

· 实验研究 ·

miR-155 在过氧化氢诱导晶状体上皮细胞氧化应激损伤中的作用及靶向 SIRT1 调控机制

牛艳桃 张丽 谢文芳

山西省人民医院眼科,太原 030012

通信作者:张丽,Email:2462005360@qq.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA(miR)-155 对过氧化氢(H_2O_2)诱导晶状体上皮细胞(LECs)氧化应激损伤的作用及其调控沉默信息调节因子相关酶 1(SIRT1)的机制。**方法** 取对数生长期 HLE-B3 细胞株,分别于 0、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 条件下培养 24 h,采用 MTT 法检测细胞存活率,筛选构建氧化应激损伤模型的 H_2O_2 最佳作用浓度。将细胞分为 6 个组,其中空白对照组不作处理,模型对照组细胞于 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 条件下培养,miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组和 miR-155 抑制剂对照组细胞分别转染 miR-155 拟似物、miR-155 拟似物对照、miR-155 抑制剂、miR-155 抑制剂对照并于 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 条件下培养。各组细胞培养 24 h,倒置显微镜下观察细胞形态;采用荧光定量 PCR 法检测细胞 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量;采用流式细胞术检测细胞凋亡率;采用二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测活性氧簇(ROS)含量;采用 ELISA 法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)浓度;采用双荧光素酶报告基因系统检测 miR-155 对 SIRT1 的靶向性;采用 Western blot 法检测细胞 SIRT1、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(bcl-2)、bcl-2 相关 X 蛋白(bax)、活化的半胱氨酸天冬氨酸酶 3(cleaved-Caspase-3)蛋白表达。**结果** 随 H_2O_2 浓度增加,细胞存活率逐渐降低,各不同浓度间细胞存活率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),选取 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为 H_2O_2 的实验浓度。空白对照组细胞贴壁生长良好;模型对照组细胞数量减少,部分存活细胞形态发生改变,边界模糊不清;miR-155 拟似物组细胞数量少于模型对照组,细胞固有形态发生改变;miR-155 抑制剂组细胞数量多于模型对照组,细胞生长状态良好。与模型对照组比较,miR-155 拟似物组细胞 miR-155 相对表达量明显升高,SIRT1 mRNA 相对表达量明显降低,细胞凋亡率、ROS 含量和 MDA 浓度升高,SOD 活性降低,SIRT1、bcl-2 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 明显降低、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);miR-155 抑制剂组细胞 miR-155 相对表达量明显降低,SIRT1 mRNA 相对表达量明显升高,细胞凋亡率、ROS 含量、MDA 浓度明显降低,SOD 活性明显升高,SIRT1、bcl-2 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 明显升高、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。转染 miR-155 拟似物细胞的野生型 SIRT1 相对荧光素酶活性为 0.41 ± 0.07 ,明显低于转染 miR-155 拟似物对照细胞的 1.00 ± 0.11 ,转染 miR-155 抑制剂细胞的野生型 SIRT1 相对荧光素酶活性为 1.98 ± 0.17 ,明显高于转染 miR-155 抑制剂对照细胞的 1.00 ± 0.12 ,差异均有统计学意义($t = 7.838, 8.157$,均 $P < 0.05$);各转染细胞对突变型 SIRT1 相对荧光素酶活性无明显影响。**结论** miR-155 参与 H_2O_2 诱导的 LECs 氧化损伤,其过表达可靶向抑制 SIRT1 表达,发挥细胞损伤作用。

【关键词】 白内障;氧化应激;微小核糖核酸-155;晶状体上皮细胞;凋亡

基金项目: 山西省回国留学人员科研项目(2014-081)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201104-00735

Regulation of miR-155 in H_2O_2 -induced oxidative stress in lens epithelial cells via targeting SIRT1

Niu Yantao, Zhang Li, Xie Wenfang

Department of Ophthalmology, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China

Corresponding author: Zhang Li, Email: 2462005360@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of microRNA (miR)-155 in hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress injury in lens epithelial cells (LECs) and its mechanism regulating silent information regulator factor related enzymes 1 (SIRT1). **Methods** The HLE-B3 at the logarithmic growth phase was taken and cultured for 24 hours under different concentrations of H_2O_2 (0, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$), and the cell viability was detected by MTT assay to determine the optimal concentration of H_2O_2 for establishing an oxidative stress injury

model. HLE-B3 cells were divided into 6 groups, untreated blank control group, model control group cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , miR-155 mimics group transfected with miR-155 mimics, miR-155 mimics negative control group transfected with miR-155 mimics negative control, miR-155 inhibitor group transfected with miR-155 inhibitor, and miR-155 inhibitor negative control group transfected with miR-155 inhibitor negative control. Transfected cells were cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Cells in various groups were cultured for 24 hours, and cell morphology was observed under an inverted microscope. The relative expression of miR-155 and SIRT1 mRNA in cells was assayed by fluorescent quantitative PCR. Cell apoptosis rates were detected by flow cytometry. Reactive oxygen species (ROS) content was identified by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe method. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentration were measured by ELISA method. The targeting of SIRT1 by miR-155 was tested by dual luciferase reporter gene system. Expressions of SIRT1, B-cell lymphoma/leukemia-2 gene (bcl-2), bcl-2 associated X protein (bax), cleaved-cysteine aspartase 3 (cleaved-Caspase-3) proteins were determined by Western blot. **Results** With the increase of H_2O_2 concentration, the cell viability gradually decreased, and the differences in cell viability among different concentrations were statistically significant (all at $P < 0.05$), and 100 $\mu\text{mol/L}$ was selected as the experimental concentration. Cells in blank control group grew well adherently. The number of cells in model control group decreased, and the morphology of some surviving cells changed, and their boundaries were blurred. There were fewer cells in miR-155 mimics group than model control group, and the cell morphology changed. There were more cells in miR-155 inhibitor group than model control group, and the cells grew well. Compared with model control group, the relative expression level of miR-155, the apoptosis rate, ROS content, MDA concentration, as well as the relative expression levels of bax and cleaved-Caspase-3 proteins were increased, and the relative expression level of SIRT1 mRNA, the SOD activity, the relative expression of SIRT1 and bcl-2 proteins, as well as bcl-2/bax were decreased in miR-155 mimics group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). Compared with model control group, the relative expression of miR-155, the apoptosis rate, ROS content, MDA concentration, as well as the relative expression levels of bax and cleaved-Caspase-3 proteins were decreased, and the relative expression level of SIRT1 mRNA, SOD activity, the relative expression levels of SIRT1 and bcl-2 protein, as well as bcl-2/bax were significantly increased in miR-155 inhibitor group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative luciferase activity of wild-type SIRT1 in cells transfected with miR-155 mimics was 0.41 ± 0.07 , which was significantly weaker than 1.00 ± 0.11 in cells transfected with miR-155 mimics negative control, and the relative luciferase activity of wild-type SIRT1 in cells transfected with miR-155 inhibitor was 1.98 ± 0.17 , which was significantly higher than 1.00 ± 0.12 in cells transfected with miR-155 inhibitor negative control, showing statistically significant differences ($t = 7.838, 8.157$; both at $P < 0.05$). No obvious effect on the relative luciferase activity of mutant SIRT1 was found in transfected cells. **Conclusions** miR-155 is involved in H_2O_2 -induced oxidative damage of LECs, and its overexpression can target the expression of SIRT1 and play a role in cell injury.

[Key words] Cataract; Oxidative stress; microRNA-155; Epithelial cells, lens; Apoptosis

Fund program: Shanxi Province Research Funding Project for Returned Overseas Students (2014-081)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201104-00735

白内障是临床常见致盲眼病,以晶状体进行性混浊为主要特征,是导致老年人视力降低及盲的主要原因。动物模型及体外细胞实验均证实,氧化应激与白内障发生和发展密切相关。晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 凋亡是白内障发生的细胞学基础,氧化应激状态下细胞代谢产生的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 异常积累,诱发 LECs 凋亡,导致晶状体混浊^[1-2]。目前白内障主要通过手术进行治疗,尚缺乏预防或延缓白内障进展的有效手段。因此,寻找安全、有效的干预手段延缓白内障进展具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miRNA) 能特异性调

控靶基因,在眼部组织生长、功能维持及蛋白表达方面具有重要调控作用^[3]。miR-155 是一种多功能 miRNA,在炎症、肿瘤及免疫过程中发挥关键作用。既往研究显示,miR-155 参与视网膜变性、葡萄膜炎等多种眼部疾病的发生和发展过程^[4-5]。抑制 miR-155 的表达可减轻脑缺血后海马炎症反应和氧化应激损伤,改善神经功能^[6]。但 miR-155 在 LECs 氧化应激损伤中的作用尚不清楚。本研究拟探讨 miR-155 在过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 诱导人 LECs HLE-B3 氧化应激损伤中的作用及其可能的机制,为临床治疗白内障提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HLE-B3 细胞株购于美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 体积分数 30% H_2O_2 (10011218) (上海国药集团化学试剂有限公司); miR-155 拟似物 (miR-155 mimics) 及其对照 (miR-155 mimics-NC)、miR-155 抑制剂 (miR-155 inhibitor) 及其对照 (miR-155 inhibitor-NC) (上海吉玛制药技术有限公司); 二氯二氢荧光素 - 乙酰乙酸酯 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) ROS 荧光探针 (CA1410)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (BC0170)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) ELISA 试剂盒 (BC0025) (北京索莱宝科技有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (GM-040502A, 美国 Genomeditech 公司); 兔抗人沉默信息调节因子相关酶 1 (silment information regulator factor related enzymes 1, SIRT1) 单抗 (sc-74465, 美国 SantaCruz 公司); 兔抗人 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (B-cell lymphoma/leukemia-2 gene, bcl-2) 单抗 (ab32124)、bcl-2 相关 X 蛋白 (bcl-2 associated X protein, bax) 单抗 (ab104156)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved-cysteine aspartase 3, cleaved-Caspase-3) 多抗 (ab2302)、 αA 晶状体蛋白多抗 (ab4632)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (ab150077) (英国 Abcam 公司)。IX53 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (美国 FALS CALIBAR BD 公司); ABI7500 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏、培养及鉴定 将液氮中冻存的 HLE-B3 细胞取出, 37 °C 水浴解冻, 离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬细胞, 加入含有体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu g/ml$ 链霉素的 DMEM 培养基, 于体积分数 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养, 待细胞融合达 80%~90% 时进行传代, 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于后续实验。取传代后的细胞, 提取总蛋白, BCA 法蛋白定量, 蛋白变性后上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、孵育 αA 晶状体蛋白一抗 (1:1 000)、二抗 (1:5 000), 增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影, 检测 αA 晶状体蛋白表达以鉴定 LECs。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期 HLE-B3 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 分别加入不同浓度 (50、100、200、400、800 $\mu mol/L$) 的 H_2O_2 , 培养 24 h, 每孔加入 20 μl MTT (5%) 溶液, 继续培养 4 h, 加入 DMSO 150 μl /孔, 充分振荡 10 min, 使用酶标仪在 490 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值, 另设不含 H_2O_2 的空白组, 计算细胞存活率, 细胞存活率 = 不同浓度 H_2O_2 组 A 值/空白组 A 值 \times 100%。根据细胞存活率筛选出最适 H_2O_2 浓度。每组设置 5 个复孔。

1.2.3 细胞转染及分组 取对数生长期细胞, 调整浓度为 1×10^5 个/ml, 接种于 6 孔板, 将细胞分为 6 个组, 其中空白对照组细胞不作处理, 模型对照组细胞于 100 $\mu mol/L$ H_2O_2 条件下培养, miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组、miR-155 抑制剂对照组细胞分别进行相应转染后于 100 $\mu mol/L$ H_2O_2 条件下培养。转染步骤为: 分别将 1 μg miR-155 拟似物、miR-155 拟似物对照、miR-155 抑制剂或 miR-155 抑制剂对照与 50 μl Opti-MEM 混合; 将 2.5 μl Lipofectamine™ 2000 与 50 μl Opti-MEM 混合; 再将 2 种混合物充分混合, 室温孵育 20 min, 加至 6 孔板中, 转染 24 h 后, 荧光显微镜下观察细胞转染效果。倒置显微镜下观察细胞形态学变化并拍照。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量 收集各组细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系: cDNA 2.0 μl , 正向、反向引物各 0.5 μl , SYBR Select Master Mix 10 μl , 加 ddH₂O 至总体积 20.0 μl 。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 20 s, 70 °C 延伸 5 s, 进行 40 个循环。miR-155 正向引物序列为 5'-AGCTAGCTAGCG ATCGCAG-3', 反向为 5'-CGTAGCATCGATCGATATG-3'; U6 正向引物序列为 5'-ACGATCGATCGGATATGCATC G-3', 反向为 5'-AAGCTAGCGCTACGACGTAGCG-3'; SIRT1 正向引物序列为 5'-ATCTATCGAGCTCGGATCG AC-3', 反向为 5'-AGGCAGCAGCTGCAGATCGAT-3'; β -actin 正向引物序列为 5'-AAGCTAGCGATTATAG CTAGA-3', 反向为 5'-ATCGATGCTAGGCAAGATTA-3'。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。miR-155 以 U6 为内参, SIRT1 以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 取各组细胞, 以 1×10^5 个/ml 密度接种至 6 孔板, 培养 24 h, 每孔加入

500 μl 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 离心半径 8 cm, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 500 μl 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μl Annexin 和 PI 染色液, 避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 计算凋亡率。细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。每组设 5 个复孔。

1.2.6 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞 ROS 含量

各组细胞于 6 孔板培养 24 h, 每孔加入 200 μl DCFH-DA, 培养箱中静置 30 min, 使探针和细胞充分混匀, 磷酸盐缓冲液洗涤, 收集各组细胞, 酶标仪检测 A 值(激发波长为 488 nm、发射波长为 525 nm); 倒置荧光显微镜下观察二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF) 荧光强度并拍照, 荧光越强代表 ROS 含量越高。每组设 5 个复孔。

1.2.7 ELISA 法检测细胞培养上清液 SOD 活性和 MDA 浓度

各组细胞于 6 孔板培养 24 h, 离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 参照试剂盒说明书步骤, 加入 SOD、MDA 抗体及酶标抗体, 洗涤后加入底物显色液避光染色 10 min, 终止反应后, 使用酶标仪于 450 nm 处测量 A 值, 根据标准曲线计算样品中 SOD 活性和 MDA 浓度。每组设 5 个复孔。

1.2.8 双荧光素酶报告基因系统检测 miR-155 靶基因表达

采用 PicTar 以及 TargetScan 生物信息软件预测分析 miR-155 与 SIRT1 序列之间结合位点, 以 SIRT1 的 3' 非翻译区(untranslated region, UTR) 插入双荧光素酶报告基因 psiCHECK2 中, 构建野生型(wild type, WT) psiCHECK2-SIRT1 WT 和突变型(mutant type, MUT) psiCHECK2-SIRT1 MUT 重组质粒, 分别将 miR-155 拟似物、miR-155 拟似物对照、miR-155 抑制剂及 miR-155 抑制剂对照与 psiCHECK2-SIRT1 WT、psiCHECK2-SIRT1 MUT 共转染至 HLE-B3 细胞, 检测相对荧光素酶活性, 以萤火虫荧光素酶活性与内参海肾荧光素酶活性的比值表示。实验重复 3 次。

1.2.9 Western blot 法检测细胞 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量

取各组细胞, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 法对蛋白进行定量, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性, 蛋白上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳完毕后, 将蛋白转印至 PVDF 膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉室温条件下封闭 2 h, 加入 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 及 β -actin 一抗(均 1:800 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 溶液洗膜, 加入 HRP 标记的相应二抗(1:2 000 稀释), 室温孵育 2 h, TBST 溶液洗膜, 加入 ECL 溶液, 显影、定影, 采用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 以目的蛋白与内参 β -actin 灰度比

值表示目的蛋白相对表达量。每组设 5 个复孔。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。本研究计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Levene 进行组间方差齐性检验。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组、miR-155 抑制剂对照组组间各测量值差异比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验。miR-155 拟似物对照组与 miR-155 拟似物组、miR-155 抑制剂对照组与 miR-155 抑制剂组相对荧光素酶活性比较均采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LECs 的鉴定

培养的 HLE-B3 细胞高表达 αA 晶状体蛋白(图 1)。

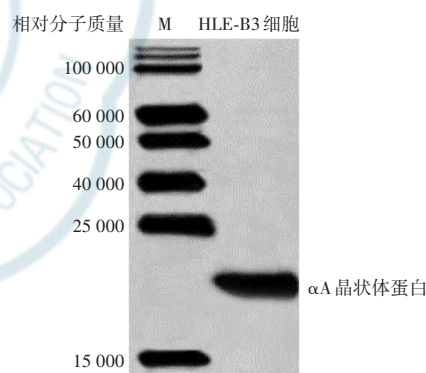


图 1 HLE-B3 细胞中 αA 晶状体蛋白表达 可见细胞中 αA 晶状体蛋白高表达 M: 蛋白分子标记

Figure 1 Expression of αA -crystallin in HLE-B3 cells αA -crystallin was highly expressed in cells M: protein marker

2.2 不同浓度 H_2O_2 干预后细胞存活率比较

MTT 检测结果显示, 不同浓度 H_2O_2 处理细胞存活率总体比较, 差异有统计学意义($F = 289.475$, $P < 0.05$)。随着 H_2O_2 浓度增加, 细胞存活率逐渐降低, 各不同浓度间细胞存活率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1), 其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理细胞存活率接近 50%, 故后续实验选取 H_2O_2 的浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 各组细胞形态学变化比较

倒置显微镜下观察结果显示, 空白对照组细胞呈长梭形或不规则椭圆形, 贴壁生长良好; 模型对照组细胞数量减少, 死亡细胞悬浮于培养基中, 呈圆形, 存活

表 1 不同浓度 H_2O_2 细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of cell survival rate at different concentrations of H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, \%$)

H_2O_2 浓度	样本量	细胞存活率
0 $\mu\text{mol/L}$	5	100.00 \pm 1.00
50 $\mu\text{mol/L}$	5	66.15 \pm 3.56 ^a
100 $\mu\text{mol/L}$	5	55.38 \pm 3.15 ^{ab}
200 $\mu\text{mol/L}$	5	41.54 \pm 2.95 ^{abc}
400 $\mu\text{mol/L}$	5	27.69 \pm 2.58 ^{abcd}
800 $\mu\text{mol/L}$	5	20.00 \pm 2.37 ^{abcde}
F 值		289.475
P 值		<0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较,^a $P < 0.05$;与 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较,^b $P < 0.05$;与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较,^c $P < 0.05$;与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较,^d $P < 0.05$;与 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较,^e $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) H_2O_2 :过氧化氢

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,^a $P < 0.05$; compared with 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,^b $P < 0.05$; compared with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,^c $P < 0.05$; compared with 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,^d $P < 0.05$; compared with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,^e $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) H_2O_2 : hydrogen peroxide

细胞部分形态发生改变,细胞边界模糊不清;miR-155 拟似物组细胞数量少于模型对照组,细胞固有形态发生改变;miR-155 抑制剂组细胞数量多于模型对照组,细胞生长状态良好,但仍可见少量死亡细胞;miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组细胞形态与模型对照组相似(图 2)。

2.4 各组细胞 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量比较

空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 抑制剂组、miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组细胞 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F = 386.952, 356.158$, 均 $P < 0.001$),其中与空白对照组相比,模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂对照组细胞 miR-155 mRNA 相对表达量升高, SIRT1 mRNA 相对表达量表达降低,miR-155 抑制剂组细胞 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组和 miR-155 拟似物对照组比较,miR-155 拟似物组细胞 miR-155 mRNA 相对表达量明显

升高, SIRT1 mRNA 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组、miR-155 抑制剂对照组和 miR-155 拟似物组比较,miR-155 抑制剂组细胞 miR-155 mRNA 相对表达量明显降低, SIRT1 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);模型对照组、miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组间细胞 miR-155 和 SIRT1 mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 2)。

2.5 各组细胞凋亡率比较

空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组和 miR-155 抑制剂对照组细胞凋亡率总体比较,差异有统计学意义($F = 263.158, P < 0.001$),其中与空白对照组比较,模型对照组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 抑制剂对照组、miR-155 抑制剂组细胞凋亡率均升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组和 miR-155 拟似物对照组比较,miR-155 拟

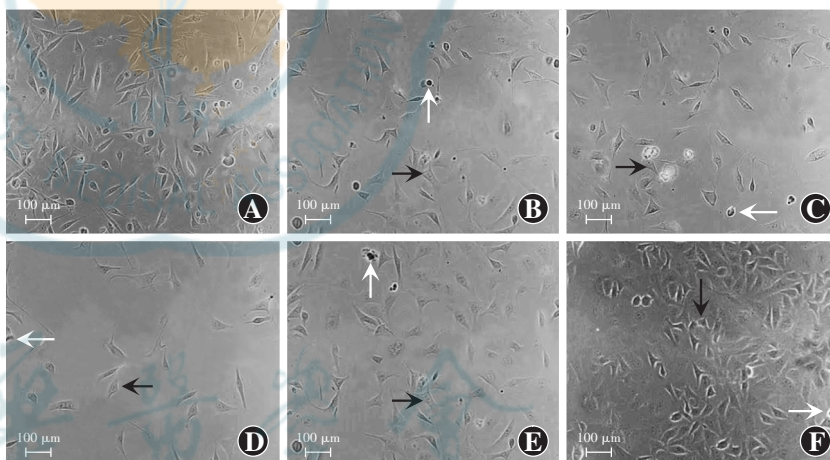


图 2 各组细胞形态变化($\times 200$, 标尺=100 μm) 空白对照组可见细胞呈长梭形或不规则椭圆形,贴壁生长良好;模型对照组可见细胞数量减少,部分存活细胞形态发生改变,边界模糊不清;miR-155 拟似物组可见细胞数量较模型对照组少,细胞形态发生改变;miR-155 抑制剂组可见中等数量细胞及少量死亡细胞;miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组可见细胞形态与模型对照组相似 白箭头示死亡细胞,黑箭头示变形细胞 A:空白对照组 B:模型对照组 C:miR-155 拟似物对照组 D:miR-155 拟似物组 E:miR-155 抑制剂对照组 F:miR-155 抑制剂组 miR:微小 RNA

Figure 2 Cell morphology changes in various groups ($\times 200$, bar = 100 μm) In blank control group, the cells showed long fusiform or irregular elliptical shape, and they grew well adherently. In model control group, the number of cells was reduced, and some surviving cells were deformed with unclear boundary. Fewer cells were seen in miR-155 mimics group compared with model control group and they were deformed. Medium number of cells and a few dead cells were seen in miR-155 inhibitor group. Cell morphology in miR-155 mimics negative control group and miR-155 inhibitor negative control group was similar to model control group White arrows indicated dead cells, and black arrows showed deformed cells A: blank control group B: model control group C: miR-155 mimics negative control group D: miR-155 mimics group E: miR-155 inhibitor negative control group F: miR-155 inhibitor group miR: microRNA

表 2 各组细胞 miR-155、SIRT1 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of the relative expression levels of miR-155 and SIRT1 mRNA among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	miR-155	SIRT1 mRNA
空白对照组	5	1.00±0.11	1.00±0.10
模型对照组	5	1.66±0.13 ^a	0.65±0.07 ^a
miR-155 拟似物对照组	5	1.63±0.12 ^a	0.61±0.08 ^a
miR-155 拟似物组	5	2.75±0.15 ^{abc}	0.43±0.06 ^{abc}
miR-155 抑制剂对照组	5	1.65±0.14 ^a	0.66±0.07 ^a
miR-155 抑制剂组	5	0.61±0.07 ^{abde}	0.84±0.08 ^{abde}
<i>F</i> 值		386.952	356.158
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.05;与模型对照组比较,^b*P*<0.05;与 miR-155 拟似物对照组比较,^c*P*<0.05;与 miR-155 拟似物组比较,^d*P*<0.05;与 miR-155 抑制剂对照组比较,^e*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA;SIRT1:沉默信息调节因子相关酶 1

Note:Compared with blank control group,^a*P*<0.05;compared with model control group,^b*P*<0.05;compared with miR-155 mimics negative control group,^c*P*<0.05;compared with miR-155 mimics group,^d*P*<0.05;compared with miR-155 inhibitor negative control group,^e*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR:microRNA;SIRT1:silent information regulator factor related enzymes 1

表 3 各组细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 3 Comparison of cell apoptosis rate among various groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	凋亡率
空白对照组	5	3.16±1.01
模型对照组	5	21.57±1.47 ^a
miR-155 拟似物对照组	5	23.35±1.65 ^a
miR-155 拟似物组	5	34.57±2.02 ^{abc}
miR-155 抑制剂对照组	5	21.96±1.58 ^a
miR-155 抑制剂组	5	11.84±1.24 ^{abde}
<i>F</i> 值		263.158
<i>P</i> 值		<0.001

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.05;与模型对照组比较,^b*P*<0.05;与 miR-155 拟似物对照组比较,^c*P*<0.05;与 miR-155 拟似物组比较,^d*P*<0.05;与 miR-155 抑制剂对照组比较,^e*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA

Note:Compared with blank control group,^a*P*<0.05;compared with model control group,^b*P*<0.05;compared with miR-155 mimics negative control group,^c*P*<0.05;compared with miR-155 mimics group,^d*P*<0.05;compared with miR-155 inhibitor negative control group,^e*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR:microRNA

似物组细胞凋亡率升高 (*P*<0.05);与模型对照组、miR-155 抑制剂对照组和 miR-155 拟似物组比较,miR-155 抑制剂组细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)。模型对照组、miR-155 拟似物对照组及 miR-155 抑制剂对照组间细胞凋亡率比较,差异均无统计学意义(均 *P*>0.05)(图 3,表 3)。

2.6 各组细胞 ROS 含量比较

倒置显微镜下观察结果显示,空白对照组 DCF 荧光较弱;模型对照组可见强 DCF 荧光;miR-155 拟似物组 DCF 荧光较模型对照组明显增强;miR-155 抑制剂组 DCF 荧光较模型对照组和 miR-155 拟似物组明显减弱;miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组

ROS 含量与模型对照组相似(图 4)。空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组和 miR-155 抑制剂对照组细胞 ROS 含量总体比较,差异有统计学意义(*F* = 163.236, *P*<0.001)。与空白对照组比较,模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组和 miR-155 抑制剂对照组细胞 ROS 含量均升高,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);与模型对照组和 miR-155 拟似物对照组比较,miR-155 拟似物组细胞 ROS 含量升高,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);与模型对照组、miR-155 抑制剂对照组和 miR-155 拟似物组比较,miR-155 抑制剂组细胞

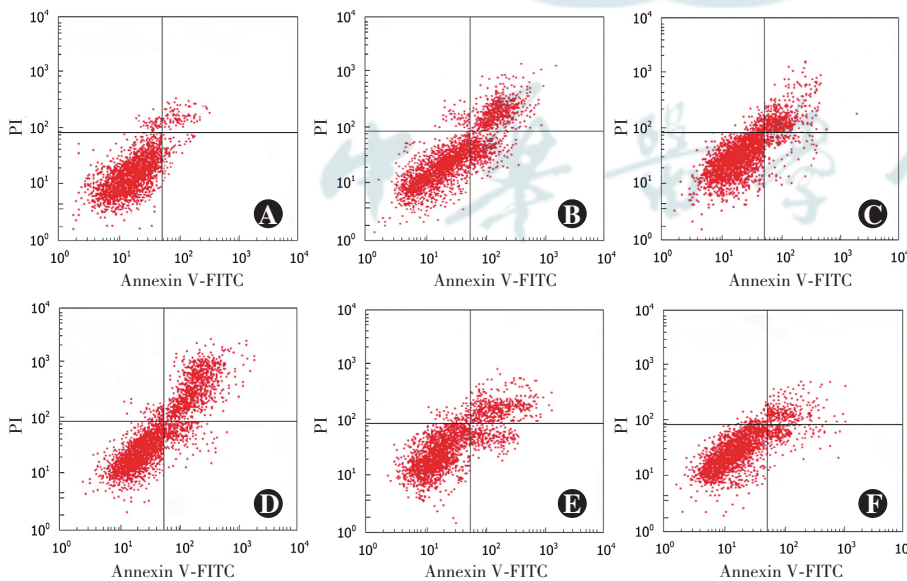


图 3 各组流式细胞分析图 A: 空白对照组 B: 模型对照组 C: miR-155 拟似物对照组 D: miR-155 拟似物组 E: miR-155 抑制剂对照组 F: miR-155 抑制剂组 PI:碘化丙啶;FITC:异硫氰酸荧光素

Figure 3 Flow cytometry analysis of cells in various groups A: blank control group B: model control group C: miR-155 mimics negative control group D: miR-155 mimics group E: miR-155 inhibitor negative control group F: miR-155 inhibitor group PI:propidium iodide; FITC: fluorescein isothiocyanate

ROS 含量降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型对照组、miR-155 拟似物对照组及 miR-155 抑制剂对照组间细胞 ROS 含量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 4)。

2.7 各组细胞 SOD 活性和 MDA 浓度比较

空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、

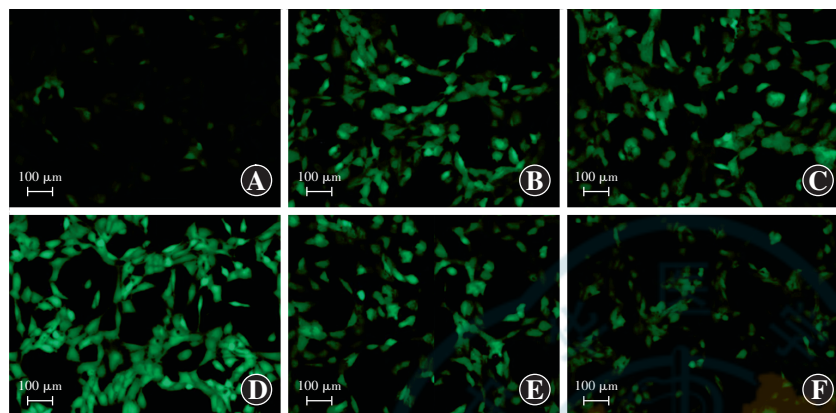


图 4 各组细胞 ROS 荧光图($\times 200$, 标尺=100 μm) 空白对照组细胞荧光强度较弱,模型对照组细胞荧光增强,miR-155 拟似物对照组和 miR-155 抑制剂对照组荧光强度与模型对照组相似,miR-155 拟似物组荧光强度较模型对照组增强,miR-155 抑制剂组荧光强度较模型对照组和 miR-155 拟似物组减弱 A:空白对照组 B:模型对照组 C:miR-155 拟似物对照组 D:miR-155 拟似物组 E:miR-155 抑制剂对照组 F:miR-155 抑制剂组

Figure 4 ROS fluorescence image of cells in various groups ($\times 200$, bar = 100 μm) Fluorescence intensity of cells in blank control group was weak; fluorescence intensity of cells in model control group was increased; fluorescence intensity of cells in miR-155 mimics negative control group and miR-155 inhibitor negative control group was similar to model control group; fluorescence intensity of cells in miR-155 mimics group was enhanced compared with model control group; fluorescence intensity of cells in miR-155 inhibitor group was attenuated in comparison with model control group and miR-155 mimics group A: blank control group B: model control group C: miR-155 mimics negative control group D: miR-155 mimics group E: miR-155 inhibitor negative control group F: miR-155 inhibitor group

表 4 各组细胞 ROS 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of ROS content among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	ROS 荧光 A 值
空白对照组	5	20.68 \pm 3.21
模型对照组	5	63.52 \pm 5.47 ^a
miR-155 拟似物对照组	5	62.59 \pm 5.18 ^a
miR-155 拟似物组	5	84.57 \pm 6.39 ^{abc}
miR-155 抑制剂对照组	5	61.96 \pm 5.26 ^a
miR-155 抑制剂组	5	41.84 \pm 4.97 ^{abde}
F 值		163.236
P 值		<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与 miR-155 拟似物对照组比较,^c $P < 0.05$;与 miR-155 拟似物组比较,^d $P < 0.05$;与 miR-155 抑制剂对照组比较,^e $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) ROS:活性氧簇 miR:微小 RNA

Note: Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with model control group, ^b $P < 0.05$; compared with miR-155 mimics negative control group, ^c $P < 0.05$; compared with miR-155 mimics group, ^d $P < 0.05$; compared with miR-155 inhibitor negative control group, ^e $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) ROS: reactive oxygen species miR: microRNA

miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组、miR-155 抑制剂对照组细胞 SOD 活性和 MDA 浓度总体比较,差异均有统计学意义($F = 62.361$ 、73.325, 均 $P < 0.001$),其中与空白对照组比较,模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组、miR-155 抑制剂对照组细胞 SOD 活性均降低,MDA 浓度均升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组和 miR-155 拟似物对照组比较,miR-155 拟似物组细胞 SOD 活性降低,MDA 浓度升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组、miR-155 抑制剂对照组和 miR-155 拟似物组比较,miR-155 抑制剂组细胞 SOD 活性升高,MDA 浓度降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型对照组、miR-155 拟似物对照组及 miR-155 抑制剂对照组间细胞 SOD 活性和 MDA 浓度比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 5)。

2.8 双荧光素酶报告结果

生物信息软件预测显示, SIRT1 的 3'UTR 区存在 miR-155 连续结合位点,靶向序列为 5'-AGCAUUA-3'。转染 miR-155 拟似物细胞野生型 SIRT1 相对荧光素酶活性为 0.41 \pm 0.07,明显弱于转染 miR-155 拟似物对照细胞的

表 5 各组细胞 SOD 活性和 MDA 浓度比较($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of SOD activity and MDA concentration in cells among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SOD [mmol/(min·L)]	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	5	52.26 \pm 5.23	1.86 \pm 0.39
模型对照组	5	23.15 \pm 3.45 ^a	5.89 \pm 0.57 ^a
miR-155 拟似物对照组	5	22.85 \pm 3.62 ^a	5.93 \pm 0.52 ^a
miR-155 拟似物组	5	11.75 \pm 3.18 ^{abc}	7.12 \pm 0.61 ^{abc}
miR-155 抑制剂对照组	5	24.43 \pm 3.71 ^a	5.85 \pm 0.48 ^a
miR-155 抑制剂组	5	41.09 \pm 4.57 ^{abde}	2.94 \pm 0.46 ^{abde}
F 值		62.361	73.325
P 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与 miR-155 拟似物对照组比较,^c $P < 0.05$;与 miR-155 拟似物组比较,^d $P < 0.05$;与 miR-155 抑制剂对照组比较,^e $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;miR:微小 RNA

Note: Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with model control group, ^b $P < 0.05$; compared with miR-155 mimics negative control group, ^c $P < 0.05$; compared with miR-155 mimics group, ^d $P < 0.05$; compared with miR-155 inhibitor negative control group, ^e $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; miR: microRNA

1.00±0.11, 差异有统计学意义 ($t = 7.838, P < 0.05$); 转染 miR-155 抑制剂细胞野生型 SIRT1 相对荧光素酶活性为 1.98±0.17, 明显强于转染 miR-155 抑制剂对照细胞的 1.00±0.12, 差异有统计学意义 ($t = 8.157, P < 0.05$)。转染 miR-155 拟似物与转染 miR-155 拟似物对照及转染 miR-155 抑制剂与转染 miR-155 抑制剂对照细胞突变型 SIRT1 相对荧光素酶活性比较, 差异均无统计学意义 ($t = 0.776, 0.350, \text{均 } P > 0.05$) (图 5)。

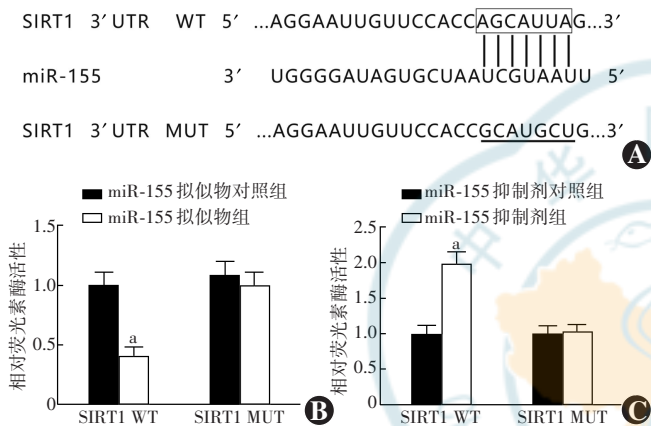


图 5 miR-155 靶向调控 SIRT1 A: miR-155 与 SIRT1 存在连续结合位点 B: miR-155 拟似物和 miR-155 拟似物对照转染细胞 SIRT1 相对荧光素酶活性比较 与 miR-155 拟似物对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) C: miR-155 抑制剂和 miR-155 抑制剂对照转染细胞 SIRT1 相对荧光素酶活性比较 与 miR-155 抑制剂对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) SIRT1: 沉默信息调节因子相关酶 1; UTR: 非翻译区; WT: 野生型; miR: 微小 RNA; MUT: 突变型

Figure 5 Targeted regulation of SIRT1 by miR-155 A: There were continuous binding sites between miR-155 and SIRT1 B: Comparison of the relative luciferase activity of SIRT1 between cells transfected with miR-155 mimics and miR-155 mimics negative control Compared with miR-155 mimics negative control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t test, $n = 3$) C: Comparison of the relative luciferase activity of SIRT1 between cells transfected with miR-155 inhibitor and miR-155 inhibitor negative control Compared with miR-155 inhibitor negative control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t test, $n = 3$) SIRT1: silent information regulator factor related enzymes 1; UTR: untranslated area; WT: wild type; miR: microRNA; MUT: mutant type

2.9 各组细胞 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 比较

空白对照组、模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂组、miR-155 抑制剂对照组细胞 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 48.596, 55.489, 15.632, 63.281, 113.259$, 均 $P < 0.001$)。与空白对照组比较, 模型对照组、miR-155 拟似物组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制

剂组、miR-155 抑制剂对照组细胞 SIRT1、bcl-2 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 降低, bax 和 cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与模型对照组和 miR-155 拟似物对照组比较, miR-155 拟似物组细胞 SIRT1、bcl-2 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 降低, bax 和 cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与模型对照组、miR-155 抑制剂对照组和 miR-155 拟似物比较, miR-155 抑制剂组细胞 SIRT1、bcl-2 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 升高, bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型对照组、miR-155 拟似物对照组及 miR-155 抑制剂对照组间细胞 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 6, 表 6)。

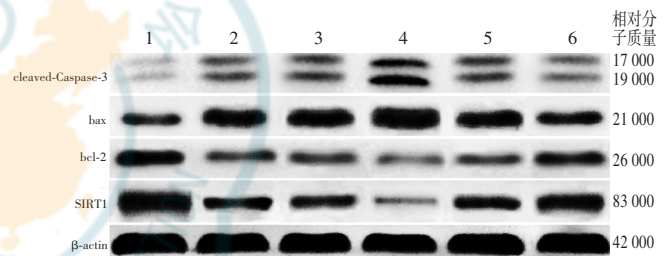


图 6 各组细胞蛋白表达电泳图 与空白对照组相比, 模型对照组、miR-155 拟似物对照组、miR-155 抑制剂对照组 SIRT1、bcl-2 蛋白条带灰度减弱, bax、cleaved-Caspase-3 蛋白条带灰度增强; miR-155 拟似物组 SIRT1、bcl-2 蛋白条带灰度较模型对照组和 miR-155 拟似物对照组弱, bax、cleaved-Caspase-3 蛋白条带灰度较模型对照组和 miR-155 拟似物对照组强; miR-155 抑制剂组 SIRT1、bcl-2 蛋白条带灰度较模型对照组和 miR-155 抑制剂对照组强, bax、cleaved-Caspase-3 蛋白条带灰度较模型对照组和 miR-155 抑制剂对照组弱 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: miR-155 拟似物对照组; 4: miR-155 拟似物组; 5: miR-155 抑制剂对照组; 6: miR-155 抑制剂组 cleaved-Caspase-3: 活化的半胱氨酸天冬氨酸酶 3; bax: bcl-2 相关 X 蛋白; bcl-2: B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因; SIRT1: 沉默信息调节因子相关酶 1

Figure 6 Electrophoretogram of proteins in various groups Compared with blank control group, the band intensity of SIRT1 and bcl-2 proteins was weaker, and the band intensity of bax and cleaved-Caspase-3 proteins was stronger in model control group, miR-155 mimics negative control group and miR-155 inhibitor negative control group. The band intensity of SIRT1 and bcl-2 proteins was weaker and the band intensity of bax and cleaved-Caspase-3 proteins was stronger in miR-155 mimics group than model control group and miR-155 mimics negative control group. The band intensity of SIRT1 and bcl-2 proteins was stronger and the band intensity of bax and cleaved-Caspase-3 proteins was weaker in miR-155 inhibitor group than model control group and miR-155 inhibitor negative control group 1: blank control group; 2: model control group; 3: miR-155 mimics negative control group; 4: miR-155 mimics group; 5: miR-155 inhibitor negative control group; 6: miR-155 inhibitor group cleaved-Caspase-3: cleaved-cysteine aspartase 3; bax: bcl-2 associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2 gene; SIRT1: silent information regulator factor related enzymes 1

表 6 各组细胞 SIRT1、bcl-2、bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 bcl-2/bax 比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression levels of SIRT1, bcl-2, bax, cleaved-Caspase-3 proteins and bcl-2/bax among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	SIRT1	bcl-2	bax	bcl-2/bax	cleaved-Caspase-3
空白对照组	1.06±0.11	0.87±0.09	0.71±0.06	1.14±0.10	0.36±0.05
模型对照组	0.65±0.07 ^a	0.45±0.07 ^a	0.96±0.10 ^a	0.46±0.06 ^a	0.89±0.09 ^a
miR-155 拟似物对照组	0.63±0.10 ^a	0.43±0.06 ^a	0.94±0.09 ^a	0.44±0.07 ^a	0.85±0.08 ^a
miR-155 拟似物组	0.35±0.07 ^{abc}	0.26±0.05 ^{abc}	1.13±0.11 ^{abc}	0.23±0.05 ^{abc}	1.03±0.10 ^{abc}
miR-155 抑制剂对照组	0.62±0.09 ^a	0.42±0.06 ^a	0.93±0.09 ^a	0.45±0.06 ^a	0.82±0.09 ^a
miR-155 抑制剂组	0.82±0.09 ^{abde}	0.63±0.08 ^{abde}	0.81±0.07 ^{abde}	0.78±0.09 ^{abde}	0.63±0.07 ^{abde}
F 值	48.596	55.489	15.632	113.259	63.281
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与 miR-155 拟似物对照组比较,^c $P<0.05$;与 miR-155 拟似物组比较,^d $P<0.05$;与 miR-155 抑制剂对照组比较,^e $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) SIRT1:沉默信息调节因子相关酶 1;bcl-2:B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因;bax;bcl-2 相关 X 蛋白;cleaved-Caspase-3:活化的半胱氨酸天冬氨酸酶 3;miR:微小 RNA

Note:Compared with blank control group,^a $P<0.05$;compared with model control group,^b $P<0.05$;compared with miR-155 mimics negative control group,^c $P<0.05$;compared with miR-155 mimics group,^d $P<0.05$;compared with miR-155 inhibitor negative control group,^e $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SIRT1:silent information regulator factor related enzymes 1;bcl-2:B-cell lymphoma/leukemia-2 gene;bax;bcl-2 associated X protein;cleaved-Caspase-3:cleaved-cysteine aspartase 3;miR:microRNA

3 讨论

ROS 过度堆积对 LECs 的损伤是引起白内障的主要因素,可损伤细胞蛋白质、核酸及脂质等成分,诱导细胞凋亡,引起组织损伤,降低细胞中 ROS 水平可有效防止晶状体混浊^[7]。H₂O₂ 是晶状体内主要 ROS 之一,SOD 等抗氧化剂可有效清除堆积的 ROS,正常情况下,晶状体中氧化与抗氧化系统处于平衡状态,随着年龄增长,房水及晶状体 H₂O₂ 增加,氧化应激损伤超过抗氧化系统,引起晶状体氧化损伤^[8]。MDA 浓度与细胞受 ROS 攻击程度有关,白内障患者晶状体中 MDA 浓度明显升高。H₂O₂ 处理的 LECs 可产生明显氧化应激损伤,同时实验性白内障大鼠晶状体中 SOD 活性明显低于正常大鼠^[9-11]。以上研究均提示氧化应激损伤参与白内障发生和发展过程。本研究结果显示,模型对照组细胞 ROS 荧光 A 值、MDA 浓度及凋亡率均较空白对照组明显升高,而 SOD 活性较空白对照组明显降低,证实 H₂O₂ 可诱导 HLE-B3 细胞氧化应激损伤,促进细胞凋亡。

研究证实,miRNA 在白内障发生和发展过程中发挥重要作用,有望作为诊断标志物或新的治疗靶点^[12-14]。miR-155 在眼部组织生长发育以及功能调节方面具有重要作用,Bian 等^[15] 研究显示,miR-155 参与视网膜损伤,与光感受器变性有关。Woeller 等^[16] 报道,miR-155 在甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞中的表达高于健康人群。以上研究均表明 miR-155 与眼部疾病密切相关。本研究结果也显示,miR-155

在 H₂O₂ 诱导的 HLE-B3 细胞氧化应激损伤模型中异常高表达,miR-155 抑制剂组细胞生长状态良好,且凋亡率较模型对照组和 miR-155 拟似物组明显降低,提示沉默 miR-155 对细胞具有保护作用,有利于细胞正常生长发育。Qiu 等^[17] 研究表明,miR-155 可通过结合环氧合酶 2 促进蟑螂过敏原诱导的哮喘小鼠模型中的氧化应激反应。在脓毒症小鼠模型中,沉默 miR-155 表达可抑制氧化应激,减轻肝损伤^[18]。本研究结果显示,miR-155 抑制剂组细胞 ROS 含量、

MDA 浓度较模型对照组和 miR-155 拟似物组明显降低,SOD 活性明显增强,提示沉默 miR-155 可减轻 HLE-B3 细胞氧化应激损伤。

SIRT1 具有调控细胞周期、抗氧化、抗凋亡等作用。Caspase-3 可裂解多种功能蛋白,是细胞凋亡的執行者,在 H₂O₂ 诱导的氧化应激细胞模型中表达升高。bcl-2 可抵抗细胞凋亡,bax 可促进细胞凋亡,二者表达水平与细胞凋亡密切相关。SIRT1 在眼部角膜、视网膜、晶状体等组织中表达,与氧化损伤引起的细胞凋亡有关,参与葡萄膜炎、视网膜退行性疾病等眼部疾病的发生和发展过程。临床研究表明,SIRT1 在年龄相关性白内障患者 LECs 中低表达,促使细胞凋亡,加速疾病发展^[19]。动物实验显示,糖尿病白内障小鼠 LECs 中 SIRT1 表达明显低于正常小鼠,可抑制细胞增生,并促进细胞凋亡^[20]。促进 SIRT1 表达或使用 SIRT1 激动剂可减少氧化应激导致的 LECs 损伤,预防白内障发生^[21]。本研究结果表明,H₂O₂ 诱导氧化应激损伤细胞中 SIRT1、bcl-2 蛋白表达水平及 bcl-2/bax 降低,bax、cleaved-Caspase-3 蛋白升高,均提示 SIRT1 参与细胞氧化应激损伤及凋亡过程,与刘金泉等^[22] 研究 SIRT1 参与帕金森模型细胞凋亡和氧化应激损伤的结果一致。同时本研究经双荧光素酶实验验证 miR-155 与 SIRT1 存在靶向性,与李世勋等^[23] 研究 miR-155 靶向 SIRT1 调控缺血性心肌细胞的结果相似,提示 miR-155 可靶向调控 SIRT1 表达,且沉默 miR-155 可减轻细胞氧化损伤,减少凋亡。

综上所述,本研究结果表明 miR-155 在 H₂O₂ 诱导的 HLE-B3 细胞氧化应激损伤模型中高表达,沉默 miR-155 可减少细胞凋亡,减轻氧化应激损伤,其可能是通过靶向调控 SIRT1 表达水平发挥细胞保护作用,为临床治疗白内障提供新的靶点和实验依据。但本研究仅针对细胞氧化损伤模型进行探讨,未建立动物模型,未来需进一步探讨 miR-155 在体内对晶状体混浊的作用及可能机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 牛艳桃:实验设计和实施、文章撰写;张丽:实验设计、文章修改及定稿;谢文芳:实验实施、数据采集及分析

参考文献

- [1] Hu X, Liang Y, Zhao B, et al. Oxyresveratrol protects human lens epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis by activation of Akt/HO-1 pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(3): 166-173. DOI:10.1016/j.jphs.2019.01.003.
- [2] Tsai CF, Wu JY, Hsu YW. Protective effects of rosmarinic acid against selenite-induced cataract and oxidative damage in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(5): 729-740. DOI:10.7150/ijms.32222.
- [3] Bao XY, Cao J. MiRNA-138-5p protects the early diabetic retinopathy by regulating NOVA1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18): 7749-7756. DOI:10.26355/eurrev_201909_18984.
- [4] Aggio-Bruce R, Chu-Tan JA, Wooff Y, et al. Inhibition of microRNA-155 protects retinal function through attenuation of inflammation in retinal degeneration [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(2): 835-854. DOI:10.1007/s12035-020-02158-z.
- [5] Muhammad F, Trivett A, Wang D, et al. Tissue-specific production of microRNA-155 inhibits melanocortin 5 receptor-dependent suppressor macrophages to promote experimental autoimmune uveitis [J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(11): 2074-2082. DOI:10.1002/eji.201848073.
- [6] Sun L, Ji S, Xing J. Inhibition of microRNA-155 alleviates neurological dysfunction following transient global ischemia and contribution of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(40): 4310-4317. DOI:10.2174/1381612825666190926162229.
- [7] Fang W, Ye Q, Yao Y, et al. Protective effects of trimetazidine in retarding selenite-induced lens opacification [J]. *Curr Eye Res*, 2019, 44(12): 1325-1336. DOI:10.1080/02713683.2019.1633359.
- [8] Li X, Meng F, Li H, et al. L-carnitine alleviates oxidative stress-related damage via MAPK signaling in human lens epithelial cells exposed to H₂O₂ [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(4): 1515-1522. DOI:10.3892/ijmm.2019.4283.
- [9] Liu YC, Setiawan M, Ang M, et al. Changes in aqueous oxidative stress, prostaglandins, and cytokines; comparisons of low-energy femtosecond laser-assisted cataract surgery versus conventional phacoemulsification [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2019, 45(2): 196-203. DOI:10.1016/j.jcrs.2018.09.022.
- [10] Zou Y, Cui B, Liang P, et al. Inhibition of NLRP3 protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by NF-κB signaling [J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(2): 174-181. DOI:10.1159/000504303.
- [11] Singh A, Bodakhe SH. Resveratrol delay the cataract formation against naphthalene-induced experimental cataract in the albino rats [J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(1): e22420 [2021-08-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31746523>. DOI: 10.1002/jbt.22420.
- [12] Zhou W, Xu J, Wang C, et al. miR-23b-3p regulates apoptosis and autophagy via suppressing SIRT1 in lens epithelial cells [J/OL]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(12): 19635-19646 [2021-08-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31338869>. DOI: 10.1002/jcb.29270.
- [13] Cao Y, Li P, Zhang G, et al. MicroRNA Let-7c-5p-mediated regulation of ERCC6 disrupts autophagic flux in age-related cataract via the binding to VCP [J]. *Curr Eye Res*, 2021, 46(9): 1353-1362. DOI:10.1080/02713683.2021.1900273.
- [14] Zhang K, Yin Y, Pei C, et al. MicroRNA-124 regulates lens epithelial cell apoptosis by affecting Fas alternative splicing by targeting polypyrimidine tract-binding protein in age-related cataract [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2021, 49(6): 591-605. DOI:10.1111/ceo.13946.
- [15] Bian M, Du X, Wang P, et al. Combination of ginsenoside Rb1 and Rd protects the retina against bright light-induced degeneration [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6015 [2021-08-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28729651>. DOI:10.1038/s41598-017-06471-x.
- [16] Woeller CF, Roztocil E, Hammond C, et al. TSHR signaling stimulates proliferation through PI3K/Akt and induction of miR-146a and miR-155 in thyroid eye disease orbital fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(13): 4336-4345. DOI:10.1167/iov.19-27865.
- [17] Qiu L, Zhang Y, Do DC, et al. miR-155 modulates cockroach allergen- and oxidative stress-induced cyclooxygenase-2 in asthma [J]. *J Immunol*, 2018, 201(3): 916-929. DOI:10.4049/jimmunol.1701167.
- [18] Yang ZB, Chen WW, Chen HP, et al. MiR-155 aggravated septic liver injury by oxidative stress-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction via targeting Nrf-2 [J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 105(3): 387-394. DOI:10.1016/j.yexmp.2018.09.003.
- [19] Lu B, Christensen IT, Ma LW, et al. miR-211 promotes lens epithelial cells apoptosis by targeting silent mating-type information regulation 2 homolog 1 in age-related cataracts [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(2): 201-207. DOI:10.18240/ijo.2018.02.04.
- [20] Zeng K, Feng QG, Lin BT, et al. Effects of microRNA-211 on proliferation and apoptosis of lens epithelial cells by targeting SIRT1 gene in diabetic cataract mice [J/OL]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4): BSR20170695 [2022-04-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28679650>. DOI:10.1042/BSR20170695.
- [21] Zheng T, Lu Y. SIRT1 protects human lens epithelial cells against oxidative stress by inhibiting p53-dependent apoptosis [J]. *Curr Eye Res*, 2016, 41(8): 1068-1075. DOI:10.3109/02713683.2015.1093641.
- [22] 刘金泉, 孙永胜, 刘春云. miR-34a 通过靶向 SIRT1 对 MPP+ 诱导的帕金森病模型细胞凋亡和氧化应激损伤的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(6): 647-652, 657. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.06.002.
- [23] Liu JQ, Sun YS, Liu CY. Effect of miR-34a on MPP+ induced apoptosis and oxidative stress of Parkinson's disease model cells by targeting SIRT1 gene [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(6): 647-652, 657. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.06.002.
- [23] 李世勋, 周凡, 王岩. miR-155 靶向 SIRT1 调控缺氧/复氧心肌细胞的活力、凋亡和氧化应激 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(24): 6084-6090. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2019.24.058.

(收稿日期:2021-09-19 修回日期:2022-04-07)

(本文编辑:张宇 骆世平)