

沉默 SIAH1 基因对 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响

贾前伟¹, 雷小平¹, 税民鸿¹, 王伟²

引用: 贾前伟, 雷小平, 税民鸿, 等. 沉默 SIAH1 基因对 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2020; 20(1): 37-40

作者单位:¹(611700) 中国四川省成都市郫都区人民医院眼科;
²(510000) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心
作者简介: 贾前伟, 本科, 主治医师, 研究方向: 白内障。
通讯作者: 王伟, 毕业于中山大学, 硕士, 副主任医师, 研究方向:
白内障. 10494602@qq.com
收稿日期: 2019-04-18 修回日期: 2019-12-04

摘要

目的: 探讨沉默 SIAH1 基因对 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响。

方法: 将培养的人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 分为正常组、H₂O₂ 组 (用含 400 μmol/L H₂O₂ 的培养液培养)、H₂O₂ + siR-SIAH1 组 (转染 SIAH1 干扰序列后用含 400 μmol/L H₂O₂ 培养液培养) 和 siR-NC 组 (转染阴性对照序列后用含 400 μmol/L H₂O₂ 培养液培养), 采用实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 SIAH1 基因表达, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞中 p38 MAPK、p-p38 MAPK、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

结果: H₂O₂ 组、siR-NC 组和 H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞中 SIAH1 mRNA 相对表达量均高于正常组, 而 H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞中 SIAH1 mRNA 相对表达量低于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组 (均 $P < 0.05$)。H₂O₂ 组、siR-NC 组和 H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞凋亡率均高于正常组, 而 H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞凋亡率低于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组 (均 $P < 0.05$)。H₂O₂ 组、siR-NC 组和 H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量低于正常组, 而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量高于正常组, H₂O₂ + siR-SIAH1 组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量高于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组, 而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量低于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组 (均 $P < 0.05$)。

结论: 下调 SIAH1 基因表达可抑制 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡, 其机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路活化有关。

关键词: 晶状体; 上皮细胞; SIAH1; 过氧化氢; 细胞凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.1.08

Effect of silencing SIAH1 gene on H₂O₂ - induced apoptosis of human lens epithelial cells

Qian-Wei Jia¹, Xiao-Ping Lei¹, Min-Hong Shui¹, Wei Wang²

¹Department of Ophthalmology, Chengdu Yudu District People's

Hospital, Chengdu 611700, Sichan Province, China; ²Zhongshan Ophthalmology Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wei Wang. Zhongshan Ophthalmology Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China. 10494602@qq.com

Received: 2019-04-18 Accepted: 2019-12-04

Abstract

• AIM: To investigate the effect of silencing SIAH1 gene on H₂O₂-induced apoptosis of human lens epithelial cells.

• METHODS: The human lens epithelial cell line HLE-B3 was cultured and divided into normal group, H₂O₂ group (cultured with medium containing 400 μmol/L H₂O₂) and H₂O₂ + siR - SIAH1 group (transfected with SIAH1 interference sequence, followed by cultured with medium containing 400 μmol/L H₂O₂) and siR - NC group (transfected with negative control sequence, followed by cultured with medium containing 400 μmol/L H₂O₂). The expression of SIAH1 gene in cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expressions of p38 MAPK, p - p38 MAPK, Bcl - 2 and Bax proteins were detected by Western blot.

• RESULTS: The relative expression levels of SIAH1 mRNA in the H₂O₂ group, siR-NC group and H₂O₂ + siR-SIAH1 group were higher than that in the normal group ($P < 0.05$). The relative expression level of SIAH1 mRNA in H₂O₂ + siR-SIAH1 group was lower than those in the H₂O₂ group and siR-NC group ($P < 0.05$). The apoptosis rates in the H₂O₂ group, siR - NC group and H₂O₂ + siR - SIAH1 group were higher than that in the normal group ($P < 0.05$). The apoptosis rate in the H₂O₂ + siR - SIAH1 group was lower than those in the H₂O₂ group and siR-NC group ($P < 0.05$). The expression levels of p38 MAPK and Bcl-2 proteins in the H₂O₂ group, siR-NC group and H₂O₂ + siR-SIAH1 group were lower than those in the normal group, while the expression levels of p - p38 MAPK and Bax proteins were higher than those in the normal group ($P < 0.05$). The expression levels of p38 MAPK and Bcl - 2 proteins in the H₂O₂ + siR - SIAH1 group were higher than those in the H₂O₂ group and siR - NC group, while the expression levels of p - p38 MAPK and Bax proteins were lower than those in the H₂O₂ group and siR-NC group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Down - regulation the expression of SIAH1 gene could inhibit H₂O₂ - induced apoptosis of human lens epithelial cell line HLE - B3, which might be

related to inhibition of p38 MAPK signaling pathway activation.

• KEYWORDS: crystalline lens; epithelial cells; SIAH1; H₂O₂; apoptosis

Citation: Jia QW, Lei XP, Shui MH, et al. Effect of silencing SIAH1 gene on H₂O₂-induced apoptosis of human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(1):37-40

0 引言

白内障作为与年龄密切相关的疾病,随着我国老龄化进程的加快,其发病率不断升高,已成为致盲的主要因素之一^[1],给中老年人群健康带来严重威胁。目前,该病发生机制尚未完全清楚,有研究指出,晶状体上皮细胞凋亡是白内障发生的始动因素和病理基础^[2]。研究表明,H₂O₂诱导的氧化应激损伤可加速晶状体上皮细胞凋亡^[3]。SIAH1作为一种E3泛素连接酶,具有蛋白泛素化和水解酶功能,在调控细胞凋亡中发挥重要作用^[4],研究发现,过表达SIAH1可触发细胞凋亡^[5]。本研究利用H₂O₂构建人晶状体上皮细胞氧化应激损伤模型,采用小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术沉默细胞中SIAH1基因表达,观察其对细胞凋亡的影响,探讨可能的机制,以期对白内障机制研究及临床防治提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料 HLE-B3细胞系购自上海子实生物科技有限公司;DMEM培养液、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、胎牛血清购自美国Hyclone公司;H₂O₂购自美国Sigma公司;Lipfectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;siRNA-SIAH1和阴性对照序列(siRNA-NC)由上海吉玛制药技术有限公司设计合成;总RNA提取试剂购自北京百奥莱博科技有限公司;反转录和PCR试剂购自日本TaKaRa公司;SIAH1和内参引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成;噻唑蓝(MTT)购自北京诺博莱德科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海基尔顿生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒购自南京恩晶生物科技有限公司;兔抗人p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和p-p38 MAPK多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,兔抗人B细胞淋巴瘤因子-2(Bcl-2)单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。StepOnePlus实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;FACSCalibur型流式细胞仪购自美国BD公司;凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 取HLE-B3细胞,用高糖DMEM培养液重悬,接种于6孔板,2×10⁵个/孔,随机分为4组:(1)正常组:置于培养皿中,用含5% CO₂、37℃培养箱培养48h;(2)H₂O₂组:置于培养皿中,用含400μmol/L H₂O₂的培养液在含5% CO₂、37℃培养箱培养48h;(3)H₂O₂+siR-SIAH1组:待正常组细胞融合度在80%以上时,胰蛋白酶消化,传代培养。取对数生长期细胞,按照Lipfectamine 2000转染试剂说明转染SIAH1干扰序列:siRNA1:5'-UUGAGGACGGAGGAATACATUAAA-3',siRNA2:5'-UAAAUGUCCUUCGUGGUCCAA-3',培养24h,

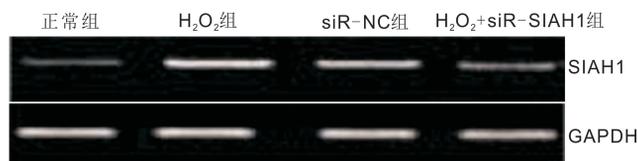


图1 实时荧光定量PCR技术检测细胞中SIAH1基因表达。

随后,用含400μmol/L H₂O₂的培养液在含5% CO₂、37℃培养箱培养48h;(4)siR-NC组:按照H₂O₂+siR-SIAH1组的方法转染阴性对照序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACCGU-3',培养24h,随后,用含400μmol/L H₂O₂的培养液在含5% CO₂、37℃培养箱培养48h。

1.2.2 实时荧光定量PCR技术检测细胞中SIAH1基因表达 取各组细胞,胰酶消化,细胞裂解液裂解,用总RNA提取试剂提取细胞中总RNA并检测纯度,反转录成cDNA,用实时荧光定量PCR仪按扩增试剂盒说明对引物扩增。引物序列:SIAH1:上游:5'-AGCCGTCAGACTGCTACAG-3',下游:5'-AAAAGACTCGCCAAGTCATTGT-3';GAPDH:上游:5'-TGTCACCAGGGCTGCTT-3',下游:5'-AGTTCCCGTTCTCAGCCTT-3'。条件:95℃ 3min,95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 60s,连续循环36次,每个样品设复孔6个,2^{-ΔΔCt}法计算各组细胞中SIAH1 mRNA相对表达量。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 取各组细胞,胰酶消化,1000r/min离心10min,取细胞沉淀,预冷PBS冲洗3次,再次离心,弃去上清液,加入结合缓冲液200μL,并调整细胞密度为2×10⁵个/mL,加入Annexin V-FITC和PI液各5μL,避光反应20min,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.4 Western blot法检测细胞中凋亡相关蛋白的表达 取各组细胞,胰酶消化,加入细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,4℃下10000r/min离心15min,提取总蛋白并检测浓度。取50μg总蛋白,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转膜,室温下用脱脂奶粉封闭60min,加入一抗兔抗人p38 MAPK、p-p38 MAPK、Bcl-2、Bax抗体,4℃过夜孵育,加入二抗,室温反应60min,TBST冲洗3次,暗室下加入ECL反应15min,拍照。用Image J分析软件对灰度值进行分析,以GAPDH为内参获得目的蛋白相对表达量。

统计学分析:利用SPSS 21.0统计软件分析数据。计量资料经正态性检验符合正态分布,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和LSD-t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中SIAH1基因表达 正常组、H₂O₂组、siR-NC组和H₂O₂+siR-SIAH1组细胞中SIAH1 mRNA相对表达量分别为1.02±0.03、2.76±0.07、2.73±0.04和1.58±0.05,差异有统计学意义($F = 1737.066, P < 0.01$);H₂O₂组、siR-NC组和H₂O₂+siR-SIAH1组细胞中SIAH1 mRNA相对表达量均高于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),H₂O₂组和siR-NC组细胞中SIAH1 mRNA相对表达量无差异($P = 0.295$),H₂O₂+siR-SIAH1组细胞中SIAH1 mRNA相对表达量低于H₂O₂组和siR-NC组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图1。

2.2 各组细胞凋亡率 正常组、H₂O₂组、siR-NC组和H₂O₂+siR-SIAH1组细胞凋亡率分别为(5.76±0.81)%、

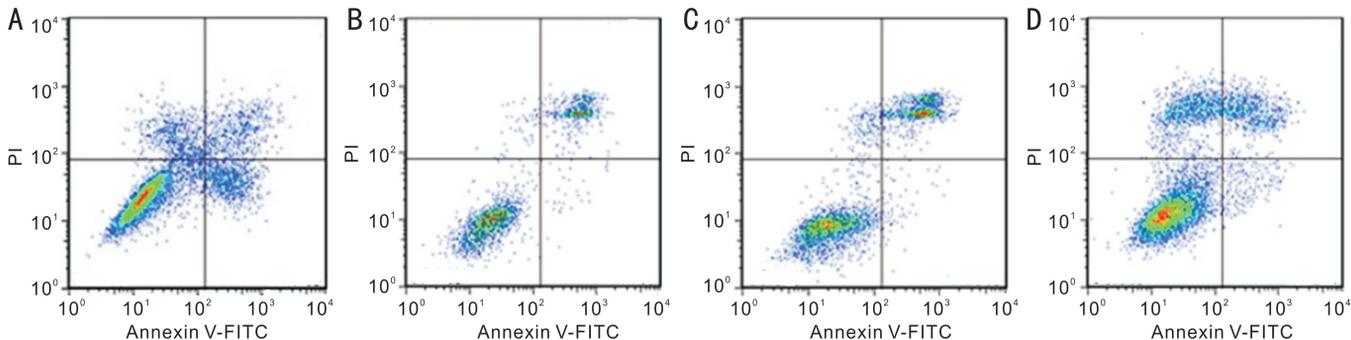


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 A:正常组;B:H₂O₂组;C:siR-NC组;D:H₂O₂+siR-SIAH1组。

表1 各组细胞中 p38 MAPK、p-p38 MAPK、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

组别	p38 MAPK	p-p38 MAPK	Bcl-2	Bax
正常组	0.72±0.07	0.18±0.06	0.79±0.07	0.28±0.08
H ₂ O ₂ 组	0.24±0.05 ^a	0.71±0.04 ^a	0.32±0.06 ^a	0.69±0.04 ^a
siR-NC组	0.22±0.02 ^a	0.73±0.05 ^a	0.31±0.04 ^a	0.72±0.03 ^a
H ₂ O ₂ +siR-SIAH1组	0.53±0.04 ^{a,c,e}	0.42±0.04 ^{a,c,e}	0.62±0.05 ^{a,c,e}	0.55±0.05 ^{a,c,e}
<i>F</i>	148.070	187.77	108.072	80.279
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 正常组;^c*P*<0.05 vs H₂O₂组;^e*P*<0.05 vs siR-NC组。

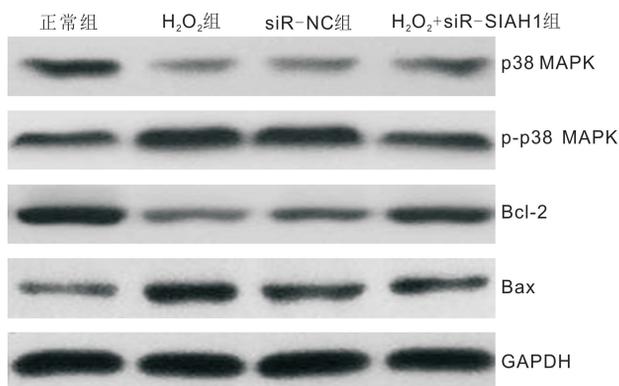


图3 Western blot 法检测细胞中 p38 MAPK、p-p38 MAPK、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

(14.85±2.40)%、(15.87±2.69)%和(9.24±2.47)%,差异有统计学意义(*F* = 27.695, *P* < 0.01), H₂O₂组、siR-NC组和 H₂O₂+siR-SIAH1组细胞凋亡率均高于正常组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05), H₂O₂组和 siR-NC组细胞凋亡率无差异(*P* = 0.433), H₂O₂+siR-SIAH1组细胞凋亡率低于 H₂O₂组和 siR-NC组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见图2。

2.3 各组细胞中凋亡相关蛋白的表达 H₂O₂组、siR-NC组和 H₂O₂+siR-SIAH1组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量低于正常组,而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量高于正常组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05), H₂O₂+siR-SIAH1组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量高于 H₂O₂组和 siR-NC组,而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量低于 H₂O₂组和 siR-NC组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表1,图3。

3 讨论

白内障作为中老年人群眼部高发疾病,发病与年龄密切相关^[6],主要表现为进行性晶状体混浊,阻碍了光线正常射入,是导致视力低下和失明的主要原因^[7],给中

老年人群生存质量带来严重威胁。因此,研究探讨该病发生及进展机制,对该病综合防治及提高中老年人群生存质量意义重大。研究发现,晶状体上皮细胞在维持晶状体稳定、纤维透明性及正常功能中发挥重要作用^[8]。而内外因素导致的氧化应激刺激可改变晶状体上皮细胞结构,促进其凋亡,使细胞骨架降解、加速蛋白在晶状体聚集,从而引发白内障^[9-10]。SIAH1 作为 SIAH 家族成员,可表达于多种正常组织中,而在多种肿瘤组织中表达缺失^[11],可能是一种肿瘤抑制因子,近年研究发现, SIAH1 基因过表达可促进细胞凋亡^[12]。SIAH1 可能通过调控细胞有丝分裂^[13]或 JNK 信号通路^[14]而在细胞凋亡中发挥重要作用。

本研究参照文献^[15]的方法利用 H₂O₂ 诱导 HLE-B3 细胞凋亡模型,结果显示, H₂O₂ 组细胞凋亡率明显高于正常组,提示模型构建成功。进一步研究显示, H₂O₂ 组细胞中 SIAH1 mRNA 相对表达量明显高于正常组,说明 SIAH1 可能参与了 H₂O₂ 诱导的 HLE-B3 细胞凋亡过程。我们利用转染 SIAH1 siRNA 的方法下调 HLE-B3 细胞中 SIAH1 基因表达,结果显示, H₂O₂+siR-SIAH1 组细胞中 SIAH1 mRNA 相对表达量显著低于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组,说明 HLE-B3 细胞中 SIAH1 基因表达被成功抑制。p38 MAPK 作为重要的 MAPK 信号通路,其激活与促进细胞凋亡密切相关^[16],在内外环境刺激下,活化的 p38 MAPK 可诱导 Bax 发生转位,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 表达失调是触发线粒体依赖的经典细胞凋亡途径的关键^[17]。本研究结果显示, siR-NC 组和 H₂O₂+siR-SIAH1 组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量低于正常组,而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量高于正常组, H₂O₂+siR-SIAH1 组细胞中 p38 MAPK 和 Bcl-2 蛋白表达量高于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组,而 p-p38 MAPK 和 Bax 蛋白表达量低于 H₂O₂ 组和 siR-NC 组,说明 p38 MAPK 活化介导的凋亡通路可能参与了 HLE-B3 细胞凋亡,而下调 SIAH1 基因表达则可抑制 p38 MAPK 活化,提示 SIAH1 基因可能通

过活化 p38 MAPK 信号通路而参与了 HLE-B3 细胞凋亡过程。

综上所述,下调 SIAH1 基因表达可抑制 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡,其机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路活化有关,有望为白内障综合防治提供新的潜在靶点。

参考文献

- 1 Song P, Wang H, Theodoratou E, *et al.* The national and subnational prevalence of cataract and cataract blindness in China: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 2018; 8(1): 010804
- 2 汪静. miR-126 对人晶状体上皮细胞凋亡的影响. *中国老年学杂志* 2018; 38(8): 1970-1972
- 3 杨洪涛, 赵静, 王媛媛, 等. 丹酚酸 A(Sal A)对 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤人晶状体上皮细胞增殖、凋亡、超微结构及炎症反应的作用. *眼科新进展* 2018; 38(8): 724-727, 731
- 4 Knauer SK, Mahendrarajah N, Roos WP, *et al.* The inducible E3 ubiquitin ligases SIAH1 and SIAH2 perform critical roles in breast and prostate cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(4): 405-413
- 5 Yuan F, Chen X, Liu J, *et al.* Up-regulation of Siah1 by ethanol triggers apoptosis in neural crest cells through p38 MAPK-mediated activation of p53 signaling pathway. *Arch Toxicol* 2017; 91(2): 775-784
- 6 Tang Y, Wang X, Wang J, *et al.* Prevalence and Causes of Visual Impairment in a Chinese Adult Population: The Taizhou Eye Study. *Ophthalmology* 2015; 122(7): 1480-1488
- 7 Gali HE, Sella R, Afshari NA. Cataract grading systems: a review of past and present. *Curr Opin Ophthalmol* 2019; 30(1): 13-18

- 8 Liu J, Xu D, Li J, *et al.* The role of focal adhesion kinase in transforming growth factor- β 2 induced migration of human lens epithelial cells. *Int J Mol Med* 2018; 42(6): 3591-3601
- 9 Meng F, Li J, Yang X, *et al.* Role of Smad3 signaling in the epithelial-mesenchymal transition of the lens epithelium following injury. *Int J Mol Med* 2018; 42(2): 851-860
- 10 田芳, 赵今雅, 滕贺, 等. Krüppel 样因子 6 经活化转录因子 4 通路对晶状体上皮细胞凋亡的调控作用. *中华实验眼科杂志* 2018; 36(3): 181-186
- 11 Jiang X, Shen X. Knockdown of miR-299-5p inhibits the progression of hepatocellular carcinoma by targeting SIAH1. *Bull Cancer* 2018; 105(10): 873-883
- 12 杨志强, 温媛媛, 李春生. SIAH1 在乳腺癌中上调 Bim 的表达诱导乳腺癌细胞凋亡研究. *现代实用医学* 2016; 28(6): 713-715
- 13 Srivastava D, Chakrabarti O. Ubiquitin in regulation of spindle apparatus and its positioning: implications in development and disease. *Biochem Cell Biol* 2015; 93(4): 273-281
- 14 Wang D, Lu Q, Shao B, *et al.* An upregulation of SIAH1 after spinal cord injury in adult rats. *J Mol Neurosci* 2011; 45(2): 134-144
- 15 孔德倩, 郑广瑛, 刘玥. 左旋肉碱通过内质网应激对人晶状体上皮细胞凋亡的影响. *中华眼科杂志* 2018; 54(5): 363-368
- 16 孙琳, 李侠. 环境因素经 MAPK 信号通路介导细胞凋亡的研究进展. *中华劳动卫生职业病杂志* 2018; 36(10): 796-800
- 17 Niu H, Li X, Yang A, *et al.* Cycloartenol exerts anti-proliferative effects on Glioma U87 cells via induction of cell cycle arrest and p38 MAPK-mediated apoptosis. *J BUON* 2018; 23(6): 1840-1845