

· 基础医学 ·

## LncRNA VIM-AS1 通过 miR-497-5p/FBXW7 轴调控高糖环境下视网膜内皮细胞的迁移和凋亡

居悦俊, 郭展宏, 王冠怡, 沈 婷, 吴润泽, 孔颖宏\*

常熟市第二人民医院内分泌科, 江苏 常熟 215500

**[摘要]** 目的:探讨长链非编码RNA(lncRNA)VIM反义RNA 1(VIM-AS1)在糖尿病视网膜病变中的潜在分子机制。方法:使用qRT-PCR测定LncRNA VIM-AS1、miR-497-5p和FBXW7 mRNA的表达。使用蛋白质印迹检测FBXW7蛋白水平。分别使用CCK-8实验、伤口愈合实验和流式细胞技术分析评估细胞增殖、迁移和凋亡。通过双荧光素酶报告基因分析验证LncRNA VIM-AS1、miR-497-5p和FBXW7之间的结合关系。结果:在高糖处理的ARPE-19细胞中,LncRNA VIM-AS1和FBXW7的表达显著降低,而miR-497-5p的表达上调。LncRNA VIM-AS1可以通过竞争性结合miR-497-5p上调FBXW7的表达。LncRNA VIM-AS1过表达能够促进HG处理的ARPE-19细胞的增殖和迁移,并抑制细胞凋亡,而miR-497-5p过表达消除了LncRNA VIM-AS1过表达对HG处理的ARPE-19细胞的影响。此外,FBXW7敲低消除了miR-497-5p对HG处理的ARPE-19细胞表型的抑制。结论:LncRNA VIM-AS1可通过调控miR-497-5p/FBXW7轴促进HG处理的ARPE-19细胞增殖和迁移,同时抑制细胞凋亡,提示LncRNA VIM-AS1作为治疗靶点潜力巨大。

**[关键词]** LncRNA VIM-AS1;miR-497-5p;FBXW7;糖尿病视网膜病变;人视网膜上皮细胞

**[中图分类号]** R774.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2023)02-187-10

**doi:**10.7655/NYDXBNS20230206

## LncRNA VIM-AS1 regulates cell migration and apoptosis of retinal endothelial cells under high glucose treatment via the miR-497-5p/FBXW7 axis

JU Yuejun, GUO Zhanhong, WANG Guanyi, SHEN Ting, WU Runze, KONG Yinghong\*

Department of Endocrinology, Changshu No.2 People's Hospital, Changshu 215500, China

**[Abstract]** **Objective:** Our study aimed to probe the potential molecular mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) VIM Antisense RNA 1 (VIM-AS1) in diabetic retinopathy. **Methods:** LncRNA VIM-AS1, miR-497-5p and FBXW7 mRNA expressions were determined using qRT-PCR. The FBXW7 protein level was also detected using western blotting. The cell viability, migration and apoptosis were evaluated using CCK-8 assay, wound healing assay and flow cytometry analysis, respectively. Additionally, the binding relationships among lncRNA VIM-AS1, miR-497-5p and FBXW7 were verified by dual luciferase reporter assays. **Results:** LncRNA VIM-AS1 and FBXW7 expressions were remarkably reduced in HG-treated ARPE-19 cells, while miR-497-5p was upregulated. LncRNA VIM-AS1 could upregulate the expression of FBXW7 by competitively binding to miR-497-5p. LncRNA VIM-AS1 overexpression promoted cell proliferation and migration, and inhibited cell apoptosis in HG-induced ARPE-19 cells, while miR-497-5p overexpression abolished the effects of lncRNA VIM-AS1 overexpression on HG-induced ARPE-19 cells. Furthermore, FBXW7 knockdown abrogated the effects of miR-497-5p inhibition on cell phenotypes of HG-treated ARPE-19 cells. **Conclusion:** LncRNA VIM-AS1 could promote the proliferation and migration, while inhibited cell apoptosis of HG-treated ARPE-19 cells by regulation of miR-497-5p/FBXW7 axis, suggesting that lncRNA VIM-AS1 might have great potential as therapeutic target for diabetic retinopathy.

**[Key words]** LncRNA VIM-AS1;miR-497-5p;FBXW7;diabetic retinopathy;human retinal epithelial cells

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02): 187-195, 248]

**[基金项目]** 常熟市卫生健康委员会科技计划指导项目(CSWZD202110);常熟市第二人民医院面上项目(CSEY2021041)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: kongyinghong@163.com

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是世界上最常见的代谢性疾病,由胰岛素缺乏及作用减弱引起<sup>[1]</sup>。目前全球有10%的人患有DM<sup>[2]</sup>。DM会引起微血管并发症,例如糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、肾病和神经病变<sup>[3]</sup>。据报道,超过30%的DM患者患有DR<sup>[4-5]</sup>,即使积极治疗,仍有10%的DR患者不可避免地会失明<sup>[6]</sup>。虽然早期检测和治疗对于防治DR非常重要,但是目前可用于DR早期发现和风险预测的诊断性生物标志物仍需要探索。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指转录本超过200 nt的单链RNA,参与调控许多生物过程<sup>[7]</sup>。已有研究表明,lncRNA与DR发生和发展密切相关,可作为DR诊断和治疗的潜在靶点<sup>[8-9]</sup>。例如,Liu等<sup>[10]</sup>研究揭示了lncRNA MALAT1敲低可以抑制高糖(high glucose, HG)环境下的人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cell, hRMEC)的小管形成。Zhang等<sup>[11]</sup>研究显示lncRNA AK077216过表达显著抑制人视网膜色素上皮细胞(human retinal pigment epithelial cell, hRPE)的凋亡。lncRNA VIM反义RNA 1(LncRNA VIM Antisense RNA 1, lncRNA VIM-AS1)之前被鉴定为癌症相关的lncRNA<sup>[12]</sup>。最近有研究显示,lncRNA VIM-AS1在DM患者中异常表达<sup>[13]</sup>。更重要的是,lncRNA VIM-AS1在DM合并DR患者中表达明显降低,lncRNA VIM-AS1过表达明显抑制HG处理的hRPE的细胞凋亡<sup>[14]</sup>,表明其在DR中起关键作用。但lncRNA VIM-AS1在DR中的具体作用机制有待进一步探讨。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种长度约为22 nt的非编码单链RNA分子,参与基因表达的转录后调控<sup>[15]</sup>。先前的一项研究显示,miR-497在DM大鼠的胰腺中显著上调,这表明miR-497可能在DM进展中充当某种作用<sup>[16]</sup>。此外,Li等<sup>[17]</sup>研究显示miR-497-5p在HG处理的视网膜神经胶质细胞中显著上调,miR-497-5p过表达显著促进HG处理的视网膜神经胶质细胞的凋亡。

F-box和WD-40结构域蛋白(F-box and WD-40 domain proteins, FBXW7)作为泛素-蛋白酶体降解途径的关键识别因子之一,被证实在调节DR进展中起关键作用。Shao等<sup>[18]</sup>证明了FBXW7敲低可以促进DR中的新生血管形成。据报道,DR小鼠和HG处理的hRMEC中FBXW7表达显著降低,并且FBXW7过表达可以抑制HG诱导的血管生成<sup>[19]</sup>。因此,本研究对lncRNA VIM-AS1、miR-497-5p和

FBXW7在DR发展中的调控关系及作用机制进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ARPE-19购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。lncRNA VIM-AS1的过表达质粒(overexpression plasmid of lncRNA VIM-AS1, OE-VIM-AS1)、短发夹-FBXW7(sh-FBXW7)、miR-497-5p模拟物(miR-497-5p mimics)、miR-497-5p抑制剂(miR-497-5p inhibitor)及其阴性对照组(pcDNA3.1、shRNA、mimics/inhibitor NC)(上海吉玛基因)。双荧光素酶报告基因测定系统(北京Promega公司)。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(上海生工公司)。Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、BCA试剂盒(Beyotime公司,上海)。SYBR试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养和处理

所有细胞均在含有10%胎牛血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific公司,美国)和1%青霉素/链霉素溶液(上海生工)的DMEM(Thermo Fisher Scientific公司,美国)中于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养。HG处理为细胞用30 mmol/L D-葡萄糖(Sigma-Aldrich公司,美国)处理48 h。使用600 μg/mL晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)(Biovision公司,美国)处理细胞,并将其作为HG处理的阳性对照组。

#### 1.2.2 细胞转染

使用Lipofectamine™ 3000(Invitrogen公司,美国)将OE-VIM-AS1、sh-FBXW7和miR-497-5p mimics/inhibitor及其阴性对照组(pcDNA3.1、shRNA、mimics/inhibitor NC)转染ARPE-19细胞。

#### 1.2.3 双荧光素酶报告基因检测

使用常见的在线工具预测lncRNA VIM-AS1、miR-497-5p和FBXW7之间的结合位点。PCR扩增人lncRNA VIM-AS1/FBXW7片段。使用定点突变试剂盒(Stratagene公司,美国)对lncRNA VIM-AS1/FBXW7片段中的miR-497-5p结合位点进行定点突变检测。将lncRNA VIM-AS1/FBXW7序列的野生型(wild type, wt)和突变型(mutate, mut)报告质粒克隆到pmirGLO载体(上海吉玛基因)中。用lncRNA VIM-AS1-wt/FBXW7-wt或lncRNA VIM-AS1-mut/FBXW7-mut质粒和miR-497-5p mimics或mimics

NC 或 miR-497-5p inhibitor 或 inhibitor NC 共转染细胞 Lipofectamine™ 3000。使用双荧光素酶报告基因测定系统检查荧光素酶活性。

#### 1.2.4 伤口愈合试验

将细胞接种到6孔板(Corning公司,美国)。当细胞融合程度达到约90%时,使用200 μL移液器吸头在融合的细胞单层中产生人工伤口。用PBS洗涤细胞3次并加入无血清培养基培养细胞,使用显微镜(Olympus公司,日本)在0 h和24 h拍摄图像。

#### 1.2.5 CCK-8检测

将细胞接种在96孔板中,与CCK-8(10 μL)一起孵育,并在37℃的培养箱中孵育2 h。使用微孔板分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司,美国)在450 nm处检测吸光度。

#### 1.2.6 细胞凋亡测定

使用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒分析细胞凋亡。收获细胞并重新悬浮在500 μL的1×Annexin结合缓冲液(中国Beyotime)中。细胞在黑暗条件下用10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI(中国Beyotime)染色10 min,立即使用流式细胞仪分析样品。

#### 1.2.7 定量实时聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-PCR, qRT-PCR)

用TRIzol试剂(Thermo Fisher Scientific公司,美国)分离总RNA。对于mRNA,使用逆转录酶试剂盒(Toyobo公司,日本)合成cDNA。对于miRNA,使用第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA。然后,使用SYBR试剂盒将cDNA用于qRT-PCR测定。miRNA和mRNA的相对表达分别用U6和GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。研究中使用的引物如下: LncRNA VIM-AS1 正义:5'-ACTGTAATGGACTCGTGGTG-3', 反义:5'-CGTCGTGTTGTCCTGATG-3'; miR-497-5p 正义:5'-CCTTCAGCAGCACACTGTGG-3', 反义:5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'; FBXW7 正义:5'-ACTGGGCTTGACCATGTTCA-3', 反义:5'-TGAGGTCCCCAAAAGTTGTTG-3'; U6 正义:5'-CGCTTCGGCAGCATATAC-3', 反义:5'-AAATATGGAACGCTTACGA-3'; GAPDH 正义:5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3', 反义:5'-TCAAAGGTGAGGAGTGGGT-3'。

#### 1.2.8 蛋白质印迹法

用RIPA分离蛋白质,用BCA试剂盒(中国Beyotime)测定蛋白质浓度。样品通过8%~12% SDS-PAGE分离,进一步转移到PVDF膜(Millipore公司,美国)。然后将膜与针对FBXW7(1:1 000, Abcam

公司,美国)和GAPDH(1:10 000, Sigma-Aldrich公司,美国)的抗体在4℃下孵育过夜。用PBS-T洗涤后,将膜与用HRP(1:10 000, Abcam公司,美国)标记的相应二抗孵育60 min。通过GEL成像系统(Bio-Rad公司,美国)对膜进行可视化和成像。通过软件Image J分析蛋白质的定量。

#### 1.3 统计学方法

本研究使用GraphPad Prism 8进行统计数据分析。进行的所有实验至少重复3次。测量数据表示为均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )。两两比较采用 $t$ 检验,多组比较采用单因素方差分析。所有数据均来自至少3个重复实验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HG处理抑制ARPE-19细胞的增殖和迁移,同时通过下调lncRNA VIM-AS1促进细胞凋亡

首先,评估了不同培养基中的ARPE-19细胞中lncRNA VIM-AS1的表达,结果显示lncRNA VIM-AS1在HG及AGE处理后的ARPE-19细胞中的表达分别为 $0.40 \pm 0.05$ 及 $0.45 \pm 0.06$ ,正常培养基(NG)组的表达为 $1.00 \pm 0.13$ ,HG组及AGE组与NG相比显著下调, $t$ 值分别为7.449及6.723, $P$ 值分别为0.002及0.003(图1A)。为了评估lncRNA VIM-AS1在DR中的功能,用lncRNA VIM-AS1过表达质粒转染ARPE-19细胞,并评估细胞表型。qRT-PCR结果显示,转染OE-VIM-AS1后ARPE-19细胞中lncRNA VIM-AS1的表达显著增加( $4.51 \pm 0.87$ ,  $t=6.481$ ,  $P=0.003$ ,图1B)表明转染成功。CCK-8实验显示经过HG处理后,ARPE-19的细胞活力明显受到抑制[( $54.06 \pm 11.16$ )%,  $t=3.346$ ,  $P=0.028$ ,图1C]。HG处理后,流式细胞检测结果显示Q2及Q3象限中的细胞凋亡明显增加[( $18.48 \pm 1.65$ )%,  $t=11.86$ ,  $P < 0.001$ ]。过表达lncRNA VIM-AS1,细胞凋亡减少[( $7.69 \pm 2.28$ )%,  $t=6.640$ ,  $P=0.003$ ]。这表明HG处理后的ARPE-19细胞的细胞增殖受到抑制,而过表达lncRNA VIM-AS1则逆转这一改变(图1D)。此外观察到HG处理ARPE-19细胞后,伤口愈合实验显示细胞迁移受到抑制[( $37.35 \pm 5.77$ )%,  $t=5.631$ ,  $P=0.005$ ]。过表达lncRNA VIM-AS1后细胞迁移增加[( $65.60 \pm 8.87$ )%,  $t=5.299$ ,  $P=0.006$ ,图1E]。所有这些结果表明,HG处理抑制了ARPE-19细胞的增殖和迁移,同时通过降低lncRNA VIM-AS1表达促进了细胞凋亡。

### 2.2 LncRNA VIM-AS1在ARPE-19细胞中通过海

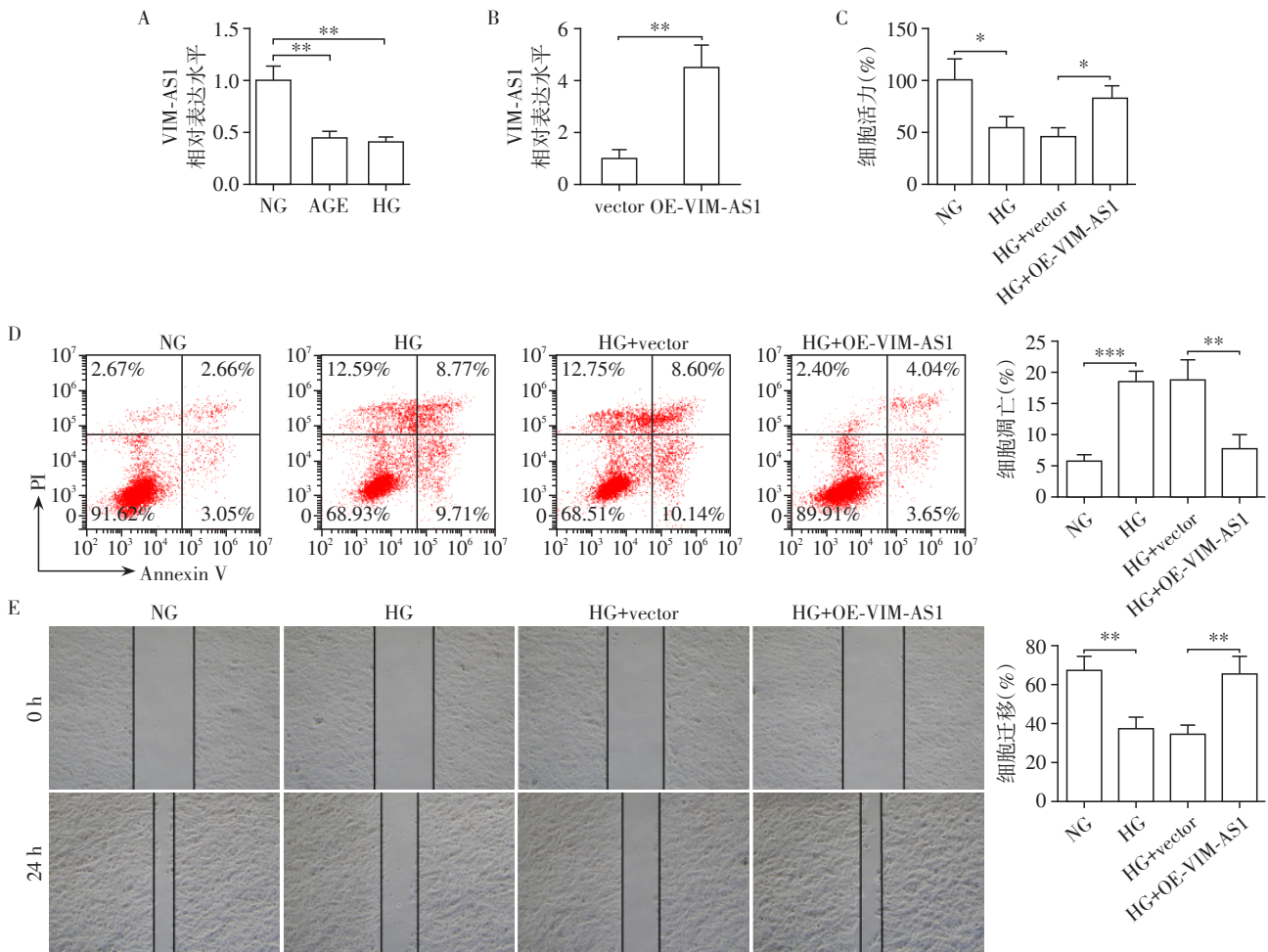
绵化 miR-497-5p 抑制 miR-497-5p 的表达

众所周知, lncRNA 通过充当 miRNA 的海绵来实现生物学功能(即 lncRNA 通过与 miRNA 结合, 减弱 miRNA 对靶基因的沉默, 从而对 miRNA 的靶基因进行调控)。本研究发现在 lncRNA VIM-AS1 过表达后, ARPE-19 细胞中 miR-497-5p 的表达显著降低 ( $0.42 \pm 0.08, t=6.768, P=0.003$ , 图 2A)。在转染 miR-497-5p mimics 后, ARPE-19 细胞中 miR-497-5p 表达显著升高 ( $3.31 \pm 0.30, t=11.38, P < 0.001$ ), 而 miR-497-5p 在 miR-497-5p 敲低后显著下调 ( $0.31 \pm 0.11, t=5.911, P=0.004$ , 图 2B), 表明转染成功。预测 lncRNA VIM-AS1 和 miR-497-5p 之间存在结合位点(图 2C)。为了进一步验证这种结合关系, 进行了双荧光素酶报告基因测定, 结果显示 miR-497-5p

mimics/inhibitor 在与 lncRNA VIM-AS1-wt 质粒共转染后抑制/提高了荧光素酶活性 ( $0.54 \pm 0.09$ ) / ( $1.53 \pm 0.21$ ),  $t$  值分别为 5.541 及 4.228,  $P$  值分别为 0.005 及 0.013。共转染 lncRNA VIM-AS1-mut 载体后没有发生显著性影响 ( $P > 0.05$ , 图 2D)。因此, lncRNA VIM-AS1 靶向 miR-497-5p 以负向调节 miR-497-5p 表达。

2.3 miR-497-5p 过表达逆转 lncRNA VIM-AS1 过表达对 HG 处理的 ARPE-19 细胞迁移和凋亡的影响

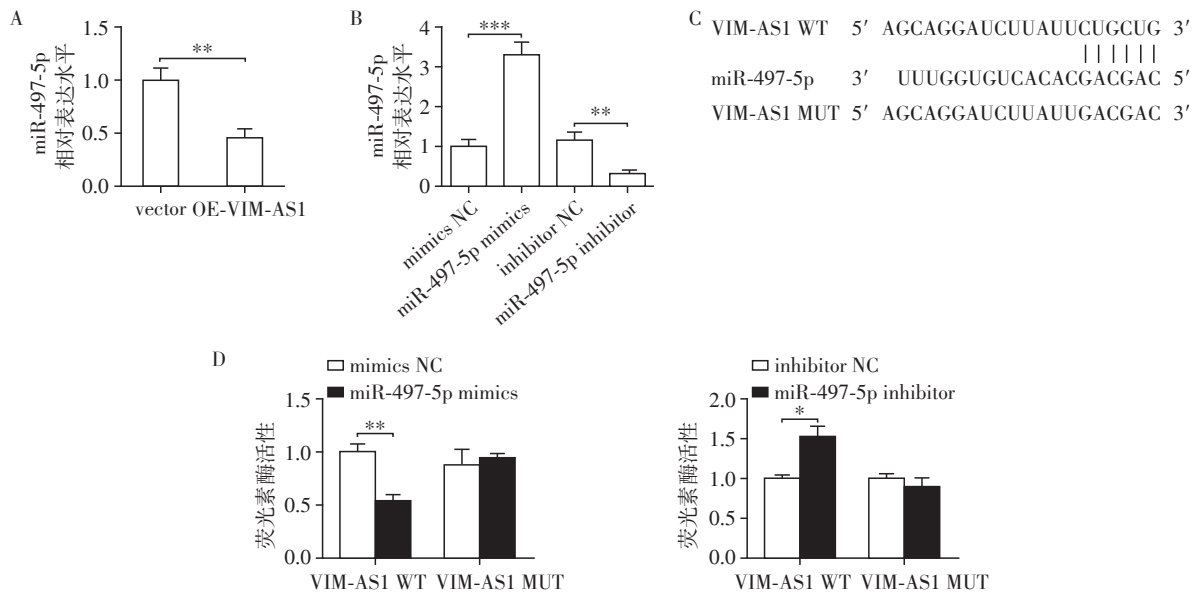
首先, 观察到 miR-497-5p 在 HG 处理后的 ARPE-19 细胞中显著上调 ( $2.36 \pm 0.31, t=6.820, P=0.002$ , 图 3A)。为探究 lncRNA VIM-AS1/miR-497-5p 在 DR 进展中的潜在作用, 将 miR-497-5p mimics 和 OE-VIM-AS1 共转染 HG 处理的 ARPE-19 细胞。



A: qRT-PCR 评估 HG、AGE 处理后 ARPE-19 细胞中 lncRNA VIM-AS1 的表达; B: 用载体 (vector) 或 OE-VIM-AS 转染 HG 处理的 ARPE-19 细胞后, qRT-PCR 测定 OE-VIM-AS1 转染后 ARPE-19 细胞中 lncRNA VIM-AS1 的表达; C: CCK-8 测定法检测细胞活力; D: 使用流式细胞术评估细胞凋亡情况; E: 伤口愈合实验用于检测细胞迁移情况。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图 1 HG 处理抑制 ARPE-19 细胞的增殖和迁移, 同时通过下调 lncRNA VIM-AS1 促进细胞凋亡

Figure 1 HG treatment inhibited the proliferation and migration of ARPE-19 cells, while promoting apoptosis by down-regulating lncRNA VIM-AS1



A:用vector或OE-VIM-AS1转染ARPE-19细胞后qRT-PCR检测miR-497-5p的表达;B:qRT-PCR评估miR-497-5p敲低和miR-497-5p过表达后ARPE-19细胞中的miR-497-5p表达;C:lncRNA VIM-AS1和miR-497-5p之间的结合位点;D:采用双荧光素酶报告基因分析验证lncRNA VIM-AS1和miR-497-5p之间的结合关系。两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

图2 LncRNA VIM-AS1通过海绵化miR-497-5p抑制miR-497-5p表达

Figure 2 LncRNA VIM-AS1 inhibits miR-497-5p expression by sponging miR-497-5p

CCK-8实验显示lncRNA VIM-AS1过表达促进了HG处理的ARPE-19细胞的活性[(181.01±26.98)%, $t=4.621$ , $P=0.009$ ]。在miR-497-5p过表达后细胞活性为(93.98±17.00)%( $t=4.726$ , $P=0.009$ )，miR-497-5p过表达能恢复lncRNA VIM-AS1过表达造成的细胞活性增加(图3B)。与HG+mimics NC+vector组相比,HG+mimics NC+OE-VIM-AS1组的流式细胞检测结果显示Q2及Q3象限中的细胞凋亡明显减少[(7.92±1.94)%, $t=11.33$ , $P < 0.001$ ]。而转染miR-497-5p mimics后细胞凋亡为(19.59±3.44)%( $t=5.528$ , $P=0.005$ )。转染miR-497-5p mimics逆转了lncRNA VIM-AS1过表达引起的细胞凋亡减少(图3C)。此外,OE-VIM-AS1转染导致HG处理的ARPE-19细胞迁移增加[(58.61±5.17)%, $t=5.551$ , $P=0.005$ ]。而miR-497-5p过表达的细胞迁移为(42.03±7.75)%( $t=3.083$ , $P=0.036$ )。miR-497-5p过表达能够逆转lncRNA VIM-AS1过表达引起的细胞迁移增加(图3D)。因此,miR-497-5p过表达逆转lncRNA VIM-AS1过表达对HG处理的ARPE-19细胞迁移和凋亡的影响。

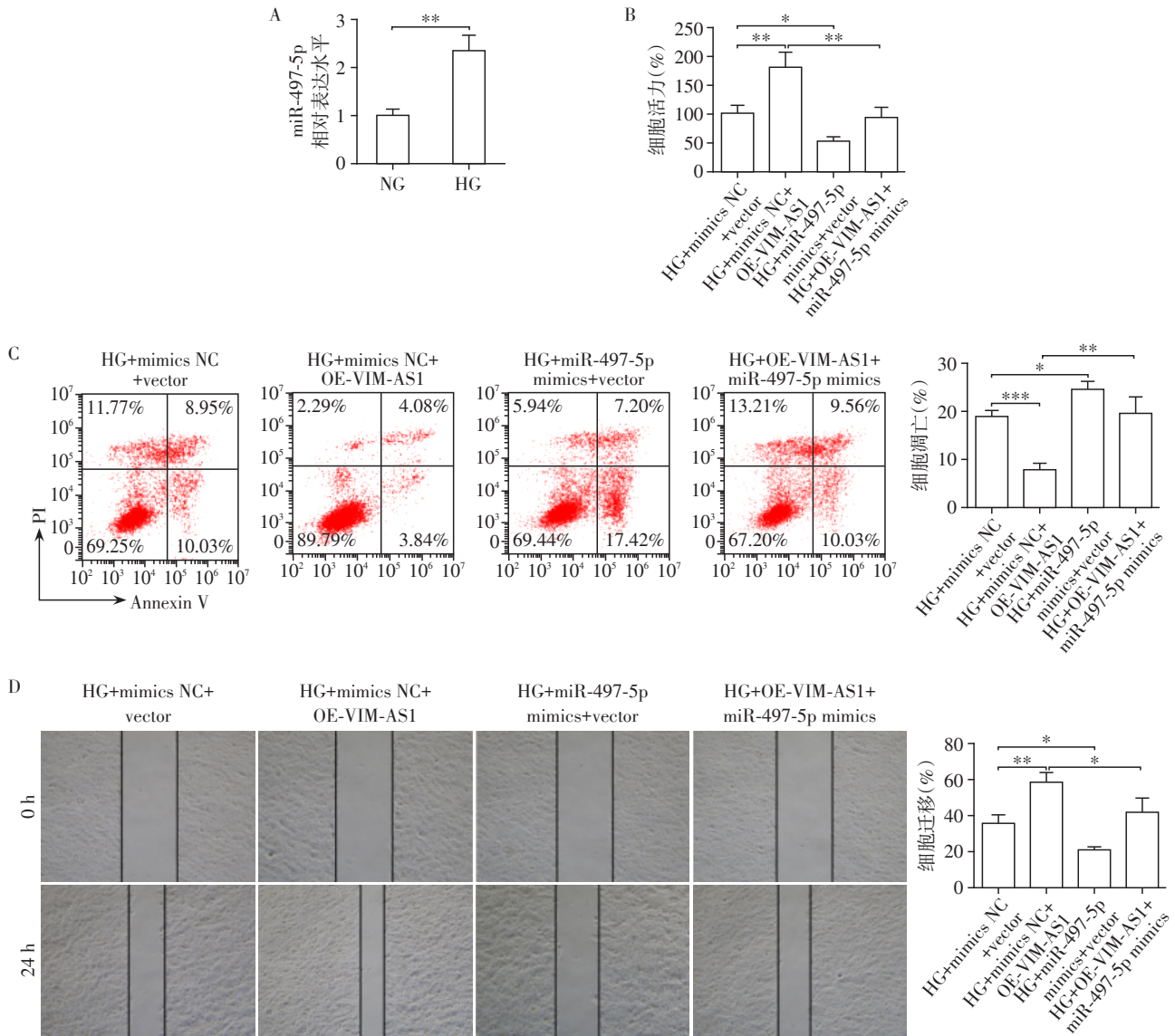
#### 2.4 FBXW7是miR-497-5p的靶基因

qRT-PCR结果显示,FBXW7的mRNA表达因miR-497-5p过表达而显著降低[(0.43±0.13), $t=6.995$ , $P=0.002$ ]。miR-497-5p敲低后FBXW7的mRNA表达升高(2.16±0.18, $t=7.960$ , $P=0.001$ ,图

4A)。免疫印迹检测结果显示,FBXW7的蛋白表达因miR-497-5p过表达而显著降低(0.16±0.04, $t=6.995$ , $P=0.002$ )。miR-497-5p敲低后FBXW7的蛋白表达升高(0.63±0.06, $t=2.822$ , $P=0.048$ ,图4B)。使用生物信息学软件miRanda预测了miR-497-5p和FBXW7之间的潜在结合位点(图4C)。随后进行了双荧光素酶报告基因测定以验证miR-497-5p和FBXW7之间的相互作用,将FBXW7的3'UTR区域构建至载体中报告基因luciferase的后面,构建荧光素酶质粒。然后转染至细胞中,比较过表达或干扰miR-497-5p后目的FBXW7的荧光素酶活性,发现过表达miR-497-5p后野生型FBXW7(FBXW7-WT)的荧光素酶活性明显下降(0.55±0.19, $t=3.702$ , $P=0.021$ )。同时敲低miR-497-5p后发现FBXW7-WT的荧光素酶活性明显上升(1.45±0.11, $t=4.385$ , $P=0.012$ )。miR-497-5p的过表达及敲低后突变型FBXW7的荧光素酶活性无显著改变( $P > 0.05$ ,图4D)。因此,FBXW7是miR-497-5p的靶基因,过表达miR-497-5p可以抑制FBXW7的表达。

#### 2.5 敲低miR-497-5p可以调节FBXW7的表达促进ARPE-19细胞的增殖和迁移并抑制细胞凋亡

探索FBXW7对miR-497-5p介导的体外生物学功能的影响。qRT-PCR检测显示,转染sh-FBXW7抑制了FBXW7 mRNA在ARPE-19细胞中的(0.36±0.10, $t=6.325$ , $P=0.003$ ,图5A)。免疫印迹检测结果



A: 采用qRT-PCR检测HG处理后ARPE-19细胞中miR-497-5p的表达; B: CCK8实验检测细胞增殖; C: 流式细胞术检测细胞的凋亡情况; D: 伤口愈合实验检测细胞迁移情况。两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

**图3 miR-497-5p过表达逆转lncRNA VIM-AS1过表达对HG处理的ARPE-19细胞表型的影响**

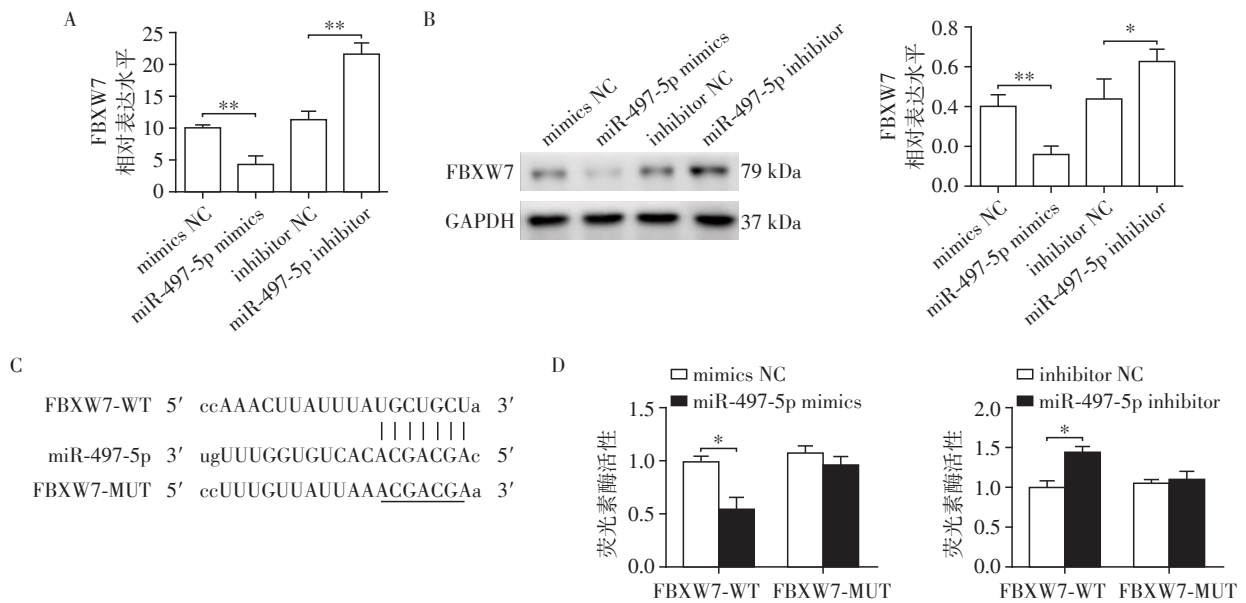
**Figure 3 miR-497-5p overexpression reverses the effect of lncRNA VIM-AS1 overexpression on the phenotype of HG-treated ARPE-19 cells**

显示转染 sh-FBXW7 抑制了 FBXW7 蛋白在 ARPE-19 细胞中的表达 ( $0.21 \pm 0.08$ ,  $t=4.590$ ,  $P=0.010$ , 图 5B)。CCK-8 检测实验的结果显示 miR-497-5p 的敲低促进了 HG 处理的 ARPE-19 细胞的细胞活性 [ $183.05 \pm 22.38$ ],  $t=6.269$ ,  $P=0.003$ ]。抑制 FBXW7 可以逆转敲低 miR-497-5p 导致的细胞活性增加 [ $91.02 \pm 22.38$ ],  $t=6.128$ ,  $P=0.004$ , 图 5C]。此外,如图 5D 所示,转染 miR-497-5p inhibitor 导致 HG 处理的 ARPE-19 细胞凋亡减少 [ $7.79 \pm 1.66$ ],  $t=9.309$ ,  $P < 0.001$ ]。转染 sh-FBXW7 后则可逆转转染 miR-497-5p inhibitor 导致的 ARPE-19 细胞凋亡减

少 [ $19.43 \pm 4.02$ ],  $t=4.636$ ,  $P=0.009$ , 图 5D]。伤口愈合实验结果表明,miR-497-5p 的敲低促进了 HG 处理的 ARPE-19 细胞的迁移 [ $62.30 \pm 7.48$ ],  $t=4.471$ ,  $P=0.011$ ],抑制 FBXW7 而能够逆转细胞迁移的增多 [ $45.42 \pm 6.13$ ],  $t=3.024$ ,  $P=0.039$ , 图 5E]。因此,敲低 miR-497-5p 促进了 ARPE-19 细胞的增殖和迁移,并通过调节 FBXW7 的表达抑制细胞凋亡。

### 3 讨论

DM 是一种高发的慢性病,其病理和生理的改变能够引起一系列并发症,对人类健康构成巨大威



A、B:qRT-PCR(A)和免疫印迹(B)检测miR-497-5p下调和miR-497-5p过表达后,ARPE-19细胞中FBXW7的表达;C:miR-497-5p与FBXW7的结合位点;D:双荧光素酶报告基因检测验证miR-497-5p与FBXW7的关系。两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图4 FBXW7是miR-497-5p的靶基因

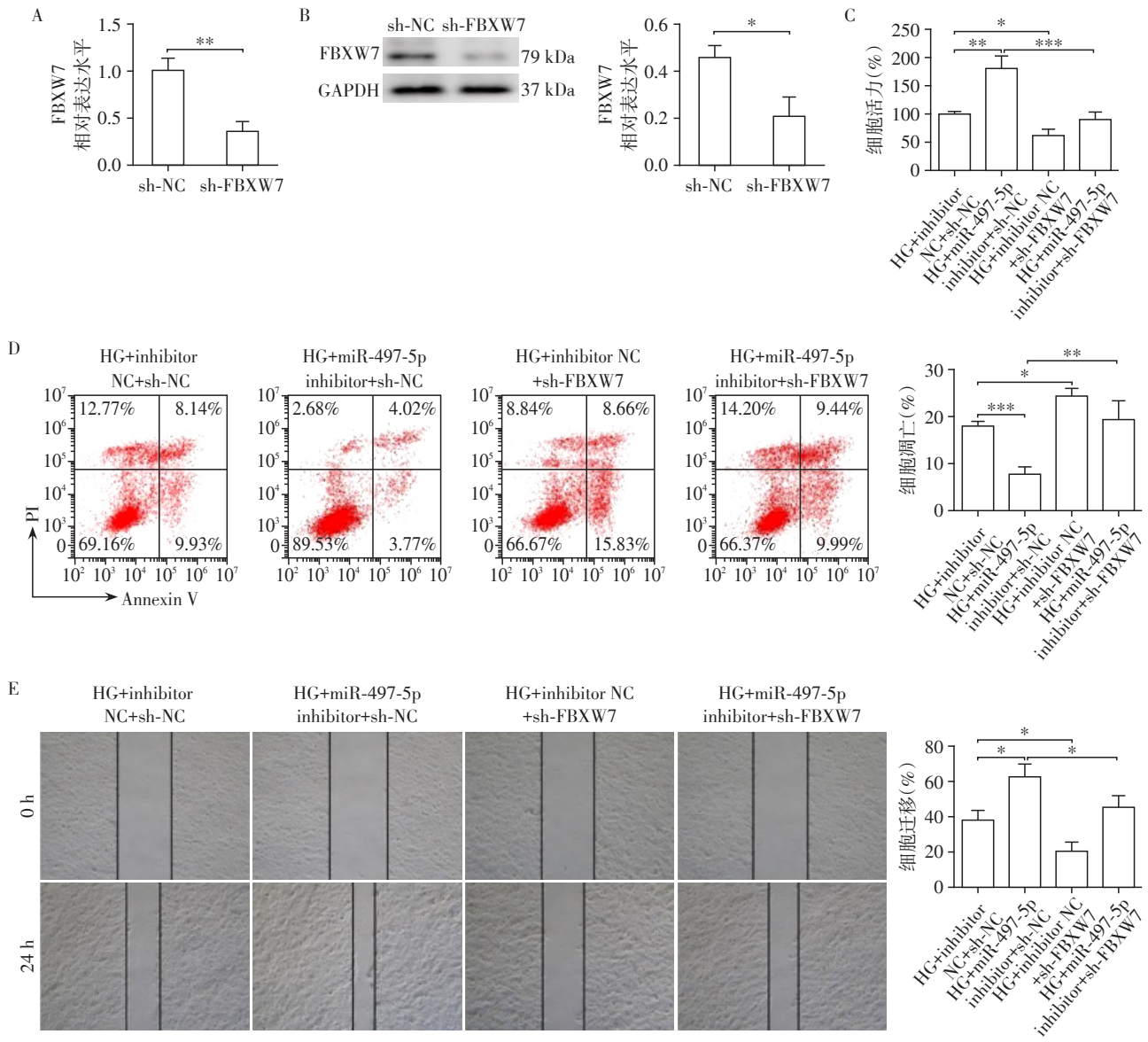
Figure 4 FBXW7 is the target gene of miR-497-5p

肺<sup>[20-21]</sup>。DR常见于病程较长的DM患者<sup>[5]</sup>,DR是DM相关失明的危险因素,中晚期DR可能会导致不可逆的病变。DR的发病机制尚不清楚,给DR的早期诊断和治疗带来了困难。本研究发现lncRNA VIM-AS1通过调节miR-497-5p/FBXW7轴来介导DR中ARPE-19细胞的增殖、迁移和凋亡。

视网膜上皮细胞是指滋养视网膜视觉细胞<sup>[22]</sup>。视网膜上皮细胞增殖降低和细胞凋亡增加会导致DR患者视力丧失<sup>[23]</sup>。正如广泛报道的那样,视网膜上皮细胞的增殖和凋亡受某些lncRNA的调节<sup>[24]</sup>。lncRNA AK077216可以抑制HG处理的ARPE-19细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。此外,据报道lncRNA MEG3可抑制HG处理的ARPE-19细胞的凋亡<sup>[25]</sup>。此外,lncRNA VIM-AS1在DM和DM相关并发症中的作用之前已有报道<sup>[13-14,26]</sup>,但在DR中的调节功能尚不清楚。最近一项研究表明,与其他DM患者相比,DR患者的lncRNA VIM-AS1表达降低<sup>[14]</sup>,这表明lncRNA VIM-AS1有可能成为DR预后和治疗的新型生物标志物。值得注意的是,据报道,lncRNA VIM-AS1通过miR-29抑制HG诱导的人视网膜上皮细胞凋亡<sup>[14]</sup>。然而,lncRNA VIM-AS1调控DR进展的具体分子机制仍不清楚。本研究中,lncRNA VIM-AS1在HG处理的ARPE-19细胞中被下调,这与之前的研究完全一致<sup>[14]</sup>。此外,lncRNA VIM-AS1过表达促进了HG处理的ARPE-19细胞的增殖和迁移,并抑制了细胞

凋亡。

lncRNA通过充当miRNA的内源诱饵发挥竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)的作用,进而影响miRNA与其靶标的结合<sup>[27]</sup>,这被认为是阐明lncRNA分子机制的重要途径之一。据此,科学界提出了ceRNA假说,这被描述为一种新的RNA调控机制<sup>[28]</sup>。据报道,lncRNA MIR497HG通过调节miR-128-3p来抑制HG处理的视网膜内皮细胞的增殖和迁移<sup>[29]</sup>。然而,尚不清楚lncRNA VIM-AS1是否通过充当miRNA海绵在DR中发挥调节作用。本研究提出了一个新的ceRNA调控网络,其中lncRNA VIM-AS1海绵化了miR-497-5p。据报道,在HG条件下,miR-497的表达与胰岛素水平一致<sup>[30]</sup>。此外,miR-497在糖尿病肾病患者和HG处理的HK-2细胞中显著下调,miR-497过表达可以抑制HG处理的HK-2细胞的焦亡<sup>[31]</sup>。更重要的是,据报道,miR-497在DM大鼠的视网膜和HG处理的Müller细胞中显著上调<sup>[32]</sup>,表明miR-497在不同的糖尿病并发症中具有不同的表达。本研究证实了miR-497-5p在HG处理的ARPE-19细胞中显著上调。此外,还发现lncRNA VIM-AS1可以通过直接靶向miR-497-5p负调控ARPE-19细胞中的miR-497-5p。正如预期的那样,miR-497-5p mimics逆转了lncRNA VIM-AS1过表达对HG诱导的ARPE-19细胞表型的影响。本研究所有的结果都提供了支持DR中存在



A、B:用sh-NC或sh-FBXW7转染ARPE-19细胞,qRT-PCR(A)和蛋白印迹法(B)检测FBXW7在细胞中的表达;C:CCK-8实验检测细胞活力;D:采用流式细胞术检测细胞的凋亡情况;E:伤口愈合试验检测细胞迁移情况。两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

图5 敲低miR-497-5p可以调节FBXW7的表达促进ARPE-19细胞的增殖和迁移并抑制细胞凋亡

Figure 5 Knockdown of miR-497-5p can regulate the expression of FBXW7, promote the proliferation and migration of ARPE-19 cells and inhibit apoptosis

lncRNA VIM-AS1/miR-497-5p 调节轴的证据。

众所周知,失调的miRNA结合靶mRNA来抑制基因表达,从而调控DR进展<sup>[33-34]</sup>。因此,本研究旨在探索miR-497-5p在调节DR进展中的下游靶点。FBXW7作为胎球蛋白A的E3泛素连接酶,参与维持葡萄糖稳态,其在肥胖患者肝脏中的表达对葡萄糖代谢具有多种有益作用;同时,敲除正常肝脏中的FBXW7会导致葡萄糖稳态受损<sup>[35]</sup>。更重要的是,据报道,FBXW7可抑制DR中的血管生成<sup>[19]</sup>。本研究发现HG处理的ARPE-19细胞中FBXW7的表达显著降低。FBXW7是miR-497-5p的直接靶标,

FBXW7调节靶蛋白泛素化和降解,FBXW7的底物包括几种广泛研究的癌蛋白,例如MYC、Notch、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR),FBXW7与底物构建调控网络,可以调节细胞的增殖、凋亡及转移<sup>[36]</sup>。FBXW7敲低消除了miR-497-5p抑制ARPE-19细胞生长的调节。因此,lncRNA VIM-AS1/miR-497-5p/FBXW7轴可能是DR发展的关键参与者。

本研究证明了lncRNA VIM-AS1通过海绵化miR-497-5p上调FBXW7。重要的是,lncRNA VIM-AS1的过表达促进了HG处理的ARPE-19细胞的增



殖和迁移,并通过 miR-497-5p/FBXW7 轴抑制细胞凋亡,最终影响 DR 进展。然而,本研究仍有一些不足之处,如 FBXW7 调控 ARPE-19 细胞增殖、凋亡及迁移的具体通路是什么? 未来需要进行体内实验来验证我们的发现。此外,需要探索 lncRNA VIM-AS1/miR-497-5p/FBXW7 轴对 DR 新生血管的潜在影响。

#### [参考文献]

- [1] MARESCCH C C, STUTE D C, FLEMING T, et al. Hyperglycemia induces spermatogenic disruption via major pathways of diabetes pathogenesis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):13074
- [2] SCHMIDT A M. Highlighting diabetes mellitus: The epidemic continuess [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(1):e1-e8
- [3] COLE J B, FLOREZ J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7):377-390
- [4] 胡启桢,顾蕙兰,秦瑶,等. 161例成人起病经典1型糖尿病微血管并发症的临床特征及相关风险因素分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(9):1364-1368
- [5] TEO Z L, THAM Y C, YU M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis. *ophthalmology* [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(11):1580-1591
- [6] SASONGKO M B, WIDYAPUTRI F, AGNI A N, et al. Prevalence of diabetic retinopathy and blindness in Indonesian adults with type 2 diabetes [J]. *Am J Ophthalmol*, 2017, 181:9-87
- [7] IYER M K, NIKNAFS Y S, MALIK R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(3):199-208
- [8] WEI J C, SHI Y L, WANG Q. LncRNA ANRIL knock-down ameliorates retinopathy in diabetic rats by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18):7732-7739
- [9] ZHANG D, QIN H, LENG Y, et al. LncRNA MEG3 over-expression inhibits the development of diabetic retinopathy by regulating TGF- $\beta$ 1 and VEGF [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3):2337-2342
- [10] LIU P, JIA S B, SHI J M, et al. LncRNA-MALAT1 promotes neovascularization in diabetic retinopathy through regulating miR-125b/VE-cadherin axis [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5):BSR20181469
- [11] ZHANG X, SHI E, YANG L, et al. LncRNA AK077216 is downregulated in diabetic retinopathy and inhibited the apoptosis of retinal pigment epithelial cells by downregulating miR-383 [J]. *Endocr J*, 2019, 66(11):1011-1016
- [12] REZANEJAD B H, ASADI M H, YAGHOUBI M M. Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(4):279-288
- [13] ERFANIAN O M, GHAEDI H, KAZEROUNI F, et al. Clinical significance of long noncoding RNA VIM-AS1 and CTBP1-AS2 expression in type 2 diabetes [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):9315-9323
- [14] ZENG F, LUO G, LU Y, et al. Long non-coding RNA VIM Antisense RNA 1 (VIM-AS1) sponges microRNA-29 to participate in diabetic retinopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2020, 57(9):1111-1116
- [15] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-97
- [16] ZENG L Q, WEI S B, SUN Y M, et al. Systematic profiling of mRNA and miRNA expression in the pancreatic islets of spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(1):67-74
- [17] SUN N, ZHANG G, LIU Y. Long non-coding RNA XIST sponges miR-34a to promotes colon cancer progression via Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Gene*, 2018, 665:141-148
- [18] SHAO J, FAN G, YIN X, et al. A novel transthyretin/STAT4/miR-223-3p/FBXW7 signaling pathway affects neovascularization in diabetic retinopathy [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 498:110541
- [19] HU L, LV X, LI D, et al. The anti-angiogenesis role of FBXW7 in diabetic retinopathy by facilitating the ubiquitination degradation of c-Myc to orchestrate the HDAC2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4):2190-2202
- [20] BERG K, CLEMMENSEN T S, TRAM E M, et al. Survival, graft function, and of allograft vasculopathy in heart transplant patients receiving adverse risk profile donor hearts [J]. *Clin Transplant*, 2018, 32(8):e13343
- [21] CARRAL-SANTANDER I E, SANTOS-PALACIOS A, MARTÍNEZ-BAEZ B E, et al. Secondary hyperhomocysteinemia-related occlusive retinal vasculopathy: A case report [J]. *Am J Ophthalmol Case Rep*, 2019, 13:41-45
- [22] BOYER M M, POULSEN G L, NORK T M. Relative contributions of the neurosensory retina and retinal pigment epithelium to macular hypofluorescence [J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118(1):27-31
- [23] SIMÓ R, VILLARROEL M, CORRALIZA L, et al. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *J Biomed Biotechnol*, (下转第248页)

- through the interventricular septum [J]. *Europace*, 2019, 21(11):1694-1702
- [12] NAGARAJAN V D, HO S Y, ERNST S. Anatomical considerations for his bundle pacing [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2019, 12(7):e006897
- [13] TEIGELER T, KOLOMINSKY J, VO C, et al. Intermediate-term performance and safety of His-bundle pacing leads: a single-center experience [J]. *Heart Rhythm*, 2021, 18(5):743-749
- [14] JIANG Z, WU T, WU Y, et al. Clinical outcomes of permanent left bundle branch area pacing in patients with left bundle branch block and left ventricular ejection fraction >35 vs. ≤35 [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 838708
- [15] VIJAYARAMAN P, RAJAKUMAR C, NAPERKOWSKI AM, et al. Clinical outcomes of left bundle branch area pacing compared to His bundle pacing [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2022, 33(6):1234-1243
- [收稿日期] 2022-10-09  
(本文编辑:唐震)

(上接第 195 页)

- 2010:190724
- [24] LI Y, XU F, XIAO H, et al. Long noncoding RNA BDNF-AS inversely regulated BDNF and modulated high-glucose induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1):817-823
- [25] XIAO F, LI L, FU J S, et al. Regulation of the miR-19b-mediated SOCS6 - JAK2/STAT3 pathway by lncRNA MEG3 is involved in high glucose-induced apoptosis in hRMECs [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7):BSR20194370
- [26] TAHERI M, EGHTEADARIAN R, GHAFOURI-FARD S, et al. Non-coding RNAs and type 2 diabetes mellitus [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2020:1-10
- [27] CUI H, XU Z, QU C. Tetramethylpyrazine ameliorates isoflurane-induced cognitive dysfunction by inhibiting neuroinflammation via miR-150 in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4):3878-3887
- [28] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(41):5661-5667
- [29] YANG J, YANG F J, WANG Y G, et al. LncRNA MIR497HG inhibits proliferation and migration of retinal endothelial cells under high-level glucose treatment via miRNA-128-3p/SIRT1 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11):5871-5877
- [30] LANG H, XIANG Y, LIN N, et al. Identification of a panel of MiRNAs as positive regulators of insulin release in pancreatic B-cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1):185-193
- [31] WANG J, ZHAO S M. LncRNA-antisense non-coding RNA in the INK4 locus promotes pyroptosis via miR-497/thioredoxin-interacting protein axis in diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2021, 264:118728
- [32] LI X J. Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 inhibits the apoptosis of retina Müller cells after diabetic retinopathy through regulating miR-497/brain-derived neurotrophic factor axis [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2018, 15(3):204-213
- [33] BAO X Y, CAO J. MiRNA-138-5p protects the early diabetic retinopathy by regulating NOVA1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18):7749-7756
- [34] ZHENG Y, LIU Y, WANG L, et al. MicroRNA-126 suppresses the proliferation and migration of endothelial cells in experimental diabetic retinopathy by targeting polo-like kinase 4 [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1):151-160
- [35] ZHAO J, XIONG X, LI Y, et al. Hepatic F-Box protein FBXW7 maintains glucose homeostasis through degradation of fetuin-A [J]. *Diabetes*, 2018, 67(5):818-830
- [36] ZHANG G, LI S, LU J, et al. LncRNA MT1JP functions as a ceRNA in regulating FBXW7 through competitively binding to miR-92a-3p in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):87
- [收稿日期] 2022-05-30  
(本文编辑:唐震)