

microRNA-132 在人脐静脉内皮细胞中调控作用的研究

张析心,陶利娟

作者单位:(410007)中国湖南省长沙市,湖南省儿童医院眼科
作者简介:张析心,女,毕业于中南大学湘雅医院眼科,博士,主治医师,研究方向:小儿眼病、眼底病。
通讯作者:陶利娟,女,毕业于南华大学,硕士,主任医师,主任,研究方向:斜弱视、屈光、眼保健。wupoxin@suhu.com
收稿日期:2016-04-28 修回日期:2016-09-07

Effect of regulation in human umbilical vein endothelia cells treated by microRNA-132

Li-Xin Zhang, Li-Juan Tao

Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China

Correspondence to: Li-Juan Tao. Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China. wupoxin@suhu.com

Received:2016-04-28 Accepted:2016-09-07

Abstract

• **AIM:** To evaluate the regulatory effect of microRNA-132 (miR-132) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC).

• **METHODS:** *In vitro* cultured human umbilical vein endothelia cells in hypoxic environment for 6h, then maintained under normal oxygen condition for 3h, 6h, 12h, 24h. miR-132 and peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) expression was detected by quantitative Real-time polymerase chain reaction and Western blot analysis. Human umbilical vein endothelial cells transfected miR-132 mimic and miR-132 inhibitor(anti-miR-132) were measured by quantitative Real-time polymerase chain reaction and Western blot.

• **RESULTS:** miR-132 and PGC-1 α expression was significantly ($P < 0.01$) upregulated in the hypoxic environment of cells at 3h compared with the normal oxygen condition. After cells transfection, the hypoxic environment the miR-132 and PGC-1 α expression were markedly increased compared with the normal oxygen condition. The cells transfected miR-132-mimic, the expression of the miR-132 and PGC-1 α were higher than that of transfected anti-miR-132 and contrast group ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** miR-132 level is highly expressed in the HUVEC under hypoxia and may be an effect of regulation for PGC-1 α .

• **KEYWORDS:** microRNA-132; peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ; human umbilical vein endothelial cells; hypoxia

Citation: Zhang LX, Tao LJ. Effect of regulation in HUVEC treated by microRNA-132. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016; 16(10):1820-1823

摘要

目的: 探讨 miR-132 在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelia cells, HUVEC) 中的调控作用。

方法: 体外低氧培养人脐静脉内皮细胞 6h 后继续常氧培养 3、6、12、24h, 利用 Real-time PCR 检测 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 表达变化, Western-blot 检测 PGC-1 α 蛋白表达变化, 及观察各组与正常培养的细胞之间的表达差异。通过对人脐静脉内皮细胞转染 miR-132 模拟物与拮抗剂后, 再分别置于常氧和低氧环境中培养, 利用 Real-time PCR 检测不同氧条件下 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 的表达变化, Western-blot 检测 PGC-1 α 蛋白表达变化。

结果: miR-132 和 PGC-1 α 在细胞低氧培养后继续常氧培养 3h 时蛋白与 mRNA 表达量最高, 与正常培养的细胞表达差异最为明显 ($P < 0.01$)。细胞转染后可观察到 miR-132 和 PGC-1 α 在低氧组表达量要高于常氧组, 而两组中转染 miR-132 模拟物后的表达量要高于转染拮抗剂组 ($P < 0.01$)。

结论: miR-132 在低氧时的人脐静脉内皮细胞中表达明显上调, 对 PGC-1 α 存在调控作用。

关键词: microRNA-132; 过氧化物酶增殖激活受体- γ 共激活子-1 α ; 人脐静脉内皮细胞; 缺氧

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.10.08

引用: 张析心, 陶利娟. microRNA-132 在人脐静脉内皮细胞中调控作用的研究. 国际眼科杂志 2016; 16(10):1820-1823

0 引言

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类生物内源的非编码小 RNA, 由 20 ~ 24 个核苷酸组成, 通过与 mRNA 转录物的 3' 非翻译区结合而调控基因转录后表达^[1]。miR-132 是发现较早的 miRNA 之一, 2002 年马克斯普朗克学会的 Lagos-Quintana 等首次在小鼠神经组织中发现 miR-132^[2], 成熟的 miR-132 长度为 22bp, 由长度为 66bp 的前体序列进行加工而成^[3], miR-132 具有进化保守性, 在人、大鼠、小鼠、猴等物种中具有相同的序列与结构。作为内皮细胞特异性 miRNA 之一, miR-132 在内皮靶向 p120RasGAP 诱导新血管形成被称为血管生成开关。调查结果显示, 在人类血管生成的胚胎干细胞模型中, miR-132 高度上调, 这在正常内皮中是检测不到的^[4]。前期研究中, 我们已经发现过氧化物酶增殖激活受体- γ 共激活子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 参与了调控小鼠视网膜新生血管形成^[5]。本研究中, 我们将体外培养人脐静脉内皮细胞, 并进行缺氧培养, 观察缺氧状态下 miR-132 和 PGC-

1 α 的表达变化,同时对细胞进行转染 miR-132 模拟物(miR-132 mimic)和 miR-132 拮抗剂(anti-miR-132),观察在缺氧与常氧环境中两者的表达变化情况,从而为缺氧诱导的新生血管性疾病的发病机制和诊治研究提供新的思路基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelia cells, HUVEC)由湖南湘雅医院皮肤科惠赠,脂质体 Lipofectamine TM 2000(LF2000)和 Trizol 均购自美国 Invitrogen 公司,EGM 培养基、Opti-MEM 培养基及新生胎牛血清购自 Gibco 公司,实时定量 PCR 试剂盒购自美国 MBI 公司,RT-PCR 引物由上海捷瑞生物技术服务有限公司合成,miR-132-mimic 和 anti-miR-132 由广州锐博生物科技有限公司合成。兔抗鼠 PGC-1 α 抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗鼠 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养分组 体外培养 HUVEC,细胞进入对数期生长后,更换培养液,再将细胞分别置于常氧(20% O₂)和低氧(1% O₂, 5% CO₂和 94% N₂混合气体)环境中培养,低氧培养 6h 后,再恢复常氧培养 3、6、12、24h。对各时间点的细胞检测 miR-132 和 PGC-1 α 的表达变化。

1.2.2 脂质体介导细胞转染 HUVEC 转染 mir-132-mimic 和 anti-miR-132 及阴性对照物,细胞在转染的前 1d,将 5 \times 10⁴ 细胞接种在 6 孔板上,按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行转染。设置空白组、阴性对照组(NC,将 miR-132 序列随机打乱)、miR-132 模拟物组(miR-132-mimic)、miR-132 拮抗剂组(anti-miR-132)。mir-132-mimic 合成序列:5'-ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU-3'; anti-mir-132 合成序列:5'-AGUAACAAUCGAAAGCCACGGU-3'。细胞转染后分别置于常氧(20% O₂)和低氧(1% O₂)环境中继续培养 16h 后,对不同氧环境的各组细胞检测 miR-132 和 PGC-1 α 的表达变化。

1.2.3 qPCR 检测 miR-132 与 PGC-1 α mRNA 表达的变化 提取各组的总 RNA,miR-132 引物序列:上游:5'-GGCAACCGTGGCTTTCGA-3'; 下游:5'-TTTGGCACTAGCACATT-3'。U6 内参基因引物:上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'; 下游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 20s,60 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 10s,共 40 个循环。PGC-1 α 引物序列:上游:5'-CCTGCATGAGTGTGTGCTCT-3'; 下游:5'-GCAAAGAGGCTGCTTTCAC-3'。 β -actin 内参引物序列:上游:5'-CATTAAGGAGAAGCTGTGCT-3'; 下游:5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3'。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 20s,58.5 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 20s,共 40 个循环。

1.2.4 Western-blot 印迹检测 PGC-1 α 蛋白表达的变化

提取各组总蛋白后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,转 PVDF 膜。取出 PVDF 膜,对比蛋白质标准质量位置,将所需测定片段和内参片段膜剪下。加入封闭液(5% 脱脂牛奶),置水平摇床于室温下封闭 1h。加入一抗,PGC-1 α 一抗稀释比为 1:1000, β -actin 稀释比例为 1:200,置水平摇床于 4 $^{\circ}$ C 振摇过夜。加入二抗,洗膜。在暗室内用 ECL 发光法检测目的条带,X 射线曝光。以 β -actin 作为内对照。用 BandScan5.0 软件进行条带灰度分析。

统计学分析:数据采用 SPSS 19.0 统计软件包处理。

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-132 细胞转染效率检测 在转染率最高的时间点 24h 时,用荧光显微镜下观察细胞转染数量,采集该时间点荧光镜下视野与光镜下视野对比片(图 1),细胞的转染效率达到 80% 以上,可以进行后续实验。采用 Realtime PCR 法进行分析,以确定最佳干预片段(图 2)。

2.2 不同时间点各组 HUVEC 细胞 miR-132 和 PGC-1 α 表达变化

2.2.1 不同时间点各组 HUVEC 细胞 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 表达 HUVEC 在低氧培养 6h,再恢复常氧继续培养 3、6、12、24h 后,Realtime PCR 检测正常组细胞与各时间点细胞 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 的表达变化(图 3、4):正常组与缺氧培养后复氧 3、6、12、24h 时 miR-132 mRNA 相对含量分别为 1.0083 \pm 0.1324、2.5735 \pm 0.3049、1.9073 \pm 0.3172、1.5634 \pm 0.3419、1.0430 \pm 0.1634。复氧 3h 时 miR-132 mRNA 表达量最高,随着复氧时间延长,其表达含量逐步降低。正常组与缺氧培养后复氧 3、6、12、24h 时 PGC-1 α mRNA 相对含量分别为 1.07293 \pm 0.1752、13.3957 \pm 0.1569、2.8705 \pm 0.3616、1.7924 \pm 0.2515、1.3616 \pm 0.1577,与 miR-132 mRNA 表达趋势相似,在复氧 3h 表达最高,与正常组含量相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2.2 不同时间点各组 HUVEC 细胞 PGC-1 α 蛋白表达

HUVEC 中 PGC-1 α 的蛋白表达水平见图 5:92kD 检测到 PGC-1 α 蛋白表达,43kD 处检测到内参 β -actin 蛋白表达。缺氧干预后复氧 3h 时,PGC-1 α 在蛋白表达水平明显增高,与正常组蛋白表达水平相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。随着复氧时间延长,蛋白表达水平逐渐下调。

2.3 不同氧条件下各组 HUVEC miR-132 和 PGC-1 α 表达变化

2.3.1 不同氧条件下各组 HUVEC 细胞 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 表达 HUVEC 转染后,在不同氧条件下各组细胞中 miR-132 和 PGC-1 α mRNA 的表达变化见图 6、7:在常氧下,正常组、阴性对照组、转染模拟物组、转染拮抗剂组的 miR-132 mRNA 的含量为 0.9683 \pm 0.1154、1.0135 \pm 0.1075、3.9581 \pm 0.3453、0.2616 \pm 0.3244;PGC-1 α mRNA 的含量为 1.0926 \pm 0.1591、1.0493 \pm 0.1331、3.3232 \pm 0.1457、0.5391 \pm 0.1612。而在缺氧条件下各组中 miR-132 mRNA 的含量为 2.7660 \pm 0.4568、2.6658 \pm 0.3494、7.1525 \pm 0.4137、0.3187 \pm 0.1109;PGC-1 α mRNA 的含量为:3.4582 \pm 0.3456、3.4751 \pm 0.2420、5.4544 \pm 0.1560、1.8523 \pm 0.2826。两种氧条件下,细胞转染 mir-132-mimic 后 miR-132 mRNA 表达量较其他各组表达量明显增高。与正常组相比,差异有统计意义($P<0.01$)。而在低氧条件下的各组细胞 miR-132 mRNA 表达量又较其在常氧条件下的表达量有不同程度的上调。

2.3.2 不同氧条件各组 HUVEC 细胞 PGC-1 α 蛋白表达

HUVEC 转染 mir-132-mimic、anti-mir-132、阴性对照物后分别在常氧和低氧环境中培育后 PGC-1 α 蛋白表达水平见图 8:与 PGC-1 α mRNA 表达趋势一致,低氧中的表

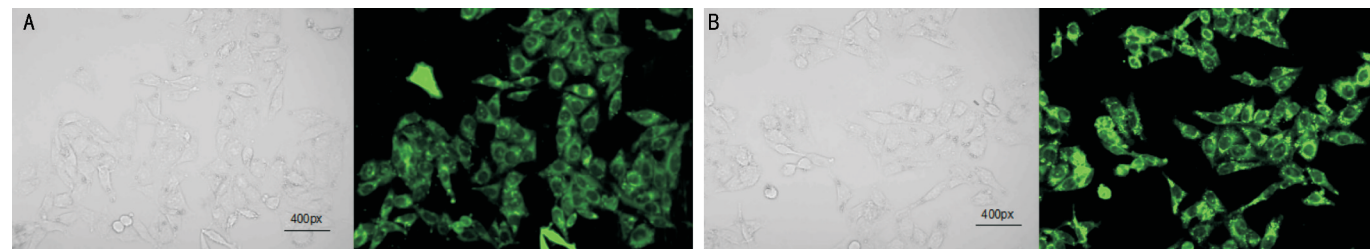


图1 细胞转染效率检测白光和荧光照片 A:人 miR-132 模拟物转染;B:人 miR-132 拮抗剂转染。

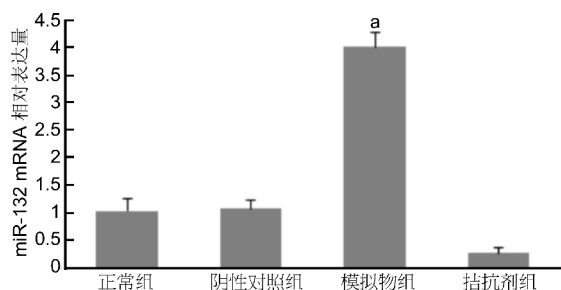


图2 各组 HUVEC 转染后 miR-132 mRNA 表达变化 $^aP < 0.01$ vs 拮抗剂组。

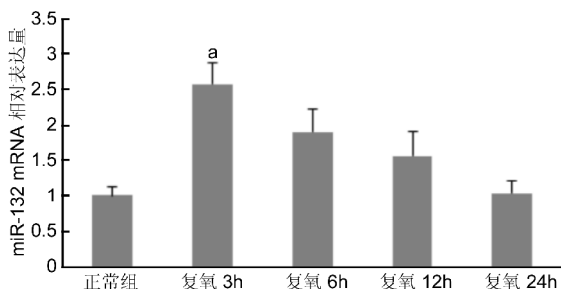


图3 不同时间点各组 HUVEC 中 miR-132 mRNA 表达 $^aP < 0.05$ vs 正常组。

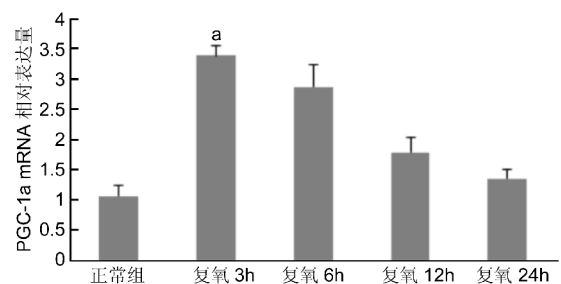


图4 各时间点组 HUVEC 中 PGC-1α mRNA 表达 $^aP < 0.05$ vs 正常组。

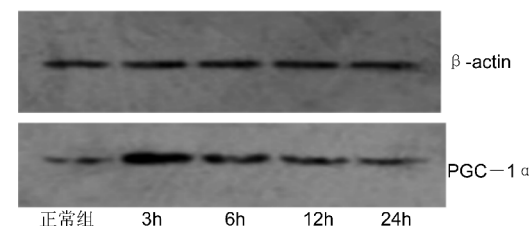


图5 不同时间点各组 HUVEC 中 PGC-1α 蛋白表达的 Western-blot 印迹结果。

达量明显高于常氧条件。而转染 miR-132-mimic 后 PGC-1α 蛋白与正常组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

microRNA 是近年来发现的存在于各种生物体内具有

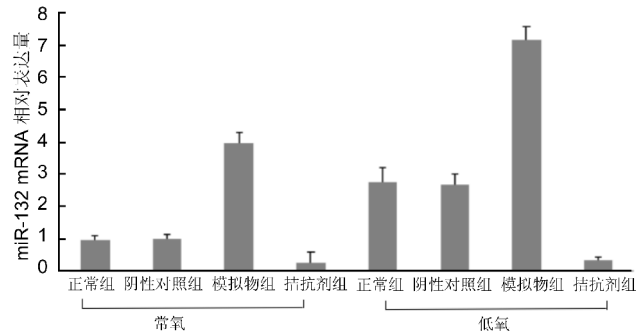


图6 不同氧条件下各组 HUVEC 中 miR-132 mRNA 表达。

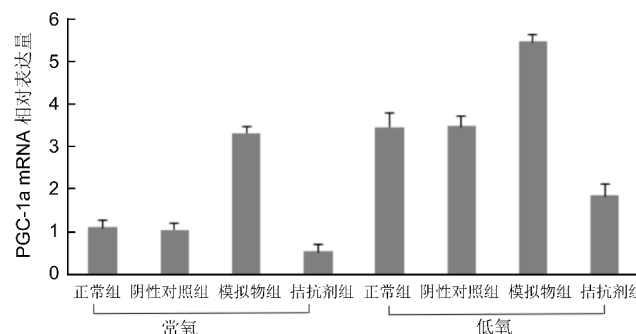


图7 不同氧条件下各组 HUVEC 中 PGC-1α mRNA 表达。

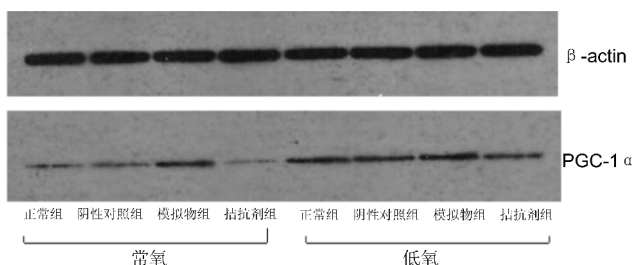


图8 不同氧条件各组 HUVEC 中 PGC-1α 蛋白表达的 Western-blot 印迹结果。

重要调控作用的一种小分子 RNA,与其它调控基因表达的方式如转录水平调控或者表观遗传修饰相比,miRNAs 具有很多优势。首先,miRNAs 相比反式作用因子的调节,能在细胞质中发挥作用。其次,miRNAs 的表达水平可在细胞中被迅速上调至几千个拷贝,相比其它调节方式具有更大的调节潜能。再者,在为细胞隔离外界干扰上,miRNAs 介导的反馈调节机制比转录抑制因子应对外界刺激更加有效。最后,miRNAs 能同时调节多个靶基因,而且通常这些靶基因位于同一信号转导通路中,使得 miRNAs 对于调节细胞针对特定刺激的基因表达改变更为有效^[6]。

miR-132 可通过作用于新生血管刺激因子,在血管过度增生、血管瘤及肿瘤血管发生中发挥重要作用,对血管新生过程中起调节作用^[7]。当血管生长因子信号上调

miR-132 的表达时, p120RasGAP 的表达水平降低, 可使 Ras 持续激活, 放大血管生成信号^[8]。本研究中, 利用人脐静脉内皮细胞在低氧中培育, 之后恢复常氧继续培育, 对细胞模拟一个“缺氧-高氧”状态, 观察 miR-132 在新生血管生成过程中表达情况以及对 PGC-1 α 可能存在的调控作用。实验结果表明: 细胞缺氧诱导后, 细胞中 miR-132 mRNA 表达水平明显升高, 复氧 3h 表达量最高, 随着复氧时间延长, 其表达量逐渐下调, 至 24h 左右表达量接近正常组状态。说明缺氧刺激后血管内皮细胞中的 miR-132 会迅速生成, 在新生血管形成过程中起着促进作用, 代偿组织的缺氧状态; 而当缺氧刺激消除后, miR-132 则会降至一个平衡状态。在我们的前期研究中, 发现在缺氧诱导的视网膜新生血管模型小鼠中, 小鼠视网膜血管 PGC-1 α 的表达也明显上调, 说明缺氧也可以调控视网膜中 PGC-1 α 的表达。为了检测 miR-132 对新生血管及 PGC-1 α 的调控作用, 本研究采用脂质体介导细胞转染 mir-132-mimic 与 anti-mir-132, 转染后将细胞分别置于常氧与低氧中培育, 观察 HUVEC 中 miR-132 和 PGC-1 α 的变化及相应的分子机制。常氧组中, 未转染与转染阴性对照物组细胞中 miR-132 处于较低表达水平, 转染 mir-132-mimic 表现出明显升高趋势, 而转染 anti-mir-132 后出现显著表达下调。而在低氧组中, 转染 mir-132-mimic 与 anti-mir-132 两者同样表现出与常氧组中类似的升高与下降的表达趋势。但在转染 mir-132-mimic、未转染与转染阴性对照物组细胞中, miR-132 的表达水平要较其在常氧中表达量高。表明在低氧状态下, 转染 mir-132-mimic 细胞中 miR-132 表达量明显增加, 可促进新生血管形成。PGC-

1 α 的表达水平也表现出类似的趋势, 进一步证实了缺氧可诱导血管内皮细胞中 PGC-1 α 的表达增加, PGC-1 α 对新生血管也存在调控作用, 但细胞转染 mir-132-mimic 后 PGC-1 α 的表达水平明显增强, 说明在缺氧环境中 miR-132 对 PGC-1 α 具有更强的调控能力。

总之, 本研究揭示了缺氧时 HUVEC 中 miR-132 和 PGC-1 α 的表达增强, 对细胞转染 mir-132-mimic 后, 可以增强细胞中 miR-132 的表达量, 进而进一步刺激 PGC-1 α 的表达上调, 进而可促进新生血管形成。本研究为探讨 miR-132 与新生血管及对 PGC-1 α 的可能存在的调节信号通路提供新的思路, 为进一步的研究提供实验基础。

参考文献

- 1 Jimenez - Mateos EM, Henshall DC. Epilepsy and microRNA. *Neuroscience* 2013;238:218-229
- 2 王攀, 戚丽华, 刘雪林, 等. MiR-132 的生物学功能. *生物技术通讯杂志* 2013;24(4):562-564
- 3 管娣, 刘春颖, 陈晨, 等. MiR-132 抑制肿瘤转移. *生物化学与生物物理进展* 2013;40(2):159-164
- 4 Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, *et al*. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nature Medicine* 2010;16(8):909-914
- 5 Zhang L, Jiang J, Xia X. Suppression of retinal neovascularization by siRNA targeting PGC-1 α . *Int J Mol Med* 2014;33(6):1523-1530
- 6 Anand S. A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis. *Vasc Cell* 2013;5(1):2
- 7 杨子岩, 晏贤春, 赵星成, 等. 微小 RNAs 与新生血管形成. *心脏杂志* 2015;27(1):102-109
- 8 Anand S, Cheresch DA. Emerging role of Micro-RNAs in the regulation of angiogenesis. *Genes Cancer* 2011;2(12):1134-1138