DOI:10.16016/j.1000-5404.201606062

microRNA-126 对 VEGF 介导血管生成的调控作用

任梦宇,迟路湘,欧书林 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所)

[摘要] **目的** 研究 microRNA-126(miR-126)对血管内皮细胞生长发育的影响,探寻 miR-126 可能参与的血管生成过程。**方法** 常规培养脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)。构建 miR-126 过表达载体并转染 HUVECs;实验分为:正常细胞组,空载慢病毒转染组,miR-126 过表达慢病毒转染组($n=6$);于转染第 6 天后用 qRT-PCR 检测内皮生长负性调节因子 spred1、Pik3R2 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 spred1、Pik3R2 的蛋白表达水平。**结果** 转染第 6 天后,对 qRT-PCR 及 Western blot 检测结果进行分析,过表达组中 spread1、Pik3R2 的 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 值较其余两组低;过表达组中 spred1/GAPDH 和 Pik3R2/GAPDH 值也均小于其余两组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。spred1、Pik3R2 的 mRNA 表达水平明显下调,其蛋白表达水平也明显降低。**结论** miR-126 能促进 VEGF 的内皮细胞增殖及血管生成作用。

[关键词] miR-126;内皮细胞;血管生成
[中图法分类号] R322.12;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Role of microRNA-126 on regulation of VEGF-mediated angiogenesis *in vitro*

Ren Mengyu, Chi Luxiang, Ou Shulin (Department of Cardiology, Chongqing Institute of Interventional Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of microRNA-126 (miR-126) on regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) mediated angiogenesis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and transfected with lentiviral vectors carrying miR-126. The cells were divided into control group, empty vector group and miR-126 transfected group (LV3-miR-126). Total RNAs were collected at day 6 after transfection. The mRNA expression of negative regulatory factors, sprouty related EVH1 domain containing 1 (spred1) and phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 (Pik3R2), were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The protein expression of spred1 and Pik3R2 was detected by Western blot. **Results** The qRT-PCR results showed that spred1 and Pik3R2 were significantly down-regulated in LV3-miR-126 group compared with the control and empty vector groups ($P<0.05$). Also, their protein expression levels were obviously decreased with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** miR-126 expression can promote proliferation of endothelial cells and VEGF-mediated angiogenesis.

[**Key words**] miR-126; endothelial cells; angiogenesis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270406). Corresponding author: Chi Luxiang, E-mail: chi68754271@126.com

内皮细胞是动、静脉和毛细血管的主要组成部分,它们所构成的血管腔起着运送血液及营养的作用,并与组织进行物质交换以维持器官的正常发育和代谢机能。另外,在一些具有调节内皮活性的物质及相关调节因子如 VEGF、FGF 等的调节作用下,内皮细胞能够很好地维系其自身的功能代谢及血管形成[1-2]。现已知 VEGF 可作用于血管细胞膜上的相应受体,通过一系列信号转导使内皮细胞分裂、增殖、迁移。VEGF 还可以通过 ERK 及 AKT 通路传递信号来完成血管生成作用,而 spred1 和 Pik3R2 是该通路的负性调节因子,起着抑制血管生成的作用[3-4]。

在不同物种中已经相继发现大量 microRNA

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270406)
[通信作者] 迟路湘,E-mail:chi68754271@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160918.1602.003.html(2016-09-18)

(miRNA/微小核糖核酸分子)[5]。它通过阻碍蛋白质翻译(转录抑制)或降解信使核糖核酸(mRNA)即基因沉默来调节相关表达。Lewis 等[6]估测人类最少有30%的基因是受 miRNA 调控的。其中,miR-126 是迄今检测出仅有的一种能在 HUVEC 特定表达的 miRNA,并成为缺血相关管腔形成的主要潜在靶点及必要调节位点。有报道称,miRNA 相关基因缺失的小鼠,其血管发生、发展及其心脏的发育均有严重缺陷[7-8]。此外,通过斑马鱼(zebra fish)模型的研究,得出的结论进一步证实 miR-126 能调节血管的发展[9-10]。这些结果表明了 miRNA 在心血管体系的发生和维护方面有着非常重要甚至不可替代的地位。

目前关于 miRNA 的研究主要集中在肿瘤的生长发育方面,而有关其在心血管系统的形成机制研究得还比较少。既然 miR-126 在动物模型中的作用如此明显,那么在人的血管内皮细胞中是否也具有类似的调控作用,从而促进损伤内皮的修复和血管的新生以减少和延缓冠脉综合征的发生、发展。我们就此问题,设计了相关实验,从而探讨其中的各种联系和可能的结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

人脐静脉内皮细胞(购于中科院上海细胞库)。胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司。*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ均购自日本 TaKaRa 公司。T_4 DNA ligase buffer 购自美国 NEB 公司。穿梭质粒 LV3(表达绿色荧光蛋白,GFP)及其余 3 种包装质粒 PG-p1-VSVG、PG-P2-REV、PG-P3-RRE 均为重庆 Western Biotechnology 公司提供。一抗:spred1、Pik3R2 及内参一抗均购自 Abcam 公司;二抗:羊抗兔 IgG、羊抗小鼠购自 Sigma 公司。PVDF 膜购自 Dupont 公司;显影液、定影液购自上海冠龙照相器材公司。胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;质粒小量抽提试剂盒购自 Promega 公司。荧光定量 PCR 试剂、Sybr green Ⅰ及所用引物均由重庆 Western Biotechnology 公司根据设计合成。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVECs 的扩增培养 从 -80 ℃液氮罐中取出冻存管迅速放入 37 ℃温水中,轻微晃动 1 min。拿出冻存管,75%酒精消毒管口,用吸管吸出已溶解的细胞悬液,加入离心管,再加入含 10% 胎牛血清(FBS)的细胞培养液 5 mL,离心 5 min。弃上清,加入 1 mL 培养液制成细胞悬液。用含 20% FBS 的细胞培养液适当稀释后接种于培养瓶,37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,24 h 后更换溶液,随后每 3 天换液 1 次,继续培养。培养瓶贴壁面至 70% ~80% 融合时,吸弃旧培养基,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶消化液约 2 mL 到 50 mL 培养瓶中,按上述比例进行消化,收集细胞液入离心管中离心 5 min,弃上清,加培养液 10 mL,轻轻吹打均匀,按 1∶2 传代,第 4 代细胞用于实验。

1.2.2 miR-126 过表达慢病毒载体构建 设计合适的引物序列。将 DNA oligo 退火处理与线性化的 LV3 质粒在 T_4 DNA 连接酶作用下进行连接反应,转化感受态细胞。阳性克隆鉴定,重组质粒测序并大量抽提。四质粒系统共转染 293T 细胞。72 h 后收集已转染的细胞上清液并过滤。CsCL 密度梯度离心法纯化病毒,收集病毒悬液,逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 HUVECs 感染 实验分 3 组,过表达感染组、空载感染组和正常细胞组。miR-126 过表达慢病毒转染组:感染 LV3-miR-126 组,即含 miR-126 病毒和 GFP;空载慢病毒转染组:感染病毒不含目的基因,即只含 GFP。第 1 天,在 24 孔培养板接种若干孔,每个孔内接种 3×10^4 个 HUVECs(靶细胞),铺板时细胞融合约 50%。第 2 天,观察细胞生长状态,病毒感染时的细胞融合度要达到约 70%,如细胞状态较好则开始实验。将冻存在 -80 ℃的病毒先在冰浴融化后取出,离心 20 s 使病毒完全悬于离心管底部;通过感染预实验得到理想的 MOI(multiplicity of infection)值,按照 MOI 值准确计算后,再将慢病毒稀释到培养基中。从培养箱中取出细胞,用移液器吸取准确体积的病毒液,加到准备好的培养基内,吸除原有培养基,在感染组靶细胞和空载组对照细胞中分别加入准确体积的病毒液,混匀后放于二氧化碳培养箱 37 ℃、5% CO_2 孵育过夜。第 3 天在 24 h 后将含有慢病毒的培养液替换成正常培养液;观察细胞状态,第 1 次换液后,确定慢病毒对细胞没有明显毒作用,则可用正常培养液换液。第 6 天,用倒置荧光显微镜观察,估测慢病毒感染靶细胞的效率。

1.2.4 qRT-PCR 将实验样本分为 3 个组进行对比:①正常细胞组:未感染组,其他培养条件同感染组;②空载慢病毒转染组;③miR-126 过表达慢病毒转染组。引物设计:spred1,正义链为 5′-GCGACTCAGGGACAAAATGG-3′,反义链为 5′-CAAAAGCCCTAGCATCAGCAG-3′,149 bp;Pik3R2,正义链为 5′-GCACGCAGGCAGAGGAGA-3′,反义链为 5′-GACGCAGTGCTTGGTGTCG-3′,122 bp;内参 β-actin,正义链为 5′-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3′,反义链为 5′-TGACG-TGGACATCCGCAAAG-3′,205 bp。提取转染 6 d 后细胞总 RNA,反转录为 cDNA 用于 PCR 扩增,最终在72 ℃ 检测荧光信号,测出 spred1、Pik3R2 的 mRNA 表达水平。

1.2.5　Western blot 检测　　将每组再分为两个样本进行检测。正常细胞组:样本 1、4;空载慢病毒转染组:样本 2、5;miR-126 过表达慢病毒转染组:样本 3、6。按照 SDS-PAGE 电泳、转膜及抗体杂交后,ECL 显影、定影。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,根据 3 组间 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 值采用单因素方差分析进行比较;Excel 软件通过 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 值制作 spred1、Pik3R2 的 mRNA 相对定量分析柱状图;通过 Labworks4.6 软件分析 Western blot 检测出的目的条带灰度值并通过 spred1/GAPDH 和 Pik3R2/GAPDH 值生成 3 组间每个样本蛋白表达量柱状图。

2　结果

2.1　HUVECs 的培养

用传代第 4 代的 HUVECs 作为实验目的细胞进行慢病毒的感染(图 1)。

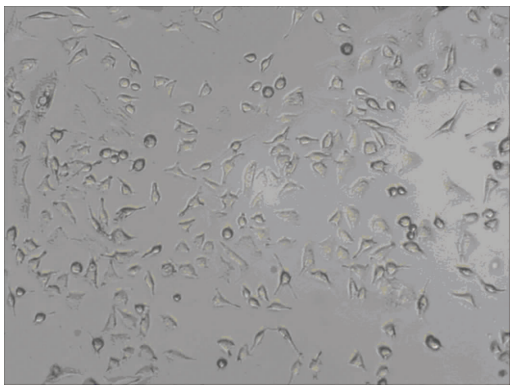


图 1　第 4 代 HUVECs 形态学鉴定结果　(LM　×100)

2.2　miR-126 过表达慢病毒载体构建

结果分析:测得 miR-126 基因序列病毒滴度 T = 1×10^8 TU/mL(图 2)。

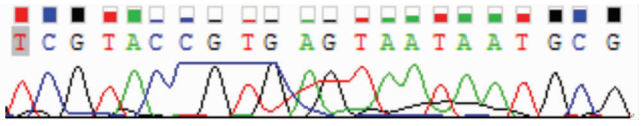


图 2　LV3-miR-126 慢病毒载体构建重组质粒测序基因序列

2.3　miR-126 慢病毒感染

空载对照组不含目的基因,感染的细胞数目很低,效率也很低;过表达组含目的基因,感染的细胞数目较多,效率也较高(图 3)。

2.4　qRT-PCR 结果

通过 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 值进行相对定量分析(图 4),3 组样本中 miR-126 过表达组相对于其他 2 组,spred1、Pik3R2 表达水平明显下降(与空载慢病毒组和正常细胞组对比,$P<0.05$)。通过扩增、熔解曲线(图 5)我们可以判断各个样品扩增效果较好,说明各样品的反转录并无问题。曲线纵坐标对应的横坐标(Tm)也基本一致,呈现单一熔解峰,此为理想的熔解曲线,表明特异性扩增,不含二聚体及其他杂质。充分反映过表达的 miR-126 明显降低 spred1、Pik3R2 的 mRNA 表达量。

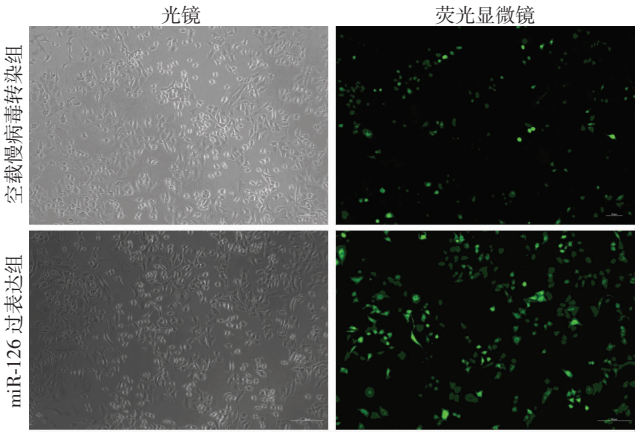
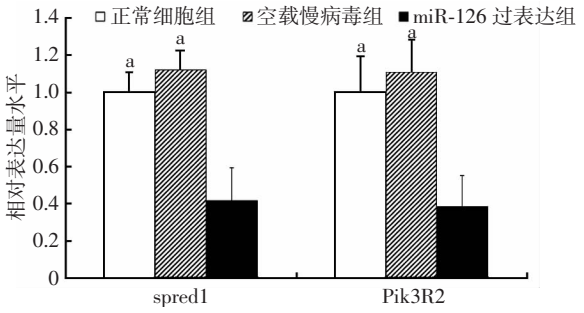
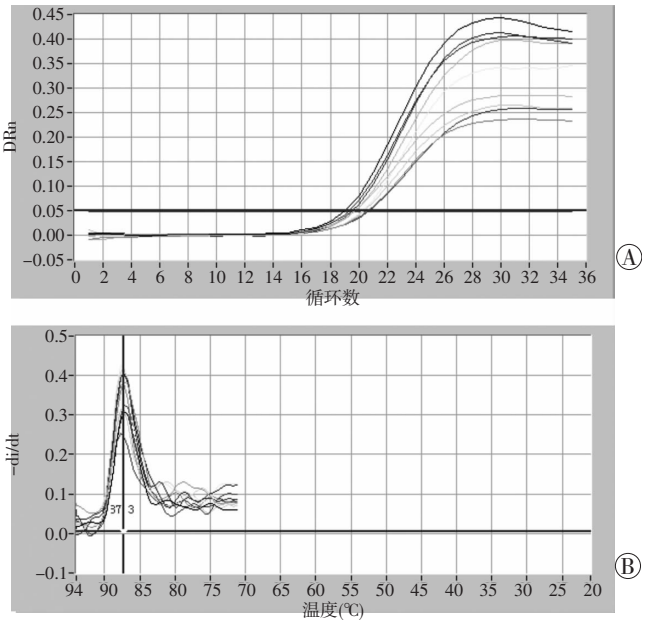


图 3　miR-126 慢病毒感染细胞形态学观察　(×100)



a:$P<0.05$,与 miR-126 过表达组比较

图 4　spred1、Pik3R2 相对定量分析

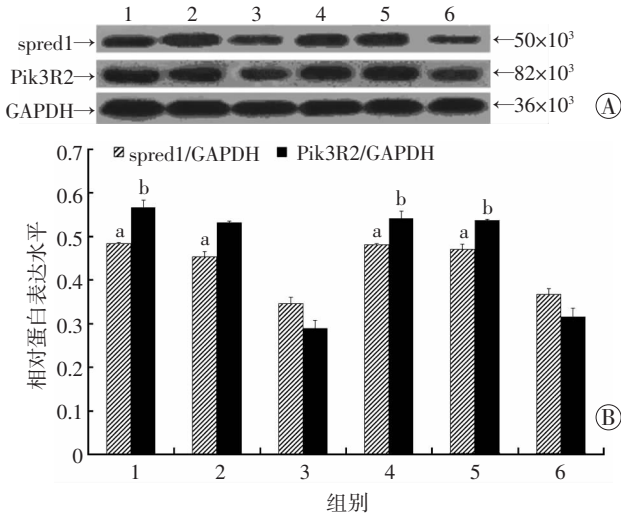


A:扩增曲线;B:熔解曲线

图 5　qRT-PCR 扩增与熔解曲线分析

2.5 Western blot 检测结果

spred1/GAPDH 和 Pik3R2/GAPDH 的值在正常细胞组最高,在空载慢病毒感染组较低,在 miR-126 过表达慢病毒感染组最低。说明 miR-126 过表达组的蛋白表达量较其余两组明显降低($P<0.05$),Pik3R2 蛋白表达量也明显降低($P<0.05$),因此可直观地判断出过表达的 miR-126 明显下调了 spread1/Pik3R2 的蛋白表达水平(图 6)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 1,4:正常细胞组;2,5:空载慢病毒感染组;3,6:miR-126 过表达慢病毒感染组;1、2、3:样本 1;4、5、6:样本 2 a:$P<0.05$,与样本 1 miR-126 过表达组比较;b:$P<0.05$,与样本 2 miR-126 过表达组比较

图 6 Western blot 检测 spread1、Pik3R2 在各个样本中的蛋白表达

3 讨论

miRNA 是长度在 20~25nt 的一类内源性小 RNA 分子,在转录后水平调控基因的表达和翻译[11]。在动物细胞内,miRNA 基因是在 RNA 聚合酶作用下先产生 Pri-miRNA,再由 Drosha 识别和切割,形成具有发夹结构的 Pre-miRNA,经 exportin-5 运送至胞质,由另一个位于胞质内的核酸酶 Dicer 识别和切割后形成二聚体,之后再与其他蛋白结合成蛋白复合体 RISC(miRNP),最终形成双链成熟 miRNA[12-16]。而其中一条成熟的 miRNA 与其互补的 mRNA 按碱基配对来调控 mRNA 表达。一般在哺乳动物中,靶 mRNA 不完全互补的 miRNA 在蛋白质翻译水平上抑制其表达(转录抑制),其位点一般在 mRNA 的 3'-UTR;在植物中,若 miRNA 与靶位点完全互补,则 miRNA 的结合往往引起靶 mRNA 的降解(基因沉默)。血管新生是一种极其复杂的过程,受到大量不同的信号分子及通路的精确调控,也涉及胚胎发育中和出生后的血管生成。血管新生也是维持组织血液灌注的重要机制,特别是生理或病理情况下(动脉粥样硬化等)。最早的 Dicer 敲除动物模型也表明,miRNA 在血管发生发育中有一定作用。小鼠的 Dicer 基因突变,使其在发育早期便死亡,是由于其血管的弹性受到损伤,管壁较未突变组薄,管网也较稀疏造成的。RNA 干扰抑制 Dicer 在内皮细胞(ECs)的表达也可引起 ECs、毛细血管成管能力减弱,从而抑制血管生成[17-18]。目前在内皮中发现了一种能特异表达的,也是唯一一种特异表达的 miRNA:miR-126。虽然其并不足以促使多能干细胞向内皮细胞系分化,不过,已有报道证实它能够在体外和体内调控 ECs 的迁移、管腔形成、粘附性和血管的完整性[19-20]。本实验进一步支持了 miRNA 对血管发生发育的理论。通过本实验的研究,我们总结出一个值得注意的问题,在内皮祖细胞或干细胞向 ECs 分化的过程中,miRNA 是否也参与其定向分化的过程,调控的关键靶基因又会是什么,又通过何种机制进行调控,还有待研究。

在未来的研究中,我们需要解决的问题还很多:到底存在多少种 miRNA? 这些 miRNA 是怎么产生的? 它们的生物学功能是什么? miRNA 的测定花费大,不能反复多次检测,而且其容易降解的特性也是需要解决的问题。虽然 miRNA 的研究并未成熟,但可以用它来治疗的疾病种类却相当之多。使用最新的芯片技术和基因编辑技术对 miRNA 和心血管疾病间的关系进行探索和研究,将会使人们对于其基因表达调控网络有一个全新的认识。最终会使 miRNA 成为诊断疾病和判断预后的生物学新标记,同时会给人类疾病提供一种全新的治疗手段。

参考文献:

[1] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. Nature, 2005, 438(7070): 937-945. DOI: 10.1038/nature04479

[2] Cleaver O, Melton D A. Endothelial signaling during development [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 661-668. DOI: 10.1038/nm0603-661

[3] Ueki K, Fruman D A, Yballe C M, *et al*. Positive and negative roles of p85 αand p85 βregulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling [J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 48453-48466. DOI: 10.1074/jbc.

m305602200

[4] Wakioka T, Sasaki A, Kato R, *et al*. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling[J]. Nature, 2001, 412(6847): 647-651. DOI: 10.1038/35088082

[5] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, *et al*. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261-271. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002

[6] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035

[7] Yang W J, Yang D D, Na S, *et al*. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development[J]. J Biol Chem, 2005, 280(10): 9330-9335. DOI: 10.1074/jbc.m413394200

[8] Zhao Y, Ransom J F, Li A, *et al*. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129(2): 303-317. DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.030

[9] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, *et al*. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008,15(2): 261-271. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002

[10] Fish J E, Santoro M M, Morton S U, *et al*. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 272-284. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008

[11] Zhan B, Pan X, Anderson T A. MicroRNA: A new player in stem cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2): 266-269. DOI: 10.1002/jcp.20713

[12] Lee Y, Kim M, Han J, *et al*. MicroRNA genes are transcribed by RNA Polymerase Ⅱ[J]. EMBO J, 2004, 23(20): 4051-4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385

[13] Borchert G M, Lanier W, Davidsonl B L. RNA polymerase Ⅲ transcribes human microRNAs[J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13(12): 1097-1101. DOI: 10.1038/nsmb1167

[14] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004, 116(2): 281-297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5

[15] Han J, Lee Y, Yeom K H, *et al*. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex[J]. Cell, 2006, 125(5): 887-901. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.043

[16] Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, *et al* . Genes and machanisms related to RNA interference regulate expression of the small tremporal RNAs that control C. elegans developmental timing[J]. Cell, 2001, 106(1): 23-24. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00431-7

[17] Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher A M, *et al*. Role of Dicer and Drosha or endothelial microRNA expression and angiogenesis[J]. Circ Res, 2007, 101(1): 59-68. DOI: 10.1161/circresaha.107.153916

[18] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, *et al*. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. Blood, 2006, 108(9): 3068-3071. DOI: 10.1182/blood-2006-01-012369

[19] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, *et al*. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261-271. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002

[20] Fish J E, Santoro M M, Morton S U, *et al*. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 272-284. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008

(收稿:2016-06-14;修回:2016-09-03)

(编辑 栾 嘉)