

MicroRNA 在氧化应激诱导晶状体上皮细胞凋亡中作用的初步研究

柏凌¹, 李鹏², 陈凌¹, 何玲¹, 王峰¹

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 30901644)

作者单位:¹(710004)中国陕西省西安市,西安交通大学第二附属医院眼科;²(710054)中国陕西省西安市,解放军第451医院眼科

作者简介:柏凌,毕业于中山大学中山眼科中心,博士,研究方向:白内障防治、视网膜疾病的基础研究。

通讯作者:柏凌.larkling@163.com

收稿日期:2014-07-09 修回日期:2014-09-09

MicroRNA profiling on oxidative stress induced apoptosis of human lens epithelium

Ling Bai¹, Peng Li², Ling Chen¹, Ling He¹, Feng Wang¹

Foundation item: National Natural Science(Youth) Foundation of China (No. 30901644)

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China;

²Department of Ophthalmology, No. 451 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Ling Bai. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. larkling@163.com

Received: 2014-07-09 Accepted: 2014-09-09

Abstract

• AIM: To identify the changes in microRNA (miRNA) profile of human lens epithelium (HLE) induced by H₂O₂ and the role of miRNA in oxidative stress induced apoptosis.

• METHODS: HLE cell line HLE - B3 was treated by 100 μmol/L H₂O₂ for 24h and the total RNA were isolated by Trizol reagent. miRNA profile was generated by miRCURY™ LNA microRNA Array. The target genes of differentially expressed miRNAs were predicted by bioinformatics software.

• RESULTS: Twenty-eight miRNAs showed significantly differential expression after H₂O₂ treatment, 18 miRNAs upregulated and 10 miRNAs downregulated. The differentially expressed miRNAs may involve in apoptosis of lens epithelium and development of cataract through targeting BCL2L2 and MIP.

• CONCLUSION: H₂O₂ can induce dramatically changes

in miRNA profile of HLE, which may play a pivotal role in the pathogenesis and development of cataract.

• KEYWORDS: microRNA; cataract; lens epithelium; apoptosis

Citation: Bai L, Li P, Chen L, et al. MicroRNA profiling on oxidative stress induced apoptosis of human lens epithelium. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(10):1770-1772

摘要

目的:观察 H₂O₂ 处理对晶状体上皮细胞 HLE-B3 miRNA 表达谱的影响,初步明确 miRNA 在氧化损伤诱导晶状体细胞凋亡中的作用及机制。

方法:100 μmol/L H₂O₂ 处理 HLE-B3 24h 后,收集细胞用 Trizol 法提取总 RNA。使用芯片检测 miRNA 的表达,并且 qRT-PCR 对芯片结果进行验证。运用生物信息学方法预测差异 miRNA 调控的靶基因。

结果:HLE-B3 细胞经 H₂O₂ 处理后,28 个 miRNA 表达发生明显变化(18 个上调,10 个下调)。差异 miRNA 可能通过调控 BCL2L2 和 MIP 的表达,参与了晶状体细胞凋亡,进而导致了白内障的发生发展。

结论:氧化损伤能够明显改变晶状体上皮细胞的 miRNA 表达谱,此变化可能在白内障的发生发展中起调节作用。

关键词:微小 RNA;白内障;晶状体上皮细胞;细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.07

引用:柏凌,李鹏,陈凌,等. MicroRNA 在氧化应激诱导晶状体上皮细胞凋亡中作用的初步研究. 国际眼科杂志 2014; 14(10):1770-1772

0 引言

晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外所有类型白内障形成的细胞学基础,深入研究晶状体上皮细胞的凋亡机制对白内障的综合防治具有重要意义^[1]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是长度小于 22 个碱基的小分子单链 RNA,能够在转录后水平对基因表达进行调控。目前已有研究显示 miRNA 参与了白内障的发生和发展,但其具体作用尚不明确^[2-5]。为此本研究通过观察人晶状体上皮细胞在过氧化氢 (H₂O₂) 作用前后 miRNA 表达谱的变化,寻找差异 miRNA 并进行生物信息学分析,为更加全面深入地研究白内障发生的分子机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 人永生生化 HLEC 系-B3 (HLE-B3) 购自美国 ATCC; TRIzol 试剂、反转录试剂购自美国 Invitrogen 公司; miRNA 芯片购自丹麦 Exiqon 公司; MicroRNA Stem-loop 引物及反转录试剂、TaqMan[®] miRNA assay 试剂购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HLE-B3 生长于 DMEM 高糖培养基, 添加 20% FBS, 100U/mL 青霉素, 100mg/mL 链霉素, 培养于 37℃, 5% CO₂ 培养箱。

1.2.2 microRNA 芯片分析 使用 100μmol/L H₂O₂ 处理 HLE-B3 24h 后, 收集细胞用 Trizol 法提取总 RNA。选用针对 miRBase 16.0 含有 1891 个捕获探针的 miRCURY[™] LNA 芯片 (版本 16.0, 内含 4 个平行对照), 标记和杂交均按 miRCURY[™] LNA microRNA Array 标记和芯片试剂盒说明进行。处理组以 Hy5[™] 荧光染料标记, 未处理组以 Hy3[™] 荧光染料标记。芯片杂交后使用 Axon 4000 扫描仪 532nm 和 635nm 两种波长扫描, 提取 Hy3 和 Hy5 荧光信号的强度, GenePix 4.0 软件计算每个基因点在本次实验中的表达差异值, 差异 miRNA 筛选标准为 Ratio ≥ 2 为上调, Ratio ≤ 0.5 为下调。

1.2.3 qRT-PCR 验证 根据芯片分析结果, 将差异表达较明显的 microRNA 进一步行 RT-PCR 验证。提取总 RNA 后使用 MicroRNA Stem-loop 引物反转录为 cDNA, 使用 TaqMan[®] miRNA assay 试剂及 ABI 7500 real time PCR 仪检测, 循环条件: 95℃ 5min, 40 个循环 95℃ 10s, 59℃ 10s。U6 RNA 作为内参, 2^{-ΔΔCT} 方法计算其的相对表达量, 与芯片结果进行对比。

1.2.4 miRNA 靶基因预测^[6] 分别将差异 miRNA 名称代入以下三种程序: TargetScan (<http://www.targetscan.org>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) 和 miRBase Targets (<http://microrna.sanger.ac.uk>), 以靶基因 mRNA 3' UTR 区 seed region 预测可能调控的基因。

统计学分析: 统计软件采用 SPSS Statistics 19, 使用独立样本 *t* 检验进行统计学检验, 显著性检验水准为 *P* < 0.05。

2 结果

2.1 氧化应激诱发的 miRNA 表达谱差异 在芯片所包含的 1425 个已知 miRNA 中, 共有 311 个表达于 HLE-B3 细胞, 其中 28 个 miRNA 在 H₂O₂ 处理前后表达发生明显变化 (18 个上调, 10 个下调, 表 1)。

2.2 芯片结果验证 通过 TaqMan[®] microRNA Real-Time PCR 检测发现, 与未处理组相比, H₂O₂ 处理后 HLE-B3 细胞的 hsa-miR-133b 表达明显升高 (*P* < 0.05), hsa-miR-423-3p 的表达明显降低 (*P* < 0.05), 见图 1。

2.3 miRNA 靶基因预测 软件预测结果显示, 表达明显上调的 hsa-miR-133b, hsa-miR-106a 和 hsa-miR-24-1* 的靶基因均有抗凋亡蛋白 BCL2L2。

3 讨论

氧化应激是白内障发生的主要原因之一, 且多数白内障患者前房内的过氧化氢 (H₂O₂) 含量明显升高^[7]。

表 1 HLE-B3 细胞氧化应激相关 miRNA

上调		下调	
名称	比值	名称	比值
hsa-miR-133b	6.8982036	hsa-miR-3621	0.2598915
hsa-miR-3613-3p	5.9326456	hsa-miR-1275	0.2857057
hsv1-miR-H4*	5.1261815	hsa-miR-1973	0.3209949
hsa-miR-3647-3p	4.3443278	hsa-miR-365*	0.3875903
hsa-miR-767-5p	4.1563211	hsa-miR-640	0.3922497
hsa-miR-24-1*	4.108078	hsa-miR-423-3p	0.4060497
hsa-miR-4292	3.4370058	hsa-miR-937	0.4344394
hsa-miR-30c	3.4037279	hsa-miR-492	0.4565742
hsa-miR-1915	2.9938877	hsa-miR-296-5p	0.4687762
hsa-miR-101	2.8311813	hsa-miR-124*	0.4988983
hsa-miR-106a	2.8196303		
hsa-let-7f-1*	2.8094154		
hsa-miRPlus-l874*	2.7930119		
hsa-miR-4258	2.6170318		
hsa-miR-130a	2.5399964		
hsa-miR-491-3p	2.157869		
hsv1-miR-H8*	2.0251584		
hsa-miR-3182	2.0051091		

注: miRNA* 是指与相应 miRNA 编码互补的 miRNA, hsa-miR-365* 是指 pre-miRNA 加工过程中产生的 RNA 双链中间体, 其中一条产生成熟的 hsa-miR-365, 与之互补链产生的即为 hsa-miR-365*。

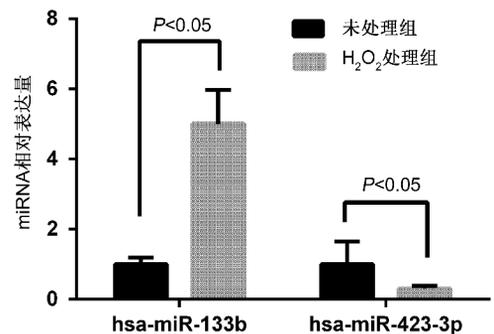


图 1 过氧化氢处理前后 miRNA 的表达变化。

Position 1524-1550 of BCL2L2 3' UTR	5' ... UUGUGCUCGCCAGAACGUGGGACCAA...
hsa-miR-133b	3' ... AUCCAGC-AACUU-C-CCUCUGUU
Position 1368-1374 of BCL2L2 3' UTR	5' ... CCAGACCUCACUGCU-GCACUUUC...
hsa-miR-106a	3' ... GAUCCAGCUGACAUCUGUGAAAA
Position 1348-1355 of BCL2L2 3' UTR	5' ... CUCCAGAUCAUGCCUCAGGCA...
hsa-miR-24	3' ... GACAAGGACGACUU-GACUCGU

图 2 靶基因预测。

H₂O₂ 对晶状体上皮细胞增殖的影响具有剂量依赖性, 低浓度的 H₂O₂ 刺激可促进晶状体上皮细胞增殖, 且以 10nmol/L 刺激增殖效应最显著。而高浓度 (100μmol/L 以上) 的 H₂O₂ 可以导致细胞毒性, 引起细胞死亡, 为此本研究选用这一浓度进行实验。

miRNA 涉及多种重要的生物学过程, 涉及发育时间和模式、造血系统分化、细胞增殖与凋亡、器官发育、肿瘤发生和其它疾病等^[8-10]。目前认为 miRNA 可能在生物体所有的生理和病理过程中都起有重要的调控作用。miRNA 表达模式的位相性和时序性的研究能够为明确 miRNA 的特定功能提供线索。本研究的结果显示氧化损伤在引起晶状体上皮细胞死亡的过程中, 使细胞 miRNA 表达谱发生了明显变化, 表明 miRNA 可能在晶状

体氧化性损伤的发生机制中具有重要作用。并且体外细胞实验与现有临床研究结果有较好的一致性,如本研究中 hsa-miR-767-5p 的表达明显升高,在人晶状体混浊时,与透明晶状体相比 hsa-miR-767-5p 亦明显升高^[5]。

生物信息学为 miRNA 的靶基因预测提供了很好的方法,相应的软件可以通过在蛋白编码基因 3' 端的非翻译区内寻找 miRNA 可以作用的靶位点来预测受 miRNA 调控的靶基因。通过软件分析发现,多个上调的 miRNA 均可能调控 BCL2L2 的表达。因此通过上调特定 miRNA 表达,抑制抗凋亡蛋白表达,进而诱导细胞凋亡可能是氧化损伤引起晶状体上皮细胞死亡的机制之一。此外,在本实验和临床研究中均呈现上调的 hsa-miR-767-5p,其预测出的靶基因中包括 MIP,而 MIP 主要表达于晶状体内并且对维持晶状体正常功能具有重要作用,因此 hsa-miR-767-5p 调节 MIP 可能也是白内障发病的重要机制之一。

虽然缺乏对通过生物信息学分析得出的 miRNA 调控靶基因的直接实验证据,但结合相关实验结果,筛选出的差异 miRNA 能够为进一步研究提供新的思路。通过对本实验中预测的靶基因和未知 miRNA 的鉴定和功能研究将有利于我们对白内障进行更加深入的研究,寻找新的治疗靶点。

参考文献

- 1 李伟华, 亢泽峰, 李凌, 等. 晶状体上皮细胞凋亡调控基因与白内障的研究. 国际眼科杂志 2010;10(1):88-89
- 2 Chien KH, Chen SJ, Liu JH, *et al.* Correlation between microRNA-34a levels and lens opacity severity in age-related cataracts. *Eye (Lond)* 2013;27(7):883-888
- 3 Dunmire JJ, Lagouros E, Bouhenni RA, *et al.* MicroRNA in aqueous humor from patients with cataract. *Exp Eye Res* 2013;108:68-71
- 4 Peng CH, Liu JH, Woung LC, *et al.* MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity. *Br J Ophthalmol* 2012;96(5):747-751
- 5 Wu C, Lin H, Wang, *et al.* Discrepant expression of microRNAs in transparent and cataractous human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3906-3912
- 6 Dweep H, Sticht C, Gretz N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics* 2013;14(2):127-136
- 7 Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981;33(6):673-681
- 8 Lee HM, Nguyen DT, Lu LF. Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Front Genet* 2014;5:178
- 9 van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* 2014;6(7):851-864
- 10 Hodzic M, Naaldijk Y, Stolzing A. Regulating aging in adult stem cells with microRNA. *Z Gerontol Geriatr* 2013;46(7):629-634