

miR-519d-3p 靶向 HIF-1 α 抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞功能障碍及血管生成

蔡 晖¹, 宋 颖², 石华宗¹, 杨豫湘³

引用:蔡晖,宋颖,石华宗,等. miR-519d-3p 靶向 HIF-1 α 抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞功能障碍及血管生成. 国际眼科杂志 2023;23(7):1087-1092

作者单位:¹(435000)中国湖北省黄石市第二医院眼科;
²(250013)中国山东省济南市,山东省军区济南第十一离职干部休养所;
³(435005)中国湖北省黄石市第五医院眼科
作者简介:蔡晖,毕业于长江大学,副主任医师,研究方向:青光眼、白内障、视网膜疾病。

通讯作者:蔡晖. caihui2015yk@163.com

收稿日期:2022-10-31 修回日期:2023-06-05

摘要

目的:明确 miR-519d-3p 对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)功能障碍与血管生成的影响,并阐明其对低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的调控机制。

方法:通过 5、30mmol/L 葡萄糖分别诱导 HRMEC 建立正常(NG)和高糖(HG)细胞模型。将 HRMEC 分为对照组(HG 细胞模型转染阴性对照模拟物)、甘露醇组(对照组加入 25mmol/L 甘露醇)、miR-519d-3p 过表达组(HG 细胞模型转染 miR-519d-3p 模拟物)、miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组(HG 细胞模型共转染 miR-519d-3p 模拟物和 HIF-1 α 过表达载体)。实时荧光定量 PCR 法检测各组 miR-519d-3p 的表达情况。Western blotting 法检测各组 HIF-1 α 蛋白的表达情况。荧光素酶报告基因实验检测 miR-519d-3p 和 HIF-1 α 的结合位点情况。CCK-8 法检测各组细胞增殖情况。Hoechst 33342 染色法检测各组细胞凋亡情况。ELISA 法检测各组细胞外液炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 蛋白的表达情况。小管形成实验检测各组新生毛细血管管腔样结构形成情况。

结果:与 NG 相比,HG 细胞模型中 miR-519d-3p 表达显著减少,而 HIF-1 α 蛋白表达显著增加(均 $P < 0.01$)。与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组中 HIF-1 α 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。miR-519d-3p 中“CGUGAAA”序列可以与 HIF-1 α 3'-非编码区(3'-UTR)中“GCACUUU”序列特异性结合。与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组细胞 24、48、72h 吸光度值均显著增加,细胞凋亡率显著减少,细胞外液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均显著减少,新生毛细血管管腔样结构数量显著减少(均 $P < 0.01$)。与 miR-519d-3p 过表达组比较,miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组细胞 24、48、72h 吸光度值均显著减少,细胞凋亡率显著增加,细胞外液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均显著增加,新生毛细血管管腔样结构数量显著增加(均 $P < 0.01$)。对照组和甘露醇组中上述各指标比较无差异(均 $P > 0.05$)。

结论:高糖诱导 HRMEC 模型中 miR-519d-3p 表达下调,而 HIF-1 α 蛋白表达上调。HIF-1 α 是 miR-519d-3p 的靶基因,miR-519d-3p 靶向 HIF-1 α 增加细胞增殖并降低细胞凋亡和炎症反应,从而减轻高糖诱导的 HRMEC 功能障碍并抑制血管生成。

关键词:miR-519d-3p;高糖;人视网膜微血管内皮细胞;功能障碍;低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.7.06

miR-519d-3p alleviates high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells dysfunction and inhibits angiogenesis by targeting hypoxia inducible factor 1 subunit alpha

Hui Cai¹, Ying Song², Hua - Zong Shi¹, Yu - Xiang Yang³

¹Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, Hubei Province, China; ²Jinan's Eleventh Retired Cadres Recuperation Center of Shandong Provincial Military Region, Jinan 250013, Shandong Province, China; ³Department of Ophthalmology, the Fifth Hospital of Huangshi, Huangshi 435005, Hubei Province, China

Correspondence to: Hui Cai. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, Hubei Province, China. caihui2015yk@163.com

Received:2022-10-31 Accepted:2023-06-05

Abstract

• AIM: To clarify the effect of miR-519d-3p on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) dysfunction and angiogenesis, and to elucidate the regulatory mechanism of miR-519d-3p on hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF-1 α).

• METHODS: The normal glucose (NG) and high glucose (HG) cell models were established by inducing HRMEC with 5 and 30 mmol/L glucose, respectively. Control group: HG cell model was transfected with negative control mimics; mannitol group: the control group was added with 25 mmol/L mannitol; miR-519d-3p overexpression group: HG cell model was transfected with miR-519d-3p mimics; miR-519d-3p combined with HIF-1 α overexpression group: HG cell model was co-transfected with miR-519d-3p mimics and HIF-1 α overexpression vector. The expression of miR-519d-3p in

each group was tested by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of HIF-1 α protein in each group was tested by Western blotting. The binding sites between miR-519d-3p and HIF-1 α were detected by luciferase reporter gene assay. The cell proliferation of each group was detected by CCK-8. The cell apoptosis of each group was tested by Hoechst 33342 staining. The protein expression of extracellular fluid inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6 in each group was tested by ELISA. The formation of new capillary lumen-like structures was detected by tubule formation assay.

• **RESULTS:** Compared with the NG, miR-519d-3p expression was significantly reduced in the HG cell model, while HIF-1 α protein expression was significantly increased in the HG (all $P < 0.01$). Compared with the control group, HIF-1 α protein expression was significantly reduced in the miR-519d-3p overexpression group ($P < 0.01$). The "CGUGAAA" sequence of miR-519d-3p could specifically bind to the "GCACUUU" sequence of HIF-1 α 3'-untranslated region (3'-UTR). Compared with the control group, the miR-519d-3p overexpression group showed a significant increase in 24, 48 and 72h absorbance values, a significant decrease in cell apoptotic rate, a significant decrease in the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6, and a significant decrease in the number of new capillary lumen-like structures (all $P < 0.01$). Compared with the miR-519d-3p overexpression group, the miR-519d-3p combined with HIF-1 α overexpression group showed a significant decrease in 24, 48 and 72h absorbance values, a significant increase in cell apoptotic rate, a significant increase in the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6, and a significant increase in the number of new capillary lumen-like structures (all $P < 0.01$). There was no difference between the control group and mannitol group in the comparison of the above indicators (all $P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** miR-519d-3p expression is down-regulated while HIF-1 α protein expression is up-regulated in high glucose induced HRMEC model. HIF-1 α is a target gene of miR-519d-3p. The miR-519d-3p targets HIF-1 α to increase cell proliferation and reduce cell apoptosis and inflammation, thereby alleviating high glucose-induced HRMEC dysfunction and inhibiting angiogenesis.

• **KEYWORDS:** miR-519d-3p; high glucose; human retinal microvascular endothelial cell; dysfunction; hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF-1 α)

Citation: Cai H, Song Y, Shi HZ, *et al.* miR-519d-3p alleviates high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells dysfunction and inhibits angiogenesis by targeting hypoxia inducible factor 1 subunit alpha. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23(7):1087-1092

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)作为糖尿病患者眼部的最常见并发症,是导致视力下降、甚至失明的主要原因^[1]。目前全球 DR 患者超过 9300 万,伴随

糖尿病发病率的持续攀升和发病年龄逐渐年轻化,DR 已成为全球性的公共卫生问题。目前针对 DR 的治疗方法,如抗血管内皮生长因子药物的使用、玻璃体内注射类固醇激素、激光光凝和手术治疗等,虽然可以部分缓解疾病进展,但疗效仍不能令人满意^[2]。DR 的主要病理变化是视网膜微血管病变,与高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells, HRMEC)功能障碍和血管生成增加密切相关。因此,如何逆转 HRMEC 功能障碍和抗血管生成是眼科专业领域亟需解决的关键问题。作为一类非编码 RNA,微小核糖核酸(microRNA, miRNA)参与多种病理生理过程,包括调节细胞增殖、凋亡、分化和各种代谢过程,维持干细胞的干性潜能,参与炎症和免疫反应等^[3]。近期研究发现,miR-519d-3p参与调控肿瘤进展、骨关节炎和心肌梗死等疾病进展^[4-6],但在 DR 中的研究较少。本团队前期已报道,低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1 α)在视网膜内皮细胞增殖、炎症、血管生成等方面具有重要作用^[7],但调控 HIF-1 α 的 miRNA 尚不清楚。基于生物信息学分析推测 HIF-1 α 可能是 miR-519d-3p 的靶基因,值得对该现象进行进一步研究。基于以上依据,本研究采用高糖诱导 HRMEC 制作细胞模型,旨在明确 miR-519d-3p 对高糖诱导的 HRMEC 功能障碍和血管生成的影响,并阐明其对 HIF-1 α 的调控机制,以期从细胞层面证实 miR-519d-3p/HIF-1 α 轴在 DR 中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料 HRMEC,由中山大学中山眼科中心提供;内皮细胞培养基(1001)、胎牛血清、生长因子、青霉素/链霉素溶液,上海中乔新舟生物科技有限公司;D-(+)-葡萄糖(ST1228)、细胞增殖/毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)(C0038)、Hoechst 33342 染色试剂盒(C1029),上海碧云天生物技术公司;阴性对照模拟物(5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')、miR-519d-3p 模拟物(5'-CAAAGUGCCUCCUUUAGAGUG-3')、HIF-1 α 过表达载体[将 HIF-1 α mRNA(NM_001530.4)编码区序列插入 pcDNA3.1(+)载体构建],上海吉玛基因公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒(L3000-015),美国赛默飞世尔科技公司;实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(638315),北京宝日医生物技术公司;HIF-1 α 抗体(ab179483)、 β -肌动蛋白(β -actin)(ab8227)抗体,上海艾博抗公司;酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)相关人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒(EH0302)、人白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 检测试剂盒(EH0185)、人 IL-6 检测试剂盒(EH0201),武汉菲恩生物科技有限公司;Matrigel 基质胶(354234),美国康宁公司;HIF-1 α 野生型报告载体[包含 miR-519d-3p 结合位点(HIF-1 α -wt)]、HIF-1 α 突变型报告载体[不包含 miR-519d-3p 结合位点(HIF-1 α -mut)],广州伯信生物科技公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒(E1910),美国普洛麦格公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HRMEC 复苏后采用内皮细胞培养基进

行培养,培养箱条件设定为 37℃、5% CO₂、95%空气。当细胞生长至约 90%融合时,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,按 1:4 传代培养。当细胞传至 2~3 代后,取生长状态良好的细胞进行实验。

1.2.2 制作高糖细胞模型 将 D-(+)-葡萄糖用适量 PBS 溶液配制成 5、30mmol/L 浓度。取 HRMEC 在 6 孔板中铺板,每孔细胞数约为 5×10⁶ 个。向细胞中分别加入 5、30mmol/L 浓度葡萄糖培养 48h,建立正常 (NG) 和高糖 (HG) 细胞模型。

1.2.3 实验分组和细胞转染 对照组:HG 细胞模型转染阴性对照模拟物;甘露醇组:在对照组基础上加入 25mmol/L 甘露醇;miR-519d-3p 过表达组:HG 细胞模型转染 miR-519d-3p 模拟物;miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组:HG 细胞模型共转染 miR-519d-3p 模拟物和 HIF-1α 过表达载体。取 HRMEC 在 6 孔板中铺板,每孔细胞数约为 5×10⁶ 个,培养过夜。当细胞生长至约 70%~90%融合时,利用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行细胞转染。对照组、甘露醇组、miR-519d-3p 过表达组、miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组分别转染 100pmol 阴性对照模拟物、100pmol 阴性对照模拟物、100pmol miR-519d-3p 模拟物、50pmol miR-519d-3p 和 2.0μg HIF-1α 过表达载体。继续培养 24h 后,收集细胞供后续使用。

1.2.4 实验指标

1.2.4.1 实时荧光定量 PCR 法检测各组 miR-519d-3p 的表达情况 提取各组细胞总 RNA,并逆转录为 cDNA。利用 cDNA 作为模版在 ABI 7100 荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应。扩增条件为:95℃ 20min,随后 95℃ 10s,58℃ 30s,72℃ 30s,共 40 个循环。miR-519d-3p 引物:5'-CAAAGTGCCTCCCTTTAGAGTG-3' (正向),5'-CGCAGGGTCCGAGGTATTC-3' (反向);U6 引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' (正向),5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' (反向)。以 U6 为内参对照,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组中 miR-519d-3p 的相对表达水平。

1.2.4.2 Western blotting 法检测各组 HIF-1α 蛋白的表达情况 采用 RIPA 蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。取 40μg 总蛋白依次进行电泳、转膜和封闭过程。随后加入 HIF-1α 抗体 (1:1000 稀释)4℃ 过夜,以 β-actin 抗体 (1:10000 稀释)为内参对照。第 2d 利用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (1:5000)37℃ 孵育 1h 后,暗室添加超敏发光液并曝光胶片。利用 Quantity-one 软件对蛋白条带进行定量分析,计算 HIF-1α 蛋白的相对表达水平。

1.2.4.3 荧光素酶报告基因实验检测 miR-519d-3p 和 HIF-1α 的结合位点情况 取对照组和 miR-519d-3p 过表达组细胞在 24 孔板中铺板,每孔细胞数约为 2×10⁵ 个,培养过夜。利用 Lipofectamine 3000 转染试剂向细胞中分别转染 0.8μg HIF-1α-wt 和 0.8μg HIF-1α-mut 报告载体。培养 24h 后,裂解细胞,利用荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各组萤火虫荧光值和海肾荧光值。以萤火虫荧光值为内参对照,计算相对荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=(海肾荧光值/萤火虫荧光值)×100%。

1.2.4.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况 取各组细胞在 96 孔板中铺板,每孔细胞数约为 7×10³ 个。培养 24、48、72h 后分别向细胞中加入 12μL CCK-8 溶液,继续培养 3h。采用多功能酶标仪测定各组 450nm 波长时的吸光度 (A) 值。

1.2.4.5 Hoechst 33342 染色法检测各组细胞凋亡情况 取各组细胞在 24 孔板细胞爬片中铺板,每孔细胞数约为 2×10⁵ 个,培养 48h。取出细胞爬片,采用 4% 多聚甲醛 37℃ 固定 30min,并以 5% 牛血清白蛋白 37℃ 封闭 1.5h。利用 Hoechst 33342 溶液在暗室中染色 2min,通过荧光显微镜观察凋亡细胞,并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=[凋亡细胞数量(5 个随机视野)/总细胞数量(5 个随机视野)]×100%。

1.2.4.6 ELISA 法检测各组细胞外液 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白的表达情况 取各组细胞在 24 孔板中铺板,每孔细胞数约为 2×10⁵ 个,培养 48h。收集各组细胞外液,将细胞外液加入反应板中 37℃ 孵育 1h,并加入生物素化抗体工作液 37℃ 孵育 1h。随后加入酶结合物工作液 37℃ 避光孵育 30min。最后加入显色底物 37℃ 避光孵育 15min。通过多功能酶标仪分析各组 450nm 波长下的 A 值,对比标准曲线,计算 TNF-α、IL-1β、IL-6 浓度。

1.2.4.7 小管形成实验检测各组新生毛细血管管腔样结构形成情况 将 24 孔板用 Matrigel 基质胶均匀铺垫,放置 30min 使其硬化。取各组细胞在 24 孔板中铺板,每孔细胞数约为 2×10⁵ 个,培养 24h。采用倒置显微镜观察新生毛细血管样结构形成情况。采用 Image-J 软件计算各组单个视野下新生毛细血管管腔样结构数量。

统计学分析:采用 SPSS 28.0 软件进行统计学分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态性分析,符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;三组间比较采用单因素方差分析,事后组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NG 和 HG 细胞模型中 miR-519d-3p 和 HIF-1α 蛋白的表达情况比较 实时荧光定量 PCR 法检测 NG 和 HG 细胞模型中 miR-519d-3p 的表达水平分别为 0.039±0.005 和 0.022±0.003,且与 NG 比较,HG 中 miR-519d-3p 表达水平显著减少,差异有统计学意义 (*t* = 9.62, *P* < 0.01)。Western blotting 法检测 NG 和 HG 细胞模型中 HIF-1α 蛋白的表达水平分别为 0.104±0.009 和 0.627±0.044,且与 NG 比较,HG 中 HIF-1α 蛋白表达水平显著增加,差异有统计学意义 (*t* = 26.53, *P* < 0.01),见图 1。

2.2 各组细胞中 miR-519d-3p 和 HIF-1α 蛋白的表达情况比较 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 miR-519d-3p 的表达情况比较,差异有统计学意义 (*F* = 171.89, *P* < 0.01),且与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组和 miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组细胞中 miR-519d-3p 表达水平均显著增加,差异有统计学意义 (*t* = 38.90、29.16,均 *P* < 0.01)。Western blotting 法检测各组细胞中 HIF-1α 蛋白的表达情况比较,差异有统计学意义 (*F* = 126.53, *P* < 0.01),且与对照组比较,miR-519d-3p 过表达

组细胞中 HIF-1 α 蛋白表达水平显著减少,而 miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组细胞中 HIF-1 α 蛋白表达水平显著增加,差异有统计学意义($t = 16.21, 44.72$, 均 $P < 0.01$)。对照组和甘露醇组细胞中 miR-519d-3p 和 HIF-1 α 蛋白的表达情况比较,差异无统计学意义($t = 0.17, 0.13$, 均 $P > 0.05$),见图 2,表 1。

2.3 miR-519d-3p 和 HIF-1 α 的结合位点检测 生物信息学分析显示,HIF-1 α 可能是 miR-519d-3p 的靶基因,miR-519d-3p 中“CGUGAAA”序列可以与 HIF-1 α 3'-非编码区(3'-UTR)中“GCACUUU”序列特异性结合,见图 3。荧光素酶报告基因实验检测对照组和 miR-519d-3p 过表达组细胞中 HIF-1 α -wt 载体的相对荧光素酶活性分别为 5.237 ± 0.485 和 2.309 ± 0.183 ,且与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组细胞中 HIF-1 α -wt 载体的相对荧光素酶活性显著减少,差异有统计学意义($t = 10.44, P < 0.01$);对照组和 miR-519d-3p 过表达组细胞中 HIF-1 α -mut 载体的相对荧光素酶活性分别为 5.081 ± 0.357 和 4.837 ± 0.392 ,差异无统计学意义($t = 0.497, P > 0.05$)。

2.4 各组细胞增殖和凋亡情况比较 CCK-8 法检测各组细胞 A 值(24、48、72h)比较,差异有统计学意义($F = 39.57, 28.29, 52.14$, 均 $P < 0.01$)。Hoechst 33342 染色法检测各组细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($F = 74.46, P < 0.01$)。与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组细胞 24、48、72h A 值均显著增加,细胞凋亡率显著减少,差异有统计学意义($t = 14.19, 17.23, 9.88, 26.07$, 均 $P < 0.01$)。与 miR-519d-3p 过表达组比较,miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组细胞 24、48、72h A 值均显著减少,细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($t = 4.65, 8.41, 5.32, 32.02$, 均 $P < 0.01$)。对照组和甘露醇组细胞 24、48、72h A 值和细胞凋亡率比较差异无统计学意义($t = 0.01, 0.18, 0.06, 0.77$, 均 $P > 0.05$),见图 4,表 2。

2.5 各组细胞外液炎症因子表达和血管生成情况比较 ELISA 法检测各组细胞外液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度比较,差异有统计学意义($F = 65.59, 74.91, 57.88$, 均 $P < 0.01$)。小管形成实验检测各组中新生毛细血管管腔样结构数量比较,差异有统计学意义($F = 163.50, P < 0.01$)。与对照组比较,miR-519d-3p 过表达组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均显著减少,新生毛细血管管腔样结构数量显著减少,差异有统计学意义($t = 14.94, 25.28, 7.29, 16.19$, 均 $P < 0.01$)。与 miR-519d-3p 过表达组比较,miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均显著增加,新生毛细血管管腔样结构数量显著增加,差异有统计学意义($t = 7.32, 17.05, 26.81, 6.34$, 均 $P < 0.01$)。对照组和甘露醇组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度和新生毛细血管管腔样结构数量比较,差异无统计学意义($t = 0.20, 0.32, 0.55, 0.17$, 均 $P > 0.05$),见图 5,表 3。

3 讨论

DR 基本病理变化包括周细胞选择性缺失、毛细血管基底膜增厚、微血管瘤形成、内皮细胞增殖及新生血管导致的视网膜脱离。HRMEC 在维持视网膜毛细血管的完整性方面发挥重要作用,高糖引起 HRMEC 功能障碍,破坏血-视网膜屏障,导致视网膜出血、渗出、脱离,促进 DR

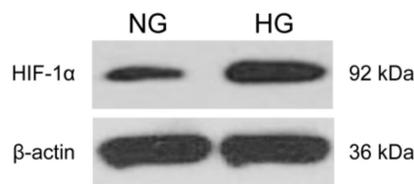


图 1 Western blotting 法检测 NG 和 HG 细胞模型中 HIF-1 α 蛋白的表达情况。

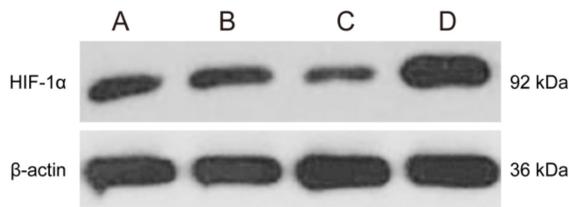


图 2 Western blotting 法检测各组细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达情况 A: 对照组; B: 甘露醇组; C: miR-519d-3p 过表达组; D: miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组。

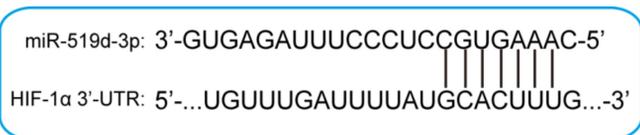


图 3 miR-519d-3p 和 HIF-1 α 3'-UTR 之间的结合位点预测。

的发生和恶化。研究发现,多种因素可以引起 HRMEC 功能障碍,如高级糖基化终产物积累、过氧化物酶体增殖体激活受体 γ 的失活、慢性炎症、氧化应激异常、生长因子及细胞因子表达失调等^[8]。此外,高糖还会影响负责表观遗传修饰和非编码 RNA 功能的酶的活性,导致非编码 RNA 表达异常。近年来,miRNAs 因其广泛的调节功能而受到青睐,目前已发表的 8 篇相关论文共报道了 93 个 miRNAs 在 DR 患者和非 DR 患者中呈差异表达,如 miR-27b、miR-320a、miR-423-5p 等^[9],阐明这些 miRNAs 的作用机制将为 DR 治疗提供新的线索。HG 诱导 HRMEC 细胞模型是研究 DR 的常用体外模型,可用于研究该病的分子机制及防治策略。本研究发现,高糖诱导 HRMEC 模型中 miR-519d-3p 表达下调,与既往文献^[5]报道一致,表明结果可信。随后本研究通过一系列细胞实验证实,miR-519d-3p 可以减轻高糖诱导的 HRMEC 功能障碍并抑制血管生成。

高糖可以引起视网膜内皮细胞的增殖失调,加速 DR 进展。同时,高糖还能诱导视网膜血管内皮细胞凋亡增加,而用抗氧化酶处理能保护细胞免受氧化应激,并降低细胞凋亡。研究显示,炎症因子包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在 DR 进展中起着重要作用^[10]。持续的高血糖导致视网膜缺血性改变,刺激血管内皮生长因子释放,最终促进新生血管生成。近年研究表明,一些异常表达的 miRNAs 在 DR 的发生发展中发挥重要作用,如 miR-15b、miR-181、miR-373、miR-425-5p 等,利用这些 miRNAs 有望开发 DR 治疗的新靶点^[11-14]。miR-519d-3p 位于人基因组 19q13.42 区域,参与调控细胞增殖、凋亡和炎症等过程。本研究利用 miR-519d-3p 模拟物在高糖诱导的 HRMEC 模型中成功过表达 miR-519d-3p,经 CCK-8 法和 Hoechst 33342 染色法发现,miR-519d-3p 过表达组细胞 24、48、

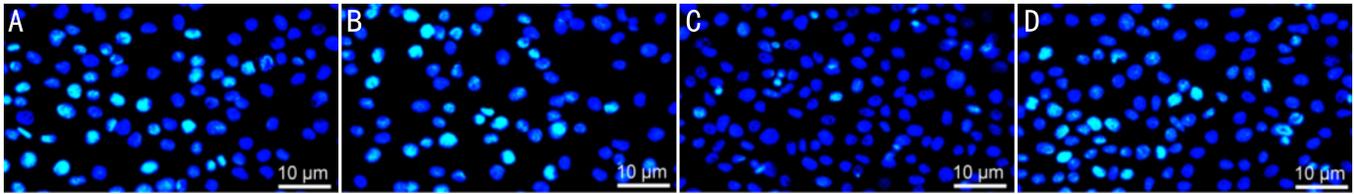


图4 Hoechst 33342 染色法检测各组细胞凋亡情况 A:对照组;B:甘露醇组;C:miR-519d-3p 过表达组;D:miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组。

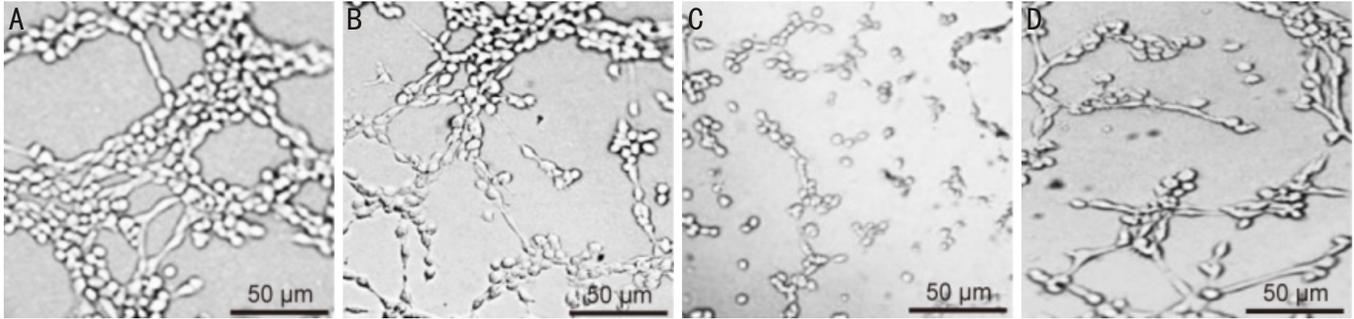


图5 小管形成实验检测各组新生毛细血管管腔样结构形成情况 A:对照组;B:甘露醇组;C:miR-519d-3p 过表达组;D:miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组。

表1 各组细胞中 miR-519d-3p 和 HIF-1α 蛋白的表达情况比较

组别	miR-519d-3p	HIF-1α 蛋白	$\bar{x} \pm s$
对照组	0.027±0.005	0.471±0.033	
甘露醇组	0.031±0.004	0.498±0.040	
miR-519d-3p 过表达组	0.857±0.071	0.136±0.007	
miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组	0.840±0.079	1.154±0.086	
<i>F</i>	171.89	126.53	
<i>P</i>	<0.01	<0.01	

表2 各组细胞不同时间点细胞增殖和凋亡率比较

组别	A 值			凋亡率 (%)	$\bar{x} \pm s$
	24h	48h	72h		
对照组	0.253±0.033	0.450±0.042	0.592±0.073	28.621±7.202	
甘露醇组	0.249±0.025	0.473±0.037	0.615±0.060	26.328±6.927	
miR-519d-3p 过表达组	0.533±0.041	0.724±0.049	0.957±0.104	9.005±2.644	
miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组	0.461±0.030	0.618±0.046	0.766±0.060	19.853±5.329	
<i>F</i>	39.57	28.29	52.14	74.46	
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

表3 各组细胞外液炎症因子表达和血管生成情况比较

组别	浓度 (ng/L)			新生毛细血管管腔样结构数量 (只)	$\bar{x} \pm s$
	TNF-α	IL-1β	IL-6		
对照组	78.346±9.580	170.774±13.910	105.918±16.738	422.350±28.058	
甘露醇组	72.861±9.762	165.450±12.614	110.732±15.242	401.483±29.354	
miR-519d-3p 过表达组	27.321±3.879	45.253±8.986	70.133±13.355	165.296±16.194	
miR-519d-3p 联合 HIF-1α 过表达组	95.078±9.162	165.042±20.473	244.693±13.423	272.538±23.431	
<i>F</i>	65.59	74.91	57.88	163.50	
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

72h 吸光度值较对照组均显著增加,而细胞凋亡率较对照组显著减少。该结果与 miR-519d-3p 在其他类型细胞中的功能一致,提示 miR-519d-3p 在 DR 中具有促进细胞增殖作用。经 ELISA 法检测发现,miR-519d-3p 过表达

组细胞外液 TNF-α、IL-1β、IL-6 的浓度较对照组均显著减少,提示 miR-519d-3p 在 DR 中具有抗炎作用。这一结果与 miR-519d-3p 在初级成纤维细胞中促炎作用相悖,具体原因有待进一步考究。此外,小管形成实验结果

显示,miR-519d-3p 过表达组新生毛细血管管腔样结构数量较对照组显著减少,与既往文献^[4]报道一致,提示 miR-519d-3p 在 DR 中具有抗血管生成作用。基于以上结果,可以得出 miR-519d-3p 在 DR 发生和发展中均具有重要作用。

众多研究表明,miRNAs 参与负性调控目的基因表达,其作用方式主要通过与目的基因 3'-UTR 中特定核苷酸序列结合,进而导致转录或翻译过程抑制。经 TargetScan 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/)、miRDB (<https://mirdb.org/>)、miRTarBase 7.0 (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>)数据库预测 miR-519d-3p 调控的目的基因,发现 HIF-1 α 预测分数较高,推测 HIF-1 α 可能是 miR-519d-3p 的靶基因。先前关于胰腺导管腺癌细胞与子宫内膜上皮细胞的研究中也曾报道,miR-519d-3p 对 HIF-1 α 具有负调控作用^[15-16]。本研究发现,miR-519d-3p 过表达组中 HIF-1 α 蛋白表达水平较对照组显著减少,提示 miR-519d-3p 对 HIF-1 α 具有负调控作用。随后经荧光素酶报告基因实验验证 miR-519d-3p 中“CGUGAAA”序列可与 HIF-1 α 中“GCACUUU”序列特异性结合,提示 HIF-1 α 是 miR-519d-3p 的靶基因。

HIF-1 α 蛋白分子量约为 92kDa,作为肿瘤治疗中的一个明星分子靶点,其广泛参与细胞增殖和凋亡、肿瘤转移、血管生成及葡萄糖代谢等过程^[17]。近年来,HIF-1 α 被报道与糖尿病及其并发症的发生和发展密切相关。Ilegems 等^[18]研究揭示 HIF-1 α 可以介导糖尿病小鼠模型中胰岛 β 细胞的损伤,而其抑制剂 PX-478 则可改善胰岛 β 细胞的胰岛素分泌指数。Zhang 等^[19]发现 DR 小鼠模型中视网膜血管生成与 HIF-1 α 水平的增加密切相关,沉默 HIF-1 α 可以降低血管内皮生长因子的表达,并以时间依赖的方式抑制血管生成。Jiang 等^[20]报道 HIF-1 α 通过血红素氧合酶 1 介导的对线粒体动态控制可以改善糖尿病肾病的肾小管损伤。本研究发现,miR-519d-3p 联合 HIF-1 α 过表达组细胞 24、48、72h 吸光度值较 miR-519d-3p 过表达组均显著减少,细胞凋亡率较 miR-519d-3p 过表达组显著增加,细胞外液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度较 miR-519d-3p 过表达组均显著增加,新生毛细血管管腔样结构数量较 miR-519d-3p 过表达组显著增加,与既往文献^[19]报道结果一致,提示 HIF-1 α 可以逆转 miR-519d-3p 的作用。由此得出,HIF-1 α 是 miR-519d-3p 发挥功能的关键下游分子,miR-519d-3p/HIF-1 α 通路在 DR 发生和发展中均具有重要作用。

综上所述,高糖诱导 HRMEC 模型中 miR-519d-3p 表达下调,而 HIF-1 α 蛋白表达上调。HIF-1 α 是 miR-519d-3p 的靶基因。miR-519d-3p 靶向 HIF-1 α 增加细胞增殖并降低细胞凋亡和炎症反应,从而减轻高糖诱导的 HRMEC 功能障碍并抑制血管生成。本研究尚存几点不足:(1)由于本研究不涉及组织样本,故未能检测 miR-519d-3p 和 HIF-1 α 表达水平的相关性;(2)未能从基因干扰层面观察沉默 miR-519d-3p 对高糖诱导的 HRMEC 功能障碍和血管生成的影响;(3)未能使用 HIF-1 α 抑制剂佐证 miR-519d-3p/HIF-1 α 通路的功能。

参考文献

1 Lin KY, Hsieh WH, Lin YB, et al. Update in the epidemiology, risk

factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig* 2021;12(8):1322-1325

2 Kutlutürk Karagöz I, Allahverdiyev A, Bağrova M, et al. Current approaches in treatment of diabetic retinopathy and future perspectives. *J Ocul Pharmacol Ther* 2020;36(7):487-496

3 黎晓冬,武海燕,何润西,等. microRNAs 在糖尿病视网膜病变中的相关研究进展. *国际眼科杂志* 2022;22(5):813-817

4 Li PH, Pan XY, Zheng ZC, et al. Downregulation of miR-519d-3p is associated with poor outcomes and facilitates tumor progression in papillary thyroid cancer by regulating FOXQ1. *Horm Metab Res* 2021;53(9):625-632

5 Gao JL, Xia SL. Reduced miR-519d-3p levels in the synovium and synovial fluid facilitate the progression of post-traumatic osteoarthritis by targeting VEGF. *Exp Ther Med* 2021;22(6):1478

6 Zhang DY, Wang BJ, Ma M, et al. lncRNA HOTAIR protects myocardial infarction rat by sponging miR-519d-3p. *J Cardiovasc Transl Res* 2019;12(3):171-183

7 蔡晖,石华宗,杨豫湘. 过表达低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 对外培养人视网膜血管内皮细胞增殖、炎症反应及血管生成的影响. *眼科新进展* 2019;39(1):32-35

8 Zhang JF, Qiu QH, Wang HY, et al. TRIM46 contributes to high glucose-induced ferroptosis and cell growth inhibition in human retinal capillary endothelial cells by facilitating GPX4 ubiquitination. *Exp Cell Res* 2021;407(2):112800

9 Zhou H, Peng C, Huang DS, et al. microRNA expression profiling based on microarray approach in human diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2020;39(3):441-450

10 李秀,刘畅. 炎症在糖尿病视网膜病变中的作用. *国际眼科杂志* 2021;21(8):1368-1372

11 Yang Y, Liu Y, Li YP, et al. microRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105(11):3404-3415

12 Cao J, Zhao CJ, Gong LL, et al. miR-181 enhances proliferative and migratory potentials of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy by targeting KLF6. *Curr Eye Res* 2022;47(6):882-888

13 郭宁,阿依努·努拉厚,卜倩,等. miR-373 靶向 VEGFA 对糖尿病视网膜病变大鼠的作用. *国际眼科杂志* 2021;21(8):1339-1344

14 Liu XA, Zhou YH, Liu YX, et al. microRNA-425-5p is involved in the development of diabetic retinopathy and regulates the proliferation and migration of retinal microvascular endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2022;65(1):60-67

15 Sun JW, Zhang PP, Tao Y, et al. Upregulation of lncRNA PVT1 facilitates pancreatic ductal adenocarcinoma cell progression and glycolysis by regulating miR-519d-3p and HIF-1A. *J Cancer* 2020;11(9):2572-2579

16 Wang XD, Miao SB, Lu LQ, et al. miR519d3p released by human blastocysts negatively regulates endometrial epithelial cell adhesion by targeting HIF1 α . *Int J Mol Med* 2022;50(4):123

17 Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Investig* 2020;130(10):5063-5073

18 Ilegems E, Bryzgalova G, Correia J, et al. HIF-1 α inhibitor PX-478 preserves pancreatic β cell function in diabetes. *Sci Transl Med* 2022;14(638):eaba9112

19 Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(16):5071-5076

20 Jiang N, Zhao H, Han YC, et al. HIF-1 α ameliorates tubular injury in diabetic nephropathy via HO-1-mediated control of mitochondrial dynamics. *Cell Prolif* 2020;53(11):e12909