

· 实验研究 ·

microRNA-23b-3p 对高糖诱导的人晶状体上皮细胞自噬和凋亡的抑制作用及其机制

刘文兰¹ 王莉¹ 杨扬¹ 闫瑾¹ 何媛²¹西安医学院医学技术学院, 西安 710021; ²西安医学院第一附属医院眼科, 西安 710077

通信作者: 王莉, Email: 63148645@qq.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-23b-3p(miR-23b-3p)对高糖诱导的人晶状体上皮细胞自噬和凋亡的调控作用。**方法** 纳入 2019 年 9 月至 2020 年 10 月在西安医学院第一附属医院眼科收治的糖尿病性白内障(DC)患者 30 例为 DC 组,同期就诊的单纯白内障患者 30 例为单纯白内障组。2 个组均行常规晶状体超声乳化及人工晶状体植入术,术中收集晶状体前囊膜组织。实时荧光定量 PCR 检测各组晶状体前囊膜组织中 miR-23b-3p 表达。体外培养人晶状体上皮细胞系 HLEB3 细胞,将其分为正常对照组、高糖组,分别于正常和高糖培养基中培养。根据生物信息学数据库预测原钙黏附蛋白 17(PCDH17)与 miR-23b-3p 的靶向关系,双荧光素酶报告基因实验验证两者的靶向关系;取高糖培养的 HLEB3 细胞,分为 miR-23b-3p 拟似物组、阴性对照(NC)拟似物组、NC-siRNA 组、PCDH17-siRNA 组、miR-23b-3p 拟似物+Vector 组、miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组,分别转染相应试剂后实时荧光定量 PCR 法检测 miR-23b-3p 和 PCDH17 mRNA 表达;Western blot 法检测哺乳动物 ATG6 同源蛋白(Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3B)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、磷酸化(p-)JNK、c-Jun、p-c-Jun、B 淋巴细胞瘤基因-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤基因-2 蛋白(Bcl-2)蛋白的表达;流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** DC 组晶状体前囊膜组织中 miR-23b-3p 相对表达量为 0.35 ± 0.15 ,明显低于单纯白内障组的 1.00 ± 0.09 ,差异有统计学意义($t = 44.627, P < 0.01$);正常对照组、高糖组、高糖+NC 拟似物组、高糖+miR-23b-3p 拟似物组细胞中 miR-23b-3p, LC3B II/I、Beclin-1、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量以及细胞凋亡率总体比较,差异均有统计学意义($F = 21.325, 28.318, 17.634, 15.482, 22.325, 26.537$,均 $P < 0.01$);其中与正常对照组比较,高糖组细胞凋亡率、LC3B II/I、Beclin-1、Bax 蛋白表达量显著升高,Bcl-2 蛋白表达量下降,与 NC 拟似物组比较,miR-23b-3p 拟似物组细胞凋亡率、LC3B II/I、Beclin-1、Bax 蛋白表达量显著下降,Bcl-2 蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);生物信息学和双荧光素酶报告基因实验结果显示,PCDH17 是 miR-23b-3p 的靶基因,miR-23b-3p 拟似物组中 PCDH17 mRNA 相对表达量较 NC 拟似物组显著降低($P < 0.05$)。与 NC-siRNA 组相比,PCDH17-siRNA 组细胞凋亡率、LC3B II/I、Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达量显著下降,Bcl-2 蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义($t = 9.116, 12.413, 5.349, 3.273, 8.419$,均 $P < 0.01$)。NC 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物+Vector 组、miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组细胞中 p-JNK/JNK、p-c-Jun/c-Jun、LC3B II/I、Beclin-1、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F = 24.724, 19.319, 23.418, 17.562, 20.263, 15.249$,均 $P < 0.05$);其中与 miR-23b-3p 拟似物+Vector 组比较,miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组细胞中 p-JNK/JNK、p-c-Jun/c-Jun、LC3B II/I、Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达量显著升高,Bcl-2 蛋白表达量降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** miR-23b-3p 对高糖环境下 HLEB3 细胞具有保护作用,其机制主要是通过靶向 PCDH17 调控 JNK 信号通路抑制高糖诱导 HLEB3 细胞的自噬和凋亡。

【关键词】 自噬; 凋亡; 糖尿病性白内障; 微小 RNA-23b-3p; 晶状体上皮细胞

基金项目: 陕西省教育厅 2019 年度科学研究计划项目 (19JK0756); 陕西省自然科学基金研究计划项目一般项目 (2021JM-500)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210309-00154

Inhibitory effect of microRNA-23b-3p on high glucose-induced autophagy and apoptosis of human lens epithelial cells and its mechanism

Liu Wenlan¹, Wang Li¹, Yang Yang¹, Yan Jin¹, He Yuan²¹School of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; ²Department of Ophthalmology, The中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究

First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China

Corresponding author: Wang Li, Email: 63148645@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effects of microRNA-23b-3p (miR-23b-3p) on the autophagy and apoptosis of human lens epithelial cells induced by high glucose. **Methods** Thirty diabetic cataract (DC) patients as DC group and 30 patients with simple cataract as simple cataract group were enrolled in The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University from September 2019 to October 2020. Conventional phacoemulsification and intraocular lens transplantation were performed in both groups. The anterior capsular tissue was collected during the operation. The expression of miR-23b-3p in the anterior lens capsule was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Human lens epithelial cell line HLEB3 cells were cultured *in vitro* and divided into normal control group and high-glucose group, which were cultured in normal and high-glucose medium, respectively. The targeting relationship between proto-cadherin 17 (PCDH17) and miR-23b-3p was predicted according to the bioinformatics database, and was verified by the dual-luciferase reporter gene experiment. High glucose-cultured HLEB3 cells were divided into miR-23b-3p mimics group, negative control (NC) mimics group, NC-siRNA group, PCDH17-siRNA group, miR-23b-3p mimics + Vector group, miR-23b-3p mimics + pcDNA-PCDH17 group, and were transfected with corresponding reagents according to grouping. The expression of miR-23b-3p and PCDH17 mRNA was detected by RT-qPCR. The expressions of a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30 (Beclin-1), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3B), c-Jun N-terminal kinases (JNK), phosphorylated (p-) JNK, c-Jun, p-c-Jun, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) proteins were assayed by Western blot. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The study protocol was approved by the Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College (No. LSL2019037). Written informed consent was obtained from each patient. **Results** The relative expression of miR-23b-3p in the anterior lens capsule of DC group was 0.35 ± 0.15 , which was significantly lower than 1.00 ± 0.09 of simple cataract group ($t = 44.627, P < 0.01$). There were significant differences in the relative expression levels of miR-23b-3p, LC3B II/I, Beclin-1, Bcl-2 and Bax proteins among normal control group, high glucose group, high glucose+NC mimics group and high glucose+miR-23b-3p mimics group ($F = 21.325, 28.318, 17.634, 15.482, 22.325, 26.537$; all at $P < 0.01$). Compared with normal control group, the apoptosis rate, LC3B II/I, Beclin-1 and Bax protein expressions in high glucose group were significantly increased, and the Bcl-2 protein expression was significantly decreased (all at $P < 0.05$). Compared with NC mimics group, the apoptosis rate, LC3B II/I, Beclin-1, and Bax protein expressions were significantly decreased and the Bcl-2 protein expression was significantly increased in miR-23b-3p mimics group (all at $P < 0.05$). The results of bioinformatics and dual-luciferase reporter gene experiments showed that PCDH17 was a target gene of miR-23b-3p, and the relative expression of PCDH17 mRNA in miR-23b-3p mimics group was significantly lower than that in NC mimics group ($P < 0.05$). Compared with NC-siRNA group, the apoptosis rate, LC3B II/I, Beclin-1 and Bax protein expressions in PCDH17-siRNA group were significantly decreased, and the Bcl-2 protein expression was significantly increased ($t = 9.116, 12.413, 5.349, 3.273, 8.419$; all at $P < 0.01$). There were significant differences in the relative expression levels of p-JNK/JNK, p-c-Jun/c-Jun, LC3B II/I, Beclin-1, Bcl-2 and Bax proteins in NC mimics group, miR-23b-3p mimics group, miR-23b-3p mimics + Vector group and miR-23b-3p mimics + pcDNA-PCDH17 group ($F = 24.724, 19.319, 23.418, 17.562, 20.263, 15.249$; all at $P < 0.05$). Compared with the miR-23b-3p mimics+Vector group, the expressions of p-JNK/JNK, p-c-Jun/c-Jun, LC3B II/I, Beclin-1 and Bax were significantly increased, and the expression of Bcl-2 protein was decreased in miR-23b-3p mimics+pcDNA-PCDH17 group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** MiR-23b-3p have a protective effect on HLEB3 cells in a high-glucose environment, mainly by targeting PCDH17 to regulate the JNK signaling pathway to inhibit high glucose-induced autophagy and apoptosis.

[Key words] Autophagy; Apoptosis; Diabetic cataract; MicroRNA-23b-3p; Lens epithelial cells

Fund program: 2019 Scientific Research Project of Education Department of Shaanxi Provincial Government (19JK0756); Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2021JM-500)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210309-00154

糖尿病是一种严重危害人类健康的内分泌疾病, 其在全球范围内的发病率呈上升趋势。糖尿病性白内

障 (diabetic cataract, DC) 是糖尿病患者的主要眼部并发症之一, 其发病年龄较早, 进展较快^[1-2]。糖尿病患

者的白内障发病率是非糖尿病人群的 2~5 倍,成为导致视力损害的主要原因^[3]。研究表明晶状体上皮细胞凋亡在白内障的发展中起着至关重要的作用^[4];此外,人晶状体细胞主要通过自噬降解衰老的细胞器和蛋白质以维持晶状体的透明度^[5]。高糖诱导的晶状体上皮细胞凋亡可能是 DC 形成的原因之一,但是具体的发病机制尚不十分清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 21~23 个核苷酸的非编码单链小 RNA,通过靶向 mRNA 分子的 3'-非翻译区 (untranslated region, UTR),以 mRNA 降解或翻译抑制的方式沉默基因表达^[6-7]。越来越多的研究表明 miRNA 在白内障的发病机制中起着重要作用,如先天性白内障、后发性白内障以及 DC^[8-10]。miR-23b-3p 已被证实在晶状体组织中高度表达^[11],然而 miR-23b-3p 是否参与 DC 的发病仍不清楚。因此,本研究拟探讨 miR-23b-3p 对高糖诱导的人晶状体上皮细胞自噬和凋亡的调节作用,为 DC 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本及细胞来源 收集 2019 年 9 月至 2020 年 10 月在西安医学院第一附属医院行白内障手术的 DC 患者 30 例 30 眼和单纯白内障患者 30 例 30 眼的晶状体前囊膜组织,分别作为 DC 组和单纯白内障组,置于冻存管中液氮保存备用。DC 组中男 19 例 19 眼,女 11 例 11 眼,年龄 61~81 岁,平均 (64.1±6.9) 岁。对照组中男 17 例 17 眼,女 13 例 13 眼,年龄 61~79 岁,平均 (62.2±9.2) 岁。DC 患者诊断为 2 型糖尿病,术前空腹血糖 <7.8 mmol/L,病程为 4~7 年;单纯白内障患者为无糖尿病病史的白内障患者。排除标准: (1) 除糖尿病外其他原因造成的白内障患者; (2) 合并青光眼、玻璃体积血等其他眼部疾病者; (3) 患者临床资料不完善、不配合治疗者; (4) 有严重心、脑、肝、肾功能障碍者。2 个组患者性别构成比、年龄比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。本研究方案经西安医学院第一附属医院伦理委员会审核批准 (批文号: LSL2019037)。每位患者及家属均被告知实验目的并签署知情同意书。人晶状体上皮细胞系 HLEB3 来自中国科学院 ATCC 细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Sigma 公司); Trizol 试剂、LipofectamineTM2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); TaqMan microRNA 逆转录试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司); PrimeScript RT-

PCR 试剂盒、SYBR Green 试剂盒 (日本 Takara 公司); RIPA 裂解液 (上海碧云天公司); BCA 蛋白含量测定试剂盒 (美国 Thermo 公司); ECL 试剂盒 (北京拜耳迪生物技术有限公司); 兔抗人原钙黏附蛋白 17 (protocadherin 17, PCDH17) 抗体 (HPA026817) (美国 Sigma 公司); 兔抗人 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK) 抗体 (ab199380)、兔抗人磷酸化 (p-) JNK 抗体 (ab47337)、兔抗人 c-Jun 抗体 (ab40766)、兔抗人 p-c-Jun 抗体 (ab32385)、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3B) 抗体 (ab192890)、兔抗人哺乳动物 ATG6 同源蛋白 (a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30, Beclin-1) 抗体 (ab207612)、兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (ab32503)、兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (ab32124)、山羊抗兔二抗 (ab205718) (美国 Abcam 公司); 双荧光素酶报告基因载体 pGL3、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Promega 公司); miR-23b-3p 拟似物、阴性对照 (negative control, NC) 拟似物 (深圳华大基因公司)。紫外分光光度计 (美国 Lab Tech 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); Thermo VarioskanTM LUX 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CO₂ 培养箱 (美国赛默飞世尔公司); 倒置普通光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 电子显微镜 (日本电子 JEOL 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组处理 将人晶状体上皮细胞系 HLEB3 接种于 DMEM/F12 培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清、质量分数 1% 青霉素, 质量分数 1% 链霉素) 6 孔板中培养,待细胞达到 80% 融合时,弃掉培养液,将其分为正常对照组和高糖组,分别于含 5 mmol/L 葡萄糖的培养基和含 25 mmol/L 葡萄糖的培养基中 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 48 h。随后取高糖培养基培养的细胞,随机分为 miR-23b-3p 拟似物组、NC 拟似物组、NC-siRNA 组、PCDH17-siRNA 组、miR-23b-3p 拟似物+Vector 组、miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组,根据 LipofectamineTM2000 试剂盒说明书分别进行转染,继续培养 24 h,用于后续实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 miR-23b-3p、PCDH17 相对表达量 收集前囊膜组织及转染后的各组细胞,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,采用紫外分光光度计测定提取的 RNA 浓度和纯度。根据

PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,检测 miR-23b-3p 表达时,按照 TaqMan microRNA 逆转录试剂盒说明书将 miRNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR。miR-23b-3p 正向引物序列为 5'-GAGCATCACATTGCCAG GG-3',反向引物序列为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 正向引物序列为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向引物序列为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3';PCDH17 正向引物序列为 5'-CTTGCCGATGTTGCCTA T-3',反向引物序列为 5'-CCATCTGTTGCTGCTTTC-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-TGACTTCAACAGCGACA CCAA-3',反向引物序列为 5'-CACCTGTTGCTGTAGC CAAA-3'。引物均由大连 Takara 公司设计合成。PCR 反应体积为 25 μ l,引物 1 μ l,cDNA 2 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 30 s,共 40 个循环。GAPDH 和 U6 分别作为 mRNA 和 miRNA 的内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算每个样本中目标基因的相对表达量。

1.2.3 双荧光素酶报告基因系统验证 miR-23b-3p 与靶基因 PCDH17 的关系 将含有 miR-23b-3p 结合位点的野生型 (wild type, WT) 和突变型 (mutant type, MUT)PCDH17 3'-UTR 克隆到 pGL3 载体中,得到荧光素酶报告载体。将细胞以 1×10^4 /ml 的密度接种至 96 孔板中,分为 NC 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物组,待细胞密度达到 70% 融合时,将 WT 和 MUT PCDH17 分别与 miR-23b-3p 拟似物、NC 拟似物共转染到各组细胞中,放于细胞培养箱中继续培养 48 h。用双荧光素酶分析系统检测各组细胞荧光素酶活性。设置 3 个复孔,取平均值,实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中 JNK、p-JNK、c-Jun、p-c-Jun、LC3B、Beclin-1、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达 收集各组转染后的细胞,加入适量的 RIPA 裂解液提取蛋白,使用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白质量浓度。取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并转印至甲醇活化的 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉在室温条件下封闭 PVDF 膜 1 h;加入 JNK、p-JNK、c-Jun、p-c-Jun、LC3B、Beclin-1、Bax、Bcl-2、GAPDH 一抗 (均 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次;加入相应二抗 (1:2 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次;采用 ECL 试剂盒进行显色,采用凝胶成像分析系统进行检测,使用 ImageJ 软件对条带进行量化分析。以 GAPDH 作为内参照,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 流式细胞术检测 HLEB3 细胞凋亡率 取正常对照组、高糖组、miR-23b-3p 拟似物组、NC 拟似物组、

NC-siRNA 组、PCDH17-siRNA 组转染 48 h 的细胞,用胰蛋白酶消化并收集细胞,磷酸盐缓冲液洗 2 次;调整细胞数量至 1×10^5 个/孔,加入 195 μ l 的 Annexin V-FITC 结合液,反复轻轻吹打细胞,用移液管将细胞充分混合成单细胞悬液。在单细胞悬液中加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 和 10 μ l 的碘化丙啶,混合均匀,放入暗盒中孵育 10 min。将单细胞悬液转移至流式细胞仪专用离心管中,流式细胞仪上样检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。各计量数据经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各 miRNA 转染组细胞中 miR-23b-3p 相对表达量以及细胞凋亡和自噬相关蛋白表达比较、各 siRNA 转染组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量比较、各共转染组细胞中 JNK 通路蛋白以及自噬和凋亡蛋白的比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。DC 组与单纯白内障组患者晶状体前囊膜组织中 miR-23b-3p 相对表达量比较、miR-23b-3p 拟似物组与 NC 拟似物组 WT 和 MUT PCDH17 细胞荧光素酶活性比较、NC-siRNA 组和 PCDH17-siRNA 组凋亡率、细胞凋亡和自噬相关蛋白表达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 单纯白内障组和 DC 组前囊膜组织中 miR-23b-3p 相对表达量比较

DC 组患者晶状体组织中 miR-23b-3p 相对表达量为 0.35 ± 0.15 ,明显低于单纯白内障组患者的 1.00 ± 0.09 ,差异有统计学意义 ($t = 44.627, P < 0.01$) (图 1)。

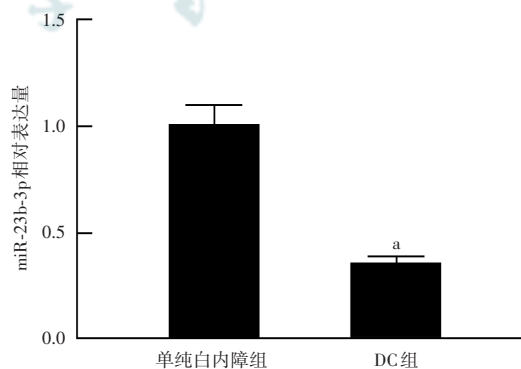


图 1 各组患者前囊膜组织中 miR-23b-3p 相对表达量比较 与单纯白内障组比较, $^aP < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 30$) miR: 微小 RNA; DC: 糖尿病性白内障

Figure 1 Comparison of the relative expression level of miR-23b-3p in anterior capsular membrane between two groups Compared with simple cataract group, $^aP < 0.01$ (Independent samples *t* test, $n = 30$) miR: microRNA; DC: diabetic cataract

2.2 各 miRNA 转染组细胞中 miR-23b-3p 相对表达量及细胞凋亡和自噬相关蛋白比较

正常对照组、高糖组、NC 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物组细胞中 miR-23b-3p 及 LC3B II/I、Beclin-1、细胞凋亡率、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F=21.325, P<0.001; F=28.318, P=0.002; F=17.634, P=0.007; F=26.537, P=0.003; F=15.482, P=0.001; F=22.325, P<0.001$)。与正常对照组比较,高糖组中 miR-23b-3p 表达量显著降低,细胞凋亡率升高,LC3B II/I 比值、Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达量显著升高,Bcl-2 蛋白表达量显著下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与 NC 拟似物组比较,miR-23b-3p 拟似物组细胞中 miR-23b-3p 表达量显著升高,细胞凋亡率降低,LC3B II/I 比值、Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达量显著下降,Bcl-2 蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 2,表 1,2)。

2.3 miR-23b-3p 靶向结合 PCDH17 验证

生物信息学数据库预测 miR-23b-3p 直接靶向结合 PCDH17 3'-UTR。miR-23b-3p 拟似物组 WT-PCDH17 荧光素酶活性为 1.00 ± 0.11 ,明显低于 NC 拟似物组的 0.42 ± 0.05 ,差异有统计学意义($t=7.306, P=0.004$);miR-23b-3p 拟似物组与 NC 拟似物组 MUT-PCDH17 荧光素酶活性分别为 1.00 ± 0.09 和 0.98 ± 0.08 ,差异无统计学意义($t=0.314, P=0.952$)。miR-23b-3p 拟似物组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量为 0.41 ± 0.04 ,明显低于 NC 拟似物组的 1.00 ± 0.09 ,差异有统计学意义($t=9.483, P=0.001$)(图 3)。

2.4 各 siRNA 转染组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量比较

正常对照组、高糖组、NC-siRNA 组、PCDH17-siRNA 组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量分别为 $1.00\pm0.04, 3.42\pm0.16, 3.35\pm0.13$ 和 1.42 ± 0.09 ,总体比较差异有统计学意义($F=41.183, P=0.001$);其中高糖组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量高于正常

对照组,PCDH17-siRNA 组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量低于 NC-siRNA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 4)。

2.5 各 siRNA 转染组凋亡率、细胞凋亡和自噬相关蛋白表达比较

与 NC-siRNA 组相比,PCDH17-siRNA 组细胞凋亡率降低,LC3B-II/I 比值、Beclin-1 以及 Bax 蛋白相对表达量显著下降,Bcl-2 蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义($t=9.116, P=0.001; t=12.413, P=0.004; t=5.349, P=0.006; t=3.273, P=0.001; t=8.419, P<0.001$)(图 5,表 3)。

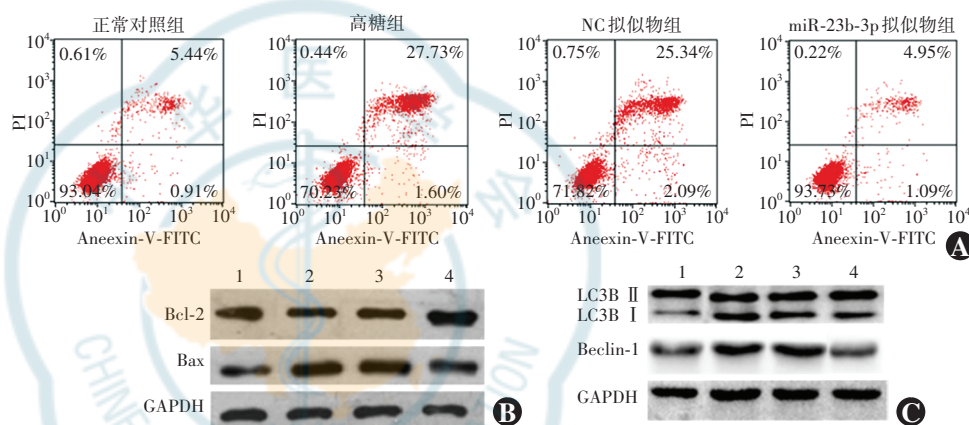


图 2 各组细胞凋亡率以及凋亡、自噬蛋白的表达 A:各组细胞凋亡流式细胞图 B:各组细胞凋亡相关蛋白表达电泳图 C:各组细胞自噬相关蛋白表达电泳图 1:正常对照组;2:高糖组;3:NC 拟似物组;4:miR-23b-3p 拟似物组 NC:阴性对照;miR:微小 RNA;Bcl-2:B 淋巴细胞瘤-2;Bax:B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;LC3B:微管相关蛋白 1 轻链 3;Beclin-1:哺乳动物 ATG6 同源蛋白

Figure 2 Apoptosis rate and expression of apoptotic and autophagy-related proteins in different groups A:Flow cytometry of cell apoptosis B:Electrophoretogram of apoptotic proteins C:Electrophoretogram of autophagy-related proteins 1:normal control group;2:high glucose group;3:NC mimics group;4:miR-23b-3p mimics group NC:normal control;miR:microRNA;Bcl-2:B-cell lymphoma-2;Bax:Bcl-2 associated X protein;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;LC3B:microtubule-associated protein 1 light chain 3;Beclin-1:a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30

表 1 各组细胞中 miR-23b-3p 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of relative expression of miR-23b-3p among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	miR-23b-3p 相对表达量
正常对照组	3	1.00 ± 0.11
高糖组	3	0.39 ± 0.08^a
NC 拟似物组	3	0.42 ± 0.07
miR-23b-3p 拟似物组	3	1.63 ± 0.16^b
F 值		21.325
P 值		<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 NC 拟似物组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-t 检验) miR:微小 RNA;NC:阴性对照

Note:Compared with normal control group,^a $P<0.05$;compared with NC mimics group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-t test) miR:microRNA;NC:negative control

表 2 各组细胞中自噬与凋亡相关蛋白相对表达量及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of apoptosis rate and the relative expression levels of autophagy-related and apoptotic protein among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	LC3B II / I	Beclin-1	Bcl-2	Bax	凋亡率 (%)
正常对照组	3	1.02±0.06	1.00±0.05	1.24±0.07	1.01±0.08	4.49±0.69
高糖组	3	3.12±0.13 ^a	2.89±0.04 ^a	0.53±0.01	3.47±0.22 ^a	19.18±1.13 ^a
NC 拟似物组	3	3.01±0.09	2.82±0.11	0.51±0.03	3.29±0.16	20.61±1.05
miR-23b-3p 拟似物组	3	1.76±0.12 ^b	1.41±0.03 ^b	1.04±0.02	1.54±0.13 ^b	5.83±0.52 ^b
F 值		28.318	17.634	15.482	22.325	26.537
P 值		0.002	0.007	0.001	<0.001	0.003

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 NC 拟似物组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) LC3B:微管相关蛋白 1 轻链 3;Beclin-1:哺乳动物 ATG6 同源蛋白;Bcl-2:B 淋巴细胞瘤-2;Bax:B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;NC:阴性对照;miR:微小 RNA

Note:Compared with normal control group,^a $P<0.05$;compared with NC mimics group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) LC3B: microtubule-associated protein 1 light chain 3;Beclin-1:a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30;Bcl-2:B-cell lymphoma-2;Bax:Bcl-2 associated X protein;NC:negative control;miR:microRNA

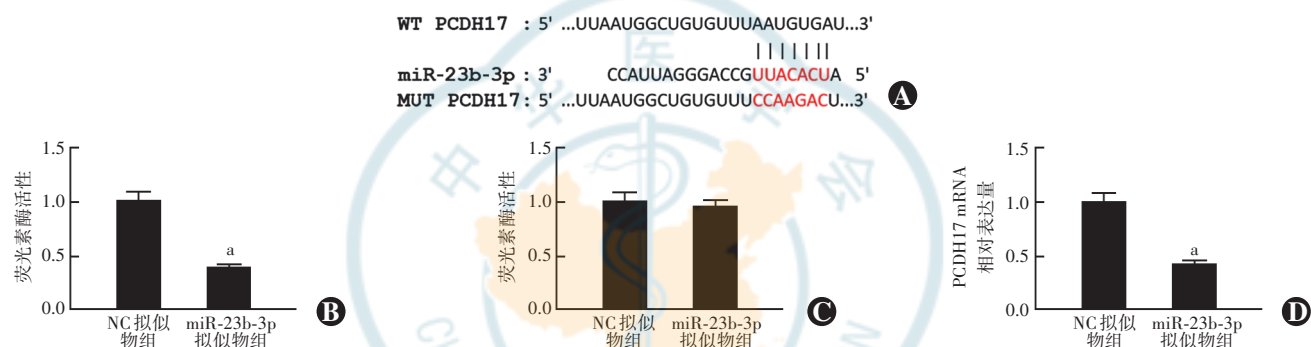


图 3 miR-23b-3p 靶向 PCDH17 验证 A:miR-23b-3p 与野生型 PCDH17 基因存在靶向结合位点 B:各组细胞野生型荧光素酶活性比较 与 NC 拟似物组比较,^a $P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) C:各组细胞突变型荧光素酶活性比较 与 NC 拟似物组比较, $P=0.952$ (独立样本 t 检验, $n=3$) D:各细胞转染组 PCDH17 mRNA 相对表达量比较 与 NC 拟似物组比较,^a $P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) WT:野生型;PCDH17:原钙黏附蛋白 17;miR:微小 RNA;MUT:突变型;NC:阴性对照

Figure 3 Validation of miR-23b-3p targeting PCDH17 A: Targeted binding sites of miR-23b-3p and wild-type PCDH17 B: Comparison of wild luciferase activity between two groups Compared with NC mimics group,^a $P<0.05$ (Independent samples t test, $n=3$) C: Comparison of mutant luciferase activity between two groups Compared with NC mimics group, $P=0.952$ (Independent samples t test, $n=3$) D: Comparison of the relative expression of PCDH17 mRNA between different transfection groups Compared with NC mimics group,^a $P<0.05$ (Independent samples t test, $n=3$) WT: wild type; PCDH17: protocadherin 17; miR: microRNA; MUT: mutant type; NC: negative control

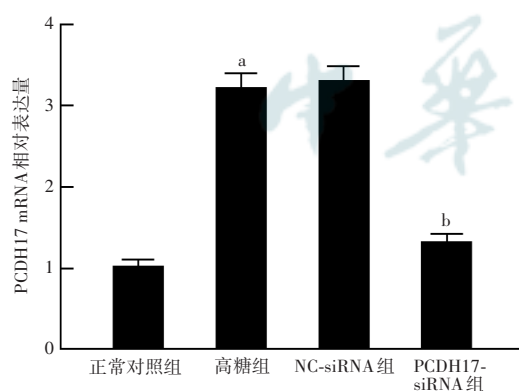


图 4 各组细胞中 PCDH17 mRNA 相对表达量比较 $F=41.183$, $P=0.001$. 与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 NC-siRNA 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n=3$) PCDH17:原钙黏附蛋白 17;NC:阴性对照

Figure 4 Comparison of the relative expression level of PCDH17 mRNA among different groups $F=41.183$, $P=0.001$. Compared with normal control group,^a $P<0.05$;compared with NC-siRNA group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) PCDH17: protocadherin 17; NC: negative control

2.6 各共转染组细胞中 JNK 通路蛋白以及自噬和凋亡蛋白比较

NC 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物组、miR-23b-3p 拟似物+Vector 组、miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组细胞中 p-JNK/JNK、p-c-Jun/c-Jun、LC3B II/I、Beclin-1、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F=24.724$, $P=0.004$; $F=19.319$, $P=0.008$; $F=23.418$, $P=0.009$; $F=17.562$, $P=0.011$; $F=20.263$, $P=0.001$; $F=15.249$, $P=0.005$);其中与 NC 拟似物组比较,miR-23b-3p 拟似物组细胞中 p-JNK/JNK 比值和 p-c-Jun/c-Jun 比值显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与 miR-23b-3p 拟似物+Vector 组比较,miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组细胞中 p-JNK/JNK 比值和 p-c-Jun/c-Jun 比值升高,LC3B II/I 比值和 Beclin-1 以及 Bax 蛋白相对表达量显著升高, Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 6,表 4)。



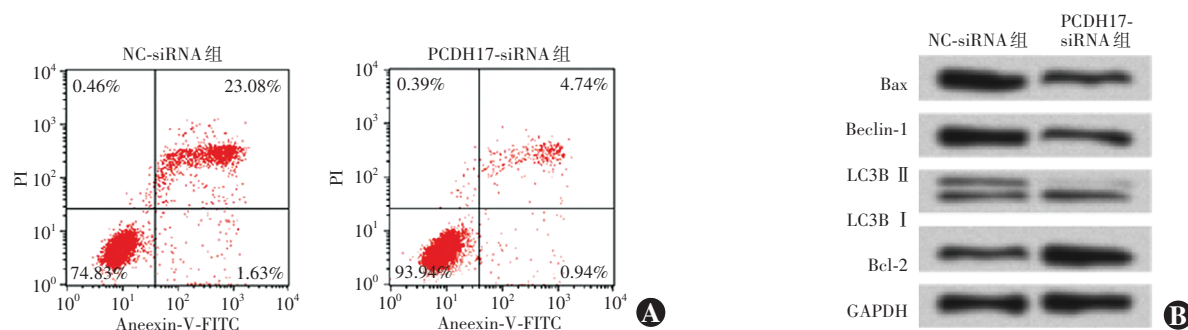


图 5 各组细胞凋亡及自噬和凋亡相关蛋白表达情况 A: 各组细胞凋亡流式细胞图 B: 各组自噬和凋亡相关蛋白表达电泳图 NC: 阴性对照; PCDH17: 原钙黏附蛋白 17; siRNA: 小干扰 RNA; Bax: B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白; Beclin-1: 哺乳动物 ATG6 同源蛋白; LC3B: 微管相关蛋白 1 轻链 3; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 5 Cell apoptosis and the expression of autophagy- and apoptosis-related proteins in two groups A: Flow cytometry of cell apoptosis B: Electrophoretogram of autophagy- and apoptosis-related proteins NC: normal control; PCDH17: protocadherin 17; siRNA: small interfering RNA; Bax: Bcl-2 associated X protein; Beclin-1: a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30; LC3B: microtubule-associated protein 1 light chain 3; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 3 各 siRNA 转染组细胞中自噬与凋亡相关蛋白相对表达量及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of apoptosis rate and the relative expression levels of autophagy-related and apoptotic proteins between different siRNA-transfected groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	LC3B II / I	Beclin-1	Bcl-2	Bax	凋亡率 (%)
NC-siRNA 组	3	1.00±0.09	1.00±0.06	1.00±0.12	1.00±0.10	24.05±1.48
PCDH17-siRNA 组	3	0.35±0.03	0.39±0.04	3.11±0.28	0.41±0.04	6.31±0.55
t 值		12.413	5.349	8.419	3.273	9.116
P 值		0.004	0.006	<0.001	0.001	0.001

注: (独立样本 t 检验) LC3B: 微管相关蛋白 1 轻链 3; Beclin-1: 哺乳动物 ATG6 同源蛋白; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; Bax: B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白; NC: 阴性对照; PCDH17: 原钙黏附蛋白 17; siRNA: 小干扰 RNA

Note: (Independent samples t test) LC3B: microtubule-associated protein 1 light chain 3; Beclin-1: a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; Bax: Bcl-2 associated X protein; NC: negative control; PCDH17: protocadherin 17; siRNA: small interfering RNA

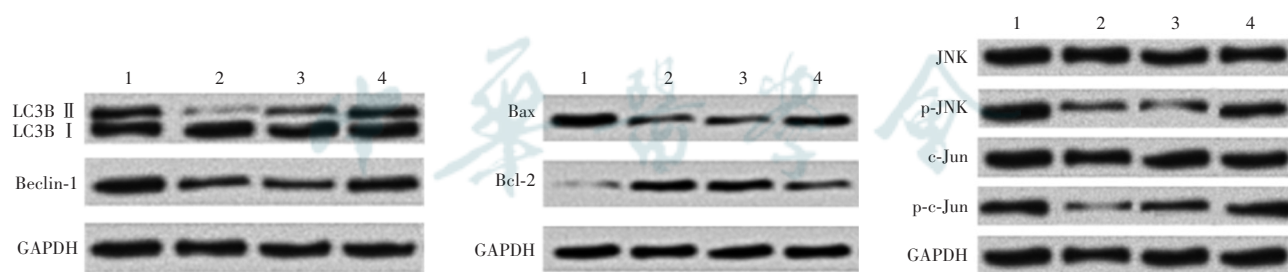


图 6 各共转染组细胞中 JNK 通路蛋白以及自噬和凋亡蛋白表达电泳图 与 NC 拟似物组比较, miR-23b-3p 拟似物组细胞中 p-JNK、p-c-Jun、LC3B II / I 和 Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达条带较窄, 强度较弱, Bcl-2 蛋白条带较宽, 强度较强; 与 miR-23b-3p 拟似物+Vector 组比较, miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组细胞中 p-JNK、p-c-Jun、LC3B II / I 和 Beclin-1 以及 Bax 蛋白表达条带较宽, 强度较强, Bcl-2 蛋白条带较窄, 强度较弱 1: NC 拟似物组; 2: miR-23b-3p 拟似物组; 3: miR-23b-3p 拟似物+Vector 组; 4: miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组 LC3B: 微管相关蛋白 1 轻链 3; Beclin-1: 哺乳动物 ATG6 同源蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Bax: B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤-2; JNK: c-Jun 氨基末端激酶

Figure 6 Electrophoretogram of JNK pathway proteins, autophagy-related and apoptotic proteins in different co-transfection groups Compared with NC mimics group, the expression bands of p-JNK, p-c-Jun, LC3B II / I, Beclin-1 and Bax were narrower and weaker, while the expression band of Bcl-2 was wider and stronger in miR-23b-3p mimics group; compared with miR-23b-3p mimics + Vector group, the expression bands of p-JNK, p-c-Jun, LC3B II / I, Beclin-1 and Bax were wider and stronger while the expression band of Bcl-2 was narrower and weaker in miR-23b-3p mimics + pcDNA-PCDH17 group 1: NC mimics group; 2: miR-23b-3p mimics group; 3: miR-23b-3p mimics + Vector group; 4: miR-23b-3p mimics + pcDNA-PCDH17 group LC3B: microtubule-associated protein 1 light chain 3; Beclin-1: a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; JNK: c-Jun N-terminal kinases

表 4 各共转染组细胞中不同蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression level of different proteins among co-transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	p-JNK/JNK	p-c-Jun/Jun	LC3B II / I	Beclin-1	Bcl-2	Bax
NC 拟似物组	3	1.01±0.02	1.00±0.06	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.02	1.00±0.03
miR-23b-3p 拟似物组	3	0.43±0.03 ^a	0.31±0.01 ^a	0.33±0.03 ^a	0.39±0.04 ^a	3.14±0.13 ^a	0.31±0.01 ^a
miR-23b-3p 拟似物+Vector 组	3	0.41±0.01	0.33±0.02	0.35±0.02	0.40±0.01	3.11±0.08	0.35±0.03
miR-23b-3p 拟似物+pcDNA-PCDH17 组	3	0.91±0.08 ^b	0.93±0.05 ^b	0.93±0.07 ^b	0.95±0.06 ^b	1.42±0.06 ^b	0.96±0.07 ^b
F 值		24.724	19.319	23.418	17.562	20.263	15.249
P 值		0.004	0.008	0.009	0.011	0.001	0.005

注:与 NC 拟似物组比较,^a $P < 0.05$;与 miR-23b-3p 拟似物+Vector 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) JNK:c-Jun 氨基末端激酶;LC3B:微管相关蛋白 1 轻链 3;Beclin-1:哺乳动物 ATG6 同源蛋白;Bcl-2:B 淋巴细胞瘤-2;Bax:B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白;NC:阴性对照;miR:微小 RNA;PCDH17:原钙黏附蛋白 17

Note:Compared with NC mimics group,^a $P < 0.05$;Compared with miR-23b-3p mimic+Vector group,^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) JNK:c-Jun N-terminal kinases;LC3B:microtubule-associated protein 1 light chain 3;Beclin-1;a mammalian homolog of yeast Atg6/Vps30;Bcl-2;B-cell lymphoma-2;Bax:Bcl-2 associated X protein;NC:negative control;miR:microRNA;PCDH17:protocadherin 17

3 讨论

miRNA 广泛参与细胞凋亡、增生、分化及应激反应等,其异常表达与多种疾病的发生密切相关。研究报道 miRNA 在白内障发展过程中异常表达,其在 DC 形成的机制研究中也受到越来越多的关注^[12-13]。目前研究表明,miR-23b-3p 在多种组织细胞中具有重要作用,可能抑制骨肉瘤细胞的增生和侵袭,并通过下调 SIX1 促进细胞凋亡^[14]。miR-23b-3p 通过调控 HS6ST2 激活关节炎患者软骨细胞中的 p38 MAPK 促进基质降解^[15]。miR-23b 通过靶向肌醇多磷酸多激酶(inositol phosphate multikinase,IPMK)抑制神经炎症,在脑溢血患者中起保护作用^[16]。此外,Zhao 等^[17]研究发现 miR-23b-3p 通过 SIRT1 依赖性信号通路调节糖尿病视网膜病变中高糖诱导的细胞代谢。在年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜组织中,circZNF292 可通过海绵吸附 miR-23b-3p 调控晶状体上皮细胞氧化应激和凋亡^[18]。目前 miR-23b-3p 在 DC 中的作用及机制尚不清楚。本研究中采用高糖培养 HLEB3 细胞作为 DC 模型,研究 miR-23b-3p 在 DC 中的作用机制。

晶状体上皮细胞的功能改变被认为是白内障发生的细胞基础。最近的研究表明,晶状体上皮细胞凋亡和自噬在白内障的发生和发展中起着重要作用。有研究显示,晶状体上皮细胞凋亡可能是 DC 形成的始动因素^[19-20]。自噬溶酶体途径对维持晶状体透明至关重要。大量研究证实自噬在多种类型的白内障发生和发展中发挥作用^[21-22]。微管相关蛋白 1 轻链 3 亚家族 LC3B 是参与自噬形成的重要泛素化系统,是细胞自噬水平的重要评价标准。LC3- II / I 的比值常用来

评估自噬水平。Beclin-1 主要参与自噬的起始阶段,是评价自噬水平的重要标志物之一。先前的研究表明,高浓度葡萄糖可诱导血管内皮细胞自噬^[23]。本研究结果也显示,在高糖条件下培养的晶状体上皮细胞中 LC3B 及 Beclin-1 表达升高,促凋亡蛋白 Bax 表达显著升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降,细胞出现自噬和凋亡。PCDH17 属于原钙粘蛋白基因家族,已被证明与细胞凋亡和自噬有关^[24-26]。目前尚无文献报道 PCDH17 在 DC 中的作用。本研究发现高糖环境下 HLEB3 细胞中 PCDH17 mRNA 表达升高,沉默 PCDH17 表达后细胞自噬和细胞凋亡水平均显著下降,推测 PCDH17 在 DC 中可能具有重要作用。但本研究未进行 PCDH17 蛋白水平的检测,在之后的研究中应重点关注 PCDH17 在 DC 中的作用机制。此外,有研究表明自噬和凋亡之间具有复杂的相互作用,激活自噬可促进视网膜神经节细胞存活,抑制自噬可降低视神经退行性病变过程中细胞的存活^[27]。本研究结果发现 DC 形成过程中细胞凋亡与自噬均发生显著变化,然而自噬与细胞凋亡的关系尚不清楚,仍有待进一步研究。

本研究还探索了 miR-23b-3p 对高糖诱导的 HLEB3 细胞中 JNK 信号通路的潜在影响。JNK 属于丝裂原活化蛋白激酶家族,可结合磷酸化 c-Jun 的转录活化结构域,在调节细胞炎症反应、细胞凋亡和细胞自噬中发挥重要作用^[28-29]。在本研究中,miR-23b-3p 过表达使 p-JNK/JNK 比值和 p-c-Jun/Jun 比值显著降低,而 PCDH17 过表达可逆转这一结果,说明在高糖诱导的 HLEB3 细胞中,miR-23b-3p 通过调控 PCDH17 抑制了 JNK 信号通路的激活。

综上所述,miR-23b-3p 通过靶向 PCDH17 抑制

JNK 通路,促进高糖诱导的 HLEB3 细胞自噬和凋亡。以上结果为 DC 发生和发展的分子机制提供了新的见解,同时为 miR-23b-3p 成为 DC 治疗的靶点提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘文兰:参与研究选题,研究设计,研究实施,论文撰写、修改及定稿;王莉:参与研究设计、数据分析、对文章的知识性内容作批评性审阅;杨扬:参与研究实施、数据采集与分析、论文修改;闫瑾:参与数据采集与分析、论文修改;何媛:参与研究实施、资料收集

参考文献

- 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.
- Gong X, Ren Y, Fang X, et al. Substance P induces sympathetic immune response in the contralateral eye after the first eye cataract surgery in type 2 diabetic patients [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1): 339 [2021-05-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32811461>. DOI: 10.1186/s12886-020-01598-4.
- Wang L, Gong R, Keel S, et al. Ten-year incidence of cataract surgery in urban Southern China: the Liwan Eye Study [J]. *Am J Ophthalmol*, 2020, 217: 74-80. DOI: 10.1016/j.ajo.2020.03.034.
- Peng J, Zheng TT, Liang Y, et al. p-Coumaric acid protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by MAPK signaling [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 8549052 [2021-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849919>. DOI: 10.1155/2018/8549052.
- Sidjanin DJ, Park AK, Ronchetti A, et al. TBC1D20 mediates autophagy as a key regulator of autophagosome maturation [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1759-1775. DOI: 10.1080/15548627.2016.1199300.
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465. DOI: 10.1002/jcp.27486.
- Ali Syeda Z, Langden S, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1723 [2021-05-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32138313>. DOI: 10.3390/ijms21051723.
- Wu CR, Ye M, Qin L, et al. Expression of lens-related microRNAs in transparent infant lenses and congenital cataract [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(3): 361-365. DOI: 10.18240/ijo.2017.03.06.
- 李晓彤, 秦宇, 赵江月, 等. 微小 RNA-133b 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞凋亡的抑制作用及其调控机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(11): 977-983. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.005.
Li XT, Qin Y, Zhao JY, et al. Inhibitory effects of microRNA-133b on ultraviolet-induced apoptosis of lens epithelial cells and its mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(11): 977-983. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.005.
- 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 [2021-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33276722>. DOI: 10.1186/s10020-020-00250-7.
- Wu C, Lin H, Wang Q, et al. Discrepant expression of microRNAs in transparent and cataractous human lenses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7): 3906-3912. DOI: 10.1167/iov.11-9178.
- Zhang L, Wang Y, Li W, et al. MicroRNA-30a regulation of epithelial-mesenchymal transition in diabetic cataracts through targeting *SNAIL* [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1117 [2021-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442786>. DOI: 10.1038/s41598-017-01320-3.
- Zhang L, Cheng R, Huang Y. MiR-30a inhibits BECN1-mediated autophagy in diabetic cataract [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77360-77368 [2021-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29100392>. DOI: 10.18632/oncotarget.20483.
- Liu H, Wei W, Wang X, et al. miR-23b-3p promotes the apoptosis and inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting SIX1 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5683-5692. DOI: 10.3892/mmr.2018.9611.
- Guo Y, Min Z, Jiang C, et al. Downregulation of HS6ST2 by miR-23b-3p enhances matrix degradation through p38 MAPK pathway in osteoarthritis [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 699 [2021-05-06]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29899528>. DOI: 10.1038/s41419-018-0729-0.
- Hu L, Zhang H, Wang B, et al. MicroRNA-23b alleviates neuroinflammation and brain injury in intracerebral hemorrhage by targeting inositol polyphosphate multikinase [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105887 [2021-05-10]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31536904>. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105887.
- Zhao S, Li T, Li J, et al. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(3): 644-654. DOI: 10.1007/s00125-015-3832-0.
- Liang S, Dou S, Li W, et al. Profiling of circular RNAs in age-related cataract reveals circZNF292 as an antioxidant by sponging miR-23b-3p [J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(17): 17271-17287 [2021-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32913142>. DOI: 10.18632/aging.103683.
- Sun Y, Lu CM, Song Z, et al. Expression and regulation of microRNA-29a and microRNA-29c in early diabetic rat cataract formation [J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(12): 1719-1724. DOI: 10.18240/ijo.2016.12.03.
- Ahn YJ, Kim MS, Chung SK. Calpain and caspase-12 expression in lens epithelial cells of diabetic cataracts [J]. *Am J Ophthalmol*, 2016, 167: 31-37. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.04.009.
- Li T, Huang Y, Zhou W, et al. Let-7c-3p regulates autophagy under oxidative stress by targeting ATG3 in lens epithelial cells [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6069390 [2021-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32258130>. DOI: 10.1155/2020/6069390.
- Ping X, Liang J, Shi K, et al. Rapamycin relieves the cataract caused by ablation of Gja8b through stimulating autophagy in zebrafish [J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3323-3337. DOI: 10.1080/15548627.2021.1872188.
- Zhao X, Su L, He X, et al. Long noncoding RNA CA7-4 promotes autophagy and apoptosis via sponging MIR877-3P and MIR5680 in high glucose-induced vascular endothelial cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 70-85. DOI: 10.1080/15548627.2019.1598750.
- Wu JC, Wang FZ, Tsai ML, et al. Se-allylselenocysteine induces autophagy by modulating the AMPK/mTOR signaling pathway and epigenetic regulation of PCDH17 in human colorectal adenocarcinoma cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(12): 2511-2522. DOI: 10.1002/mnfr.201500373.
- Liu S, Lin H, Wang D, et al. PCDH17 increases the sensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil treatment by inducing apoptosis and autophagic cell death [J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 53 [2021-05-17]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31815010>. DOI: 10.1038/s41392-019-0087-0.
- Feng Y, Xu W, Zhang W, et al. LncRNA DCRF regulates cardiomyocyte autophagy by targeting miR-551b-5p in diabetic cardiomyopathy [J]. *Theranostics*, 2019, 9(15): 4558-4566. DOI: 10.7150/tno.31052.
- Russo R, Varano GP, Adornetto A, et al. Rapamycin and fasting sustain autophagy response activated by ischemia/reperfusion injury and promote retinal ganglion cell survival [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 981 [2021-05-17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30250019>. DOI: 10.1038/s41419-018-1044-5.
- Chen J, Ye C, Wan C, et al. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in infectious diseases [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9640 [2022-08-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34502556>. DOI: 10.3390/ijms22179640.
- 闫梅, 马倩, 马雅玲, 等. 枸杞多糖对 LPS 诱导的人视网膜色素上皮细胞炎症反应的影响及机制 [J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21(3): 411-416. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.3.06.
Yan M, Ma Q, Ma YL, et al. Effect and relative mechanism of lycium barbarum polysaccharide on LPS-induced inflammatory response within human retinal pigment epithelial cells [J]. *Int Eye Sci*, 2021, 21(3): 411-416. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.3.06.

(收稿日期:2022-01-25 修回日期:2022-08-12)

(本文编辑:张宇 骆世平)

