

lncRNA KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p/TSHZ3 影响高糖诱导的人视网膜上皮细胞增殖与凋亡

张妮红, 侯定善, 乔建治, 付珂, 王洪亮

引用: 张妮红, 侯定善, 乔建治, 等. lncRNA KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p/TSHZ3 影响高糖诱导的人视网膜上皮细胞增殖与凋亡. 国际眼科杂志 2021;21(12):2044-2052

作者单位: (473000) 中国河南省南阳市, 南阳医学高等专科学校第一附属医院眼科

作者简介: 张妮红, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 综合眼科。

通讯作者: 王洪亮, 男, 本科, 主任医师, 研究方向: 临床眼科. wanghl0211@163.com

收稿日期: 2021-04-13 修回日期: 2021-11-10

摘要

目的: 观察长链非编码 RNA (lncRNA) KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p/TSHZ3 影响高糖 (HG) 诱导的人视网膜上皮细胞 (ARPE-19) 增殖、凋亡与氧化应激情况。

方法: 运用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 检测 5、15、45、135mmol/L HG 刺激的 ARPE-19 的细胞存活率。将 ARPE-19 细胞分为 NC 组、45mmol/L HG 组、si-NC + 45mmol/L HG 组、si-lncRNA KCNQ1OT1 + 45mmol/L HG 组、miR-NC + 45mmol/L HG 组、miR-19a-3p mimics + 45mmol/L HG 组、si-con + 45mmol/L HG 组、si-TSHZ3 + 45mmol/LHG 组、pcDNA+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组、pcDNA-TSHZ3+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组。运用 CCK-8 检测细胞存活率, qRT-PCR 检测 lncRNA KCNQ1OT1、miR-19a-3p 和 TSHZ3 mRNA 表达, Western Blot 检测 TSHZ3、活化-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved-caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白质的表达, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测氧化应激指标活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA) 水平。双荧光素酶活性检测 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p、miR-19a-3p 和 TSHZ3 之间的靶向结合。

结果: 15、45、135mmol/L HG 抑制 ARPE-19 细胞的存活率, 后续选择细胞存活率约 50% 的 HG 浓度 45mmol/L。45mmol/L HG 提高 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1、TSHZ3 mRNA、TSHZ3 蛋白表达水平、凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达、ROS 和 MDA 水平, 降低 miR-19a-3p 表达水平、细胞存活率 ($P < 0.05$)。lncRNA KCNQ1OT1、TSHZ3 低表达或 miR-19a-3p 高表达提高 HG 诱导的 ARPE-19 细胞的存活率, 降低凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达、ROS 和 MDA 水平 ($P < 0.05$)。lncRNA KCNQ1OT1 靶向 miR-19a-3p, miR-19a-3p 靶向 TSHZ3, lncRNA KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 的表达。lncRNA KCNQ1OT1 低表达对 HG 诱导的 ARPE-19 细胞存活率、凋亡以及氧化应激的影响被 TSHZ3 过表达所逆转。

结论: lncRNA KCNQ1OT1 低表达通过 miR-19a-3p/TSHZ3, 促进 HG 诱导的 ARPE-19, 并抑制其凋亡和氧化应激。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 长链非编码 RNA (lncRNA) KCNQ1OT1; miR-19a-3p; TSHZ3; 增殖; 凋亡; 氧化应激

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.12.05

lncRNA KCNQ1OT1 affects the proliferation and apoptosis of retinal epithelial cells induced by high glucose through miR-19a-3p/TSHZ3

Ni-Hong Zhang, Ding-Shan Hou, Jian-Zhi Qiao, Ke Fu, Hong-Liang Wang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China

Correspondence to: Hong - Liang Wang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China. wanghl0211@163.com

Received: 2021-04-13 Accepted: 2021-11-10

Abstract

• AIM: To investigate whether long-chain non-coding RNA (lncRNA) KCNQ1OT1 affects the proliferation, apoptosis and oxidative stress of retinal epithelial cells induced by high glucose (HG) through miR-19a-3p/TSHZ3.

• METHODS: Cell counting kit 8 (CCK-8) was used to detect the cell viability of human retinal epithelial cells ARPE-19 stimulated with 5, 15, 45, 135mmol/L HG. The ARPE-19 cells were divided into NC group, 45mmol/L HG group, si-NC + 45mmol/L HG group, si-lncRNA KCNQ1OT1 + 45mmol/L HG group, miR-NC + 45mmol/L HG group, miR-19a-3p mimics + 45mmol/L HG group, si-con + 45mmol/L HG group, si-TSHZ3 + 45mmol/L HG group, pcDNA + si-lncRNA KCNQ1OT1 + 45mmol/L HG group, pcDNA-TSHZ3 + si-lncRNA KCNQ1OT1 + 45mmol/L HG group. CCK-8 was used to detect cell viability, qRT-PCR was used to detect the expressions of lncRNA KCNQ1OT1, miR-19a-3p and TSHZ3 mRNA, Western Blot was used to detect TSHZ3, activation-cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved-caspase-3), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) related X protein (Bax) protein expressions, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the

levels of oxidative stress indicators reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA). The dual luciferase activity was used to detect the targeted binding between lncRNA KCNQ1OT1 and miR-19a-3p, miR-19a-3p and TSHZ3.

• **RESULTS:** 15, 45, 135mmol/L HG inhibited the survival rate of ARPE-19 cells, and the subsequent select the HG concentration 45mmol/L with a cell survival rate of about 50%. 45mmol/L HG increased the expression levels of lncRNA KCNQ1OT1, TSHZ3 mRNA, TSHZ3 protein, the apoptosis rate, Cleaved-caspase-3 and Bax protein expressions, ROS and MDA levels in ARPE-19 cells, and reduced cell survival rate and the expression level of miR-19a-3p ($P < 0.05$). Low expression of lncRNA KCNQ1OT1, TSHZ3 or high expression of miR-19a-3p improved the survival rate of ARPE-19 cells induced by HG, and reduced apoptosis rate, Cleaved-caspase-3 and Bax protein expressions, ROS and MDA levels ($P < 0.05$). lncRNA KCNQ1OT1 targeted miR-19a-3p, miR-19a-3p targeted TSHZ3, and lncRNA KCNQ1OT13 regulated the expression of TSHZ3 through miR-19a-3p. The effect of lncRNA KCNQ1OT1 low expression on the survival rate, apoptosis and oxidative stress of ARPE-19 cells induced by HG was reversed by the overexpression of TSHZ3.

• **CONCLUSION:** The low expression of lncRNA KCNQ1OT13 promotes the proliferation of retinal epithelial cells induced by high glucose, and inhibits their apoptosis and oxidative stress through miR-19a-3p/TSHZ3.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; lncRNA KCNQ1OT1; miR-19a-3p; TSHZ3; proliferation; apoptosis; oxidative stress

Citation: Zhang NH, Hou DS, Qiao JZ, *et al.* lncRNA KCNQ1OT1 affects the proliferation and apoptosis of retinal epithelial cells induced by high glucose through miR-19a-3p/TSHZ3. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(12):2044-2052

0 引言

糖尿病视网膜病变是糖尿病的常见并发症,也是糖尿病患者视力障碍和失明的常见原因,但其发病机制仍有待阐明^[1]。越来越多的证据表明,细胞凋亡和氧化应激是参与糖尿病视网膜病变发病机制的主要原因^[2]。长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是长度超过 200 个核苷酸的非编码转录物^[3]。最近研究报道,多种 lncRNA 作为直接或间接介质在糖尿病等进程中起关键作用^[4]。lncRNA KCNQ1 重叠转录物 1 (KCNQ1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1)定位于染色体 11p15.5,被认为是多种肿瘤的致癌基因^[5-6]。李莹等^[7]在糖尿病肾病患者血清中检测出高水平的 lncRNA KCNQ1OT1,另一项研究显示, lncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病视网膜病变患者和人视网膜内皮细胞中上调,通过调节微小 RNA (microRNA, miRNA/miR)-1470 和表皮生长因子受体影响糖尿病视网膜病变的进展^[8]。然而, lncRNA KCNQ1OT1 在高糖 (high glucose, HG) 诱导的视网膜上皮细胞损伤中的机制仍不清楚。miRNA 的主要作用是调节翻译后基因的表达,通过与 mRNA 3' 非翻译区 (untranslational region, UTR) 结合而导致翻译破坏或抑制。由于 miRNA 调控的任何变化都与

生理异常有关,因此这些分子可用于治疗或诊断诸如糖尿病及其并发症等疾病的生物标记^[9]。糖尿病患者的 miR-19a-3p 水平显著降低, miR-19a-3p 靶向细胞因子信号转导抑制因子 3 促进胰腺 β 细胞增殖和胰岛素分泌^[10]。TSHZ3 (teashirt zinc finger homeobox 3) 作为 miR-338-5p 的靶基因,减弱 miR-338-5p 模拟物的侵袭效应^[11]。但 miR-19a-3p/TSHZ3 是否参与 lncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病视网膜病变中的调控机制仍未可知。本研究在人视网膜上皮细胞 (ARPE-19) 中利用 HG 构建糖尿病视网膜病变模型,研究 lncRNA KCNQ1OT1 在 HG 诱导的细胞增殖、凋亡和氧化应激中的作用,并进一步探讨了 lncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病视网膜病变发病机制中的潜在机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ARPE-19 (深圳豪地华拓), 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 试剂盒、RIPA 溶液、BCA 蛋白质分析试剂盒 (上海碧云天), 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) ELISA 试剂盒 (上海瓦兰), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体、活化-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved-cysteiny l aspartate specific proteinase 3, Cleaved-caspase-3) 抗体、TSHZ3 抗体 (上海艾博抗)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 ARPE-19 细胞在 37°C 和 5% CO₂ 条件下含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中孵育。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 将 ARPE-19 细胞接种于 96 孔板, 24h 后分别以 5、15、45、135mmol/L HG 刺激细胞, 同时以不加 HG 的 ARPE-19 细胞为 NC 组 (对照)。48h 后, 以 10 μ L CCK-8 试剂孵育细胞 2h, 于酶标仪 450nm 处测量 OD 值, 以实验组与对照组 OD 值之比来计算细胞存活率 (%), 确定最佳 HG 浓度。

1.2.3 细胞转染 取对数生长期 ARPE-19 细胞, 将其培养至密度为 80% 左右, 将 lncRNA KCNQ1OT1 的小干扰 RNA (siRNA) (si-lncRNA KCNQ1OT1) 和 siRNA 阴性对照 (si-NC), miR-19a-3p 模拟物 (miR-19a-3p mimics) 和阴性对照 (miR-NC), TSHZ3 siRNA (si-TSHZ3) 和阴性对照 (si-con) 分别转染至 ARPE-19 细胞, 转染 6h 后用 45mmol/L HG 刺激 48h, 记为 si-NC+45mmol/L HG 组、si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组、miR-NC+45mmol/L HG 组、miR-19a-3p mimics+45mmol/L HG 组、si-con+45mmol/L HG 组、si-TSHZ3+45mmol/L HG 组; 将 TSHZ3 过表达载体 (pcDNA-TSHZ3)、过表达空载体 (pcDNA) 分别与 si-lncRNA KCNQ1OT1 共转染至 ARPE-19 细胞, 转染 6h 后用 45mmol/L HG 刺激 48h, 记为 pcDNA+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组、pcDNA-TSHZ3+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组。所有序列均由广州 RiboBio 合成。45mmol/L HG 刺激 48h 的 ARPE-19 细胞记为 45mmol/L HG 组, 不加 HG 培养的正常细胞为 NC 组 (对照)。利用 CCK-8 法检测 ARPE-19 细胞存活率, 并进行其他实验。

1.2.4 qRT-PCR 检测 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p 及 TSHZ3 mRNA 表达 使用 TRIzol 提取 ARPE-19

表1 45mmol/L HG 处理 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p 及 TSHZ3 表达水平 (n=9, $\bar{x}\pm s$)

组别	lncRNA KCNQ1OT1	miR-19a-3p	TSHZ3 mRNA	TSHZ3 protein
NC 组	1.00±0.08	1.00±0.05	1.00±0.09	0.37±0.02
45mmol/L HG 组	1.86±0.12	0.46±0.03	2.73±0.18	0.87±0.06
t	17.889	27.783	25.789	23.717
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:NC 组:不加 HG 的 ARPE-19 细胞。

细胞的总 RNA。在 NanoDrop 分光光度计检测 RNA 的浓度。使用逆转录试剂盒对 RNA 进行反转录。使用 SYBR Green 试剂盒通过 ABI 7500 快速实时 PCR 系统对 cDNA 进行扩增和检测。根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达水平。GAPDH 用作 lncRNA 和 mRNA 的内部对照。U6 用作 miRNA 的内部对照。引物序列如下:lncRNA KCNQ1OT1 正向:5'-GCACTCTGGGTCTCTTCTC-3', 反向:5'-CACTTCCCTGCCTCTACAC-3'。miR-19a-3p 正向:5'-CGCTGTGCAAATCTATGCAA-3', 反向:5'-CGGCCCACTGTTTCAGACTAC-3'。TSHZ3 正向:5'-CAGAGGAGCATAACGCAGAT-3', 反向:5'-TGTGTGACTCGCTGTCCATT-3'。GAPDH 正向:5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3', 反向:5'-TTTCTAGACGGCAGTCCAGG-3'。U6 正向:5'-CTCCGCTTCGGCAGCAC-3', 反向:5'-AACGCTTCACGAATTCGCT-3'。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 收集 ARPE-19 细胞,在 4℃、黑暗中用 10 μ L FITC-Annexin V 和 10 μ L PI (0.5mg/mL) 对细胞进行染色,然后使用流式细胞仪检测凋亡细胞。以早期和晚期凋亡细胞的百分比来计算凋亡率。使用 Flowjo 软件通过 FACSscan 流式细胞仪分析数据。

1.2.6 Western Blot 检测 TSHZ3 和 Cleaved-caspase-3 及 Bax 蛋白质的表达情况 将 ARPE-19 细胞与 RIPA 溶液混合以提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白质分析试剂盒进行定量。在 100℃ 沸水中将蛋白质变性 10min。然后,通过 12% SDS-PAGE 分离 25 μ g 蛋白,并将其转移到聚偏二氟乙烯膜上。TSHZ3、Cleaved-caspase-3、Bax 和 β -肌动蛋白(β -actin;对照)抗体在 5% 封闭缓冲液中以 1:1000 的稀释度制备,并用于 4℃ 下与膜过夜孵育。随后,在室温下将膜用辣根过氧化物酶标记的二抗探测 1h。冲洗后,将膜转移到 Bio-Rad ChemiDoc XRS 系统中,并以 ECL 发光底物产生信号,通过 Image Lab 软件进行捕获和分析。

1.2.7 ELISA 检测氧化应激指标 ROS 和 MDA 水平 各组 ARPE-19 细胞以 2000r/min 离心 20min,收集细胞上清液,分别按照 ROS ELISA 试剂盒、MDA ELISA 试剂盒的操作说明,检测 ROS、MDA 水平。

1.2.8 双荧光素酶检测活性 用 LncBase Predicted v.2 软件预测 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p 之间的靶向结合区域,用 targetscan 软件预测 miR-19a-3p 和 TSHZ3 之间的靶向结合区域。分别构建含有 miR-19a-3p 结合位点的 lncRNA KCNQ1OT1-野生型(WT)、突变型(MUT)报告基因载体 lncRNA KCNQ1OT1-WT、lncRNA KCNQ1OT1-MUT,以及含有 miR-19a-3p 结合位点的 TSHZ3-3'UTR-WT 及 MUT 报告基因载体 TSHZ3-3'UTR-WT、TSHZ3-3'UTR-MUT。随后,利用 Lipofectamine 2000 在 ARPE-19 细胞中共转染 miR-19a-3p 模拟物或 miR-NC 与 lncRNA KCNQ1OT1-WT、lncRNA KCNQ1OT1-MUT、TSHZ3-3'

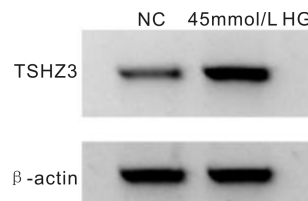


图1 Western Blot 检测 TSHZ3 蛋白质的表达。

UTR-WT 或 TSHZ3-3'UTR-MUT 报告基因载体,48h 后进行双荧光素酶活性检测。另在 ARPE-19 细胞中转染 pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1、pcDNA、si-lncRNA KCNQ1OT1、si-NC、miR-19a-3p 模拟物、miR-NC、anti-miR-19a-3p、anti-miR-NC,以及共转染 miR-19a-3p 模拟物与 pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1、miR-19a-3p 模拟物与 pcDNA、anti-miR-19a-3p 与 si-lncRNA KCNQ1OT1、anti-miR-19a-3p 与 si-NC,利用 qRT-PCR、Western Blot 检测 lncRNA KCNQ1OT1、miR-19a-3p 和 TSHZ3 蛋白表达,分析 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p、miR-19a-3p 和 TSHZ3 之间的靶向调控。

统计学分析:采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,服从正态分布的计量资料表示为 $\bar{x}\pm s$ 。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 HG 对 ARPE-19 细胞存活率的影响 5、15、45、135mmol/L HG 处理 ARPE-19 后,细胞的存活率分别为 (98.13±6.02)%、(79.03±4.25)%、(55.76±3.27)%、(39.76±2.53)% ,均低于 NC 组的 (100.00±8.13)% ,其中 5mmol/L HG 组与 NC 组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$) ,15、45、135mmol/L HG 组与 NC 组之间差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。后续选择 ARPE-19 存活率接近一半时的 HG 浓度 45mmol/L。

2.2 45mmol/L HG 处理 ARPE-19 中 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p 及 TSHZ3 表达水平 45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平高于 NC 组,miR-19a-3p 表达水平低于 NC 组,TSHZ3 mRNA 和 TSHZ3 蛋白表达水平均高于 NC 组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) ,见表 1、图 1。

2.3 lncRNA KCNQ1OT1 低表达抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 与 NC 组比较,45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平升高,细胞存活率降低,凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达水平增加,ROS 和 MDA 水平增加,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 si-NC+45mmol/L HG 组比较,si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平降低,细胞存活率升

表2 lncRNA KCNQ1OT1 低表达抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA KCNQ1OT1	细胞存活率 (%)	凋亡率 (%)	Cleaved-caspase-3	Bax	ROS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
NC 组	1.00 \pm 0.10	100.00 \pm 9.13	6.38 \pm 0.51	0.46 \pm 0.03	0.34 \pm 0.03	6.02 \pm 0.43	3.86 \pm 0.21
45mmol/L HG 组	1.84 \pm 0.11 ^a	51.69 \pm 3.66 ^a	23.16 \pm 1.54 ^a	0.94 \pm 0.07 ^a	0.79 \pm 0.06 ^a	16.94 \pm 1.02 ^a	10.98 \pm 0.76 ^a
si-NC+45mmol/L HG 组	1.82 \pm 0.10	52.94 \pm 3.54	24.87 \pm 1.94	0.92 \pm 0.07	0.81 \pm 0.07	16.43 \pm 1.13	10.43 \pm 0.54
si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组	1.15 \pm 0.08 ^c	92.27 \pm 7.16 ^c	8.39 \pm 0.61 ^c	0.53 \pm 0.04 ^c	0.41 \pm 0.03 ^c	7.02 \pm 0.47 ^c	4.67 \pm 0.32 ^c
<i>F</i>	181.239	145.813	496.567	187.195	213.524	458.113	495.653
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: NC 组; 不加 HG 的 ARPE-19 细胞; ^a $P < 0.05$ vs NC 组; ^c $P < 0.05$ vs si-NC+45mmol/L HG 组。

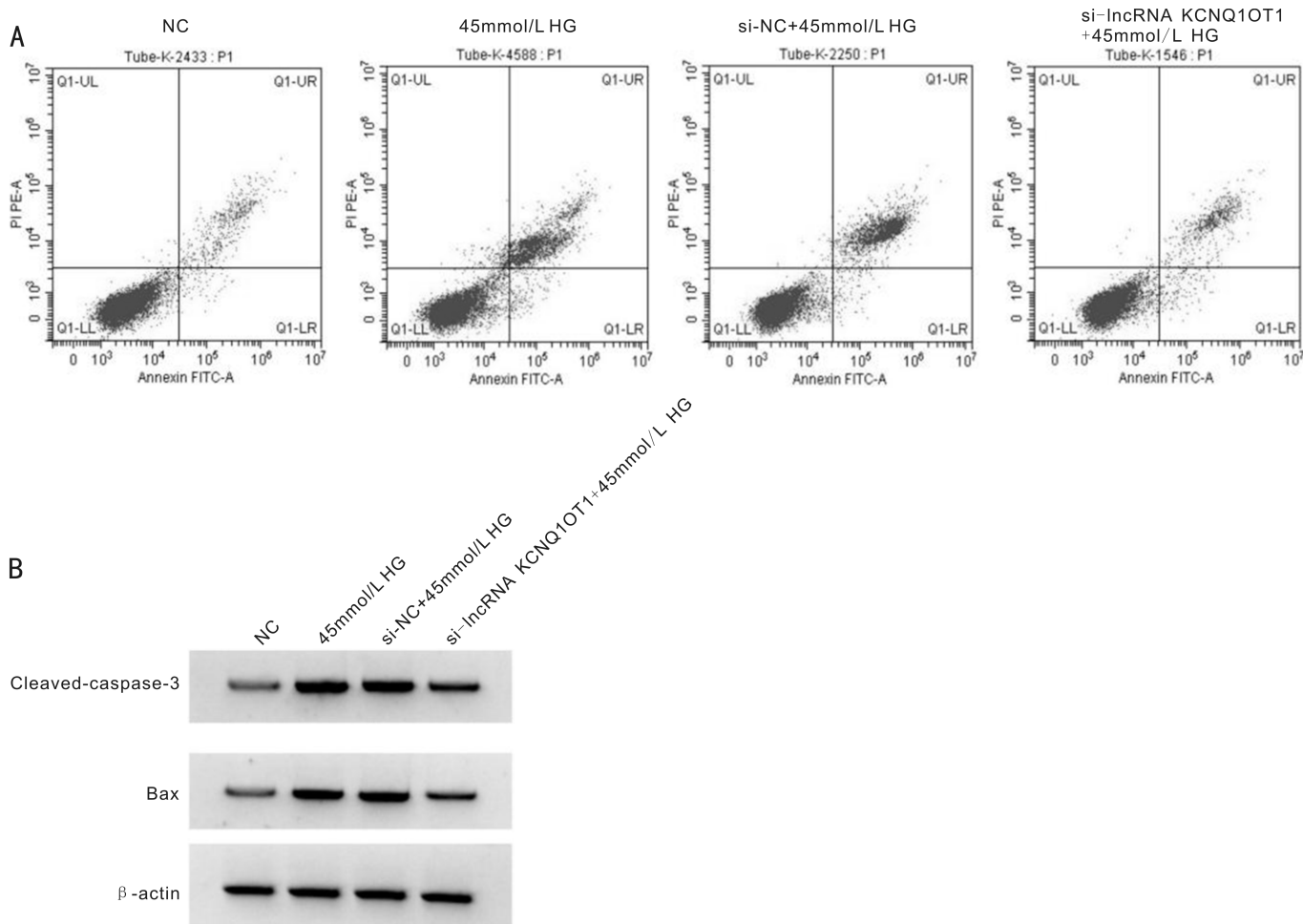


图2 lncRNA KCNQ1OT1 低表达抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 A: 流式细胞仪检测细胞凋亡; B: Western Blot 检测 Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白质的表达。

高, 凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达水平减少, ROS 和 MDA 水平减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 2、图 2。

2.4 miR-19a-3p 模拟物抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 与 miR-NC+45mmol/L HG 组比较, miR-19a-3p mimics+45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中 miR-19a-3p 表达水平、细胞存活率升高, 凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达、ROS 和 MDA 水平减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 3、图 3。

2.5 si-TSHZ3 抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 si-TSHZ3+45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中 TSHZ3 表达水平比 si-con+45mmol/L HG 组低, 细胞存活率比 si-con+45mmol/L HG 组高, 凋亡率、Cleaved-

caspase-3、Bax 蛋白表达、ROS 和 MDA 水平比 si-con+45mmol/L HG 组低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 4、图 4。

2.6 lncRNA KCNQ1OT13 通过 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 的表达 lncBase Predicted v.2、targetscan 分别对 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p、miR-19a-3p 和 TSHZ3 之间的靶向结合进行预测, 见图 5。miR-19a-3p 组 lncRNA KCNQ1OT1-WT 相对荧光素酶活性低于 miR-NC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); miR-19a-3p 组与 miR-NC 组 lncRNA KCNQ1OT1-MUT 相对荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.01$); miR-19a-3p 组 TSHZ3-3'UTR-WT 相对荧光素酶活性低于 miR-NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); miR-19a-3p 组与 miR-NC 组 TSHZ3-3'UTR-MUT 相对荧光素酶活性差异无统计

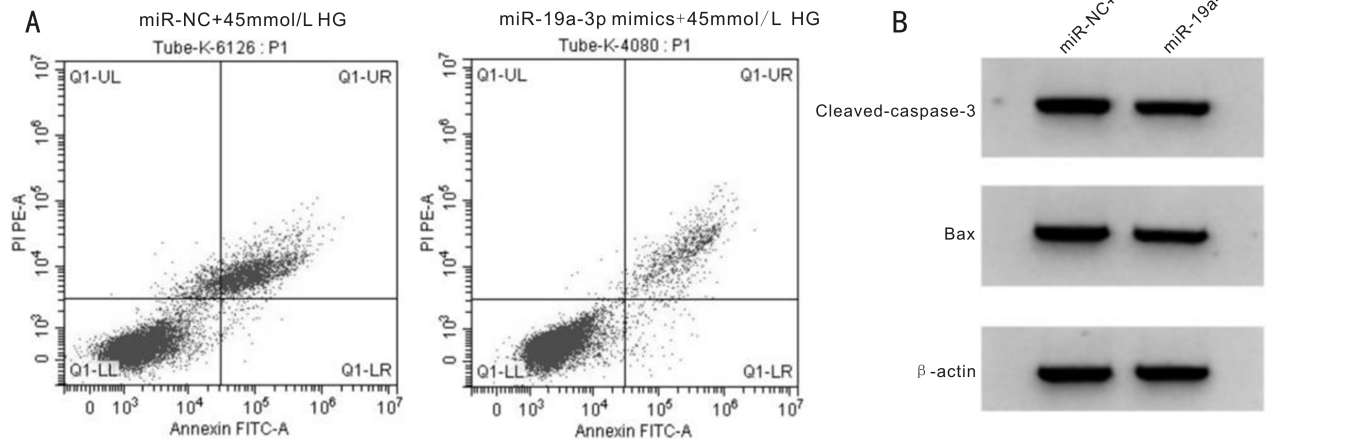


图3 miR-19a-3p 模拟物抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Western Blot 检测 Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白质的表达。

表3 miR-19a-3p 模拟物抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	miR-19a-3p	细胞存活率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-caspase-3	Bax	ROS(μmol/mg)	MDA(μmol/mg)
miR-NC+45mmol/L HG 组	1.00±0.10	52.91±4.05	23.47±1.34	0.92±0.08	0.82±0.07	16.49±1.17	11.08±0.81
miR-19a-3p mimics+45mmol/L HG 组	2.05±0.14 ^a	87.13±6.10 ^a	8.10±0.61 ^a	0.51±0.03 ^a	0.47±0.03 ^a	8.25±0.51 ^a	4.87±0.31 ^a
t	18.309	14.021	31.318	14.396	13.787	19.368	21.481
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^aP<0.05 vs miR-NC+45mmol/L HG 组。

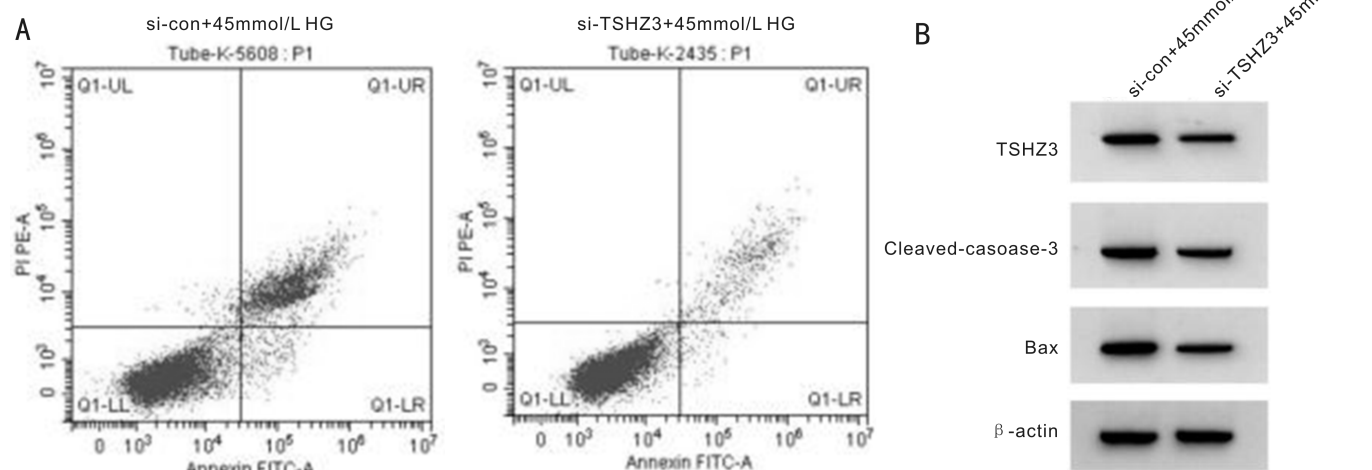


图4 si-TSHZ3 抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Western Blot 检测 TSHZ3、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白质的表达

表4 si-TSHZ3 抑制 HG 对 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	TSHZ3	细胞存活率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-caspase-3	Bax	ROS(μmol/mg)	MDA(μmol/mg)
si-con+45mmol/L HG 组	0.85±0.07	52.03±4.05	23.69±1.37	0.97±0.06	0.78±0.07	16.85±0.97	10.77±0.65
si-TSHZ3+45mmol/L HG 组	0.41±0.03 ^a	96.72±7.15 ^a	6.83±0.61 ^a	0.44±0.04 ^a	0.36±0.03 ^a	6.18±0.43 ^a	4.28±0.27 ^a
t	17.332	16.315	33.727	22.049	16.545	30.169	27.662
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:^aP<0.05 vs si-con+45mmol/L HG 组。

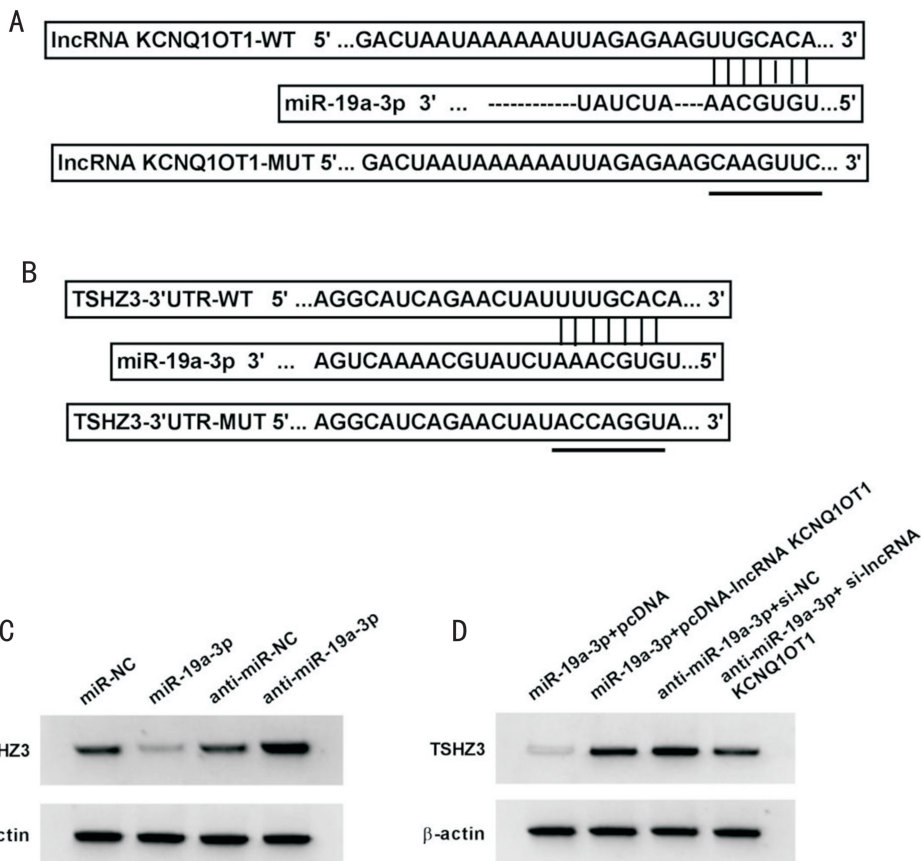


图5 lncRNA KCNQ1OT13 通过 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 的表达 A: LncBase Predicted v.2 预测 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-19a-3p 之间的靶向结合区域; B: targetscan 预测 miR-19a-3p 和 TSHZ3 之间的靶向结合区域; C: Western Blot 检测 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 蛋白质的表达; D: Western Blot 检测 lncRNA KCNQ1OT13 通过 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 蛋白质的表达。

表5 ARPE-19 细胞相对双荧光素酶活性检测

(n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA KCNQ1OT1-WT	lncRNA KCNQ1OT1-MUT	TSHZ3-3'UTR-WT	TSHZ3-3'UTR-MUT
miR-NC 组	1.00±0.10	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.11
miR-19a-3p 组	0.44±0.03 ^a	1.02±0.09	0.38±0.02 ^a	0.97±0.06
t	16.091	0.498	25.549	0.718
P	<0.01	0.625	<0.01	0.483

注: ^aP<0.05 vs miR-NC 组。

表6 qRT-PCR 检测 miR-19a-3p 的表达 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA KCNQ1OT1	miR-19a-3p
pcDNA	1.00±0.10	1.00±0.08
pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1	2.15±0.13 ^a	0.42±0.03 ^a
si-NC	1.03±0.09	0.99±0.08
si-lncRNA KCNQ1OT1	0.45±0.03 ^c	1.97±0.12 ^c
F	510.309	530.093
P	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.05 vs pcDNA 组; ^cP<0.05 vs si-NC 组。

表7 Western Blot 检测 TSHZ3 蛋白表达 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	miR-19a-3p	TSHZ3
miR-NC	1.00±0.08	0.39±0.02
miR-19a-3p	2.43±0.18 ^a	0.11±0.01 ^a
anti-miR-NC	1.03±0.06	0.40±0.03
anti-miR-19a-3p	0.47±0.03 ^c	0.85±0.07 ^c
F	584.889	535.381
P	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.05 vs miR-NC 组; ^cP<0.05 vs anti-miR-NC 组。

学意义 ($P>0.05$), 见表 5。pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1 组 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平比 pcDNA 组高, miR-19a-3p 表达水平比 pcDNA 组低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); si-lncRNA KCNQ1OT1 组 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平比 si-NC 组低, miR-19a-3p 表达水平比 si-NC 组高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见表 6。miR-19a-3p 组 miR-19a-3p 表达水平比 miR-NC 组高, TSHZ3 蛋白表达水平比 miR-NC 组低, 差异均有统

计学意义 (均 $P<0.05$); anti-miR-19a-3p 组 miR-19a-3p 表达水平比 anti-miR-NC 组低, TSHZ3 蛋白表达水平比 anti-miR-NC 组高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见图 5C、表 7。miR-19a-3p+pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1 组 TSHZ3 蛋白表达水平比 miR-19a-3p+pcDNA 组高, anti-miR-19a-3p+si-lncRNA KCNQ1OT1 组 TSHZ3 蛋白表达水平比 anti-miR-19a-3p+si-NC 组低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见图 5D、表 8。

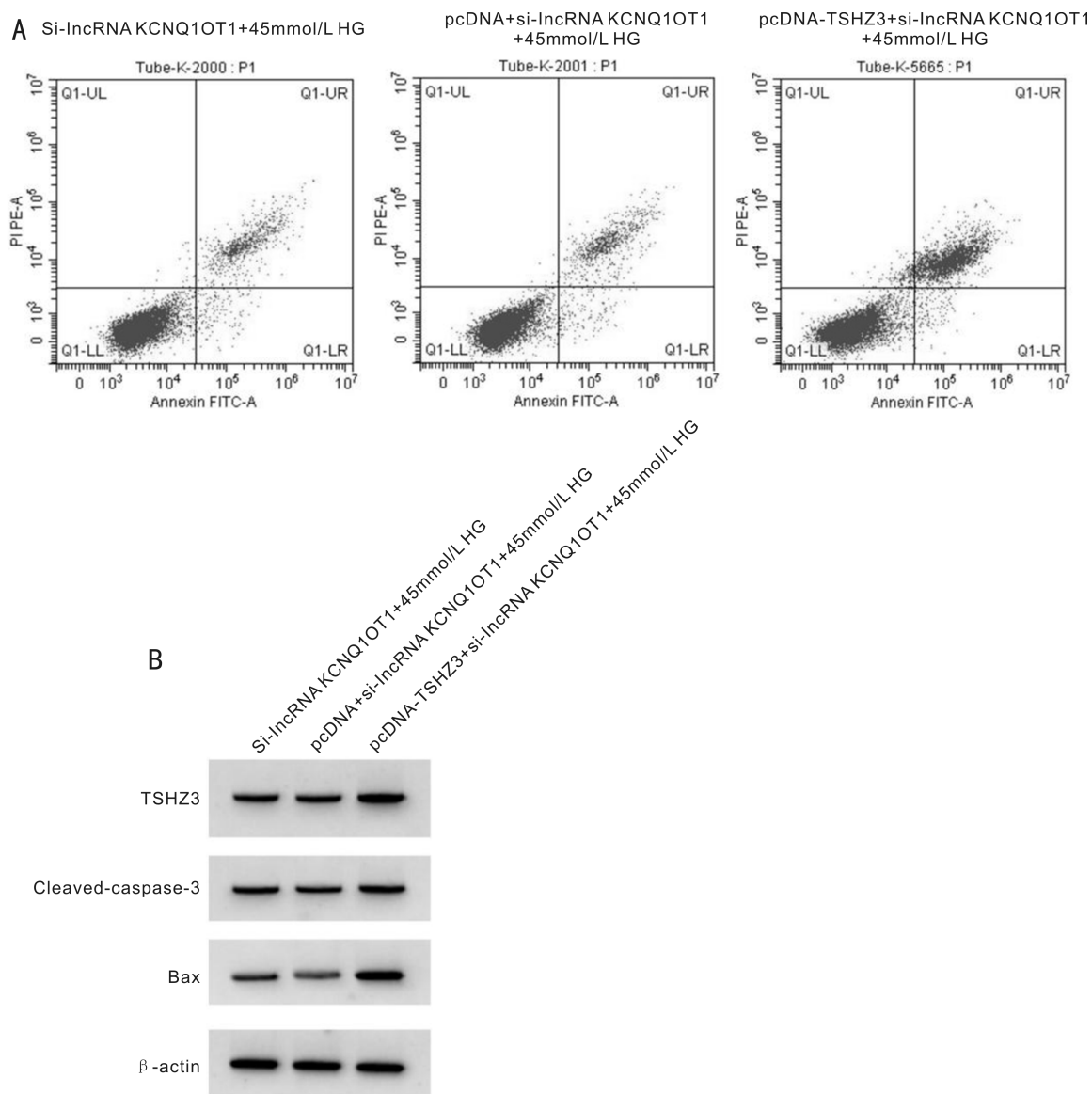


图6 TSHZ3 过表达可以逆转 lncRNA KCNQ1OT1 低表达对 HG 处理的 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Western Blot 检测 TSHZ3、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白质的表达。

表8 lncRNA KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p 调控 TSHZ3 蛋白质的表达 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	TSHZ3
miR-19a-3p+pcDNA	0.11±0.02
miR-19a-3p+pcDNA-lncRNA KCNQ1OT1	0.51±0.04 ^a
anti-miR-19a-3p+si-NC	0.83±0.07
anti-miR-19a-3p+si-lncRNA KCNQ1OT1	0.39±0.03 ^c
F	410.462
P	<0.01

注:^aP<0.05 vs miR-19a-3p+pcDNA 组;^cP<0.05 vs anti-miR-19a-3p+si-NC 组。

2.7 TSHZ3 过表达可以逆转 lncRNA KCNQ1OT1 低表达对 HG 处理的 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响 与 si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组比较, pcDNA + si-lncRNA KCNQ1OT1 + 45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞 TSHZ3 蛋白表达、存活率、凋亡以及氧化应激均无统计学意义(均 P>0.05); 而 pcDNA-TSHZ3+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组 ARPE-19 细胞中

TSHZ3 表达水平升高, 存活率降低, 凋亡率、Cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达、ROS 和 MDA 水平增加, 差异均有统计学意义(均 P<0.05), 见表 9, 图 6。

3 讨论

最近研究显示 lncRNA 在眼组织中差异表达, 并在诸如青光眼、角膜疾病、白内障、糖尿病视网膜病变和眼肿瘤的眼科疾病的发病机制中起重要作用^[12]。证据表明, lncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病患者、HG 诱导的心肌细胞和糖尿病小鼠心脏组织中表达增加^[13]。lncRNA KCNQ1OT1 促进了 ARPE-19 细胞的增殖和血管生成, 相反, 在 HG 诱导的 ARPE-19 细胞中, 敲低 lncRNA KCNQ1OT1 诱导细胞的凋亡并抑制其增殖^[8]。lncRNA KCNQ1OT1 可能作为竞争性内源性 RNA 结合 miR-214 来调节 caspase-1 的表达, 诱导 HG 处理的角膜内皮细胞的焦亡^[14]。此外, 在 HG 条件下, lncRNA KCNQ1OT1 敲低可通过 miR-26a-5p/ITGAV/TGF-β/Smad3 轴抑制晶状体上皮细胞的活力、迁移和上皮间质转化^[15]。本研究发现了类似的结果, 即 HG 使 ARPE-19 细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 表达上调, 而 lncRNA KCNQ1OT1 低表达使 HG 诱导的 ARPE-19 细胞

表 9 TSHZ3 过表达可以逆转 lncRNA KCNQ1OT1 低表达对 HG 处理的 ARPE-19 细胞存活率和凋亡以及氧化应激的影响

(n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	TSHZ3	细胞存活率 (%)	凋亡率 (%)	Cleaved-caspase-3	Bax	ROS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
si-lncRNA KCNQ1OT1+ 45mmol/L HG 组	0.42±0.03	91.88±6.03	8.41±0.51	0.52±0.04	0.39±0.03	6.98±0.53	4.59±0.31
pcDNA+si-lncRNA KCNQ1OT1+ 45mmol/L HG 组	0.40±0.04	92.13±7.16	8.36±0.55	0.50±0.03	0.38±0.02	6.91±0.35	4.62±0.25
pcDNA-TSHZ3+si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组	0.91±0.08 ^a	46.37±3.16 ^a	25.69±1.25 ^a	0.96±0.07 ^a	0.85±0.05 ^a	18.53±1.04 ^a	11.52±0.87 ^a
F	253.112	192.019	1268.262	246.649	512.289	813.430	470.083
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.05 vs si-lncRNA KCNQ1OT1+45mmol/L HG 组。

的增殖升高,细胞凋亡降低,这与之前报道^[8]一致,提示 lncRNA KCNQ1OT1 可能加速糖尿病视网膜病变。且 lncRNA KCNQ1OT1 低表达后,细胞凋亡的关键执行蛋白 Bax、Cleaved-caspase-3 水平降低,氧化应激标志 ROS、MDA 水平同样降低。此前,lncRNA KCNQ1OT1 的敲除被证明可以减弱 HG 导致的细胞 ROS、MDA 水平升高^[16-17]。这些结果说明 lncRNA KCNQ1OT1 低表达通过促进视网膜上皮细胞的增殖、减弱细胞凋亡与氧化应激,来保护 HG 诱导后视网膜上皮细胞的损伤。

越来越多的证据表明,lncRNA 与 miRNA 竞争性结合以调节靶基因的表达^[18]。在线预测软件预测 miR-19a-3p 可能是 lncRNA KCNQ1OT1 的下游靶标。先前的研究表明,糖尿病患者的血浆 miR-19a-3p 水平和血糖浓度之间显著负相关,表明 miR-19a-3p 的负调节与糖尿病的进展有关^[10]。miR-19a-3p 过表达减轻缺血再灌注损伤模型中神经元细胞的氧化应激和凋亡^[19]。在这项研究中,HG 诱导 ARPE-19 细胞后,miR-19a-3p 表达降低,miR-19a-3p 模拟物提高 HG 诱导的 ARPE-19 细胞增殖,降低凋亡和氧化应激水平。这与以前的报道^[10, 18]相似。此外,lncRNA KCNQ1OT1 直接靶向 miR-19a-3p,并通过使 miR-19a-3p 海绵化来调节 HG 诱导的视网膜上皮细胞损伤。

TSHZ3 编码锌指转录因子,并在发育中的人类新皮层中高度表达^[20]。研究表明,在 DNA 损伤的神经干细胞中,TSHZ3 的表达与 DNA 损伤程度有关,并且 TSHZ3 作为 miR-125b-1-3p 的靶基因,介导大鼠椎间盘退变^[21]。在本研究中,miR-19a-3p 在 ARPE-19 细胞中直接靶向 TSHZ3,并对 TSHZ3 表达起负调控作用。si-TSHZ3 提高 HG 诱导的 ARPE-19 细胞增殖,降低凋亡和氧化应激水平。lncRNA KCNQ1OT1 通过靶向 miR-19a-3p 来调节 TSHZ3 表达,lncRNA KCNQ1OT1 低表达对 HG 诱导的 ARPE-19 细胞存活率、凋亡以及氧化应激的影响被 TSHZ3 过表达所逆转。这些结果说明,lncRNA KCNQ1OT1 通过 miR-19a-3p/TSHZ3 来调节 HG 诱导的视网膜上皮细胞增殖、凋亡和氧化应激。

总之,lncRNA KCNQ1OT1 可以通过靶向 miR-19a-3p 来调节 TSHZ3 的表达。此外,lncRNA KCNQ1OT1 低表达通过介导 miR-19a-3p 和 TSHZ3 改善了高糖诱导的视网膜上皮细胞损伤。提示 lncRNA KCNQ1OT1/miR-19a-3p/TSHZ3 轴可能是糖尿病视网膜病变的潜在治疗靶标。

参考文献

- Spencer BG, Estevez JJ, Liu E, et al. Pericytes, inflammation, and diabetic retinopathy. *Inflammopharmacology* 2020;28(3):697-709
- Shao J, Zhang Y, Fan G, et al. Transcriptome analysis identified a novel 3-lncRNA regulatory network of transthyretin attenuating glucose induced hRECs dysfunction in diabetic retinopathy. *BMC Med Genomics* 2019;12(1):134
- Barangi S, Hayes AW, Reiter R, et al. The therapeutic role of long non-coding RNAs in human diseases: a focus on the recent insights into autophagy. *Pharmacol Res* 2019;142:22-29
- Guo J, Liu Z, Gong R. Long noncoding RNA: an emerging player in diabetes and diabetic kidney disease. *Clin Sci (Lond)* 2019;133(12):1321-1339
- 冀天楠, 赵志飞, 怀思远, 等. lncRNA KCNQ1OT1 在结肠癌细胞中的促癌功能和下游调控通路研究. *解放军医学院学报* 2019;40(6):570-579
- 王天娇, 吴瑾, 张旭凤, 等. lnc-KCNQ1OT1 在胃癌组织和细胞中的表达及其临床意义. *现代肿瘤医学* 2019;27(21):3827-3830
- 李莹, 刘琦, 欧三桃, 等. lncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病肾病患者血清中的表达及临床意义. *实用医学杂志* 2019;35(1):71-74
- Shao J, Pan X, Yin X, et al. KCNQ1OT1 affects the progression of diabetic retinopathy by regulating miR-1470 and epidermal growth factor receptor. *J Cell Physiol* 2019;234(10):17269-17279
- Goodarzi G, Maniati M, Quijue D. The role of microRNAs in the healing of diabetic ulcers. *Int Wound J* 2019;16(3):621-633
- Li Y, Luo T, Wang L, et al. MicroRNA-19a-3p enhances the proliferation and insulin secretion, while it inhibits the apoptosis of pancreatic β cells via the inhibition of SOCS₃. *Int J Mol Med* 2016;38(5):1515-1524
- Li Y, Huang Y, Qi Z, et al. MiR-338-5p promotes glioma cell invasion by regulating TSHZ3 and MMP2. *Cell Mol Neurobiol* 2018;38(3):669-677
- Zhang L, Dong Y, Wang Y, et al. Long non-coding RNAs in ocular diseases: new and potential therapeutic targets. *Febs J* 2019;286(12):2261-2272
- Yang F, Qin Y, Wang Y, et al. lncRNA KCNQ1OT1 mediates pyroptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cell Physiol Biochem* 2018;50(4):1230-1244
- Zhang Y, Song Z, Li X, et al. Long noncoding RNA KCNQ1OT1 induces pyroptosis in diabetic corneal endothelial keratopathy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020;318(2):C346-C359
- Liu J, Dong Y, Wen Y, et al. lncRNA KCNQ1OT1 knockdown inhibits viability, migration and epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells via miR-26a-5p/ITGA5/TGF- β /Smad3 axis. *Exp Eye Res* 2020;200:108251

16 Li J, Li M, Bai L. KCNQ1OT1/miR-18b/HMGA2 axis regulates high glucose-induced proliferation, oxidative stress, and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. *Mol Cell Biochem* 2021;476(1):321-331

17 Zhu B, Cheng X, Jiang Y, et al. Silencing of KCNQ1OT1 decreases oxidative stress and pyroptosis of renal tubular epithelial cells. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020;13:365-375

18 Meng QQ, Zhai XL, Yuan Y, et al. lncRNA ZEB1-AS1 inhibits high glucose-induced EMT and fibrogenesis by regulating the miR-216a-5p/BMP7 axis in diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res* 2020; 53

(4):e9288

19 Gao N, Tang H, Gao L, et al. LncRNA H19 aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury by functioning as a CeRNA for miR-19a-3p to target PTEN. *Neuroscience* 2020;437:117-129

20 Caubit X, Gubellini P, Andrieux J, et al. TSHZ3 deletion causes an autism syndrome and defects in cortical projection neurons. *Nat Genet* 2016;48(11):1359-1369

21 Meng XT, Zhu Y, Tao L, et al. MicroRNA-125b-1-3p mediates intervertebral disc degeneration in rats by targeting teashirt zinc finger homeobox 3. *Exp Ther Med* 2018;15(3):2627-2633

2020 中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	1909	2	0.963	1	73.2	1
眼科新进展	1430	3	0.842	2	66.0	2
国际眼科杂志	2133	1	0.589	5	54.9	3
中华眼科医学杂志电子版	114	10	0.455	8	48.3	4
中华实验眼科杂志	1056	4	0.677	3	43.1	5
中华眼底病杂志	738	5	0.585	6	37.9	6
临床眼科杂志	450	7	0.470	7	37.6	7
眼科	388	8	0.393	9	26.9	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	661	6	0.590	4	21.8	9
中国斜视与小儿眼科杂志	240	9	0.376	10	13.6	10

摘编自 2020 版《中国科技期刊引证报告》核心版