

## · 实验研究 ·

## siRNA-KCNQ1OT1 对人 LECs 凋亡的抑制作用及其靶向 miR-199a-5p 机制

鲁诚<sup>1</sup> 张凤妍<sup>2</sup> 张宇航<sup>2</sup> 张佳娟<sup>1</sup><sup>1</sup>新乡市第一人民医院眼科, 新乡 453000; <sup>2</sup>郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450000

通信作者: 张凤妍, Email: zfy19640717@163.com

**【摘要】** **目的** 探讨长链非编码 RNA KCNQ1 重叠转录物 1 (KCNQ1OT1) 对人晶状体上皮细胞 (LECs) 凋亡的影响及其机制。 **方法** 收集 2018 年 12 月至 2019 年 8 月在新乡市第一人民医院行白内障手术的 23 例年龄相关性白内障患者的晶状体前囊膜组织, 同时收集 20 例正常供体眼晶状体前囊膜组织。采用实时荧光定量 PCR 法检测并比较不同人群晶状体前囊膜组织中 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p mRNA 表达水平。体外培养人 LECs (SRA01/04), 将细胞分为空白对照组、模型对照组、小干扰 RNA-阴性对照 (siR-NC) 组、siR-KCNQ1OT1 组、miR-NC 组、miR-199a-5p 组、siR-KCNQ1OT1+anti-miR-NC 组和 siR-KCNQ1OT1+anti-miR-199a-5p 组, 其中空白对照组不做任何处理, 模型对照组采用 100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 培养细胞 24 h 制作氧化应激损伤模型, 其余各组分别采用相应转染试剂按照脂质体法转染 6 h 后换用 100%  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理细胞 24 h。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组晶状体前囊膜组织和各组 LECs 细胞中 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p 表达水平; 采用 MTT 法检测各组细胞活力值; 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 采用 Western blot 法检测各组 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (bcl-2) 和 bcl-2 相关 X 蛋白 (bax) 表达水平; 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测各组细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量; 采用双荧光素酶报告实验检测 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p 的关系。 **结果** 年龄相关性白内障患者前囊膜内 KCNQ1OT1 相对表达量为  $2.41 \pm 0.42$ , 明显高于正常人的  $0.97 \pm 0.19$ , 差异有统计学意义 ( $t = 14.112, P < 0.001$ ); miR-199a-5p 相对表达量为  $0.36 \pm 0.12$ , 明显低于正常人的  $1.04 \pm 0.15$ , 差异有统计学意义 ( $t = 16.507, P < 0.001$ )。与空白对照组比较, 模型对照组中 KCNQ1OT1 和 bax 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 含量明显增加, miR-199a-5p 和 bcl-2 蛋白相对表达量、细胞活力值、SOD 活性值明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ); 与 siR-NC 组比较, siR-KCNQ1OT1 组细胞中 KCNQ1OT1 和 bax 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 含量降低, bcl-2 蛋白相对表达量、细胞生存率、SOD 活性值增加, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。与 miR-NC 组比较, miR-199a-5p 组 KCNQ1OT1-WT 荧光素酶活性显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 21.131, P < 0.001$ ); 与 miR-NC 组相比, miR-199a-5p 组 miR-199a-5p 和 bcl-2 蛋白相对表达量、细胞生存率、SOD 活性值明显升高, bax 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 含量显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。siR-KCNQ1OT1+anti-miR-199a-5p 组 miR-199a-5p 和 bcl-2 蛋白相对表达量、细胞生存率、SOD 活性值明显低于 siR-KCNQ1OT1+anti-miR-NC 组, 细胞凋亡率、bax 蛋白相对表达量和 MDA 含量显著高于 siR-KCNQ1OT1+anti-miR-NC 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。 **结论** 抑制 KCNQ1OT1 能够增强人 LECs 活力, 抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞凋亡和氧化应激反应, 其作用机制可能与上调 miR-199a-5p 有关。

**【关键词】** KCNQ1 重叠转录物 1; 微小 RNA-199a-5p; 人晶状体上皮细胞; 凋亡; 氧化应激

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210427-00280

**Inhibitory effect of siRNA-KCNQ1OT1 on human lens epithelial cell apoptosis by targeting miR-199a-5p**Lu Cheng<sup>1</sup>, Zhang Fengyan<sup>2</sup>, Zhang Yuhang<sup>2</sup>, Zhang Jiajuan<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Xinxiang First People's Hospital, Xinxiang 453000; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Zhang Fengyan, Email: zfy19640717@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the inhibitory effect of long non-coding RNA (lncRNA) KCNQ1 overlapping transcript 1 (KCNQ1OT1) by targeting microRNA-199a-5p (miR-199a-5p) on the apoptosis of human lens epithelial cells (LECs). **Methods** The anterior lens capsule tissue of 23 age-related cataract patients who underwent cataract surgery in Xinxiang First People's Hospital from December 2018 to August 2019 was collected. At the same time, anterior lens capsules from 20 healthy donor were collected. The expressions of KCNQ1OT1 and miR-

199a-5p in the tissues were detected by real-time fluorescence PCR. Human LECs SRA01/04 cultured *in vitro* were divided into blank control group, model control group, small interfering RNA-negative control (siR-NC) group, siR-KCNQ1OT1 group, miR-NC group, miR-199a-5p group, siR-KCNQ1OT1+anti-miR-NC group and siR-KCNQ1OT1+anti-miR-199a-5p group. No intervention was administered to blank control group. Cells in model control group were cultured with 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hours to establish oxidative stress injured model, and cells in the other six groups were transfected with corresponding transfection reagents for 6 hours by liposome method according to grouping, and then treated with 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hours. The expressions of KCNQ1OT1 and miR-199a-5p in lens anterior capsule tissue and LECs cells were determined by real-time fluorescent quantitative PCR. Cell viability was detected with thiazolyl blue (MTT). Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expressions of B-cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2) and bcl-2 related X protein (Bax) proteins were assayed by Western blot. The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The targeting relationship between KCNQ1OT1 and miR-199a-5p was verified by dual luciferase reporter experiment. The study protocol was approved by an Ethics Committee of Xinxiang First People's Hospital (No. 2019-001). Written informed consent was obtained from relatives of patient. **Results** The relative expression of KCNQ1OT1 in the anterior capsule of patients with age-related cataract was  $2.41 \pm 0.42$ , which was significantly higher than  $0.97 \pm 0.19$  of normal people, and the relative expression of miR-199a-5p in the capsule of patients with age-related cataract was  $0.36 \pm 0.12$ , which was lower than  $1.04 \pm 0.15$  of normal people, and the differences were statistically significant ( $t = 14.112, 16.507$ ; both at  $P < 0.001$ ). Compared with blank control group, the relative expressions of KCNQ1OT1 and bax protein, cell apoptosis rate and MDA content were significantly increased, and the relative expressions of miR-199a-5p and bcl-2 protein, cell viability and SOD activity were significantly reduced in model control group, showing statistically significant differences (all at  $P < 0.001$ ). Compared with siR-NC group, the relative expressions of KCNQ1OT1 and bax protein, cell apoptosis rate and MDA content in cells of siR-KCNQ1OT1 group were decreased, while the relative expression of bcl-2 protein, cell survival rate and SOD activity were increased, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). Compared with miR-NC group, the KCNQ1OT1-wild type (WT) luciferase activity in miR-199a-5p group was significantly decreased, with a statistically significant difference ( $t = 21.131, P < 0.001$ ). The relative expression levels of miR-199a-5p and bcl-2 proteins, cell survival rate and SOD activity were significantly increased, and the relative expression of bax protein, cell apoptosis rate and MDA content were significantly decreased in miR-199a-5p group than those in miR-NC group, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). The relative expression levels of miR-199a-5p and bcl-2 proteins, cell survival rate and SOD activity were significantly lower, and the cell apoptosis rate, relative expression of bax protein and MDA content were significantly higher in siR-KCNQ1OT1+anti-miR-199a-5p group than those in siR-KCNQ1OT1+anti-miR-NC group, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The inhibition of KCNQ1OT1 can promote the cell viability of human LECs, inhibit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell apoptosis and oxidative stress, and the mechanism may be related to the up-regulation of miR-199a-5p.

**[Key words]** KCNQ1 overlapping transcript 1; MicroRNA-199a-5p; Human lens epithelial cells; Apoptosis; Oxidative stress

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210427-00280

白内障是严重致盲眼病,常用的治疗方法是手术治疗,寻求白内障的非手术治疗方法一直是相关研究的热点<sup>[1-3]</sup>。研究显示,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 参与细胞增生、凋亡和氧化应激过程<sup>[4-6]</sup>,如 KCNQ1 重叠转录物 1 (KCNQ1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1) 在过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 诱导的人晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 中表达量升高,其可通过靶向负调控 miR-214 抑制 LECs 凋亡<sup>[7]</sup>。微小 RNA (micro RNA, miRNA) 广泛参与多种疾病的发生和发展,包括白内障<sup>[8-9]</sup>。miR-199a-5p 在高糖诱导人 LECs 中表达

量减少,miR-199a-5p 通过负调控特异性蛋白 1 而抑制细胞的上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[10]</sup>。LECs 的 EMT 与白内障发病密切相关<sup>[11]</sup>。如何干预  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导人 LECs 的生物学行为对于白内障的防治具有重要意义。关于 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p 调控作用研究鲜有报道,在线生物信息学网站 Starbase 预测显示,KCNQ1OT1 与 miR-199a-5p 有互补结合位点,推测 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p 共同参与 LECs 的生物学功能,但二者间的相互作用及其能否对白内障的 EMT 过程产生影响尚未阐明。本研究拟探讨 KCNQ1OT1 和 miR-199a-5p 的相互作用

及其对氧化应激状态下人 LECs 增生、凋亡的影响及可能的作用机制,以期对白内障的治疗寻找新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本及细胞来源** 收集 2018 年 12 月至 2019 年 8 月在新乡市第一人民医院行白内障手术的 23 例年龄相关性白内障患者的晶状体前囊膜组织,同时收集 20 例正常供体眼晶状体前囊膜组织。本研究方案经新乡市第一人民医院伦理委员会批准[批文号:2019(001)],患者家属均签署知情同意书。人 LECs 株 SRA01/04 购于上海研生生化公司。本实验在郑州大学第一附属医院眼科学与视觉科学实验室进行。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司); $H_2O_2$ (美国 Sigma 公司);小干扰 RNA-阴性对照(small interfering RNA-negative control, siR-NC)、siRNA-KCNQ10T1、miR-NC、miR-199a-5p、抗 miR-NC、抗-miR-199a-5p(广州锐博生物科技有限公司);Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 试剂盒、Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒(日本 Toyobo 公司);MTT 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);凋亡试剂盒(上海贝博生物技术有限公司);鼠单克隆 bcl-2 抗体(12381-1-AP)、鼠单克隆 bax 抗体(50571-2-Ig)、鼠单克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(59094-1-Ig)(美国 Protein Tech 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗羊 IgG(SV0002)(武汉博士德生物工程有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物研究所);双荧光素酶活性试剂盒(美国 Promega 公司)。Multiskan<sup>TM</sup> FC Microplate Photometer 酶标仪、Attune<sup>TM</sup> NxT 流式细胞仪、Applied Biosystems PCR 仪(美国 Thermo 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** LECs(SRA01/04)解冻复苏后接种在含有质量分数 10%胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液内,在 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%  $CO_2$  恒温培养箱内进行培养,待细胞生长融合至 85%,加入胰蛋白酶消化传代培养。取第 5 代细胞用于后续实验。

**1.2.2 细胞分组及处理** 取对数生长期细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 96 孔板中,将细胞分为空白对照组、

模型对照组、siR-NC 组、siR-KCNQ10T1 组、miR-NC 组、miR-199a-5p 组、siR-KCNQ10T1+anti-miR-NC 组和 siR-KCNQ10T1+ anti-miR-199a-5p 组。空白对照组不做任何处理;模型对照组采用 100  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  培养细胞 24 h 制作氧化应激损伤模型;其余各组按照 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 试剂盒说明分别用 siR-NC、siR-KCNQ10T1、miR-NC、miR-199a-5p、siR-KCNQ10T1 + anti-miR-NC、siR-KCNQ10T1 + anti-miR-199a-5p 转染 LECs 6 h 后更换培养基,添加 100  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  继续培养 24 h。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测晶状体前囊膜组织及各组细胞中 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 表达** 取晶状体前囊膜组织及各组培养的细胞,采用 Trizol 试剂盒抽提细胞总 RNA,采用逆转录试剂盒合成 cDNA,按照荧光定量试剂盒的操作步骤进行 PCR 反应。引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。KCNQ10T1 正向引物序列:5'-GCACTCTGGGTCCTGTTCTC-3',反向引物序列:5'-CACTTCCCTGCCTCCTACAC-3';GAPDH 正向引物序列:5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3',反向引物序列:5'-TTTCTAGACGGCAGGTCAGG-3'。miR199a-5p 正向引物序列:5'-TTATTACCCAGGCAGACACCG-3',反向引物序列:5'-AGTGCGAACTGTGGCGAT-3';U6 正向引物序列:5'-CTTCGGCAGCACATATAC-3',反向引物序列:5'-GAACGCTTCACGAATTTGC-3'。反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min,95  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s;72  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;60  $^{\circ}$ C 延长 5 min。以 GAPDH 作为 KCNQ10T1 反应的内参,U6 作为 miR-199a-5p 反应的内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 相对表达量。

**1.2.4 MTT 法检测细胞活力** 将培养的各组细胞接种在 96 孔板中,细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/ml,在恒温培养箱内培养 48 h,每孔培养基中加入 20  $\mu$ l MTT,室温培养 4 h,加入 DMSO 溶液 150  $\mu$ l,结晶振荡溶解,采用酶标仪在波长为 490 nm 处检测吸光度(A)值。细胞生存率(%)=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率** 将培养的各组细胞接种在 6 孔板中,细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/ml,加入磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)制备细胞悬液,取悬液 200  $\mu$ l,加入 Annexin V-FITC 和 PI 5  $\mu$ l,避光孵育 15 min,加入 PBS 150  $\mu$ l 重悬细胞 1 h,流式细胞仪检测细胞凋亡水平。细胞凋亡率(%)=早期凋亡细胞百分率+晚期凋亡细胞百分率。

**1.2.6 Western blot 法检测细胞中 bcl-2 和 bax 蛋白**



表达 取各组培养细胞加入蛋白裂解液提取细胞总蛋白,按照 BCA 法定量蛋白。100 °C 变性 10 min,取 35 μg 上样,10% SDS-PAGE 处理蛋白样品,转膜,采用新鲜脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入 bcl-2(1:500)、bax(1:500)和 GAPDH 抗体(1:1 000),4 °C 孵育 24 h,加入 HRP 标记的 IgG 抗体(1:2 500),37 °C 孵育 2 h,加入化学发光液显影并拍照,应用 Band Scan 5.0 凝胶软件扫描分析蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

**1.2.7 ELISA 法检测各组细胞中 SOD 活性和 MDA 含量** 取各组培养细胞,离心半径 14 cm,1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞上清液,根据 SOD 试剂盒说明书步骤,将上清液稀释至 150 μl,酶标仪上检测 589 nm 处 A 值,计算细胞 SOD 活性。SOD 活性值=(对照组 A 值-实验组 A 值)×样品体积/(0.5×对照组 A 值×样品鲜重×测定样品用量)。按照 MDA 试剂盒说明书步骤,将上清液稀释至 10 μl,与待测样本混匀,离心取上清液,于酶标仪上检测 530 nm、600 nm 处 A 值,计算细胞 MDA 含量。MDA 含量=6.45×(A<sub>530</sub>-A<sub>600</sub>)-0.560。

**1.2.8 双荧光素酶报告实验检测法验证 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 的关系** 生物信息学网站预测显示,KCNQ10T1 与 miR-199a-5p 有结合互补关系,构建 KCNQ10T1 野生型载体(KCNQ10T1-WT)和突变型载体(KCNQ10T1-MUT),分别与 miR-NC 和 miR-199a-5p 转染 LECs(SRA01/04)48 h,采用双荧光素酶活性试剂盒检测荧光素酶活性。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表达,2 个组间计量资料数据比较采用独立样本 *t* 检验;多组间计量资料的数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 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 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 表达比较

与正常供体组织相比,白内障患者晶状体前囊膜组织内 KCNQ10T1 mRNA 相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $t = 14.112, P < 0.001$ );miR-199a-5p 相对表达量明显降低,差异有统计学意义( $t = 16.507, P < 0.001$ )(表 1)。

### 2.2 模型对照组与空白对照组细胞中 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 相对表达量比较

与空白对照组比较,模型对照组细胞中 KCNQ10T1 mRNA 相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $t = 15.449, P < 0.001$ );miR-199a-5p 相对表达量较空白对照组明显降低,差异有统计学意义( $t = 22.823, P < 0.001$ )(表 2)。

**表 1 正常供体和白内障患者晶状体前囊膜组织中 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 1 Comparison of the expressions of KCNQ10T1 and miR-199a-5p in lens anterior capsule between normal donor and cataract patients ( $\bar{x} \pm s$ )**

组织	样本量	KCNQ10T1	miR-199a-5p
正常供体前囊膜	20	0.97±0.19	1.04±0.15
白内障患者前囊膜	23	2.41±0.42	0.36±0.12
<i>t</i> 值		14.112	16.507
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:(独立样本 *t* 检验) KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1;miR:微小 RNA

Note:(Independent samples *t* test) KCNQ10T1:KCNQ1 overlapping transcript 1;miR:microRNA

**表 2 模型对照组与空白对照组细胞中 KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 2 Comparison of the relative expression levels of KCNQ10T1 and miR-199a-5p between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	KCNQ10T1	miR-199a-5p
空白对照组	9	1.03±0.09	0.97±0.08
模型对照组	9	2.35±0.24	0.32±0.03
<i>t</i> 值		15.449	22.823
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:(独立样本 *t* 检验) KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1;miR:微小 RNA

Note:(Independent samples *t* test) KCNQ10T1:KCNQ1 overlapping transcript 1;miR:microRNA

### 2.3 不同 siRNA 转染组 KCNQ10T1 及凋亡相关蛋白表达量比较

模型对照组、siR-NC 组细胞中 bax 蛋白表达条带强于空白对照组和 siR-KCNQ10T1 组,bcl-2 蛋白表达条带弱于模型对照组和 siR-NC 组(图 1)。空白对照组、模型对照组、siR-NC 组、siR-KCNQ10T1 组细胞中 KCNQ10T1 及 bcl-2 和 bax 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F = 96.159, 175.196, 85.656$ , 均  $P < 0.001$ ),其中与空白对照组比较,模型对照组细胞中 KCNQ10T1 和 bax 蛋白相对表达量明显升高,bcl-2 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与 siR-NC 组比较,siR-KCNQ10T1 组细胞中 KCNQ10T1 和 bax 蛋白相对表达量降低,bcl-2 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 1,表 3)。

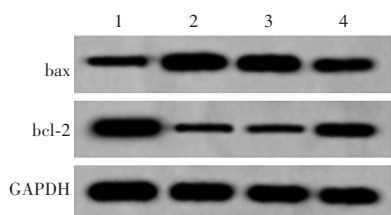


图 1 不同 siRNA 转染组凋亡相关蛋白表达电泳图 1:空白对照组;2:模型对照组;3:siR-NC 组;4:siR-KCNQ10T1 组 bax; bcl-2 相关 X 蛋白; bcl-2: B 细胞淋巴瘤/白血病-2; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 Electrophoretogram of apoptosis-related protein in different siRNA transfection groups 1:blank control group;2: model control group;3: siR-NC group;4: siR-KCNQ10T1 group bax; bcl-2 related X protein; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 3 不同 siRNA 转染组细胞中 KCNQ10T1 及凋亡相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of the relative expressions of KCNQ10T1 and apoptosis-related proteins among different siRNA transfection groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	KCNQ10T1	bcl-2	bax
空白对照组	9	0.98±0.06	0.97±0.08	0.92±0.07
模型对照组	9	2.21±0.22 <sup>a</sup>	0.41±0.03 <sup>a</sup>	1.76±0.16 <sup>a</sup>
siR-NC 组	9	2.16±0.24	0.44±0.04	1.72±0.15
siR-KCNQ10T1 组	9	1.54±0.13 <sup>b</sup>	0.67±0.07 <sup>b</sup>	1.26±0.12 <sup>b</sup>
F 值		96.159	175.196	85.656
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 siR-NC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) siRNA: 小干扰 RNA; KCNQ10T1: KCNQ1 重叠转录物 1; NC: 阴性对照; bcl-2: B 细胞淋巴瘤/白血病-2; bax: bcl-2 相关 X 蛋白

Note: Compared with blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with siR-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) siRNA: small interfering RNA; KCNQ10T1: KCNQ1 overlapping transcript 1; NC: negative control; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; bax: bcl-2 related X protein

### 2.4 不同 siRNA 转染组细胞生存率和凋亡率比较

空白对照组、模型对照组、siR-NC 组、siR-KCNQ10T1 组细胞生存率和凋亡率总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 136.460, 137.352$ , 均  $P < 0.001$ ), 其中与空白对照组比较, 模型对照组细胞生存率明显降低, 细胞凋亡率明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 siR-NC 组比较, siR-KCNQ10T1 组细胞生存率明显升高, 细胞凋亡率明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2, 表 4)。

### 2.5 不同 siRNA 转染组细胞中氧化应激相关指标比较

不同转染组细胞中 SOD 活性值和 MDA 含量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 162.758, 81.059$ , 均  $P < 0.001$ ), 其中与空白对照组相比, 模型对照组 SOD 活性值显著降低, MDA 含量显著升高, 差异均有统计学

意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 siR-NC 组比较, siR-KCNQ10T1 组 SOD 活性值显著升高, MDA 含量显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 5)。

### 2.6 KCNQ10T1 与 miR-199a-5p 的靶向关系

在线生物信息学预测结果显示, KCNQ10T1 与 miR-199a-5p 存在互补的核苷酸序列。与 miR-NC 组比较, miR-199a-5p 组的 KCNQ10T1-WT 荧光素酶活性值显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 21.131, P < 0.001$ ), 2 个组间 KCNQ10T1-MUT 荧光素酶活性值比较差异无统计学意义 ( $t = 1.302, P = 0.211$ ) (图 3, 表 6)。

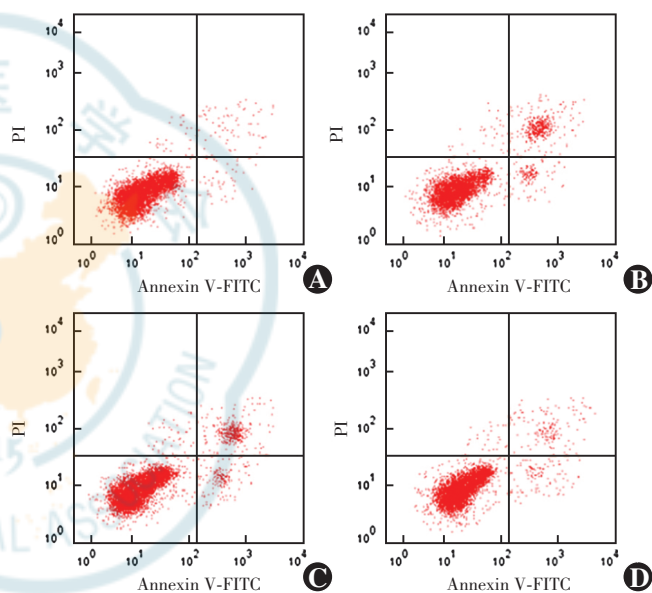


图 2 流式细胞术检测不同 siRNA 转染组细胞凋亡水平 A: 空白对照组 B: 模型对照组 C: siR-NC 组 D: siR-KCNQ10T1 组

Figure 2 Cell apoptosis analysis of different siRNA transfection groups detected by flow cytometry A: blank control group B: model control group C: siR-NC group D: siR-KCNQ10T1 group

表 4 不同 siRNA 转染组细胞生存率和凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 4 Comparison of cell survival rate and apoptosis rate among different siRNA transfection groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	细胞生存率	细胞凋亡率
空白对照组	9	98.2±9.8	9.2±0.9
模型对照组	9	42.5±4.6 <sup>a</sup>	26.5±2.9 <sup>a</sup>
siR-NC 组	9	46.7±4.2	27.2±3.1
siR-KCNQ10T1 组	9	75.1±6.7 <sup>b</sup>	15.3±1.2 <sup>b</sup>
F 值		136.460	137.352
P 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 siR-NC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) siRNA: 小干扰 RNA; NC: 阴性对照; KCNQ10T1: KCNQ1 重叠转录物 1

Note: Compared with blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with siR-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) siRNA: small interfering RNA; NC: negative control; KCNQ10T1: KCNQ1 overlapping transcript 1

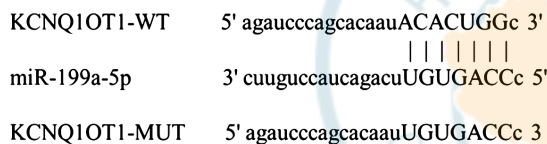
**表 5 不同 siRNA 转染组细胞中 SOD 活性值和 MDA 含量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 5 Comparison of SOD activity and MDA concentration in cells among different siRNA transfection groups ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	样本量	SOD 活性值 [mmol/(L·min)]	MDA 含量 (mmol/L)
空白对照组	9	45.4±3.9	36.7±3.5
模型对照组	9	21.4±2.2 <sup>a</sup>	65.4±5.7 <sup>a</sup>
siR-NC 组	9	18.6±1.8	68.6±6.1
siR-KCNQ10T1 组	9	32.5±3.1 <sup>b</sup>	49.2±4.0 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		162.758	81.059
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 siR-NC 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) siRNA:小干扰 RNA;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;NC:阴性对照;KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1

Note:Compared with blank control group,<sup>a</sup>*P*<0.05;compared with siR-NC group,<sup>b</sup>*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) siRNA: small interfering RNA; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; NC: negative control;KCNQ10T1:KCNQ1 overlapping transcript 1



**图 3 KCNQ10T1 与 miR-199a-5p 结合位点** KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1;WT:野生型;miR:微小 RNA;MUT:突变型

**Figure 3 The binding site of KCNQ10T1 and miR-199a-5p** KCNQ10T1: KCNQ1 overlapping transcript 1; WT: wild type; miR: microRNA; MUT: mutant type

**表 6 各组间野生型和突变型 KCNQ10T1 荧光素酶活性值比较 ( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 6 Comparison of the luciferase activity of wild-type and mutant KCNQ10T1 between two groups ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	KCNQ10T1-WT	KCNQ10T1-MUT
miR-NC 组	1.03±0.08	0.95±0.07
miR-199a-5p 组	0.40±0.04	0.99±0.06
<i>t</i> 值	21.131	1.302
<i>P</i> 值	<0.001	0.211

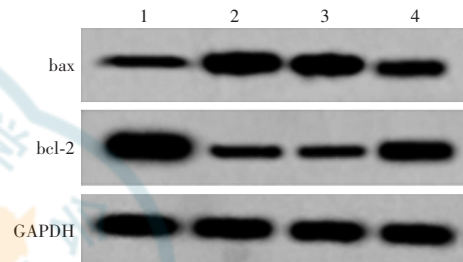
注:(独立样本 *t* 检验) KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1;WT:野生型;MUT:突变型;miR:微小 RNA;NC:阴性对照

Note:(Independent samples *t* test) KCNQ10T1:KCNQ1 overlapping transcript 1;WT:wild type;MUT:mutant type;miR:microRNA;NC:negative control

## 2.7 不同 miRNA 转染组细胞 miR-199a-5p 及凋亡相关蛋白表达量比较

模型对照组和 miR-NC 组细胞中 bax 蛋白表达条带明显强于空白对照组,bcl-2 蛋白表达条带弱于空白对照组;miR-199a-5p 组细胞中 bax 蛋白表达条带明显弱于 miR-NC 组,bcl-2 蛋白表达条带强于模型对照组

和 miR-NC 对照组(图 4)。空白对照组、模型对照组、miR-NC 组和 miR-199a-5p 组 miR-199a-5p 及 bcl-2 和 bax 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F=367.360、220.909、61.407$ ,均  $P<0.001$ ),其中与空白对照组比较,模型对照组 miR-199a-5p 和 bcl-2 蛋白相对表达量下降,bax 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );与 miR-NC 组比较,miR-199a-5p 组 miR-199a-5p 和 bcl-2 蛋白相对表达量明显升高,bax 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )(表 7)。



**图 4 不同 miRNA 转染组凋亡相关蛋白表达电泳图** 1:空白对照组;2:模型对照组;3:miR-NC 组;4:miR-199a-5p 组 bax:bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤/白血病-2;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**Figure 4 Electrophoretogram of apoptosis-related proteins in different miRNA transfection groups** 1: blank control group; 2: model control group; 3: miR-NC group; 4: miR-199a-5p group bax:bcl-2 related X Protein; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**表 7 不同 miRNA 转染组细胞中 miR-199a-5 表达及凋亡相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 7 Comparison of the expression of miR-199a-5 and the relative expression of apoptosis-related proteins among different miRNA transfection groups ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	样本量	miR-199a-5p	bcl-2	bax
空白对照组	9	0.99±0.06	0.95±0.07	0.96±0.08
模型对照组	9	0.35±0.03 <sup>a</sup>	0.42±0.03 <sup>a</sup>	1.66±0.15 <sup>a</sup>
miR-NC 组	9	0.38±0.04	0.39±0.04	1.61±0.14
miR-199a-5p 组	9	0.63±0.05 <sup>b</sup>	0.66±0.06 <sup>b</sup>	1.26±0.12 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		367.360	220.909	61.407
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与 miR-NC 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.01(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miRNA:微小 RNA;NC:阴性对照;bcl-2:B 细胞淋巴瘤/白血病-2;bax:bcl-2 相关 X 蛋白

Note:Compared with blank control group,<sup>a</sup>*P*<0.01;compared with miR-NC group,<sup>b</sup>*P*<0.01 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) miRNA: microRNA; NC: negative control; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; bax: bcl-2 related X protein

## 2.8 不同 miRNA 转染组细胞生存率和凋亡率比较

空白对照组、模型对照组、miR-NC 组和 miR-199a-5p 组细胞生存率和凋亡率总体比较差异均有统计学意义( $F=184.269、370.944$ ,均  $P<0.001$ ),其中与空白



对照组比较,模型对照组细胞生存率明显降低,细胞凋亡率明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与 miR-NC 组比较,miR-199a-5p 组细胞生存率明显升高,细胞凋亡率明显降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 5,表 8)。

2.9 不同 miRNA 转染组 SOD 活性值和 MDA 含量比较

空白对照组、模型对照组、miR-NC 组和 miR-199a-5p 组 SOD 活性值和 MDA 含量总体比较差异均有统计学意义( $F = 164.651, 66.376$ , 均  $P < 0.001$ ),其中与空白对照组比较,模型对照组 SOD 活性值明显降低,MDA 含量明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与 miR-NC 组比较,miR-199a-5p 组 SOD 活性值明显升高,MDA 含量明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 9)。

2.10 抑制 miR-199a-5p 表达后 miR-199a-5p 相对表达量、细胞生存率、凋亡和氧化应激相关指标比较

与 siR-KCNQ10T1 + anti-miR-NC 组相比,siR-KCNQ10T1+anti-miR-199a-5p 组 bax 蛋白表达条带增强,bcl-2 蛋白表达条带减弱。siR-KCNQ10T1 + anti-miR-199a-5p 组 miR-199a-5p 相对表达量、细胞生存率、bcl-2 蛋白相对表达量和 SOD 活性值明显低于 siR-KCNQ10T1+anti-miR-NC 组,细胞凋亡率、bax 蛋白相对表达量和 MDA 含量显著高于 siR-KCNQ10T1+anti-miR-NC 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 6, 7,表 10)。

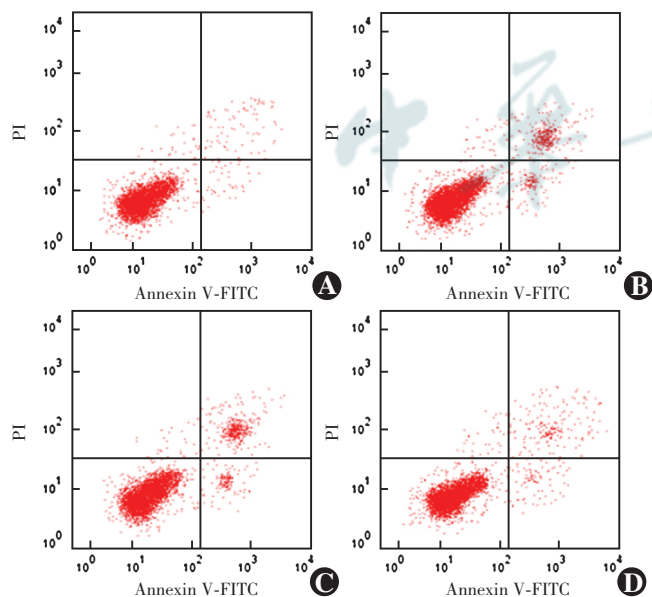


图 5 流式细胞术检测不同 miRNA 转染组细胞凋亡水平 A:空白对照组 B:模型对照组 C:miR-NC 组 D:miR-199a-5p 组

Figure 5 Cell apoptosis analysis of different miRNA transfection groups determined by flow cytometry A: blank control group B: model control group C: miR-NC group D: miR-199a-5p group

表 8 不同 miRNA 转染组细胞生存率和凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 8 Comparison of cell survival rate and apoptosis rate among different miRNA transfection groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	细胞生存率	细胞凋亡率
空白对照组	9	99.7±8.7	8.7±0.6
模型对照组	9	45.4±3.9 <sup>a</sup>	27.1±1.9 <sup>a</sup>
miR-NC 组	9	41.2±4.1	26.4±1.7
miR-199a-5p 组	9	69.5±5.8 <sup>b</sup>	14.2±1.1 <sup>b</sup>
F 值		184.269	370.944
P 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 miR-NC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miRNA:微小 RNA;NC:阴性对照

Note:Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with miR-NC group,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) miRNA:microRNA;NC:negative control

表 9 不同 miRNA 转染组细胞中 SOD 活性值和 MDA 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 9 Comparison of SOD activity and MDA concentration among different miRNA transfection groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	SOD 活性值 [mmol/(min·L)]	MDA 含量 (mmol/L)
空白对照组	9	41.2±3.4	33.4±3.1
模型对照组	9	17.2±1.8 <sup>a</sup>	61.6±5.8 <sup>a</sup>
miR-NC 组	9	20.4±2.0	58.4±5.5
miR-199a-5p 组	9	28.6±2.5 <sup>b</sup>	45.1±4.2 <sup>b</sup>
F 值		164.651	66.376
P 值		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 miR-NC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miRNA:微小 RNA;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;NC:阴性对照

Note:Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;compared with miR-NC group,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) miRNA:microRNA SOD:superoxide dismutase;MDA:malondialdehyde;NC:negative control

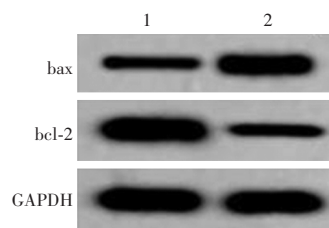


图 6 抑制 miR-199a-5p 表达后凋亡相关蛋白表达电泳图 1:siR-KCNQ10T1 + anti-miR-NC 组;2:siR-KCNQ10T1 + anti-miR-199a-5p 组 bax;bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤/白血病-2;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 6 Electrophoretogram of apoptosis-related proteins after inhibiting miR-199a-5p expression 1: siR-KCNQ10T1+anti-miR-NC group;2: siR-KCNQ10T1+anti-miR-199a-5p group bax;bcl-2 related X protein;bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

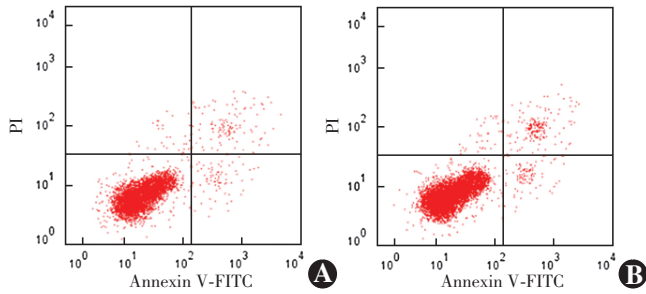


图 7 流式细胞术检测抑制 miR-199a-5p 表达后细胞凋亡水平  
A: siR-KCNQ10T1 + anti-miR-NC 组 B: siR-KCNQ10T1 + anti-miR-199a-5p 组

Figure 7 Cell apoptosis analysis after the inhibition of miR-199a-5p detected by flow cytometry A: siR-KCNQ10T1+anti-miR-NC group B: siR-KCNQ10T1+anti-miR-199a-5p group

### 3 讨论

LECs 凋亡是除先天性白内障外其他类型白内障形成的细胞分子基础,减轻 LECs 凋亡和氧化损伤是防治白内障的关键<sup>[12-14]</sup>。在体外实验中常用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、高糖和高钙等因素诱导 LECs 产生大量活性氧,促进细胞氧化损伤和凋亡<sup>[15-18]</sup>。本研究采用 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人 LECs 损伤后,细胞活力和 SOD 活性明显降低,细胞凋亡率和 MDA 含量显著升高,bcl-2 蛋白表达下调,bax 蛋白表达上调,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 损伤模型构建成功。

LncRNA 已被证实在白内障疾病中发挥着关键作用<sup>[19-21]</sup>,如肺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 在高糖诱导的人 LECs 中表达上调,MALAT1 通过激活 p38MAPK 信号通路促进高糖诱导人 LECs 凋亡和氧化应激,并抑制细胞增生<sup>[22]</sup>。Du 等<sup>[23]</sup> 研究结果显示,INK4 基因座中反义非编码 RNA (antisense noncoding RNA in the INK4 locus, ANRIL) 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱

导的人 LECs 中表达上调,ANRIL 通过靶向负调控 miR-21 促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 凋亡。KCNQ10T1 位于人染色体 11p15.5,在多种疾病中表达上调<sup>[24]</sup>,如 KCNQ10T1 在白内障组织和转化生长因子 β2 (transforming growth factor-β2, TGF-β2) 诱导的人 LECs 中表达上调,沉默 KCNQ10T1 通过调节 miR-29c-3p/FOS 轴促进 TGF-β2 诱导的人 LECs 增生和转移,并抑制细胞凋亡<sup>[25]</sup>。本研究发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人 LECs 损伤后 KCNQ10T1 表达上调,抑制 KCNQ10T1 能够增强细胞活力和 SOD 活性,降低细胞凋亡率和 MDA 含量,上调 bcl-2 蛋白表达,下调 bax 蛋白表达,表明抑制 KCNQ10T1 可以增强 LECs 活力,减缓细胞凋亡和氧化应激,这与之前的研究结果相似。有研究发现,miR-199a-5p 在高糖诱导人 LECs 中表达下调,miR-199a-5p 通过 SP1 调控细胞的 EMT 过程,但是对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 研究机制尚不明确。在线生物信息学网站预测结果显示,KCNQ10T1 和 miR-199a-5p 有互补的结合位点,并进行首次验证。

miRNA 已经成为近年在白内障研究中的热点,如 miR-34a、miR-124 和 miR-204 等已被证实与白内障相关<sup>[26-28]</sup>。Zhou 等<sup>[29]</sup> 研究显示,miR-23b-3p 在白内障组织和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 中表达上调,miRNA-23b-3p 通过靶向负调控 SIRT1 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 凋亡和自噬,这与本研究结果相反。Li 等<sup>[30]</sup> 研究显示,miR-182-5p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 中表达下调,而过表达 miR-182-5p 可增强 LECs 增生活性,并抑制细胞凋亡和氧化损伤。以上研究说明 miRNA 与白内障发展有关,但是 miR-199a-5p 与白内障的研究鲜有报道。本研究结果显示,miR-199a-5p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人 LECs 中表达下调,过表达 miR-199a-5p 可以增强细胞活力和 SOD 活性,细胞凋亡率和 MDA 含量降低,上调

表 10 抑制 miR-199a-5p 表达后各组 miR-199a-5p 相对表达量、细胞生存率、凋亡和氧化应激指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 10 Comparison of relative expression level of miR-199a-5p, cell survival rate, apoptosis and oxidative stress index between two groups after inhibiting miR-199a-5p expression ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	miR-199a-5p 相对表达量	细胞生存率 (%)	细胞凋亡率 (%)	bcl-2 蛋白 相对表达量	bax 蛋白 相对表达量	SOD 活性值 [mmol/(L·min)]	MDA 含量 (mmol/L)
siR-KCNQ10T1+ anti-miR-NC 组	9	0.93±0.07	78.2±7.2	14.4±1.6	0.72±0.07	1.32±0.14	36.7±3.4	45.2±3.8
siR-KCNQ10T1+ anti-miR-199a-5p 组	9	0.35±0.03	62.3±6.8	21.4±1.8	0.53±0.04	1.58±0.16	25.3±2.2	53.2±4.7
t 值		22.847	4.816	8.720	7.070	3.669	8.445	3.971
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001

注:(独立样本 t 检验) miR:微小 RNA;KCNQ10T1:KCNQ1 重叠转录物 1;NC:阴性对照;bcl-2:B 细胞淋巴瘤/白血病-2;bax:bcl-2 相关 X 蛋白;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛

Note: (Independent samples t test) miR: microRNA; KCNQ10T1: KCNQ1 overlapping transcript 1; NC: negative control; bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; bax: bcl-2 related X protein; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde



bcl-2 蛋白表达,下调 bax 蛋白表达。KCNQ10T1 可通过调控下游多个 miRNA 影响疾病的发生和发展,通过在线生物信息学网站预测显示,miR-199a-5p 是 KCNQ10T1 的靶标,双荧光素酶报告实验证实 KCNQ10T1 可以靶向 miR-199a-5p 的表达。进一步研究发现,抑制 miR-199a-5p 表达可部分恢复抑制 KCNQ10T1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 增生、凋亡和氧化应激的影响,说明 KCNQ10T1 通过靶向负调控 miR-199a-5p 的表达减弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人 LECs 损伤。

综上所述,本研究结果显示在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人 LECs 氧化应激损伤中 KCNQ10T1 表达上调,miR-199a-5p 表达下调,siRNA-KCNQ10T1 通过上调 miR-199a-5p 的表达增强人 LECs 的活力,并抑制细胞凋亡和氧化应激。关于 miR-199a-5p 对下游基因的调控作用以及 KCNQ10T1 与 miR-199a-5p 对信号转导途径的作用机制需要进一步研究。

**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** 鲁诚:酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草及修改文章;张凤妍:酝酿和设计实验、实施研究、对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿;张宇航:采集数据、分析/解释数据、起草文章;张佳娟:采集数据

## 参考文献

- [1] Khokhar SK, Pillay G, Dhull C, et al. Pediatric cataract [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2017, 65(12): 1340-1349. DOI: 10. 4103/ijo. IJO\_1023\_17.
- [2] Peterson SR, Silva PA, Murtha TJ, et al. Cataract surgery in patients with diabetes: management strategies [J]. *Semin Ophthalmol*, 2018, 33(1): 75-82. DOI: 10. 1080/08820538. 2017. 1353817.
- [3] 闫楚凡, 韩笑, 张劲松. 糖皮质激素对晶状体上皮细胞生物学功能调控作用的生物信息学分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(4): 297-303. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190821-00359.
- [4] Yan CF, Han X, Zhang JS. Regulatory effect of glucocorticoid on the biological function of lens epithelial cells: a bioinformatics analysis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(4): 297-303. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190821-00 359.
- [5] Cheng T, Xu M, Qin B, et al. lncRNA H19 contributes to oxidative damage repair in the early age-related cataract by regulating miR-29a/TDG axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6131-6139. DOI: 10. 1111/jcmm. 14489.
- [6] Zhang N, Zhang C, Wang X, et al. High-throughput sequencing reveals novel lincRNA in age-related cataract [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1829-1839. DOI: 10. 3892/ijmm. 2017. 3185.
- [7] Jing R, Ma B, Qi T, et al. Long noncoding RNA OIP5-AS1 promotes cell apoptosis and cataract formation by blocking POLG expression under oxidative stress [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(12): 3 [2021-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33006594/>. DOI: 10. 1167/iov. 61. 12. 3.
- [8] Jin X, Jin H, Shi Y, et al. Long non-coding RNA KCNQ10T1 promotes cataractogenesis via miR-214 and activation of the caspase-1 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1): 295-305. DOI: 10. 1159/000477330.
- [9] Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, et al. MicroRNAs as peripheral biomarkers in aging and age-related diseases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 146: 47-94. DOI: 10. 1016/bs. pmbts. 2016. 12. 013.
- [10] Ni S, Yang B, Xia L, et al. EZH2 mediates miR-146a-5p/HIF-1 $\alpha$  to alleviate inflammation and glycolysis after acute spinal cord injury [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 5591582 [2021-10-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34104112/>. DOI: 10. 1155/2021/5591582.
- [11] Liu X, Gong Q, Yang L, et al. microRNA-199a-5p regulates epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic cataract by targeting SP1 gene [J/OL]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 122 [2021-10-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33276722/>. DOI: 10. 1186/s10020-020-00250-7.
- [12] Das SJ, Wishart T, Jandeleit-Dahm K, et al. Nox4-mediated ROS production is involved, but not essential for TGF $\beta$ -induced lens EMT leading to cataract [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 192: 107918 [2021-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926131/>. DOI: 10. 1016/j. exer. 2020. 107918.
- [13] Sun W, Liu J, Li J, et al. Human lens epithelial cell apoptosis and epithelial to mesenchymal transition in femtosecond laser-assisted cataract surgery [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(3): 401-407. DOI: 10. 18240/ijo. 2018. 03. 09.
- [14] Zhou S, Yang J, Wang M, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 173-180. DOI: 10. 3892/mmr. 2019. 10814.
- [15] Zhang C, Chen M, Zhou N, et al. Metformin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence in human lens epithelial B3 cells [J/OL]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2020, 26: e923391 [2021-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336745/>. DOI: 10. 12659/MSMBR. 923391.
- [16] Shentu XC, Ping XY, Cheng YL, et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis of human lens epithelial cells is inhibited by parthenolide [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(1): 12-17. DOI: 10. 18240/ijo. 2018. 01. 03.
- [17] Li D, Liu GQ, Lu PR. High glucose: activating autophagy and affecting the biological behavior of human lens epithelial cells [J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(7): 1061-1066. DOI: 10. 18240/ijo. 2019. 07. 02.
- [18] 李翔, 张颖, 黄亚琳, 等. miR-125b 对晶状体上皮细胞的抗氧化应激作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(4): 280-288. DOI: 10. 3760/cma. j. cn 115989-20191022-00458.
- [19] Li X, Zhang Y, Huang YL, et al. Anti-oxidative stress effects of miR-125b on lens epithelial cells and its mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(4): 280-288. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20191022-00458.
- [20] 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 [2021-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32186721/>. DOI: 10. 1042/BSR20193006.
- [21] Yang J, Zhao S, Tian F. SP1-mediated lncRNA PVT1 modulates the proliferation and apoptosis of lens epithelial cells in diabetic cataract via miR-214-3p/MMP2 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 554-561. DOI: 10. 1111/jcmm. 14762.
- [22] Zhang Z, Zhu H, Liu Y, et al. LncRNA HOTAIR mediates TGF- $\beta$ 2-induced cell growth and epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(10): 1028-1037. DOI: 10. 1093/abbs/gmy101.
- [23] Wang H, Zheng G. LncRNA NEAT1 promotes proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition process in TGF- $\beta$ 2-stimulated lens epithelial cells through regulating the miR-486-5p/SMAD4 axis [J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 529 [2021-10-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33292220/>. DOI: 10. 1186/s12935-020-01619-8.
- [24] Gong W, Zhu G, Li J, et al. LncRNA MALAT1 promotes the apoptosis and oxidative stress of human lens epithelial cells via p38MAPK pathway in diabetic cataract [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 144: 314-321. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2018. 06. 020.
- [25] Du S, Shao J, Qi Y, et al. Long non-coding RNA ANRIL alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury by up-regulating microRNA-21 in human lens epithelial cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(8): 6543-6557. DOI: 10. 18632/aging. 102800.
- [26] Liu H, Chen R, Kang F, et al. KCNQ10T1 promotes ovarian cancer progression via modulating MIR-142-5p/CAPN10 axis [J/OL]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(2): e1077 [2021-10-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31909901/>. DOI: 10. 1002/mgg3. 1077.
- [27] Yao L, Yang L, Song H, et al. MicroRNA miR-29c-3p modulates FOS expression to repress EMT and cell proliferation while induces apoptosis in TGF- $\beta$ 2-treated lens epithelial cells regulated by lncRNA KCNQ10T1 [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110290 [2021-10-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32534225/>. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110290.
- [28] Liu B, Sun J, Lei X, et al. MicroRNA-486-5p suppresses TGF- $\beta$ 2-induced proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of

- lens epithelial cells by targeting Smad2 [J]. J Biosci, 2017, 42 (4) : 575-584. DOI:10.1007/s12038-017-9709-2.
- [27] Wang X, Wang L, Sun Y, et al. MiR-22-3p inhibits fibrotic cataract through inactivation of HDAC6 and increase of  $\alpha$ -tubulin acetylation [J/OL]. Cell Prolif, 2020, 53 (11) : e12911 [2021-10-19]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32985730/. DOI:10.1111/cpr.12911.
- [28] Wei YL, Sun H. Identification of hsa-mir-34a, hsa-mir-124, and hsa-mir-204 as signatures for cataract [J/OL]. J Cell Physiol, 2019, 234 (7) : 10709-10717 [2021-10-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30478927/. DOI:10.1002/jcp.27741.
- [29] 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 [2021-10-19]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31338869/. DOI:10.1002/jcb.29270.
- [30] Li ZN, Ge MX, Yuan ZF. MicroRNA-182-5p protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by inhibiting NOX4 and p38 MAPK signalling [J/OL]. BMC Ophthalmol, 2020, 20 (1) : 233 [2021-10-19]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32552665/. DOI:10.1186/s12886-020-01489-8.

(收稿日期:2021-10-25 修回日期:2022-04-29)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

## · 病例报告 ·

## 结膜鳞状细胞癌眼内转移 1 例

白惠玲<sup>1</sup> 马建民<sup>2</sup> 刘勤<sup>1</sup> 马建军<sup>1</sup><sup>1</sup>甘肃省人民医院眼科,兰州 730000;<sup>2</sup>首都医科大学附属北京同仁医院,北京 100730

白惠玲,北京同仁医院进修医师

通信作者:马建民,Email:jmma@sina.com

## Intraocular metastasis of conjunctival squamous cell carcinoma: a case report

Bai Huiling<sup>1</sup>, Ma Jianmin<sup>2</sup>, Liu Qin<sup>1</sup>, Ma Jianjun<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China;<sup>2</sup>Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Bai Huiling is a trainee physician at Beijing Tongren Hospital

Corresponding author: Ma Jianmin, Email:jmma@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190816-00352

患者,男,58岁,2019年1月发现左眼角膜缘处结膜肿物,当地医院以左眼结膜肿物行手术治疗,未行病理学检查。术后1个月,结膜肿物复发,再次于当地医院手术,术后病理检查示鳞状细胞癌。3个月后因结膜肿物再次复发于北京同仁医院眼科住院行左眼结膜肿物扩大切除术,术中见巩膜表层受累,组织病理检查示鳞状细胞癌,切缘未见癌细胞;免疫组织化学染色结果示CKH(+~++)、Ki-67(+)、p53(+)、p16(-)、PAS(-)(图1)。病变处加行巩膜局部冷冻术。术后2周,左眼角膜后可见灰白色KP,房水混浊,虹膜表面可见数个褐色结节及灰白色絮状物(图2);眼部MRI检查示左眼颞侧虹膜、睫状体增厚改变(图3),高度怀疑左眼结膜鳞状细胞癌眼内转移,再次入院。行PET-CT检查未见明显异常,在全身麻醉下行左眼前房穿刺术,术中离心涂片未见肿瘤细胞;又行左眼部分虹膜肿物切除术,术中组织病理学检查结果显示鳞状细胞癌,行左眼球摘除术。术后组织病理学检查示鳞状细胞癌(高-中分化),肿瘤侵犯巩膜、色素膜;免疫组织化学染色结果显示CK(++)、CK56(+)、HMB(-)、Ki-67(30%)、MelanA(-)、p40(++)、p63(++~+++)、S100(-)、Syn(-)、Vimentin(-)(图4)。术后辅助局部放射治疗,随访至今,未见眶内浸润及全身转移病灶。建议定期随访。

讨论:结膜鳞状细胞癌是一种原发

性上皮性恶性肿瘤,一般为低度恶性,好发于角膜缘,以睑裂部颞侧角膜缘发病率最高<sup>[1]</sup>。肿瘤早期多表现为灰白色隆起,表面粗糙,生长缓慢,在眼球表面向外生长,侵犯角膜、结膜,也可沿角膜缘生长;后期肿瘤明显增大,呈结节状、菜花状、草莓状或乳头状,表面可破溃糜烂,并向深层侵犯,甚至可以突破巩膜表面和角膜的前弹力层向眼内生长<sup>[2]</sup>。文献中报道结膜鳞状细胞癌浸润生长至眼内者较少见<sup>[3]</sup>。吴晓梅等<sup>[4]</sup>研究显示,结膜鳞状细胞癌肿瘤细胞中抑癌基因nm-23表达呈阳性,也说明了结膜鳞状细胞癌的生长侵袭性及转移能力均较差。

结膜鳞状细胞癌肿瘤细胞可经巩膜静脉窦侵入眼内,也可向深部侵及房角Schlemm管,并由此经小梁网进入眼内<sup>[5]</sup>。本例患者组织病理学检查结果显示,肿瘤侵犯巩膜和色素膜,因此肿瘤转移可能通过巩膜侵犯前房、虹膜和睫状体,从而发生眼内转移;该例患者在第3次手术后2周即出现角膜后灰白色KP、虹膜褐色结节及虹膜表面灰白色絮状物等明显眼内转移

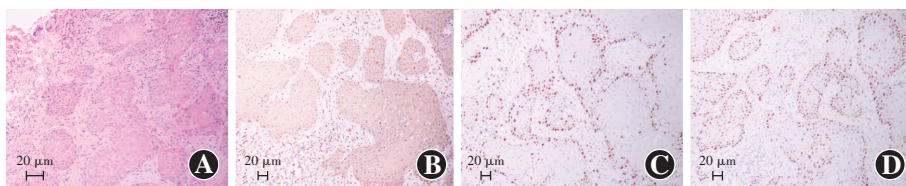


图1 术中组织病理学检查及免疫组织化学染色( $\times 100$ ,标尺=20  $\mu\text{m}$ ) A:苏木精-伊红染色结果示结膜组织内可见大量呈浸润性生长的异型上皮细胞呈巢团状排列,部分癌巢内可见癌珠及细胞间桥,肿瘤细胞体大,细胞质丰富红染,核大,核仁明显,病理性核分裂象可见瘤巢周围淋巴细胞浸润 B~D:免疫组织化学染色示CKH(+~++)、Ki67(+)、p53(+)

