

miR-20a-5p 通过靶向 MRTFA 缓解 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤

王晓景¹, 张明星², 陈小亮³

(1. 武汉市普仁医院心血管内科, 湖北省武汉市 430060; 2. 湖北省武警总队医院心胸外科, 湖北省武汉市 430060; 3. 郴州市第一人民医院心内科, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] miR-20a-5p; 内皮损伤; 心肌素相关转录因子 A; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨 miR-20a-5p 是否可通过靶向心肌素相关转录因子 A (MRTFA) 缓解氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤。方法 RT-qPCR 检测 miR-20a-5p 在不同剂量不同时间 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中的表达; MTT 法、流式细胞术和 Western blot 检测过表达 miR-20a-5p 和 MRTFA 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 增殖和凋亡的影响; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒测定过表达 miR-20a-5p 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 中 LDH 释放的影响; ELISA 法检测过表达 miR-20a-5p 和 MRTFA 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中氧化应激指标超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和丙二醛 (MDA) 的影响; 荧光素酶报告和 Western blot 实验验证 miR-20a-5p 与 MRTFA 的靶向关系。结果 miR-20a-5p 的表达随着 ox-LDL 诱导时间和剂量的增加而逐渐下降; 过表达 miR-20a-5p 可部分逆转 ox-LDL 诱导对 HUVEC 增殖和凋亡的影响; 上调 miR-20a-5p 可部分修复 ox-LDL 诱导对 HUVEC 氧化应激损伤; MRTFA 是 miR-20a-5p 的靶基因; 在 ox-LDL 诱导 HUVEC 中, MRTFA 过表达可逆转 miR-20a-5p 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞增殖和凋亡、氧化应激损伤指标的影响。结论 miR-20a-5p 靶向 MRTFA 修复 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

MiR-20a-5p alleviated endothelial cell injury induced by ox-LDL through regulating MRTFA

WANG Xiaojing¹, ZHANG Mingxing², CHEN Xiaoliang³

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Wuhan Puren Hospital, Wuhan, Hubei 430060; 2. Cardiothoracic Surgery Department, Hubei Provincial General Hospital of the Chinese People's Armed Police Force, Wuhan, Hubei 430060; 3. Department of Cardiology, Chenzhou NO. 1 People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[KEY WORDS] miR-20a-5p; endothelial injury; myocardin-related transcription factor A; cell apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether microRNA-20a-5p (miR-20a-5p) alleviates oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by targeting myocardin-related transcription factor A (MRTFA). **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-20a-5p in HUVEC induced by ox-LDL of various doses at different time. MTT, flow cytometry and Western blot assays were performed to evaluate the effect of overexpression of miR-20a-5p and MRTFA on the ox-LDL-induced proliferation and apoptosis of HUVEC. Lactate dehydrogenase (LDH) kit was conducted to determine the effect of overexpression of miR-20a-5p on ox-LDL-induced LDH release in HUVEC. ELISA assay was employed to examine the effects of upregulation of miR-20a-5p and MRTFA on ox-LDL-mediated changes of oxidative stress indexes superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and malondialdehyde (MDA) in HUVEC. Luciferase reporter Western blot assays was introduced to validate the relationship between miR-20a-5p and MRTFA. **Results** The expression of miR-20a-5p was significantly decreased in a time or dose dependent manner. Overexpression of miR-20a-5p attenuated the effect of ox-

[收稿日期] 2019-01-26

[修回日期] 2019-03-28

[基金项目] 郴州市科技局项目 (czkj2016060)

[作者简介] 王晓景, 主治医师, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 dc112018@163.com。通信作者陈小亮, 硕士, 主任医师, 研究方向为心血管内科。

LDL on proliferation, apoptosis, and LDH release in HUVEC. Upregulation of miR-20a-5p repaired ox-LDL-induced oxidative stress injury in HUVEC. MRTFA was a direct target gene of miR-20a-5p. MRTFA overexpression undermined the effects of miR-20a-5p on proliferation, apoptosis, and oxidative stress injury index in ox-LDL-treated HUVEC.

Conclusion miR-20a-5p can repair ox-LDL-induced HUVEC damage via targeting MRTFA.

动脉粥样硬化是一种常见的心血管疾病,该病的发生发展与内皮细胞损伤机制密切相关,心血管的早期疾病特征为内皮细胞功能紊乱,进而引起血管结构和形态发生明显改变,内皮功能损伤被认为是动脉粥样硬化的关键环节^[1]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可通过引起内皮细胞损伤^[2]和功能障碍进而促进动脉粥样硬化的发展。近些年研究表明,纠正异常的内皮功能可有效防治心血管疾病^[3]。Chen等^[4]发现 ox-LDL 诱导可抑制主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)中 miR-20a-5p 的表达, miR-20a-5p 可负调节 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和 NLR 家族热蛋白结构域包含蛋白 3(NLR family, pyrin domain-containing 3, NLRP3) 信号转导以保护 HAEC 免受炎症损伤。Fang 等^[5]发现 ox-LDL 诱导人静脉血管内皮细胞和大动脉内皮细胞中心肌素相关转录因子 A(myocardin-related transcription factor A, MRTFA) 的表达, MRTFA 可作为转录因子通过调节细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 表达调控 ox-LDL 诱导的内皮损伤,表明 MRTFA 与内皮细胞损伤的病理生理机制密切相关。而 miR-20a-5p 是否可通过 MRTFA 参与内皮细胞损伤的调节仍未可知。通过 Targetscan 及 Micode 预测 miR-20a-5p 可能与 MRTFA 靶向结合,因此,本研究拟以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象,以 ox-LDL 诱导内皮细胞功能紊乱,并以此为模型探讨 miR-20a-5p 靶向调控 MRTFA 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 的影响及其可能的分子机制,为 miR-20a-5p 靶向调控 MRTFA 治疗动脉粥样硬化的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为 GIBCO 公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT)为美国 AMRESCO 公司产品;二甲基

亚砷(DMSO)为美国 Sigma 公司产品;丙二醛(molondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和 eNOS 试剂盒为南京建成生物工程研究所;双荧光素酶活性检测试剂盒、miRNeasy Mini Kit 试剂盒、Total RNA 提取试剂盒和 miRNA qRT-PCR SYBR[®] Kit 购于 TaKaRa 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司;蛋白免疫印记法(Western blot, WB)中所用一抗为博士德生物有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 IgG 为北京中杉金桥生物技术有限公司;miR-NC、miR-20a-5p mimics、miR-NC inhibitors(anti-miR-NC)、miR-20a-5p inhibitors(anti-miR-20a-5p)、pcDNA3.0 空载、pcDNA3.0 MRTFA 为美国 Beckman Coulter 产品。

1.2 ox-LDL 制备及鉴定

利用硫酸铜(CuSO₄)修饰低密度脂蛋白制备 ox-LDL,采用硫代巴比妥酸法鉴定。

1.3 细胞培养

HUVEC 购于美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC),培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,培养条件为 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞长至 80% 融合度进行后续实验。

1.4 实验分组

(1)不同浓度 ox-LDL 处理 HUVEC:0、25、50、100 mg/L;50 mg/L 的 ox-LDL 处理 HUVEC 不同时间:0、12、24、48 h。(2)对照组:10% FBS 的 DMEM 培养液;(3)ox-LDL 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液;(4)ox-LDL + miR-NC 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液 + miR-NC;(5)ox-LDL + miR-20a-5p 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液 + miR-20a-5p mimics;(6)ox-LDL + anti-miR-20a-5p 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液 + miR-20a-5p inhibitor;(7)ox-LDL + miR-20a-5p + Vector 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液 + miR-20a-5p mimics + pcDNA3.0 空载;(8)ox-LDL + miR-20a-5p + MRTFA 组:10% FBS + 50 mg/L 的 ox-LDL 培养液 + miR-20a-5p mimics + MRTFA 过表达载体。(9)荧光素酶报告

基因实验: miR-NC 与 miR-20a-5p mimics 分别与 MRTFA-WT 或 MRTFA-MUT 质粒共转染; miR-NC inhibitor 与 miR-20a-5p inhibitor 分别与 MRTFA-WT 或 MRTFA-MUT 质粒共转染。

1.5 RT-qPCR

采用总 RNA 提取试剂盒和 miRNeasy Mini Kit 试剂盒提取待测细胞的总 RNA 和 miRNA, 以紫外分光光度仪检测 RNA 的浓度与纯度。以 RNA 为模板, 参照相对应的反转录试剂盒操作步骤反转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 检测。其中, miR-20a-5p 与 U6 引物来源于 mi-croRNA Real-time PCR 试剂盒; 以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-20a-5p 的表达水平。

1.6 细胞活力测定

取对数生长期细胞, 调整细胞密度至 $1 \times 10^8/L$, 接种至 96 孔板, 不同处理组设置 5 个重复, 待细胞长至待检测时间点, 加入 MTT 10 μL , 继续培养 4 h, 每孔加入 DMSO 溶解结晶, 在 490 nm 处用酶标仪测定吸光度值。实验重复 3 次。

1.7 LDH 活性测定

按照上述分组处理细胞, 收集上清培养液, 取 6 μL 样品与 200 μL LDH 试剂盒 R1 试剂混匀, 37 $^{\circ}C$ 孵育 3 min, 再加入 100 μL R2 试剂, 37 $^{\circ}C$ 孵育 90 s, 全自动化监测 2 min 吸光度值, 根据公式 $LDH(U/L) = A/min \times F$ 计算 $\Delta A/min$ 。

1.8 Western blot 检测

根据碧云天蛋白抽提试剂盒提取细胞总蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒进行浓度测定, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白, 将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉进行封闭, 用相应的一抗 (cleaved Caspase-3, Bcl-2 和 MRTFA) 4 $^{\circ}C$ 进行孵育, 37 $^{\circ}C$ 辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h, 滴加 ECL 化学发光剂显影, 凝胶成像系统分析。

1.9 细胞凋亡检测

按上述各分组处理细胞, 继续培养 48 h 后, Annexin V (5 μL) 和 PI (5 μL) 对细胞进行处理, 然后利用流式细胞仪对细胞凋亡率进行分析。

1.10 MDA、NO、SOD 和 eNOS 含量的测定

将细胞消化, 制备 $1 \times 10^8/L$ 的细胞悬液, 接种至 24 孔板, 按照上述实验分组, 进行相应处理, 继续培养 24 h, 取细胞培养上清液检测 NO, 取细胞裂解液检测细胞内 MDA、SOD 和 eNOS 含量, 操作步骤参考对应试剂盒。

1.11 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用 SPSS22.0 进行

统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 One-way ANOVA test, 两组间比较采用 Student's t test。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 处理抑制 HUVEC 中 miR-20a-5p 的表达

与对照组相比, miR-20a-5p 表达量随着 ox-LDL 剂量的增加而不断降低, 呈现剂量依赖性 ($P < 0.05$, 表 1)。本试验选择 50 mg/L 的 ox-LDL 作为后续实验中诱导 HUVEC 氧化应激损伤模型浓度; 用 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 HUVEC, RT-qPCR 检测不同时间点下 miR-20a-5p 表达量, 发现 miR-20a-5p 的表达量随着 ox-LDL 处理时间的增加而不断降低, 呈现时间依赖性 ($P < 0.05$, 表 2)。本试验最终选择 24 h 作为 ox-LDL 诱导 HUVEC 氧化应激损伤模型时间。

表 1. 不同浓度 ox-LDL 对 HUVEC 表达 miR-20a-5p 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1. Effect of different concentrations of ox-LDL on the expression of miR-20a-5p in HUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

ox-LDL 浓度	miR-20a-5p 相对表达量
0 mg/L (对照组)	1.00 \pm 0.08
25 mg/L	0.84 \pm 0.03 ^a
50 mg/L	0.55 \pm 0.03 ^{ab}
100 mg/L	0.34 \pm 0.02 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 25 mg/L 的 ox-LDL 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 50 mg/L 的 ox-LDL 组相比。

表 2. 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 HUVEC 不同时间对 miR-20a-5p 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2. Effects of 50 mg/L ox-LDL on the expression of miR-20a-5p in HUVEC at different time ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

ox-LDL 处理时间	miR-20a-5p 相对表达量
0 h (对照组)	1.00 \pm 0.07
12 h	0.81 \pm 0.05 ^a
24 h	0.52 \pm 0.03 ^{ab}
48 h	0.36 \pm 0.01 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 12 h 处理组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 24 h 处理组相比。

2.2 miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖和凋亡的影响

与 ox-LDL+miR-NC 组相比, ox-LDL+miR-20a-

5p 组中 miR-20a-5p 表达显著上调 ($P < 0.05$, 图 1A); 细胞活力显著增加 ($P < 0.05$, 表 3); 细胞 LDH 释放显著降低 ($P < 0.05$, 表 3)。Western blot 检测凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 的表达, 结果显示, 与 ox-LDL+miR-NC 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p 组细胞 cleaved Caspase-3 表达显著下调, Bcl-2 显

著上调 ($P < 0.05$, 图 1B 和表 4); 流式细胞术检测 HUVEC 凋亡发现, 与 ox-LDL+miR-NC 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$, 图 1C 和表 4), 上述结果表明, 过表达 miR-20a-5p 可缓解 ox-LDL 对 HUVEC 造成的凋亡促进和增殖抑制。

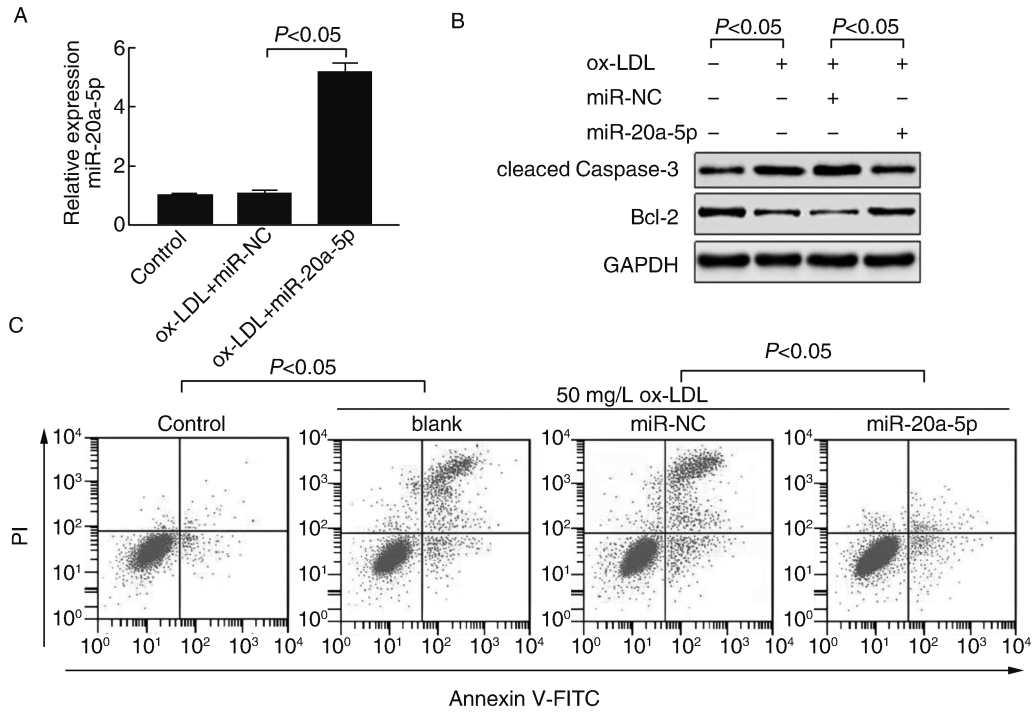


图 1. miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 凋亡的影响 A 为 RT-qPCR 检测 miR-20a-5p 在细胞中的表达; B 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达; C 为流式细胞术检测细胞凋亡。

Figure 1. Effect of miR-20a-5p on apoptosis in ox-LDL-treated HUVEC

表 3. miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3. Effect of miR-20a-5p on the viability of HUVEC treated with ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	细胞活力 (% of Control)	LDH 释放 (fold of Control)
对照组	100.00±5.20	1.00±0.06
ox-LDL 组	50.21±3.23 ^a	2.58±0.15 ^a
ox-LDL+miR-NC 组	58.40±3.30	2.52±0.14
ox-LDL+miR-20a-5p 组	79.60±3.41 ^b	1.36±0.09 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+miR-NC 组相比。

2.3 miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中氧化应激的影响

与 ox-LDL+miR-NC 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p 组细胞 SOD、NO、eNOS 显著升高 ($P < 0.05$),

MDA 显著降低 ($P < 0.05$, 表 5), 表明 miR-20a-5p 上调可显著减少 ox-LDL 引起的氧化应激。

表 4. miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4. Effect of miR-20a-5p on apoptosis of HUVEC treated with ox-LDL ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	cleaved Caspase-3 蛋白	Bcl-2 蛋白	细胞 凋亡率 (%)
对照组	1.00±0.06	1.00±0.05	7.8±0.5
ox-LDL 组	2.28±0.09 ^a	0.57±0.02 ^a	22.1±1.0 ^a
ox-LDL+miR-NC 组	2.32±0.07	0.49±0.01	23.9±1.1
ox-LDL+miR-20a-5p 组	1.17±0.09 ^b	0.87±0.03	9.2±0.5 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+miR-NC 组相比。

表 5. miR-20a-5p 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 氧化应激的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)Table 5. Effect of miR-20a-5p on oxidative stress in HUVEC treated with ox-LDL ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分 组	SOD(mU/L)	MDA(ng/L)	NO(μ mol/L)	eNOS(U/L)
对照组	65.36 \pm 3.43	3.16 \pm 0.15	78.06 \pm 3.21	30.06 \pm 2.06
ox-LDL 组	52.24 \pm 2.48 ^a	4.26 \pm 0.21 ^a	68.23 \pm 2.56 ^a	24.35 \pm 1.17 ^a
ox-LDL+miR-NC 组	54.37 \pm 3.16	4.48 \pm 0.23	66.37 \pm 2.41	22.61 \pm 1.14
ox-LDL+miR-20a-5p 组	63.26 \pm 3.06 ^b	3.28 \pm 0.16 ^b	74.58 \pm 3.01 ^b	28.65 \pm 1.08 ^b

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+miR-NC 组相比。

2.4 MRTFA 是 miR-20a-5 的靶基因

通过 Targetscan 在线预测发现 miR-20a-5p 与 MRTFA 的 3'UTR 存在结合位点(图 2A); 双荧光素酶报告基因实验结果发现, 与 miR-NC 相比, miR-20a-5p 可显著抑制野生型 MRTFA-WT 的荧光素酶活性($P<0.05$), 而不影响 MRTFA-MUT 的荧光素酶活性($P>0.05$)(图 2B); 与 anti-miR-NC 相比, anti-miR-20a-5p 可显著增强野生型 MRTFA-WT 的荧光素酶活性($P<0.05$), 而不影响 MRTFA-MUT 的荧光素酶活性($P>0.05$)(图 2C); Western blot 检测

MRTFA 表达, 结果发现, 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中, 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + miR-20a-5p 组 MRTFA 表达显著下调($P<0.05$; 图 2D 和表 6), 表明过表达 miR-20a-5p 可抑制 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 MRTFA 的表达; 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+anti-miR-20a-5p 组 MRTFA 表达显著上调($P<0.05$)(图 2E 和表 7), 表明抑制 miR-20a-5p 表达可促进 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 MRTFA 表达。上述结果证实 miR-20a-5p 可靶向调控 MRTFA 表达。

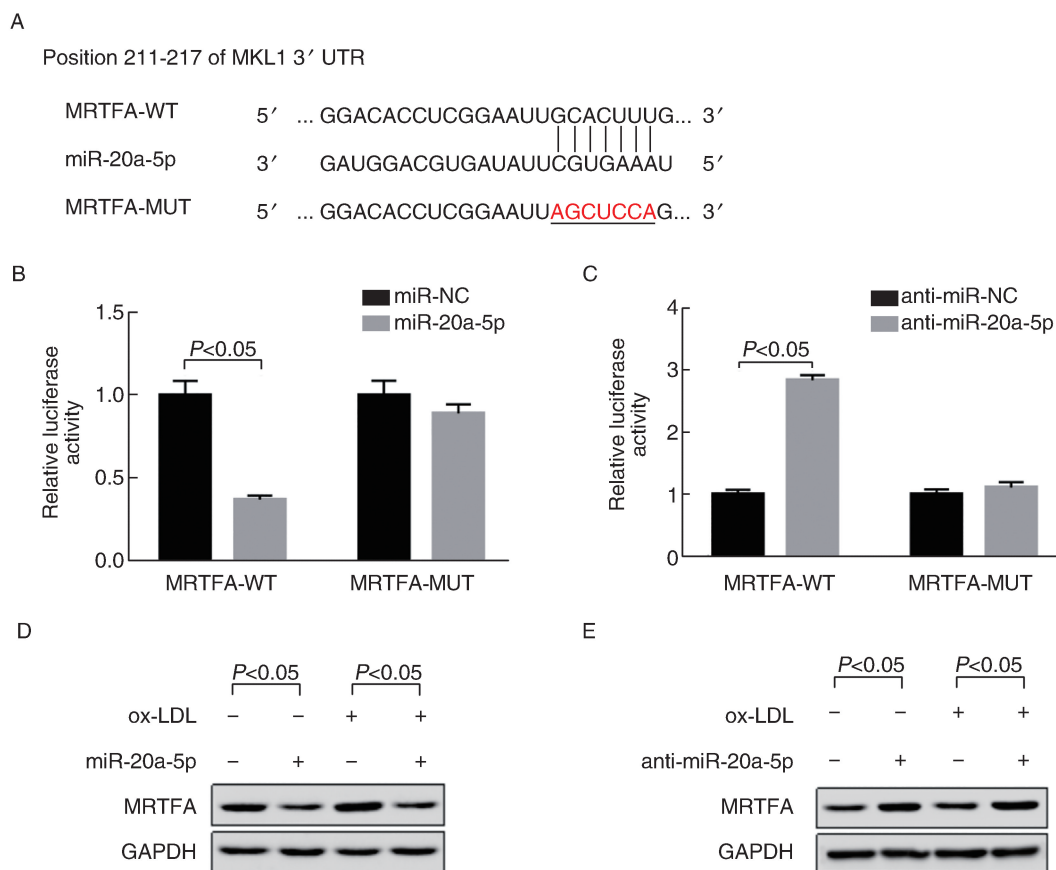


图 2. MRTFA 是 miR-20a-5p 的靶基因 A 为 MRTFA 与 miR-20a-5p 之间的结合位点; B 和 C 为荧光素酶报告基因实验检测 MRTFA 与 miR-20a-5p 的靶向关系; D 和 E 为 Western blot 检测 miR-20a-5p 对 MRTFA 蛋白表达的影响。

Figure 2. MRTFA is a direct target of miR-20a-5p

表 6. 过表达 miR-20a-5p 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 MRTFA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6. Effect of miR-20a-5p overexpression on MRTFA expression in HUVEC induced by ox-LDL($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	MRTFA 蛋白相对表达
对照组	1.00±0.08
miR-20a-5p 组	0.32±0.01 ^a
ox-LDL 组	1.23±0.08
ox-LDL+miR-20a-5p 组	0.42±0.02 ^b

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比。

表 7. miR-20a-5p 下调对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 MRTFA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7. Effect of miR-20a-5p depletion on MRTFA expression in HUVEC induced by ox-LDL ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	MRTFA 蛋白相对表达
对照组	1.00±0.06
anti-miR-20a-5p 组	2.03±0.12 ^a
ox-LDL 组	1.22±0.07
ox-LDL+anti-miR-20a-5p 组	2.32±0.11 ^b

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比。

2.5 miR-20a-5p 通过 MRTFA 调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖和凋亡

与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p+MRTFA 组细胞活力显著降低 ($P<0.05$), LDH 显著增加 ($P<0.05$), 表明过表达 MRTFA 可逆转 miR-20a-5p 对细胞活力和 LDH 释放的影响 (表 8)。Western blot 结果表明, 与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p+MRTFA 组细胞 cleaved Caspase-3 表达显著上调 ($P<0.05$), Bcl-2 表达显著下调 ($P<0.05$), 表明过表达 MRTFA 可逆转 miR-20a-5p 对细胞 cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响 (图 3A 和表 9); 与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p+MRTFA 组细胞凋亡显著增加, 表明过表达 MRTFA 可逆转 miR-20a-5p 对细胞凋亡的抑制作用 (图 3B 和表 9)。上述结果表明 MRTFA 参与 miR-20a-5p 调控内皮细胞损伤的过程。

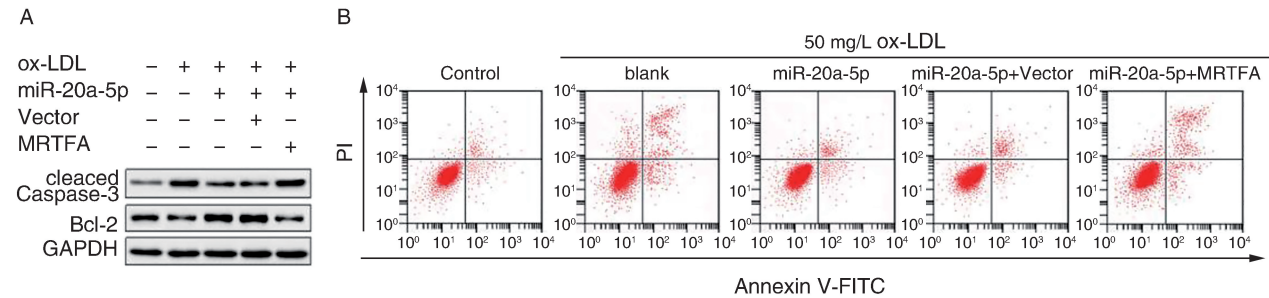


图 3. miR-20a-5p 通过 MRTFA 影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡 A 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达; B 为流式细胞术检测细胞凋亡。

Figure 3. miR-20a-5p regulated apoptosis in ox-LDL-treated HUVEC by targeting MRTFA

表 8. miR-20a-5p 通过 MRTFA 影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞活力($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8. miR-20a-5p regulated cell viability in ox-LDL-treated HUVEC by targeting MRTFA($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	细胞活力 (% of Control)	LDH 释放 (fold of Control)
对照组	100.00±4.00	1.00±0.05
ox-LDL 组	53.36±3.14 ^a	2.62±0.15 ^a
ox-LDL+miR-20a-5p 组	75.46±3.18 ^b	1.47±0.08 ^b
ox-LDL+miR-20a-5p+ Vector 组	79.10±3.40	1.39±0.08
ox-LDL+miR-20a-5p+ MRTFA 组	50.21±3.26 ^c	2.48±0.16 ^c

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比。

表 9. miR-20a-5p 通过 MRTFA 影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞凋亡($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9. Effect of miR-20a-5p on apoptosis in ox-LDL-treated HUVEC by targeting MRTFA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	cleaved Caspase-3 蛋白	Bcl-2 蛋白	细胞凋亡率 (%)
对照组	1.00±0.07	1.00±0.06	8.84±0.65
ox-LDL 组	2.36±0.10 ^a	0.73±0.03 ^a	22.36±1.12 ^a
ox-LDL+miR-20a- 5p 组	1.37±0.07 ^b	1.39±0.07 ^b	13.13±0.97 ^b
ox-LDL+miR-20a- 5p+Vector 组	1.26±0.06	1.40±0.05	15.21±0.98
ox-LDL+miR-20a- 5p+MRTFA 组	2.46±0.13 ^c	0.53±0.09 ^c	20.06±1.04 ^c

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比。

2.6 miR-20a-5p 通过 MRTFA 调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化损伤

与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比, ox-LDL+miR-20a-5p+MRTFA 组细胞 SOD、NO 和 eNOS 显著降低

($P<0.05$), MDA 显著升高($P<0.05$), 表明 MRTFA 可逆转 miR-20a-5p 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化损伤指标的影响(表 10)。

表 10. miR-20a-5p 通过 MRTFA 影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞氧化应激($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 10. miR-20a-5p affects ox-LDL-induced oxidative stress in HUVEC cells by targeting MRTFA ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分 组	SOD (mU/L)	MDA (ng/L)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	eNOS (U/L)
对照组	68.37 \pm 3.41	3.31 \pm 0.16	75.18 \pm 3.22	32.07 \pm 2.07
ox-LDL 组	53.26 \pm 2.41 ^a	4.28 \pm 0.23 ^a	68.03 \pm 2.41 ^a	23.38 \pm 1.14 ^a
ox-LDL+miR-20a-5p 组	64.28 \pm 3.05 ^b	3.24 \pm 0.16 ^b	72.28 \pm 3.05 ^b	29.15 \pm 1.09 ^b
ox-LDL+miR-20a-5p+Vector 组	62.36 \pm 3.08	3.32 \pm 0.18	74.53 \pm 3.14	28.15 \pm 1.02
ox-LDL+miR-20a-5p+MRTFA 组	50.64 \pm 2.47 ^c	4.36 \pm 0.26 ^c	64.32 \pm 2.56 ^c	25.31 \pm 1.10 ^c

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+miR-20a-5p 组相比。

3 讨 论

内皮细胞功能紊乱^[6]是一个复杂的过程, 研究表明, 内皮细胞功能紊乱是动脉粥样硬化等心血管疾病的重要特征。ox-LDL 作为内皮细胞损伤的主要原因, 可通过直接引起内皮细胞损伤和与血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 结合诱导内皮细胞氧化应激损伤, 加速脂质沉积、血管收缩性改变等病理性损伤的发生进而促进动脉粥样硬化的发展。因此, 本研究以 ox-LDL 诱导的 HUVEC 为模型进行研究。

越来越多的研究发现 miRNA 与动脉粥样硬化的发生发展密切相关^[7], miRNA 通过对内皮细胞结构及功能、细胞增殖凋亡及迁移等细胞生物学功能^[8-9]的调控参与其中。有研究表明下调 miR-92a^[10]可抑制内皮细胞的损伤, miR-195 可减少炎症因子释放^[11], 下调其表达可加速动脉粥样硬化斑块形成, 过表达 miR-24^[12]可明显增强 HUVEC 迁移、增殖, 促进血管新生。最新研究表明 miR-20a-5p 可负向调节 TLR4 和 NLRP3 信号转导以保护 HAEC 免受炎症损伤。在本研究中, RT-qPCR 检测 miR-20a-5p 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中的表达, 结果发现, 与正常 HUVEC 相比, miR-20a-5p 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中表达下调, 且随着 ox-LDL 处理浓度和时间的增加, miR-20a-5p 表达差异越显著。本研究采用 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 24 h 作为 ox-LDL 诱导 HUVEC 模型的条件。后续研究中, 将 miR-20a-5p mimics 转染至 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中, 检

测细胞的增殖和凋亡情况, 结果显示, ox-LDL 诱导会导致 HUVEC 增殖活性减弱, LDH 的释放增加, 促凋亡因子 cleaved Caspase-3^[13]表达上调, 抑凋亡因子 Bcl-2^[14]表达下调, 细胞凋亡率显著增加; miR-20a-5p 表达上调可部分逆转 ox-LDL 诱导对 HUVEC 增殖和凋亡的影响。

动脉硬化形成会导致 ROS 产生增加, 机体清除氧自由基的主要 SOD^[15]酶活性下降, 进而导致细胞通透性增加, 加重细胞损伤, 同时 ROS 还能氧化低密度脂蛋白生成 ox-LDL; 而 ox-LDL 可抑制内皮细胞中 NOS 的活性, 加速 NO 溶解, 致使内皮细胞功能失调, NO 是一种自由基分子, 具有抑制血小板聚集、白细胞黏附以及平滑肌细胞增殖等功能, 也是完整内皮抵抗动脉硬化的机制之一, HUVEC 的 NO 是由 eNOS 催化氧化 L-精氨酸生成, 它可抑制脂质过氧化和自由基的产生; MDA^[16]是反应机体脂质过氧化的主要标志物。接着本研究以 MDA、SOD、NO、eNOS 作为 HUVEC 中氧化应激指标^[17], 检测 miR-20a-5p 过表达对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激损伤的修复作用。结果发现, ox-LDL 诱导会导致 HUVEC 中 SOD、NO、eNOS 显著降低, 而 MDA 显著升高, 过表达 miR-20a-5p 可部分修复 ox-LDL 诱导对 HUVEC 氧化应激损伤。

MRTFA 作为转录因子参与血管平滑肌特异基因的转录调控从而影响平滑肌的舒缩功能^[18], 近期也有研究表明在 ox-LDL 诱导内皮细胞后, MRTFA 表达显著增加, 干扰 MRTFA 表达可抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞功能失调^[5]。本研究通过生物信息学在线预测分析网站预测到 miR-20a-5p 与 MRTFA

的3'UTR存在结合位点,双荧光素酶报告基因实验和Western blot结果证实miR-20a-5p可靶向并调控MRTFA表达,在ox-LDL诱导HUVEC中,过表达miR-20a-5p可抑制MRTFA表达,而敲低miR-20a-5p上调MRTFA表达。因此我们大胆预测miR-20a-5p靶向调控MRTFA参与ox-LDL诱导的HUVEC损伤修复过程。进一步研究发现,在ox-LDL诱导HUVEC中,miR-20a-5p和MRTFA同时过表达可逆转miR-20a-5p对ox-LDL诱导的HUVEC细胞增殖的抑制作用,同时与miR-20a-5p过表达组相比,miR-20a-5p和MRTFA同时过表达可使促凋亡因子cleaved Caspase-3表达上调,抑凋亡因子Bcl-2表达下调,细胞凋亡率显著增加,表明MRTFA可部分逆转miR-20a-5p对ox-LDL诱导的HUVEC增殖和凋亡的影响。进一步检测各个氧化应激指标的变化,发现过表达miR-20a-5p会使ox-LDL诱导的HUVEC中SOD、NO、eNOS显著升高,而MDA显著降低,而miR-20a-5p和MRTFA同时过表达可部分逆转这些指标的变化。

综上所述,本研究发现miR-20a-5p可靶向调控MRTFA表达并对ox-LDL诱导的HUVEC功能损伤进行部分修复,为明确内皮细胞损伤修复机制提供了科学依据,为临床上动脉粥样硬化的靶向治疗提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 709-721.
- [2] Chung MJ, Kim SH, Park JW, et al. Platycodon grandiflorum root attenuates vascular endothelial cell injury by oxidized low-density lipoprotein and prevents high-fat diet-induced dyslipidemia in mice by up-regulating antioxidant proteins [J]. *Nutr Res*, 2012, 32(5): 365-373.
- [3] Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension [J]. *J Hypertens*, 2005, 23(2): 233-246.
- [4] Chen M, Li W, Zhang Y, et al. MicroRNA-20a protects human aortic endothelial cells from Ox-LDL-induced inflammation through targeting TLR4 and TXNIP signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103(4): 191-197.
- [5] Fang F, Yang Y, Yuau Z, et al. Myocardin-related transcription factor a mediates oxLDL-induced endothelial injury [J]. *Circ Res*, 2011, 108(6): 797-807.
- [6] Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(8): 1983-1992.
- [7] Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(1): 7-18.
- [8] Schober A, Schober A, Nazarijahan M, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1 [J]. *Nat Med*, 2015, 20(4): 368-376.
- [9] Zhang X, Mao H, Chen JY, et al. Increased expression of microRNA-221 inhibits PAK1 in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(3): 404-408.
- [10] Zhang L, Zhou M, Qin G, et al. MiR-92a regulates viability and angiogenesis of endothelial cells under oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(4): 952-958.
- [11] 吴小苑, 范文冬. MicroRNA-195参与切应力对血管内皮细胞炎症调控作用的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(10): 26-31.
- [12] 杨鹏, 罗雪兰, 莫国君, 等. miR-24对人脐静脉内皮细胞增殖、转移及自噬的影响 [J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 24-27.
- [13] Pradeep AR, Suke DK, Prasad MV, et al. Expression of key executioner of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease [J]. *J Investig Clin Dent*, 2016, 7(2): 174-179.
- [14] 范宗静, 吴咏, 唐杰, 等. 缺血再灌注损伤人心脏微血管内皮细胞凋亡基因Bcl-2、Bax的表达及黄芪多糖干预研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12): 5603-5606.
- [15] Fukai, T. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(2): 239-249.
- [16] Tian JN, Shi XD, Wang XK, et al. Astemizole protects against human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide via the p53 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4286-4290.
- [17] 刘朝阳. 黄芪注射液对老年高血压患者血小板参数及氧化应激指标的影响 [J]. *河南中医*, 2015, 35(8): 1994-1996.
- [18] Bian H, Lin JZ, Li C, et al. Myocardin-related transcription factor A (MRTFA) regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and its absence in mice leads to osteopenia [J]. *Mol Metab*, 2016, 5(10): 970-979.

(此文编辑 许雪梅)