

· 实验研究 ·

miR-125b 对晶状体上皮细胞的抗氧化应激作用及其机制

李翔 张颖 黄亚琳 吴众 郭浩轶

河南省人民医院 河南省立眼科医院 郑州大学人民医院眼科, 郑州 450003

通信作者: 郭浩轶, Email: haoyiguo2000@aliyun.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA 125b(miR-125b)对年龄相关性白内障晶状体上皮细胞(LECs)抗氧化应激能力的影响及其可能的作用机制。方法 收集 2018 年 7 月至 2019 年 3 月于河南省立眼科医院接受白内障超声乳化手术的年龄相关性白内障患者 24 例 24 眼的晶状体前囊膜组织标本 24 份,同期纳入河南省立眼科医院眼库的 20 例 20 眼供体正常前囊膜组织 20 份,分别采用逆转录 PCR 和 Western blot 法检测并比较不同标本 LECs 中 miR-125b 和核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的表达量;将人 LECs 细胞系 HLEB-3 细胞分为对照组和氧化应激模型组,采用不同浓度的 H₂O₂(100、200、400 μmol/L)共培养细胞建立氧化应激细胞模型,对照组采用不含 H₂O₂ 的培养基。细胞培养 24 h 后采用 DCFH-DA 荧光探针测定不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞内源性活性氧簇(ROS)含量,ELISA 法检测总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)浓度;分别采用逆转录 PCR 和 Western blot 法检测各组细胞中 miR-125b 和 Nrf2 的表达水平。用含有 miR-125b 拟似物、miR-125b 对照和 miR-125b 抑制物序列的质粒分别转染 HLEB-3 细胞 24 h,采用 DCFH-DA 荧光探针法测定并比较不同转染组细胞中 ROS 含量,ELISA 法检测 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 浓度;采用双荧光素酶报告法验证 miR-125b 与 Nrf2 的靶向关系;采用 Western blot 法检测各转染组细胞内 Nrf2 蛋白表达水平;采用免疫荧光双染色法检测不同转染组细胞中 Nrf2 和 Keap1 的表达和定位。结果 正常晶状体前囊膜组织中 miR-125b 和 Nrf2 的相对表达量分别为 0.21±0.03 和 0.27±0.06,少于白内障前囊膜组织中的 0.89±0.05 和 0.84±0.12,差异均有统计学意义($t=15.355, P<0.05$; $t=18.647, P<0.05$)。各浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 miR-125b 和 Nrf2 相对表达量均明显高于对照组,miR-125b 和 Nrf2 相对表达量随着 H₂O₂ 浓度的增加而升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与对照组比较,各浓度 H₂O₂ 处理组细胞内 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性均明显降低,ROS 含量和 MDA 浓度均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与 miR-125b 对照组比较,miR-125b 拟似物组细胞中 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高,ROS 含量和 MDA 浓度均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);miR-125b 抑制物组细胞中 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性均明显低于 miR-125b 对照组,ROS 含量和 MDA 浓度均明显高于 miR-125b 对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。双荧光素酶报告结果提示 H₂O₂ 刺激后细胞中 Nrf2 发生不同程度的核转移,miR-125b 拟似物组细胞质中 Nrf2 荧光最强,核转移也最显著,细胞质中 Keap1 的表达微弱;miR-125b 抑制物组细胞质中 Nrf2 荧光强度最弱,核转移少,细胞质中 Keap1 荧光表达增强。结论 miR-125b 能增强年龄相关性白内障 LECs 的抗氧化应激能力,其机制可能与 miR-125b 靶向刺激 Nrf2 表达上调,进而调控 Keap1/Nrf2 信号通路活性有关。

【关键词】 白内障, 年龄相关性; 晶状体上皮细胞; 微小 RNA 125b; Keap1/Nrf2 信号通路; 氧化应激

基金项目: 国家自然科学基金项目(81600775)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191022-00458

Anti-oxidative stress effects of miR-125b on lens epithelial cells and its mechanism

Li Xiang, Zhang Ying, Huang Yalin, Wu Zhong, Guo Haoyi

Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Department of Ophthalmology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Guo Haoyi, Email: haoyiguo2000@aliyun.com

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-oxidative stress effects of microRNA 125b (miR-125b) on lens epithelial cells (LECs) and its possible mechanism. **Methods** Twenty-four anterior capsule specimens were collected from 24 eyes of 24 age-related cataract patients during phacoemulsification and 20 normal anterior capsule

specimens were obtained from 20 eyes of 20 donors in Henan Eye Hospital from July 2018 to March 2019 under the approval of a Medical Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. YKYY20193151). The reverse transcription PCR and Western blot assay were employed to detect and compare the relative expression levels of miR-125b and nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in different specimens. The human lens epithelial cell line HLEB-3 was divided into control group and oxidative stress model group. The oxidative stress models were established by coculture with different concentrations (100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) of H_2O_2 for 24 hours, and the cells were cultured with normal medium without H_2O_2 in the control group. The reactive oxygen species (ROS) content was detected by DCFH-DA fluorescent probe, and the activities of total-antioxidative capability (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) as well as malondialdehyde (MDA) concentration were detected by ELISA, and compared among the groups. The expression levels of miR-125b and Nrf2 were detected by reverse transcription PCR and Western blot assay, respectively. The cells were transfected with miR-125b mimics, miR-125b control and miR-125b inhibitor for 24 hours, respectively, and ROS content was detected by DCFH-DA fluorescent probe and T-AOC, SOD and GSH-Px activities as well as MDA concentration were detected by ELISA and compared among different transfected groups. A dual luciferase reporter assay was used to assess an association between miR-125b and Nrf2. The expression level of Nrf2 protein was detected by Western blot assay and the expression levels of Nrf2 and Keap1 were assayed and located by immunofluorescence double staining.

Results The relative expression levels of miR-125b and Nrf2 in the normal lens anterior capsule specimens were 0.21 ± 0.03 and 0.27 ± 0.06 , which were significantly lower than 0.89 ± 0.05 and 0.84 ± 0.12 in the cataract specimens, respectively ($t = 15.355, P < 0.05; t = 18.647, P < 0.05$). The relative expression levels of miR-125b and Nrf2 were significantly increased in various H_2O_2 treated groups in comparison with the control group and were gradually elevated with the increase of H_2O_2 concentration (all at $P < 0.05$). Compared with the control group, the T-AOC, SOD and GSH-Px activities were reduced, and ROS content and MDA concentration were significantly ascended (all at $P < 0.05$). Compared with the miR-125b control group, the T-AOC, GSH-Px and SOD activities were increased, and ROS content and MDA concentration were decreased in the miR-125b mimics group (all at $P < 0.05$). In addition, the T-AOC, GSH-Px and SOD activities were significantly weakened, and ROS content and MDA concentration were significantly increased in the miR-125b inhibitor group in comparison with the miR-125b control group (all at $P < 0.05$). Dual luciferase reporter assay showed that miR-125b targeted to the expression of Nrf2 in the H_2O_2 model cells. The fluorescence of Nrf2 in the cytoplasm was the strongest with more nuclear transfer in the miR-125b mimics group, and the expression intensity of Keap1 in the cytoplasm was weaker. The expression of Nrf2 was the weakest with less nuclear transfer in the miR-125b inhibitor group, and the expression level of Keap1 in the cytoplasm was stronger.

Conclusions MiR-125b can enhance the anti-oxidative stress of LECs in age-related cataractous eyes probably by upregulating the expression of Nrf2 and activating the Keap1/Nrf2 signaling pathway.

[Key words] Cataract, age-related; Lens epithelial cells; MicroRNA 125b; Keap1/Nrf2 signaling pathway; Oxidative stress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81600775)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191022-00458

年龄相关性白内障是导致老年人群盲的重要原因。目前认为,氧化应激是导致白内障的主要因素,氧化应激反应产物导致晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的通透性及蛋白构象发生改变,从而导致晶状体混浊^[1-3]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是非编码 RNA, 通过与靶基因的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)的互补序列结合而刺激或抑制靶基因的翻译^[4]。近年来发现多种 miRNA 在 LECs 的氧化应激损伤过程中发挥作用, 参与白内障的发生和发展^[5-6], 此外, miRNA 125b (miR-125b) 在多种细胞的氧化应激反应中发挥作用^[7-8], 推测其可能参与人 LECs 的氧化应激过程, 但目前尚未得到证实。

本研究探讨 miR-125b 对年龄相关性白内障 LECs 抗氧化应激能力的作用及其可能的作用机制, 为白内障的防治寻找潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 晶状体前囊膜组织标本的收集 收集 2018 年 7 月至 2019 年 3 月于河南省立眼科医院行白内障超声乳化手术的单纯性年龄相关性白内障患者 24 例 24 眼, 其中男 10 例 10 眼, 女 14 例 14 眼; 年龄 54~73 岁, 平均(64.32±7.93)岁, 于手术中收集晶状体前囊膜组织; 同时收集河南省立眼科医院眼库的供体晶状体前

囊膜组织 20 例 20 眼,其中男 9 例 9 眼,女 11 例 11 眼;年龄 52~70 岁,平均(61.28±8.21)岁。本研究标本提供者或其家属均签署知情同意书,本研究方案及标本使用经河南省立眼科医院伦理委员会批准(批文号:YKYY20193151)。

1.1.2 细胞来源、主要试剂及仪器 永生化人 LECs 系(HLEB-3)购自中国科学院上海细胞库。miR125b 拟似物、miR-125b 抑制物和 miR-125b 对照序列均由上海吉玛基因公司合成;CCK-8 试剂盒(杭州四季青公司);Lipofectamine™2000、Trizol、兔源核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)多克隆抗体(PA5-68817)、山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(A32731)、山羊抗鼠 IgG(H+L)二抗(A32723)、兔源 Nrf2 荧光一抗(710574)、鼠源 Keap1 荧光一抗(MA5-17106)(美国 Invitrogen 公司);DAPI 染色液(北京索莱宝公司);DCFH-DA 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)荧光探针(北京百奥莱博科技有限公司);总抗氧化能力(total-antioxidative capability, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(上海碧云天有限公司)。免疫荧光显微镜(日本 Olympus 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞氧化应激模型的制备 将冻存的 HLEB-3 细胞解冻、复苏,重悬于含体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和含青链霉素混合液的 DMEM 培养基中,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合至约 80% 时传代,按照培养基中添加 H₂O₂ 浓度不同将细胞分为 100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组,对照组加入不含 H₂O₂ 的培养基,于培养箱中继续培养。

1.2.2 细胞转染 取处于对数生长期的 HLEB-3 细胞以 2×10⁵ 个/孔细胞密度接种于 6 孔板,分别使用含有 miR-125b 拟似物、miR-125b 对照和 miR-125b 抑制物序列的质粒转染细胞,将细胞分为 miR-125b 拟似物组、miR-125b 对照组和 miR-125b 抑制物组。按照转染试剂 Lipofectamine2000 说明书中所示步骤,分别转染细胞 6 h,将各组细胞转移至完全培养基继续培养。

1.2.3 应用 DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞中内源性 ROS 含量 取处于对数生长期的 HLEB-3 细胞以 1×10⁴ 个/孔细胞密度接种于 96 孔板,将细胞按照

1.2.1 描述的方法制备氧化应激模型,继续培养 24 h,吸去培养液,加入 10 μmol/L DCFH-DA 荧光探针溶液,培养箱中孵育 20 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞,多功能酶标仪检测荧光强度值,即为细胞内 ROS 含量,用激光扫描共焦显微镜拍照,激发光波长为 485 nm,发射光波长为 530 nm。转染细胞在含 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基中继续培养 24 h,细胞中 ROS 含量检测方法同上。

1.2.4 ELISA 法检测 T-AOC、SOD、GSH-Px、GSH 活性及 MDA 浓度 将处于对数生长期的 HLEB-3 细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板,将细胞按照 1.2.1 描述的方法制备氧化应激模型,细胞继续培养 24 h,采用相应试剂盒说明书中的步骤测定细胞中 T-AOC、SOD、GSH-Px、GSH 活性和 MDA 浓度。转染的细胞在含 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基中继续培养 24 h,采用上述方法检测细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px、GSH 活性和 MDA 浓度。

1.2.5 逆转录 PCR 法测定晶状体前囊膜组织标本和 HLEB-3 细胞内 miR-125b 表达 取白内障患者和正常供体晶状体前囊膜组织标本,收集对照组及不同浓度 H₂O₂(100、200、400 μmol/L)处理组细胞,Trizol 法提取组织和细胞总 RNA,逆转录得到 cDNA,反应体系: Master Mix 10 μl,正反向引物各 2 μl,cDNA 模板 2 μl, ddH₂O 10 μl;反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 25 s,60℃ 退火 40 s,60℃ 延伸 50 s,重复 45 个循环。行 PCR 扩增,反应体系:cDNA<0.5 μl,正向引物(10 μmol/L)1.0~2.0 μl,反向引物(10 μmol/L)1.0~2.0 μl,10 倍 Easy Taq buffer 5.0 μl,2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μl,Easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μl,ddH₂O 定容至 50.0 μl。扩增条件:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;72℃ 延伸 6 min。琼脂糖凝胶电泳,用图像记录分析系统对目的基因、参比基因的条带灰度值进行分析。目的基因表达量=目标 DNA 条带灰度值/GAPDH 条带灰度值×100%。转染后细胞在含 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基中继续培养 24 h,以上述方法检测细胞内 miR-125b 的相对表达量。每个实验结果独立重复 3 次。引物序列:miR-125b 正向引物为 5'-CGTATCGGATTCGGACTTGC-3',反向引物为 5'-CTTTAGCTAGGGCTAGCGTG-3';GAPDH 正向引物为 5'-AGTGCTAGCTGATATGAC-3',反向引物为 5'-CGTAGTCGATGCATAGCT-3'。

1.2.6 Western blot 法测定晶状体前囊膜组织标本和 HLEB-3 细胞内 Nrf2 蛋白的表达 采用不同浓度

H₂O₂ (0、100、200 和 400 μmol/L H₂O₂) 分别处理细胞 24 h, 收集各组细胞, RIPA 裂解液提取总蛋白, 将蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔进行电泳, 使蛋白转移至 PVDF 膜, 用质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 温和洗膜 3 min 后加入相应的一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 10 min, 共 3 次, 加入对应二抗 (1:1000), 室温下孵育 1 h, TBST 洗涤 10 min, 共 3 次, 加入配制好的 ECL 发光液, 避光孵育 5 min, 采用化学发光凝胶成像仪采集图片信息, 图片用 Image pro plus 6.0 软件进行灰度分析, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白和内参灰度之比, 即为蛋白相对表达量。将转染细胞在含 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基中继续培养 24 h, 以上述方法检测细胞内 Nrf2 的表达。每个实验结果独立重复 3 次。

1.2.7 免疫荧光双染色法检测细胞内 Keap1、Nrf2 表达 采用 200 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 24 h, PBS 洗涤细胞, 采用预冷多聚甲醛在 4 °C 下固定 30 min, 质量分数 0.1% 吐温处理 10 min, 室温下 PBS 洗涤 5 min, 封闭液中室温封闭 30 min, 加入鼠源 Keap1 (1:20)、兔源 Nrf2 (1:100) 一抗, 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤细胞, 加入相应二抗 (1:1000), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤, 加入核染色剂室温染色 1 min, PBS 洗涤后, 荧光封片剂封片, 荧光显微镜下观察细胞内 Keap1 和 Nrf2 荧光强度, 每个切片任意选取 5 个视野。ROS 阳性反应呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光。

1.2.8 靶基因预测及双荧光素酶报告基因分析 为了确定 miR-125b 在 HLEB-3 细胞中发挥生物学功能的靶向作用点, 利用 miRanda、TargetScan 数据库预测 miR-125b 的潜在靶基因, 其中 Nrf2 在 miR-125b 的 3' UTR 上有结合位点。将处于对数生长期的 HLEB-3 细胞以 2 × 10⁵ 个/孔的密度接种于 24 孔板, 用 Lipofectamine™ 2000 将荧光素酶报告载体 (Nrf2-3' UTR-WT 或 Nrf2-3' UTR-MT) 与 miR-125b 拟似物/抑制剂/对照共转染细胞, 以 Renilla 荧光素酶质粒 (100 ng/孔) 为对照, 与载体共转染。细胞转染 24 h, 以 GAPDH 为内参, 用双荧光素酶报告分析系统测定荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 mean ± SD 表示, 组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 正常供体晶状体前囊膜和白内障患者晶状体前囊膜组间各检测指标差异比较采用独立样本 *t* 检

验, miR-125b 拟似物组、miR-125b 对照组和 miR-125b 抑制物组间各检测指标总体差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常供体和白内障患者晶状体前囊膜组织中 miR-125b 和 Nrf2 表达

白内障患者晶状体前囊膜中 miR-125b 和 Nrf2 蛋白的表达条带均明显增强。白内障患者晶状体前囊膜中 miR-125b 和 Nrf2 蛋白的相对表达量分别为 0.89 ± 0.05 和 0.84 ± 0.12, 明显高于正常供体中的 0.21 ± 0.03 和 0.27 ± 0.06, 组间比较差异均有统计学意义 (*t* = 15.355, *P* < 0.05; *t* = 18.647, *P* < 0.05) (图 1)。

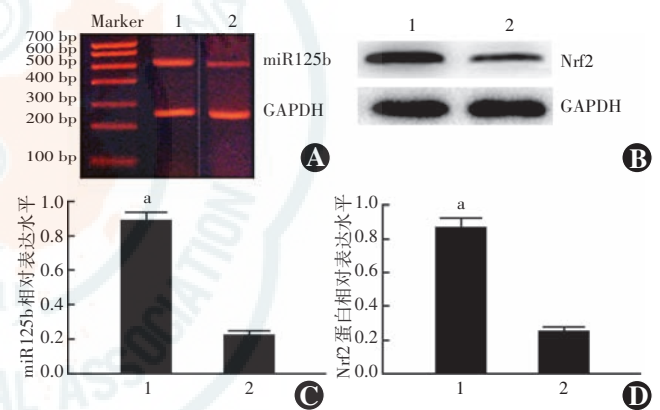


图 1 正常供体和白内障患者晶状体前囊膜中 miR-125b 和 Nrf2 蛋白的表达 A: 逆转录 PCR 法检测各组晶状体前囊膜中 miR-125b 的表达 B: Western blot 法检测各组晶状体前囊膜中 Nrf2 蛋白的表达 C: 各组晶状体组织中 miR-125b 的相对表达量比较 与正常晶状体组织比较, ^a*P* < 0.05 (独立样本 *t* 检验; 白内障组织, *n* = 24; 正常组织, *n* = 20) D: 各组晶状体组织中 Nrf2 蛋白的相对表达量比较 与正常晶状体组织比较, ^a*P* < 0.05 (独立样本 *t* 检验; 白内障组织, *n* = 24; 正常组织, *n* = 20) 1: 白内障晶状体组织 2: 正常晶状体组织 miR: 微小 RNA; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2

Figure 1 Expression levels of miR-125b and Nrf2 protein in the lens anterior capsule of normal donors and cataract patients

A: The expression intensity of miR-125b in the lens anterior capsule of different specimens by reverse transcription PCR B: The expression intensity of Nrf2 protein in the lens anterior capsule of different specimens by Western blot assay C: The comparison of relative expression levels of miR-125b Compared with the normal anterior lens capsule specimen, ^a*P* < 0.05 (Independent-samples *t* test; cataract tissues, *n* = 24; normal tissues, *n* = 20) D: The comparison of relative expression levels of Nrf2 protein Compared with the normal anterior lens capsule specimen, ^a*P* < 0.05 (Independent-samples *t* test; cataract tissues, *n* = 24; normal tissues, *n* = 20) 1: Lens anterior capsule of cataract patients 2: Lens anterior capsule of normal donors miR: microRNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2

2.2 不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 miR-125b、Nrf2 的表达比较

与对照组比较,100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内 miR-125b 和 Nrf2 蛋白表达条带均明显增强,且随着 H₂O₂ 浓度增加,miR-125b 和 Nrf2 蛋白的表达条带均逐渐增强。对照组及 100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内 miR-125b 相对表达量分别为 0.21±0.03、0.52±0.05、0.69±0.04 和 0.86±0.11,总体比较差异有统计学意义($F = 13.513$,

$P < 0.01$),100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内 miR-125b 相对表达量均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组及 100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 0.24±0.04、0.49±0.06、0.74±0.06 和 0.91±0.10,总体比较差异有统计学意义($F = 10.228$, $P = 0.012$),100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内 Nrf2 蛋白相对表达量均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2)。

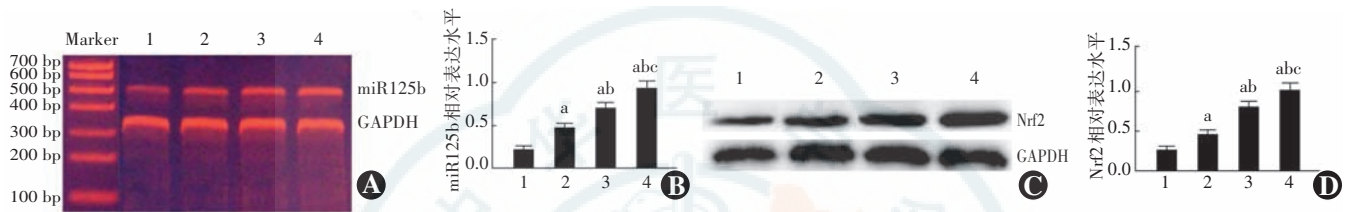


图 2 不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 miR-125b 和 Nrf2 的表达 A: 逆转录 PCR 法检测各组细胞中 miR-125b 表达 B: 各组细胞中 miR-125b 相对表达量比较 $F = 13.513, P < 0.01$ 。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 100 μmol/L H₂O₂ 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 200 μmol/L H₂O₂ 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 6$) C: Western blot 法检测不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 Nrf2 蛋白表达 D: 各组细胞中 Nrf2 蛋白相对表达量比较 $F = 10.228, P = 0.012$ 。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 100 μmol/L H₂O₂ 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 200 μmol/L H₂O₂ 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 6$) 1: 对照组 2: 100 μmol/L H₂O₂ 组 3: 200 μmol/L H₂O₂ 组 4: 400 μmol/L H₂O₂ 组 miR: 微小 RNA; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2

Figure 2 Expression levels of miR-125b and Nrf2 protein in different concentrations of H₂O₂ groups A: The expression intensity of miR-125b in different concentrations of H₂O₂ groups by reverse transcription PCR B: Comparison of relative expression levels of miR-125b among different concentrations of H₂O₂ groups $F = 13.513, P < 0.01$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the 100 μmol/L H₂O₂ group, ^b $P < 0.05$; compared with the 200 μmol/L H₂O₂ group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 6$) C: The expression intensity of Nrf2 protein in oxidative stress model groups by Western blot D: Comparison of relative expression levels of Nrf2 protein $F = 10.228, P = 0.012$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the 100 μmol/L H₂O₂ group, ^b $P < 0.05$; compared with the 200 μmol/L H₂O₂ group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 6$) 1: Control group 2: 100 μmol/L H₂O₂ group 3: 200 μmol/L H₂O₂ group 4: 400 μmol/L H₂O₂ group miR: micro RNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2

2.3 不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 ROS 含量及氧化应激相关酶活性比较

对照组未发现 ROS 荧光,随着处理组 H₂O₂ 浓度增加,ROS 荧光强度明显增强(图 3)。对照组及 100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内源性 ROS 荧光强度分别为 89.43 ± 3.23、147.38 ± 8.33、94.44 ± 7.29 和 252.34 ± 11.31,总体比较差异有统计学意义($F = 25.316$, $P < 0.01$),100、200 和 400 μmol/L H₂O₂ 组细胞内源性 ROS 荧光强度均显著高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与对照组比较,各组 T-AOC、GSH-Px 和 SOD 活性均明显降低,MDA 浓度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),这种差异随着 H₂O₂ 浓度的增加而增大,任意 2 个组间两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

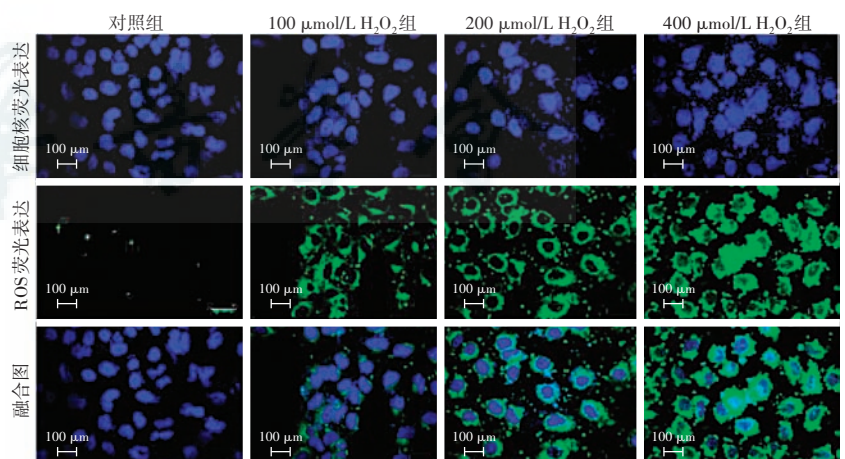


图 3 不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞内源性 ROS 表达(×600, 标尺 = 100 μm) ROS 阳性反应呈绿色荧光(DCFH-DA),细胞核呈蓝色荧光(DAPI)。随着 H₂O₂ 浓度的增加,ROS 荧光明显增强 ROS: 活性氧簇; H₂O₂: 过氧化氢

Figure 3 The expression intensity of endogenous ROS in different concentrations of H₂O₂ groups(×600, bar = 100 μm) ROS-positive reaction showed green fluorescence (DCFH-DA), and nuclei showed blue fluorescence (DAPI). The ROS response was enhanced with the increase of H₂O₂ concentration ROS: reactive oxygen species; H₂O₂: hydrogen peroxide

表 1 不同浓度 H₂O₂ 处理组细胞中 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较 (mean±SD)
Table 1 Comparison of T-AOC, SOD, GSH-Px activities and MDA concentration among different concentrations of H₂O₂ groups (mean±SD)

组别	样本量	T-AOC 活性 [mol/(min·L)]	SOD 活性 [mol/(min·L)]	GSH-Px 活性 [mol/(min·L)]	MDA 浓度 (μmol/L)
对照组	6	7.85±0.46	84.58±3.99	160.62±8.68	35.73±1.38
100 μmol/L H ₂ O ₂ 组	6	5.63±0.49 ^a	69.01±3.56 ^a	130.25±3.43 ^a	45.02±2.26 ^a
200 μmol/L H ₂ O ₂ 组	6	3.87±0.55 ^{ab}	56.40±2.43 ^{ab}	103.25±4.38 ^{ab}	57.84±3.87 ^{ab}
400 μmol/L H ₂ O ₂ 组	6	1.29±0.17 ^{abc}	25.12±3.54 ^{abc}	62.63±3.48 ^{abc}	71.25±2.43 ^{abc}
F 值		27.945	31.257	35.124	20.547
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自的对照组比较,^a*P*<0.05;与各自的 100 μmol/L H₂O₂ 组比较,^b*P*<0.05;与各自的 200 μmol/L H₂O₂ 组比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) H₂O₂:过氧化氢;T-AOC:总抗氧化能力;SOD:超氧化物歧化酶;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶;MDA:丙二醛

Note:Compared with the respective control group,^a*P*<0.05;compared with the respective 100 μmol/L H₂O₂ group,^b*P*<0.05;compared with the respective 200 μmol/L H₂O₂ group,^c*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) H₂O₂: hydrogen peroxide; T-AOC: total-antioxidative capability; SOD: superoxide dismutase; GSH-Px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde

2.4 不同转染组细胞中氧化应激相关指标表达

miR-125b 拟似物组 ROS 表达最弱,miR-125b 抑制物组 ROS 表达最强(图 4)。miR-125b 拟似物组、miR-125b 对照组和 miR-125b 抑制物组细胞中 ROS 荧光强度分别为 73.23±5.33、189.32±7.33 和 324.23±10.33,总体比较差异有统计学意义(*F* = 34.138, *P*<0.01),miR-125b 拟似物组 ROS 荧光强度显著低于 miR-125b 对照组和 miR-125b 抑制物组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);miR-125b 拟似物组细胞内 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性均显著高于 miR-125b 对照组,MDA 浓度低于 miR-125b 对照组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);与 miR-125b 对照组比较,miR-125b 抑制物组细胞内 T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性均明显下降,MDA 浓度明显升高,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)(表 2)。

2.5 miR-125b 靶基因预测

miR-125b 靶基因预测发现,miR-125b 与 Nrf2 保守位点有高分结合,Nrf2 为 miR125b 的一个潜在作用靶点。双荧光素酶报告系统结果显示,miR-125b 拟似物刺激 HELE3 细胞中 Nrf2-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性,而 miR-125b 抑制物抑制 Nrf2-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性,差异有统计学意义(*P*<0.05),转染突变载体的细胞内未观察到明显的荧光素酶活性改变,提示 Nrf2 是 miR-125b 的直接靶向蛋白。miR-125b 拟似物组细胞内 Nrf2 蛋白相对表达量高于 miR-125b 对照组,miR-125b 抑制物组细胞内 Nrf2 蛋白相对表达量低于 miR-125b 对照组和 miR-125b 拟似物组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)(表 3,图 5)。200 μmol/L H₂O₂ 刺激后,Nrf2 表达发生核转移,miR-125b 拟似物组细胞质中 Nrf2 荧光染色最强,核转移也最显著,细胞质中 Keap1 的表达微弱;miR-125b 抑制物组细胞质内 Nrf2 荧光较弱,核转移程度最弱,细胞质中 Keap1 的荧光最强(图 6)。

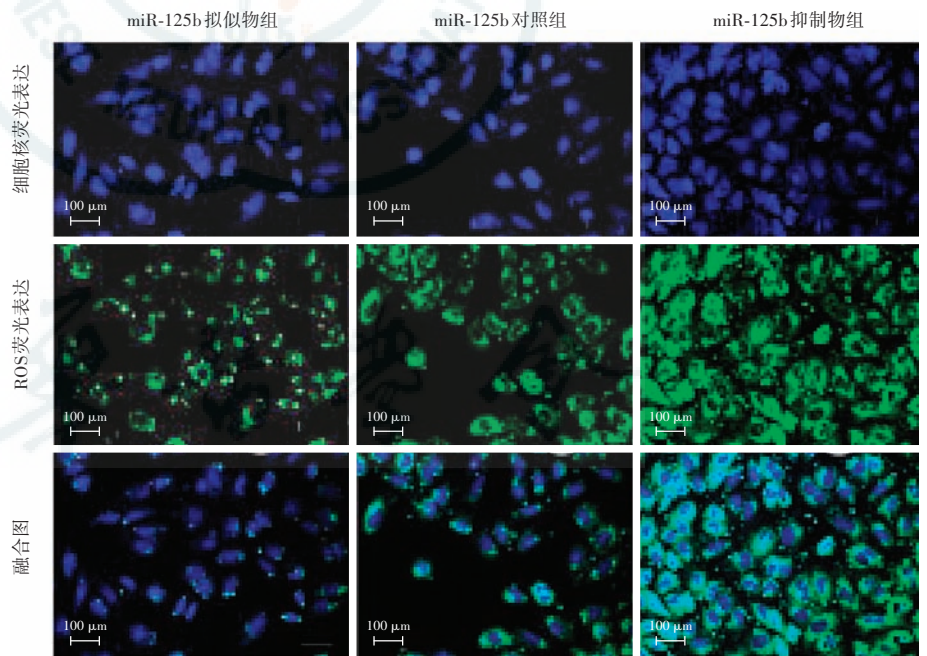


图 4 不同转染组细胞中内源性 ROS 荧光表达 (×600, 标尺 = 100 μm) 细胞中 ROS 反应呈绿色荧光(DCFH-DA),细胞核呈蓝色荧光(DAPI)。不同转染组中 miR-125b 拟似物组细胞中 ROS 荧光强度最弱,miR-125b 抑制物组 ROS 荧光最强 ROS:活性氧簇;miR:微小 RNA

Figure 4 The response intensity of endogenous ROS in different transfected groups (×600, bar=100 μm) The positive response of ROS showed green fluorescence (DCFH-DA),and the nuclei displayed blue fluorescence (DAPI). In different transfected groups,ROS response was the weakest in the miR-125b mimics group and strongest in the miR-125b inhibitor group ROS:reactive oxygen species; miR: micro RNA

表 2 不同转染组 LECs 中 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of T-AOC, SOD and GSH-Px activities and MDA concentration among different transfected groups (mean±SD)

组别	样本量	T-AOC 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$]	SOD 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$]	GSH-Px 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$]	MDA 浓度 [$(\mu\text{mol}/\text{L})$]
miR-125b 拟似物组	6	6.31±0.46	68.93±4.27	126.39±8.90	37.87±1.49
miR-125b 对照组	6	3.50±0.55 ^a	54.42±2.41 ^a	104.95±6.63 ^a	56.92±3.89 ^a
miR-125b 抑制物组	6	2.62±0.36 ^{ab}	34.28±3.06 ^{ab}	73.83±3.70 ^{ab}	72.59±3.42 ^b
F 值		13.953	16.337	9.124	18.783
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自的 miR-125b 拟似物组比较,^a $P<0.05$;与各自的 miR-125b 对照组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) LECs:晶状体上皮细胞;T-AOC:总抗氧化能力;SOD:超氧化物歧化酶;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶;MDA:丙二醛;miR:微小 RNA

Note:Compared with respective miR-125b mimics group,^a $P<0.05$;compared with respective miR-125b control group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) LECs:lens epithelial cells;T-AOC:total-antioxidative capability;SOD:superoxide dismutase;GSH-Px:glutathione peroxidase;MDA:malondialdehyde;miR:micro RNA

表 3 不同转染组 miR-125b 靶基因预测相关指标比较 (mean±SD)

Table 3 Comparison of miR-125b target gene prediction indicators among different transfected groups (mean±SD)

组别	样本量	Nrf2-3'-UTR-WT 报告基因的 荧光素酶活性	Nrf2-3'-UTR-MT 报告基因的 荧光素酶活性	Nrf2 相对蛋白 表达水平
miR-125b 拟似物组	6	1.77±0.15	1.41±0.07	0.97±0.01
miR-125b 对照组	6	0.97±0.11 ^a	1.38±0.09	0.78±0.06 ^a
miR-125b 抑制物组	6	0.52±0.06 ^{ab}	1.46±0.09	0.43±0.03 ^{ab}
F 值		11.314	0.124	18.413
P 值		0.011	1.310	<0.01

注:与各自的 miR-125b 拟似物组比较,^a $P<0.05$;与各自的 miR-125b 对照组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA;Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;UTR:非翻译区;WT:野生型;MT:突变型

Note:Compared with the respective miR-125b mimics group,^a $P<0.05$;compared with the respective miR-125b control group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR:micro RNA;Nrf2:nuclear factor E2-related factor 2;UTR:untranslated region;WT:wild type;MT:mutant type

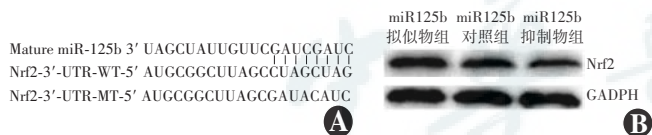


图 5 miR-125b 靶基因预测结果 A:生物信息软件检测 Nrf2 和 miR-125b 潜在结合位点,双荧光素酶报告基因实验检测 Nrf2 和 miR-125b 的直接关系 B:Western blot 法检测不同转染组 Nrf2 蛋白表达 miR-125b 抑制物组细胞中 Nrf2 蛋白表达条带弱于 miR-125b 对照组和 miR-125b 拟似物组 miR:微小 RNA;Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;UTR:非翻译区;WT:野生型;MT:突变型;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 5 MiR-125b target gene prediction A:Bioinformatics software detected the binding sites of Nrf2 and miR-125b,and the double luciferase reporter gene assay showed a direct relationship between Nrf2 and miR-125b B:The expression intensity of Nrf2 protein in different transfected groups by Western blot assay The intensity of Nrf2 band was weakened in the miR-125b inhibitor group compared with the miR-125b control group and miR-125b mimics group miR:microRNA;Nrf2:nuclear factor E2-related factor 2;UTR:untranslated region;WT:wild type;MT:mutant type;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3 讨论

氧化应激损伤指机体内源性或外源性 ROS 对细胞信号转导途径的综合损伤,或对细胞内核酸、蛋白质及其他重要因子的损伤^[2-3,9]。研究发现,多种刺激因子产生的氧自由基介导的氧化损伤是导致白内障发生和发展的重要原因,白内障患者房水中 H₂O₂ 浓度升高,介导早期氧化应激^[10-11]。本研究用不同浓度的 H₂O₂ 刺激 HLEB-3 细胞,成功建立氧化应激模型。近年来,miRNA 在白内障中的作用越来越受到关注。miR-125b 是近年来广泛研究的 miRNA 之一,与多种细胞的生物学活动密切相关,如多种癌细胞、成骨细胞等^[12-15]。Li 等^[16]研究证实,miR-125b 通过靶向 p53 诱导的核蛋白 1 促进非小细胞肺癌患者的肿瘤转移;Wu 等^[17]研究证实 miR-125b 通过靶向胃癌中的

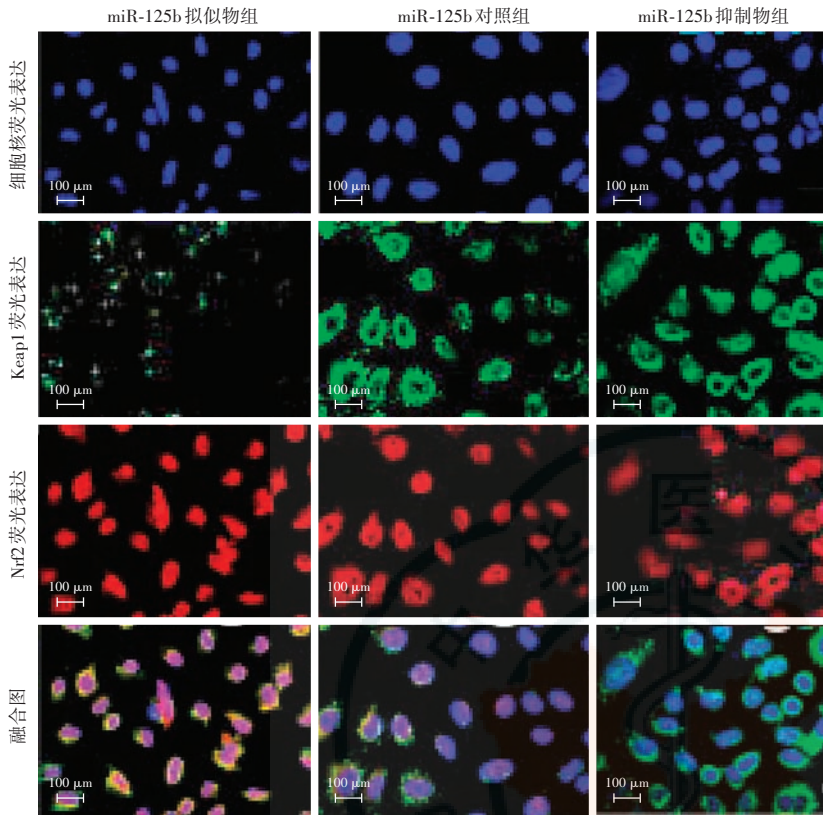


图 6 免疫荧光双染色检测不同转染组 LECs 中 Keap1、Nrf2 的表达和定位 ($\times 600$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 免疫荧光双染色显示细胞质中 Keap1 反应呈绿色荧光, Nrf2 反应呈红色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) miR-125b 拟似物组细胞质中 Keap1 荧光强度弱, Nrf2 荧光强, 存在大量核转移; miR-125b 对照组细胞质中 Keap1 荧光稍强于 miR-125b 拟似物组, Nrf2 荧光强度弱, 存在少量核转移; miR-125b 抑制物组 Keap1 荧光强, Nrf2 荧光微弱 Keap1: Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1; Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; miR: 微小 RNA

Figure 6 Expression and localization of Keap1 and Nrf2 in lens epithelial cells in different transfected groups by immunofluorescence double staining ($\times 600$, bar = $100 \mu\text{m}$) The Keap1 presented green fluorescence and Nrf2 showed red fluorescence, and the nuclei displayed blue fluorescence. The fluorescence of Keap1 in the cytoplasm was weaker and Nrf2 was stronger in the miR-125b mimics group, indicating more nuclear metastases. In the miR-125b control group, the Keap1 fluorescence was slightly enhanced and Nrf2 was weakened in comparison with the miR-125b mimics group. Keap1 fluorescence was strong and Nrf2 was weakened in the miR-125b inhibitor group Keap1: kelch-like ECH-associated protein-1; Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2; miR: micro RNA

PPP1CA-Rb 信号通路来促进细胞迁移和侵袭, 导致预后不良; 彭俊等^[18]报道 miR-125b 可调控骨髓间充质干细胞成骨能力; 也有研究报道 miR-125b 通过靶向 Stat3 调节单核细胞中降钙素的生成^[19], 但其对白内障晶状体细胞生物学行为是否有调控作用尚未见报道。本研究检测 miR-125b 在白内障晶状体前囊膜组织中的表达, 发现 miR-125b 在发生白内障的晶状体前囊膜组织内的表达增加, 经过 H_2O_2 刺激的 HLEB-3 细胞内 miR-125b 的表达随着 H_2O_2 浓度的升高而增加, 提示 miR-125b 可能参与了白内障的发病过程。

生理状态下适量的 ROS 自由基对维持机体氧化平衡状态有重要意义, 氧化应激条件下促氧化剂与抗

氧化剂之间失衡, 诱导 LECs 的线粒体损伤, ROS 水平升高, 导致细胞内脂质过氧化, 产生大量 MDA, SOD、T-AOC、GSH-Px 是细胞内抗氧化酶, 其活性降低会直接导致细胞内氧自由基积累^[20-21]。本研究发现氧化应激模型细胞内 ROS 活性、MDA 浓度均高于对照组, 而 SOD、T-AOC、GSH-Px 的活性均显著下降, 与预测结果一致。miR-125b 在多种细胞的氧化应激过程中发挥调节作用。Wei 等^[7]报道 miR-125b-5p 在氧化应激下能保护内皮细胞免于凋亡; Liu 等^[8]研究证实人视网膜色素上皮细胞的氧化应激状态可刺激 miR-125b 的表达, 从而缓解葡萄糖代谢异常。本研究中发现, 在 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的刺激下转染 miR-125b 拟似物组的细胞中 SOD、T-AOC、GSH-Px 活性较 miR-125b 对照组增加, ROS 活性和 MDA 浓度降低, 转染 miR-125b 抑制物组细胞中 SOD、T-AOC、GSH-Px 活性下调, ROS 活性和 MDA 浓度均较高, 说明 miR-125b 可能是通过缓解 LECs 的氧化应激损伤而参与白内障的发病过程。

Nrf2 是调控细胞氧化应激损伤的关键性转录因子, 生理状态下 Nrf2 与 Keap1 以复合体的形式存在于细胞质内, Nrf2 处于非活性状态, 当细胞受到氧化损伤信号刺激时, Nrf2 被激活进入细胞核内, 启动下游 HO-1 的转录, 增强细胞抗氧化能力, 该信号通路在细胞的氧化应激、抗凋亡过程中发挥重要作用^[22-24]。李佳等^[25]研究证实, Nrf2 在人 LECs 中的高表达及核移位能增加抗氧化酶的含量, 从而起到自身抗氧化损伤作用。为了进一步研究 miR-125b 调控 LECs 氧化应激损伤的作用机制, 本研究用 miRanda、TargetScan 数据库筛选 miR-125b 下游靶向蛋白, 发现 miR-125b 与 Nrf2 保守位点有高分结合, Nrf2 为 miR-125b 的一个潜在作用靶点。同时, 在 miR-125b 拟似物组细胞内, Nrf2 的表达高于 miR-125b 对照组, 而 Nrf2 在 miR-125b 抑制物组细胞内的表达受到抑制。免疫荧光双染色检测发现, 随着转染时间的增加, miR-125b 拟似组细胞内 Nrf2 向细胞核转移, 细胞质中 Keap1 的表达也随之减弱, 而 Nrf2 核转移相对较弱的 miR-125b 抑制物组细胞质内 Keap1 的表达较强烈。

综上所述,本研究结果表明 miR-125b 能缓解年龄相关性白内障 LECs 氧化应激损伤,这种作用可能是通过靶向刺激 Nrf2 的表达、调控 Keap1/Nrf2 信号通路的活性而实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cai M, Li J, Lin S, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 protects cultured human lens epithelial cells against oxidative stress [J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(8): 822-829. DOI: 10.3109/02713683.2014.959607.
- [2] Zhao WJ, Yan YB. Increasing susceptibility to oxidative stress by cataract-causing crystallin mutations [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 665-673. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.013.
- [3] 张越,付安安,李薇,等. 17-β 雌二醇对 H₂O₂ 诱导氧化损伤的晶状体上皮细胞的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(10): 918-921. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0233.
Zhang Y, Fu AA, Li W, et al. Protective effects of 17-β estradiol on lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(10): 918-921. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0233.
- [4] 蒋国路,李奉玲,宁东,等. 微小核糖核酸在肺部感染性疾病诊断中的研究进展[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(2): 158-162. DOI: 10.7683/xxyxyxb.2018.02.020.
Jiang GL, Li FL, Ning D, et al. Advances of miRNAs in the diagnosis of pulmonary infectious diseases [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2018, 35(2): 158-162. DOI: 10.7683/xxyxyxb.2018.02.020.
- [5] 李晓彤,秦宇,赵江月,等. 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[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(11): 977-983. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.005.
Li XT, Qin Y, Zhao JY, et al. Inhibitory effects of microRNA-133b on ultraviolet-induced apoptosis of lens epithelial cells and its mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(11): 977-983. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.005.
- [6] 邹莹. miRNAs 对白内障患者晶状体上皮细胞中氧化损伤的生物学效应及其机制[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(8): 1961-1963. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2018.08.069.
- [7] Wei M, Gan L, Liu Z, et al. MiR125b-5p protects endothelial cells from apoptosis under oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 453-460. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.072.
- [8] Liu G, Zhang CD, Wang J, et al. Inhibition of the oxidative stress-induced miR-125b protects glucose metabolic disorders of human retinal pigment epithelium (RPE) cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(4): 1-5.
- [9] 丁建光,李含玉,曾令柏,等. 晶状体上皮细胞凋亡与过氧化氢诱导白内障形成研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2001, 19(3): 202-204. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2001.03.004.
Ding JG, Li HY, Zeng LB, et al. An experimental study of lens epithelial cells apoptosis and hydrogen peroxide induced cataract formation [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2001, 19(3): 202-204. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2001.03.004.
- [10] Zhang J, Yan H, Lou MF. Does oxidative stress play any role in diabetic cataract formation? —Re-evaluation using a thioltransferase gene knockout mouse model [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 161: 36-42. DOI: 10.1016/j.exer.2017.05.014.
- [11] Wang S, Guo C, Yu M, et al. Identification of H₂O₂ induced oxidative stress associated microRNAs in HLE-B3 cells and their clinical relevance to the progression of age-related nuclear cataract [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2018, 18(1): 93 [2020-03-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899325/>. DOI: 10.1186/s12886-018-0766-6.
- [12] Fan YX, Bian XH, Qian PD, et al. MicroRNA-125b inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by targeting BMF [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 61-72. DOI: 10.3892/or.2018.6413.
- [13] 杜莉,曹伟靖,田莹,等. MicroRNA-125b 对人牙周膜干细胞成骨分化的影响[J]. *上海口腔医学*, 2018, 27(1): 11-17.
Du L, Cao WJ, Tian Y, et al. MicroRNA-125b regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *Shanghai J Stomatol*, 2018, 27(1): 11-17.
- [14] Zhou S, Zhang P, Liang P, et al. The expression of miR-125b regulates angiogenesis during the recovery of heat-denatured HUVECs [J]. *Burns*, 2015, 41(4): 803-811. DOI: 10.1016/j.burns.2014.10.012.
- [15] Chen X, Liu J, Feng WK, et al. MiR-125b protects against ethanol-induced apoptosis in neural crest cells and mouse embryos by targeting Bak 1 and PUMA [J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 104-111. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.04.026.
- [16] Li Q, Han Y, Wang C, et al. MicroRNA-125b promotes tumor metastasis through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in patients with non-small-cell lung cancer [J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 84 [2020-07-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26388699/>. DOI: 10.1186/s12935-015-0233-x.
- [17] Wu JG, Wang JJ, Jiang X, et al. MiR-125b promotes cell migration and invasion by targeting PPP1CA-Rb signal pathways in gastric cancer, resulting in a poor prognosis [J]. *Gastric Cancer*, 2015, 18(4): 729-739. DOI: 10.1007/s10120-014-0421-8.
- [18] 彭俊,刘英杰,宗阳,等. miR-125b 调控 Runx2/Osx 表达对骨髓间充质干细胞成骨机制的影响[J]. *东南国防医药*, 2019, 21(2): 124-129. DOI: 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.003.
Peng J, Liu YJ, Zong Y, et al. Effect of miR-125b regulating the expression of Runx2/Osx on osteogenesis mechanism of bone mesenchymal stem cells [J]. *Mil Med J Southeast Chin*, 2019, 21(2): 124-129. DOI: 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.003.
- [19] Zhang F, Fan X, Bai Y, et al. miR-125b regulates procalcitonin production in monocytes by targeting Stat3 [J]. *Microbes Infect*, 2016, 18(2): 102-108. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.09.027.
- [20] AINT THU THU WIN, 李松蔓, 韩子豪, 等. 急性氧化应激状态下人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中衰老标记蛋白 30、Caspase-3、Ca²⁺-ATP 表达的变化 [J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(8): 1222-1226. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2019.08.002.
AINT THU THU W, Li SM, Han ZH, et al. Effect of acute oxidative stress on expression of senescence marker protein-30, Caspase-3, Ca²⁺-ATP in human lens epithelial cell line SRA01/04 [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2019, 36(8): 1222-1226. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2019.08.002.
- [21] Bai J, Yu N, Mu H, et al. Histidine protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress injury through the NF-κB pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1637-1645. DOI: 10.1002/jcb.26323.
- [22] Ma TJ, Lan DH, He SZ, et al. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative and ER stress; the ATF4 may be involved [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 169: 28-37. DOI: 10.1016/j.exer.2018.01.018.
- [23] Paul S, Ghosh S, Mandal S, et al. NRF2 transcriptionally activates the heat shock factor 1 promoter under oxidative stress and affects survival and migration potential of MCF7 cells [J/OL]. *J Biol Chem*, 2018, 293(50): 19303-19316 [2020-07-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30309986/>. DOI: 10.1074/jbc.RA118.003376.
- [24] 周玉,东莉洁,张红,等. Krüppel 样因子 6 抑制人晶状体上皮细胞增生的研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(4): 325-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.009.
Zhou Y, Dong LJ, Zhang H, et al. Pilot study on suppression of Krüppel-like factor 6 for proliferation of human lens epithelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(4): 325-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.009.
- [25] 李佳,李兵. 核因子 E2 相关因子 2 在晶状体上皮细胞抗氧化损伤中的作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(11): 25-30. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.005.
Li J, Li B. Anti-oxidative effect of Nrf2 in human lens epithelial cells [J]. *Chin J Mod Med*, 2019, 29(11): 25-30. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.005.

(收稿日期:2020-08-22 修回日期:2021-03-03)

(本文编辑:尹卫靖)