

引文格式:赵鑫,杨静,辛向阳.基于miR-224-5P调控的IL6ST/JAK/STAT信号通路在糖尿病视网膜病变发生发展中的作用[J].眼科新进展,2023,43(5):357-362. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0072

【实验研究】

基于 miR-224-5P 调控的 IL6ST/JAK/STAT 信号通路在糖尿病视网膜病变发生发展中的作用[△]

赵鑫 杨静 辛向阳

【摘要】 目的 探讨 miR-224-5P 在糖尿病视网膜病变(DR)患者中的表达变化及其在高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)中的作用和机制。方法 抽取 DR 患者及健康人群各 6 名的外周血,RT-qPCR 检测 miR-224-5P 相对表达量。将正常培养的 ARPE-19 细胞随机分成高糖组(给予 30 mmol·L⁻¹高糖)、高糖+miR-224-5P mimics 组(转染 100 nmol·L⁻¹miR-224-5P mimics 后给予 30 mmol·L⁻¹高糖)、高糖+miR-224-5P inhibitor 组(转染 100 nmol·L⁻¹miR-224-5P inhibitor 后给予 30 mmol·L⁻¹高糖)、高糖+OE-IL6ST 组(转染 100 nmol·L⁻¹OE-IL6ST 后给予 30 mmol·L⁻¹高糖)和高糖+miR-224-5P mimics+OE-IL6ST 组(转染 100 nmol·L⁻¹miR-224-5P mimics 和 100 nmol·L⁻¹OE-IL6ST 后给予 30 mmol·L⁻¹高糖),CCK-8 检测细胞活力,Transwell 检测细胞迁移率,双荧光素酶实验验证 miR-224-5P 与 IL6ST 的靶向关系,Western blot 检测 IL6ST、P-JAK 及 P-STAT 蛋白表达,ELISA 检测细胞中 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 蛋白表达水平。通过过表达 IL6ST 进一步验证 miR-224-5P 是否通过 IL6ST/JAK/STAT 通路发挥作用。结果 DR 患者外周血中 miR-224-5P mRNA 相对表达量显著低于健康人群($P < 0.001$)。与高糖组相比,高糖+miR-224-5P mimics 组细胞活力、细胞迁移率增高,高糖+miR-224-5P inhibitor 组细胞活力、细胞迁移率降低(均为 $P < 0.001$)。双荧光素酶实验检测结果证实 IL6ST 是 miR-224-5P 调控的靶基因。与高糖组相比,高糖+miR-224-5P mimics 组细胞的 IL6ST 蛋白表达水平降低,P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平升高(均为 $P < 0.05$);高糖+miR-224-5P inhibitor 组细胞的 IL6ST 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平降低(均为 $P < 0.05$)。与高糖组相比,高糖+miR-224-5P mimics 组细胞的 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 蛋白表达水平均下降(均为 $P < 0.01$),高糖+miR-224-5P inhibitor 组细胞的 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 蛋白表达水平均显著上升(均为 $P < 0.01$)。高糖+miR-224-5P mimics+OE-IL6ST 组细胞活力和细胞迁移率均较高糖+miR-224-5P mimics 组显著降低(均为 $P < 0.001$)。与高糖+OE-IL6ST 组相比,高糖+miR-224-5P mimics+OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均升高(均为 $P < 0.001$);与高糖+miR-224-5P mimics 组相比,高糖+miR-224-5P mimics+OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均降低(均为 $P < 0.001$)。结论 miR-224-5P 在 DR 患者血液中表达降低,过表达 miR-224-5P 可降低高糖引起的炎症因子表达,并可通过 IL6ST/JAK/STAT 信号通路增加高糖诱导的 ARPE-19 细胞活力及细胞迁移率,从而调控 DR 的发生和发展。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;miR-224-5P;IL6ST/JAK/STAT 通路

【中图分类号】 R774.1

糖尿病视网膜病变(DR)是工作年龄人群失明的主要原因^[1]。DR 发生机制被认为是高血糖通过多种生化机制促进血管功能障碍和神经炎症,这些生化机制包括增加细胞因子和生长因子表达、激活氧化应激、激活多元醇途径、增加晚期的糖基化和脂氧化终产物、导致血流动力学变化及白细胞停滞等^[2-3]。微小核糖核酸(miRNA)是一类广泛存在于动物界的转录后基因抑制因子家族,广泛参与各种环境中基因表达的调控^[4]。miRNA 在 DR 中具有明显的分化表达,对 DR 的发生发展具有重要作用^[5-7]。miR-224-5P 在正常人体组织中多处表达,其异常表达与许多疾病相关。前期的多项研究表明,miR-224-5P 是肝细胞癌^[8]、胰腺导管腺癌^[9]及非小细胞肺癌^[10]等肿瘤性疾病发生和发展的关键因素。

在眼部疾病中,miR-224-5P 通过靶向葡萄膜黑色素瘤中 PIK3R3/AKT3 抑制细胞的增殖、迁移和侵袭^[11];LncRNA PLCD3-OT1 可以作为 CeRNA 通过海绵 miR-224-5P 和调节 PLCD3 的表达来预防年龄相关性白内障^[12]。而对 miR-224-5P 在 DR 中的表达变化及在 DR 发生发展中发挥的作用研究较少。因此,本研究聚焦 miR-224-5P 在 DR 中的作用,探讨 miR-224-5P 对 DR 发生发展的影响,分析该作用是否与 JAK/STAT 信号通路有关,为 DR 的诊断和治疗提供新的途径和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验标本 选取 2021 年 6 月至 2022 年 3 月

在内蒙古包钢医院眼科确诊为 DR 的患者及同期来我院体检中心体检的健康人群各 6 例,采集纳入研究者的空腹肘静脉血各 5 mL,放入 -80°C 低温冰箱中保存备用。DR 患者年龄 $55 \sim 80(66.0 \pm 8.4)$ 岁,其中男 2 例,女 4 例,糖尿病病程为 $6 \sim 30(16.2 \pm 8.8)$ 年;健康人群年龄 $42 \sim 76(63.0 \pm 11.8)$ 岁,其中男 3 例,女 3 例。DR 患者与健康人群的年龄及性别构成差异均无统计学意义 ($P = 0.623, 0.083$)。DR 患者纳入标准:(1)所有研究对象长期居住于本地;(2)年龄为 $55 \sim 80$ 岁。排除标准:(1)伴有除糖尿病外的其他严重的全身性疾病者;(2)合并有青光眼、葡萄膜炎、黄斑变性等其他眼部疾病者。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则,并经内蒙古包钢医院伦理委员会批准(批号:2021MER-041)。纳入研究者均知情同意,并已签署知情同意书。

1.1.2 细胞与主要实验试剂 人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 购自上海雅吉公司;RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒及反转录引物均由上海生工生物工程股份有限公司提供;慢病毒、质粒及 siRNA 的构建均由上海华大公司提供;LipofectamineTM3000 试剂盒由美国 Invitrogen 公司提供;CCK-8 试剂盒及 Transwell 试剂盒由美国 Corning 公司提供;Promega Dual-Luciferase system 试剂盒由美国 Promega 公司提供;一抗、二抗试剂由英国 Abcam 公司提供;ELISA 试剂盒由上海联迈公司提供。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR 检测血液中 miR-224-5P 表达情况 DR 患者和健康人群空腹外周血解冻后,Trizol 法抽提总 RNA,将 miRNA 逆转录成 cDNA,按照 $95^{\circ}\text{C} 10 \text{ min}, 95^{\circ}\text{C} 10 \text{ s}, 60^{\circ}\text{C} 60 \text{ s}, 40$ 个循环进行 PCR 扩增,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对外周血中 miR-224-5P 的表达情况进行分析。引物序列:miR-224-5P 上游引物为 $5'-\text{GGT CCT AAG TCA CTA CTG GTT CCG T T-3}'$,下游引物为 $5'-\text{CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3}'$;内参基因 U6 上游引物为 $5'-\text{CGC ACT TTA CGG CTA CCT CT-3}'$;下游引物为 $5'-\text{CGC CCC AGA CTG AAA AAG AC-3}'$ 。

1.2.2 细胞培养及分组处理 ARPE-19 细胞使用含体积分数 10% FBS 和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉素的专用完全培养基,于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。将细胞随机分组为高糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组和高糖 + miR-224-5P inhibitor 组。其中,高糖组:细胞用含 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高糖培养基培养 48 h;高糖 + miR-224-5P mimics 组和高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞使用 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LipofectamineTM3000 分别将 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ miR-224-5P mimics 或 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ miR-224-5P inhibitor 转染至细胞中,6 h 后置于含 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高糖培养基中培养 48 h。

另外,将正常培养的 ARPE-19 细胞随机分成高

糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组、高糖 + OE-IL6ST 组和高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组来验证 miR-224-5P mimics 是否通过 IL6ST/JAK/STAT 通路发挥作用。其中,高糖 + OE-IL6ST 组和高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组使用 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LipofectamineTM3000 分别将 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OE-IL6ST 或 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ miR-224-5P mimics 和 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OE-IL6ST 转染至细胞中,6 h 后置于含 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高糖培养基中培养 48 h。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力 将 ARPE-19 细胞按照每孔 2×10^3 个接种到 96 孔板中,培养箱中培养 4 h,分组处理后向每孔中加 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,培养箱中孵育 5 d,分别于孵育 1 d、2 d、3 d、4 d 及 5 d 的同一时间点用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。每组设置 2 个复孔,实验重复 3 次,取平均值统计。

1.2.4 Transwell 细胞迁移实验 在 24 孔板中放入小室,加 $100 \mu\text{L}$ 无血清培养基到小室内,培养箱放置 2 h 后移去培养基。加 $600 \mu\text{L}$ 含体积分数 20% FBS 培养基到下室内。胰蛋白酶消化处于对数生长期的各组细胞,用含体积分数 2% FBS 的低血清培养基重悬,用无血清培养基稀释细胞悬液,使每孔接种细胞数为 50×10^3 个,每个小室中加细胞悬液 $100 \mu\text{L}$ 。在细胞培养箱中培养 24 h。棉拭子轻轻移去未转移细胞,室温下 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 20 min。用 $400 \mu\text{L}$ 吉姆萨染色 5 min,去离子水适度漂洗,倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.5 双荧光素酶实验验证 miR-224-5P 与 IL6ST 的靶向关系 通过 Targetscan (<http://www.targetscan.org>) 及 MiRWALK 网站 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) 预测 miR-224-5P 可能的靶基因,并从中挑选 IL6ST 为候选靶基因进行实验验证。构建 IL6ST 基因野生型 (wt) 及突变型 (mut) 质粒载体,使用 pcDNA3.1 编码萤火虫荧光素酶,phRC 编码海肾荧光素酶为阴性对照。将 HEK-293T 细胞和目的质粒分别加入 96 孔板,在细胞密度达到 50% ~ 70% 时使用 $0.3 \mu\text{L}$ LipofectamineTM3000 进行细胞转染。实验分为阴性对照 + IL6ST wt 组 (转染 1 pmol 阴性对照及 $0.1 \mu\text{g}$ IL6ST-3' UTR-wt)、miR-224-5P mimics + IL6ST wt 组 (转染 1 pmol miR-224-5P mimics 及 $0.1 \mu\text{g}$ IL6ST-3' UTR-wt)、阴性对照 + IL6ST mut 组 (转染 1 pmol 阴性对照及 $0.1 \mu\text{g}$ IL6ST-3' UTR-mut)、miR-224-5P mimics + IL6ST mut (转染 1 pmol miR-224-5P mimics 及 $0.1 \mu\text{g}$ IL6ST-3' UTR-mut) 4 组。转染 48 h 后,各组细胞分别取出 $25 \mu\text{L}$ 置于 96 孔板中 (每孔 1×10^5 个细胞),加入 Dual-Glo[®] Reagent $75 \mu\text{L}$ 室温静置 10 min,测定 Firefly luciferase 值为报告基因发光值;加入 $75 \mu\text{L}$ Stop & Glo[®] Reagent,室温静置 10 min 后测定 Renilla luciferase 值为内参值。统计分析相对荧光值变化,明确 miR-224-5P 对 IL6ST 的调控作用。

1.2.6 RT-qPCR 检测各组细胞 IL6ST 基因的内源性表达 各组细胞用 Trizol 法抽提总 RNA, 质控后将 miRNA 逆转录为 cDNA, 检测各组细胞中 IL6ST 相对表达量。引物序列: IL6ST 上游引物为 5'-ACG AAT GGC AGC ATA CAC-3', 下游引物为 5'-AGC AAA CAG GCA CGA CTA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3', 下游引物为 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'。

1.2.7 Western blot 检测各组细胞 IL6ST、P-JAK 及 P-STAT 蛋白相对表达 高糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组、高糖 + miR-224-5P inhibitor 组、高糖 + OE-IL6ST 组和高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞加 160 μ L 细胞裂解液进行总蛋白的抽提, BCA 法进行总蛋白定量。采用 Western blot 法以 GAPDH 为内参, 检测各组细胞 IL6ST、P-JAK 及 P-STAT 蛋白表达水平, 使用 ImageJ 行定量计算。

1.2.8 ELISA 检测各组细胞 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平 将 100 μ L 标准品及高糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组和高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞加入反应孔中, 封板后于 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 90 min, 分别加入 100 μ L 生物素化抗体工作液、100 μ L 酶结合物工作液封板孵育 60 min 及 30 min, 再加入 100 μ L 显色底物至反应孔中, 封板后于 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min, 加入 50 μ L 终止液后即刻用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD), 通过标准曲线计算样品中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 含量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析, 数据均进行正态分布及方差齐性检验, 不符合正态分布者采用 Wilcoxon 秩和检验, 差异显著时使用 LSD 检验进行多重比较分析; 符合正态分布者采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较进行 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 DR 患者及健康人群外周血中 miR-224-5P 的相对表达量比较 RT-qPCR 检测结果显示, DR 患者外周血中 miR-224-5P mRNA 相对表达量为 0.421 ± 0.079 , 显著低于健康人群 (0.973 ± 0.249), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.2 miR-224-5P 对细胞活力及迁移的影响 CCK-8 检测结果显示, 与高糖组相比, 高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞活力增高, 高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞活力降低 ($P < 0.001$) (图 1)。Transwell 实验结果显示, 高糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组、高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞迁移率分别为 $1.000\% \pm 0.080\%$ 、 $2.480\% \pm 0.059\%$ 、 $0.590\% \pm 0.053\%$, 高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞迁移率较高糖组明显升高 ($P < 0.001$), 高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞迁移率较高糖组明显降低 ($P < 0.001$)。

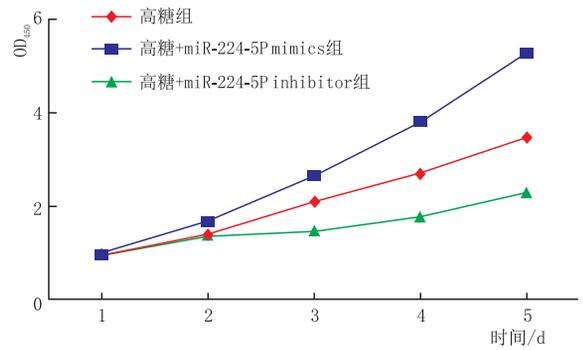


图 1 各组 ARPE-19 细胞活力

2.3 miR-224-5P 与 IL6ST 的靶向关系验证 通过软件预测 miR-224-5P 与 IL6ST 之间有结合位点 (图 2)。双荧光素酶实验结果显示, miR-224-5P mimics + IL6ST wt 组细胞相对荧光素酶活性 (0.006 ± 0.000) 低于阴性对照 + IL6ST wt 组 (0.011 ± 0.000) ($P < 0.001$), miR-224-5P 显著下调野生型荧光素酶活性的表达, 提示两者间存在结合作用。突变后, miR-224-5P mimics + IL6ST mut 组细胞相对荧光素酶活性 (0.009 ± 0.000) 与阴性对照 + IL6ST mut 组 (0.011 ± 0.000) 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 miR-224-5P 不能下调突变型荧光素酶活性的表达, 突变成功后两者间不存在结合作用。RT-qPCR 检测结果显示, 与阴性对照 + IL6ST wt 组 (1.003 ± 0.093) 相比, miR-224-5P mimics + IL6ST wt 组细胞的 IL6ST mRNA 表达水平 (0.408 ± 0.070) 显著降低 ($P < 0.001$), 进一步验证 miR-224-5P 与 IL6ST 的相互作用关系。



图 2 miR-224-5P 在 IL6ST mRNA 3' UTR 的结合位点及突变位点示意图

2.4 miR-224-5P 对 IL6ST、P-JAK 及 P-STAT 蛋白表达水平的影响 Western blot 检测结果显示, 与高糖组相比, 高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞的 IL6ST 蛋白表达水平降低, P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平升高 (均为 $P < 0.05$); 高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞的 IL6ST 蛋白表达水平升高, P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平降低 (均为 $P < 0.05$) (图 3)。

2.5 miR-224-5P 对 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平的影响 ELISA 检测结果显示, 与高糖组相比, 高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平均显著降低, 而高糖 + miR-224-5P inhibitor 组细胞的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平均显著上升 (均为 $P < 0.01$) (图 4)。

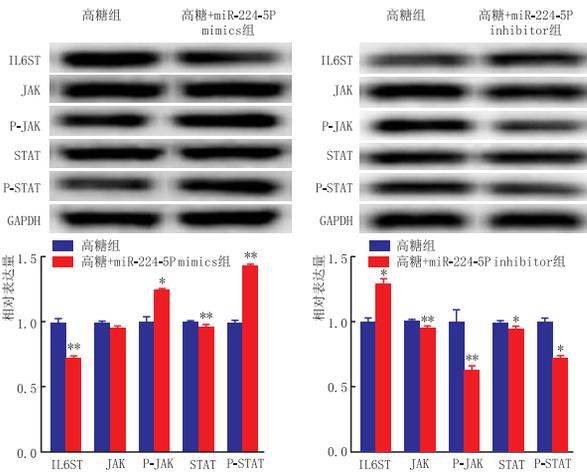


图3 各组 ARPE-19 细胞的 IL6ST、P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达 与高糖组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

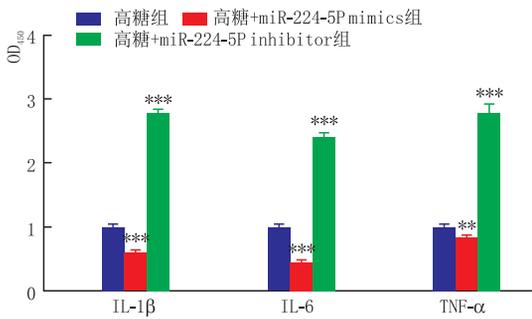


图4 各组 ARPE-19 细胞炎症因子的表达情况 与高糖组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.6 过表达 IL6ST 可以逆转 miR-224-5P 对高糖诱导 ARPE-19 细胞的影响

CCK-8 和 Transwell 检测结果显示:高糖组、高糖 + miR-224-5P mimics 组、高糖 + OE-IL6ST 组和高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组 ARPE-19 细胞活力分别为 $2.634\% \pm 1.142\%$ 、 $3.186\% \pm 1.525\%$ 、 $1.938\% \pm 0.629\%$ 、 $2.699\% \pm 1.198\%$, 细胞迁移率分别为 $0.990\% \pm 0.020\%$ 、 $1.390\% \pm 0.024\%$ 、 $0.440\% \pm 0.016\%$ 、 $0.480\% \pm 0.020\%$ 。与高糖组相比,高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞活力和细胞迁移率均显著升高,高糖 + OE-IL6ST 组细胞活力和细胞迁移率均显著降低(均为 $P < 0.001$);与高糖组相比,高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞活力升高,细胞迁移率降低(均为 $P < 0.001$);高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞活力和迁移率均较高糖 + miR-224-5P mimics 组显著降低(均为 $P < 0.001$)。Western blot 检测结果显示,与高糖组相比,高糖 + miR-224-5P mimics 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均升高(均为 $P < 0.05$);高糖 + OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均显著降低(均为 $P < 0.001$);与高糖组相比,高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均降低(均为 $P < 0.001$);与高糖 + OE-

IL6ST 组相比,高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均升高(均为 $P < 0.001$);与高糖 + miR-224-5P mimics 组相比,高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组细胞的 P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达水平均降低(均为 $P < 0.001$)(图5)。

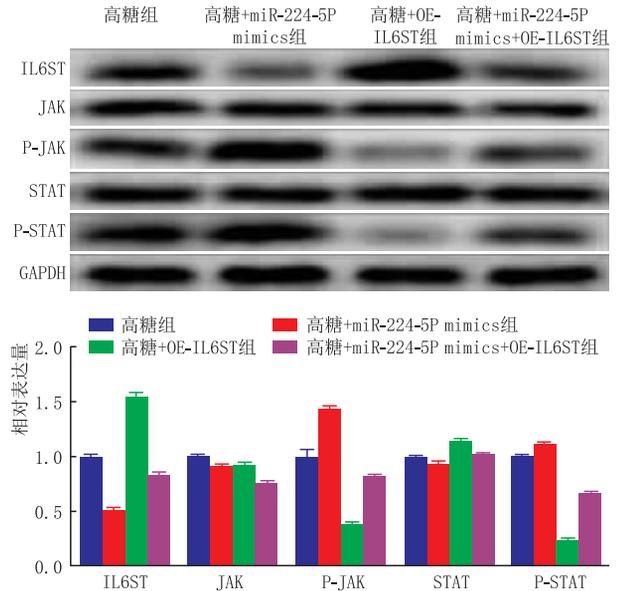


图5 过表达 IL6ST 对各组 ARPE-19 细胞的 IL6ST、P-JAK 和 P-STAT 蛋白表达的影响

3 讨论

DR 是与持续高血糖相关的一种慢性、进行性、潜在危害视力的视网膜微血管疾病,其发生的分子机制错综复杂,涉及氧化应激、炎症、新生血管、视网膜神经节细胞死亡和胶质细胞活性的改变等^[13]。有研究发现,microRNA 在 DR 中可以调节炎症、氧化应激及神经变性这几种病理过程的分子相互作用和信号通路^[14]。Becker 等^[15]研究显示,miR-224-5P 是与 DR 相关的重要 RNA 分子,在 DR 患者死后视网膜样本中富集并显著降低。本研究发现,miR-224-5P 在 DR 患者血液中表达显著低于健康对照人群,提示 miR-224-5P 可能参与调控 DR 的发生发展。

视网膜色素上皮(RPE)是神经视网膜和脉络膜区域之间的单层细胞屏障,可以调节视网膜营养物质代谢、分泌生长因子促进视网膜和脉络膜生长、吞噬衰老的感光细胞外膜^[16]。有研究显示,在高糖诱导的 ARPE-19 细胞中,miR-455-5P 可通过上调血管内皮生长因子及转化生长因子显著增强细胞活力^[17]。本实验以 miR-224-5P 过表达/抑制质粒干预处理高糖诱导的 ARPE-19 细胞,结果发现,过表达 miR-224-5P 可增加细胞活力和迁移率,而抑制 miR-224-5P 后细胞活力和迁移率降低,提示 miR-224-5P 可以增加高糖诱导的 ARPE-19 细胞活力及迁移率,也许可以成为 DR 的治疗靶点。

DR 的发生已经证实与炎症有关^[18]。本研究结果显示,过表达 miR-224-5P 可降低高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达,而抑制 miR-224-5P 可增加上述炎症因子表达,表明 miR-224-5P 可以抑制 DR 的炎症反应。本研究进一步探究了 miR-224-5P 可能的作用机制。经典 JAK/STAT 信号通路是细胞功能的中心通讯节点之一,在视网膜的损伤和再生反应、神经胶质细胞的增殖以及星形胶质细胞的分化、视网膜微血管内皮细胞的损伤过程中是一个重要信号“枢纽”^[19],在 DR 发病中也有重要作用。IL6ST 是一种信号受体亚基,编码膜糖蛋白 130 (GP130),作用于 IL-6 家族细胞因子^[20]。IL6ST 能通过 JAK-STAT 途径转导,其中受体相关 JAK(即 JAK1、JAK2 和 TYK2)激活潜在转录因子 STAT1、STAT3 和 STAT5 的募集和活化^[21]。研究发现,IL-6/JAK/STAT3 信号通路与许多炎症性疾病和癌症有关^[22]。同时,部分研究已证明,IL-6/JAK/STAT 信号转导途径也通过与细胞 miRNA 的复杂相互作用发挥作用^[23]。本研究通过双荧光素酶实验证实了 IL6ST 是 miR-224-5P 调控的靶基因,并且与阴性对照组相比,过表达 miR-224-5P 后 IL6ST 的 mRNA 表达水平显著降低,两者呈负相关,说明 miR-224-5P 可以通过负调控 IL6ST 影响 DR 进程。我们进一步探究了 miR-224-5P 是否通过 IL6ST/JAK/STAT 信号通路在高糖诱导的 ARPE-19 细胞中发挥作用。结果显示,过表达 miR-224-5P 降低 IL6ST 的蛋白水平,而增加了下游分子 P-JAK 和 P-STAT 蛋白水平。抑制 miR-224-5P 使 IL6ST 的蛋白表达水平升高,P-JAK 和 P-STAT 的蛋白水平下降。通过过表达 IL6ST 进一步验证发现,与高糖 + miR-224-5P mimics 组相比,高糖 + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST 组 ARPE-19 细胞活力和细胞迁移率均显著降低,且 P-JAK 和 P-STAT 的蛋白表达水平降低。这表明 miR-224-5P 在高糖诱导的 ARPE-19 细胞中是通过活化 IL6ST/JAK/STAT 信号通路发挥作用的。本研究结果中 P-JAK 和 P-STAT 的蛋白表达水平变化,与 Fiebelkow 等^[24]研究认为的 IL-6 受体激活 JAK/STAT 信号通路引起的 P-JAK 和 P-STAT 的蛋白表达水平变化不同。Darnell 等^[25]研究显示,50 多种细胞因子和生长因子可以作用于 JAK/STAT 信号通路引起 P-JAK 和 P-STAT 的蛋白表达水平发生变化,本实验研究结果可能是由于多种细胞因子综合作用表现出的结果,详细机制有待后续进一步研究。

综上所述,本研究发现,miR-224-5P 在 DR 患者血液中表达降低,过表达 miR-224-5P 可降低高糖引起的炎症因子表达,并可通过 IL6ST/JAK/STAT 信号通路增加高糖诱导的 ARPE-19 细胞活力及迁移率,从而调控 DR 的发生和发展。后续我们将进一步研究 miR-224-5P 增加 RPE 细胞活力及迁移率对 DR 的可能作用,并验证其他 miRNA 在 DR 发生发展

中的具体表达机制,为 DR 的分子标记物研究提供新的思路和依据。

参考文献

- [1] JAMPOL L M, GLASSMAN A R, SUN J. Evaluation and care of patients with diabetic retinopathy [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(17):1629-1637.
- [2] KINUTHIA U M, WOLF A, LANGMANN T. Microglia and inflammatory responses in diabetic retinopathy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:564077.
- [3] PIETRAS-BACZEWSKA A, NOWOMIEJSKA K, BRZOZOWSKA A, TORO M D, ZALUSKA W, SZTANKE M, et al. Antioxidant status in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment with and without proliferative vitreoretinopathy, macular hole and epiretinal membrane [J]. *Life*, 2021, 11(5):453.
- [4] ZHANG S, ZHOU Y, WANG Y, WANG Z, XIAO Q, ZHANG Y, et al. The mechanistic, diagnostic and therapeutic novel nucleic acids for hepatocellular carcinoma emerging in past score years [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(2):1860-1883.
- [5] CHANG X, ZHU G, CAI Z, WANG Y, LIAN R, TANG X, et al. MiRNA, lncRNA and circRNA: targeted molecules full of therapeutic prospects in the development of diabetic retinopathy [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:771552.
- [6] MARTINS B, AMORIM M, REIS F, AMBROSIO A F, FER-NANDES R. Extracellular vesicles and microRNA: putative role in diagnosis and treatment of diabetic retinopathy [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8):705.
- [7] 田涛,姚睿,彭婧利,刘茹,谢丽莲,邝国平,等. miR-106 调控 CC 趋化因子配体 2 对增生型糖尿病视网膜病变中人视网膜微血管内皮细胞增殖、血管生成和炎症反应的影响 [J]. *眼科新进展*, 2021, 41(9):831-837.
TIAN T, YAO R, PENG J L, LIU R, XIE L L, KUANG G P, et al. MiR-106 affects proliferation of human retinal microvascular endothelial cells, angiogenesis and inflammatory response in proliferative diabetic retinopathy via regulating CCL2 [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2021, 41(9):831-837.
- [8] WU M, DENG X, ZHONG Y, HU L, ZHANG X, LIANG Y, et al. Maff is regulated via the circ-ITCH/miR-224-5P axis and acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Res*, 2020, 28(3):299-309.
- [9] GUO C, PENG X, SONG L, YING M, WU Y, CHANG R, et al. Autophagy promotes malignant migration and invasion via miR2245p/BCL2 in pancreatic mucinous cystadenocarcinoma MCC1 cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6):276.
- [10] ZHOU J, WANG H, SUN Q, LIU X, WU Z, WANG X, et al. MiR-224-5P-enriched exosomes promote tumorigenesis by directly targeting androgen receptor in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23:1217-1228.
- [11] LI J, LIU X, LI C, WANG W. miR-224-5P inhibits proliferation, migration, and invasion by targeting PIK3R3/AKT3 in uveal melanoma [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8):12412-12421.
- [12] XIANG J, CHEN Q, KANG L, ZHANG G, WANG Y, QIN B, et al. LncRNA PLCD3-OT1 functions as a ceRNA to prevent age-related cataract by sponging miR-224-5P and regulating PLCD3 expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(14):4670-4680.
- [13] SHOKRI Y, VARLI A, NOSRATI M, KHONAKDAR-TARSI A, KIANMEHR A, KASHI Z, et al. Importance of paraoxonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: genotypic and phenotypic evaluation [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2020, 161:108067.
- [14] 欧玉仑,邝国平,周小平. miRNA-let-7c 在逆转大鼠糖尿病视网膜病变中的作用 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40(7):619-624.
OU Y L, KUANG G P, ZHOU X P. Effects of microma-let-7c on reversing diabetic retinopathy in rats [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40(7):619-624.
- [15] BECKER K, KLEIN H, SIMON E, VIOLLET C, HASLINGER C, LEPARC G, et al. In-depth transcriptomic analysis of human retina reveals molecular mechanisms underlying diabetic retinopathy [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):10494.
- [16] LIU C, SUN W, ZHU T, SHI S, ZHANG J, WANG J, et al. Glia maturation factor- β induces ferroptosis by impairing chaperone-mediated autophagic degradation of ACSL4 in early dia-

- betic retinopathy [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102292.
- [17] CHEN P, MIAO Y, YAN P, WANG X J, JIANG C, LEI Y. MiR-455-5p ameliorates HG-induced apoptosis, oxidative stress and inflammatory via targeting SOCS3 in retinal pigment epithelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21915-21924.
- [18] LU J, HUANG Y, ZHANG X, XU Y, NIE S. Noncoding RNAs involved in DNA methylation and histone methylation, and acetylation in diabetic vascular complications [J]. *Pharmacol Res*, 2021(4): 105520.
- [19] DUNCAN R S, ROHOWETZ L, VOGT A, KOULEN P. Repeat exposure to polyinosinic; polycytidylic acid induces TLR3 expression via JAK-STAT signaling and synergistically potentiates NF κ B-RelA signaling in ARPE-19 cells [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109494.
- [20] ROSE-JOHN S. Interleukin-6 family cytokines [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(2): 028415.
- [21] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248.
- [22] ZANDERS L, KNY M, HAHN A, SCHMIDT S, WUNDERSTITZ S, TODIRAS M, *et al*. Sepsis induces interleukin 6, GPI30/JAK2/STAT3, and muscle wasting [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(1): 713-727.
- [23] ZHANG L, SUI C, ZHANG Y, WANG G, YIN Z. Knockdown of hsa_circ_0134111 alleviates the symptom of osteoarthritis via sponging microRNA-224-5P [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(11): 1052-1066.
- [24] FIEBELKOW J, GUENDEL A, GUENDEL B, MEHWALD N, JETKA T, KOMOROWSKI M, *et al*. The tyrosine phosphatase SHP2 increases robustness and information transfer within IL-6-induced JAK/STAT signalling [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 94.
- [25] DARNELL J E J R. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1630-1635.

Effect of micro-ribonucleic acid-224-5P in the occurrence and development of diabetes retinopathy via regulating interleukin-6 signal transducer/Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway

ZHAO Xin^{1,2}, YANG Jing¹, XIN Xiangyang²

1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Inner Mongolia University of Science and Technology Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia, China

2. Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou 014010, Inner Mongolia, China

Corresponding author: YANG Jing, E-mail: yangjing2569@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the expression changes of micro-ribonucleic acid-224-5P (miR-224-5P) in diabetes retinopathy (DR) patients and its effect and mechanism in high glucose-induced adult retinal pigment epithelial cell-19 (ARPE-19 cells). **Methods** The peripheral blood was extracted from 6 DR patients and healthy people, respectively. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction was used to detect the relative expression of miR-224-5P. The normally cultured ARPE-19 cells were randomly divided into the high glucose group (administered with 30 mmol · L⁻¹ high glucose), high glucose + miR-224-5P mimics group (administered with 30 mmol · L⁻¹ high glucose after transfection with 100 nmol · L⁻¹ miR-224-5P mimics), high glucose + miR-224-5P inhibitor group (administered with 30 mmol · L⁻¹ high glucose after transfection with 100 nmol · L⁻¹ miR-224-5P inhibitor), high glucose + OE-IL6ST group (administered with 30 mmol · L⁻¹ high glucose after transfection with 100 nmol · L⁻¹ OE-IL6ST), and high glucose + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST group (administered with 30 mmol · L⁻¹ high glucose after transfection with 100 nmol · L⁻¹ miR-224-5P mimics and 100 nmol · L⁻¹ OE-IL6ST). Cell viability was analyzed by Cell Counting Kit-8; cell migration rate was detected by Transwell; targeting relationship between miR-224-5P and interleukin-6 signal transducer (IL6ST) was verified by dual-luciferase assay; Western blot was used to determine the protein expressions of IL6ST, phosphorylated Janus-activated kinase (P-JAK) and phosphorylated signal transducer and activator of transcription (P-STAT); the protein expressions of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Additionally, the IL6ST was overexpressed to confirm whether miR-224-5P functioned through IL6ST/JAK/STAT signaling pathway. **Results** The relative messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of miR-224-5P in the peripheral blood of DR patients was lower than the healthy people ($P < 0.001$). Compared with the high glucose group, the viability and migration rate of cells increased in the high glucose + miR-224-5P mimics group, and decreased in the high glucose + miR-224-5P inhibitor group (all $P < 0.001$). The results of the dual-luciferase assay confirmed that IL6ST was the target gene regulated by miR-224-5P. Compared with the high glucose group, the protein expression of IL6ST decreased and protein expressions of P-JAK, P-STAT increased (all $P < 0.05$) in the high glucose + miR-224-5P mimics group; the protein expression of IL6ST increased and protein expressions of P-JAK, P-STAT decreased (all $P < 0.05$) in the high glucose + miR-224-5P inhibitor group. Compared with the high glucose group, the protein expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α decreased in the high glucose + miR-224-5P mimics group (all $P < 0.01$), while significantly increased in the high glucose + miR-224-5P inhibitor group (all $P < 0.01$). Compared with the high glucose + miR-224-5P mimics group, the viability and cell migration rate of cells decreased in the high glucose + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST group (both $P < 0.001$). Compared with the high glucose + OE-IL6ST group, the protein expressions of P-JAK and P-STAT increased in the high glucose + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST group (both $P < 0.001$). Compared with the high glucose + miR-224-5P mimics group, the protein expressions of P-JAK and P-STAT decreased in the high glucose + miR-224-5P mimics + OE-IL6ST group (both $P < 0.001$). **Conclusion** The expression of miR-224-5P is lower in DR patients, and the expression of high glucose-induced inflammatory factors can be reduced by overexpression of miR-224-5P. The viability and migration rate of ARPE-19 cells induced by high glucose can be increased by regulating IL6ST/JAK/STAT signaling pathway so as to affect the occurrence and development of DR.

[Key words] diabetic retinopathy; micro-ribonucleic acid-224-5P; interleukin-6 signal transducer/Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway