

本文引用格式:曾清雨,汤中,李生富,等.lncRNA MEG3靶向miR-130a-5p调控人视网膜色素上皮细胞损伤的研究[J].安徽医学,2023,44(11):1302-1308.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.11.006

lncRNA MEG3 靶向 miR-130a-5p 调控人视网膜色素上皮细胞损伤的研究

曾清雨 汤中 李生富 唐云聪

[摘要] 目的 探讨lncRNA MEG3在年龄相关性黄斑变性(AMD)患者中的表达及其靶向miR-130a-5p对人视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤的影响。方法 选取2020年6月至2021年8月永州职业技术学院附属医院收治的AMD患者38例以及同期的健康体检者38例,收集其空腹静脉血,qRT-PCR检测其血清lncRNA MEG3表达水平。不同浓度(0 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、600 $\mu\text{mol/L}$)过氧化氢(H_2O_2)处理人RPE细胞系ARPE-19细胞构建RPE细胞损伤模型,并检测lncRNA MEG3在 H_2O_2 处理的ARPE-19细胞中表达。双荧光素酶报告基因实验和RNA结合蛋白免疫沉淀(RIP)实验分析lncRNA MEG3与miR-130a-5p的靶向关系。ARPE-19细胞分为对照组(常规培养,不进行任何特殊处理)、 H_2O_2 组(200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理24 h)、Vector组(转染pcDNA3.1-NC 24 h后200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理24 h)、lncRNA MEG3组(转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3 24 h后200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理24 h)、lncRNA MEG3+miR-NC组(共转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3和miR-NC 24 h后200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理24 h)、lncRNA MEG3+miR-130a-5p组(共转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3和miR-130a-5p mimics 24 h后200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理24 h),qRT-PCR检测各组细胞中lncRNA MEG3、miR-130a-5p表达水平,噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞活性,流式细胞仪检测各组细胞凋亡,2,7-二氯二氢荧光素二醋酸(DCFH-DA)荧光探针法、硫代巴比妥酸(TBA)法、水溶性四唑盐1(WST-1)法分别检测各组细胞内活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,ELISA法检测各组细胞上清液中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 β -淀粉样蛋白(A β)水平,Western blot检测各组细胞中核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶1(HO-1)通路相关蛋白表达。结果 与健康体检者比较,lncRNA MEG3在AMD患者血清中呈低表达($P<0.05$)。与0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组比较,100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理ARPE-19细胞均可降低细胞存活率以及下调细胞中lncRNA MEG3表达水平($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验和RIP实验证实lncRNA MEG3与miR-130a-5p存在靶向关系。过表达lncRNA MEG3通过下调miR-130a-5p表达提供了 H_2O_2 诱导的ARPE-19细胞存活率、SOD水平及Nrf2、HO-1蛋白表达水平,降低了细胞凋亡率及ROS、MDA、IL-6、TNF- α 、A β 水平($P<0.05$)。结论 lncRNA MEG3在AMD患者血清中呈低表达,上调lncRNA MEG3可靶向负调控miR-130a-5p表达,激活Nrf2/HO-1通路,减轻人RPE细胞氧化应激和炎症反应,保护细胞免受损伤。

[关键词] lncRNA MEG3;miR-130a-5p;年龄相关性黄斑变性;人视网膜色素上皮细胞;氧化应激;炎症反应

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.11.006

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种常见的致盲性眼病,其通过影响视网膜的黄斑区域引起老年人严重和永久性视力障碍及失明,发生率较高,且至今无有效治疗方法,极大影响患者生活质量^[1-2]。目前研究认为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞功能障碍在AMD发生和进展中发挥关键作用,在外源性刺激或内源性病理变化作用下,氧化应激和炎症反应导致RPE细胞损伤,细胞凋亡增加^[3-4]。

多个lncRNA和miRNA已被证实参与调控AMD发生发展,可作为AMD的诊断标志物和治疗靶点^[5-6]。

其中lncRNA MEG3可通过靶向调控miR-93或miR-34a减轻高糖诱导的人RPE细胞ARPE-19凋亡和炎症反应^[7-8]。氧化应激也可诱导人RPE细胞中miR-130a-5p表达上调,提示miR-130a-5p可能参与氧化应激相关的AMD发病机制^[9]。此外,研究发现,lncRNA MEG3可靶向调节miR-130a-5p表达^[10]。基于此,本研究检测lncRNA MEG3在AMD患者血清中的表达情况,并采用 H_2O_2 诱导建立人RPE细胞损伤模型,初步探究lncRNA MEG3对RPE细胞损伤的可能机制,以期对AMD研究以及治疗靶点的选择提供参考依据。

作者单位:425000 湖南永州 永州职业技术学院附属医院眼科(曾清雨,汤中,唐云聪)

425000 湖南永州 永州市中心医院乳甲外科(李生富)

通信作者:唐云聪,87963104@qq.com

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样本来源 选取2020年6月至2021年8月永州职业技术学院附属医院诊治的AMD患者38例(38眼)为研究对象,符合《美国眼科学会年龄相关性黄斑变性临床指南(2019)解读》中的诊断标准^[11],男20例,女18例,年龄50~80岁,平均(62.38±6.82)岁。另选取同期本院健康体检者38例作为对照,无眼部疾病及相关家族史,男21例,女17例,年龄51~80岁,平均(62.59±7.03)岁。本研究均经受试者知情同意并签署知情同意书,且本研究经医院伦理委员会批准(审批号:202005001)。

1.1.2 细胞来源 人RPE细胞系ARPE-19细胞(AC-2141H)来源于美国ATCC公司,使用含10%胎牛血清和双抗(青霉素和链霉素)的DMEM完全培养基重悬,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,每两天换液一次,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.1.3 主要试剂 过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂) (88597)购自美国Millipore公司;lncRNA MEG3过表达载体(pcDNA3.1-lncRNA MEG3)和空载体对照(pcDNA3.1-NC)、miR-130a-5p模拟物(miR-130a-5p mimics)和阴性对照(miR-NC)由上海吉玛公司提供;MTT试剂盒(101079G)购自江西艾博因公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(11402ES60)购自上海翌圣公司;RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试剂盒(RIP-12RXN)购自中国Sigma-aldrich公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(A003-1-2、A001-3-2)购自南京建成生物工程研究所;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、β-淀粉样蛋白(amyloid β-protein, Aβ)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(EH0201、AQ-H0302-B、FN-EH4494)购自武汉菲恩生物科技有限公司;膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(AD10-2)购自日本同仁公司;ROS检测试剂盒(ab113851)及兔抗人核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)、血红素氧合酶1(heme oxygenase 1, HO-1)、β-肌动蛋白(β-actin)、Argonaute2(Ago2)、IgG抗体(ab62352、ab52947、ab8227、ab156870、ab109489)购自英国Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RPE细胞损伤模型的构建 将处于对数生长

期的ARPE-19细胞接种于96孔培养板(5000个/孔),待细胞贴壁后根据苏途等^[12]的方法和前期预实验结果添加不同浓度的H₂O₂(0 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L、600 μmol/L),另设仅添加培养液的孔为调零组,每个处理设置6个复孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养24 h,每孔添加20 μL MTT溶液(5 mg/mL),孵育4 h后吸去上层培养液,每孔添加150 μL二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),使用酶标仪检测各孔在490 nm波长处的吸光度(optical density, OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 OD_值-调零组 OD_值)/(对照组 OD_值-调零组 OD_值)×100%。选取细胞存活率接近50%的H₂O₂浓度作为ARPE-19细胞损伤造模浓度。

1.2.2 双荧光素酶报告基因实验 通过ENCORI数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测miR-130a-5p可能是lncRNA MEG3的靶点之一。将预测的lncRNA MEG3序列片段和突变片段分别插入到pmirGLO荧光素酶载体中,构建野生型载体(lncRNA MEG3-WT)和突变型载体(lncRNA MEG3-MUT)。采用脂质体法将所构建的lncRNA MEG3-WT、lncRNA MEG3-MUT分别与miR-130a-5p mimic或miR-NC共转染至ARPE-19细胞,转染48 h后进行荧光素酶活性检测,具体操作严格按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明执行。

1.2.3 RNA结合蛋白免疫沉淀实验 收集转染miR-130a-5p mimic或miR-NC 48 h后的ARPE-19细胞,采用冷PBS洗涤后添加RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)裂解缓冲液裂解。将细胞裂解物与抗Argonaute2(Ago2)抗体(1%)或IgG抗体(1%)偶联的磁珠于4℃下孵育过夜,洗涤磁珠后使用TRIzol试剂提取磁珠结合的RNA, qRT-PCR检测lncRNA MEG3表达水平。

1.2.4 细胞分组与处理 ARPE-19细胞分为对照组(常规培养,不进行任何特殊处理)、H₂O₂组(200 μmol/L H₂O₂处理24 h)、Vector组(转染pcDNA3.1-NC 24 h后200 μmol/L H₂O₂处理24 h)、lncRNA MEG3组(转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3 24 h后200 μmol/L H₂O₂处理24 h)、lncRNA MEG3+miR-NC组(共转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3和miR-NC 24 h后200 μmol/L H₂O₂处理24 h)、lncRNA MEG3+miR-130a-5p组(共转染pcDNA3.1-lncRNA MEG3和miR-130a-5p mimics 24 h后200 μmol/L H₂O₂处理24 h),所用转染方法为脂质体法。

1.2.5 qRT-PCR检测血清和细胞中lncRNA MEG3、miR-130a-5p表达水平 分别收集每位AMD患者和

健康体检者清晨空腹静脉血 5 mL, 离心后收集血清, 超低温冰箱保存, 备用)。TRIzol 试剂提取血清和细胞中总 RNA 并将其逆转录合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板配制 qRT-PCR 反应体系, 于 qRT-PCR 仪上进行扩增, 获取循环阈值(Ct 值)。20 μ L qRT-PCR 反应体系: 200 ng/ μ L cDNA 2 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L (引物序列见表 1, 由上海吉玛设计并合成), SYBR Green Mix 5 μ L, 无菌 ddH₂O 11 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算血清和细胞中 lncRNA MEG3 相对表达水平(内参基因为 GAPDH), 以及细胞中 miR-130a-5p 相对表达水平(内参基因为 U6)。

1.2.6 MTT 法检测细胞活性 将处于对数生长期的 ARPE-19 细胞接种于 96 孔培养板(5 000 个/孔), 待细胞贴壁后按照 1.2.4 方法处理细胞, 随后参照 1.2.1 中所述步骤检测各组 ARPE-19 细胞存活率。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集处理后的各组 ARPE-19 细胞, PBS 洗涤后添加 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 并依次添加 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 染色液室温避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测各组 ARPE-19 细胞凋亡率。

1.2.8 细胞内氧化应激指标检测 收集处理后的各组 ARPE-19 细胞, 参照 ROS 检测试剂盒以及 MDA、SOD 测定试剂盒说明书操作, 采用 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞荧光强度(激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm), 根据荧光强度计算各组 ARPE-19 细胞内活性氧(reactive oxygen, ROS)水平(标准化为对照组); 分别采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法、水溶性四唑盐 1(water soluble tetrazolium salt 1, WST-1)法测定各组 ARPE-19 细胞内 MDA、SOD 水平。

1.2.9 细胞上清液中炎症因子水平检测 收集处理后的各组 ARPE-19 细胞上清液, 参照 IL-6、TNF- α 、 β ELISA 试剂盒说明操作, 采用 ELISA 法检测各组 ARPE-19 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 水平。

1.2.10 Western blot 检测细胞中 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达 收集处理后的各组 ARPE-19 细胞, 添加裂解液于冰上充分裂解后离心, 吸取上清液(即总蛋白), 二辛可宁酸法定量蛋白浓度。各样品取 20 μ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后将分离

的蛋白转至聚偏二氟乙烯膜, 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后加入兔抗人 Nrf2(1:1000)、HO-1(1:2000)、 β -actin(1:2000)抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 磷酸盐缓冲液洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2000)室温孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液洗涤后电化学发光试剂显色。Image J 软件分析各蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量(归一化为内参蛋白 β -actin)。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 25.0 进行统计分析。正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 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, 进一步两两组间比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA MEG3 表达情况 AMD 患者血清 lncRNA MEG3 表达水平为(0.61 \pm 0.16), 低于健康体检者(1.01 \pm 0.17), 差异有统计学意义($t=10.562$, $P<0.05$)。见图 1。

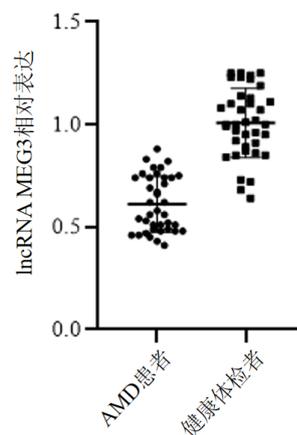


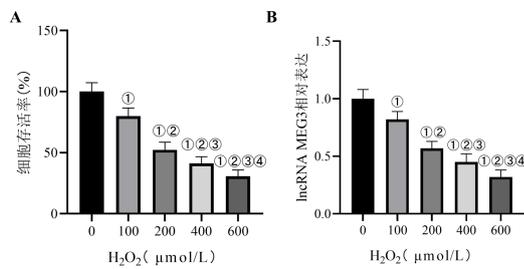
图 1 血清 lncRNA MEG3 表达情况

2.2 RPE 细胞存活率及 lncRNA MEG3 表达情况 与 0 μ mol/L 比较, 100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L、600 μ mol/L H₂O₂ 处理 ARPE-19 细胞后, 细胞存活率依次降低($P<0.05$), 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平亦依次下调($P<0.05$)。见图 2。当 H₂O₂ 处理浓度为 200 μ mol/L 时, 细胞存活率最接近 50%。

2.3 lncRNA MEG3 与 miR-130a-5p 关系的验证

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

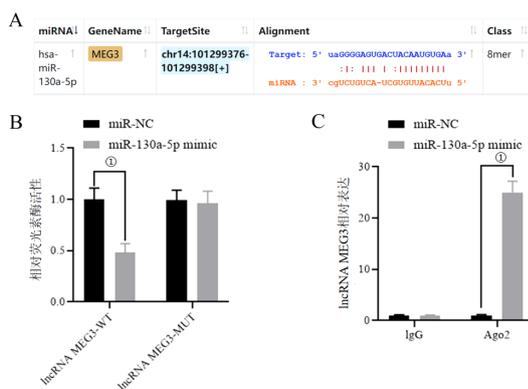
引物名称	引物序列(5'→3')	
lncRNA MEG3	F: CTGCCCATCTACACCTCACC	R: CTCTCCGCCGTCTGCGCTAGGGGCT
GAPDH	F: CCTGCCGTCTAGAAAAACCTG	R: AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT
miR-130a-5p	F: AACACGCGCTGACTCCTAGT	R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCAC	R: ACGCTTCACGAATTTGCGT



注:A为RPE细胞存活率;B为lncRNA MEG3表达水平;与0 μmol/L比较,^① $P<0.05$;与100 μmol/L比较,^② $P<0.05$;与200 μmol/L比较,^③ $P<0.05$;与400 μmol/L比较,^④ $P<0.05$ 。

图2 不同浓度H₂O₂处理后RPE细胞存活率和lncRNA MEG3表达水平

ENCORI 数据库 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测显示 lncRNA MEG3 与 miR-130a-5p 存在靶向结合位点 (图 3A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与转染 miR-NC 比较,同时转染 miR-130a-5p mimic 和 lncRNA MEG3-WT 的细胞相对荧光素酶活性降低 ($P<0.05$),而同时转染 miR-130a-5p mimic 和 lncRNA MEG3-MUT 的细胞相对荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3B。RIP 实验结果显示,与转染 miR-NC 的细胞比较,转染 miR-130a-5p mimic 的细胞中 Ago2 抗体富集更多的 lncRNA MEG3 ($P<0.05$),而转染 miR-130a-5p mimic 的细胞中 IgG 抗体富集的 lncRNA MEG3 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3C。

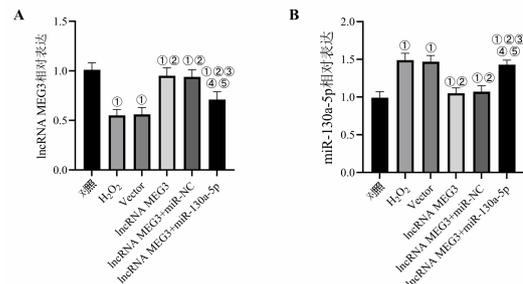


注:^① $P<0.05$ 。

图3 lncRNA MEG3与miR-130a-5p的靶向关系

2.4 lncRNA MEG3 和 miR-130a-5p 表达水平比较 与对照组比较,H₂O₂组 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平降低,miR-130a-5p 表达水平升高 ($P<0.05$);与 H₂O₂组、Vector 组比较,lncRNA MEG3 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平升高,miR-

130a-5p 表达水平降低 ($P<0.05$);与 lncRNA MEG3 组、lncRNA MEG3+miR-NC 组比较,lncRNA MEG3+miR-130a-5p 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平降低,miR-130a-5p 表达水平升高 ($P<0.05$);H₂O₂组和 Vector 组、lncRNA MEG3 组和 lncRNA MEG3+miR-NC 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3、miR-130a-5p 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4。



注:A为lncRNA MEG3表达水平;B为miR-130a-5p表达水平;与对照组比较,^① $P<0.05$;与H₂O₂组比较,^② $P<0.05$;与Vector组比较,^③ $P<0.05$;与lncRNA MEG3组比较,^④ $P<0.05$;与lncRNA MEG3+miR-NC组比较,^⑤ $P<0.05$ 。

图4 各组RPE细胞中lncRNA MEG3和miR-130a-5p表达水平比较

2.5 细胞活性和凋亡情况比较 与对照组比较,H₂O₂组 ARPE-19 细胞存活率降低,凋亡率升高 ($P<0.05$);与 H₂O₂组、Vector 组比较,lncRNA MEG3 组 ARPE-19 细胞存活率升高,凋亡率降低 ($P<0.05$);与 lncRNA MEG3 组、lncRNA MEG3+miR-NC 组比较,lncRNA MEG3+miR-130a-5p 组 ARPE-19 细胞存活率降低,凋亡率升高 ($P<0.05$);H₂O₂组和 Vector 组、lncRNA MEG3 组和 lncRNA MEG3+miR-NC 组 ARPE-19 细胞存活率、凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 5、6。

2.6 氧化应激情况比较 与对照组比较,H₂O₂组 ARPE-19 细胞内 ROS、MDA 水平升高,SOD 水平降低 ($P<0.05$);与 H₂O₂组、Vector 组比较,lncRNA MEG3 组 ARPE-19 细胞内 ROS、MDA 水平降低,SOD 水平升高 ($P<0.05$);与 lncRNA MEG3 组、lncRNA MEG3+miR-NC 组比较,lncRNA MEG3+miR-130a-5p 组 ARPE-19 细胞内 ROS、MDA 水平升高,SOD 水平降低 ($P<0.05$);H₂O₂组和 Vector 组、lncRNA MEG3 组和 lncRNA MEG3+miR-NC 组 ARPE-19 细胞内 ROS、MDA、SOD 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 7。

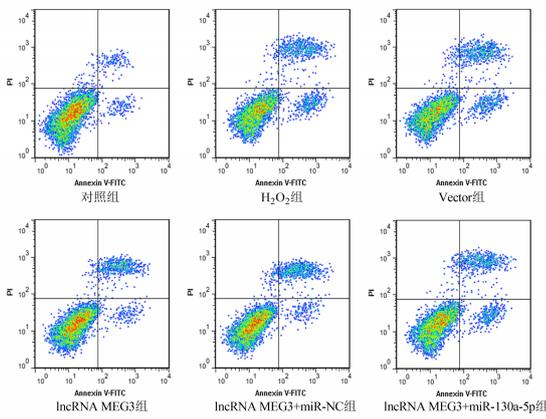
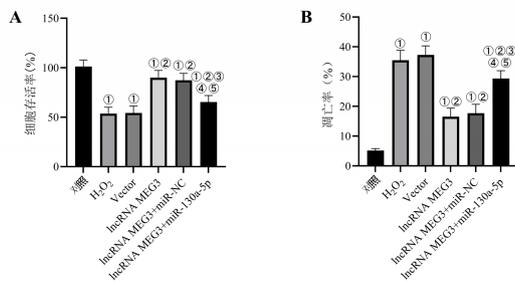
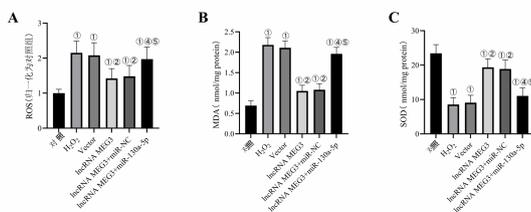


图 5 流式细胞仪检测 RPE 细胞凋亡



注: A 为 lncRNA MEG3 表达水平; B 为 miR-130a-5p 表达水平; 与对照组比较, ^① $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较, ^② $P < 0.05$; 与 Vector 组比较, ^③ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3 组比较, ^④ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, ^⑤ $P < 0.05$ 。

图 6 各组 RPE 细胞存活率和凋亡率比较

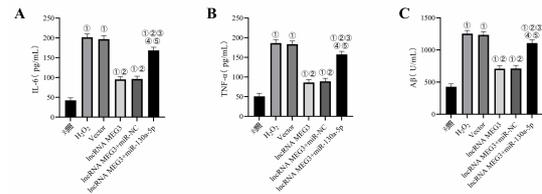


注: A 为 ROS 水平; B 为 MDA 水平; C 为 SOD 水平; 与对照组比较, ^① $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较, ^② $P < 0.05$; 与 Vector 组比较, ^③ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3 组比较, ^④ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, ^⑤ $P < 0.05$ 。

图 7 各组 RPE 细胞内 ROS、MDA、SOD 水平比较

2.7 炎症反应情况比较 与对照组比较, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 水平升高 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组、Vector 组比较, lncRNA MEG3 组 ARPE-19 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 水平降低 ($P < 0.05$); 与 lncRNA MEG3 组、lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, lncRNA MEG3+miR-130a-5p 组 ARPE-19 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 水平升高 ($P < 0.05$); H_2O_2 组和 Vector 组、lncRNA MEG3 组和 lncRNA

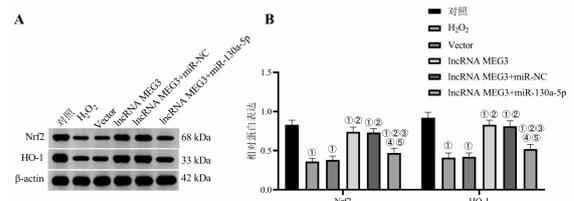
MEG3+miR-NC 组 ARPE-19 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 8。



注: A 为 IL-6 水平; B 为 TNF- α 水平; C 为 β 水平; 与对照组比较, ^① $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较, ^② $P < 0.05$; 与 Vector 组比较, ^③ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3 组比较, ^④ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, ^⑤ $P < 0.05$ 。

图 8 各组 RPE 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、 β 比较

2.8 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达情况比较 与对照组比较, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组、Vector 组比较, lncRNA MEG3 组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 lncRNA MEG3 组、lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, lncRNA MEG3+miR-130a-5p 组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); H_2O_2 组和 Vector 组、lncRNA MEG3 组和 lncRNA MEG3+miR-NC 组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 9。



注: A 为 Western blot 检测 Nrf2、HO-1 蛋白表达; B 为 Nrf2、HO-1 蛋白表达比较; 与对照组比较, ^① $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较, ^② $P < 0.05$; 与 Vector 组比较, ^③ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3 组比较, ^④ $P < 0.05$; 与 lncRNA MEG3+miR-NC 组比较, ^⑤ $P < 0.05$ 。

图 9 各组 RPE 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达

3 讨论

随着全球人口老龄化加剧, AMD 已成为导致老年群体失明的重要原因之一, 为患者和社会带来了沉重的精神和经济负担。因此, 确定 AMD 的潜在治疗靶点、早期规范治疗对于 AMD 预后改善至关重要。研究表明, lncRNA (如 lncRNA TUG1、lncRNA MALAT1、lncRNA MEG3) 可影响 RPE 细胞功能, 调节正常视觉功

能,并可能导致视网膜功能障碍^[13]。Sun等^[14]发现 lncRNA MEG3 可通过 miR-7-5p/Pax6 轴维持 RPE 分化,从而对 AMD 发挥保护作用,表明 lncRNA MEG3 可能是 AMD 治疗中的一个保护性治疗靶点。本研究结果显示,lncRNA MEG3 在 AMD 患者血清中低表达,提示 lncRNA MEG3 可能在 AMD 发生发展中发挥重要作用。

RPE 介导的氧化应激广泛参与 AMD 发病机理和进程,H₂O₂作为一种强氧化剂,通常在体外实验中用于诱导 RPE 细胞氧化损伤^[15-16]。本研究发现,不同浓度 H₂O₂ 处理 ARPE-19 细胞均可降低细胞存活率,且当 H₂O₂ 处理浓度为 200 μmol/L 时,细胞存活率最接近 50%,故而后续实验选择 200 μmol/L H₂O₂ 处理 ARPE-19 细胞进行造模。同时,本研究发现,H₂O₂ 诱导后细胞存活率、SOD 水平降低,而细胞凋亡率及 ROS、MDA、IL-6、TNF-α、Aβ 水平升高。氧化应激是 ROS 大量产生和积累的结果,且 ROS 作用于脂质发生过氧化反应生成 MDA,而 SOD 是抗氧化酶^[17]。IL-6、TNF-α 是促炎细胞因子,氧化应激可促进 RPE 细胞分泌更多的 IL-6、TNF-α,进而诱导细胞氧化损伤^[18]。Aβ 亦可作为一种炎症因子,其在眼内大量聚集,可直接损伤 RPE 细胞,已被证实是 AMD 发病机制的重要启动因子^[19]。以上结果均提示 H₂O₂ 诱导 ARPE-19 细胞发生氧化应激和炎症反应,导致细胞损伤。此外,H₂O₂ 处理可下调 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平,上调 lncRNA MEG3 可减轻 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞损伤,这进一步证实了 lncRNA MEG3 在 RPE 细胞损伤中的保护作用^[14]。

本研究中,H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达下调的同时,发现 miR-130a-5p 表达水平上调,这与 Ayaz 等^[9] 研究结果一致。推测 lncRNA MEG3、miR-130a-5p 可能通过某种机制参与调控 RPE 细胞损伤。经 ENCORI 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)分析以及双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验验证,发现人 RPE 细胞中 lncRNA MEG3 与 miR-130a-5p 存在靶向关系。此外,上调 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 lncRNA MEG3 表达可降低 miR-130a-5p 表达,且上调 miR-130a-5p 表达可部分减弱上调 lncRNA MEG3 表达对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞损伤的减轻作用。提示上调 lncRNA MEG3 可靶向负调控 miR-130a-5p 表达减轻 H₂O₂ 诱导的人 RPE 细胞氧化应激和炎症反应,保护 RPE 细胞免受损伤。

Nrf2/HO-1 通路是重要的抗氧化应激通路,氧化应激状态下,调节氧化还原平衡的关键转录因子 Nrf2 被活化后与抗氧化反应元件结合,上调下游 HO-1 等抗

氧化因子,提高 SOD 等抗氧化酶的活性,从而减弱氧化应激和炎症反应,抑制细胞凋亡^[20-21]。本研究发现,上调 lncRNA MEG3 可升高 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平,且上调 miR-130a-5p 表达亦可部分减弱上调 lncRNA MEG3 表达对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平的影响。提示 Nrf2/HO-1 通路参与 lncRNA MEG3 靶向负调控 miR-130a-5p 对 H₂O₂ 诱导的人 RPE 细胞损伤的保护作用。Luo 等^[7] 研究显示,lncRNA MEG3、Nrf2 在高糖处理的人 RPE 细胞中均降低,lncRNA MEG3 通过 miR-93/Nrf2 轴抑制高糖诱导的 RPE 细胞凋亡和炎症。

综上所述,lncRNA MEG3 在 AMD 患者血清中低表达,上调 lncRNA MEG3 可靶向负调控 miR-130a-5p 表达,激活 Nrf2/HO-1 通路,减轻 H₂O₂ 诱导的人 RPE 细胞氧化应激和炎症反应,保护 RPE 细胞免受损伤。本研究为 AMD 发病机制研究以及治疗靶点的选择提供了新的思路。但 miR-130a-5p 是直接还是间接作用于 Nrf2/HO-1 通路尚不清楚;此外,miR-130a-5p 下游靶基因众多,参与人 RPE 细胞损伤的 lncRNA MEG3/miR-130a-5p/mRNA 网络仍有待挖掘。

参考文献

- [1] THOMAS C J, MIRZA R G, GILL M K. Age-related macular degeneration[J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105(3):473-491.
- [2] STAHL A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(29/30): 513-520.
- [3] SOMASUNDARAN S, CONSTABLE I J, MELLOUGH C B, et al. Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: a review of major disease mechanisms[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2020, 48(8):1043-1056.
- [4] KAARNIRANTA K, UUSITALO H, BLASIAK J, et al. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 79:100858.
- [5] BLASIAK J, HYTTINEN J M T, SZCZEPANSKA J, et al. Potential of long non-coding RNAs in age-related macular degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17):9178.
- [6] ELSHELMANI H, BRENNAN I, KELLY D J, et al. Differential circulating microRNA expression in age-related macular degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12321.
- [7] LUO R, JIN H, LI L, et al. 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.
- [8] TONG P, PENG Q H, GU L M, et al. LncRNA-MEG3 allevi-

- ates high glucose induced inflammation and apoptosis of retina epithelial cells via regulating miR-34a/SIRT1 axis[J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 107:102-109.
- [9] AYAZ L, DINÇ E. Evaluation of microRNA responses in ARPE-19 cells against the oxidative stress[J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2018, 37(2):121-126.
- [10] DONG J, XIA R, ZHANG Z, et al. lncRNA MEG3 aggravated neuropathic pain and astrocyte overaction through mediating miR-130a-5p/CXCL12/CXCR4 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(19):23004-23019.
- [11] 朱静吟, 沈念慈. 美国眼科学会年龄相关性黄斑变性临床指南(2019)解读[J]. *老年医学与保健*, 2021, 27(1):10-14.
- [12] 苏途, 方圆, 谢平, 等. α -倒捻子素对过氧化氢诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(6):959-962.
- [13] POSTNIKOVA O A, ROGOZIN I B, SAMUEL W, et al. Volatile evolution of long non-coding RNA repertoire in retinal pigment epithelium: Insights from comparison of bovine and human RNA expression profiles[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(3):205.
- [14] SUN H J, ZHANG F F, XIAO Q, et al. lncRNA MEG3, acting as a ceRNA, modulates RPE differentiation through the miR-7-5p/Pax6 axis[J]. *Biochem Genet*, 2021, 59(6):1617-1630.
- [15] CHOUDHURY R, BAYATTI N, SCHARFF R, et al. FHL-1 interacts with human RPE cells through the $\alpha 5\beta 1$ integrin and confers protection against oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):14175.
- [16] CUI R, TIAN L, LU D, et al. Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H_2O_2 -induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling[J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(4):404-412.
- [17] 孙涛, 邓婷, 秦涛, 等. 山楂叶黄酮通过 Nrf-2/ARE 信号通路对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2021, 4(1):47-55.
- [18] KIM S Y, KAMBHAMPATI S P, BHUTTO I A, et al. Evolution of oxidative stress, inflammation and neovascularization in the choroid and retina in a subretinal lipid induced age-related macular degeneration model[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 203:108391.
- [19] 王燕, 袁远, 吕佳, 等. 杞黄颗粒对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞炎症损伤的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2021, 41(1):23-27.
- [20] DANG X, HE B, NING Q, et al. Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- κ B pathways[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1):95.
- [21] ZHANG Q, LIU J, DUAN H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. *J Adv Res*, 2021, 34:43-63.

(2023-03-22 收稿)

(本文编校:刘菲,胡欣)