

引文格式:王艳平,刘含军.长链非编码 RNA(LncRNA)母系表达基因 3(MEG3)对糖尿病视网膜病变大鼠模型视网膜血管内皮细胞凋亡的影响[J].眼科新进展,2023,43(1):18-24. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0004

【实验研究】

# 长链非编码 RNA(LncRNA)母系表达基因 3(MEG3)对糖尿病视网膜病变大鼠模型视网膜血管内皮细胞凋亡的影响<sup>△</sup>

王艳平 刘含军

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(LncRNA)母系表达基因 3(MEG3)对糖尿病视网膜病变(DR)大鼠模型视网膜血管内皮细胞凋亡的影响。方法 取 SPF 级雄性 SD 大鼠以及体外培养的人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC),均随机分为对照组、模型组、LncRNA MEG3 过表达组、miR-145-5p agomir 组、共转染(LncRNA MEG3 过表达质粒 + miR-145-5p agomir)组、共转染阴性对照(LncRNA MEG3 空载质粒 + miR-145-5p agomir 阴性对照质粒)组,采用腹腔注射链脲佐菌素建立 DR 大鼠模型,25 mmol · L<sup>-1</sup> 葡萄糖诱导 DR 细胞模型。对照组大鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液,对照组细胞以正常培养基培养,将大鼠与细胞均分组进行处理,以 LncRNA MEG3 质粒、miR-145-5p agomir 转染处理后,通过伊文思蓝(EB)检测大鼠视网膜血管通透性;TUNEL 染色检测大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡率;EdU 染色与 Hoechst 33258 染色分别检测细胞增殖、凋亡情况;依照试剂盒测量大鼠房水中及 HRMEC 炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-1β 含量;实时荧光定量 PCR 实验检测 HRMEC 及大鼠视网膜组织 miR-145-5p 表达;蛋白免疫印迹法检测 HRMEC 及大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)表达;双荧光素酶实验验证 HRMEC 中 LncRNA MEG3 对 miR-145-5p 的靶向调节作用。结果 LncRNA MEG3 过表达组大鼠玻璃体中 EB 含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中 IL-6、IL-1β 含量均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );miR-145-5p agomir 组大鼠玻璃体中 EB 含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中 IL-6、IL-1β 含量均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。LncRNA MEG3 过表达组 HRMEC 增殖率均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。HRMEC 凋亡率及 IL-6、IL-1β 含量均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。HRMEC 增殖率均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。LncRNA MEG3 过表达组 HRMEC、大鼠视网膜组织 miR-145-5p 及 Bax 表达均低于模型组、共转染组,Bcl-2 表达均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );miR-145-5p agomir 组 HRMEC、大鼠视网膜组织 miR-145-5p 及 Bax 表达均高于模型组、共转染组,Bcl-2 表达均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。转染野生型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 过表达质粒组细胞相对荧光素酶活性( $0.33 \pm 0.05$ )低于转染野生型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 空载质粒组( $1.02 \pm 0.21$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 LncRNA MEG3 可通过靶向下调 miR-145-5p 表达,抑制炎症反应,减轻 DR 大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡,促使 HRMEC DR 细胞模型存活,改善 DR 大鼠视网膜血管屏障功能。

【关键词】 长链非编码 RNA;母系表达基因 3;miR-145-5p;糖尿病视网膜病变;视网膜血管内皮细胞凋亡

【中图分类号】 R774

the HG + si-HMGB1 group were cultured in the medium with 25.0 mmol · L<sup>-1</sup> glucose. The expression levels of apoptosis-related proteins (Bax and Bcl-2) and autophagy-related proteins (LC3B and p62) were detected by Western Blot. The apoptosis rate was examined by TUNEL assay. **Results** The relative expression level of HMGB1 protein from the anterior lens capsules of patients in the DC group was  $1.18 \pm 0.02$ , which was higher than that in the ARC group ( $1.00 \pm 0.02$ ), and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). The relative expression level of HMGB1 protein from the SRA01/04 cells in the HG group was also significantly higher than that in the NG group ( $P < 0.001$ ). The relative expression level of HMGB1 mRNA from SRA01/04 cells in the si-HMGB1 group was significantly lower than that in the scr-siRNA group ( $P < 0.001$ ). The expression level of pro-apoptotic protein Bax from SRA01/04 cells in the HG group was higher than that in the NG group, while the expression level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was lower than that in the NG group (both  $P < 0.05$ ). After HMGB1 knockdown, the expression level of Bax from SRA01/04 cells in the HG + si-HMGB1 group was lower than that in the HG + scr-siRNA group, while the expression level of Bcl-2 was higher than that in the HG + scr-siRNA group, showing significant differences (both  $P < 0.05$ ). The expression level of LC3II from SRA01/04 cells in the HG group was higher than that in the NG group, while the expression level of p62 was lower than that in the NG group, and the differences were statistically significant (both  $P < 0.05$ ). The expression level of LC3II from SRA01/04 cells in the HG + si-HMGB1 group was significantly lower than that in the HG + scr-siRNA group, while the expression level of p62 was significantly higher than that in the HG + scr-siRNA group (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** HMGB1 may be involved in the occurrence and development of DC via regulating the apoptosis and autophagy of LEC.

【Key words】 high mobility group box 1; diabetic cataract; lens epithelial cells; apoptosis; autophagy

糖尿病视网膜病变(DR)是发生于糖尿病患者的微血管并发症,主要病理学特征包括视网膜血管内皮细胞受损、管腔变窄、视网膜神经节细胞凋亡等,可造成患者视力不同程度受损<sup>[1-2]</sup>。高糖可导致炎症因子过量表达,引起内皮细胞凋亡。抗炎治疗是目前改善DR的有效方法<sup>[3-4]</sup>。长链非编码RNA(LncRNA)母系表达基因3(MEG3)在DR患者体内表达明显减少,促进其表达可抑制炎症,降低汞诱导的人视网膜上皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>,并可通过抑制炎症因子的产生而减轻Müller细胞的胶质增生,延缓DR进展<sup>[6]</sup>。miR-145-5p是一种调控炎症和细胞增殖与凋亡的重要微小RNA分子,转染miR-145-5p抑制剂可降低炎症因子表达,提高高糖环境下视网膜神经节细胞活力,抑制其凋亡。因此,miR-145-5p可能是治疗DR的重要靶点<sup>[7-8]</sup>。有研究显示,在缺血再灌注损伤处理的肾脏细胞中,LncRNA MEG3可与miR-145-5p结合并下调其表达<sup>[9]</sup>,但LncRNA MEG3是否可通过靶向miR-145-5p影响DR大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡,目前尚不清楚。本文通过构建DR大鼠及细胞模型,探讨LncRNA MEG3对DR大鼠模型视网膜血管内皮细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物与细胞** SPF级雄性SD大鼠购自宁波科瑞特动物药业有限公司,体质量为180~210 g。将大鼠分笼饲养,每笼不超过6只,在本院动物中心屏障环境下饲养1周后用于实验。本研究实验操作遵守3R原则,动物处理遵循《实验动物管理条例》(2017修订版)的规定。人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)、HRMEC完全培养基均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 链脲佐菌素(试剂级)、葡萄糖(纯度≥99.5%)、miR-145-5p与U6引物、LncRNA MEG3过表达质粒、miR-145-5p agomir、LncRNA MEG3空载质粒、miR-145-5p agomir阴性对照、野生型miR-145-5p报告质粒、突变型miR-145-5p报告质粒、RIPA裂解液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,伊文思蓝(EB)溶液(纯度≥85%)、Opti-MEM减血清培养基、总RNA提取试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、即用型Hoechst 33258染色液(10 mg·L<sup>-1</sup>)、脂质体2000、一步法实时荧光定量PCR试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,Cell-Light™EdU荧光显微镜检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司,双荧光素酶试剂盒购自美国Promega公司,白细胞介素(IL)-1β检测试剂盒、BCA蛋白质定量检测试剂盒、IL-6检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,兔源β-actin一抗、兔源Bcl-2一抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、兔源Bax一抗均购自美国Abcam公司。

EnSpire™ 2300全自动酶标仪购自英国PerkinElmer公司,FSX100荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司,Stepone plus实时荧光定量PCR仪购自ABI公司,F96Pro荧光分光光度计购自上海棱光技术有限公司,CM3600 XP冷冻切片机购自德国Leica公司,Trans-Blot SD半干转膜系统、PowerPac Universal电泳仪、GelDox XR+凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 DR大鼠模型制备** 参考文献[10]制备DR大鼠模型:将链脲佐菌素溶于0.1 mol·L<sup>-1</sup>的柠檬酸缓冲液中,制成6 g·L<sup>-1</sup>溶液;大鼠禁食12 h后,自腹腔按照10 mL·kg<sup>-1</sup>剂量注入链脲佐菌素溶液,使其终剂量达到60 mg·kg<sup>-1</sup>,72 h后测量大鼠尾静脉血样中血糖水平,每天测量3次,连续一周内血糖浓度均超过16.7 mmol·L<sup>-1</sup>,表明DR模型建立成功。共成功构建DR模型大鼠60只,随机分为模型组、LncRNA MEG3过表达组、miR-145-5p agomir组、共转染组、共转染阴性对照组,每组分配12只大鼠,再取12只大鼠按照10 mL·kg<sup>-1</sup>剂量自腹腔注入0.1 mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸缓冲液,作为对照组。

**1.2.2 大鼠分组给药及视网膜血管通透性检测** 参考文献[11]给予大鼠药物:LncRNA MEG3过表达组大鼠玻璃体内注射LncRNA MEG3过表达质粒(浓度参照说明书设定);miR-145-5p agomir组大鼠玻璃体内注射miR-145-5p agomir(浓度参照说明书设定);共转染组大鼠玻璃体内同时注射LncRNA MEG3过表达质粒和miR-145-5p agomir;共转染阴性对照组大鼠玻璃体内同时注射LncRNA MEG3空载质粒和miR-145-5p agomir阴性对照质粒,各组大鼠均每7 d注射1次,共注射9次。

**视网膜血管通透性检测:**第9次注射后7 d,每组随机选出6只大鼠,自尾静脉向其体内注射20 g·L<sup>-1</sup>EB溶液5 mL,2 h后将大鼠置于充满乙醚气体的玻璃瓶中麻醉,然后取大鼠玻璃体,加入生理盐水研磨后离心,采用荧光分光光度计测出上清中EB含量,借此反映视网膜血管通透性。

**1.2.3 大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡检测及标本采集** 第9次注射后7 d,将每组剩余的6只大鼠以同样方法麻醉后取出房水,保存于-80℃备用。将取出房水后的大鼠,每组随机选出3只,取大鼠视网膜组织后平分为两份,一份存在液氮备用,另一份加入RIPA裂解液于冰水中高速研磨成浆,离心(4℃,20 min,1000 r·min<sup>-1</sup>)后以BCA试剂盒测量上清液中蛋白总浓度,根据测量结果将各组蛋白浓度调至相同后置入-80℃保存备用;将剩余的3只大鼠取出视网膜组织后,包埋并置于液氮中快速冰冻成块状,使用冰冻切片将其切为连续的薄片,自其中选出没有破损且厚薄均匀的切片,室温中静置5 min后,浸入冰丙酮中固定后以TUNEL试剂盒染色,漂洗后封片观



察,随机采集5个视野图像,以ImageJ软件分析,计算细胞凋亡率(凋亡细胞数/总细胞数×100%)。

**1.2.4 DR细胞模型制备及分组处理** 将购买的HRMEC复苏后置于37℃含体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中无菌培养,细胞融合度达到约80%时传代,然后接种在12孔板中无菌培养12h,随机分为对照组、模型组、LncRNA MEG3过表达组、miR-145-5p agomir组、共转染组、共转染阴性对照组,对照组细胞以HRMEC完全培养基培养,其余5组细胞均以含有25mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖的HRMEC完全培养基培养24h,诱导出DR细胞模型<sup>[11]</sup>,然后严格遵照脂质体2000试剂盒说明书指导步骤分组转染质粒、miR-145-5p agomir及其阴性对照质粒。

**1.2.5 细胞增殖、细胞凋亡检测及标本采集** 细胞分组转染48h后,弃去培养基,轻柔洗涤细胞后加入40g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛溶液固定2h,然后加入EdU,严格遵照Cell-Light™EdU荧光显微镜检测试剂盒说明书指导步骤检测细胞增殖情况,荧光显微镜下观察可发现EdU阳性细胞,即是增殖细胞,将对照组的EdU阳性细胞数作为标准,检测其余各组相对于对照组的EdU阳性细胞比例,即是各组细胞增殖率,对照组记为100%。

将传代的HRMEC接种在12孔板,以同样方法分组转染后48h,弃去培养基,轻柔洗涤细胞后加入40g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛溶液固定2h,然后加入10mg·L<sup>-1</sup>的Hoechst 33258染色5min,荧光显微镜下观察可发现凋亡细胞,将对照组的凋亡细胞数作为标准,检测其余各组相对于对照组的凋亡细胞比例,即是各组细胞凋亡率,对照组记为100%。

将传代的HRMEC接种在12孔板,以同样方法分组转染后48h,收集各组细胞及其培养液备用。

**1.2.6 大鼠房水中及HRMEC炎症因子IL-6、IL-1β含量检测** 取出1.2.3中大鼠房水置于4℃冰箱中冻融,取1.2.5中备用的各组细胞培养液离心(4℃,20min,1000r·min<sup>-1</sup>),以试剂盒测量房水及细胞培养液离心后上清液中IL-6、IL-1β含量,具体步骤严格遵照试剂盒说明书指导进行。

**1.2.7 HRMEC及大鼠视网膜组织miR-145-5p表达水平检测** 取出1.2.3中存于液氮中的大鼠视网膜组织和1.2.5中备用的各组细胞,均以总RNA提取试剂盒将其中总RNA提取出来,然后通过一步法实时荧光定量PCR试剂盒进行PCR扩增实验,具体步骤及反应条件严格遵照试剂盒说明书指导进行,所得数据以算法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。各基因引物序列见表1。

**1.2.8 HRMEC及大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax表达水平检测** 采用蛋白免疫印迹法检测HRMEC及大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)表达。取出1.2.3中保存的大鼠视网膜组织蛋白样品液置于4℃冰箱中冻融,取1.2.5中备用的

表1 基因引物序列		
基因	方向	引物序列(5'-3')
miR-145-5p	正向	GTCCAGTTTTCCTCCAGGAATCC
	反向	TCGCTTCGGCAGCACATAT
U6	正向	GCGCGTCGTGAAGCGTTC
	反向	GTGCAGGGTCCGAGGT

各组细胞,以RIPA裂解液提取总蛋白后离心(4℃,20min,1000r·min<sup>-1</sup>),以BCA试剂盒测量蛋白总浓度后调至各组相同,然后分别取上述各组大鼠视网膜组织及细胞蛋白样品液20μL,加热变性蛋白后,依次进行电泳、半干转实验,封闭膜上蛋白非特异位点,孵育兔源抗大鼠Bcl-2、Bax及β-actin一抗,洗涤、孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗,洗涤、显影,拍照后采集蛋白条带图像,并以ImageJ软件测定其灰度值,以内参β-actin为标准,计算各组蛋白的相对表达量,并进行统计分析。

**1.2.9 LncRNA MEG3对miR-145-5p靶向调控的检测** 将传代的HRMEC接种于24孔板,无菌培养12h后随机分为6组:转染野生型miR-145-5p报告质粒+LncRNA MEG3空载质粒组、转染野生型miR-145-5p报告质粒+LncRNA MEG3过表达质粒组、转染突变型miR-145-5p报告质粒+LncRNA MEG3空载质粒组、转染突变型miR-145-5p报告质粒+LncRNA MEG3过表达质粒组、转染miR-145-5p无义序列+LncRNA MEG3空载质粒组、转染miR-145-5p无义序列+LncRNA MEG3过表达质粒组,以1.2.4中方法分组转染24h后,收集各组细胞并用试剂盒检测双荧光素酶相对活性,具体操作遵照说明书指导步骤进行。

**1.3 统计学方法** 实验数据均为计量资料以均数±标准差表示,采用SPSS 24.0软件做统计学分析,对照组与模型组之间差异比较采用t检验;模型组与其余各组之间差异比较采用单因素方差分析,两两之间进一步比较行LSD-t检验。检验水准:α=0.05。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中炎症因子IL-6、IL-1β含量** 模型组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中IL-6、IL-1β含量均高于对照组,差异均有统计学意义(均为P<0.05)。LncRNA MEG3过表达组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中IL-6、IL-1β含量均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为P<0.05);miR-145-5p agomir组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中IL-6、IL-1β含量均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为P<0.05);共转染阴性对照组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中IL-6、IL-1β含量与模型组、共转染组相比,差异均无统计学意义(均

为  $P>0.05$ )(图1和表2)。

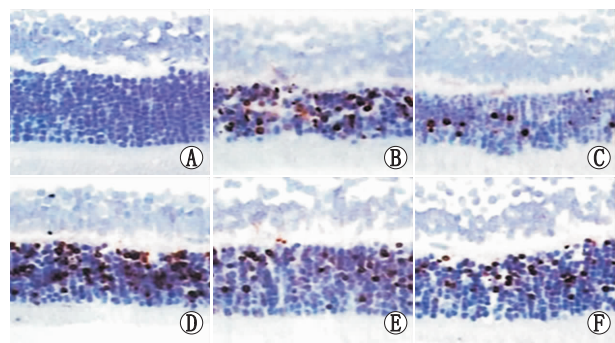


图1 各组大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡情况(×200)  
A:对照组;B:模型组;C:LncRNA MEG3 过表达组;D:miR-145-5p agomir 组;E:共转染组;F:共转染阴性对照组。

表2 各组大鼠玻璃体中EB含量、视网膜血管内皮细胞凋亡率及房水中炎症因子IL-6、IL-1β含量

组别	EB 含量/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	视网膜血管内皮细胞凋亡率/%	IL-6 含量/( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ 含量/( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
对照组	13.24 ± 3.08	0.00 ± 0.00	26.41 ± 4.02	20.93 ± 3.95
模型组	30.85 ± 4.53 <sup>a</sup>	32.69 ± 3.41 <sup>a</sup>	237.35 ± 32.07 <sup>a</sup>	163.48 ± 18.64 <sup>a</sup>
LncRNA MEG3 过表达组	16.02 ± 3.10 <sup>bc</sup>	3.01 ± 0.93 <sup>bc</sup>	30.07 ± 3.96 <sup>bc</sup>	24.21 ± 4.13 <sup>bc</sup>
miR-145-5p agomir 组	41.26 ± 4.21 <sup>bc</sup>	49.78 ± 5.12 <sup>bc</sup>	380.21 ± 50.14 <sup>bc</sup>	306.94 ± 25.69 <sup>bc</sup>
共转染组	28.96 ± 3.67	30.02 ± 3.73	226.72 ± 38.12	156.57 ± 19.10
共转染阴性对照组	31.03 ± 4.18	33.15 ± 4.02	335.43 ± 37.63	164.02 ± 23.82

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与共转染组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

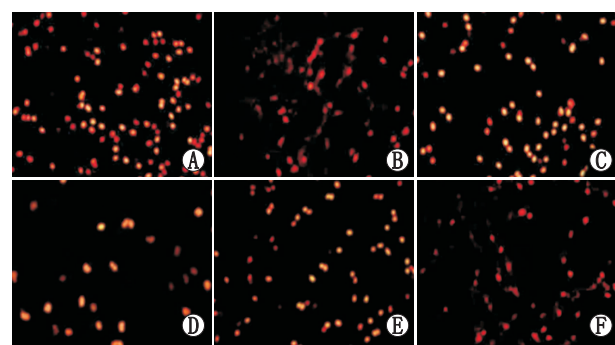


图2 各组HRMEC增殖情况(×200) A:对照组;B:模型组;C:LncRNA MEG3 过表达组;D:miR-145-5p agomir 组;E:共转染组;F:共转染阴性对照组。

表3 各组HRMEC增殖率、凋亡率及炎症因子IL-6、IL-1β含量

组别	HRMEC 增殖率/%	HRMEC 凋亡率/%	IL-6 含量/( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ 含量/( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.23 ± 0.04	0.18 ± 0.03
模型组	56.73 ± 6.15 <sup>a</sup>	193.68 ± 14.59 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.14 <sup>a</sup>
LncRNA MEG3 过表达组	93.85 ± 10.82 <sup>bc</sup>	109.12 ± 10.18 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.07 <sup>bc</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>bc</sup>
miR-145-5p agomir 组	34.62 ± 4.20 <sup>bc</sup>	276.36 ± 17.53 <sup>bc</sup>	1.10 ± 0.15 <sup>bc</sup>	1.86 ± 0.17 <sup>bc</sup>
共转染组	58.74 ± 5.93	187.48 ± 15.26	0.63 ± 0.11	1.01 ± 0.13
共转染阴性对照组	55.81 ± 6.22	194.07 ± 16.24	0.67 ± 0.09	1.06 ± 0.10

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与共转染组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

### 2.3 各组HRMEC、大鼠视网膜组织miR-145-5p及凋亡相关蛋白表达情况

模型组HRMEC、大鼠视

2.2 各组HRMEC增殖率、凋亡率及炎症因子IL-6、IL-1β含量 模型组HRMEC增殖率低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );HRMEC凋亡率及IL-6、IL-1β含量均高于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ )。LncRNA MEG3 过表达组HRMEC增殖率均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ );HRMEC凋亡率及IL-6、IL-1β含量均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ )。miR-145-5p agomir 组HRMEC增殖率均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ ),HRMEC凋亡率及IL-6、IL-1β含量均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ );共转染阴性对照组HRMEC增殖率、凋亡率及IL-6、IL-1β含量与模型组、共转染组相比,差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$ )(图2、图3和表3)。

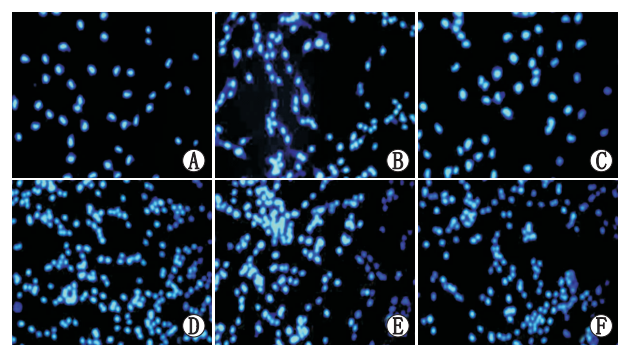


图3 各组HRMEC凋亡情况(×200) A:对照组;B:模型组;C:LncRNA MEG3 过表达组;D:miR-145-5p agomir 组;E:共转染组;F:共转染阴性对照组。

网膜组织miR-145-5p及Bax表达高于对照组,Bcl-2表达低于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P<$



0.05)。LncRNA MEG3 过表达组 HRMEC、大鼠视网膜组织 miR-145-5p 及 Bax 表达均低于模型组、共转染组,Bcl-2 表达均高于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );miR-145-5p agomir 组 HRMEC、大鼠视网膜组织 miR-145-5p 及 Bax 表达均高于模型组、共转染组,Bcl-2 表达均低于模型组、共转染组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );共转染阴性对照组 HRMEC、大鼠视网膜组织 miR-145-5p 及 Bax、Bcl-2 表达与模型组、共转染组相比,差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ )(图 4 和表 4)。

表 4 各组大鼠视网膜组织和 HRMEC miR-145-5p 及凋亡相关蛋白表达情况

组别	大鼠视网膜组织蛋白相对表达量			HRMEC 蛋白相对表达量		
	miR-145-5p/U6	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	miR-145-5p/U6	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
对照组	1.01 ± 0.12	0.87 ± 0.10	0.39 ± 0.05	0.97 ± 0.15	1.03 ± 0.14	0.41 ± 0.04
模型组	1.82 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.15 <sup>a</sup>
LncRNA MEG3 过表达组	1.14 ± 0.20 <sup>bc</sup>	0.81 ± 0.12 <sup>bc</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>bc</sup>	1.08 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.98 ± 0.13 <sup>bc</sup>	0.48 ± 0.06 <sup>bc</sup>
miR-145-5p agomir 组	2.43 ± 0.17 <sup>bc</sup>	0.10 ± 0.02 <sup>bc</sup>	1.41 ± 0.19 <sup>bc</sup>	2.35 ± 0.16 <sup>bc</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>bc</sup>	1.60 ± 0.16 <sup>bc</sup>
共转染组	1.75 ± 0.16	0.47 ± 0.06	0.87 ± 0.10	1.72 ± 0.10	0.61 ± 0.12	0.98 ± 0.14
共转染阴性对照组	1.84 ± 0.21	0.42 ± 0.05	0.90 ± 0.12	1.80 ± 0.17	0.57 ± 0.08	1.05 ± 0.11

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与共转染组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 HRMEC 中 LncRNA MEG3 对 miR-145-5p 的靶向调节作用** 通过在线预测软件 targetscan 发现 LncRNA MEG3 与 miR-145-5p 之间有结合位点(图 5)。转染野生型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 过表达质粒组细胞相对荧光素酶活性( $0.33 \pm 0.05$ )低于转染野生型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 空载质粒组( $1.02 \pm 0.21$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ );转染突变型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 空载质粒组细胞相对荧光素酶活性( $0.98 \pm 0.14$ )与转染突变型 miR-145-5p 报告质粒 + LncRNA MEG3 过表达质粒组( $1.01 \pm 0.22$ )相比,转染 miR-145-5p 无义序列 + LncRNA MEG3 空载质粒组细胞相对荧光素酶活性( $0.99 \pm 0.16$ )与转染 miR-145-5p 无义序列 + LncRNA MEG3 过表达质粒组( $1.03 \pm 0.24$ )相比,差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ )。

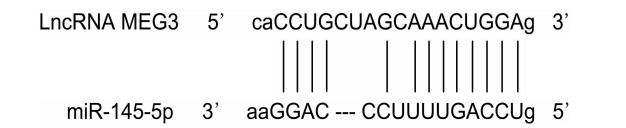


图 5 预测软件 targetscan 显示的 LncRNA MEG3 和 miR-145-5p 之间结合位点

3 讨论

DR 是糖尿病引发的最常见眼部并发症,对患者日常工作和生活造成很大不便,防治 DR 是糖尿病与眼底病领域的研究热点<sup>[12-13]</sup>。本实验通过腹腔注射链脲佐菌素建立大鼠 DR 模型,以  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖诱导 DR 细胞模型,结果显示,链脲佐菌素可

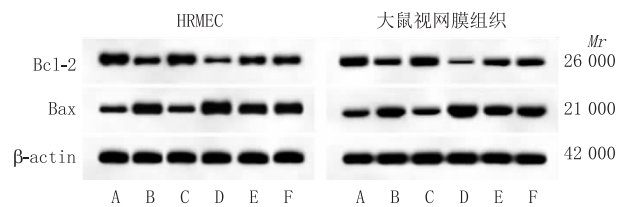


图 4 各组 HRMEC 及大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白表达情况 A:对照组;B:模型组;C:LncRNA MEG3 过表达组;D:miR-145-5p agomir 组;E:共转染组;F:共转染阴性对照组。

造成大鼠高血糖,促使炎症因子 IL-6、IL-1β 表达,引发炎症,导致视网膜血管内皮细胞凋亡,视网膜血管屏障功能受损,另外高糖可通过诱导炎症因子 IL-6、IL-1β 过表达而引发 HRMEC 细胞炎症,抑制其增殖,并促进其凋亡。这表明 DR 大鼠及细胞模型构建成功。

研究显示,LncRNA MEG3 是介导 DR 发生发展的重要 RNA 分子,在 DR 患者血清中,LncRNA MEG3 水平显著降低<sup>[14]</sup>;过表达 MEG3 可抑制 DR 大鼠模型和细胞模型内皮间充质转化,缓解视网膜病变<sup>[15]</sup>。本实验以 LncRNA MEG3 过表达质粒干预处理 DR 大鼠模型和细胞模型,可降低炎症因子 IL-6、IL-1β 表达,抑制炎症发生及进展,减轻高糖导致的 HRMEC 及大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡,修复 DR 大鼠视网膜血管屏障功能。这表明过表达 LncRNA MEG3 可抑制 DR 大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡,再次证实了其对 DR 可起到防治作用。

DR 发病原因复杂,高糖引发的炎症是导致 DR 患者视网膜微血管内皮细胞凋亡的主要病理因素,减轻炎症、抑制视网膜血管内皮细胞凋亡是防治 DR 的重要手段<sup>[16-17]</sup>。miR-145-5p 可介导炎症因子诱导的炎症反应,抑制炎症因子表达,阻断炎症信号转导,显著减轻脂多糖引发的小胶质细胞炎症反应,从而改善继发性脊髓损伤<sup>[18-19]</sup>,还可保护视网膜神经节细胞免受高糖诱导的炎症损伤<sup>[8]</sup>。而 LncRNA MEG3 可通过靶向抑制 miR-145-5p 表达,影响结核杆菌感染的巨噬细胞的生物学活性<sup>[20]</sup>,因而推测下调 miR-145-5p 表达可能是过表达 MEG3 治疗 DR 的分子机制。本研究以 miR-145-5p agomir 上调 DR 大鼠及细胞模型中 miR-145-5p 的表达,可增强炎症因

子表达,放大炎症反应,促进 HRMEC 及视网膜血管内皮细胞凋亡,加重 DR 大鼠视网膜血管屏障功能损伤,而过表达 LncRNA MEG3 可靶向下调 HRMEC 中 miR-145-5p 表达,并抑制 DR 大鼠视网膜组织过表达 miR-145-5p。另外,本实验结果显示,miR-145-5p agomir 可减弱过表达 LncRNA MEG3 对炎症因子表达的抑制作用,拮抗对炎症的减轻功效,最终逆转过表达 LncRNA MEG3 对视网膜血管内皮细胞凋亡的改善作用。这表明 miR-145-5p 介导 DR 的发生发展过程,LncRNA MEG3 可通过靶向下调 miR-145-5p 抑制炎症反应,从而减轻 DR 大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡。

综上所述,LncRNA MEG3 可靶向下调 HRMEC 中 miR-145-5p 表达,从而降低高糖引发的炎症因子表达,抑制视网膜组织炎症及视网膜血管内皮细胞凋亡,改善血管通透性,进而修复血-视网膜屏障功能。本研究为 DR 的防治提供了新的候选治疗靶点,为 DR 临床治疗策略的改进及发展提供了参考。

参考文献

[1] ANTONETTI D, SILVA P S, STITT A W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(4): 195-206.

[2] HE M, CHEN H, WANG W. Refractive errors, ocular biometry and diabetic retinopathy: a comprehensive review[J]. *Curr Eye Res*, 2021, 46(2): 151-158.

[3] YU M D, ZHANG L J, SUN S S, ZHANG Z H. Gliquidone improves retinal injury to relieve diabetic retinopathy via regulation of SIRT1/Notch1 pathway[J]. *BMC Ophthalmol*, 2021, 21(1): 451.

[4] WANG H, ZHANG M, ZHOU H, CAO L, ZHOU J, CHEN Q, et al. Salusin-β mediates high glucose-induced inflammation and apoptosis in retinal capillary endothelial cells via a ROS-dependent pathway in diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 2021(14): 2291-2308.

[5] LUO R, JIN H, LI L, HU Y X, XIAO F. Long noncoding RNA MEG3 inhibits apoptosis of retinal pigment epithelium cells induced by high glucose via the miR-93/Nrf2 axis[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(9): 1813-1822.

[6] TU Y, ZHU M, WANG Z, WANG K, CHEN L, LIU W, et al. Melatonin inhibits Müller cell activation and pro-inflammatory cytokine production via upregulating the MEG3/miR-204/Sirt1 axis in experimental diabetic retinopathy[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8724-8735.

[7] LIU X, SU K, KUANG S, FU M, ZHANG Z. miR-16-5p and miR-145-5p trigger apoptosis in human gingival epithelial cells by down-regulating BACH2[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 901-911.

[8] ZHANG J, CUI C, XU H. Downregulation of miR-145-5p elevates retinal ganglion cell survival to delay diabetic retinopathy progress by targeting FGF5[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(9): 1655-1662.

[9] LIU D, LIU Y, ZHENG X, LIU N. c-MYC-induced long noncoding RNA MEG3 aggravates kidney ischemia-reperfusion injury through activating mitophagy by upregulation of RTKN to trigger the Wnt/β-catenin pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 191-206.

[10] XU Y, ZHANG Y, LIANG H, LIU X. Coumestrol mitigates retinal cell inflammation, apoptosis, and oxidative stress in a rat model of diabetic retinopathy via activation of SIRT1[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(4): 5342-5357.

[11] 刘轩,程育宏,齐赞,崔丽娟,丁国龙,杨文,等. miR-939-5p 对糖尿病视性网膜病变和视网膜微血管内皮细胞的调控作用[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(22): 4249-4255, 4307.

[12] LIU X, CHENG Y H, QI Y, CUI L J, DING G L, YANG W, et al. Diabetic retinopathy MiR-939-5p Inducible nitric oxide synthase Human retinal microvascular endothelial cells[J]. *Prog Mod Biomed*, 2021, 21(22): 4249-4255, 4307.

[13] VALDEZGUERRERO A S, QUINTANA-PÉREZ J C, ARELLANO-MENDOZA M G, CASTAEDA-IBARRA F J, TAMAYCACH F, ALEMÁN-GONZÁLEZ-DUHART D. Diabetic retinopathy: important biochemical alterations and the main treatment strategies[J]. *Can J Diabetes*, 2021, 45(6): 504-511.

[14] AZAD R, SINHA S, NISHANT P. Asymmetric diabetic retinopathy[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2021, 69(11): 3026-3034.

[15] ZHANG D, QIN H, LENG Y, LI X, ZHANG L, BAI D, et al. LncRNA MEG3 overexpression inhibits the development of diabetic retinopathy by regulating TGF-β1 and VEGF[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2337-2342.

[16] HE Y, DAN Y, GAO X, HUANG L, CHEN J. DNMT1-mediated lncRNA MEG3 methylation accelerates endothelial-mesenchymal transition in diabetic retinopathy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 320(3): E598-E608.

[17] ZOU C, GU C, ZHAO M, ZHU D, ZHANG Z. The role of the AIMP1 pathway in diabetic retinopathy: AIMP1-targeted intervention study in diabetic retinopathy[J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(2): 122-132.

[18] ZHOU P, XIE W, MENG X, ZHAI Y, DONG X, ZHANG X, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates diabetic retinopathy through PINK1-dependent activation of mitophagy[J]. *Cells*, 2019, 8(3): 213-236.

[19] ZAMANIAN A M, REZAEI-TAVIRANI M, REZAEI-TAVIRANI M, ROBATI R M. Gestational diabetes mellitus regulatory network identifies hsa-miR-145-5p and hsa-miR-875-5p as potential biomarkers[J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2019, 17(3): e86640-e86646.

[20] JIANG L, WEI Z C, XU L L, YU S Y, LI C. Inhibition of miR-145-5p reduces spinal cord injury-induced inflammatory and oxidative stress responses via affecting Nurr1-TNF-α signaling axis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2021, 79(4): 791-799.

[21] SUN W, LOU H, CAO J, WANG P, SUN Q. LncRNA MEG3 control mycobacterium tuberculosis infection via controlled MiR-145-5p expression and modulation of macrophages proliferation[J]. *Microb Pathog*, 2020, 149(4): 104550-1045507.

Effect of long non-coding ribonucleic acid maternally expressed gene 3 on retinal vascular endothelial cell apoptosis in rats with diabetes retinopathy

WANG Yanping, LIU Hanjun

Department of Ophthalmology, Xiantao First People's Hospital Affiliated to Changjiang University, Xiantao 433000, Hubei Province, China

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of long non-coding ribonucleic acid (LncRNA) maternally expressed gene 3 (MEG3) on apoptosis of retinal vascular endothelial cells in diabetes retinopathy (DR) rats. **Methods** Specific pathogen-free male Sprague-Dawley rats and human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) cultured in vitro were randomly divided into control group, model group, LncRNA MEG3 overexpression group, miR-145-5p agomir group, co-transfection (LncRNA MEG3 overexpression plasmid + miR-145-5p agomir) group, and co-transfection negative control

(LncRNA MEG3 empty plasmid + miR-145-5p agomir negative control plasmid) group. DR rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin, and the DR cell model was induced by  $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose. The rats in the control group were intraperitoneally injected with citrate acid buffer, and the cells in the control group were cultured in a normal medium. The rats and cells were divided into groups and transfected with LncRNA MEG3 plasmid and miR-145-5p agomir, then the retinal vascular permeability was detected by Evans blue (EB); the apoptosis rate of retinal vascular endothelial cells was detected by TUNEL staining; cell proliferation and apoptosis were detected by EdU and Hoechst 33258 staining, respectively; the contents of inflammatory factor interleukin (IL)-6 and IL-1 $\beta$  in the aqueous humor of rats and HRMEC were measured with kits; the expression of miR-145-5p in HRMEC and rat retinal tissue was detected by real-time quantitative PCR experiment; the expressions of apoptosis-related proteins (Bcl-2 and Bax) in HRMEC and rat retina were detected by western blot; the targeted regulation of LncRNA MEG3 on miR-145-5p in HRMEC was verified by dual-luciferase experiments.

**Results** The content of EB in the vitreous body, the apoptosis rate of retinal vascular endothelial cells, and the contents of IL-6 and IL-1 $\beta$  in the aqueous humor of rats in the LncRNA MEG3 overexpression group were lower than those in the model group and co-transfection group, and the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ); the content of EB in vitreous body, the apoptosis rate of retinal vascular endothelial cells, the contents of IL-6 and IL-1 $\beta$  in aqueous humor of rats in the miR-145-5p agomir group were higher than those in the model group and co-transfection group, and the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The proliferation rate of HRMEC in the LncRNA MEG3 overexpression group was significantly higher than that in the model group and co-transfection group (both  $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate of HRMEC and the contents of IL-6, IL-1 $\beta$  were significantly lower than those in the model group and co-transfection group (all  $P < 0.05$ ); the proliferation rate of HRMEC in the miR-145-5p agomir group was significantly lower than that in the model group and co-transfection group (both  $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate of HRMEC and the contents of IL-6, IL-1 $\beta$  were significantly higher than those in the model group and co-transfection group (all  $P < 0.05$ ). The expressions of miR-145-5p and Bax in HRMEC and rat retinal tissue in the LncRNA MEG3 overexpression group were lower than those in the model group and co-transfection group, and the expression of Bcl-2 was higher than that in the model group and co-transfection group, with statistical significance (all  $P < 0.05$ ); the expressions of miR-145-5p and Bax in HRMEC and rat retinal tissue in the miR-145-5p agomir group were higher than those in the model group and co-transfection group, and the expression of Bcl-2 was lower than that in the model group and co-transfection group, with statistical significance (all  $P < 0.05$ ). The relative luciferase activity of cells in the wild-type miR-145-5p-transfected report plasmid + LncRNA MEG3 overexpression plasmid group ( $0.33 \pm 0.05$ ) was lower than that in the wild-type miR-145-5p-transfected report plasmid + LncRNA MEG3 empty plasmid group ( $1.02 \pm 0.21$ ), and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** LncRNA MEG3 can realize the targeted down-regulation of miR-145-5p expression to inhibit the inflammatory response, reduce the apoptosis of retinal vascular endothelial cells in DR rats, promote the survival of HRMEC DR cell model, and improve retinal vascular barrier function in DR rats.

**[Key words]** long non-coding ribonucleic acid; maternally expressed gene 3; miR-145-5p; diabetic retinopathy; retinal vascular endothelial cell apoptosis