

调节 miR-27b-3p 和 Nrf2 对人 RPE 细胞代谢记忆形成的抑制作用

赖巧玲 谢婷 黄焱

福建医科大学医学技术与工程学院眼视光学系,福州 350004

谢婷现在福建医科大学附属第一医院,福州 350004

通信作者:黄焱,Email:fjhyan-1988@fjmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-27b-3p(miR-27b-3p)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)对人视网膜色素上皮(RPE)细胞代谢记忆损伤的影响及其调控机制。**方法** 取 ARPE-19 细胞,将其置于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基培养 6 d 作为正常对照组;于 30 mmol/L 高糖培养基中培养 3 d 后,换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为代谢记忆组;慢病毒转染细胞并加入嘌呤霉素,筛选转染成功的细胞,并将其置于 30 mmol/L 高糖培养基 3 d 后换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为 miR-27b-3p 抑制剂组;细胞于 30 mmol/L 高糖+利拉鲁肽培养基培养 3 d 后换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为利拉鲁肽组。采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-27b-3p、Nrf2、醌氧化还原酶-1(NQO1)、血红素加氧酶-1(HO-1) mRNA 表达水平;采用 Western blot 法检测 Nrf2 总蛋白、核蛋白水平;采用细胞免疫荧光检测 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白表达水平;采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞增生率以评估细胞活力;采用 DHE 试剂盒检测活性氧簇(ROS)水平。**结果** 正常对照组、代谢记忆组、miR-27b-3p 对照组和 miR-27b-3p 抑制剂组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.881 ± 0.034 、 1.683 ± 0.088 和 0.111 ± 0.008 , 总体比较差异有统计学意义($F=850.815, P<0.001$),其中,正常对照组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量低于代谢记忆组,miR-27b-3p 抑制剂组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。代谢记忆组 Nrf2 mRNA 及总蛋白、核蛋白相对表达量较正常对照组降低,miR-27b-3p 抑制剂组较 miR-27b-3p 对照组明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);代谢记忆组 NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量较正常对照组降低,miR-27b-3p 抑制剂组较 miR-27b-3p 对照组明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度均低于正常对照组,miR-27b-3p 抑制剂组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度均高于 miR-27b-3p 对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。与代谢记忆组相比,利拉鲁肽组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。利拉鲁肽组 Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA、Nrf2 总蛋白及核蛋白相对表达水平均较代谢记忆组升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),利拉鲁肽组荧光强度较代谢记忆组增强,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与正常对照组及利拉鲁肽组相比,代谢记忆组细胞增生活力均下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。代谢记忆组 ROS 相对含量较正常对照组及利拉鲁肽组升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。**结论** 利拉鲁肽通过下调 miR-27b-3p 逆转代谢记忆对 Nrf2、NQO1 和 HO-1 的抑制作用。

【关键词】 糖尿病视网膜膜病变; 利拉鲁肽; 视网膜色素上皮; 代谢记忆; 微小 RNA-27b-3p; Nrf2

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2016J01155、2020J01652)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201208-00831

Inhibitory effect of miR-27b-3p and Nrf2 regulation on metabolic memory formation in human RPE cells

Lai Qiaoling, Xie Ting, Huang Yan

Department of Ophthalmology & Optometry, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Xie Ting now works at the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Corresponding author: Huang Yan, Email: fjhyan-1988@fjmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effect of microRNA-27b-3p (miR-27b-3p)/nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) on metabolic memory impairment of human retinal pigment epithelial (RPE) cells and to explore its regulatory mechanism. **Methods** ARPE-19 cells were divided into normal control group, metabolic

memory group, miR-27b-3p control group, miR-27b-3p inhibitor group, and liraglutide group. Cells in normal control group were cultured in 5.5 mmol/L normal glucose medium for 6 days. Cells in metabolic memory group were cultured in 30 mmol/L glucose for 3 days and changed to 5.5 mmol/L for 3 days. Cells in miR-27b-3p inhibitor group were added with puromycin after lentiviral transfection to select the successfully transfected cells, and were cultured in 30 mmol/L glucose for 3 days then 5.5 mmol/L glucose for 3 days. Cells in liraglutide group were cultured in 30 mmol/L glucose with liraglutide for 3 days then 5.5 mmol/L glucose for 3 days. The regulatory relationship between miR-27b-3p and Nrf2 was verified by lentiviral transfection. Expressions of miR-27b-3p, Nrf2, NAD(P)H dehydrogenase[quinone]1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA and protein levels were analyzed by real-time quantitative PCR. Total and nuclear Nrf2 protein expressions were detected by Western blot. The cell proliferation rates of various groups were determined by cell counting kit-8 (CCK-8). The reactive oxygen species (ROS) level was detected by the DHE kit. **Results** The miR-27b-3p mRNA relative expression of normal control group, metabolic memory group, miR-27b-3p control group, miR-27b-3p inhibitor group was 1.000 ± 0.000 , 1.881 ± 0.034 , 1.683 ± 0.088 and 0.111 ± 0.008 , respectively, with a statistically significant difference ($F = 850.815, P < 0.001$). The miR-27b-3p mRNA relative expression level was lower in normal control group than in metabolic memory group, lower in miR-27b-3p inhibitor group than in normal control group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.01$). The expression levels of Nrf2 mRNA, total protein, and nuclear protein were decreased in metabolic memory group in comparison with normal control group and were significantly increased in miR-27b-3p inhibitor group in comparison with miR-27b-3p control group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.01$). The NQO1 and HO-1 mRNA expressions were decreased in metabolic memory group in comparison with normal control group, and were significantly higher in miR-27b-3p inhibitor group compared with miR-27b-3p control group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.01$). The fluorescence intensity of Nrf2, NQO1, and HO-1 was lower in metabolic memory group than in normal control group, and was higher in miR-27b-3p inhibitor group than in miR-27b-3p control group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.01$). Compared with metabolic memory group, the relative expression of miR-27b-3p mRNA declined in liraglutide group, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The relative expression levels of Nrf2 mRNA, NQO1 mRNA, HO-1 mRNA, total and nuclear Nrf2 protein of liraglutide group were enhanced in comparison with metabolic memory group, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$). The fluorescence intensity of Nrf2, NQO1, and HO-1 was enhanced in liraglutide group in comparison with metabolic memory group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). Compared with normal control group and liraglutide group, the cell proliferation viability was decreased in metabolic memory group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.01$). The relative content of ROS was higher in metabolic memory group than in normal control group and liraglutide group, and the difference was significant (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Liraglutide reverses the inhibition of metabolic memory on Nrf2, NQO1, and HO-1 by downregulating miR-27b-3p.

[Key words] Diabetic retinopathy; Liraglutide; Retinal pigment epithelium; Metabolic memory; MicroRNA-27b-3p; Nrf2

Fund program: Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J01155, 2020J01652)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201208-00831

对于长期血糖控制欠佳的糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 患者, 即使后期严格控制血糖, 既往高血糖对视网膜的损伤仍可持续进展, 即存在代谢记忆现象^[1]。可见高血糖及其代谢产物所致的代谢记忆现象可继续损伤视网膜并抑制其自我修复能力, 这可能是 DR 持续进展的原因之一。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 及其靶基因血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1,

NQO1) 是体内强抗氧化因子^[2]。研究发现, DR 发展过程中随着高血糖及其代谢产物的刺激可能会破坏 Nrf2 信号转导功能, 而保护 Nrf2 可恢复并改善视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞、血管内皮细胞、神经节细胞的正常生理功能^[3-5]。另有研究发现, Nrf2 是微小 RNA-27b-3p (microRNA-27b-3p, miR-27b-3p) 的下游靶基因^[6], 后者不仅与 DR 的发生和发展相关, 还参与糖脂代谢、调节葡萄糖耐量及胰岛素敏感性^[7-9]。在糖尿病小鼠模型中发现利拉鲁肽可

促进 Nrf2 及下游靶基因表达增加,可能对 Nrf2 起到激活和保护作用^[10]。因此,推测利拉鲁肽可能通过调节 miR-27b-3p/Nrf2 减轻代谢记忆损伤。本研究拟探讨 miR-27b-3p/Nrf2 对人 RPE 细胞代谢记忆损伤的影响及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 RPE 细胞系 ARPE-19 购自上海翼和应用生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 青-链霉素(美国 HyClone 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);蛋白 Marker(美国 Thermo 公司);胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(德国 PAN 公司);D-葡萄糖、BSA 粉剂(美国 Sigma 公司);Bluge-LoopTM miRNA qRT-PCR Starter Kit、miR-27b-3p/U6 引物(广东锐博生物科技有限公司);TB GreenTM Premix Ex TaqTM、PrimeScriPtTM RT Reagent Kit with gDNA(日本 TaKaRa 公司);Nrf2、NQO1、HO-1、 β -actin PCR 扩增引物,兔抗人 β -actin 多克隆抗体(上海生工生物工程股份有限公司);慢病毒载体 miR-27b-3p 抑制剂(上海吉凯基因化学技术有限公司);RIPA 蛋白裂解液、Trizol 细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、脱脂奶粉、HRP 标记的羊抗兔二抗(EM-35111-01)、HRP 标记的羊抗鼠二抗(EM-35110-02)(北京依玛博科技有限公司);核蛋白提取试剂盒、荧光衰减封片剂(含 DAPI)(北京索莱宝科技有限公司);超强显色液(美国 Genview 公司);PVDF 膜(美国 Merck 公司);兔抗人 Nrf2 单克隆抗体(ab62352)、兔抗人 NQO1 多克隆抗体(ab80588)、兔抗人 HO-1 多克隆抗体(ab13243)、Alexa fluor 标记羊抗兔多克隆抗体 IgG(ab150083)(英国 Abcam 公司);鼠抗人 H3 多克隆抗体(100005-MM01,北京义翘神州科技股份有限公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8,CCK-8)(上海碧云天生物科技有限公司);二氢乙锭(dihydroethidium,DHE)/PD-MY 003(美国 MCE 生物科技有限公司);利拉鲁肽(大连美仑生物技术有限公司)。7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜(BX53,日本 Olympus 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组处理 将 ARPE-19 细胞株置于含有 10%胎牛血清、100 IU/ml(商品单位)青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中培养,待细胞生长至 80%融合时用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,加入培

养基制备细胞悬液并接种于培养板中,将细胞置于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基中培养 6 d 作为正常对照组;于 30 mmol/L 高糖培养基中培养 3 d 后,换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为代谢记忆组;经慢病毒 miR-27b-3p 抑制剂转染成功,将其置于 30 mmol/L 葡萄糖培养基培养 3 d 后换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为 miR-27b-3p 抑制剂组;细胞于 30 mmol/L 高糖+利拉鲁肽培养基培养 3 d 后换成 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基继续培养 3 d 作为利拉鲁肽组。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增生率 调整细胞密度为 2×10^4 个/ml,按每孔 200 μ l 置于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,加入过滤除菌后的 D-葡萄糖溶液,调整培养基糖浓度为 5.5、25、30、35、40 mmol/L,并设置无细胞培养基作为空白组,培养 3 d 后加入 CCK-8 试剂 10 μ l/孔继续孵育 2 h,采用多功能酶标仪在 450 nm 波长处读取吸光度(absorbance,A)值,以细胞增生率降至接近正常对照组一半的糖浓度为最适高糖浓度。此外,将细胞分为正常对照组、代谢记忆组和利拉鲁肽组(10、20、30 nmol/L),即细胞分别置于培养基糖浓度为 5.5 mmol/L、30 mmol/L 和 30 mmol/L+不同浓度利拉鲁肽中培养 3 d,细胞活力检测操作步骤同上,选取细胞活力最佳组为最适利拉鲁肽给药浓度。随后将细胞分为正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽组(20 nmol/L)于 96 孔板中培养,6 d 后根据上述步骤检测 A 值并计算各组细胞增生率。细胞增生率 = $(A_{\text{检测组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$ 。

1.2.3 慢病毒 miR-27b-3p 转染细胞 构建含有嘌呤霉素抗性基因的慢病毒载体 miR-27b-3p 抑制剂(1×10^8 TU/ml),取原液 10 μ l 加入 90 μ l 培养基配成稀释液,ARPE-19 常规培养并以 4×10^4 个/ml 细胞悬液 100 μ l 接种于 96 孔板,8 h 后加入慢病毒稀释液 4、8、12、16 μ l 及 HitransG P 增强剂,使感染复数(multiplicity of infection,MOI),即感染时病毒与细胞数量的比值梯度达到 10、20、30、40,转染 96 h,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)表达丰度较高时用荧光显微镜观察,转染效率为 80%左右且细胞生长良好组所对应的最适 MOI 和转染条件即为后续实验依据。配制嘌呤霉素,使终质量浓度为 1 μ g/ml。将细胞分为正常对照组、miR-27b-3p 对照组和 miR-27b-3p 抑制剂组,调整细胞密度为 5×10^5 个/ml 接种于培养瓶中,转染 72 h 后慢病毒转染效率达 80%且细胞生长状态良好,加入嘌呤霉素,筛选转染成功、含抗性基因的细胞,未被转染细胞大量破裂死亡,继续培养 24 h 后收集细

胞传代。将转染细胞诱导为代谢记忆空载病毒模型、代谢记忆病毒模型,并设置正常对照组、代谢记忆组进行后续实验。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 水平 调整细胞密度为 3×10^5 个/孔并置于 6 孔板中分组处理培养 6 d,收集各组细胞后使用 Trizol 提取 RNA,引物序列见表 1。参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ 实时荧光定量 PCR 检测 Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 水平,以 β -actin 为内对照,反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火/延伸 34 s,40 个循环。根据 Bluge-Loop™ miRNA qRT-PCR 试剂盒说明书进行 miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 检测,以 U6 为内源性对照,反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 2 s,60 °C 退火/延伸 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。

表 1 逆转录 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of reverse transcription PCR

引物名称	引物序列
Nrf2	正向:5'-ATCAACTACCCGTTTCGAGAAG-3' 反向:5'-ACTTGGTCATGTCGATTCATA-3'
NQO1	正向:5'-AGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGG-3' 反向:5'-AATATCACAAAGGTCTGCCGCTCC-3'
HO-1	正向:5'-CCTCCCTGTACCACATCTATGT-3' 反向:5'-GCTCTTCTGGGAAGTAGACAG-3'
β -actin	正向:5'-CTCGCCTTTGCCGATCC-3' 反向:5'-GAATCCTTCTGACCCATGCC-3'
miR-27b-3p	正向:5'-GCGCGTTCACAGTGGCTAAG-3' 反向:5'-AGTGCAGGGTCCGAGGATT-3'
U6	正向:5'-AGAGAAGATTAGCATGCCCCCTG-3' 反向:5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'

注:PCR:聚合酶链式反应;Nrf:核因子 E2 相关因子;NQO:醌氧化还原酶;HO:血红素加氧酶; β -actin: β -肌动蛋白;miR:微小 RNA

Note: PCR: polymerase chain reaction; Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD (P) H ehydrogenase [quinone]; HO: heme oxygenase; miR: microRNA

1.2.5 Western blot 法检测 Nrf2 核蛋白和总蛋白表达水平 调整细胞密度为 5×10^5 个/孔,置于培养皿中分组培养 6 d,收集各组细胞并在预冷 RIPA 裂解液和核蛋白试剂盒中分别提取总蛋白和核蛋白并配置成 5 倍蛋白上样缓冲液。取等蛋白量缓冲液在 SDS-PAGE 中电泳并转印至 PVDF 膜上,经脱脂牛奶封闭后与 Nrf2、H3 和 β -actin 抗体(均 1:1 000 稀释)稀释液在 4 °C 下孵育过夜,充分漂洗后加入二抗(1:1 000)在室温下孵育 2 h,加入 ECL 混合液,暗室曝光、显影。 β -actin 和 H3 蛋白水平分别作为总蛋白及核蛋白的内参。采

用 ImageJ 软件分析各目的条带的灰度值。

1.2.6 细胞免疫荧光染色检测 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达水平 调整细胞密度为 3×10^4 个/孔,在专用爬片培养 6 d,收集爬片后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 1% Triton X-100 破膜 15 min,加入 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,加入 Nrf2、NQO1 和 HO-1 抗体(1:500)稀释液,4 °C 孵育过夜,充分漂洗后在室温下加入荧光二抗(1:500)避光孵育 2 h。置于载玻片上,将荧光猝灭剂覆盖表面,暗室中于正置荧光显微镜下观察并拍照,每片不少于 6 个视野(200 倍),采用 ImageJ 软件分析目的蛋白荧光强度。

1.2.7 DHE 检测细胞活性氧含量 将细胞以 4×10^4 个/孔接种于 12 孔板中分组培养 6 d 后去除培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 3 次,将配制好的 2 μ mol/L DHE 反应液 1 ml 加入细胞中,继续培养 30 min 后 PBS 洗涤 3 次,在倒置荧光显微镜下任意选取 6 个视野(100 倍),采用 ImageJ 分析活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)荧光强度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 6.0 作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组各指标总体比较采用单因素方差分析,事后多重比较,方差齐时采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时采用 Dunnett-T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖浓度及药物浓度筛选

CCK-8 法检测结果显示,正常对照组和 25、30、35、40 mmol/L 高糖组的细胞增生率分别为 1.000 ± 0.000 、 0.832 ± 0.040 、 0.582 ± 0.042 、 0.548 ± 0.048 、 0.444 ± 0.031 ,组间总体比较差异有统计学意义($F = 115.611, P < 0.001$),其中 25、30、35、40 mmol/L 高糖组细胞增生率均低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);葡萄糖浓度为 30 mmol/L 时细胞增生率明显下降,选择最低有效葡萄糖浓度 30 mmol/L 进行后续实验(图 1A)。正常对照组、高糖组和利拉鲁肽 10、20、30 nmol/L 组细胞增生率分别为 1.000 ± 0.000 、 0.480 ± 0.030 、 0.445 ± 0.021 、 0.621 ± 0.023 、 0.562 ± 0.025 ,组间总体比较差异有统计学意义($F = 303.883, P < 0.001$),其中高糖组细胞增生率低于利拉鲁肽 20 nmol/L、30 nmol/L 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);利拉鲁肽 20 nmol/L 组细胞增生率最高,因此选择利拉鲁肽 20 nmol/L 为最佳浓度(图 1B)。

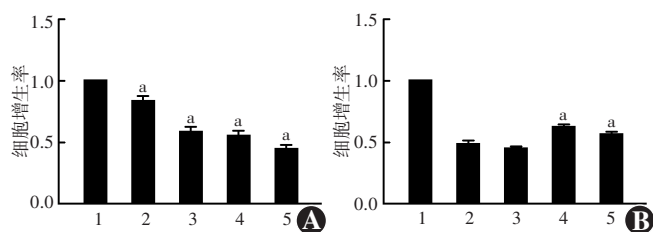


图 1 不同葡萄糖和利拉鲁肽浓度干预下人 RPE 细胞增生率的比较 A:不同葡萄糖浓度干预下人 RPE 细胞增生率比较 $F = 115.611, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 25 mmol/L 高糖组; 3: 30 mmol/L 高糖组; 4: 35 mmol/L 高糖组; 5: 40 mmol/L 高糖组 B: 不同利拉鲁肽浓度干预高糖诱导的人 RPE 细胞增生率比较 $F = 303.883, P < 0.001$. 与高糖组比较, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: 利拉鲁肽 10 mmol/L 组; 4: 利拉鲁肽 20 mmol/L 组; 5: 利拉鲁肽 30 mmol/L 组

Figure 1 Comparison of human RPE cell proliferation rate treated with different glucose and liraglutide concentrations A: Comparison of human RPE cell proliferation rate treated with different glucose concentrations $F = 115.611, P < 0.001$. Compared with normal control group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: normal control group; 2: 25 mmol/L high glucose group; 3: 30 mmol/L high glucose group; 4: 35 mmol/L high glucose group; 5: 40 mmol/L high glucose group B: Comparison of human RPE cell proliferation rate induced by high glucose with different liraglutide concentrations $F = 303.883, P < 0.001$. Compared with high glucose group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: normal control group; 2: high glucose group; 3: Liraglutide 10 mmol/L group; 4: Liraglutide 20 mmol/L group; 5: Liraglutide 30 mmol/L group

2.2 慢病毒转染条件筛选

在荧光显微镜下观察 GFP 绿色荧光表达的细胞, 转染条件为 miR-27b-3p 对照组 MOI = 40、miR-27b-3p 抑制剂组 MOI = 30 时荧光最强, 此为最佳转染条件 (图 2A)。miR-27b-3p 抑制剂组慢病毒载体包含嘌呤霉素抗性基因, 慢病毒转染 72 h 加入 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素继续培养至 96 h, 筛选已转染成功的细胞, GFP 表达效率超过 80% (图 2B)。

2.3 转染后各组 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 和蛋白表达量比较

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 正常对照组、代谢记忆组、miR-27b-3p 对照组、miR-27b-3p 抑制剂组 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 850.815, 329.653, 876.195, 439.192$, 均 $P < 0.001$), 其中代谢记忆组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量高于正常对照组, Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量均低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); miR-27b-3p 抑制剂组 miR-27b-3p mRNA 相对表达量明显低于 miR-27b-3p 对照组, Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量均高于 miR-27b-3p 对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

代谢记忆组 Nrf2 总蛋白、核蛋白表达条带均较正常对照组减弱, miR-27b-3p 抑制剂组各条带较 miR-

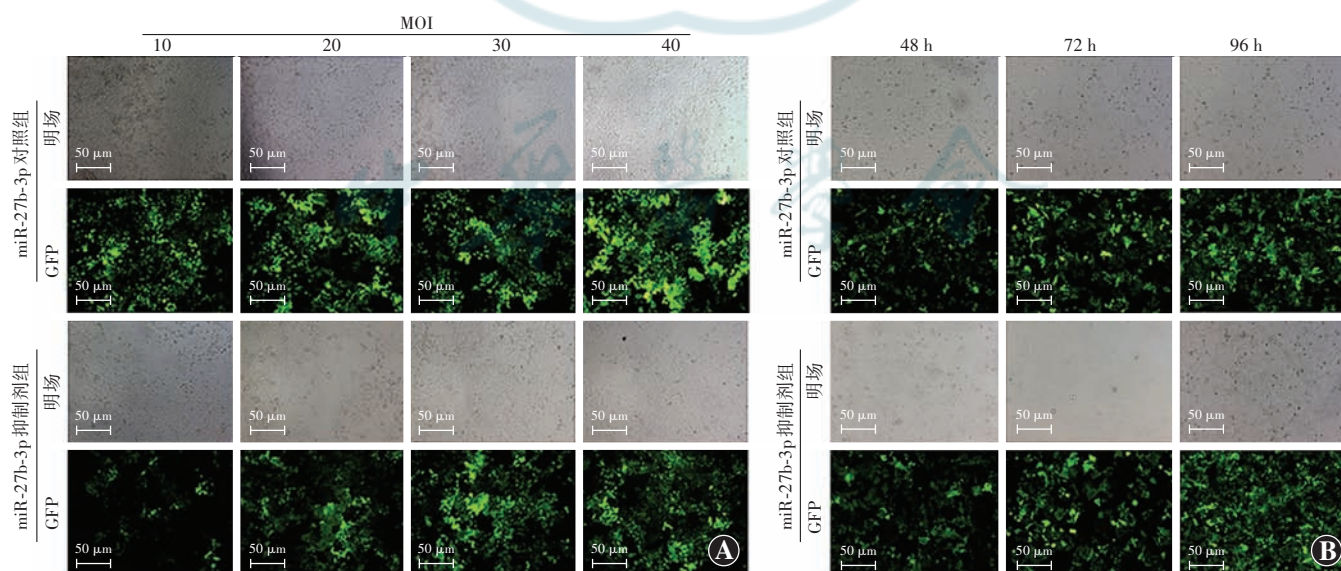


图 2 慢病毒 miR-27b-3p 转染细胞荧光图 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) A: MOI: 10、20、30、40 条件下人 RPE 细胞转染慢病毒 miR-27b-3p 抑制剂和 miR-27b-3p 对照组的明场和 GFP 绿色荧光图 B: 人 RPE 细胞转染慢病毒 miR-27b-3p 抑制剂和 miR-27b-3p 对照组 48、72、96 h 后的明场和 GFP 绿色荧光图 MOI: 感染复数; miR: 微小 RNA; GFP: 绿色荧光蛋白

Figure 2 Cell fluorescence images of miR-27b-3p lentivirus transfection ($\times 200$, bar = 50 μm) A: Bright field and GFP green fluorescence images of human RPE cells transfected with miR-27b-3p-inhibitor and miR-27b-3p-control lentivirus in MOI (10, 20, 30, 40) B: Bright field and GFP green fluorescence images of human RPE cells transfected with miR-27b-3p-inhibitor and miR-27b-3p-control lentivirus at 48, 72, and 96 hours after transfection

MOI: multiplicity of infection; miR: microRNA; GFP: green fluorescent protein

表 2 各组细胞 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of miR-27b-3p, Nrf2, NQO1, and HO-1 mRNA relative expressions among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	miR-27b-3p	Nrf2	NQO1	HO-1
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	1.881±0.034 ^a	0.432±0.032 ^a	0.420±0.024 ^a	0.409±0.056 ^a
miR-27b-3p 对照组	3	1.683±0.088	0.401±0.044	0.497±0.053	0.386±0.046
miR-27b-3p 抑制剂组	3	0.111±0.008 ^b	1.576±0.091 ^b	1.575±0.023 ^b	1.427±0.041 ^b
F 值		850.815	329.653	876.195	439.192
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a $P<0.01$;与 miR-27b-3p 对照组相比,^b $P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett-T3 检验及 LSD-t 检验) miR:微小 RNA;Nrf:核因子 E2 相关因子;NQO:醌氧化还原酶;HO:血红素加氧酶

Note: Compared with normal control group, ^a $P<0.01$; compared with miR-27b-3p control group, ^b $P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett-T3 test and LSD-t test) miR: microRNA; Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD(P)H dehydrogenase[quinone]; HO: heme oxygenase

27b-3p 对照组明显增强(图 3)。正常对照组、代谢记忆组、miR-27b-3p 对照组、miR-27b-3p 抑制剂组 Nrf2 总蛋白、核蛋白相对表达水平总体比较差异均有统计学意义($F=86\ 757.666$ 、 $11\ 504.213$, 均 $P<0.001$), 其中代谢记忆组 Nrf2 总蛋白、核蛋白相对表达水平较正常对照组下降, miR-27b-3p 抑制剂组较 miR-27b-3p 对照组明显上升, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$) (表 3)。

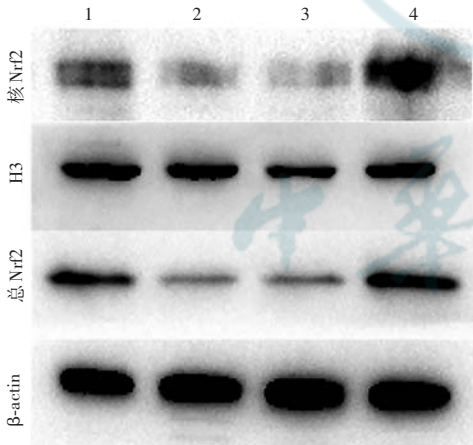


图 3 Western blot 检测总蛋白及核蛋白 Nrf2 蛋白电泳图 1: 正常对照组; 2: 代谢记忆组; 3: miR-27b-3p 对照组; 4: miR-27b-3p 抑制剂 Nrf:核因子 E2 相关因子; H3: 组蛋白 3

Figure 3 Electrophoretogram of total and nuclear Nrf2 protein expressions by Western blot 1: normal control group; 2: metabolic memory group; 3: miR-27b-3p control group; 4: miR-27b-3p inhibitor group Nrf: nuclear factor-E2-related factor; H3: histone 3

细胞免疫荧光图显示 Nrf2、NQO1、HO-1 在细胞核细胞质均可见表达, 相较正常对照组及 miR-27b-3p 抑

制剂组, 代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 细胞免疫荧光强度均明显减弱(图 4)。正常对照组、代谢记忆组、miR-27b-3p 对照组、miR-27b-3p 抑制剂组 Nrf2、NQO1、HO-1 细胞免疫荧光强度总体比较, 差异均有统计学意义($F=464.178$ 、 83.959 、 37.831 , 均 $P<0.001$), 其中代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度均低于正常对照组, miR-27b-3p 抑制剂组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度均高于 miR-27b-3p 对照组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$) (表 4)。

表 3 各组细胞 Nrf2 总蛋白和核蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of relative expressions of total and nuclear Nrf2 protein among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	总蛋白 Nrf2	核蛋白 Nrf2
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	0.175±0.001 ^a	0.538±0.003 ^a
miR-27b-3p 对照组	3	0.237±0.002	0.690±0.008
miR-27b-3p 抑制剂组	3	1.266±0.006 ^b	2.990±0.036 ^b
F 值		86 757.666	11 504.213
P 值		<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a $P<0.01$;与 miR-27b-3p 对照组相比,^b $P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett-T3 检验) Nrf:核因子 E2 相关因子;miR:微小 RNA

Note: Compared with normal control group, ^a $P<0.01$; compared with miR-27b-3p control group, ^b $P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett-T3 test) Nrf: nuclear factor-E2-related factor; miR: microRNA

2.4 利拉鲁肽干预后各组 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 及蛋白表达量比较

利拉鲁肽干预后正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽组 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=300.050$ 、 657.987 、 33.092 、 500.841 , 均 $P<0.001$), 其中代谢记忆组 miR-27b-3p 相对表达量高于正常对照组, Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量低于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$); 利拉鲁肽组 miR-27b-3p 相对表达量低于代谢记忆组, Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量高于代谢记忆组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$) (表 5)。

与正常对照组相比, 代谢记忆组 Nrf2 总蛋白、核蛋白条带较弱, 利拉鲁肽组 Nrf2 总蛋白、核蛋白条带明显增强(图 5)。正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽

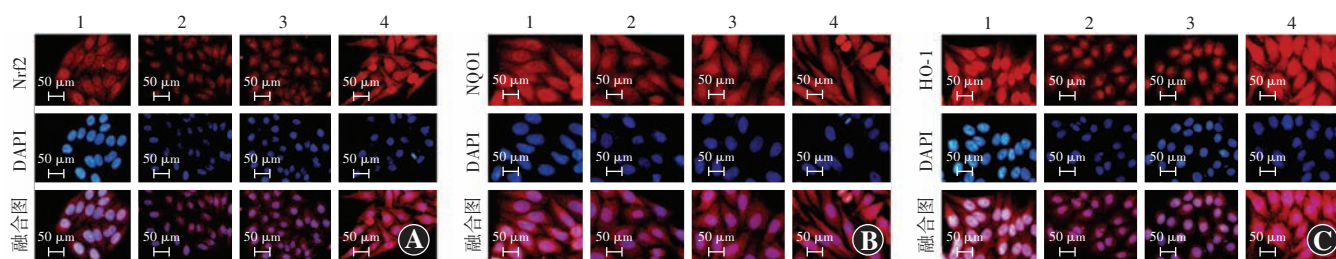


图 4 各组细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 免疫荧光图 (×200, 标尺 = 50 μm) 相较正常对照组及 miR-27b-3p 抑制剂组, 代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 细胞免疫荧光强度均明显减弱 Nrf2、NQO1、HO-1 表达于胞核胞质中, 呈红色荧光; 细胞核呈蓝色荧光 (含 DAPI) A: Nrf2 B: NQO1 C: HO-1 1: 正常对照组 2: 代谢记忆组; 3: miR-27b-3p 对照组; 4: miR-27b-3p 抑制剂组 Nrf: 核因子 E2 相关因子; NQO: 醌氧化还原酶; HO: 血红素加氧酶
Figure 4 Cellular immunofluorescence pictures of Nrf2, NQO1, and HO-1 in different groups (×200, bar = 50 μm) Compared with normal control group and miR-27b-3p inhibitor group, the immunofluorescence intensity of Nrf2, NQO1 and HO-1 in metabolic memory group was significantly decreased. Nrf2, NQO1, and HO-1 were expressed in cytoplasm and nuclei, showing red fluorescence. The nuclei showed blue fluorescence (containing DAPI) A: Nrf2 B: NQO1 C: HO-1 1: normal control group 2: metabolic memory group 3: miR-27b-3p control group 4: miR-27b-3p inhibitor group Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD(P)H dehydrogenase[quinone]; HO: heme oxygenase

表 4 各组 Nrf2、NQO1、HO-1 细胞免疫荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of Nrf2, NQO1, and HO-1 cellular immunofluorescence intensity among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Nrf2	NQO1	HO-1
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	0.796±0.033 ^a	0.735±0.080 ^a	0.765±0.058 ^a
miR-27b-3p 对照组	3	0.686±0.079	0.721±0.102	0.849±0.056
miR-27b-3p 抑制剂组	3	1.622±0.042 ^b	1.261±0.043 ^b	1.028±0.055 ^b
F 值		464.178	83.959	37.831
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与 miR-27b-3p 对照组相比, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett-T3 检验) Nrf: 核因子 E2 相关因子; NQO: 醌氧化还原酶; HO: 血红素加氧酶; miR: 微小 RNA

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with miR-27b-3p control group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett-T3 test) Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD(P)H dehydrogenase[quinone]; HO: heme oxygenase; miR: microRNA

组 Nrf2 总蛋白、核蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 12.391, 714, 458.465$, 均 $P < 0.001$), 其中代谢记忆组 Nrf2 总蛋白、核蛋白相对表达量均低于正常对照组, 利拉鲁肽组 Nrf2 总蛋白、核蛋白相对表达量均较代谢记忆组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 6)。

细胞免疫荧光染色可见, Nrf2、NQO1、HO-1 在细胞核、细胞质中均有表达, 与正常对照组相比, 代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光均减弱, 代谢记忆组荧光均明显增强 (图 6)。正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度总体比较差异均有统计学意义 ($F = 10.392, 44.351, 47.217$, 均 $P < 0.01$), 其中代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1

荧光强度均低于正常对照组, 利拉鲁肽组荧光强度均高于代谢记忆组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 7)。

2.5 利拉鲁肽干预后各组细胞增生率及 ROS 含量比较

CCK-8 法检测结果显示, 正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽组细胞增生率总体比较差异有统计学意义 ($F = 73.209, P < 0.001$), 其中与正常对照组相比, 代谢记忆组细胞增生率下降, 利拉鲁肽组细胞增生率高于代谢记忆组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 8)。DHE 检测结果显示, 代谢记忆组 ROS 荧光强度较正常对照组及利拉鲁肽组增强 (图 7)。正常对照组、代谢记忆组、利拉鲁肽组 ROS 荧光强度总体比较差异有统计学意义 ($F = 739.668, P < 0.001$), 其中代谢记忆组 ROS 相对含量高于正常对照组和利拉鲁肽组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 8)。

表 5 利拉鲁肽干预后各组细胞 miR-27b-3p、Nrf2、NQO1、HO-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of miR-27b-3p, Nrf2, NQO1, and HO-1 mRNA relative expressions in liraglutide-treated cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-27b-3p	Nrf2	NQO1	HO-1
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	1.747±0.105 ^a	0.287±0.047 ^a	0.568±0.047 ^a	0.389±0.064 ^a
利拉鲁肽组	3	0.489±0.033 ^b	1.142±0.026 ^b	0.991±0.120 ^b	1.435±0.030 ^b
F 值		300.050	657.987	33.092	500.841
P 值		<0.001	<0.001	0.038	<0.001

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与代谢记忆组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验及 Dunnett-T3 检验) miR: 微小 RNA; Nrf: 核因子 E2 相关因子; NQO: 醌氧化还原酶; HO: 血红素加氧酶
 Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with metabolic memory group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test and Dunnett-T3 test) miR: microRNA; Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD(P)H dehydrogenase[quinone]; HO: heme oxygenase

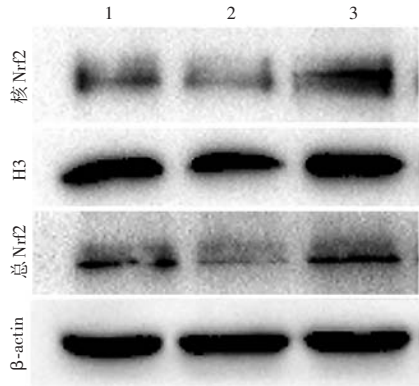


图 5 利拉鲁肽干预后各组总蛋白及核蛋白 Nrf2 蛋白电泳图
1: 正常对照组; 2: 代谢记忆组; 3: 利拉鲁肽组 β-actin; β-肌动蛋白; Nrf: 核因子 E2 相关因子; H3: 组蛋白 3
Figure 5 Electrophoretogram of total and nuclear Nrf2 protein expressions after liraglutide treatment 1: normal control group; 2; metabolic memory group; 3: liraglutide group Nrf: nuclear factor-E2-related factor; H3: histone 3

表 7 利拉鲁肽干预后各组细胞 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparison of Nrf2, NQO1, and HO-1 cellular immunofluorescence intensity after liraglutide treatment among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Nrf2	NQO1	HO-1
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	0.900±0.048 ^a	0.844±0.064 ^a	0.771±0.077 ^a
利拉鲁肽组	3	1.013±0.060 ^b	1.040±0.018 ^b	0.988±0.022 ^b
F 值		10.392	44.351	47.217
P 值		0.002	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与代谢记忆组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett-T3 检验) Nrf: 核因子 E2 相关因子; NQO: 醌氧化还原酶; HO: 血红素加氧酶

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with metabolic memory group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Dunnett-T3 test) Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD (P) H dehydrogenase [quinone]; HO: heme oxygenase

表 6 利拉鲁肽干预后各组细胞 Nrf2 总蛋白和核蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of total and nuclear Nrf2 protein expressions after liraglutide treatment among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	总蛋白 Nrf2	核蛋白 Nrf2
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	0.247±0.009 ^a	0.732±0.028 ^a
利拉鲁肽组	3	1.156±0.010 ^b	1.625±0.058 ^b
F 值		12 391.714	458.465
P 值		<0.001	<0.001

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与代谢记忆组相比, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-t 检验及 Dunnett-T3 检验) Nrf: 核因子 E2 相关因子

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with metabolic memory group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test and Dunnett-T3 test) Nrf: nuclear factor-E2-related factor

表 8 利拉鲁肽干预后各组细胞增殖率及 ROS 相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Comparison of proliferation rate and ROS content of liraglutide-treated cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞增殖率	ROS 相对含量
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000
代谢记忆组	3	0.786±0.021 ^a	4.182±0.132 ^a
利拉鲁肽组	3	0.842±0.026 ^b	3.723±0.224 ^b
F 值		73.209	739.668
P 值		<0.001	<0.001

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与代谢记忆组相比, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-t 检验及 Dunnett-T3 检验) ROS: 活性氧

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with metabolic memory group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test and Dunnett-T3 test) ROS: reactive oxygen species

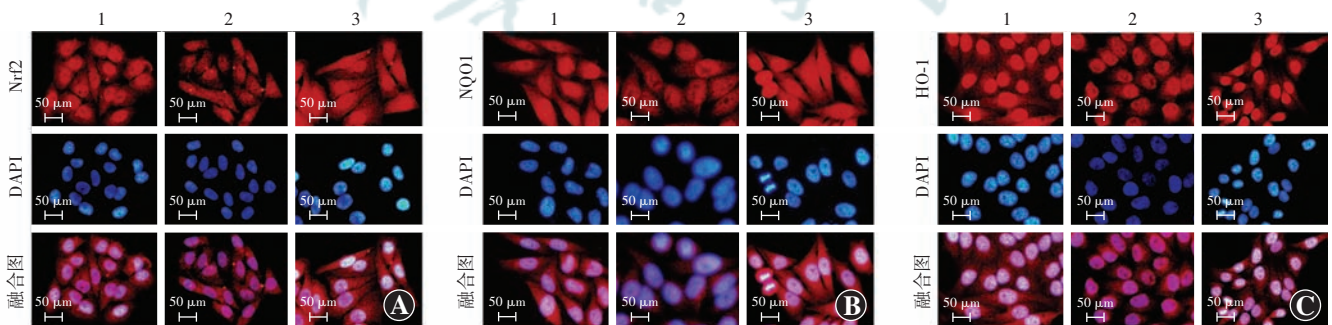


图 6 利拉鲁肽干预后各组 Nrf2、NQO1、HO-1 免疫荧光图 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) 与正常对照组相比, 代谢记忆组 Nrf2、NQO1、HO-1 荧光均减弱, 利拉鲁肽组荧光均明显增强 Nrf2、NQO1、HO-1 表达于细胞核、细胞质中, 呈红色荧光; 细胞核呈蓝色荧光 (含 DAPI) A: Nrf2 B: NQO1 C: HO-1 1: 正常对照组; 2: 代谢记忆组; 3: 利拉鲁肽组 Nrf: 核因子 E2 相关因子; NQO: 醌氧化还原酶; HO: 血红素加氧酶

Figure 6 Nrf2, NQO1, and HO-1 immunofluorescence images of liraglutide-treated cells ($\times 200$, bar = 50 μm) Compared with the normal control group, the fluorescence of Nrf2, NQO1 and HO-1 in metabolic memory group was decreased, and the fluorescence of the liraglutide group was significantly enhanced. Nrf2, NQO1, and HO-1 were expressed in cytoplasm and nuclei, showing red fluorescence. The nuclei showed blue fluorescence (containing DAPI) A: Nrf2 B: NQO1 C: HO-1 1: normal control group; 2; metabolic memory group; 3: liraglutide group Nrf: nuclear factor-E2-related factor; NQO: NAD (P) H dehydrogenase [quinone]; HO: heme oxygenase

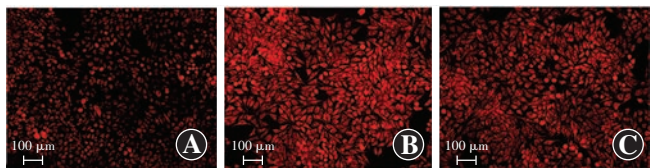


图7 利拉鲁肽干预后各组细胞 ROS 荧光图 ($\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 代谢记忆组 ROS 荧光强度较正常对照组及利拉鲁肽组增强 A: 正常对照组 B: 代谢记忆组 C: 利拉鲁肽组

Figure 7 ROS fluorescence images of liraglutide-treated cells ($\times 100$, bar = $100 \mu\text{m}$) The fluorescence intensity of ROS was stronger in metabolic memory group than in normal control group and liraglutide group A: Normal control group B: Metabolic memory group C: Liraglutide group

3 讨论

代谢记忆是高血糖的延续性损伤现象,参与氧化应激、糖代谢异常等病理过程^[11-12]。本研究发现代谢记忆引起人 RPE 细胞中 ROS 大量堆积,ROS 是氧自由基的主要成分之一。大量研究已证实氧自由基可引起氧化应激损伤,抑制细胞的正常代谢功能及活性,其机制涉及 Nrf2、NF- κ B、GLP1R、PI3K/AKT 等相关通路,其中 Nrf2 是体内强抗氧化因子,可激活 HO-1、NQO1、GCLC 等相关抗氧化靶基因,降低细胞中 ROS 水平,清除代谢产物^[13-16]。本研究发现人 RPE 细胞在去除高糖后,Nrf2 表达仍受到抑制,对下游靶基因激活作用减弱。Bollong 等^[17]研究发现,Nrf2 在细胞质中主要与 Keap1 结合失活,受到内外源刺激后立即与 Keap1 解离,并转入胞核内激活下游靶基因,完成信号转导。本研究证实 Nrf2 在细胞核、细胞质中均有表达,代谢记忆可抑制总蛋白及核蛋白 Nrf2 表达水平。细胞形成代谢记忆后,细胞核内 Nrf2 含量减少,对 HO-1 和 NQO1 的激活作用也相应减弱。HO-1 是清除氧自由基的主要酶之一,NQO1 主要清除外源性代谢产物,当 HO-1 和 NQO1 表达水平不足以清除 ROS 及糖代谢产物时,将引起氧化应激反应,RPE 细胞的代谢功能也随之减弱。

在长期高血糖状态下,糖与蛋白质或脂质结合产生难以降解的代谢产物,刺激细胞释放氧自由基,形成代谢记忆后仍继续促进糖代谢产物堆积,导致细胞持续性氧化损伤,影响细胞代谢功能^[18-20]。因此,在代谢记忆形成过程中,促进 Nrf2 表达并维持活性状态可能有利于清除代谢产物、对抗代谢记忆损伤。本实验评估了代谢记忆对 miR-27b-3p 的作用,结果证明 miR-27b-3p 与 Nrf2 呈现相反趋势,可见 miR-27b-3p 极有可能通过调节 Nrf2 参与代谢记忆形成。通过慢病毒转染抑制 miR-27b-3p 表达,结果验证了在人 RPE 细

胞中 Nrf2 是 miR-27b-3p 的下游靶基因之一。在此基础上,本研究发现抑制 miR-27b-3p 不仅解除了代谢记忆对细胞核、细胞质中 Nrf2 表达的抑制,也促进了 Nrf2 对 HO-1 和 NQO1 的激活,一定程度上保护细胞免受代谢记忆损伤。

临床随访病例显示利拉鲁肽可延缓 DR 进展^[21]。本研究发现采用利拉鲁肽干预高糖诱导的 RPE 细胞,细胞活性有所恢复,所释放的 ROS 也相应减少,可见利拉鲁肽具有清除氧自由基,改善细胞增生活力的作用,因此,我们推测利拉鲁肽具有抗氧化作用,其机制可能与 miR-27b-3p/Nrf2 途径相关。本研究结果证实了这一假设,利拉鲁肽干预后细胞中 miR-27b-3p 表达受到抑制,对下游靶基因 Nrf2 的负性调节作用减弱,促进细胞核、细胞质中 Nrf2 表达,这可能与减少 Nrf2 与 Keap1 结合或促进两者解离相关^[17]。利拉鲁肽提高了细胞核中 Nrf2 含量,也相应增强了对下游靶基因 NQO1、HO-1 的激活作用。随着 NQO1、HO-1 表达增加,细胞清除高糖和代谢记忆所产生的代谢产物能力增强,修复并改善细胞功能及活性,缓解了细胞的持续性氧化损伤。清除氧自由基还可保护 RPE 细胞的线粒体酶活性^[22],因此利拉鲁肽不仅具有降糖作用,还可通过 miR-27b-3p/Nrf2 途径激活抗氧化通路,改善人 RPE 代谢功能,达到抑制代谢记忆形成的目的。

综上所述,在人 RPE 细胞中 Nrf2 是 miR-27b-3p 的下游靶基因之一,代谢记忆对人 RPE 细胞的损伤可能与 miR-27b-3p 上调促进了 Nrf2 失活或抑制其解离相关。而利拉鲁肽可逆转这一现象,其抗氧化机制可通过抑制 miR-27b-3p 同时提高细胞核中 Nrf2 含量进而逆转细胞代谢记忆现象。因此,miR-27b-3p 和 Nrf2 有可能成为 DR 的治疗靶点,本研究也为利拉鲁肽的临床治疗提供理论基础及实验依据。

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 赖巧玲: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、统计分析、分析/解释数据、起草文章; 谢婷: 实施研究、采集数据、统计分析; 黄焱: 指导实验、文章审阅、修改及定稿

参考文献

- [1] Chen Z, Miao F, Paterson AD, et al. Epigenomic profiling reveals an association between persistence of DNA methylation and metabolic memory in the DCCT/EDIC type 1 diabetes cohort [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113 (21): E3002-3011 [2022-12-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27162351/>. DOI: 10.1073/pnas.1603712113.
- [2] Xu Z, Wei Y, Gong J, et al. NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice [J]. Diabetologia, 2014, 57 (1): 204-213. DOI: 10.1007/s00125-013-3093-8.
- [3] Liu B, Li CP, Wang WQ, et al. Lignans extracted from *Eucommia*

- ulmoides Oliv.* Protects against AGEs-induced retinal endothelial cell injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39 (5) : 2044–2054. DOI: 10.1159/000447900.
- [4] Jadeja RN, Jones MA, Abdelrahman AA, et al. Inhibiting microRNA-144 potentiates Nrf2-dependent antioxidant signaling in RPE and protects against oxidative stress-induced outer retinal degeneration [J/OL]. *Redox Biol*, 2020, 28 : 101336 [2022 - 12 - 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31590045/>. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101336.
- [5] Chen N, Li Y, Huang N, et al. The Nrf2 activator MIND4-17 protects retinal ganglion cells from high glucose-induced oxidative injury [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (10) : 7204–7213. DOI: 10.1002/jcp.29619.
- [6] Signorelli SS, Volsi GL, Pitruzzella A, et al. Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in patients with peripheral artery disease and their potential relationship with oxidative stress [J]. *Angiology*, 2016, 67 (10) : 945–950. DOI: 10.1177/0003319716638242.
- [7] Zampetaki A, Willeit P, Burr S, et al. Angiogenic microRNAs linked to incidence and progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2016, 65 (1) : 216–227. DOI: 10.2337/db15-0389.
- [8] Xie Z, Chang C, Zhou Z. Molecular mechanisms in autoimmune type 1 diabetes: a critical review [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 47 (2) : 174–192. DOI: 10.1007/s12016-014-8422-2.
- [9] Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes [J]. *Pediatr Diabetes*, 2018, 19 (3) : 346–353. DOI: 10.1111/ptdi.12597.
- [10] Liu J, Wei L, Wang Z, et al. Protective effect of Liraglutide on diabetic retinal neurodegeneration via inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J/OL]. *Neurochem Int*, 2020, 133 : 104624 [2022 - 12 - 15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31794832/>. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104624.
- [11] Liao Y, Gou L, Chen L, et al. NADPH oxidase 4 and endothelial nitric oxide synthase contribute to endothelial dysfunction mediated by histone methylations in metabolic memory [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 115 : 383–394. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.017.
- [12] Genuth S, Sun W, Cleary P, et al. Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64 (1) : 266–278. DOI: 10.2337/db14-0215.
- [13] Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1 [J]. *Nature*, 2018, 556 (7699) : 113–117. DOI: 10.1038/nature25986.
- [14] Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (7) : 363–383. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- [15] Alicic RZ, Cox EJ, Neumiller JJ, et al. Incretin drugs in diabetic kidney disease: biological mechanisms and clinical evidence [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17 (4) : 227–244. DOI: 10.1038/s41581-020-00367-2.
- [16] Aikawa R, Nawano M, Gu Y, et al. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt [J]. *Circulation*, 2000, 102 (23) : 2873–2879. DOI: 10.1161/01.cir.102.23.2873.
- [17] Bollong MJ, Lee G, Coukos JS, et al. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling [J]. *Nature*, 2018, 562 (7728) : 600 – 604. DOI: 10.1038/s41586-018-0622-0.
- [18] Koska J, Saremi A, Howell S, et al. Advanced glycation end products, oxidation products, and incident cardiovascular events in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41 (3) : 570–576. DOI: 10.2337/dc17-1740.
- [19] Russell RD, Hu D, Greenaway T, et al. Skeletal muscle microvascular-linked improvements in glycemic control from resistance training in individuals with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40 (9) : 1256–1263. DOI: 10.2337/dc16-2750.
- [20] Schalkwijk CG, Stehouwer C. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100 (1) : 407–461. DOI: 10.1152/physrev.00001.2019.
- [21] Tsapas A, Avgerinos I, Karagiannis T, et al. Comparative effectiveness of glucose-lowering drugs for type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173 (4) : 278–286. DOI: 10.7326/M20-0864.
- [22] Cheng YS, Linetsky M, Li H, et al. 4-Hydroxy-7-oxo-5-heptenoic acid lactone can induce mitochondrial dysfunction in retinal pigmented epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160 : 719–733. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.009.

(收稿日期:2023-04-20 修回日期:2023-08-24)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。(4)对论文的诚信负责。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)