

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0028-04

## MicroRNA-21 对肺高压血管平滑肌细胞增殖的影响

吴翔<sup>1</sup>, 卓书伟<sup>1</sup>, 郑才玲<sup>1</sup>, 高戈<sup>2</sup>

(1. 海南省中医院 检验科, 海南 海口 570203; 2. 中南大学 医学检验系, 湖南 长沙 410013)

**摘要: 目的** 研究 microRNA-21 (miRNA-21) 在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中抑制肺高压 (PH) 血管平滑肌细胞增殖的可能机制。**方法** 复制外源性 miRNA-21 干扰的野百合碱大鼠肺高压原代肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 模型, 分别用 Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测外源性 miRNA-21 对 Wnt 通路中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和拮抗剂 DDK1 表达的影响。**结果** 外源性抑制 miRNA-21 表达时, PASMCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 表达水平增高, 拮抗剂 DDK1 表达降低, 拮抗作用减弱; 而外源性上调 miRNA-21 表达时, PASMCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 表达水平降低, 拮抗剂 DDK1 表达增高, 拮抗作用增强。**结论** miRNA-21 的早期干预可通过调控 Wnt 通路的拮抗剂 DKK1 作用与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与 PH 肺血管重构。

**关键词:** miRNA-21; 肺高压; Wnt 通路; 增殖; 血管重构

**中图分类号:** R544.1

**文献标识码:** A

## Role of MicroRNA-21 on proliferation of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension

Xiang Wu<sup>1</sup>, Shu-wei Zhuo<sup>1</sup>, Cai-ling Zheng<sup>1</sup>, GeGao<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory, Hainan Provincial Hospital of Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570203, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

**Abstract: Objective** To study the role of MicroRNA-21 on proliferation of pulmonary vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension and potential mechanisms. **Methods** Rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension (PH) was established. Primary pulmonary artery smooth muscle cells were isolated and treated with various insults. Western blot and Real-time fluorescent quantitative PCR were performed for determination of expression of  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 and antagonist of DDK1. **Results** The level of  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 was increased while DDK1 was decreased significantly when exogenous MicroRNA-21 was inhibited. However, upregulation of exogenous MicroRNA-21 induced decreased levels of  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 increased levels of antagonist of DDK1. **Conclusions** Early intervention of MicroRNA-21 participates in pulmonary remodeling in PH model through regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Keywords:** MicroRNA-21; PH; Wnt pathways; proliferation; vascular remodeling

肺高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一大类以肺动脉压进行性升高为特点的肺血管疾病<sup>[1]</sup>, 其中肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell,

PASMC) 增殖是肺血管重塑的关键所在<sup>[2-3]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在血管平滑肌细胞的功能和血管平滑肌细胞增殖中起着重要作用<sup>[4]</sup>。DKK1 作为 Wnt/ $\beta$ -

收稿日期: 2017-11-16

[通信作者] 高戈, E-mail: ggboxy@163.com; Tel: 13637471948

catenin 信号通路的拮抗剂, 可以特异地与 Wnt 的受体结合, 从而抑制下游信号的传导<sup>[5]</sup>。MicroRNA (miRNA) 是一种新型的 18 ~ 23 nt 长的非编码 RNA, 已经在多种真核生物中证明调控 miRNA 表达是发育、细胞生长和分化过程中的关键参与者<sup>[6]</sup>。miRNA-21 在疾病早期即呈现高表达趋势<sup>[7]</sup>, 它有调节细胞增殖、侵袭和凋亡的作用, 且它的表达水平与细胞的分化程度相关, 能够提示患者预后<sup>[8]</sup>。本研究拟通过 Wnt 通路的拮抗剂 DKK1 探讨 miRNA-21 在平滑肌细胞的形成和促进平滑肌细胞的增殖中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DMEM 细胞培养基、OPTI-MEM 细胞转染培养基 (Gibco)、细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000、实时荧光定量 PCR 试剂盒、miRNA-21 引物、内参 (Ambion), 相关抗体购自 Abcam 公司, 大鼠肺血管平滑肌细胞 (原代分离)。

### 1.2 细胞培养与转染

野百合碱干预喂养大鼠复制 PH 动物模型, 取模型肺动脉组织剪碎消化, 贴壁培养, 获得肺高压大鼠 PSMCs<sup>[9]</sup>, 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 2 天换液, 3 ~ 4 d 传代 1 次。

miRNA-21 mimics 和对照序列自行设计交生工生物工程上海 (股份) 有限公司合成。实验分 3 组: miRNA-21 抑制组、miRNA-21 正常组和 miRNA-21 过表达组。miRNA-21 引物序列: 正向 5'-AGGCTGTGAAGCTCTCCCACT-3', 反向 5'-GCCACTGCTGCCTTTTAGTCCC-3'。GADPH 探针序列: 正向 5'-ACGCCTCTGGCCGTACCACT-3', 反向 5'-TGGTGAAGCTGTAGCCGCGC-3'。进行瞬时转染, 细胞存活率 < 50%。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA, 样本置入 -20℃ 冰箱冷冻保存。按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应。

**1.3.1 miRNA-21 表达水平检测** PH 大鼠模型原代 PSMCs 瞬时转染 miRNA-21 inhibits 和 overpress mimics 48 h 后, 实时荧光定量 PCR 分别检测 3 组细胞中 miRNA-21 表达水平。

**1.3.2  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DKK1 核酸表达水**

**平检测** 外源性 miRNA-21 干扰 PH 大鼠模型原代 PSMCs 后, 实时荧光定量 PCR 法分别检测 3 组细胞 Wnt 通路中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DKK1 的核酸表达水平。

### 1.4 Western blot 检测 $\beta$ -catenin、Cyclin D1、DKK1 蛋白表达

一抗浓度 1 : 1 000,  $\beta$ -actin: 一抗浓度 1 : 1 000。收集瞬时转染后 72 h 细胞, 提取总蛋白。SDS-PAGE 分离蛋白质, 转膜。室温封闭, 一抗 4℃ 反应过夜, 洗膜, 二抗室温孵育 1 h, 洗膜, 增强发光底物试剂反应发光, X 射线片显影。

外源性 miRNA-21 干扰 PH 鼠模型原代 PSMCs 后, Western blot 法分别检测 3 组细胞 Wnt 通路中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DKK1 的蛋白表达水平, 阳性条带以 Gel pro 4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析, 测其累积光密度 (integrated optical density, IOD) 参考值, 其发表强度用  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 或者 DKK1 光密度值 /  $\beta$ -actin 光密度值表示, 重复 6 次, 统计结果。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多样本均数比较采用方差分析, 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 原代大鼠 PSMCs 瞬时转染后 miRNA-21 表达的改变

miRNA-21 的表达, miRNA-21 正常组为 (0.000 407  $\pm$  0.000 184), miRNA-21 抑制组为 (0.000 038  $\pm$  0.000 013), miRNA-21 过表达组为 (0.041 4  $\pm$  0.001 2), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 68.32, P = 0.000$ )。其中, 与 miRNA-21 正常组比较, miRNA-21 抑制剂组原代大鼠 PSMCs 中 miRNA-21 表达下降 ( $P < 0.05$ ), 而 miRNA-21 过表达组原代大鼠 PSMCs 中 miRNA-21 表达增高 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 外源性 miRNA-21 对 Wnt 通路中 $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DKK1 mRNA 表达的影响

各组细胞中  $\beta$ -atenin、Cyclin D1 和 DKK1 mRNA 表达, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。其中在外源性 miRNA-21 被抑制的时候, PH 大鼠模型原代 PSMCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 的

mRNA 表达水平增高 (均  $P < 0.05$ ), DDK1 的 miRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 而在外源性 miRNA-21 过表达干预的时候, 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 的 mRNA 表达水平反而降低 (均  $P < 0.05$ ), DDK1 mRNA 表达水平增高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 外源性 miRNA-21 对 Wnt 通路中 $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DDK1 蛋白表达的影响

各组细胞  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DDK1 蛋白表

达, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。其中, 在外源性 miRNA-21 被抑制的时候, PH 大鼠模型原代 PSMCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 的蛋白表达水平增高 (均  $P < 0.05$ ), DDK1 的蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 而在外源性 miRNA-21 过表达干预的时候, 细胞中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 的蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), DDK1 的蛋白表达水平增高 ( $P < 0.05$ ), 与基因表达一致。见附图和表 2。

表 1 外源性 miRNA-21 对  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DDK1 mRNA 表达的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

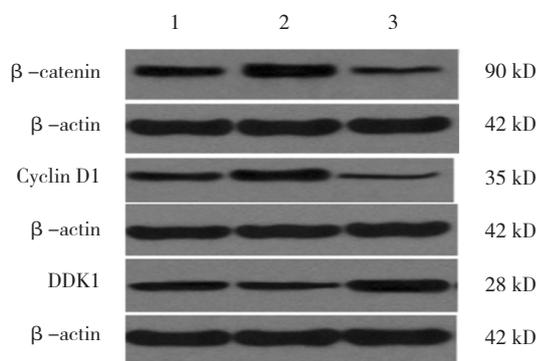
组别	$\beta$ -catenin mRNA	Cyclin D1 mRNA	DDK1 mRNA
miRNA-21 正常组	0.000 867 $\pm$ 0.000 256	0.003 469 $\pm$ 0.001 022	0.000 813 7 $\pm$ 0.000 368 6
miRNA-21 抑制组	0.002 769 $\pm$ 0.000 879 <sup>†</sup>	0.011 08 $\pm$ 0.003 517 <sup>†</sup>	0.000 075 5 $\pm$ 0.000 022 6 <sup>†</sup>
miRNA-21 过表达组	0.000 200 9 $\pm$ 0.000 078 <sup>†</sup>	0.000 401 7 $\pm$ 0.000 156 <sup>†</sup>	0.010 37 $\pm$ 0.003 057 <sup>†</sup>
F 值	37.867	40.464	62.627
P 值	0.000	0.000	0.000

注: † 与 miRNA-21 组比较,  $P < 0.05$

表 2 外源性 microRNA-21 对  $\beta$ -catenin、cyclin D1 和 DDK1 蛋白表达的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	$\beta$ -catenin 蛋白	cyclin D1 蛋白	DDK1 蛋白
miRNA-21 正常组	0.418 1 $\pm$ 0.017 42	0.320 3 $\pm$ 0.019 25	0.300 3 $\pm$ 0.030 7
miRNA-21 抑制组	0.860 9 $\pm$ 0.090 11 <sup>†</sup>	0.717 2 $\pm$ 0.045 32 <sup>†</sup>	0.190 3 $\pm$ 0.032 64 <sup>†</sup>
miRNA-21 过表达组	0.220 5 $\pm$ 0.030 04 <sup>†</sup>	0.176 6 $\pm$ 0.253 5 <sup>†</sup>	0.769 8 $\pm$ 0.090 19 <sup>†</sup>
F 值	103.818	230.183	84.055
P 值	0.000	0.000	0.000

注: † 与 miRNA-21 正常组比较,  $P < 0.05$



1: miRNA-21 正常组; 2: miRNA-21 抑制组; 3: miRNA-21 过表达组

附图 外源性 miRNA-21 对  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DDK1 蛋白表达的影响 ( $n=3$ )

## 3 讨论

早期预测高度保守的基因类型的 miRNA 不仅扩大人类对该疾病的生物学理解, 更重要的是开辟新的发展途径新的预后和诊断策略<sup>[10]</sup>。由于 miRNA 稳定性高, 即使在保存不良的标本中, 也被认为是强大的临床分析物, 对临床研究和生物标志物发现很有价值。miRNA-21 以前多报道见于人类癌细胞系, miRNA-21 扮演着癌基因的角色, 有调节细胞增殖、侵袭和凋亡的作用<sup>[11-13]</sup>, 而在 PH 的发病机制中, 肺血管收缩、肺血管重塑和肺血管原位血栓形成是 PH 发生、发展的 3 个重要病理生理基础, 其主要病理特征为肺血管重构。主要表现为 PSMCs 增殖, 肌型血管中膜增

厚, 非肌型血管肌化, 成纤维细胞和胞外基质合成增多等<sup>[2]</sup>。PASCs 增殖是肺血管重塑的关键所在, 亦是阻止和逆转肺高压进程的关键所在, 本研究认为, miRNA-21 在 PH 早期通过对肺动脉平滑肌细胞增殖的影响, 也参与肺血管的重塑。

而在不同的 Wnt 信号途径中, DKK 仅特异地影响经典 Wnt 信号通路, 而对于 Wnt/PCP 通路及 Wnt/Ca<sup>2+</sup> 通路无明显的作用。在 DKK 家族中, DKK1 作为 Wnt 通路的抑制子是研究得较清楚的。DKK1 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的拮抗剂, 可以特异地与 Wnt 的受体之一 LRP5/6 结合, 从而干扰 LRP5/6 与 Wnt-Frizzled 复合物的结合, 抑制下游信号的传导。当在野百合碱诱导的大鼠 PH 模型中使用 DKK1 抗体后可降低平滑肌细胞的增殖。这表明通过阻断 Wnt 通路的拮抗剂 DKK1 对平滑肌细胞的形成和促进平滑肌细胞的增殖都具有重要意义。

本实验结果证实, 在外源性 miRNA-21 干扰 PH 大鼠模型原代 PASCs 后, PH 大鼠模型原代 PASCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 和 DDK1 的表达水平随之改变。在外源性 miRNA-21 被抑制的时候, PASCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 表达水平增高, DDK1 表达降低, 拮抗作用减弱; 而在外源性 miRNA-21 过表达干预的时候, PASCs 中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 表达水平降低, DDK1 表达增高, 拮抗作用增强。所以笔者认为 miRNA-21 的早期干预可通过调控 Wnt 通路的 DKK1 作用与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在血管平滑肌细胞的功能和血管平滑肌细胞增殖中起着重要作用, Wnt 蛋白通过与膜上受体 LRP5/6 及 frizzled (Fz) 结合形成的跨膜复合物导致细胞内信号通路活化, 激活的受体将信号进一步传递到细胞质中, 使得 Dishevelled 和 Axin 被募集到细胞膜上, 导致 Axin-APC-GSK3 $\beta$  复合物被破坏, 于是  $\beta$ -catenin 从这个降解复合体中释放出来并在细胞质中积累。胞质中积累的  $\beta$ -catenin 继而进入细胞核与 LEF/TCF 等转录因子结合, 激活下游靶基因的转录, 从而促进血管平滑肌细胞增殖。miRNA-21 有望成为早期检测 PH 的新靶点。

#### 参 考 文 献:

- [1] PAULIK L B, SMITH B W, BERGMANN A J, et al. Passive samplers accurately predict PAH levels in resident crayfish[J]. *Sci Total Environ*, 2016, 544(15): 782-791.
- [2] CUI C, ZHANG H, GUO L N, et al. Inhibitory effect of NBL1 on PDGF-BB-induced human PASC proliferation through blockade of PDGF  $\beta$ -p38 MAPK pathway[J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): 361-370.
- [3] YOUNG K A, IVESTER C, WEST J, et al. BMP signaling controls PASCCKV channel expression in vitro and in vivo[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5): L841-848.
- [4] PIVA M B R, JAKUBZIG B, BENDAS G. Integrin activation contributes to lower cisplatin sensitivity in MV3 melanoma cells by inducing the Wnt signaling pathway[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(9): 1-16.
- [5] KNOBLOCH J, SHAUGHNESSY JD J R, RÜTHER U. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway[J]. *FASEB J*, 2007, 21(7): 1410-1421.
- [6] HORNSTEIN E, MANSFIELD J H, YEKTA S, et al. The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development[J]. *Nature*, 2005, 43(8): 671-674.
- [7] DU RIEU M C, TORRISANI J, SELVES J, et al. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(4): 603-612.
- [8] GIOVANNETTI E, FUNEL N, PETERS G J, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its Role in the modulation of gemcitabine activity[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4528-4538.
- [9] 王欣, 谢立, 胡建国, 等. 三羟基二苯乙烯及其对肺动脉平滑肌细胞生长抑制和致凋亡作用的研究 [J]. *中南大学学报: 医学版*. 2014, 37(4): 390-399.
- [10] BORTOLOMEAZZI M, GAFFO E, BORTOLUZZI S. A survey of software tools for microRNA discovery and characterization using RNA-seq[J]. *Brief Bioinform*, 2017, 11(6): 1093-1148.
- [11] FU D, DONG J, LI P, et al. MiRNA-21 has effects to protect kidney injury induced by sepsis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94(10): 1138-1144.
- [12] FANG H, XIE J, ZHANG M, et al. miRNA-21 promotes proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells through targeting PTEN[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 953-961.
- [13] MARKOU A, ZAVRIDOU M, LIANIDOU ES. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer[J]. *Lung Cancer (Auckl)*, 2016(5): 19-27.

(王荣兵 编辑)