

## · 实验研究 ·

## miR-338-3p/TCF4 对脉络膜微血管内皮细胞增生及凋亡的影响

李建成<sup>1</sup> 卜战云<sup>2</sup> 潘俊辉<sup>3</sup><sup>1</sup>驻马店市中心医院重症医学科 463000; <sup>2</sup>郑州大学第一附属医院眼科 450052; <sup>3</sup>郑州市第二人民医院眼科 450006

通信作者: 卜战云, Email: buzhanyn123@163.com

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA-338-3p (miR-338-3p) 对脉络膜微血管内皮细胞增生和凋亡的影响及其调控机制。方法 体外培养人脉络膜微血管内皮细胞, 将培养的细胞分为血管内皮生长因子 (VEGF) 组和正常对照组, 正常对照组细胞常规培养, VEGF 组细胞应用 VEGF 处理 24 h; 将 VEGF 组培养的细胞分为 4 个亚组, 分别将阴性对照 (miR-NC)、miR-338-3p 拟似物、miR-338-3p 拟似物+pcDNA、miR-338-3p 拟似物+pcDNA-TCF4 转染至脉络膜微血管内皮细胞后用 VEGF 处理 24 h。采用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 检测细胞中 miR-338-3p 和 TCF4 相对表达量; 采用 MTT 法检测细胞增生率以评估细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 行双荧光素酶报告实验验证 miR-338-3p 与 TCF4 的靶向关系; 采用 Western blot 法检测细胞中增生标记蛋白细胞增生核抗原-67 (Ki-67)、增生细胞核抗原 (PCNA)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 (bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (bcl-2) 蛋白相对表达量。结果 与正常对照组比较, VEGF 组细胞中 miR-338-3p mRNA 表达水平显著降低, TCF4 mRNA 表达水平显著升高, 细胞增生率显著升高, 细胞凋亡率显著降低, 细胞中 Ki-67、PCNA、bcl-2 蛋白表达水平显著升高, bax 蛋白水平显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 VEGF+miR-NC 组比较, VEGF+miR-338-3p 组细胞增生率显著降低, 细胞凋亡率显著升高, 细胞中 Ki-67、PCNA、bcl-2 蛋白表达水平显著降低, bax 蛋白表达水平显著升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 双荧光素酶报告实验证实 miR-338-3p 可靶向结合 TCF4; 与 VEGF+miR-338-3p+pcDNA 组比较, VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组细胞增生率显著升高 [(56.48±13.20)% vs. (96.24±16.24)%], 细胞凋亡率显著降低 [(30.59±3.57)% vs. (12.36±1.29)%], 细胞中 Ki-67、PCNA、bcl-2 蛋白表达水平显著升高 (0.41±0.11 vs. 0.96±0.19; 0.44±0.10 vs. 0.97±0.20; 0.55±0.12 vs. 0.98±0.15), bax 蛋白表达水平显著降低 (0.87±0.13 vs. 0.42±0.11), 差异均有统计学意义 ( $t = 5.700, 14.408, 7.516, 7.111, 6.715, 7.927$ , 均  $P < 0.01$ )。结论 miR-338-3p 过表达可负向调控 TCF4 在细胞中的表达量, 从而抑制脉络膜微血管内皮细胞的增生及诱导细胞凋亡。

**【关键词】** miR-338-3p; T 细胞生长因子 4; 脉络膜微血管内皮细胞; 增生; 凋亡

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (201702146)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200407-00242

**Effects of miR-338-3p/TCF4 on choroidal microvascular endothelial cell proliferation and apoptosis**Li Jiancheng<sup>1</sup>, Bu Zhanyun<sup>2</sup>, Pan Junhui<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Critical Medicine, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Zhengzhou Second People's Hospital, Zhengzhou 450006, China

Corresponding author: Bu Zhanyun, Email: buzhanyn123@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether microRNA-338-3p (miR-338-3p) affects the proliferation and apoptosis of choroidal microvascular endothelial cells by regulating the expression of T cell factor 4 (TCF4).**Methods** Human choroidal microvascular endothelial cells were cultured *in vitro*, and they were divided into vascular endothelial growth factor (VEGF) group and Normal control group. The Cultured cells in the VEGF group were divided into four subgroups, and were transfected with miR-NC, miR-338-3p mimics, miR-338-3p mimics + pcDNA, miR-338-3p mimics + pcDNA-TCF4 before VEGF treatment, respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

was used to detect the expression of miR-338-3p and TCF4. MTT assay was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The double luciferase report experiment verified the targeting relationship of miR-338-3p and TCF4. Western blot was used to detect the expression of Ki-67, PCNA, bax, and bcl-2.

**Results** After VEGF treatment, the expression level of miR-338-3p was significantly reduced, the expression level of TCF4 mRNA was significantly increased, the cell viability was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly decreased, the levels of Ki-67, PCNA, bcl-2 protein were increased significantly, and the level of bax protein was decreased significantly (all at  $P < 0.05$ ). After miR-338-3p overexpression, the cell viability was significantly reduced, the apoptosis rate was significantly increased, and the levels of Ki-67, PCNA, and bcl-2 proteins were significantly reduced, the level of bax protein was increased significantly (all at  $P < 0.05$ ). Double luciferase reporting experiments confirmed that miR-338-3p targeted TCF4. Compared with the VEGF + miR-338-3p + pcDNA group, the cell viability of the VEGF + miR-338-3p + pcDNA-TCF4 group was significantly increased ( $[56.48 \pm 13.20] \% vs. [96.24 \pm 16.24] \%$ ), and the apoptosis rate was significantly reduced ( $[30.59 \pm 3.57] \% vs. [12.36 \pm 1.29] \%$ ), the levels of Ki-67, PCNA and bcl-2 protein were significantly increased ( $0.41 \pm 0.11 vs. 0.96 \pm 0.19$ ;  $0.44 \pm 0.10 vs. 0.97 \pm 0.20$ ;  $0.55 \pm 0.12 vs. 0.98 \pm 0.15$ ), and the levels of bax protein were significantly decreased ( $0.87 \pm 0.13 vs. 0.42 \pm 0.11$ ) ( $t = 5.700, 14.408, 7.516, 7.111, 6.715, 7.927$ ; all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Overexpression of miR-338-3p can negatively regulate TCF4 expression, thereby inhibit choroidal microvascular endothelial cell proliferation and induce apoptosis.

**[Key words]** miR-338-3p; T cell factor 4; Choroidal vascular endothelial cells; Hyperplasia; Apoptosis

**Fund program:** Henan Medical Science and Technology Project (201702146)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200407-00242

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是多种眼底病变的严重并发症, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可促进血管内皮细胞的增生, 在 CNV 的形成过程中发挥促进作用<sup>[1-3]</sup>。微小 RNA (microRNA, miRNA) 在 CNV 的发生过程中可能发挥重要调控作用, 有望成为 CNV 治疗靶点<sup>[4]</sup>。研究发现, 微小 RNA-338-3p (microRNA-338-3p, miR-338-3p) 在脂多糖诱导的人支气管上皮细胞中表达下调, 可能参与人支气管上皮细胞炎性损伤过程<sup>[5]</sup>。生物信息学分析显示, T 细胞生长因子 4 (T cell factor 4, TCF4) 可能是 miR-338-3p 的靶基因, TCF4 表达上调可抑制脂多糖诱导的骨关节炎的进展<sup>[6]</sup>。miR-338-3p 可能参与炎症性疾病发生及发展过程, 推测 miR-338-3p 可能参与 CNV 发生和发展过程。本研究中探讨 miR-338-3p 对 VEGF 处理的脉络膜微血管内皮细胞增生和凋亡的影响及其调控作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

人脉络膜微血管内皮细胞 (上海联迈生物工程有限公司); 青霉素 (北京索莱宝科技有限公司); VEGF (美国 Peprotech 公司); 杜氏改良培养基 (DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); Lipofectamine2000、Trizol (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、实时荧光

定量 PCR 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); miR-338-3p 寡核苷酸拟似物 (miR-338-3p mimics) 及阴性对照序列 (miR-negative control, miR-NC)、miR-338-3p 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-miR-338-3p) 及阴性对照 (anti-miR-NC) (广州锐博生物科技有限公司); pcDNA (上海远慕生物科技有限公司); MTT (上海泽叶生物科技有限公司); 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (FITC)/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡试剂盒 (美国 Sigma 公司); RIPA 裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量检测试剂盒、增强型化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) (北京全式金生物技术有限公司); 兔抗人 TCF4 抗体 (美国 Epitomics 公司); 兔抗人增生标记蛋白细胞增生核抗原-67 (antigen identified by monoclonal, Ki-67) 抗体 (sc-23900)、增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (sc-56) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白抗体 (bcl-2-associated X protein, bax; 抗体编号: 14796)、兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 抗体 (B-cell lymphoma-2, bcl-2; 抗体编号: 15071) (美国 CST 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司); 野生型载体 WT-TCF4、突变型载体 MUT-TCF4 (美国 Promega 公司); 荧光素酶活性检测试剂盒 (美国 Promega 公司)。7500 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞转染** 脉络膜微血管内皮细胞培养于含有体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml (商品单位) 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基, 待细胞生长至 80% 融合时用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 加入培养基制备细胞悬液, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$ /ml, 按照每孔 200 μl 的容量接种于 24 孔板。将培养的细胞分为 VEGF 组和正常对照组, 参照文献 [7] 的方法, VEGF 组在培养液中加入 10 ng/ml VEGF (2 ml) 处理细胞 24 h, 正常对照组常规方法培养细胞。将 VEGF 组细胞亚分为 VEGF 组、VEGF + miR-NC 组、VEGF + miR-338-3p 组、VEGF + miR-338-3p + pcDNA 组和 VEGF + miR-338-3p + pcDNA-TCF4 组。参照 Lipofectamine 2000 试剂说明书分别将 miR-NC、miR-338-3p 拟似物、pcDNA 和 pcDNA-TCF4 各 20 μl 转染至细胞, 转染后 6 h 将培养基更换为含有 VEGF 的培养基继续培养 24 h。

**1.2.2 实时荧光定量法检测细胞中 miR-338-3p 和 TCF4 mRNA 表达** 收集各组对数生长期细胞, Trizol 法提取 RNA, 采用 Nanodrop2000c 超微量分光光度计检测 RNA 浓度。参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。反应引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, miR-338-3p 以 U6 为内参, TCF4 以 GAPDH 为内参。miR-338-3p 正向引物: 5'-TCCTGGTCTGAGTGATGAC-3', 反向引物 5'-GACTAGCATCGATCAGCATCAG-3'; TCF4 正向引物: 5'-CTTCCTCCAAACCAGCAACC-3', 反向引物: 5'-ATGTGGATGCAGGCTACAGT-3'; U6 正向引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3', 反向引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'; GAPDH 正向引物: 5'-AACGGATTTGGTCTGATTG-3', 反向引物 5'-GGAAGATGGTATGGGATT-3'。以 cDNA 为模板, 反应条件: 95 °C 预变性 60 s; 95 °C 变性 60 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 36 次循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-338-3p 和 TCF4 mRNA 相对表达量。

**1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活性** 收集各组对数生长期细胞, 将 0.25% 胰蛋白酶加入培养基, 制备单细胞悬液接种于 96 孔板, 细胞密度为  $5 \times 10^4$ /孔, 每组设 3 个复孔, 继续培养 24 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μl, 继续培养 4 h, 离心半径 10 cm, 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO), 室温下避光孵育 5 min, 采用酶标仪检测各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = (实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率** 收集各组对数

生长期细胞, 预冷 PBS 洗涤, 离心半径 6 cm, 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 加入 5 μl Annexin V-FITC 及 5 μl PI, 室温下孵育 10 min, 用 FACS Calibur 流式细胞仪及仪器中 Cellaest 软件检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞) / 细胞总数 × 100%。

**1.2.5 双荧光素酶报告基因检测 miR-338-3p 靶基因** StarBase 预测显示, TCF4 的 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 含有 miR-338-3p 互补序列, 将含有结合位点与突变位点的序列插入荧光素酶报告基因载体分别构建野生型载体 WT-TCF4 和突变型载体 MUT-TCF4, 加入细胞培养液转染 48 h, 参照检测试剂盒说明书检测各组荧光素酶活性。

**1.2.6 Western blot 法检测细胞中 TCF4、增生相关蛋白和凋亡调控蛋白表达** 将细胞分为 miR-NC 组、miR-338-3p 组、anti-miR-NC 组和 anti-miR-3p 组, 收集各组对数生长期细胞, 加入适量 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 分离蛋白, 将分离的蛋白凝胶转移至 PVDF 膜, 采用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 滴加目的蛋白一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育 24 h, TBST 洗涤, 滴加相应二抗 (1:5 000), 室温下孵育 1 h, TBST 洗涤。滴加 ECL, 采用 Image J 软件分析蛋白表达灰度值。以 GAPDH 为内参照, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达灰度值/内参表达灰度值。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料采用 Shapiro-Wilk 法检测证实符合正态分布, 以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 计数资料以频数和百分数表示。采用均衡分组单因素干预研究设计, 正常对照组与 VEGF 组 miR-338-3p 和 TCF4 mRNA 相对表达量差异比较采用独立样本 *t* 检验, 不同 miRNA 转染组间细胞增殖率及增生相关因子、细胞凋亡率、凋亡调控蛋白相对表达量差异总体比较采用单因素方差分析, 不同 TCF4 转染组间细胞增殖率和凋亡率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 VEGF 组与正常对照组细胞中 miR-338-3p mRNA 和 TCF4 mRNA 表达比较

与正常对照组比较, VEGF 组 miR-338-3p mRNA 的相对表达量显著降低, TCF4 mRNA 相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 5.951, 5.580$ , 均  $P < 0.05$ ) (表 1)。

**表 1 各组细胞中 miR-338-3p mRNA 和 TCF4 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)**  
**Table 1 Comparison of miR-338-3p and TCF4 mRNA relative expressions between the two groups (mean±SD)**

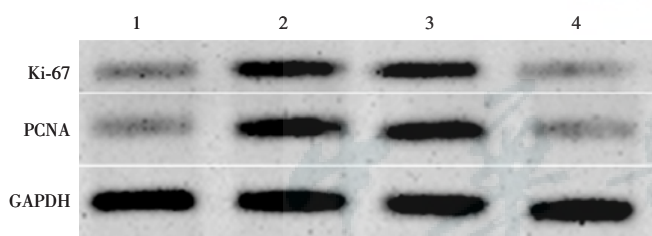
组别	样本量	miR-338-3p mRNA	TCF4 mRNA
正常对照组	9	1.01±0.26	1.00±0.30
VEGF 组	9	0.45±0.11	1.96±0.42
<i>t</i> 值		5.951	5.580
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: (独立样本 *t* 检验) miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; TCF4: T 细胞生长因子 4; VEGF: 血管内皮生长因子

Note: (Independent sample *t* test) miR-338-3p: microRNA-338-3p; TCF4: T cell factor 4; VEGF: vascular endothelial growth factor

## 2.2 不同 miRNA 转染组细胞增殖率和细胞增殖相关蛋白表达变化

正常对照组、VEGF 组、VEGF + miR-NC 组和 VEGF + miR-338-3p 组细胞增殖率及细胞中 miR-338-3p、Ki-67 和 PCNA 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 32.417, 16.766, 21.544, 50.849$ , 均  $P < 0.01$ )。与正常对照组比较, VEGF 组细胞增殖率及细胞中 Ki-67 和 PCNA 蛋白相对表达量均明显增加, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 VEGF+miR-NC 组比较, VEGF + miR-338-3p 组细胞增殖率及细胞中 Ki-67 和 PCNA 蛋白相对表达量均明显下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1, 表 2)。



**图 1 Western blot 法检测各组细胞中 Ki-67、PCNA 蛋白表达** 可见 VEGF 组和 VEGF+miR-NC 组 Ki-67 和 PCNA 蛋白表达条带灰度值均明显强于正常对照组 1: 正常对照组 2: VEGF 组 3: VEGF+miR-NC 组 4: VEGF+miR-338-3p 组 Ki-67: 增生标记蛋白细胞增生核抗原-67 抗体; PCNA: 增生细胞核抗原; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

**Figure 1 The expressions of Ki-67 and PCNA protein in the cells of different groups detected by Western blot** Ki-67 and PCNA protein expression bands in the VEGF group and VEGF + miR-NC group were significantly stronger than those in the normal control group 1: normal control group 2: VEGF group 3: VEGF + miR-NC group 4: VEGF + miR-338-3p group Ki-67: antigen identified by monoclonal antibody; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase

**表 2 不同 miRNA 转染组细胞增殖率和增殖相关蛋白相对表达量比较 (mean±SD)**  
**Table 2 Comparison of cell proliferation rate and relative expression of proliferation-related proteins in different miRNA transfection groups (mean±SD)**

组别	样本量	细胞增殖率 (%)	miR-338-3p	Ki-67	PCNA
正常对照组	9	100.03±23.20	1.02±0.31	0.46±0.13	0.48±0.11
VEGF 组	9	132.03±20.16 <sup>a</sup>	0.46±0.12 <sup>a</sup>	0.97±0.25 <sup>a</sup>	0.98±0.13 <sup>a</sup>
VEGF+miR-NC 组	9	130.21±16.21	0.47±0.16	0.96±0.21	0.97±0.15
VEGF+miR-338-3p 组	9	56.54±13.29 <sup>b</sup>	0.96±0.25 <sup>b</sup>	0.42±0.11 <sup>b</sup>	0.45±0.10 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		32.417	16.766	21.544	50.849
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 VEGF+miR-NC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; NC: 阴性对照; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; Ki-67: 增生标记蛋白细胞增生核抗原-67; PCNA: 增生细胞核抗原

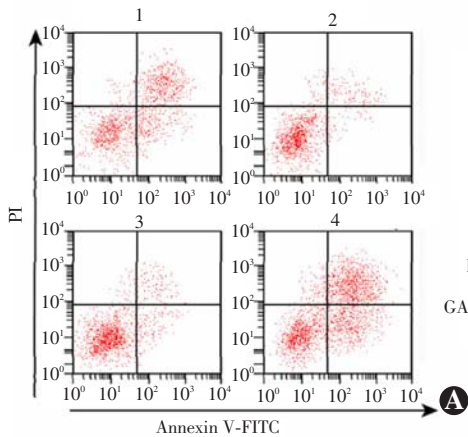
Note: Compared with the normal control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the VEGF + miR-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (one-way ANOVA, LSD-*t* test) VEGF: vascular endothelial growth factor; NC: negative control; miR-338-3p: microRNA-338-3p; Ki-67: antigen identified by monoclonal antibody; PCNA: proliferating cell nuclear antigen

## 2.3 不同 miRNA 转染组细胞凋亡率及凋亡调控相关蛋白表达量变化

正常对照组、VEGF 组、VEGF+miR-NC 组和 VEGF+miR-338-3p 组细胞凋亡率及 bax 和 bcl-2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 207.668, 37.245, 20.321$ , 均  $P < 0.01$ )。与正常对照组比较, VEGF 组细胞凋亡率和 bax 蛋白相对表达量均明显下降, bcl-2 蛋白相对表达量明显增高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 VEGF+miR-NC 组比较, VEGF + miR-338-3p 组细胞凋亡率和 bax 蛋白相对表达量明显增高, bcl-2 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2, 表 3)。

## 2.4 双荧光素酶报告结果及不同共转染组细胞中 TCF4 蛋白表达

双荧光素酶报告实验结果显示, 共转染野生型载体 WT-TCF4 的细胞实验中, 与 miR-NC 组比较, miR-338-3p 组荧光素酶活性显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 5.341, P < 0.05$ ); 共转染突变型载体 MUT-TCF4 细胞实验中, miR-NC 组与 miR-338-3p 组荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ( $t = 0.117, P = 0.908$ )。不同共转染组细胞中 TCF4 蛋白相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 28.204, P < 0.05$ ), 其中与 miR-NC 组比较, miR-338-3p 组细胞中 TCF4 蛋白相对表达量明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-338-3p 组细胞中 TCF4 蛋白相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 3, 表 4, 5)。



**图 2 不同 miRNA 转染组细胞凋亡率及凋亡调控蛋白表达** A: 流式细胞术检测显示与 VEGF 组和 VEGF+miR-NC 组比较, VEGF+miR-338-3p 组细胞凋亡率明显升高 B: Western blot 法检测显示与 VEGF 组和 VEGF+miR-NC 组比较, VEGF+miR-338-3p 组 bax 蛋白灰度增强, bcl-2 蛋白灰度减弱 1: 正常对照组 2: VEGF 组 3: VEGF+miR-NC 组 4: VEGF+miR-338-3p 组 PI: 碘化丙啶; FITC: 异硫氰酸荧光素; bax: B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白; bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

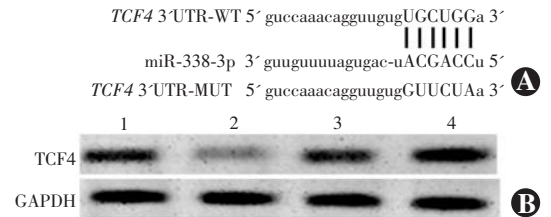
**Figure 2 Apoptosis rate and expression of apoptosis regulatory proteins in different miRNA transfection groups** A: Flow cytometry showed that compared with the VEGF group and VEGF+miR-NC group, the apoptosis rate in the VEGF+miR-338-3p group was significantly increased B: Western blot analysis showed that compared with the VEGF group and VEGF+miR-NC group, the relative expression of bax protein in the VEGF+miR-338-3p group was significantly increased, and the relative expression of bcl-2 protein was significantly decreased 1: normal control group 2: VEGF group 3: VEGF+miR-NC group 4: VEGF+miR-338-3p group PI: propidium iodide; FITC: fluorescein isothiocyanate; bax: bcl-2-associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2; GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase

**表 3 不同 miRNA 转染组细胞凋亡率和凋亡调控蛋白相对表达量比较 (mean±SD)**  
**Table 3 Comparison of apoptosis rate and relative expression of apoptosis-regulating proteins in different miRNA transfection groups (mean±SD)**

组别	样本量	细胞凋亡率(%)	bax	bcl-2
正常对照组	9	23.26±3.25	0.98±0.16	0.42±0.09
VEGF 组	9	8.54±1.28 <sup>a</sup>	0.45±0.13 <sup>a</sup>	0.98±0.24 <sup>a</sup>
VEGF+miR-NC 组	9	8.56±1.32	0.42±0.15	0.96±0.27
VEGF+miR-338-3p 组	9	30.24±2.57 <sup>b</sup>	0.85±0.11 <sup>b</sup>	0.52±0.11 <sup>b</sup>
F 值		207.668	37.245	20.321
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05;与 VEGF+miR-NC 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; NC: 阴性对照; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; bax: B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白; bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2

Note: Compared with the normal control group, <sup>a</sup>*P*<0.05; Compared with the VEGF+miR-NC group, <sup>b</sup>*P*<0.05 (one-way ANOVA, LSD-*t* test) VEGF: vascular endothelial growth factor; NC: negative control; miR-338-3p: microRNA-338-3p; bax: bcl-2-associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2



**图 3 不同共转染组细胞中 TCF4 蛋白表达** A: TCF4 的 3' UTR 中含有与 miR-338-3p 互补的核苷酸序列 B: Western blot 法检测可见 miR-338-3p 组 TCF4 蛋白相对表达量明显低于 miR-NC 组, anti-miR-338-3p 组 TCF4 蛋白相对表达量明显高于 anti-miR-NC 组 1: miR-NC 组 2: miR-338-3p 组 3: anti-miR-NC 组 4: anti-miR-338-3p 组 TCF4: T 细胞生长因子 4; UTR: 非翻译区; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

**表 4 2 个组双荧光素酶报告实验结果比较 (mean±SD)**  
**Table 4 Comparison of dual luciferase reports experimental results between the two groups (mean±SD)**

组别	样本量	野生型 TCF4	突变型 TCF4
miR-NC 组	9	1.03±0.24	1.05±0.16
miR-338-3p 组	9	0.56±0.11	1.04±0.20
<i>t</i> 值		5.341	0.117
<i>P</i> 值		<0.05	0.908

注: (独立样本 *t* 检验) NC: 阴性对照; TCF4: T 细胞生长因子 4; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p  
Note: (Independent sample *t* test) NC: negative control; TCF4: T cell factor 4; miR-338-3p: microRNA-338-3p

**表 5 不同共转染组细胞中 TCF4 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)**  
**Table 5 Comparison of relative expression of TCF4 protein in cells of different co-transfection groups (mean±SD)**

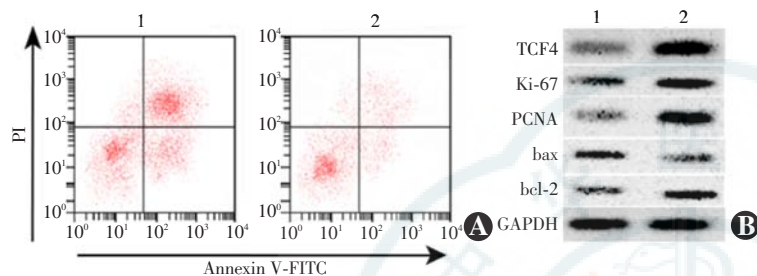
组别	样本量	TCF4
miR-NC 组	9	0.72±0.16
miR-338-3p 组	9	0.42±0.11 <sup>a</sup>
anti-miR-NC 组	9	0.73±0.18
anti-miR-338-3p 组	9	1.05±0.12 <sup>b</sup>
F 值		28.204
P 值		<0.01

注: 与 miR-NC 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 anti-miR-NC 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TCF4: T 细胞生长因子 4; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; NC: 阴性对照

Note: Compared with miR-NC group, <sup>a</sup>*P*<0.05; compared with anti-miR-NC group, <sup>b</sup>*P*<0.05 (one-way ANOVA, LSD-*t* test) TCF4: T cell factor 4; miR-338-3p: microRNA-338-3p; NC: negative control

### 2.5 TCF4 转染与否细胞增生率、凋亡率及其相关蛋白相对表达量变化

与 VEGF + miR-338-3p + pcDNA 组比较, VEGF + miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组细胞增生率明显增高, 细胞凋亡率显著下降, 细胞中 TCF4、Ki-67、PCNA、bcl-2 蛋白相对表达量明显升高, bax 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ( $t = 5.700, 14.408, 9.694, 7.516, 7.111, 6.715, 7.927$ , 均  $P < 0.01$ ) (图 4, 表 6)。



**图 4 TCF4 过表达细胞增生和凋亡变化** A: 流式细胞术检测细胞凋亡率 VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组细胞凋亡率明显低于 VEGF+miR-338-3p+pcDNA 组 B: Western blot 法检测 TCF4 转染与否细胞中 Ki-67、PCNA、bcl-2、bax 蛋白表达 与 VEGF+miR-338-3p+pcDNA 比较, VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组细胞中 Ki-67、PCNA、bcl-2 表达条带增强, bax 表达条带减弱 1: VEGF+miR-338-3p+pcDNA 组 2: VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组 PI: 碘化丙啶; FITC: 异硫氰酸荧光素; TCF4: T 细胞生长因子 4; Ki-67: 增生标记蛋白细胞增生核抗原-67; PCNA: 增生细胞核抗原; bax: B 淋巴瘤-2 相关蛋白; bcl-2: B 淋巴瘤-2; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

**Figure 4 The proliferation and apoptosis changes of TCF4 overexpressing cell** A: Apoptosis rate measured by flow cytometry The apoptosis rate of the cells in the VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 group was significantly lower than that in the VEGF+miR-338-3p+pcDNA group B: The expression of Ki-67, PCNA, bcl-2, bax protein in TCF4 transfected cells detected by Western blot Compared with the VEGF+miR-338-3p+pcDNA group, the expression bands of Ki-67, PCNA and bcl-2 in the VEGF+miR-338-3p+pcDNA group were enhanced, and the bax expression bands were weakened 1: VEGF+miR-338-3p+pcDNA group 2: VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 group PI: propidium iodide; FITC: fluorescein isothiocyanate; TCF4: T cell factor 4; Ki-67: antigen identified by monoclonal antibody; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; bax: bcl-2-associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2; GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase

### 3 讨论

脉络膜微血管内皮细胞异常增生可促进 CNV 的形成进而损伤患者视力。研究表明, 抑制脉络膜微血管内皮细胞增生可减少 CNV 形成<sup>[8-9]</sup>。CNV 形成的分子机制尚未完全阐明, 本研究中探寻新型 miRNA 并分析其对脉络膜微血管内皮细胞增生及凋亡的影响。

Qian 等<sup>[10]</sup>通过实时荧光定量 PCR 法检测显示, miR-338-3p 在宫颈癌中表达下调, 并可促进宫颈癌发生及发展。Yang 等<sup>[11]</sup>通过 qRT-PCR 法检测显示, miR-338-3p 在非小细胞肺癌中表达水平降低, 并可能通过靶向调控 IRS2 的表达从而参与非小细胞肺癌的进展。Xiong 等<sup>[12]</sup>通过 qRT-PCR 法检测显示, miR-338-3p 在神经胶质瘤中表达异常并可参与神经胶质瘤发生及发展过程。本研究结果显示, VEGF 处理后脉络膜微血管内皮细胞中 miR-338-3p 表达下调, 提示 miR-338-3p 可能参与 CNV 形成过程。本研究还显示, VEGF 处理后脉络膜微血管内皮细胞活力升高, 而 miR-338-3p 过表达后细胞活力显著降低, 提示 miR-338-3p 过表达可抑制 VEGF 诱导的脉络膜微血管内皮细胞的生物学行为。本研究结果显示 VEGF 处理后脉络膜微血管内皮细胞中 Ki-67、PCNA 表达上调, 而 miR-338-3p 过表达后细胞中 Ki-67、PCNA 表达下调, 提示 miR-338-3p 过表达可能通过调控 Ki-67、PCNA 表达从而抑制 VEGF 诱导的脉络膜微血管内皮细胞增生。Western blot 法检测结果显示心肌细胞中 bcl-2 表达上调可抑制细胞凋亡, bax 表达上调可通过促进线粒体释放细胞色素 C 而激活 caspase 级联反应从而诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,

**表 6 TCF4 转染与否细胞增生率、凋亡率及其相关蛋白相对表达量比较 (mean±SD)**  
**Table 6 Comparison of cell proliferation and apoptosis rate and related protein expression levels between with and without TCF4 transfection (mean±SD)**

组别	样本量	细胞增生率 (%)	细胞凋亡率 (%)	TCF4	Ki-67	PCNA	bax	bcl-2
VEGF+miR-338-3p+pcDNA 组	9	56.48±13.20	30.59±3.57	0.44±0.10	0.41±0.11	0.44±0.10	0.87±0.13	0.55±0.12
VEGF+miR-338-3p+pcDNA-TCF4 组	9	96.24±16.24	12.36±1.29	0.97±0.13	0.96±0.19	0.97±0.20	0.42±0.11	0.98±0.15
t 值		5.700	14.408	9.694	7.516	7.111	7.927	6.715
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 t 检验) TCF4: T 细胞生长因子 4; VEGF: 血管内皮生长因子; miR-338-3p: 微小 RNA-338-3p; Ki-67: 增生标记蛋白细胞增生核抗原-67; PCNA: 增生细胞核抗原; bax: B 淋巴瘤-2 相关蛋白; bcl-2: B 淋巴瘤-2  
Note: (Independent sample t test) VEGF: vascular endothelial growth factor; miR-338-3p: microRNA-338-3p; TCF4: T cell factor 4; Ki-67: antigen identified by monoclonal antibody; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; bax: bcl-2-associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2

VEGF 处理后脉络膜微血管内皮细胞凋亡率降低, bax 表达下降, bcl-2 表达升高, 而 miR-338-3p 过表达后细胞凋亡率显著升高, bax 表达升高, bcl-2 表达下降, 提示 miR-338-3p 过表达促进 VEGF 诱导的脉络膜微血管内皮细胞凋亡与凋亡调控通路有关。

Western blot 法检测结果显示结直肠癌细胞中 TCF4 的表达水平升高, 并可能通过调节 ZEB1 / ZEB2 表达而促进结直肠癌的发生<sup>[14-15]</sup>, TCF4 表达上调可以减弱 miR-139-5p 在宫颈癌进展中的肿瘤抑制活性<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, VEGF 处理后脉络膜微血管内皮细胞中 TCF4 的表达增加, 提示 TCF4 可能参与脉络膜微血管生成。本研究结果证实, miR-338-3p 可靶向调控 TCF4 的表达。为了进一步探究 miR-338-3p 是否可通过 TCF4 的表达而影响脉络膜微血管内皮细胞增生及凋亡, 本研究将 miR-338-3p 拟似物与 pcDNA-TCF4 共转染至脉络膜微血管内皮细胞, VEGF 处理后显示细胞活力显著升高, 细胞凋亡率降低, TCF4、Ki-67、PCNA、bcl-2 表达升高, 而 bax 表达下降, 提示 TCF4 过表达可减弱 miR-338-3p 过表达对 VEGF 诱导的脉络膜微血管内皮细胞增生及凋亡的作用。

VEGF 诱导的脉络膜微血管内皮细胞中 miR-338-3p 表达下降, miR-338-3p 过表达可明显抑制细胞增生及促进细胞凋亡, 其作用机制可能与负向调控 TCF4 表达有关, 为进一步揭示 CNV 的发生机制奠定实验基础, 并为眼底病变疾病的临床治疗提供了潜在靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Smith JR, David LL, Appukuttan B, et al. Angiogenic and immunologic proteins identified by deep proteomic profiling of human retinal and choroidal vascular endothelial cells: potential targets for new biologic drugs [J]. *Am J Ophthalmol*, 2018, 193 : 197 - 229. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2018. 03. 020.
- [2] 杨秀梅, 王雨生, 张建, 等. MEK/ERK 和 PI3K/Akt 通路对大鼠脉络膜新生血管中 DDR2 和 MMP-13 表达的调控作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(8) : 678 - 685. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 002.  
Yang XM, Wang YS, Zhang J, et al. Modulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways to the expression of DDR2 and MMP-13 in choroidal neovascularization [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(8) : 678 - 685. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 002.
- [3] 刘彦江, 亢泽峰, 邢凯, 等. 加减驻景方含药血清对缺氧状态下大鼠脉络膜血管内皮细胞增生的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(12) : 1065 - 1071. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 12. 003.  
Liu YJ, Kang ZF, Xing K, et al. Inhibitory effects of jiajianzhuang decoction containing serum on proliferation of rat choroidal vascular endothelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(12) : 1065 - 1071. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 12. 003.
- [4] 吕洋, 侯慧媛, 王雨生. miRNA 在脉络膜新生血管发生发展中的作用研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2015, 35(3) : 283 - 286. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2015. 0076.  
Lyu Y, Hou HY, Wang YS. Research advances in role of miRNA in development of choroidal neovascularization [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 35(3) : 283 - 286. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2015. 0076.
- [5] Liu G, Wan Q, Li J, et al. Circ\_0038467 regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human bronchial epithelial cells through sponging miR-338-3p [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(5) : 1297 - 1308. DOI: 10. 1111/1759-7714. 13397.
- [6] Luo X, Wang J, Wei X, et al. Knockdown of lncRNA MFI2-AS1 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by miR-130a-3p/TCF4 [J/OL]. *Life Sci*, 2020, 240 : 117019 [2020-04-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31678554/>. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2019. 117019.
- [7] 刘雅琦, 顾金海, 孟锐, 等. 神经胶质瘤细胞与人脑微血管内皮细胞之间 STAT3 信号的交互作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(4) : 432 - 437. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2015. 04. 004.  
Liu YQ, Gu JH, Meng R, et al. STAT3 activation is involved in the interaction of glioma and human brain microvascular endothelial cells [J]. *Chin J Cancer Biotherapy*, 2015, 22(4) : 432 - 437. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2015. 04. 004.
- [8] 汪晓磊, 马维, 李俊发, 等. 抑制 IKK2/NF- $\kappa$ B 信号通路在小鼠脉络膜新生血管形成中的作用 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(13) : 1348 - 1351. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4695. 2018. 13. 002.  
Wang XL, Ma W, Li JF, et al. Effects of IKK2/NF- $\kappa$ B inhibitor on laser-induced choroidal neovascularization in mice [J]. *J Clin Exp Med*, 2018, 17(13) : 1348 - 1351. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4695. 2018. 13. 002.
- [9] 冯宇梁, 李杰, 刘中男. 视网膜脉络膜新生血管性疾病机制及治疗研究进展 [J]. *西部医学*, 2016, 28(9) : 1328 - 1332. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2016. 09. 038.  
Feng YL, Li J, Liu JN. Advances in research of retinal and choroidal neovascularization diseases [J]. *Med J West China*, 2016, 28(9) : 1328 - 1332. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2016. 09. 038.
- [10] Qian W, Huang T, Feng W. Circular RNA HIPK3 promotes EMT of cervical cancer through sponging miR-338-3p to up-regulate HIF-1 $\alpha$  [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12 : 177 - 187. DOI: 10. 2147/CMAR. S232235.
- [11] Yang Z, Lin X, Zhang P, et al. Long non-coding RNA LINC00525 promotes the non-small cell lung cancer progression by targeting miR-338-3p/IRS2 axis [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124(1) : 109858 [2020-04-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991382/>. DOI: 10. 15283/ijsc19041.
- [12] Xiong Z, Zhou C, Wang L, et al. Circular RNA SMO sponges miR-338-3p to promote the growth of glioma by enhancing the expression of SMO [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24) : 12345 - 12360. DOI: 10. 18632/aging. 102576.
- [13] 杜峥, 王巍, 路军, 等. 白藜芦醇对 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9C2 心肌细胞损伤的保护作用研究 [J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(8) : 877 - 881, 886. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3205. 2018. 08. 003.  
Du Z, Wang W, Lu J, et al. Study on the protective effect of resveratrol on H9C2 myocardial cell injury induced by CoCl<sub>2</sub> [J]. *J Hebei Med Univer*, 2018, 39(8) : 877 - 881, 886. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3205. 2018. 08. 003.
- [14] Lee GT, Rosenfeld JA, Kim WT, et al. TCF4 induces enzalutamide resistance via neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(9) : e0213488 [2020-04-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31536510/>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0213488.
- [15] Sun S, Yang X, Qin X, et al. TCF4 promotes colorectal cancer drug resistance and stemness via regulating ZEB1/ZEB2 expression [J]. *Protoplasma*, 2020, 257(3) : 921 - 930. DOI: 10. 1007/s00709-020-01480-6.
- [16] Ji X, Guo H, Yin S, et al. miR-139-5p functions as a tumor suppressor in cervical cancer by targeting TCF4 and inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12 : 7739 - 7748. DOI: 10. 2147/OTT. S215796.

(收稿日期: 2020-04-07 修回日期: 2020-07-06)

(本文编辑: 刘艳)