

ox-Lp(a) 通过上调 miR-125a-5p 靶向抑制 10,11-转位酶 2 增加单层血管内皮细胞通透性

张凯¹, 邓智敏², 曾召林³, 陈姣姣³, 刘亚密³, 马小峰², 姜森³, 王佐³

(1.南华大学附属第二医院,3.南华大学心血管疾病研究所,湖南省衡阳市 421001;

2.南华大学附属南华医院,湖南省衡阳市 421002)

[关键词] 血管内皮细胞; 微小 RNA; 细胞通透性; 氧化型脂蛋白(a); 10,11-转位酶 2

[摘要] 目的 探讨 ox-Lp(a) 损伤血管内皮细胞的表现遗传调控机制。方法 生物信息学分析和筛选与 10,11-转位酶 2(TET2) mRNA 3'-UTR 靶向结合的候选 miRNA, 荧光素酶报告基因系统验证其结合的靶向性; 以 0 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L 的 ox-Lp(a) 与 HUVEC-12 内皮细胞孵育 24 h, 或用 100 mg/L ox-Lp(a) 与 HUVEC-12 内皮细胞孵育 0 h、6 h、12 h、24 h 及 48 h, qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 TET2 mRNA 和蛋白的表达水平。qRT-PCR 检测 hsa-miR-125a-5p 表达水平, 以 5hmc 水平分析 TET2 活性的变化, Transwell 检测 ox-Lp(a) 对单层血管内皮细胞通透性的影响。结果 生物信息学分析和荧光素酶报告基因验证结果表明 TET2 为 hsa-miR-125a-5p 的靶基因, 且 hsa-miR-125a-5p 与 TET2 mRNA 的 3'-UTR 结合的自由能值低(-30.1 kcal/mol)。ox-Lp(a) 呈剂量和时间依赖性抑制 TET2 蛋白和 mRNA 的表达水平, 以 100 mg/L ox-Lp(a) 作用 HUVEC-12 内皮细胞 24 h 的效果最佳; 100 mg/L ox-Lp(a) 作用 HUVEC-12 内皮细胞 24 h 后, TET2 活性显著下降, 且显著上调 hsa-miR-125a-5p 的表达。anti-hsa-miR-125a-5p 能逆转 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 蛋白和 mRNA 表达水平的抑制作用和活性下降。ox-Lp(a) 显著增加单层血管内皮细胞通透性, 但可被 anti-hsa-miR-125a-5p 部分逆转。结论 ox-Lp(a) 通过上调 hsa-miR-125a-5p 并与 TET2 mRNA 3'-UTR 靶向性结合, 抑制 TET2 蛋白和 mRNA 的表达水平及活性, 从而增加单层血管内皮细胞通透性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Ox-Lp(a) increases permeability of monolayer vascular endothelial cells by upregulating miR-125a-5p expression and targeted inhibiting 10,11- translocation enzyme 2

ZHANG Kai¹, DENG Zhi-Min², ZENG Zhao-Lin³, CHEN Jiao-Jiao³, LIU Ya-Mi³, MA Xiao-Feng², JIANG Miao³, WANG Zuo³

(1.The Second Affiliated Hospital of University of South China, 3.Institute of Cardiovascular Disease Research, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2.Affiliated Nanhua Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Vascular endothelial cells; MicroRNA; Permeability; Oxidized lipoprotein(a); 10,11- translocation enzyme 2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the epigenetic regulation mechanism of oxidized lipoprotein(a) [ox-Lp(a)] injury on vascular endothelial cells. **Methods** Bioinformatics and luciferase reporter gene were used to screen candidate microRNA binding to 10,11- translocation enzyme 2 (TET2) mRNA 3'-UTR and verify their targeted binding tendency. 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L of ox-Lp(a) were incubated with HUVEC-12 vascular endothelial cell line for 24 h, or incubated with HUVEC-12 vascular endothelial cell line with 100 mg/L ox-Lp(a) for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h respectively. qRT-PCR and Western blot were used to detect TET2 mRNA and protein expression levels. The expression of hsa-miR-125a-5p was detected by qRT-PCR. The change of TET2 activity was analyzed by detecting 5hmc

[收稿日期] 2017-03-01

[修回日期] 2017-09-08

[基金项目] 湖南省教育厅项目(15C1201)

[作者简介] 张凯, 硕士, 助理医师, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 251981416@qq.com。通讯作者马小峰, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管相关疾病研究, E-mail 为 13786437543@139.com。

level. Transwell was used to detect the permeability of monoclonal vascular endothelial cells. **Results** Bioinformatic analysis and luciferase reporter assay showed that TET2 was the target gene of hsa-miR-125a-5p, and the binding energy of hsa-miR-125a-5p to the 3'-UTR of TET2 mRNA was low (-30.1 kcal/mol). The activity of TET2 protein and mRNA was inhibited by ox-Lp(a) in the dose and time-dependent manner. The best reaction dose and time of ox-Lp(a) was 100 mg/L and 24 h. The activity of TET2 was down-regulated by 100 mg/L ox-Lp(a), while the expression of hsa-miR-125a-5p was significantly up-regulated, and anti-hsa-miR-125a-5p could reverse it. Ox-Lp(a) significantly increased the permeability of monolayer endothelial cells, but could be partially reversed by anti-hsa-miR-125a-5p. **Conclusion** Ox-Lp(a) inhibited the expression and activity of TET2 and increased the permeability of monolayer vascular endothelial cells by up-regulating hsa-miR-125a-5p expression which targeted binding to 3'-UTR of TET2 mRNA.

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和血管介入治疗后再狭窄病理过程的关键环节。脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]是一种与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)结构相似的蛋白质, Lp(a)能直接损伤内皮细胞引起内皮功能紊乱^[1-2],而Lp(a)的氧化形式氧化型脂蛋白(a)[oxidized lipoprotein(a), ox-Lp(a)]尤其如此,其引起内皮细胞坏死的能力远大于氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)^[3-5]。桥粒是上皮细胞特有的一种细胞间黏着结构,其质膜下方有盘状斑,与下面的中间丝锚定在一起。桥粒主要由两类蛋白组成:一类是跨膜蛋白,主要为桥粒芯糖蛋白(desmoglein, DSG)和桥粒芯胶蛋白(desmocollin, DSC),形成桥粒的电子致密层和细胞间接触层,ox-Lp(a)可能通过损伤血管内皮的桥粒连接而破坏血管壁组织屏障的完整性,其下调单层人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)上DSG1和DSC2表达,增加单层血管内皮细胞通透性^[6],但其作用机制并不清楚。

10, 11-转位酶 2(10, 11-translocation enzyme 2, TET2)是一种依赖 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)和 Fe^{2+} 的双加氧酶。研究发现TET2具有保护血管内皮细胞的作用^[7],并可能成为As的治疗新靶点^[7-10]。但ox-Lp(a)对血管内皮细胞的损伤作用是否与TET2有关,及ox-Lp(a)是否能调控TET2表达均不清楚。故本研究拟使用人血管内皮细胞株,研究ox-Lp(a)与TET2表达的作用,并通过生物信息学的方法筛选与其靶向的miRNA,分析ox-Lp(a)对候选miRNA表达的影响,研究候选miRNA沉默后对其干预效用,找到一种内源性的调控ox-Lp(a)损伤血管内皮细胞的小分子,探索ox-Lp(a)损伤血管内皮细胞的新的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC-12 内皮细胞由中南大学湘雅医学院细

胞中心惠赠;Trizol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒(ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)购自 Promega 公司;2×PCR MasterMix、DNA 分子量 Marker 购自北京天根生化科技有限公司;引物由 Invitrogen 生物公司合成;抗 5mc 单克隆抗体、抗 5hmc 单克隆抗体购自美国 Epigentek 公司;抗 TET2 多克隆抗体购自美国 Santa 公司; β -actin 兔抗人一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德生物公司;Lp(a)购自 American Research Products 公司;ECL 化学发光试剂盒购自上海 BestBio 贝博生物;BCA 蛋白含量测定试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 生物信息学分析及靶基因实验验证

人 hsa-TET2 mRNA 3'-UTR 序列直接来自 Targetscan(http://www.targetscan.org/vert_71/),使用在线软件 Targetscan 预测人 TET2 的靶向结合 miRNA,相应的 miRNA 成熟序列从 miRDB(<http://www.mirdb.org/miRDB/>)中得到,人 TET2 mRNA 3'-UTR 与其相应靶向结合 miRNA 的自由能使用在线软件 BiBiserv2 RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)分析。最后,以荧光素酶报告基因系统加以验证 TET2 mRNA 3'-UTR 与相应 miRNA 结合的靶向性。将 TET2 mRNA 3'-UTR 序列插入到质粒 pGL4 中。其位置在萤火虫荧光素酶下游和海肾荧光素酶上游之间,将质粒转录成 mRNA 后,检测荧光强度的变化。

1.3 Lp(a)的氧化修饰及鉴定

参考文献[6]进行。Lp(a)用不含 EDTA 的 PBS 液在 4℃ 下透析 72 h,再用 PBS 液(含 20 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4)于 37℃ 下氧化 24 h,直到肉眼看到颜色由淡黄色变为乳白色,表明 Lp(a)已经被氧化,再用 PBS 液(含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA)在 4℃ 下透析 24 h,除去 Cu^{2+} 终止氧化,再用 PBS 液于 4℃ 下透析 24 h 以除去 EDTA。鉴定采用琼脂糖凝胶电泳方法。

1.4 细胞培养

HUVEC-12 内皮细胞于含 10% 胎牛血清的

DMEM 培养基中(含 100 kU/L 青霉素和 100 kU/L 链霉素),37℃、5% CO₂ 的培养箱中静置培养。每 2~3 天进行传代培养同时给细胞更换新鲜的培养基和血清。取对数生长期的细胞进行实验。每次实验前 6 h 更换新鲜的无血清培养基使细胞获得同步化生长,然后加处理因素进行实验。

1.5 实验分组

①不同浓度 ox-Lp(a)对 HUVEC-12 内皮细胞的影响:分为 5 组,分别用 0 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L ox-Lp(a)孵育 HUVEC-12 内皮细胞 24 h;②ox-Lp(a)处理不同时间对 HUVEC-12 内皮细胞的影响:分为 5 组,用 100 mg/L ox-Lp(a)处理 HUVEC-12 内皮细胞 0 h、6 h、12 h、24 h 及 48 h;③靶基因验证实验:分为 5 组,即对照组、TET2-WT 3'-UTR 组、TET2-m 3'-UTR 组、hsa-miR-125a-5p+TET2-WT 3'-UTR 组和 hsa-miR-125a-5p+TET2-m 3'-UTR 组;④ox-Lp(a)对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 活性和 miR-125a-5p 表达的影响:均分为两组,即对照组、ox-Lp(a)组;⑤anti-miR-125a-5p 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 的表达和活性及单层血管内皮细胞通透性的影响:均分为 3 组,即对照组、ox-Lp(a)组和 anti-miR-125a-5p+ox-Lp(a)组。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

按试剂盒说明书提取细胞总 RNA,测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀值。取细胞总 RNA 2 μL,用 Promega 公司逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。PCR 扩增用 qPCR MasterMix 试剂盒以及 StepOne™ real-time PCR system,操作方法严格按照说明书进行。引物为上海生工设计并合成,引物序列:GAPDH sense 为 5'-TGC CAT CAA CGA CCC CTT CA-3'; GAPDH antisense 为 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3'; TET2 sense 为 5'-ACT CAC CCA TCG CAT ACC TC-3'; TET2 antisense 为 5'-TCA GCA TCA TCA GCA TCA CA-3'。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 45 s,35 个循环;最终 72℃延伸 8 min。然后开始溶解曲线,每 0.5℃一个梯度,从 55℃到 95℃,每个梯度延续 10 s。统计 Ct 值,以 GAPDH 作为内参,用 2^{-ΔΔCt}法计算 RNA 的相对表达量。

1.7 miR-125a-5p 检测

总 RNA 的提取按照说明书将冰冻细胞溶解在 700 mL 的 Trizol 试剂中,用 miRNeasy 试剂盒提取总的小分子 RNA。RNA 样本储存在 -80℃中。miRNA 反转录使用 TaqMans microRNA 反转录试剂盒,PCR 反应使用 Taq-Mans Universal PCR MasterMix system。

50 ng 小 RNA 转换为互补的 cDNA,加入 miRNA 引物,miRNA 的转录水平通过与内参 U6B 比较得到其相对含量,每个样本按照上述重复 3 次。

1.8 Western blot 检测

按常规步骤提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,按 SDS-PAGE 凝胶试剂盒说明配置 8% 的分离胶及 5% 浓缩胶,每孔上样 10 μL,先恒压 80 mV 电泳 30 min,再切换至 120 mV 电泳约 90 min,待蛋白样本达到分离胶的底部时,停止电泳。PVDF 剪切覆盖后恒定电流 200 mA 转膜 2 h,取出 PVDF 膜,浸泡于脱脂牛奶中 4℃封闭过夜,封口袋封闭孵育相应一抗,4℃冰箱内过夜,孵育相应二抗 2 h,洗膜后用 Tanon 化学发光成像系统显影。

1.9 TET2 活性测定

取出载有细胞的玻片,1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;4%多聚甲醛固定细胞 30 min,1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;0.1% Triton X-100 透膜 10 min;1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;10%血清 37℃下封闭 1 h;完全移除血清,不再漂洗,直接滴加按适量比例稀释的一抗,4℃孵育过夜;第 2 天 37℃下复温 1 h;1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加按适量比例稀释的荧光二抗(二抗的稀释、孵育及以后的步骤需避光),室温孵育 2 h;孵育完成后,1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;使用 DAPI 室温染色 30 min,孵育完成后,1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,移除残留液体,滴加抗荧光猝灭剂封片,按相应的二抗选择适当的波长,于荧光显微镜下观察。Image-pro plos 图像处理软件进行分析并统计。

1.10 单层血管内皮细胞通透性分析

参考文献[6]进行。以 2.5×10⁷/L 的细胞密度接种到 24 孔 Transwell 的 PET 膜上,每个小室内加 100 μL 细胞培养液,Transwell 下室加 600 μL 的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)。37℃、5% CO₂ 培养孵育 3 天,在显微镜下见到长成致密单层后,Transwell 下室再换上 600 μL 无血清培养基,而 Transwell 上室则换上 100 μL 含有 ox-Lp(a)的培养基作用 24 h,然后下室再换上 600 μL 无血清培养基,上室则换上 100 μL 1 g/L 的 FITC-dextran 荧光染料,孵育一定时间后,收集 Transwell 下室中的液体,用荧光分光光度计(EX 492 nm,EM 520 nm)测量液体的荧光强度,以荧光强度大小代表其通透性大小。

1.11 统计学分析

实验均重复 3 次,采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism.v5.0 软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本

均数的比较采用 *t* 检验,多个样本均数间的比较采用 One-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa-miR-125a-5p 对 TET2 靶向性的生物信息学分析

使用在线软件 Targetscan,可见与大鼠 TET2 强保

守结合的 miRNA 为 hsa-miR-125a-5p (图 1A), hsa-miR-125a-5p 与 TET2 mRNA 3'-UTR 的结合位点有 3 个结合位置:428-434、4300-4306、4389-4395。故选出 hsa-miR-125a-5p 作为候选 miRNA。BiBiserv2 在线软件可见人 TET2 mRNA 3'-UTR 与 hsa-miR-125a-5p 结合的自由能低于阈值 (-10 kcal/mol),为 -30.1 kcal/mol (图 1B)。说明二者之间有稳定的结合。

A Conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 428-434 of TET2 3' UTR	5' ... GGAAGGCGUCCAUUCACAGGG... 3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
hsa-miR-125b-5p	3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
Position 428-434 of TET2 3' UTR	5' ... GGAAGGCGUCCAUUCACAGGG... 3' CACCGAAAAGAGUCCU
hsa-miR-4319	3' CACCGAAAAGAGUCCU
Position 428-434 of TET2 3' UTR	5' ... GGAAGGCGUCCAUUCACAGGG... 3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
hsa-miR-125a-5p	3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
Position 4300-4306 of TET2 3' UTR	5' ... UUUUGUUCUAAAAAU--UCAGGGAU... 3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
hsa-miR-125a-5p	3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
Position 4300-4306 of TET2 3' UTR	5' ... UUUUGUUCUAAAAAUUCAGGGAU... 3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
hsa-miR-125b-5p	3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
Position 4300-4306 of TET2 3' UTR	5' ... UUUUGUUCUAAAAAUUCAGGGAU... 3' CACCGAAAAGAGUCCU
hsa-miR-4319	3' CACCGAAAAGAGUCCU
Position 4389-4395 of TET2 3' UTR	5' ... UAAAUAUAUUCUUCUCAGGGAU... 3' CACCGAAAAGAGUCCU
hsa-miR-4319	3' CACCGAAAAGAGUCCU
Position 4389-4395 of TET2 3' UTR	5' ... UAAAUAUAUUCUUCUCAGGGAU... 3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU
hsa-miR-125a-5p	3' AGUGUCCA...UCCAGAGUCCU

B

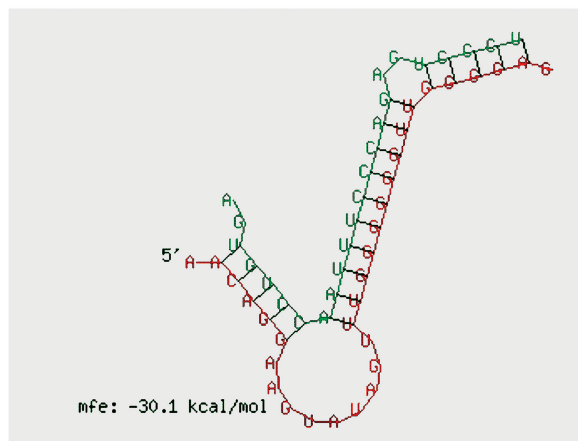


图 1. hsa-miR-125a-5p 对 TET2 靶向性的生物信息学分析
合分析;B 为其结合自由能分析。

A 为 Targetscan 对 hsa-miR-125a-5p 与 TET2 mRNA 3'-UTR 的靶向性结

Figure 1. Bioinformatics analysis of hsa-miR-125a-5p targeting TET2

2.2 miR-125a-5p 对 TET2 靶向性的荧光素酶报告基因验证

转染 hsa-miR-125a-5p mimic 能使野生型 psi-CHECKTM-2-TET2-WT 3'-UTR 质粒的表达水平显著下降,而对突变型 psiCHECKTM-2-TET2-m 3'-UTR 质粒的表达无影响(图 2),这说明 TET2 为 hsa-miR-125a-5p 的靶基因, hsa-miR-125a-5p 通过靶向结合 TET2 mRNA 3'-UTR 抑制野生型重组质粒的表达。

2.3 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达和活性的影响

2.3.1 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的剂量效用 ox-Lp(a) 呈剂量依赖性下调 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 蛋白和 mRNA 的表达, 25 mg/L ox-Lp(a) 即表现出显著的抑制效用 ($P < 0.05$),且随着 ox-Lp(a) 剂量的增加, TET2 蛋白和 mRNA 的表达逐渐下降,当 ox-Lp(a) 浓度达到 100 mg/L 时,表现出最大的抑制效用, 200 mg/L ox-Lp(a) 与 100 mg/L ox-Lp(a) 之间无显著差异 (图 3)。

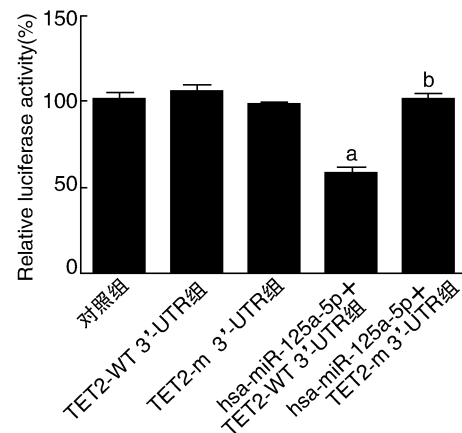


图 2. hsa-miR-125a-5p 对 TET2 荧光素酶表达水平的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 TET2-WT 3'-UTR 组比较。

Figure 2. Effect of hsa-miR-125a-5p on the expression of TET2 luciferase ($n = 3$)

2.3.2 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的时间效用 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的时间效用也较为明显, 100 mg/L ox-Lp(a) 与

HUVEC-12 内皮细胞孵育 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h, 随着时间的延长, TET2 蛋白和 mRNA 的表达水平逐渐下降, 到第 6 h 时, 即表现出显著的抑制效用 ($P < 0.05$), 当到达 24 h 时, 表现出最大的抑制效用, 48 h

与 24 h 之间无显著性差异 (图 4)。故后续实验采用 100 mg/L ox-Lp(a) 和 24 h 作为最佳的作用浓度和作用时间。

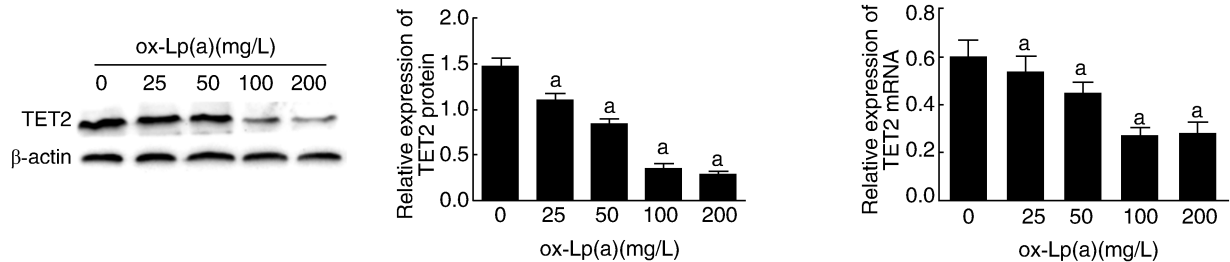


图 3. 不同剂量 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L ox-Lp(a) 组比较。
Figure 3. Effect of different doses of ox-Lp(a) on TET2 expression in HUVEC-12 endothelial cells ($n=3$)

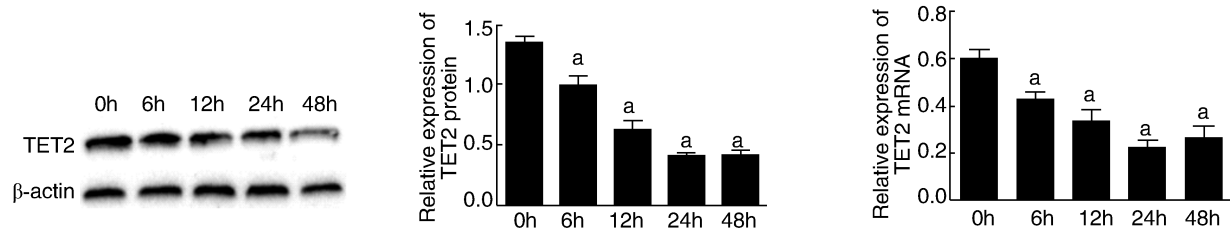


图 4. 100 mg/L ox-Lp(a) 作用不同时间对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与 100 mg/L ox-Lp(a) 作用 0 h 组比较。
Figure 4. Effect of 100 mg/L ox-Lp(a) on the expression of TET2 in HUVEC-12 endothelial cells at different times ($n=3$)

2.3.3 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 活性的影响 100 mg/L ox-Lp(a) 与 HUVEC-12 内皮细胞孵育 24 h 后, 与对照组比较, 5hmc 水平显著下降 ($P < 0.05$; 图 5), 说明 ox-Lp(a) 对 TET2 的活性有一定的抑制作用。

因, ox-Lp(a) 可下调 TET2 的表达, 为了研究 ox-Lp(a) 的这种作用是否由 miR-125a-5p 介导的, 以 100 mg/L ox-Lp(a) 与 HUVEC-12 内皮细胞孵育 24 h, 采用 qRT-PCR 检测 miR-125a-5p 的表达水平, 结果发现 ox-Lp(a) 显著上调 miR-125a-5p 的表达 ($P < 0.05$; 图 6), 其表达水平是对照组的 7~8 倍, 因此推测, ox-Lp(a) 下调 TET2 的表达可能与上调 miR-125a-5p 表达有关。

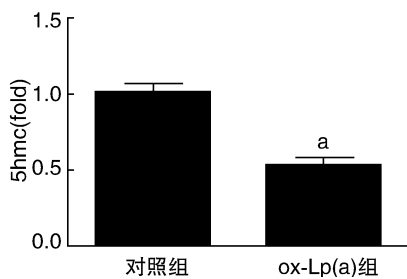


图 5. ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 活性的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。
Figure 5. Effect of ox-Lp(a) on TET2 activity in HUVEC-12 endothelial cells ($n=3$)

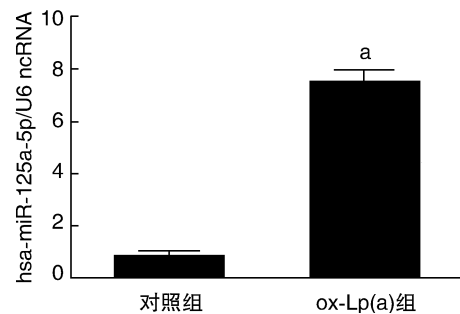


图 6. ox-Lp(a) 促进 HUVEC-12 内皮细胞 miR-125a-5p 的表达 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。
Figure 6. Ox-Lp(a) promotes the expression of miR-125a-5p in HUVEC-12 endothelial cells ($n=3$)

2.4 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞 miR-125a-5p 表达的影响

前述研究已经证实 TET2 为 miR-125a-5p 的靶基

2.5 anti-miR-125a-5p 对 HUVEC-12 内皮细胞 TET2 表达的影响

2.5.1 anti-miR-125a-5p 上调 TET2 的表达和活性

100 mg/L ox-Lp(a) 显著下调 TET2 蛋白的表达

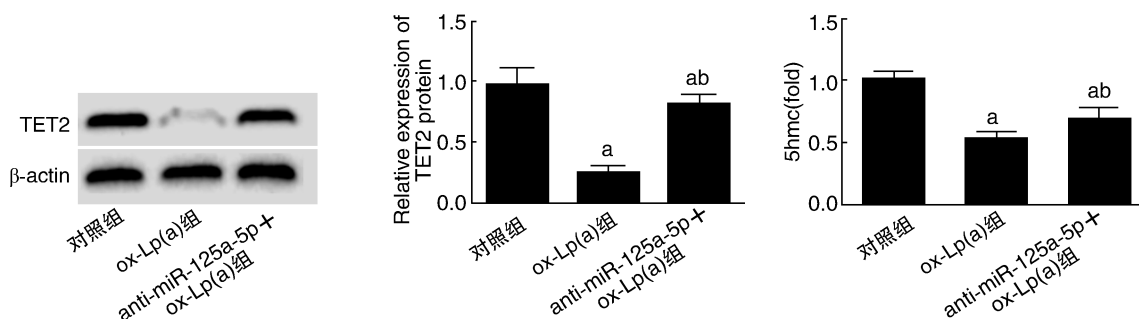


图 7. anti-miR-125a-5p 上调 TET2 的表达和活性 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-Lp(a) 组比较。

Figure 7. Anti-miR-125a-5p up-regulates TET2 expression and activity ($n=3$)

2.5.2 anti-miR-125a-5p 减轻 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞的损伤

100 mg/L ox-Lp(a) 处理后, Transwell 下室的荧光强度增加了近 8 倍, 表明 HUVEC-12 内皮细胞明显受到损伤, 但向 HUVEC-12 内皮细胞转染 anti-miR-125a-5p 可部分逆转 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞通透性增加的作用 ($P<0.05$), 但其通透性仍然显著高于对照组 ($P<0.05$; 图 8), 表明 anti-miR-125a-5p 的抑制作用有限, 其并不能完全逆转 ox-Lp(a) 对 HUVEC-12 内皮细胞的损伤作用, 因此, ox-Lp(a) 对血管内皮细胞损伤的机制仍然有待于阐明。

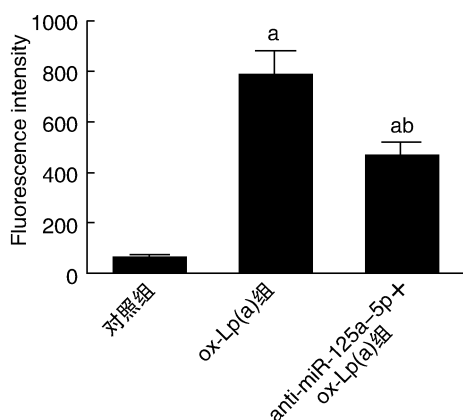


图 8. anti-miR-125a-5p 对 HUVEC-12 单层血管内皮细胞通透性的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-Lp(a) 组比较。

Figure 8. Effect of anti-miR-125a-5p on permeability of HUVEC-12 monolayer vascular endothelial cells ($n=3$)

水平, 同时 TET2 的活性也显著下降 ($P<0.05$), 而 anti-miR-125a-5p 能显著逆转这一作用 ($P<0.05$), 但与对照组相比, 其逆转作用有限, TET2 蛋白表达水平及活性仍然低于对照组 ($P<0.05$; 图 7)。

3 讨论

单层血管内皮细胞通透性是血管内皮细胞受损与否的重要评价指标。单层血管内皮细胞的通透性主要受桥粒结构的控制^[11], 这种连接不但是结构上的, 而且是功能上的, 通过介导细胞与细胞间的黏附以及细胞与胞内中间丝的连接, 在细胞形态改变、运动、黏附以及信号转导等方面发挥重要作用, 桥粒受损必然引起单层血管内皮细胞通透性的改变。研究发现 ox-Lp(a) 能降低桥粒蛋白表达, 增加单层内皮细胞的通透性^[6], 但其作用机制不清楚。

表观遗传学在 As 中的作用已经成为该研究领域的热点之一, DNA 甲基化/去甲基化可调控 As 的发生发展, 促甲基化加速 As 的形成^[12-13], 而抑制甲基化可以预防 As 的形成^[14]。TET2 是一种在血管内皮细胞上表达十分丰富的去甲基化酶, 加强 TET2 的表达有明显的保护血管内皮细胞和抗 As 作用^[10, 15], 而 TET2 突变则加速 As 的形成^[8]。有报道, ox-Lp(a) 能够显著增加 HUVEC 内活性氧的形成, 而且这种作用比 ox-LDL 要强很多^[16]。而活性氧又可以下调 TET2 的表达^[17], 故推测 ox-Lp(a) 对血管内皮细胞的损伤作用可能与 TET2 表达水平有关, 研究结果表明, 这个推断是正确的, ox-Lp(a) 可下调血管内皮细胞 TET2 的表达水平, 这一发现丰富了 ox-Lp(a) 损伤血管内皮细胞的分子机制。进一步通过生物信息学分析发现 TET2 为 miR-125a-5p 的强保守性靶基因, 且在 TET2 mRNA 的 3' -UTR

上有多个 miR-125a-5p 的结合位点,验证性实验也证实 TET2 为 miR-125a-5p 的靶基因,受此启发,我们进一步发现 ox-Lp(a) 在 HUVEC-12 内皮细胞上可以上调 miR-125a-5p 的表达,且 miR-125a-5p 在调控途径上位于 TET2 的上游,因为抑制 miR-125a-5p 后 TET2 表达水平得到上调。相应的血管内皮细胞通透性实验进一步证实了 miR-125a-5p/TET2 介导了 ox-Lp(a) 对血管内皮细胞的损伤。但活性氧是否参与 ox-Lp(a)/miR-125a-5p/TET2 影响血管内皮细胞通透性,有待于进一步验证;桥粒结构的完整性及桥粒蛋白表达水平是调控血管内皮细胞通透性的关键,miR-125a-5p/TET2 是否介导桥粒蛋白的表达也值得深入探索。

[参考文献]

- [1] Pellegrino M, Furmaniak-Kazmierczak E, LeBlanc JC, et al. The apolipoprotein (a) component of lipoprotein (a) stimulates actin stress fiber formation and loss of cell-cell contact in cultured endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6 526-533.
- [2] Cho T, Jung Y, Koschinsky ML. Apolipoprotein(a), through its strong lysine-binding site in KIV(10'), mediates increased endothelial cell contraction and permeability via a Rho/Rho kinase/MYPT1-dependent pathway [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45): 30 503-512.
- [3] Heermeier K, Schneider R, Heinloth A, et al. Oxidative stress mediates apoptosis induced by oxidized low-density lipoprotein and oxidized lipoprotein (a) [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1 310-312.
- [4] Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, et al. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a): role of oxygen-derived radicals [J]. *Circulation*, 1995, 92(6): 1 582-589.
- [5] Li GH, Lin XL, Zhang H, et al. Ox-Lp(a) transiently induces HUVEC autophagy via an ROS-dependent PAPR-1-LKB1-AMPK-mTOR pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(1): 223-235.
- [6] Wei DH, Zhang XL, Wang R, et al. Oxidized lipoprotein (a) increases endothelial cell monolayer permeability via ROS generation [J]. *Lipids*, 2013, 48(6): 579-586.
- [7] Peng J, Tang ZH, Ren Z, et al. TET2 protects against ox-LDL-induced HUVEC dysfunction by upregulating the CSE/H₂S system [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 486.
- [8] Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice [J]. *Science*, 2017, 355(6327): 842-847.
- [9] Wang Y, Zhao D, Lu P, et al. TET2 might be a therapeutic target for atherosclerosis [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 203: 396-397.
- [10] Yang Q, Li X, Li R, et al. Low shear stress inhibited endothelial cell autophagy through TET2 downregulation [J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(7): 2 218-227.
- [11] Ishii K, Norvell SM, Bannon LJ, et al. Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(1): 26-35.
- [12] Lund G, Andersson L, Lauria M, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29 147-154.
- [13] Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(5): 433-443.
- [14] Cao Q, Wang X, Jia L, et al. Inhibiting DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine ameliorates atherosclerosis through suppressing macrophage inflammation [J]. *Endocrinol*, 2014, 155(12): 4 925-938.
- [15] Li G, Peng J, Liu Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits THP-1-derived macrophage autophagy via TET2 down-regulation [J]. *Lipids*, 2015, 50(2): 177-183.
- [16] Galle J, Schneider R, Heinloth A, et al. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: Role of oxidative stress [J]. *Kidney Int*, 1999, 55(4): 1 450-461.
- [17] Ma Y, Fu H, Zhang C, et al. Chiral antioxidant-based gold nanoclusters reprogram DNA epigenetic patterns [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33436.

(此文编辑 文玉珊)