

## miR-146a 调控人脐静脉内皮细胞的衰老及机制

安雪青, 吕健东, 苏 锋

(天津市第五中心医院, 天津市 300450)

[关键词] miR-146a; 衰老; 脐静脉内皮细胞; NADPH 氧化酶 4

[摘要] 目的 探究 miR-146a 在人脐静脉内皮细胞衰老中的调节作用, 并初步探究其机制。方法 以人脐静脉内皮 ECV-304 细胞为研究对象, 连续传代建立 ECV-304 细胞复制性衰老模型, 衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -gal) 法检测不同代次 (P2、P6、P9、P12、P15 代) 细胞中衰老细胞比例, 实时定量 PCR 法检测不同代次 (P2、P6、P9、P12、P15 代) 细胞中 miR-146a 表达。靶基因预测软件预测 miR-146a 靶基因。细胞转染建立 miR-146a 表达上调的 P12 代细胞 (Pre-miR146a 组) 和 miR-146a 表达下调的 P12 代细胞 (Anti-miR146a 组), 并建立相应对照组, SA- $\beta$ -gal 法检测衰老细胞比例, Western blot 检测 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 蛋白表达。结果 P6、P9、P12 和 P15 代细胞的衰老细胞比例明显高于 P2 代细胞 ( $P < 0.05$ ), miR-146a 表达则明显低于 P2 代细胞 ( $P < 0.05$ )。靶基因预测 miR-146a 的靶基因为 NOX4; 转染后, Pre-miR146a 组衰老细胞比例明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Anti-miR146a 组衰老细胞比例明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); Pre-miR146a 组 NOX4 蛋白表达明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Anti-miR146a 组 NOX4 蛋白表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 miR-146a 在衰老的人脐静脉内皮细胞 ECV-304 中表达下降, 上调 miR-146a 表达能够抑制 ECV-304 衰老, 其机制与调节 NOX 表达有关。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

## miR-146a regulates human umbilical vein endothelial cells senescence and its mechanism

AN Xueqing, LV Jiandong, SU Feng

(Tianjin Fifth Hospital, Tianjin 300450, China)

[KEY WORDS] miR-146a; senescence; umbilical vein endothelial cells; NADPH oxidase 4

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulatory role of miR-146a in the senescence of human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. **Methods** The replication aging model of human umbilical vein endothelial ECV-304 cells was established. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) method was used to detect the ratio of senescent cells in different generations cells (P2, P6, P9, P12, P15 generation); real time quantitative PCR method was used to detect the level of miR-146a in different generations cells (P2, P6, P9, P12, P15 generation); Target gene prediction software was used to predict the target gene of miR-146a. The cells in P12 generation were transfected with Pre-miR146a, Pre-miR146a control, Anti-miR146a, and Anti-miR146a control; SA- $\beta$ -gal method was used to detect the ratio of senescent cells; Western blot was used to detect the protein expression of NADPH oxidase 4 (NOX4). **Results** The ratio of senescent cells in P6, P9, P12 and P15 generations was significantly higher than cells in P2 generation ( $P < 0.05$ ). And the expression of miR-146a in P6, P9, P12 and P15 generations was significantly lower than cells in P2 generation ( $P < 0.05$ ). Predicting the target gene of miR-146a was NOX4. After transfection, the ratio of senescent cells in Pre-miR146a group was significantly lower than control group ( $P < 0.05$ ), but it was significantly higher in Anti-miR146a group ( $P < 0.05$ ). The expression of NOX4 protein in Pre-miR146a group was significantly lower than control group ( $P < 0.05$ ), but it was significantly higher in Anti-miR146a group than control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of miR-146a decreased in the aging human umbilical vein endothelial ECV-304 cells, the up-regulation of miR-146a expression can inhibit ECV-304 senescence, and its mechanism is related to the regulation of NOX expression.

[收稿日期] 2018-07-05

[修回日期] 2018-10-29

[基金项目] 天津市卫生局科技基金项目 (2013KZ020); 滨海新区卫生局科技项目 (2012BWKY006)

[作者简介] 安雪青, 主治医师, 研究方向为普外科。

大量流行病学研究表明,血管内皮细胞衰老在动脉粥样硬化、血栓形成等血管功能障碍疾病的发病过程中发挥着至关重要的作用<sup>[1-2]</sup>。血管内皮细胞衰老主要通过细胞复制性衰老和应激诱发的早衰两种机制,其中细胞复制性衰老最为常见,以端粒缩短为主要特征,是细胞老龄化的重要表征<sup>[3]</sup>。阐明内皮细胞衰老的机制有助于血管疾病新治疗策略的开发。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种小型的非编码RNA,它是一类18~24个核苷酸组成的非编码RNA,通过与目标mRNA的互补序列结合来抑制基因表达<sup>[4]</sup>。新近研究表明,miRNA能够调节血管内皮细胞的生理功能,miR-217、miR-34a等miRNA均在内皮细胞的衰老过程中发挥重要的调节作用<sup>[5]</sup>。miR-146a在人细胞内广泛存在,具有调节巨噬细胞功能、抑制炎症因子表达、促进血管平滑肌细胞增殖等多项生物学功能<sup>[6]</sup>,也有研究报道miR-146a对脂质代谢具有调节作用,参与动脉粥样硬化的形成<sup>[7]</sup>。本研究以人脐静脉内皮ECV-304细胞为研究对象,建立ECV-304细胞复制衰老模型,拟探究miR-146a在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)衰老中的调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞株ECV-304购自中国科学院上海细胞生物研究所。DMEM培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素(Gibco,美国);Lipofectamine™2000细胞转染试剂盒(北京旷博生物技术有限公司,中国);衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal)测定试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,中国);实时定量PCR试剂盒(宝生物工程大连有限公司,中国);考马斯亮蓝G-250、蛋白裂解液及硝酸纤维素膜(Sigma,美国);NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)一抗、 $\beta$ -actin一抗和羊抗兔二抗(Abcam,美国)。

免疫荧光显微镜(Olympus,日本);细胞培养箱(HEPA CLASS 100,美国Thermo Scientific公司);全自动凝胶成像分析系统(GelDoc EZ,美国Bio-Rad公司);实时荧光定量PCR仪(LightCycler 480 II,德国Roche公司)。

### 1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞ECV-304培养于37℃、5%

CO<sub>2</sub>和100%饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中,培养基为含10%胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素的DMEM培养基。每隔2~3天换液一次,每天均使用倒置显微镜观察细胞,记录细胞数量和状态等指标。观察细胞融合度超过80%时,弃细胞生长液,加入0.25%胰蛋白酶消化细胞后,800 r/min离心5 min,弃上清液,加入PBS重悬洗涤细胞,用适量细胞生长液悬浮细胞后,传代培养。

取第一代细胞连续传代培养,构建ECV-304细胞体外复制衰老模型,通过检测SA- $\beta$ -gal活性评价第2代(P2)、第6代(P6)、第9代(P9)、第12代(P12)和第15代(P15)衰老细胞比例。

### 1.3 细胞转染

miR-146a扩增表达的寡核苷酸(Pre-miR146a)、Pre-miR146a阴性对照寡核苷酸(Control 1)、miR-146a反义寡核苷酸(Anti-miR146a)、Anti-miR146a阴性对照寡核苷酸(Control 2)由上海生工公司合成。取第12代ECV-304细胞,以每孔 $5.0 \times 10^5$ 个细胞接种于6孔板中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育24 h,按lipofectamine™2000说明书进行转染,培养10~12 h后加入通过荧光显微镜检测转染效率。设置Pre-miR-146a组、对照组1(Pre-miR146a阴性对照)、Anti-miR146a组和对照组2(Anti-miR146a阴性对照)。

### 1.4 SA- $\beta$ -gal活性的检测

待细胞融合度超过60%时,使用PBS缓冲液漂洗3次,再加入SA- $\beta$ -gal染色固定液,室温固定15 min;其后弃去染色固定液,使用PBS缓冲液漂洗3次,再加入染色工作液,在37℃、CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育8~12 h;最后使用显微镜检测,蓝染细胞即为衰老细胞,随机选取5个视野采集图像,计算衰老细胞占观察细胞的百分比。

### 1.5 实时定量PCR检测miR-146a的表达水平

收集6孔板中培养不同代次(P2、P6、P9、P12、P15)的ECV-304细胞,用RNA分离试剂抽提细胞中总RNA,取5  $\mu$ g RNA运用Promega MMLV逆转录酶及相关试剂进行逆转录反应,反应体系为20  $\mu$ L,取0.5  $\mu$ L逆转录产物进行实时定量PCR反应。miR-146a上游引物序列为5'-CGGCGGTGAGAACT-GAATTCCA-3',下游引物序列为5'-GTGCAGGGTC-CGAGGT-3'。每组设置3个重复,扩增条件为94℃ 4 min→94℃ 30 s→50℃ 30 s→72℃ 40 s×40。以P2组mRNA水平为1,实验组相对mRNA表达水平=实验组mRNA水平/P2组mRNA水平。

### 1.6 miR-146a 靶基因预测

根据靶基因预测库 Target Scan (<http://www.targetscan.org/>)、The miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 和 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 预测 miR-146a 的靶基因。

### 1.7 Western blot 检测 NOX4 的表达水平

收集转染成功的第 12 代 ECV-304 细胞,以每孔  $5.0 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,37 °C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h。培养结束后,收集培养细胞,100 μL 冰预冷的蛋白裂解液重悬细胞,冰上孵育 60 min 裂解细胞,裂解液 12000 r/min 离心 10 min,收集上清液。每组设置 3 个重复,处理后的样品 100 °C 金属浴 5 min 变性蛋白,每次取 20 μg 蛋白上样,使用 10%SDS 电泳分离蛋白条带。分离好的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,在室温条件下封闭缓冲液溶液中封闭 30 min,加入一抗(NOX4 一抗,1:300;β-actin 一抗,1:500)在 4 °C 摇床孵育过夜后,与二抗(1:1000)室温摇床孵育 30 min。结合信号使用化学发光法标记,凝胶成像系统分析实验结

果,β-actin 为内参对照,以 NOX4 蛋白条带与 β-actin 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达值。

### 1.8 统计学处理

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析,Origin 8.6 软件绘图,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人脐静脉内皮细胞 ECV-304 体外复制衰老模型的建立

经 SA-β-gal 染色,显示蓝绿色的细胞即为衰老细胞,经过不同代次的培养后(P2、P6、P9、P12、P15),衰老的 ECV-304 细胞比例逐渐升高,P6、P9、P12 和 P15 组衰老细胞比例均明显高于 P2 组细胞( $P < 0.05$ ,图 1),表明人脐静脉内皮细胞 ECV-304 体外复制衰老模型的建立成功。

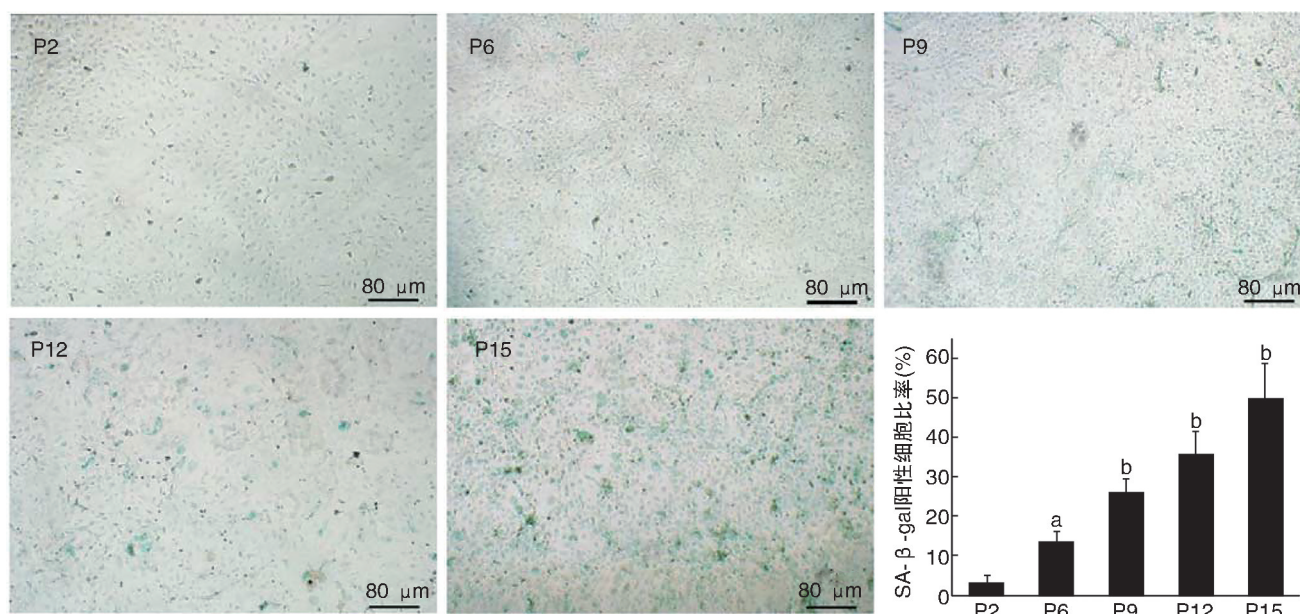


图 1. 不同代次 ECV-304 细胞的 SA-β-gal 染色( $n=5$ ) a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 P2 组相比。

Figure 1. SA-β-gal staining of ECV-304 cells in different generations( $n=5$ )

### 2.2 miR-146a 在衰老的人脐静脉内皮细胞 ECV-304 中表达降低

实时定量 PCR 结果显示,经过不同代次的培养后(P2、P6、P9、P12、P15),ECV-304 细胞中 miR-146a 表达逐渐降低,P6、P9、P12 和 P15 组 miR-146a 水平均明显低于 P2 组细胞( $P < 0.05$ ,图 2),提示 miR-146a 与 ECV-304 细胞复制性衰老相关。

### 2.3 Pre-miR146a 和 Anti-miR146a 转染改变 ECV-304 细胞衰老程度

为进一步确认 miR-146a 与 ECV-304 细胞衰老的相关性,本研究转染 Pre-miR146a 上调 ECV-304 细胞 miR-146a 表达,转染 Anti-miR146a 下调 miR-146a 表达,经 SA-β-gal 染色显示,Pre-miR146a 组衰老细胞比例明显降低( $P < 0.05$ ),Anti-miR146a 组衰



老细胞比例明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

#### 2.4 miR-146a 靶基因预测

根据靶基因预测库 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、The miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 和 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 预测 miR-146a 的靶基因为 NOX4 (图 4)。

#### 2.5 Pre-miR146a 和 Anti-miR146a 转染改变 ECV-304 细胞 NOX4 表达

Western blot 结果显示, Pre-miR146a 和 Anti-miR146a 转染后, Pre-miR146a 组 NOX4 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 Anti-miR146a 组 NOX4 表达明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 5)。

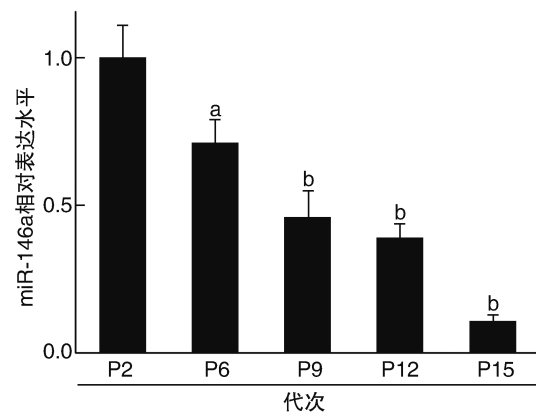


图 2. 不同代次 ECV-304 细胞中 miR-146a 的表达 ( $n = 3$ )

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 P2 组相比。

Figure 2. The expression of miR-146a in different generations of ECV-304 cells ( $n = 3$ )

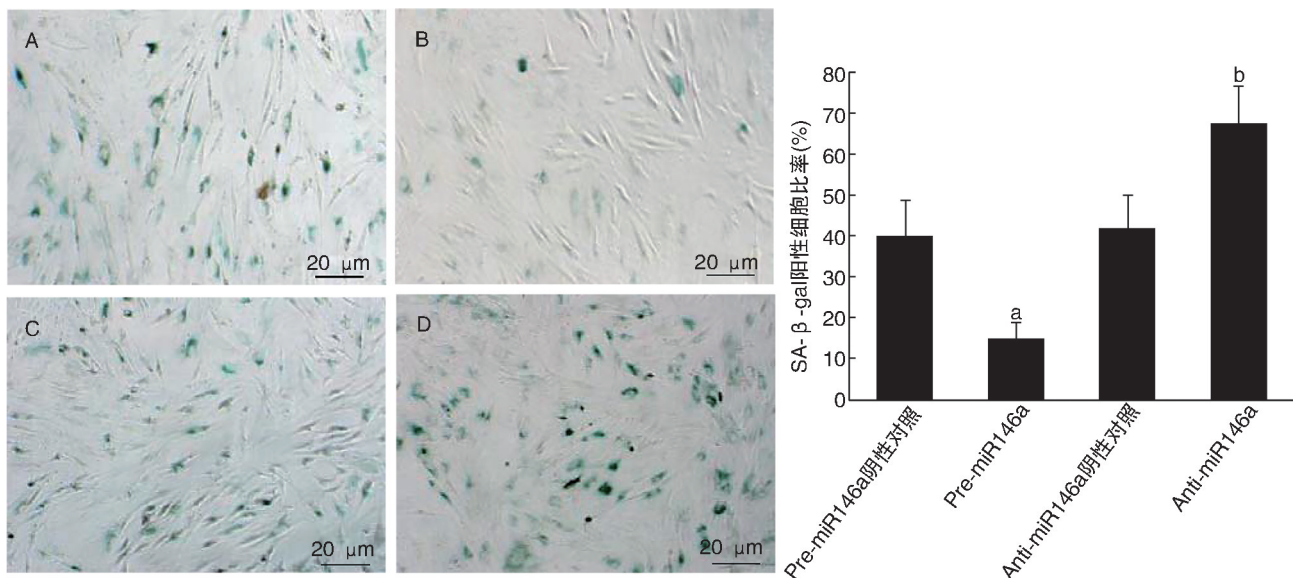


图 3. Pre-miR146a 和 Anti-miR146a 转染后 ECV-304 细胞 SA-β-gal 染色结果 ( $n = 5$ )

A 为 Pre-miR146a 阴性对照组, B 为 Pre-miR146a 组, C 为 Anti-miR146a 阴性对照组, D 为 Anti-miR146a 组。a 为  $P < 0.05$ , 与 Pre-miR146a 阴性对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 Anti-miR146a 阴性对照组相比。

Figure 3. SA-β-gal staining of ECV-304 cells after transfected with Pre-miR146a and Anti-miR146a ( $n = 5$ )

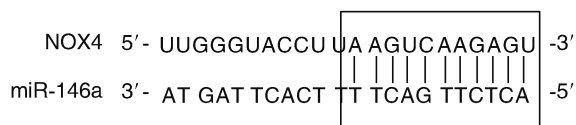


图 4. miR-146a 与 NOX4 mRNA 序列同源重组

Figure 4. Homology between miR-146a and the NOX4 mRNA sequence

### 3 讨论

衰老是心血管疾病的主要风险因素, 心血管事件的发生率随着年龄的增长而增加<sup>[8]</sup>。血管内皮

细胞作为抗血栓和抗炎的屏障, 通过调节血管张力和完整性, 在正常机体中对血管内稳态的维持至关重要<sup>[9]</sup>。相关研究表明, 内皮细胞功能的完整性受到衰老的影响, 内皮细胞衰老在与年龄相关的心血管疾病的发生发展中起着关键作用<sup>[10]</sup>。因此, 阐明内皮细胞衰老的机制有助于血管疾病治疗策略的开发。

miRNA 能够在机体内发挥多种生物功能, 包括细胞增殖、发育、分化和凋亡等<sup>[11]</sup>。最新研究报道, miRNA 在心血管疾病的发生发展中发挥重要的调控作用, 包括参与心脏发育、血管病变、心肌重构、

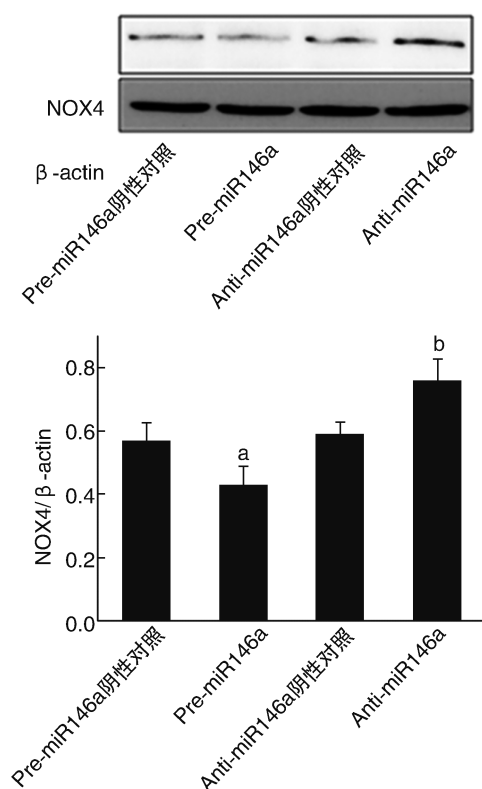


图 5. Pre-miR146a 和 Anti-miR146a 转染改变 ECV-304 细胞 NOX-4 蛋白表达 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 Pre-miR146a 阴性对照组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 Anti-miR146a 阴性对照组相比。

Figure 5. The expression of NOX4 in ECV-304 cells after transfected with Pre-miR146a or Anti-miR146a ( $n=3$ )

血管炎症、高血压等<sup>[12]</sup>。某些 miRNA 也在血管内皮细胞中发挥重要的调节功能,包括调节血管内皮细胞增殖、迁移、凋亡、衰老、炎症等,对维持内皮细胞的稳定性发挥重要作用<sup>[13]</sup>。Cheng 等<sup>[14]</sup>报道, miR-34a 能够调节组蛋白去乙酰化酶诱导的内皮细胞衰老,阻滞细胞周期,且 miR-34a 在年老大鼠心脏和脾脏中的表达水平明显高于幼龄小鼠。Menghini 等<sup>[15]</sup>报道, miR-217 在衰老的衰老人类脐静脉内皮细胞中明显高于新生脐静脉内皮细胞,且 miR-217 的表达上调与叉头框蛋白 O1 (forkhead box O1, FoxO1) 基因表达密切相关。研究证实 miR-146a 对机体脂质代谢具有调节作用,并参与动脉粥样硬化的形成,但 miR-146a 在血管内皮细胞衰老中的作用并不清楚。本研究建立人脐静脉内皮 ECV-304 细胞复制衰老模型,拟探究 miR-146a 在 ECV-304 细胞衰老中的作用。

本研究中,随着 ECV-304 细胞传代次数的增加,衰老细胞比例也逐渐增加,与陈春燕等<sup>[16]</sup>的报道一致,该研究中分离获得人脐静脉内皮细胞,通过传代获得稳定的细胞复制性衰老模型。且衰老

细胞占比较高的高传代次数的 ECV-304 细胞中 miR-146a 表达明显降低。进一步的细胞转染实验也验证了上述结果, miR-146a 表达上调能够延缓 ECV-304 细胞衰老。Taganov 等<sup>[17]</sup>报道冠心病患者外周单核细胞中 miR-146a、miR-146b 及下游 Toll 样受体 4 (toll-like receptors 4, TLR4) 蛋白表达均明显升高,提示 miR-146a 和 miR-146b 是心脏事件独立的预测指标,结合本研究揭示 miR-146a 与心血管疾病密切相关。

miRNA 在血管内皮细胞中发挥的生物学作用并不清楚,本研究预测并验证了 miR-146a 的靶点为 NOX4。NOX4 即 NADPH 氧化酶 4, NADPH 氧化酶是血管内皮细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要来源, ROS 的增加导致血管内皮细胞的氧化损伤,加速了动脉粥样硬化的发生<sup>[18]</sup>。Vendrov 等<sup>[19]</sup>研究报道, NOX4 在血管内皮细胞中表达水平要高于 NOX1、NOX2 或 NOX5 的水平超过 100 倍,是人血管内皮细胞中主要的 NADPH 氧化酶。结合本研究提示 miR-146a 通过抑制 NOX4 表达抑制人脐静脉内皮细胞的复制性衰老。

综上所述,本研究发现 miR-146a 在多次传代的人脐静脉内皮细胞中表达下调,多次传代导致 miR-146a 抑制 NOX4 表达的能力下降,从而导致人脐静脉内皮细胞衰老。鉴于细胞衰老在心血管疾病发生中的关键作用,本研究初步探究了 miR-146a 在衰老过程中的调控作用,但其详细的分子机制仍有待深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Kao C L, Chen L K, Chang Y L, et al. Resveratrol protects human endothelium from  $H_2O_2$ -induced oxidative stress and senescence via SIRT1 activation[J]. J Atheroscler Thromb, 2010, 17(9): 970-979.
- [2] Yentrapalli R, Azimzadeh O, Barjaktarovic Z, et al. Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation[J]. Proteomics, 2013, 13(7): 1096-1107.
- [3] Ota H, Eto M, Kano M R, et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(11): 2205-2211.
- [4] Ito T, Yagi S, Yamakuchi M, et al. MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(4): 735-740.

- [5] Pourrajab F, Zarch A V, Hekmatimoghaddam S, et al. The master switchers in the aging of cardiovascular system, reverse senescence by microRNA signatures; as highly conserved molecules[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2015, 119(2): 111-128.
- [6] 孟凡磊, 王超, 霍晓川, 等. miR-146a 促进动脉粥样硬化斑块形成调控机制研究[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(8): 847-849.
- [7] 李玉媚, 欧和生. miRNA 对血管内皮细胞功能调节的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(10): 1072-1076.
- [8] Wang J C, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence[J]. *Circ Res*, 2012, 111(2): 245-259.
- [9] Diener T, Neuhaus M, Koziel R, et al. Role of endonuclease G in senescence-associated cell death of human endothelial cells[J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(7-8): 638-644.
- [10] Oeseburg H, de Boer R A, Buikema H, et al. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1407-1414.
- [11] 常学锋, 刘彤, 刘巍. 循环 microRNA 参与冠状动脉粥样硬化的机制及其临床应用价值探讨[J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 35(3): 240-242.
- [12] Hulsmans M, De Keyser D, Holvoet P, et al. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis[J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 2515-2527.
- [13] Menghini R, Stöhr R, Federici M, et al. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 17: 68-78.
- [14] Cheng Y, Zhu P, Yang J, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PD-CD4[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(3): 431-439.
- [15] Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1[J]. *Circulation*, 2009, 120(15): 1524-1532.
- [16] 陈春燕, 郭晋村, 黄卫斌. 胰岛素样生长因子结合蛋白 4 基因对内皮细胞衰老的调节作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 490-494.
- [17] Taganov K D, Boldin M P, Chang K J, et al. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [18] Regina C, Panatta E, Candi E, et al. Vascular ageing and endothelial cell senescence: Molecular mechanisms of physiology and diseases[J]. *Mech Ageing Dev*, 2016, 159: 14-21.
- [19] Vendrov A E, Vendrov K C, Smith A, et al. NOX4 NADPH oxidase-dependent mitochondrial oxidative stress in aging-associated cardiovascular disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(18): 1389-1409.
- (此文编辑 许雪梅)