

• 论 著 •

miR-409-3p 通过靶向 CACNB2 调控糖尿病视网膜病变作用机制研究*

罗 宁¹, 王玲玲^{2△}

南京市浦口区中医院:1. 内分泌科;2. 眼科, 江苏南京 211800

摘要:目的 探讨微小 RNA-409-3p(miR-409-3p)对人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)氧化应激、凋亡、炎症的影响及作用机制。方法 将对数期的 HRCEC 细胞分为对照组、高渗葡萄糖(HG)组、HG+miR-con 组、HG+miR-409-3p 组、HG+si-con 组、HG+si-CACNB2 组、HG+miR-409-3p+pcDNA 和 HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组。采用荧光定量 PCR(qPCR)法检测 miR-409-3p 的相对表达量,Western blotting(WB)法检测 L-型电压依赖型钙通道 β (CACNB2)、裂解的半胱天冬酶-3(Cleaved caspase-3)蛋白表达量,流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测炎症因子水平,酶标仪及试剂盒检测氧化应激相关指标,双荧光素酶检测(LRA)验证 miR-409-3p 与 CACNB2 调控关系。结果 HG 组 miR-409-3p 相对表达量低于对照组,CACNB2 mRNA 和蛋白表达量高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-409-3p 可靶向结合 CACNB2,在 HRCEC 细胞中负向调控 CACNB2 的表达。与 HG+miR-con 组相比,HG+miR-409-3p 组的乳酸脱氢酶(LDH)及谷胱甘肽(GSH)水平升高($P<0.01$),CACNB2 蛋白表达量、活性氧(ROS)及丙二醛(MDA)水平降低($P<0.01$);与 HG+miR-con 组相比,HG+miR-409-3p 组 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达量,细胞凋亡率,白细胞介素(IL)-6、IL-18 及 IL-1 β 水平均降低,同时,细胞间黏附分子(ICAM)蛋白表达量降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。敲减 CACNB2 具有相似的作用,过表达 CACNB2 可逆转 miR-409-3p 过表达对 HRCEC 细胞氧化应激、细胞凋亡、炎症反应的影响。结论 miR-409-3p 抑制 HRCEC 细胞的氧化应激、凋亡、炎症与下调 CACNB2 表达有关。

关键词:miR-409-3p; CACNB2; 糖尿病视网膜病变; 人视网膜血管内皮细胞; 凋亡; 炎症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.20.015 **中图法分类号:**R587.2;R774.1

文章编号:1673-4130(2023)20-2508-07

文献标志码:A

Mechanism of miR-409-3p regulating diabetes retinopathy by targeting CACNB2*

LUO Ning¹, WANG Lingling^{2△}

1. Department of Endocrinology; 2. Department of Ophthalmology, Nanjing Pukou District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 211800, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of microRNA-409-3p (miR-409-3p) on oxidative stress, apoptosis and inflammation of human retinal vascular endothelial cells (HRCEC) and its mechanism. **Methods** The HRCEC cells at logarithmic proliferation stage were divided into control group, hypertonic glucose (HG) group, HG+miR-con group, HG+miR-409-3p group, HG+si-con group, HG+si-CACNB2 group, HG+miR-409-3p+pcDNA and HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 group. The relative expression levels of miR-409-3p were detected by fluorescence quantitative PCR (qPCR), and the protein expression levels of L-type calcium channel β 2 subunit (CACNB2) and Cleaved caspase-3 were detected by Western blotting (WB). Flow cytometry (FCM) was used to detect cell apoptosis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect inflammatory factors, oxidative stress related indexes were detected by enzyme-labeled instrument and kits, and the regulatory relationship between miR-409-3p and CACNB2 was verified by dual luciferase assay (LRA). **Results** The relative expression level of miR-409-3p in HG group was lower than that in control group, and the mRNA and protein expression levels of CACNB2 in HG group were higher than those in control group, with statistical significance ($P<0.05$). MiR-409-3p targeted to CACNB2 and negatively regulate the expression of CACNB2 in HRCEC cells. Compared with HG+miR-con group, lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione (GSH) levels in HG+miR-409-3p group increased ($P<0.01$), while CACNB2 pro-

* 基金项目:江苏省优势学科建设工程项目(YSHL0803-213)。

作者简介:罗宁,女,主治中医师,主要从事糖尿病微血管并发症方向研究。△ 通信作者,E-mail:229468693@qq.com。

tein expression levels, reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels decreased ($P < 0.01$). Compared with HG+miR-con group, protein expression levels of Cleaved caspase-3, Bax, and apoptosis rate, interleukin (IL)-6, IL-18 and IL-1 β levels in HG+miR-409-3p group decreased, as well as protein expression level of intercellular adhesion molecule (ICAM), and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). Knockdown of CACNB2 had a similar effect, and overexpression of CACNB2 could reverse the effects of miR-409-3p overexpression on oxidative stress, apoptosis and inflammation of HRCEC cells.

Conclusion The inhibition of oxidative stress, apoptosis and inflammation of HRCEC cells by miR-409-3p is related to the down-regulation of CACNB2 expression.

Key words: miR-409-3p; CACNB2; diabetic retinopathy; human retinal vascular endothelial cells; apoptosis; inflammation

糖尿病视网膜病变(DR)是最常见的糖尿病微血管并发症之一,主要表现为血-视网膜屏障遭到破坏,发生新生血管的病理学变化,使糖尿病患者视力受损。DR 病因学十分复杂,新血管生成主要与人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)增殖有关^[1]。在 DR 患者中发现,HRCEC 细胞存在迁移与凋亡的情况^[2],因此以高糖诱导 HRCEC 细胞为研究对象,对探索 DR 的病理过程及发病机制具有重要的意义。微小 RNA(miRNA)是长约为 22 个核苷酸的短链非编码小 RNA 分子,在转录后可抑制机体靶基因的表达而调控信号通路的活性,进一步参与疾病进程^[3]。miR-409-3p 是近几年来发现的一种新 miRNA,可调控多种肿瘤的发展^[4-5],同时有研究表明,miR-409-3p 在调节人体微小血管生成中具有重要作用,在血管生成相关的人脑微血管内皮细胞(hCMEC/D3)中下调^[6],但是关于其在 DR 中的功能及作用机制研究甚少。L-型电压依赖型钙通道 β (CACNB2)是 1 型糖尿病中 DR 的一种新的易感基因,有研究表明其在 DR 患者视网膜细胞中大量表达,并可以调节血管内皮生长因子(VEGF)的分泌^[7]。但是,miR-409-3p 是否可靶向结合 CACNB2,调控 DR 至今尚罕见相关研究报道。本研究拟观察 miR-409-3p 是否靶向调控 CACNB2 表达影响 HRCEC 细胞的凋亡、炎症反应、氧化应激,以期对 DR 的治疗提供可能的新靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材 人 HRCEC 购自上海中科院细胞库,胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,四甲基噻唑蓝(MTT)试剂盒和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,Trizol 试剂、LipofectamineTM 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,PCR 引物由北京三博远志生物技术有限公司合成,逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,RIPA 蛋白裂解液、人白细胞介素(IL)-6、IL-18、IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自碧云天生物技术公司,BCA 蛋白检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝公司,miR-409-3p、miR-con、CACNB2 过表达质

粒、空白质粒购自北京百奥莱博科技有限公司,双荧光素酶活性检测(LRA)试剂盒购自美国 Promega 公司,CACNB2、活性氧(ROS)、Cleaved caspase-3、Bax 及 Bcl-2 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Sigma 公司。

1.2 HRCEC 细胞培养 复苏 HRCEC 细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基置于恒温培养箱中进行培养,设置条件为 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 97%。根据细胞生长状况(细胞融合至 80%~90%时传代),每 2~3 天传代 1 次,传代时加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,弃除 PBS 后,加入 0.25%胰蛋白酶溶液消化。

1.3 细胞转染与分组 转染前一天将 1×10^5 个 HRCEC 细胞接种至 6 孔板,用 50 μ L Opti-MEM 培养基稀释 miR-409-3p 过表达质粒及空白质粒(miR-NC)。将对数期的 HRCEC 细胞分为对照组、高渗葡萄糖(HG)组、HG+miR-con 组、HG+miR-409-3p 组、HG+si-con 组、HG+si-CACNB2 组、HG+miR-409-3p+pcDNA 和 HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组。对照组用 5 mmol/L 的葡萄糖处理 HRCEC 细胞 48 h,HG 组用 30 mmol/L 的葡萄糖处理 HRCEC 细胞 48 h。按照 LipofectamineTM 2000 试剂盒操作步骤的要求,将相应质粒转染至 HRCEC 细胞,转染持续 5 h。转染成功后,用 30 mmol/L 的葡萄糖处理继续培养 48 h,收集各组细胞备用。

1.4 荧光定量 PCR(qPCR)法检测细胞中 miR-409-3p、CACNB2 的表达 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,微量核酸仪(美国 Thermo 公司)对 RNA 进行定量,按逆转录试剂盒操作说明,将 RNA 逆转录为 cDNA,对靶基因进行扩增。扩增条件:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共循环 35 次。miR-409-3p:上游引物为 5'-GCGAATGTT-GCTCGGTGA-3',下游引物为 5'-GTGCAGGGTC-CGAGGT-3';内参 U6:上游引物为 5'-ATTCCCCT-GTAGGGCTATGA-3',下游引物为 5'-AACGCT-

TCACGAATTTGCGT-3';CACNB2:上游引物为 5'-AGGGTCGCTGTTCTGCATC-3',下游引物为 5'-AATTCTTTGCCTGCTTTTCTG-3';内参 GAPDH:上游引物为 5'-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3',下游引物为 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-409-3p 和 CACNB2 mRNA 的相对表达量。

1.5 Western blotting(WB)法检测蛋白表达 RIPA 蛋白裂解液提取各组细胞的总蛋白,13 400×g 离心 20 min,收集上清,BCA 蛋白试剂盒检测蛋白样品浓度。定量蛋白后进行变性,再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳后,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,使用 5%脱脂牛奶对 PVDF 膜封闭 1 h。然后,分别将 CACNB2、裂解的半胱天冬酶-3 (Cleaved caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(Bcl-2)和 Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)一抗与 PVDF 膜 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,洗膜后显影,采用凝胶成像系统曝光拍照。使用 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 条带的灰度值的比值进行蛋白相对定量。

1.6 LRA 验证靶向关系 TargetScan 生物信息学软件预测显示,CACNB2 的 3'端非翻译区(3'UTR)中含有与 miR-409-3p 互补的核苷酸序列,即 miR-409-3p 与靶基因 CACNB2 存在结合位点。构建 CACNB2 野生型(CACNB2-WT 组)和突变型(CACNB2-MUT 组)荧光素酶报告载体。使用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒分别将 CACNB2-WT、CACNB2-MUT 与 miR-409-3p、anti-miR-409-3p、miR-con、anti-miR-con 共转染至 HRCEC 细胞。转染 24 h 后,通过荧光素酶活性检测试剂盒检测细胞荧光素酶的活性,结果以萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性的比值表示。

1.7 活性氧(ROS)荧光强度检测 采用免疫荧光法检测 ROS 荧光强度。以 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.5% Triton X-100[以磷酸盐缓冲液(PBS)配制]室温通透 10 min,1% BSA 室温封闭 30 min,细胞滴加适量稀释至适当比例(1:2 000)的 ROS 一抗,4℃ 孵育过夜,滴加荧光二抗(1:1 000)。DAPI 染细胞核,浓度和时间根据试剂说明书使用,用抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察采集图像。

1.8 炎症因子检测 收集各组细胞,13 400×g 离心 20 min,收集上清,参照酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒说明书检测白细胞介素(IL)-6、IL-18 及 IL-1β 分泌情况,使用全波长酶标仪测得 IL-6、IL-18 及 IL-1β 在 450 nm 波长下的吸光度值,并计算炎症因子水平。

1.9 氧化应激因子检测 收集细胞,13 400×g 离心 20 min 后收集上清,按照试剂盒操作说明检测乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)活性,使用全波长酶标仪测得 LDH、MDA、GSH 在 490 nm 波长下的吸光度值,严格按照试剂盒说明书操作并计算酶活性。

1.10 流式细胞术实验检测细胞凋亡 收集各实验组细胞,加入 600 μL 的结合缓冲液重悬细胞,再按照细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI)操作说明,先加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 避光反应 20 min,再加入 5 μL 的 PI 避光反应 20 min,300 目细胞过滤器过滤后,于 1 h 内上流式细胞仪完成检测。凋亡率计算方法如下:细胞的凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。每个样品重复 3 次。

1.11 统计学处理 利用 SPSS26.0 软件分析数据,符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上比较采用方差分析以及 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-409-3p 和 CACNB2 在人视网膜血管内皮细胞中的表达 与对照组比较,HG 组 miR-409-3p 相对表达量降低($P < 0.05$),CACNB2 mRNA 和蛋白表达量升高($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。

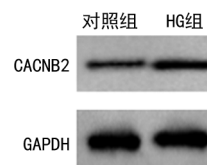


图 1 人视网膜血管内皮细胞 CACNB2 蛋白表达

表 1 两组 miR-409-3p 和 CACNB2 mRNA、蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-409-3p	CACNB2 mRNA	CACNB2 蛋白
对照组	1.07±0.13	1.02±0.12	0.29±0.03
HG 组	0.43±0.07 ^a	4.09±0.78 ^a	0.46±0.06 ^a
<i>t</i>	13.004	11.670	7.603
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 miR-409-3p 靶向 CACNB2 表达 miRDB 数据库预测 miR-409-3p 与 CACNB2 结合位点见图 2A。LRA 检测结果显示,相较于 miR-con 组,转染 miR-409-3p mimics 的 CACNB2-WT 组细胞荧光素酶活性降低($P < 0.01$);与 anti-miR-con 组相比,转染 anti-miR-409-3p 的 CACNB2-WT 组细胞荧光素酶活性升高($P < 0.01$),CACNB2-MUT 组细胞荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。miR-409-3p 组 CACNB2 蛋白表达量低于 miR-con 组($P < 0.01$),

anti-miR-409-3p 组 CACNB2 蛋白表达量高于 anti-miR-con 组 ($P<0.01$),说明 CACNB2 为 miR-409-3p 的靶基因。见图 2B、表 2。

2.3 miR-409-3p 和 CACNB2 蛋白表达对 HG 诱导的 HRCEC 细胞氧化应激的影响 各组 CACNB2 蛋白表达量和各组 ROS 比较, HG 组高于对照组, HG+miR-409-3p 组低于 HG+miR-con 组, HG+si-CACNB2 组低于 HG+si-con 组, HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组高于 HG+miR-409-3p+pcDNA 组,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。各组 CACNB2 蛋白表达量和各组 ROS 的比较结果一致。与对照组相比, HG 组 miR-409-3p 相对表达量和 LDH 及 GSH 水平降低 ($P<0.01$),MDA 水平升高 ($P<0.01$);与 HG+miR-con 组相比, HG+miR-409-3p 组 miR-409-3p 相对表达量、LDH 及 GSH 水平上调,MDA 水平下降 ($P<0.01$);HG+si-con 组相比, HG+si-CACNB2 组 miR-409-3p 相对表达量、LDH 及 GSH 水平升高 ($P<0.01$),MDA 水平下降

($P<0.01$);与 HG+miR-409-3p+pcDNA 组相比, HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组 miR-409-3p 相对表达量、LDH 及 GSH 水平下降,MDA 水平升高 ($P<0.01$)。见图 3、表 3。

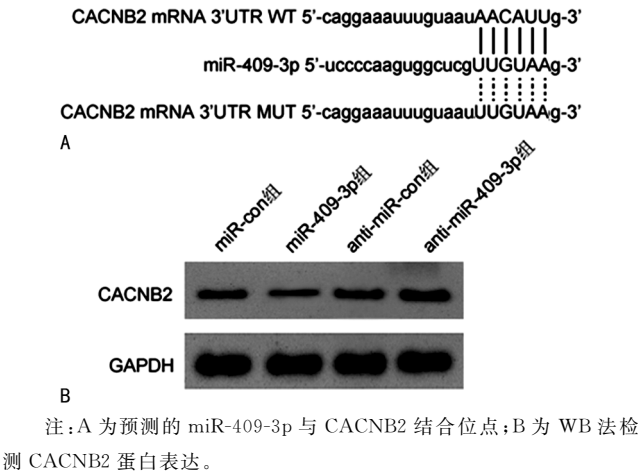
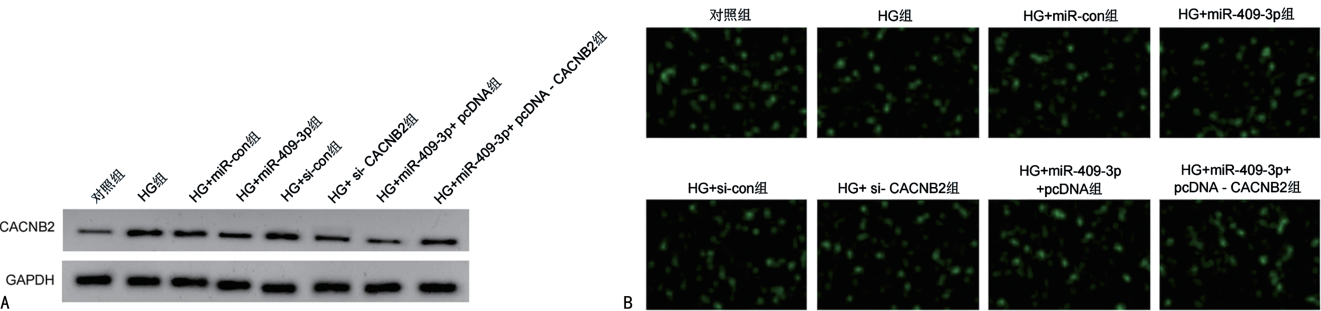


图 2 miR-409-3p 与 CACNB2 靶向序列和调控 CACNB2 蛋白表达

表 2 双荧光素酶报告实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	CACNB2-WT	CACNB2-MUT	CACNB2 蛋白
miR-con 组	1.06±0.12	1.08±0.11	0.42±0.07
miR-409-3p 组	0.55±0.04 ^a	1.12±0.11	0.23±0.03 ^a
anti-miR-con 组	1.04±0.08	1.04±0.15	0.45±0.04
anti-miR-409-3p 组	2.39±0.36 ^b	1.09±0.09	0.68±0.05 ^b
F	147.584	0.717	123.758
P	<0.001	0.549	<0.001

注:与 miR-con 组比较, ^a $P<0.05$;与 anti-miR-con 组比较, ^b $P<0.05$ 。



注:A 为 WB 法检测 HRCEC 细胞 CACNB2 蛋白表达;B 为免疫荧光法检测 HRCEC 细胞 ROS 水平。

图 3 过表达 miR-409-3p、干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞 CACNB2 蛋白和 ROS 水平的影响

表 3 过表达 miR-409-3p、干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞 LDH、GSH 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-409-3p	CACNB2 蛋白	LDH(%)	GSH(U/ μ g)	MDA(nmol/mg)	ROS
对照组	1.04±0.13	0.23±0.04	100.96±13.72	1.01±0.10	7.50±1.09	105.76±10.93
HG 组	0.43±0.09 ^a	0.53±0.03 ^a	55.01±2.42 ^a	0.61±0.07 ^a	18.23±1.63 ^a	403.43±31.76 ^a
HG+miR-con 组	0.47±0.04	0.52±0.06	53.53±2.42	0.58±0.05	19.77±1.17	435.16±49.32
HG+miR-409-3p 组	4.62±0.52	0.34±0.06 ^b	80.35±4.38 ^b	0.75±0.08 ^b	11.22±1.89 ^b	178.76±9.28 ^b
HG+si-con 组	0.56±0.05	0.57±0.04	53.34±3.01	0.56±0.07	20.81±1.75	432.62±37.63
HG+si-CACNB2 组	0.75±0.08 ^c	0.35±0.07	78.96±4.90 ^c	0.79±0.08 ^c	10.91±2.70 ^c	180.46±15.80 ^c

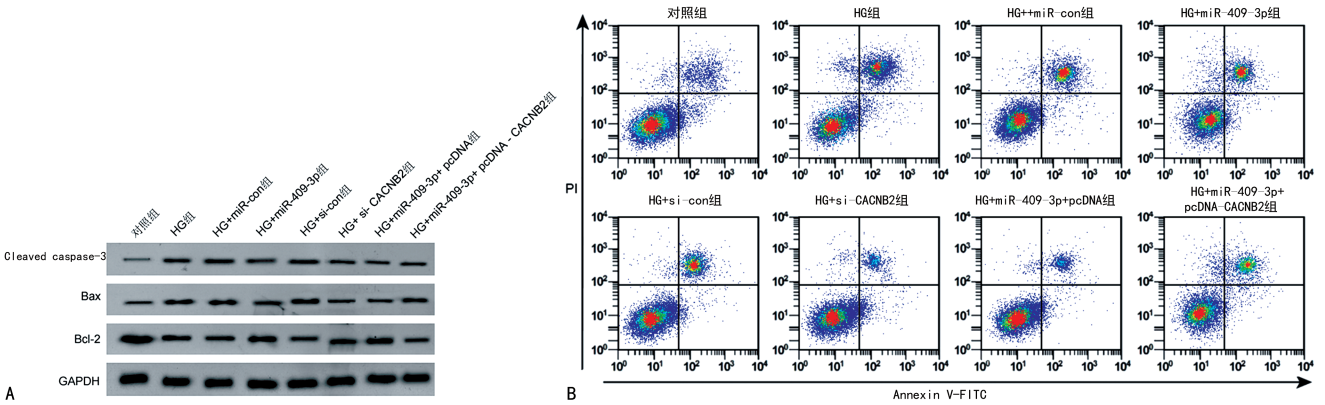
续表 3 过表达 miR-409-3p、干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞 LDH、GSH 和 MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-409-3p	CACNB2 蛋白	LDH(%)	GSH(U/ μ g)	MDA(nmol/mg)	ROS
HG+miR-409-3p+pcDNA 组	4.39 $\pm$ 0.55	0.33 $\pm$ 0.09	77.90 $\pm$ 5.98	0.77 $\pm$ 0.08	12.90 $\pm$ 1.37	176.80 $\pm$ 13.71
HG + miR-409-3p + pcDNA-CACNB2 组	2.14 $\pm$ 0.33 ^d	0.47 $\pm$ 0.06 ^d	61.08 $\pm$ 2.42 ^d	0.66 $\pm$ 0.06 ^d	16.63 $\pm$ 1.36 ^d	316.50 $\pm$ 31.16 ^d
F	336.345	40.273	70.918	32.242	76.241	223.588
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 HG+miR-con 组比较,^b $P<0.05$;与 HG+si-con 组比较,^c $P<0.05$;与 HG+miR-409-3p+pcDNA 组比较,^d $P<0.05$ 。

2.4 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HG 诱导 HRCEC 细胞凋亡的影响 与对照组相比, HG 组 HRCEC 细胞 Cleaved caspase-3、Bcl-2 蛋白表达量降低($P<0.01$), Bax 蛋白表达量及细胞凋亡率升高($P<0.01$); 与 HG+miR-con 组相比, HG+miR-409-3p 组 HRCEC 细胞 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达量及细胞凋亡率降低($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达量及细胞凋亡率升高($P<0.01$); 与 HG+si-con

组相比, HG+si-CACNB2 组 HRCEC 细胞 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达量及细胞凋亡率降低($P<0.01$), Bcl-2 水平上升($P<0.01$); 与 HG+miR-409-3p+pcDNA 组相比, HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组 HRCEC 细胞 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达量及细胞凋亡率升高($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达量下降($P<0.01$), 见图 4、表 4。



注:A 为 WB 法检测 HRCEC 细胞 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达;B 为流式细胞术检测 HRCEC 细胞凋亡。

图 4 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HG 诱导 HRCEC 细胞的影响

表 4 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞凋亡率及 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Cleaved caspase-3	Bax	Bcl-2	细胞凋亡率(%)
对照组	0.15 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.12	2.53 $\pm$ 0.40
HG 组	0.46 $\pm$ 0.06 ^a	0.44 $\pm$ 0.07 ^a	0.44 $\pm$ 0.04 ^a	12.39 $\pm$ 1.28 ^a
HG+miR-con 组	0.49 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.05	11.55 $\pm$ 1.71
HG+miR-409-3p 组	0.23 $\pm$ 0.05 ^b	0.22 $\pm$ 0.04 ^b	0.64 $\pm$ 0.07 ^b	6.75 $\pm$ 1.09 ^b
HG+si-con 组	0.42 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.06	11.00 $\pm$ 1.91
HG+si-CACNB2 组	0.24 $\pm$ 0.05 ^c	0.28 $\pm$ 0.11 ^c	0.65 $\pm$ 0.08 ^c	5.54 $\pm$ 1.13 ^c
HG+miR-409-3p+pcDNA 组	0.24 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.04	5.63 $\pm$ 0.56
HG+miR-409-3p+pcDNA-CACNB2 组	0.33 $\pm$ 0.04 ^d	0.32 $\pm$ 0.04 ^d	0.55 $\pm$ 0.04 ^d	8.02 $\pm$ 1.25 ^d
F	66.352	21.911	28.734	66.685
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 HG+miR-con 组比较,^b $P<0.05$;与 HG+si-con 组比较,^c $P<0.05$;与 HG+miR-409-3p+pcDNA 组比较,^d $P<0.05$ 。

2.5 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HG 诱导 HRCEC 细胞炎症因子分泌情况的影响 HG 组 IL-6、IL-18 及 IL-1 β 高于对照组 ($P < 0.01$); 与 HG + miR-con 组相比, HG + miR-409-3p 组 IL-6、IL-18 及 IL-1 β 下降 ($P < 0.01$); HG + si-

CACNB2 组 IL-6、IL-18 及 IL-1 β 水平低于 HG + si-con 组 ($P < 0.01$); 与 HG + miR-409-3p + pcDNA 组比较, HG + miR-409-3p + pcDNA-CACNB2 组 IL-6、IL-18 及 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞 IL-6、IL-18 和 IL-1 β 分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	IL-6 (ng/mg)	IL-18 (ng/mg)	IL-1 β (ng/mg)
对照组	2.28 $\pm$ 0.24	5.07 $\pm$ 0.91	7.58 $\pm$ 0.69
HG 组	16.75 $\pm$ 1.03 ^a	16.38 $\pm$ 1.48 ^a	16.24 $\pm$ 1.17 ^a
HG + miR-con 组	16.36 $\pm$ 1.62	16.53 $\pm$ 0.96	16.64 $\pm$ 1.29
HG + miR-409-3p 组	7.48 $\pm$ 0.54 ^b	8.19 $\pm$ 0.69 ^b	7.40 $\pm$ 0.96 ^b
HG + si-con 组	16.43 $\pm$ 0.81	16.48 $\pm$ 1.10	16.36 $\pm$ 0.95
HG + si-CACNB2 组	7.24 $\pm$ 0.71 ^c	7.55 $\pm$ 0.61 ^c	7.40 $\pm$ 0.86 ^c
HG + miR-409-3p + pcDNA 组	7.85 $\pm$ 0.54	8.00 $\pm$ 0.96	7.75 $\pm$ 0.59
HG + miR-409-3p + pcDNA-CACNB2 组	13.63 $\pm$ 2.41 ^d	12.23 $\pm$ 4.57 ^d	16.43 $\pm$ 0.90 ^d
<i>F</i>	220.062	61.980	246.548
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HG + miR-con 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 HG + si-con 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 HG + miR-409-3p + pcDNA 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.6 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HG 诱导 HRCEC 细胞 VEGF 和 ICAM 的影响 HG 组、HG + miR-409-3p + pcDNA-CACNB2 组 VEGF、ICAM 蛋白表达量分别高于对照组和 HG + miR-409-3p + pcDNA 组, HG + miR-409-3p 组、HG + si-CACNB2 组的 RGF、ICAM 蛋白表达量分别低于 HG + miR-con 组、HG + si-con 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 5、表 6。

表 6 过表达 miR-409-3p 表达和干扰 CACNB2 对 HRCEC 细胞 VEGF 和 ICAM 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	VEGF	ICAM
对照组	0.31 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.04
HG 组	0.65 $\pm$ 0.05 ^a	0.66 $\pm$ 0.05 ^a
HG + miR-con 组	0.63 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.05
HG + miR-409-3p 组	0.44 $\pm$ 0.06 ^b	0.48 $\pm$ 0.06 ^b
HG + si-con 组	0.57 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.08
HG + si-CACNB2 组	0.26 $\pm$ 0.03 ^c	0.32 $\pm$ 0.03 ^c
HG + miR-409-3p + pcDNA 组	0.40 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.07
HG + miR-409-3p + pcDNA-CACNB2 组	0.52 $\pm$ 0.05 ^d	0.58 $\pm$ 0.04 ^d
<i>F</i>	57.351	105.173
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HG + miR-con 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 HG + si-con 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 HG + miR-409-3p + pcDNA 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

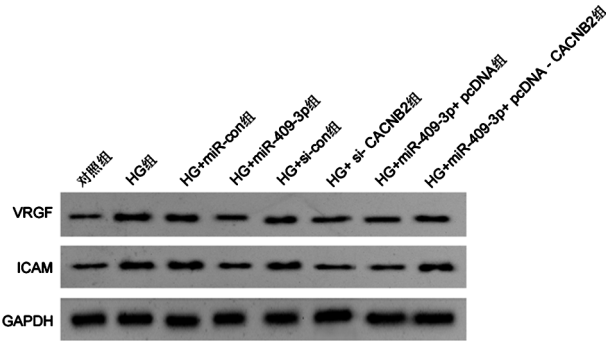


图 5 WB 法检测 HRCEC 细胞 VEGF 和 ICAM 蛋白表达

3 讨 论

HRCEC 细胞的增殖是眼部新血管生成的主要原因,同时会导致机体氧化-抗氧化系统紊乱,分泌过量 ROS,破坏细胞结构和功能,引起机体的致炎指标的过度表达,造成机体内环境紊乱^[8-9]。因此,抑制 HRCEC 细胞的增殖及致炎因子分泌、平衡氧化应激系统对抑制 DR 进程具有积极作用。miRNA 参与人类多种疾病的进程中,其中包括糖尿病^[10],由于机体 miRNA 的调控机制复杂,因此关于其调控疾病的机制逐渐成为研究热点。本研究通过培养暴露于高糖环境的 HRCEC 细胞,模拟糖尿病患者体内高血糖状态,分析 HRCEC 细胞 miR-409-3p、CACNB2 表达情况,并研究 miR-409-3p 通过靶向结合 CACNB2 对 HRCEC 细胞的氧化应激、凋亡、炎症的调节作用及相关机制。

有研究发现,miR-409-3p 具有调节抗血管生成作用^[11],血浆 miR-409-3p 水平在 1 型糖尿病发展的过程中逐渐降低,经过治疗后随着病情缓解而有所提高,靶点预测工具将 miR-409-3p 与免疫和代谢相关信号联系起来^[12]。CACNB2 基因与夜盲症有关并且可改变小鼠的视网膜形态^[13-14],其可能通过钙通道参与 DR 的发病。本研究发现,miR-409-3p 能够通过负向调节 CACNB2 抑制新血管生成;同时发现过表达的 miR-409-3p 或敲减 CACNB2 均提高了 LDH 及 GSH 水平,并使 ROS 及 MDA 水平下调,证明了 miR-409-3p 可以平衡机体氧化应激水平。另外,本研究结果发现,过表达的 miR-409-3p 抑制了高糖诱导的 HRCEC 细胞炎症因子 IL-6、IL-18 及 IL-1 β 的分泌,降低了 HRCEC 细胞的炎症反应,抑制了 DR 的进程。而 miR-409-3p 的这种作用能够被过表达 CACNB2 明显减弱。这提示,miR-409-3p 参与调节抗血管生成作用可能与其靶向结合 CACNB2 调控细胞氧化应激及炎症反应相关。

研究显示,视网膜色素上皮中 VEGF 的表达和释放与 CACNB2 有关,并通过基因敲除实验证明了这一论点^[15]。有研究发现,VEGF 是血管生成和糖尿病视网膜新生血管的形成中起至关重要的作用的能量底物^[16],抑制 VEGF 可防止眼部新生血管形成。在 DR 患者血清 ICAM 水平呈高表达,提示其与微血管损伤密切相关^[17]。本研究结果证明,过表达 miR-409-3p 降低了 HG 环境下 HRCEC 细胞中 VEGF、ICAM 蛋白表达量。本研究虽然探讨了 miR-409-3p 通过靶向 CACNB2 调控 DR 作用机制,但不足之处在于未研究 miR-409-3p 在不同严重程度 DR 中的作用,下一步研究重点在于 miR-409-3p 对 DR 病情进展的影响。

综上所述,miR-409-3p 可促进 HG 诱导的 HRCEC 细胞凋亡,其作用机制与调控 CACNB2 有关,可为 DR 的治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] CHEN S, LIAO M, LI J, et al. The correlation between microvessel pathological changes of the endplate and degeneration of the intervertebral disc in diabetic rats[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 1-10.
- [2] STRIGLI A, TRIGLIA E, CACCIOPPO A, et al. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2020, 25(3): 261-271.
- [3] GANJU A, KHAN S, HAFEEZ B, et al. miRNA nano-therapeutics for cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 424-432.
- [4] CHEN H, DAI J. miR-409-3p suppresses the proliferation, invasion and migration of tongue squamous cell carcinoma via targeting RDX[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 543-551.
- [5] YE Q, CHEN Z. MicroRNA-409-3p regulates macrophage migration in polymyositis through targeting CXCR4[J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(6): 353-361.
- [6] AL-HUSSANIY H A. The effect of microRNA-409-3p for treatment and response to tumor proliferation of lung cancer cell lines (in vitro)[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(9): 3151-3156.
- [7] VUORI N, SANDHOLM N, KUMAR A, et al. CACNB2 is a novel susceptibility gene for diabetic retinopathy in type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2019, 30(11): 1901-2005.
- [8] CHEN S, LIAO M, LI J, et al. The correlation between microvessel pathological changes of the endplate and degeneration of the intervertebral disc in diabetic rats[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 1-19.
- [9] NAVANEETHAN S D, KIRWAN J P, REMER E M, et al. Adiposity, physical function, and their associations with insulin resistance, inflammation, and adipokines in CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(1): 44-55.
- [10] ZHAO Z, YANG F, LIU Y, et al. MicroRNA-409-3p suppresses cell proliferation and cell cycle progression by targeting cyclin D2 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5237-5242.
- [11] STEPIENEL, MARTYNA D K, KAMINSKA A, et al. Circulating ectosomes: determination of angiogenic microRNAs in type 2 diabetes[J]. *Theranostics*, 2018, 8(14): 3874-3890.
- [12] MA Z, CHEN Z, ZHOU Y, et al. Hsa_circ_0000418 promotes the progression of glioma by regulating microRNA-409-3p/pyruvate dehydrogenase kinase 1 axis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7541-7552.
- [13] DURAIRAJ PANDIAN V, GIOVANNUCCI D R, VAZQUEZ G, et al. CACNB2 is associated with aberrant RAS-MAPK signaling in hypertensive Dahl Salt-Sensitive rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(3): 760-765.
- [14] 段继昌, 曹路, 柴晶美, 等. 湿热中阻方对脾胃湿热证小鼠氧化应激和炎症因子影响研究[J]. *吉林中医药*, 2021, 41(5): 647-653.
- [15] VUORI N, SANDHOLM N, KUMAR A, et al. CACNB2 is a novel susceptibility gene for diabetic retinopathy in type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2019, 68(11): 2165-2174.
- [16] 孙鹏, 孟岩, 张剑, 等. NGF 结合抗 VEGF 在糖尿病患者视网膜病变中的作用及 IGF-1 和 VEGF 的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(6): 1323-1326.
- [17] 程铭, 刘红, 许颖茗等. 糖尿病视网膜病变患者血清 VEGF 和 ICAM-1 水平变化及与微血管损伤的关系[J]. *当代医学*, 2021, 27(17): 25-27.