

miR-30b 对血管平滑肌细胞迁移能力的影响

俞啟遥, 王丹琳

(河北医科大学第四医院, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 血管平滑肌细胞; microRNA-30b; E-Cadherin; 细胞迁移

[摘要] 目的 探究 microRNA-30b(miR-30b)对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)迁移能力的影响。方法 体外分离培养大鼠 VSMC,将 VSMC 随机分为正常对照组(未进行转染)、miR-对照组(转染 miR-NC,浓度为 50 nmol/L)、miR-30b mimics 组(转染 miR-30b mimics,浓度为 50 nmol/L)。采用实时荧光定量 PCR 实验检测 miR-30b 及钙黏附蛋白 E-Cadherin 的表达情况;采用划痕愈合实验检测 VSMC 的迁移率;采用 Transwell 实验检测 VSMC 的迁移能力;采用 Western blot 技术检测 E-Cadherin 蛋白的表达。结果 ①miR-30b mimics 组与正常对照组和 miR-对照组比较,miR-30b 表达水平升高($P<0.05$)。②划痕愈合实验结果显示,与正常对照组和 miR-对照组相比,miR-30b mimics 组 VSMC 的划痕修复率明显降低($P<0.05$)。③Transwell 实验可见,miR-30b mimics 组 VSMC 的迁移能力较正常对照组和 miR-对照组明显减弱($P<0.05$)。④miR-30b mimics 组 E-Cadherin mRNA 和蛋白的表达较正常对照组和 miR-对照组明显增强($P<0.05$)。结论 miR-30b 上调 E-Cadherin 的表达,从而抑制大鼠 VSMC 的迁移。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

The effect of miR-30b on the migration of vascular smooth muscle cells

YU Qiyao, WANG Danlin

(The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] vascular smooth muscle cell; microRNA-30b; E-cadherin; cell migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of microRNA-30b(miR-30b) on the migration of rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Rat VSMC were isolated and cultured in vitro. VSMC were randomly divided into normal control group (no transfection), miR-NC group (transfected miR-NC concentration 50 nmol/L), miR-30b mimics group (transfected miR-30b mimics, concentration 50 nmol/L). Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of miR-30b and E-cadherin. The mobility of VSMC was detected by scratch healing test. The migration ability of VSMC was detected by Transwell assay. The expression of E-cadherin protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group and the miR-NC group, the expression level of miR-30b was increased in the miR-30b mimics group ($P<0.05$). The results of the scratch-healing experiment showed that the migration ability of the miR-30b mimics group was significantly weaker than that of the normal control group and the miR-NC group ($P<0.05$). Transwell experiments showed that the migration ability of miR-30b mimics group was weakened ($P<0.05$). The expression of E-cadherin mRNA and protein in miR-30b mimics group was significantly higher than that in normal control group and miR-NC group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-30b can up-regulate the expression of E-cadherin, thereby inhibiting the migration of rat VSMC.

动脉粥样硬化是增加心血管疾病发生率的关键因素^[1]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)是血管中膜的主要组成成分,是以低迁移、低分化的形态存在,能够保持血管处于正常形态^[2];当血管受到不良刺激时,VSMC 可转变为分

泌型的细胞,从而增殖能力和迁移能力增强,进而发生动脉粥样硬化,导致血管的管腔重塑和狭窄^[3-4]。因此抑制 VSMC 的迁移可有效降低心血管疾病的发生。microRNA(miRNA,miR)是一类长度为 18~23 个核苷酸的非编码 RNA,广泛存在于生

[收稿日期] 2018-09-13

[修回日期] 2018-11-05

[基金项目] 河北省教育厅课题(QN2016273);河北省卫计委课题(20160185)

[作者简介] 俞啟遥,硕士,主治医师,研究方向为心血管疾病的研究,E-mail 为 yumnn9@163.com。

物体内,具有多种调控功能,广泛参与细胞的增殖、迁移等生物学过程^[5]。研究发现 miR-30b 可抑制肿瘤细胞的侵袭转移^[6]。但 miR-30b 在 VSMC 迁移中的作用研究较少,因此,本研究以大鼠 VSMC 为模型,观察 miR-30b 对 VSMC 迁移能力的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

DMEM 培养基和胎牛血清选自美国 Gibco,实时荧光定量 PCR 试剂盒选自南京 Vazyme,miR-30b 试剂盒选自富能公司,GAPDH 兔一抗抗体选自 Bioworld,E-Cadherin 兔一抗抗体选自 Abcam,山羊抗兔 IgG 抗体选自美国 KPL 公司,增强型 ECL 试剂盒选自美国 Thermo 公司,Transwell 小室选自美国 Corning 公司。

1.2 实验模型的制备与分组

选取 8 只健康雄性 SD 大鼠,均为 SPF 级,选自动物实验中心(证书号是 1305090)。取大鼠胸主动脉,去除血管内外膜,剪碎成小块,均匀贴在细胞培养瓶上,VSMC 爬出后进行分瓶,传代至第 3~4 代时用于细胞实验。VSMC 融合率达 70%~80% 时给予刺激。实验分为:①正常对照组:用完全培养基给细胞换液(DMEM 培养基中含 10% 牛清);②miR-对照组:参照说明书,转染 miR-NC 浓度为 50 nmol/L;③miR-30b mimics 组:参照说明书,转染 miR-30b mimics 浓度为 50 nmol/L。

1.3 划痕愈合实验检测 VSMC 的划痕修复率

转染 VSMC 24 h 后,用 20 μ L 枪头进行划痕,用 PBS 洗去脱落细胞,加入含 2% 胎牛血清的细胞培养基 2 mL。显微镜下观察并拍照,此时,记录时间并记录 0 h 时的划痕宽度;将细胞于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱继续培养 24 h,显微镜下观察并拍照,记录时间并记录 24 h 时的划痕宽度。通过不同时间段的划痕宽度计算划痕修复率。

1.4 Transwell 实验观察迁移细胞数

转染 24 h 后,以冷的不含牛血清的 DMEM 培养基与 Transwell 基质胶以 8:1 比例混合,并于每孔加入 50 μ L 混合液,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱进行孵育 5 h,待混合液凝固。用不含牛血清的 DMEM 培养基重悬 VSMC,调整 VSMC 密度为 1×10^9 个/L,取 100 μ L VSMC 的悬液加入 Transwell 小室的上室中,取 500 μ L 的完全培养基加入下室中。继续于 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,之后 PBS 洗 2 遍,采用甲醇固定 30 min,加入质量分数 0.1% 结晶紫染液进行染色

20 min,于显微镜下观察并拍照,计算迁移至 Transwell 小室下室中的细胞数,实验重复 3 次。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 miR-30b 及 E-Cadherin 的 mRNA 表达情况

细胞转染 48 h 后,提取各组细胞的 RNA,反转录后以各组 cDNA 为模板,加入 miR-30b 引物,以 U6 作为内参照;加入 E-Cadherin 的引物,以 GAPDH 作为内参照。引物序列为:GAPDH 上游 5'-AAGGT-CATCCATGACAACCTTTG-3',下游 5'-TCCACCACCCT GTTGCTGTAG-3';E-Cadherin 上游 5'-TGCTCTTGCT-GTTTCTTCGG-3',下游 5'-TGCCCCATTTCGTTCAAG-TAG-3'。采用 SYBR[®] Green 方法,应用实时荧光定量 PCR 仪进行检测。miR-30b 及 U6 体系为 20 μ L 的反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,40 个循环;E-Cadherin 及 GAPDH 体系为 20 μ L 的反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,40 个循环,并设置溶解曲线,在退火延伸阶段采集信号,采集图像进行分析。实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 E-Cadherin 蛋白的表达情况

VSMC 转染 48 h 后,提取各组 VSMC 的蛋白质,配制 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,调整蛋白质上样量为 50 μ g,电泳条件设置为恒压 95 V,电泳 1.5 h。之后进行转膜,转膜时间为恒流 200 mA,洗膜,5% 牛奶封闭 1 h。使用一抗稀释液稀释抗体(GAPDH 1:10 000,E-Cadherin 1:5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜,放入二抗中(稀释比例 1:10 000),室温孵育 2 h。观察显色效果,采集图像,实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,采用 Student-Newman-Keuls 检验进行组间比较,采用单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSMC 中 miR-30b 的 mRNA 表达情况

miR-30b mimics 转染 VSMC 48 h 后,实时荧光定量 PCR 结果显示:miR-30b mimics 组 VSMC 中 miR-30b mRNA 表达水平明显高于正常对照组和 miR-对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-对照组与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明 miR-30b mimics 有效增强了 VSMC 中 miR-30b mRNA 表达(图 1)。

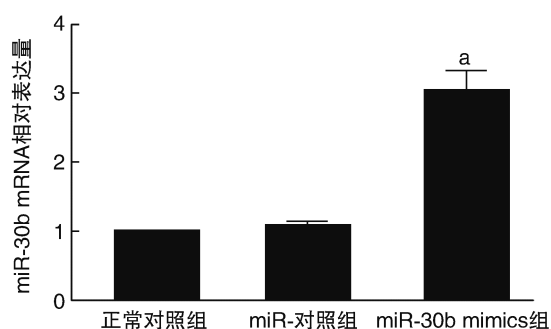


图 1. VSMC 中 miR-30b 的 mRNA 表达情况 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组和 miR-对照组比较。

Figure 1. Expression of miR-30b in VSMC of each group ($n=3$)

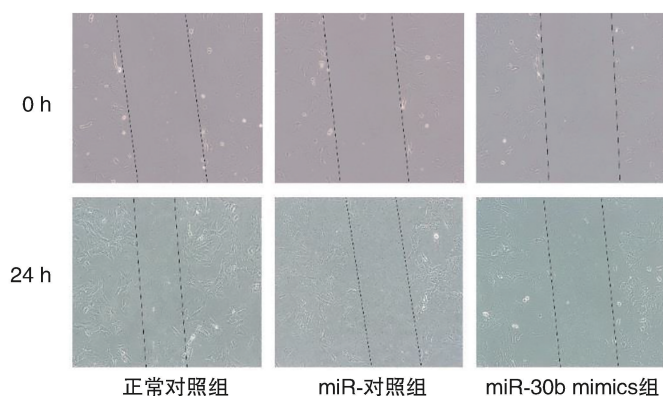


图 2. 划痕愈合实验检测各组 VSMC 划痕修复率

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组和 miR-对照组比较。

Figure 2. Scratch healing test was used to detect scratch repair rate of VSMC in each group

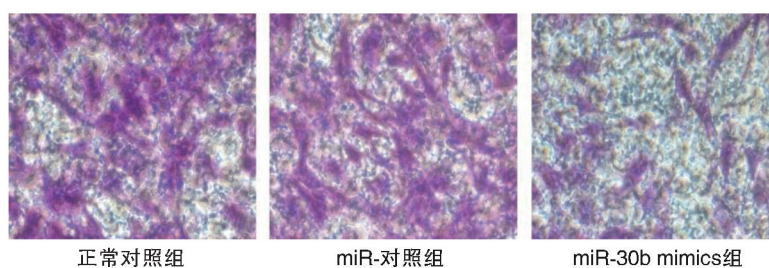
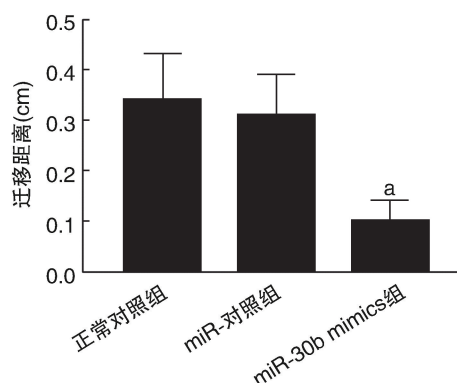


图 3. Transwell 实验检测各组 VSMC 的迁移能力 (400×)

Figure 3. Transwell assay was used to measure the migration of VSMC in each group (400×)

2.4 VSMC 中 E-Cadherin 的表达情况

与正常对照组和 miR-对照组比较, miR-30b mimics 组 E-Cadherin 蛋白和 mRNA 的相对表达量显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$; 图 4)。

3 讨论

动脉粥样硬化是心血管疾病发病率增加的重

2.2 划痕愈合实验检测各组 VSMC 划痕修复率

划痕愈合实验 24 h 后, miR-30b mimics 组 VSMC 向中央迁移的距离为 (0.10 ± 0.04) cm, 正常对照组 VSMC 迁移的距离为 (0.34 ± 0.09) cm, miR-对照组 VSMC 迁移的距离为 (0.31 ± 0.08) cm, miR-30b mimics 组 VSMC 迁移距离明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$; 图 2)。

2.3 Transwell 实验检测 VSMC 的迁移能力

Transwell 实验结果显示, 正常对照组、miR-对照组和 miR-30b mimics 组迁移细胞数分别为 (154.83 ± 12.85) 个、 (147.17 ± 9.93) 个和 (62.83 ± 9.00) 个 ($F=68.03$, $P<0.05$)。与正常对照组和 miR-对照组比较, miR-30b mimics 组的迁移能力明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$; 图 3)。

要因素^[7]。动脉血管的中膜 VSMC 出现迁移和分泌细胞外基质会导致血管狭窄, 有研究发现具有 VSMC 形状的细胞出现于动脉中膜至内膜下间隙, 而动脉粥样硬化的斑块中也存在具有 VSMC 形状的细胞, 表明动脉中膜层的血管平滑肌细胞迁移到了动脉粥样硬化斑块中^[8]。由此可见, 抑制 VSMC 迁移可以有效降低动脉粥样硬化斑块的形成, 进而防止发生动脉血管狭窄。

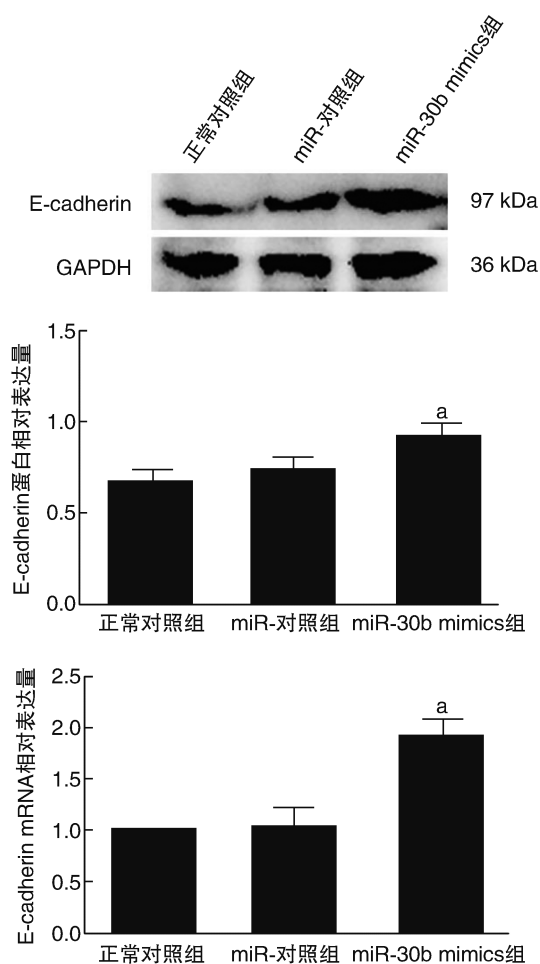


图4. 各组 VSMC E-Cadherin 的表达情况 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组和 miR-对照组比较。

Figure 4. The expression of E-Cadherin in VSMC of each group ($n=3$)

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码 RNA, 在生物体内广泛存在, 参与调控众多生物学过程。近年来血管动脉粥样硬化的相关调节因素已成为热点。miRNA 可与其靶基因 mRNA 分子结合, 能够抑制 mRNA 翻译, 也能够降低 mRNA 的稳定性, 参与细胞增殖、分化、转移等^[9-11]。miR-30 家族是由 6 个位于人类 1, 6 和 8 号染色体上的基因编码, 包括 5 个成员, miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d、miR-30e, 其在心血管、肿瘤等疾病的发生和发展中扮演着重要的角色^[12-14]。研究显示 miR-30b 过表达能够有效抑制细胞的迁移与侵袭能力^[15]。在本研究中, 划痕愈合实验和 Transwell 小室实验结果提示, 与正常对照组和 miR-对照组相比, miR-30b mimics 组 VSMC 迁移能力显著降低。表明过表达 miR-30b 基因能够抑制 VSMC 的迁移能力。

上皮蛋白标志物 E-Cadherin 为钙黏附蛋白家族

重要成员之一, 为糖蛋白, 其作用是维持细胞的完整形态, 并维持细胞间的黏附能力^[16], 与细胞的分化、转移与侵袭紧密相关。Choi 等^[17]人研究表明干扰 E-Cadherin 表达, 会增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。Ping 等^[18-19]人在 VSMC 的研究中发现, E-Cadherin 基因表达下调后, VSMC 的迁移能力增强。Xiong 等^[20]人研究发现 miR-30b 能靶向作用于 Snail 的 3'-UTR, 下调 Snail 的表达, 并通过促进 Snail 下游基因 E-Cadherin 表达, 进而抑制细胞的侵袭和转移能力。本研究结果显示, 与正常对照组和 miR-对照组比较, miR-30b mimics 组 E-Cadherin 表达水平明显上调, 表明过表达 miR-30b 基因能够促进 E-Cadherin 的表达, 增加了细胞间的黏附作用, 从而使 VSMC 的迁移能力受到了抑制。

上述研究表明, 过表达 miR-30b 基因后, 使得 E-Cadherin 基因及蛋白表达上调, 细胞的迁移能力降低。表明 miR-30b 可正向调节钙黏附蛋白 E-Cadherin, 促使 VSMC 间黏附作用增强, 从而抑制细胞的迁移能力。

[参考文献]

- [1] 王绿娅. 冠状动脉粥样硬化性心脏病相关临床脂质研究新亮点[J]. 心肺血管病杂志, 2017, 36(10): 797-799.
- [2] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 214(1): 33-50.
- [3] Liu R, Leslie KL, Martin KA. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849: 448-453.
- [4] Cui L, Bai Y, Zhang J, et al. Effects of extracellular acid stimulation on rat vascular smooth muscle cell in Gas6/Axl or PI3K/Akt signaling pathway[J]. Clin Exp Hypertens, 2016, 38(5): 451-456.
- [5] 王雪琴, 何雪梅, 周翔宇, 等. microRNA 在动脉硬化闭塞症中调控血管平滑肌的作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 210-216.
- [6] Qi Z, Zhang B, Zhang J, et al. MicroRNA-30b inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting the epidermal growth factor receptor[J]. Neoplasia, 2018, 65(2): 192-200.
- [7] Holm NS, Tenqryd C, Edsfieldt A, et al. A biomarker of collagen type I degradation is associated with cardiovascular events and mortality in patients with atherosclerosis[J]. J Intern Med, 2019, 285(1): 118-123.

(下转第 438 页)

- signaling pathway[J]. *Autophagy*, 2013, 9(12): 2033-2045.
- [41] Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(4): 1367-1374.
- [42] Muller C, Salvayre R, Negre-Salvayre A, et al. Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress and autophagy: prevention by HDLs[J]. *Autophagy*, 2011, 7(5): 541-543.
- [43] Torisu T, Torisu K, Lee IH, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor[J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1281-1287.
- [44] Medici D, Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5-6): 379-384.
- [45] Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1029.
- [46] Sun L, Zhao M, Liu A, et al. Shear stress induces phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR/ULK1-mediated autophagy[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(2): 541-548.
- [47] Wang L, Han Y, Shen Y, et al. Endothelial insulin-like growth factor-1 modulates proliferation and phenotype of smooth muscle cells induced by low shear stress[J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(4): 776-786.
- [48] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2679-2688.
- [49] Moore KJ, Koplev S, Fisher EA, et al. Macrophage trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC macrophage in CVD series[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(18): 2181-2197.
- [50] uimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 655-667.
- [51] Finn AV, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1282-1292.
- [52] Martinet W, De Meyer I, Verheye S, et al. Drug-induced macrophage autophagy in atherosclerosis: for better or worse[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(1): 321.
- [53] Martinet W, De Loof H, De Meyer GR, et al. mTOR inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233(2): 601-607.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 394 页)

- [8] 程仕彤, 王绿娅. 关注免疫炎症及其标志物在动脉硬化性心血管病中的作用[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(10): 883-888.
- [9] Barwari T, Joshi A, Mayr M, et al. microRNAs in cardiovascular disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(23): 2577-2584.
- [10] Cooper JB, Ronecker JS, Tobias ME, et al. Molecular sequence of events and signaling pathways in cerebral metastases[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4): 1859-1877.
- [11] Lou W, Liu J, Gao Y, et al. MicroRNAs in cancer metastasis and angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115787-115802.
- [12] Croset M, Pantano F, Kan CWS, et al. MicroRNA-30 family members inhibit breast cancer invasion, osteomimicry, and bone destruction by directly targeting multiple bone metastasis-associated genes[J]. *Cancer Res*, 2018, DOI:10.1158/0008-5472.can-17-3058.
- [13] Demolli S, Doebele C, Doddaballapur A, et al. MicroRNA-30 mediates anti-inflammatory effects of shear stress and KLF2 via repression of angiopoietin 2[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 88: 111-119.
- [14] Liu YF, Spinelli A, Sun LY, et al. MicroRNA-30 inhibits neointimal hyperplasia by targeting Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ (CaMKII δ) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26166.
- [15] Tian SB, Yu JC, Liu YQ, et al. MiR-30b suppresses tumor migration and invasion by targeting EIF5A2 in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(31): 9337-9347.
- [16] Higashi K, Ueda Y, Shimasaki M, et al. High FDG uptake on PET is associated with negative cell-to-cell adhesion molecule E-cadherin expression in lung adenocarcinoma [J]. *Ann Nucl Med*, 2017, 31(8): 590-595.
- [17] Choi JE, Bae JS, Kang MJ, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: clinicopathological significance [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1695-1705.
- [18] Ping S, Yanhong Z, Kathleen AC, et al. AMPK α 2 deficiency promotes vascular smooth muscle cell migration via Skp2 upregulation and E-cadherin downregulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12): 2800-2809.
- [19] 张东雪, 张胜雷, 张璐, 等. SET8-shRNA 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(2): 152-156.
- [20] Xiong Y, Wang Y, Wang L, et al. MicroRNA-30b targets Snail to impede epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells[J]. *J Cancer*, 2018, 9(12): 2147-2159.
- (此文编辑 许雪梅)