

miR-92a对大鼠骨髓源性内皮祖细胞功能的影响

宿云娟¹ 孙玉聪¹ 楚海荣² 李宏^{2*} 崔晓栋² 王钢³ 成敏²

(¹潍坊医学院生物科学与技术学院, 潍坊 261053; ²潍坊医学院医学研究实验中心, 潍坊 261053;

³潍坊医学院认知神经研究室, 潍坊 261053)

摘要 该文探讨了miR-92a对大鼠骨髓源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)迁移、黏附、增殖以及血管形成能力等的影响。采用密度梯度离心法分离大鼠骨髓来源的单核细胞, 体外培养于含10%胎牛血清的EGM-2MV完全培养基中。利用LipofectamineTM 3000分别将miR-92a模拟物(miR-92a mimics)、miR-92a抑制剂(miR-92a inhibitor)及其对应的对照组(negative control, NC)转染入第3~5代EPCs, 即晚期EPCs。采用改良Boyden小室、黏附实验、CCK-8及Matrigel胶分别检测EPCs迁移、黏附、增殖及体外成血管能力。miR-92a模拟物明显抑制了EPCs的迁移和体外成血管能力($P<0.05$), 但不影响EPCs的黏附和增殖能力; 而miR-92a抑制剂则促进了EPCs的迁移和体外成血管能力($P<0.05$), 亦不影响EPCs的黏附和增殖能力。结果表明, miR-92a可抑制EPCs的迁移及体外成血管能力。该研究结果将为临床以miR-92a和EPCs为靶点防治动脉粥样硬化性心血管疾病提供理论及实验依据。

关键词 内皮祖细胞; miR-92a; 迁移; 增殖; 血管形成

Effects of miR-92a on the Functions of Endothelial Progenitor Cells Isolated from Rat Bone Marrow

Su Yunjuan¹, Sun Yucong¹, Chu Hairong², Li Hong^{2*}, Cui Xiaodong², Wang gang³, Cheng Min²

(¹College of Biological Science and Technology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

²Medicine Research Center, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

³Cognitive Neuroscience Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract This article aimed to investigate the effects of miR-92a on the migration, adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells isolated from rat bone marrow. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation from rat bone marrow and then cultured with EGM-2MV containing 10% fetal bovine serum. The miR-92a mimics, miR-92a inhibitors and their corresponding negative controls (NC) were transfected into 3-5 generations EPCs, namely late EPCs, by LipofectamineTM 3000, respectively. Modified Boyden chamber, adhesion assay, CCK-8 assay and Matrigel were employed to study EPCs migration, adhesion, proliferation and angiogenesis *in vitro*. miR-92a mimics significantly inhibited EPCs migration and angiogenesis *in vitro* ($P<0.05$), but had no effect on EPCs adhesion and proliferation. However, miR-92a inhibitor obviously promoted EPCs migration and angiogenesis

收稿日期: 2016-03-16 接受日期: 2016-05-11

国家自然科学基金(批准号: 31570941、31270993、30900290)、国家教育部“新世纪优秀人才计划”资助项目(批准号: NCET-10-0922)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2013CQ032、ZR2014JL018)和潍坊医学院大学生科技创新基金(批准号: KX2014015)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15953651845, E-mail: lihongno.1978@163.com

Received: March 16, 2016 Accepted: May 11, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570941, 31270993, 30900290), Program for New Century Excellent Talents in Ministry of Education (Grant No.NCET-10-0922), the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No.ZR2013CQ032, ZR2014JL018) and College Students' Science and Technology Foundation of Weifang Medical University (Grant No.KX2014015)

*Corresponding author. Tel: +86-15953651845, E-mail: lihongno.1978@163.com

网络出版时间: 2016-06-30 15:24:14 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160630.1524.006.html>

in vitro ($P<0.05$). miR-92a inhibits the migration and angiogenesis of EPCs *in vitro*. The results may provide new clinical strategies toward the prevention and/or treatment of cardiovascular diseases by targeting miR-92a and EPCs.

Keywords endothelial progenitor cells; miR-92a; migration; proliferation; angiogenesis

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)主要存在于骨髓、外周血和脐带血中,是成熟内皮细胞的前体细胞。大量研究表明,EPCs可通过迁移、黏附至血管损伤部位,在局部增殖并分化为成熟内皮细胞参与损伤内皮的修复,进而减缓动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病的发病进程^[1-2]。因此,明晰调控EPCs的相关机制、提升EPCs的数量以及改善其功能是防治AS等心血管疾病的重要策略。既往有关影响EPCs功能调控的研究主要聚焦于编码蛋白RNAs,而忽略了占人类基因转录本98%的非编码RNAs(non-coding RNAs, ncRNAs)的作用。

microRNA(miRNA)是一类长18~25个核苷酸、机体内源性表达的非编码小分子RNA。它通过与特定靶mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)不完全或完全互补配对,降解靶mRNA或抑制其翻译,从而调控基因的表达。研究显示,某些miRNA在心血管系统中高度表达,同时与心血管疾病密切相关^[3]。本实验主要观察miR-92a对EPCs迁移、黏附、增殖及成血管能力的影响,有助于深入理解miRNA对EPCs功能的调控,从全新的视角阐明AS等心血管疾病的发病机理,为临床防治AS性心血管疾病提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

实验动物为SPF级SD大鼠,体质量100~200 g,雌雄不限(由中国人民解放军第89医院实验动物中心提供)。miR-92a模拟物(miR-92a mimics)及其对应的对照组模拟物(negative control mimics, NC mimics)、miR-92a抑制剂(miR-92a inhibitor)及其对应的对照组抑制剂(NC inhibitor)均由上海吉玛制药技术有限公司合成。Lipofectamine™ 3000转染试剂盒购自Invitrogen公司。纤连蛋白购自Roche公司。梯度离心液Histopaque-1083购自Sigma公司。胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公司。EGM-2MV培养购LONZA公司。Matrigel购自BD公司。改良Boyden小室、8 μm微孔滤膜均购自海门市麒麟

医用仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓源性EPCs的分离、培养及鉴定 按本实验室建立的分离和培养方法^[4],如下所示。无菌条件下取大鼠四肢骨,PBS冲洗骨髓腔后,利用Histopaque-1083密度梯度离心法分离单核细胞,EGM-2MV完全培养基重悬后按 $2\times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于预包被纤连蛋白的培养瓶中,96 h后弃去未贴壁细胞并换液。待细胞长满后,0.25%胰蛋白酶消化传代。

贴壁细胞在含Dil-ac-LDL的培养基中于37 °C孵育4 h。4%多聚甲醛固定30 min后,用PBS洗涤3次,再加入FITC-UEA-1,37 °C孵育1 h。激光共聚焦显微镜下观察,红色和绿色双染色阳性细胞为EPCs。

1.2.2 细胞转染 将EPCs种于在6孔板内,每孔加入无抗生素培养基1.5 mL,待细胞密度达到70%~90%时转染:用125 μL无血清EGM-2MV培养基稀释Lipofectamine™ 3000,加入Lipofectamine™ 3000的量为3.75 μL。再用250 μL EGM-2MV培养基分别稀释5 μL miR-92a模拟物(mimics组)及其对应的对照组(NC mimics)、miR-92a抑制剂(inhibitor组)及其对应的对照组(NC inhibitor)(以上四个处理组浓度均为20 μmol/L),充分混匀,室温孵育5 min,将混合物加到相对应孔中。72 h后,荧光定量PCR检测miR-92a的表达情况。相应的序列信息如下:miR-92a模拟物(正向:5'-UAU UGC ACU UGU CCC GGC CUG-3',反向:5'-GGC CGG GAC AAG UGC AAU AUU-3');NC模拟物(正向:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反向:5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3');miR-92a抑制剂(5'-CAG GCC GGG ACA AGU GCA AUA-3');NC抑制剂(5'-CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA-3')。

1.2.3 迁移能力检测 收集转染后的细胞,将100 μL(2×10^3 个)细胞悬液垂直加入改良Boyden小室上室,下室加入200 μL EGM-2MV,移入37 °C、5% CO₂培养箱中孵育。8 h后,用棉棒轻轻拭去滤膜上未迁移的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,DAPI染色30 min,PBS清洗后置于荧光显微镜下

观察, 每孔随机选取5个视野(200×), 拍照并计数迁移细胞。

1.2.4 黏附功能检测 收集转染后的细胞, 取500 μL /孔(1×10^4 个)种植于提前用纤连蛋白包被1 h的24孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育30 min后PBS洗涤3遍, 显微镜下每孔随机选取5个视野(200×), 计数贴壁细胞, 并取其平均数。

1.2.5 增殖功能检测 收集转染后的细胞, 制成细胞悬液, 取100 μL /孔(2×10^3 个), 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 48 h后取出, 弃原培养液, 按1:9的比例加入CCK-8试剂和培养基的混合液100 μL , 在培养箱内孵育1 h后酶标仪测定450 nm的吸光度。

1.2.6 体外成血管能力检测 消化转染后的EPCs, 用EGM-2MV重悬细胞并计数。取70 μL Matrigel胶于96孔板中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育1 h后, 每孔加入100 μL (2×10^4 个)细胞悬液, 6 h后用倒置显微镜观察并拍照, 计数形成的管腔样结构并取其平均数。

1.3 统计学方法

所有实验均重复3~4次。实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 13.0进行统计分析。组间差异采用ANOVA分析, 两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs的培养与鉴定

刚分离的单核细胞大多都呈悬浮生长, 培养4 d后贴壁细胞开始变形, 数量逐渐增多, 培养7 d后出现集落样结构。传至第3代的细胞呈现铺路石样外观。细胞经Dil-ac-LDL和FITC-UEA-1染色后呈双染阳性表现, 提示培养细胞为EPCs(图1)。

2.2 miR-92a对EPCs迁移能力的影响

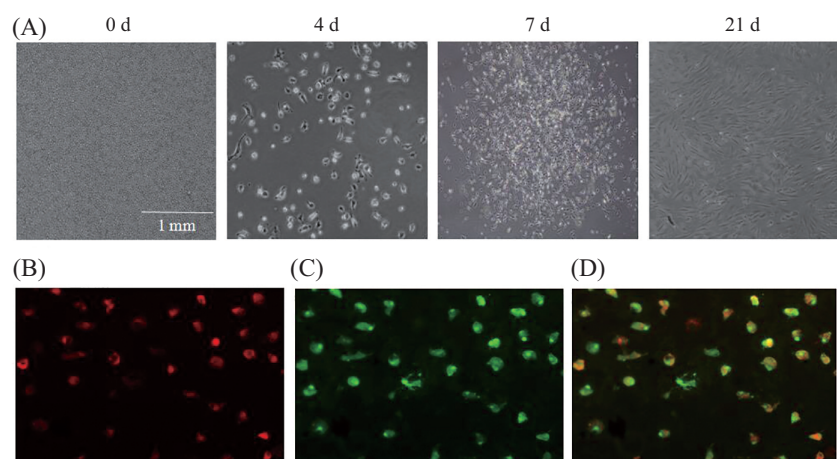
收集转染后的EPCs, 用改良Boyden小室检测EPCs的迁移能力, 荧光显微镜下观察迁移的细胞数并计数。结果显示, 转染miR-92a模拟物的EPCs迁移细胞数明显低于对照组, 而转染miR-92a抑制剂的EPCs迁移细胞数明显高于对照组($P < 0.05$)(图2)。此结果提示, 过表达miR-92a可以抑制EPCs的迁移能力, 而抑制miR-92a的表达则可提高EPCs的迁移能力。

2.3 miR-92a对EPCs黏附能力的影响

为了研究miR-92a对EPCs黏附能力的影响, 我们将转染后的EPCs接种于已包被纤连蛋白的24孔板中, 30 min后对贴壁的细胞计数。结果显示, 无论miR-92a过表达或抑制miR-92a的表达, EPCs的黏附数与对照组相比均无明显差异(图3), 提示miR-92a不影响EPCs的黏附能力。

2.4 miR-92a对EPCs增殖能力的影响

收集转染后的EPCs, 接种于96孔板中, CCK-8

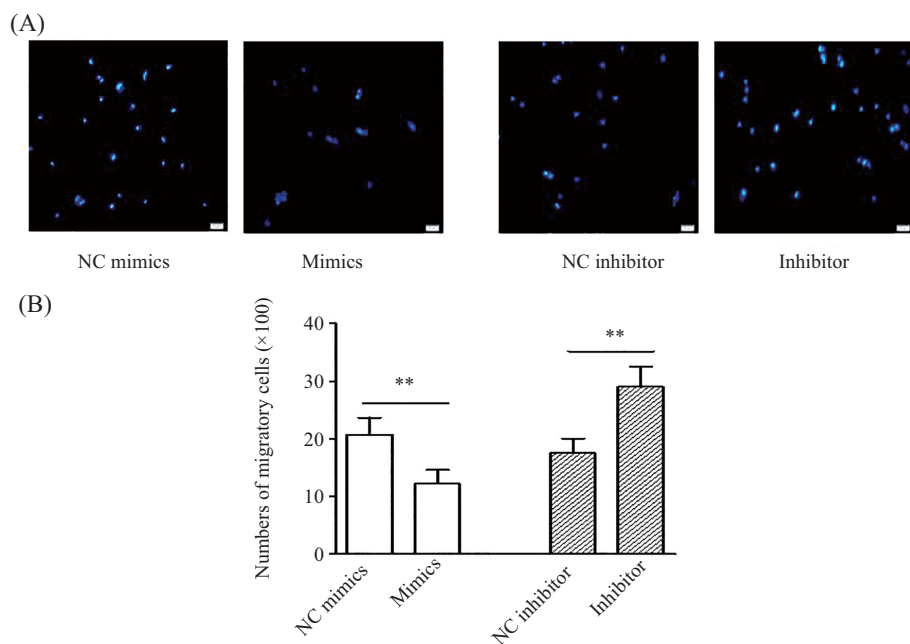


A: 倒置显微镜下观察培养0、4、7、21 d的EPCs; 标尺=1 mm。B: Dil-ac-LDL染色阳性细胞(100×)。C: FITC-UEA-1染色阳性细胞(100×)。D: Dil-ac-LDL、FITC-UEA-1染色双阳性细胞(100×)。

A: morphology of EPCs. 0, 4, 7, 21 d after plating, Scale bar=1 mm. B: Dil-ac-LDL positive cells (red) under the fluorescence microscope (100×). C: fluorescein isothiocyanate UEA-1 positive cells (green) under the fluorescence microscope (100×). D: EPCs were characterized as double positive fluorescent staining with Dil-ac-LDL(red) and UEA-1 (green) (100×).

图1 EPCs的培养与鉴定

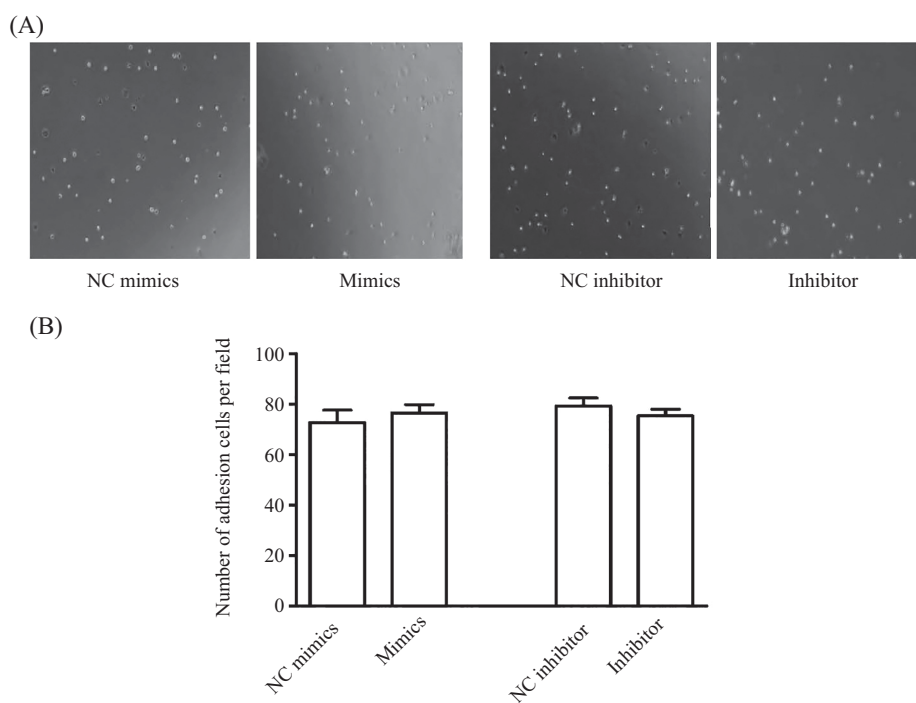
Fig.1 EPCs culture and identification



A: 荧光显微镜下, 各组迁移细胞的DAPI染色结果(100 $\times$); B: 各组迁移细胞的统计学分析结果。 ** $P < 0.01$ 。

A: DAPI staining results of migratory cells in each group under fluorescence microscope (100 $\times$); B: the statistical analysis results of migrating cells. ** $P < 0.01$.

图2 miR-92a对EPCs迁移能力的影响
Fig.2 The effects of miR-92a on the migration of EPCs



A: 光镜下各组黏附细胞图像(100 $\times$); B: 各组黏附细胞的统计学分析结果。

A: image of adhesion cells under optical microscope in each group (100 $\times$); B: the statistical analysis results of adhesion cells.

图3 miR-92a对EPCs黏附能力的影响
Fig.3 The effects of miR-92a on the adhesion of EPCs

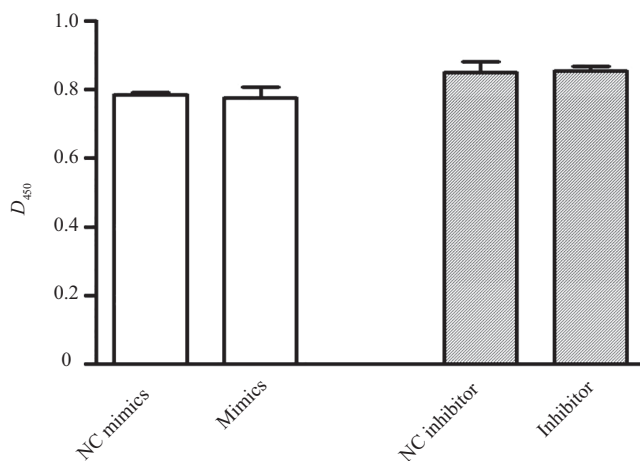
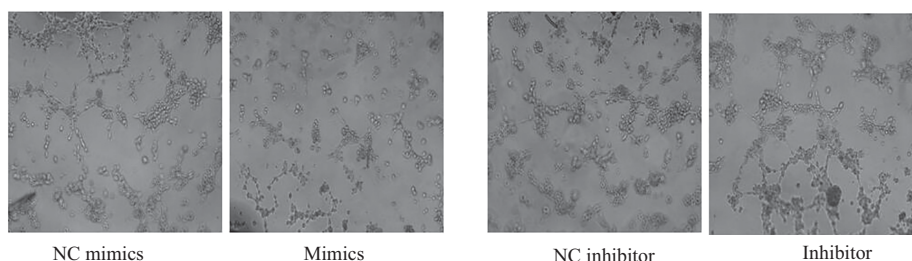


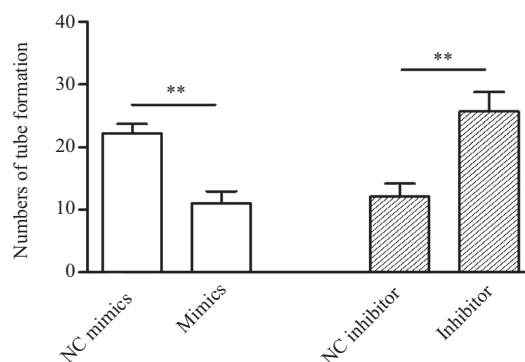
图4 miR-92a对EPCs增殖能力的影响

Fig.4 The effects of miR-92a on the proliferation of EPCs

(A)



(B)



A: 光镜下, 各组细胞的体外成血管图像(100×); B: 各组细胞成血管长度的统计学分析结果。 ** $P < 0.01$ 。

A: image of the tube formation in each group under optical microscope (100×); B: the statistical analysis results of the tube formation length. ** $P < 0.01$.

图5 miR-92a对EPCs体外生成血管能力的影响

Fig.5 The effects of miR-92a on the tube formation ability of EPCs

孵育1 h后酶标仪测定450 nm的吸光度。结果显示, 无论过表达或抑制miR-92a的表达, EPCs的 D 值与对照组相比无明显差异(图4), 提示miR-92a不影响EPCs的增殖能力。

2.5 miR-92a对EPCs体外成血管能力的影响

收集转染后的EPCs, 接种于96孔板Matrigel基质胶上。结果显示, 过表达miR-92a的EPCs体外生成血管的长度明显低于对照组, 而抑制miR-92a

组EPCs的体外生成血管的长度明显高于对照组($P < 0.05$)(图5), 提示miR-92a抑制了EPCs的体外生成血管能力。

3 讨论

2015年,《中国心血管病报告2014》指出, 心血管疾病占我国城乡居民总死亡原因的首位, 并且其发病人数持续增加, 今后10年心血管病患者人

数仍将快速增长^[5],故明晰心血管疾病的病因、病理,遏制其发生、发展已成为生物学界、医学界所面临的重要任务。目前研究已证实,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、血栓性疾病及高血压等常见心血管疾病的发生与发展大多与血管内皮细胞损伤后的生理功能障碍有关^[6],因此,加强受损血管内皮的修复可作为心血管疾病的防治措施。传统观点认为,血管内皮的修复是由病变部位邻近的内皮细胞迁移并整合到受损部位实现的。随着对损伤内皮修复过程研究的不断深入,越来越多的学者认识到,成熟内皮细胞是终末分化细胞,其增殖潜能低,替代损伤内皮的能力有限,对受损内皮的修复并不理想。

近年来的研究发现,EPCs可分化为成熟内皮细胞,参与损伤血管内皮的修复,对维持正常内皮功能和结构的完整性具有重要作用^[2]。然而体内EPCs数量有限,特别是罹患心血管疾病时,EPCs数量会进一步减少,其迁移、黏附等功能亦受损,修复损伤内皮的能力也随之下降^[7]。因此,深入研究决定EPCs数量和更新率的影响因素及激活或抑制其黏附、迁移、成血管的机制,以提高其修复血管损伤的能力,有助于我们阐明AS等心血管疾病的发病机理,为临床防治AS性心血管疾病提供理论及实验依据。

miR-92a广泛存在于各种组织的血管内皮细胞中。研究显示,miR-92a与血管内皮细胞的存活、迁移等功能密切相关,譬如Bonauer等^[8]实验表明,在正常的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中过表达miR-92a,可以抑制HUVECs的迁移,阻断血管的出芽,但不影响HUVECs的增殖。最新研究发现,抑制miR-92a表达可显著改善损伤血管内皮的再内皮化,抑制新生内膜的形成^[9]。

研究提示,miRNA具有细胞和组织特异性。Zhang等^[10]研究发现,作为内皮细胞的前体细胞——EPCs同样表达内皮细胞特异的、血管生成相关的miRNA,例如miR-126、miR-130、miR-221、miR-222和miR-92a等,且冠心病患者循环血中EPCs的数量及功能与miR-92a的表达水平呈负相关。这一研究提示,miR-92a极有可能直接调控EPCs的功能。本研究结果表明,过表达miR-92a可抑制EPCs的体

外迁移和血管生成能力,但不影响EPCs的黏附和增殖能力,这必将影响到损伤血管的再内皮化,在一定程度上影响着AS性心血管疾病的发生和发展。本研究还发现,抑制miR-92a的表达则可有效促进EPCs的体外迁移和血管生成能力。因此,miR-92a可能是通过抑制EPCs的迁移能力,进一步抑制其新生血管的形成。这提示,miR-92a可能作为一个新的靶点,通过调节EPCs的迁移和血管新生,从而改善缺血性心血管疾病的预后,这对于临床以EPCs为基础的细胞疗法防治AS性心血管疾病具有重要的价值。

参考文献 (References)

- 1 Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Curr Opin Hematol* 2014; 21(3): 224-8.
- 2 Krankel N, Luscher TF, Landmesser U. "Endothelial progenitor cells" as a therapeutic strategy in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10(1): 107-24.
- 3 Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. microRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians. *Heart* 2015; 101(12): 921-8.
- 4 Guan XM, Cheng M, Li H, Cui XD, Li X, Wang YL, *et al.* Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Mol Med Rep* 2013; 8(6): 1722-8.
- 5 陈伟伟,高润霖,刘力生,朱曼璐,王文,王拥军,等.《中国心血管病报告2014》概要.中国循环杂志(Chen Weiwei, Gao Runlin, Liu Lisheng, Zhu Manlu, Wang Wen, Wang Yongjun, *et al.* China cardiovascular disease report 2014. *Chinese Circulation Journal*) 2015; 37(7): 617-22.
- 6 Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, *et al.* The assessment of endothelial function: From research into clinical practice. *Circulation* 2012; 126(6): 753-67.
- 7 King TF, McDermott JH. Endothelial progenitor cells and cardiovascular disease. *J Stem Cells* 2014; 9(2): 93-106.
- 8 Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, *et al.* microRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 2009; 324(5935): 1710-3.
- 9 Daniel JM, Penzkofer D, Teske R, Dutzmann J, Koch A, Bielenberg W, *et al.* Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 2014; 103(4): 564-72.
- 10 Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(1): 42-6.