

MicroRNA 对老年性黄斑变性中血管紧张素 II 1 型受体的调控机制

李霞

作者单位:(448000)中国湖北省荆门市第一人民医院眼科
作者简介:李霞,女,硕士,住院医师,研究方向:老年眼科医学。
通讯作者:李霞. lixia49998@163.com
收稿日期:2016-11-08 修回日期:2017-02-17

Regulation mechanism of microRNA on angiotensin II type 1 receptor in patients with age-related macular degeneration

Xia Li

Department of Ophthalmology, Jingmen First People's Hospital, Jingmen 448000, Hubei Province, China

Correspondence to: Xia Li. Department of Ophthalmology, Jingmen First People's Hospital, Jingmen 448000, Hubei Province, China. lixia49998@163.com

Received:2016-11-08 Accepted:2017-02-17

Abstract

• **AIM:** To study the effect of miR-410 on the regulation of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) in retinal pigment epithelium (RPE) cells of age-related macular degeneration (AMD) patients.

• **METHODS:** The experiment was divided into AMD patients, cataract patients and normal people group. AT1R was the target gene of miR-410 by bioinformatics, and the normal RPE cells were cultured in the simulated microenvironment of AMD and cataracts and the expression of miR-410 was detected. Then miR-410 mimics was transfected into cells, and the expression of mRNA and protein of AT1R were detected by Q-PCR and Western blot respectively. The relationship between miR-410 and AT1R was confirmed by the dual luciferase reporter assay.

• **RESULTS:** The miR-410 expression of in RPE cells with AMD was significantly reduced ($P = 0.0006, 0.0008$) compared with cataract and normal controls. The miR-410 can regulate the function of AT1R by dual luciferase reporter gene experiment and the inhibition rate was about 40%. In addition, miR-410 inhibition rate was about 40%~50% to AT1R mRNA and protein expression by cell experiment.

• **CONCLUSION:** AT1R was a target gene of miR-410 in cell experiments, and it is demonstrated that increasing the expression of miR-410 in RPE cells with AMD can suppress the expression of AT1R.

• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; angiotensin II type 1 receptor; miR-410

Citation: Li X. Regulation mechanism of microRNA on angiotensin II type 1 receptor in patients with age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(3):436-439

摘要

目的:研究 AMD 患者的 RPE 细胞中微小 RNA miR-410 对血管紧张素受体 II 的 1 型受体(AT1R)的调控效应。

方法:实验分为 AMD 组、白内障组和正常组,运用生物信息学预测出 AT1R 是 miR-410 的靶基因,将正常的 RPE 细胞模拟 AMD 和白内障的微环境进行培养,检测其中 miR-410 的表达量,进一步将 miR-410 mimics 转染入细胞中,分别运用 Q-PCR 和 Western blot 的方法检测 AT1R mRNA 和蛋白的表达量,并通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-410 与 AT1R 的相互作用关系。

结果:AMD 组与白内障组和正常对照组相比,RPE 细胞中的 miR-410 表达量显著降低($P = 0.0006, 0.0008$),双荧光素酶报告基因实验表明,miR-410 对 AT1R 具有明显的调控作用,且 miR-410 mimics 的下调效率大致为 40% 左右。细胞实验显示 miR-410 对 AT1R 的 mRNA 和蛋白表达的抑制率约为 40%~50%。

结论:AT1R 是 miR-410 的靶基因,且在 AMD 的 RPE 细胞中提高 miR-410 的表达可以抑制 AT1R 的表达。

关键词:老年性黄斑变性;血管紧张素受体 II 的 1 型受体; miR-410

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.11

引用:李霞. MicroRNA 对老年性黄斑变性中血管紧张素 II 1 型受体的调控机制. 国际眼科杂志 2017;17(3):436-439

0 引言

AMD 是当前老年人致盲的重要疾病,但其发病因素尚未完全阐明,当前的治疗效果也并不理想,研究表明血管紧张素受体 II 的 1 型受体(AT1R)在 AMD 的发病机制中具有重要研究意义。microRNA 是一类内源性的大小在 20~25nt 的非编码 RNAs,主要通过和靶基因的 3' 端非翻译区(3' untranslated regions, 3' UTR)完全互补或不完全匹配结合,降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译,发挥调控作用^[1]。mRNA 翻译生成 AT1R 蛋白质阶段的调控对 AT1R 的表达以及功能的发挥也至关重要, microRNA (miRNA)是其中一个非常重要的调控因素,目前对于 AMD 中那些针对血管紧张素受体 II 的 1 型受体(AT1R)发挥调控作用的 microRNAs 目前尚未见报道。因此,本课题运用生物信息学预测出在 AMD 中 miR-410 以 AT1R 为靶基因,通过双荧光素酶报告基因实验验证二者的靶向关系,进而在细胞中观察 miR-410 对 AT1R 表达的调控作用。这为临床治疗 AMD 提供新靶标、新途径,缓解 AMD 病情。

1 材料和方法

1.1 材料 RPE 细胞购自 ATCC 公司。正常组细胞常规培养;AMD 组细胞用缺氧培养方法使正常细胞氧化应激,模拟 AMD 体内 RPE 细胞状态;白内障组细胞用过氧化氢诱导培养方法,模拟白内障体内 RPE 细胞状态。DMEM/F12 培养基购自美国 GIBCO 公司(GIBCO12400-024);逆转录试剂盒(PrimeScript RT reagent kit, RR047A)和 qPCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq kit, RR420L)购自日本 Takara 公司;Western 及 IP 细胞裂解液购自上海碧云天生物公司(P0013);实时荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene 6000, Corbett Research);逆转录 PCR 仪(PCR SYSTEM 9700, Applied Biosystems);凝胶成像系统(GelDoc 2000, Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学预测 microRNAs 与 AT1R 的关系及其验证 利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、miRanda (<http://www.microrna.org>)、miTarget (<http://cbiit.snu.ac.kr/~miTarget/>)等预测软件对 AT1R mRNA 3' 端非编码区(3' UTR)可能结合的 microRNA 进行生物信息学分析,得出以 AT1R 为靶基因的 microRNA。生物信息学分析获取可能的候选 microRNA,进行 Q-PCR 检测并用荧光素酶报告基因加以证明。

1.2.2 细胞实验检测 microRNA 对 AT1R 调节作用 (1)培养 AMD 组和正常组 RPE 细胞,将 microRNA mimics (microRNA 模拟物)分别转染到两组细胞中。miR-410 mimics 转染 RPE 细胞的步骤按照广州市锐博生物技术有限公司提供的转染试剂说明书进行操作。用 $1 \times$ riboFECT™ CP Buffer 稀释 miR-410 mimics,轻轻混匀后加入 riboFECT™ CP Reagent,室温孵育 0 ~ 15min。将 riboFECT™ CP 混合液加入到细胞培养基中,轻轻混匀后置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中继续培养。AMD 组和正常组的 RPE 细胞长满后,将细胞种植于直径 60mm 的细胞培养皿中培养 24h 后,在相应组别的细胞中分别加入 miR-410 的 mimics(模拟物)和 miR-410 的 mimics control(模拟物的阴性对照),放入 CO₂ 培养箱中培养。(2)运用 qPCR 检测 AT1R mRNA 表达水平,研究 microRNA 水平的变化对 AT1R 在转录水平的影响。细胞 RNA 的提取及 Q-PCR 检测 AT1R mRNA 表达水平的实验步骤:采用经典的 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,逆转录反应,得到 cDNA 后进行 PCR 反应,反应重复 40 个循环,得到各组和对照组的相对 CT 值,重复 3 次。(3)Western Blot 检测 AT1R 总蛋白的表达:碱裂解法提取各组细胞总蛋白,煮沸变性,电泳,转膜,封闭。分别加入 AT1R 和 β -actin 的一抗和相应的二抗孵育,利用化学发光试剂在凝胶成像系统上进行曝光。用 Image J 软件对曝光所得图片中条带的强度进行扫描分析。

统计学分析:所得数据应用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以均数 \pm 标准误表示。采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-410 在 AMD 组 RPE 细胞中的表达 分别提取三组 RPE 细胞的 RNA 利用 Q-PCR 进行 miR-410 表达量的检测。实验结果显示,AMD 组(0.47 ± 0.097)与白内障组(1.12 ± 0.073)和正常对照相比,以正常组的 CT 值为 1,RPE 细胞中的 miR-410 表达量显著降低($P = 0.0006, 0.0008$)。

2.2 双荧光素酶报告基因实验证实 AT1R 是 miR-410 的靶基因 双荧光素酶报告基因实验是目前 miRNA 靶基因

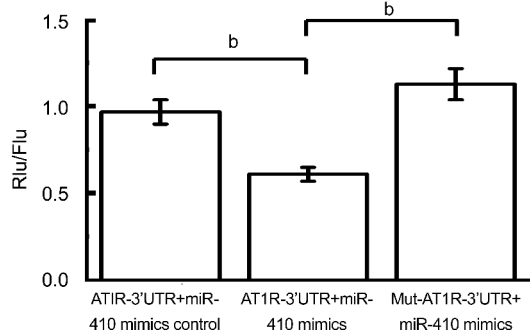


图 1 双荧光素酶报告基因实验 $^b P < 0.01$ vs AT1R-3' UTR+miR-410 mimics。

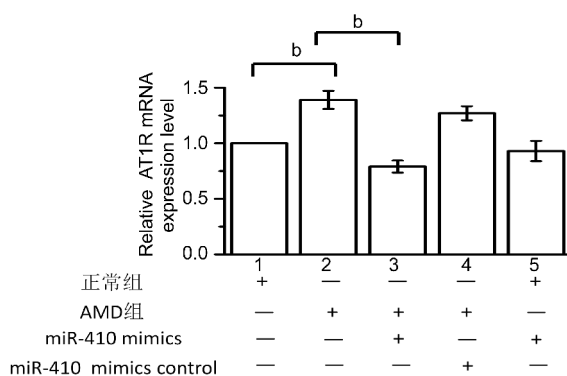


图 2 miR-410 在 AMD 组 RPE 细胞中 AT1R mRNA 的影响 1:正常组;2:AMD 对照细胞;3:AMD+miR-410 mimics;4:AMD+miR-410 mimics control; $^b P < 0.01$ vs AMD 对照细胞。

验证直接有效的方法,本实验中采用的 Dual-Luciferase 双荧光素酶报告基因检测系统在细胞中同时表达萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶,二者没有交叉干扰,能够得到超强的光信号和超高的信噪比,因此本系统广泛应用于 miRNA 靶基因验证。miRNA 主要通过作用于靶基因的 3' 非翻译区(3' UTR)起作用,将目的基因 3' UTR 序列插入至载体中报告基因 luciferase 的后面,比较过表达或者干扰 miRNA 后报告基因表达的改变(监测荧光素酶的活性变化)来定量地反映 miRNA 对目的基因的抑制作用;也可以通过结合定点突变等方法来进一步确定 miRNA 与靶基因 3' UTR 的作用位点。在本部分实验中,首先构建包含野生型 AT1R 的 3' UTR 序列(AT1R-3' UTR)和突变型 AT1R 的 3' UTR 序列(Mut-AT1R-3' UTR)的双荧光素酶标记的表达载体,再将重组载体分别与 miR-410 mimics 共转染至 293T 细胞中,检测其荧光值的表达。miR-410 对 AT1R 有明显的调控作用,且 miR-410 mimics 的下调效率大致为 40% 左右,可以证明预测的 AT1R 靶点为 miR-410 的真实靶点(图 1)。

2.3 提高 miR-410 的表达可以抑制 AT1R 的 mRNA 表达

在 AMD 患者的 RPE 原代细胞中,miR-410 对 AT1R 的 mRNA 表达具有明显的调控作用(图 2)。由实验结果可知,miR-410 的 mimics 可以显著降低 AT1R 的 mRNA 表达,说明在 AMD 中 miR-410 可以调节 AT1R 的 mRNA 表达,直接或间接地抑制 AT1R 的 mRNA 表达。

2.4 提高 miR-410 的表达可以抑制 AT1R 的蛋白表达

AMD 组 RPE 细胞中,miR-410 对 AT1R 的蛋白表达具有明显的调控作用(图 3)。由实验结果可知,miR-410 的

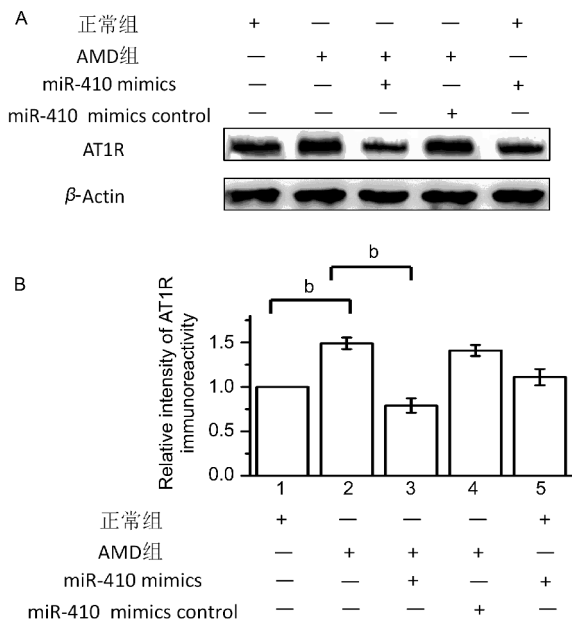


图3 miR-410在AMD组RPE细胞中AT1R总蛋白的影响
 A:蛋白电泳结果;B:统计分析结果;1:正常组;2:AMD对照组;
 3:AMD+miR-410 mimics;4:AMD+miR-410 mimics control;^b*P*<
 0.01 vs AMD对照组。

mimics可以显著降低AT1R的蛋白表达,说明在AMD中miR-410可以调节AT1R的蛋白表达,直接或间接地抑制AT1R的蛋白表达。

3 讨论

老年性黄斑变性为黄斑区结构的衰老性改变,又称年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)。AMD多发于50岁以上的人群,患病率随年龄增长而增高,常为双眼先后发病,无性别倾向,中央视力丧失很严重,是当前老年人致盲的重要疾病^[2-4]。AMD的主要病理特征是形成玻璃膜疣,玻璃膜疣继发的种种病理改变后,则导致黄斑部变性发生。玻璃膜疣也可以引起Bruch膜本发生断裂,脉络膜毛细血管经过破裂的Bruch膜进入继发视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)下及视网膜神经上皮下,从而形成脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)。新生血管壁的结构异常,导致血管的渗漏和出血,进而引发一系列的继发性病理改变^[5]。

AMD是一种遗传基因和环境因素共同作用的眼底病变,明确的病因并没有完全阐明,有研究指出炎症反应、脉络膜血流动力学、氧化应激等因素都可能参与AMD的病变过程。在众多发病机制中,血管模式机制一直是研究的热点,血管模式认为AMD是一种以原发性脉络膜血管灌注异常为主要特征的血管性疾病,升高的血管压再作用于已压力升高的脉络膜毛细血管,会导致血管代偿失调,继发引起视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞损害,从而导致AMD^[6-7]。最新研究表明,眼局部具有独立形成肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)的能力,并且多项研究表明RAS在AMD的早期和晚期均直接参与了疾病的发生发展,在AMD的发病过程中起到了重要作用^[8]。RAS各调节因素中以血管紧张素II(Ag II)具有最重要的生物学效应,Ag II能够引起交感神经兴奋使血管收缩释放醛固酮,同时可以调节肾

脏的功能来控制血压。近年来许多研究表明Ag II参与促进细胞凋亡肥大新生血管形成炎症以及纤维化等病理过程,并且这些作用主要是经过激动血管紧张素受体II的1型受体(AT1R)而产生^[8-10]。研究表明RPE能够分泌肾素,并发现AT1R存在于RPE的基底膜中,同时也有研究表明血管内皮上Ag II、AT1R和AT2R在AMD患者离体的新生血管膜及激光诱导的小鼠内都有表达,并且AT1R介导的炎症反应在CNV的形成过程中具有重要作用。更重要的是,其它研究发现阻断AT1R后会选择性抑制病理性的CNV形成,并且AT1R敲除的小鼠对激光诱导形成CNV有一定抵抗作用^[11]。因此,AT1R在AMD的发病机制中具有重要研究意义。

AT1R在蛋白质水平的变化固然对其功能的正常发挥具有重要作用。然而,mRNA翻译生成AT1R蛋白质阶段的调控对AT1R的表达以及功能的发挥也至关重要,microRNA(miRNA)是其中一个非常重要的调控因素。

一种microRNA可以定位于多个mRNA,并参与生物体的生长、发育、衰老、死亡的调控等生物学过程,人类有接近1/3的基因受到microRNA的调控^[12]。miRNA的异常会导致机体的一系列病理变化,并且与肿瘤的发生发展有着密切的关联^[12]。目前,发现很多microRNA参与调控CNV的发生,其中陆续发现了一些参与AMD发病过程的microRNA。有研究表明,与正常对照人群相比,在干性AMD患者的血清中miR-661和miR-3121的表达增加,湿性AMD患者的血清miR-4258、miR-889和Let-7的表达增加^[13]。此外,Murad等的研究发现在AMD患者的原代培养的RPE细胞中miR-184的表达水平显著降低,而降低的miR-184与AMD患者RPE细胞中溶酶体相关蛋白(Lysosome Associated Membrane Protein, LAMP-1)的低表达有直接联系,研究表明在AMD的发病中miR-184的正常表达对RPE功能的正常发挥起重要作用^[14]。

虽然目前与AMD相关的microRNAs已经有所发现,并且部分已鉴定了靶基因,而且也有报道miR-133和miR-208a/b可能参与调控血管紧张素受体II的1型受体(AT1R)^[15-16],但是对于AMD中那些针对血管紧张素受体II的1型受体(AT1R)发挥调控作用的microRNAs目前尚未见报道。近年来miR-410在乳腺癌、胆管癌、结直肠癌等癌症中的研究逐渐兴起^[17-19],但仍较少有关于miR-410在眼科领域的研究报道。本文中我们的研究发现与正常组相比,miR-410在AMD组RPE细胞中表达降低,通过生物信息学分析及实验证实了AT1R是miR-410的靶基因,进一步发现在AMD组RPE细胞中运用miR-410的模拟物mimics提高miR-410的表达可以抑制AT1R的表达。但其中的具体机制以及AMD的治疗效应还有待进一步的研究。

综上所述,AT1R是miR-410的靶基因,miR-410表达增加可以抑制AT1R表达,因此研究何种机制或物质在恰当时机能激发miR-410的表达,阻止AT1R表达,对AMD的改善疾病亦是一种具有前景的治疗方式。

参考文献

- Liang H, Li WH. MicroRNA regulation of human protein-protein interaction network. *RNA* 2007;13(9):1402-1408
- 中华医学会眼科学会眼底病学组. 老年性黄斑变性临床诊断标准. *中华眼科杂志* 1987;23:封二
- 阴正勤,赵家良,李平华,等. 我国九省眼病调查中重庆市永川区

- 50岁及以上人群盲和中、重度视力损伤患病率及致病原因调查. 中华眼科杂志 2013;49(9):777-782
- 4 葛坚,何明光,赵家良,等. 我国九省眼病调查中广东省阳西县50岁及以上人群盲和中、重度视力损伤患病率及致病原因调查. 中华眼科杂志 2014;50(3):167-172
- 5 邱峰,陶军,王雅文,等. 渗出性老年黄斑变性视力性质分析. 中国实用眼科杂志 2014;2(7):843-845
- 6 Del Priore LV, Kuo YH, Tezel TH. Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion *in situ*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(10):3312-3318
- 7 Ciulla TA. Evolving pathophysiological paradigms for age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2001;85(5):510-512
- 8 Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med* 2010;2(7):247-257
- 9 Stegbauer J, Coffman TM. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20(1):84-88
- 10 Willis LM, Remessy AB, Somanath PR, *et al*. Angiotensin receptor blockers and angiogenesis: clinical and experimental evidence. *Clin Sci (Lond)* 2011;120(8):307-319
- 11 唐海林,武明花. miRNA 失调与肿瘤的发生发展. 中南医学科学杂志 2013;41(1):1-6
- 12 Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, *et al*. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005; 309(5732):310-311
- 13 Berber P, Grassmann F, Kiel C, *et al*. An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol Diagn Ther* 2016;21(1):31-43
- 14 Murad N, Kokkinaki M, Gunawardena N, *et al*. miR-184 regulates ezrin, LAMP-1 expression, affects phagocytosis in human retinal pigment epithelium and is downregulated in age-related macular degeneration. *FEBS J* 2014;281(23):5251-5264
- 15 Diniz GP, Lino CA, Guedes EC, *et al*. Cardiac microRNA-133 is down-regulated in thyroid hormone-mediated cardiac hypertrophy partially via Type 1 Angiotensin II receptor. *Basic Res Cardiol* 2015;110(5):49
- 16 Diniz G, Takano AP, Barreto-Chaves ML. MiRNA-208a and miRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy-role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on miRNA-208a/α-MHC modulation. *Mol Cell Endocrinol* 2013;374(1-2):117-124
- 17 Zhang YF, Yu Y, Song WZ, *et al*. miR-410-3p suppresses breast cancer progression by targeting Snail. *Oncol Rep* 2016;36(1):480-486
- 18 Palumbo T, Poultsides GA, Kouraklis G, *et al*. A functional microRNA library screen reveals miR-410 as a novel anti-apoptotic regulator of cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 2016;16:353
- 19 Liu C, Zhang A, Cheng L, *et al*. miR-410 regulates apoptosis by targeting Bak1 in human colorectal cancer cells. *Mol Med Rep* 2016;14(1):467-473