doi:10.11659/jjssx.04E022034

·基础研究·

LncRNA PVT1/miR-124 轴靶向 Jagged-1/Notch 通路抑制晶状体纤维化的分子机制研究

汪 涛[1],张振华[2],陈文兵[3],刘建军[1],张彩霞[2],吕嘉华[4] (1.南京医科大学附属苏州科技城医院眼科,江苏 苏州 215153;2.苏州眼耳鼻喉科医院眼科,江苏 苏州 215006;3.苏州大学附属第一医院眼科,江苏 苏州 215006;4.上海复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科,上海 200031)

[摘 要] **目的** 探究环状 LncRNA PVT1 调节人晶状体上皮细胞(LECs)纤维化的作用及可能的分子机制。**方法** 收集新鲜晶状体前囊膜标本,包括前囊下白内障(ASC)手术眼和健康死后眼各 9 例。体外培养 SRA01/04 细胞,并分为空白组、TGFβ2 组、si-control 组、si-PVT1 组、si-PVT1 + miR-NC 组、si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组。除空白组外,其余各组在转染相应序列后,用 5 ng·mL^{-1} TGFβ2 作用 48 h。提取组织或细胞 RNA 并进行微阵列分析。应用实时荧光定量 PCR 法检测组织样本或细胞中 LncRNA PVT1、miR-124 表达。采用双荧光素酶报告系统和 RNA 结合蛋白免疫共沉淀(RIP)法分析 LncRNA PVT1、miR-124、Jagged-1 之间的靶向关系。Western blot 法检测各组细胞 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3、Snail、Slug、纤维蛋白(FN)、Ⅳ型胶原蛋白(Col Ⅳ)、肌动蛋白 α(α-SMA)等蛋白表达。**结果** LncRNA PVT1 在 ASC 眼的前囊膜组织或 TGFβ$_2$ 组 SRA01/04 细胞中表达上调,同时 miR-124 表达水平降低($P<0.05$),且 LncRNA PVT1 与 miR-124 表达水平均呈负相关性($P<0.05$)。与空白组相比,TGFβ2 组和 si-control 组 FN、α-SMA、Col Ⅳ、Snail、Slug 蛋白表达上调;与 TGFβ2 组和 si-control 组比较,si-PVT1 组和 si-PVT1 + miR-NC 组上述蛋白表达下调,但 si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组可逆转 si-PVT1 对上述蛋白表达的下调作用($P<0.05$)。双荧光素酶报告系统和 RIP 法分析结果显示,LncRNA PVT1 通过“海绵吸附”miR-124,负性调节 miR-124 的表达。与空白组相比,TGFβ2 组 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达显著上调;与 TGFβ2 组和 si-control 组比较,si-PVT1 组 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达下调,同时 si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组可逆转 si-PVT1 对上述蛋白表达的下调作用($P<0.05$)。**结论** TGFβ2 通过一种 LncRNA PVT1 依赖机制诱导 LECs 发生上皮—间充质转化,其机制可能是 LncRNA PVT1 通过“海绵吸附”miR-124 负性调节其表达,进而诱导下游 Jagged-1/Notch 信号通路激活。

[关键词] LncRNA PVT1;miR-124;Jagged-1/Notch 通路;人晶状体上皮细胞;晶状体纤维化

[中图分类号] R776 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-12

Molecular mechanism of LncRNA PVT1/miR-124 axis inhibiting lens fibrosis by targeting Jagged-1/Notch pathway

WANG Tao[1], ZHANG Zhen-hua[2], CHEN Wen-bing[3], LIU Jian-jun[1], ZHANG Cai-xia[2], LYU Jia-hua[4] (1. Department of Ophthalmology, Suzhou Science and Technology City Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou Jiangsu 215153, China; 2. Department of Ophthalmology, Suzhou Ophthalmology and Otolaryngology Hospital, Suzhou Jiangsu 215006, China; 3. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou Jiangsu 215006, China; 4. Department of Ophthalmology, Eye & Ent Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China)

Abstract: Objective To investigate the role and possible molecular mechanism of circ LncRNA PVT1 in regulating human lens epithelial cells (LECs) fibrosis. **Methods** The fresh lens anterior capsule specimens were collected, including eyes from 9 patients underwent anterior subcapsular cataract surgery and 9 healthy post-mortem eyes. SRA01/04 cells were cultured in vitro and divided into the blank group, the TGFβ2 group, the si-control group, the si-PVT1 group, the si-PVT1 + miR-NC group, and the si-PVT1 + miR-124-inhibitor group. Except the blank group, the other groups were treated with 5 ng · mL^{-1} TGFβ2 for 48 hours after transfection with the corresponding sequences. RNA was extracted from tissues or cells and analyzed by microarray analysis. The real-time fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the expressions of LncRNA PVT1 and miR-124 in tissues or cells, the targeting relationships between LncRNA PVT1, miR-124 and Jagged-1 were analyzed by double-luciferase reporter system and RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) method, the expressions of Jagged-1, Notch-1, Notch-2, Notch-3, Snail, Slug, fibronectin (FN), collagen type Ⅳ (Col Ⅳ), and alpha-smooth muscle actin (α-SMA) of cells in each groups were detected by Western blot. **Results** LncRNA PVT1 was up-regulated in the anterior capsule of ASC

[基金项目] 江苏省卫生计生委年度面上科研课题项目(H201518)

[通信作者] 张振华,E-mail:jinjihu2006@126.com

eyes or in the SRA01/04 cells of TGFβ2 group, and the expression level of miR-124 decreased ($P<0.05$), and the expression levels of LncRNA PVT1 and miR-124 were negatively correlated ($P<0.05$). The expression of FN, α-SMA, Col Ⅳ, Snail and Slug proteins were up-regulated in the TGFβ2 group and the si-control group compared with those in the blank group, but the expressions of these proteins in the si-PVT1 group and the si-PVT1 + miR-NC group were lower than those in the TGFβ2 group and the si-control group, however, the si-PVT1 + miR-124-inhibitor group could reverse the down-regulation effect of si-PVT1 on the expressions of the above proteins ($P<0.05$). The double-luciferase reporter system and RIP method showed that LncRNA PVT1 negatively regulated miR-124 expression by "sponge adsorption". The expressions of Jagged-1, Notch-1, Notch-2 and Notch-3 proteins in the TGFβ2 group were significantly higher than those in the blank group, the expressions of Jagged-1, Notch-1, Notch-2 and Notch-3 in the si-PVT1 group were lower than those in the TGFβ2 group and the si-control group, at the same time, the si-PVT1 + miR-124-inhibitor group could reverse the down-regulation effect of si-PVT1 on the expressions of the above proteins ($P<0.05$). **Conclusion** TGFβ2 induces epithelial-mesenchymal transformation in LECs through a LncRNA PVT1 dependent mechanism and the mechanism may be that LncRNA PVT1 negatively regulates the expression of miR-124 through "sponge adsorption", thereby inducing the activation of the downstream Jagged-1/Notch signaling pathway.

Keywords: LncRNA PVT1; miR-124; Jagged-1/Notch pathway; human lens epithelial cells; lens fibrosis

纤维化是一种慢性多器官疾病,其主要病变基础为病理性上皮—间充质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)[1]。晶状体纤维性疾病,如前囊下白内障(anterior subcapsular cataract, ASC)和后囊膜混浊(posterior caular opacification, PCO),是视力障碍的常见原因[2-3],其细胞学机制都与晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)EMT 有关,转化生长因子-β(transforming growth factor-beta, TGF-β)诱导的 LEC-sEMT 被认为是构建晶状体纤维性疾病体外模型的有效途径,这为我们开展相关研究提供了方便的实验模型[4]。据报道,众多非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)在调节 EMT 过程中发挥关键作用[5-7]。深入探索基因调控网络,如 LncRNAs/miRNAs/mRNAs,有助于了解晶状体纤维化的进展机制。本研究结合 ASC 患者的晶状体前囊膜组织转录组学数据,筛选差异性表达最典型的 LncRNA PVT1,探究其在 LECs 纤维化和白内障进展中的作用及潜在分子机制,以期证实针对 LncRNA PVT1/miR-124/Jagged-1/Notch 通路的药物靶向在预防和治疗 ASC、PCO 或其他器官纤维化方面的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本采集 共收集了 18 例捐赠者(年龄 40~58 岁,男性 15 例,女性 3 例)的新鲜晶状体标本,其中 9 例来自白内障手术患者(ASC 患者,晶状体混浊度 LOCSⅢ分级 4~6 级,排除糖尿病葡萄膜炎病史者),术中取出晶状体囊膜后,用撕囊钳分离前囊纤维化组织部分;另 9 例正常透明晶状体组织来自健康人体的死后捐赠眼(在死后 8 h 内获得,排除眼部疾病,LOCSⅢ分级 1~2 级),采用撕囊钳沿晶状体赤道区切开晶状体前囊膜,取晶状体上皮组织。将晶状体上皮组织块置于含体积分数 1% 胎牛血清、体积分数 1% 非必需氨基酸、100 IU·mL^{-1} 青霉素和 100 μg·mL^{-1}链霉素的 DMEM 培养基中,培养上皮侧面朝上。本研究获南京医科大学附属苏州科技城医院医学伦理委员会批准(2020021),所有实验及样本采集符合《赫尔辛基宣言》。

1.1.2 细胞、主要药物与试剂 人晶状体上皮细胞株 SRA01/04(中国医学科学院肿瘤研究所协和医院)。TGFβ2、特异性 Notch 受体裂解抑制剂同义 γ-分泌酶抑制剂Ⅸ(γ-Secretase Inhibitor Ⅸ, GSI-Ⅸ)、TGF-β/Smad 抑制剂 SB431542(美国 Sigma-Aldrich 公司);miRNeasy Mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司)。GenePORTER 转染试剂(美国 Genlantis 公司);pcDNA3.1 质粒(美国 Invitrogen 公司);SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒、PrimeScript RT Master Mix 试剂盒、SYBR PrimeScript RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。初级抗体:纤维蛋白(fibronectin, FN)、Ⅳ型胶原蛋白(collagen type Ⅳ, Col Ⅳ)、钙黏附蛋白 E(E-cadherin)、钙黏附蛋白 N(N-cadherin)、肌动蛋白 α(alpha-smooth muscle actin, α-SMA)、Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3、Snail、Slug(美国 Cell Signaling Technology 公司)。EZ-Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(美国 Millipore 公司)。

1.1.3 主要仪器 ND-1000 紫外分光光度计(美国 NanoDrop Technologies 公司);LSM510 激光扫描共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司);LightCycler 480II 实时 PCR 系统(瑞士 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及分组 将 SRA01/04 细胞培养

于 DMEM 完全培养基(含体积分数 1% 胎牛血清、体积分数 1% 非必需氨基酸、100 IU·mL^{-1} 青霉素和 100 μg·mL^{-1}链霉素)中。为了研究下调 LncRNA-PVT1 表达对 EMT 及下游通路的影响,将 SRA01/04 细胞分为空白组、TGFβ2 组、si-control 组、si-PVT1 组、si-PVT1 + miR-NC 组、si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组。空白组细胞不作任何特殊处理。TGFβ2 组用 5 ng·mL^{-1} TGFβ2 作用 48 h,si-control 组、si-PVT1 组、si-PVT1 + miR-NC 组、si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组分别转染 PVT1 小分子干扰 RNA(siRNAs)的阴性对照序列、si-PVT1-1/si-PVT1-2、si-PVT1 + miR-124 inhibitor 阴性对照序列或 miR-124 inhibitor 序列后,用 5 ng·mL^{-1} TGFβ2 作用 48 h。为了研究 TGFβ2 对 LncRNA PVT1 表达的影响,将 SRA01/04 细胞分为空白组、TGFβ2 组、GSI-Ⅸ + TGFβ2 组和 SB431542 + TGFβ2 组。GSI-Ⅸ + TGFβ2 组和 SB431542 + TGFβ2 组分别在 TGFβ2 作用前 60 min 加入 GSI-Ⅸ(10 μmol·L^{-1})或 SB431542(10 μmol·L^{-1})。

1.2.2 微阵列分析 使用 TRIzol 试剂和 miRNeasy Mini 试剂盒提取组织或细胞总 RNA(每 3 份 RNA 合并成 1 份样本)。利用紫外分光光度计检测 RNA 样本的质量和纯度,通过凝胶电泳测定 RNA 完整性。利用 Agilent Array 平台进行微阵列分析,分别以健康眼和 ASC 眼、TGFβ2 组和未经 TGFβ2 处理的空白组 SRA01/04 细胞 LncRNAs 差异表达为目标。从总 RNA 中去除 rRNA 后提纯 mRNA,然后采用随机引物法扩增样本,并沿着整个转录本长度转录成荧光 cRNA。将标记的 cRNAs 与 Arraystar 人 LncRNA 微阵列 v3.0 杂交。利用 Agilent G2505C 扫描仪扫描和特征提取软件 v11.0.1.1 对采集的阵列图像进行分析,用 GeneSpring GX v11.5.1 软件对微阵列数据进行生物信息学分析和可视化处理。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测基因表达 利用 TRIzol 试剂提取 SRA01/04 细胞总 RNA,使用 DNase I 酶提纯基因组 DNA。合成 cDNA,并在 ABI Prism7000 热循环仪上进行实时 PCR 反应。循环条件为:50 ℃ 2 min;95 ℃ 5 min;然后在 95 ℃ 10 s 和 60 ℃ 45 s 下进行 40 次循环。采用 RNU6B 和 GAPDH 作为内参。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达 用 100 μL 裂解液提取细胞总蛋白,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,半干法电印迹到聚偏氟乙烯膜上。用体积分数 5% 的脱脂牛奶封闭细胞膜,并与不同的一抗(Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3、Snail、Slug、FN、Col Ⅳ、E-cadherin、N-cadherin、α-SMA)在 4 ℃下孵育过夜。然后在室温下与辣根过氧化物酶藕联的二抗孵育 1 h。

1.2.5 双荧光素酶报告基因分析 利用两种靶向识别工具 Pictar(http://pictar.mdc-berlin.de/)和 TargetScan 4.2(http://www.targetscan.org/vert_42/)来寻找 LncRNA PVT1 和 miR-124 的潜在靶基因。用 PCR 法扩增含有预测 miR-124 结合位点或相应突变位点的 Jagged-1 和 LncRNA PVT1 的 3'-UTR 序列,并转染至 pMIR-RB-REPORT 荧光素酶编码区。在转染前 24 h 先将 293T 细胞接种于 96 孔板中。次日用 Lipofectamine™2000 转染试剂将 100 ng·mL^{-1}报告质粒和 50 nmol·L^{-1}的 miR-124 mimics 或对照序列共转染至 293T 细胞,用双荧光素酶检测系统检测荧光素酶活性。

1.2.6 RNA 结合蛋白免疫共沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation,RIP)法分析 裂解 1×10^7 个细胞,将 100 μL 细胞裂解混合物与含有抗 Ago2 结合磁珠的 RIP 缓冲液共孵育。用蛋白酶 K 缓冲液消化样本,分离免疫沉淀 RNA。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 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和 *Tukey* 事后多重检验;LncRNA PVT1、miR-124 表达水平采用 *Spearman* 秩相关系数分析;$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 微阵列分析 LncRNAs 差异表达谱

利用人 LncRNA 微阵列分析,热图显示健康眼、ASC 眼前囊膜组织存在 628 个差异性表达的 LncRNAs(变化倍数≥2.0,$P<0.05$),其中 287 个 LncRNAs 表达上调,341 个 LncRNAs 表达下调,其中 PVT1 上调最明显(图 1a)。此外,在 LECs 样本中,空白组、TGFβ2 组存在 371 个差异性表达的 LncRNAs(变化倍数≥2.0,$P<0.05$),其中 171 个 LncRNAs 表达上调,200 个 LncRNAs表达下调,PVT1 是上调最明显(前五位)的 LncRNAs 之一(图 1b)。

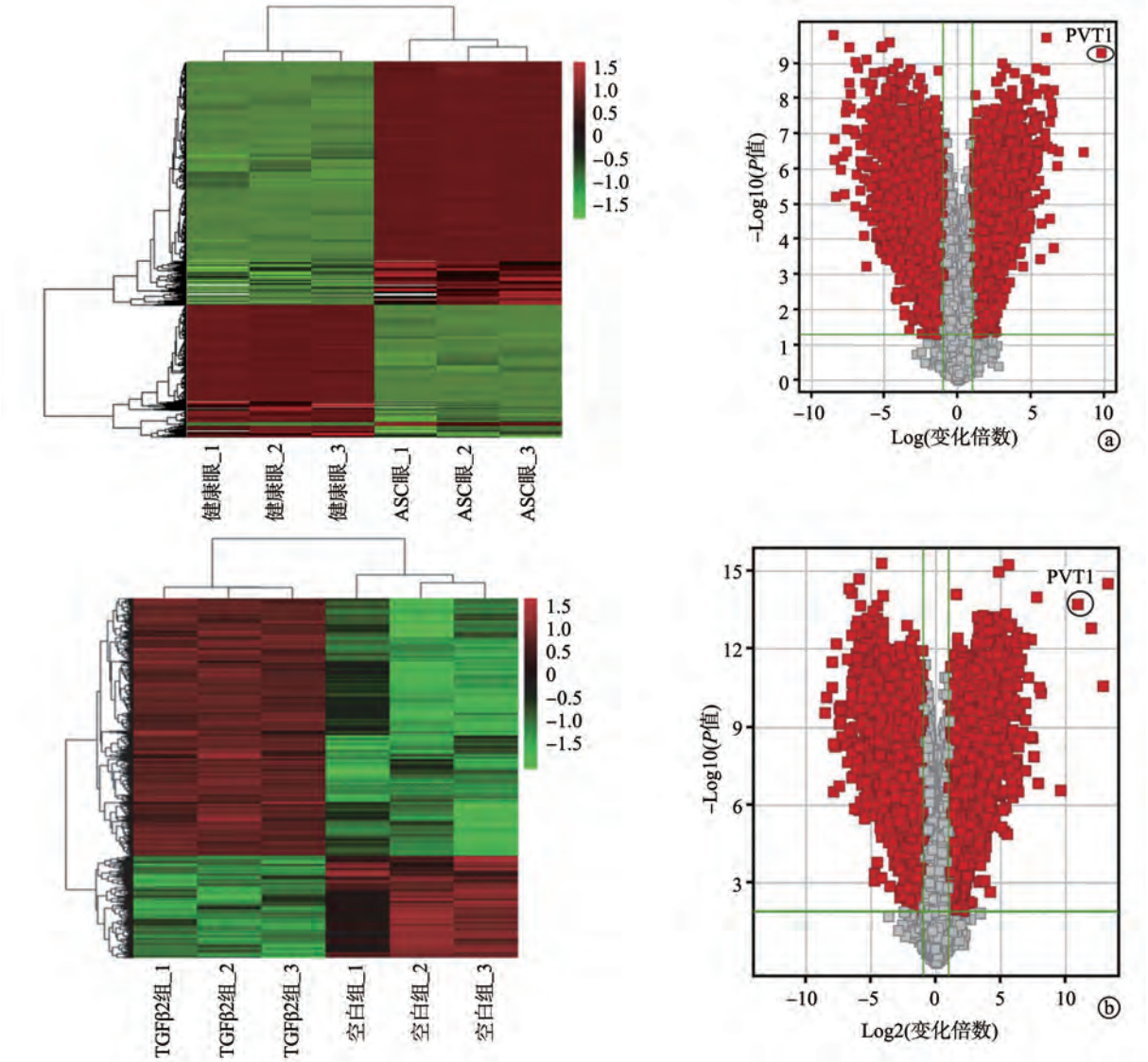
2.2 实时荧光定量 PCR 法检测前囊膜组织和细胞中 LncRNA PVT1、miR-124 mRNA 表达水平

ASC 眼的前囊膜组织和 TGFβ2 组 SAR01/04 细胞中 LncRNA PVT1 mRNA 表达水平较健康眼或空白组细胞升高($P<0.05$),同时 miR-124 mRNA 表达水

平降低($P<0.05$)。经 *Spearman* 秩相关系数分析,在 ASC 眼的前囊膜组织或 TGFβ2 组 SRA01/04 细胞中 LncRNA PVT1 与 miR-124 表达水平均呈负相关性($P<0.05$)。此外,分别用 1 ng·mL^{-1}、2 ng·mL^{-1}、5 ng·mL^{-1} TGFβ2 作用于细胞 48 h,LncRNA PVT1 mRNA 表达水平逐渐升高($P<0.05$);用 5 ng·mL^{-1} TGFβ2 分别作用于细胞 12 h、24 h、48 h,LncRNA PVT1 mRNA 表达水平亦逐渐升高($P<0.05$),说明 TGFβ2 可显著诱导 SRA01/04 细胞 LncRNA PVT1 过表达,且呈剂量依赖性和时间依赖性,见图 2。

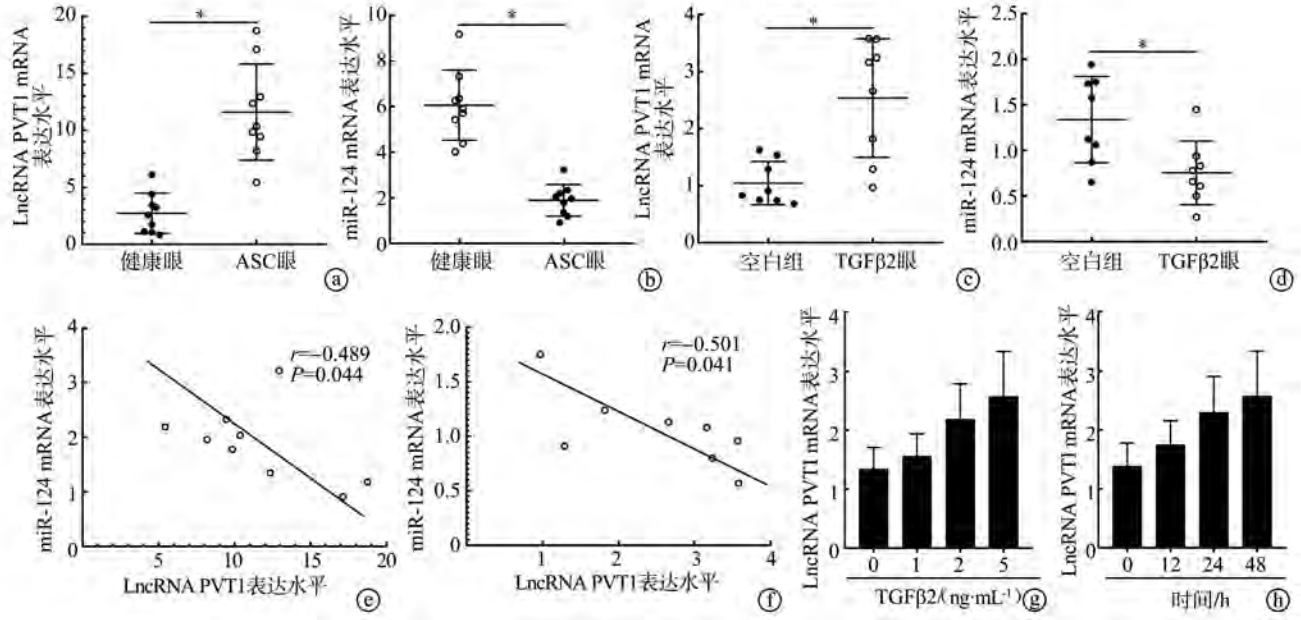
2.3 Western blot 法检测 SRA01/04 细胞 EMT 标记蛋白表达

与空白组相比,TGFβ2 组上皮分化标志物 E-cadherin 蛋白表达下调,同时间充质细胞标志物 FN 蛋白表达上调($P<0.05$)。然而分别转染 si-PVT1-1 和 si-PVT1-2 后,E-cadherin 蛋白表达高于 TGFβ2 组和 si-control 组,同时 FN 蛋白表达低于 TGFβ2 组和 si-control 组,尤其以 si-PVT1-2 组变化最明显($P<0.05$),见图 3a。故选择转染 si-PVT1-2 用于后续实验。此外,与空白组相比,TGFβ2 组和 si-control 组间充质细胞标志物 FN、α-SMA、Col Ⅳ、Snail、Slug 蛋白表达上调,而 si-PVT1 组和 si-PVT1 + miR-NC 组上述蛋白表达低于 TGFβ2 组和 si-control 组,但 si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组可逆转 si-PVT1 对上述蛋白表达的下调作用($P<0.05$),见图 3b。



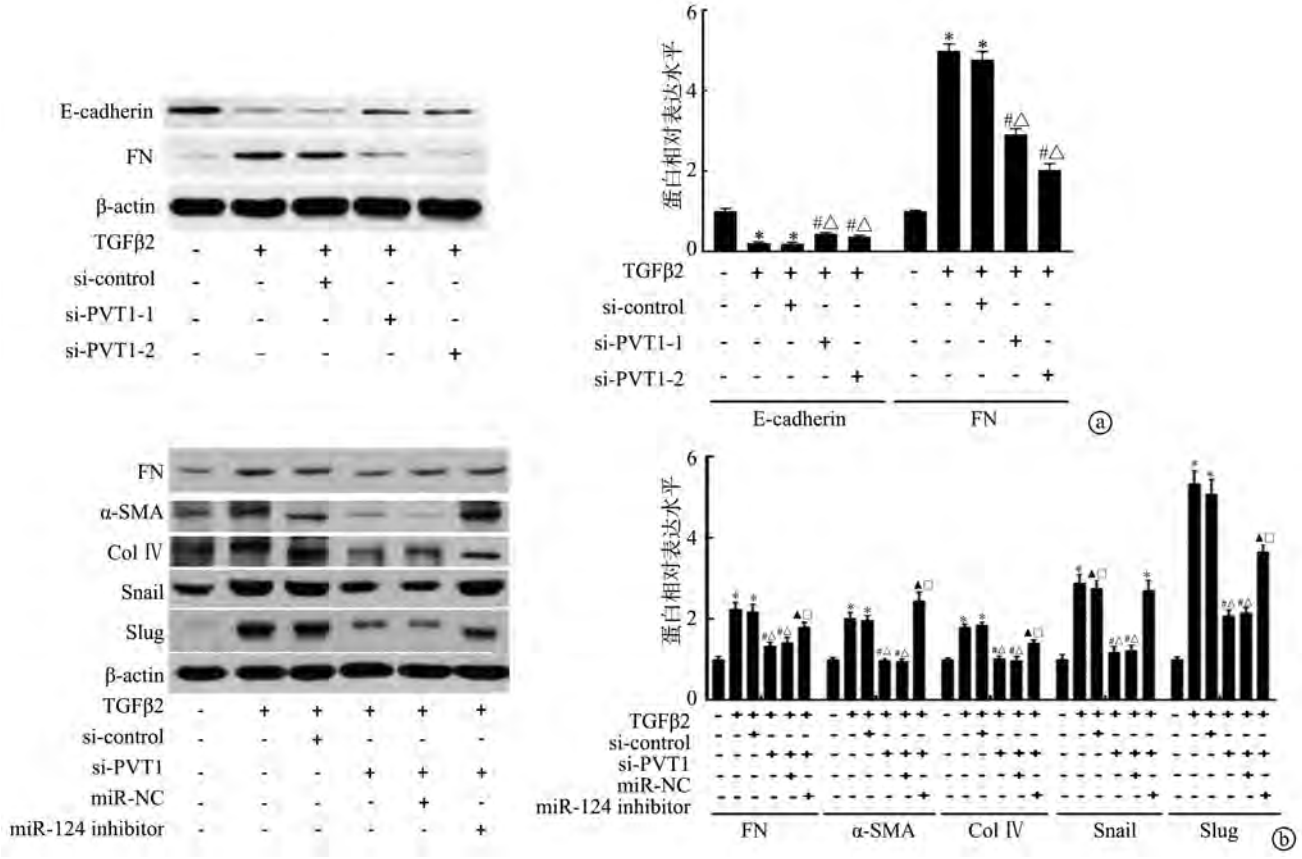
a:健康眼和 ASC 眼差异性表达的聚类分析热图和火山图;b:空白组和 TGFβ2 组 SAR01/04 细胞差异性表达的聚类分析热图和火山图

图 1 LncRNA 微阵列数据分析



a:前囊膜组织 LncRNA PVT1 mRNA 表达差异($n=9$);b:前囊膜组织 miR-124 mRNA 表达差异($n=9$);c:SRA1/04 细胞中 LncRNA PVT1 mRNA 表达差异($n=8$);d:SRA1/04 细胞中 miR-124 mRNA 表达差异($n=8$);e:前囊膜组织 LncRNA PVT1 mRNA 和 miR-124 mRNA 表达的关系;f:SRA1/04 细胞 LncRNA PVT1 mRNA 和 miR-124 mRNA 表达的关系;g:不同浓度 TGFβ2 作用于 SRA1/04 细胞 48 h;h:不同时间 5 ng·mL^{-1} TGFβ2 作用于 SRA1/04 细胞 ＊:$P<0.05$

图 2 实时荧光定量 PCR 法检测前囊膜组织和细胞中 LncRNA PVT1、miR-124 表达水平



a:FN、E-cadherin 蛋白表达;b:FN、α-SMA、Col Ⅳ、Snal、Slug 蛋白表达 ＊:与空白组相比,$P<0.05$;#:与 TGFβ2 组相比,$P<0.05$;△:与 si-control 组相比,$P<0.05$;▲:与 si-PVT1 组相比,$P<0.05$;□:与 si-PVT1 + miR-NC 组相比,$P<0.05$

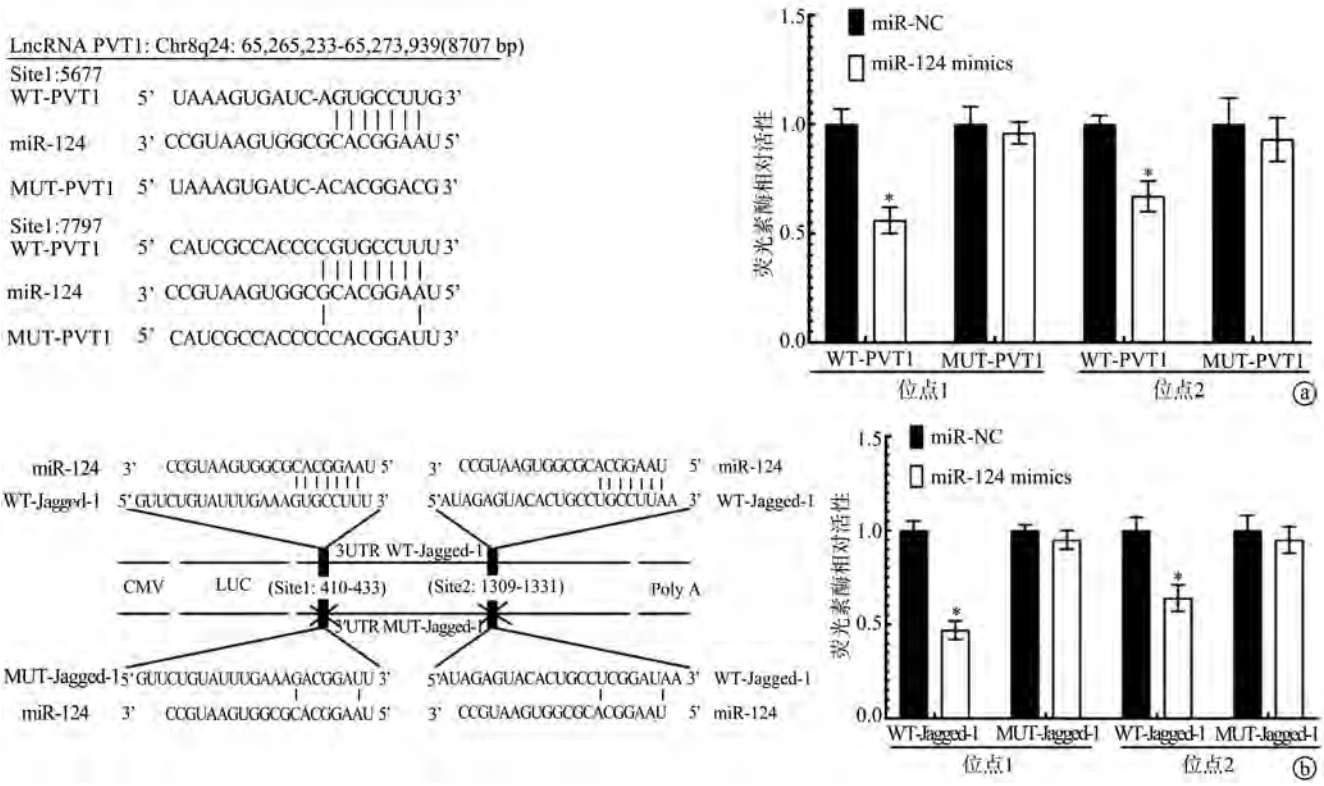
图 3 Western blot 法检测 SRA01/04 细胞中 EMT 相关蛋白表达

2.4 双荧光素酶报告基因验证 LncRNA PVT1、miR-124、Jagged-1 之间的靶向作用

与转染 miR-NC 相比,转染 miR-124 mimics 能显著降低 PVT1、Jagged-1 野生型(位点 1、位点 2)的荧光素酶活性($P<0.05$),见图 4。

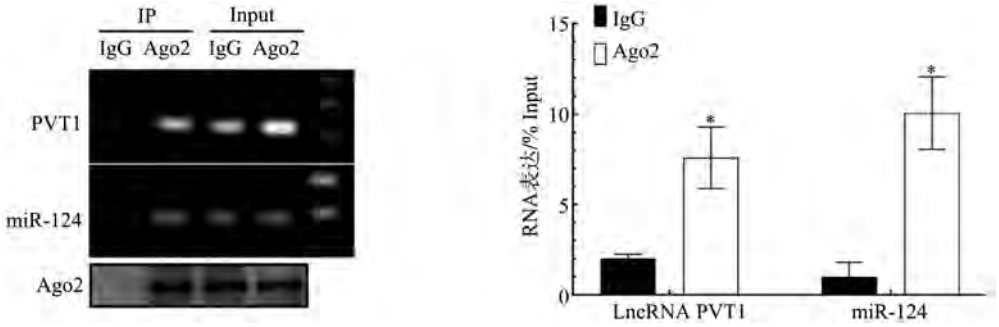
2.5 RIP 法分析 LncRNA PVT1 和 miR-124 的调控关系

结果证实,LncRNA PVT1 和 miR-124 都特异性富集了 Ago2 抗体相关复合物($P<0.05$),见图 5,表明 PVT1 通过"海绵吸附"miR-124,负向调节 miR-124 的表达。



a:LncRNA PVT1 与 miR-124 靶向结合关系;b:Jagged1 与 miR-124 靶向结合关系 *:与 miR-NC 相比,$P<0.05$

图 4 双荧光素酶报告基因实验

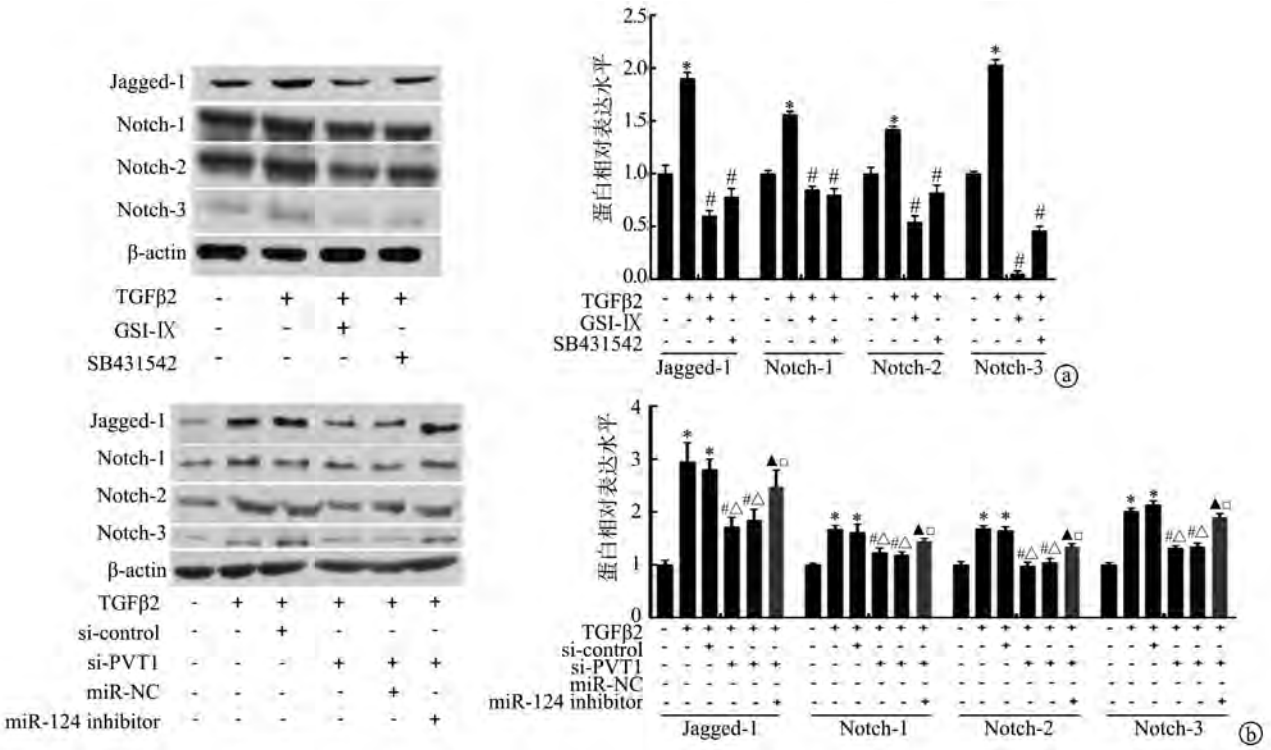


*:与 IgG 相比,$P<0.05$

图 5 RIP 法分析

2.6 Western blot 法检测 SRA01/04 细胞 Jagged-1/Notch 通路相关蛋白表达

与空白组相比,TGFβ2 组 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达显著上调,而 GSI-Ⅸ + TGFβ2 组、SB431542 + TGFβ2 组 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达则低于 TGFβ2 组($P<0.05$),见图 6a。此外,同样在 TGFβ2 作用下,si-PVT1组 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达则低于 TGFβ2 组和 si-control 组,同时 si-PVT1 + miR-124-inhibitor 组可逆转 si-PVT1 对上述蛋白表达的下调作用($P<0.05$),见图 6b。



a：TGFβ2 对 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达的影响；b：LncRNA PVT1 对 Jagged-1、Notch-1、Notch-2、Notch-3 蛋白表达的影响 ＊：与空白组相比，$P<0.05$；#：与 TGFβ2 组相比，$P<0.05$；△：与 si-control 组相比，$P<0.05$；▲：与 si-PVT1 组相比，$P<0.05$；□：与 si-PVT1 + miR-NC 组相比，$P<0.05$

图 6 Western blot 法检测 SRA01/04 细胞中 Jagged-1/Notch 通路相关蛋白表达

3 讨论

本研究首先基于微阵列数据，发现 LncRNA PVT1 在 ACS 前囊膜组织或 TGFβ2 诱导的 LECs 中明显表达上调。进一步的细胞实验证实，TGFβ2 可诱导 LECs 中上皮分化标志物 E-cadherin 蛋白表达下调，同时间充质细胞标志物 FN 蛋白表达上调，说明 TGFβ2 可促进 LECs 向间充质细胞表型转化。在机制分析实验中，TGFβ2 可诱导 SRA01/04 细胞 LncRNA PVT1 过表达，这是一个呈剂量依赖性和时间依赖性的过程；而 PVT1 可负性调节 miR-124，进而导致 Jagged-1/Notch 信号通路激活。因此，我们认为 PVT1/miR-124/Jagged-1/Notch 轴可能是 TGFβ2 诱导 LECs 发生 EMT 的重要分子机制之一。

LncRNA 是非编码转录体，虽然缺乏蛋白质编码能力，但其在调节基因表达方面起着关键作用[8]。LECs 发生 EMT 是导致 ASC 或 PCO 等继发性白内障的重要原因，而 TGFβ2 被认为是一个重要的诱因[2-4]。本研究结果显示，TGFβ2 以剂量依赖性和时间依赖性的方式诱导 SRA01/04 细胞 LncRNA PVT1 表达上调，这一点在 ASC 眼的前囊膜组织中也得到证实，说明 LncRNA PVT1 参与了 ASC 的病变过程。Western blot 结果显示，TGFβ2 可抑制上皮分化标志物 E-cadherin 蛋白表达，同时诱导间充质细胞标志物 FN 蛋白表达上调，且 TGFβ2 诱导 LECs 发生 EMT 的作用受到 LncRNA PVT1 基因敲除的影响，下调 PVT1 基因表达后，miR-124 表达相应上调，而 TGFβ2 对 LECs 中 EMT 标志物表达的影响得以改善。因此，我们认为 TGFβ2 通过 PVT1 依赖性机制诱导 LECs 发生 EMT。

在分子机制方面，LncRNAs 通过与 miRNAs 相互作用，调节 miRNA 下游靶基因的表达，发挥其在疾病发生发展中的作用。研究显示，PVT1 能与 miR-214[9]、miR-26b[10]等相互作用，进而调节细胞下游 TGFβ1 信号转导，影响肿瘤细胞的侵袭和迁移。本研究双荧光素酶报告基因实验和免疫共沉淀实验证实，PVT1 可通过吸附 miR-124 进而影响 miR-124 下游通路 Jagged1/Notch 轴的激活。miR-124 属于肿瘤抑制分子，研究显示其在癌症[11-12]、肾间质纤维化[13]等疾病中可以抑制细胞 EMT 进程。此外，miR-124 可以通过调节 STAT3 抑制视网膜母细胞瘤细胞的活性和侵袭[14]。本研究发现，ASC 眼前囊膜组织中 miR-124 表达下降，说明其参与了继发性白内障的发病，并且 miR-124 在 TGFβ2 诱导的 LECs-EMT 中起着重要作用。目前已发现多种 miR-124 靶基因与纤维化有关，包括 Col Ⅰ[15]、结缔组

织生长因子[16]、Smad4[17]等。在本研究中,我们确定了其另一个靶基因 Jagged-1, miR-124 可直接与 Jagged-1的3'-UTR 相互作用,从而负向调节 Jagged-1 的表达。此外, miR-124 也可影响 Notch-1、Notch-2 和 Notch-3 受体表达,这意味着miR-124除了直接抑制 Jagged-1 信号传递外,还可抑制下游 Notch 受体的表达,进而影响 LECs 纤维化进程。Notch 信号在胚胎发育[18]、肿瘤转移[19]和各种纤维化疾病[20]中起关键作用。因此阻断 Jagged-1 信号传导,可以整体逆转 TGFβ2 诱导的 LECs-EMT 进程。

综上,TGFβ2 通过一种 LncRNA PVT1 依赖机制诱导 LECs 发生 EMT。其机制之一是 LncRNA PVT1 通过"海绵吸附" miR-124 负性调节其表达,进而诱导下游 Jagged-1/Notch 信号通路激活。因此, PVT1/miR-124/Jagged-1/Notch 轴参与了 TGFβ2 诱导的 LECs-EMT进程,而 LncRNA PVT1 有望成为治疗 ASC 或 PCO 的潜在靶点。

[参考文献]

[1] 张红专,蔡 成,李 娟,等. 长链非编码 RNA MALAT1 与白细胞介素-6 在早产儿支气管肺发育不良中表达的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2021,36(7):533-536. doi:10.3760/cma.j.cn101070-20201204-01850.

[2] 洪 慧,唐思梦,赵 露,等. CTGF、TGF-β1、Vimentin 和 α-SMA 在 2 型糖尿病患者白内障术后囊袋收缩中的作用研究[J]. 临床和实验医学杂志,2019,18(23):2537-2540. doi:10.3969/j.issn.1671-4695.2019.23.022.

[3] 张利民,包秀丽. Sprouty 调控转化生长因子-β 信号通路介导的上皮间充质转化抑制后囊膜混浊的研究进展[J]. 眼科新进展,2019,39(7):690-694. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0159.

[4] Chen X, Yan H, Chen Y, et al. Moderate oxidative stress promotes epithelial-mesenchymal transition in the lens epithelial cells via the TGF-beta/Smad and Wnt/beta-catenin pathways[J]. Mol Cell Biochem, 2021,476(3): 1631-1642. doi:10.1007/s11010-020-04034-9.

[5] 段 聿,陈 吉,崔 宏,等. 长链非编码 RNA 尿路上皮癌胚抗原 1/微 RNA-143-3p/成纤维细胞生长因子 1 轴对胃癌细胞 BGC-823 增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 新乡医学院学报, 2021,38(7): 607-611. doi:10.7683/xxyxyxb.2021.07.002.

[6] Wang H, Zheng G. LncRNA NEAT1 promotes proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition process in TGF-beta2-stimulated lens epithelial cells through regulating the miR-486-5p/SMAD4 axis[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 529. doi: 10.1186/s12935-020-01619-8.

[7] Peng C, Wang Y, Ji L, et al. LncRNA-MALAT1/miRNA-204-5p/Smad4 axis regulates epithelial-mesenchymal transition, proliferation and migration of lens epithelial cells[J]. Curr Eye Res, 2021, 46(8): 1137-1147. doi:10.1080/02713683.2020.1857778.

[8] 王 莹,张国伟,曹 宇,等. 非编码 RNA 调控晶状体上皮细胞死亡在白内障中的作用[J]. 眼科新进展,2021,41(1):84-89. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0018.

[9] Xiong X, Yuan J, Zhang N, et al. Silencing of lncRNA PVT1 by miR-214 inhibits the oncogenic GDF15 signaling and suppresses hepatocarcinogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(2): 478-484. doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.137.

[10] Wang BJ, Ding HW, Ma GA. Long Noncoding RNA PVT1 promotes melanoma progression via endogenous sponging miR-26b[J]. Oncol Res, 2018, 26(5): 675-681. doi: 10.3727/096504017X14920318811730.

[11] Chen J, Zhong Y, Li L. miR-124 and miR-203 synergistically inactivate EMT pathway via coregulation of ZEB2 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 69-79. doi:10.1186/s12967-020-02242-x.

[12] Shi B, Wang Y, Yin F. MALAT1/miR-124/Capn4 axis regulates proliferation, invasion and EMT in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(10): 792-800. doi:10.1080/15384047.2017.1373214.

[13] Zhou H, Qiu ZZ, Yu ZH, et al. Paeonol reverses promoting effect of the HOTAIR/miR-124/Notch1 axis on renal interstitial fibrosis in a rat model[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 14351-14363. doi: 10.1002/jcp.28137.

[14] Liu S, Hu CH, Wang YX, et al. miR-124 inhibits proliferation and invasion of human retinoblastoma cells by targeting STAT3[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4): 2398-2404. doi:10.3892/or.2016.4999.

[15] 张海萍,袁 梅,彭 慧. miR-124-3p 靶向 WISP1 对 TNF-α 诱导的大鼠脑动脉血管平滑肌细胞增殖、迁移、侵袭的影响[J]. 中国免疫学杂志,2020,36(15):1793-1799. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.15.001.

[16] Tang SL, Huang QH, Wu LG, et al. MiR-124 regulates osteoblast differentiation through GSK-3beta in ankylosing spondylitis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20): 6616-6624. doi:10.26355/eurrev_201810_16136.

[17] Zhang Z, Gong Q, Li M, et al. MicroRNA-124 inhibits the proliferation of C6 glioma cells by targeting Smad4[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(4): 1226-1234. doi:10.3892/ijmm.2017.3088.

[18] Sonnen KF, Lauschke VM, Uraji J, et al. Modulation of phase shift between Wnt and Notch signaling oscillations controls mesoderm segmentation[J]. Cell, 2018, 172(5): 1079-1090. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.026.

[19] Perez-fidalgo JA, Ortega B, Simon S, et al. NOTCH signalling in ovarian cancer angiogenesis[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(24): 1705-1715. doi:10.21037/atm-20-4497.

[20] Chen X, Xiao W, Chen W, et al. MicroRNA-26a and -26b inhibit lens fibrosis and cataract by negatively regulating Jagged-1/Notch signaling pathway[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(8): 1431-1442. doi:10.1038/cdd.2016.152.

(编辑:刘 艺)