

miR-96-5p 靶向 FOXO4 对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响

李欢, 路璐

引用:李欢,路璐. miR-96-5p 靶向 FOXO4 对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响. 国际眼科杂志 2020; 20(8):1331-1338

作者单位:(054001)中国河北省邢台市,河北省眼科医院
作者简介:李欢,毕业于大连医科大学,硕士,主治医师,研究方向:眼底病基础与临床研究。
通讯作者:李欢. lhjybyp@163.com
收稿日期:2019-05-23 修回日期:2020-07-03

摘要

目的:探讨微小 RNA-96-5p(miR-96-5p)对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制。

方法:体外培养 SD 大鼠视网膜血管内皮细胞(RRVEC)进行实验,将细胞分为对照组(NG)、高糖组(HG),收集高糖诱导的细胞,分别或共同转染 miR-96-5p 模拟物(mimic)、无义 miRNA(miR-NC)、FOXO4 siRNA(si-FOXO4)、FOXO4 阴性对照序列(si-NC)、pcDNA-FOXO4、pcDNA。分别采用 qRT-PCR 与 Western blotting 检测 miR-96-5p 与 FOXO4 的表达;MTT 法检测细胞增殖活性;流式细胞仪检测细胞凋亡率;双荧光素酶报告实验验证 miR-96-5p 的靶基因;Western blotting 检测细胞中 CyclinD1、p21、p27、Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达。

结果:高糖处理后,RRVEC 中 miR-96-5p、CyclinD1、Bcl-2 表达水平均显著降低,而 FOXO4、p21、p27、Bax、cleaved-caspase-3 表达水平显著升高,抑制细胞增殖活性,促进细胞凋亡;miR-96-5p 过表达与抑制 FOXO4 表达后 CyclinD1、Bcl-2 表达水平显著升高,抑制 p21、p27、Bax、cleaved-caspase-3 表达,增强细胞增殖能力,抑制细胞凋亡;双荧光素酶报告实验证明,FOXO4 是 miR-96-5p 的靶基因;FOXO4 过表达可逆转 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的 RRVEC 增殖和凋亡的作用。

结论:miR-96-5p 通过靶向 FOXO4 以抑制高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡并促进细胞增殖。

关键词:miR-96-5p;FOXO4;高糖;视网膜血管内皮细胞;增殖;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.8.07

Effect of miR-96-5p targeting FOXO4 on proliferation and apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells induced by high glucose

Huan Li, Lu Lu

Hebei Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China

Correspondence to: Huan Li. Hebei Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China. lhjybyp@163.com
Received:2019-05-23 Accepted:2020-07-03

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of microRNA-96-5p(miR-96-5p) on proliferation and apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells induced by high glucose and to explore its mechanism.

• **METHODS:** SD rat retinal vascular endothelial cells(RRVEC) were cultured and the RRVEC was divided into control group(NG) and high glucose group(HG). The high glucose-induced RRVECs were harvested separately or co-transfected with miR-96-5p mimic, miR-NC, si-FOXO4, si-NC. The expression of miR-96-5p and FOXO4 was detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. MTT assay was used to detect the proliferation activity. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The dual luciferase reporter assay validated the target gene of miR-96-5p. Western blotting was used to detect the expression of CyclinD1, p21, p27, Bcl-2, Bax and cleaved-caspase-3.

• **RESULTS:** The expression levels of miR-96-5p, CyclinD1 and Bcl-2 in RRVEC were significantly decreased after high glucose treatment, and the expression levels of FOXO4, p21, p27, Bax and cleaved-caspase-3 were significantly increased, inhibiting cell proliferation activity, but promoting apoptosis. Overexpression of miR-96-5p and inhibition of FOXO4 expression increased the expression levels of CyclinD1 and Bcl-2, inhibited the expression of p21, p27, Bax, cleaved-caspase-3, enhanced cell proliferation and inhibited apoptosis. Dual luciferase reporter assay demonstrated that FOXO4 was a target gene for miR-96-5p. Overexpression of FOXO4 reversed the effect of miR-96-5p overexpression on high glucose-induced proliferation and apoptosis of RRVEC.

• **CONCLUSION:** miR-96-5p inhibits high glucose-induced apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells and promotes cell proliferation by targeting FOXO4.

• **KEYWORDS:** miR-96-5p; FOXO4; high glucose; retinal vascular endothelial cells; proliferation; apoptosis

Citation: Li H, Lu L. Effect of miR-96-5p targeting FOXO4 on proliferation and apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells induced by high glucose. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(8):1331-1338

0 引言

糖尿病视网膜病变是糖尿病并发症中最严重的一种微血管病变,严重时可导致失明并降低患者生活质量,其

发病机制尚未完全阐明,既往研究显示血糖持续性升高是诱导患者视网膜病变的主要原因之一^[1]。因此深入探究糖尿病视网膜病变发病机制可为临床预防糖尿病患者发生视网膜病变提供理论指导。研究表明,微小RNA-96-5p(miRNA-96-5p,miR-96-5p)在2型糖尿病患者外周血中表达下调^[2]。miR-96在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠心肌组织中表达下调并可能参与心肌细胞增殖及凋亡过程^[3]。相关研究表明过表达miR-96可抑制宫颈癌细胞的增殖,促进细胞凋亡^[4]。但miR-96-5p在糖尿病视网膜病变过程中的表达变化及其可能作用机制尚未见报道。靶基因预测软件得到叉头框转录因子O4(forkhead box O4,FOXO4)可能是miR-96-5p的靶基因,研究表明FOXO4在糖尿病视网膜膜中高表达, α -黑色素细胞刺激激素在抗视网膜内皮细胞氧化应激过程中表达下调^[5-6]。高糖处理后的视网膜血管内皮细胞中FOXO4表达上调^[7]。但miR-96-5p在高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞中的表达及其对大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响,且miR-96-5p是否通过调控FOXO4的表达影响大鼠视网膜血管内皮细胞的增殖和凋亡目前还尚未可知。因此,本研究通过体外培养SD大鼠视网膜血管内皮细胞(RRVEC)并构建高糖模型,观察高糖诱导的RRVEC中miR-96-5p与FOXO4表达变化及其对RRVEC增殖、凋亡的影响,为早期防治糖尿病视网膜病变研究提供理论基础,以期临床治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD雄性大鼠10只,体质量200~220g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号:SCXK(济)2012-0003。本研究经伦理委员会审批通过。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白酶、Lipofectamine 2000均购自美国Invitrogen公司;MTT试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、RNA提取及反转录试剂盒购自美国Sigma公司;细胞培养基、IgG二抗均购自武汉博士德生物有限公司;GAPDH抗体购自杭州贤至生物有限公司;兔抗鼠B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关x蛋白(Bax)、cleaved-caspase-3抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗鼠FOXO4、CyclinD1、p21、p27抗体购自美国Santa Cruz公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;miR-96-5p模拟物(mimic)、无义miRNA(miR-NC)、FOXO4 siRNA(si-FOXO4)、FOXO4阴性对照序列(si-NC)均购自广州锐博生物科技有限公司;pcDNA 3.1购自上海索宝生物科技有限公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自江苏依莱萨生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 ABI 7500型荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;Multiskan Sky酶标仪购自美国赛默飞公司;CytoFLEX流式细胞仪购自美国贝克曼公司。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠视网膜血管内皮细胞培养与鉴定 参照文献进行RRVEC分离培养^[8]。麻醉大鼠后用脱颈法处死大鼠,消毒后摘除大鼠眼球,用乙醇浸泡30s后使用预冷的PBS缓冲液冲洗3次,剪切视网膜组织并剪碎,放入培养液内,I型胶原酶消化视网膜组织,30min后收集消化液,用100 μ m的网孔过滤消化液,经1500r/min转速离

心5min(离心半径13cm),弃上清,向沉淀物中加入DMEM培养基(肝素钠、胎牛血清),细胞接种至24孔板,置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养,每隔2d更换1次培养液,RRVEC稳定传代4代后接种于盖玻片上(密度为 1×10^4 个/mL),继续培养24h,细胞贴壁生长后取出盖玻片,采用免疫荧光染色法鉴定细胞,并置于荧光显微镜下观察,分离的细胞均呈铺路石样单层贴壁生长,Cy3(红色荧光)阳性表达。

1.2.2 细胞转染与分组收集 生长状态良好的RRVEC,将其分为对照组(NG):葡萄糖浓度5.5mmol/L处理;高糖组(HG):葡萄糖浓度30mmol/L处理^[9]。分别采用miR-96-5p mimic、miR-NC、si-FOXO4、si-NC转染高糖诱导的RRVEC,分为HG+miR-96-5p组、HG+miR-NC组、HG+si-FOXO4组、HG+si-NC组。通过转染miR-96-5p mimic后再转染pcDNA-FOXO4验证miR-96-5p过表达是否通过抑制FOXO4表达进而促进高糖诱导的RRVEC增殖并抑制细胞凋亡,将细胞分为HG+miR-96-5p+pcDNA组、HG+miR-96-5p+pcDNA-FOXO4组。细胞转染后放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱内培养,6h后更换为含有10%胎牛血清的新鲜培养基,继续培养48h后收集对数生长期细胞进行后续研究。

1.2.3 qRT-PCR检测细胞中miR-96-5p和FOXO4 mRNA表达水平 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测miR-96-5p、FOXO4 mRNA表达,分别设计miR-96-5p、FOXO4基因引物并由上海生物工程股份有限公司设计合成(表1)。用Trizol、酚/氯仿提取总RNA进行qRT-PCR反应,配置反应体系20 μ L:SYBR Premix Ex Taq II(2 \times)10 μ L,cDNA 2 μ L,上下游引物各0.8 μ L,ROX Reference Dye(50 \times)0.4 μ L,ddH₂O 6 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min循环1次,95 $^{\circ}$ C变性30s,60 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共40个循环。收集各样本Ct值并采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算miR-96-5p、FOXO4 mRNA相对表达量。

1.2.4 Western blotting检测相关蛋白表达 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)检测FOXO4、CyclinD1、p21、p27、Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达。取对数生长期RRVEC进行实验处理后,预冷PBS洗涤2次,弃上清液,加入蛋白裂解液,孵育20min(冰上进行),取细胞裂解液经转速13000r/min离心20min,取上清并根据BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度,20 μ g蛋白样品加入上样缓冲液,经10% SDS-PAGE电泳反应后用PVDF膜转膜分离蛋白,5%脱脂奶粉封闭1h,4 $^{\circ}$ C条件下加入各蛋白一抗孵育过夜,次日用TBST清洗3次 \times 10min,室温条件下加入二抗孵育40min,TBST清洗3次 \times 10min,滴加ECL发光液,置于成像系统观察并用Image-Pro Plus软件分析蛋白条带灰度值,各蛋白相对表达量为目的蛋白条带灰度值与GAPDH条带灰度值的比值。

1.2.5 MTT检测细胞增殖 收集细胞RRVEC,预冷PBS洗涤,用0.1%胰蛋白酶消化后加入培养液重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,根据实验分组将细胞接种于96孔板(1%明胶包被),置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养48h,根据分组条件处理结束前4h分别在每孔中加入20 μ L MTT试剂(5g/L),放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱继续培养4h弃培养液,加入DMSO(150 μ L/孔),室温振荡10min后选取570nm

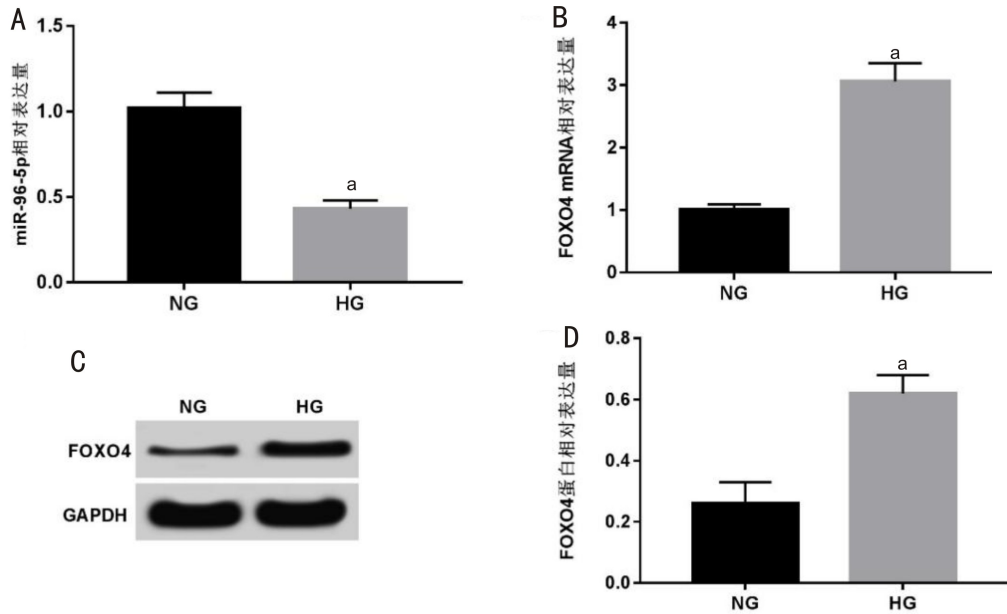


图1 高糖处理对RRVEC中miR-96-5p和FOXO4表达的影响 A:高糖处理对miR-96-5p表达的影响;B:高糖处理对FOXO4 mRNA表达的影响;C、D:高糖处理对FOXO4蛋白表达的影响。^a*P*<0.05 vs NG。

表1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
miR-96-5p	ATCAACTCTATCAAGAACTGCC	GACCATCATCACCAGATAATTGT
FOXO4	GGTGCTAAGCAGGCCTCATCTC	AATGGCGTGGGATTCACAAAG
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG
GAPDH	AACGGATTTGCTCGTATTG	GGAAGATGGTGATGGGATT

波长的酶标仪检测各孔吸光度值(OD_{570nm}),实验均设置3次重复。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 采用流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡情况。取对数生长期 RRVEC 进行实验处理后,收集各组细胞,0.25%胰蛋白酶消化,用 PBS 清洗后经 1000r/min 离心 10min 收集细胞,分别加入 500μL Binding Buffer,加入 5μL Annexin V-FITC 充分混匀 10min 后加入 5μL PI 孵育 5min,利用流式细胞仪检测各组细胞荧光强度并计算细胞凋亡率。实验设置 3 次重复。

1.2.7 双荧光素酶报告实验 通过靶基因预测软件确定 miR-96-5p 与 FOXO4 具有连续性结合靶点,分别设计含有 miR-96-5p 结合位点的 FOXO4 3'UTR 野生型荧光素酶报告基因载体 (WT-FOXO4),并设计 FOXO4 3'UTR 突变后的突变型荧光素酶报告基因载体 (MUT-FOXO4),将 WT-FOXO4、MUT-FOXO4 分别与 miR-96-5p mimic 或 miR-NC 共转染 RRVEC,置于 37℃ 恒温培养箱继续培养 48h 后收集细胞并使用荧光素酶活性检测试剂盒检测 RRVEC 的相对荧光素酶活性。

统计学分析:采用 SPSS 21.0 统计软件分析实验数据。Shapiro-Wilk 检验数据均符合正态分布,经 Levene 检验方差齐性,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,若差异具有统计学意义,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖处理对 RRVEC 中 miR-96-5p 和 FOXO4 表达的影响 qRT-PCR 与 Western blotting 分别检测高糖处理

后 RRVEC 中 miR-96-5p 和 FOXO4 表达变化,结果显示,相较于 NG 组,HG 组细胞中 miR-96-5p 表达水平显著降低(*t*=17.191,*P*<0.05),而 FOXO4 mRNA(*t*=20.443,*P*<0.05)和蛋白(*t*=11.714,*P*<0.05)表达水平均显著升高,见图 1。

2.2 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的 RRVEC 增殖的影响 采用 miR-96-5p mimic 转染高糖诱导的 RRVEC, qRT-PCR 检测结果显示(图 2A),HG+miR-96-5p 组细胞 miR-96-5p 表达水平较 HG+miR-NC 组明显升高(*t*=15.363,*P*<0.05),表明成功提高高糖诱导的 RRVEC 中 miR-96-5p 表达水平。MTT 检测高糖诱导的 RRVEC 转染 miR-96-5p mimic 48h 后细胞增殖能力变化,结果显示(图 2B),HG 组细胞增殖活性显著低于 NG 组(*t*=15.757,*P*<0.05);HG+miR-96-5p 组细胞增殖活性显著高于 HG+miR-NC 组(*t*=13.377,*P*<0.05),表明上调 miR-96-5p 表达可明显促进高糖诱导的细胞增殖。Western blotting 进一步检测细胞增殖相关蛋白表达,结果显示(图 2C、2D),与 NG 组相比,HG 组细胞中 CyclinD1 蛋白表达显著降低(*t*=18.783,*P*<0.05),而 p21、p27 蛋白表达水平显著升高(*t*=16.100、15.757,均 *P*<0.05);与 HG+miR-NC 组相比,HG+miR-96-5p 组细胞中 CyclinD1 蛋白表达水平显著升高(*t*=19.498,*P*<0.05),而 p21、p27 蛋白表达水平显著降低(*t*=13.587、9.603,均 *P*<0.05),表明 miR-96-5p 过表达可能通过抑制 p21、p27 蛋白表达促进 CyclinD1 蛋白表达,进而促进细胞增殖。

2.3 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的 RRVEC 凋亡的影响 流式细胞术检测 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的 RRVEC 凋亡的影响,结果显示(图 3A、3C),高糖处理后细

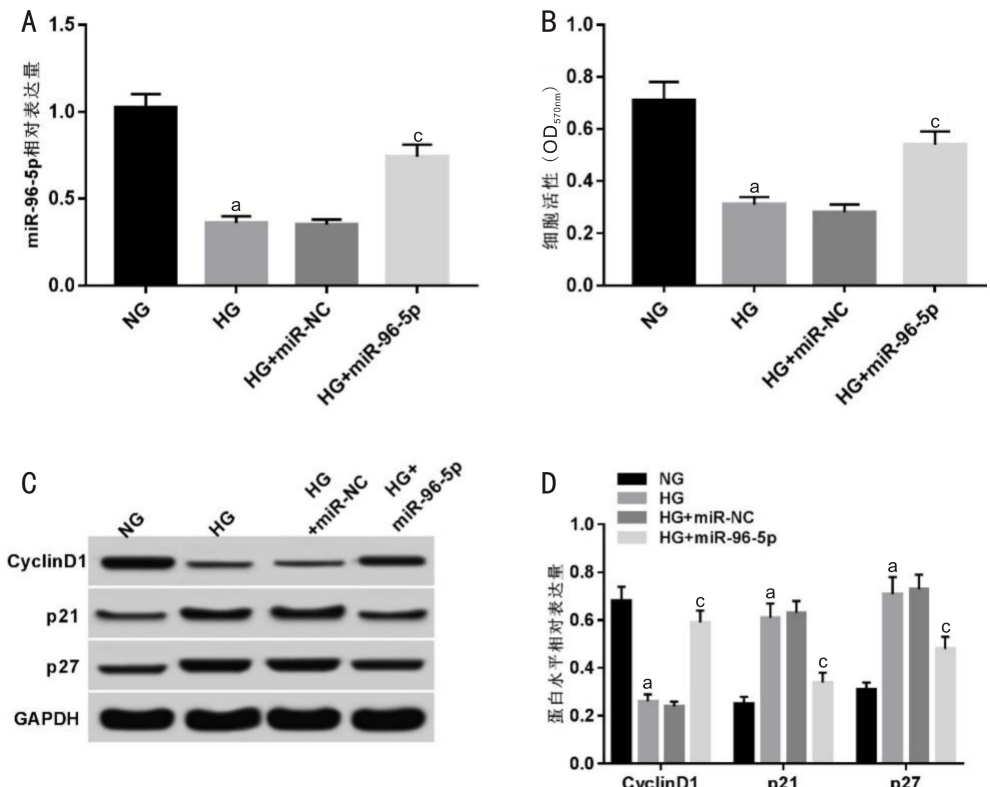


图2 miR-96-5p过表达对高糖诱导的RRVEC增殖的影响 A:miR-96-5p相对表达量($F=273.804, P<0.001$);B:miR-96-5p过表达对高糖诱导的RRVEC增殖的影响($F=161.478, P<0.001$);C、D:miR-96-5p过表达对高糖诱导的细胞增殖相关蛋白表达的影响($F=247.257、154.281、121.286$,均 $P<0.001$)。* $P<0.05$ vs NG;° $P<0.05$ vs HG+miR-NC。

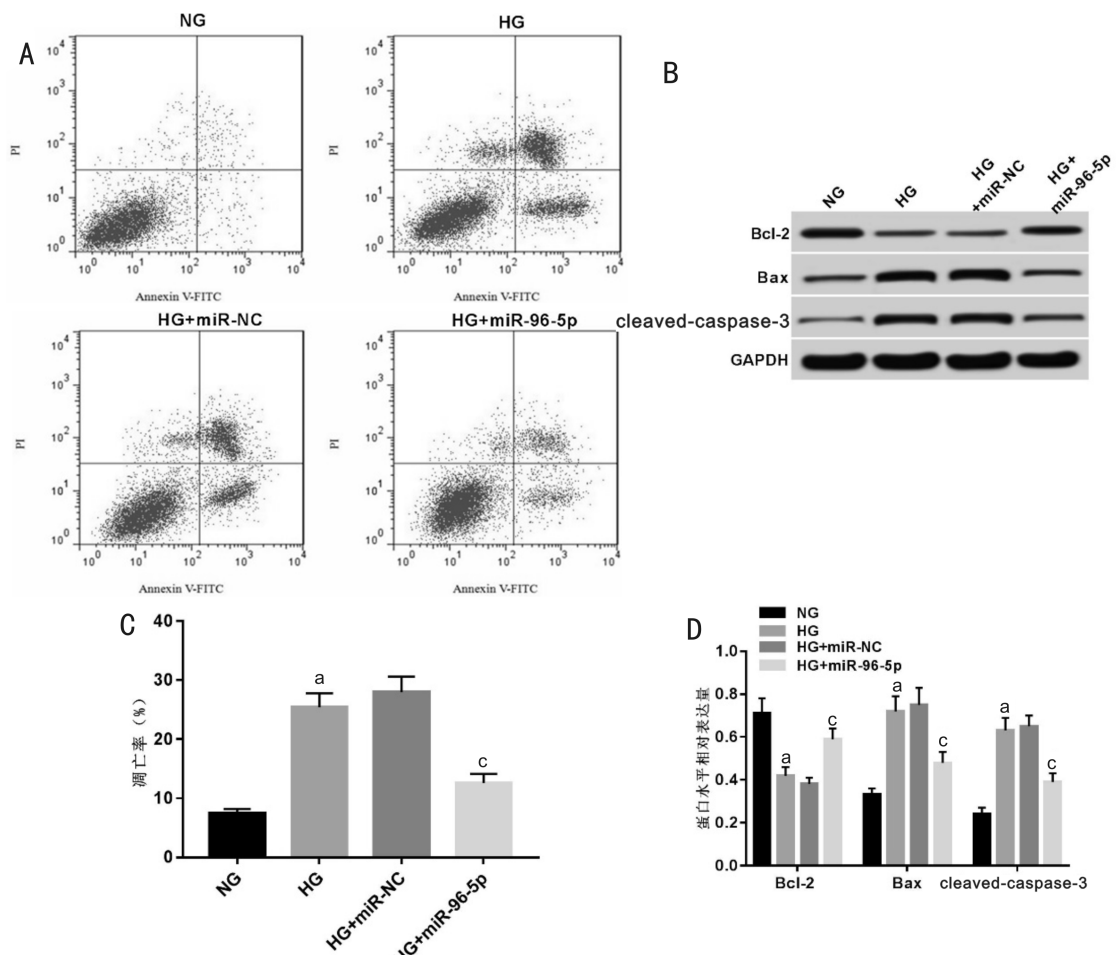


图3 miR-96-5p过表达对高糖诱导的RRVEC凋亡的影响 A:细胞凋亡流式图;B:凋亡相关蛋白表达检测条带;C:miR-96-5p过表达对高糖诱导的细胞凋亡率的影响($F=227.640, P<0.001$);D:miR-96-5p过表达对高糖诱导的细胞凋亡相关蛋白表达的影响($F=85.455、98.449、163.360$,均 $P<0.001$)。* $P<0.05$ vs NG;° $P<0.05$ vs HG+miR-NC。

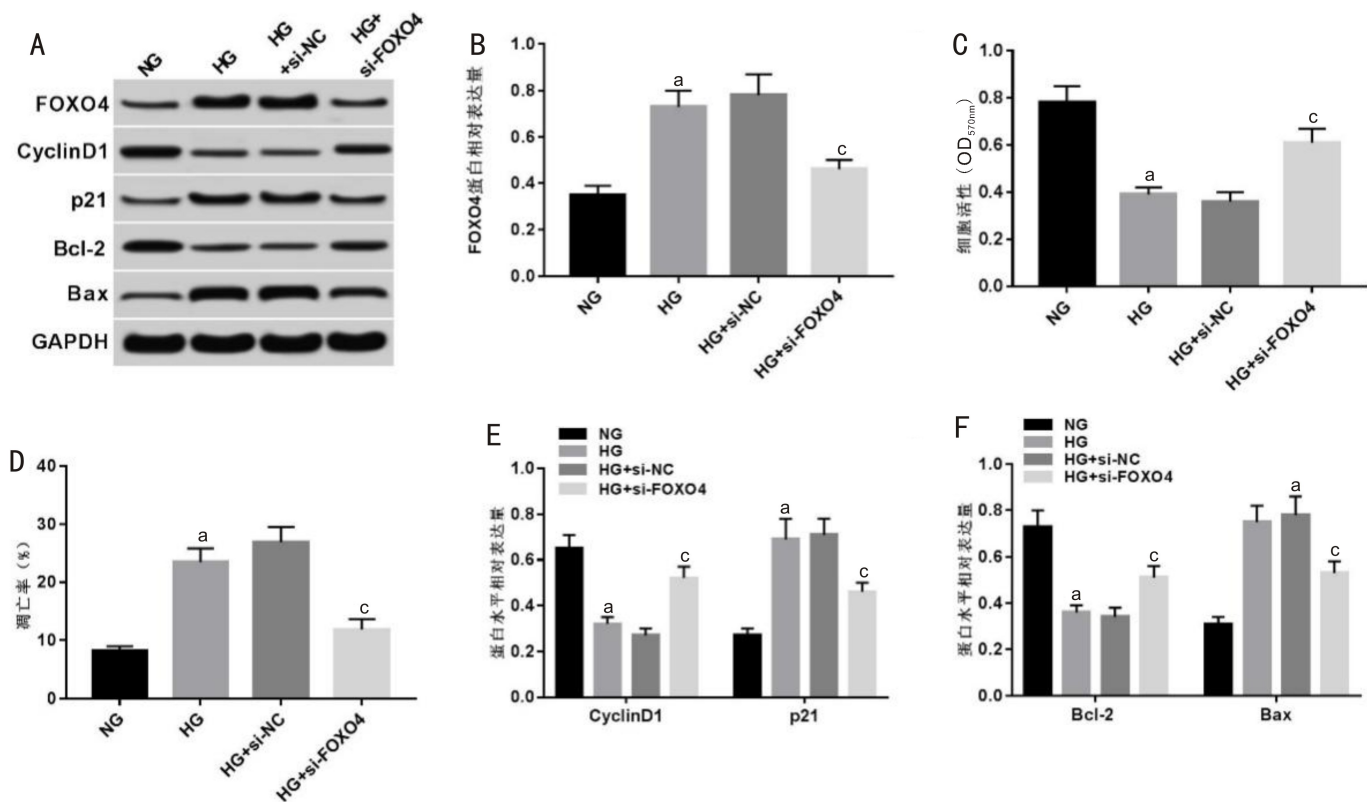


图4 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的 RRVEC 增殖和凋亡的影响 A: 蛋白表达检测条带; B: FOXO4 蛋白相对表达量 ($F=96.148, P<0.001$); C: 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的细胞增殖的影响 ($F=127.964, P<0.001$); D: 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的细胞凋亡的影响 ($F=178.801, P<0.001$); E: 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的细胞增殖相关蛋白表达的影响 ($F=142.481, 198.190, 均 P<0.001$); F: 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($F=117.939, 117.286, 均 P<0.001$)。^a $P<0.05$ vs NG; ^c $P<0.05$ vs HG+si-NC。

胞凋亡率显著高于 NG 组 ($t=31.778, P<0.05$), 而转染 miR-96-5p mimic (HG+miR-96-5p 组) 后细胞凋亡率较 HG+miR-NC 组明显降低 ($t=15.078, P<0.05$), 表明高糖诱导可促进 RRVEC 凋亡, 上调 miR-96-5p 表达可抑制高糖诱导的 RRVEC 凋亡。Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白表达, 结果显示 (图 3B、3D), HG 组细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著低于 NG 组 ($t=10.791, P<0.05$), 而 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平均显著高于 NG 组 ($t=15.363, 17.441, 均 P<0.05$); HG+miR-96-5p 组细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 HG+miR-NC 组 ($t=10.804, P<0.05$), 而 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平均显著降低 ($t=8.586, 12.182, P<0.05$), 表明 miR-96-5p 过表达可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达而下调 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达, 进而抑制高糖诱导的细胞凋亡。

2.4 抑制 FOXO4 表达对高糖诱导的 RRVEC 增殖和凋亡的影响 为探究 FOXO4 表达变化对高糖诱导的 RRVEC 增殖和凋亡的影响, 采用 si-FOXO4 转染高糖诱导的 RRVEC, Western blotting 检测结果显示 (图 4A、4B), HG+si-FOXO4 组细胞 FOXO4 蛋白表达显著低于 HG+si-NC 组 ($t=9.747, P<0.05$), 提示细胞转染成功。MTT 检测结果显示 (图 4C), 与 HG+si-NC 组相比, HG+si-FOXO4 组细胞增殖活性明显升高 ($t=11.180, P<0.05$)。流式细胞仪检测结果显示 (图 4D), 与 HG+si-NC 组相比, HG+si-FOXO4 组细胞凋亡率显著降低 ($t=14.276, P<0.05$)。Western blotting 检测结果显示 (图 4A、4E、4F), 与 HG+si-NC 组相比, HG+si-FOXO4 组细胞 CyclinD1、Bcl-2 表达水平显著升高 ($t=12.862, 7.965, 均 P<0.05$), 而 p21、Bax 表

达水平均显著降低 ($t=9.303, 7.950, 均 P<0.05$)。上述结果表明, 抑制 FOXO4 表达可促进高糖诱导的细胞增殖并抑制细胞凋亡。

2.5 miR-96-5p 靶向调控 FOXO4 的表达 双荧光素酶报告实验显示 (图 5A、5B), RRVEC 中 miR-96-5p mimic 能够显著抑制 WT-FOXO4 报告载体的荧光素酶活性 ($t=17.192, P<0.05$), miR-96-5p 与 FOXO4 结合位点突变后, miR-96-5p mimic 对 MUT-FOXO4 报告基因载体的荧光素酶活性无明显影响 ($P>0.05$), 表明 miR-96-5p 能够直接靶向 RRVEC 中 FOXO4 的 3'UTR 进而抑制其表达。进一步采用 Western blotting 法检测 miR-96-5p 过表达或抑制 miR-96-5p 表达后 FOXO4 蛋白表达变化, 结果显示 (图 5C、5D), 与 miR-NC 组相比, 转染 miR-96-5p mimic 的 RRVEC 中 FOXO4 蛋白表达水平受到明显抑制 ($t=13.800, P<0.05$), 而转染 anti-miR-96-5p 的 RRVEC 中 FOXO4 蛋白表达水平较 anti-miR-NC 组明显升高 ($t=18.120, P<0.05$), 表明 miR-96-5p 可直接靶向调节 FOXO4 表达水平。

2.6 FOXO4 过表达逆转 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的 RRVEC 增殖和凋亡的作用 转染 miR-96-5p mimic 后再转染 pcDNA-FOXO4 以此验证 miR-96-5p 过表达是否通过抑制 FOXO4 表达进而促进高糖诱导的 RRVEC 增殖并抑制细胞凋亡。Western blotting 检测结果显示 (图 6A、6B), 转染 miR-96-5p mimic 后再采用 pcDNA-FOXO4 转染高糖诱导的 RRVEC (HG+miR-96-5p+pcDNA-FOXO4 组), 细胞中 FOXO4 表达水平显著高于 HG+miR-96-5p+pcDNA 组 ($t=15.949, P<0.05$), 表明细胞转染成

功。进一步检测 RRVEC 增殖及凋亡变化情况,结果显示,与 HG+miR-96-5p+pcDNA 组比较,HG+miR-96-5p+pcDNA-FOXO4 组细胞增殖活性明显降低($t=9.675, P<0.05$,图 6C),细胞凋亡率明显增加($t=8.937, P<0.05$,图 6D),p21、Bax 蛋白表达升高($t=11.833、8.737$,均 $P<0.05$,图 6E、6F),CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达降低($t=9.985、7.904$,均 $P<0.05$,图 6E、6F),表明 FOXO4 过表达可逆转 miR-96-5p 过表达对高糖诱导的细胞增殖和凋亡的作用。

3 讨论

糖尿病视网膜病变发生后血管内皮细胞会暴露在血浆中并极易受到高血糖刺激而发生损伤,随后破坏视网膜屏障,高糖持续刺激情况下可抑制视网膜血管内皮细胞增殖,还可能通过促进细胞凋亡进而促使内皮细胞损伤^[10-11]。研究表明,miRNA 表达异常可通过调节相关信号通路进而影响糖尿病视网膜病变大鼠视网膜血管内皮细胞增殖与凋亡^[12]。目前关于 miRNA 与糖尿病视网膜病变发生机制的研究相对较少,因此积极寻找新型 miRNA 与糖尿病视网膜病变发生及发展的关系对临床预防及治疗均具有重要意义。

研究发现,miR-96-5p 表达异常可能参与人类滋养层细胞的自噬和迁移损伤过程^[13]。长非编码 RNA CASC2 通过调节 miR-96-5p/SYVN1 途径进而抑制乳腺癌细胞生长和转移^[14]。miR-96-5p 通过靶向 caspase-9 基因进而调控肝癌细胞凋亡^[15]。本研究结果显示,高糖处理后 RRVEC 中 miR-96-5p 表达水平显著降低,高糖诱导的 RRVEC 转染 miR-96-5p mimic 而上调其表达水平,结果发现高糖诱导后细胞增殖能力明显降低,而转染 miR-96-5p mimic 后细胞增殖能力明显增强,进一步研究显示,转染 miR-96-5p mimic 后高糖诱导的 RRVEC 中 CyclinD1 蛋白表达水平显著增高,而 p21、p27 蛋白表达水平显著降低。另有研究表明,CyclinD1 可正向调控细胞周期,p21、p27 可负向调控细胞周期,p21、p27 表达水平升高可抑制 CyclinD1 对细胞周期的调控作用^[16-17]。说明上调 miR-96-5p 表达可通过上调 CyclinD1 的表达及下调 p21、p27 的表达进而促进 RRVEC 增殖。同时本研究结果发现,高糖诱导后 RRVEC 凋亡率明显增加,miR-96-5p 过表达可降低细胞凋亡率,通过检测细胞凋亡蛋白表达,结果发现,miR-96-5p 过表达 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高,而 Bax 蛋白表达水平明显降低。相关研究结果表明,通过抑制高糖诱导的血管内皮细胞中 Bax、cleaved-caspase-3 的表达,增强 Bcl-2 的表达能够抑制血管内皮细胞凋亡,最终达到治疗糖尿病血管病变的目的^[18]。说明上调高糖诱导的 RRVEC 中 miR-96-5p 表达可通过促进 Bcl-2 表达及抑制 Bax、cleaved-caspase-3 表达,进而抑制细胞凋亡。提示 miR-96-5p 过表达可通过影响细胞增殖及凋亡蛋白表达进而影响高糖诱导的细胞增殖及凋亡,由此推测 miR-96-5p 上调表达可能作为临床早期诊断及防治糖尿病视网膜病变的重要分子标志物。

FOXO4 可能通过调控胰岛素等参与糖尿病并发症的发生及发展过程^[19-20]。糖尿病条件下沉默 FOXO4 表达可保护内皮细胞,并可参与内皮组织损伤等过程,同时胰岛素及靶器官中营养物质等均可影响 FOXO4 表达^[21]。相关研究表明,糖尿病视网膜病变组织中 FOXO4 表达水平明显升高并可能调控血管内皮细胞损伤发生过程^[22]。

本研究结果显示,高糖诱导后 RRVEC 中 FOXO4 表达水平明显升高,通过转染 si-FOXO4 后发现 RRVEC 增殖活性明显增强,细胞凋亡率明显下降,促进 CyclinD1、Bcl-2 的表达,抑制 p21、Bax 的表达,说明抑制 FOXO4 表达可通过上调 CyclinD1、Bcl-2 的表达及下调 p21、Bax 的表达进而促进高糖诱导的细胞增殖并抑制细胞凋亡。本研究通过双荧光素酶报告基因实验验证 FOXO4 是 miR-96-5p 的靶基因,miR-96-5p 可负向调控 FOXO4 表达。为验证 miR-96-5p 是否通过抑制 FOXO4 表达进而对高糖诱导的 RRVEC 增殖及凋亡产生影响,结果发现高糖诱导的 RRVEC 共转染 miR-96-5p mimic 与 pcDNA-FOXO4 后细胞增殖活性明显降低,细胞凋亡率明显增加,CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,而 p21、Bax 蛋白表达水平明显升高,说明 miR-96-5p 过表达可通过下调 FOXO4 表达进而促进高糖诱导的细胞增殖并抑制细胞凋亡。提示 miR-96-5p 过表达能够抑制高糖诱导的 RRVEC 凋亡并促进细胞增殖。

综上所述,miR-96-5p 在高糖诱导的 RRVEC 中呈低表达,FOXO4 表达水平升高,上调 miR-96-5p 表达可促进高糖诱导的细胞增殖以及抑制细胞凋亡的发生,其作用机制可能是通过抑制靶基因 FOXO4 表达,上调下游 CyclinD1、Bcl-2 表达,下调 p21、p27、Bax、cleaved-caspase-3 表达,提示上调 miR-96-5p 表达可通过抑制 FOXO4 表达进而影响细胞增殖及凋亡蛋白表达而保护视网膜血管内皮细胞,可为临床防治糖尿病视网膜病变提供理论依据。但关于 miR-96-5p 表达变化及其对下游相关信号通路的影响均需进行分子生物学研究证实。

参考文献

- 1 乔园,段惠惠,黄建梅,等.三七总皂苷对高糖诱导大鼠视网膜血管内皮细胞损伤的保护作用.北京中医药大学学报 2015; 38(5): 318-322
- 2 郭宜晨,鲁亚静,钟伟传,等.2型糖尿病患者外周血 miRNA 表达谱差异研究.现代检验医学杂志 2018; 33(6): 5-8
- 3 张羽飞,王学勇,李厚忠,等.链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠心肌组织中 microRNA 的表达.中国糖尿病杂志 2014; 22(3): 255-258
- 4 赵靓,夏春军,吴堂兵,等.微小 RNA-96 对宫颈癌细胞 HeLa 增殖凋亡及 Spindlin1 表达的影响.临床肿瘤学杂志 2017; 22(10): 10-14
- 5 张丽娟.α-MSH 对糖尿病视网膜血管内皮细胞保护作用的机制研究.天津医科大学 2014
- 6 魏晓伟,马晓伟,郭晓惠. FoxO₄ 与糖尿病及其并发症的研究进展.中国糖尿病杂志 2014; 22(3): 276-279
- 7 陆骏,秦瑜,肖文玮,等. FOXO4 对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响.国际眼科杂志 2018; 18(12): 2146-2150
- 8 黄江,李翊,肖建江,等.姜黄素对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞凋亡的影响.中华眼底病杂志 2017; 33(5): 513-517
- 9 曾凯宏,王元,邓波,等.白藜芦醇调节微小 RNA-29b 表达抑制高糖诱导的大鼠视网膜 muller 细胞凋亡.实用医院临床杂志 2017; 14(4): 22-26
- 10 Sun J, Xu Y, Sun S, et al. Intermittent high glucose enhances cell proliferation and VEGF expression in retinal endothelial cells; the role of mitochondrial reactive oxygen species. Mol Cell Biochem 2010; 343(1-2): 27-35
- 11 Zhang J, Zeng Y, Chen J, et al. miR-29a/b cluster suppresses high glucose-induced endothelial-mesenchymal transition in human retinal microvascular endothelial cells by targeting Notch2. Exp Ther Med 2019; 17(4): 3108-3116
- 12 Liu TT, Hao Q, Zhang Y, et al. Effects of microRNA-133b on retinal

vascular endothelial cell proliferation and apoptosis through angiotensinogen-mediated angiotensin II-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling pathway in rats with diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2018; 96(5): 626-635

13 Mao Z, Yao M, Li Y, *et al.* miR-96-5p and miR-101-3p as potential intervention targets to rescue TiO₂ NP-induced autophagy and migration impairment of human trophoblastic cells. *Biomater Sci* 2018; 6(12): 3273-3283

14 Gao Z, Wang H, Li H, *et al.* Long non-coding RNA CASC2 inhibits breast cancer cell growth and metastasis through the regulation of the miR-96-5p/SYVN1 pathway. *Int J Oncol* 2018; 53(5): 2081-2090

15 Iwai N, Yasui K, Tomie A, *et al.* Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2018; 53(1): 237-245

16 张振, 李静, 苏万江, 等. 胰升血糖素样肽-1改善波动性高糖诱导大鼠胰岛细胞增殖功能机制的研究. *中国糖尿病杂志* 2014; 22(12): 1124-1127

17 裴星, 韩勇, 张占华, 等. 芥子酸对高糖诱导下大鼠血管平滑肌

细胞增殖和凋亡的影响. *中国病理生理杂志* 2016; 32(7): 1174-1179

18 张贝贝, 刘文洪, 李俊峰, 等. 铁皮石斛多糖对高糖诱导的血管内皮细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响. *中国药理学通报* 2015; 31(1): 64-70

19 Saian M, Hansen B, Iev R 3rd, *et al.* Brain Insulin Signaling Is Increased in Insulin-Resistant States and Decreases in FOXOs and PGC-1 α and Increases in A β 1-40/42 and Phospho-Tau May Abet Alzheimer Development. *Diabetes* 2016; 65(7): 1892-1903

20 Chuang PY, Yu Q, Fang W, *et al.* Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int* 2007; 72(8): 965-976

21 Dansen TB, Smits LM, Van Triest MH, *et al.* Redox-sensitive cysteines bridge p300/CBP-mediated acetylation and FoxO4 activity. *Nat Chem Biol* 2009; 5(9): 664-672

22 Ding M, Xie Y, Wagner RJ, *et al.* Adiponectin Induces Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation via repression of mTORC1 and FoxO4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(6): 1403-1410