

# microRNA - 132 通过调节 VEGF 通路抑制缺血性脑血管病患者血管生成的机制研究

李 巍 高 洋 赵永刚 刘 欣 孙显辉 吕 彦 张景华

**摘要** 目的 探讨 microRNA(miRNA) - 132 通过调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通路抑制缺血性脑血管病患者血管生成的机制。方法 人脐静脉内皮细胞分为空白组、阴性组与实验组,空白组不进行转染,阴性组与实验组经 Lipofectamine2000 转染对照模拟物及 miRNA - 132 模拟物。采用 MTT 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,real - time PCR 检测 RNA 表达,Western blot 法检测蛋白表达。结果 转染后 24h 与 36h,实验组的 miRNA - 132 表达水平、细胞凋亡指数显著高于阴性组与空白组( $P < 0.05$ ),低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF) - 1 $\alpha$  和 VEGF RNA 与蛋白表达水平、细胞增殖指数显著低于阴性组与空白组( $P < 0.05$ ),阴性组与空白组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 miRNA - 132 可通过抑制 HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF 的表达,抑制人脐静脉内皮细胞增殖,促进其凋亡,从而发挥抑制缺血性脑血管病患者血管生成的作用。

**关键词** microRNA - 132 血管内皮生长因子 缺血性脑血管病 细胞增殖 细胞凋亡

**中图分类号** R74 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.014

**Mechanism of MicroRNA - 132 Inhibiting Angiogenesis in Patients with Ischemic Cerebrovascular Disease by Regulating VEGF Pathway.**

Li Wei, Gao Yang, Zhao Yonggang, et al. Department of Neurology, General Hospital of Northern Theater Command, PLA, Liaoning 110016, China

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of microRNA(miRNA) - 132 inhibiting angiogenesis in patients with ischemic cerebrovascular disease by regulating the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were divided into blank group, negative group and experimental group. The blank group were not transfected, and the negative group and the experimental group were transfected with control mimics and miRNA - 132 mimics by Lipofectamine2000. Cell proliferation was detected by MTT assay. Apoptosis were detected by flow cytometry. RNA expression was detected by real - time PCR, and protein expression was detected by Western blot. **Results** At 24h and 36h after transfection, the expression level and apoptosis index of miRNA - 132 in the experimental group were significantly higher than those in the negative group and the blank group ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of hypoxia inducible factor (HIF) - 1 $\alpha$  and VEGF RNA, protein and cell proliferation index were significantly lower than those of negative group and blank group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences compared between the negative group and the blank group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** MiRNA - 132 can inhibit the proliferation of human umbilical vein endothelial cells and promote its apoptosis by inhibiting the expression of HIF - 1 $\alpha$  and VEGF, thereby inhibiting the angiogenesis of patients with ischemic cerebrovascular disease.

**Key words** MicroRNA - 132; Vascular endothelial growth factor; Ischemic cerebrovascular disease; Cell proliferation; Apoptosis

缺血性脑血管病具有高发生率、高致残率及高病死率的特点,是指中枢神经系统局灶性缺血所致的神经功能障碍<sup>[1]</sup>。我国每年约有 200 万缺血性脑血管病患者发病,其中 60% 左右留有不同程度的残疾<sup>[2]</sup>。该疾病的病理特征主要表现为颈动脉壁的逐渐变化和动脉的慢性退化,使得动脉变细,导致整个动脉失

去弹性。该疾病的形成是一个复杂的过程,其病因包括饮酒、血液黏滞度升高、高血压、年龄、吸烟、血糖、高血脂等,相关的学说主要有氧化应激反应学说、感染学说、脂质浸润学说、炎症学说等<sup>[3,4]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的最重要的血管生成刺激因子,是在牛垂体形状细胞体外细胞培养分离并纯化的糖蛋白,能够增强内皮细胞具有的分裂增生能力,还可以提升毛细血管通透性。其也可参与正常组织形态的维持和保证

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401097)

作者单位:110016 沈阳,北部战区总医院神经内科

通讯作者:李巍,电子信箱:liwei66233@126.com

细胞排列结构的稳定,可保证细胞层的通透屏障功能<sup>[5]</sup>。中枢神经细胞、神经细胞可在一些内源性因子的刺激下合成、分泌 VEGF,特别是中枢神经系统受到侵犯后,机体的炎症反应与免疫反应也可诱导 VEGF 水平升高<sup>[6]</sup>。微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为一类新型基因调控分子,与缺血性脑血管病的发生、发展密切相关。miRNA 可影响血管内皮细胞的功能,参与血管平滑肌细胞的迁移和增殖。miRNA - 132 是激活突触活性和可塑性的分子,在缺血性脑血管病患者中呈现低表达状况<sup>[7]</sup>。miRNA - 132 表达下降可使得内皮细胞增殖及迁移能力均受到抑制,进而导致血管出血、破裂,诱发心脑血管疾病的发生<sup>[8]</sup>。本研究具体探讨了 microRNA - 132 通过调节 VEGF 通路抑制缺血性脑血管病患者血管生成的机制,从而揭示 miRNA - 132 在缺血性脑血管病中的分子作用机制,现报道如下。

### 材料与方 法

1. 材料与试剂:人脐静脉内皮细胞来源于中国医学科学院的细胞储藏中心,培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>; miRNA - 132 模拟物 (5' - UAACAGUCUACAGC-CAUGGUCGACCAUGGCUGUAGACUGUAAU - 3') 和 miRNA - 132 对照模拟物 (5' - CGACCAUGGCU-GUAGACUGUUA - 3') 购自美国 Ambion 公司;胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶、转染试剂脂质体 Lipofectamine2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司;兔抗人 β - actin 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;兔抗人 HIF - 1α、VEGF 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;总 RNA 抽提试剂盒、Total RNA Kit 购自美国 Omega 公司。

2. 细胞分组与转染:人脐静脉内皮细胞维持对数生长,转染前 1 天将处于对数生长期的细胞分别接种至 6 孔板中,将其分为空白组、阴性组与实验组,每组设 3 个重复。待细胞汇合度达 60% 左右时,空白组不进行转染。阴性组与实验组经 Lipofectamine2000 转染对照模拟物及 miRNA - 132 模拟物,转染后 6h 换液。

3. MTT 法检测细胞增殖:细胞转染后 24h 与 36h,接种到 96 孔板中,根据合适的铺板细胞数,每孔约 100μl 细胞悬液,培养 2h,加入 10μl MTT 试剂,再培养 4h 后测定每孔的 450nm 吸光度,参比波长 600 ~ 650nm,计算细胞增殖指数。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡:细胞转染后 24h 与 36h,接种到 6 孔板,细胞贴壁后用 PBS 洗涤 2 次,加入 100μl Binding buffer 和 FITC 标记的 Annexin - V (20μg/ml) 10μl,室温避光 30min,再加入 PI (50μg/ml) 5μl,避光反应 5min 后,加入 400μl Binding buffer,立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测,记录细胞凋亡指数。

5. real - time PCR 检测 RNA 表达:本研究的 miRNA - 132 及 U6 特异性扩增引物来源于 ABI 相关试剂盒,根据 Genebank 查到人 HIF - 1α、VEGF 的 mRNA 序列。细胞转染后 24h 与 36h 收集细胞,提取总 RNA,采用两步法 real - time PCR:预变性 95℃, 15s;变性 95℃, 5s,退火延伸 60℃, 30s,共进行 45 个循环,数值分析采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 分析法。

6. Western blot 法检测蛋白表达:细胞转染后 24h 与 36h 收集细胞,裂解并提取细胞总蛋白,以 BCA 法检测蛋白浓度,每孔上样 20μg 蛋白,进行 SDS - PAGE 胶分离,转膜后封闭过夜,用 TBST 溶液先快速洗涤 3 次,孵育一抗过夜;TBST 溶液洗涤 3 次,孵育二抗室温 1h;TBST 溶液洗涤 3 次,将 ECL 试剂盒中 A 液和 B 液按 1:1 体积比例混合于 EP 管中,均匀覆盖于膜的表面,避光室温放置 2min,然后进行曝光分析。

7. 统计学方法:采用 SPSS 19.00 统计学软件对数据进行统计分析,计量数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间对比采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD - t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. RNA 表达比较:转染后 24h 与 36h,实验组的 miRNA - 132 表达水平显著高于阴性组与空白组 (P < 0.05),HIF - 1α、VEGF RNA 表达水平显著低于阴性组与空白组 (P < 0.05),阴性组与空白组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),详见表 1。

2. 细胞增殖指数比较:转染后 24h 与 36h,实验组的细胞增殖指数都显著低于阴性组与空白组 (P < 0.05),阴性组与空白组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),详见表 2。

3. 细胞凋亡指数比较:转染后 24h 与 36h,实验组的细胞凋亡指数都显著高于阴性组与空白组 (P < 0.05),阴性组与空白组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),详见表 3。

表 1 3 组转染后不同时间点的 RNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24h			36h		
		miRNA - 132	HIF - 1 $\alpha$	VEGF	miRNA - 132	HIF - 1 $\alpha$	VEGF
实验组	3	21.44 $\pm$ 4.22*#	0.67 $\pm$ 0.33*#	0.43 $\pm$ 0.21*#	45.23 $\pm$ 7.33*#	0.45 $\pm$ 0.14*#	0.38 $\pm$ 0.14*#
阴性组	3	2.18 $\pm$ 0.55	5.30 $\pm$ 0.11	4.98 $\pm$ 0.54	2.08 $\pm$ 0.53	5.28 $\pm$ 0.55	5.02 $\pm$ 0.41
空白组	3	2.14 $\pm$ 0.53	5.27 $\pm$ 0.13	5.02 $\pm$ 0.66	2.11 $\pm$ 0.45	5.33 $\pm$ 0.10	5.00 $\pm$ 0.51
F		18.402	22.013	24.022	65.202	18.033	25.066
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与阴性组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与空白组比较, #  $P < 0.05$

表 2 3 组转染后不同时间点的细胞增殖指数比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24h	36h
实验组	3	75.22 $\pm$ 3.19*#	68.22 $\pm$ 2.84*#
阴性组	3	98.29 $\pm$ 2.11	99.17 $\pm$ 3.14
空白组	3	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
F		8.373	9.333
P		0.004	0.001

与阴性组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与空白组比较, #  $P < 0.05$

表 3 3 组转染后不同时间点的细胞凋亡指数比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24h	36h
实验组	3	17.20 $\pm$ 2.49*#	21.48 $\pm$ 3.15*#
阴性组	3	1.29 $\pm$ 1.43	1.14 $\pm$ 0.22
空白组	3	0.52 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.18
F		35.024	45.016
P		0.000	0.000

与阴性组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与空白组比较, #  $P < 0.05$

4. HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达比较: 转染后 24h 与 36h, 实验组的 HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达量显著低于阴性组与对照组 ( $P < 0.05$ ), 阴性组与空白组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 详见图 1。

### 讨 论

缺血性脑血管病在临床上比较常见, 该疾病的发生机制尚不十分明确, 涉及到血流动力学改变、微血栓等学说<sup>[9]</sup>。现代研究显示缺血性脑血管病的病因是血液系统与脑组织之间的直接屏障——脑血管内皮细胞被严重损伤, 特别是损伤引起白细胞和内皮细胞持续性释放可溶性黏附分子以及各种细胞因子, 促使单核细胞黏附于血管内皮细胞, 转变为巨噬细胞, 导致疾病的发生与恶化<sup>[10]</sup>。

VEGF 广泛存在于机体中, 主要在血管内皮细胞中表达<sup>[11]</sup>。VEGF 能促进血管内皮细胞增殖, 参与血管的生成, 增加血管的通透性, 在缺血性脑损伤时具有一定的脑保护作用<sup>[12]</sup>。低氧诱导因子 - 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor - 1 $\alpha$ , HIF - 1 $\alpha$ ) 是哺乳动物和人体内的核转录因子, HIF - 1 $\alpha$  在肿瘤细胞中可获得大

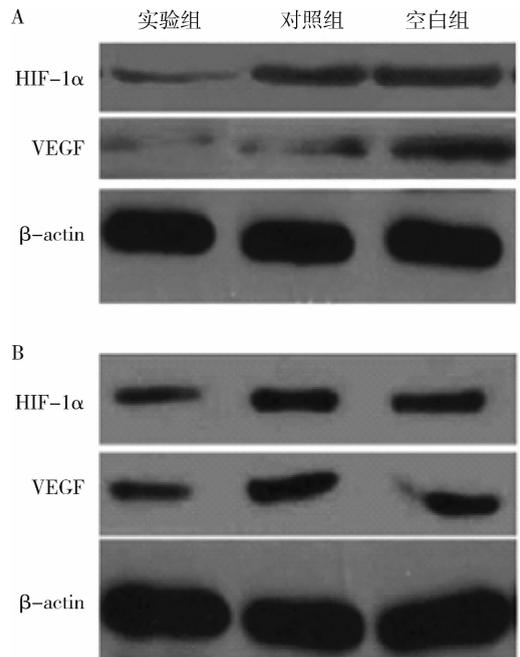


图 1 3 组细胞 HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达比较  
A. 24h; B. 36h

量表达, 可以激活 PI<sub>3</sub>K/AKT/FRAP 途径, 从而调节细胞增殖与凋亡<sup>[13]</sup>。miRNA - 132 在慢性角膜炎组织中高表达, 通过作用于 VEGF, 参与病毒感染恢复期血管修复过程, anti - miRNA - 132 可以减少角膜血管新生, 降低角膜炎损伤<sup>[14]</sup>。本研究转染后 24h 与 36h, 实验组的 miRNA - 132 表达水平显著高于阴性组与空白组 ( $P < 0.05$ ), HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF RNA 与蛋白表达水平显著低于阴性组与空白组 ( $P < 0.05$ ), 阴性组与空白组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明过表达 miRNA - 132 能够抑制 HIF - 1 $\alpha$ 、VEGF 的表达。当前也有研究显示 miR - 132 通过调控 SIRT1 信号突进, 抑制有利于细胞修复的脂类物质的合成, 促进血管内皮细胞的炎症过程, 抵制血管内皮细胞增殖、迁移的修复过程, 从而使内皮细胞活性减低<sup>[15]</sup>。

现代研究表明,miRNA 与疾病发生和发展关系密切,特异的 miRNA 表达谱可作为疾病预防和诊断的标志物<sup>[16-18]</sup>。miRNA-126 通过加强内皮细胞的修复,发挥了抗动脉粥样硬化的作用,也可能通过直接抑制 VEGF 通路的负性调节因子来调节内皮细胞对 VEGF 的应答,从而促进冠状动脉粥样硬化<sup>[19,20]</sup>。HIF-1 由  $\alpha$  亚单位和  $\beta$  亚单位组成, $\alpha$  亚单位受氧调控,具有特异性,对 HIF-1 活性有着决定性作用。本研究显示转染后 24h 与 36h,实验组的细胞凋亡指数都显著高于阴性组与空白组 ( $P < 0.05$ ),细胞增殖指数都显著高于阴性组与空白组 ( $P < 0.05$ ),阴性组与空白组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),表明过表达 miR-132 能抑制内皮细胞的增殖与促进其凋亡。在未来的深入研究中,还需通过验证 miRNA-132 下游靶基因,继续阐明 miRNA-132 参与人脐静脉内皮细胞增殖与凋亡的分子机制,为开发新的缺血性脑血管病治疗手段和方法提供重要的理论基础和实验依据。

综上所述,miRNA-132 可通过抑制 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达,抑制人脐静脉内皮细胞增殖,促进其凋亡,从而发挥抑制缺血性脑血管病患者血管生成的作用。

#### 参考文献

- 1 阳喜喜,陈庆伟,叶力文,等. microRNA-145 通过靶向抑制 CREB 调节内皮细胞增殖和血管新生[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(13): 1213-1220
- 2 王珏,赵海苹. MicroRNA 调控缺血性及出血性脑血管病过程中免疫反应的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2): 369-374
- 3 Chen S, Xu Z, Shao J, et al. MicroRNA-218 promotes early chondrogenesis of mesenchymal stem cells and inhibits later chondrocyte maturation[J]. BMC Biotechnol, 2019, 19(1): 6
- 4 Dai Y, Wan Y, Qiu M, et al. lncRNA MEG3 Suppresses the Tumorigenesis of Hemangioma by Sponging miR-494 and Regulating PTEN/PI3K/AKT Pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2872-2886
- 5 Gao B, Li S, Tan Z, et al. ACTG1 and TLR3 are biomarkers for alcohol-associated hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 1714-1722
- 6 Gasparotto AS, Borges DO, Sassi MGM, et al. Differential expression of miRNAs related to angiogenesis and adipogenesis in subcutaneous fat of obese and nonobese women[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1): 965-973
- 7 Gentile AM, Lhamyani S, Coin-Araguez L, et al. miR-20b, miR-296, and Let-7f expression in human adipose tissue is related to obesity and type 2 diabetes[J]. Obesity (Silver Spring), 2019, 27

- (2): 245-254
- 8 Hu XB, Fu SH, Luo QL, et al. Down-regulation of microRNA-216a confers protection against yttrium aluminium garnet laser-induced retinal injury via the GDNF-mediated GDNF/GFRalpha1/RET signalling pathway[J]. J Biosci, 2018, 43(5): 985-1000
- 9 Liu HN, Li X, Wu N, et al. Serum microRNA-221 as a biomarker for diabetic retinopathy in patients associated with type 2 diabetes[J]. Int J Ophthalmol, 2018, 11(12): 1889-1894
- 10 Lyu L, Zhao Y, Lu H, et al. Integrated interaction network of microRNA target genes in keloid scarring[J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(1): 53-63
- 11 McNeill B, Ostojic A, Rayner KJ, et al. Collagen biomaterial stimulates the production of extracellular vesicles containing microRNA-21 and enhances the proangiogenic function of CD34<sup>+</sup> cells[J]. FASEB J, 2019, 33(3): 4166-4177
- 12 Nampoothiri SS, Rajanikant GK. miR-9 upregulation integrates post-ischemic neuronal survival and regeneration in vitro[J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39(2): 223-240
- 13 Yin JH, Liu CS, Yu AP, et al. Pro-angiogenic activity of monocytic-type myeloid-derived suppressor cells from Balb/C mice infected with echinococcus granulosus and the regulatory role of miRNAs[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(3): 1207-1220
- 14 Zhang A, Wang G, Jia L, et al. Exosome-mediated microRNA-138 and vascular endothelial growth factor in endometriosis through inflammation and apoptosis via the nuclear factor-kappaB signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(1): 358-370
- 15 Negrete-Garcia MC, Ramirez-Rodriguez SL, Rangel-Escareno C, et al. Deregulated microRNAs in cancer-associated fibroblasts from front tumor tissues of lung adenocarcinoma as potential predictors of tumor promotion[J]. Tohoku J Exp Med, 2018, 246(2): 107-120
- 16 Sabry D, El-Deek SEM, Maher M, et al. Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 $\alpha$ -VEGF signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 454(1-2): 177-189
- 17 Shang J, He Q, Chen Y, et al. miR-15a-5p suppresses inflammation and fibrosis of peritoneal mesothelial cells induced by peritoneal dialysis via targeting VEGFA[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 9746-9755
- 18 Sun J, Yang J, Chi J, et al. Identification of drug repurposing candidates based on a miRNA-mediated drug and pathway network for cardiac hypertrophy and acute myocardial infarction[J]. Hum Genomics, 2018, 12(1): 52
- 19 Zhang C, Liang Y, Ma MH, et al. Downregulation of microRNA-376a in gastric cancer and association with poor prognosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5): 2010-2018
- 20 Ye T, Yang M, Huang D, et al. MicroRNA-7 as a potential therapeutic target for aberrant NF-kappaB-driven distant metastasis of gastric cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 55

(收稿日期:2019-04-01)

(修回日期:2019-05-16)