

氧化应激致人视网膜血管内皮细胞损伤中 microRNA 表达谱的改变及生物信息学分析

韩雪 张睿 姜磊 谢冰 崔冬生 许顺江 周慧敏

【摘要】 目的 检测氧化应激引起人视网膜血管内皮细胞(HMREC)损伤过程中微小 RNA(miRNA)表达谱的改变,并探讨这些差异性表达的 miRNA 在视网膜血管内皮损伤过程中的作用。**方法** 利用不同浓度的 H_2O_2 溶液孵育人脐静脉内皮细胞(HUVEC)建立氧化应激模型,并用 CCK-8 细胞增殖实验检测细胞活性。采用基因芯片技术检测氧化应激介导的 HUVEC 中 miRNA 表达谱的变化,对差异性表达的 miRNA 进行生物信息学分析,用实时 PCR 方法在 HMREC 中进行验证。**结果** CCK-8 检测 HUVEC 活力的结果显示,与同一时间对照组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预组 8 h 和 16 h HUVEC 存活率未发生明显改变($F_{100\mu\text{mol/L}} = 3.897, P > 0.05$),其他浓度 H_2O_2 干预组细胞存活率明显下降($F_{200\mu\text{mol/L}} = 8.172, F_{800\mu\text{mol/L}} = 239.214, P$ 均 < 0.05),且呈剂量和时间依赖性。400 $\mu\text{mol/L}$ 干预组 24 h 细胞存活率下降接近 50% ($F_{400\mu\text{mol/L}} = 6.905, P < 0.05$)。微阵列分析显示, H_2O_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 HUVEC 24 h 后,共有 116 个 miRNA 的表达发生改变。其中有 11 个 miRNA 表达差异在 1.5 倍以上。生物信息学分析提示,差异表达的 miRNA 可能参与细胞的代谢调节、AMP 活化蛋白激酶(AMPK)信号通路等多个生物学过程。实时 PCR 检测证实,在经过 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h 后的 HUVEC 和 HMREC 的氧化应激模型中,miRNA-15b、miRNA-106b、miRNA-497 均显著下调($F_{\text{miRNA-15b, HUVEC}} = 9.9, F_{\text{miRNA-106b, HUVEC}} = 8.4, F_{\text{miRNA-497, HUVEC}} = 63.5, F_{\text{miRNA-15b, HMREC}} = 643.7, F_{\text{miRNA-106b, HMREC}} = 81.4, F_{\text{miRNA-497, HMREC}} = 199.9, P$ 均 < 0.05),而 miRNA-195、miRNA-638、miRNA-1246、miRNA-4267 和 miRNA-4734 均显著上调($F_{\text{miRNA-195, HUVEC}} = 592.1, F_{\text{miRNA-638, HUVEC}} = 812, F_{\text{miRNA-1246, HUVEC}} = 58.5, F_{\text{miRNA-4267, HUVEC}} = 1179.1, F_{\text{miRNA-4734, HUVEC}} = 173, F_{\text{miRNA-195, HMREC}} = 67.8, F_{\text{miRNA-638, HMREC}} = 103.7, F_{\text{miRNA-1246, HMREC}} = 2078.9, F_{\text{miRNA-4267, HMREC}} = 234.6, F_{\text{miRNA-4734, HMREC}} = 10.7, P$ 均 < 0.05)。**结论** 氧化应激可导致 HMREC 中多个 miRNA 表达失衡,这些差异性表达的 miRNA 可能通过 AMPK 信号通路,在视网膜血管内皮损伤过程中发挥潜在作用。

【关键词】 氧化应激; microRNA; 人脐静脉内皮细胞; 人视网膜血管内皮细胞; 生物信息学分析
基金项目:国家自然科学基金(81570728)

Alterations of microRNA expression profile and bioinformatics analysis in human microvascular retinal endothelial cell injured by oxidative stress Han Xue*, Zhang Rui, Jiang Lei, Xie Bing, Cui Dongsheng, Xu Shunjiang, Zhou Huimin. * Department of Endocrinology, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China

Corresponding author: Zhou Huimin, Email: zhouhuimindocor@163.com; Xu Shunjiang, Email: sjxu66@sina.com

Corresponding author: Zhou Huimin, Email: zhouhuimindocor@163.com; Xu Shunjiang, Email: sjxu66@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the changes of microRNA(miRNA) expression profile during oxidative stress in human microvascular retinal endothelial cell(HMREC) and to explore the function of the differentially expressed miRNA in the process of retinal vascular endothelial injury. **Methods** Oxidative stress model was developed with different concentrations of H_2O_2 in human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Cell viability was determined by using Cell Counting Kit-8 assay. Gene chip technology was used to detect the alterations of miRNA expression profile induced by oxidative stress in HUVEC and bioinformatics analysis was performed in differentially expressed miRNA. Real-time PCR analysis was used to val-

identify the changed miRNA in HMREC. **Results** According to the results of viability of HUVEC detected by CCK-8 assay, the cell viability of HUVEC treated by 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 8 hours and 16 hours were not different from those of the control group ($F_{100\mu\text{mol/L}} = 3.897, P > 0.05$). However, the cell viability of HUVEC treated by other concentrations of H_2O_2 were decreased significantly and in a dose and time-dependent manner ($F_{200\mu\text{mol/L}} = 8.172, F_{800\mu\text{mol/L}} = 239.214, \text{all } P < 0.05$). The cell viability of HUVEC treated with 400 $\mu\text{mol/L}$ of H_2O_2 for 24 hours were decreased by nearly 50% ($F_{400\mu\text{mol/L}} = 6.905, P < 0.05$). The microarray analysis results showed that there were 116 differentially expressed miRNAs in HUVEC after exposure to H_2O_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours. Among them, 11 miRNAs were decreased or increased for more than 1.5 times. The results of bioinformatics analysis showed that these miRNAs might be involved in multiple biological pathways such as metabolic pathways in cells, adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) signaling pathway and so on. The results of real-time PCR validated that miRNA-15b, miRNA-106b, and miRNA-497 were significantly downregulated ($F_{\text{miRNA-15b, HUVEC}} = 9.9, F_{\text{miRNA-106b, HUVEC}} = 8.4, F_{\text{miRNA-497, HUVEC}} = 63.5, F_{\text{miRNA-15b, HMREC}} = 643.7, F_{\text{miRNA-106b, HMREC}} = 81.4, F_{\text{miRNA-497, HMREC}} = 199.9, \text{all } P < 0.05$), whereas miRNA-195, miRNA-638, miRNA-1246, miRNA-4267, miRNA-4324, and miRNA-4734 were significantly upregulated ($F_{\text{miRNA-195, HUVEC}} = 592.1, F_{\text{miRNA-638, HUVEC}} = 812, F_{\text{miRNA-1246, HUVEC}} = 58.5, F_{\text{miRNA-4267, HUVEC}} = 1179.1, F_{\text{miRNA-4734, HUVEC}} = 173, F_{\text{miRNA-195, HMREC}} = 67.8, F_{\text{miRNA-638, HMREC}} = 103.7, F_{\text{miRNA-1246, HMREC}} = 2078.9, F_{\text{miRNA-4267, HMREC}} = 234.6, F_{\text{miRNA-4734, HMREC}} = 10.7, \text{all } P < 0.05$) in HUVEC and HMREC oxidative stress model treated by 400 $\mu\text{mol/L}$ of H_2O_2 for 24 hours. **Conclusion** Oxidative stress induces the imbalance of miRNA expression in HMREC, and differentially expressed miRNA might play a potential role in the process of retinal vascular endothelial injury through AMPK signaling pathway.

[Key words] Oxidative stress; microRNA; Human umbilical vein endothelial cells; Human microvascular retinal endothelial cells; Bioinformatics analysis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570728)

氧化应激是指活性氧簇的产生与机体内抗氧化防御系统的清除之间失衡,导致活性氧簇产生过多,造成机体组织细胞内蛋白和核酸等生物大分子损伤^[1]。血管内皮细胞损伤与活性氧簇等自由基大量产生密切相关,可直接导致血管内皮细胞结构和功能的损伤,表现为细胞活力下降、细胞凋亡和坏死等^[2]。因此,氧化应激是引起血管内皮损伤的重要因素。microRNA是由 18~24 个核苷酸组成的内源性非编码小分子 RNA,主要在转录后水平调控基因表达,具有广泛的生物学效应。研究发现,氧化应激介导的 miRNA-486-5p 表达下降,可通过调控蛋白激酶 B (Akt) 信号通路,引起人骨髓间充质干细胞凋亡^[3]。糖尿病视网膜病变的特点是视网膜微血管系统的渐进性变化,包括新血管形成、血-视网膜屏障分离、毛细血管出血和糖尿病黄斑水肿等。虽然糖尿病视网膜病变的发病机制还没有完全清楚,但研究发现,氧化应激损伤是这些病变的早期始动环节^[4]。与其他组织相比,视网膜由于含有丰富的多不饱和脂肪酸,消耗的氧气和葡萄糖较多,加之光的照射,更容易受到氧化应激的损伤^[5]。在糖尿病视网膜病变发病早期,miRNA 表达的变化及其对靶基因分子

的调控机制尚不明确。本研究首先利用方便易得的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 制备氧化应激细胞模型,采用基因芯片技术筛选出氧化应激损伤相关的 miRNA;然后在人视网膜血管内皮细胞 (HMREC) 内进行验证,为进一步研究氧化应激在糖尿病视网膜病变中的作用和分子机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 胎牛血清、ECM 培养液、DMEM 培养液、内皮细胞生长因子购自 Sciencell 公司; H_2O_2 和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司; microRNA 引物购于北京天根生化科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备 CO_2 细胞培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); Multiskan Ascent 酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); A7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HUVEC (购自 Scienecell 公司) 用含 10% 胎牛血清的 ECM 培养液,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。每 2 天换液 1 次,待细胞长至约 80% 的融合状态后传代,实验采用第 3~5 代

细胞。HMREC购自武汉原生原代生物医药科技有限公司)常规培养于 25 cm² 培养瓶,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于条件为 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液 1 次。当细胞融合度达 90% 左右时进行传代处理,第 3~5 代且处于对数生长期的 HMREC 用于实验。

1.2.2 氧化应激细胞模型的建立 在 HUVEC 培养瓶中加入 0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液消化,计数,配制成细胞悬液,浓度为 5×10^4 个/ml。将 HUVEC 分为 5 组,每组 6 个复孔,种植于 96 孔培养板中,每孔加入 100 μ l (5×10^3 个细胞),共加入 30 个孔。不同浓度的 H₂O₂ 溶液 (0、100、200、400 和 800 μ mol/L) 处理细胞。在 37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 8、16、24 h。吸出培养液,加入 100 μ l 无血清培养液及 10 μ l 的 CCK-8 试剂,震荡混匀 5 min,置于 37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 2 h,并在酶标仪读取各孔 450 nm 波长的吸光度值。以 0 μ mol/L H₂O₂ 溶液为对照组,设定对照组吸收度至为 100%,其余各组吸光度值表示为对照组的百分比。计算不同组别细胞存活率,样本准备一式 3 份,实验重复 3 次,取平均值。在 HMREC 培养瓶中加入 0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液消化/计数,配制成细胞悬液,浓度为 5×10^4 个/ml。应用 400 μ mol/L H₂O₂ 溶液处理细胞,并在 37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 24 h。

1.2.3 miRNA 的表达谱分析 采用 miRNeasy Mini 试剂盒提取 HUVEC 中总 RNA,按说明书操作。使用 Nanodrop1000 分光光度计对提取的总 RNA 进行定量。使用 GeneChip miRNA 分析 miRNA 的表达谱。数据分析委托杭州联川生物技术有限公司进行。

1.2.4 miRNA 表达的基因功能聚类 (GO) 富集分析 利用 TargetScan 软件 (<http://www.targetscan.org/>) 对 HUVEC 中差异性表达 miRNAs 的靶基因进行预测,并选取相关靶基因运用 DAVID 生物信息学数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 进行基于 GO 的功能富集分析。

1.2.5 miRNA 表达的 KEGG 分析 利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 KEGG 信号转导通路富集分析,针对预测出的相关靶基因,通过软件附带的 Fisher exact test 计算 P 值, $P < 0.05$ 代表具有统计学意义的信号转导通路。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 利用 Bioooper 核酸提取分离试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提

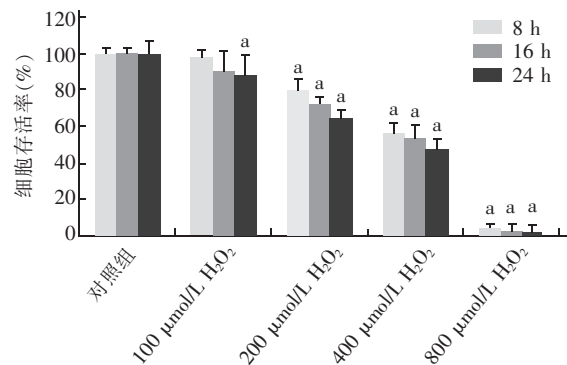
取 400 μ mol/L H₂O₂ 处理 24 h 前、后的 HUVEC 和 HMREC 的 miRNA。NanoDrop 超微量分光光度计测定 RNA 浓度。利用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。利用 miRcute miRNA qPCR Detection Kit 进行实时 PCR 验证。以 snRNA U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miRNA 表达量。 $\Delta Ct = Ct(miRNA) - Ct(U6)$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的} - Ct_{内参})_{干预} - (Ct_{目的} - Ct_{内参})_{对照}$ 。具体操作步骤体系参照说明书进行。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,利用 *t* 检验和单因素方差分析进行统计学分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化应激细胞模型的制备及细胞活力测定

CCK-8 检测细胞活力结果显示,与同一时间对照组相比,100 μ mol/L H₂O₂ 组 8 h 和 16 h HUVEC 存活率未发生明显改变,其他浓度 H₂O₂ 干预组细胞存活率明显下降 ($F_{200\mu mol/L} = 8.172$, $F_{800\mu mol/L} = 239.214$, P 均 < 0.05),且呈剂量和时间依赖性。400 μ mol/L H₂O₂ 干预组 24 h 细胞存活率下降接近 50% ($F_{400\mu mol/L} = 6.905$, $P < 0.05$)。因此,后续实验采用 400 μ mol/L H₂O₂ 刺激 24 h 作为 HUVEC 氧化应激模型的作用条件 (图 1)。



注:与同一时间对照组相比,* $P < 0.05$; HUVEC:人脐静脉内皮细胞

图 1 H₂O₂ 对 HUVEC 细胞活力的影响

2.2 差异性表达的 miRNA 的筛选 miRNA 芯片分析结果显示,与正常组相比,400 μ mol/L H₂O₂ 处理 24 h 后,有 116 个 miRNA 的表达发生改变 (47 个表达上调,69 个表达下调)。其中 11 个 miRNA 变化在 1.5 倍以上,包括 8 个表达上调的 miRNA: miRNA-195、miRNA-17、miRNA-638、miRNA-1246、miRNA-1275、miRNA-4267、miRNA-4324 和 miRNA-4734,3 个表达下调的 miRNA: miRNA-15b、miRNA-106b 和 miRNA-497。

2.3 差异性表达的 miRNA 的 GO 富集分析 对上述差异性表达的 miRNA 靶基因进行预测并进行功能分析。GO 富集分析结果显示,这些靶基因在分子功能方面的作用主要集中在小分子的结合,如蛋白结合、腺苷结合等。在细胞组成方面的作用主要体现在参与细胞质、细胞核、细胞膜的组成等。在参与生物学过程方面的作用,主要富集在代谢功能,如细胞周期、蛋白磷酸化等。表 1 列出靶基因主要富集前 10 个条目(表 1)。

2.4 差异性表达的 miRNA 靶基因的 KEGG 分析 将预测的靶基因向 KEGG 数据库映射,结果显示这些靶基因参与 70 个 KEGG 通路条目,表 2 列出靶基因主要参与的 20 个 KEGG 通路,表明这些差异表达的 miRNA 可能参与代谢调节、信号转导、转录调控等。其中有 8.4% 的靶基因参与代谢途径的调节。此外,靶基因还可能调控蛋白激酶信号通路、脂肪酸代谢、胰岛素信号通路、AMP 活化蛋白激酶信号通路、p53 信号通路等(表 2)。

2.5 实时 PCR 检测 HUVEC 和 HMREC 氧化应激模型中 miRNA 的表达 应用实时 PCR 技术对 11 个差异表达 miRNA 进行验证,结果显示,经过 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h 后,在 HUVEC 和 HMREC 的氧化应激模型中,miRNA-195、miRNA-638、miRNA-1246、miRNA-4267、miRNA-4324 和 miRNA-4734 表达量均上升($F_{\text{miRNA-195,HUVEC}} = 592.1$ 、 $F_{\text{miRNA-638,HUVEC}} = 812$ 、 $F_{\text{miRNA-1246,HUVEC}} = 58.5$ 、 $F_{\text{miRNA-4267,HUVEC}} =$

1 179.1、 $F_{\text{miRNA-4324,HUVEC}} = 4.8$ 、 $F_{\text{miRNA-4734,HUVEC}} = 173$ 、 $F_{\text{miRNA-195,HMREC}} = 67.8$ 、 $F_{\text{miRNA-638,HMREC}} = 103.7$ 、 $F_{\text{miRNA-1246,HMREC}} = 2 078.9$ 、 $F_{\text{miRNA-4267,HMREC}} = 234.6$ 、 $F_{\text{miRNA-4324,HMREC}} = 4.5$ 、 $F_{\text{miRNA-4734,HMREC}} = 10.7$, P 均 <0.05), miRNA-15b、miRNA-106b、miRNA-497 表达量均下降($F_{\text{miRNA-15b,HUVEC}} = 9.9$ 、 $F_{\text{miRNA-106b,HUVEC}} = 8.4$ 、 $F_{\text{miRNA-497,HUVEC}} = 63.5$ 、 $F_{\text{miRNA-15b,HMREC}} = 643.7$ 、 $F_{\text{miRNA-106b,HMREC}} = 81.4$ 、 $F_{\text{miRNA-497,HMREC}} = 199.9$, P 均 <0.05), miRNA-17 和 miRNA-1275 的表达量无明显变化($F_{\text{miRNA-17,HUVEC}} = 0.4$ 、 $F_{\text{miRNA-17,HMREC}} = 3.9$ 、 $F_{\text{miRNA-1275,HUVEC}} = 0.4$ 、 $F_{\text{miRNA-1275,HMREC}} = 0.9$, P 均 >0.05), 见图 2。

3 讨论

报道显示,miRNA 在多种生理和病理过程中扮演了重要角色。氧化应激损伤是活性氧簇连锁反应引起的细胞毒性作用和生命大分子如膜脂质、蛋白质和 DNA 的损伤,可导致多种疾病的发生。而众多实验表明,氧化应激状态下,miRNA 对诸多内皮细胞的损伤和凋亡具有调控作用^[6-9]。研究表明,miRNA-125b-5p 在脐静脉内皮细胞经 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 24 h 后,表达下调,进而导致靶分子 Smad4 表达上调,而 Smad4 可抑制血管内皮生长因子的表达,最终引起内皮细胞损伤^[6-7]。Magenta 等^[8]研究发现,氧化应激可诱导 miRNA-200c 表达上调,其靶基因 ZEB1 的表达被抑制,导致内皮细胞凋亡和坏死。胃促生长素介导的血管内皮细胞通过维持 miRNA-126 表达,抵御活性氧簇失衡^[9]。在众多活性氧簇中, H_2O_2 因为其可以跨越细胞膜并且具有

表 1 HUVEC 中差异性表达的 miRNA 的 GO 分析

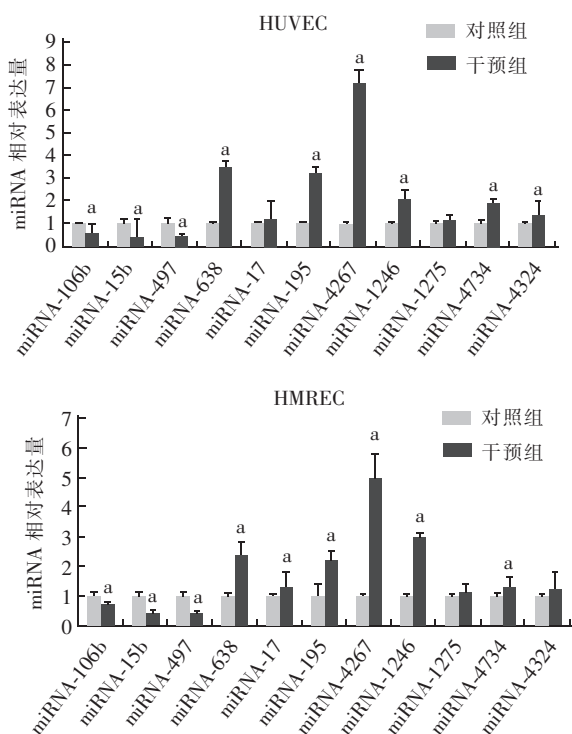
靶基因富集条目	靶基因与参与该富集基因的比值(%)	P 值	靶基因富集条目	靶基因与参与该富集基因的比值(%)	P 值
分子功能			核浆	11.3	0.01
蛋白质结合	9.9	0.01	溶酶体膜	2.1	0.01
三磷酸腺苷结合	9.8	0.01	胞内细胞器	4.7	0.01
蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性	3.0	0.01	外泌体	15.7	0.01
蛋白激酶活性	2.6	0.01	高尔基体	5.6	0.01
三磷酸鸟苷结合	3.0	0.01	生物学过程		
泛素蛋白连接酶活性	1.7	0.01	细胞周期	1.4	0.01
蛋白质复合体结合	2.7	0.01	蛋白磷酸化	4.0	0.01
蛋白质糖基结合	1.8	0.01	对 X 射线的反应	0.6	0.01
蛋白二聚体活性	1.5	0.01	肌动蛋白细胞骨架组织	1.4	0.01
Hsp90 蛋白结合	0.5	0.01	脂肪酸代谢过程	0.8	0.01
细胞组成			有丝分裂	1.3	0.01
胞质	33.3	0.01	激活蛋白激酶活性	0.7	0.00
胞液	12.1	0.01	细胞内信号转导	2.9	0.01
胞核	29.3	0.01	DNA 依赖的转录	4.0	0.01
胞膜	13.9	0.01	轴突生成	1.2	0.01
线粒体	10.5	0.01			

注:HUVEC:人脐静脉血管内皮细胞;GO:基因功能聚类;Hsp90:热休克蛋白 90;miRNA 微小 RNA

表 2 HUVEC 中差异性表达的 miRNA 的 KEGG 分析

KEGG 通路	靶基因与参与该通路基因的比值 (%)	P 值
代谢通路	8.4	6.6×10^{-5}
AMPK 信号通路	1.4	1.9×10^{-4}
脂肪酸代谢	0.8	5.0×10^{-4}
长时程抑制	0.8	2.1×10^{-3}
过氧化物酶体	0.9	3.0×10^{-3}
催产素信号通路	1.4	3.2×10^{-3}
胰岛素信号通路	1.3	4.2×10^{-3}
肾细胞癌	0.8	4.6×10^{-3}
磷脂酰肌醇信号系统	1.0	4.8×10^{-3}
FoxO 信号通路	1.2	6.0×10^{-3}
PPAR 信号通路	0.8	6.7×10^{-3}
p53 信号通路	0.8	6.8×10^{-3}
血管平滑肌收缩	1.1	6.9×10^{-3}
抗生素的生物合成	1.7	7.4×10^{-3}
癌症的中心碳代谢	0.7	7.9×10^{-3}
卵母细胞的减数分裂	1.0	8.6×10^{-3}
细胞周期	1.1	1.1×10^{-2}
磷酸肌醇代谢	0.8	1.1×10^{-2}
肌动蛋白细胞骨架调控	1.7	1.2×10^{-2}
碳代谢	1.1	1.3×10^{-2}

注: AMPK: AMP 活化蛋白激酶; FoxO: 叉头转录因子; PPAR: 过氧化物酶体增殖物活化受体; HUVEC: 人脐静脉内皮细胞; miRNA: 微小 RNA



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; HUVEC: 人脐静脉内皮细胞; HMREC: 人视网膜血管内皮细胞; miRNA: 微小 RNA

图 2 实时 PCR 检测 miRNA 在 HUVEC 和 HMREC 中的表达

相对较长的半衰期,在细胞信号通路研究中具有特别重要的意义^[10]。利用 H_2O_2 处理细胞制备的体外模型已被广泛应用于氧化应激机制的研究。本研究

将HUVEC和HMREC两种不同的内皮细胞模型结合起来分析差异性表达的 miRNA,能更精确筛选出与氧化应激相关,并在内皮损伤的发生中具有重要作用的miRNA,为内皮损伤的机制研究及防治奠定基础。

本文利用 H_2O_2 刺激 HUVEC,制备氧化应激细胞损伤模型,并通过 miRNA 芯片筛选出氧化应激介导的 11 个表达异常的 miRNA (miRNA-195、miRNA-17、miRNA-638、miRNA-1246、miRNA-1275、miRNA-4267、miRNA-4324、miRNA-4734、miRNA-15b、miRNA-106b、miRNA-497)。目前的研究显示,在小鼠脐静脉内皮细胞中,miRNA-17 表达显著上调,可减少内皮细胞出芽。通过抑制靶蛋白 Janus 激酶 (JAK)1 的表达,从而抑制 JAK/信号转导与转录激活因子信号通路活性,最终抑制血管新生^[11]。Wang 等^[12] 研究发现,在大鼠颈动脉球囊损伤模型中,由腺病毒介导的 miRNA-195 基因显著减少球囊损伤的颈动脉新生内膜的形成。该研究表明,miRNA-195 能调节内皮细胞的增殖和表型转化,进而调控血管损伤后修复。在宫颈癌细胞中,miRNA-1246 表达上调,抑制肿瘤抑制因子血小板反应蛋白 2 蛋白的表达,从而促进了宫颈癌 SiHa 细胞的生长,增强了 SiHa 细胞的迁移、侵袭能力。而 miRNA-497 在宫颈癌 HeLa 细胞中能够通过 CCNE1 的 3'UTR 区结合靶向降解其 mRNA 的表达,抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖^[13-14]。而 miRNA-15b 在子宫内膜癌中低表达与血管生成相关^[15]。miRNA-106b 的过表达可以调控信号转导与转录激活因子 3 的表达,在内皮细胞中发挥抑制血管新生的作用^[11]。本研究 GO 分析与 KEGG 分析结果显示,差异性表达的 miRNA 可能参与了代谢通路、胰岛素信号通路、AMP 活化蛋白激酶信号通路、p53 信号通路相关蛋白的表达调控、转录调控等,这些通路均与视网膜血管内皮损伤的发生和发展有密切关系。血管内皮细胞中产生过量的超氧化物导致 DNA 损伤、多种基因的转录因子的激活和多基因的调控^[16]。经实时 PCR 验证,表达显著上调的 miRNA 有 8 个(miRNA-195、miRNA-17、miRNA-638、miRNA-1246、miRNA-1275、miRNA-4267、miRNA-4324、miRNA-4734),表达显著下调的 miRNA 有 3 个(miRNA-15b、miRNA-106b、miRNA-497)。因此推测,差异性表达的 miRNA 可通过影响 AMP 活化蛋白激酶信号转导通路等的相关蛋白表达,参与视网膜血管内皮细胞损伤的发生、发展。

综上所述,氧化应激可导致视网膜血管内皮细胞多个 miRNA 的表达失调,这些 miRNA 可能参与早

期糖尿病视网膜病变的发生,进而影响糖尿病视网膜病变的发生、发展。本研究为阐明糖尿病视网膜病变的发病机制和开发以miRNA为治疗靶点的药物提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Reddy VP, Zhu X, Perry G, et al. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16 (4): 763-774. DOI:10.3233/JAD-2009-1013.
- [2] 周曦, 易龙, 金鑫, 等. SIRT1/UCP2 通路在白藜芦醇抑制血管内皮细胞氧化应激损伤中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35 (16): 1671-1675.
- [3] 胡明, 黎佼, 刘宁宁, 等. miR-486-5p 在氧化应激引起人骨髓间充质干细胞凋亡中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (3): 524-529. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2015.03.024.
- [4] 张亚琴. miR-21 对氧化应激诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. 重庆医学, 2016, 45 (16): 2257-2260. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.033.
- [5] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. Diabetes, 2005, 54 (6): 1615-1625.
- [6] Kumari S, Panda S, Mangaraj M, et al. Plasma MDA and antioxidant vitamins in diabetic retinopathy [J]. Indian J Clin Biochem, 2008, 23 (2): 158-162. DOI:10.1007/s12291-008-0035-1.
- [7] 魏明, 甘露, 杨晓梅, 等. 过氧化氢处理的脐静脉血管内皮细胞 miR-125b-5p 水平降低但 Smad4 表达增加 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32 (8): 1088-1093.
- [8] Zhou Z, Lu J, Dou J, et al. FHL1 and Smad4 synergistically inhibit vascular endothelial growth factor expression [J]. Mol Med Rep, 2013, 7 (2): 649-653. DOI:10.3892/mmr.2012.1202.
- [9] Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, et al. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition [J]. Cell Death Differ, 2011, 18 (10): 1628-1639. DOI:10.1038/cdd.2011.42.
- [10] Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, et al. Unacylated ghrelin induces oxidative stress resistance in a glucose intolerance and peripheral artery disease mouse model by restoring endothelial cell miR-126 expression [J]. Diabetes, 2015, 64 (4): 1370-1382. DOI:10.2337/db14-0991.
- [11] 郭俊, 刘宇, 王忠凯, 等. 氧化应激诱导内皮细胞凋亡 microRNA 表达改变的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16 (10): 1821-1824. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2016.10.005.
- [12] 艾丽菲热·买买提, 陈红, 任景怡. 微小 RNA-106b 参与内皮细胞介导的血管新生作用机制研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16 (6): 633-636. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2014.06.022.
- [13] Wang YS, Wang HY, Liao YC, et al. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation [J]. Cardiovasc Res, 2012, 95 (4): 517-526. DOI:10.1093/cvr/cvs223.
- [14] 陈军莹, 姚德生, 贺娟娟, 等. miR-1246 对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响及其靶基因的初步研究 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2015, 36 (2): 195-200. DOI:10.7652/jdyxb201502010.
- [15] 韩继明, 霍满鹏, 慕明涛, 等. miR-497 靶向细胞周期蛋白 E1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30 (6): 597-600.
- [16] Finnerty JR, Wang WX, Hébert SS, et al. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases [J]. J Mol Biol, 2010, 402 (3): 491-509. DOI:10.1016/j.jmb.2010.07.051.
- [17] Wu H, Li R, Wei ZH, et al. Diabetes-induced oxidative stress in endothelial progenitor cells may be sustained by a positive feedback loop involving high mobility group box-1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1943918. DOI:10.1155/2016/1943918.

(收稿日期: 2017-08-23)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《国际内分泌代谢杂志》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织