

视网膜色素上皮细胞氧化应激相关 microRNA 的鉴定

梁厚成^{1,2}, 陈凌¹, 冯海晓¹, 何玲¹, 姚亮¹, 柏凌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(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科

作者简介:梁厚成,毕业于第四军医大学,副主任医师,主任,研究方向:白内障防治。

通讯作者: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。larkling@163.com

收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-08-17

Identification of oxidative stress related microRNA in human retinal pigment epithelium

Hou-Cheng Liang^{1,2}, Ling Chen¹, Hai-Xiao Feng¹, Ling He¹, Liang Yao¹, Ling Bai¹

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

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

²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, 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: 2015-06-08 Accepted: 2015-08-17

Abstract

• AIM: To identify the oxidative stress related miRNA in retinal pigment epithelium (RPE) by miRNA expression profile chip and provide a new idea for comprehensive and deep research on the molecular mechanisms of age-related macular degeneration (AMD).

• METHODS: Human RPE cell line D407 was treated by 100, 200, 400 μmol/L H₂O₂ for 24h and harvested to isolate total RNA by Trizol reagent. The expression difference of D407 cell miRNA after processing of different concentrations was generated by Exiqon miRCURY LNATM microRNA expression profile chip and the changes after processing of different concentrations were conducted by Hierarchical Clustering analysis. The results of chips were verified through Stem loop realtime PCR, and the target genes of identified miRNAs were predicted by bioinformatics software.

• RESULTS: Among the 1425 known miRNAs listed on microarray, 367 miRNAs showed differential expression after H₂O₂ treatment. The Treeview Clustering showed that 17 miRNAs, including miR-31, were downregulated along with the increase of H₂O₂ concentration.

Meanwhile, 7 miRNAs, including miR206, were upregulated. The results of qRT-PCR further validated the better results of microarray.

• CONCLUSION: The miRNA expression of human RPE is dramatically changed after H₂O₂ treatment. miRNA adjusts the molecules level of micrornas transcription and it is involved in cell oxidative stress reaction, and miRNA may play a pivotal role in the pathogenesis and development of AMD.

• KEYWORDS: oxidative stress; retinal pigment epithelium; microRNA; age-related macular degeneration

Citation: Liang HC, Chen L, Feng HX, et al. Identification of oxidative stress related microRNA in human retinal pigment epithelium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(9):1521-1524

摘要

目的:应用 miRNA 表达谱芯片筛选视网膜色素上皮细胞与氧化应激相关的 miRNA,为更加全面深入地研究年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)发生的分子机制提供新的思路。

方法:培养 D407 细胞,分别使用 100、200、400 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 24h 后,Trizol 试剂抽提细胞总 RNA,使用 Exiqon miRCURY LNATM microRNA 表达谱芯片(miRBase 16.0 数据库)检测不同浓度处理后 D407 细胞 miRNA 的表达差异,并将不同浓度处理后的变化进行聚类分析。使用 Stem loop realtime PCR 对芯片结果进行验证,并运用生物信息学方法预测差异 miRNA 调控的靶基因。

结果:芯片所包含的 1425 个已知 miRNA 中,共有 367 个在不同浓度 H₂O₂ 处理后表达发生变化。通过 Treeview 软件进行聚类分析发现 miR-31 等 17 个 miRNA 随 H₂O₂ 浓度的升高呈现逐渐降低的趋势,miR-206 等 7 个则逐渐升高。PCR 验证显示芯片结果准确性较好。

结论:H₂O₂ 作用前后 RPE 的 miRNA 表达存在明显差异,miRNA 作为转录后水平的调节分子,参与了细胞氧化应激反应,可能在 AMD 的发生发展中起有重要作用。

关键词:氧化应激;视网膜色素上皮细胞;miRNA;年龄相关性黄斑变性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.07

引用:梁厚成,陈凌,冯海晓,等.视网膜色素上皮细胞氧化应激相关 microRNA 的鉴定.国际眼科杂志 2015;15(9):1521-1524

0 引言

近年来研究显示视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)的氧化应激与年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)等众多视网

膜疾病的发生、发展关系密切,但机制尚不明确^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是长度小于22个碱基的小分子单链RNA,位于基因组非编码区,进化上高度保守,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AMD的发生和发展,但其具体作用尚不明确^[2-6]。为此本研究通过观察人RPE在不同浓度过氧化氢(H₂O₂)作用后miRNA表达谱的变化,寻找与氧化应激相关的miRNA,为更加全面深入地研究AMD发生的分子机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 人RPE D407细胞系购自中山大学实验动物中心;Trizol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 D407生长于DMEM高糖培养基,添加10% FBS,100U/mL青霉素,100mg/mL链霉素,培养于37℃,5% CO₂培养箱。隔日换液,每4d以1:5传代。

1.2.2 miRNA芯片分析 使用100、200、400μmol/L H₂O₂处理D407细胞24h后,收集细胞用Trizol法提取总RNA。选用针对miRBase数据库(16.0)含有1891个捕获探针的miRCURY[™] LNA芯片进行检测,标记和杂交均按试剂盒说明进行。不同浓度处理组使用Hy5[™]荧光染料标记,未处理组使用Hy3[™]荧光染料标记。将杂交后的芯片使用Axon 4000扫描仪532nm和635nm两种波长扫描,提取荧光信号的强度,GenePix 4.0软件计算每个基因点在本次实验中的表达差异值,筛选标准为比值≥2为上调,比值≤0.5为下调。

1.2.3 聚类分析 将芯片所得全部数据导入Cluster软件,采用整体聚类分析方法(Hierarchically Cluster),Similaruty Metric选择Correlation(uncentered),进行Average Linkage Clustering,Treeview软件展示聚类结果。

1.2.4 qRT-PCR验证 根据芯片和聚类分析结果,将鉴定与氧化应激相关的miRNA进一步使用qRT-PCR验证。Trizol提取总RNA后使用miRNA Stem-loop引物反转录为cDNA,使用TaqMan[®] miRNA assay试剂在ABI 7500 real time PCR仪上进行检测,循环条件:95℃ 5min,40个循环95℃ 10s,59℃ 10s。U6 RNA作为内参,2^{-ΔΔCt}方法计算其相对表达量,独立实验重复三次,与芯片结果进行对比。

1.2.5 miRNA靶基因预测^[7] 分别将筛选出的miRNA代入以下三种程序:TargetScan(<http://www.targetscan.org>),miRBase Targets(<http://microrna.sanger.ac.uk>)和PicTar(<http://pictar.bio.nyu.edu/>),预测其可能调控的靶基因。

统计学分析:统计软件采用SPSS Statistics 19.0,使用单因素方差分析(ANOVA)对筛选出的miRNA在不同浓度H₂O₂处理后的变化进行统计学检验,检验水准为α=0.05。

2 结果

2.1 氧化应激诱发的miRNA表达变化 在芯片所包含的1425个已知miRNA中,共有367个在不同浓度H₂O₂处理后表达发生变化(100μmol/L:300个,200μmol/L:230个,400μmol/L:262个),其中94个miRNA在不同浓度H₂O₂处理后发生了明显变化(43个上调,51个下调,表1)。

表1 D407细胞氧化损伤后变化明显的miRNA

上调	下调
hsa-miR-7	hsa-let-7b
hsa-miR-16	hsa-miR-21 *
hsa-miR-20a	hsa-miR-23c
hsa-miR-26b	hsa-miR-31
hsa-miR-27a	hsa-miR-32 *
hsa-miR-30c-1 *	hsa-miR-150
hsa-miR-32	hsa-miR-151-3p
hsa-miR-130a	hsa-miR-124 *
hsa-miR-133b	hsa-miR-148b
hsa-miR-149 *	hsa-miR-193b
hsa-miR-181d	hsa-miR-195 *
hsa-miR-206	hsa-miR-210
hsa-miR-214	hsa-miR-224 *
hsa-miR-301a	hsa-miR-302c *
hsa-miR-335	hsa-miR-330-3p
hsa-miR-374a	hsa-miR-340
hsa-miR-422a	hsa-miR-326
hsa-miR-423-5p	hsa-miR-361-5p
hsa-miR-424	hsa-miR-491-3p
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-518b
hsa-miR-508-5p	hsa-miR-518e *
hsa-miR-552	hsa-miR-520d-5p
hsa-miR-553	hsa-miR-548e
hsa-miR-663b	hsa-miR-574-5p
hsa-miR-638	hsa-miR-622
hsa-miR-711	hsa-miR-625 *
hsa-miR-767-5p	hsa-miR-634
hsa-miR-1246	hsa-miR-636
hsa-miR-1249	hsa-miR-640
hsa-miR-1290	hsa-miR-647
hsa-miR-1915	hsa-miR-665
hsa-miR-3178	hsa-miR-885-5p
hsa-miR-3195	hsa-miR-937
hsa-miR-3201	hsa-miR-1236
hsa-miR-3607-5p	hsa-miR-1273
hsa-miR-3611	hsa-miR-1275
hsa-miR-3613-3p	hsa-miR-1285
hsa-miR-3618	hsa-miR-1909
hsa-miR-3646	hsa-miR-1973
hsa-miR-3656	hsa-miR-1976
hsa-miR-3686	hsa-miR-2355-3p
hsa-miR-4258	hsa-miR-3142
hsa-miR-4284	hsa-miR-3149
	hsa-miR-3182
	hsa-miR-3196
	hsa-miR-3675-3p
	hsa-miR-3941
	hsa-miR-4268
	hsa-miR-4284
	hsa-miR-4286
	hsa-miR-4312

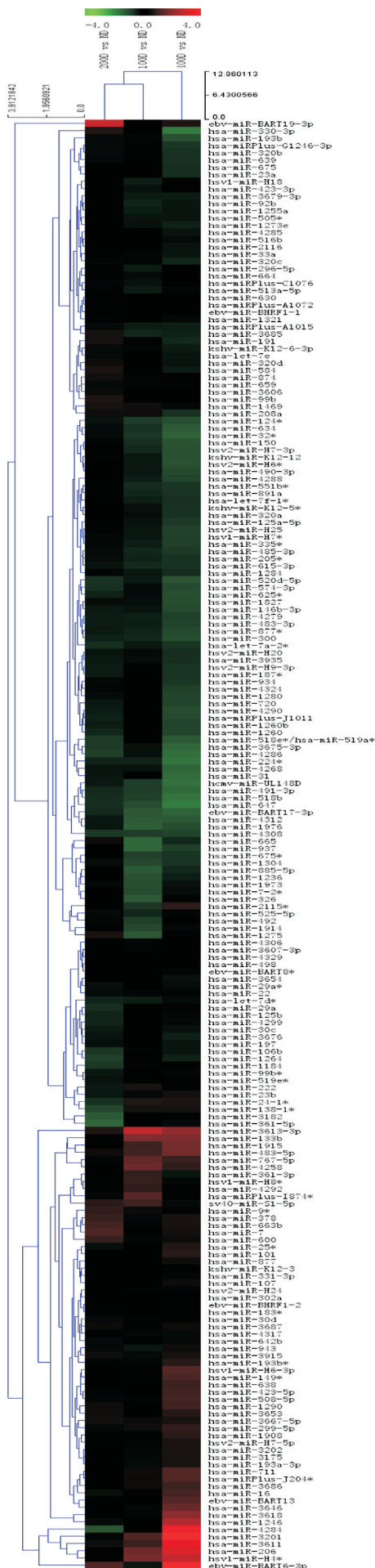


图1 氧化应激相关 miRNA 聚类分析。

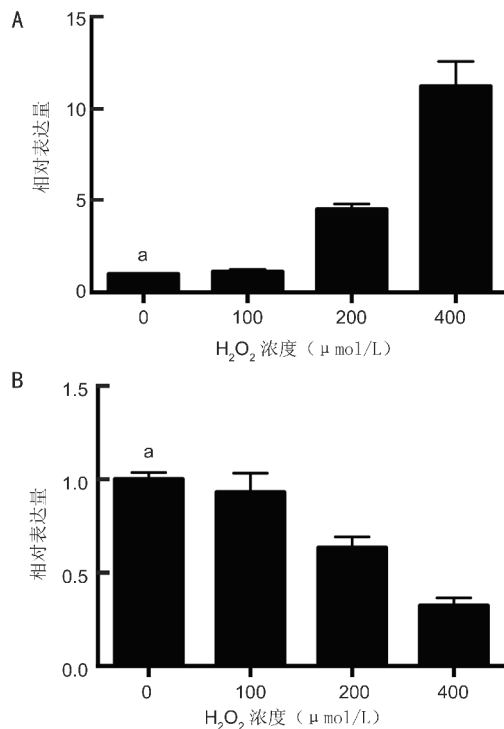


图2 H₂O₂ 处理前后 miRNA 的表达变化 A: hsa-miR-206 相对表达量; B: hsa-miR-31 相对表达量; ^aP<0.05 vs 400μmol/L。

Position 1-7 of SOD1 3' UTR	5' . . . NNNNNNNNNNNNNNCAUUC . . .	7mer-m8
hsa-miR-206	3' GGUGUGUGAAGGAAUGUAAGGU	

图3 靶基因预测。

经聚类分析后发现, 24 个 miRNA 的表达变化与 H₂O₂ 的浓度具有一定关联性, 其中 7 个 miRNA (hsa-miR-206, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-149*, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-1290, hsa-miR-3611, hsa-miR-1246) 随 H₂O₂ 浓度的升高呈现逐渐升高的趋势, 17 个 miRNA (hsa-miR-31, hsa-miR-518e*, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-32*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-300, hsa-miR-634, hsa-miR-647, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-1827, hsa-miR-625*, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-4286, hsa-miR-4279, hsa-miR-4308, hsa-miR-3675-3p, hsa-miR-518b) 则逐渐降低 (图 1)。

2.2 芯片结果验证 通过 TaqMan[®] miRNA Real-Time PCR 检测发现, 与未处理组相比, H₂O₂ 处理后 D407 细胞的 hsa-miR-206 表达升高 (100μmol/L: P = 0.995; 200μmol/L: P = 0.001; 400μmol/L: P = 0.000 vs control), 与 H₂O₂ 处理浓度有很好的相关性 (F = 144.968, P = 0.000), hsa-miR-31 的表达则逐渐降低 (100μmol/L: P = 0.565; 200μmol/L: P = 0.001; 400μmol/L: P = 0.000 vs control), 呈现明显的浓度依赖性 (F = 70.079, P = 0.000, 图 2)。

2.3 miRNA 靶基因预测 软件预测结果显示, 表达上调的 hsa-miR-206 靶基因为超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)。预测结合位点见图 3。此外, 其他差异表达的 miRNA 预测的靶基因中包括 PRDX3, GSR, GPX8 等多种与氧化应激相关的基因。

3 讨论

氧化应激是 AMD 发生发展的重要病理机制之一,氧化应激将会导致 RPE 或是脉络膜微血管损伤,RPE 的损伤又会进一步介导 Bruch 膜及脉络膜的炎症反应,促发的炎症反应又会使 ECM 异常沉积,进而影响 RPE 加重 AMD 进展^[8-9]。目前认为 miRNA 可能在病理性新生血管、氧化应激、免疫反应以及炎症等 AMD 相关的重要病理因素中扮演着重要作用^[5,10-11]。通过对 miRNA 表达模式的位相性和时序性的研究能够为明确 miRNA 在 AMD 发生发展过程中的特定功能提供线索。本研究结果显示不同程度的氧化损伤作用于 RPE 细胞后,细胞 miRNA 表达发生了明显变化,并且部分 miRNA 的表达变化与损伤程度有一定相关性,表明 miRNA 可能在 RPE 的氧化损伤及 AMD 的发生发展中具有重要作用。

进一步的生物信息学分析发现,细胞氧化损伤后发生变化的 miRNA 可能调控的靶基因与氧化应激关系密切。正常情况下,人体内的 SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化系统可拮抗氧化应激反应^[12]。Sod1^{-/-}和 Sod2 knockdown 小鼠的视网膜表现出与 AMD 类似的病理学改变^[13-14]。本实验结果显示 miR-206 可能从转录后水平调控 SOD1,并且与氧化损伤的程度明显相关,表明 miR-206 可以通过调节 SOD1 的表达抑制抗氧化反应,加重氧化损伤。

氧化损伤可诱导 RPE 细胞死亡、局部自身免疫反应和慢性炎症,这些病理改变可致 GA 和 CNV。有文献报道,miR-21,miR-31 和 miR-150 等在激光诱导的 CNV 小鼠中表达显著减少,而过表达以上三种 miRNA 均能抑制激光诱导 CNV 的病理进程^[15]。本实验芯片结果显示,经 H₂O₂ 处理后,细胞内 miR-21,miR-31 和 miR-150 的表达均明显降低,并且 miR-31 的变化趋势与 H₂O₂ 浓度有很好的关联性,更加说明 miRNA 在 AMD 的发病机制中具有重要的作用,但其具体作用机制还有待进一步研究。

综上所述,氧化损伤作用于 RPE 会引起细胞内 miRNA 发生明显变化,差异表达的 miRNA 可通过调节抗氧化反应等多个途径,参与 AMD 的发生与发展。虽然缺乏对生物信息学分析得出的 miRNA 调控靶基因的直接实验验证,但结合相关文献,筛选出的差异 miRNA 能够为进一步研究提供新的思路。通过对本实验中筛选出的氧化应激相关 miRNA 的确证和功能研究,将有利于我们从基因水平对 AMD 进行更加深入的研究,寻找新的治疗靶点。

参考文献

- 1 向艳芳,彭惠. 氧化应激及补体在年龄相关性黄斑变性发病中的作用机制. 国际眼科杂志 2013;13(8):1579-1582
- 2 Grassmann F, Schoenberger PG, Brandl C, et al. A circulating microRNA profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration. *PLoS One* 2014;9(9):e107461
- 3 Liu MM, Chan CC, Tuo J. Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics. *Hum Genomics* 2012;6:13
- 4 Liu MM, Chan CC, Tuo J. Epigenetics in ocular diseases. *Curr Genomics* 2013;14(3):166-172
- 5 Wang S, Koster KM, He Y, et al. miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration. *Future Med Chem* 2012;4(3):277-287
- 6 邓淋曼,彭惠. miRNAs 在年龄相关性黄斑变性的潜在作用. 国际眼科杂志 2015;15(1):61-64
- 7 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
- 8 Mitter SK, Song C, Qi X, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* 2014;10(11):1989-2005
- 9 Rabin DM, Rabin RL, Blenkinsop TA, et al. Chronic oxidative stress upregulates Drusen-related protein expression in adult human RPE stem cell-derived RPE cells: a novel culture model for dry AMD. *Aging (Albany NY)* 2013;5(1):51-66
- 10 Saxena K, Rutar MV, Provis JM, et al. Identification of miRNAs in a model of retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;56(3):1820-1829
- 11 Lin H, Qian J, Castillo AC, et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6308-6314
- 12 Reddi AR, Culotta VC. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* 2013;152(1-2):224-235
- 13 Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(30):11282-11287
- 14 Justilien V, Pang JJ, Renganathan K, et al. SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4407-4420
- 15 Sabatel C, Malvaux L, Bovy N, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One* 2011;6(2):e16979