

miR-15a 对高糖诱导人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的促进作用及其机制

南安超 南建茹 刘亚东 刘向玲

郑州大学第二附属医院眼科, 郑州 450014

通信作者: 南安超, Email: nananchao0208@163.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA15a(miR-15a)对高糖诱导的人晶状体上皮细胞(LECs)抗氧化应激能力的调控作用及其可能的作用机制。方法 收集糖尿病性白内障(DC)患者晶状体前囊膜组织标本及健康供体前囊膜组织标本各 26 个,采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法分别检测组织中 miR-15a 和沉默信息调节蛋白 1(SIRT1)的表达。取人晶状体上皮细胞系 HLEB-3 细胞分别于 0、10、20 和 50 mmol/L 葡萄糖条件下培养 24 h,采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 miR-15a 表达;采用 Western blot 法检测细胞中 SIRT1、叉头转录因子 3a(FOXO3a)、p53 蛋白表达;采用流式细胞术检测细胞凋亡;采用 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针法检测细胞内源性活性氧簇(ROS)含量,试剂盒检测细胞内源性活性氧总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)浓度。将 miR-15a 对照和 miR-15a 抑制剂分别转染至 HLEB-3 细胞,在 50 mmol/L 葡萄糖条件下培养 24 h,采用流式细胞术检测细胞凋亡率;采用 DCFH-DA 检测细胞内源性 ROS 表达;采用试剂盒检测细胞内源性 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 浓度;采用双荧光素酶报告实验验证 miR-15a 与 SIRT1 的靶向关系;采用 Western blot 法检测各转染组细胞内 SIRT1、FOXO3a 和 p53 蛋白表达。结果 miR-15a 在正常晶状体前囊膜组织中的相对表达量为 0.21 ± 0.02 , 低于 DC 患者晶状体前囊膜组织的 0.96 ± 0.10 , 差异有统计学意义($t = 12.231, P < 0.001$); SIRT1 在正常晶状体前囊膜组织中的相对表达量为 0.89 ± 0.09 , 高于 DC 患者晶状体前囊膜组织中的 0.31 ± 0.05 , 差异有统计学意义($t = 8.964, P < 0.001$)。随着葡萄糖浓度的增加,细胞中 miR-15a、FOXO3a 和 p53 相对表达量增加, SIRT1 蛋白相对表达量下降, 细胞凋亡率升高, ROS 含量和 MDA 浓度增加, T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。miR-15a 对照组细胞凋亡率、ROS 含量和 MDA 浓度高于 miR-15a 抑制剂组, T-AOC、SOD 和 GSH-Px 活性低于 miR-15a 抑制剂组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。miR-15a 对照组 SIRT1-3'-非翻译区(UTR)-野生型(WT)报告基因的荧光素酶活性明显低于 miR-15a 抑制剂组, 差异有统计学意义($t = 5.978, P = 0.004$); 2 个组 SIRT1-3'-UTR-突变型(MUT)报告基因的荧光素酶活性差异无统计学意义($t = 0.432, P = 0.688$)。miR-15a 对照组细胞 FOXO3a 和 p53 蛋白相对表达量明显高于 miR-15a 抑制剂组, SIRT1 蛋白相对表达量明显低于 miR-15a 抑制剂组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 miR-15a 能抑制高糖诱导下 LECs 的抗氧化应激损伤能力, 其可能是通过抑制 SIRT1 表达从而上调 FOXO3a 和 p53 的活性, 加重细胞凋亡。

【关键词】 氧化应激; 糖尿病性白内障; 晶状体上皮细胞; 微小 RNA15a; 沉默信息调节蛋白 1; 凋亡

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(201602159)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200301-00126

Promoting effect of miR-15a on high glucose-induced oxidative stress in human lens epithelial cells and its mechanism

Nan Anchao, Nan Jianru, Liu Yadong, Liu Xiangling

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

Corresponding author: Nan Anchao, Email: nananchao0208@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of microRNA-15a (miR-15a) on the anti-oxidative stress ability of human lens epithelial cells (LECs) induced by high glucose and its possible mechanism. **Methods** The anterior lens capsule specimens from patients with diabetic cataract (DC) and healthy donors were collected. The expressions of miR-15a and silent information regulator 1 (SIRT1) in the specimens were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot, respectively. The human lens epithelial cell line HLEB-3 cells were cultured with 0, 10, 20, or 50 mmol/L glucose for 24 hours. The expression of miR-15a in the cells was detected by RT-qPCR. The expressions of SIRT1, forkhead transcription factor 3a (FOXO3a), and p53 proteins in the cells were determined by Western blot. The cell apoptosis was assayed by flow cytometry. The endogenous reactive oxygen species (ROS) content in the cells was measured by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). The total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and malondialdehyde (MDA) activities in the cells were identified. HLEB-3 cells were transfected with miR-15a control or miR-15a inhibitor, then incubated with 50 mmol/L glucose for 24 hours. Cell apoptosis of the transfected cells was detected by flow cytometry. The endogenous ROS expression in the transfected cells was determined by DCFH-DA.

The T-AOC, SOD, and GSH-Px activities as well as MDA concentration were measured. The relationship between miR-15a and SIRT1 was verified by dual-luciferase reporter assay. The SIRT1, FOXO3a, and p53 protein expressions in the transfected cells were detected by Western blot. This study was approved by an Ethics Committee of the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University (No. ZDEFY201803160023). Written informed consent was obtained from each subject. **Results** The relative expression of miR-15a in normal lens anterior capsule tissue was 0.21 ± 0.02 , which was lower than 0.96 ± 0.10 in lens anterior capsule tissue of DC patients, and the difference was statistically significant ($t = 12.231, P < 0.001$). The relative expression of SIRT1 in the anterior lens capsule tissue was 0.89 ± 0.09 , which was higher than 0.31 ± 0.05 in the anterior lens capsule tissue of DC patients, showing a statistically significant difference ($t = 8.964, P < 0.001$). With the increase of glucose concentration, the relative expression of miR-15a, FOXO3a, and p53 in cells increased, and the relative expression of SIRT1 decreased; the apoptosis rate of cells increased; the ROS content and MDA concentration increased; the activities of T-AOC, SOD and GSH-Px decreased, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The apoptosis rate, ROS content, and MDA concentrations were higher in miR-15a control group than miR-15a inhibitor group, and the activities of T-AOC, SOD, and GSH-Px were lower in miR-15a control group than miR-15a inhibitor group, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$). The luciferase activity of the SIRT1-3'-untranslated region (UTR)-wild type (WT) reporter gene in miR-15a control group was significantly lower than that in miR-15a inhibitor group, and the difference was statistically significant ($t = 5.978, P = 0.004$). No significant difference was found in the luciferase activity of the SIRT1-3'-UTR-mutant type (MUT) reporter gene ($t = 0.432, P = 0.688$). The relative expressions of FOXO3a and p53 proteins were significantly higher in miR-15a control group than miR-15a inhibitor group, and the relative expression of SIRT1 protein was significantly lower in miR-15a control group than miR-15a inhibitor group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). **Conclusions** miR-15a can inhibit the anti-oxidative stress damage ability of LECs induced by high glucose, which may be achieved by inhibiting the expression of SIRT1 to up-regulate the activities of FOXO3a and p53, and aggravating apoptosis.

[Key words] Oxidative stress; Cataract, diabetic; Epithelial cells, lens; microRNA-15a; Silent information regulator 1; Apoptosis

Fund program: Henan Province Medical Science and Technology Research Project (20160215)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200301-00126

糖尿病性白内障 (diabetic cataract, DC) 是除糖尿病视网膜病变外, 糖尿病患者致盲的又一重要因素。DC 患者晶状体混浊进展快, 晶状体体积较正常人明显增大, 目前临床上主要通过手术治疗 DC, 但并发症发生率较高^[1]。因此, 深入研究 DC 发病机制, 寻找有效防治途径至关重要。晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的氧化应激损伤是高糖环境下晶状体混浊的主要原因之一^[2]。氧化应激是指机体受到刺激后, 产生大量活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 超出机体对其的清除速度, 导致 ROS 等氧自由基在体内或细胞内蓄积, 从而引起组织损伤的过程^[3-4]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是非编码 RNA, 能特异性识别靶基因的 3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR), 通过与靶基因完全或部分互补结合, 导致靶基因的降解或抑制其翻译^[5]。近年来的研究发现, 多种 miRNA 在 LECs 的氧化应激损伤中发挥作用, 参与白内障的发生和发展^[6-7]。miR-15a 是 miRNA 家族成员, 其在白内障患者 LECs 中呈异常高表达, 且能诱导 LECs 凋亡^[8]。Cho 等^[9]报道, miR-15a 是糖尿病性黄斑水肿患者房水中差异表达的 miRNA 之一。但 miR-15a 与 DC 发生和发展的关系尚不明确。本研究拟检测 DC 患者 LECs 中 miR-15a 的表达情况, 并探讨 miR-15a 对高糖环境下 LECs 抗氧化应激能力的影响

及其可能的作用机制, 为 DC 的发病机制及治疗靶点研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本及细胞来源 收集 2018 年 5 月至 2019 年 10 月于郑州大学第二附属医院进行超声乳化白内障摘出术的 DC 患者共 26 例 26 眼晶状体前囊膜组织标本作为 DC 组, 其中男 10 例 10 眼, 女 16 例 16 眼, 年龄 61~82 岁, 平均 (70.35±4.56) 岁; 同时收集郑州大学第二附属医院健康供体 26 例 26 眼透明晶状体前囊膜组织作为正常对照组, 其中男 11 例 11 眼, 女 15 例 15 眼, 年龄 61~84 岁, 平均 (69.73±4.49) 岁。2 个组晶状体前囊膜组织来源人群年龄和性别比例比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。永生型人 LECs HLEC-B3 细胞株 (中科院上海细胞库)。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, 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 (上海碧云天生物技术有限公司); miR-15a 抑制剂、miR-15a 对照 (上海

吉玛基因公司); Lipofectamine™ 2000、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针 (美国 Sigma 公司); Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、CCK-8 试剂盒 (杭州四季青公司); 兔抗人沉默信息调节蛋白 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 一抗 (703368)、兔抗人叉头转录因子 3a (forkhead transcription factor 3a, FOXO3a) 一抗 (PA5-104701)、兔抗人 p53 一抗 (MA5-12557)、山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG (H+L) 二抗 (A32731) (美国 Invitrogen 公司); Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒 (美国 BD 公司); 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Abcam 公司)。免疫荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 酶标仪 (美国 Biorad 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 紫外分光光度计 (德国 Eppendorf 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 晶状体前囊膜的收集 (1) DC 组晶状体前囊膜 DC 患者行超声乳化白内障摘出术过程中, 常规连续环形撕囊后, 取出直径 5.5~6.5 mm 前囊膜, 双蒸水冲洗后, 分成 2 份, 置入冻存管中于 -80 °C 保存备用。

(2) 正常对照组晶状体前囊膜 无菌条件下环形剪下完整角膜, 在手术显微镜下剪开眼球, 清除晶状体悬韧带、房水、玻璃体及黏附血液等成分, 完整取出透明晶状体, 从透明晶状体前部旁中心环形撕取前囊膜中央及周边 5.5 mm×5.5 mm 范围的前囊膜, 双蒸水分离, 清除晶状体皮质, PBS 冲洗后, 分成 2 份, 置于冻存管中于 -80 °C 保存备用。本研究经郑州大学第二附属医院伦理委员会审核批准 (批文号: ZDEFY201803160023), 研究对象均签署知情同意书。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测晶状体前囊膜组织中 miR-15a 表达 取冻存的 DC 组和正常对照组晶状体前囊膜组织各 1 份标本于液氮预冷的研钵中研磨成粉末, 加 1 ml Trizol 试剂, 参照 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA。取 2 μl 模板 cDNA 进行 PCR 扩增, U6 引物: 正向序列为 5'-GCTTAGCTTCGATCGGCTAA-3', 反向序列为 5'-GCTTAGCTAGGCCCTACCAC-3'; miR-15a 引物: 正向序列为 5'-CGTTTCGATTGCCATTACGC-3', 反向序列为 5'-GCTTTAGGCTAGCCATGCTT-3'。实验所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。扩增条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 总延伸 6 min。以 U6 为内参照, 采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法计算 miR-15a 的相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法检测晶状体前囊膜组织中 SIRT1 蛋白的表达 取剩余冻存的 DC 组和正常对照组晶状体前囊膜组织各 1 份, 剪切成小块, 称质量, 装入 1 ml 玻璃匀浆器中, 按每 20 mg 组织 100~200 μl 的比例加入蛋白裂解液, 在冰水中匀浆裂解 1 min, 14 000×g 离心 5 min, 取上清, 检测蛋白浓度。取蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔进行电泳, 并转移至 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, 加入 SIRT1 (1:500) 或 β-actin (1:800) 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入对应二抗 (1:1 000), 室温下孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入配制好的 ECL 发光液, 避光孵育 5 min, 化学发光凝胶成像仪中采集图片信息。采用 Image pro plus 6.0 软件进行条带灰度分析, 以 β-actin 为内参照, 计算 SIRT1 蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.4 HLEB-3 细胞氧化应激模型的制备 将冻存的 HLEB-3 细胞解冻、复苏, 使用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞并接种于 96 孔板中, 将细胞置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养, 每 2 天换液 1 次, 细胞融合近 80% 时, 更换为不含 FBS 的 DMEM 培养基并分别加入终浓度为 0、10、20 和 50 mmol/L 葡萄糖, 每个浓度设置 6 个复孔, 于培养箱中继续培养 24 h。光学显微镜下观察细胞形态学改变。

1.2.5 细胞转染 取对数期 HLEB-3 细胞以 2×10⁵/孔的密度接种于 6 孔板, 将细胞分为 miR-15a 对照组和 miR-15a 抑制剂组, 按照转染试剂 Lipofectamine™ 2000 说明书分别转染 miR-15a 对照和 miR-15a 抑制剂, 每组设置 6 个复孔, 转染细胞 8 h 后, 将各组细胞转移至含 50 mmol/L 葡萄糖的完全培养基继续培养。

1.2.6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 取不同浓度葡萄糖以及各转染组培养 24 h 的 HLEB-3 细胞, 胰蛋白酶消化, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 离心半径 10 cm, 2 000 r/min 离心并弃上清, 将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液中, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀, 室温条件下避光反应 15 min, 继续加入 300 μl 结合缓冲液, 上样前加入 5 μl PI, 于 1 h 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。左下象限为活细胞, 左上象限为死亡细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 细胞凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。实验独立重复 3 次。将于 50 mmol/L 葡萄糖条件下培养 24 h 的各转染组细胞, 采用上述方法检测细胞凋亡率。实验独立重复 3 次。

1.2.7 DCFH-DA 荧光探针法检测各组细胞内源性

ROS 含量 将细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,用不同浓度葡萄糖培养 24 h,吸去培养液,加入 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 荧光探针溶液,培养箱中孵育 20 min,预冷的 PBS 洗涤细胞,采用多功能酶标仪检测荧光强度值,用激光扫描共聚焦显微镜拍照,设置激发光波长为 485 nm,发射光波长为 530 nm。实验独立重复 3 次。取 50 mmol/L 葡萄糖条件下培养 24 h 的各转染组细胞,采用上述方法计算细胞内 ROS 含量。实验独立重复 3 次。

1.2.8 试剂盒检测各组细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px、GSH 活性及 MDA 浓度 取不同浓度葡萄糖培养 24 h 的细胞以及 50 mmol/L 葡萄糖条件下培养 24 h 的各转染组细胞,采用相应试剂盒说明书中的步骤,以铁还原法检测细胞中 T-AOC 活性,以黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性,以二硫代二硝基苯甲酸法检测 GSH-Px 和 GSH 活性,以硫代巴比妥法检测 MDA 浓度。实验独立重复 3 次。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞内 miR-15a 表达 取不同浓度葡萄糖培养 24 h 的细胞,采用 1.2.2 方法提取并计算 miR-15a 的相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.10 Western blot 法检测各组细胞内 SIRT1、FOXO3a、p53 蛋白表达 收集不同浓度葡萄糖培养 24 h 的细胞,RIPA 裂解液提取总蛋白,按照 1.2.3 方法进行 Western blot 检测,其中 SIRT1 (1:500)、FOXO3a(1:500)、p53(1:1 000)、 β -actin(1:800)一抗 4°C 孵育过夜,二抗(1:1 000)室温下孵育 1 h。以 β -actin 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。取 50 mmol/L 葡萄糖培养 24 h 的各转染组细胞,以上述方法检测细胞内 SIRT1、FOXO3a、p53 蛋白的相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.11 miR-15a 靶基因预测及双荧光素酶报告基因分析 为了确定 miR-15a 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-15a 的潜在靶基因,其中 SIRT1 在 miR-15a 的 3'UTR 上有结合位点。将对数期细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板,以 Renilla 荧光素酶质粒(100 ng/孔)转染作为对照,用 Lipofectamine™ 2000 将荧光素酶报告载体[SIRT1-3'UTR-野生型(wild type,WT)或 SIRT1-3'UTR-突变型(mutant type,MUT)]与 miR-15a 对照和抑制剂共转染至细胞。细胞转染 24 h,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定荧光素酶活性。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据经 Levene 检验方差齐。不同浓度葡萄糖条件下细胞各检测指标差异总体比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。miR-15a 对照组和 miR-15a 抑制剂组间各检测指标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 各组晶状体前囊膜组织中 miR-15a 和 SIRT1 的表达比较

正常对照组中 miR-15a 相对表达量明显低于 DC 组,差异有统计学意义($t = 12.231, P < 0.001$)。正常对照组 SIRT1 蛋白条带灰度明显强于 DC 组,2 个组间 SIRT1 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($t = 8.964, P < 0.001$)(图 1,表 1)。

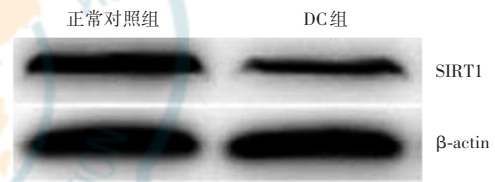


图 1 各组晶状体前囊膜组织中 SIRT1 蛋白表达电泳图 DC 组 SIRT1 蛋白条带强度较正常对照明显减弱 DC:糖尿病性白内障;SIRT1:沉默信息调节蛋白 1

Figure 1 Electropherogram of SIRT1 protein in the anterior lens capsule The SIRT1 protein band intensity was significantly weakened in DC group in comparison with normal control group DC: diabetic cataract;SIRT1:silent information regulator 1

表 1 2 个组 miR-15a 和 SIRT1 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of relative expression levels of miR-15a and SIRT1 protein between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-15a 相对表达量	SIRT1 蛋白相对表达量
正常对照组	3	0.21±0.02	0.89±0.09
DC 组	3	0.96±0.10	0.31±0.05
<i>t</i> 值		12.231	8.964
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:(独立样本 *t* 检验) miR:微小 RNA;SIRT1:沉默信息调节蛋白 1;DC:糖尿病性白内障

Note:(Independent samples *t* test) miR:microRNA;SIRT1:silent information regulator 1;DC:diabetic cataract

2.2 不同浓度葡萄糖处理细胞形态学改变

0 mmol/L 葡萄糖处理的 HLEB-3 细胞大小均一,边缘光滑,细胞贴壁紧密。随着葡萄糖浓度的增加,细胞形态变得不规则,细胞皱缩,贴壁松弛,细胞边缘呈毛刺样突起(图 2)。

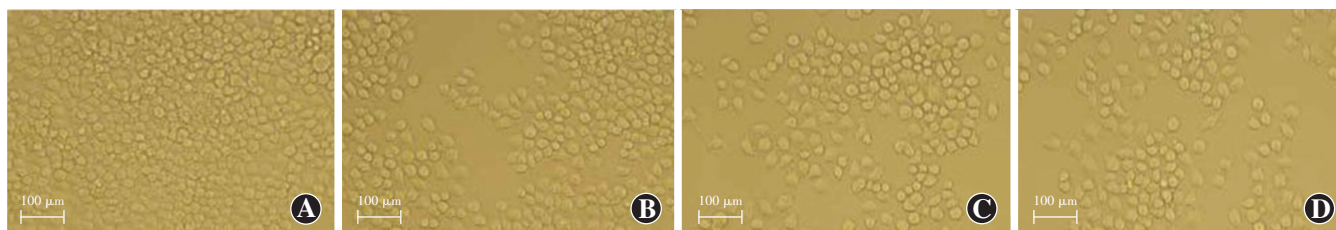


图 2 不同浓度葡萄糖处理细胞形态学观察(×200, 标尺=100 μm) 0 mmol/L 葡萄糖处理的细胞形状规则, 数量较多, 随着浓度的增加, 细胞形状发生改变, 数量减少 A:0 mmol/L B:10 mmol/L C:20 mmol/L D:50 mmol/L

Figure 2 Morphological observation of HLEB-3 cells after treatment of different concentrations of glucose (×200, bar = 100 μm) Cells treated with 0 mmol/L glucose were in regular shape and the number was large. With the increase of glucose concentration, the shape of cells changed and the number decreased A:0 mmol/L B:10 mmol/L C:20 mmol/L D:50 mmol/L

2.3 不同浓度葡萄糖处理细胞内 miR-15a 及 SIRT1、FOXO3a 和 p53 蛋白表达比较

细胞中 miR-15a 相对表达量随着葡萄糖浓度的增加而增加, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 38.904, P < 0.001$)。细胞中 FOXO3a 和 p53 蛋白条带相对灰度值随着葡萄糖浓度的增加而增强, SIRT1 蛋白条带相对灰度值随着葡萄糖浓度的增加而减弱; 各不同浓度葡萄糖条件下细胞中 FOXO3a、p53 和 SIRT1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 50.771, 67.135, 45.534, 均 P < 0.001$)。各不同浓度葡萄糖条件下细胞中 miR-15a、FOXO3a、p53 和 SIRT1 相对表达量两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 2)。

2.4 不同浓度葡萄糖处理细胞凋亡率比较

0、10、20 和 50 mmol/L 葡萄糖处理细胞的凋亡率分别为 (3.02 ± 0.47)%、(10.20 ± 0.91)%、(13.32 ± 2.01)% 和 (25.40 ± 1.46)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 13.311, P < 0.001$) ; 随着葡萄糖浓度增加, 细胞凋亡率升高, 组间比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.5 不同浓度葡萄糖处理细胞内 ROS 表达比较

0、10、20 和 50 mmol/L 葡萄糖处理细胞内源性 ROS 荧光强度分别为 42.12 ± 10.32、92.43 ± 15.65、153.65 ± 17.43 和 218.65 ± 24.83, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 11.320, P < 0.001$) ; 随着葡萄糖浓度增加, ROS 荧光强度随之增强, 组间比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

2.6 不同浓度葡萄糖处理细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较

不同浓度葡萄糖处理细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度总体比较差异均有统计学意义 ($F = 178.410、$

182.238、133.766、191.744, 均 $P < 0.001$) ; 随着葡萄糖浓度增加, 细胞产生 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性下降, MDA 浓度升高, 组间比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

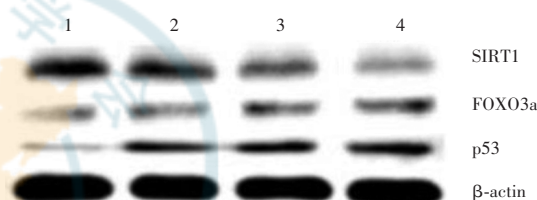


图 3 各组不同浓度葡萄糖处理细胞中 SIRT1、FOXO3a 和 p53 表达电泳图 随着葡萄糖浓度升高, 细胞中 FOXO3a 和 p53 蛋白条带逐渐增强, SIRT1 蛋白条带逐渐减弱 SIRT1: 沉默信息调节蛋白 1; FOXO3a: 叉头转录因子 3a 1:0 mmol/L 葡萄糖; 2:10 mmol/L 葡萄糖; 3:20 mmol/L 葡萄糖; 4:50 mmol/L 葡萄糖

Figure 3 Electropherogram of SIRT1, FOXO3a and p53 proteins in cells treated with different concentrations of glucose With the increase of glucose concentration, the intensity of FOXO3a and p53 protein bands increased, and the intensity of SIRT1 protein band decreased SIRT1: silent information regulator 1; FOXO3a: forkhead transcription factor 3a 1: 0 mmol/L glucose; 2: 10 mmol/L glucose; 3: 20 mmol/L glucose; 4: 50 mmol/L glucose

表 2 不同浓度葡萄糖处理细胞中 miR-15a、SIRT1、FOXO3a 和 p53 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expression levels of miR-15a, SIRT1, FOXO3a and p53 proteins in HLEB-3 cells after treatment of different concentrations of glucose ($\bar{x} \pm s$)

葡萄糖浓度	样本量	miR-15a 相对表达量	SIRT1 蛋白 相对表达量	FOXO3a 蛋白 相对表达量	p53 蛋白 相对表达量
0 mmol/L	3	0.21 ± 0.05	0.89 ± 0.12	0.18 ± 0.04	0.10 ± 0.02
10 mmol/L	3	0.43 ± 0.07 ^a	0.65 ± 0.08 ^a	0.32 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.03 ^a
20 mmol/L	3	0.62 ± 0.04 ^{ab}	0.41 ± 0.06 ^{ab}	0.51 ± 0.08 ^{ab}	0.46 ± 0.05 ^{ab}
50 mmol/L	3	0.82 ± 0.11 ^{abc}	0.17 ± 0.03 ^{abc}	0.66 ± 0.04 ^{abc}	0.57 ± 0.06 ^{abc}
F 值		38.904	45.534	50.771	67.135
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 0 mmol/L 葡萄糖比较, ^a $P < 0.05$; 与 10 mmol/L 葡萄糖比较, ^b $P < 0.05$; 与 20 mmol/L 葡萄糖比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) miR: 微小 RNA; SIRT1: 沉默信息调节蛋白 1; FOXO3a: 叉头转录因子 3a

Note: Compared with 0 mmol/L glucose, ^a $P < 0.05$; compared with 10 mmol/L glucose, ^b $P < 0.05$; compared with 20 mmol/L glucose, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miR: microRNA; SIRT1: silent information regulator 1; FOXO3a: forkhead transcription factor 3a

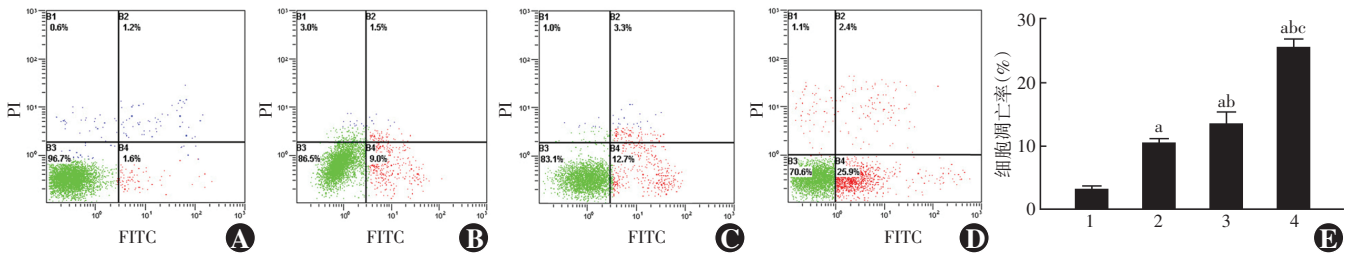


图 4 不同浓度葡萄糖处理细胞凋亡率比较 A~D:0、10、20、50 mmol/L 葡萄糖处理细胞流式细胞图 (FITC/PI) E:细胞凋亡率量化比较 细胞凋亡率随着葡萄糖浓度的增加而升高 与 0 mmol/L 葡萄糖比较,^a*P*<0.05;与 10 mmol/L 葡萄糖比较,^b*P*<0.05;与 20 mmol/L 葡萄糖比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验,*n*=3) 1:0 mmol/L 葡萄糖;2:10 mmol/L 葡萄糖;3:20 mmol/L 葡萄糖;4:50 mmol/L 葡萄糖

Figure 4 Comparison of apoptosis of HLEB-3 cells treated with different concentrations of glucose A~D:Flow cytometry of cells treated with 0,10,20,50 mmol/L glucose (FITC/PI) E:Quantitative comparison of apoptosis rates Apoptosis rate was enhanced with increasing glucose concentration Compared with 0 mmol/L glucose,^a*P*<0.05; compared with 10 mmol/L glucose,^b*P*<0.05; compared with 20 mmol/L glucose,^c*P*<0.05 (One-way ANOVA,LSD-*t* test,*n*=3) 1:0 mmol/L glucose;2:10 mmol/L glucose;3:20 mmol/L glucose;4:50 mmol/L glucose

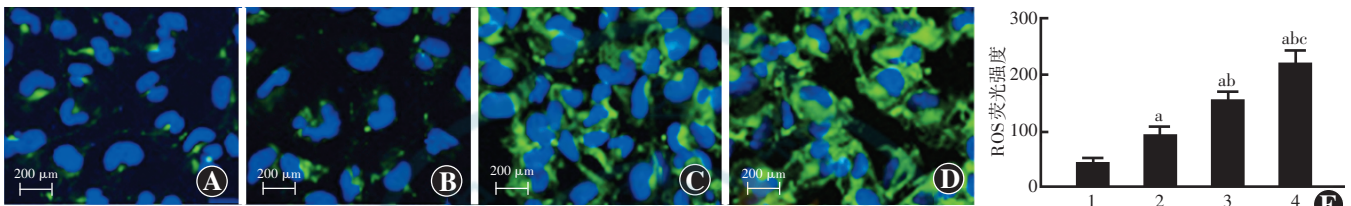


图 5 不同浓度葡萄糖处理细胞内 ROS 表达比较 A~D:0、10、20、50 mmol/L 葡萄糖处理细胞荧光染色图 (DCFH-DA ×400, 标尺 = 200 μm) 随着葡萄糖浓度的增加,ROS 荧光强度随之增强 E:不同浓度葡萄糖处理细胞 ROS 荧光强度量化比较 与 0 mmol/L 葡萄糖比较,^a*P*<0.05;与 10 mmol/L 葡萄糖比较,^b*P*<0.05;与 20 mmol/L 葡萄糖比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验,*n*=3) ROS:活性氧簇 1:0 mmol/L 葡萄糖;2:10 mmol/L 葡萄糖;3:20 mmol/L 葡萄糖;4:50 mmol/L 葡萄糖

Figure 5 Comparison of ROS expression in HLEB-3 cells after treatment of different concentrations of glucose by DCFH-DA A~D:DCFH-DA staining of HLEB-3 cells treated with 0,10,20,50 mmol/L glucose (×400, bar = 200 μm) The ROS fluorescence was enhanced as the glucose concentration increased E:Quantitative comparison of ROS fluorescence intensity Compared with 0 mmol/L glucose group,^a*P*<0.05; compared with 10 mmol/L glucose group,^b*P*<0.05; compared with 20 mmol/L glucose group,^c*P*<0.05 (One-way ANOVA,LSD-*t* test,*n*=3) ROS: reactive oxygen species 1:0 mmol/L glucose;2:10 mmol/L glucose;3:20 mmol/L glucose;4:50 mmol/L glucose

表 3 不同浓度葡萄糖处理细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of T-AOC,SOD,GSH-Px activities and MDA concentration in HLEB-3 cells after treatment of different concentrations of glucose ($\bar{x}\pm s$)

葡萄糖浓度	样本量	T-AOC 活性值 [mol/(min·L)]	SOD 活性值 [mol/(min·L)]	GSH-Px 活性值 [mol/(min·L)]	MDA 浓度 (μmol/L)
0 mmol/L	3	8.01±0.52	87.32±4.21	173.10±7.92	32.13±1.03
10 mmol/L	3	5.32±0.39 ^a	65.34±3.11 ^a	128.34±8.03 ^a	44.92±2.01 ^a
20 mmol/L	3	3.22±0.41 ^{ab}	53.02±2.97 ^{ab}	102.31±4.22 ^{ab}	58.31±3.10 ^{ab}
50 mmol/L	3	1.03±0.08 ^{abc}	24.66±2.96 ^{abc}	73.66±3.86 ^{abc}	75.65±2.65 ^{abc}
<i>F</i> 值		178.410	182.238	133.766	191.744
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 0 mmol/L 葡萄糖比较,^a*P*<0.05;与 10 mmol/L 葡萄糖比较,^b*P*<0.05;与 20 mmol/L 葡萄糖比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) 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 0 mmol/L glucose,^a*P*<0.05; compared with 10 mmol/L glucose,^b*P*<0.05; compared with 20 mmol/L glucose,^c*P*<0.05 (One-way ANOVA,LSD-*t* test) T-AOC:total-antioxidative capability;SOD:superoxide dismutase;GSH-Px: glutathione peroxidase;MDA:malondialdehyde

2.7 各转染组转染效率比较

细胞荧光图显示,miR-15a 抑制物组和 miR-15a 对照组细胞均呈明显绿色荧光,转染成功,转染率分别为 90.7%和 93.5%(图 6)。

2.8 不同转染组细胞凋亡率比较

miR-15a 对照组细胞凋亡率为 (35.22±2.04)% ,明显低于 miR-15a 抑制剂组的 (17.3±1.05)% ,差异有统计学意义(*t*=10.320,*P*<0.001)(图 7)。

2.9 不同转染组细胞 ROS 表达比较

miR-15a 抑制剂组细胞 ROS 荧光强度为 63.22±7.31,低于 miR-15a 对照组的 135.31±12.33,差异有统计学意义(*t*=14.422,*P*<0.001)(图 8)。

2.10 不同转染组细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较

miR-15a 对照组细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性显著低于 miR-15a 抑制剂组,差异有统计学意义(*t*=

10.155、12.616、12.874,均 $P < 0.001$),MDA 浓度显著高于 miR-15a 抑制剂组,差异有统计学意义 ($t = 14.631, P < 0.001$) (表 4)。

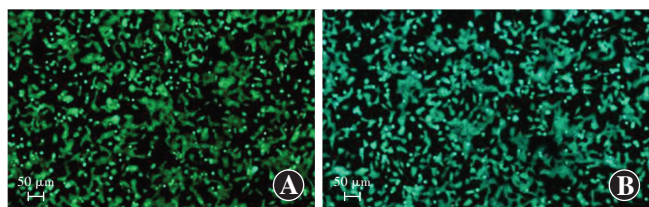


图 6 miR-15a 抑制剂组和 miR-15a 对照组细胞转染荧光图 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) 各组细胞均呈明显绿色荧光,转染成功率高 A:miR-15a 对照组 B:miR-15a 抑制剂组

Figure 6 Transfection fluorescence of miR-15a inhibitor group and miR-15a NC transfection group ($\times 200$, bar = 50 μm) Cells in both groups showed green fluorescence with high transfection rate A:miR-15a control group B:miR-15a inhibitor group

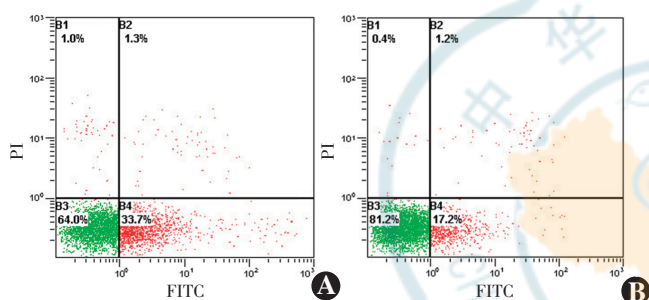


图 7 不同转染组流式细胞图 (FITC/PI) miR-15a 对照组细胞凋亡率较 miR-15a 抑制剂组明显降低 A:miR-15a 对照组 B:miR-15a 抑制剂组

Figure 7 Flow cytometry of HLEB-3 cells in two transfection groups (FITC/PI) The apoptosis rate of miR-15a control group was significantly lower than that of miR-15a inhibitor group A:miR-15a control group B:miR-15a inhibitor group

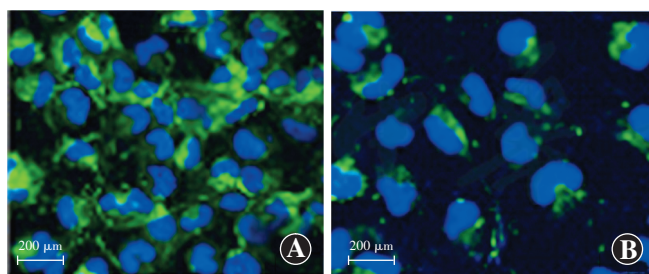


图 8 不同转染组细胞内 ROS 荧光染色图 (DCFH-DA $\times 400$, 标尺 = 200 μm) miR-15a 抑制剂组细胞 ROS 荧光微弱,miR-15a 对照组细胞 ROS 荧光较强.DCFH-DA 染色呈绿色荧光,细胞核染色呈蓝色荧光 (DAPI) A:miR-15a 对照组 B:miR-15a 抑制剂组

Figure 8 Fluorescence staining of ROS expression in cells of two transfection groups (DCFH-DA $\times 400$, bar = 200 μm) The ROS fluorescence was weak in miR-15a inhibitor group and strong in miR-15a control group. DCFH-DA staining showed green fluorescence, and nuclei were in blue fluorescence (DAPI) A:miR-15a control group B:miR-15a inhibitor group

2.11 miR-15a 靶基因预测

miR-15a 靶基因预测发现,miR-15a 与 SIRT1 保守位点有高分结合, SIRT1 为 miR-15a 的一个潜在作

用靶点 (图 9)。双荧光素酶报告系统结果显示,miR-15a 对照组 SIRT1-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性明显低于 miR-15a 抑制剂组,差异有统计学意义 ($t = 5.978, P = 0.004$),2 个组 SIRT1-3'-UTR-MUT 报告基因的荧光素酶活性差异无统计学意义 ($t = 0.432, P = 0.688$) (表 5)。

表 4 各转染组细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性和 MDA 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of T-AOC, SOD, GSH-Px activities and MDA concentration of cells between two transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	T-AOC 活性值 [mol/(min · L)]	SOD 活性值 [mol/(min · L)]	GSH-Px 活性值 [mol/(min · L)]	MDA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
miR-15a 对照组	3	4.04 ± 0.48	51.32 ± 2.66	94.44 ± 3.53	64.76 ± 3.66
miR-15a 抑制剂组	3	8.32 ± 0.55	86.43 ± 4.02	158.96 ± 7.93	32.17 ± 1.22
t 值		10.155	12.616	12.874	14.631
P 值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:(独立样本 t 检验) 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:(Independent samples t test) T-AOC:total-antioxidative capability; SOD: superoxide dismutase; GSH-Px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; miR: microRNA

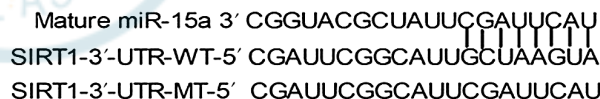


图 9 miR-15a 靶基因预测 生物信息软件检测 miR-15a 与 SIRT1 存在潜在结合位点 miR:微小 RNA;SIRT1:沉默信息调节蛋白 1; UTR:非翻译区;WT:野生型;MT:突变型

Figure 9 miR-15a target gene prediction Bioinformatics software detects potential binding sites of miR-15a and SIRT1 miR:microRNA; SIRT1:silent information regulator 1; UTR: untranslated region; WT:wild type; MT:mutant type

表 5 miR-15a 靶基因预测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of target gene prediction of miR-15a ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SIRT1-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性比值	SIRT1-3'-UTR-MUT 报告基因的荧光素酶活性比值
miR-15a 对照组	3	0.52 ± 0.07	1.38 ± 0.09
miR-15a 抑制剂组	3	0.97 ± 0.11	1.41 ± 0.07
t 值		5.978	0.432
P 值		0.004	0.688

注:(独立样本 t 检验) miR:微小 RNA;SIRT1:沉默信息调节蛋白 1; UTR:非翻译区;WT:野生型;MUT:突变型

Note:(Independent samples t test) miR: microRNA; SIRT1: silent information regulator 1; UTR: untranslated region; WT: wild type; MUT:mutant type

2.12 不同转染组 HLEB-3 细胞 SIRT1、FOXO3a 和 p53 蛋白表达比较

miR-15a 对照组细胞内 SIRT1 蛋白条带相对灰度弱于 miR-15a 抑制剂组, FOXO3a 和 p53 蛋白条带相对灰度值均强于 miR-15a 抑制剂组, 各组间 SIRT1、FOXO3a、p53 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($t=17.134, 4.193, 6.792$, 均 $P<0.001$) (表 6, 图 10)。

表 6 各转染组细胞 SIRT1、FOXO3a、p53 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression levels of SIRT1, FOXO3a and p53 proteins between two transfection groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	SIRT1 蛋白	FOXO3a 蛋白	p53 蛋白
miR-15a 对照组	3	0.31±0.06	0.62±0.08	0.83±0.15
miR-15a 抑制剂组	3	0.74±0.11	0.31±0.10	0.21±0.05
<i>t</i> 值		17.134	4.193	6.792
<i>P</i> 值		<0.001	0.014	0.001

注: (独立样本 *t* 检验) SIRT1: 沉默信息调节蛋白 1; FOXO3a: 叉头转录因子 3a; miR: 微小 RNA

Note: (Independent samples *t* test) SIRT1: silent information regulator 1; FOXO3a: forkhead transcription factor 3a; miR: microRNA

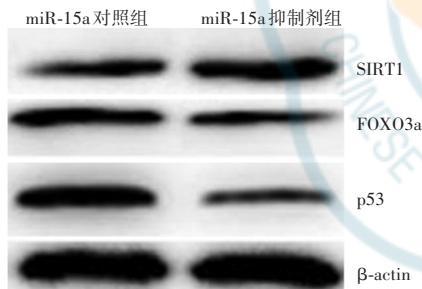


图 10 各转染组细胞 SIRT1、FOXO3a、p53 蛋白表达电泳图
miR-15a 对照组细胞内 SIRT1 蛋白条带强度较 miR-15a 抑制剂组弱, FOXO3a 和 p53 蛋白条带强度较 miR-15a 抑制剂组强 miR: 微小 RNA; SIRT1: 沉默信息调节蛋白 1; FOXO3a: 叉头转录因子 3a

Figure 10 Electrophoretogram of SIRT1, FOXO3a and p53 proteins in cells The SIRT1 protein band intensity was weaker, and the intensity of FOXO3a and p53 protein bands was stronger in miR-15a control group than miR-15a inhibitor group miR: microRNA; SIRT1: silent information regulator 1; FOXO3a: forkhead transcription factor 3a

3 讨论

近年来, miRNA 在白内障发生和发展中的作用越来越受到关注。miR-15a 是近年来广泛研究的 miRNA, 对视网膜病变和白内障的发生有调控作用。石佳等^[10]研究发现, miR-15a 通过炎症反应和血管生成双重调节作用参与糖尿病视网膜病变的发生。Li 等^[11]研究发现, hsa-miR-15a 在正常 LECs 中的表达低于年龄相关性白内障患者 LECs。Liu 等^[12]研究发现, miR-15a 能影响 LECs 的增生、凋亡和迁移能力。本研究也发现, miR-15a 在 DC 患者晶状体前囊膜内的表达

高于正常晶状体前囊膜, HLEB-3 细胞内 miR-15a 表达量随着葡萄糖浓度的升高而增加, 结合文献推测 miR-15a 可能参与了白内障的发病过程。

高糖环境诱导的 LECs 发生氧化应激反应是 DC 患者晶状体混浊的原因之一^[13]。LECs 内产生大量 ROS, 同时抗氧化酶失活, 细胞内氧化代谢产物堆积导致细胞毒性损伤, 造成细胞凋亡^[14-15]。本研究采用不同浓度的葡萄糖处理 HLEB-3 细胞, 结果显示随着葡萄糖浓度增加, 细胞凋亡率升高, 同时 ROS 活性、MDA 浓度增加, 而 SOD、CAT、GSH-Px 活性下降。

miR-15a 被证实不同疾病的氧化应激过程中发挥作用。Kamalden 等^[16]研究发现, miR-15a 通过诱导氧化应激损伤加重糖尿病病情; Cao 等^[17]研究证实, miR-15a 可能对高氧诱导的肺氧化应激损伤有调节作用。本研究发现, miR-15a 抑制剂组 HLEB-3 细胞的凋亡率明显低于 miR-15a 对照组, 细胞 ROS 活性、MDA 浓度明显低于 miR-15a 对照组, 而 SOD、CAT、GSH-Px 的活性明显高于 miR-15a 对照组, 以上结果提示, miR-15a 可能是通过抑制 HLEB-3 细胞的抗氧化应激能力诱导细胞凋亡, 继而加重 DC 患者的病情。

SIRT1 能通过组蛋白脱乙酰化作用调节下游 p53、FOXO 等转录因子的活性, 减轻内皮细胞线粒体损伤, 减缓内皮细胞氧化应激损伤^[18-19]。Zeng 等^[20]研究证实, SIRT1 在 DC 小鼠 LECs 中表达下调; 刘鹤楠等^[21]研究发现 SIRT1 在糖尿病大鼠视网膜中表达下调, 且随着糖尿病病程延长, 其表达量逐渐减少。FOXO3a 是 FOX 家族成员, 是 SIRT1 的非组蛋白底物, SIRT1 可使 FOXO3a 去乙酰化, 激活 FOXO3a 的转录活性并增加其下游靶标的表达, 从而调节细胞增生、凋亡和抗氧化能力, 最终保护细胞免受氧化应激损伤^[22]。有研究证实, 高糖处理的 LECs 中 FOXO3a 蛋白表达量以剂量和时间依赖性方式升高, FOXO3a 可以作为高血糖条件下人 LECs 氧化应激的生物标志物^[23]。p53 是 SIRT1 另一个重要的下游底物, 正常情况下, p53 处于休眠状态, 当细胞处于氧化应激损伤状态, p53 被激活, 刺激下游靶基因的转录, 进而诱导细胞凋亡; 而 SIRT1 能通过 p53 去乙酰化减少其介导的转录激活, 从而抑制细胞凋亡^[24]。本研究也发现, 随着氧化应激模型中 SIRT1 表达降低, FOXO3a 和 p53 表达升高。为了进一步探讨 miR-15a 调控 LECs 氧化应激损伤的作用机制, 本研究采用 miRanda、TargetScan 数据库筛选 SIRT1 下游靶向蛋白, 发现 SIRT1 为 miR-15a 的一个潜在作用靶点; miR-15a 抑制剂组 HLEB-3 细胞的 SIRT1 蛋白表达明显强于 miR-15a 对照组, FOXO3a 和

p53 的表达明显弱于 miR-15a 对照组。以上结果说明在 HLEB-3 细胞中, miR-15a 通过靶向抑制 SIRT1 的转录, 继而上调其下游 FOXO3a 和 p53 的表达, 导致 HLEB-3 细胞抗氧化能力的减弱。

综上所述, 本研究结果表明 miR-15a 能抑制高糖诱导下 LECs 的抗氧化应激损伤能力, 这种作用可能是通过抑制 SIRT1 表达, 从而上调下游底物 FOXO3a 和 p53 活性, 加重细胞凋亡而实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 南安超: 实验设计和实施、文章撰写; 南建茹、刘亚东: 采集和分析数据; 刘向玲: 文章校对及修改

参考文献

- [1] 许明林, 丁雨溪, 马立威, 等. 糖尿病患者超声乳化白内障摘除联合人工晶状体植入术后角膜内皮细胞的早期变化[J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(12): 1133-1135. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2020.12.016.
- [2] Xu ML, Ding YX, Ma LW, et al. Early changes in corneal endothelial cells after phacoemulsification and intraocular lens implantation in diabetic patients[J]. J China Med Univ, 2020, 49(12): 1133-1135. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2020.12.016.
- [3] Liu X, Zhao X, Cheng R, et al. Autophagy attenuates high glucose-induced oxidative injury to lens epithelial cells[J/OL]. Biosci Rep, 2020, 40(4): BSR20193006[2021-05-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32186721. DOI: 10.1042/BSR20193006.
- [4] Yang H, Cui Y, Tang Y, et al. Cytoprotective role of humanin in lens epithelial cell oxidative stress-induced injury[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2): 1467-1479. DOI: 10.3892/mmr.2020.11202.
- [5] Hsueh YJ, Meir YJ, Yeh LK, et al. Topical ascorbic acid ameliorates oxidative stress-induced corneal endothelial damage via suppression of apoptosis and autophagic flux blockage[J/OL]. Cells, 2020, 9(4): 943[2021-05-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32290365. DOI: 10.3390/cells9040943.
- [6] Tyc KM, Wong A, Scott RT Jr, et al. Analysis of DNA variants in miRNAs and miRNA 3'UTR binding sites in female infertility patients[J]. Lab Invest, 2021, 101(4): 503-512. DOI: 10.1038/s41374-020-00498-x.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Shen Q, Zhou T. Knockdown of lncRNA TUG1 protects lens epithelial cells from oxidative stress-induced injury by regulating miR-196a-5p expression in age-related cataracts[J/OL]. Exp Ther Med, 2021, 22(5): 1286[2021-09-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34630641. DOI: 10.3892/etm.2021.10721.
- [10] Abdullah OA, El Gazzar WB, Salem TI, et al. miR-15a: a potential diagnostic biomarker and a candidate for non-operative therapeutic modality for age-related cataract[J]. Br J Biomed Sci, 2019, 76(4): 184-189. DOI: 10.1080/09674845.2019.1639337.
- [11] Cho H, Hwang M, Hong EH, et al. Micro-RNAs in the aqueous humour of patients with diabetic macular oedema[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2020, 48(5): 624-635. DOI: 10.1111/ceo.13750.
- [12] 石佳, 唐晨, 吕红彬. miR-15a 对糖尿病性视网膜病变抗炎和抗新生血管生成的双重调节作用[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2017, 46(4): 443-448. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2017.04.014.
- [13] Shi J, Tang C, Lv HB. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of miR-15a on diabetic retinopathy[J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2017, 46(4): 443-448. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2017.04.014.
- [14] Li Y, Liu S, Zhang F, et al. Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(2): 2405-2410.
- [15] Liu SJ, Wang WT, Zhang FL, et al. miR-15a-3p affects the proliferation, migration and apoptosis of lens epithelial cells[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 1110-1116. DOI: 10.3892/mmr.2018.9738.
- [16] 谢丹丹, 杜珊珊, 祁颖, 等. 核心蛋白多糖对高糖条件下人晶状体上皮细胞凋亡的抑制作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(4): 252-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.003.
- [17] Xie DD, Du SS, Qi Y, et al. The inhibitory effect of decorin on apoptosis of human lens epithelial cells under high glucose condition and its mechanism[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(4): 252-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.003.
- [18] Brennan L, Khoury J, Kantorow M. Parkin elimination of mitochondria is important for maintenance of lens epithelial cell ROS levels and survival upon oxidative stress exposure[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(1): 21-32. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.09.020.
- [19] Bahia S, Blais E, Murugkar S, et al. Oxidative and nitrate stress-related changes in human lens epithelial cells following exposure to X-rays[J]. Int J Radiat Biol, 2018, 94(4): 366-373. DOI: 10.1080/09553002.2018.1439194.
- [20] Kamalden TA, Macgregor-Das AM, Kannan SM, et al. Exosomal microRNA-15a transfer from the pancreas augments diabetic complications by inducing oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 27(13): 913-930. DOI: 10.1089/ars.2016.6844.
- [21] Cao Y, Zhang D, Moon HG, et al. miR-15a/16 regulates apoptosis of lung epithelial cells after oxidative stress[J]. Mol Med, 2016, 22: 233-243. DOI: 10.2119/molmed.2015.00136.
- [22] Ma F, Wu J, Jiang Z, et al. P53/NRF2 mediates SIRT1's protective effect on diabetic nephropathy[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(8): 1272-1281. DOI: 10.1016/j.bbamer.2019.04.006.
- [23] Maiese K. Targeting the core of neurodegeneration: FoxO, mTOR, and SIRT1[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(3): 448-455. DOI: 10.4103/1673-5374.291382.
- [24] 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[2021-08-28]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28679650. DOI: 10.1042/BSR20170695.
- [25] 刘鹤南, 陈晓隆, 吴娜. 糖尿病视网膜病变患者血清微核糖核酸表达谱的初步研究[J]. 中华眼科医学杂志: 电子版, 2019, 9(4): 246-251. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2019.04.009.
- [26] Liu HN, Chen XL, Wu N. Preliminary study on serum microRNA expression profile in patients with diabetic retinopathy[J]. Chin J Ophthalmol Med (Electronic Edition), 2019, 9(4): 246-251. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2019.04.009.
- [27] Chen H, Hu X, Yang R, et al. SIRT1/FOXO3a axis plays an important role in the prevention of mandibular bone loss induced by 1, 25(OH)₂D deficiency[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2712-2726. DOI: 10.7150/ijbs.48169.
- [28] Raju I, Kannan K, Abraham EC. FOXO3a serves as a biomarker of oxidative stress in human lens epithelial cells under conditions of hyperglycemia[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6): e67126[2021-08-28]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805295. DOI: 10.1371/journal.pone.0067126.
- [29] Xu K, Wu S, Li Z, et al. Expression of SIRT1 and P53 in rat lens epithelial cells in experimentally induced DM[J]. Curr Eye Res, 2018, 43(4): 493-498. DOI: 10.1080/02713683.2017.1410178.

(收稿日期: 2021-09-20 修回日期: 2022-03-31)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

