

引文格式:李晶,曾卫娟.LncRNA HAGLR 靶向 miR-625-5p 对脂多糖诱导的视网膜色素上皮细胞凋亡和炎症因子表达的影响[J].眼科新进展,2024,44(3):178-182. doi:10.13389/j.cnki.rao.2024.0035

【实验研究】

LncRNA HAGLR 靶向 miR-625-5p 对脂多糖诱导的视网膜色素上皮细胞凋亡和炎症因子表达的影响[△]

李晶 曾卫娟

作者简介:李晶(ORCID:0000-0002-4205-2015),女,1979年8月出生,吉林辽源人。研究方向:基础医学研究。E-mail:18790999669@163.com

通信作者:曾卫娟(ORCID:0009-0000-2477-6012),女,1980年10月出生,湖北武汉人,博士,主治医师。研究方向:眼科疾病。E-mail:chenjie197410@163.com

收稿日期:2023-09-22

修回日期:2024-01-05

本文编辑:付中静

△基金项目:国家卫生健康委“十三五”规划全国重点课题(编号:YY-WS2330)

作者单位:457000 河南省濮阳市,濮阳医学高等专科学校(李晶); 430062 湖北省武汉市,武汉大学中南医院眼科(曾卫娟)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA HAGLR(LncRNA HAGLR)是否可通过靶向调控微小 RNA-625-5p(miR-625-5p)表达而影响脂多糖(LPS)诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞凋亡、炎症因子表达,为揭示视网膜病变机制奠定实验基础。**方法** 将LPS诱导人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)设为LPS组,正常培养的ARPE-19细胞设为Con组。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测LncRNA HAGLR、miR-625-5p表达水平。根据转染物不同分为LPS+sh-NC组、LPS+sh-HAGLR组、LPS+miR-NC组、LPS+miR-625-5p组、LPS+sh-HAGLR+anti-miR-NC组、LPS+sh-HAGLR+anti-miR-625-5p组。采用流式细胞术检测细胞凋亡率;ELISA法检测白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;验证LncRNA HAGLR、miR-625-5p靶向关系;Western blot检测活化的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶3(cleaved-Caspase 3)、cleaved-Caspase 9蛋白水平。**结果** 与Con组比较,LPS组LncRNA HAGLR表达水平升高,miR-625-5p表达水平降低(均为 $P<0.05$),细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均升高(均为 $P<0.05$)。与LPS+sh-NC组比较,LPS+sh-HAGLR组细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均降低(均为 $P<0.05$);LncRNA HAGLR可负向调控miR-625-5p表达水平($P<0.05$)。与LPS+miR-NC组比较,LPS+miR-625-5p组miR-625-5p表达水平升高,细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均降低(均为 $P<0.05$)。与LPS+sh-HAGLR+anti-miR-NC组比较,LPS+sh-HAGLR+anti-miR-625-5p组miR-625-5p表达水平降低,细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均升高(均为 $P<0.05$)。**结论** 干扰LncRNA HAGLR表达可通过靶向调控miR-625-5p表达抑制细胞凋亡、炎症因子表达,以减轻LPS诱导的ARPE-19细胞损伤。

【关键词】 长链非编码 RNA HAGLR;微小 RNA-625-5p;脂多糖;视网膜色素上皮细胞;细胞凋亡;炎症

【中图分类号】 R774.1

视网膜色素上皮(RPE)细胞处于神经视网膜、脉络膜之间,可维持光感受器存活、视网膜内环境稳定,参与血-视网膜屏障、黄斑免疫防御等,其病变可引起年龄相关性黄斑变性等视网膜病^[1-2]。因而明确RPE细胞损伤机制,有助于保护视网膜功能,以防视网膜疾病发生发展。长链非编码RNA(LncRNA)可通过染色体重塑、转录后加工等方式调节基因表达,其差异表达可调控眼部疾病发生发展。研究发现,LncRNA可调节RPE细胞生理功能,影响视网膜疾病发展进程^[3-4]。LncRNA HAGLR可与内源性RNA竞争性结合微小RNA(miRNA),在炎症反应、心肌细胞凋亡等过程中发挥调控作用^[5]。但LncRNA HAGLR与视网膜病变相关研究报道相对较少。StarBase预测显示,LncRNA HAGLR与微小RNA-625-5p(miR-625-5p)存在结合位点。但关于miR-625-5p对RPE细胞损伤的研究报道较少。因此,本研究旨在探讨LncRNA HAGLR是否可通过靶向调控miR-625-5p表达参与RPE细胞损伤过程,为揭示视网膜病变机制及临床治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)购自上海启达生物公司;脂多糖(LPS)购自上海碧云天生物公司;阴性对照(sh-NC)、HAGLR慢病毒短发夹RNA(sh-HAGLR)、阴性对照mimic NC序列(miR-NC)、miR-625-5p寡核苷酸模拟物(miR-625-5p mimics)、特异性寡核苷酸抑制剂阴性对照(anti-miR-NC)、miR-625-5p特异性寡核苷酸抑制剂(anti-miR-625-5p)购自广州锐博生物公司;pcDNA、pcDNA-HAGLR购自上海吉玛生物公司;双荧光素酶活性检测试剂盒、野生型载体(WT-HAGLR)、突变型载体(MUT-HAGLR)购自美国Promega公司;Trizol试剂、转染试剂Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒、SYBR Green试剂盒购自北京天根生化公司;凋亡检测试剂盒、蛋白裂解液购自江苏凯基生物公司;白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)检测试剂盒购自上海酶研生

物公司;兔抗人活化的半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 3 (cleaved-Caspase 3) 抗体、兔抗人活化的cleaved-Caspase 9 抗体、内参 GAPDH、二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

ARPE-19 细胞采用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,取对数生长期细胞接种于 24 孔板 (每孔 2×10^5 个),加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 孵育 24 h^[6],记为 LPS 组。设置正常培养的 ARPE-19 细胞作为 Con 组。采用脂质体转染法将 sh-NC、sh-HAGLR、miR-NC、miR-625-5p mimics、sh-HAGLR + anti-miR-NC、sh-HAGLR + anti-miR-625-5p 分别转染至 ARPE-19 细胞,用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 孵育 24 h,依次分别记为 LPS + sh-NC 组、LPS + sh-HAGLR 组、LPS + miR-NC 组、LPS + miR-625-5p 组、LPS + sh-HAGLR + anti-miR-NC 组、LPS + sh-HAGLR + anti-miR-625-5p 组,各组处理完成后收集细胞并进行后续实验。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应

收集各组 ARPE-19 细胞后采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,采用试剂盒标准三步法进行实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 扩增,LncRNA HAGLR 以 GAPDH 为内参,miR-625-5p 以 U6 为内参,采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

取各组 ARPE-19 细胞加入预冷 PBS 洗涤,之后加入 500 μL Binding Buffer 悬浮液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下细胞悬液转移至 EP 管,经 $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,PBS 洗涤 2 次,加入 200 μL 结合缓冲液,加入 5 μL Annexin V-FITC,振荡混匀,室温避光孵育 15 min,加入 10 μL PI 染色液,振荡混匀,室温避光孵育 10 min,加入 400 μL 结合缓冲液,涡旋振荡器中持续振荡 10 min,过滤,应用流式细胞仪及应用 Cellaquest 软件检测各组细胞凋亡率。

1.2.4 ELISA 法检测炎症因子水平

收集各组 ARPE-19 细胞 (4×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$),取细胞悬液加入 24 孔板 (每孔 500 μL),经 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液,采用 ELISA 法检测 IL-6、IL-1 β 水平:收集各组细胞培养基,从冰箱中取出 ELISA 试剂盒,若试剂盒内洗涤液出现结晶吸出,需放入恒温水浴锅内溶解,取细胞培养于室温条件,经 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,IL-6 标准品稀释浓度:240、160、80、40、20、0 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,IL-1 β 标准品稀释浓度:120、80、40、20、10、0 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,设置不加样品孔与酶标试剂的空白对照孔,待测样品孔内加入样品稀释液 40 μL 、上清液 10 μL ,水浴锅升温至 37 $^{\circ}\text{C}$,酶标板封板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内孵育 30 min 后检测。

1.2.5 双荧光素酶报告实验

采用 StarBase 预测显示 LncRNA HAGLR、miR-625-5p 存在结合位点,以结合位点为模板进行扩增,

插入 pmirGLO 载体,分别构建 WT-HAGLR、MUT-HAGLR,同时取对数生长期 ARPE-19 细胞接种于 24 孔板,将上述载体分别与 miR-NC 或 miR-625-5p mimics 共转染至 ARPE-19 细胞,48 h 后收集细胞并检测荧光素酶活性。

1.2.6 Western blot 检测 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白表达水平

收集各组 ARPE-19 细胞加入 RIPA 裂解液,冰上孵育 30 min 后离心取上清,采用 BCA 法检测蛋白浓度,蛋白变性 5 min 后行 SDS-PAGE 凝胶分离,转膜后采用脱脂奶粉 (37 $^{\circ}\text{C}$) 封闭 90 min,加入 cleaved-Caspase 3 (1 : 800)、cleaved-Caspase 9 (1 : 800) 一抗、内参 GAPDH 抗体 (1 : 1 000) 稀释液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,次日加入二抗稀释液 (1 : 5 000) 后室温下孵育 90 min,显色曝光后应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间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 LncRNA HAGLR 和 miR-625-5p 在 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中的表达

Con 组、LPS 组 LncRNA HAGLR 表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 3.71 ± 0.29 ,miR-625-5p 表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 0.42 ± 0.05 ,与 Con 组比较,LPS 组 LncRNA HAGLR 表达水平升高,miR-625-5p 表达水平降低 (均为 $P < 0.05$)。

2.2 干扰 LncRNA HAGLR 表达对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞损伤的影响

Con 组、LPS 组、LPS + sh-NC 组、LPS + sh-HAGLR 组细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。与 Con 组比较,LPS 组细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均升高 (均为 $P < 0.05$)。与 LPS + sh-NC 组比较,LPS + sh-HAGLR 组细胞凋亡率,cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平,IL-6、IL-1 β 水平均降低 (均为 $P < 0.05$) (表 1)。

2.3 LncRNA HAGLR 靶向调控 miR-625-5p 的表达

LncRNA HAGLR 基因序列上存在 miR-625-5p 结合位点 (图 1)。miR-NC、miR-625-5p mimics 与 WT-HAGLR 共转染后荧光素酶活性分别为 1.08 ± 0.07 、 0.34 ± 0.04 ,miR-NC、miR-625-5p mimics 与 MUT-HAGLR 共转染后荧光素酶活性分别为 1.06 ± 0.09 、 1.04 ± 0.08 。与 miR-NC、WT-HAGLR 共转染相比,miR-625-5p mimics、WT-HAGLR 共转染后荧光

素酶活性明显降低 ($P < 0.05$)。与 miR-NC、MUT-HAGLR 共转染相比,miR-625-5p mimics 与 MUT-HAGLR 共转染后荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。LncRNA HAGLR 可负向调控 miR-625-5p 表达 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1 LncRNA HAGLR 对 ARPE-19 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | LncRNA HAGLR | 细胞凋亡率/% | cleaved-Caspase 3 蛋白 | cleaved-Caspase 9 蛋白 | IL-6/(ng · L ⁻¹) | IL-1β/(ng · L ⁻¹) |
|------------------|---------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Con 组 | 1.00 ± 0.00 | 5.25 ± 0.63 | 0.12 ± 0.02 | 0.08 ± 0.01 | 8.74 ± 0.69 | 15.96 ± 1.39 |
| LPS 组 | 3.85 ± 0.41 * | 26.74 ± 2.46 * | 0.64 ± 0.05 * | 0.58 ± 0.05 * | 23.48 ± 3.01 * | 72.48 ± 6.83 * |
| LPS + sh-NC 组 | 3.88 ± 0.39 | 27.05 ± 2.52 | 0.66 ± 0.04 | 0.59 ± 0.04 | 24.17 ± 2.59 | 73.04 ± 7.29 |
| LPS + sh-HAGLR 组 | 1.69 ± 0.17 # | 9.63 ± 0.87 # | 0.19 ± 0.02 # | 0.14 ± 0.02 # | 11.63 ± 1.74 # | 28.61 ± 2.72 # |
| <i>F</i> | 75.496 | 114.530 | 202.184 | 197.804 | 39.532 | 96.327 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$;与 LPS + sh-NC 组比较, # $P < 0.05$ 。



图 1 LncRNA HAGLR 的序列中含有与 miR-625-5p 互补的核苷酸序列

2.4 miR-625-5p 过表达对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞损伤的影响

与 LPS + miR-NC 组比较,LPS + miR-625-5p 组 miR-625-5p 表达水平升高,细胞凋亡率及 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平,IL-6、IL-1β 水

平均降低(均为 $P < 0.05$) (表 3)。

表 2 LncRNA HAGLR 调控 miR-625-5p 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 指标 | LncRNA HAGLR | miR-625-5p |
|-------------|---------------|---------------|
| pcDNA | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| pcDNA-HAGLR | 4.05 ± 0.36 * | 0.53 ± 0.05 * |
| sh-NC | 1.02 ± 0.08 | 0.99 ± 0.08 |
| sh-HAGLR | 0.29 ± 0.03 # | 3.11 ± 0.27 # |
| <i>F</i> | 245.861 | 196.033 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.000 |

注:与 pcDNA 比较, * $P < 0.05$;与 sh-NC 比较, # $P < 0.05$ 。

表 3 miR-625-5p 对 ARPE-19 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | miR-625-5p | 细胞凋亡率/% | cleaved-Caspase 3 蛋白 | cleaved-Caspase 9 蛋白 | IL-6/(ng · L ⁻¹) | IL-1β/(ng · L ⁻¹) |
|--------------------|-------------|--------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| LPS + miR-NC 组 | 1.00 ± 0.00 | 28.16 ± 2.33 | 0.65 ± 0.06 | 0.57 ± 0.05 | 25.68 ± 2.39 | 76.89 ± 8.05 |
| LPS + miR-625-5p 组 | 3.67 ± 0.38 | 11.45 ± 1.37 | 0.23 ± 0.03 | 0.19 ± 0.02 | 16.72 ± 1.42 | 33.41 ± 3.57 |
| <i>t</i> | 11.896 | 10.708 | 10.844 | 12.222 | 5.582 | 8.552 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.001 |

2.5 下调 miR-625-5p 表达可逆转干扰 LncRNA HAGLR 表达对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞损伤的影响

与 LPS + sh-HAGLR + anti-miR-NC 组比较,

LPS + sh-HAGLR + anti-miR-625-5p 组 miR-625-5p 表达水平降低,细胞凋亡率及 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平,IL-6、IL-1β 水平均升高(均为 $P < 0.05$) (表 4)。

表 4 sh-HAGLR 与 anti-miR-NC 共转染对 ARPE-19 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | miR-625-5p | 细胞凋亡率/% | cleaved-Caspase 3 蛋白 | cleaved-Caspase 9 蛋白 | IL-6/(ng · L ⁻¹) | IL-1β/(ng · L ⁻¹) |
|------------------------------------|-------------|--------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| LPS + sh-HAGLR + anti-miR-NC 组 | 1.00 ± 0.00 | 8.43 ± 0.81 | 0.18 ± 0.02 | 0.13 ± 0.02 | 10.58 ± 1.14 | 25.52 ± 2.46 |
| LPS + sh-HAGLR + anti-miR-625-5p 组 | 0.26 ± 0.03 | 20.52 ± 2.36 | 0.57 ± 0.05 | 0.51 ± 0.04 | 19.75 ± 1.63 | 63.19 ± 5.72 |
| <i>t</i> | 42.724 | 8.393 | 12.544 | 14.717 | 7.985 | 10.479 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 |

3 讨论

视网膜病变机制可能与炎症、氧化应激等有关,ARPE 细胞炎症损伤可降低其吞噬功能,促使未消化碎片处于胞浆内,并沉积于基底膜、Bruch 膜后形成玻璃膜疣,促使新生血管形成,进而发展为视网膜病变,LPS 可作为视网膜病变炎症细胞模型的刺激物^[7]。因而本研究选用 LPS 构建 ARPE-19 细胞损伤模型。既往研究显示,LncRNA 在 LPS 诱导的

ARPE 细胞损伤中可发挥调控作用,并可参与年龄相关性黄斑变性等视网膜病变发生发展过程^[8]。

目前 LncRNA HAGLR 在 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中表达趋势尚未明确,本研究结果显示,LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中 LncRNA HAGLR 表达水平升高。既往研究表明,LncRNA HAGLR 在 LPS 诱导的神经细胞中表达上调,敲低其表达可抑制 LPS 诱导的神经细胞炎症、神经元凋亡,并可靶向调节 miR-182-5p/ATAT1 表达,而 ATAT1 又可激活 NLRP3 炎

症小体加重神经细胞损伤^[9]。LncRNA HAGLR 可靶向调控 miR-130a-3p 表达促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,沉默其表达可抑制炎症因子分泌,减少细胞凋亡,减轻软骨细胞炎症损伤,而 miR-130a-3p 可直接靶向 JAK1 参与软骨细胞损伤过程^[10]。LncRNA HAGLR 可调节 miR-204/CDK5R1 表达促进周围神经损伤^[11]。由此推测,LncRNA HAGLR 表达水平升高可能引起组织或细胞损伤。同时本研究发现,LPS 处理后细胞凋亡率及 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白水平升高,与既往研究结果类似^[12]。Caspase 在细胞凋亡信号转导中发挥调节作用,线粒体膜电位变化可促进细胞色素 C 释放至细胞质,激活 Caspase 9、Caspase 3,导致细胞凋亡^[13]。本研究结果表明,干扰 LncRNA HAGLR 表达后细胞凋亡率降低,通过对凋亡蛋白研究,证实 LncRNA HAGLR 具有促凋亡作用,提示 LncRNA HAGLR 可能作为视网膜病变临床治疗的潜在靶点。炎症反应与视网膜病变发生发展密切相关,而 ARPE-19 细胞受到外界刺激后可产生多种炎症因子,可激活 Caspase 途径,促使细胞凋亡^[14]。本研究选取检测 LncRNA HAGLR 对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞外分泌炎症因子 IL-6、IL-1 β 水平变化,用于判别 LncRNA HAGLR 是否可通过调节炎症因子形成以调节炎症反应,结果发现,LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中 IL-6、IL-1 β 水平升高,而干扰 LncRNA HAGLR 后 IL-6、IL-1 β 水平降低,提示干扰 LncRNA HAGLR 表达可抑制炎症因子分泌,阻断炎症反应相关 ARPE-19 细胞凋亡。其作用机制可能与 LncRNA HAGLR 调节 miR-182-5p/ATAT1、miR-130a-3p/JAK1、miR-204/CDK5R1 表达有关。

本研究证实 LncRNA HAGLR 可靶向结合 miR-625-5p,并负向调控 miR-625-5p 表达,这也是本研究创新之处。miR-625-5p 在 LPS 诱导的急性肺损伤模型中呈低表达,上调其表达可抑制 NF- κ B p65 蛋白表达,发挥抗炎作用,以减轻急性肺损伤^[15-16]。本研究结果显示,LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中 miR-625-5p 表达水平降低,提示 miR-625-5p 水平降低可能促进 ARPE-19 细胞损伤。由此推测,miR-625-5p 水平降低可促进炎症因子释放,加重 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞损伤。本研究进一步分析发现,miR-625-5p 过表达可抑制细胞凋亡、炎症因子分泌,而下调其表达可减弱干扰 LncRNA HAGLR 表达对 ARPE-19 细胞的损伤作用,提示 LncRNA HAGLR 可能通过靶向调控 miR-625-5p 表达参与 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞损伤过程。

4 结论

LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中 LncRNA HAGLR 表达上调,miR-625-5p 表达下调,干扰 LncRNA HAGLR 表达可通过靶向调节 miR-625-5p 表达,降低细

胞凋亡率、炎症因子表达水平,进而减轻 ARPE-19 细胞损伤,但关于 miR-625-5p 是如何调控下游靶基因表达尚需进一步探究。

参考文献

[1] 杨小玲,方海珍,周挺业,潘建东. 视网膜内微血管异常及其来源的新生血管的临床特征[J]. 国际眼科杂志,2021,21(1): 164-168.
YANG X L, FANG H Z, ZHOU T Y, PAN J D. Clinical characterization of intraretinal microvascular abnormality and associated neovascularization[J]. *Int Eye Sci*, 2021, 21(1): 164-168.

[2] BLASIAK J, HYTTINEN J M T, SZCZEPANSKA J, PAWLOWSKA E, KAARNIRANTA K. Potential of long non-coding RNAs in age-related macular degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9178-9188.

[3] KACZYNSKI T J, AU E D, FARKAS M H. Exploring the lncRNA localization landscape within the retinal pigment epithelium under normal and stress conditions[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 539-549.

[4] YU X Y, LUO Y Z, CHEN G Y, LIU H, TIAN N, ZEN X T, et al. Long non-coding RNA PWRN2 regulates cytotoxicity in an in vitro model of age-related macular degeneration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 535(1): 39-46.

[5] WANG Z, LUO W Q, ZHONG P, FENG Y F, WANG H B. lncRNA HAGLR modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice through regulating miR-133a-3p/MAPK1 axis[J]. *Open Med (Wars)*, 2022, 17(1): 1299-1307.

[6] 闫梅,马倩,马雅玲,刘媛,蒋璐. 枸杞多糖对脂多糖诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2021,43(6): 595-602.
YAN M, MA Q, MA Y L, LIU Y, JIANG L. The effect of lycium barbarum polysaccharide on the apoptosis of human retinal pigment epithelial cells induced by lipopolysaccharide[J]. *J Ningxia Med Univ*, 2021, 43(6): 595-602.

[7] PAN J, ZHAO L. Long non-coding RNA histone deacetylase 4 antisense RNA 1 (HDAC4-AS1) inhibits HDAC4 expression in human ARPE-19 cells with hypoxic stress[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2228-2237.

[8] HYTTINEN J M T, BLASIAK J, KAARNIRANTA K. Non-coding RNAs regulating mitochondrial functions and the oxidative stress response as putative targets against age-related macular degeneration (AMD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2636-2646.

[9] ZHANG Q Y, ZHOU L, XIE H, ZHANG H J, GAO X Z. HAGLR aggravates neuropathic pain and promotes inflammatory response and apoptosis of lipopolysaccharide-treated SH-SY5Y cells by sequestering miR-182-5p from ATAT1 and activating NLRP3 inflammasome [J]. *Neurochem Int*, 2021, 145(1): 105001-105011.

[10] ZUO Y Z, XIONG C J, GAN X W, XIE W, YAN X K, CHEN Y Z, et al. LncRNA HAGLR silencing inhibits IL-1 β -induced chondrocytes inflammatory injury via miR-130a-3p/JAK1 axis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 203-213.

[11] XIA L, LI P, BI W C, YANG R Z, ZHANG Y L. LncRNA HAGLR promotes the proliferation, migration, and neurotrophic factor production of Schwann cells via miR-204/CDK5R1 after sciatic nerve injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2023, 82(4): 324-332.

[12] LIU J, MA Z Z, RAN Z L. MiR-21-3p modulates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis via targeting TGS4 in retinal pigment epithelial cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(10): 883-889.

[13] 叶亚婷,窦国睿,常天芳,孙宇,牛亚丽,周子义,等. 紫杉醇对视网膜色素上皮细胞功能的破坏及其潜在机制[J]. 国际眼科杂志,2022,22(2): 194-199.
YE Y T, DOU G R, CHANG T F, SUN Y, NIU Y L, ZHOU Z Y, et al. Damage of retinal pigment epithelial cells function by paclitaxel and its potential mechanism [J]. *Int Eye Sci*, 2022, 22(2): 194-199.

[14] 崔锋,靖鹏举,朱冬梅,王媛. 地塞米松对脂多糖诱导人视网膜色素上皮细胞炎症损伤及 NLRP3/Caspase-1 通路的影响[J]. 眼科新进展,2020,40(9): 826-830.

CUI Z, JING P J, ZHU D M, WANG Y. Effects of dexamethasone on lipopolysaccharide-induced inflammatory damage of human retinal pigment epithelial cells and NLRP3/Caspase-1 pathway[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40(9): 826-830.

[15] TANG B, XU Q M, XUAN L, WANG H J, ZHANG H, WANG X J, et al. Circ 0001434 RNA reduces inflammation in acute lung injury model through Wnt/ β -catenin and NF- κ B by miR-625-5p[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9): 3290-3300.

[16] QIAN F H, DENG X, ZHUANG Q X, WEI B, ZHENG D D. miR-625-5p suppresses inflammatory responses by targeting AKT2 in human bronchial epithelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1951-1957.

Effect of long-chain non-coding ribonucleic acid HAGLR targeting micro ribonucleic acid-625-5p on lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammatory factor expression in retinal pigment epithelial cells

LI Jing¹, ZENG Weijuan²

1. Puyang Medical College, Puyang 457000, Henan Province, China
2. Department of Ophthalmology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430062, Hubei Province, China

Corresponding author: ZENG Weijuan, E-mail: chenjie197410@163.com

[Abstract] Objective To investigate whether long-chain non-coding ribonucleic acid HAGLR (LncRNA HAGLR) can affect lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis and expression of inflammatory factors of retinal pigment epithelium (RPE) cells by targeted regulation of the expression of micro ribonucleic acid-625-5p (miR-625-5p), so as to lay an experimental foundation for revealing the mechanism of retinopathy. **Methods** LPS-induced human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells were set as the LPS group, and normally cultured ARPE-19 cells were assigned to the Con group. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to detect the expression levels of LncRNA HAGLR and miR-625-5p. Based on different transfection reagents, the cells were divided into the LPS + sh-NC group, LPS + sh-HAGLR group, LPS + miR-NC group, LPS + miR-625-5p group, LPS + sh-HAGLR + anti-miR-NC group, and LPS + sh-HAGLR + anti-miR-625-5p group. Flow cytometry was used to detect apoptosis rate; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β); the targeting relationship between LncRNA HAGLR and miR-625-5p was verified; Western blot was used to detect the protein levels of activated cysteinyl aspartate specific proteinase 3 and 9 (cleaved-Caspase 3 and cleaved-Caspase 9). **Results** Compared with the Con group, the LPS group showed an increase in the expression level of LncRNA HAGLR and a decrease in the expression level of miR-625-5p (both $P < 0.05$), and there were increases in apoptosis rate, protein levels of cleaved-Caspase 3 and cleaved-Caspase 9, and levels of IL-6 and IL-1 β (all $P < 0.05$). Compared with the LPS + sh-NC group, the LPS + sh-HAGLR group showed decreases in apoptosis rate, protein levels of cleaved-Caspase 3 and cleaved-Caspase 9, and levels of IL-6 and IL-1 β (all $P < 0.05$); LncRNA HAGLR could negatively regulate the expression level of miR-625-5p ($P < 0.05$). Compared with the LPS + miR-NC group, the LPS + miR-625-5p group showed an increase in the expression level of miR-625-5p and decreases in apoptosis rate, protein levels of cleaved-Caspase 3 and cleaved-Caspase 9, and levels of IL-6 and IL-1 β (all $P < 0.05$). Compared with the LPS + sh-HAGLR + anti-miR-NC group, the LPS + sh-HAGLR + anti-miR-625-5p group showed a decrease in the expression level of miR-625-5p and increases in apoptosis rate, protein levels of cleaved-Caspase 3 and cleaved-Caspase 9, and levels of IL-6 and IL-1 β (all $P < 0.05$). **Conclusion** Interference on LncRNA HAGLR expression can realize the targeted regulation of miR-625-5p expression to inhibit the apoptosis and inflammatory factor expression, reducing LPS-induced injury of ARPE-19 cells.

[Key words] long-chain non-coding ribonucleic acid HAGLR; micro ribonucleic acid-625-5p; lipopolysaccharide; retinal pigment epithelial cells; apoptosis; inflammation