

引文格式:田思佳,王骞,张蕾,屈林,肖燕,朱俊英,等. miR-181a 靶向沉默信息调节因子相关酶 1 在过氧化氢诱导的人小梁网细胞氧化应激中的调节作用[J]. 眼科新进展, 2021, 41(9): 826-830. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2021. 0173

【实验研究】

miR-181a 靶向沉默信息调节因子相关酶 1 在过氧化氢诱导的人小梁网细胞氧化应激中的调节作用[△]

田思佳 王骞 张蕾 屈林 肖燕 朱俊英 王怀洲

【摘要】目的 探讨 miR-181a 对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人小梁网细胞(HTMCs)氧化应激的调节作用及其机制。方法 HTMCs 随机分为空白组(0 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、400 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、600 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组,分别使用相应浓度 H₂O₂ 处理 HTMCs,24 h 后 MTT 法检测各组细胞存活率,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测各组细胞 miR-181a mRNA 表达,Western blot 检测各组细胞中沉默信息调节因子相关酶 1(SIRT1)蛋白表达。根据转染物的不同分为 miR-181a inhibitor 组、miR-181a NC 组、miR-181a mimics 组、miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组和 miR-181a inhibitor + si-NC 组,使用二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针检测各组细胞内活性氧(ROS)含量,使用超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒检测各组细胞 SOD 和 MDA 活性,使用 Annexin V FITC/PI 联合流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Western blot 检测各组细胞中 SIRT1 蛋白表达,双荧光素酶报告基因实验对靶点进行验证。结果 与空白组比较,200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、400 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、600 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组细胞存活率均降低(均为 P<0.05)。细胞 miR-181a mRNA 的表达随着 H₂O₂ 浓度的增加而增加,SIRT1 蛋白的表达随着 H₂O₂ 浓度的增加而降低(均为 P<0.05)。与 miR-181a NC 组比较,miR-181a mimics 组细胞凋亡率、MDA 活性和 ROS 含量均升高,细胞 SOD 活性、SIRT1 蛋白表达均降低,miR-181a inhibitor 组细胞凋亡率、MDA 活性和 ROS 含量均降低,细胞 SOD 活性、SIRT1 蛋白表达均升高(均为 P<0.05)。双荧光素酶报告基因实验证实,miR-181a 靶向抑制 SIRT1 蛋白的表达。与 miR-181a inhibitor + si-NC 组比较,miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组细胞凋亡率、MDA 活性和 ROS 含量均升高,SOD 活性降低(均为 P<0.05)。结论 miR-181a 可能通过靶向 SIRT1 调节 H₂O₂ 诱导的 HTMCs 氧化应激作用。

【关键词】 青光眼;人小梁网细胞;氧化应激;miR-181a;沉默信息调节因子相关酶 1

【中图分类号】 R775

原发性开角型青光眼(POAG)是一种由多种因素诱发的致盲眼病^[1]。人眼中 70% 以上的房水引流是通过小梁网进行的,眼内房水排出受阻引发的眼压升高是 POAG 发病的主要原因之一^[2-3]。近年来研究表明,氧化应激损伤是导致青光眼患者小梁网细胞损伤、凋亡及功能异常的重要原因^[4]。miRNA 是非编码 RNA,能特异性识别靶基因的 3'-非翻译区(3'-UTR),通过与靶基因完全或部分互补结合,导致靶基因的降解或抑制其翻译^[5]。多种 miRNA 在小梁网细胞的氧化应激损伤中发挥作用,参与青光眼的发生、发展^[6-7]。miR-181a 是一种多功能 miRNA,与白内障等眼部疾病进展过程中的氧化应激损伤过程密切相关^[8-9],在小梁网细胞氧化应激损伤中研究尚少。本研究探讨 miR-181a 对人小梁网细胞(HTMCs)抗氧化应激能力的影响及其可能的作用机制,为青光眼的防治寻找潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 HTMCs(中科院细胞库);胎牛血清(FBS)(上海碧云天生物技术有限公司);miR-181a 抑制剂(miR-181a inhibitor)、miR-181a 拟似物(miR-

181a mimics)及 miR-181a 阴性对照(miR-181a NC)、沉默信息调节因子相关酶 1(SIRT1)小干扰 RNA(si-SIRT1)及其阴性对照(si-NC)(上海吉玛基因公司);LipofectamineTM 2000、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(美国 Abcam 公司);二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)活性氧(ROS)荧光探针、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)ELISA 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Genomeditech 公司);兔抗人 SIRT1 单抗(美国 Santacruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与培养 HTMCs 复苏,重悬于含体积分数 10% FBS 的 DME 培养基中,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,融合至 80% 时,2.5 g·L⁻¹ 胰蛋白酶消化,离心弃上清,重悬,继续培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期的 HTMCs,随机分为空白组(0 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、400 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组、600 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 组,按 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 接种于 96 孔板中培养 24 h,分别加入相应浓度 H₂O₂ 处理 HTMCs,24 h 后每孔加入 20 μL 50 g·L⁻¹ MTT 溶液,孵育

4 h,每孔加入 150 μL DMSO,充分振荡 10 min,酶标仪在 490 nm 处检测各孔光密度(D),计算细胞存活率(细胞存活率 = $D_{\text{不同浓度H}_2\text{O}_2\text{组}}/D_{\text{空白组}} \times 100\%$)。

1.2.3 qRT-PCR 检测各组 HTMCs 中 miR-181a mRNA 表达 收集空白组、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组 HTMCs,Trizol 法提取总 RNA,分析 RNA 浓度和纯度,逆转录 cDNA,qRT-PCR 检测 miR-181a mRNA 表达。反应体系包括:cDNA 2.0 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,SYBR[®] 预混液 10 μL ,加双蒸水至总体积 20.0 μL 。其中 miR-181a 上游引物序列:5'-TGCTTGATTGCTTAGCTTAC-3',下游引物序列:5'-TAGGCTTAGCTTAGCATGGC-3';U6 上游引物序列:5'-GCTGCTTAGGCTACCATCGT-3',下游引物序列:5'-GTAGCTAACGATTACACCTGA-3'。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-181a mRNA 相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测各组 HTMCs 中 SIRT1 蛋白表达 收集空白组、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组 HTMCs,RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,脱脂牛奶室温封闭 2 h;加入 SIRT1(1:1000)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜;加入二抗(1:2000),室温封闭 1 h;加入电化学发光液曝光。以 β -actin 为内参,使用 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.5 细胞转染 根据转染物不同,将 HTMCs 分为 miR-181a inhibitor 组(转染 miR-181a inhibitor)、miR-181a NC 组(转染 miR-181a NC)、miR-181a mimics 组(转染 miR-181a mimics)、miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组(同时转染 miR-181a inhibitor 和 si-SIRT1)、miR-181a inhibitor + si-NC 组(同时转染 miR-181a inhibitor 和 si-NC),使用 Lipofectamine[™] 2000 转染后,加入 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 于培养箱中继续培养 24 h。

1.2.6 Annexin V FITC/PI 联合流式细胞仪检测 HTMCs 凋亡 取 miR-181a inhibitor 组、miR-181a NC 组和 miR-181a mimics 组 HTMCs,转染 24 h 后,胰蛋白酶消化,PBS 洗涤,200 μL Binding Buffer 重悬,加入 5 μL Annexin V FITC 和 5 μL 碘化丙啶(PI)染液,避光反应 15 min,1 h 内上流式细胞仪检测细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。重复 3 次取均值。取 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组和 miR-181a inhibitor + si-NC 组细胞,转染 24 h 后,检测各组细胞凋亡率。重复 3 次取均值。

1.2.7 各组细胞中 ROS 含量检测 取 miR-181a inhibitor 组、miR-181a NC 组和 miR-181a mimics 组 HTMCs,转染 24 h 后,每孔加入 200 μL DCFH-DA,静置 30 min,PBS 洗涤,收集各组细胞,酶标仪检测荧

光值(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm);倒置显微镜下观察 2',7'-二氯荧光素(DCF)荧光,荧光越强代表 ROS 活性越高。每组设 5 个复孔。取 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组和 miR-181a inhibitor + si-NC 组细胞,转染 24 h 后收集细胞,HTMCs 检测各组细胞 ROS 含量。每组设 5 个复孔。

1.2.8 SOD、MDA 活性的检测 取 miR-181a inhibitor 组、miR-181a NC 组和 miR-181a mimics 组 HTMCs,转染 24 h 后,1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清,加入 SOD、MDA 抗体和酶标抗体,洗涤后加入底物显色液避光染色 10 min,终止反应后,使用酶标仪于 450 nm 处测量 D ,根据标准曲线计算样品中 SOD 和 MDA 活性。每组设 5 个复孔。

取 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组和 miR-181a inhibitor + si-NC 组 HTMCs,转染 24 h 后,收集细胞,离心检测各组细胞 SOD、MDA 活性,方法同上。每组设 5 个复孔。

1.2.9 miR-181a 靶基因预测及双荧光素酶报告基因分析 将对数期细胞以每孔 2×10^5 个接种于 24 孔板,用 Lipofectamine[™] 2000 将荧光素酶报告载体(SIRT1-3'-UTR-WT 或 SIRT1-3' UTR-MT)与 miR-181a NC/inhibitor/mimics 共转染细胞,以海肾荧光素酶质粒(每孔 100 ng)为对照,与载体共转染。细胞转染 24 h,用双荧光素酶报告分析系统测定荧光素酶活性。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件对数据统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 H_2O_2 对 HTMCs 存活率的影响 MTT 法检测结果显示,与空白组比较,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组细胞存活率均降低(均为 $P < 0.05$);随着 H_2O_2 浓度增加,细胞存活率逐渐降低(均为 $P < 0.05$),呈现剂量依赖性。其中 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组处理细胞后存活率接近半数抑制率,故后续实验选取 H_2O_2 的浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (见图 1)。

2.2 H_2O_2 对 HTMCs miR-181a mRNA 和 SIRT1 蛋白表达的影响 与空白组比较,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 组 HTMCs miR-181a mRNA 的表达均升高,SIRT1 蛋白的表达均降低(均为 $P < 0.05$);miR-181a mRNA 的表达随着 H_2O_2 浓度的增加而升高,SIRT1 蛋白的表达随着 H_2O_2 浓度的增加而降低(均为 $P < 0.05$)(见图 2、表 1)。

2.3 miR-181a 对 HTMCs 凋亡的影响 miR-181a NC 组、miR-181a mimics 组和 miR-181a inhibitor 组细

胞凋亡率分别为 $(16.6 \pm 1.85)\%$ 、 $(34.65 \pm 2.66)\%$ 和 $(10.05 \pm 1.02)\%$,3组间比较差异有统计学意义($F=6.424, P<0.001$)。两两比较结果显示,miR-181a mimics 组细胞凋亡率高于 miR-181a NC 组($P<0.05$),miR-181a inhibitor 组细胞凋亡率低于 miR-181a NC 组($P<0.05$)。

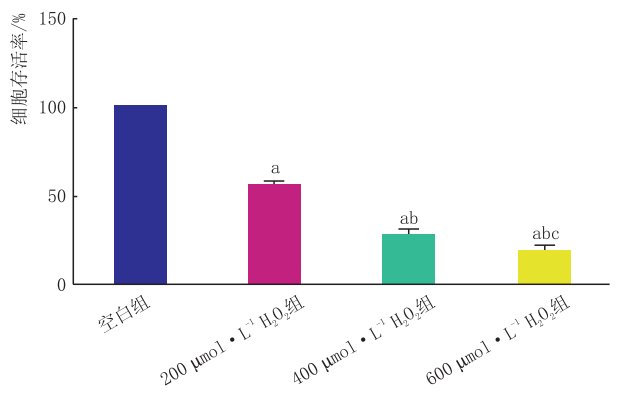


图1 H₂O₂ 对 HTMCs 存活率的影响 与空白组比较,^a $P<0.05$;与 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组比较,^b $P<0.05$;与 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

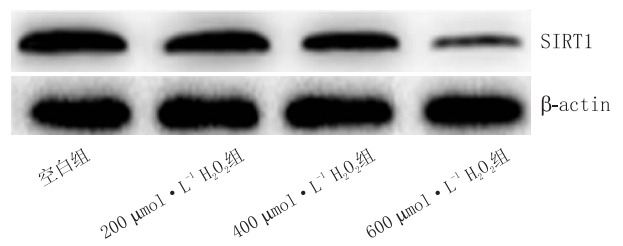


图2 Western blot 检测 H₂O₂ 对 HTMCs SIRT1 蛋白表达的影响

表1 H₂O₂ 对 HTMCs miR-181a mRNA、SIRT1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	miR-181a mRNA	SIRT1 蛋白
空白组	0.08 ± 0.02	1.06 ± 0.04
200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂ 组	0.53 ± 0.08^a	0.87 ± 0.08^a
400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂ 组	1.15 ± 0.06^{ab}	0.58 ± 0.07^{ab}
600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H ₂ O ₂ 组	1.89 ± 0.08^{abc}	0.26 ± 0.03^{abc}
<i>F</i>	24.245	11.335
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组比较,^b $P<0.05$;与 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 miR-181a 对 HTMCs 各氧化应激指标表达的影响 miR-181a NC 组、miR-181a mimics 组和 miR-181a inhibitor 组间细胞 SOD 活性、MDA 活性和 ROS 含量比较,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。两两比较结果显示,miR-181a mimics 组细胞 SOD 活性低于 miR-181a NC 组,MDA 活性和 ROS 含量均高于 miR-181a NC 组(均为 $P<0.05$);miR-181a inhibi-

tor 组细胞 SOD 活性高于 miR-181a NC 组,MDA 活性和 ROS 含量均低于 miR-181a NC 组(均为 $P<0.05$)(见表2)。

表2 各组 HTMCs 氧化应激相关指标表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	SOD/(U · mL ⁻¹)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ROS/%
miR-181a NC 组	22.85 ± 3.62	15.93 ± 0.56	62.59 ± 5.18
miR-181a mimics 组	11.75 ± 3.18^a	26.12 ± 0.67^a	84.57 ± 6.39^a
miR-181a inhibitor 组	41.09 ± 4.57^{ab}	8.94 ± 0.36^{ab}	40.84 ± 4.97^{ab}
<i>F</i>	6.677	5.798	10.533
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 miR-181a NC 组比较,^a $P<0.05$;与 miR-181a mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 miR-181a 靶基因预测结果 miR-181a 靶基因预测结果显示,miR-181a 与 SIRT1 保守位点有高度结合,SIRT1 为 miR-15a 的一个潜在作用靶点。双荧光素酶报告分析结果显示,miR-181a inhibitor 组细胞 SIRT1-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性高于 miR-181a NC 组($P<0.05$),miR-181a mimics 组细胞 SIRT1-3'-UTR-WT 报告基因的荧光素酶活性低于 miR-181a NC 组($P<0.05$),转染突变载体的细胞内未观察到明显的荧光素酶活性改变,表明 SIRT1 是 miR-181a 的直接靶向蛋白。miR-181a inhibitor 组细胞内 SIRT1 蛋白相对表达量均高于 miR-181a NC 组和 miR-181a mimics 组(均为 $P<0.05$),miR-181a mimics 组细胞内 SIRT1 蛋白相对表达量低于 miR-181a NC 组($P<0.05$)(见图3)。

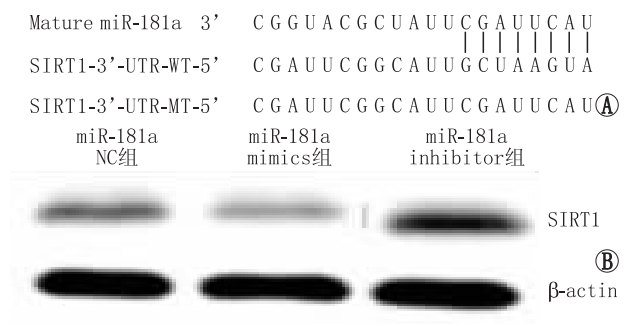


图3 miR-181a 靶基因预测 A:生物信息软件检测 miR-181a 和 SIRT1 潜在结合位点;B:Western blot 检测各组细胞 SIRT1 蛋白表达。

2.6 干预 SIRT1 表达对 miR-181a inhibitor 组 HTMCs 凋亡率的影响 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组细胞凋亡率为 $(45.24 \pm 5.73)\%$,显著高于 miR-181a inhibitor + si-NC 组 $[(16.32 \pm 1.03)\%]$ ($P<0.05$)。

2.7 干预 SIRT1 表达对 miR-181a inhibitor 组 HTMCs 各氧化应激指标表达水平的影响 miR-181a inhibitor + si-NC 组细胞 SOD 活性高于 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组,MDA 活性和 ROS 含量均低于 miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组(均为 $P<0.05$)(见表3)。

表3 各组 HTMCs 氧化应激相关指标表达水平
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	SOD/(U · mL ⁻¹)	MDA/(μmol · L ⁻¹)	ROS/%
miR-181a inhibitor + si-NC 组	35.16 ± 2.13	12.02 ± 0.66	31.60 ± 4.97
miR-181a inhibitor + si-SIRT1 组	20.31 ± 1.46	26.33 ± 1.05	68.44 ± 4.11
t	8.241	13.525	14.675
P	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

正常情况下,机体利用抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等和抗氧化剂谷胱甘肽及微量元素等清除体内 ROS。若 ROS 生成增多或清除减少,则可发生氧化应激反应^[10-11]。小梁网是房水流出通道及眼压调节的主要部位,其形态、体积、收缩特性及其与细胞外基质的相互作用决定了房水外流程度和眼压高低。青光眼眼压增高与小梁网氧化变性过程有关。本研究应用 H₂O₂ 建立 HTMCs 氧化应激模型,探讨其发生发展机制,旨在指导临床治疗青光眼。

miR-181a 能通过多个靶向基因,调控细胞的生物学活动。王超等^[12]研究证实,敲除 miR-181a 能够逆转由氧化应激诱导的 HLE-B3 细胞凋亡。另有研究显示,白内障患者晶状体上皮细胞中 miR-181a 高表达,SIRT1 低表达,miR-181a 可调控人晶状体上皮细胞中 SIRT1 表达,从而影响年龄相关性白内障的发病^[13]。但有关 miR-181a 在青光眼中的作用的报道尚少,因青光眼和白内障都是与氧化应激损伤密切相关的疾病,因此,本研究探讨 miR-181a 是否对 HTMCs 的氧化应激损伤有调控作用。

本研究结果表明,氧化应激条件下,HTMCs 中 miR-181a mRNA 相对表达量增加,抑制 miR-181a mRNA 表达后,HTMCs 凋亡率降低,上调其表达后,HTMCs 凋亡率升高,同时,与 miR-181a NC 组比较,miR-181a inhibitor 组细胞 SOD 活性升高,MAD 活性和 ROS 含量降低,提示在氧化应激条件下,miR-181a 能刺激 HTMCs 凋亡,抑制 HTMCs 的抗氧化应激能力。

SIRT1 是细胞代谢辅酶 NAD⁺ 依赖的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,Ren 等^[14]研究发现,青光眼 HTMCs 中 SIRT1 表达低于正常 HTMCs,转染 SIRT1 后受损细胞修复能力增强,细胞衰老延缓,证明 SIRT1 具有抗氧化应激作用。另有研究发现,POAG 患者小梁网组织中 SIRT1 表达水平降低,可能在线粒体功能失调和氧化应激对小梁网的损伤中发挥重要调控作用^[15]。本研究结果发现,氧化应激条件下 HTMCs 中 SIRT1 表达降低,说明 SIRT1 可能参与 HTMCs 氧化应激调控,且调控结果同 miR-181a 相反。转染 miR-181a inhibitor 的 HTMCs 中 SIRT1 表达上调,而转染 miR-181a mimics 的 HTMCs 中 SIRT1 表达被抑制,表明 miR-181a 可能参与调控 SIRT1 表达。本研

究进一步经双荧光素酶报告基因实验检测 miR-181a 与 SIRT1 的靶向关系,结果证实 SIRT1 是 miR-181a 的靶基因,且最终通过转染 si-SIRT1,证明了这一通路在高糖诱导的 HTMCs 氧化应激损伤中的作用。

综上,本研究结果表明,miR-181a 通过调节 SIRT1 在 H₂O₂ 诱导的 HTMCs 氧化应激中发挥重要调控作用,对该机制的进一步研究可能有助于开发新的白内障的治疗靶点。

参考文献

[1] 杨迪亚,王宁利. 重视原发性开角型青光眼的整合眼科学研究[J]. 中华眼科医学杂志(电子版),2016,6(1):1-7.
YANG D Y, WANG N L. Devoting much attention to the study of primary open angle glaucoma with holistic integrative ophthalmology[J]. Chin J Ophthalmol Med (Electron Ed), 2016,6(1):1-7.

[2] DREWRY M D, CHALLA P, KUCHTEY J G, NAVARRO I, HELWA I, HU Y, et al. Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma[J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(7):1263-1275.

[3] FIRAT P G, DEMIREL E E, DEMIREL S, DIKCI S, TURKOZ Y, OZYAL N F. Increased aqueous humor symmetric dimethylarginine level in patients with primary open angle glaucoma[J]. Curr Eye Res, 2019, 44(6):619-622.

[4] HARADA C, NORO T, KIMURA A, GUO X, NAMEKATA K, NAKANO T, et al. Suppression of oxidative stress as potential therapeutic approach for normal tension glaucoma[J]. Antioxidants (Basel), 2020,9(9):874.

[5] YIN L, ZHANG M, HE T, CHEN S. The expression of miRNA-146a-5p and its mechanism of treating dry eye syndrome[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(1):e23571.

[6] 郭俊宏,苏畅,蒋少云,王芳,封霄,汪建涛. 微小 RNA-1 在氧化应激下对小梁网细胞中纤维连接蛋白表达的调节作用[J]. 中华眼科杂志, 2019, 55(5):355-360.
GUO J H, SU C, JIANG S Y, WANG F, FENG X, WANG J T. microRNA-1 regulates fibronectin expression in human trabecular meshwork cells under oxidative stress[J]. Chin J Ophthalmol, 2019, 55(5):355-360.

[7] WANG X, LI Z, BAI J, SONG W, ZHANG F. miR-17-5p regulates the proliferation and apoptosis of human trabecular meshwork cells by targeting phosphatase and tensin homolog[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4):3132-3138.

[8] JIANG Y, GONG Y, LIN N, QIU W. Expression of miR-181a and TGF-β2 in lens epithelial cells of patients with cataractous retinal detachment and its clinical significance[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(6):4435-4440.

[9] WANG Y, ZHOU H, LIU X, HAN Y, PAN S, WANG Y. miR-181a inhibits human trabecular meshwork cell apoptosis induced by H₂O₂ through the suppression of NF-κB and JNK pathways[J]. Adv Clin Exp Med, 2018, 27(5):577-582.

[10] QIU L, ZHANG Y, DO D C, KE X, ZHANG S, LAMBERT K, et al. miR-155 modulates cockroach allergen-and oxidative stress-induced cyclooxygenase-2 in asthma[J]. J Immunol, 2018, 201(3):916-929.

[11] BAHIA S, BLAIS E, MURUGKAR S, CHAUHAN V, KUMAR-ATHASAN P. Oxidative and nitrate stress-related changes in human lens epithelial cells following exposure to X-rays[J]. Int J Radiat Biol, 2018, 94(4):366-373.

[12] 王超,陈文静,冯广忠,陈怡,施展. 下调 microRNA-181a 抑制氧化应激诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 凋亡[J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41(2):93-101.
WANG C, CHEN W J, FENG G Z, CHEN Y, SHI Z. Downregulation of microRNA-181a attenuates hydrogen peroxide-induced human lens epithelial cell apoptosis in vitro[J]. Int J Genetics, 2018, 41(2):93-101.

[13] 孔俐,文燕,刘真,吴平,孙杨,谭德文,等. 年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中 miR-181a 和 SIRT1 的表达关系及意义[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(6):1274-1278.
KONG L, WEN Y, LIU Z, WU P, SUN Y, TAN D W, et al. Rela-

relationship and significance of miR-181a and SIRT1 in cataract lens epithelial cells[J]. *Chin J Geron*, 2020, 40 (6) : 1274-1278.

[14] 任朋亮,范雪娇,杨晓龙,刘明佳,刘戟,黄晶晶. SIRT1 增强青光眼小梁网细胞 DSBs 修复能力及抗细胞衰老的研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(4) : 572-577.

REN P L, FAN X J, YANG X L, LIU M J, LIU J, HUANG J J. SIRT1 promote GTM cell DSBs repair and resist cellular senescence[J]. *J Sichuan Univ*, 2014, 45(4) : 572-577.

[15] 纪舒昱,钟华,李雷,冯诗婷. SIRT1、PGC-1 α 在原发性开角型青光眼患者小梁网组织中的表达及意义[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(3) : 250-254.

JI S Y, ZHONG H, LI L, FENG S T. Expression and significances of SIRT1 and PGC-1 α in the trabecular meshwork tissues of patients with primary open-angle glaucoma[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2019, 39(3) : 250-254.

miR-181a regulates H₂O₂-induced oxidative stress in human trabecular meshwork cells by targeting SIRT1

TIAN Sijia, WANG Qian, ZHANG Lei, QU Lin, XIAO Yan, ZHU Junying, WANG Huaizhou

Department of Ophthalmology, Zhengzhou Second People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect of miR-181a on H₂O₂-induced oxidative stress in trabecular meshwork cells and its possible mechanism. **Methods** Human trabecular meshwork cells (HTMCs) were induced with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ or 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂, respectively, for 24 h. MTT assay was performed to detect cell viability. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect mRNA level of miR-181a, and Western blot was used to detect protein level of silent information regulator factor related enzymes 1 (SIRT1). In addition, HTMCs were transfected with miR-181a inhibitor, miR-181a negative control, miR-181a mimics, SIRT1 small interfering RNA (si-SIRT1) or negative control (si-NC) was transfected into HTMCs cells. DCFH-DA fluorescent probe was used to detect the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in each transfection group. Superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) activities were measured by ELISA. Cell apoptosis was determined by Annexin V FITC/PI using flow cytometry. Western blot was used to detect protein level of SIRT1 in each transfection group. Dual-luciferase reporter assay was performed to identify the targeting between miR-181a and SIRT1. **Results** Compared with the blank group, induction of 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ significantly decreased survival rate in HTMCs (all $P < 0.05$). Besides, miR-181a was upregulated, while SIRT1 was downregulated with the increase in H₂O₂ concentration (all $P < 0.05$). Compared with the miR-181a NC group, transfection of miR-181a mimics increased the apoptosis rate, and MDA and ROS activities, but decreased SOD activity and downregulated SIRT1. Knockdown of miR-181a yielded the opposite results (all $P < 0.05$). Dual-luciferase reporter assay confirmed that miR-181a targeted SIRT1. Compared with HTMCs with miR-181a knockdown, those with co-silence of miR-181 and SIRT1 presented higher apoptosis rate, and MDA and ROS activities, but lower SOD activity (all $P < 0.05$). **Conclusion** MiR-181a may regulate H₂O₂-induced oxidative stress of HTMCs by targeting SIRT1.

[Key words] glaucoma; human trabecular meshwork cells; oxidative stress; miR-181a; silent information regulator factor related enzymes 1