

## 【实验研究】

唐飞 甘露 吕仲平

**作者简介:**唐飞,男,1985年7月出生,四川成都人,硕士。研究方向:白内障。联系电话:15881131022;E-mail:shanxiao8318870@163.com;ORCID:0000-0003-3563-804X

**通信作者:**甘露,女,1987年4月出生,四川成都人,硕士。研究方向:白内障。E-mail:562910416@qq.com;ORCID:0000-0002-3186-5213

**收稿日期:**2019-12-19  
**修回日期:**2020-03-11  
**本文编辑:**盛丽娜

**作者单位:**611731 四川省成都市,四川大学华西医院上锦南府医院眼科(唐飞);610000 四川省成都市,华西第四医院眼科(甘露);610000 四川省成都市,四川大学华西医院眼科(吕仲平)

**1.1 实验材料** hLECs SRA01/04 细胞购于上海拜力生物科技有限公司;DMEM 低糖培养基、胎牛血清和青霉素、链霉素溶液购于美国 Hyclone 公司;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 购于美国 Sigma 公司;Lipofectamine™ 2000、TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司;兔抗半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3)、P21、10-11 易位酶 2 (ten-eleven translocation 2, TET2) 抗体以及山羊抗兔 IgG 购于美国 Abcam 公司;pcDNA3.1-LINC00473、pcDNA3.1、si-NC、si-LINC00473、si-TET2、miR-NC、miR-210mimics、anti-miR-NC、anti-miR-210、WT-LINC00473、MUT-LINC00473、WT-TET2、MUT-TET2 由上海吉玛制药有限公司提供;cDNA 合成试剂盒、SYBR Green Real-time PCR 试剂盒购于日本 Toyobo 公司;细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购于上海贝博生物;丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 以及谷胱甘

肽过氧化物酶(glutathion peroxidase, GSH-Px)活性检测试剂盒购于北京索莱宝科技公司。

**1.2 细胞培养和模型构建** SRA01/04 细胞采用 DMEM 低糖培养基(含体积分数 10% 胎牛血清和  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  青-链霉素)在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内培养。当细胞融合度达 90% 时消化传代。细胞培养液内加入  $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  后于培养箱内培养 24 h, 建立  $\text{H}_2\text{O}_2$  细胞损伤模型。

**1.3 细胞分组处理** 将 SRA01/04 细胞按照每孔  $200 \times 10^3$  个细胞接种于 6 孔板, 当细胞融合度达到 50% 时按照脂质体转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书将 pcDNA3.1-LINC00473、pcDNA3.1 分别转染至 SRA01/04 细胞, 经  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导后, 依次标记为  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1-LINC00473}$  组、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1}$  组。同时设置 Con 组(正常对照组)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  组(仅建立  $\text{H}_2\text{O}_2$  细胞损伤模型)。

**1.4 实验方法** 收集细胞, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, CCK-8 法检测各组细胞存活率, 严格按照试剂盒说明书步骤检测各组细胞中 MDA 含量以及 SOD、GSH-Px 活性。同时进行以下实验。

**1.4.1 集落形成实验** 将对数生长期的各组细胞按照每孔 200 个接种于 6 孔板, 米字型方向轻轻晃动平板使细胞分散均匀, 培养 7 d 后观察细胞生长情况, 当出现肉眼可见的细胞克隆时终止培养, 弃去细胞培养基, 固定和染色后, 显微镜下观察拍照, 计算克隆形成数。实验重复 3 次。

**1.4.2 RT-qPCR 检测** 利用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 以 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA, 利用 SYBR Green Realtime PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。以 GAPDH 为内源性参照, 运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析 LINC00473 的表达水平。引物序列为: LINC00473 上游引物:  $5' - \text{GATGGAAAGGAGGGAAGG} - 3'$ , 下游引物:  $5' - \text{CACAGTGGGTCCAGGGTT} - 3'$ ; GAPDH 上游引物:  $5' - \text{GAAGGTGAAGTCCGAGT} - 3'$ , 下游引物:  $5' - \text{GATGGCAACAATATCCACTT} - 3'$ 。

**1.4.3 Western blot 检测** 收集各组细胞获得细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 按照每泳道  $40\text{ }\mu\text{g}$  蛋白样品上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用湿法转膜将已分离的细胞蛋白转移至硝酸纤维素膜, 洗膜后, 将膜置于  $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂牛奶中封闭 1 h, 洗膜后将膜置于稀释的一抗(Caspase-3 为 1 : 500, P21 为 1 : 1000, TET2 为 1 : 250)溶液中室温孵育 2 h, 洗膜后, 将膜置于稀释的二抗(1 : 2000)溶液中室温孵育 1 h。加入化学发光试剂避光显色后, Quantity One 软件分析蛋白表达水平。

**1.4.4 双荧光素酶报告基因实验** 等线生物信息学分析工具 starBase 进行靶基因预测, 发现 LINC00473 与 miR-210 之间存在结合位点, targetscan 进行靶基因预测, 发现 miR-210 与 TET2 之间存在结合位点, 采用双荧光素酶报告基因实验验证

LINC00473 与 miR-210、miR-210 与 TET2 靶向调控关系。将 WT-LINC00473、MUT-LINC00473、WT-TET2、MUT-TET2 分别与 miR-NC、miR-210 mimics 共转染至 SRA01/04 细胞, 转染 48 h 后, 测定各组细胞荧光素酶活性。同时将 pcDNA3.1、pcDNA3.1-LINC00473、si-NC、si-LINC00473 分别转染 hLECs SRA01/04 细胞, 以 U6 为内参, 参照 1.4.2 方法检测 miR-210 的表达水平。将 miR-NC、miR-210 mimics、anti-miR-NC、anti-miR-210 分别转染 SRA01/04 细胞, 以 GAPDH 为内参, 参照 1.4.2 方法检测 TET2 的表达水平。引物序列为: miR-210 上游引物:  $5' - \text{GTGCAGGGTCCGAGGT} - 3'$ , 下游引物:  $5' - \text{CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA} - 3'$ ; U6 上游引物:  $5' - \text{CTCGCTTCGGCAGCACA} - 3'$ , 下游引物:  $5' - \text{AACGCTTCACGAATTTGCGT} - 3'$ ; TET2 上游引物:  $5' - \text{TAAGTGGGTGTTCCGAGA} - 3'$ , 下游引物:  $5' - \text{TCCGAGTAGAGTTTGTCTAGCC} - 3'$ 。

**1.4.5 LINC00473 调控 miR-210/TET2 分子轴影响  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 hLECs 增殖、凋亡以及氧化应激损伤** 为验证 LINC00473 是否通过调控 miR-210/TET2 分子轴进而影响  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 hLECs 增殖、凋亡以及氧化应激损伤, 将 pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC、pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210、pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC、pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 分别转染 SRA01/04 细胞, 经  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导后, 再次检测细胞存活率、凋亡率、克隆形成数、MDA 含量以及 SOD 和 GSH-Px 活性。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析, 所有结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间比较采用 SNK- $q$  检验。检验水准:  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 LINC00473 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 SRA01/04 细胞的影响** 与 Con 组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 SRA01/04 细胞 LINC00473 的表达水平显著降低, Caspase-3 和 P21 蛋白的表达显著升高, 细胞克隆形成数显著减少, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1}$  组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1-LINC00473}$  组 SRA01/04 细胞 LINC00473 的表达水平显著升高, Caspase-3 和 P21 蛋白的表达显著降低, 细胞克隆形成数显著增加, 细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。与 Con 组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 SRA01/04 细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性均显著降低, MDA 含量显著升高, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ); 与  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1}$  组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{pcDNA3.1-LINC00473}$  组 SRA01/04 细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性均显著升高, MDA 含量显著降

低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。见表1和表2。

**2.2 LINC00473 靶向调控 miR-210** starBase 预测发现,LINC00473 与 miR-210 之间存在部分连续互补的核苷酸序列,见图1。双荧光素酶报告实验结果显示,miR-NC 和 WT-LINC00473 共转染组 SRA01/04 细胞荧光素酶活性( $0.36 \pm 0.03$ )较 miR-210 mimics 和 WT-LINC00473 共转染组( $0.96 \pm 0.10$ )显著降低( $P < 0.05$ );miR-NC 和 MUT-LINC00473 共转染组 SRA01/04 细胞荧光素酶活性( $1.04 \pm 0.10$ )与 miR-210 mimics 和 MUT-LINC00473 共转染组( $0.99 \pm 0.10$ )相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。RT-qPCR 检测结果显示,上调 LINC00473 表达后,SRA01/04 细胞 miR-210 的表达水平( $0.23 \pm 0.02$ )

较正常 SRA01/04 细胞( $1.00 \pm 0.10$ )显著降低( $P < 0.05$ );干扰 LINC00473 表达后,SRA01/04 细胞 miR-210 的表达水平( $2.11 \pm 0.22$ )较正常 SRA01/04 细胞显著升高( $P < 0.05$ )。以上结果表明,LINC00473 靶向负调控 miR-210 表达。

表1 各组细胞中 LINC00473 的表达及 Caspase-3 和 P21 蛋白表达情况

组别	LINC00473	Caspase-3	P21
Con 组	$1.02 \pm 0.10$	$0.21 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.02$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	$0.30 \pm 0.03^*$	$0.75 \pm 0.07^*$	$0.89 \pm 0.09^*$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1 组	$0.27 \pm 0.03$	$0.78 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.09$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 组	$0.88 \pm 0.08^{\#}$	$0.30 \pm 0.03^{\#}$	$0.35 \pm 0.03^{\#}$

注:与 Con 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1 组比较, $^{\#}P < 0.05$

表2 LINC00473 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SRA01/04 细胞增殖、凋亡及 SOD、GSH-Px、MDA 表达的影响

组别	克隆形成数	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%	SOD/U · mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U · mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol · mL <sup>-1</sup>
Con 组	$146.01 \pm 13.22$	$100.16 \pm 10.21$	$8.16 \pm 1.01$	$88.25 \pm 5.57$	$167.27 \pm 13.57$	$52.11 \pm 4.53$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	$64.04 \pm 6.53^*$	$46.68 \pm 4.69^*$	$27.83 \pm 2.57^*$	$37.26 \pm 2.18^*$	$101.34 \pm 9.85^*$	$97.26 \pm 8.84^*$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1 组	$62.29 \pm 6.47$	$47.02 \pm 4.67$	$28.10 \pm 2.62$	$37.10 \pm 2.13$	$99.26 \pm 8.67$	$96.55 \pm 8.63$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 组	$130.13 \pm 12.68^{\#}$	$91.24 \pm 9.35^{\#}$	$13.58 \pm 1.41^{\#}$	$71.34 \pm 4.38^{\#}$	$149.26 \pm 12.68^{\#}$	$61.14 \pm 5.37^{\#}$

注:与 Con 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1 组比较, $^{\#}P < 0.05$

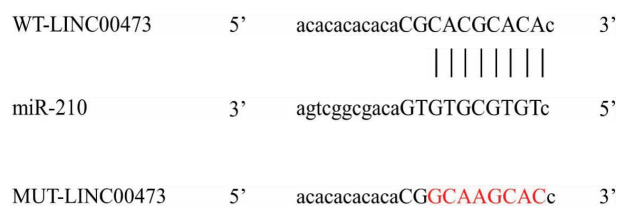


图1 LINC00473 靶向 miR-210

**2.3 过表达 miR-210 逆转 LINC00473 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SRA01/04 细胞增殖、凋亡及氧化损伤的影响**与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC 组 SRA01/

04 细胞中 miR-210 ( $1.01 \pm 0.10$ )、Caspase-3 蛋白 ( $0.31 \pm 0.03$ )和 P21 蛋白( $0.38 \pm 0.04$ )表达比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210 组 SRA01/04 细胞 miR-210 ( $1.89 \pm 0.17$ )、Caspase-3 蛋白 ( $0.66 \pm 0.07$ )和 P21 蛋白( $0.79 \pm 0.08$ )的表达水平均显著升高。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210 组的细胞克隆形成数显著减少,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高,SOD 和 GSH-Px 活性均显著降低,MDA 含量显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。见表3。

表3 过表达 miR-210 及抑制 TET2 对 SRA01/04 细胞增殖、凋亡及 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响

组别	克隆形成数	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%	SOD/U · mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U · mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol · mL <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC 组	$127.22 \pm 12.46$	$90.44 \pm 9.32$	$14.13 \pm 1.42$	$70.68 \pm 4.42$	$151.13 \pm 13.10$	$60.95 \pm 5.53$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210 组	$77.31 \pm 7.58^*$	$53.36 \pm 5.40^*$	$25.12 \pm 2.55^*$	$44.68 \pm 2.67^*$	$122.37 \pm 11.17^*$	$83.55 \pm 7.84^*$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC 组	$129.03 \pm 12.51$	$90.84 \pm 9.27$	$13.96 \pm 1.40$	$70.52 \pm 4.38$	$150.97 \pm 12.89$	$61.03 \pm 5.49$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 组	$68.12 \pm 7.03^{\#}$	$49.26 \pm 4.77^{\#}$	$27.14 \pm 2.62^{\#}$	$39.46 \pm 2.37^{\#}$	$108.65 \pm 10.03^{\#}$	$91.34 \pm 8.25^{\#}$

注:与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC 组比较, $^{\#}P < 0.05$

**2.4 miR-210 靶向调控 TET2** miR-210 与 TET2 之间存在部分连续互补的核苷酸序列,见图2。双荧光素酶报告实验结果显示,miR-NC 和 WT-TET2 共转染组 SRA01/04 细胞荧光素酶活性( $0.33 \pm 0.03$ )较 miR-210 mimics 和 WT-TET2 共转染组( $0.94 \pm 0.09$ )显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );miR-NC 和 MUT-TET2 共转染组 SRA01/04 细胞荧光素酶活性( $1.00 \pm 0.10$ )较 miR-210 mimics 和 MUT-TET2 共转染组( $0.96 \pm 0.09$ )变化不明显,差异无统

计学意义( $P > 0.05$ )。RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,上调 miR-210 表达后,SRA01/04 细胞 TET2 mRNA( $0.34 \pm 0.03$ )和蛋白( $0.20 \pm 0.02$ )的表达水平均较正常 SRA01/04 细胞 TET2 mRNA ( $1.01 \pm 0.10$ )和蛋白( $0.61 \pm 0.06$ )的表达水平显著降低;下调 miR-210 表达后,SRA01/04 细胞 TET2 mRNA( $1.88 \pm 0.18$ )和蛋白( $1.45 \pm 0.15$ )的表达水平均较正常 SRA01/04 细胞显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。提示 miR-210 靶向负调控



TET2 表达。

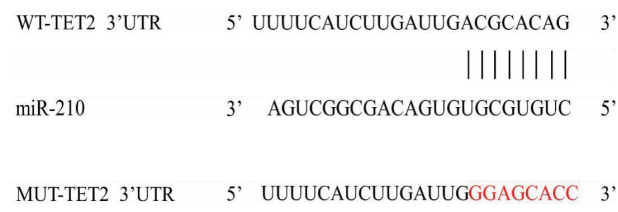


图2 miR-210 靶向 TET2

**2.5 抑制 TET2 逆转 LINC00473 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SRA01/04 细胞增殖、凋亡及氧化损伤的影响** 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC 组 TET2 质粒 (0.88 ± 0.08)、Caspase-3 蛋白 (0.29 ± 0.03)、P21 蛋白 (0.37 ± 0.03) 表达比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 组 SRA01/04 细胞 TET2 质粒 (0.24 ± 0.02) 表达显著降低, Caspase-3 蛋白 (0.72 ± 0.07) 和 P21 蛋白 (0.85 ± 0.08) 表达均显著升高。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC 组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 组细胞克隆形成数显著减少, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高, SOD 和 GSH-Px 活性显著降低, MDA 含量显著升高 (均为  $P < 0.05$ ), 见表 3。

3 讨论

白内障是全球致盲的主要眼病之一, 全球约 50% 的失明患者是由白内障引起的<sup>[10]</sup>。晶状体是由单层上皮细胞构成的透明器官, 氧化应激引起的 hLECs 损伤和凋亡是引发白内障的主要原因。本研究通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 hLECs 氧化应激损伤和凋亡, 探索与其相关的基因, 以期为基于 hLECs 防治白内障提供新的方法。

LINC00473 是乳腺癌预后的独立影响因素, 其高表达与乳腺癌患者的淋巴结转移、临床分期及预后较差有关, 抑制 LINC00473 表达可抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡<sup>[11]</sup>。LINC00473 在胶质瘤中表达上调, 干扰 LINC00473 可抑制胶质瘤细胞的增殖和肿瘤生长, 抑制胶质瘤进展<sup>[12]</sup>。本研究结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后 SRA01/04 细胞存活率和克隆形成能力均显著降低, P21 的表达显著升高, LINC00473 的表达水平显著降低; 上调 LINC00473 表达后, SRA01/04 细胞存活率和克隆形成能力均显著升高, 说明上调 LINC00473 表达可提高 SRA01/04 细胞的增殖能力。正常机体内存在 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶防御系统, 可清除自由基, 保护机体免受氧化应激损伤, 维持机体正常代谢活动。本研究结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后 SRA01/04 细胞脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高, SOD、GSH-Px 的活性显著降低, 而上调 LINC00473 可显著降低 MDA 含量, 提高 SOD 和 GSH-Px 活性。因此, LINC00473 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导

的 SRA01/04 细胞氧化应激损伤。同时本研究结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后 SRA01/04 细胞中 Caspase-3 的表达水平显著升高, 细胞凋亡率显著增加, 而上调 LINC00473 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞凋亡。以上结果表明, 上调 LINC00473 可促进细胞增殖, 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤和凋亡, 进而对 SRA01/04 细胞发挥保护作用。

有研究表明, miRNA 异常表达与晶状体发育、LECs 的凋亡、晶状体透明度降低以及白内障的发生关系密切<sup>[13]</sup>。为探讨 LINC00473 对 SRA01/04 细胞的保护作用机制, 本研究通过序列分析发现, miR-210 是 LINC00473 的潜在功能性靶基因之一。miR-210 在 hLECs 氧化损伤中表达上调, 且其在年龄相关性白内障患者晶状体组织中亦是高表达, miR-210 高表达可促进 LECs 凋亡<sup>[14-15]</sup>。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实, LINC00473 靶向负性调控 miR-210 表达, 过表达 miR-210 可逆转 LINC00473 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SRA01/04 细胞增殖、凋亡以及 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响。

TET2 是 TET 蛋白家族成员之一。有研究显示, TET2 参与病理条件下神经元细胞存活过程, 上调 TET2 对氧化应激介导的神经元损伤的细胞保护作用<sup>[16]</sup>。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实 miR-210 可靶向负性调控 TET2 表达, 进一步研究显示, 抑制 TET2 表达能逆转 LINC00473 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SRA01/04 细胞增殖、凋亡及 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响。提示 LINC00473 通过调控 miR-210/TET2 分子轴可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 hLECs 氧化应激损伤和凋亡。

综上所述, LINC00473 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 hLECs 中表达下调, 上调 LINC00473 表达通过调控 miR-210/TET2 分子轴可促进细胞增殖, 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤和凋亡, 进而对 hLECs 发挥保护作用, 为基于 hLECs 防治白内障提供了新的方向。

参考文献

[1] SHI Z, SU Y, WANG F, LIU P. Downregulation of microRNA-181a attenuates hydrogen peroxide-induced human lens epithelial cell apoptosis *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 6009-6015.

[2] FENG K, GUO H K. Eaf2 protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by Wnt signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2795-2802.

[3] XU X D, LI K R, LI X M, JIN Y, QIN J, YAN B. Long non-coding RNAs: new players in ocular neovascularization [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4493-505.

[4] SHEN Y, DONG L F, ZHOU R M, YAO J, SONG Y C, YANG H, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3): 537-548.

[5] SHI C, YANG Y, YU J, MENG F, ZHANG T, GAO Y. The long noncoding RNA LINC00473, a target of microRNA 34a, promotes tumorigenesis by inhibiting ILF2 degradation in cervical cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(11): 2157-2168.

[6] ZHOU W Y, ZHANG M M, LIU C, KANG Y, WANG J O, YANG X H. Long noncoding RNA LINC00473 drives the progression of pancreatic cancer via upregulating programmed death-lig-

- and 1 by sponging microRNA-195-5p [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23176-23189.
- [7] WU D, XU Y, ZOU Y, ZUO Q, HUANG S, WANG S, et al. Long noncoding RNA 00473 is involved in preeclampsia by LSD1 binding-regulated TFPI2 transcription in trophoblast cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 381-392.
- [8] BAI J, ZHENG Y, DONG L, CAI X, WANG G, LIU P. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation decreases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human lens epithelial cells [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253(11): 1933-1940.
- [9] MOK J W, CHANG D J, JOO C K. Antiapoptotic effects of anthocyanin from the seed coat of black soybean against oxidative damage of human lens epithelial cell induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(11): 1090-1098.
- [10] PASCOLINI D, MARIOTTI S P. Global estimates of visual impairment; 2010 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(5): 614-618.
- [11] BAI J, ZHAO W Y, LI W J, YING Z W, JIANG D Q. Long non-coding RNA LINC00473 indicates a poor prognosis of breast cancer and accelerates tumor carcinogenesis by competing endogenous sponging miR-497 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8): 3410-3420.
- [12] ZHANG Q, WANG G, XU L, YAO Z, SONG L. Long non-coding RNA LINC00473 promotes glioma cells proliferation and invasion by impairing miR-637/CDK6 axis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3896-3903.
- [13] 曹佳, 严瑾, 邵振彦, 花静, 颜崇淮. 姜黄素对铅氧化损伤大鼠的保护作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(12): 942-945.
- CAO J, YAN J, ZHEN Z Y, HUA J, YAN C H. Protective effect of curcumin on lead oxidative injury in rats [J]. *J Chin Appl Clin Pediatr*, 2019, 34(12): 942-945.
- [14] 王位, 马续祥, 陈卫东. 环黄芩醇对庆大霉素诱导小鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(8): 715-719.
- WANG W, MA X X, CHEN W D. Protective effect of cycloastragenol on acute kidney injury induced by gentamicin in mice [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2019, 36(8): 715-719.
- [15] LU B, CHRISTENSEN I T, MA L W, WANG X L, JIANG L F, WANG C X, et al. miR-24-p53 pathway evoked by oxidative stress promotes lens epithelial cell apoptosis in age-related cataracts [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5021-5028.
- [16] 谭钢, 吴安花, 邵毅, 吴恺, 邹雪香, 周颖. miR-210 靶向沉默 Bcl-2 诱导人晶状体上皮细胞凋亡 [J]. 眼科新进展, 2016, 36(8): 701-704, 708.
- TAN G, WU A H, SHAO Y, WU K, ZOU X X, ZHOU Y. miR-210 targeted silence Bcl-2 induces apoptosis of human lens epithelial cells [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(8): 701-704, 708.

## Effect of LINC00473 on biological characteristics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced human lens epithelial cells by regulating miR-210/TET2 molecular axis

TANG Fei<sup>1</sup>, GAN Lu<sup>2</sup>, LYU Zhongping<sup>3</sup>

1. Department of Ophthalmology, Sichuan University Huaxi Hospital Shangjin Nanfu Hospital, Chengdu 611731, Sichuan Province, China

2. Department of Ophthalmology, West China Fourth Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

3. Department of Ophthalmology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

**Corresponding author:** LYU Zhongping, E-mail: 15881131022@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of LINC00473 on the biological characteristics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced human lens epithelial cells by regulating miR-210/10-11 transposase 2 (TET2) molecular axis. **Methods** Human lens epithelial SRA01/04 cells were cultured with 100 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. SRA01/04 cells were divided into Con group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC group, pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC group, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 group. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell viability; flow cytometry was used to detect cell apoptosis; the kit was used to detect malondialdehyde (MDA) content, activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). The dual luciferase reporter gene assay detected the targeted binding correlation of LINC00473 with miR-210, of miR-210 with TET2. **Results** Statistical differences were observed in cell viability, cell apoptosis rate, colony forming efficiency, MDA content, activities of SOD and GSH-Px for Con group comparing with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1 group comparing with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + miR-NC group comparing with pcDNA3.1-LINC00473 + miR-210 group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-NC group comparing with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + pcDNA3.1-LINC00473 + si-TET2 group (all  $P < 0.05$ ). The dual luciferase reporter gene confirmed that SRA01/04 cell luciferase activity was  $0.36 \pm 0.03$  in miR-NC and WT-LINC00473 cotransfection group, and obviously lower than  $0.96 \pm 0.10$  in miR-210 mimics and WT-LINC00473 cotransfection group ( $P < 0.05$ ); SRA01/04 cell luciferase activity was  $0.33 \pm 0.03$  in miR-NC and WT-TET2 cotransfection group, and obviously lower than  $0.94 \pm 0.09$  in miR-210 mimics and WT-TET2 cotransfection group ( $P < 0.05$ ). LINC00473 targeted miR-210 and down-regulated its expression level, and miR-210 negatively regulated the expression level of TET2. **Conclusion** LINC00473 can reduce the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on proliferation, apoptosis and oxidative damage of human lens epithelial cells by down-regulating miR-210/TET2 molecular axis.

**[Key words]** LINC00473; miR-210; TET2; hydrogen peroxide; lens epithelial cells; proliferation; apoptosis; oxidative stress