

低氧抑制人脐静脉血管内皮细胞 miR-26a 的表达

俞楠泽 龙 飞 贾毅弘 王晓军 龙 笑

摘 要 目的 观察低氧对人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) miR-26a 及 PTEN/AKT/VEGF 通路相关因子表达的影响。方法 分常氧组和低氧组培养 48h。荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测 miR-26a 及 PTEN/AKT/VEGF 通路相关因子的表达。结果 RT-PCR 结果显示低氧组 HUVEC 中 miR-26a 和 PTEN 的相对表达量为 0.42 ± 0.02 和 0.62 ± 0.03 , 显著低于常氧组的 1.00 ± 0.34 和 1.00 ± 0.35 ($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果显示, 与常氧组相比, 乏氧组 HIF-1、VEGF 和 AKT 蛋白表达明显升高, PTEN 蛋白明显降低 ($P < 0.05$)。结论 低氧抑制 HUVEC miR-26a 的表达并继发下游 PTEN/AKT/VEGF 因子的序贯反应, 可作为创面改善缺血状态治疗的新靶点。

关键词 低氧 人脐静脉血管内皮细胞 miR-26a PTEN

中图分类号 R318.0 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.015

Hypoxia Inhibits MiR-26a Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Yu Nanze, Long Fei, Jia Yihong, et al. Division of Plastic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Abstract Objective To observe the miR-26a expression and PTEN/AKT/VEGF pathway factor expression of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) under hypoxia condition. **Methods** HUVEC were divided into normoxia group and hypoxia group. RT-PCR was used to detect differences of miR-26a and PTEN expression between the groups, and the expression of PTEN/AKT/VEGF pathway factors at the protein level was detected by Western blot. **Results** After 48 hours, the cells in the hypoxic group expressed much lower miR-26a and PTEN than the normoxia group at the RNA level ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that the hypoxic group expressed increased HIF-1 and VEGF protein level and decreased AKT and PTEN protein level. **Conclusion** Low expression of miR-26a can trigger PTEN/AKT/VEGF pathway factor chain reaction in HUVEC under hypoxia conditions in vitro, which indicates miR-26a may be a potential treatment target for chronic ischemic wounds.

Key words Under hypoxia; Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); MiR-26a; PTEN

创面愈合的过程中涉及多种细胞、因子、介质和基质等, 是一个动态、复杂的生物学过程。发生急性损伤后不久, 由于创伤后组织血供减少, 更重要的是修复细胞增殖时造成的高代谢的高氧耗, 使创面微环境处于低氧状态。在急性创伤发生的几天后, 创面血运逐步重建, 局部氧含量逐渐恢复。因为各种因素如营养不良、组织缺血再灌注损伤、感染、糖尿病、细胞衰老等, 可使局部较长时间处于低氧状态, 血管重建受阻, 创面局部继续恶化, 导致创面经久不愈, 成为难治性创面。血管的新生在组织修复重建中起到关键的作用, 细胞低氧很可能是影响创面难愈的最关键因素。miR-26a 是新发现的具有血管生成抑制作用的

microRNA, 它作用靶向基因 PTEN, 对血管生成起调控作用。本实验比较常氧及低氧状态下人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) miR-26a 及 PTEN/AKT/VEGF 的表达情况及变化规律, 为难治性创面的治疗提供一些依据。

材料与方法

1. 实验材料: 人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC) (北京协和细胞中心); DMSO, DMEM 培养基, 胎牛血清 (美国 Gibco 公司)。所有抗体 (英国 Abcam 公司)。

2. 方法: (1) 细胞培养及分组处理: HUVEC 分为常氧和低氧组。低氧组: 细胞在 $1\% \text{O}_2 - 5\% \text{CO}_2 - 94\% \text{N}_2$ 的混合气体细胞培养箱中培养 48h; 常氧组: 细胞在 $20\% \text{O}_2 - 5\% \text{CO}_2 - 75\% \text{N}_2$ 的混合气体细胞培养箱中培养 48h。(2) 免疫细胞化学检测 HUVEC 表面 CD31 的表达: 取第 2 代 HUVEC, 消化后接种于铺有盖玻片的 24 孔培养板中, 贴壁培养 24h。弃去

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81401600); 中国医学科学院协和青年科研基金资助项目 (A101100)

作者单位: 100073 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院整形外科

通讯作者: 龙笑, 电子信箱: pumclongxiao@126.com

培养基, PBS 清洗 3 次 $\times 5\text{min}$, 4°C 4% 多聚甲醛固定 10min, PBS 洗两遍。随后滴加 0.5% H_2O_2 溶液室温孵育 10min 去除内源性过氧化物酶。再次用 PBS 清洗 3 次 $\times 5\text{min}$, 滴加封闭用 1% 牛血清白蛋白, 室温孵育 10min, 封闭非特异抗原。滴加鼠抗人 CD31 一抗工作液, 4°C 过夜; PBS 代一抗为阴性对照。PBS 冲洗, 加二抗孵育 10min, 室温下 1h。PBS 冲洗, DAB 显色, 镜下观察, 自来水清洗终止反应。(3) 荧光定量 RT-PCR 检测 miR-26a 的表达: 从 GenBank 获得目的基因 mRNA 的全长序列, 利用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计引物序列。95 $^{\circ}\text{C}$, 3min, 变性。95 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30s, 35 个循环。采用比较 Ct 值法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法) 进行相对定量的数据分析。其计算公式为: ①改变的倍数 (fold change) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; ② $\Delta\text{Ct} = \text{Ct 靶基因} - \text{Ct 内参}$; ③ $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct 靶基因} - \text{Ct 内参})_{\text{实验组}} - (\text{Ct 靶基因} - \text{Ct 内参})_{\text{对照组}}$ 。(4) Western blot 法检测 PTEN/AKT/VEGF 通路相关因子的表达: 用 Quantity One 图像分析软件分析目标条带的吸光度值。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 所有计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据表达水平的比较采用两独立样本的 t 检验, 3 组或 3 组以上数据的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 体外培养和鉴定: HUVEC 传代细胞一般在 0.5~1.0h 开始贴壁增殖, 3~4h 完全贴壁, 3~5 天汇合成单层。传代次数越多, 增殖越慢, 汇合成单层

时间越长。早期贴壁多数细胞聚集成团, 只有少数细胞分散存在。贴壁细胞呈梭形, 胞核清晰, 呈圆形或椭圆形, 核分裂象多见, 胞质丰富, 内含小颗粒。长梭形或三角形的内皮细胞融合成单层后呈典型的“铺路石样”镶嵌排列 (图 1)。

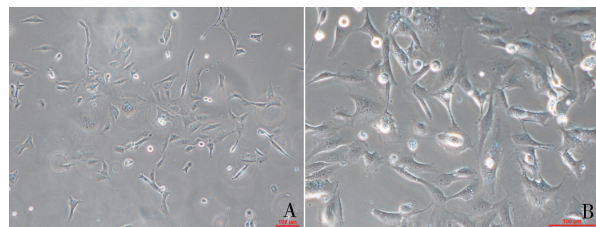


图 1 倒置显微镜下观察 HUVEC 的生长
A. $\times 100$; B. $\times 200$

2. 免疫组化检测 HUVEC 表面 CD31 的表达: CD31 免疫组化鉴定表现为培养细胞的胞质着棕黄色, 胞核蓝色, 阳性率为 99% (图 2)。

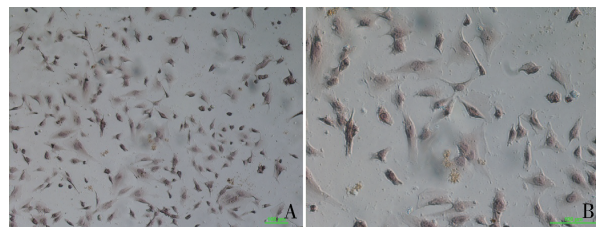


图 2 CD31 免疫组化鉴定结果
A. $\times 100$; B. $\times 200$

3. 荧光定量 RT-PCR 检测 miR-26a 的表达: 低氧组 HUVEC 中 miR-26a 相对表达量为 0.42 ± 0.02 , 显著低于对照组的 1.00 ± 0.34 ($P < 0.05$)。低氧组 HUVEC 中 PTEN 相对表达量为 0.62 ± 0.03 , 显著低于对照组的 1.00 ± 0.35 ($P < 0.05$)。

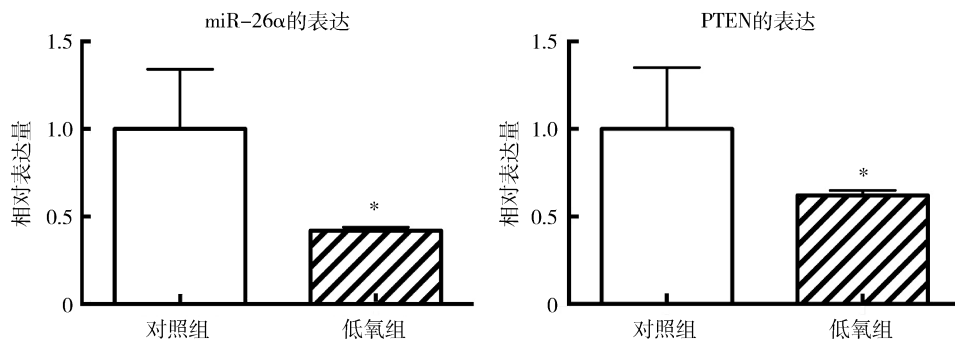


图 3 常氧和低氧条件下 HUVEC 膜型 miR-26a 和 PTEN 的表达差异
与对照组比较, * $P < 0.05$

4. Western blot 法检测 PTEN/AKT/VEGF 通路相关因子的表达: 低氧组 HIF-1、VEGF 和 AKT 蛋白表

达明显升高 ($P < 0.05$), 而 PTEN 蛋白明显降低 ($P < 0.05$)。如图 4 所示。

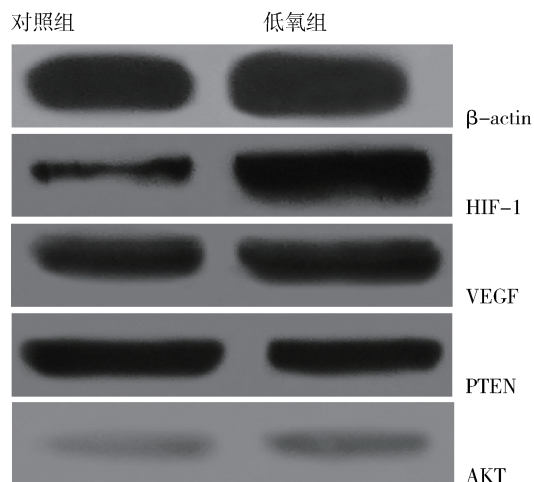


图 4 常氧和低氧条件下 HUVEC 膜型 HIF-1、VEGF、PTEN 和 AKT 蛋白表达

讨 论

血管的新生在组织修复重建中起到关键的作用,是肉芽组织成熟的必然过程,也是创伤后血运重新建立的基础。细胞低氧在难愈创面的发生、发展及其转归过程中扮演着极其重要的角色。笔者考虑,在慢性创面的情况下,这种内皮细胞的低氧状态,是否会影响血管内皮细胞的状态,通过相关生长因子的表达从而获得血管新生的趋向性。

在生长因子的刺激下,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI_3K)产生脂质第二信使 3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)。PIP3 是 PI_3K 途径的主要脂质第二信使,其反过来又结合到丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT^[1],将其聚集到细胞膜上并磷酸化,随后激活。激活的 AKT 参与一些与细胞存活,细胞循环和新陈代谢息息相关的蛋白磷酸化,其中,AKT 通过使哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)的磷酸化控制蛋白质合成和增殖。而内皮细胞的 AKT 持续活化已被证明是诱发肿瘤血管结构畸变和异常血管形成的一大因素^[2]。活化的 PI_3K /mTOR 信号通路可以特异性地提高低氧诱导因子 1α (HIF- 1α)的蛋白水平^[3]。血管内皮生长因子(VEGF)是一种强效血管生成因子, PI_3K /AKT 信号通路对内皮细胞血管生成和 VEGF 的表达均具有重要作用^[4]。 PI_3K /AKT 信号通路的活化通过 HIF- 1α 依赖性和非依赖性机制增加 VEGF 的表达,而低氧引起 HIF- 1α 的稳定化,刺激了 VEGF 的产生^[5]。

PTEN 主要存在于细胞质内,PTEN 基因的产物是一种双特异性磷酸酶,其同时具有蛋白磷酸酶活性

和脂质磷酸酶活性,在 D3 的位置拮抗 PI_3K 的功能^[6]。PTEN 使 PIP3 向 PIP2 转化从而负调节 PI_3K /AKT 信号通路调节血管生成^[7],通过抑制 PIP3 间接减少激活的 AKT 浓度,在 PI_3K 的下游效应水平调节 PI_3K /AKT 信号通路。AKT 的活化可维持 HIF- 1α 的稳定性,而低氧介导 PTEN 抑制 HIF- 1α 稳定^[8]。虽然 PTEN 基因对造血细胞的侵入及其临床意义还有待进一步阐明,但其已成为治疗白血病抑制血管生成的重要靶基因。最近的研究已经证明,在抑制 AKT 活化的同时,PTEN 还调节着 Jun N-末端激酶(JNK)的活性,而 JNK 通过稳定 VEGF 增加血管生成细胞的活性,从而刺激血管形成。亦有研究表明,PTEN 基因的突变也可以影响 VEGF 的活性^[9]。PTEN 基因的突变也可破坏 HIF- 1α ,从而影响 VEGF 的转录^[10]。将内皮细胞的 PTEN 基因完全敲除使内皮细胞过度增殖和血管重塑受损从而引起胚胎死亡,而有条件的 PTEN 基因敲除却使血管新生能力增强,促进肿瘤的生长^[11]。

本研究的实验结果也充分验证了 PTEN/AKT/VEGF 通路的存在及其在血管新生中的作用。根据 Western blot 法检测结果,当 HUVEC 在低氧的条件下培养时,细胞会相对地产生更多的 VEGF,从而促进血管新生。虽然,对于 VEGF 表达的调控可能存在不同的信号通路,但 PTEN/AKT/VEGF 通路的作用始终不可小视。笔者的研究结果显示,与常氧培养的 HUVEC 细胞相比,低氧组 PTEN 蛋白表达明显受到抑制,从而进一步促进了其下游的 AKT、HIF-1 基因的表达,最终上调血管生成强效因子 VEGF 的表达。

小分子 RNA(miR)是一类内源性的、短的、具有调控功能的非编码 RNA,在转录后水平通过结合 30 非翻译区(UTR)互补区域调节基因的表达,称为 mRNA 翻译抑制或 mRNA 的降解^[12]。最近证据表明,miR 在不同的生理和病理过程中扮演着重要的角色,包括发育、分化、增殖、凋亡与肿瘤的发生,其调节包括细胞分化,复制,迁移的不同的细胞过程中,细胞凋亡。miR-26a 含有 21 个核苷酸,位于人 3 号染色体的 3P21,是新发现的具有血管生成抑制作用的 miR,在人类及动物心肌梗死模型中其表达均显著上升^[13]。利用 miR-26a 抑制剂阻断其表达后,血管新生增加两倍,梗死面积显著减少。因此 miR-26a 可以作为缺血性疾病的治疗新靶点^[14]。此外,最新研究表明 PTEN 是 miR-26a 的直接目标,miR-26a 通

过影响 PTEN 的表达进而激活 AKT 信号通路, 增强肺癌细胞转移^[15]。

本实验的结果显示, 在低氧条件下培养的 HUVEC 细胞, 其 miR-26a 的表达明显抑制, 与其伴随的是其靶基因 PTEN 表达的减少, 及其 PTEN/AKT/VEGF 通路下游相关因子的改变。虽然 miR-26a 影响 PTEN 相关的信号通路进而影响血管生成的作用机制和效应仍需进一步研究。本研究首次发现在低氧条件下, HUVEC 内的 miR-26a 的表达受到抑制并继发下游因子的序贯反应, 推测其可作为创面改善缺血状态治疗新的研究靶点, 为难治性创面的治疗提供依据。

参考文献

- Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2: 220-223
- Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, *et al.* Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10: 159-170
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, *et al.* HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3995-4004
- Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 1749-1753
- Karar J, Maity A. PI₃K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 51
- Cully M, You H, Levine AJ, *et al.* Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 184-192
- Polak R, Buitenhuis M. The PI₃K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia [J]. *Blood*, 2012, 119: 911-923
- Li YM, Zhou BP, Deng J, *et al.* A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3257-3263
- Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective [J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16: 485-494
- Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8: 19-26
- Hamada K, Sasaki T, Koni PA, *et al.* The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 2054-2065
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 2999-3004
- 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: 1231-1241
- Liu B, Wu X, Liu B, *et al.* MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822: 1692-1704
- (收稿日期: 2015-11-02)
- (修回日期: 2015-11-20)
- (上接第 54 页)
- Lin GM, Li YH, Lin CL, *et al.* Gender differences in the impact of diabetes on mortality in patients with established coronary artery disease: A report from the Eastern Taiwan integrated health care delivery system of Coronary Heart Disease (ET-CHD) registry, 1997-2006 [J]. *Journal of Cardiology*, 2013, 61(6): 393-398
- 王洪义, 高明林. 2 型糖尿病患者下肢骨折后凝血指标变化与下肢深静脉血栓形成的关系 [J]. *血栓与止血学*, 2015, 21(1): 10-12
- Gustafsson I, Hildebrandt P, Seibaek M, *et al.* Long-term prognosis of diabetic patients with myocardial infarction: relation to antidiabetic treatment regimen. The TRACE Study Group [J]. *Eur Heart J*, 2000, 21(23): 1937-1943
- Gloria LV, Barlow CE, Grundy SM, *et al.* Triglyceride-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio is an index of heart disease mortality and of incidence of type 2 diabetes mellitus in men [J]. *J In-*
- vest Med, 2014, 62(2): 345-349
- Franklin K, Goldberg RJ, Spencer F, *et al.* Implications of diabetes in patients with acute coronary syndromes. The global registry of acute coronary events [J]. *Arch Intern Med*, 2004, 164: 1457-1463
- Burgess SN, Mussap CJ, French JK. Management of acute coronary syndromes in patients with diabetes: implications of the FREEDOM trial. [J]. *Clin Ther*, 2013, 35(8): 1069-1075
- Xu X, Zhang W, Zhou Y, *et al.* Effect of trimetazidine on recurrent angina pectoris and left ventricular structure in elderly multivessel coronary heart disease patients with diabetes mellitus after drug-eluting stent implantation: a single-centre, prospective, randomized, double-blind study at 2-year follow-up [J]. *Clin Drug Invest*, 2014, 34(4): 1-8
- (收稿日期: 2015-12-29)
- (修回日期: 2016-01-09)