引文格式：张虹，陈颖平，陈圣文. miR-124-3p 靶向调控 KLF6 基因表达对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 眼科新进展，2020，40(2)：125-130. doi：10.13389/j.cnki.rao.2020.0030

【实验研究】

miR-124-3p 靶向调控 KLF6 基因表达对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞增殖和凋亡的影响

张虹　陈颖平　陈圣文

作者简介：张虹，女，1983 年 7 月出生，主治医师。主要研究方向：眼表及眼底病。联系电话：13648653258；E-mail：yazhu25203@163.com；ORCID：0000-0002-9414-8748

收稿日期：2019-06-29
修回日期：2019-09-11
本文编辑：方红玲

作者单位：570216　海南省海口市，海南医学院第二附属医院眼科

【摘要】 **目的**　探讨微小 RNA-124-3p(miR-124-3p)对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞增殖及凋亡的影响及其靶向调控 Krüppel 样因子 6(Krüppel like factor 6，KLF6)的机制。**方法**　按 HLE-B3 细胞处理方式的不同，将其分为 HLE-B3 组、HLE-B3 + H_2O_2 组、HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组、HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组、HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC 组、HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6 组、miR-124-3p + pcDNA3.1 组、miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 组。利用 MTT 实验检测各组 HLE-B3 细胞增殖活性，流式细胞仪检测各组 HLE-B3 细胞凋亡。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-124-3p 与 KLF6 的靶向关系。Western blot 检测各组 HLE-B3 细胞中 Cyclin D1、P21、Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果**　H_2O_2 可抑制人晶状体上皮 HLE-B3 细胞中 miR-124-3p 的表达(HLE-B3 组 0.79 ± 0.07、HLE-B3 + H_2O_2 组 0.31 ± 0.03)(P < 0.05)，而明显促进 KLF6 的表达；miR-124-3p 过表达或抑制 KLF6 表达可促进 HLE-B3 细胞增殖，抑制 HLE-B3 细胞凋亡(19.34 ± 1.27、7.66 ± 0.38；19.29 ± 1.33、11.46 ± 1.02)，促进 Cyclin D1(0.39 ± 0.04、0.89 ± 0.08；0.39 ± 0.04、0.74 ± 0.07)、Bcl-2 表达(0.29 ± 0.03、0.74 ± 0.07；0.29 ± 0.03、0.60 ± 0.06)，抑制 P21(0.73 ± 0.07、0.26 ± 0.03；0.79 ± 0.07、0.33 ± 0.03)、Bax 表达(0.86 ± 0.08、0.37 ± 0.03；0.86 ± 0.08、0.51 ± 0.05)。共转染 miR-124-3p mimics 与 WT-KLF6 可明显降低 HLE-B3 细胞的荧光素酶活性(0.27 ± 0.03、0.98 ± 0.08)(P < 0.05)；过表达 KLF6 可逆转 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 细胞增殖及凋亡的作用。**结论**　miR-124-3p 可通过靶向调控 KLF6 表达进而促进 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 细胞增殖并抑制其凋亡。

【关键词】 miR-124-3p；KLF6；人晶状体上皮细胞；氧化应激；增殖；凋亡
【中图分类号】 R776

白内障是临床上常见眼病之一，内质网样氧化应激反应可促使人晶状体上皮细胞凋亡，进而导致白内障发生[1]。目前，临床上可通过手术治疗白内障，但手术极易产生后囊膜混浊等并发症，因而深入了解白内障发生机制并积极寻找治疗靶点十分重要。H_2O_2 处理人晶状体上皮细胞可影响细胞活性，并诱导细胞凋亡[2]。研究表明，Krüppel 样因子 6(Krüppel like factor 6，KLF6)，又称锌指转录因子 6，在大鼠晶状体上皮细胞中高表达，并可通过降解 p21 和 p27kip1 进而抑制细胞增殖[3]。KLF6 可通过活化 ATF4 促进晶状体上皮细胞凋亡[4]。但 KLF6 在 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞的表达变化及其上游调控微小 RNA(microRNA，miRNA)的作用尚未见报道。miRNA 是一种内源性非编码单链 RNA 分子，miRNA 可通过调控下游基因表达进而参与白内障发生及发展过程，但其具体作用机制尚未完全阐明[5-6]。研究表明，体外和体内上调微小 RNA-124(microRNA-124，miR-124)可减轻脊髓损伤后的氧化损伤[7]。通过靶基因预测软件发现，KLF6 可能是微小 RNA-124-3p(microRNA-124-3p，miR-124-3p)靶基因，然而 miR-124-3p 是否通过调控 KLF6 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞增殖、凋亡产生影响尚未见相关报道。因此，本研究通过观察人晶状体上皮细胞在 H_2O_2 作用前后 miR-124-3p 与 KLF6 的表达变化，初步分析其对人晶状体上皮细胞增殖及凋亡的影响，为深入分析白内障发病机制提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料　人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 购自吉妮欧生物科技有限公司。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、体积分数 10% 胎牛血清、10 g · L^{-1} 青霉素及链霉素均购自美国 Gibco 公司；Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司；miR-124-3p 模拟物(mimics)、miR-124-3p 抑制剂(anti-miR-124-3p)及其各自阴性对照均购自广州锐博生物科技有限公司；siRNA KLF6(si-KLF6)及其阴性对照(si-NC)均购自上海吉玛制药技术有限公司；兔抗人 KLF6 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司；兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 CST 公司；Trizol 试剂购自北京索莱宝科技有限公司；反转录试剂盒与 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司；PVDF 膜购自德国 Millipore 公司；甲基四唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司；膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)细胞凋亡试剂盒购自大连美仑生物技术有限

公司;兔抗人 Cyclin D1 单克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司;鼠抗人 p21 单克隆抗体购自美国 NeoMarker 公司;兔抗人 Bax、Bcl-2 抗体购自美国 ProteinTech 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔与山羊抗鼠 IgG 二抗购自江苏碧云天生物技术有限公司;H_2O_2 购自上海抚生实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 H_2O_2 诱导细胞模型构建 不含胎牛血清 RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 培养基加入终浓度为 100 μmol·L^{-1} H_2O_2,将未经处理的 HLE-B3 细胞作为 HLE-B3 组,H_2O_2 诱导 48 h 的 HLE-B3 细胞作为 HLE-B3 + H_2O_2 组。同时另将 H_2O_2 加入到转染后各组 HLE-B3 细胞中,放入 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 培养箱内继续培养 48 h 后收集细胞[8],严格参照 Lipofectamine2000 试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 细胞培养、转染及实验分组 HLE-B3 细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 培养箱培养,取对数生长期的 HLE-B3 细胞以 5000 个·mL^{-1} 的浓度接种于 6 孔板,调整细胞浓度为(100×10^3 个·mL^{-1}),待细胞浓度达到 40%~60% 进行转染,参照 Lipofectamine2000 转染试剂盒说明书分别将 miR-124-3p mimics 与 miR-NC 加入到 HLE-B3 细胞,si-NC 与 si-KLF6 加入到 HLE-B3 细胞,分别为 miR-NC 组、miR-124-3p 组、si-NC 组、si-KLF6 组。收集各组转染后 12 h 的细胞,均使用 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 处理细胞 48 h,分别为 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组、HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组、HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC 组、HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6 组。共转染组为 miR-124-3p mimics 与 pcDNA3.1 共转染至 HLE-B3 细胞,miR-124-3p mimics 与 pcDNA3.1-KLF6 共转染至 HLE-B3 细胞,分别命名为 miR-124-3p + pcDNA3.1 组、miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 组。

1.2.3 qRT-PCR 检测 HLE-B3 细胞中 miR-124-3p、KLF6 mRNA 表达 收集各组对数生长期 HLE-B3 细胞,加入 200 μL 氯仿,振荡 5 s 后室温放置 5 min,12×10^3 r·min^{-1} 离心 15 min,吸取上层水相层放入另一无菌无酶的 1.5 mL EP 试管内,加入 500 μL 异丙醇振荡 5 s 后室温放置 20 min,12×10^3 r·min^{-1} 离心 15 min,弃上清,加入体积分数 75% 乙醇混合后 12×10^3 r·min^{-1} 离心 5 min,晾干后加入适量 DEPC 水溶解 RNA。紫外分光光度计检测 RNA 浓度,按照反转录试剂盒说明书得到 cDNA,根据试剂盒说明书配置 qRT-PCR 反应体系;反应条件为 95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共循环 40 次。$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-124-3p、KLF6 mRNA 相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 KLF6、Cyclin D1、P21、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取各组对数生长期 HLE-B3 细胞,PBS 洗 5 min × 3 次,以每孔 500 μL 的密度加入 RIPA 裂解液,冰上放置 5 min,刮取细胞置于 1.5 mL 离心管,冰上静置 5 min,12×10^3 r·min^{-1} 离心 10 min,收集上清提取蛋白。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,反应结束后将分离的蛋白凝胶转移至 PVDF 膜,50 g·L^{-1} 脱脂奶粉封闭 1 h,加入蛋白一抗(稀释比例为 1∶1000)4 ℃ 下孵育 24 h,TBST 洗 10 min × 3 次,加入蛋白二抗(稀释比例为 1∶5000),TBST 洗 10 min × 3 次,滴加 ECL 显影,放入凝胶成像仪曝光并应用 Quantityone 软件检测条带灰度值。蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参照条带灰度值。

1.2.5 细胞增殖实验 收集转染后各组 HLE-B3 细胞,置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱,分别于培养 12 h、24 h、36 h 时,12×10^3 r·min^{-1} 离心 10 min,弃上清液,每孔加入 5 g·L^{-1} MTT 溶液 20 μL,放入 37 ℃ 恒温培养箱内继续培养 4 h,12×10^3 r·min^{-1} 离心 10 min,弃上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL,涡旋振荡后置于全自动酶标仪检测波长为 490 nm 处各孔光密度值(*A* 值),每组实验均设置 3 次重复。

1.2.6 细胞凋亡实验 收集各组对数生长期 HLE-B3 细胞,2.5 g·L^{-1} 胰蛋白酶消化细胞,预冷 PBS 洗涤细胞,4 ℃ 下 2000 r·min^{-1} 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 结合缓冲液调整细胞浓度为 100×10^3 个·mL^{-1},加入 5 μL Annexin V-FITC/PI 双染试剂,室温下避光孵育 20 min,冰上放置 5 min,加入 500 μL 结合缓冲液,充分混合均匀后放入流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 靶基因预测库预测 miR-124-3p 的靶基因,结果发现 miR-124-3p 与 KLF6 的 3'UTR 存在结合位点,构建野生型 KLF6 的 3'UTR(WT-KLF6)质粒,突变型 KLF6 的 3'UTR(MUT-KLF6),收集对数生长期 HLE-B3 细胞,用含体积分数 10% 胎牛血清及 10 g·L^{-1} 青霉素-链霉素混合溶液的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为每孔 200×10^3 个,将 WT-KLF6、MUT-KLF6 与 miR-124-3p mimics 或阴性对照共转染至 HLE-B3 细胞,放入 37 ℃、含体积分数 5% CO_2 培养箱继续培养 48 h,检测细胞荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

本研究数据分析采用 SPSS 19.0 统计学软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准:$\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 miR-124-3p、KLF6 在 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 中的表达

与 HLE-B3 组细胞相比,HLE-B3 + H_2O_2 组 HLE-B3 中 miR-124-3p 表达水平显著降低($P < 0.05$),而 KLF6 mRNA 及蛋白表达

水平显著升高($P<0.05$)。见表1。

表1 miR-124-3p、KLF6 mRNA 和蛋白在 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	miR-124-3p	KLF6 mRNA	KLF6 蛋白
HLE-B3 组	0.79±0.07	1.01±0.10	0.27±0.02
HLE-B3 + H_2O_2 组	0.31±0.03[a]	1.36±0.14	0.64±0.06[a]

注:与 HLE-B3 组比较,[a]$P<0.05$

2.2 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖的影响 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组 HLE-B3 中 miR-124-3p 的表达水平显著高于 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组($P<0.05$)。相较于 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组,HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组 HLE-B3 细胞活性显著增强($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组 HLE-B3 细胞中 Cyclin D1 蛋白表达水平与 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组相比显著升高($P<0.05$),而 P21 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。见表2、表3。

2.3 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 凋亡的影响 与 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组相比,HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 凋亡率显著降低($P<0.05$)。Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达结果显示,HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 中 Bax 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),见表4、图1。

表2 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的 HLE-B3 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	miR-124-3p	A 值		
		12 h	24 h	36 h
HLE-B3 组	0.93±0.09	1.59±0.16	1.07±0.11	0.83±0.08
HLE-B3 + H_2O_2 组	0.26±0.02[a]	0.84±0.08[a]	0.43±0.04[a]	0.27±0.02[a]
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组	0.28±0.02	0.88±0.08	0.41±0.04	0.26±0.02
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组	0.61±0.06[b]	1.28±0.11[b]	0.75±0.07[b]	0.47±0.04[b]

注:与 HLE-B3 组比较,[a]$P<0.05$;与 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组比较,[b]$P<0.05$

2.4 miR-124-3p 靶向调控 KLF6 的表达 双荧光素酶报告基因检测结果显示,miR-124-3p mimics、野生型载体 WT-KLF6 共转染至 HLE-B3 细胞后细胞荧光素酶活性(0.27±0.03)低于阴性对照、WT-KLF6 共转染组(0.98±0.08)($P<0.05$),miR-124-3p mimics、突变型载体 MUT-KLF6 共转染(1.01±0.09)与阴性对照、MUT-KLF6 共转染组比较(0.96±0.08),差异无统计学意义($P>0.05$)。qRT-PCR 与 Western blot 实验分别检测 miR-124-3p 过表达或抑制 miR-124-3p 表达后 HLE-B3 细胞中 KLF6 mRNA 及蛋白表达变化,miR-124-3p 过表达后 HLE-B3 细胞中 KLF6 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低(均为 $P<0.05$),而抑制 miR-124-3p 表达后 HLE-B3 细胞中 KLF6 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高(均为$P<0.05$)。见表5。

表3 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的 HLE-B3 细胞增殖蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白
HLE-B3 组	1.03±0.10	0.13±0.01
HLE-B3 + H_2O_2 组	0.37±0.04[a]	0.74±0.07[a]
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组	0.39±0.04	0.73±0.07
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组	0.89±0.08[b]	0.26±0.03[b]

注:与 HLE-B3 组比较,[a]$P<0.05$;与 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组比较,[b]$P<0.05$

表4 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的 HLE-B3 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	细胞凋亡率/%
HLE-B3 组	0.20±0.02	0.96±0.09	6.64±0.35
HLE-B3 + H_2O_2 组	0.88±0.08[a]	0.27±0.03[a]	19.52±1.34[a]
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组	0.86±0.08	0.29±0.03	19.34±1.27
HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p 组	0.37±0.03[b]	0.74±0.07[b]	7.66±0.38[b]

注:与 HLE-B3 组比较,[a]$P<0.05$;与 HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组比较,[b]$P<0.05$

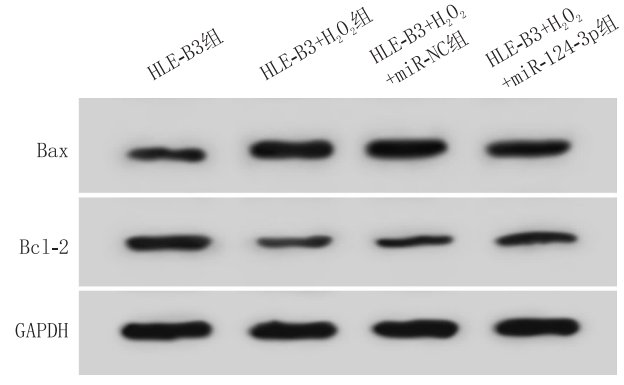


图1 过表达 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 凋亡蛋白表达的影响

表5 各组 KLF6 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=24$)

组别	KLF6 mRNA	KLF6 蛋白
miR-NC 组	1.03±0.10	0.64±0.06
miR-124-3p 组	0.36±0.04[a]	0.18±0.02[a]
anti-miR-NC 组	0.35±0.04	0.65±0.06
anti-miR-124-3p 组	0.69±0.07[b]	0.97±0.09[b]

注:与 miR-NC 组比较,[a]$P<0.05$;与 anti-miR-NC 组比较,[b]$P<0.05$

2.5 抑制 KLF6 表达对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖、凋亡的影响 si-KLF6 转染至 HLE-B3 细胞后用 H_2O_2 诱导处理结果显示,HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6 组 HLE-B3 细胞中 KLF6 蛋白表达水平较 HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC 组显著降低($P<0.05$),细胞增殖活性显著增强($P<0.05$),细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高(均为 $P<0.05$),P21、Bax 蛋白表达水平均显著降低(均为$P<0.05$),见图2、表6、表7。

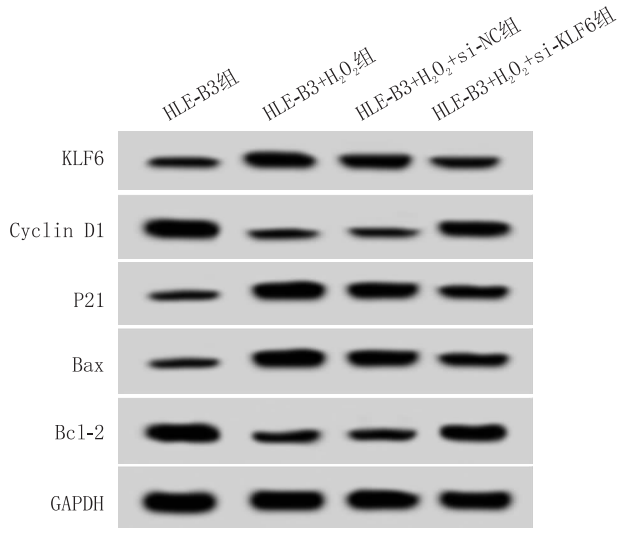


图2 抑制 KLF6 的表达对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 增殖、凋亡蛋白表达的影响

表6 抑制 KLF6 的表达对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 增殖、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	A值		
	12 h	24 h	36 h
HLE-B3 组	1.57 ± 0.15	1.02 ± 0.10	0.77 ± 0.07
HLE-B3 + H_2O_2 组	0.86 ± 0.08[a]	0.45 ± 0.04[a]	0.23 ± 0.02[a]
HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC 组	0.88 ± 0.08	0.46 ± 0.04	0.24 ± 0.02
HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6 组	1.19 ± 0.10[b]	0.70 ± 0.07[b]	0.41 ± 0.04[b]

注：与 HLE-B3 组比较，[a]$P < 0.05$；与 HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC 组比较，[b]$P < 0.05$

2.6 过表达 KLF6 逆转 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖、凋亡的作用

与 miR-124-3p + pcDNA3.1 组比较，miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 组 HLE-B3 细胞增殖活力明显降低（$P < 0.05$），细胞凋亡率明显升高（$P < 0.05$），能够明显促进 P21、Bax 蛋白表达（均为 $P < 0.05$），显著抑制 Cyclin D1、Bcl-2 表达（均为 $P < 0.05$），见图3、表8、表9。这表明，过表达 KLF6 可逆转 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖的促进作用及其对细胞凋亡的抑制作用。

表7 抑制 KLF6 的表达对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 增殖、凋亡蛋白的表达及细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	KLF6 蛋白	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	细胞凋亡率/%
HLE-B3	0.15 ± 0.01	0.97 ± 0.09	0.16 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.87 ± 0.09	7.36 ± 0.74
HLE-B3 + H_2O_2	0.66 ± 0.06[a]	0.40 ± 0.04[a]	0.81 ± 0.08[a]	0.84 ± 0.08[a]	0.27 ± 0.03[a]	19.17 ± 1.30[a]
HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC	0.64 ± 0.06	0.39 ± 0.04	0.79 ± 0.07	0.86 ± 0.08	0.29 ± 0.03	19.29 ± 1.33
HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6	0.29 ± 0.02[a]	0.74 ± 0.07[b]	0.33 ± 0.03[b]	0.51 ± 0.05[b]	0.60 ± 0.06[b]	11.46 ± 1.02[b]

注：与 HLE-B3 组比较，[a]$P < 0.05$；与 HLE-B3 + H H_2O_2 + HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC 组比较，[b]$P < 0.05$

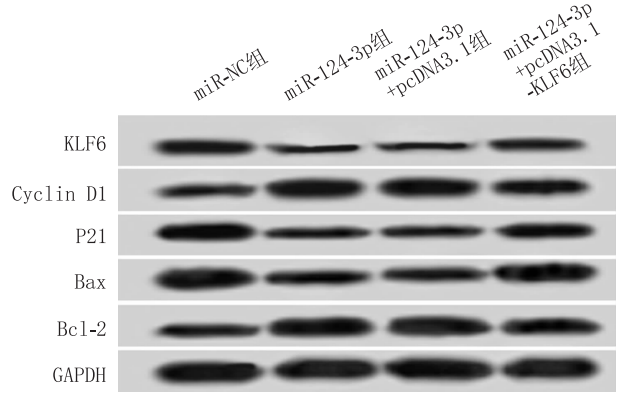


图3 过表达 KLF6 环境下 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 增殖、凋亡蛋白表达的影响

表8 过表达 KLF6 环境下 miR-124-3p 对 H_2O_2 诱导的细胞 HLE-B3 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 36$)

组别	细胞活性（A值）		
	12 h	24 h	36 h
miR-NC 组	0.88 ± 0.08	0.46 ± 0.04	0.24 ± 0.03
miR-124-3p 组	1.28 ± 0.11[a]	0.75 ± 0.07[a]	0.44 ± 0.04[a]
miR-124-3p + pcDNA3.1 组	1.26 ± 0.12	0.78 ± 0.07	0.45 ± 0.04
miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 组	1.10 ± 0.11[b]	0.60 ± 0.05[b]	0.35 ± 0.03[b]

注：与 miR-NC 组比较，[a]$P < 0.05$；与 miR-124-3p + pcDNA3.1 组比较，[b]$P < 0.05$

表9 各组 HLE-B3 细胞增殖蛋白表达及细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 36$)

组别	KLF6 蛋白	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	细胞凋亡率/%
miR-NC 组	0.63 ± 0.06	0.39 ± 0.04	0.73 ± 0.07	0.86 ± 0.08	0.29 ± 0.03	19.34 ± 1.27
miR-124-3p 组	0.16 ± 0.01[a]	0.89 ± 0.08[a]	0.26 ± 0.03[a]	0.37 ± 0.03[a]	0.74 ± 0.07[a]	7.66 ± 0.38[a]
miR-124-3p + pcDNA3.1 组	0.17 ± 0.01	0.91 ± 0.09	0.28 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.76 ± 0.07	7.61 ± 0.38
miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 组	0.42 ± 0.04[b]	0.68 ± 0.06[b]	0.53 ± 0.05[b]	0.62 ± 0.06[b]	0.54 ± 0.05[b]	12.63 ± 0.81[b]

注：与 miR-NC 组比较，[a]$P < 0.05$；与 miR-124-3p + pcDNA3.1 组比较，[b]$P < 0.05$

3 讨论

年龄相关性白内障是损害视力甚至导致失明的重要原因，随着年龄的增长，白内障发生率逐渐升高，白内障会严重降低患者的生活质量[9]。氧化应激反应可参与白内障发生及发展过程，已有研究表明 H_2O_2 可诱导人晶状体上皮细胞凋亡，但其具体作用机制尚未完全阐明[10]。还有研究发现，miRNA 可

参与细胞增殖、凋亡及氧化应激等多种病理过程，同时发现 miRNA 表达异常与白内障等年龄相关性疾病的发生及发展密切相关[11]。因此，阐明 miRNA 在白内障发生及发展过程中的作用，并探讨其是否可拮抗氧化应激相关的晶状体上皮细胞凋亡，可为揭示白内障发病机制奠定一定的理论基础。

miR-124-3p 可通过靶向 STAT3 表达而降低氧化应激反应，进而减弱 MPP + 诱导的神经元损伤[12]。Wu 等[13]研究表明，白内障晶状体样本中抗氧化基因 miR-124-3p 表达下调，靶向促氧化基因的 3 ' UTR 并且还可以结合抗氧化基因的 TATA 盒区域，进而参与白内障发生，但其具体作用机制尚未完全阐明。Dong 等[14]研究表明，miR-124-3p 可通过调节 ANAX5 在 6-羟基多巴胺诱导的帕金森病细胞模型中发挥神经保护作用。Wei 等[15]研究表明，miR-124-3p 表达水平降低可能是引发白内障的主要作用机制之一。本研究发现，H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 中 miR-124-3p 表达水平显著降低，说明 H_2O_2 可降低人晶状体上皮细胞 HLE-B3 中 miR-124-3p 的表达。本研究还发现，上调 miR-124-3p 表达可促进 HLE-B3 细胞增殖并抑制细胞凋亡。提示 miR-124-3p 可通过促进人晶状体上皮细胞增殖并抑制其凋亡进而参与白内障发生过程。同时本研究进一步检测发现，miR-124-3p 过表达后 HLE-B3 细胞中 Cyclin D1、Bcl-2 表达水平明显升高，而 P21、Bax 表达水平明显降低。Cyclin D1 是 Wnt/β-catenin 信号通路的核内靶基因之一，并可调控细胞增殖，Cyclin D1 表达水平升高可通过促进细胞周期向 S 期转换进而促进细胞进入分裂期导致晶状体上皮细胞增殖，而 P21 高表达可抑制 Cyclin D1 与 CDK 结合，进而抑制细胞周期进展最终影响白内障发生[16]。已有研究表明，促进 Bcl-2 蛋白表达及抑制 Bax 蛋白表达可抑制线粒体凋亡途径，进而抑制 H_2O_2 诱导的晶状体上皮细胞凋亡，从而减轻 H_2O_2 诱导的氧化损伤[17]。提示 miR-124-3p 过表达可通过影响细胞增殖及凋亡相关蛋白表达而抑制 H_2O_2 诱导的晶状体上皮细胞凋亡并促进细胞增殖。

有研究报道指出，KLF6 可调控细胞增殖、分化及凋亡等多种生理或病理过程[18]。白内障患者术后其房水内部环境可发生改变，细胞上皮标志蛋白 E-cadherin 表达水平降低可促使晶状体上皮细胞迁移进而增加白内障并发症的发生率，KLF6 高表达可通过影响细胞-上皮间质转化进程，进而促进 TGF-β2 诱导的晶状体上皮细胞纤维化过程，沉默 KLF6 表达可保护晶状体上皮细胞[19]。本研究结果表明，H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞中 KLF6 的表达水平显著升高，抑制 KLF6 表达后细胞增殖能力明显增强，而细胞凋亡能力明显受到抑制，并可明显促进 Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达及抑制 P21、Bax 蛋白表达，说明沉默 KLF6 可通过影响细胞增殖及凋亡相关蛋白表达进而促进 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞增殖并抑制其凋亡。同时双荧光素酶报告基因实验证明，KLF6 是 miR-124-3p 的靶基因，为验证 miR-124-3p 是否通过抑制 KLF6 表达而发挥对人晶状体上皮细胞的保护作用，将 miR-124-3p mimics 与 pcDNA3. 1-KLF6 共转染至 HLE-B3 细胞，结果发现共转染后明显抑制 HLE-B3 细胞增殖并促进细胞凋亡，说明 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖及凋亡过程中 miR-124-3p 与 KLF6 均发挥了一定的调控作用。提示 miR-124-3p 可通过抑制靶基因 KLF6 表达进而促进 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 增殖并抑制其凋亡。

综上所述，特异性上调人晶状体上皮细胞中 miR-124-3p 的表达可通过抑制 KLF6 表达而提高细胞的抗氧化能力，进而抑制或减缓白内障发生及发展过程。本研究结果有助于全面了解 miR-124-3p 对晶状体上皮细胞增殖及凋亡的调控作用，为靶向调控 miR-124-3p 表达而预防白内障发生及发展提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] ZHENG X Y, XU J, CHEN X I, LI W, WANG T Y. Attenuation of oxygen fluctuation-induced endoplasmic reticulum stress in human lens epithelial cells[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(5): 1883-1887.

[2] XING K Y, LOU M F. Effect of H_2O_2 on human lens epithelial cells and the possible mechanism for oxidative damage repair by thioltransferase[J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74(1): 113-122.

[3] SU Y, WANG F, ZHOU D, GAO W, HU Q, CUI H, *et al*. Inhibition of proliferation of rat lens epithelial cell by overexpression of KLF6[J]. *Mol Vis*, 2011, 17(122): 1080-1084.

[4] 田芳，赵今稚，滕贺，黄亮瑜，刘勋，苏睿虹，等. Krüppel 样因子 6 经活化转录因子 4 通路对晶状体上皮细胞凋亡的调控作用[J]. 中华实验眼科杂志，2018，36(3)：181-186.
TIAN F, ZHAO J Z, TENG H, HUANG L Y, LIU X, SU R H, *et al*. Regulation of Krüppel-like factor 6 via activating transcription factor 4 pathway to apoptosis of human lens epithelial cells[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(3): 181-186.

[5] CHEIN K H, CHEN S J, LIU J H, CHANG H M, WOUNG L C, LIANG C M, *et al*. Correlation between microRNA-34a levels and lens opacity severity in age-related cataracts[J]. *Eye*, 2013, 27(7): 883-888.

[6] WU C, LIN H, WANG Q, CHEN W, LUO H, CHEN W, *et al*. Discrepant expression of micrornas in transparent and cataractous human lenses[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7): 3906-3912.

[7] GONG G, GU Y, ZHANG Y, LIU W, LI L, LI J. Anshinone IIA alleviates oxidative damage after spinal cord injury *in vitro* and *in vivo* through up-regulating miR-124[J]. *Life Sci*, 2019, 147(5): 147-155.

[8] BO L, LI P, CHEN L, HE L, WANG F. MicroRNA profiling on oxidative stress induced apoptosis of human lens epithelium[J]. *Int Eye Sci*, 2014, 14(10): 1770-1772.

[9] SHARON G S, YUSOF Y A, MAKPOL S. Expression of senescence-associated micrornas and target genes in cellular aging and modulation by tocotrienol-rich fraction[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014(5): 1-12.

[10] ELMARAEZY A, EBRAHEEM MORRA M, TAREK MOHAMMED A, AL-HABAA A, ELGEBALY A, ABDELMOTALEB GHAZY A, *et al*. Risk of cataract among interventional cardiologists and catheterization lab staff: A systematic review and meta-analysis[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2017, 90(1): 1-9.

[11] REN H, TAO H, GAO Q, SHEN W, NIU Z, ZHANG J, *et al*. MiR-326 antagomir delays the progression of age-related

cataract by upregulating FGF1-mediated expression of betaB2-crystallin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2):505-510.
[12] GENG L, LIU W, CHEN Y. miR-124-3p attenuates MPP+-induced neuronal injury by targeting STAT3 in SH-SY5Y cells [J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2017, 242(18):1757-1764.
[13] WU C, LIU Z, MA L, PEI C, QIN L, GAO N, *et al*. MiRNAs regulate oxidative stress related genes via binding to the 3' UTR and TATA-box regions: a new hypothesis for cataract pathogenesis[J]. *BMC Ophthalmol*, 2017, 17(1):142-150.
[14] DONG R F, ZHANG B, TAI L W, LIU H M, SHI F K, LIU N N. The neuroprotective role of miR-124-3p in a 6-hydroxydopamine-induced cell model of parkinson's disease via the regulation of ANAX5[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1):269-277.
[15] WEI Y L, SUN H. Identification of hsa-mir-34a, hsa-mir-124, and hsa-mir-204 as signatures for cataract[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10709-10717.
[16] 吴明星,李绍珍,曾骏文,刘奕志. 外源性细胞周期蛋白激酶抑制因子p21基因对人晶状体上皮细胞周期的影响[J]. 中华眼科杂志,2003,39(4):209-214.
WU M X, LI S Z, ZENG J W, LIU Y Z. Effects of exogenous p21 gene on cells cycle of human lens epithelial cells[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2003, 39(4):209-214.
[17] 俞茜,季青山,孙思勤. 枸杞多糖对H_2O_2诱导人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2016,36(6):524-527.
YU Q, JI Q S, SUN S Q. Protective effects of lycium barbarum polysaccharides on human lens epithelial cells against H_2O_2-induced oxidative stress[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(6):524-527.
[18] HSU L S, HUANG R H, LAI H W, HSU H T, SUNG W W, HSIEH M J, *et al*. KLF6 inhibited oral cancer migration and invasion via downregulation of mesenchymal markers and inhibition of MMP-9 activities[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(6):530-535.
[19] SHU D Y, WOJCIECHOWSKI M C, LOVICU F J. Bone morphogenetic protein-7 suppresses TGFβ2-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: implications for cataract prevention[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(2):781-796.

Effect of miR-124-3p targeted regulation of KLF6 genes on proliferation and apoptosis of H_2O_2-induced human lens epithelial cells

ZHANG Hong, CHEN Yingping, CHEN Shengwen

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570216, *Hainan Province, China*

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of microRNA-124-3p (miR-124-3p) on proliferation and apoptosis of H_2O_2-induced human lens epithelial cells, and its mechanism of targeted regulation of Krüppel-like factor 6 (KLF6). **Methods** According to different cell treatment methods, HLE-B3 cells were divided into HLE-B3 group, HLE-B3 + H_2O_2 group, HLE-B3 + H_2O_2 + miR-NC group, HLE-B3 + H_2O_2 + miR-124-3p group, HLE-B3 + H_2O_2 + si-NC group, HLE-B3 + H_2O_2 + si-KLF6 group, miR-124-3p + pcDNA3.1 group and miR-124-3p + pcDNA3.1-KLF6 group. HLE-B3 cell proliferation activity was detected by MTT assay and HLE-B3 cell apoptosis was detected by flow cytometry. The targeting relationship between miR-124-3p and KLF6 was verified by dual luciferase reporter gene assay. Protein expression of Cyclin D1, P21, Bax and Bcl-2 in HLE-B3 cells was detected by Western blot. **Results** H_2O_2 inhibited the expression of miR-124-3p in human lens epithelial HLE-B3 cells (HLE-B3 group: 0.79 ± 0.07; HLE-B3 + H_2O_2 group: 0.31 ± 0.03) ($P < 0.05$), and significantly promoted the expression of KLF6. Overexpression or inhibition of KLF6 expression by miR-124-3p promoted the proliferation of HLE-B3 cells and inhibited the apoptosis of HLE-B3 cells (19.34 ± 1.27 *vs* 7.66 ± 0.38; 19.29 ± 1.33 *vs* 11.46 ± 1.02), and promoted the expression of Cyclin D1 (0.39 ± 0.04 *vs* 0.89 ± 0.08; 0.39 ± 0.04 *vs* 0.74 ± 0.07), promoted the expression of Bcl-2 (0.29 ± 0.03 *vs* 0.74 ± 0.07; 0.29 ± 0.03 *vs* 0.60 ± 0.06), inhibited the expression of P21 (0.73 ± 0.07 *vs* 0.26 ± 0.03; 0.79 ± 0.07 *vs* 0.33 ± 0.03), inhibited the expression of Bax (0.86 ± 0.08 *vs* 0.37 ± 0.03; 0.86 ± 0.08 *vs* 0.51 ± 0.05). Co-transfection of miR-124-3p mimics with WT-KLF6 significantly reduced luciferase activity in HLE-B3 cells (0.27 ± 0.03 *vs* 0.98 ± 0.08) ($P < 0.05$). Overexpression of KLF6 reversed the effect of miR-124-3p on proliferation and apoptosis of H_2O_2-induced HLE-B3 cells. **Conclusion** miR-124-3p can promote the proliferation of HLE-B3 cells induced by H_2O_2 and inhibit its apoptosis by targeting KLF6 expression.

【Key words】 miR-124-3p; KLF6; human lens epithelial cells; oxidative stress; proliferation; apoptosis