

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.10.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 10-0026-06

MicroRNA-195 参与切应力对血管内皮细胞炎症调控作用的研究

吴小苑¹, 范文冬²

(1. 广东省职业病防治院 广东 广州 510300; 2. 中山大学附属第一医院
心内科, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 研究 microRNA-195 (miR-195) 是否参与切应力对血管内皮细胞 (ECs) 炎症的调控作用。**方法** ①验证生理切应力调节 ECs miRNAs 的表达: 15 dyne/cm² 的生理切应力处理人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 24 h 后利用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测内皮细胞相关 miRNAs (miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等) 的表达变化; ② miR-195 与内皮细胞炎症反应的关系: 体外转染 miR-195 mimics 及 inhibitors 至 HUVEC, 通过 Western blot、免疫荧光检测 ECs 中炎症相关因子表达及 miR-195 对内皮细胞的炎症控制水平。**结果** 15 dyne/cm² 的生理切应力处理 HUVEC, 24 h 后 miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等表达上调; 过表达 miR-195 对 ECs 内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达没有影响, 但抑制了 p65 的磷酸化 (P-p65) 表达; 采用 miRNA inhibitors 抑制内源性的 miR-195 后, ECs eNOS 的表达下调, 抑制了 κ B 抑制蛋白 (I κ B α) 的表达水平。免疫荧光结果显示, 在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 NF- κ B 的核转运, 而抑制 miR-195 可能促进了 NF- κ B 的核转运, 促进炎症。**结论** 生理切应力诱导 miR-195 表达上调, miR-195 可能参与切应力对 ECs 炎症的调控作用。

关键词: miR-195; 内皮细胞; 炎症反应

中图分类号: R54

文献标识码: A

Role of miR-195 in regulation of vascular endothelial cell inflammation by shear stress

Xiao-yuan Wu¹, Wen-dong Fan²

(1. Guangdong Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Guangzhou, Guangdong 510300, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To investigate whether miR-195 is involved in the regulation of vascular endothelial cell (EC) inflammation by shear stress. **Methods** To verify the regulation of EC miRNA expression by physiological shear stress, 15 dyne/cm² of physiological shear stress were used to process human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), after 24 hours, the expressions of miRNAs (miR-27b, miR-143/145, miR-195, etc.) in endothelial cells were detected by qRT-PCR. To study the relationship between miR-195 and endothelial cell inflammatory response, miR-195 mimics and inhibitors were transfected into HUVECs *in vitro*, the expressions of inflammatory factors in ECs and the effect of miR-195 in controlling endothelial cell inflammation were detected using Western blot and immunofluorescence technique. **Results** After processing HUVECs with 15 dyne/cm² of physiological shear stress for 24 hours, the expressions of miR-27b, miR-143/145 and miR-195 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The over-expression of miR-195 did not affect the expression of eNOS, but significantly inhibited the expression of P-p65

($P < 0.05$); while inhibition of endogenous miR-195 by miRNA inhibitors significantly reduced the expression of EC eNOS ($P < 0.05$) and inhibited the expression of IκBα ($P < 0.05$). Immunofluorescence results showed that over-expression of miR-195 in ECs inhibited nuclear translocation of NF-κB, while inhibition of miR-195 may promote the nuclear translocation of NF-κB and promote inflammation. **Conclusions** The expression of miR-195 is significantly up-regulated by physiological shear stress. miR-195 may be involved in the regulation of EC inflammation by shear stress.

Keywords: miR-195; endothelial cell; inflammatory response

血流切应力决定着动脉粥样硬化斑块的非随机分布,对维持血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)结构与功能的稳定起关键作用。生理范围内的血流切应力保护 ECs,阻抑动脉粥样硬化病变的分子与生物学机制仍不十分清楚^[1]。新近研究发现,生理切应力能诱导 ECs 的 microRNAs (miRNAs) 表达谱发生改变,并通过 miRNAs 调控 ECs 的功能^[2-5],但目前只有 miR-19a^[4]、miR-23b^[5]及 miR-21^[2]等少数几个切应力诱导 miRNAs 的功能得到部分阐明。

随着研究的不断深入,动脉粥样硬化被认为是一种慢性炎症反应性疾病^[6]。近年来,miRNA 调控动脉粥样硬化炎症反应机制的研究正逐渐成为心血管研究领域的热点。当前研究表明生理切应力诱导 miR-27b^[2, 4-5]、miR-143/145^[7]、miR-195^[2, 4]、miR-19a^[4]、miR-23b^[5]及 miR-10a^[8]等表达上调;诱导 miR-92a^[9]、miR-221^[5]、miR-20a^[5]及 miR-182^[4]等表达下调。其中 miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等在 ECs 中的功能还不清楚,而 miR-195 与 ECs 炎症反应的关系目前国内外未见有相关报道,本研究进一步验证它们的确受到生理切应力的调控以及 miR-195 与 ECs 炎症的相关关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)。MicroRNA mimics 及 inhibitors: miR-27b、miR-143/145、miR-195、miR-126 mimics、miR-195 inhibitors 及相应对照(NC)和 inhibitor-NC(INC)(广州,锐博生物)。

1.2 miRNAs 的 qRT-PCR

验证生理切应力调节 ECs miRNAs 的表达: 15 dyne/cm² 的生理切应力处理 HUVEC, 24 h 后利用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测内皮细

胞 miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等的表达变化。① miRNAs 的逆转录: 使用 Life Technology 的 TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒,按照其说明书的介绍,用 miRNAs 特异性引物进行逆转录;② qRT-PCR 检测: 置于 LightCycler®480 仪器中,以 U6 作为内参,按照说明书介绍的方法扩增 45 个循环,每个样品做 3 个重复。

1.3 切应力发生装置的构建

这个系统由切应力处理腔室(μ-Slide I 0.4 Luer, ibidi),蠕动泵,以及各种导管组成。HUVEC 细胞生长在 μ-Slide I 0.4 Luer 中,形成单细胞层后,在超净台中将培养液输送导管与装有培养基的透气广口瓶以及蠕动泵相连。由蠕动泵驱动培养基流经生长有细胞的 μ-Slide I 0.4 Luer 腔室,整个系统置于二氧化碳 CO₂ 培养箱中。切应力与流速的关系可根据 μ-Slide I 0.4 Luer 腔室供应商 ibidi 所供的公式计算:

$$\tau \left[\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2} \right] = 1.316 \Phi \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

1.4 细胞转染实验

miRNAs mimics 及 inhibitors 转染 HUVEC 细胞: 分别用 125 μl 的 opti-MEM 培养基稀释小分子 RNA 和 Lipofectamine RNAiMAX 试剂,将上述 2 种溶液混合并用移液器轻轻混匀,室温放置 25 min。在等待的过程中给细胞更换新鲜的内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)。达到孵育时间后,将 250 μl opti-MEM、RNA 及转染试剂的混合液,逐滴加入 12 孔板的相应孔中,轻轻摇动 12 孔板以混匀转染混合物,于培养箱中培养 8 h 后更换新鲜 ECM 完全培养基,细胞转染 48 ~ 72 h 后按实验需要处理细胞。

1.5 Western blot

体外转染 miR-195 等 mimics 及 inhibitors 至 HUVEC,通过 Western blot 检测 ECs 中 p65 的磷酸化(P-p65)水平及内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、κB 抑制蛋白(IκBα)等炎症相关因子的表达。Western blot 方法包括: SDS

PAGE 电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、ECL 显色, 结果扫描后用 Quantity One (biorad) 软件分析灰度值。

1.6 免疫荧光

体外转染 miR-195 mimics 及 inhibitors 至 HUVEC, 通过免疫荧光检测 miR-195 对 ECs 的炎症控制水平, 主要检测转录因子核因子 κ B (NF- κ B) 的核转运情况。免疫荧光方法中所用抗体名称 NF- κ B, CST 抗体编号为 4764 (兔抗)。一抗稀释比例, 1 : 50 左右; 二抗 1 : 5 000。HUVEC 经过细胞固定、免疫染色后行荧光显微镜观察。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 18.0 软件进行数据分析。分子生物学实验的结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异两组时用 t 检验, 多组时采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 切应力发生装置构建及生理切应力调节 ECs miRNAs 的表达

2.1.1 切应力诱导 HUVEC 形态的改变 为分析切应力对 ECs miRNAs 表达的影响, 首先建立一套体外切应力发生装置。采用 15 dyne/cm^2 的切应力处理 HUVEC, 24 h 后用显微镜观察细胞形态。结果表明: 在生理切应力作用下, HUVEC 排列成梭形并沿着切应力作用的方向排列; 而未用切应力处理的 HUVEC 排列不规则, 并且有少量死亡的细胞漂浮。上述结果证明切应力发生装置构建成功, 可用于研究切应力对 ECs miRNAs 的表达的影响^[1]。见图 1。

2.1.2 生理切应力诱导 miR-195 等表达上调 由于 miR-126 不受切应力的影响^[7], 因此以 miR-126 作为阴性对照, U6 作为 miRNAs 表达的内参, 运用 TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒验证生理切应力是否调控上述 miRNAs 的表达。结果表明: 15 dyne/cm^2 的生理切应力处理 HUVEC, 24 h 后 miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等表达上调 ($t = 4.080$ 、 2.145 、 2.106 、 2.079 , $P = 0.000$ 、 0.020 、 0.028 及 0.037), 而 miR-126 的表达不受切应力的影响 ($t = 1.655$, $P = 0.103$)。见图 2。

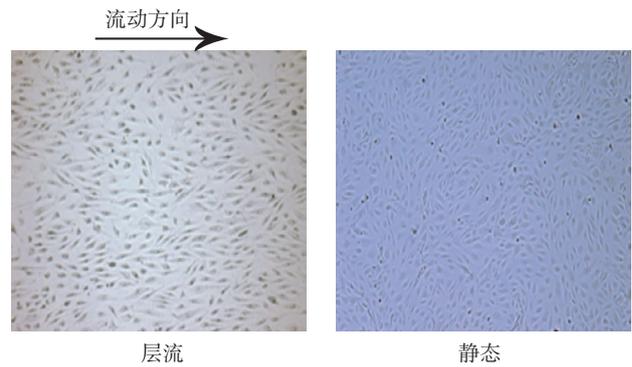


图 1 切应力诱导 HUVEC 形态的改变

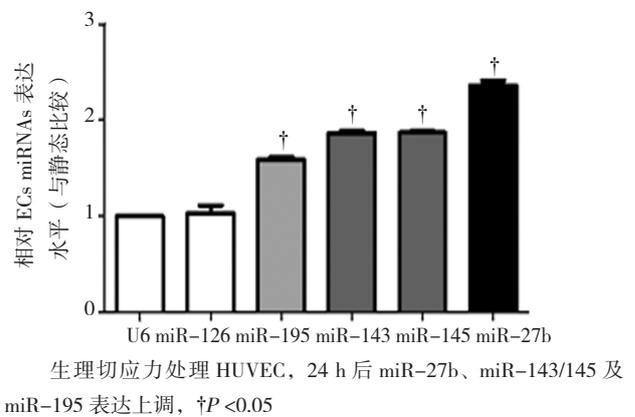


图 2 生理切应力诱导 ECs miRNAs 的表达

2.2 miR-195 可能参与切应力对 ECs 炎症的调控作用

2.2.1 过表达 miR-195 抑制 P-p65 的表达 NF- κ B 为 1 个转录因子蛋白家族, 包括: Rel (cRel), p65 (RelA 和 NF- κ B3), RelB 和 p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2)。在细胞核内, p65 识别并结合特定的 DNA 序列, 控制炎症基因的转录。p65 的磷酸化 (P-p65) 促进 NF- κ B 的活性, 促进炎症, 为探究 miRNA-195 介导了 ECs 炎症反应, 本研究首先建立了一套有效的体外转染 miRNAs 至 HUVEC 的方法, 通过 Western blot 证实了在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 P-p65 的表达 ($t = 2.664$, $P = 0.021$) (见图 3)。为了探索在内皮细胞激活的状况下 miR-195 发挥的功能, 在转染 miRNAs 的同时, 加入炎症刺激因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 结果与无 TNF- α 共处理情况一致。

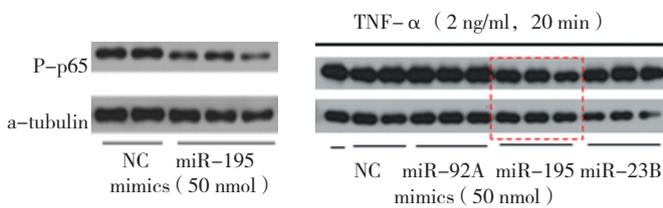
2.2.2 抑制内源性的 miR-195 抑制 I κ B α 的表达水平 I κ B α 通过与 NF- κ B p65 结合抑制 NF- κ B 的核转运, 抑制炎症。本研究发现, 采用 miRNA inhibitors 抑制内源性的 miR-195 抑制了 I κ B α 的表

达水平 ($t=3.492, P=0.003$)。见图 4。

2.2.3 miR-195 在 ECs 中的可能功能 过表达 miR-195 对 ECs eNOS 的表达没有影响, 生理切应力诱导上调的 miR-23b 及生理切应力诱导下调的 miR-92a 对 eNOS 的表达影响差异无统计学意义 ($F=1.786, P=0.07$)。而采用 miRNA inhibitors 抑制内源性的 miR-195 抑制了 eNOS 的表达水平 ($t=3.650, P=0.002$) (见图 5)。这提示着 miR-195 可能对于维持 eNOS 的稳定起关键作用, 但其作用机制不明确, 有待进一步的研究。

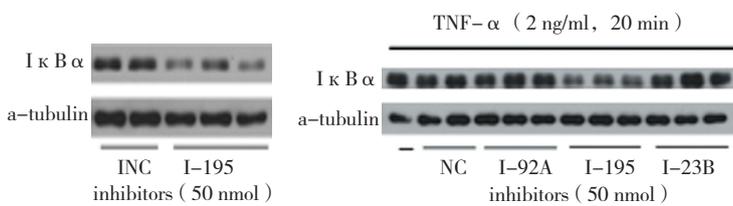
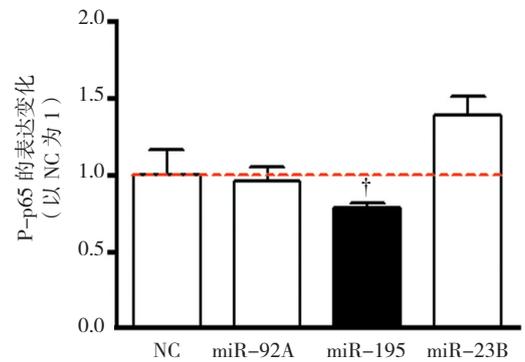
2.2.4 MiR-195 抑制 NF-κB 的核转运 NF-κB

的核转位在维持细胞正常生理功能方面发挥着重要作用, 在促炎细胞因子刺激下, NF-κB 转位到细胞核中并激活炎症基因的表达。免疫荧光结果显示 (见图 6): 加入 TNF-α 促进了 NF-κB 的核转运。在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 NF-κB 的核转运, 表现为无 NF-κB 核聚集或者核聚集量非常少, 细胞质泛红 (miR-195 VS NC)。INC 与 miR-195-inhibitor 比较, 可见细胞质里面也红色充满多一些 (INC VS miR-195-inhibitor), 而 miR-195-inhibitor 组细胞核内可见泛红荧光, 说明抑制 miR-195 可能促进了 NF-κB 的核转运, 促进炎症。



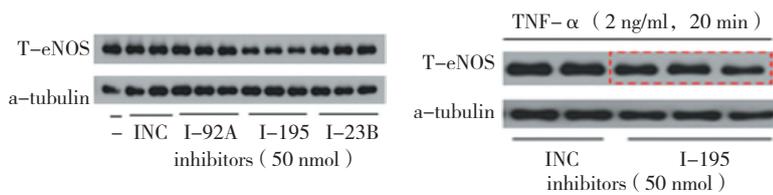
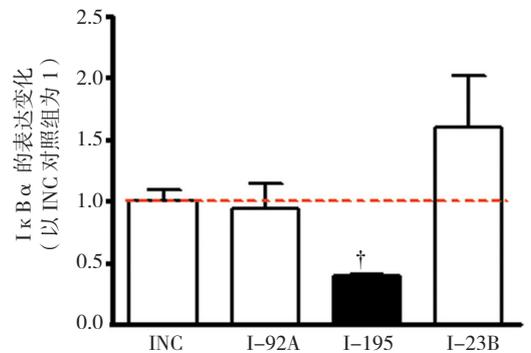
† miRNAs mimics 与 NC 比较, $P < 0.05$

图 3 过表达 miR-195 抑制 P-p65 的表达



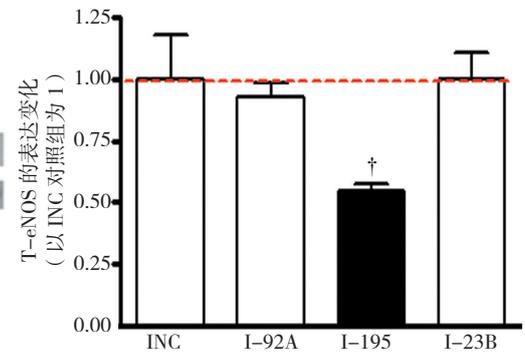
† miRNAs inhibitors 与 INC 比较, $P < 0.05$

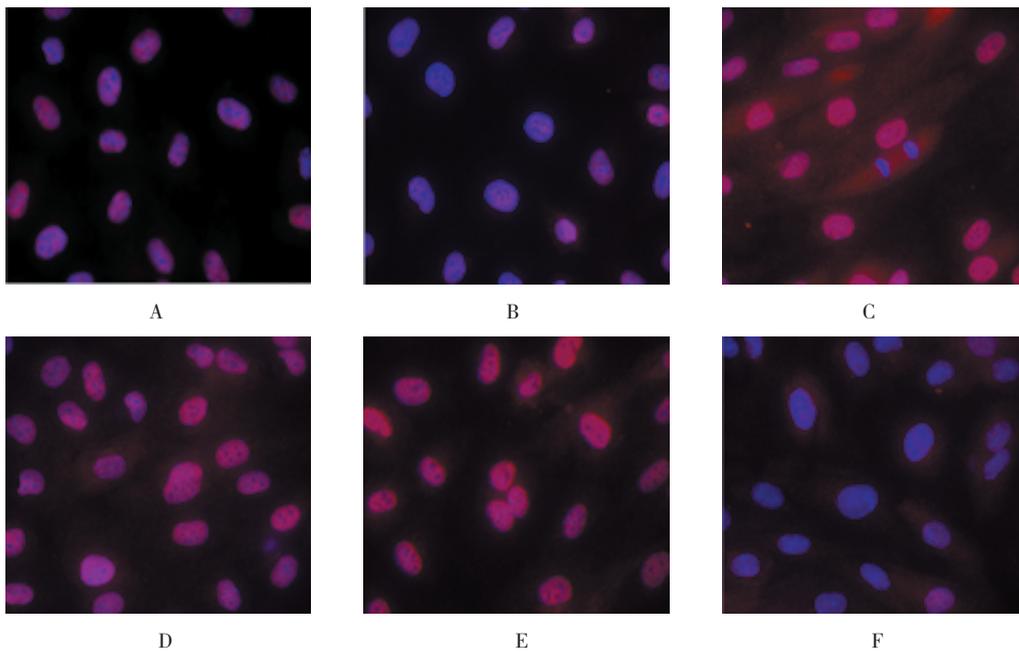
图 4 抑制内源性的 miR-195 抑制 IκBα 的表达水平



† miRNAs inhibitors 与 INC 组比较, $P < 0.05$

图 5 miR-195 的抑制剂抑制 ECs eNOS 的表达





A: TNF- α , 0; B: TNF- α , NC; C: TNF- α , miR-195; D: TNF- α , miR-195-inhibitor; E: TNF- α , INC; F: 0, 0; 免疫荧光 (10 \times 40), 这里指示的是细胞核、细胞质的分布, 染色的是 NF- κ B 的核转运。集中在细胞核的红色越多, 表示炎症通路被激活。位于细胞质越多则活性被抑制。加入 TNF- α 促进了 NF- κ B 的核转运 (TNF- α , 0 VS 0, 0)。在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 NF- κ B 的核转运, 表现为细胞质泛红 (miR-195 VS NC)

图 6 miR-195 抑制 NF- κ B 的核转运

3 讨论

血流切应力是与血流方向一致的血流对 ECs 的摩擦力, 决定着动脉粥样硬化斑块的非随机分布, 对维持 ECs 功能的稳定起关键作用^[1]。越来越多的证据表明, miRNAs 参与切应力对 ECs 功能的调控作用, 然而许多切应力诱导 miRNAs 在 ECs 中的功能还未被阐明。

动脉粥样硬化是一种炎症性疾病, 炎症的其中 1 个关键调节器为转录因子核因子 κ B (NF- κ B), 很长一段时间以来, 一直被视为促动脉粥样硬化的因素, 主要因为它调控着许多涉及动脉粥样硬化的促炎基因。NF- κ B 作为促炎和抗炎基因的直接调节者以及在细胞存活和增殖方面的调控角色, 可能在维护动脉粥样硬化过程的微妙平衡中发挥重要作用^[10-11]。转录因子 (NF)- κ B 家族成员是 ECs 炎症反应的重要调节因子。在细胞核内, RelA (p65) 识别并结合特定的 DNA 序列, 控制炎症基因的转录。

近年来, microRNA 调控 As 炎症反应机制的研究逐渐成为心血管研究领域的热点。本研究首先建立了一套有效的体外转染 miRNAs 至 HUVEC 的方法, 借助该套方法能够实现在 ECs 中过表达或是下调相关 miRNAs 的水平, 从而分析它们在 ECs 中的功能。接

着又成功构建了体外切应力模拟发生装置, 利用该系统成功的实现了生理切应力对 ECs 形态方面的调控。在证实了该套系统的可靠性后, 本研究用该系统所产生的 15 dyne/cm² 生理切应力处理 HUVEC, 24 h 后 miR-27b、miR-143/145 及 miR-195 等表达上调, 而 miR-126 的表达则不受切应力的影响, 这印证了相关文献的报道^[7]。为探究 miRNA-195 介导了 ECs 炎症反应, 本研究通过 Western blot 证实了在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 P-p65 的表达。在静息情况下, NF- κ B 二聚体与 1 个抑制蛋白 (κ B 抑制剂, I κ B) 结合保持非活性状态。I κ B α 通过与 NF- κ B p65 结合抑制 NF- κ B 的核转运, 抑制炎症。本研究发现, 采用 miRNA inhibitors 抑制内源性的 miR-195 抑制了 I κ B α 的表达水平。

eNOS 在 ECs、心肌细胞、血小板等多种细胞上均有表达, 在一氧化氮 NO 的生成过程中也具有重要作用^[12-13]。病理状态时, eNOS 生成障碍或者表达降低, 不仅会使血管内皮舒张受损, 还会加重动脉粥样硬化等的血管炎症^[14]。本研究采用 miRNA inhibitors 抑制内源性的 miR-195 也抑制了 eNOS 的表达水平。NF- κ B 的核转位在维持细胞正常生理机能方面发挥着重要作用。在促炎细胞因子刺激下, NF- κ B 转位

到细胞核中并激活炎症基因的表达。免疫荧光结果显示: 加入 TNF α 促进了 NF- κ B 的核转运。在 ECs 中过表达 miR-195 抑制了 NF- κ B 的核转运, 而抑制 miR-195 可能促进了 NF- κ B 的核转运, 促进炎症。因此, 生理切应力诱导的 miR-195 功能可以归纳为两点: ①抑制 Phospho-NF- κ B p65 亚基, Ser536 位点的磷酸化, 抑制 NF- κ B 的活性, 从而抑制炎症。②虽然不能够促进但却能够稳定 eNOS 的表达。

MiRNA 通过与靶标基因 mRNA 的完全匹配结合, 促使 mRNA 发生降解, 或通过不完全地与靶 mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR) 互补结合抑制靶 mRNA 的翻译^[15-16], 将蛋白控制在生命活动所需的最佳水平上。根据 miRNA 的作用方式, 通过生物信息学分析发现 BTRC/IRAK2/MAP3K7 等可能为 miRNA-195 的潜在靶标。因此, 可推测生理切应力诱导 miR-195 表达上调, 可能通过负调节潜在靶标的表达, 抑制 NF- κ B 通路, 从而影响动脉粥样硬化炎症反应。本文较全面地探索了生理切应力诱导的 miR-195 的血管内皮保护功能, 有助于进一步阐明动脉粥样硬化发生的分子和生物力学机制, 为动脉粥样硬化相关病变的预防提供理论依据。

参 考 文 献:

- [1] FAN W, FANG R, WU X, et al. Shear-sensitive microRNA-34a modulates flow-dependent regulation of endothelial inflammation[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(1): 70-80.
- [2] WEBER M, BAKER M B, MOORE J P, et al. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(4): 643-648.
- [3] SEARLES C D, MOORE J, BAKER M, et al. Endothelial cell microRNA expression in response to laminar shear stress (abstract)[J]. *Circulation*, 2008, 118(18): S298.
- [4] QIN X, WANG X, WANG Y, et al. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *PNAS*, 2010, 107(7): 3240-3244.
- [5] WANG K C, GARMIRE L X, YOUNG A, et al. Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth[J]. *PNAS*, 2010, 107(7): 3234-3239.
- [6] ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999 Jan 14, 340(2): 115-126.
- [7] HERGENREIDER E, HEYDT S, TREGUER K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 249-256.
- [8] FANG Y, SHI C, MANDUCHI E, et al. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro[J]. *PNAS*, 2010, 107(30): 13450-13455.
- [9] WU W, XIAO H, LAGUNA-FERNANDEZ A, et al. Flow-dependent regulation of kruppel-like factor 2 is mediated by microRNA-92a[J]. *Circulation*, 2011, 124: 633-641.
- [10] WU X Y, FAN W D, FANG R, et al. Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)- κ B p65[J]. *J Cell Biochem*, 2014 Nov, 115(11): 1928-1936.
- [11] DE WINTHER M P, KANTERS E, KRAAL G, et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005 May, 25(5): 904-914.
- [12] ALDERTON W K, COOPER C E, KNOWLES R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition[J]. *Biochem J*, 2001 Aug 1, 357(3): 593-615.
- [13] DUDZINSKI D M, IGARASHI J, GREIF D, et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006, 46: 235-276.
- [14] SESSA W C. eNOS at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(12): 2427-2429.
- [15] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004 (431): 350-355.
- [16] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009(136): 215-233.

(张西倩 编辑)