青岛大学医学院 山东省眼科研究所(苏现华);266071 青岛,山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地(王晔、黄钰森)

通信作者:黄钰森,Email:huang_yusen@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.008

【摘要】 背景 miRNAs 是一类非编码的小分子 RNA,对 LECs 的凋亡发挥调控作用,但 miRNAs 对年龄相关性白内障患者 LECs 中氧化损伤的生物学效应及其机制仍需进一步研究。目的 探讨 miR-204 在体内及体外对年龄相关性白内障氧化损伤的作用及其机制。方法 收集 20 例年龄相关性白内障患者的晶状体前囊膜和 20 个正常供体眼晶状体前囊膜,采用实时荧光定量 PCR 法检测 2 个组晶状体前囊膜中 miR-204 的表达量。对人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 进行培养,在细胞培养液中添加 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 建立 LECs 氧化损伤模型,然后将细胞分为模型对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组、拮抗物对照组,分别在细胞培养液中添加相应的转染剂,未用 H_2O_2 处理的 LECs 作为正常对照组。转染后 24 h 采用实时定量 PCR 法测定各组 LECs 中 miR-204 mRNA 的表达以验证转染率;采用流式细胞仪测定体外各组细胞的凋亡率;采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 LECs 中 TP53INP1 及 p53 mRNA 和蛋白的相对表达量。结果 年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜中 miR-204 mRNA 相对表达量明显低于正常人,差异有统计学意义 ($t=14.21, P<0.05$)。正常对照组、模型对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组、拮抗物对照组细胞凋亡率分别为 1.31 ± 0.12 、 4.90 ± 0.28 、 2.60 ± 0.15 、 4.39 ± 0.20 、 5.74 ± 0.13 和 4.34 ± 0.63 ,模型对照组细胞凋亡率明显高于正常对照组,差异有统计学意义 ($t=-20.69, P<0.01$);miR-204 拟似物组细胞凋亡率明显低于拟似物对照组,而 miR-204 拮抗物组细胞凋亡率明显高于拮抗物对照组,差异均有统计学意义 ($t=-12.20, P<0.01$; $t=3.79, P<0.05$)。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测结果显示,模型对照组细胞中 TP53INP1、p53 mRNA 及蛋白的相对表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 (mRNA 相对表达量: $t=6.44, 11.71$, 均 $P<0.01$; 蛋白相对表达量: $t=10.72, 19.40$, 均 $P<0.01$);miR-204 拟似物组细胞中 TP53INP1、p53 mRNA 和蛋白的相对表达量低于拟似物对照组,差异均有统计学意义 (mRNA 相对表达量: $t=-19.28, -10.58$, 均 $P<0.01$; 蛋白相对表达量: $t=-6.50, -6.36$, 均 $P<0.05$);miR-204 拮抗物组 TP53INP1、p53 mRNA 的相对表达量高于拮抗物对照组,差异均有统计学意义 (mRNA 相对表达量: $t=4.07, 3.74$, 均 $P<0.05$; 蛋白相对表达量: $t=7.18, 10.58$, 均 $P<0.05$)。结论 MiR-204 通过下调靶基因 TP53INP1 在 LECs 中的表达抑制 LECs 的凋亡,从而对年龄相关性白内障 LECs 发挥抗氧化损伤作用,该作用可能是通过影响 TP53INP1-p53 通路实现的。

【关键词】 微小 RNA; TP53INP1; p53; 年龄相关性白内障; 氧化损伤

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81370996); 山东省自然科学基金项目 (ZR2012HM009)

Anti-oxydative effects of miR-204 on LECs in age-related cataract Su Xianhua, Wang Ye, Huang Yusen
Medical College, Qingdao University, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Su XH); Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Wang Y, Huang YS)
Corresponding author: Huang Yusen, Email: huang_yusen@126.com

[Abstract] **Background** miRNAs are a group of non-coding small RNA molecules, and they play an important role in regulating the apoptosis of LECs. The biological effects and mechanisms of miRNAs on LECs in age-related cataract still need to be further elucidated. **Objective** This study was to investigate the anti-oxidative effects of miR-204 on age-related cataract *in vitro*. **Methods** The specimens of anterior lens capsules from age-related cataract patients and normal donors were collected in Shandong Eye Institution and 20 subjects for each. The expression level of miR-204 was detected and compared between cataractous eyes and normal eyes by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). HLE-B3 cells, a human LEC line, were cultured, and the oxidative

stress models of LECs were established by adding 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 in the medium. The models were divided into model control group, miR-204 agomir group, agomir negative control group, miR-204 antagomir group and antagomir negative control group according to the difference of transfected agents, and normal cells served as the control group. Twenty-four hours after transfection, the expression levels of miR-204 mRNA in the cells of various groups were detected by RT-qPCR to verify the transfection rate. Apoptosis rate of the cells was assayed by flow cytometry. The relative expression levels of TP53INP1 mRNA and p53 mRNA as well as their proteins were detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. **Results** The mean expression level of miR-204 was significantly lower in the anterior lens capsules of cataractous eyes than that in the normal eyes ($t=14.21, P<0.05$). The mean apoptosis rate of cells was $1.31\pm 0.12, 4.90\pm 0.28, 2.60\pm 0.15, 4.39\pm 0.20, 5.74\pm 0.13$ and 4.34 ± 0.63 in the normal control group, model control group, miR-204 agomir group, agomir negative control group, miR-204 antagomir group and antagomir negative control group, respectively. The apoptosis rate was significantly increased in the model control group compared with the normal control group ($t=-20.69, P<0.01$) and the apoptosis rate was also increased in the miR-204 antagomir group compared with antagomir negative control group ($t=3.79, P<0.05$); while the apoptosis rate in the miR-204 agomir group was significantly declined in comparison with agomir negative control group ($t=-12.20, P<0.01$). The relative expression levels of TP53INP1 and p53 mRNA and proteins in the cells were significantly higher in the model control group than those in normal control group (mRNA: $t=6.44, 11.71$, both at $P<0.01$; protein: $t=10.72, 19.40$, both at $P<0.01$), and so were between the miR-204 antagomir group and antagomir negative control group (mRNA: $t=4.07, 3.74$, both at $P<0.05$; protein: $t=7.18, 10.58$, both at $P<0.05$). However, the expression levels of TP53INP1 and p53 mRNA and protein were significantly reduced in the miR-204 agomir group in comparison with the agomir negative control group (mRNA: $t=-19.28, -10.58$, both at $P<0.05$; protein: $t=-6.50, -6.36$, both at $P<0.05$). **Conclusions** miR-204 induces oxidative damage of age-related cataract via targeting TP53INP1, which suggests that the activation of TP53INP1-p53 signaling may be involved in the development of age-related cataract.

[**Key words**] MicroRNA; TP53INP1; p53; Age-related cataract; Oxidative damage

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370996); National Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2012HM009)

白内障是常见的致盲疾病,其发病机制与年龄、性别、辐射、外伤、手术、氧化作用等多种因素有关^[1-3],其中年龄相关性白内障的发病机制主要包括氧化应激、紫外线损伤、钙蛋白酶激活、细胞凋亡等^[4]。近年来的研究发现,微小RNA(microRNA, miRNA)对人晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的凋亡发挥不同程度的调控作用,进而影响年龄相关性白内障的病程^[5-6],如 miR-125 通过抑制靶基因 p53 的表达来抑制 LECs 凋亡,miR-34a 或 let-7 等分别通过不同途径参与白内障的发病过程^[7-8]。MiRNA 广泛表达于视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)、晶状体、睫状体和神经视网膜层,miR-204 表达于 LECs 中^[9],通过 Meis-2 调控 PAX6 的转录,继而影响晶状体的分化。目前关于 miR-204 在年龄相关性白内障发病过程中与氧化损伤的关系国内外鲜有报道。我们前期的研究中利用生物信息学预测分析软件 TargetScan、miRanda 等共同进行预测和研究,显示 TP53INP1 是 miR-204 的靶基因之一,同时我们也利用双荧光素酶报告基因也验证了这一结果。本研究中拟探讨 miR-204 对年龄相关性白内障氧化损伤的抑制作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本的来源 于 2014 年 8-10 月收集青岛眼科医院行白内障手术的 20 例皮质性年龄相关性白内障患者的晶状体前囊膜标本,同时从青岛眼科医院眼库收集 20 名正常供体眼球晶状体前囊膜标本 20 份。本研究方案经过山东省眼科研究所伦理学委员会的批准,患者均被告知其标本使用的目的,并获得患者知情同意。

1.1.2 主要试剂及仪器 人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 细胞(由美国宾夕法尼亚大学基因治疗实验室提供);胎牛血清、DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);兔抗人 TP53INP1 一抗(sc68919)(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 p53 一抗(abcam1431)(英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(ZB-2301)(北京中杉金桥公司);ECL 发光试剂盒(北京碧云天生物技术研究所);RNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司);cDNA 合成第一链试剂盒(大连 Takara 公司);Real Master Mix(SYBR Green)(北京天根生化科技有限公司);AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国

BD 公司); 体积分数 3% H_2O_2 (美国 Sigma 公司); 人工合成的 miR-204 拟似物、miR-204 拮抗物、miR-204 拟似物对照物、miR-204 拮抗物对照物 (广州 Ribobio 生物有限公司)。实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 法检测晶状体前囊膜标本中 miRNA 的表达

分别将收集的年龄相关性白内障及正常人晶状体囊膜标本加入裂解液进行裂解, 用 RNA 提取试剂盒提取囊膜中总 RNA, 利用紫外分光光度计分析所提取 RNA 的浓度与纯度。收集 1 μ l Oligo dT 和 8 μ g 总 RNA, 无 RNA 酶水加入 EP 管中至 10 μ l, 按照 M-MLV 步骤行逆转录得到 cDNA。加入 Mix 4.0 μ l, miR-204、GAPDH (内参) 和上下游引物各 0.3 μ l (中国 Ribbio 生物公司设计和合成)。取 cDNA 1.0 μ l 及无 RNA 酶水 4.4 μ l 建立反应体系。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 25 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.2 细胞培养

HLE-B3 细胞复苏后用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.3 转染步骤及转染效率的检测

以 1×10^5 /孔细胞密度将细胞接种于 6 孔板进行培养。分别取 1 nmol miR-204 拟似物、拮抗物及对照 RNA 转染试剂溶于 50 μ l 水并进行分装。当细胞生长至 30% ~ 50% 融合时, 将细胞分为正常对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组和拮抗物对照组。转染前 PBS 清洗细胞 2 次, 更换为 2 ml 无血清 DMEM 培养液。按分组情况分别将上述稀释的转染试剂加入相应的培养孔, 拟似物、拟似物对照、拮抗物和拮抗物对照的最终使用量分别为 10、10、15 和 15 μ l, 终浓度分别为 100、100、150 和 150 nmol/L, 正常对照组不添加转染试剂, 继续培养细胞 24 h, 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 miR-204 的相对表达量以验证转染效率。

1.2.4 细胞模型的建立与分组

收集对数生长期的 HLE-B3 细胞, 以 1×10^5 /孔的细胞密度接种于 6 孔板, 待细胞生长至 80% 融合时, 各孔培养液中分别添加体积分数 3% H_2O_2 (终浓度为 200 μ mol/L) 处理 6 h, 以建立体外的 LECs 氧化损伤模型。然后将模型细胞分为模型对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组、拮抗物对照组, 未经 H_2O_2 处理的细胞作为正常对照组。各组细胞用 H_2O_2 作用 6 h 后, 弃上清, PBS 清洗 2 次, 更换 DMEM/F12 培养液, 继续置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 和饱和湿度的培养箱中孵育 12 h。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

各组转染细胞经 H_2O_2 作用后, 加入胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 每组细胞数约为 5×10^5 个, 离心半径 19 cm, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去培养液。PBS 洗 2 遍, 参照凋亡试剂盒说明书, 避光染色 30 min, 立即于 FACSCalibur 流式细胞仪中在波长为 488 nm 激光下检测细胞的凋亡情况。绘制流式细胞图, 左下象限为正常细胞 (AnV^-PI^-), 右下象限为早期凋亡细胞 (AnV^+PI^-), 左上象限为损伤细胞 (AnV^-PI^+), 右上象限为晚期凋亡细胞 (AnV^+PI^+)。计算细胞凋亡率, 相对凋亡率 = (早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 相对表达量

采用 QIAGEN 试剂盒提取细胞总 mRNA, 用紫外分光光度计检测 mRNA 的纯度和浓度。按照 Takara 逆转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA, 用特异性引物行实时荧光定量 PCR 检测, 测定 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量, 以 GAPDH 作为内参, 引物由青岛德罗海达生物有限公司设计并合成 (表 1)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 45 个循环。实验重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 TP53INP1 和 p53 引物序列

基因名称	引物序列	退火温度 ($^{\circ}$ C)	产物大小 (bp)
p53	F: 5'-CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTA-3'	58	149
	R: 5'-CACGCACCTCAAAGCTGTTTC-3'	60	
TP53INP1	F: 5'-CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTA-3'	58	155
	R: 5'-CACGCACCTCAAAGCTGTTTC-3'	58	
GAPDH	F: 5'-GGACCTGACCTGCCCTAGAT-3'	58	155
	R: 5'-GAGGAGTGGTGTGCTGCTT-3'	59	

1.2.7 Western blot 法检测细胞中 TP53INP1 和 p53 蛋白的表达

各组细胞培养液加入 100 μ l 细胞裂解液, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 10 μ g 蛋白行质量分数 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将样品蛋白转印至硝酸纤维素膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别添加相应一抗 (均为 1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜每次 10 min, 共 3 次, 添加二抗 (1:2 000) 后室温孵育 1 h, TBST 洗膜每次 10 min, 共 3 次, ECL 化学发光液显影 5 min, 暗室 X 射线压片曝光 2 min, 洗片。GAPDH 作为内参, 计算各目的蛋白表达的灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (序列号: 9A657E90-

E2B7-44DE-8929-055948162595, 美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料数据经 Sapiro-wilk 检验呈正态分布, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Bartlett 检验证实方差齐。本研究采用细胞均衡分组多个水平实验设计, 正常供体眼与年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜中 miR-204 mRNA 相对表达量的差异比较采用独立样本 *t* 检验; 正常对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组和拮抗物对照组间细胞中 miR-204 mRNA 的相对表达量、细胞凋亡率、LECs 中 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 及其蛋白的相对表达量总体比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较均采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-204 mRNA 在年龄相关性白内障晶状体组织中的表达变化

实时荧光定量 PCR 法检测显示, miR-204 mRNA 在正常人及年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜中的相对表达量分别为 1.27 ± 0.07 和 0.46 ± 0.06 , 年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜中 miR-204 mRNA 的表达水平明显低于正常人, 差异有统计学意义 ($t = 14.21, P < 0.05$) (图 1)。

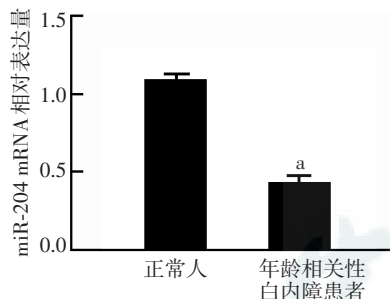


图 1 正常人与年龄相关性白内障患者晶状体组织中 miR-204 mRNA 相对表达量的比较 与正常人比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$)

2.2 各组细胞转染后 miR-204 mRNA 的相对表达量

实时荧光定量 PCR 法检测显示, 正常对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组和拮抗物对照组间细胞中 miR-204 mRNA 的总体比较差异有统计学意义 ($F = 207.43, P < 0.01$), 其中 miR-204 拟似物组细胞中 miR-204 mRNA 的相对表达量明显增加, 是拟似物对照组的 5.6 倍, 2 个组间比较差异有统计学意义 ($t = 15.14, P < 0.01$); 而 miR-204 拮抗物组细胞中 miR-204 mRNA 相对表达量明显下降, 为 miR-204 拮抗物对照组的 32.5%, 2 个组间差异有统计学意义 ($t = -11.16, P < 0.01$), 各组细胞的转染效率达到预期效果 (表 2)。

表 2 各组细胞转染后 miR-204 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-204 mRNA 表达量
正常对照组	3	1.00 ± 0.00
miR-204 拟似物组	3	5.21 ± 0.36^a
拟似物对照组	3	0.85 ± 0.34
miR-204 拮抗物组	3	0.45 ± 0.07
拮抗物对照组	3	1.39 ± 0.12^b
<i>F</i>		207.43
<i>P</i>		< 0.01

注: 与拟似物对照组比较, $^a P < 0.05$; 与拮抗物对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.3 各组 LECs 的凋亡率

流式细胞仪检测结果显示, 正常对照组、模型对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组和拮抗物对照组的细胞凋亡率分别为 $(1.31 \pm 0.12)\%$ 、 $(4.90 \pm 0.28)\%$ 、 $(2.60 \pm 0.15)\%$ 、 $(4.39 \pm 0.20)\%$ 、 $(5.74 \pm 0.13)\%$ 和 $(4.34 \pm 0.63)\%$, 6 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 36.01, P < 0.01$), 其中模型对照组的细胞凋亡率明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = -20.69, P < 0.01$), miR-204 拟似物组细胞凋亡率明显低于拟似物对照组, 差异有统计学意义 ($t = -12.20, P < 0.01$), miR-204 拮抗物组细胞凋亡率显著高于拮抗物对照组, 差异有统计学意义 ($t = 3.79, P < 0.05$)。拟似物对照组和拮抗物对照组的细胞凋亡率与模型对照组接近, 组间比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 2)。

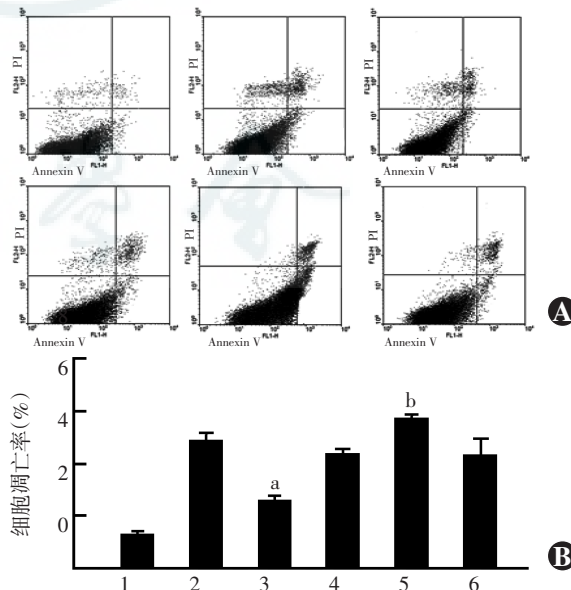


图 2 各组 LECs 凋亡率的检测 A: 各组 LECs 凋亡率的流式细胞图 B: 各组 LECs 凋亡率的量化比较 $F = 36.01, P < 0.01$. 与拟似物对照组比较, $^a P < 0.05$; 与拮抗物对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组 2: 模型对照组 3: miR-204 拟似物组 4: 拟似物对照组 5: miR-204 拮抗物组 6: 拮抗物对照组

2.4 各组 LECs 中 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量

正常对照组、模型对照组、miR-204 拟似物组、拟似物对照组、miR-204 拮抗物组、拮抗物对照组间 LECs 中 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=35.97, 46.54$, 均 $P<0.01$), 其中模型对照组细胞中 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t=6.44, 11.71$, 均 $P<0.01$); miR-204 拟似物组 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量均低于拟似物对照组, 差异均有统计学意义 ($t=-19.28, -10.58$, 均 $P<0.01$); miR-204 拮抗物组 TP53INP1 mRNA 和 p53 mRNA 的相对表达量均高于拮抗物对照组, 差异均有统计学意义 ($t=4.07, 3.74$, 均 $P<0.05$) (表 3)。

2.5 各组 LECs 中 TP53INP1 和 p53 蛋白的表达

Western blot 法检测显示, 各组间 TP53INP1 和 P53 蛋白表达量总体比较差异有统计学意义 ($F=39.53, 29.50$, 均 $P<0.01$)。与正常对照组相比, 模型对照组 TP53INP1、p53 蛋白的显影条带明显增强, 差异均有统计学意义 ($t=10.72, 19.40$, 均 $P<0.01$)。转染 miR-204 拟似物组中 TP53INP1、p53 蛋白的表达条带弱于拟似物对照组, 2 个组间 TP53INP1 和 p53 蛋白表达条带的灰度值差异均有统计学意义 ($t=-6.50, -6.36$, 均 $P<0.05$)。miR-204 拮抗物组中 TP53INP1 和 p53 蛋白表达条带强于拮抗物对照组, 差异均有统计学意义 ($t=7.18, 10.58$, 均 $P<0.05$) (图 3, 表 3)。

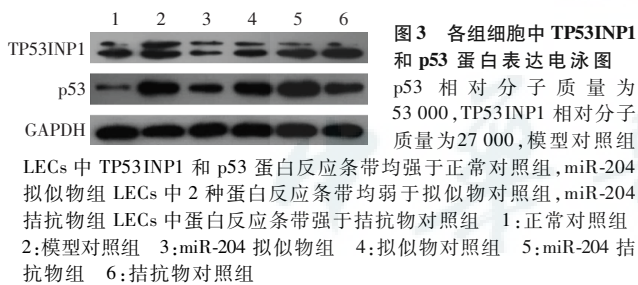


表 3 各组 LECs 中 TP53INP1 和 p53 mRNA 及蛋白的相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	目的基因		目的蛋白	
		TP53INP1	p53	TP53INP1	p53
正常对照组	3	0.80±0.15	0.77±0.14	1.00±0.00	1.00±0.00
模型对照组	3	1.43±0.07 ^a	2.37±0.18 ^a	1.53±0.06	2.70±1.18
miR-204 拟似物组	3	0.75±0.01 ^b	0.66±0.13 ^b	0.76±0.06 ^b	1.37±0.19 ^b
拟似物对照组	3	1.38±0.05	2.21±0.21	1.45±0.14	2.64±0.15
miR-204 拮抗物组	3	1.69±0.17 ^c	3.29±0.15 ^c	1.82±0.02 ^c	2.72±0.01 ^c
拮抗物对照组	3	1.21±0.11	2.58±0.42	1.24±0.11	2.43±0.03
<i>F</i>		35.97	46.54	39.53	29.50
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与拟似物对照组比较, ^b $P<0.05$; 与拮抗物对照组比较, ^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR-204: 微小 RNA204

3 讨论

白内障的发生及发展与氧自由基, 如氧化物阴离子、 H_2O_2 和羟自由基在 LECs 周围过度聚集密切相关^[11]。晶状体氧化损伤的机制可能是氧自由基激活细胞凋亡的信号途径, 生物膜受到损伤, 钙泵功能失调, 干扰细胞内钙离子的稳态, 最终导致细胞凋亡, 引起晶状体损伤^[12-13]。白内障患者房水中 H_2O_2 浓度高于正常人, 而 H_2O_2 是重要的细胞凋亡诱导剂, 在体外能诱导细胞凋亡, 广泛用于制作各种急性和慢性氧化损伤模型^[14]。本研究中利用 H_2O_2 处理人 LECs, 模拟年龄相关性白内障发生的微环境, 建立体外人 LECs 氧化损伤的细胞模型。

miRNA 是近年来发现的内源性非编码 RNA 分子, 由 21~25 个核苷酸组成, 通常靶向调控 1 个或多个 mRNA, 通过抑制翻译水平或使靶基因 mRNA 断裂而调节基因的表达^[15-16]。miRNA 参与细胞发育、增生和凋亡等过程, 与多种疾病的发生具有一定关系。miRNA 参与年龄相关性白内障的发生及发展, 但 miR-204 与年龄相关性白内障氧化损伤的发病机制关系及机制尚不清楚。研究发现, miR-204 在子宫内膜腺癌、胃远端腺癌、大肠癌、心肌缺血-再灌注等疾病累及的组织中呈低表达^[17-19]。此外, 研究显示 miR-204 参与调控晶状体分化和视盘的发育过程, 其可能通过作用于 *Meis-2* 基因进而调控 *Pax6* 基因转录途径, 调控晶状体的分化^[10]。本研究中通过实时荧光定量 PCR 发现 miR-204 在年龄相关性白内障 LECs 中低表达, 提示 miR-204 与年龄相关性白内障的发生可能存在一定关系。miR-204 拟似物, 一种经过特殊修饰的 miRNAs 模拟物, 可以使 miR-204 表达上调; miR-204 拮抗物, 一种能沉默 miR-204 的反义核苷酸, 可以使 miR-204 表达下调, 本研究中利用 miR-204 拟似物及拮抗物进一步探讨基因与年龄相关性白内障的关系。结果显示, 人 LECs 转染 miR-204 拟似物后细胞中 miR-204 表达上调, 细胞凋亡率显著低于拟似物对照组, 而 LECs 转染 miR-204 拮抗物后细胞中 miR-204 表达下调, 细胞凋亡率高于拮抗物对照组, 进一步证实 miR-204 参与 LECs 氧化损伤过程中的细胞凋亡。既往研究表明 miR-125b 可抑制靶基因 *p53* 的表达, 对 LECs 的凋亡发挥调控作用^[20]。本研究中结果显示 miR-204 与 TP53INP1 的表达趋势相反, 提示 miR-204 可负性调节靶基因 *TP53INP1* 而参与 LECs 的氧化损伤过程。由此推测 miR-204 表达的上调抑制 LECs 凋亡的机制可能是通过某些生物信号发挥抗凋亡、抗氧化损伤作用,

从而减少 LECs 的损伤和凋亡。

TP53INP1 是 p53 诱导的核蛋白 1, 可编码 TP53INP1- α 和 TP53INP1- β , TP53INP1 也是 p53 的靶基因之一, 作为转录因子在 p53 诱导细胞凋亡网络中起关键作用, 当细胞处于应激极化状态时表达上调^[20]。TP53INP1 是多种 miRNAs 的靶基因, 如在白血病的发病过程中, miR-93 和 miR-130b 通过调节 TP53INP1 而发挥重要作用。Jiang 等^[21] 研究显示, miR-125b 通过调控 TP53INP1 的表达在乳腺癌的发病过程中发挥重要作用。本研究通过生物信息学软件预测和双荧光素酶报告基因证实 TP53INP1 为 miR-204 的靶基因, 而 TP53INP1 在年龄相关性白内障发生中的作用尚未明确。本研究中发现, H₂O₂ 处理的 LECs 中 TP53INP1 mRNA 及蛋白表达高于正常 LECs, 进一步验证了细胞在应激状态下 TP53INP1 表达上调这一现象。TP53INP1 可与 p53 直接作用, 也可与某些激酶结合而发挥作用。研究发现, TP53INP1 能作用于 p53, 使 p53 蛋白的第 46 位丝氨酸 (Ser-46) 磷酸化而调节 p53 的活性^[22]。p53 是调控细胞凋亡的重要基因, 能够参与细胞凋亡、生长抑制、干扰细胞周期进程、分化及加速 DNA 修复以及细胞应激后的衰老等过程的调控。Okamura 等^[23] 研究显示, 细胞在应激状态下导致 DNA 损伤, 激活凋亡因子 p53 等细胞相关因子, 进而作用于依赖 p53 途径的 TP53INP1, 参与细胞凋亡过程。而本研究结果显示, LECs 在 H₂O₂ 氧化损伤后 TP53INP1 与 p53 表达均上调, 且两者表达趋势一致, 氧化损伤的细胞可激活 p53, 进而激活下游靶基因 TP53INP1, 通过调控细胞凋亡参与年龄相关性白内障的发生。

综上所述, 在年龄相关性白内障的发病过程中, LECs 中 miR-204 表达的上调能够抑制氧化损伤过程中的细胞凋亡, 同时 miR-204 可以负调控下游靶基因 TP53INP1 以影响 TP53INP1-p53 途径, 从而参与年龄相关性白内障的发生过程。今后需继续深入探讨 miR-204 参与年龄相关性白内障 LECs 氧化损伤的作用和具体机制, 为临床生物治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, et al. 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies [J]. Ophthalmic Epidemiol, 2004, 11 (2): 67-115.
- [2] Mukesh BN, Le A, Dimitrov PN, et al. Development of cataract and associated risk factors: the visual impairment project [J]. Arch Ophthalmol, 2006, 124 (1): 79-85. DOI: 10.1001/archoph.124.1.79.
- [3] Delcourt C, Dupuy AM, Carriere I, et al. Albumin and transthyretin as risk factors for cataract: the POLA study [J]. Arch Ophthalmol, 2005, 123 (2): 225-232. DOI: 10.1001/archoph.123.2.225.
- [4] Malina H, Richter C, Frueh B, et al. Lens epithelial cell apoptosis and intracellular Ca²⁺ increase in the presence of xanthurenic acid [J/OL]. BMC Ophthalmology, 2002, 2: 1 [2016-01-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103667. DOI: 10.1186/1471-2415-2-1.
- [5] Amiel J, de Pontual L, Henrion-Caude A. miRNA, development and disease. Advances in genetics [J]. Adv Genet, 2012, 80: 1-36. DOI: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00001-6.
- [6] Wu C, Lin H, Wang Q, et al. Discrepant expression of microRNAs in transparent and cataractous human lenses [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (7): 3906-3912. DOI: 10.1167/iov.11-9178.
- [7] 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.
- [8] Peng CH, Liu JH, Wong 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.
- [9] Melton C, Judson RL, Belloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells [J]. Nature, 2010, 463 (7281): 621-626. DOI: 10.1038/nature08725.
- [10] Conte I, Carrella S, Avellino R, et al. miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (35): 15491-15496. DOI: 10.1073/pnas.0914785107.
- [11] Huang L, Estrada R, Yappert MC, et al. Oxidation-induced changes in human lens epithelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41 (9): 1425-1432. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.022.
- [12] Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataract [J]. Exp Eye Res, 1981, 33 (6): 673-681.
- [13] Truscott RJ. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key [J]. Exp Eye Res, 2005, 80 (5): 709-725. DOI: 10.1016/j.exer.2004.12.007.
- [14] Haudek VJ, Gundacker NC, Slany A, et al. Consequences of acute and chronic oxidative stress upon the expression pattern of proteins in peripheral blood mononuclear cells [J]. J Proteome Res, 2008, 7 (12): 5138-5147. DOI: 10.1021/pr800438f.
- [15] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116 (2): 281-297.
- [16] 张丽娟, 张琰, 东莉洁, 等. MicroRNA 在眼部的表达及其功能 [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48 (12): 1136-1140. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.12.023. Zhang LJ, Zhang Y, Dong LJ, et al. Expression and function of microRNA in the eye [J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 48 (12): 1136-1140. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.12.023.
- [17] Wu W, Lin Z, Zhuang Z, et al. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma [J]. Eur J Cancer Prev, 2009, 18 (1): 50-55. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e328305a07a.
- [18] Chen L, Yan HX, Chen J, et al. Negative regulation of c-Myc transcription by pancreas duodenum homeobox-1 [J]. Endocrinology, 2007, 148 (5): 2168-2180. DOI: 10.1210/en.2006-1221.
- [19] Xiao J, Zhu X, He B, et al. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II [J/OL]. J Bio Sci, 2011, 18: 35 [2016-01-13]. http://jbiomed.sci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-18-35. DOI: 10.1186/1423-0217-18-35.
- [20] Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL, et al. Conserved regulation of p53 network dosage by micro RNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs [J/OL]. PLoS Genet, 2011, 7 (9): e1002242 [2016-01-04]. http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002242. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002242.

- [21] Jiang F, Liu T, He Y, et al. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo[J/OL]. BMC Cancer, 2011, 11: 425 [2016-01-04]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-425>. DOI:10.1186/1471-2407-11-425.
- [22] Tomasini R, Samir AA, Carrier A, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity[J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37722-37729. DOI:10.1074/jbc.M301979200.
- [23] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis[J]. Mol Cell, 2001, 8(1): 85-94.

(收稿日期:2016-01-28)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

本刊对参考文献著录格式的要求

参考文献著录格式基本执行 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录,以文献出现的先后顺序用阿拉伯数字标出并列于文后,序号以方括号标注。参考文献应选用亲自阅读的近期文献,不宜引用摘要作为参考文献。未公开发表的资料(不包括已被接收的待发表资料)、内部刊物、个人通信、会议论文集等请不要列入参考文献。文献作者为 1~3 位者姓名全部列出,3 位以上者,列出前 3 位作者姓名,再加“等”。英文作者姓名的著录方式为姓在前用全称,首字母大写,名在后用缩写,均大写,但不加缩写点符号;参考文献的责任者间以“,”间隔,不用“和”、“and”等连词。人为复姓者请用英文半字线连接。外文期刊名称用缩写,可以采用国际医学期刊编辑委员会推荐的 NLM's Citing Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256>) 中的格式,中文期刊用全名,日文汉字请按日文规定书写,勿与中国汉字及简化字混淆,其他国家文字来源的参考文献请以各国的习惯书写。每条参考文献的文题后须根据 GB 3469-1983《文献类型与文献载体代码》标注文献类型和电子文献载体标志代码,并均著录起止页。各条参考文献在正文引用处用角标标出序号并用方括号标示(如:USH3 综合征较少见^[1-3]),正文引用的参考文献作者姓名(中文参考文献)或姓(英文参考文献)应与文后著录的作者相一致。有 DOI 号的参考文献应在文后参考文献中提供。为了国际交流的需要,本刊要求凡是中文参考文献均需中英文双语著录。参考文献著录格式如下:

[期刊]主要责任者.题名[文献类型标志].连续出版物题名:其他题名信息,年,卷(期):起页-止页. DOI:xx. xxxxx/xxxx. x. xx.

例:[1]刘高勤,陈源,陈磊,等.一氧化氮合成酶及其抑制剂在碱烧伤诱导的角膜新生血管中的作用[J].中华实验眼科杂志, 2013, 31(10): 908-913. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.002.

[2] Jager MJ, Ho L, Ly LV. The role of inflammation and aging in age-related macular degeneration and uveal melanoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(1): 1-7. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.001.

[书籍]析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者.专著题名:其他题名信息.版本项(第 1 版可省略).出版地:出版者,出版年:析出文献起止页码.

例:[1]周文炳.临床青光眼[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2000:311-313.

[2] Hollyfield JG, Anderson RE, Lavail MM. Retinal degenerations[M]. Florida: CRC Press Inc., 1991: 39-41.

[3] 徐锦堂.眼化学伤的药物治疗[M]//陈祖基.眼科临床药理学.北京:化学工业出版社,2002:463-468.

[4] Grabow HB. The clear-corneal incision[M]//Fine IH, Fichman RA. Clear-corneal cataract surgery and topical anesthesia. Thorofare: Slack, 1993: 29-62.

[专利]专利申请者或所有者.专利题名:专利国别,专利号[文献类型标志].公告日期或公开日期.

例:姜锡洲.一种温热外敷药制备方案:中国,88105607.3[P].1989-07-26.

[电子文献]主要责任者.题名:其他题名信息[文献类型标志/文献载体标志].出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期].获取和访问路径.

例:[1]王明亮.关于中国学术期刊标准化数据库系统工程的进展[EB/OL][1998-08-16].<http://www.cajed.edu.cn/pub/wrnl.txt/980110-2.html>.

[2] Tucker BA, Park IH, Qi SD, et al. Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptors precursors restore retinal structure and function in degenerative mice[J/OL]. PLoS One, 2011, 6(4): E18992 [2015-11-04]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018992>. DOI:10.1371/journal.pone.0018992.

(本刊编辑部)