

【实验研究】

陆博 马立威 王欣玲 冯莉 江陵峰 王春霞 张劲松 阎启昌

【摘要】 目的 检测 miR-138 在年龄相关性白内障晶状体组织中的表达情况,并探讨 miR-138 对人晶状体上皮细胞增殖和凋亡的影响及其可能的靶基因。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测年龄相关性白内障患者(白内障组)与正常对照组中 SIRT1 因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)的表达水平。向人晶状体上皮细胞系(SRA01/1)转染 miR-138 模拟物、miR-138 抑制物、抑制物阴性对照物,采用 RT-qPCR 检测 SIRT1 的 mRNA 表达水平;转染 72 h 后细胞暴露于 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2$ 1 h, Caspase-3 活性检测试剂盒报告基因检测验证 miR-138 与 SIRT1 的靶向关系。**结果** 与正常对照组相比,白内障患者晶状体上皮细胞中 miR-138 表达水平升高($P<0.001$),SIRT1 的 mRNA 表达(0.32 ± 0.06)显著下降($P<0.001$);相对于模拟物转染的 SIRT1 的 mRNA(0.42 ± 0.05)及蛋白(0.46 ± 0.05)表达水平均明显降低,Caspase-3 活性

(3.24 ± 0.17) 明显升高(均为 $P < 0.05$); 相对于抑制物阴性对照组, miR-138 抑制物组的 SIRT1 的 mRNA (2.95 ± 0.13) 及蛋白 (1.98 ± 0.12) 表达水平均明显升高, Caspase-3 活性 (0.42 ± 0.05) 均明显下降(均为 $P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因检测确证 SIRT1 为 miR-138 的直接作用靶点。结论 miR-138 在年龄相关性白内障患者晶状体囊膜中高表达, miR-138 通过靶向性负性调控 SIRT1 表达, 促进晶状体上皮细胞凋亡。

【关键词】 miR-138; 沉默信息调节因子 1; 年龄相关性白内障; 凋亡; 增殖

【中图分类号】 R776.1

沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 参与细胞凋亡的调节并与细胞应激状态下的存活有关^[1]。MicroRNAs (miRNAs) 是一类微小非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 序列的 3' 非翻译区互补结合, 从而负性调控靶基因的转录与功能, 现有研究证明 miRNAs 参与多种生理及病理过程^[2-3]。已有研究证明多种 miRNAs 与年龄相关性白内障的发病相关, 因此 miRNAs 可能成为白内障诊断和治疗的新靶点^[4]。生物学软件预测 miR-138 可能与 SIRT1 存在靶向关系, 因此本研究检测 miR-138 和 SIRT1 在年龄相关性白内障晶状体组织中的表达水平, 并进而阐明 miR-138 靶向作用 SIRT1 调控人晶状体上皮细胞增殖、凋亡, 揭示 miR-138 在年龄相关性白内障发病过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 2016 年 1 月至 8 月在中国医科大学附属第四医院诊断为年龄相关性白内障并行超声乳化白内障吸出术的患者(排除其他眼部疾病), 于术中收集新鲜晶状体前囊膜标本(白内障组) 46 例 46 眼, 其中男 21 例, 女 25 例, 年龄 53 ~ 72 (61.23 ± 9.41) 岁。新鲜透明晶状体前囊膜(正常对照组) 24 例 24 眼来源于中国医科大学附属第四医院眼科眼库, 供体无白内障、青光眼、虹膜炎等眼部疾病, 其中男 9 例, 女 15 例, 年龄 49 ~ 68 (59.12 ± 6.17) 岁。所有标本取材后立即保存于液氮中。本实验经中国医科大学附属第四医院伦理委员会批准, 研究对象知情同意并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 体积分数 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司), 100×10^3 U · L⁻¹ 青霉素和 100 g · L⁻¹ 链霉素、miR-138 的上下游引物和 RNU6B 引物、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司), DMEM 培养液、Trizol 试剂、 100 g · L⁻¹ NuPAGE™ Bis-Tris 预制凝胶、Lipofectamine® RNAiMAX 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司), TaqMan™ MicroRNA 反转录试剂盒、TaqMan™ MicroRNA 试剂盒、TaqMan Universal Master Mix II 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司), PrimerScript™ 反转录试剂盒(日本 Takara 公司), SIRT1 引物及 β -actin 引物(上海生物工程公司), RIPA 蛋白裂解液(美国 Pierce 公司), 兔抗人 SIRT1、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、Caspase-3 活性检测试剂盒(美国 Abcam 公司), HRP 标记羊抗兔 IgG (H + L) 二抗, pGL3-Promoter 载体、双荧光素酶报

告检测系统(美国 Promega 公司), 采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(RT-PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司)进行 RT-qPCR 反应。

1.3 细胞培养 人晶状体上皮细胞系(SRA01/04) 由美国 Doheny 眼科研究所 Yi-sin Liu 教授惠赠。培养于含有体积分数 10% 胎牛血清、含 100×10^3 U · L⁻¹ 青霉素和 100 g · L⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.4 RT-qPCR 检测 采用 Trizol 试剂提取细胞内总 RNA, 反转录获得 microRNA cDNA, 检测 miR-138 的表达量, 以 RNU6B 作为内参。反转录获得 cDNA, 检测 SIRT1 的 mRNA 表达水平, β -actin 作为内参。SIRT1 引物序列: 上游引物: 5'-TCGGCAGGTC-CCTTTGTCATCC-3', 下游引物: 5'-TGCAGGT-CAACTGGTGTCTCGT-3'; β -actin 引物序列: 上游引物: 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3', 下游引物: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。经过 3 次独立实验, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法定量分析相对表达量。

1.5 Western blotting 检测 采用加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白, 定量蛋白浓度后, 每孔 40 μ g 蛋白上样, 100 V 电压下 90 min 进行电泳分离蛋白, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜, 50 g · L⁻¹ 脱脂奶粉溶液室温下封闭 1 h, 兔抗 SIRT1 (1 : 1000)、兔抗 GAPDH (1 : 2000) 4 °C 下孵育过夜。HRP 标记羊抗兔 IgG (H + L) 二抗 (1 : 2500) 室温下孵育 2 h。ECL 发光反应后, 采用 Image J 软件定量分析蛋白条带。

1.6 细胞转染 将 SRA01/04 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 每孔 1000 个, 分为 4 组: 模拟物阴性对照组、miR-138 模拟物组、抑制物阴性对照组和 miR-138 抑制物组。24 h 后进行转染, 模拟物阴性对照组: 每孔加入 1.5 μ L Lipofectamine® RNAiMAX + 0.7 μ L 模拟物阴性对照物 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); miR-138 模拟物组: 每孔加入 1.5 μ L Lipofectamine® RNAiMAX + 0.7 μ L miR-138 模拟物 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 抑制物阴性对照组: 每孔加入 1.5 μ L Lipofectamine® RNAiMAX + 0.7 μ L 抑制物阴性对照物 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); miR-138 抑制物组: 每孔加入 1.5 μ L Lipofectamine® RNAiMAX + 0.7 μ L miR-138 抑制物 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。转染完成 72 h 后, 进行相应后续实验。

1.7 双荧光素酶报告基因检测 以人 cDNA 文库为模板, 扩增获得含有预测 miR-138 结合区域的野生型 SIRT1 3'-UTR 序列, 将此片段克隆入荧光素酶

报告载体获得野生型荧光素酶报告基因载体(pGL3-SIRT1-野生型)。在野生型 SIRT1 3'-UTR 片段突变预测的 miR-138 结合区域,将此片段克隆入荧光素酶报告载体同一位置,获得突变型荧光素酶报告基因载体(pGL3-SIRT1-突变型)。接种于 24 孔细胞培养板后 24 h,按照 Lipofectamine® RNAiMAX 转染试剂盒说明书向 SRA01/04 细胞中共转染荧光素酶报告基因载体和 miR-138 抑制物,分为四组:pGL3-SIRT1-野生型 + 抑制物阴性对照组、pGL3-SIRT1-野生型 + miR-138 抑制物组、pGL3-SIRT1-突变型 + 抑制物阴性对照组、pGL3-SIRT1-突变型 + miR-138 抑制物组。转染完成后 72 h,采用双荧光素酶报告检测系统检测各组的相对荧光素酶活性,以海肾荧光素酶活性作为内参,重复 3 次独立实验。

1.8 Caspase-3 活性检测 采用 Caspase-3 活性检测试剂盒检测 Caspase-3 活性。SRA01/04 细胞转染后 72 h,暴露于 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$ 1 h 后,按照说明书使用裂解液与冰上裂解细胞,离心,取上清,使用 BCA 法测定蛋白浓度。96 孔板中依次加入 50 μL 待测样品,50 μL 缓冲液,0.5 μL 二硫苏糖醇,5 μL Caspase-3 催化底物天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸-对硝基苯胺(DEVd-p-NA),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,使用酶标仪在 405 nm 波长处检测吸光度(A)值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。以对照组 Caspase-3 活性为 1,Caspase-3 相对活性为(实验组 A 值 - 空白孔 A 值)/(对照组 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.9 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差表示,用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,两组均数比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-138 在年龄相关性白内障患者晶状体囊膜中的表达 RT-qPCR 检测 miR-138 的表达水平结果表明,相对于正常对照组,白内障组 miR-138 表达(3.64 ± 0.19)水平显著升高($P < 0.001$,图 1)。

图1 RT-qPCR 检测 miR-138 在各组晶状体囊膜中的表达。与正常对照组比较,白内障组 miR-138 表达水平显著升高。与正常对照组比较,** $P < 0.001$

2.2 SIRT1 在年龄相关性白内障患者晶状体囊膜中的表达 RT-qPCR 检测 SIRT1 mRNA 表达水平结果表明,与正常对照组比较,白内障组 SIRT1 mRNA 表达水平(0.32 ± 0.06)显著下降($P < 0.001$,图 2)。

2.3 miR-138 调控人晶状体上皮细胞中 SIRT1 表达 RT-qPCR 检测 SIRT1 的 mRNA 表达水平,Western blotting 检测 SIRT1 蛋白表达水平,发现与模拟物阴性对照组比较,miR-138 模拟物组 SIRT1 的 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.001$,图 3),蛋白表达水平亦明显降低($P < 0.05$,图 4A-4B)。与抑制物阴性对照组比较,miR-138 抑制物组 SIRT1 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.001$,图 3),蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$,图 4C-4D)。

图2 RT-qPCR 检测 SIRT1 mRNA 在各组晶状体囊膜中的表达。与正常对照组比较,白内障组 SIRT1 mRNA 表达水平显著下降。与正常对照组比较,** $P < 0.001$

图3 RT-qPCR 检测各组 SIRT1 mRNA 表达水平。1:模拟物阴性对照组;2:miR-138 模拟物组;3:抑制物阴性对照组;4:miR-138 抑制物组。与对照组与比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$

2.4 SIRT1 为 miR-138 的靶基因 首先利用在线生物软件 miRanda 预测 SIRT1 可能为 miR-138 的靶基因(图 5A),然后采用双荧光素酶报告基因检测系统确证 SIRT1 为 miR-138 的靶基因。结果表明,与 pGL3-SIRT1-野生型 + 抑制物阴性对照组比较,共转染 pGL3-SIRT1-野生型 + miR-138 抑制物

组相对荧光素酶活性均显著升高(均为 $P < 0.001$, 图 5B)。与 pGL3-SIRT1-突变型 + 抑制物阳性对照组比较,共转染 pGL3-SIRT1-突变型 + miR-138 抑制物组相对荧光素酶活性均无明显变化(均为 $P > 0.05$,图 5B),证明 SIRT1 为 miR-138 的直接作用靶点。

2.5 miR-138 对人晶状体上皮细胞凋亡的调控
各组 Caspase-3 活性检测结果表明,与模拟物阴性对照组比较,miR-138 模拟物组 Caspase-3 活性明显升高($P < 0.001$,图 6);与抑制物阴性对照组比较,miR-138 抑制物组 Caspase-3 活性明显降低($P < 0.001$,图 6),表明 miR-138 促进人晶状体上皮细胞凋亡。

图 4 各组 SRA01/04 细胞中的 SIRT1 的表达。A:各组 SIRT1 蛋白表达水平(1:模拟物阴性对照组;2:miR-138 模拟物组);B:SIRT1 蛋白灰度值比较(1:模拟物阴性对照组;2:miR-138 模拟物组);C:各组 SIRT1 蛋白表达水平(1:抑制物阴性对照组;2:miR-138 抑制物组);D:SIRT1 蛋白灰度值比较(1:抑制物阴性对照组;2:miR-138 抑制物组)。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$

图 5 双荧光素酶报告基因检测系统确证 SIRT1 为 miR-138 的靶基因。A:在线生物软件 miRanda 预测野生型 SIRT1 的 miR-138 结合区域及突变的 SIRT1 (SIRT1-mut)的 miR-138 结合区域的序列;B:各组 SRA01/04 的荧光素酶活性。与对照组比较,** $P < 0.001$

图 6 各组 SRA01/04 细胞的 Caspase-3 活性。1:模拟物阴性对照组;2:miR-138 模拟物组;3:抑制物阴性对照组;4:miR-138 抑制物组。与对照组比较,** $P < 0.001$

3 讨论

miRNAs 是一类内源性非编码 RNA,由 21 ~ 25

个核苷酸组成,通过与靶基因的 3'-UTR 互补配对,抑制靶基因翻译或介导靶基因降解而调节基因表达^[5]。miRNAs 参与多种生理及病理过程,包括:细胞生长和凋亡、激素分泌、老化、器官发育和免疫应答等与许多疾病的发生发展密切相关^[2,6]。已有研究表明 miRNAs 在眼部发育及眼科疾病中发挥重要作用,如白内障、青光眼、年龄相关性黄斑变性、脉络膜新生血管^[7-9],可能成为眼科疾病诊断、预防及治疗的新靶

点。本研究阐明了 miRNA-138 靶向调控 SIRT1 影响年龄相关性白内障发生和发展的作用机制。

本研究发现 miR-138 在年龄相关性白内障患者中表达水平显著升高,提示 miR-138 可能参与年龄相关性白内障的发病及发展。miRNAs 在白内障中的异常表达已有相关报道。Qin 等^[10]报道 miR-125b 在年龄相关性白内障晶状体囊膜中低表达并抑制人晶状体上皮细胞凋亡。另有研究表明 miR-421^[11]和 miR-133b^[4]在年龄相关性白内障患者晶状体上皮细胞中表达下降,miR-15a 和 miR-161 表达升高^[12]。miR-138 被证实多种肿瘤组织中低表达,发挥抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡的作用^[13-15]。已知 miRNAs 的表达及功能具有高度的组织特异性和时间特异性,因此 miR-138 在人晶状体上皮细胞中的作用及机制仍需进一步研究。

本研究发现 SIRT1 在年龄相关性白内障患者中表达水平显著下降,提示 SIRT1 可能参与年龄相关性白内障的发病及发展,并与 miR-138 存在相互作用。SIRT1 基因编码蛋白为 NAD⁺ 依赖性蛋白去乙酰化酶,属于人 Sirtuin 蛋白家族,在各物种均具有高度保守性,几乎存在于机体所有类型细胞中^[16]。SIRT1 能够乙酰化 p53 从而降低 p53 诱导细胞凋亡的能力^[17]。Calapre 等^[18]研究表明激活 SIRT1 可以促进 p53 的乙酰化,从而抑制 DNA 损伤引起的细胞凋亡。在成骨细胞中过表达 SIRT1 能够抑制低氧诱导的凋亡^[1]。SIRT1 在多种病理条件下通过抑制炎症、凋亡和氧化应激发挥保护作用。然而 SIRT1 在白内障中的作用机制仍不明确。

本研究利用在线生物软件 TargetScan 预测 SIRT1 可能为 miR-138 的靶基因,然后向晶状体上皮细胞系瞬时转染 miR-138 模拟物上调 miR-138, SIRT1 表达水平显著下降;瞬时转染 miR-138 抑制物下调 miR-138, SIRT1 表达水平显著上升,进一步证实 miR-138 调节晶状体上皮细胞中 SIRT1 表达, SIRT1 和 miR-138 之间可能存在靶向关系。最后采用双荧光素酶报告基因检测系统确证 SIRT1 为 miR-138 的直接作用靶点。随后向晶状体上皮细胞系分别转染 miR-138 模拟物和 miR-138 抑制物后暴露于 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 1 h 诱导凋亡,结果发现过表达 miR-138 组 Caspase-3 活性明显升高,抑制 miR-138 组 Caspase-3 活性显著下降,说明 miR-138 诱导晶状体上皮细胞凋亡。以上结果表明,在年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中 miR-138 通过靶向性抑制 SIRT1 表达,促进晶状体上皮细胞凋亡,从而在白内障发生发展中发挥重要作用。

综上所述,miR-138 在年龄相关性白内障患者晶状体囊膜中高表达,miR-138 通过靶向性负性调控 SIRT1 表达,促进晶状体上皮细胞凋亡,从而在白内障发生发展中发挥关键性作用,随着研究的进展,miR-138 有望成为白内障诊断和治疗的新靶点。

参考文献

- [1] ZHOU L, WANG SI, MOON YJ, KIM KM, LEE KB, PARK BH, et al. Overexpression of SIRT1 prevents hypoxia-induced apoptosis in osteoblast cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (3): 2969-2975.
- [2] ZHOU X, JIAO Z, JI J, LI S, HUANG X, LU X, et al. Characterization of mouse serum exosomal small RNA content: The origins and their roles in modulating inflammatory response [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (26): 42712-42727.
- [3] WU XH, HUANG PC, QIN HX. miR-320 regulate proliferation and transfer of cervical cancer cells by targeting Rab11 [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2017, 34 (10): 885-888. 吴向晖, 黄鹏, 秦海霞. miR-320 靶向 Rab11 对宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2017, 34 (10): 885-888.
- [4] ZHANG F, MENG W, TONG B. Down-regulation of microRNA-133b suppresses apoptosis of lens epithelial cell by up-regulating BCL2L2 in age-related cataracts [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4139-4145.
- [5] FILIPOWICZ W, BHATTACHARYA SN, SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs; are the answers in sight [J]? *Nat Rev Genet*, 2008, 9 (2): 102-114.
- [6] ZHUANG L, WANG X, WANG Z, MA X, HAN B, ZOU H, et al. MicroRNA-23b functions as an oncogene and activates AKT/GSK3 β /beta-catenin signaling by targeting ST7L in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (5): e2804.
- [7] BERBER P, GRASSMANN F, KIEL C, WEBER BH. An eye on age-related macular degeneration: the role of MicroRNAs in disease pathology [J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21 (1): 31-43.
- [8] DUNMIRE JJ, LAGOUROS E, BOUHENNI RA, JONES M, EDWARD DP. MicroRNA in aqueous humor from patients with cataract [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 108 (1): 68-71.
- [9] LI X, ZHAO F, XIN M, LI G, LUNA C, LI G, et al. Regulation of intraocular pressure by microRNA cluster miR-143/145 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 915.
- [10] QIN Y, ZHAO J, MIN X, WANG M, LUO W, WU D, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842 (12 Pt A): 2439-2447.
- [11] LI G, SONG H, CHEN L, YANG W, NAN K, LU P. TUG1 promotes lens epithelial cell apoptosis by regulating miR-421/caspase-3 axis in age-related cataract [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 356 (1): 20-27.
- [12] LI Y, LIU S, ZHANG F, JIANG P, WU X, LIANG Y. Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (2): 2405-2410.
- [13] LUO J, CHEN P, XIE W, WU F. MicroRNA-138 inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting Sirt1 [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38 (2): 1067-1074.
- [14] YUAN Z, MO H, MO L, HE J, WU Z, LIN X. Suppressive effect of microRNA-138 on the proliferation and invasion of osteosarcoma cells via targeting SIRT1 [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13 (6): 3417-3423.
- [15] LI H, SHENG Y, ZHANG Y, GAO N, DENG X, SHENG X. MicroRNA-138 is a potential biomarker and tumor suppressor in human cervical carcinoma by reversely correlated with TCF3 gene [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145 (3): 569-576.
- [16] YONAMINE CY, PINHEIRO-MACHADO E, MICHALANI ML, ALVES-WAGNER AB, ESTEVES JV, FREITAS HS, et al. Resveratrol improves glycemic control in type 2 diabetic obese mice by regulating glucose transporter expression in skeletal muscle and liver [J]. *Molecules*, 2017, 22 (7): 1180.
- [17] GU X, GU B, LV X, YU Z, WANG R, ZHOU X, et al. 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 with tumor necrosis factor- α protects against rheumatoid arthritis by promoting p53 acetylation-mediated apoptosis via Sirt1 in synoviocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (10): e2423.
- [18] CALAPRE L, GRAY ES, KURDYKOWSKI S, DAVID A, DESCARGUES P, ZIMAN M. SIRT1 activation mediates heat-induced survival of UVB damaged Keratinocytes [J]. *BMC Dermatol*, 2017, 17 (1): 8.