

miR-21/PTEN/Akt 参与白藜芦醇促 EPC 的体外成血管能力

刘晓飞¹, 武振东¹, 李兰兰², 贺燕婷², 张耀文¹, 李振凤³, 官秀梅², 李宏², 成敏²

(潍坊医学院 1. 生物科学与技术学院, 2. 临床医学院, 3. 医学研究中心, 山东省潍坊市 261053)

[关键词] 白藜芦醇; 内皮祖细胞; miR-21; PTEN; Akt

[摘要] **目的** 探讨 miR-21 及其下游 PTEN/Akt 信号通路在白藜芦醇促进大鼠骨髓源性内皮祖细胞(EPC)体外成血管能力中的作用。**方法** 采用密度梯度离心法分离大鼠四肢骨髓的单个核细胞, 培养于含 10% 胎牛血清的 EGM-2MV 完全培养基中诱导分化成 EPC, 实验用 3~5 代的 EPC。白藜芦醇(20 $\mu\text{mol/L}$) 干预 12 h 后, 采用 Matrigel 胶检测 EPC 的体外成血管能力; 实时荧光定量 PCR 检测 miR-21 及 PTEN 基因的表达情况; 干扰 miR-21 表达后检测 EPC 的体外成血管能力; 双荧光素酶报告基因检测 miR-21 对 PTEN 的靶向调控; Western blot 检测 PTEN 蛋白表达情况以及 Akt 磷酸化水平。**结果** 白藜芦醇(20 $\mu\text{mol/L}$) 明显促进 EPC 的体外成血管能力($P < 0.05$), 抑制了 miR-21($P < 0.01$) 的表达, 然而却促进了 miR-21 下游靶基因 PTEN 的基因($P < 0.01$) 及蛋白表达($P < 0.05$), 进而抑制 PTEN 下游信号分子 Akt 的磷酸化水平。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-21 可与 PTEN mRNA 的 3'UTR 靶向结合($P < 0.01$)。**结论** miR-21 调控了白藜芦醇促 EPC 的体外成血管能力, 其机制可能是通过 PTEN/Akt 信号通路来发挥的, 该研究结果揭示了白藜芦醇调控 EPC 功能一种新的细胞内信号机制。

[中图分类号] R453; R543.5

[文献标识码] A

Effects of miR-21/PTEN/Akt signal pathway on the angiogenesis of EPC promoted by resveratrol

LIU Xiaofei¹, WU Zhendong¹, LI Lanlan², HE Yanting², ZHANG Yaowen¹, LI Zhenfeng³, GUAN Xiumei², LI Hong², CHENG Min²

(1. College of Biological Science and Technology, 2. Clinical Medical School, 3. Medicine Research Center, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

[KEY WORDS] resveratrol; endothelial progenitor cells; miR-21; PTEN; Akt

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of miR-21/PTEN/Akt signal pathway in resveratrol promoting angiogenesis of endothelial progenitor cells(EPC) isolated from rat bone marrow. **Methods** Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation from rat bone marrow and then cultured with EGM-2MV containing 10% fetal bovine serum. 3~5 generations of EPC were used in the experiments. EPC were treated with resveratrol (20 $\mu\text{mol/L}$) for 12 h. And then matrigel, real-time PCR and Western blot were used to detect the angiogenesis, the expression of miR-21 and PTEN mRNA, and the PTEN protein and Akt phosphorylation level of EPC in vitro separately. The dual luciferase reporter system was employed to detect the binding of miR-21 and PTEN mRNA. **Results** Resveratrol (20 $\mu\text{mol/L}$) significantly promoted the angiogenesis of EPC in vitro ($P < 0.05$). In the meantime, resveratrol inhibited the expression of miR-21 which promoted the gene and protein expression of PTEN. PTEN furtherly inhibited the phosphorylation level of Akt. The results of the double luciferase reporter system showed that miR-21 bound to the 3'UTR of PTEN mRNA. **Conclusion** miR-21 regulated the angiogenesis ability of EPC promoted by resveratrol. The present study indicated that miR-21/PTEN/Akt signaling pathway may play an important role in EPC angiogenesis promoted by resveratrol in vitro.

[收稿日期] 2020-02-18

[修回日期] 2020-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81870237、31570941 和 81700406); 山东省高校科研计划项目(J14LK12、J18KA275); 潍坊医学院公派国内访学项目经费资助

[作者简介] 刘晓飞, E-mail 为 lxf19980406@163.com。通信作者李宏, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为细胞功能调控, E-mail 为 lihongno.1978@163.com。

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 可通过分化为成熟的内皮细胞参与损伤内皮的修复过程,从而在防治糖尿病血管并发症、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心脑血管疾病中发挥重要的作用^[1]。因此,众多研究者积极寻找促进 EPC 向内皮细胞分化的药物或化合物,以更好地发挥其血管保护功能。近年的研究证实,白藜芦醇 (resveratrol, Res) 能促进 EPC 的增殖和分化,并改善 EPC 的功能,从而对心血管系统产生保护作用^[2-3],但其确切作用机制尚不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 在多种疾病的发生发展过程中发挥重要的调控功能,其中 miR-21 是近年研究最广泛的 miRNA 之一,其在内皮细胞和 EPC 中高表达,并与心血管疾病的发生发展密切相关^[4]。最新研究显示,miR-21 调控了 EPC 的增殖和成血管能力^[5]。本研究旨在观察 miR-21 在白藜芦醇促进 EPC 体外成血管能力中的作用及可能机制,为临床应用白藜芦醇防治动脉粥样硬化性心脑血管疾病提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SD (Sprague-Dawley) 大鼠 (雌雄不限,体质量 150 ~ 200 g,中国人民解放军第 89 医院实验动物中心); EGM-2MV 完全培养基 (Lonza, 美国),胎牛血清 (Hyclone, 美国); 白藜芦醇、梯度分离液 (Histopaque-1083) 和纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 均购自美国 Sigma 公司; Matrigel 基质胶 (BD, 美国); miR-21、U6、PTEN 及 GAPDH 引物和荧光定量 PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega, 美国); PTEN 一抗、p-Akt/Akt 一抗均购自美国 CST 公司; β -actin 一抗及 HRP-山羊抗兔二抗购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 大鼠骨髓源性 EPC 的分离、培养及鉴定

按本实验室建立的方法^[6]: 无菌分离大鼠四肢骨,用 PBS 冲洗骨髓腔,吹打均匀后, Histopaque-1083 梯度离心分离单个核细胞,用 EGM-2MV 完全培养基重悬后,按 2×10^5 个/cm² 培养于预包被纤维连接蛋白的培养瓶,4 天后 PBS 洗去未贴壁细胞并更换新鲜培养基。在 3 ~ 5 代的 EPC 中加入 Dil-ac-LDL 后 37 °C 孵育 4 h,4% 多聚甲醛固定 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次,再加入 FITC-UEA-1 于 37 °C 孵育 1 h。激光共聚焦显微镜下拍照,同时呈现红色和绿

色荧光的细胞即为实验用 EPC。

1.3 白藜芦醇对 EPC 成血管能力的影响

实验中以 DMSO 处理的 EPC 为空白对照组,20 μ mol/L 白藜芦醇干预的 EPC 为白藜芦醇组 (前期研究结果显示,白藜芦醇可以剂量依赖性方式拮抗 TNF- α 导致的 EPC 功能损伤^[7],因此本实验采用白藜芦醇的浓度为 20 μ mol/L)。提前加 70 μ L Matrigel 胶至 96 孔板,置于细胞培养箱中孵育至 Matrigel 胶凝固。白藜芦醇干预 12 h 后消化各组 EPC 并计数。每孔加入 2×10^4 个细胞,6 h 后倒置显微镜观察形成的管腔样结构。

1.4 白藜芦醇对 EPC 的 miR-21 及 PTEN 基因表达的影响

采用常规 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,反转录试剂盒反转录成 cDNA 后,荧光定量 PCR 以 U6 为内参检测 miR-21 的表达;以 GAPDH 为内参,测定 PTEN 基因的表达。miR-21/U6 反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环; PTEN/GAPDH 反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 80 °C 10 s, 共 40 个循环; 每个样品实验重复 3 次, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

1.5 抑制 miR-21 的表达对 EPC 成血管能力的影响

将 EPC 接种于 6 孔板内,待细胞汇合到 70% ~ 80% 后用 Lipo3000 将 miR-21 抑制剂 (miR-21 inhibitor) 及对应的阴性对照 (negative control, NC) 转染至 EPC。24 h 后,在 Matrigel 胶上,通过检测管状结构的长度分析 EPC 的成血管能力。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

构建 PTEN 野生型 (PTEN-WT) 和 PTEN 突变型 (PTEN-MUT) 3'UTR 萤火虫荧光素酶报告基因质粒 pMIR-REPORT, 使用 Lipo3000 将 miR-21 模拟物 (miR-21 mimics) 及对应的阴性对照、PTEN 萤火虫荧光素酶质粒 pMIR-REPORT 和作为对照的海肾荧光素酶质粒 pRL-TK Vector 共转染入 293T 细胞。转染 48 h 后,超级酶标仪检测萤火虫荧光素酶荧光值和海肾荧光素酶荧光值的相对荧光素酶活性。

1.7 白藜芦醇对 EPC 的 PTEN 蛋白表达及 Akt 磷酸化水平的影响

收集各组细胞,用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白后 BCA 法测定样品蛋白浓度,加上样缓冲液高温变性,调整浓度进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 1 h, PTEN 一抗 (1 : 1 000)、 β -actin 一抗 (1 : 1 500)、p-Akt/Akt 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。一抗孵育完成后 TBST 漂洗 10 min \times

5次,加入TBST稀释的二抗(1:2000)后37℃恒温摇育1h。TBST漂洗10min×3次,采用凝胶成像系统进行发光显色,分析PTEN/ β -actin和p-Akt/Akt的相对表达量。

1.8 统计学方法

所有实验均重复3次。实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS13.0统计软件进行数据分析。组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC的鉴定

骨髓分离的单个核细胞经EGM-2MV完全培养基诱导4天后,细胞开始贴壁生长,7天左右会出现干细胞的集落样形态。传至第3代的细胞呈现内皮

系细胞典型的铺路石样外观(图1A)。双染色结果显示,培养细胞可呈现Dil-ac-LDL的红色荧光(图1B)和FITC-UEA-1的绿色荧光(图1C)的双荧光染色(图1D),提示细胞为分化中的EPC。

2.2 白藜芦醇对EPC成血管能力的影响

倒置相差显微镜观察结果显示,白藜芦醇干预12h后,EPC的体外管状结构长度明显高于空白对照组($P<0.05$,图2),提示白藜芦醇可促进EPC的体外成血管能力。

2.3 白藜芦醇对EPC miR-21表达的影响

荧光定量PCR结果显示,与空白对照组相比,白藜芦醇组miR-21的表达明显下降($P<0.01$)(图3A)。而应用miR-21抑制剂有效抑制miR-21表达($P<0.01$,图3B)后,EPC的体外血管形成长度明显增加($P<0.05$,图3C),提示白藜芦醇可通过抑制miR-21的表达来促进EPC的体外成血管能力。

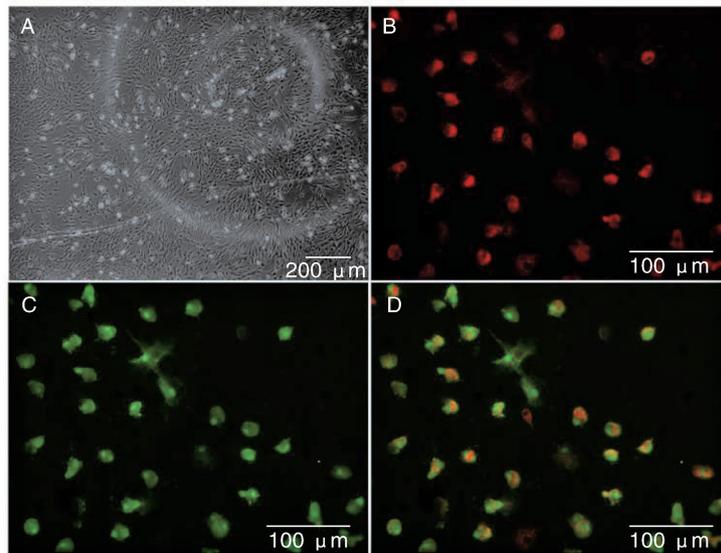


图1. 骨髓源性EPC的鉴定

A为内皮系细胞的铺路石样形态,B为Dil-ac-LDL的红色荧光,
C为FITC-UEA-1的绿色荧光,D为双荧光染色的EPC。

Figure 1. Characterization of EPC derived from bone marrow

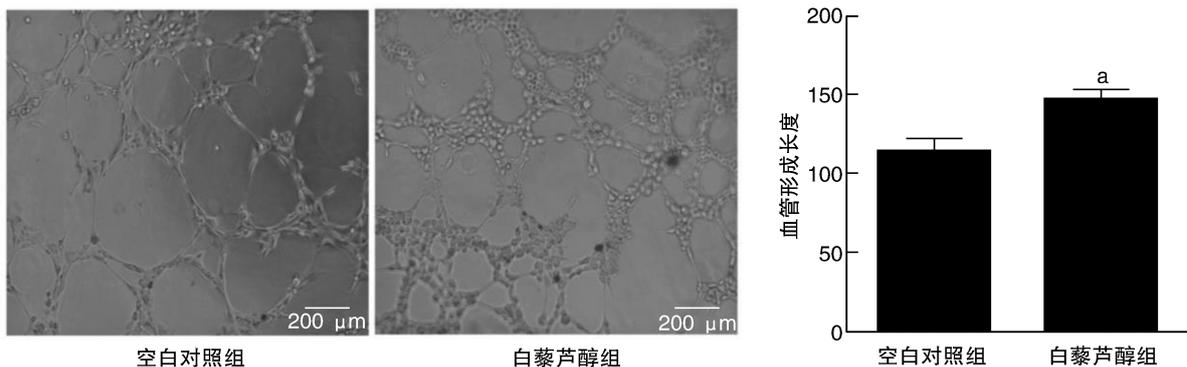


图2. 白藜芦醇对EPC成血管能力的影响

a为 $P<0.05$,与空白对照组相比。

Figure 2. The effects of Res on the tube formation ability of EPC

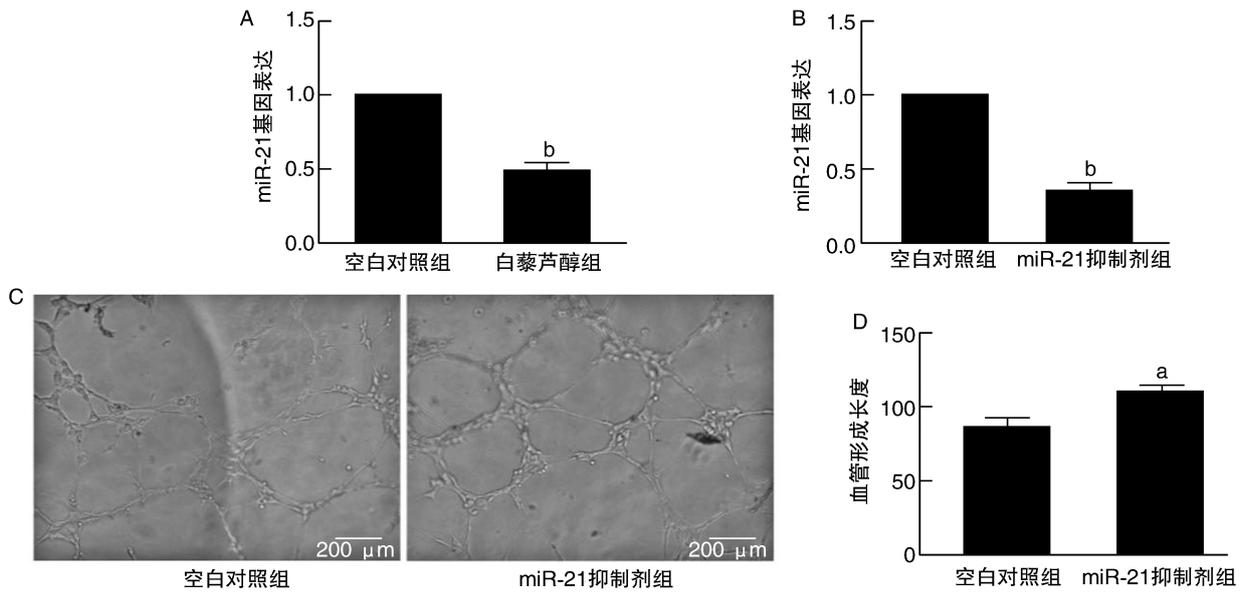


图 3. 白藜芦醇对 EPC miR-21 表达及 miR-21 对 EPC 成血管能力的影响
 A 和 B 为白藜芦醇及 miR-21 抑制剂对 EPC miR-21 基因表达的影响; C 和 D 为抑制 miR-21 对 EPC 成血管能力的影响。
 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

Figure 3. The effects of Res on the expression of miR-21 and the effects of miR-21 on the tube formation ability of EPC

2.4 白藜芦醇对 EPC PTEN 基因及蛋白表达的影响

荧光定量 PCR 和 Western blot 结果表明,白藜芦醇能够促进 PTEN mRNA ($P < 0.01$) 和蛋白的表达 ($P < 0.05$, 图 4)。

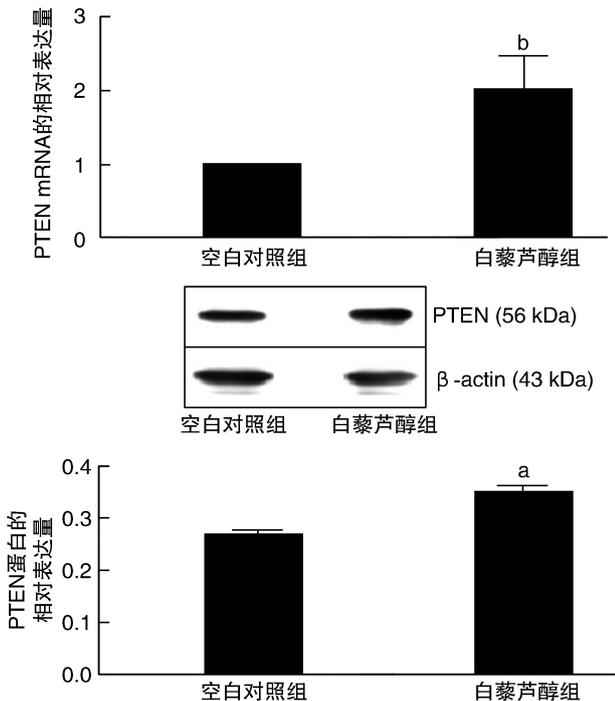


图 4. 白藜芦醇对 EPC PTEN mRNA 及蛋白表达的影响
 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

Figure 4. The effects of Res on the mRNA and protein expression of PTEN

2.5 双荧光素酶报告基因检测

与 miR-21-NC + PTEN-WT 组相比, miR-21 和 PTEN-WT 共转染组荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$), 而 miR-21 和 PTEN-MUT 共转染组, 荧光素酶活性没有显著变化 ($P > 0.05$, 图 5), 提示 miR-21 能够与 PTEN mRNA 的 3'UTR 结合, 从而靶向调控 PTEN 基因的表达。

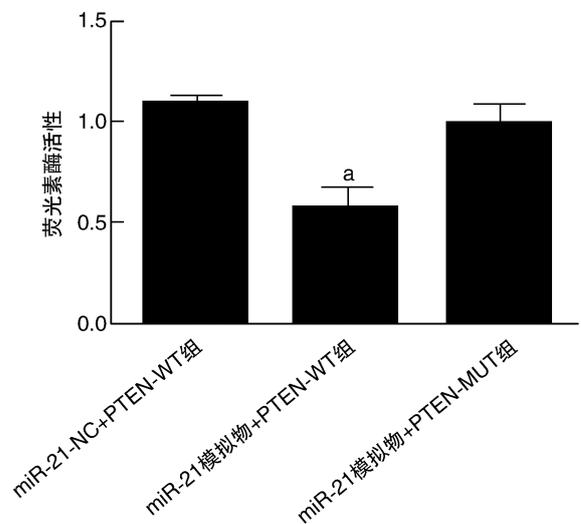


图 5. 双荧光素酶报告基因检测 miR-21 和 PTEN mRNA 的 3'UTR 结合

a 为 $P < 0.01$, 与 miR-21-NC+PTEN-WT 组相比。

Figure 5. Luciferase assay of miR-21 binds to the 3'UTR of PTEN mRNA

2.6 白藜芦醇抑制 EPC Akt 的磷酸化水平

白藜芦醇干预 EPC 不同时间(1、3、6、12 h)后的 Western blot 结果显示,与空白对照组相比,白藜芦醇干预 3 h 后, Akt 的磷酸化水平开始降低 ($P < 0.05$), 12 h 后 Akt 的磷酸化水平降至低点 ($P < 0.01$, 图 6)。

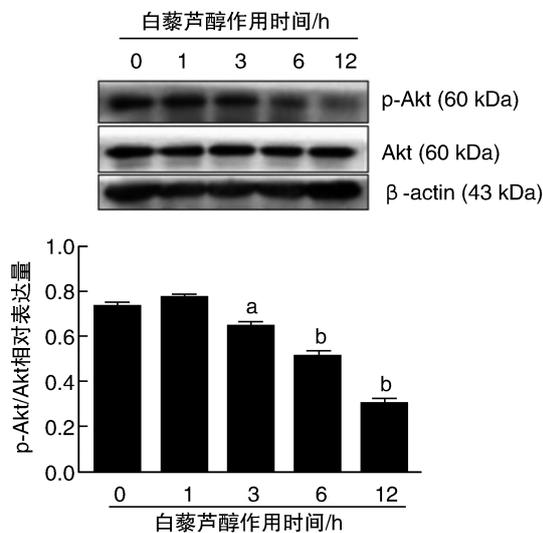


图 6. 白藜芦醇对 EPC Akt 蛋白磷酸化水平的影响
a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组(0 h)相比。

Figure 6. The effects of Res on the phosphorylation level of Akt

3 讨论

《中国心血管病报告 2018》概要指出,中国心血管疾病现患人数为 2.9 亿,占居民疾病死亡构成的 40% 以上^[8]。As 是心血管疾病的共同病理基础,而内皮细胞损伤是公认的 As 发生发展的始动因素。因此,保护内皮细胞结构和功能的完整性,在防治心血管疾病中处于至关重要的地位。随着 EPC 的发现,其在 As 中的保护作用逐渐得到学者们的认同。作为内皮细胞的前体细胞, EPC 可分化为内皮细胞,促进损伤血管内皮修复,抑制新生内膜的形成,进而达到防治 As 的作用^[9]。因此,临床上使用促进 EPC 向内皮细胞分化的药物来防治 As 不失为一种有效的策略。

白藜芦醇是一种来源于葡萄(红葡萄酒)、桑葚、何首乌和虎杖等植物的天然非黄酮类多酚化合物,具有抗炎、抗衰老和保护血管的作用,被广泛应用于冠状动脉硬化性心脏病等疾病的防治^[10]。白藜芦醇在调控 EPC 功能中的作用已经得到相关研究的证实,我们前期研究结果亦表明白藜芦醇剂量

依赖性逆转了肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 导致的 EPC 功能损伤^[7]。但白藜芦醇对 EPC 体外成血管能力的影响及其内在的作用机制尚不明确。

miRNA 是一类不参与蛋白质编码的单链 RNA 分子,通过对靶基因的 mRNA 进行转录后调控,进而发挥重要的生物学作用,包括调控细胞的分化、迁移和增殖等。miR-21 是近年来备受关注的 miRNA 之一,广泛参与调节 EPC 及血管平滑肌细胞的增殖、凋亡和衰老等,在心血管疾病的发生发展中发挥着重要作用^[4,11],但其在调控 EPC 成血管能力方面的研究报道甚少。我们的研究表明,白藜芦醇可明显抑制 miR-21 的表达,促进 EPC 的体外成血管能力;而抑制 miR-21 的表达后, EPC 的成血管能力明显增强,提示 miR-21 在该过程中发挥重要的调控功能。

miR-21 引起的生物学效应是其靶基因受抑制的结果,但在不同的细胞, miR-21 作用的靶基因类型可能不同,即便在同一类细胞,不同刺激条件下 miR-21 的靶基因亦有可能不同。PTEN 是一种具有磷脂酰肌醇 3-磷酸酶活性、能拮抗 PI3K 作用的蛋白酶,是一个很有效的 PI3K/Akt 信号通路负性调节因子。我们应用双荧光素酶报告基因检测实验证实, miR-21 能与 PTEN mRNA 的 3' UTR 结合,进而调控 PTEN 的表达。有研究发现,在球囊损伤血管的大鼠模型中,过量表达的 miR-21 通过抑制 PTEN 的表达,导致内膜过度增生;抑制 miR-21 的表达后, PTEN 的表达水平升高,损伤内皮的修复能力增强^[12]。Kumarswamy 等^[13]发现转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 通过诱导 miR-21 的表达,激活 Akt 信号通路,导致内皮细胞标记分子表达减少,进而诱发内皮间质转化的发生;抑制 miR-21 的表达后, Akt 信号通路受到抑制,内皮细胞功能增强。我们的研究表明,白藜芦醇抑制 miR-21 的表达后,升高了 PTEN 基因及蛋白的表达,进而抑制了 Akt 的磷酸化作用,这与文献^[14]报道的相一致。

综上所述,本研究结果表明, miR-21 调控了白藜芦醇促进 EPC 的体外成血管能力,其下游靶基因 PTEN 及磷酸化 Akt 在其中扮演着重要的调节作用,该研究结果为临床应用白藜芦醇抗动脉粥样硬化性心血管疾病提供了理论及实验依据。

[参考文献]

[1] Kränkel N, Lüscher TF, Landmesser U. "Endothelial pro-

- genitor cells” as a therapeutic strategy in cardiovascular disease[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10(1): 107-124.
- [2] 顾俊, 王长谦, 张大东, 等. 白藜芦醇对损伤动脉再内皮化和内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(10): 829-834.
- [3] 余惠珍, 陈成, 陈俊明, 等. 白藜芦醇对大鼠骨髓内皮祖细胞增殖活性的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(1): 43-49.
- [4] Bonci D. MicroRNA-21 as therapeutic target in cancer and cardiovascular disease [J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2010, 5(3): 156-161.
- [5] Du X, Hong L, Sun L, et al. miR-21 induces endothelial progenitor cells proliferation and angiogenesis via targeting FASLG and is a potential prognostic marker in deep venous thrombosis[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 270.
- [6] 宿云娟, 孙玉聪, 楚海荣, 等. miR-92a 对大鼠骨髓源性内皮祖细胞功能的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(6): 676-681.
- [7] Chu H, Li H, Guan X, et al. Resveratrol protects late endothelial progenitor cells from TNF- α -induced inflammatory damage by upregulating Krüppel-like factor-2[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5708-5715.
- [8] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3): 209-220.
- [9] Brixius K, Funcke F, Graf C, et al. Endothelial progenitor cells; a new target for the prevention of cardiovascular diseases[J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2006, 13(5): 705-710.
- [10] 阮景明, 朱鹏立, 蒋娜, 等. 白藜芦醇对兔动脉粥样硬化及 PPAR γ 相关炎症因子表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(3): 203-208.
- [11] 梁戎, 李兰英, 张国珍, 等. 白藜芦醇通过调节 miR-21-5p/PDCD4 通路抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(1): 26-31.
- [12] Yang F, Liu W, Yan X, et al. Effects of miR-21 on cardiac microvascular endothelial cells after acute myocardial infarction in rats; role of phosphatase and tensin homolog (PTEN)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signal pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3562-3575.
- [13] Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, et al. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(2): 361-369.
- [14] Campagnolo P, Hong X, Di BE, et al. Resveratrol-induced vascular progenitor differentiation towards endothelial lineage via miR-21/Akt/ β -Catenin is protective in vessel graft models [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125122.

(此文编辑 许雪梅)