

lncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴促进视网膜血管内皮细胞增殖及迁移和血管生成

陈前波, 席晓婷, 马嘉, 赵剑峰, 王雪维, 蔡斌, 程泉, 李俊娴, 李燕

引用: 陈前波, 席晓婷, 马嘉, 等. lncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴促进视网膜血管内皮细胞增殖及迁移和血管生成. 国际眼科杂志 2022;22(10):1608-1614

基金项目: 云南省应用基础研究重点项目 [No. 2017FE468 (-175)]; 云南省应用基础研究面上项目 [No. 2017FE468 (-046)]; 云南省医疗卫生单位内设研究机构科技计划项目 (No. 2018NS0145, 2016NS064)

作者单位: (650032) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第一附属医院眼科

作者简介: 陈前波, 男, 毕业于昆明医科大学, 博士, 讲师, 研究方向: 眼底病、神经保护与再生。

通讯作者: 李燕, 女, 毕业于德国明斯特大学, 博士, 主任医师, 主任, 研究方向: 眼底病、神经保护与再生. Liyanr@hotmail.com

收稿日期: 2021-12-14 修回日期: 2022-09-10

关键词: 糖尿病视网膜病变; lncRNA MALAT1; miR-124-3p; SOX7; 血管形成

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.10.02

Research on the lncRNA MALAT1 promoting the proliferation, migration and angiogenesis of retinal vascular endothelial cells in diabetic retinopathy through the molecular axis of miR-124-3p/SOX7

Qian-Bo Chen, Xiao-Ting Xi, Jia Ma, Jian-Feng Zhao, Xue-Wei Wang, Bin Cai, Quan Cheng, Jun-Xian Li, Yan Li

Foundation items: Key Project of Applied Basic Research in Yunnan Province [No. 2017FE468 (-175)]; Yunnan Province Applied Basic Research General Project [No. 2017FE468 (-046)]; Scientific and Technological Plan Project of Internal Research Institutions in Medical and Health Units in Yunnan Province (No. 2018NS0145, 2016NS064)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Yan Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China. Liyanr@hotmail.com

Received: 2021-12-14 Accepted: 2022-09-10

摘要

目的: 探讨 lncRNA MALAT1 对视网膜血管内皮细胞增殖、迁移及血管生成的影响及其分子机制。

方法: qPCR 检测正常对照组、糖尿病患者无视网膜病变组、糖尿病视网膜病变患者组血清中 lncRNA MALAT1 的表达水平以及葡萄糖培养对 lncRNA MALAT1 的表达水平的影响。qRT-PCR 检测 miR-124-3p 表达水平; Western blotting 检测 SOX7 表达水平; 双荧光素酶报告系统检测 lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p、miR-124-3p 与 SOX7 的靶向作用关系; CCK-8 实验检测细胞的增殖活力; Transwell 实验检测细胞的迁移能力; 体外成管实验检测 hRMECs 血管形成能力。

结果: lncRNA MALAT1 在糖尿病视网膜病变患者血清中的表达水平显著高于糖尿病患者无视网膜病变组和正常对照组 ($P < 0.001$); 体外葡萄糖培养显著促进 lncRNA MALAT1 在 hRMECs 细胞的表达, 并显著促进 hRMECs 细胞的增殖、迁移和血管形成 (均 $P < 0.05$)。敲低 lncRNA MALAT1 显著抑制 hRMECs 细胞的增殖、迁移和成管能力 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验表明, lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p、miR-124-3p 与 SOX7 之间存在靶向结合作用。过表达 miR-124-3p 显著抑制 hRMECs 细胞的增殖、迁移和成管能力 (均 $P < 0.05$); 过表达 lncRNA MALAT1+miR-124-3p, 同时过表达 miR-124-3p+SOX7, 敲低 lncRNA MALAT1+过表达 SOX7 均显著消除了过表达 miR-124-3p 对 hRMECs 细胞增殖、迁移和血管形成的抑制作用 (均 $P < 0.05$)。

结论: lncRNA MALAT1 通过下调 miR-124-3p 对 SOX7 的负调控作用促进糖尿病视网膜病变中视网膜内皮细胞增殖、迁移和血管形成。lncRNA MALAT1 在糖尿病视网膜病变患者的异常上调可能是微血管功能障碍的潜在生物标志。

Abstract

• AIM: To investigate the effect of lncRNA MALAT1 on the proliferation, migration and angiogenesis of retinal vascular endothelial cells and its molecular mechanism.

• METHODS: The expression levels of lncRNA MALAT1 in plasma of normal control group, diabetic without retinopathy group and diabetic retinopathy group were detected by qPCR and the effect of glucose culture on the expression levels of lncRNA MALAT1 were detected by qPCR too. The expression level of miR-124-3p was detected by qRT-PCR; Western blotting was used to detect the expression level of SOX7; The targeting relationship between lncRNA MALAT1 and miR-124-3p, miR-124-3p and SOX7 were detected by the dual-luciferase reporter system; CCK-8 assay was used to detect cell proliferation activity; Transwell assay was used to detect the migration ability of cells; Angiogenesis of hRMECs cells was measured by *in vitro* tube formation assay.

• **RESULTS:** The expression level of lncRNA MALAT1 in plasma of diabetic retinopathy patients was significantly higher than that of diabetic without retinopathy group and normal control group ($P < 0.001$). *In vitro* glucose culture significantly promoted the expression of lncRNA MALAT1 in hRMECs cells, as well as the proliferation, migration and angiogenesis of hRMECs cells (all $P < 0.05$). Knockdown of lncRNA MALAT1 significantly inhibited the proliferation, migration and tubule formation of hRMECs cells (all $P < 0.05$). Dual-luciferase reporter gene assay showed that lncRNA MALAT1 targeted with miR-124-3p, and miR-124-3p targeted with SOX7. Overexpression of miR-124-3p significantly inhibited the proliferation, migration and tubule formation of hRMECs cells (all $P < 0.05$). Overexpression of lncRNA MALAT1+miR-124-3p, miR-124-3p+SOX7, and knockdown of lncRNA MALAT1+overexpression of SOX7 all significantly eliminated the inhibitory effect of hRMECs cells (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** lncRNA MALAT1 promote the proliferation, migration and angiogenesis of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy by down-regulating the negative regulation of miR-124-3p on SOX7. Therefore, abnormal upregulation of lncRNA MALAT1 in patients with diabetic retinopathy is a potential biomarker.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; lncRNA MALAT1; miR-124-3p; SOX7; angiogenesis

Citation: Chen QB, Xi XT, Ma J, *et al.* Research on the lncRNA MALAT1 promoting the proliferation, migration and angiogenesis of retinal vascular endothelial cells in diabetic retinopathy through the molecular axis of miR-124-3p/SOX7. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(10):1608-1614

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见和严重的并发症之一^[1]。DR 在糖尿病患者中的发病率超过 50%。视网膜血管基底膜增厚、血管内皮细胞异常增殖形成新的血管是 DR 的主要病理特征^[2]。其中,视网膜血管内皮细胞恶性生物学行为加强,引起的微血管功能障碍,或最终导致新生血管形成是危害视网膜功能的主要原因之一^[3]。因此,寻找 DR 患者中与视网膜微血管功能障碍相关的分子并探究其作用机制,有助于发现新的靶标用于诊断或缓解患者微血管功能障碍。近年研究发现,lncRNA MALAT1 是在人类多种恶性肿瘤中的一种高表达且具有促癌作用的 lncRNA。其表达水平可作为肿瘤发生发展、诊断及预后的标志^[4]。lncRNA MALAT1 在体内和体外能显著促进血管内皮细胞的成管能力^[5]。最近研究表明,lncRNA MALAT1 与 DR 的发展相关^[6]。miRNA 在转录后水平调控靶基因表达参与或调控疾病的进展已被大量研究证实。并且异常表达的 miRNA 也被建议作为 DR 诊断生物标志物^[7]。其中,miR-124-3p 在 DR 患者血浆中的表达水平显著降低^[8-9]。并且,有研究表明,体外视网膜血管内皮细胞血管生成过程中 miR-124-3p 的表达显著下调^[10]。SOX7 (Sex-determining region Y-box 7) 在调控心血管系统的发育、内皮细胞向造血细胞转化、动静脉分化等进程中发挥重要作用^[11-12]。研究表明,

SOX7 参与促进和维持视网膜血管系统形成^[13]。Starbase 网站预测结果表明,SOX7 是 miR-124-3p 的一个靶基因。为此,本研究将探讨 lncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴调控视网膜血管内皮细胞增殖、迁移及血管形成的分子机制。深化了解 DR 患者视网膜新生血管的形成,为发展新的分子标记用于诊断或缓解 DR 患者微血管功能障碍提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞株与主要试剂:人视网膜微血管内皮细胞 hRMECs(货号:BNCC340362)购自北纳生物昆明细胞库。DMEM、胎牛血清、胰酶购自 Hyclone;青霉素、链霉素购自阿拉丁试剂;Lipofectamine 2000、Trizol 和逆转录试剂盒购自 Invitrogen;qPCR 定量试剂盒购自 Takara;RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 显色试剂盒、CCK8 试剂盒购自碧云天生物技术公司;Transwell 小室购自 Corning;质粒提取试剂盒、双荧光素报告基因试剂盒购自 Promega;钙黄绿素染色试剂盒购自上海生工;Western blotting 一抗 (Antibody-SOX7、Antibody-GADPH) 和二抗 (羊抗兔) 购自 Abcam;Matrigel 胶购自 BD;MALAT1、miR-124-3p、U6 的引物,miR-124-3p mimic/inhibitor/scramble 以及敲低和过表达实验中用到的 sh-lncRNA MALAT1、SOX7 过表达载体由上海生工代为合成或构建。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 收集 2016-06/2018-12 在云南省第一人民医院就诊的糖尿病患者 (糖尿病组,30 例)、糖尿病视网膜病变患者 (糖尿病视网膜病变组,30 例) 以及健康志愿者 (正常组,30 例) 空腹状态下早晨 6:00~8:00 时间段的静脉血清样本。入选标准参考中华医学会眼底病组通过的 DR 临床诊疗指南 (2014 年)^[14],糖尿病患者和糖尿病视网膜病变患者:血糖 $> 10.0\text{mmol/L}$;正常志愿者对照血清标本:血糖 $< 7.0\text{mmol/L}$ 。本研究通过医院伦理委员会批准,所有研究对象均知情同意。

1.2.2 细胞培养和分组及转染 hRMECs 细胞用 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。检测葡萄糖处理对 lncRNA MALAT1 表达水平的影响实验中,将 hRMECs 细胞分为 4 组培养 96h:阴性对照组 (NC 组),正常对照组 (Control 组,5mmol/L D-葡萄糖)、葡萄糖组 1 (15mmol/L D-葡萄糖)、葡萄糖组 2 (25mmol/L D-葡萄糖)、葡萄糖组 3 (35mmol/L D-葡萄糖)。机制研究实验进行以下分组:正常对照组 (5mmol/L) (I 组);葡萄糖组 (25mmol/L) (II 组);葡萄糖+过表达 miR-124-3p 组 (III 组);葡萄糖+过表达 lncRNA MALAT1+过表达 miR-124-3p 组 (IV 组);葡萄糖+过表达 miR-124-3p+过表达 SOX7 组 (V 组);葡萄糖+敲低 lncRNA MALAT1+过表达 SOX7 组 (VI 组)。

选择生长状况良好的对数期细胞进行实验,0.25% 的胰酶消化,调整密度为 1×10^5 cell/mL,接种到 6 孔板,每孔加 2mL 细胞悬液,培养 24h,待细胞融合度达到 70% 左右,采用 lipofectamine 2000 按上述分组进行转染。将 sh-lncRNA MALAT1、miR-124-3p mimics、pcDNA-SOX7 等分别转染到 hRMECs,并转染相应的阴性对照。所有实验组均设置 3 个复孔。

1.2.3 qRT-PCR 检测 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 的表达水平 RNA 提取试剂盒提取各组细胞的总 RNA, DNA 酶处理后进行逆转录。对逆转录产物采用 SYBR

Green Master Mix 反应体系进行 q-PCR 检测。U6 作内参,检测各组细胞 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 相对表达。反应体系总量 20 μ L。cDNA 产物 2 μ L、上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L)、SYBR Green Mix 10 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,共 40 个循环。测定每个样本的 Ct 值,循环数法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 定量相对表达量。每组样本或细胞检测 3 次,取平均值。

1.2.4 Western blotting 检测 SOX7 表达 离心收集细胞,蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,每孔 50 μ g 上样,10% SDS-PAGE 凝胶分离 1h,转膜,用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液封闭 1h,加入 SOX7 一抗 (1:1000),4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5min,加入 SOX7 二抗 (羊抗兔),37 $^{\circ}$ C 孵育 4h。PBST 缓冲液漂洗 3 次, β -Actin 作内参,显色,成像,Image J 分析目的蛋白的灰度值。实验重复 3 次。

1.2.5 CCK-8 法检测 hRMECs 增殖活力 胰酶消化对数生长期的各组细胞,96 孔板接种细胞,接种量 5×10^4 个/孔,每孔加 100 μ L 培养基,在 48h 后,更换新鲜培养基。检测前每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂,1h 后,用酶标仪测定 450nm 波长处的吸光值 (D_{450nm});每组 3 个复孔,每孔在相同条件下检测 3 次。

1.2.6 Transwell 实验检测 hRMECs 迁移能力 将各实验组细胞与对照组细胞用胰酶处理,用 1% FBS 的完全培养基将细胞稀释至密度 1×10^5 cell/mL,接种于 Transwell 小室 24 孔板,上室加 200 μ L 细胞悬液,下室加 500 μ L 含 10% FBS 的培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 48h,取出小室,用棉签除去微孔膜上室的细胞,PBS 上下冲洗 2 遍,微孔膜下细胞用 5% 的多聚甲醛固定 15min,0.5% 结晶紫溶液染色 15min,显微镜下随机选取 10 个视野 (100 \times),对细胞进行计数;实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 体外培养成管试验检测 hRMECs 血管形成能力 取 96 孔培养板每孔加入 50 μ L Matrigel 胶 (1:2 与预冷 2% 血清 DMEM 稀释),置 37 $^{\circ}$ C 培养箱内 30min 使其凝固,将各组视网膜血管内皮细胞接种于包被 Matrigel 的 96 孔板 (接种细胞数为 1×10^5),置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 箱内孵育;48h 后,吸去培养基,并用 PBS 清洗 2 遍;每孔 1mL 加入 2 μ mol/L 钙黄绿素的 HBSS 溶液,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;用 PBS 缓冲液洗 2 遍;荧光显微镜观察管状结构的形成情况并拍照;Image J 计算形成管状结构的面积 (成管率 = 管状结构的面积/培养孔面积 $\times 100\%$)。其中,每组细胞接种 3 个复孔,结果取平均值。

1.2.8 双荧光素酶报告基因验证 miR-124-3p 与 lncRNA MALAT1 和 SOX7 的靶向作用关系 StarBase 数据库预测结果表明,lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p、miR-124-3p 与 SOX7 之间可能存在直接靶向作用关系。将 lncRNA MALAT1、SOX7 与 miR-124-3p 的可能靶序列及其突变体片段插入 Firefly 荧光素酶报告基因下游,构建相应的表达载体。将 miR-124-3p mimics 与 pmirGLO-lncRNA MALAT1-WT/MUT 或 pmirGLO-SOX7-WT/MUT 共转染到 HEK293 细胞。对照组用 miR-124-3p scramble 与 pmirGLO-lncRNA MALAT1-WT/MUT 或 pmirGLO-SOX7-WT/MUT 共转染。转染实验完成后,细胞继续培养 48h,测荧光强度。每个转染组重复 3 次实验,以 3 次荧光强度

的平均值作为每组的结果数据。

统计学分析:实验结果采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图并进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA MALAT1 在 DR 患者血清中高表达可能与高血糖相关 qRT-PCR 实验结果显示,与正常组患者相比,糖尿病组患者血清 lncRNA MALAT1 的表达显著升高,差异有统计学意义 ($t = 10.48, P < 0.001$)。与糖尿病组患者相比,糖尿病视网膜病变组患者血清中 lncRNA MALAT1 的表达均显著升高,差异有统计学意义 ($t = 8.33, P < 0.001$),见表 1。由此推测,lncRNA MALAT1 表达水平上调可能与糖尿病视网膜病变的发生相关。

2.2 葡萄糖对 hRMECs 增殖及迁移和血管生成的影响 体外培养 hRMECs 细胞发现,与阴性对照组相比,正常对照组 (5mmol/L) lncRNA MALAT1 的表达水平无显著差异 ($t = 0.41, P = 0.704$)。与正常对照组 (5mmol/L) 相比,葡萄糖组 1 (15mmol/L)、葡萄糖组 2 (25mmol/L) 和葡萄糖组 3 (35mmol/L) lncRNA MALAT1 的表达水平呈浓度依赖性上升 ($t = 6.10, 18.57, 18.52$, 均 $P < 0.001$)。由此进一步表明,lncRNA MALAT1 表达上调可能与高血糖相关。CCK-8 检测结果发现,与阴性对照组相比,正常对照组 (5mmol/L) hRMECs 增殖活力无显著差异 ($t = 0.13, P = 0.905$)。与正常对照组 (5mmol/L) 相比,葡萄糖组 1 (15mmol/L) hRMECs 增殖活力无显著差异 ($t = 2.723, P = 0.053$),而葡萄糖组 2 (25mmol/L) 和葡萄糖组 3 (35mmol/L) hRMECs 增殖活力显著升高 ($t = 2.83, 2.98$, 均 $P < 0.05$)。Transwell 实验结果表明,与阴性对照组相比,正常对照组 (5mmol/L) hRMECs 迁移能力无显著差异 ($t = 0.59, P = 0.588$)。与正常对照组 (5mmol/L) 相比,葡萄糖组 1 (15mmol/L)、葡萄糖组 2 (25mmol/L) 和葡萄糖组 3 (35mmol/L) hRMECs 迁移能力均显著提高 ($t = 12.85, 25.24, 25.92$, 均 $P < 0.001$)。此外,体外成管能力结果显示,与阴性对照组相比,正常对照组 (5mmol/L) 管形成能力无显著差异 ($t = 0.49, P = 0.652$)。与正常对照组 (5mmol/L) 相比,葡萄糖组 1 (15mmol/L)、葡萄糖组 2 (25mmol/L) 和葡萄糖组 3 (35mmol/L) 对 hRMECs 成管能力显著提升 ($t = 10.06, 20.83, 21.37$, 均 $P < 0.001$)。且葡萄糖组 2 (25mmol/L) 和葡萄糖组 3 (35mmol/L) 在对 hRMECs

表 1 qRT-PCR 检测 lncRNA MALAT1 的表达水平

(n = 30, $\bar{x}\pm s$)	
组别	lncRNA MALAT1 mRNA
正常组	0.90 \pm 0.107
糖尿病组	1.92 \pm 0.516 ^b
糖尿病视网膜病变组	5.12 \pm 2.219 ^d
F	101.6
P	<0.001

注:正常组:健康志愿者。^b $P < 0.001$ vs 正常组;^d $P < 0.001$ vs 糖尿病组。

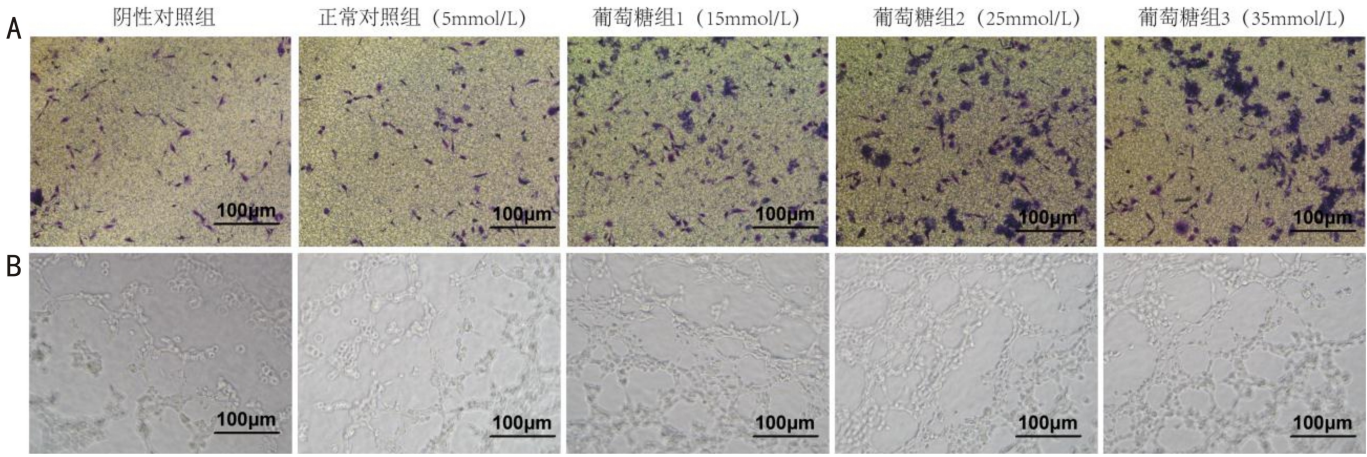


图1 葡萄糖显著促进 hRMECs 迁移和成管能力 A:Transwell 检测细胞迁移;B:血管形成实验检测成管能力。

表2 葡萄糖显著促进 lncRNA MALAT1 mRNA 表达及 hRMECs 增殖、迁移和血管生成 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA MALAT1 mRNA	细胞活力(OD _{450nm})	细胞迁移数目(个/视野)	血管形成率(%)
阴性对照组	1.06±0.046	0.75±0.110	38.33±2.055	19.00±2.944
正常对照组(5mmol/L)	1.08±0.064	0.73±0.171	39.33±1.247	19.33±2.055
葡萄糖组 1(15mmol/L)	3.81±0.629 ^{b,d}	0.98±0.113	58.00±1.633 ^{b,d}	37.00±2.160 ^{b,d}
葡萄糖组 2(25mmol/L)	6.02±0.370 ^{b,d}	1.06±0.090 ^{b,d}	75.33±1.886 ^{b,d}	58.00±1.633 ^{b,d}
葡萄糖组 3(35mmol/L)	6.34±0.396 ^{b,d}	1.12±0.077 ^{b,d}	77.00±1.633 ^{b,d}	57.67±2.494 ^{b,d}
F	93.96	4.11	257.6	239.4
P	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001

注:^bP<0.01 vs 阴性对照组;^dP<0.01 vs 正常对照组。

增殖活力、迁移和管形成无显著差异($t=1.085, 0.61, 0.61$, $P=0.339, 0.573, 0.573$), 见图1, 表2, 因此, 后续实验葡萄糖组浓度采用25mmol/L进行。由此可见, 高浓度葡萄糖可在一定程度上促进 hRMECs 的增殖、迁移和血管生成。

2.3 敲低 lncRNA MALAT1 显著抑制 hRMECs 增殖及迁移和成管能力 qRT-PCR 检测结果显示, 与正常对照组(5mmol/L)相比, 葡萄糖组 2(25mmol/L) lncRNA MALAT1 的表达水平显著升高($t=11.02, P<0.001$)。与葡萄糖组 2(25mmol/L)相比, 敲低 lncRNA MALAT1 后则显著降低($t=13.97, P<0.001$)。CCK-8 实验结果表明, 与正常对照组(5mmol/L)组相比, 葡萄糖组 2(25mmol/L) hRMECs 的细胞活力显著增强($t=3.53, P=0.024$)。与葡萄糖组 2(25mmol/L)相比, 敲低 lncRNA MALAT1 减弱了葡萄糖对 hRMECs 增殖活力的促进作用($t=5.02, P=0.0074$)。Transwell 和体外成管培养检测结果分别表明, 与正常对照组(5mmol/L)相比, 葡萄糖组 2(25mmol/L) hRMECs 的迁移能力显著增强、成管率显著上升($t=29.43, 23.88$, 均 $P<0.001$)。与葡萄糖组 2(25mmol/L)相比, 敲低 lncRNA MALAT1 后则逆转了这一过程($t=18.37, 19.60$, 均 $P<0.001$), 见图2, 表3。由此可见, 敲低 lncRNA MALAT1 可显著抑制葡萄糖对 hRMECs 增殖、迁移和血管生成能力的促进作用。

2.4 miR-124-3p 与 lncRNA MALAT1 和 SOX7 的靶向作用关系 StarBase 网站预测结果显示, lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p, miR-124-3p 与 SOX7 可能存在靶向结合关系(图3A)。双荧光素酶报告基因实验结果表明, miR-124-3p mimics 与 pmirGLO-lncRNA MALAT1-WT、

pmirGLO-SOX7-WT 共转染实验组, 荧光素酶活性显著低于 miR-NC(miR-124-3p 阴性对照)组(1 ± 0.024 vs $0.39 \pm 0.042, 1 \pm 0.082$ vs $0.45 \pm 0.017, t=17.68, 9.27$, 均 $P<0.001$, 图3B,C), 而 miR-124a-3p mimics 与 pmirGLO-lncRNA MALAT1-MUT、pmirGLO-SOX7-MUT 共转染组, 荧光素酶活性与 miR-NC 组相比无显著差异(1.01 ± 0.065 vs $1.00 \pm 0.041, 1.05 \pm 0.029$ vs $1.04 \pm 0.031, t=0.12, 0.11, P=0.909, 0.916$, 图3B,C)。qRT-PCR 检测结果显示, 与 sh-NC(sh-lncRNA MALAT1)组相比, sh-lncRNA MALAT1 组 miR-124-3p 基因表达水平显著升高(0.99 ± 0.034 vs $6.92 \pm 0.509, t=16.44, P<0.001$, 图3D)。Western blot 检测结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-124-3p mimic 组 SOX7 蛋白表达水平显著性降低(1.26 ± 0.072 vs $0.73 \pm 0.37, t=9.27, P<0.001$, 图3E)。总之, 本研究结果表明, lncRNA MALAT1 负调控 miR-124-3p, miR-124-3p 负调控 SOX7。

2.5 lncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴促进 hRMECs 增殖及迁移和体外成管能力 与 I 组相比, II 组 miR-124-3p 表达显著下调($t=9.13, P<0.001$)。与 II 组相比, III 组 miR-124-3p 表达显著上调($t=11.27, P<0.001$); 与 III 组相比, IV、V、VI 组 miR-124-3p 表达显著下调($t=9.89, 8.10, 8.87$, 均 $P<0.01$)。CCK-8 实验结果表明, 与 I 组相比, II 组细胞增殖活力显著升高($t=3.18, P=0.033$)。与 II 组相比, III 组细胞增殖活力显著下降($t=3.30, P=0.030$); 与 III 组相比, IV、V、VI 组细胞增殖活力显著升高($t=3.84, 3.03, 3.00, P=0.019, 0.039, 0.040$)。Transwell 实验结果表明, 与 I 组相比, II 组细胞迁移能力

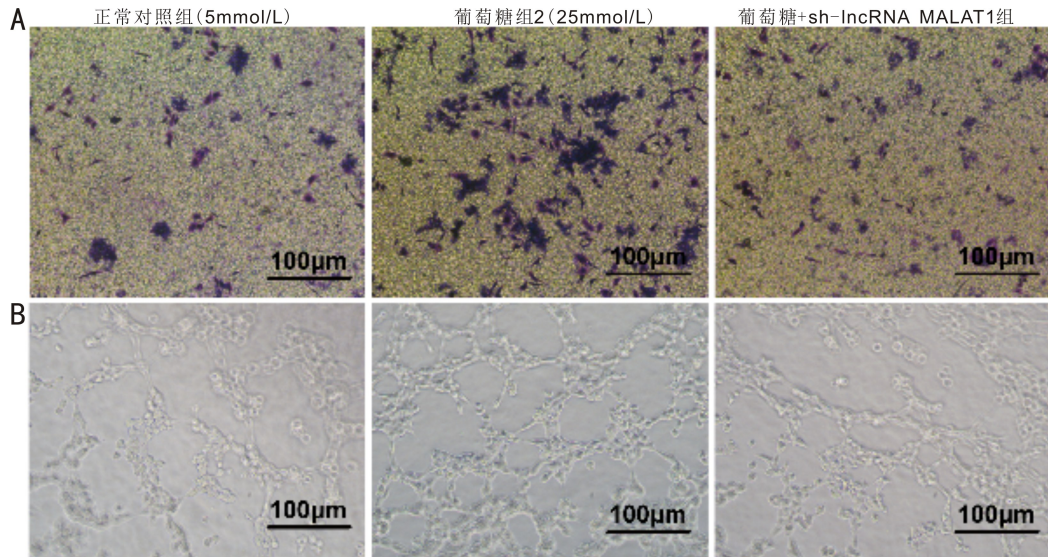


图2 敲低 lncRNA MALAT1 显著抑制 hRMECs 迁移和成管能力 A:Transwell 检测细胞迁移;B:血管形成实验检测成管能力。

表3 敲低 lncRNA MALAT1 显著抑制 hRMECs 增殖、迁移和成管能力

($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA MALAT1 mRNA	细胞活力(OD _{450nm})	细胞迁移数目(个/视野)	血管形成率(%)
正常对照组(5mmol/L)	1.07±0.050	0.65±0.179	39.33±1.247	20.33±2.494
葡萄糖组 2(25mmol/L)	6.80±0.733 ^b	1.13±0.071 ^a	79.67±3.859 ^b	59.00±2.160 ^b
葡萄糖+sh-lncRNA MALAT1 组	2.59±0.145 ^d	0.74±0.094 ^d	45.67±2.055 ^d	27.67±2.867 ^d
F	94.16	8.469	401.3	324.3
P	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 正常对照组(5mmol/L);^d $P<0.01$ vs 葡萄糖组 2(25mmol/L)。

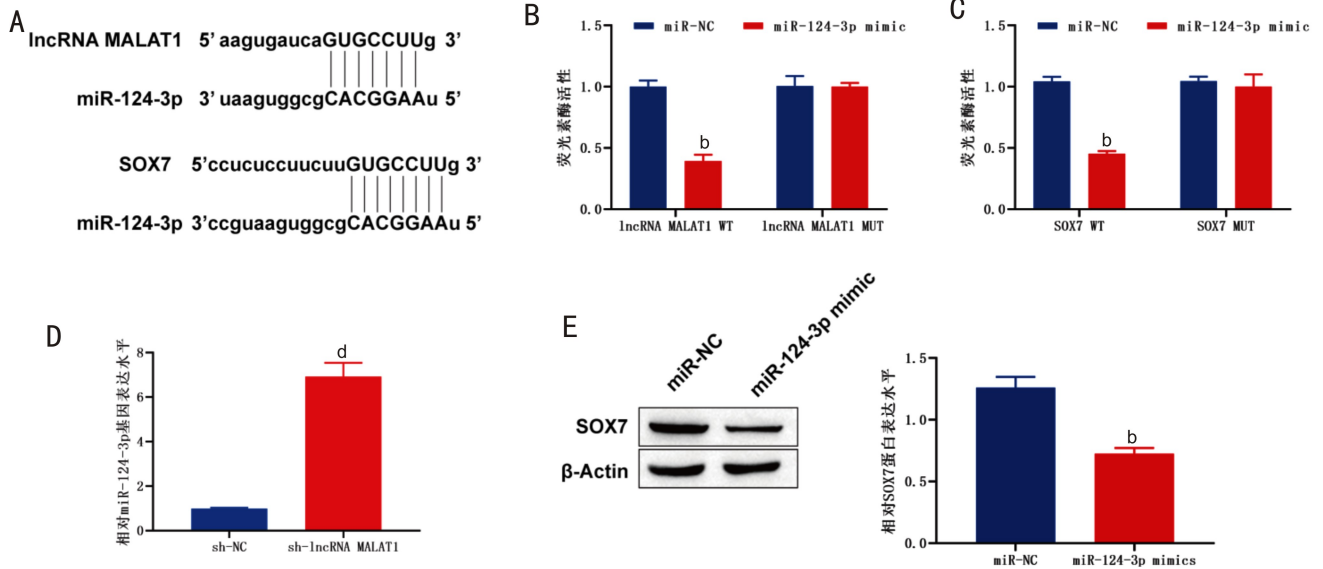


图3 miR-124-3p 与 lncRNA MALAT1 和 SOX7 的靶向作用关系 A:StarBase 网站预测 lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p、miR-124-3p 与 SOX7 靶向结合关系;B:双荧光素酶报告基因检测证明 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 靶向结合;C:双荧光素酶报告基因检测证明 miR-124-3p 和 SOX7 靶向结合;D:qRT-PCR 检测 miR-124-3p 的表达水平;E:Western blot 检测 SOX7 蛋白表达水平。
^b $P<0.01$ vs miR-NC 组;^d $P<0.01$ vs sh-NC 组。

显著上升($t=45.32, P<0.001$)。与 II 组相比, III 组细胞迁移能力显著降低($t=61.24, P<0.001$);与 III 组相比, IV、V、VI 组细胞迁移能力显著提高($t=61.24, 55.11, 52.66$, 均 $P<0.001$)。管形成实验结果表明,与 I 组相比, II 组细胞管形成能力显著提高($t=25.27, P<0.001$)。与 II 组相比, III 组细胞管形成能力显著降低($t=28.86, P<0.001$);与 III

组相比, IV、V、VI 组细胞管形成能力显著提高($t=28.06, 20.79, 27.20$, 均 $P<0.001$), 见图 4, 表 4。进一步分析发现 miR-124-3p 与 lncRNA MALAT1 和 SOX7 的靶向结合序列相同, 由此可知 lncRNA MALAT1 与 SOX7 竞争结合 miR-124-3p, 降低 miR-124-3p 对 SOX7 负调控作用, 促进 hRMECs 增殖、迁移和血管形成。

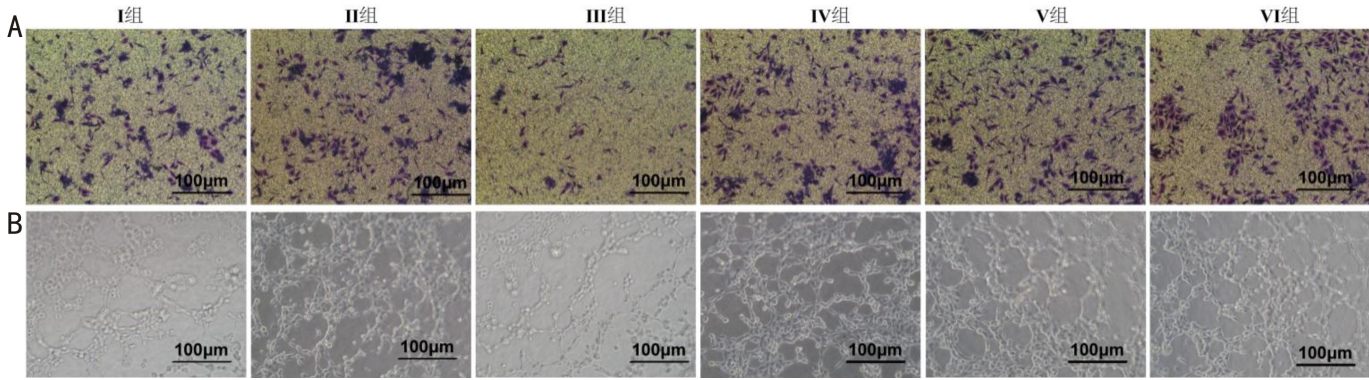


图4 IncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴促进 hRMECs 迁移和成管能力 A: Transwell 检测细胞迁移; B: 血管形成实验检测成管能力。

表4 IncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/SOX7 分子轴促进 hRMECs 增殖、迁移和体外成管能力 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	miR-124-3p mRNA	细胞活力 (OD _{450nm})	细胞迁移数目 (个/视野)	血管形成率 (%)
I 组	1.07±0.049	0.78±0.149	37.33±3.859	19.33±2.867
II 组	0.69±0.032 ^a	1.28±0.167 ^a	79.00±2.944 ^a	60.33±2.867 ^a
III 组	1.77±0.132 ^c	0.75±0.157 ^c	25.67±2.055 ^c	21.33±2.055 ^c
IV 组	0.82±0.035 ^e	1.38±0.174 ^e	75.00±2.944 ^e	56.33±2.055 ^e
V 组	0.86±0.088 ^e	1.23±0.161 ^e	71.00±1.633 ^e	56.00±5.354 ^e
VI 组	0.81±0.077 ^e	1.16±0.113 ^e	68.33±2.494 ^e	53.00±2.944 ^e
F	52.65	6.02	1386	310.5
P	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001

注: I 组: 正常对照组 (5mmol/L); II 组: 葡萄糖组 (25mmol/L); III 组: 葡萄糖+过表达 miR-124-3p 组; IV 组: 葡萄糖+过表达 IncRNA MALAT1+过表达 miR-124-3p 组; V 组: 葡萄糖+过表达 miR-124-3p+过表达 SOX7 组; VI 组: 葡萄糖+敲低 IncRNA MALAT1+过表达 SOX7 组。^aP<0.05 vs I 组; ^cP<0.05 vs II 组; ^eP<0.05 vs III 组。

3 讨论

高血糖可能是诱发 DR 的一个重要因素, DR 患者长期的高血糖可能直接或间接促进视网膜血管形成和血液-视网膜屏障的破坏^[15]。近年研究表明 IncRNA 参与了 DR 的发生和发展, DR 患者血浆中异常表达的 IncRNA 可能成为一种新的预后指标和治疗靶点^[16]。IncRNA MALAT1 是一个与在眼部疾病发生发展相关的 IncRNA。IncRNA MALAT1 在糖尿病性白内障患者前晶状体囊组织中高表达, 体外葡萄糖处理显著促进 IncRNA MALAT1 在人晶状体上皮细胞中的表达, 并通过激活 p38/MAPK 信号通路促进晶状体上皮细胞 HLECs 的凋亡和氧化应激^[17]。增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR) 中, IncRNA MALAT1 在视网膜色素上皮 (RPE) 细胞中高表达, 并促进 RPE 细胞的增殖和迁移^[18]。最近研究表明 IncRNA MALAT1 可作为筛查 DR 和 NPDR 早期诊断以避免进展为 PDR 的无创生物标志物^[19]。IncRNA MALAT1 在糖尿病小鼠视网膜、高糖处理的 RF/6A 细胞以及糖尿病患者的体液样本中均显著上调^[20]。体外实验中敲低 IncRNA MALAT1 显著抑制内皮细胞增殖, 体内实验中 IncRNA MALAT1 基因敲除降低新生小鼠视网膜血管生成^[21]。由上述多项研究结果可知 IncRNA MALAT1 在 DR 中高表达可能促进视网膜微血管的形成。miRNAs 参与糖尿病及其慢性并发症的发病机制, 异常表达的 miRNAs 可作为糖尿病并发症发生发展的生物标志物^[22-23]。DR 患者中异常表达的 miRNA 参与细胞增殖、迁移、凋亡、炎症反应、氧化应

激及血管生成等生物学过程的调控。Walz 等通过分析视网膜病变患者和正常人的 miRNA 的转录组发现 10 个异常表达的 miRNA, 其中, miR-124-3p 在视网膜病变血管形成过程中表达水平显著下调^[8]。体外实验发现 miR-124-3p 表达下调与癌细胞的增殖、迁移、上皮间质转化及血管形成等恶性生物学行为相关^[24-26]。

SOX7 是 SOX 家族成员之一, 在细胞增殖、分化、迁移, 血管生成等过程中具有重要调控作用。SOX7 在血管内皮细胞中特异性表达, SOX7 缺失导致胚胎致死性和小鼠血管生成严重受损^[27]。SOX7 在调控血管形成的主要途径, 包括 VEGF/Flk1 信号通路、Wnt 信号通路和 Notch 通路^[12]; 同时, SOX7 作为 VEGF 信号的正反馈调节因子, 促进血管生成^[28]。

本研究发现, IncRNA MALAT1 在 DR 患者血浆中高表达, 体外高浓度的葡萄糖培养显著促进 IncRNA MALAT1 在 hRMECs 中的表达, IncRNA MALAT1 通过降低 miR-124-3p 对 SOX7 的负调控作用而促进葡萄糖诱导的 hRMECs 增殖、迁移和血管形成。因此, 在 DR 患者中抑制 IncRNA MALAT1 的水平可能有助于缓解视网膜微血管功能障碍。

参考文献

- Cheung CY, Tang FY, Ting DSW, et al. Artificial intelligence in diabetic eye disease screening. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2019 [Online ahead of print]
- Park JC, Chau FY, Lim JI, et al. Electrophysiological and

pupillometric measures of inner retina function in nonproliferative diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol* 2019;139(2):99-111

3 Capitão M, Soares R. Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy. *J Cell Biochem* 2016;117(11):2443-2453

4 Li ZX, Zhu QN, Zhang HB, et al. MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res* 2018;10:6757-6768

5 Huang XJ, Xia Y, He GF, et al. MALAT1 promotes angiogenesis of breast cancer. *Oncol Rep* 2018;40(5):2683-2689

6 Wang CY, Qu YY, Suo R, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates angiogenesis following oxygen - glucose deprivation/reoxygenation. *J Cell Mol Med* 2019;23(4):2970-2983

7 Mazzeo A, Lopatina T, Gai C, et al. Functional analysis of miR-21-3p, miR-30b-5p and miR-150-5p shuttled by extracellular vesicles from diabetic subjects reveals their association with diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2019;184:56-63

8 Platania CBM, Maisto R, Trotta MC, et al. Retinal and circulating miRNA expression patterns in diabetic retinopathy: an in silico and in vivo approach. *Br J Pharmacol* 2019;176(13):2179-2194

9 Liang Z, Gao KP, Wang YX, et al. RNA sequencing identified specific circulating miRNA biomarkers for early detection of diabetes retinopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018;315(3):E374-E385

10 Walz JM, Wecker T, Zhang PP, et al. Impact of angiogenic activation and inhibition on miRNA profiles of human retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2019;181:98-104

11 Lilly AJ, Lacaud G, Kouskoff V. SOXF transcription factors in cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol* 2017;63:50-57

12 Wat JJ, Wat MJ. Sox7 in vascular development: review, insights and potential mechanisms. *Int J Dev Biol* 2014;58(1):1-8

13 Zhou YL, Williams J, Smallwood PM, et al. Sox7, Sox17, and Sox18 cooperatively regulate vascular development in the mouse retina. *PLoS One* 2015;10(12):e0143650

14 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014年). *中华眼科杂志* 2014;50(11):851-865

15 Nawaz IM, Rezzola S, Cancarini A, et al. Human vitreous in proliferative diabetic retinopathy: characterization and translational implications. *Prog Retin Eye Res* 2019;72:100756

16 Chang XY, Zhu GM, Cai ZY, et al. miRNA, lncRNA and circRNA: targeted molecules full of therapeutic prospects in the development of

diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:771552

17 Gong WF, Zhu GY, Li J, et al. lncRNA MALAT1 promotes the apoptosis and oxidative stress of human lens epithelial cells via p38MAPK pathway in diabetic cataract. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;144:314-321

18 Yang S, Yao HP, Li M, et al. Long non-coding RNA MALAT1 mediates transforming growth factor Beta1 - induced epithelial - mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 2016;11(3):e0152687

19 Shaker OG, Abdelaleem OO, Mahmoud RH, et al. Diagnostic and prognostic role of serum miR - 20b, miR - 17 - 3p, HOTAIR, and MALAT1 in diabetic retinopathy. *IUBMB Life* 2019;71(3):310-320

20 Liu JY, Yao J, Li XM, et al. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis* 2014;5(10):e1506

21 Michalik KM, You XT, Manavski Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res* 2014;114(9):1389-1397

22 Gong QY, Su GF. Roles of miRNAs and long noncoding RNAs in the progression of diabetic retinopathy. *Biosci Rep* 2017; 37(6):BSR20171157

23 Biswas S, Chakrabarti S. Increased extracellular matrix protein production in chronic diabetic complications: implications of non-coding RNAs. *Noncoding RNA* 2019;5(1):E30

24 Yan GL, Li YH, Zhan L, et al. Decreased miR-124-3p promoted breast cancer proliferation and metastasis by targeting MGAT5. *Am J Cancer Res* 2019;9(3):585-596

25 Wang JR, Liu B, Zhou L, et al. microRNA-124-3p suppresses cell migration and invasion by targeting ITGA3 signaling in bladder cancer. *Cancer Biomark* 2019;24(2):159-172

26 Long HD, Ma YS, Yang HQ, et al. Reduced hsa-miR-124-3p levels are associated with the poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* 2018;45(6):2615-2623

27 Kim K, Kim IK, Yang JM, et al. SoxF transcription factors are positive feedback regulators of VEGF signaling. *Circ Res* 2016;119(7):839-852

28 Lilly AJ, Mazan A, Scott DA, et al. SOX7 expression is critically required in FLK1-expressing cells for vasculogenesis and angiogenesis during mouse embryonic development. *Mech Dev* 2017;146:31-41