

# miR-221 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡的作用机制

路璐, 李欢

引用:路璐, 李欢. miR-221 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡的作用机制. 国际眼科杂志 2020;20(9):1509-1513

作者单位:(054001)中国河北省邢台市,河北省眼科医院  
作者简介:路璐,毕业于河北联合大学,硕士,住院医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:路璐. 13603193557@163.com

收稿日期:2019-05-23 修回日期:2020-07-22

Correspondence to:Lu Lu. Hebei Provincial Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China. 13603193557@163.com

Received:2019-05-23 Accepted:2020-07-22

## Abstract

• AIM: To study the effect of miR-221 on apoptosis of high glucose-induced human retinal vascular endothelial cells and to explore its mechanism.

• METHODS: High-glucose-induced HRCECs were established by treatment of HRCECs cells with glucose at 30mmol/L for 48h; HG+miR-NC group (transfected miR-NC), HG+miR-221 group (transfected miR-221 mimics), HG+anti-miR-NC group (transfected anti-miR-NC), HG+anti-miR-221 group (transfected anti-miR-221), HG+miR-221+pcDNA 3.1 group (co-transfected miR-221 mimics and pcDNA 3.1), HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2 group (co-transfected miR-221 mimics and pcDNA 3.1-MDM2), transfected into HRCECs cells by liposome method, and then treated with high glucose; qRT-PCR method for detection the expression of miR-221, p53 and MDM2; the protein expression of p53 and MDM2 were detected by Western blot. The apoptosis of cells was detected by flow cytometry.

• RESULTS: Compared with NG group, the expression of miR-221 and p53 was significantly increased, the expression of MDM2 was significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased in high glucose-induced HRCECs. Overexpression of miR-221 induced apoptosis of high glucose-induced HRCECs cells is more obvious. Inhibition of miR-221 can down-regulate the apoptosis of high glucose-induced HRCECs and down-regulate p53, up-regulate MDM2; overexpression of MDM2 can reverse the inhibition by miR-221 anti-apoptotic effect of cells and regulation of p53 and MDM2 of high-glucose-induced HRCECs.

• CONCLUSION: miR-221 can promote the apoptosis of high-glucose-induced human retinal vascular endothelial cells, and its mechanism is related to p53/MDM2 signaling pathway.

• KEYWORDS: miR-221; p53/MDM2 signaling pathway; apoptosis; diabetic retinopathy

## 摘要

目的:研究 miR-221 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞(HRCECs)凋亡的影响,并探讨其作用机制。

方法:用葡萄糖 30mmol/L 处理 HRCECs 48h 建立高糖诱导的 HRCECs 细胞;将 HG+miR-NC 组(转染 miR-NC)、HG+miR-221 组(转染 miR-221 mimics)、HG+anti-miR-NC 组(转染 anti-miR-NC)、HG+anti-miR-221 组(转染 anti-miR-221)、HG+miR-221+pcDNA 3.1 组(共转染 miR-221 mimics 和 pcDNA 3.1)、HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2 组(共转染 miR-221 mimics 和 pcDNA 3.1-MDM2),用脂质体法转染至 HRCECs 细胞,再进行高糖处理;qRT-PCR 法检测细胞中 miR-221、p53、MDM2 的表达;Western blot 检测细胞中 p53、MDM2 的蛋白表达;流式细胞术检测细胞的凋亡。

结果:与 NG 组相比,高糖诱导的 HRCECs 细胞中 miR-221、p53 的表达显著升高,MDM2 的表达显著降低,细胞凋亡率显著升高;过表达 miR-221 可使高糖诱导的 HRCECs 细胞的凋亡率升高更明显,抑制 miR-221 可下调高糖诱导的 HRCECs 细胞的凋亡并下调 p53,上调 MDM2;过表达 MDM2 则可逆转抑制 miR-221 对高糖诱导的 HRCECs 细胞的抗凋亡作用及对 p53、MDM2 的调控。

结论:miR-221 可促进高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡,其机制与 p53/MDM2 信号通路有关。

关键词:miR-221; p53/MDM2 信号通路;凋亡;糖尿病视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.08

## Molecular mechanism of miR-221 promoting apoptosis of human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose by regulating p53/MDM2 signaling pathway

Lu Lu, Huan Li

Hebei Provincial Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China

Citation:Lu L, Li H. Molecular mechanism of miR-221 promoting apoptosis of human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose by regulating p53/MDM2 signaling pathway. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(9):1509-1513

## 0 引言

miRNA 为短链的非编码内源性保守的微小 RNA 分子,其通过抑制靶基因的转录或翻译过程及调控信号通路的活性,在疾病的发生发展中具有重要作用<sup>[1]</sup>。miR-221 在机体多种肿瘤中均出现表达失调,其在糖尿病引起的疾病中也有重要作用<sup>[2]</sup>,但是其在糖尿病视网膜病变中的功能及作用机制研究甚少。本研究拟以高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞 HRCECs 为研究对象,检测其中 miR-221、p53、MDM2 的表达,观察过表达 miR-221、抑制 miR-221、过表达 MDM2 对高糖诱导的 HRCECs 细胞凋亡的影响,揭示 miR-221 促进高糖诱导的 HRCECs 细胞凋亡的机制与 P53/MDM2 信号通路有关。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人视网膜血管内皮细胞 HRCECs 购自 ATCC; DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司;Trizol 液购自上海格敏生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 购自北京宜科思源科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自北京艾然生物科技有限公司;逆转录试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;RIPA 蛋白裂解液购自碧云天生物技术公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝公司。P53 抗体购自上海研谨生物科技有限公司;MDM2 抗体购自 Abcam;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将人视网膜血管内皮细胞 HRCECs 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中常规培养,每 2~3d 传代一次。

**1.2.2 细胞转染与分组** 将正常培养的 HRCECs 细胞分为 NG 组、HG 组、HG+miR-NC 组、HG+miR-221 组、HG+anti-miR-NC 组、HG+anti-miR-221 组、HG+miR-221+pcDNA 3.1 组、HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2 组。各组细胞的处理方法分别为:NG 组:用 5mmol/L 的葡萄糖处理 48h 的 HRCECs 细胞;HG 组:用 30mmol/L 的葡萄糖处理 48h 的 HRCECs 细胞;将 miR-NC、miR-221 mimics、anti-miR-NC、anti-miR-221、miR-221 mimics+pcDNA 3.1、miR-221 mimics+pcDNA 3.1-MDM2 按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书的操作步骤转染至 HRCECs 细胞,转染 5h 后,弃去培养液更换新鲜的培养基继续培养 48h,用 qRT-PCR 法确认转染效率达到要求。转染成功后用 30mmol/L 的葡萄糖处理培养 48h,分别标记为 HG+miR-NC 组、HG+miR-221 组、HG+anti-miR-NC 组、HG+anti-miR-221 组、HG+miR-221+pcDNA 3.1 组、HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2 组,用于后续实验研究。

**1.2.3 qRT-PCR 法检测细胞中 miR-221、p53、MDM2 的表达** Trizol 法提取对数生长期的细胞样本总 RNA,并用 Nano-Drop 2000 微量分光光度计进行 RNA 定量。DNase I 消化 RNA 中可能污染的 DNA。逆转录反应采用逆转录试剂盒方式,操作按照试剂盒说明书进行,合成模板链 cDNA。按照反应体系进行,反应结束后通过分析 Ct 值,以 U6、β-actin 为内参,计算定量结果,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法测定 miR-221、p53、MDM2 的相对表达水平。引物信息(5'-3'):miR-221 上游引物 ACACTCCAGCTGGGGAAACCCA GCAGACAA,下游引物 CTCAACTGGTCTCCTGGAGT;p53

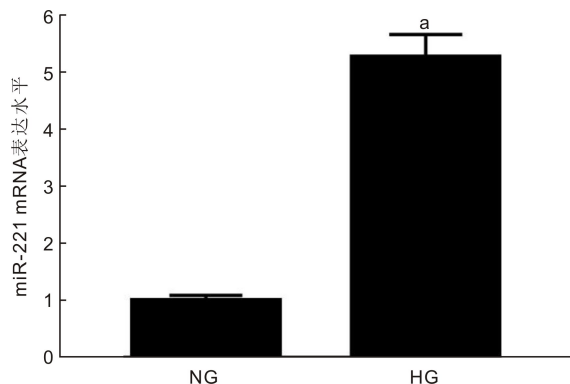


图 1 miR-221 在高糖诱导的 HRCECs 细胞中的表达 <sup>a</sup>*P*< 0.05 vs NG 组。

上游引物 TGACACGCTTCCTGGATTGGCAGCCAGAC,下游引物 CTGACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC;MDM2 上游引物 CACCTCACAGATTCCAGCTT,下游引物 CGCCAAACAAATCTCTAGTA;β-actin 上游引物 GGAAGT CGAGCAAGAGATGG,下游引物 AGCACTGTGTTGGCGTACAG;U6 上游引物 CTCGCTTCGGCAGCACACA,下游引物 AACGCTTCACGAATTTGCGT。

### 1.2.4 Western blot 实验检测细胞中 p53、MDM2 的蛋白表达

将对数期细胞进行冰上蛋白裂解 1h,提取总蛋白,以 BCA 法测定样品蛋白的浓度。以 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲液,混匀,沸水浴变性 5min,离心取上清,取 60μg 目的蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。然后将蛋白湿转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,TBST 洗涤,4℃ 条件下,将封闭后的 PVDF 膜放入一抗(1:1000 稀释的 P53 抗体、MDM2 抗体)中反应过夜,以封闭液洗膜 3 次,每次 5min,再在 37℃ 下将 PVDF 膜转入二抗(1:500 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体)中反应 2h。于暗室内 ECL 试剂盒显影曝光;滴加化学发光剂显影,以凝胶成像系统采集图像。Quantity One 4.62 图像分析软件进行条带灰度分析,以 GAPDH 为内参,以目的条带灰度值与 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白的表达情况。

### 1.2.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术实验检测细胞凋亡

将 1.2.2 各转染组细胞,用 500μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,分别加入 5μL 的 Annexin V-FITC 避光反应 20min 后再加入 5μL 的 PI 避光反应 20min,用 300 目铜筛过滤,最后在 1h 内上流式细胞仪结束检测。细胞的凋亡率(%)=早期凋亡率+晚期凋亡率。每个样品重复 3 次。

**统计学分析:**实验中所有数据均采用 SPSS21.0 软件进行分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-221 在高糖诱导的 HRCECs 细胞中的表达** 结果如图 1 所示,与 NG 组相比,HG 组细胞中 miR-221 表达显著升高,差异有统计学意义(*t*=32.863,*P*<0.05)。

**2.2 p53 和 MDM2 在高糖诱导的 HRCECs 细胞中的表达** 结果如图 2 所示,与 NG 组相比,HG 组细胞中 p53 的

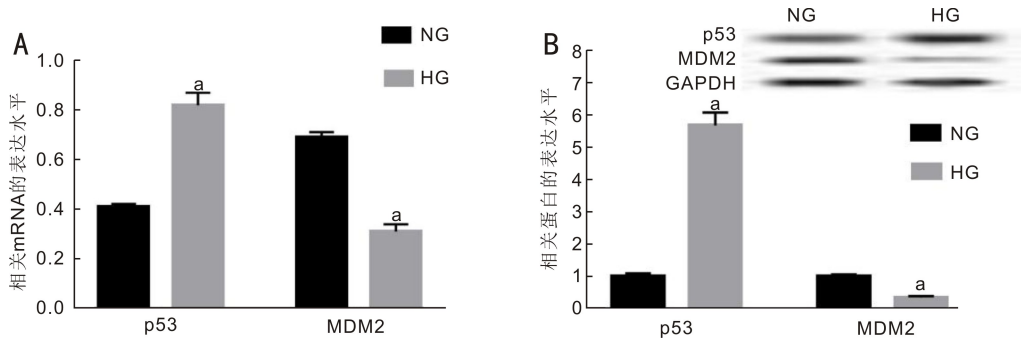


图2 p53和MDM2在高糖诱导的HRCECs细胞中的表达 A:p53、MDM2在高糖诱导的HRCECs细胞的mRNA的表达;B:p53、MDM2在高糖诱导的HRCECs细胞的蛋白表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NG组。

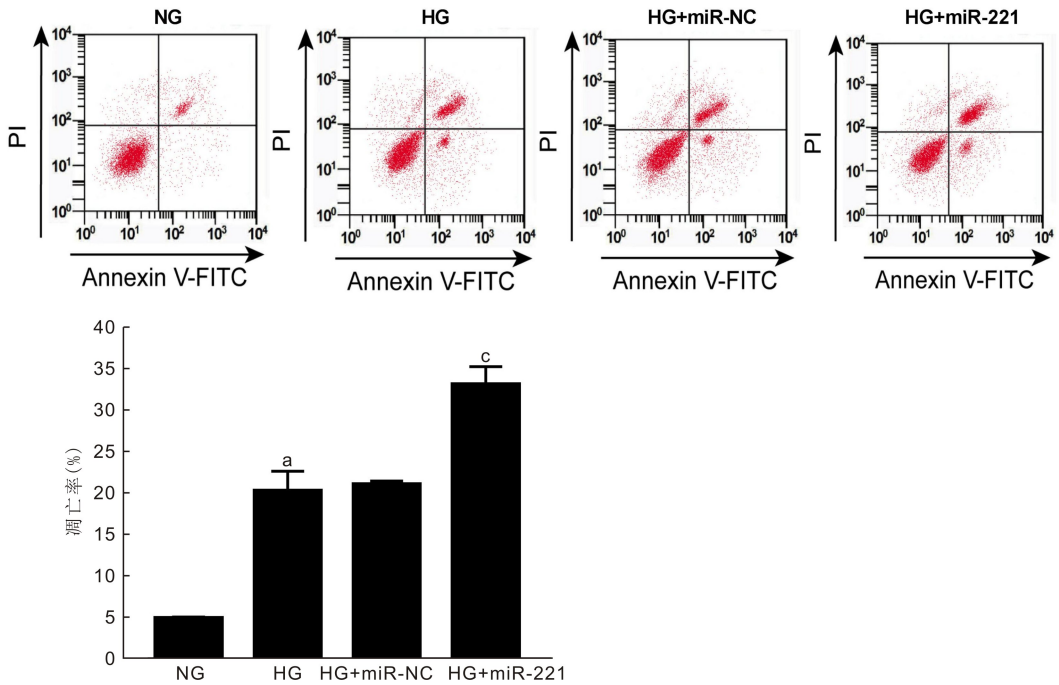


图3 过表达miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NG组, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG+miR-NC组。

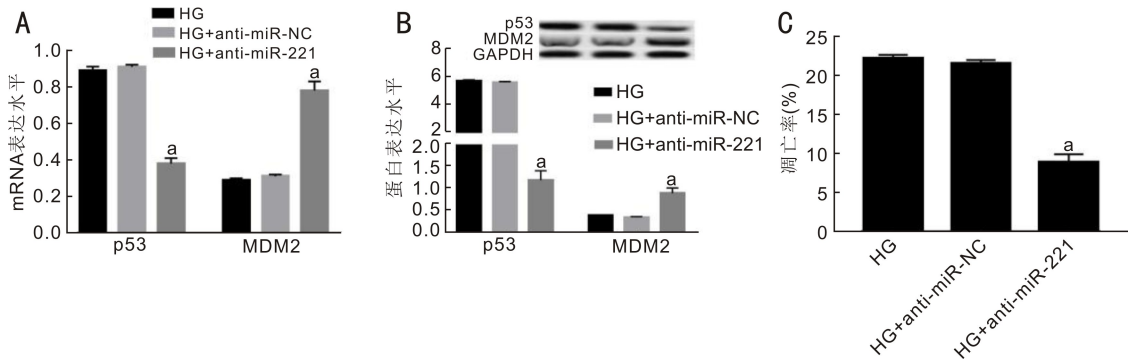


图4 抑制miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞中p53、MDM2表达及凋亡的影响 A:抑制miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞p53、MDM2的mRNA的影响;B:抑制miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞p53、MDM2的蛋白表达的影响;C:抑制miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HG+anti-miR-NC组。

mRNA和蛋白表达均显著升高( $t = 15.274, 16.127$ , 均 $P < 0.05$ ),MDM2的mRNA和蛋白表达均显著降低( $t = 22.472, 16.994$ , 均 $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义。

2.3 过表达miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响 结果如图3所示,NG组、HG组、HG+miR-NC组、HG+miR-221组细胞凋亡率比较,差异具有统计学意义( $F = 29.506, P < 0.01$ )。与NG组相比,HG组细胞的凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),与HG+miR-NC组相比,HG+

miR-221组细胞的凋亡率显著升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.4 抑制miR-221对高糖诱导的HRCECs细胞中p53、MDM2表达及凋亡的影响 结果如图4所示,HG组、HG+anti-miR-NC组、HG+anti-miR-221组细胞中p53 mRNA和蛋白表达、MDM2 mRNA和蛋白表达、凋亡率比较,差异均有统计学意义( $F = 707.353, 211.787, 372.761, 334.887, 170.664$ , 均 $P < 0.01$ )。与HG+anti-miR-NC组

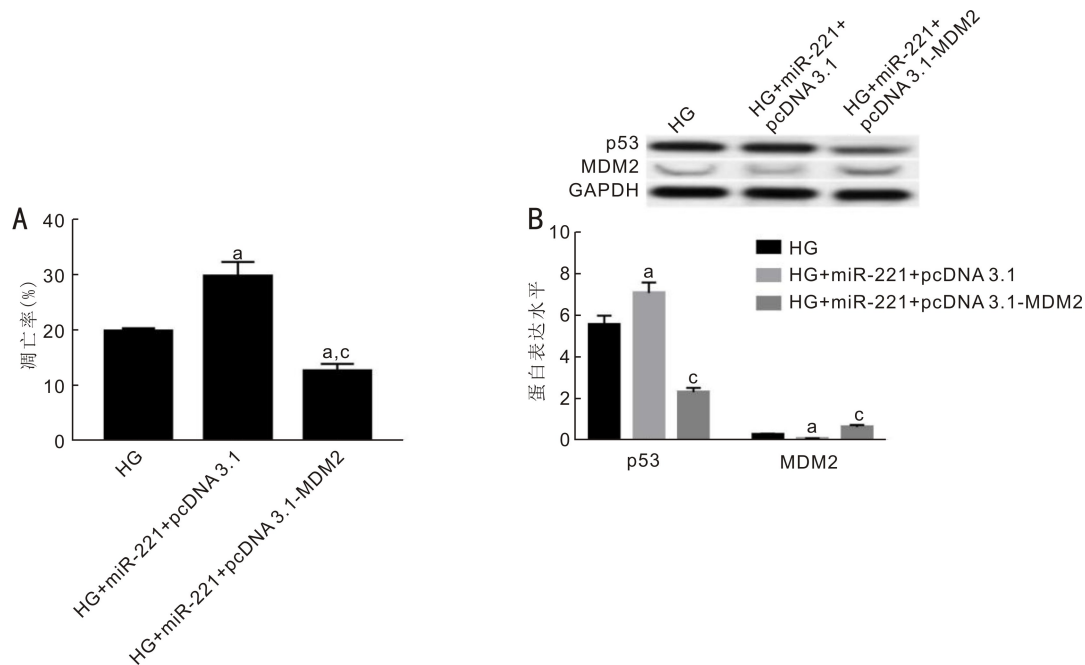


图5 过表达MDM2对抑制miR-221的抗高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响 A:过表达MDM2对抑制miR-221的抗高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响;B:过表达MDM2对抑制miR-221的抗高糖诱导的HRCECs细胞中p53、MDM2蛋白表达的影响。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HG组, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG+miR-221+pcDNA 3.1组。

相比, HG+anti-miR-221组细胞中p53的mRNA和蛋白表达均显著降低,MDM2的mRNA和蛋白表达均显著升高,细胞凋亡率显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.5 过表达MDM2对抑制miR-221的抗高糖诱导的HRCECs细胞凋亡的影响** 结果如图5所示, HG组、HG+miR-221+pcDNA 3.1组、HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2组细胞凋亡率、p53蛋白表达、MDM2蛋白表达,差异均有统计学意义( $F = 202.442, 347.115, 621.257$ , 均 $P < 0.01$ )。与HG组相比, HG+miR-221+pcDNA 3.1组细胞凋亡率显著升高, p53蛋白表达显著升高, MDM2蛋白表达显著降低, HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2组细胞凋亡率显著降低, p53蛋白表达显著降低, MDM2蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与HG+miR-221+pcDNA 3.1组相比, HG+miR-221+pcDNA 3.1-MDM2组细胞凋亡率显著降低, p53蛋白表达显著降低, MDM2蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

miRNA参与人类机体的多种疾病的发生发展, 其中包括糖尿病<sup>[3-4]</sup>。由于miRNA的调控网络十分复杂, 因此其在疾病中的作用机制成为研究的热点和难点。据报道, miR-221在糖尿病肾病、糖尿病心脏疾病中均出现异常表达<sup>[5-6]</sup>。Daniel等<sup>[7]</sup>报道, miR-221和miR-222在糖尿病小鼠血管平滑肌细胞中的表达上调, 促进糖尿病小鼠的血管内膜增厚, 而抑制上调的miR-221和miR-222可有效预防糖尿病心血管疾病, 其可能与细胞外信号应答激酶-1/2(ERK-1/2)和p27Kip1有关。Liu等<sup>[8]</sup>在研究中报道, miR-221在糖尿病视网膜病变患者血清中的表达水平明显的上调, 并与患者的总体存活率具有显著的相关性, 更重要的是, miR-221的诊断效率明显的高于Ang II、

VEGF, 揭示血清miR-221作为潜在的生物标志物不仅与T2DM患者DR的发生有关, 而且与DR的进展有关。遗憾的是, 没有继续进行miR-221在糖尿病视网膜病变的体外研究。本研究用高糖诱导了HRCECs建立糖尿病视网膜病变的体外研究细胞模型, 检测了其中miR-221的表达水平发现, miR-221高表达, 这与Liu等<sup>[8]</sup>在患者血清中的检测结果相呼应; 进一步研究, 通过流式细胞术检测过表达miR-221在高糖诱导的HRCECs细胞中的作用发现, 过表达miR-221后, 高糖诱导的HRCECs细胞的凋亡率上调更严重, 并上调p53、下调MDM2, 抑制miR-221则起相反的作用抑制凋亡作用, 这说明miR-221在高糖诱导的HRCECs凋亡中具有促进作用, 提示miR-221具有促进糖尿病视网膜病变的恶性进展的作用, 推测可能与p53/MDM2通路相关, 为糖尿病视网膜病变的诊断和治疗提供新的靶点。

p53为一种可诱导细胞凋亡核磷酸蛋白, 其在糖尿病大鼠的视网膜毛细血管内大量积累<sup>[9-10]</sup>。MDM2是一种负向调节p53的下游因子, 其可通过与p53结合引起其泛素化降解, 从而抑制p53引起的凋亡级联反应<sup>[11-13]</sup>。有研究报道, MDM2过度表达时, 可抑制p53的功能<sup>[14]</sup>。郭承伟等<sup>[15]</sup>在研究中发现, 在糖尿病视神经病变大鼠模型中, p53的表达明显升高, MDM2的表达明显降低, 大黄虫丸治疗后, p53、MDM2的表达得到平衡, 可见, p53/MDM2通路在糖尿病视神经病变中的关键作用。本研究检测了高糖诱导了HRCECs细胞中p53、MDM2的表达发现, p53的表达升高, MDM2的表达降低, 二者呈明显的负相关, 这与前人的实验结果均相一致; 进一步研究发现, p53、MDM2的表达水平受miR-221的调控, 这为p53/MDM2信号通路的调控机制研究提供参考依据; 深入研究发现, 过表达MDM2可逆转抑制miR-221的抗高糖诱导的

HRCECs 细胞凋亡,这说明不仅 miR-221 可调控 p53/MDM2 信号通路,相反,MDM2 也可反向调控 miR-221 在高糖诱导的 HRCECs 细胞的功能。

综上所述,miR-221 可促进高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡,其作用机制与调控 p53/MDM2 信号通路调控有关,为糖尿病视网膜病变的治疗提供新靶点。

#### 参考文献

- 1 Lu M, Zhang Q, Deng M, *et al.* An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008;3(10):e3420
- 2 Li B, Lu Y, Yu L, *et al.* miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- $\kappa$ B/COX-2 activation. *Chem Biol Interact* 2017;277(11):33-42
- 3 Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol* 2017;1509(1):1-10
- 4 Baradan R, Hollander JM, Das S. Mitochondrial miRNAs in diabetes: just the tip of the iceberg. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95(10):1156-1162
- 5 Fiorentino L, Cavalera M, Mavilio M, *et al.* Regulation of TIMP3 in diabetic nephropathy: a role for microRNAs. *Acta Diabetol* 2013;50(6):965-969
- 6 Costantino S, Paneni F, Lüscher TF, *et al.* MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *Eur Heart J* 2016;37(6):572

- 7 Daniel JIJ, Stephanie CM, Cooper W. Upregulation of miR-221 and-222 in response to increased extracellular signal-regulated kinases1/2 activity exacerbates neointimal hyperplasia in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2018;269(1):71-78
- 8 Liu HN, Li X, Wu N, *et al.* Serum microRNA-221 as a biomarker for diabetic retinopathy in patients associated with type 2 diabetes. *Int J Ophthalmol* 2018;11(12):1889-1894
- 9 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88(3):323-331
- 10 Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, *et al.* p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74(6):957-967
- 11 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387(6630):296-299
- 12 Zheng T, Wang J, Zhao Y, *et al.* Spliced MDM2 isoforms promote mutant p53 accumulation and gain-of-function in tumorigenesis. *Nat Commun* 2013;4(1):2996
- 13 Mendoza M, Mandani G, Momand J. The MDM2 gene family. *Biomol Concepts* 2014;5(1):9-19
- 14 Bose I, Ghosh B. The p53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis. *J Biosci* 2007;32(5):991-997
- 15 郭承伟, 宁云红, 田丽珍, 等. 大黄虫丸对 p53 介导的信号通路调控糖尿病大鼠视网膜周细胞凋亡的研究. *辽宁中医杂志* 2019;4(3):624-626