

引文格式:李静,李迪,李雪颖,寇列玲,车选义.上调microRNA-27b对血小板衍生因子诱导下的人视网膜色素上皮细胞增殖的抑制作用[J].眼科新进展,2020,40(9):822-825. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0187

【实验研究】

上调microRNA-27b对血小板衍生因子诱导下的人视网膜色素上皮细胞增殖的抑制作用[△]

李静 李迪 李雪颖 寇列玲 车选义

作者简介:李静(ORCID:0000-0002-3331-6787),女,1981年8月出生,陕西西安人,博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师。研究方向:眼底病。E-mail:lix-ww@163.com
通信作者:车选义(ORCID:0000-0001-8057-0895),男,1972年12月出生,陕西合阳人,硕士,副主任医师。研究方向:眼底病、眼整形。E-mail:chexuanyu@126.com
收稿日期:2020-02-08
修回日期:2020-06-02
本文编辑:付中静
△基金项目:陕西省重点研发计划项目(编号:2018SF-155)
作者单位:710068 陕西省西安市,陕西省人民医院眼科(李静,李迪,李雪颖,车选义);725000 陕西省安康市,安康市中医院(寇列玲)

【摘要】目的 观察过表达的microRNA-27b(miR-27b)对血小板衍生因子(platelet-derived growth factor,PDGF)诱导下的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)增殖的抑制作用,探讨miR-27b在ARPE细胞生物学行为中的作用及其调控机制。方法 将miR-27b过表达质粒或空载体转入ARPE-19细胞36 h后,用终浓度为20 μg·L⁻¹的PDGF预处理ARPE-19细胞5 h。根据转染物不同,将实验分为空白对照组(control组)、miR-27b阴性对照组(miR-27b NC组)、miR-27b模拟物转染组(PDGF+mimics组)和空载体转染组(PDGF+NC组)。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测转染后各组ARPE-19细胞中miR-27b的表达水平;MTT法测定各组细胞活性;通过流式细胞术评估各组细胞周期的分布变化;Western blot检测各组细胞周期的正向调控因子cyclinD1、CDK4和负向调控因子p21^{CIP1}和p27^{KIP1}的表达水平。结果 qRT-PCR检测结果显示:经PDGF处理5 h,与miR-27b NC组相比,PDGF+NC组miR-27b的表达显著降低($P<0.01$);与PDGF+NC组相比,PDGF+mimics组miR-27b的表达增加($P<0.01$)。MTT检测结果显示:与miR-27b NC组相比,PDGF+NC组ARPE-19细胞的光密度(D)值增加($P<0.01$);而与PDGF+NC组相比,PDGF+mimics组可明显抑制ARPE-19细胞的D值($P<0.01$)。流式细胞术检测结果显示:与空白对照组和miR-27b NC组相比,PDGF+NC组G0/G1期细胞的百分比显著降低,S期细胞的百分比增加($P<0.05$);而与PDGF+NC组相比,PDGF+mimics组miR-27b的过表达显著增加了G0/G1期细胞的百分比,并抑制了细胞增殖(均为 $P<0.05$)。Western blot检测结果显示:与PDGF-NC组相比,PDGF+mimics组miR-27b的过表达可显著降低cyclinD1蛋白和CDK4蛋白的表达,同时增强了p21^{CIP1}蛋白和p27^{KIP1}蛋白的表达(均为 $P<0.05$)。结论 上调miR-27b表达可抑制PDGF诱导的ARPE细胞增殖。【关键词】 miR-27b;人视网膜色素上皮细胞;血小板衍生因子;细胞周期;细胞增殖【中图分类号】 R774.5

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)是保护视网膜光感受器外层和脉络膜血管系统的外屏障^[1],RPE细胞的异常增殖和迁移是年龄相关性黄斑变性(AMD)、增生型糖尿病视网膜病变(PDR)和增生性玻璃体视网膜病变(PVR)等多种眼部疾病共同的病理基础^[2-4]。microRNA(miRNA)是一类短(19~24个核苷酸)的非蛋白质RNA,通过与目标mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)结合,对转录后的基因表达产生负调控,抑制或降解mRNA^[5]。miRNA在复杂的生理过程(包括炎症、血管生成、增殖和凋亡)的调控机制中起着至关重要的作用^[6],前期研究观察到氧化应激下RPE细胞中的microRNA-27b(miR-27b)下调^[7],但miR-27b在RPE细胞增殖中的作用仍未完全清楚。本研究探讨在对血小板衍生因子(platelet-derived growth factor,PDGF)作用下miR-27b对ARPE-19细胞增殖的调控作用,旨在为临床上与RPE细胞增殖有关的眼科疾病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 ARPE-19细胞(美国ATCC公司);

DMEM/F12培养液、Lipofectamine 2000转染试剂盒、TRIZOL(美国Invitrogen公司);TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒、TaqMan microRNA分析试剂盒(美国Applied Biosystems公司);抗cyclinD1抗体(CST 2922)、抗CDK4抗体(ab108357)、抗p21^{CIP1}抗体(ab109520)、抗p27^{KIP1}抗体(CST 3686)、内参β-肌动蛋白(ab8226)(美国Abcam公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);miR-27b模拟物、miR-27b阴性对照(NC)过表达质粒(上海吉玛制药技术公司);PDGF(美国R&D System公司);MTT(美国Sigma公司);流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 ARPE-19细胞培养 ARPE-19细胞常规复苏后,将细胞置于含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液中,于CO₂恒温培养箱中培养,细胞融合至80%时进行传代,取3~6代细胞用于实验。

1.2.2 细胞转染及分组 培养ARPE-19细胞,并使用Lipofectamine 2000试剂将miR-27b模拟物(mimics)、miR-27b NC质粒或空载体转染入ARPE-19细胞。转染36 h后用重组人PDGF(20 μg·L⁻¹)处理5 h。根据转染物不同,将实验分为空白对照组(con-

trol 组)、miR-27b 阴性对照组 (miR-27b NC 组)、miR-27b 模拟物转染组 (PDGF + mimics 组) 和空载体转染组 (PDGF + NC 组)。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 使用 TRIZOL 试剂处理 ARPE-19 细胞。使用 TaqMan microRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。使用 TaqMan microRNA 分析试剂盒进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-27b 表达水平,使用 U6 进行标准化。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 miR-27b 相对表达量。

1.2.4 MTT 检测细胞活性 将处于对数生长期的 ARPE-19 细胞,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液配成单细胞悬液,以每孔 2×10^3 个细胞接种到 96 孔板,在含体积分数 5% CO_2 培养箱中,37 ℃ 孵育 24 h、48 h、72 h。用 miR-27b 模拟物或 NC 转染 ARPE-19 细胞 36 h 后加入 PDGF 刺激 5 h,每孔加入 20 μL 终浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液并于 37 ℃ 温育 4 h。小心弃上清,每孔加入 100 μL 裂解液孵育过夜,使结晶物充分融解;选择 490 nm 波长,分光光度计检测两组各孔光密度 (D) 值,记录结果。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 通过流式细胞术测定各组的细胞周期。用 PBS 洗涤细胞,1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液,然后在 4 ℃ 下用体积分数 70% 冷乙醇再悬浮固定 30 min,加入 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rnase A,在 37 ℃ 下孵育 1 h,然后在 4 ℃ 避光加入 50 μL 碘化丙二钠 (PI) 溶液染色 30 min,通过流式细胞仪检测各组的细胞周期分布情况。

1.2.6 Western blot 检测各种因子蛋白表达 收集 ARPE-19 细胞并在 RIPA 缓冲液中裂解,然后在 4 ℃ 以 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。上清液的蛋白质浓度使用 Bradford 分析法。转膜,在室温下用 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶封闭 1 h 后,将膜与 cyclinD1 (1 : 500)、CDK4 (1 : 1000)、p21^{CIP1} (1 : 1000)、p27^{KIP1} (1 : 1000) 和内参 β -肌动蛋白 (1 : 1000) 在 4 ℃ 过夜后漂洗。将膜与辣根过氧化物酶结合的二抗 (1 : 1000) 在 37 ℃ 下孵育 1 h。用增强的化学发光试剂检测蛋白条带,并用 ImageJ 系统定量。 β -肌动蛋白为内参。

1.3 统计学方法 所有数据均采用均数 \pm 标准差表示。使用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Bonferroni 事后检验进行统计学分析。每个实验重复三次。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 miR-27b 表达水平 生长融合至 80% ~ 90% 的 ARPE-19 细胞呈现出与典型鹅卵石形态一致的天然 RPE 细胞的结构特征 (图 1A)。qRT-PCR 检测结果显示:经 PDGF 处理 5 h,与 miR-27b NC 组相比,PDGF + NC 组 miR-27b 的表达显著降

低 ($P < 0.01$);与 PDGF + NC 组相比,PDGF + mimics 组 APRE-19 细胞 miR-27b 表达增加 ($P < 0.01$, 图 1B)。

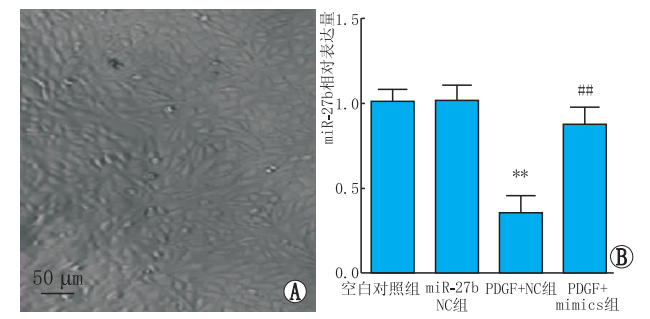


图 1 ARPE-19 细胞形态及各组 miR-27b 表达水平 A:ARPE-19 细胞生长至融合状态后的形态学变化。B: miR-27b 相对表达量;与 miR-27b NC 组相比, ** $P < 0.01$;与 PDGF + NC 组相比, ## $P < 0.01$

2.2 MTT 法检测 ARPE-19 细胞活性 MTT 检测结果显示:与 miR-27b NC 组和空白对照组相比,PDGF + NC 组 48 h 和 72 h APRE-19 细胞的 D 值均显著增加 (均为 $P < 0.01$);而与 PDGF + NC 组相比,miR-27b 过表达的 PDGF + mimics 组 APRE-19 细胞的 D 值明显降低 ($P < 0.01$) (见图 2)。

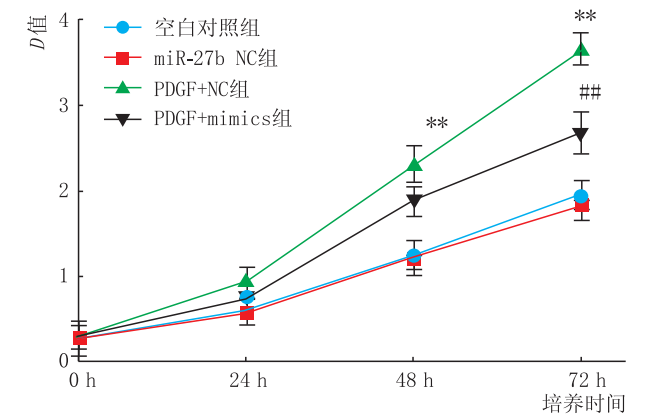


图 2 MTT 法检测各组 ARPE-19 细胞活性 与 miR-27b NC 组相比, ** $P < 0.01$;与 PDGF + NC 组相比, ## $P < 0.01$

2.3 miR-27b 过表达对 ARPE-19 细胞周期的调控作用 与空白对照组和 miR-27b NC 组相比,PDGF + NC 组 G0/G1 期细胞的百分比显著降低,S 期细胞的百分比显著增加 (均为 $P < 0.05$);而与 PDGF + NC 组相比,PDGF + mimics 组可显著增加 G0/G1 期的细胞百分比,抑制 S 期的细胞百分比,抑制了细胞增殖 (均为 $P < 0.05$) (见图 3)。此外,Western blot 检测结果还显示:与 miR-27b NC 组相比,PDGF + NC 组 cyclinD1 蛋白和 CDK4 蛋白的表达水平均显著增加,p21^{CIP1} 蛋白和 p27^{KIP1} 蛋白的表达均下降 (均为 $P < 0.05$);与 PDGF + NC 组相比,PDGF +

mimics 组 cyclinD1 蛋白和 CDK4 蛋白的表达均降低, p21^{CIP1} 蛋白和 p27^{KIP1} 蛋白的表达均增加(均为 $P < 0.05$)(见图 4)。

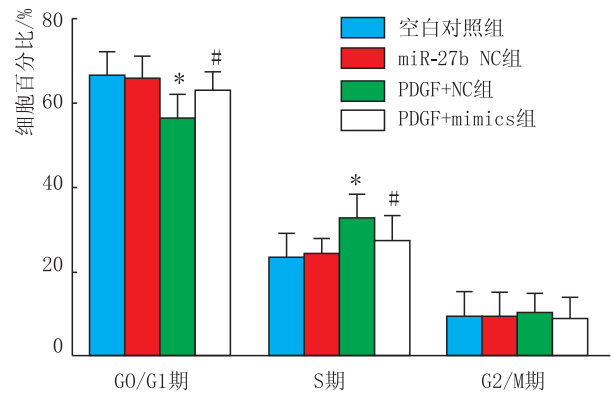


图3 各组细胞周期的变化 与 miR-27b NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 PDGF + NC 组相比, # $P < 0.05$

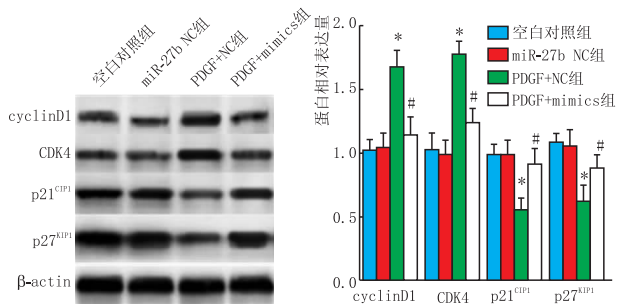


图4 Western blot 检测各组 cyclinD1、CDK4、p21^{CIP1} 和 p27^{KIP1} 蛋白的表达水平 A: 蛋白表达情况。B: 定量分析; 与 miR-27b NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 PDGF + NC 组相比, # $P < 0.05$

3 讨论

正常情况下, RPE 细胞是静止的, 具有不增殖、不迁移和良好的细胞间通讯连接^[8]; 病理条件下, RPE 细胞可迁移到玻璃体内和视网膜表面, 诱发脉络膜或视网膜新生血管膜形成, 促进 PDR 和 PVR 等多种严重视觉损伤疾病的发生^[2,9]。RPE 细胞增殖和迁移涉及多种生长因子和细胞因子, 其中 RPE 细胞产生的 PDGF 已被确定为 RPE 细胞增殖的主要有丝分裂原和促细胞分裂剂, 参与各种视网膜疾病的发生^[10-11]。进一步了解 PDGF 诱导的 RPE 细胞增殖和迁移的机制是非常必要的。

miR-27b 是一种内含子 miRNA, 参与多种生物学过程, 包括脂质代谢、2 型糖尿病和胰岛素抵抗, 与癌症也相关^[12-14]。已有研究表明, 各种 miRNA, 如 miR-204、miR-211、miR-34a、miR-184 和 miR-222, 参与了眼部疾病中 RPE 细胞的增殖和分化^[15-16]。本研究中 PDGF 可增强 ARPE-19 细胞活性, 促进细胞增殖。PDGF 处理后异常增殖的 ARPE 细胞中 miR-

27b 表达也明显下调。MTT 检测结果发现: miR-27b 过表达可使 ARPE-19 细胞 D 值明显下降, 抑制细胞活性。因此, 我们认为 ARPE-19 的异常增殖与 miR-27b 的下调可能有关。同时, 从细胞周期的 G1/G0 期到 S 期的准确过渡是细胞增殖的关键步骤, 这主要受有丝分裂信号转导靶向标志物诸如细胞周期蛋白 (cyclinD1、D2、D3, cyclinE) 的刺激, 细胞周期蛋白与细胞周期蛋白结合依赖性激酶 (CDK2 和 CDK4) 促进细胞周期向 DNA 复制期发展^[17]。p21^{CIP1} 蛋白和 p27^{KIP1} 蛋白属于 CDK 抑制剂的 CIP/KIp 家族, 可灭活细胞周期蛋白-CDK 复合物并随后抑制 DNA 合成^[18]。本研究中, miR-27b 模拟物转染 ARPE-19 细胞, 使之过表达 miR-27b, 可以显著抑制 PDGF 诱导的 ARPE-19 细胞周期从 G0/G1 到 S 期的转变, 使 cyclinD1 蛋白和 CDK4 蛋白的表达降低, p21^{CIP1} 蛋白和 p27^{KIP1} 蛋白的表达增加, 抑制细胞增殖。

miR-27b 也被发现参与血管生成。Veliceasa 等^[19]证明, miR-27b 在心脏血管生成中具有促血管生成作用; 但也有学者发现, miR-27b 通过靶向 VEGF-C 抑制胃癌和大肠癌的血管生成^[20]。本研究中, 我们发现在 PDGF 刺激下 ARPE-19 细胞中 miR-27b 表达显著降低, 这可能与血-视网膜屏障的存在、miRNAs 的表达和功能在眼内有严格的组织特异性有关^[21]。

综上所述, 在 PDGF 的诱导下, miR-27b 在 ARPE-19 细胞中表达下调。同时, miR-27b 的过表达可抑制细胞活性, 调控细胞周期, 部分抑制了 PDGF 诱导的 ARPE 细胞增殖。因此, miR-27b 有可能是抑制 ARPE 细胞增殖的潜在候选物, 从而为相关疾病的治疗提供新的靶点。而 miR-27b 的过表达对 PDGF 诱导下 ARPE-19 细胞迁徙能力的影响, 靶基因以及信号通路的调控机制将作为我们后续研究的内容。

参考文献

[1] SIMO R, VILLARREL M, CORRALIZA L, HERNANDEZ C, GARCIA-RAMIREZ M. The retinal pigment epithelium; something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 17(2): 1-15.
[2] FUHRMANN S, ZOU C, LEVINE E M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123(6): 141-150.
[3] CHARTERIS D G, SETHI C S, LEWIS G P, FISHER S K. Proliferative vitreoretinopathy—developments in adjunctive treatment and retinal pathology [J]. *Eye (Lond)*, 2002, 16(4): 369-374.
[4] HE S, KUMAR S R, ZHOU P, KRASNOPOEROV V, RYAN S J, GILL P S, et al. Soluble EphB4 inhibition of PDGF-induced RPE migration *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(1): 543-552.
[5] HAMMOND S M. An overview of microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87(1): 3-14.
[6] WAHID F, KHAN T, KIM Y Y. MicroRNA and diseases: therapeutic potential as new generation of drugs [J]. *Biochimie*, 2014, 104: 12-26.
[7] AYAZ L, DINC E. Evaluation of microRNA responses in ARPE-19

- cells against the oxidative stress [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2018, 37(2):121-126.
- [8] CHANG J H, KANG S W, HAM D I. Sensitivity of CD95-induced apoptosis in different proliferative status of human retinal pigment epithelial cells [J]. *Korean J Ophthalmol*, 2001, 15(2):74-80.
 - [9] KUZNETSOVA A V, KURINOV A M, ALEKSANDROVA M A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium [J]. *J Ophthalmol*, 2014, 1:1-18.
 - [10] ROBBINS S G, MIXON R N, WILSON D J, HART C E, ROBERTON J E, WESTRA I, *et al*. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(10):3649-3663.
 - [11] LI R, MAMINISHKIS A, WANG F E, MILLER S S. PDGF-C and -D induced proliferation/migration of human RPE is abolished by inflammatory cytokines [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12):5722-5732.
 - [12] CHAKRABORTY C, DOSS C G, BANDYOPADHYAY S, AGORAMOORTHY G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(5):697-712.
 - [13] WAN L, ZHANG L, FAN K, WANG J. MiR-27b targets LIMK1 to inhibit growth and invasion of NSCLC cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390(1-2):85-91.
 - [14] JIN L, WESSELY O, MARCUSSON E G, IVAN C, CALIN G A, ALAHARI S K. Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF- α in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(9):2884-2896.
 - [15] OHANA R, WEIMAN-KELMAN B, RAVIV S, TAMM E R, PASMANIK-CHOR M, RINON A, *et al*. MicroRNAs are essential for differentiation of the retinal pigmented epithelium and maturation of adjacent photoreceptors [J]. *Development*, 2015, 142(14):2487-2498.
 - [16] SUNDERMEIER T R, PALCZEWSKI K. The impact of microRNA gene regulation on the survival and function of mature cell types in the eye [J]. *FASEB J*, 2016, 30(1):23-33.
 - [17] SANTAMARIA D, ORTEGA S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice [J]. *Front Biosci*, 2006, 11(10):1164-1188.
 - [18] TANE S, IKENISHI A, OKAYAMA H, IWAMOTO N, NAKAYAMA K I, TAKEUCHI T. CDK inhibitors, p21 (Cip1) and p27 (Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3):1105-1109.
 - [19] VELICEASA D, BIYASHEV D, QIN G, MISENER S, MACKIE AR, KISHORE R, *et al*. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b [J]. *Vasc Cell*, 2015, 7(1):6.
 - [20] LIU H T, XING A Y, CHEN X, MA R R, WANG Y W, SHI D B, *et al*. MicroRNA-27b, microRNA-101 and microRNA-128 inhibit angiogenesis by down-regulating vascular endothelial growth factor C expression in gastric cancers [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35):37458-37470.
 - [21] LUDWIG N, LEIDINGER P, BECKER K, BACKES C, FEHLMANN T, PALLASCH C, *et al*. Distribution of miRNA expression across human tissues [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8):3865-3877.

Up-regulation of microRNA-27b inhibits PDGF-induced cell proliferation in ARPE-19 cells

LI Jing¹, LI Di¹, LI Xueying¹, KOU Lieling², CHE Xuanyi¹

1. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

2. Department of Ophthalmology, Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang 725000, Shaanxi Province, China

Corresponding author: CHE Xuanyi, E-mail: chexuanyi@126.com

[Abstract] Objective To observe the inhibitory effect of overexpressed miR-27b on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) induced by platelet-derived growth factor (PDGF), and to explore the role and regulatory mechanism of miR-27b in the biological behavior of human RPE cells. **Methods** After transferring miR-27b overexpression plasmid or empty body into ARPE-19 cells for 36 hours, ARPE-19 cells were pretreated with PDGF with final concentration of $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 5 hours. According to the different transfection materials, the experiment was divided into control group, miR-27b negative control group (miR-27b NC group), miR-27b analog transfection group (PDGF + mimics group) and empty vector transfection group (PDGF + NC group). The expression level of miR-27b in ARPE-19 cells was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The cell activity was measured by MTT and the distribution of cell cycle was evaluated by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression levels of CyclinD1, CDK4, p21^{CIP1} and p27^{KIP1}. **Results** qRT-PCR showed that, 5 hours after PDGF pretreat, the expression of miR-27b in PDGF + NC group was significantly lower than that in miR-27b NC group ($P < 0.01$), and PDGF + mimics group was significantly higher than PDGF + NC group ($P < 0.01$). The results of MTT showed that the optical density (D) of ARPE-19 cells in PDGF + NC group was higher than that in miR-27b NC group ($P < 0.01$), while PDGF + mimics group significantly inhibited the D value when compared with PDGF + NC group ($P < 0.01$). The results of flow cytometry showed that compared with the control group and miR-27b NC group, the percentage of G0/G1 phase cells in PDGF + NC group decreased significantly, while the percentage of S phase cells increased ($P < 0.05$). Compared with PDGF + NC group, over expression of miR-27b in PDGF + mimics group significantly increased the proportion of cells in G0/G1 phase and inhibited cell proliferation (all $P < 0.05$). Western blot showed that the overexpression of miR-27b in PDGF + mimics group significantly decreased the expression of cyclin D1 and CKD4, and enhanced the expression of p21^{CIP1} and p27^{KIP1} compared with PDGF + NC group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Up-regulation of miR-27b expression can inhibit PDGF induced proliferation of ARPE cells.

[Key words] miR-27b; human retinal pigment epithelium cell; platelet-derived growth factor; cell cycle; cell proliferation