

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 凋亡作用的机制研究

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 凋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]** 微 RNAs;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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2-4]</sup>。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<sup>[5-6]</sup>。

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。

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 凋亡中的作用机制。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。

**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, Lipofectamine™2000 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), TUENL 凋亡检测试剂(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℃、5% CO<sub>2</sub> 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℃ 15 min, 85℃ 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℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 共行 39 次循环; 反应结束后得到 C<sub>t</sub> 值, 根据 C<sub>t</sub> 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 1×10<sup>5</sup>/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 溶解所形成的甲瓩晶体, 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℃ 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。

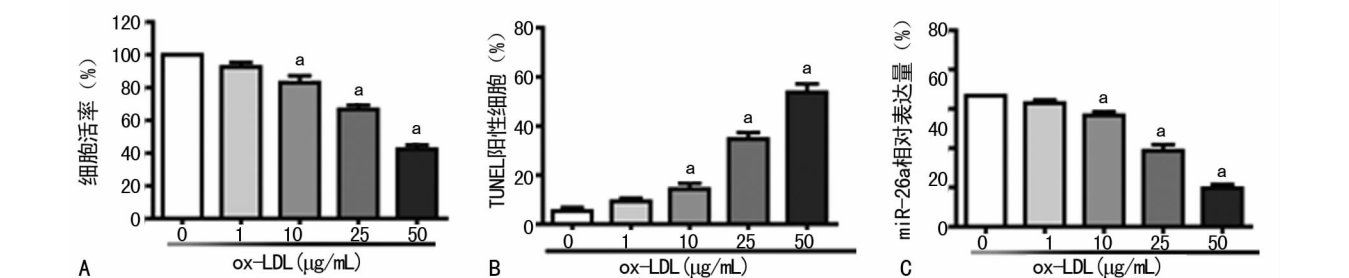
**1.2.6 蛋白质印迹法(Western blot)** 将转染 miR-26a mimics 和 miR-NC 后的两组 HAECs 细胞使用细胞裂解缓冲液裂解, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清并行蛋白浓度测定。取 20 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE 胶分离后, 湿转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别采用 PTEN 的一抗(1:1 000 稀释), GAPDH 的一抗(1:2 000 稀释)孵育过夜, 再与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h, 采用 Supersignal West Dura Extended Duration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



[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<sup>2+</sup> 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- $\gamma$ 、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 对移植血管病的影响和机制, 可能会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-RORgammat + 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)