

miR-34a 调控内皮祖细胞介导的血管新生

黎 健

(卫生部北京老年医学研究所, 北京市 100730)

[关键词] 内皮祖细胞; miR-34a; 血管新生; SIRT1; 衰老; GTPCH I

背景和目的 血管新生在整个生命过程中都发挥着关键的作用,但是随着年龄的增长,老年个体的血管新生功能呈现进程性减弱,修复缺血和受损组织的能力显著降低。内皮祖细胞(EPC)已被证实成体的血管新生中起重要作用,来源于老年个体的 EPC 其增殖、存活及迁移功能明显减弱。最近的研究表明 miRNA 参与了血管新生的调控。miR-34a 是肿瘤抑制因子,通过作用于靶蛋白沉默信息调控子 1(SIRT1)导致细胞周期阻滞或者细胞凋亡。但是,目前尚不清楚 miR-34a 是否在 EPC 介导的血管新生中起作用。此外,最近已报道 miR-34a 在老年小鼠的心脏和脾脏中水平升高,提示衰老可上调 miR-34a 水平。EPC 还受到 eNOS 的调控,在衰老的情况下 eNOS 的功能也被削弱。研究已证明,eNOS 的必需辅因子 BH4 水平的下降可引起 eNOS 解偶联,导致 EPC 的数量及迁移能力降低。GTP 水解酶 I(GTPCH I)是生理情况下合成 BH4 的限速酶。GTPCH I 活性的降低可减少 BH4 的产生,引起 eNOS 解偶联,从而导致活性氧(ROS)水平升高。但是 EPC 中的 GTPCH I 是否可以通过影响 ROS 的产生进而调控 miR-34a 的表达尚不清楚。本研究旨在探讨正常与衰老情况下 miR-34a 调控 EPC 介导的血管新生及 miR-34a 的上游调控因素。**方法** 我们分别从成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(201~225 g)、年轻(8 周龄)的 C57BL/6 小鼠(野生型)、GTPCH I 转基因小鼠(Tg-GCH,内皮特异性过表达 GTPCH I)、Hph-I 小鼠(GTPCH I 表达水平组成型降低)、老年(18~20 月龄)的 C57BL/6 小鼠及 eNOS/GCH 双转基因小鼠(全部为雄性)的骨髓中分离 EPC。用流式细胞术联合干细胞和内皮细胞表面标志对培养 7 天后的细胞进行表型鉴定。应用 Real-time PCR 和 Western blot 分别检测 miR-34a 和 SIRT1 的表达水平。miR-34a mimic 或 inhibitor 被转染进入 EPC 以过表达 miR-34a 或抑制 miR-34a 的表达。SIRT1 siRNA 也被用来降低 EPC 中 SIRT1 的水平。我们还应用 Matrigel 小管形成试验检测 EPC 的体外血管新生能力,用 Matrigel plug 试验分析 EPC 的体内血管新生能力,用衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色确定 EPC 的衰老状况,用流式细胞术测定 ROS 水平。小鼠后肢缺血模型结合随后的激光多普勒成像用来评估小鼠急性缺血后血流的恢复能力。**结果** miR-34a 调节大鼠 EPC 介导的血管新生。流式细胞术的结果显示,培养 7 天后的 EPC 表达干细胞标志 CD34、CD133 和内皮细胞标志 VEGFR-2、VE-Cadherin。Real-time PCR 证实 EPC 表达 miR-34a。转染 miR-34a mimic 后,EPC 中 miR-34a 水平增加约 23 倍,伴随着 EPC 的血管新生功能显著降低。过表达 miR-34a 还增加了约 40% 的衰老细胞,同时 SIRT1 的表达水平降低了约 40%。在 EPC 中用 SIRT1 siRNA 抑制 SIRT1 的表达后,EPC 的血管新生能力明显降低,而衰老细胞数增加。进一步的研究发现,过表达 miR-34a 或者敲低 SIRT1 都能增加 SIRT1 效应蛋白 FoxO1 的乙酰化水平,提示 SIRT1-FoxO1 信号通路可能介导了 miR-34a 对 EPC 血管新生的抑制作用。老龄小鼠 EPC 血管新生功能下降与 miR-34a 相关。老年小鼠在股动、静脉结扎后血流的恢复较年轻小鼠明显减慢。与减缓的血流恢复相一致,老年小鼠 EPC 的体外血管新生能力下降约 56%。值得注意的是老年小鼠 EPC 中 miR-34a 水平增加约 1 倍,而 SIRT1 蛋白水平下降约 46%。在老年小鼠 EPC 中转染 miR-34a inhibitor 抑制 miR-34a 的表达后,血管新生能力显著升高。相反在年轻小鼠 EPC 中转染 miR-34a mimic 过表达 miR-34a 后,其血管新生活性减弱。Matrigel plug 试验结果显示,混有过表达 miR-34a 的 EPC 的 plug 中形成了无序的细胞簇,但是混有对照 EPC 的 plug 中则形成了血管样结构,并且在管腔中可见红细胞,表明过表达 miR-34a 会抑制 EPC 的体内血管新生功能。进一步研究发现,抑制 miR-34a 可增加老年小鼠 EPC 中 SIRT1 的表达,而过表达 miR-34a 则降低年轻小鼠 EPC 中 SIRT1 的含量。GTPCH I 调控 miR-34a 和 SIRT1 的表达。老年小鼠 EPC 中 ROS 水平显著升高,而 GTPCH I 蛋白水平显著降低。与老年野生型小鼠的 EPC 相比,老年 eNOS/GCH 双转基因小鼠 EPC 中 miR-34a 水平降低,伴随着 SIRT1 水平的升高,但与年轻野生型小鼠 EPC 比较,老年 eNOS/GCH 双转基因小鼠 EPC 中 miR-34a 和 SIRT1 水平无显著差异,提示 GTPCH I 和/或 eNOS 可能参与了调控 miR-34a 及其靶蛋白 SIRT1 的表达。最后,我们在 Tg-GCH 小鼠和 GTPCH I 缺乏的 Hph-I 小鼠的 EPC 中检测了 miR-34a 和 SIRT1 的表达水平。结果显示,与野生型小鼠 EPC 相比,Tg-GCH 小鼠 EPC 中 miR-34a 水平下降,伴随 SIRT1 水平的升高,而在 Hph-I 小鼠 EPC 中 miR-34a 水平升高,伴随 SIRT1 水平的降低。**结论** miR-34a 抑制 EPC 介导的血管新生;衰老与 SIRT1-FoxO1 信号通路介导了 miR-34a 对 EPC 血管新生功能的抑

制作用;老龄小鼠 EPC 血管新生功能减弱与 miR-34a 水平升高及其靶蛋白 SIRT1 的表达下降相关;GTPCH I 参与了 miR-34a 及其靶蛋白 SIRT1 表达的调控。本研究从 miRNA 调控 EPC 介导的血管新生角度阐明了 miR-34a 在老年动物血管新生能力减弱中的作用机制,为改善老龄个体血管新生能力提供了新的思路。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2006CB503910);国家高科技研究发展计划(863 计划)课题(2006AA02A408);American Diabetes Association Research Award(7-08-RA-23)

(此文编辑 文玉珊)