

微小 RNA-126 抑制间质转化中内皮祖细胞的增殖与迁移

张宗荣¹, 周瑶瑶¹, 韦小未¹, 张俊峰¹, 王长谦²
(1. 上海交通大学医学院附属第三人民医院心内科, 上海市 201999;
2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院心内科, 上海市 200011)

[关键词] 内皮祖细胞; 内皮-间质转化; 微小 RNA-126; 增殖; 迁移
[摘要] 目的 探讨微小 RNA-126(miR-126)对间质转化中的血管内皮祖细胞(EPC)增殖与迁移的影响。方法 分离大鼠骨髓源内皮祖细胞,转化生长因子β1(TGF-β1)诱导 EPC 的间质转化,慢病毒转染建立 miR-126 过表达 EPC,通过 MMT 法检测 EPC 的增殖,细胞划痕实验与 Transwell 法检测细胞迁移能力。结果 TGF-β1 成功诱导 EPC 间质转化,miR-126 抑制间质转化中 EPC 损伤细胞间距的缩短,抑制 Transwell 小室膜下单位面积的细胞数量。结论 miR-126 过表达抑制间质转化中 EPC 的增殖与迁移。
[中图分类号] R34 [文献标识码] A

MicroRNA-126 Inhibits the Proliferation and Migration of Endothelial Progenitor Cell in the Process of Endothelial-to-Mesenchymal Transition

ZHANG Zong-Qi¹, ZHOU Yao-Yao¹, WEI Xiao-Wei¹, ZHANG Jun-Feng¹, and WANG Chang-Qian²
(1. Department of Cardiology, the Affiliated Third People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201999, China; 2. Department of Cardiology, the Affiliated Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Endothelial-to-mesenchymal Transition; MicroRNA-126; Proliferation; Migration
[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of microRNA-126 (miR-126) on the proliferation and migration of endothelial progenitor cell (EPC) in the process of endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). Methods Rat bone marrow-derived EPC was isolated, and then induced to mesenchymal cells by transforming growth factor-β1 (TGF-β1). Overexpression of miR-126 was constructed in EPC by using lentiviral transfection. The proliferation of EPC was measured by using MTT assay, and migration was detected by using cell injury assay and Transwell assay. Results The transition of EPC from endothelial cells to mesenchymal cells was fully developed after 7 days treatment with TGF-β1 (5 μg/L) miR-126. MiR-126 inhibited the decrease of distance between injured EPC in the process of EndMT, and attenuated the cells per unit area on the bottom of membrane of Transwell. Conclusion MiR-126 inhibits the proliferation and migration of endothelial progenitor cells in the process of endothelial-to-mesenchymal transition.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell,EPC)是在特定条件下可以分化成血管内皮细胞的前体细胞,亦称为成血管细胞^[1];它是机体内皮损伤修复的重要执行者,对心血管疾病颇具治疗前景^[2]。当血管内皮受损时,EPC 由骨髓动员至外周血,并与血小板相互作用,归巢到内皮损伤部位,分化为新生单层内皮细胞,覆盖损伤部位,合成、分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)

[收稿日期] 2014-08-03 [修回日期] 2014-09-18
[基金项目] 上海市自然科学基金面上项目(12ZR1417400);上海市教育委员会科研创新项目(12YZ045);教育部博士点基金(新教师类)(20110073120096)
[作者简介] 张宗荣,博士,主治医师,研究方向为动脉粥样硬化防治,E-mail 为 zqzhang_scde@126.com。通讯作者张俊峰,硕士,主任医师,研究方向为动脉粥样硬化及冠心病综合防治,E-mail 为 jfzhang_dr@163.com。周瑶瑶,在读硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化及冠心病综合防治,E-mail 为 joyoyo88@163.com。

等因子,改善血管的舒张功能,从而修复损伤的内皮功能^[3]。然而,多项研究发现 EPC 能发生内皮-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT):在转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 的诱导下,EPC 失去 KDR⁺、CD34⁺、VEGF 等血管内皮分子标记,转而表达 α -平滑肌肌动蛋白、平滑肌 22 α 、心肌素等间质细胞标记物,及 EndMT 相关的转录因子如 Slug、Snail、Zeb1、内皮素 1,而具有向间质样细胞转化的潜能^[4-6]。EPC 内皮-间质转化的潜在促动脉粥样硬化作用是其应用于心血管疾病临床治疗的重要限制^[7]。发生间质转化的 EPC 在细胞生长及迁移等生物学活性方面直接影响 EPC 对血管内皮的修复作用。

微小 RNA-126 (microRNA-126, miR-126) 是在内皮细胞特异性表达的一种促血管新生的微小 RNA^[8]。miR-126 能促进 EPC 的迁移、增殖,但不影响 EPC 的内皮分化^[9]。我们前期研究发现,miR-126 能抑制 EPC 向间质转化^[10],但 miR-126 对发生间质转化 EPC 的迁移能力的影响国内外目前仍未见相关报道。本研究拟观察 miR-126 对间质转化的 EPC 迁移与增殖的影响,为 EPC 对动脉粥样硬化的治疗作用进一步提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 EPC 的分离、培养与鉴定

Sprague-Dawley 雄性大鼠 (350 g 左右,2 月龄),在无菌条件下分离股骨和胫骨,迅速放入 D-Hanks 液中。用 D-Hanks 液反复冲洗骨髓腔将骨髓尽量全部冲出。收集含有骨髓的 D-Hanks 液,以 1:1 的体积比将含有骨髓的 D-Hanks 液缓慢叠加于人淋巴细胞分离液的液面上,在室温下采用密度梯度离心法 1500 r/min 离心 25 min,离心后收集单个核细胞层,用细胞培养液 EBM-2 重悬细胞,接种于包被有鼠尾胶的 25 cm² 细胞培养瓶中。细胞培养 4 天左右,用胰酶消化成单细胞悬液,按每 10⁶ 个细胞加 10 μ L 体积 CD133 抗体的比例加入 CD133 抗体,去除未结合的抗体,上机分选。收集分选所得的 CD133 阳性细胞,用含 20% 胎牛血清的 EBM-2 培养液在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。第 4 天以 PBS 洗掉非贴壁细胞,全量换液后继续培养,第 6 天时用 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞并计数。流式细胞仪检测 CD133、CD34、KDR 表达进行细胞鉴定。

1.2 EPC 的 EndMT 诱导

根据我们前期报道的方法^[10],以 TGF- $\beta 1$ (5 μ g/

L) 加入 EBM-2 培养基,诱导 7 天后,能成功诱导 EPC 的 EndMT。

1.3 miR-126 过表达 EPC 建立

参照我们前期报道的方法^[10],miR-126 的 PCR 表达产物克隆至 PLKO.1-puro 慢病毒表达载体,利用 psPAX2-pMD2G 进行慢病毒包装,病毒感染 293T 约 4~6 h,弃去含有转染混和物的培养液,加入 PBS 15 mL,轻摇后弃去,待细胞培养基变黄时,收集转染的 293T 细胞上清液,并进行病毒浓缩。接种 EPC 于 6 cm² 培养皿中,当细胞融合度达到 30%~45% 左右时,加入 3 mL 的病毒上清[感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 10],同时加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的细胞培养液,感染 72 h 后,荧光显微镜检测感染效率。感染 EPC 在含有嘌呤霉素 (2 mg/L) 的细胞培养液中培养 7 天,然后用于后续实验,并检测 miR-126 表达情况。选用小核 RNA U6 作为 miR-126 检测内参。

1.4 细胞增殖实验

采用噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 方法。生长状态良好的细胞用 0.25% 胰酶消化,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 2×10^7 /L,取 200 μ L 细胞悬液接种 96 孔板 (即初始细胞数为 4×10^3 个/孔),每株细胞设 3 个重复孔。共接种 8 块 96 孔板。放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。从第 2 天开始,每天在固定时间取 1 块 96 孔板进行 MTT 试验,酶标仪 570 nm 处读取吸光度 (absorbance, A) 值,连续检测 5 天。

1.5 细胞迁移实验

(1) 细胞划痕实验:6 孔细胞培养板上,用 10 μ L Tip 头进行划痕,并在显微镜下进行位置标记,各组培养 24 h 后,测定损伤区间距离。(2) Transwell 法:在 Millicell-PCF 培养小室中进行,孔径 8 μ m。在 24 孔板孔内先加入含血清培养液,然后将 Millicell 放入上述孔内,分别加入含 EPC 细胞、TGF 诱导的 EPC 细胞和 TGF 诱导的 miR-126 过表达 EPC 细胞 (0.5×10^8 /L) 悬液。其中,将 24 孔板置于 37℃、5% CO₂ 孵育 24 h。之后用棉签小心刮除未迁移过膜的细胞,2% 多聚甲醛固定 20 min,Diff-Quik 染色,光学显微镜下 (200 \times) 观察,计算迁移的细胞数。每组设 3 个复孔,每孔取 5 个视野计数,计算均数。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。每组实验均至少重复 3 次。均数比较采用方差分析,并采用 LSD-t 检验进行多组间比较。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-126 在 EPC 过表达的建立

分离的 EPC 慢病毒转染 72 h 后,流式细胞仪检测绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光,miR-12 转染效率可达到 87.56% (图 1B)。再连

续培养至第 7 天,光镜下观察 EPC 的细胞形态,无明显变化(图 1A);实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR,real-time PCR)检测 miR-126 表达,与 GFP 空转组比较,miR-126 转染组细胞内 miR-126 表达约为 GFP 空转组的 3.6 倍(图 1B)。

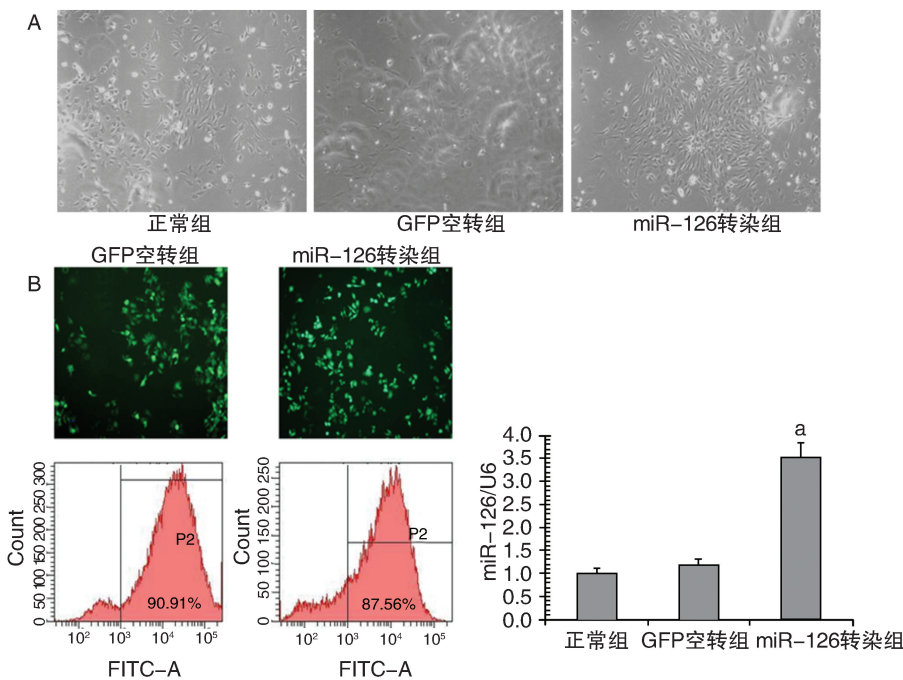


图 1. miR-126 在 EPC 过表达的建立 A 为光镜下观察 EPC 的细胞形态(200 ×);B 为 miR-126 转染效率及 miR-126 的相对表达量检测。正常组:未接受任何处理的 EPC;GFP 空转组:转染空载体表达 GFP 的 EPC;miR-126 转染组:转染慢病毒表达 miR-126 的 EPC。a 为 $P < 0.01$,与 GFP 空转组比较。

Figure 1. Overexpression of miR-126 was constructed in EPC

2.2 miR-126 对间质转化的 EPC 细胞增殖的影响

miR-126 慢病毒转染后连续培养,在第 2、3、4、5、6、7 天,MMT 法检测正常组、GFP 空转组及 miR-126 转染组的 EPC 细胞增殖,结果发现 miR-126 过表达在各培养时间点(2、3、4、5、6、7 天)对 EPC 的增殖无明显影响(图 2A)。

我们前期研究结果已显示,TGF- β 1 作用 7 天后,能成功诱导 EPC 的间质转化^[10]。与正常组 EPC 相比较,TGF- β 1 诱导 4 天时,EPC 增殖明显增高,第 7 天发生间质转化时,增殖最为明显($P < 0.05$);与 TGF- β 1 组相比较,在第 4 到第 7 天,TGF- β 1 + miR-126 组 EPC 的增殖明显降低($P < 0.05$)(图 2B)。

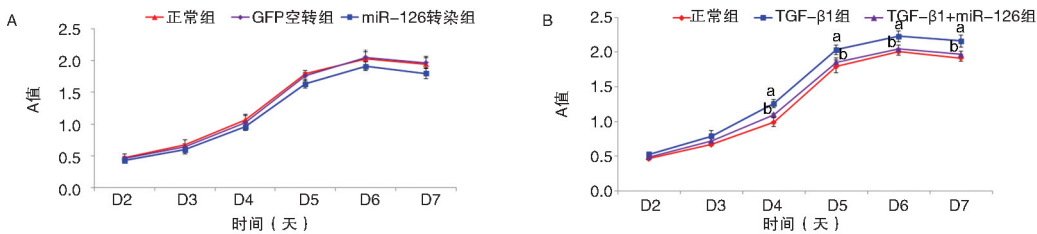


图 2. miR-126 对间质转化的 EPC 细胞增殖的影响 A 为 miR-126 慢病毒转染对正常 EPC 增殖的影响;B 为 miR-126 对间质转化中的 EPC 增殖的影响。正常组:未接受任何处理的 EPC;GFP 空转组:转染空载体表达 GFP 的 EPC;miR-126 转染组:转染慢病毒表达 miR-126 的 EPC;TGF- β 1 组:TGF- β 1 (5 μ g/L) 诱导正常培养的 EPC;TGF- β 1 + miR-126 组:TGF- β 1 (5 μ g/L) 诱导过表达 miR-126 的 EPC。a 为 $P < 0.05$,与正常组比较;b 为 $P < 0.05$,与 TGF- β 1 组比较。

Figure 2. The effect of miR-126 on the proliferation of EPC in the process of endothelial-to-mesenchymal transition

2.3 miR-126 对间质转化的 EPC 细胞迁移的影响

细胞损伤实验显示,TGF- β 1 诱导 EPC 间质转化后,损伤细胞间的距离明显较正常组($P < 0.01$)或 TGF- β 1 + miR-126 组缩短($P < 0.05$;图 3A)。细

胞 Transwell 迁移实验显示,TGF- β 1 诱导 EPC 间质转化后,膜底面单位面积细胞数量明显较正常组或 TGF- β 1 + miR-126 组增多($P < 0.01$;图 3B)。

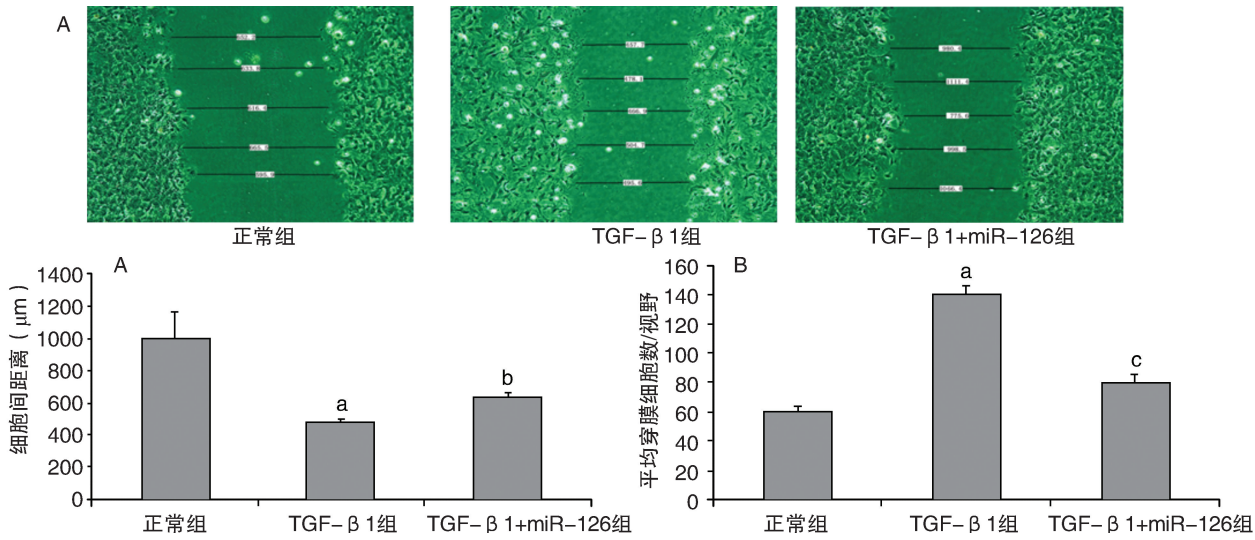


图 3. miR-126 对间质转化的 EPC 细胞迁移能力的影响 A 为细胞划痕实验检测 miR-126 过表达对间质转化中的 EPC 细胞迁移的影响;B 为 Transwell 实验检测 miR-126 过表达对间质转化中的 EPC 细胞迁移的影响。光镜下(200 ×)观察测量细胞间距和膜面迁移细胞数目。正常组:未接受任何处理的 EPC;TGF- β 1 组:TGF- β 1 (5 μ g/L) 诱导正常培养的 EPC;TGF- β 1 + miR-126 组:TGF- β 1 (5 μ g/L) 诱导过表达 miR-126 的 EPC。a 为 $P < 0.01$,与正常组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 TGF- β 1 组比较。

Figure 3. The effect of miR-126 on the migration of EPC in the process of endothelial-to-mesenchymal transition

3 讨论

内皮损伤是动脉粥样硬化发生的始动环节,EPC 是内皮修复的主要执行者。早期研究发现 EPC 在静脉或者动脉局部移植能促进损伤部位的再内皮化,改善血管的舒缩功能^[11],展示了其在动脉粥样硬化性疾病中应用的诱人前景。

然而,越来越多的研究表明 EPC 对损伤血管内皮的修复仍存在一定争议。动物体内研究发现:内皮损伤局部植入的 EPC,28 天即发生 EndMT 现象,反而加剧缺血下肢动脉的狭窄^[5];尤其最新一系列大型队列研究结果显示:CD34 包被的 EPC 捕捉支架对冠心病患者的冠状动脉血运重建方面无明显优势,尤其对于分叉病变或糖尿病患者,EPC 捕捉支架内再狭窄率明显高于对照组^[12-14]。尽管 EPC 捕捉支架能使移植血管有较完整的内皮覆盖,但新生内膜增生反而更加显著,其潜在机制可能是被募集的 EPC 发生内皮-间质转化,内皮细胞失去抗血栓生成作用,导致平滑肌细胞增殖^[15]。这些研究证明 EPC 有促动脉粥样硬化发生的潜力。

多种因子均能促进 EPC 的间质转化,如血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、

TGF- β 1、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 等,而这些因子在血管内皮损伤时均能在损伤处分泌^[5]。因此,EPC 归巢于内皮损伤处后,有一部分可转化为间质细胞,促进动脉粥样硬化的发生。在本研究中,我们体外成功用 TGF- β 1 诱导 EPC 发生间质转化,与国外研究一致。已经明确 EPC 的间质转化主要由 Smad 信号途径介导,因此此研究仅选择 TGF- β 1 作为诱导剂。

我们前期研究已经证明,在 EPC 发生间质转化过程中,miR-126 在 EPC 的表达逐渐降低,且呈时间依赖性,在间质转化完全形成时表达最少;且 miR-126 的过表达能抑制 EPC 的间质化进程^[10]。尽管 EPC 能发生间质转化,但动脉粥样硬化的发生发展与间质细胞的数量增殖及其凋亡的比例失衡相关^[16],本研究中我们发现 miR-126 的过表达能抑制间质转化中的 EPC 的增殖与迁移,这提示 miR-126 在 EPC 的过表达能减少 EPC 的促粥样硬化生物活性,这对于 EPC 在动脉粥样硬化的应用具有重要作用。值得注意的是,EPC 能通过旁分泌途径上调 T 细胞的 IL-1 表达与分泌^[17],而既往研究发现 IL-1 能促进 EPC 的间质转化;miR-126 是否能抑制 IL-1 诱导的 EPC 间质转化及其增殖与迁移能力,仍需要

我们进一步研究。

我们前期研究发现,miR-126 在抑制 EPC 间质进程时同时抑制 Smad4 在细胞核内的表达^[10],而既往研究发现,Smad 途径的激活能促进间质细胞的迁移与增殖^[18],这提示 miR-126 抑制间质化 EPC 的增殖与迁移与其对 Smad 途径的抑制相关。同时值得注意的是,我们前期研究发现,miR-126 对 Smad 途径的抑制是通过激活 PI3K/Akt 途径实现的,但 Akt 途径的激活能促进间质细胞的迁移与增殖^[19],这可能与不同亚型 Akt 激活能产生不同生物学效应有关,需要我们进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275 (5302): 964-967.

[2] Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair[J]. Circ Res, 2007, 100(9): 1 243-245.

[3] Pompilio G, Capogrossi MC, Pesce M, et al. Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: clinical implications[J]. Int J Cardiol, 2009, 131(2): 156-167.

[4] Moonen JR, Krenning G, Brinker MG, et al. Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(3): 506-515.

[5] Imamura H, Ohta T, Tsunetoshi K, et al. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor-beta 1 [J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 114-121.

[6] Diez M, Musri MM, Ferrer E, et al. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGF-beta RI [J]. Cardiovasc Res, 2010, 88 (3): 502-511.

[7] Xu Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis [J]. Circ Res, 2008, 102(9): 1 011-024.

[8] Bonauer A, Boon RA, Dimmeler S. Vascular microRNAs[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(8): 943-949.

[9] Meng S, Cao JT, Zhang B, et al. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(1): 64-72.

[10] Zhang J, Zhang Z, Zhang DY, et al. MicroRNA 126 inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells via the PIK3R2-PI3K/Akt signalling pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83 294.

[11] He T, Smith LA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries [J]. Stroke, 2004, 35 (10): 2 378-384.

[12] Klomp M, Beijk MA, Varma C, et al. 1-year outcome of TRIAS HR (TRI-stent adjudication study-high risk of restenosis) a multi-center, randomized trial comparing genous endothelial progenitor cell capturing stents with drug-eluting stents[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2011, 4(8): 896-904.

[13] Klomp M, Beijk MA, Damman P, et al. Three-year clinical follow-up of an unselected patient population treated with the genous endothelial progenitor cell capturing stent [J]. J Interv Cardiol, 2011, 24(5): 442-449.

[14] Rognoni A, Secco GG, Lupi A, et al. Use of endothelial progenitor capture cell stent during percutaneous treatment of coronary bifurcations: a prospective angiographic registry[J]. Crit Pathw Cardiol, 2011, 10(4): 189-192.

[15] Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts [J]. Circulation, 2005, 112(1): 12-18.

[16] Jaipersad AS, Lip GY, Silverman S, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(1): 1-11.

[17] Zhang Q, Kandic I, Barfield JT, et al. Coculture with late, but not early, human endothelial progenitor cells up regulates IL-1 beta expression in THP-1 monocytic cells in a paracrine manner [J]. Stem Cells Int, 2013, 2013: 859 643.

[18] Ungefroren H, Sebens S, Giehl K, et al. Rac 1b negatively regulates TGF-beta 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling [J]. Oncotarget, 2014, 5 (1-1): 277-290.

[19] Liang-Kuan B, Nan Z, Cheng L, et al. Kidney cancer cells secrete IL-8 to activate Akt and promote migration of mesenchymal stem cells [J]. Urol Oncol, 2014, 32(5): 607-612.

(此文编辑 曾学清)