

miR-206 对血管内皮细胞增殖的影响及其机制

郑莹¹, 马艳玲¹, 谷秀莲¹, 王阳²

(1. 北京小汤山医院, 北京市 102211; 2. 郑州大学第五附属医院, 河南省郑州市 450052)

[关键词] miR-206; 血管内皮细胞; 细胞增殖; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究 miR-206 对血管内皮细胞增殖的影响及其机制, 为临床动脉硬化疾病提供新的诊疗方向。**方法** 收集临床病理首次确诊为糖尿病下肢动脉粥样硬化病变的患者病变处动脉内皮组织和正常内皮组织, qPCR 检测 miR-206 的表达; 而后通过基础实验研究将 HUVEC 分为未转染组、miR-206-mimics 组和 miR-206-inhibitor 组, 观察转染效率; 三组细胞均采用 CCK8 检测细胞增殖情况, Transwell 进行迁移能力评估, 流式细胞仪检测细胞周期情况, Western blot 检测 Cx43 表达情况。**结果** 糖尿病动脉硬化患者下肢动脉(均为胫腓动脉)病变处内皮细胞 miR-206 的 mRNA 表达较正常组织内皮细胞明显增加 ($P < 0.05$); HUVEC 转染 miR-206-mimics 后, miR-206 表达显著升高 ($P < 0.05$), 转染 miR-206-inhibitor 后, miR-206 表达明显降低 ($P < 0.05$); 在 HUVEC 转染 miR-206-mimics 24 h 后, 细胞增殖率相比于未转染组和 miR-206-inhibitor 组要明显降低 ($P < 0.05$); 在 HUVEC 转染 miR-206-mimics 后, 细胞迁移能力明显降低 ($P < 0.05$), 细胞周期在 G2 期发生阻滞, 而 HUVEC 转染 miR-206-inhibitor 后细胞迁移能力提高 ($P < 0.05$); miR-206-mimics 组细胞 Cx43 表达明显降低, 而 miR-206-inhibitor 组细胞 Cx43 表达明显增加。**结论** miR-206 可以抑制血管内皮细胞的增殖, 将内皮细胞阻滞在有丝分裂 G2 期, 并且抑制内皮细胞迁移, 其对内皮细胞增殖的影响可能是通过调节 Cx43 表达来实现的。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Effect of miR-206 on proliferation of vascular endothelial cell and its mechanism

ZHENG Ying¹, MA Yanling¹, GU Xiulian¹, WANG Yang²

(1. Beijing Xiaotangshan Hospital, Beijing 102211, China; 2. The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] miR-206; vascular endothelial cell; cell proliferation; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of miR-206 on proliferation of vascular endothelial cell and its mechanism, and provide a new therapeutic target for clinical arteriosclerosis. **Methods** The arterial endothelial tissue on lesion site and normal endothelial tissue were collected from the patients who were diagnosed as diabetic lower limb atherosclerosis by first time in clinical pathology. The expression of miR-206 was detected by qPCR. Normal HUVEC cell lines, HUVEC transfected with miR-206-mimics and HUVEC transfected with miR-206-inhibitor were studied through fundamental experiment, and the transfection efficiency were observed. In the three groups, CCK8 was used to detect the proliferation status, transwell was used to evaluate the migration ability, flow cytometry was used to detect cell cycle and Western blot was used to observe expression of Cx43. **Results** The mRNA expression of miR-206 on lesion site of lower limb artery (shin peroneal artery) in the patients with diabetic arteriosclerosis was significantly increased compared with normal endothelial tissue ($P < 0.05$); The expression of miR-206 significantly increased ($P < 0.05$) after transfected with miR-206-mimics, while it was significantly reduced ($P < 0.05$) after transfected with miR-206-inhibitor. Compared with normal HUVEC and HUVEC transfected with miR-206-inhibitor, the cell proliferation rate was significantly lower in HUVEC transfected with miR-206-mimics for 24 h ($P < 0.05$). After HUVEC was transfected with miR-206-mimics, the cell migration capacity was significantly lower than normal HUVEC group ($P < 0.05$), and the cell cycle was blocked during G2 phase; while the cell migration capacity was higher in HUVEC transfected with miR-206-inhibitor group than that of normal HUVEC group ($P < 0.05$). Cx43 expression was significantly reduced in miR-206-mimics group but significantly increased in miR-206-inhibitor group. **Conclusion** miR-206 can inhibit the proliferation of vascular endothelial cells,

block endothelial cells in G2 phase and suppress their migration, and it may affect proliferation of endothelial cells by regulating Cx43 expression.

动脉粥样硬化(atherosclerosis)性疾病是一种常见的慢性疾病^[1-3]。随着我国居民饮食习惯由碳水化合物向高脂、高蛋白的转变,以及人口老龄化的不断增长,动脉粥样硬化性疾病的发病率逐年提高。As是冠心病、心肌梗死等许多心血管疾病发生的始动因素,动脉粥样硬化病变可以在人体内存在数年、数十年却不显示出任何病态,早期诊断和有效的治疗,可以很大程度上缓解病情进展,降低相关疾病的发生率,提高患者的生活质量^[4-5]。As的形成过程非常复杂,参与的细胞和组织成分多种多样,危险因素又众多,目前临床上主要采用降脂、扩血管、改善循环等抗As^[6-8]。研究显示^[9-12],血管内皮细胞作为血管壁的重要组成部分,其损伤所导致的异常增殖和凋亡是动脉粥样硬化性疾病发生、发展的共同病理生理基础,并且迄今As具体详细的发生机制还未阐明,因此探求As内皮细胞增殖、凋亡的机制,成为其研究的重要方向,并且随着分子生物学的发展,对As在分子方面的研究成为热点。

随着对微小RNA(microRNA, miRNA)结构与功能研究的不断深入,多种miRNA被证实人类多种疾病的几乎每个病理过程都有参与^[13-14]。有研究显示^[15],miRNA在As性疾病发生过程中具有重要作用,且miRNA水平与冠状动脉内皮功能密切相关,对参与As形成的重要细胞——血管内皮细胞、单核巨噬细胞和血管平滑肌细胞等具有调节作用。其中在糖尿病下肢动脉硬化中病变的内皮组织存在miR-206的差异性表达,但其与病变血管内皮细胞的关系及机制临床报道较少。因此本研究主要选取糖尿病下肢动脉硬化患者为研究对象,针对性研究miR-206对病变血管内皮细胞增殖的影响并通过基础实验探明其可能机制,为临床诊疗提供新的方案。

1 资料和方法

1.1 临床资料

整理在我院临床病理首次确诊为糖尿病下肢动脉硬化患者150例,年龄50~75岁,平均(65.5±7.4)岁。获取并收集患者下肢病变动脉内皮组织和下肢非病变处血管内皮组织(均为下肢胫腓动脉)。所有患者之前未接受过对症治疗。均取得患者知情同意。

1.2 主要材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)系HUVEC-12购买于中科院细胞库。DMEM培养基、胎牛血清(美国GIBCO公司),Transwell小室(美国Costar公司),胰蛋白酶(美国Invitrogen公司),MTT、PI染料(德国Thermo公司),鼠抗人 β -actin、P27、CDK4和CyclinD1一抗(美国CST公司),Lipofectamine 2000 Reagent(美国Invitrogen公司),qPCR试剂盒(美国Invitrogen公司)。CO₂恒温培养箱、酶标仪(德国Thermo公司),倒置显微镜(美国Life公司),Real-time qPCR仪(美国Bio-Rad公司),流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 细胞中miR-206 qPCR检测

收集组织样品,将组织放入研钵中加入适量液氮进行研磨,组织研碎后加入1 mL Trizol,按照Trizol法说明书提取细胞总RNA。按照All-in-One miRNA qRT-PCR Detection kit试剂盒说明书操作进行反转录合成cDNA,得到的cDNA样品通过SYBR Green法进行qPCR检测miR-206的表达情况。miR-206及内参U6 PCR的引物均由广州锐博生物科技有限公司合成。引物序列为miR-206上游5'-GGCCGCTGGAATGTAAGGAAG-3',下游5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6上游5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。Real-time qPCR反应步骤:95℃预变性10 min; 95℃变性5 s、60℃退火34 s、72℃延伸3 s,共40个循环。同时检测70~95℃溶解曲线,以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}值比较各组组织之间表达倍数差异。

1.4 细胞培养

待细胞送达实验室后,用含10%胎牛血清的高糖型培养基复苏后培养,在培养基中加入0.1%双抗(青霉素-链霉素)以防细菌感染,加0.1 g/L肝素和生长因子[内皮细胞生长因子粗品(ECCS)0.03~0.05 g/L或纯品(ECGF)50 mg/L]。细胞培养箱设置的条件为37℃、5% CO₂以及95%饱和湿度,适时观察细胞状态,隔天更换培养基,待细胞生长达80%~90%汇合时,吸弃培养基,加入含0.01% EDTA的0.25%胰蛋白酶溶液进行消化约3 min,用含10%胎牛血清培养基终止消化,1 000 r/min离心10 min,弃上清后加入培养液重悬细胞后按1:3比例传代。

1.5 细胞转染

将对数生长期 HUVEC, 以每孔大约 1×10^5 个细胞种植于 6 孔培养板中, 隔夜培养至细胞融合度为 80%, 更换无血清 opti-DMEM 培养基, 同时准备开始转染 miR-206-mimics 和 miR-206-inhibitor。miR-206-mimics 和 miR-206-inhibitor 由上海吉玛制药有限公司合成。采用 Lipofectamine 2000 分别转染 300 nmol/L miR-206-mimics、miR-206-inhibitor 到细胞, 转染步骤参照 Invitrogen 公司给定的说明书。通过 Real-time qPCR 检测转染效果。

1.6 CCK8 检测细胞增殖情况

分别在培养 1 天、2 天、3 天后收集未转染组、miR-206-mimics 组、miR-206-inhibitor 组细胞。在 96 孔板中以 2×10^3 个/孔的细胞数接种, 每组 5 个复孔。在各时间点, 加 5 g/L 的 CCK8 20 μ L 避光培养, 弃上清, 每孔加 150 μ L DMSO 溶液, 避光摇 15 min, 在酶标仪上检测吸光度 (A490) 值。去除离群值, 利用空白对照调零, 绘图软件绘制生长曲线。每个样本独立重复 3 次。

1.7 Transwell 细胞迁移能力评估

收集对数生长期未转染组、miR-206-mimics 组、miR-206-inhibitor 组细胞。用不含血清的低糖 DMEM 培养基重悬计数, 于 Transwell 上室接种 100 μ L 细胞悬液, 下室加入 600 μ L 含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 常规培养 1 天后, 将 Transwell 小室从 24 孔板中拿出, 并吸弃孔中剩余培养基, PBS 润洗一遍, 小室膜下表面用 100% 乙醇室温固定 30 min, 0.1% 结晶紫常温染色 10 min, 清水漂净。倒置显微镜观察结果, 在相同倍数下 (200 \times) 随机选择 5 个视野, 计算迁移细胞数量, 求出平均值。

1.8 流式细胞仪进行细胞周期检测

未转染组、miR-206-mimics 组、miR-206-inhibitor 组三组细胞均铺布于 100 mm 直径培养皿中, 使其培养 1 天后密度达 60% ~ 80%。2 天后收集全部细胞, 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜后加入 0.05 g/L PI, 室温暗处孵育 30 min, 用 FAC Scan 测 DNA 含量, 实验重复 3 次。FAC Station running Cell Quest 软件分析结果, 统计不同周期细胞所占百分比。

1.9 Western blot 检测各组细胞 Cx43 表达情况

收集未转染组、miR-206-mimics 组、miR-206-inhibitor 组三组细胞, 每孔加入 100 μ L 含蛋白酶抑制剂 Cocktail 的细胞裂解液裂解细胞, 用干净的细胞刷刮下所有细胞后, 收集于 1.5 mL EP 管中, 冰浴裂

解半小时。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清即细胞总蛋白。加入适量 Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min, 冰浴 1 min 即可上样。用 5% ~ 12% 非线性 SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品, 半干转法将胶中蛋白转入 PVDF 膜中, 完成后, 将 PVDF 膜加入 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h。按 1 : 2 000 比例加入鼠抗人 β -actin、P27、CDK4 和 CyclinD1 一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜; PVDF 膜用 0.1% TBST 洗 4 次, 用时 7 min; 加入相应的二抗 (1 : 3 000), 室温孵育 1 h; 0.1% TBST 漂洗 4 次, 每次 7 min。ECL 法显影, Bio-Rad 拍照, Image J 软件分析各目的蛋白的表达。

1.10 统计学方法

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Prism5 作图软件作图。SPSS 17.0 用于临床相关性研究, 根据分布类型选择 t 检验或 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 所选患者下肢动脉内皮病变处和正常处组织 miR-206 表达

采用 qPCR 法对所提取的病变处组织和正常组织检测 miR-206 的表达情况, 结果发现, 糖尿病动脉硬化病变处 miR-206 表达比正常组织明显增加 ($P < 0.01$, 图 1), 表明 miR-206 增加可能是糖尿病下肢动脉硬化受损内皮细胞的一个生物学标志之一。

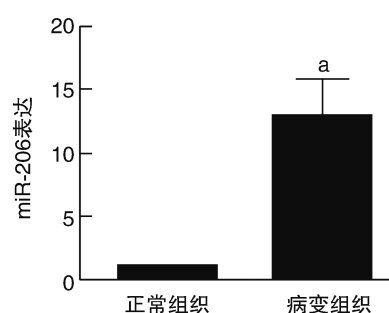


图 1. 正常血管内皮和病变血管内皮组织 miR-206 表达
a 为 $P < 0.05$, 与正常组织比较。

Figure 1. miR-206 was expressed in both normal and diseased vascular endothelial tissues

2.2 miR-206-mimics 及 miR-206-inhibitor 转染效率与未转染组比较, miR-206-mimics 组 miR-206 表达显著升高 ($P < 0.05$), miR-206-inhibitor 组 miR-206 表达明显下降 ($P < 0.05$; 图 2)。

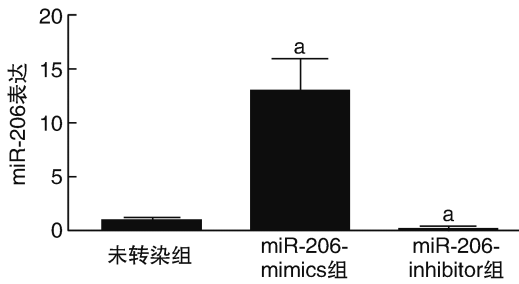


图2. 三组细胞 miR-206 表达情况 a 为 $P < 0.05$, 与未转染组比较。

Figure 2. Expression of miR-206 in the three groups

2.3 miR-206 对 HUVEC 细胞增殖的影响

分别于 24、48、72 h 时检测三组细胞增殖率, 24 h 后, 相比于未转染组和 miR-206-inhibitor 组, miR-206-mimics 组细胞增殖率下降, 说明 miR-206 可以抑制细胞增殖 ($P < 0.05$; 图 3)。

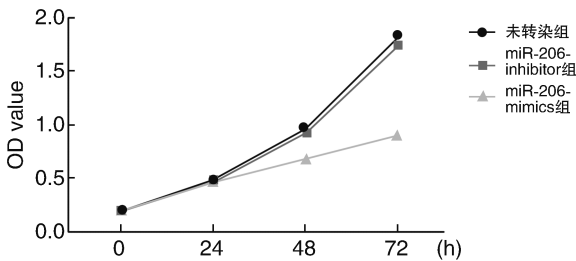


图3. miR-206 对 HUVEC 增殖的影响

Figure 3. Effect of miR-206 on HUVEC proliferation

2.4 miR-206 对细胞迁移的影响

与正常 HUVEC (未转染组) 相比, miR-206-mimics 组细胞迁移数明显降低 ($P < 0.05$), miR-206-inhibitor 组细胞迁移数量明显增加 ($P < 0.05$; 图 4)。

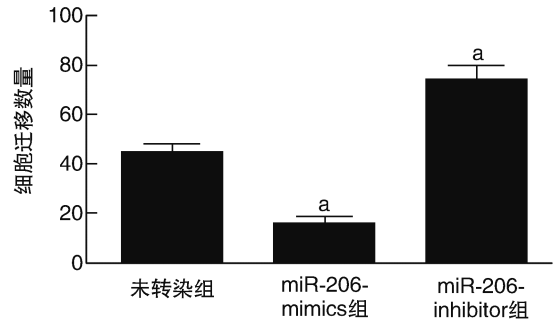


图4. miR-206 对 HUVEC 迁移数量的影响 a 为 $P < 0.05$, 与未转染组比较。

Figure 4. Effect of miR-206 on HUVEC migration

2.5 miR-206 对 HUVEC 周期的影响

与未转染组相比, miR-206-mimics 组 G2/M 期细胞明显增加 ($P < 0.05$), 而 G0/G1 期和 S 期细胞则出现明显减少 ($P < 0.05$), miR-206-inhibitor 组 S 期细胞明显增加 ($P < 0.05$), G2/M 期细胞明显减少 ($P < 0.05$; 图 5), 说明 miR-206 能使细胞在 G2 期发生阻滞。

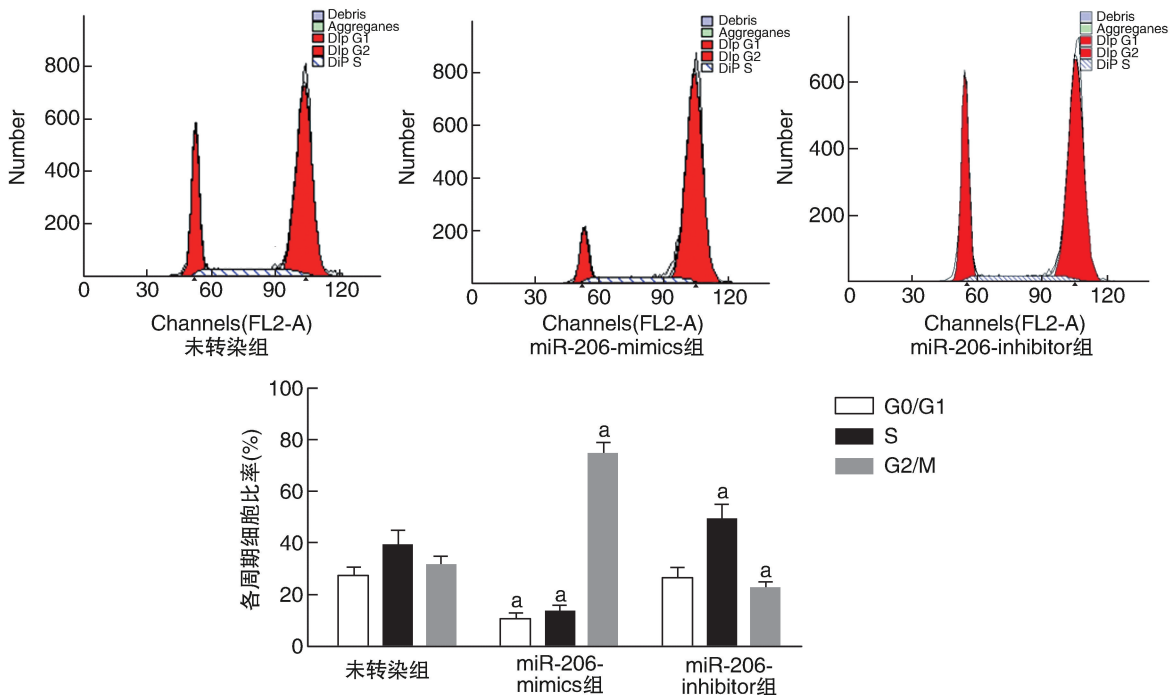


图5. 三组细胞不同细胞周期比例 a 为 $P < 0.05$, 与未转染组比较。

Figure 5. The cell cycle ratios of the three groups

2.6 Western blot 检测三组细胞 Cx43 表达情况

与未转染组比较, miR-206-mimics 组 Cx43 表达明显降低 ($P < 0.05$), miR-206-inhibitor 组 Cx43 表达明显增加 ($P < 0.05$; 图 6)。

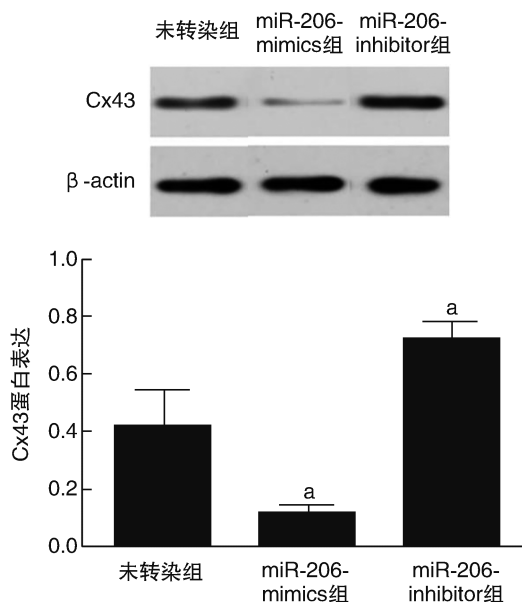


图 6. 各组 Cx43 蛋白表达情况 a 为 $P < 0.05$, 与未转染组比较。

Figure 6. Cx43 protein expression in each group

3 讨论

miRNA 是最大的一类基因表达转录后调控因子, 据推测受到 miRNA 调控的人类基因超过 30%^[1]。近十年来, miRNA 一直是分子生物学领域的研究热点, 并且近年来国内外开展了大量关于 miRNA 与动脉粥样硬化发生机制的研究, 其表达水平的高低与动脉内皮功能密切相关^[16]。有研究证实^[17-18], miR-206 在一些肿瘤组织中发挥作用, 在乳腺癌组织中存在 miR-206 低表达增强乳腺癌细胞增殖和远处转移能力, 及 miR-206 与细胞增殖和迁移有关。

本研究中, 我们以 150 例糖尿病下肢动脉硬化患者为研究对象, 取下肢动脉血管病变处和正常处内皮组织, 提取并定量检测 miR-206, 结果发现动脉粥样硬化病变处内皮细胞 miR-206 的 mRNA 表达明显增加, 而正常下肢动脉内皮细胞则刚好相反。上述研究提示 miR-206 可能对动脉粥样硬化内皮细胞的功能发挥起重要作用。并且在后续的以 HUVEC 为研究对象的基础实验中发现, HUVEC 细胞中过表达 miR-206 后, 细胞增殖能力和侵袭迁移

能力明显减弱, 在细胞周期实验中, 过表达 miR-206 后, 细胞周期阻滞在 G2 期。可见 miR-206 可以明显抑制动脉内皮细胞增殖和迁移能力, 及通过抑制内皮细胞增殖, 使破坏的内皮组织无法修复, 并且通过抑制内皮细胞迁移, 使病变处周围正常组织无法移动到病变处进行修补从而促进内皮细胞进一步破坏, 而内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化发生、发展的起始动因。因此我们可以以针对 miR-206 来进行动脉粥样硬化的诊疗。

有研究发现^[19-21], 连接蛋白 (connexin, Cx) 是存在于相邻细胞间的膜通道结构缝隙连接的基本组成单位, 其对于细胞增殖、转移、细胞间相互沟通起到重要作用。其中连接蛋白 Cx43 作为转录后调控因子, 其启动子上存在着多个转录因子的结合位点, 并且在我们的研究中发现, miR-206 过表达 HUVEC 中后, 细胞中 Cx43 的蛋白水平明显增加, 而抑制 HUVEC 中 miR-206 表达后, 细胞中 Cx43 的蛋白水平明显下降, 由此我们推测 miR-206 可以调控 Cx43 的表达, 是 Cx43 众多调控因素之一。并因此猜测 miR-206 通过调节 Cx43 的表达来实现对血管内皮细胞增殖、迁移的调控。

综上, miR-206 通过抑制血管内皮细胞增殖在动脉粥样硬化中发挥致病性, 促进动脉粥样硬化的发生、发展。并且我们猜测 miR-206 功能的发挥可能是通过 Cx43 蛋白表达来实现的。本研究以 miR-206 为研究点, 为临床诊疗动脉粥样硬化提供新的方案, 对于动脉粥样硬化中的其他致病位点以及 Cx43 具体致病机制, 还有待进一步探索。

[参考文献]

- [1] 孙平, 肖乐, 龚昆梅, 等. 应用微阵列芯片分析糖尿病大鼠下肢动脉硬化 miRNAs 差异表达谱[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5): 917-922.
- [2] Sakellarios AI, Raber L, Bourantas CV, et al. Prediction of atherosclerotic plaque development in an in vivo coronary arterial segment based on a multilevel modeling approach[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2017, 64(8): 1721-1730.
- [3] Auguet T, Aragonès G, Guiu-Jurado E, et al. Adipo/cytokines in atherosclerotic secretomes: increased visfatin levels in unstable carotid plaque[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2016, 16(1): 149
- [4] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报, 2015, 36(2): 141-152.
- [5] 杨凯麟, 曾柳庭, 葛金文. 基于网络药理学的丹参干预动脉粥样硬化分子机制的分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(4): 407-413.

- [6] 王热华. 白藜芦醇对糖尿病 ApoE 小鼠动脉粥样硬化的影响及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2017: 1-10.
- [7] 温婷, 袁锋, 尚茹茹. 糖尿病与动脉粥样硬化相关机制的研究[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(7): 999-1002.
- [8] 杜宏伟. 同时合并高血压和糖尿病的老年人血压和血糖控制与颈动脉粥样硬化的相关性研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2012: 2-7.
- [9] 徐旭英, 孙丽蕴. 糖尿病足与下肢动脉硬化闭塞症相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1843-1845.
- [10] 周辰光, 董巍巍, 赵晓静. 下肢动脉硬化闭塞症合并糖尿病足的介入治疗及其研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(1): 109-111.
- [11] 王红, 石岩, 田向东, 等. 彩色多普勒超声与踝、趾臂指数在诊断2型糖尿病下肢中小型动脉病变中的价值[J]. 宁夏医学杂志, 2013, 35(12): 1186-1187.
- [12] 陈海峰, 卢楠, 赵月明. 内脂素在人脐静脉内皮细胞增殖凋亡中的作用及机制[J]. 中华高血压杂志, 2016, 12(24): 1166-1169.
- [13] 梁健球. 关于心肌梗死后心力衰竭患者血浆中 miRNA 表达及基于 ECHO 的心肌能量消耗的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013: 15-23.
- [14] 金晓露, 杨建香, 李真. 乳腺发育及泌乳相关 miRNA 研究进展[J]. 遗传, 2013, 35(6): 695-702.
- [15] 郑刚. 动脉粥样硬化及其相关心血管疾病药物治疗新靶点的研究进展[J]. 世界临床药物, 2018, 39(1): 54-58.
- [16] 王来娣, 郑云, 蒋拾贝. miRNA 在脂代谢中的研究进展[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7): 1446-1452.
- [17] 杜俊泽. miRNA-206 通过调控 Cx43 表达对乳腺癌细胞影响及其机制的初步探讨[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014: 26-78.
- [18] 张培培. miR-206 对婴幼儿血管瘤内皮细胞增殖的影响及作用机制的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2015: 31-45.
- [19] 徐建国. 上调 miR-206 对婴幼儿血管瘤内皮细胞生长状态和侵袭能力的影响[J]. 中国美容整形外科杂志, 2016, 27(4): 238-240.
- [20] Chojnacka K, Hejmej A, Zarzycka M, et al. Flutamide induces alterations in the cell-cell junction ultrastructure and reduces the expression of Cx43 at the blood-testis barrier with no disturbance in the rat seminiferous tubule morphology[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2016, 3(14): 14.
- [21] 张才臻, 母晓凤, 徐先祥, 等. 下调间隙连接蛋白 43 表达对血管内皮细胞生物功能的影响[J]. 药学报, 2015, 50(3): 298-304.

(此文编辑 许雪梅)