

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.004

miRNA-26a 抑制 ox-LDL 介导的 HAECS 淀亡作用的机制研究

李 勇, 杨 特, 沈 怡

(重庆市中医院心血管内科 400011)

[摘要] 目的 探究 miR-26a 在 ox-LDL 介导内皮细胞 HAECS 淀亡中的作用及其调控机制。方法 采用不同浓度的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)在体外作用于 HAECS 细胞, 噻唑蓝(MTT)和 TUNEL 染色检测 ox-LDL 作用 HAECS 后细胞的活性与凋亡率, 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 ox-LDL 作用 HAECS 后细胞中 miR-26a 的表达水平。在 HAECS 中过表达 miR-26a mimic, MTT 和 TUNEL 染色检测 ox-LDL 作用后细胞的活性和凋亡率。构建荧光素酶报告载体 pMIR-PTEN 的 3'UTR, 利用荧光素酶活性检测鉴定 miR-26a 的预测靶基因。qRT-PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 ox-LDL 能够介导 HAECS 细胞的毒性死亡和细胞凋亡, 并且降低了 HAECS 细胞中 miR-26a 的表达水平。过表达 miR-26a mimic 能够抑制 ox-LDL 作用 HAECS 后细胞的毒性和凋亡。转染 miR-26a mimic 显著抑制荧光素酶的活性($P < 0.05$)。转染 miR-26a mimic 显著下调 HAECS 细胞中 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05$)。结论 miR-26a 能够抑制 ox-LDL 作用 HAECS 后细胞的毒性和凋亡, 其可能的作用机制是下调了 PTEN 的表达。miR-26a 可能成为治疗凋亡相关的动脉粥样硬化的潜在靶点。

[关键词] microRNAs; 人类主动脉内皮细胞; 第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5052-04

Study on the mechanism of miRNA-26a inhibiting ox-LDL-mediated apoptosis of HAECS

Li Yong, Yang Te, Shen Yi

(Department of Cardiovascular Medicine, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of miR-26a in ox-LDL-mediated apoptosis of HAECS in endothelial cells and its mechanism. **Methods** Various concentrations of ox-LDL were added in HAECS culture. Cell cytotoxicity and apoptosis were monitored by MTT and TUNEL assay, and expression level of miR-26a examined by qRT-PCR. Overexpression of miR-26a mimic in HAECS, MTT and TUNEL staining were used to detect the activity and apoptosis of ox-LDL. The 3'UTR of luciferase reporter vector pMIR-PTEN was constructed and the predicted target gene of miR-26a was identified by luciferase activity assay. QRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of PTEN. **Results** ox-LDL could mediate the toxic death and apoptosis of HAECS cells, and decrease the expression level of miR-26a in HAECS cells. Overexpression of miR-26a mimic could inhibit the cytotoxicity and apoptosis of ox-LDL cells after HAECS. Transfection of miR-26a mimics significantly inhibited luciferase activity ($P < 0.05$). The expression of mRNA and protein in HAECS cells was significantly down regulated by transfection of miR-26a analog ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-26a can inhibit the cytotoxicity and apoptosis of ox-LDL cells after HAECS inhibition, and the possible mechanism of action is to down regulate the expression of PTEN. The study suggests that miR-26a may be a potential target for the treatment of atherosclerosis related to apoptosis.

[Key words] microRNAs; HAECS; PTEN; apoptosis; atherosclerosis

动脉粥样硬化是引起死亡和残疾的主要原因之一^[1]。内皮细胞的凋亡被认为是动脉粥样硬化发生、发展的一个关键进程。由于内皮细胞的凋亡, 内皮组织将失去调控脂质稳态, 免疫及炎症的能力。内皮细胞的损伤打破了内皮组织完整的屏障功能, 利于脂质体的沉积, 而导致动脉粥样硬化的发生^[2-4]。此外, 内皮细胞的凋亡也会引起斑块的不稳定, 而引起急性心肌梗死和猝死。然而现阶段内皮细胞的凋亡机制研究还并不清楚。

MicroRNAs(miRs)是近年来新发现的一类长度较短的非编码 RNA 分子, 长度约为 22 个核苷酸, 与靶 mRNAs 或靶 mRNAs 的 3' 非翻译区互补结合, 诱导靶 mRNAs 降解或抑制靶 mRNAs 的翻译, 从而实现转录后基因的表达调控作用^[5-6]。

新近研究发现, miR-26a 在多种心血管疾病中表达是失调的, 其中包括心脏肥大、心房纤维性颤动和心肌缺血^[7]。芯片数据分析发现, miR-26a 的表达在主动脉瓣狭窄患者的主动脉瓣中下调了 65%, 而具体的分子生物学机制尚未阐明^[8]。

本研究旨在探究 miR-26a 在氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)介导内皮细胞 HAECS 淀亡中的作用机制。明确 miR-26a 在内皮细胞凋亡中与 PTEN 表达的调控关系及其在动脉粥样硬化发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人类主动脉内皮细胞系 HAECS 及转染用工具细胞 HEK293 均购自上海细胞研究所。

作者简介: 李勇(1972—), 副主任医师, 硕士, 主要从事冠心病基础与临床研究。

1.1.2 试剂 胎牛血清、DMEM 培养基(美国 hyclone 公司),反转录试剂盒(日本 Taraka 公司),RNA 提取试剂 Trizol, LipofectamineTM2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),miR-26a 逆转录引物(广州锐博公司),ox-LDL(上海生工),细胞活性测定试剂噻唑蓝(MTT,上海碧云天公司),TUNEL 调亡检测试剂(美国 Roche 公司)。野生型 PTEN 的 3'UTR 及突变型 PTEN 的 3'UTR 寡核苷酸(上海英骏公司)。PTEN、GAPDH 一抗(美国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人类主动脉内皮细胞系 HAECS 和 HEK293 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/H 培养基在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR) 按照 TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit 说明书加入逆转录反应所需试剂,miR-26a 逆转录引物,总 RNA 进行逆转录反应。反转录条件:42 °C 15 min,85 °C 5 s。合成的 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR 扩增,根据 Premix ExTaq 试剂盒说明加入 Premix,miR-26a 正向引物和 miR-26a 反向引物进行反应。qRT-PCR 条件:95 °C 1 min; 95 °C 15 s、60 °C 20 s,共行 39 次循环;反应结束后得到 C_t 值,根据 C_t 值进行相对定量分析。

1.2.3 MTT 测定细胞活性 取对数期的 HAECS 细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 1×10⁵/mL,加入不同浓度的(0、1、10、25、50 μg/mL)ox-LDL 处理后,共培养 24 h,后去掉上清,加入含有 10% MTT 的新鲜培养基继续培养 4 h。最后加入 DMSO 溶解所形成的甲瓒晶体,在 570 nm 波长处测定吸光度值,根据对应的吸光度值,计算细胞的相对活性。在过表达 miR-26a 抑制了 ox-LDL 对 HAECS 细胞活性能力 MTT 测定中共分为 4 组:Control 组、ox-LDL 组、ox-LDL + miR-26a mimic 组、ox-LDL + miR-NC 组,各组培养 24 h 后,处理方法同前。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞的凋亡 6 孔板中处理作用后的 HAECS 细胞,加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,加 4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 洗涤 1 次,加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 冰浴 2 min,室温下在含 0.3% 过氧化氢的甲醇溶液中孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,加入 50 μL TUNEL 检测液,37 °C 避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下拍照并计数。在过表达 miR-26a 抑制了 ox-LDL 对 HAECS 细胞凋亡测定中共分为 4 组:Control 组、ox-LDL 组、

ox-LDL + miR-26a mimics 组、ox-LDL + miR-NC 组,各组培养 24 h 后,处理方法同前。

1.2.5 pMIR-PTEN 的 3'UTR 荧光报告载体构建及荧光素酶活性检测 合成野生型 PTEN 的 3'UTR 及突变型 PTEN 的 3'UTR 寡核苷酸经退火,双酶切后插入荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT,在含有 miR-26a 结合位点的 PTEN 的 3'UTR 片段,构建 pMIR-PTEN 的 3'UTR 载体。HEK293 细胞接种于 96 孔板,24 h 后细胞贴壁达 70% 时进行转染。转染分为 4 组,分别是 miR-NC 和 pMIR-PTEN 的 3'UTR 组,miR-26a mimic 和 pMIR-PTEN 的 3'UTR 转染组,miR-NC 和突变型 pMIR-PTEN 的 3'UTR 组,miR-26a 和突变型 pMIR-PTEN 的 3'UTR 组,再与质粒 pRL-TK 共转染 HEK293 细胞。转染 24 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测系统处理裂解细胞,GloMax20/20 Luminometer 检测荧光强度。

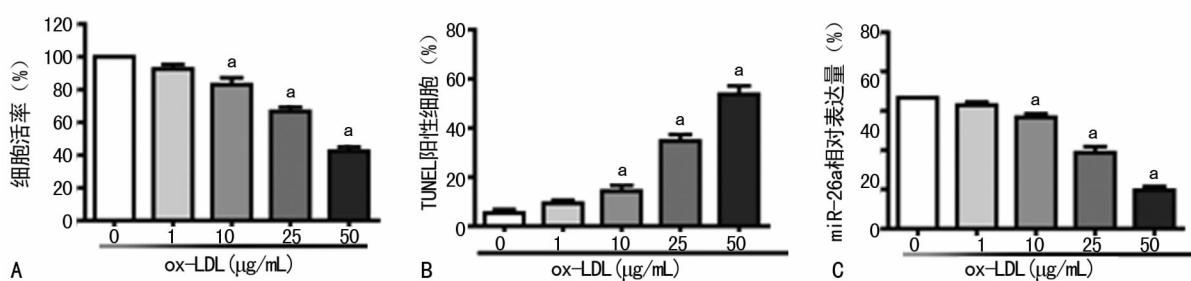
1.2.6 蛋白质印迹法(Western blot) 将转染 miR-26a mimics 和 miR-NC 后的两组 HAECS 细胞使用细胞裂解缓冲液裂解,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清并行蛋白浓度测定。取 20 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE 胶分离后,湿转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,分别采用 PTEN 的一抗(1:1 000 稀释),GAPDH 的一抗(1:2 000 稀释)孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,采用 Supersignal West Dura Extended Duration Substrate 试剂处理并曝光显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理。采用非配对 t 检验分析组间差异。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

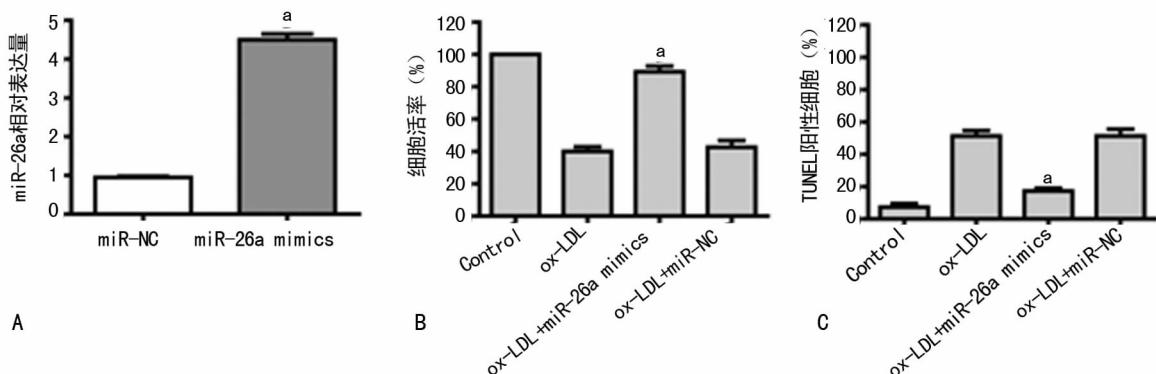
2.1 ox-LDL 对 HAECS 细胞活性、凋亡及 miR-26a 的影响 结果表明,ox-LDL 的 10、25、50 μg/mL 浓度能够显著抑制 HAECS 细胞的活性(图 1A),显著促进 HAECS 细胞的凋亡发生(图 1B),显著抑制 HAECS 细胞中 miR-26a 的表达水平(图 1C)。

2.2 过表达 miR-26a 抑制 ox-LDL 对 HAECS 细胞活性和凋亡的作用 体外转染实验表明,转染 miR-26a 模拟物显著提高了 miR-26a 在 HAECS 细胞中的表达水平(图 2A)。MTT 检测发现,转染 miR-26a mimics 组较转染 miR-NC 组显著增强了 ox-LDL 作用 HAECS 细胞后的活性(图 2B)。TUNEL 调亡检测发现,转染 miR-26a mimics 组较转染 miR-NC 组显著抑制了 ox-LDL 作用 HAECS 细胞后的凋亡发生(图 2C)。



A: MTT 检测不同浓度 ox-LDL 作用 HAECS 后的细胞活性;B: TUNEL 检测不同浓度 ox-LDL 作用 HAECS 后的细胞的凋亡率;C: qRT-PCR 检测不同浓度 ox-LDL 作用 HAECS 后的细胞中 miR-26a 的相对表达水平;^a: P<0.05, 与 0 μg/mL ox-LDL 比较。

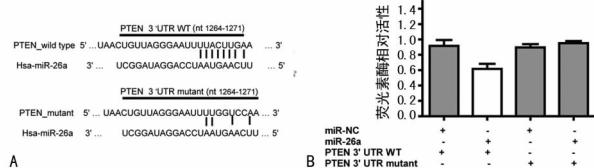
图 1 ox-LDL 对 HAECS 细胞活性、凋亡及 miR-26a 的影响



A: 转染 miR-26a mimic 后 HAECS 细胞中 miR-26a 的相对表达水平; B: 不同处理组作用 HAECS 后的细胞活性; C: 不同处理组作用 HAECS 后的细胞凋亡率;^a: $P < 0.05$, 与转染 miR-NC 组比较。

图 2 过表达 miR-26a 抑制 ox-LDL 对 HAECS 细胞活性和凋亡的作用

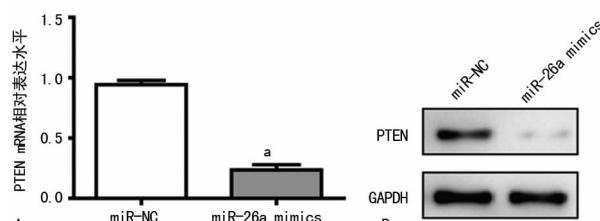
2.3 pMIR-PTEN 的 3'UTR 荧光报告载体构建及荧光素酶活性检测 采用生物信息学软件(Targetscan)预测 miR-26a 的靶基因 PTEN, 同时构建 PTEN 3'UTR 及突变型 3'UTR 的荧光素酶报告基因载体(图 3A)。荧光素酶活性检测结果显示, 转染 miR-26a mimics 和 pMIR-PTEN 的 3'UTR 的荧光强度较转染 miR-NC 和 pMIR-PTEN 的 3'UTR 显著降低($P < 0.05$), miR-26a 对 pMIR-PTEN 的 3'UTR 的表达具有抑制作用, 并且该抑制功能通过 miR-26a 与 pMIR-PTEN 的 3'UTR 区结合实现, 提示 PTEN 是 miR-26a 的靶基因(图 3B)。



A: Targetscan 预测 miR-26a 的靶基因; B: 检测不同转染组的相对荧光素酶活性。

图 3 pMIR-PTEN 的 3'UTR 荧光报告载体构建及荧光素酶活性检测

2.4 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平 转染 miR-26a mimics 后 PTEN mRNA 和蛋白水平较转染 miR-NC 显著降低。见图 4。



A: qRT-PCR 检测转染 miR-26a mimic 后 HAECS 细胞中 PTEN 的相对表达水平; B: Western blot 检测转染 miR-26a mimic 后 HAECS 细胞中 PTEN 的蛋白表达水平。

图 4 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达水平

3 讨 论

动脉粥样硬化是一种复杂的免疫炎性疾病。内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞在动脉粥样硬化的发生、发展中都发挥重要的作用。重要的是血管内皮细胞的损伤通常被认为是动脉粥样硬化发生的起始步骤。促动脉粥样硬化的危险因素包括,

高血糖、血管紧张素Ⅱ、ox-LDL, 这些因素均能介导内皮细胞的凋亡^[9]。ox-LDL 在损伤形成, 刺激内皮细胞的自杀性程序死亡发挥关键的作用, 其主要的机制是通过 caspase 依赖和 caspase 非依赖的途径介导的。miRNAs 的异常表达参与调控了多种内皮细胞的存活与死亡, 新近的研究报道了 miR-126 影响了内皮细胞的重建, 同时也有研究表明 miR-21、miR-223、miR-29b 等参与了内皮细胞的凋亡^[10]。miR-26 被报道在心血管疾病中发挥不同的功能, miR-26a 的过表达能够减少房颤的发生率^[11], 另外 miR-26a 能够发挥抗血管生成因子的作用, miR-26a 在内皮细胞中表达的降低能够促进血管的生成。本研究发现了 miR-26a 在内皮细胞发挥着抗细胞凋亡的重要作用。

PTEN 起初被鉴定发挥肿瘤抑制子的功能, 主要通过 PI3K 依赖的信号通路^[12]。凋亡是细胞的一种程序性死亡, 而在这个过程中线粒体和内质网都发挥了重要的作用。有文献报道, 用凋亡诱导剂 staurosporine 处理细胞后, 能够使 PTEN 定位聚集于线粒体^[13]。更进一步的研究表明抑制 PTEN 的表达能够显著降低活性氧族(ROS)的增加水平, 同时也有研究表明 PTEN 的沉默表达损伤了雌激素受体(ER)钙离子的释放功能, 这就降低了细胞质和线粒体中钙离子的浓度, 也就降低了细胞对钙离子介导的凋亡刺激信号的敏感性^[14]。这些研究均表明了 PTEN 在促凋亡发生过程中发挥重要的作用。

在本研究中, 证实了 miR-26a 是体外内皮细胞凋亡过程中的关键因子。miR-26a 的过表达能够抑制 ox-LDL 介导的 HAECS 凋亡作用。其主要的作用机制是 miR-26a 抑制了其靶向调控基因 PTEN 及 PTEN 相关的凋亡信号通路。本研究为血管性疾病(如动脉粥样硬化)的治疗提供了新的治疗靶点和研究策略。

参考文献

- [1] Shah NR, Mahmoudi M. The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 86(2): 147-157.
- [2] De Lorenzo A, Moreira AS, Souza EG, et al. Insulin-like growth factor-1 in early-onset coronary artery disease: Insights into the pathophysiology of atherosclerosis[J]. Int J Cardiol, 2015, 202(6): 1-2.

- [3] Hovland A, Jonasson L, Garred P, et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2):480-494.
- [4] Moss ME, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6(3):153.
- [5] Jansen F, Yang X, Nickenig G, et al. Role, function and therapeutic potential of microRNAs in vascular aging [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(3):324-330.
- [6] Menghini R, Stöhr R, Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis [J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 17(8):68-78.
- [7] Zhang ZH, Li J, Liu BR, et al. MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(3):312-319.
- [8] Luo X, Pan Z, Shan H, et al. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier Potassium current changes in atrial fibrillation [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5):1939-1951.
- [9] Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic
- Clue to the 'response to injury' hypothesis [J]. *Circulation*, 1997, 95(7):1760-1763.
- [10] Zhu HQ, Li Q, Dong LY, et al. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3):764-770.
- [11] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. *Circ Res*, 2013, 113(11):1231-1241.
- [12] Hopkins BD, Parsons RE. Molecular pathways: intercellular PTEN and the potential of PTEN restoration therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(21):5379-5383.
- [13] Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, et al. PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(2):197-207.
- [14] Bononi A, Bonora M, Marchi S, et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca^{2+} signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(12):1631-1643.

(收稿日期:2016-08-11 修回日期:2016-10-06)

(上接第 5051 页)

导致的 IFN- γ 、IL-2 下调和 IL-4、IL-10 上调, 均对抑制炎症反应和 CAV 进程起到了关键作用, 对术后排斥反应起到了保护作用。

本实验证明腺病毒载体介导的供体 SOCS3 基因转染能够通过调控 Th1/Th2 细胞分化, 抑制其促炎功能。在该研究方向上继续深入挖掘, 可能会获得更多信息。进一步明确 SOCS3 对移植植物血管病的影响和机制, 可能在慢性排斥反应的治疗方面取得新的突破口。

参考文献

- [1] Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy—recent developments [J]. *Circulation*, 2008, 117(16):2131-2141.
- [2] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways regulation of T-Cell inflammation by SOCS1 and SOCS3 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5):980-985.
- [3] Gelpi C, Roldan C, Mirabet S, et al. Correlation of immunological markers with graft vasculopathy development in heart transplantation [J]. *J Heart Lung Tran*, 2012, 31(4S):S167.
- [4] Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(9):666-678.
- [5] Frey O, Kamradt T. Effector function plasticity of T helper lymphocytes [J]. *Z Rheumatol*, 2009, 68(10):834-835.
- [6] Zhu JF, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells [J]. *Cell Res*, 2010, 20(1):4-12.
- [7] Xu W, Di Santo JP. Taming the beast within: regulation of innate lymphoid cell homeostasis and function [J]. *J Immunol*, 2013, 191(9):4489-4496.
- [8] Bernink JM, Spits H. Th1-and Th2-like subsets of innate lymphoid cells [J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1):133-138.
- [9] Klose SC. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ T+ innate lymphoid cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7436):261-265.
- [10] Carow B, Reuschl AK, Gavier-Widen DA, et al. Critical and independent role for SOCS3 in either myeloid or T cells in resistance to mycobacterium tuberculosis [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7):e1003442.
- [11] Issa FS, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, 6(1):155-169.
- [12] Safinia N. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction [J]. *Kidney Int Suppl*, 2010(119):S2-12.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)