

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.34.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 34-0011-06

## MicroRNA-200c 对 Ox-LDL 介导的 人主动脉内皮细胞损伤的影响

朱伟军<sup>1</sup>, 雷军荣<sup>2</sup>, 白晓君<sup>3</sup>, 王蕊<sup>1</sup>, 叶玉兰<sup>1</sup>, 鲍建军<sup>1</sup>

(1. 陕西省西安高新医院 心内科, 陕西 西安 710075; 2. 陕西省西安高新医院 心胸外科, 陕西 西安 710075; 3. 西安交通大学医学院第一附属医院 心血管内科, 陕西 西安 710061)

**摘要:** **目的** 探讨 microRNA-200c (miR-200c) 在氧化低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 损伤人主动脉内皮细胞 (HAEC) 中的表达及其对细胞活力、凋亡的影响及相关机制。 **方法** 采用 qRT-PCR 检测 Ox-LDL 损伤 HAEC miR-200c 的表达水平; 转染 miR-200c inhibitor 抑制 miR-200c 的表达后, 分别运用 MTT 和流式细胞术检测细胞活力和细胞凋亡情况; Western blot 检测 Slit2 蛋白表达水平; 荧光素酶报告系统检测 miR-200c 对 Slit2 的靶向调节。 **结果** Ox-LDL 呈浓度和时间模式刺激 HAEC 中 miR-200c 表达上调。抑制 miR-200c 表达可上调细胞活力, 抑制 Ox-LDL 诱发的细胞凋亡。抑制 miR-200c 可上调 Slit2 蛋白表达水平。双荧光素酶报告实验转染 In-miR-200c 的细胞内 Slit2 相对荧光强度高于对照组。沉默 Slit2 可部分逆转 In-miR-200c 对细胞活力的促进作用和对细胞凋亡的抑制作用。 **结论** miR-200c 在 Ox-LDL 诱导的 HAEC 表达上调, 抑制 miR-200c 的表达可通过靶向作用于 Slit2 抑制 Ox-LDL 诱导的细胞凋亡。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 微 RNAs; 细胞增殖; 细胞凋亡; 脂蛋白类, 低密度脂蛋白; Slit2

**中图分类号:** R543

**文献标识码:** A

## Effect of miR-200c on Ox-LDL-induced injury of human aortic endothelial cells

Wei-jun Zhu<sup>1</sup>, Jun-rong Lei<sup>2</sup>, Xiao-jun Bai<sup>3</sup>, Rui Wang<sup>1</sup>, Yu-lan Ye<sup>1</sup>, Jian-jun Bao<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an, Shaanxi 710075, China; 3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and effect of miR-200c on cell survival and apoptosis in human aortic endothelial cells (HAECs) injured by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL). **Methods** The expression of miR-200c in Ox-LDL injured HAECs was detected by qRT-PCR. After transfection of miR-200c inhibitor, the cell viability and cell apoptosis were analyzed by MTT and flow cytometry respectively. Luciferase assay was performed to detect whether Slit2 was the direct target of miR-200c. **Results** miR-200c expression was up-regulated by Ox-LDL treatment in the HAECs in a time- and dose-dependent manner. miR-200c inhibition enhanced cell survival and inhibited cell apoptosis. Knockdown of miR-200c up-regulated Slit2 protein expression level. The transfection of miR-200c inhibitor significantly increased the relative luciferase intensity of Slit2. Furthermore, silencing of Slit2 partly reversed the effect of miR-200c inhibitor on cell survival and cell apoptosis. **Conclusions** miR-200c is up-regulated in Ox-LDL-treated HAECs, and miR-200c inhibition impedes Ox-LDL-induced apoptosis by targeting Slit2.

**Keywords:** atherosclerosis; microRNAs; proliferation; apoptosis; lipoproteins, LDL; Slit2

收稿日期: 2018-04-15

[通信作者] 雷军荣, E-mail: junongl@163.com

动脉粥样硬化是造成死亡和残疾的主要原因,也是缺血性卒中和高血压的主要诱因之一。而内皮细胞的增殖是斑块形成的重要机制,此外,内皮细胞凋亡也是动脉粥样硬化发展过程中至关重要的因素。因此,探讨影响血管平滑肌细胞增殖和凋亡相关的分子对于预防或治疗血管增生性疾病具有重要的意义。MicroRNA (miRNA) 是一类干扰转录和转录后过程的非编码小 RNA 家族<sup>[1]</sup>。miRNA 在心血管疾病包括心肌缺氧复氧损伤、心肌肥厚、心律失常以及心力衰竭等过程中具有重要的作用<sup>[2]</sup>。miR-200c 是 miR-200 基因家族的一员,和 miR-141 都聚集在 12 号染色体。前期的研究发现<sup>[3]</sup>,过氧化氢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激可上调 miR-200c 在人脐静脉内皮细胞的表达水平,且上调的 miR-200c 可调节内皮细胞的增殖、凋亡。本研究通过制备氧化低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 损伤的人主动脉内皮细胞 (HAEC) 模型,研究 miR-200c 对 Ox-LDL 诱导的 HAEC 损伤的作用及相关机制,为动脉粥样硬化的治疗提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

HAEC 和内皮细胞培养基购自美国 ATCC 公司,转染试剂盒 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司, RNA 提取试剂盒 miRNeasy Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司, Taq Man miRNA 逆转录试剂盒购自美国 ABI 公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自中国碧云天公司,兔抗 EphA2 多克隆抗体、HRP 标记的牛抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司。Applied Biosystems 7500 实时聚合酶链反应系统 (美国应用生物系统公司), 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

### 1.2 细胞培养及处理

将 HAECs 接种于含内皮细胞生长因子、5% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的内皮细胞培养基中。置于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气的培养箱中进行培养。待细胞长至 80% 汇合时,将培养基换成含不同浓度 (0、30、60 μg/ml) Ox-LDL 的培养基进行培养,选择 30 μg/ml 浓度的 Ox-LDL 分别培养 0、12、24、48 h。

### 1.3 转染

将胰酶消化的 HAECs 以 2 × 10<sup>5</sup> 个 / 孔的浓度接种于 6 孔培养箱中,根据 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书将 miR-200c inhibitor (In-miR-200c) 及其阴

性对照 (NC 组) 或 Slit2 及对应阴性对照 (Sham 组) 转染至细胞,培养 24 h 后,收集细胞检测 miR-200c 和 Slit2 表达水平或进一步进行 Ox-LDL 处理,未进行任何处理的细胞为对照组 (CON 组)。

### 1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)

收集细胞,采用 miRNeasy Mini Kit 试剂盒提取总 RNA, Taq Man miRNA 逆转录合成 cDNA,随后使用 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统进行实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。PCR 反应条件为: 95℃ 10 min, 40 个周期的 95℃ 15 s 和 60℃ 60 s,以 U6 为内参。

### 1.5 MTT 法

将 miR-200c 和 Ox-LDL 处理的细胞接种于 96 孔板,培养 0、12、24、48、72 h 分别向每孔中加入 20 ml 的 MTT,继续孵育 4 h 后,加入 150 μl DMSO 振荡使结晶物充分溶解。在酶标仪上测定 490 nm 处吸光度值。

### 1.6 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况。收集细胞并以 1 × 10<sup>6</sup> 个 / ml 浓度进行重悬浮。取 500 μl 细胞悬液加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 溶液,然后在室温下避光孵育 15 min。用流式细胞仪进行测定。

### 1.7 Western blot 检测

将细胞置于含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中进行裂解。离心后,收集上清液并对获得的蛋白进行定量。取适量蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳并分离,然后转移到硝酸纤维素膜上。经 5% 脱脂乳封闭 1 h 后,将膜分别与 Slit2 一抗和 HRP 标记的二抗孵育。用奥德赛成像系统对条带进行扫描。

### 1.8 荧光素酶检测

将含有 Slit2 野生型 (WT) 或突变 (MUT) 3'-UTR 的基因序列构建到 psi-check2 荧光素酶报告基因质粒载体 (美国 Promega 公司)。然后,将 HAEC 接种于 24 孔板,并加入 0.5 mg miR-200c inhibitor 或阴性对照质粒用脂质体 2000 试剂进行共转染。转染 48 h 后,收集细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒的荧光素酶活性。

### 1.9 统计学方法

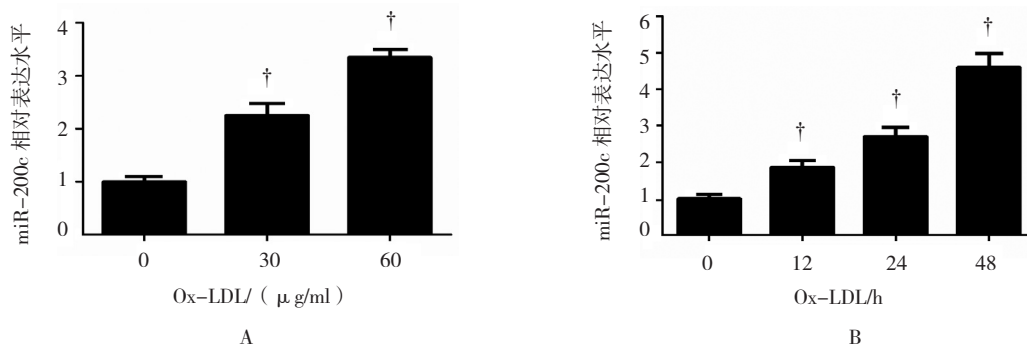
数据分析采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,数据分析采用单因素方

差分析和重复测量设计的方差分析, 比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-200c 在经 Ox-LDL 干预的 HAEC 中的表达

qRT-PCR 结果显示, 30 和 60  $\mu\text{g/ml}$  Ox-LDL 处理组 miR-200c 表达为  $(2.25 \pm 0.23)$  和  $(3.35 \pm 0.15)$ ,



A: † 与 0  $\mu\text{g/ml}$  Ox-LDL 处理组比较,  $P < 0.05$ ; B: † 与 0 h Ox-LDL 处理组比较,  $P < 0.05$

图 1 miR-200c 在经 Ox-LDL 干预的 HAEC 中的表达

为  $(1.05 \pm 0.10)$ , In-miR-200c 组为  $(0.23 \pm 0.04)$  (见图 2A)。CON 组、Ox-LDL 组及 Ox-LDL+In-miR-200c 转染组。12、24、48、72 h 吸光度值比较, 结果: ①不同时间点的吸光度值有差异 ( $F=234.37, P=0.000$ ); ②3 组吸光度值有差异 ( $F=13.259, P=0.006$ ), Ox-LDL 组吸光度值较低; ③3 组吸光度值变化趋势有差异 ( $F=88.172, P=0.000$ )。见图 2B 和附表。

### 2.3 过表达 miR-200c 抑制细胞凋亡

细胞凋亡结果显示, Ox-LDL 组细胞凋亡水平高于 CON 组 ( $t=-37.836, P=0.000$ )。而与 Ox-LDL 组比较, Ox-LDL+In-miR-200c 组细胞凋亡水平下降 ( $t=16.362,$

与 0  $\mu\text{g/ml}$  Ox-LDL 处理组 ( $1.00 \pm 0.10$ ) 比较, 差异有统计学意义 ( $F=145.700, P=0.000$ ); 30  $\mu\text{g/ml}$  Ox-LDL 12、24 和 48 h 处理组 miR-200c 表达为  $(1.85 \pm 0.19)$ 、 $(2.71 \pm 0.25)$  和  $(4.62 \pm 0.38)$ , 与 0 h 处理组 ( $1.00 \pm 0.12$ ) 比较, 差异有统计学意义 ( $F=110.6, P=0.000$ )。见图 1。

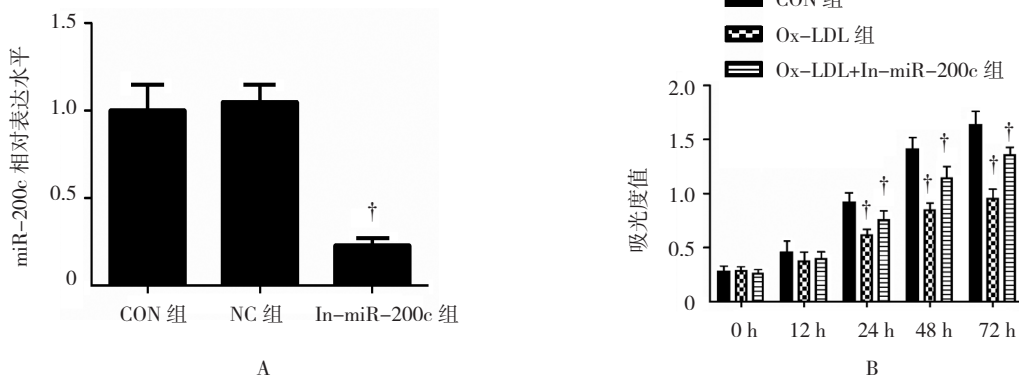
### 2.2 沉默 miR-200c 上调细胞生存活性

经 miR-200c inhibitor 转染后 miR-200c 表达沉默, CON 组 miR-200c 的相对表达为  $(1.00 \pm 0.15)$ , NC 组

$P=0.000$ ) (见图 3A)。此外, 对 Caspase-3 的检测也发现, 与 CON 组比较, Ox-LDL 组 Caspase-3 活性升高 ( $t=-9.275, P=0.001$ ), 且高于 Ox-LDL+In-miR-200c 组 ( $t=5.517, P=0.005$ ) (见图 3B)。

### 2.4 miR-200c 靶向抑制 Slit2 表达

通过检索 microRNA 预测程序 microRNA.org (<http://www.microRNA.org/microrna/home.do>), Target Scan ([http://www.targetscan.org/vert\\_60/](http://www.targetscan.org/vert_60/)) 和 PicTar ([http://www.pictar.org/cgi-bin/PicTar\\_vertbrate.cgi](http://www.pictar.org/cgi-bin/PicTar_vertbrate.cgi)) 发现 Slit2 的 3'-UTR 含有 miR-200c 的结合位点 (见图 4A)。Western blot 检测结果显示, Ox-LDL+In-miR-200c 组 Slit2

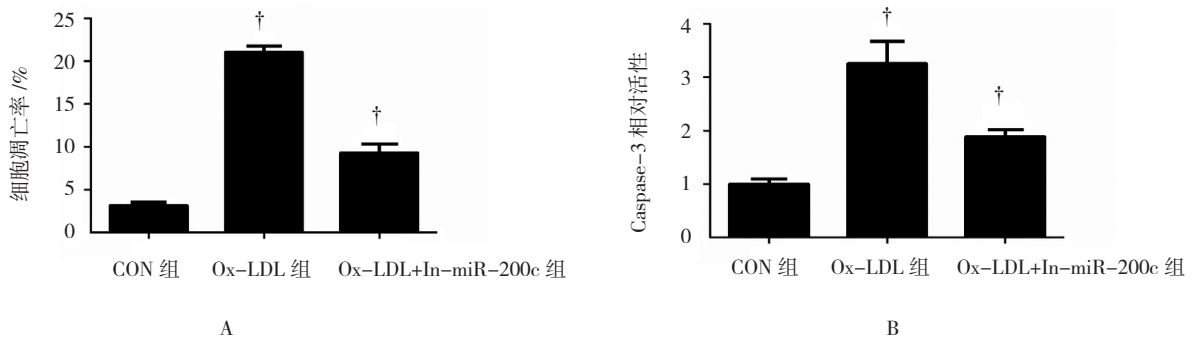


† 与 CON 组比较,  $P < 0.05$

图 2 下调 miR-200c 对 Ox-LDL 损伤 HAEC 活性的影响

附表 各组吸光度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
CON 组	0.28 ± 0.05	0.46 ± 0.10	0.93 ± 0.08	1.42 ± 0.11	1.64 ± 0.12
Ox-LDL 组	0.29 ± 0.03	0.38 ± 0.08	0.62 ± 0.05	0.85 ± 0.06	0.96 ± 0.08
Ox-LDL+In-miR-200c 组	0.26 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.76 ± 0.08	1.15 ± 0.13	1.36 ± 0.07

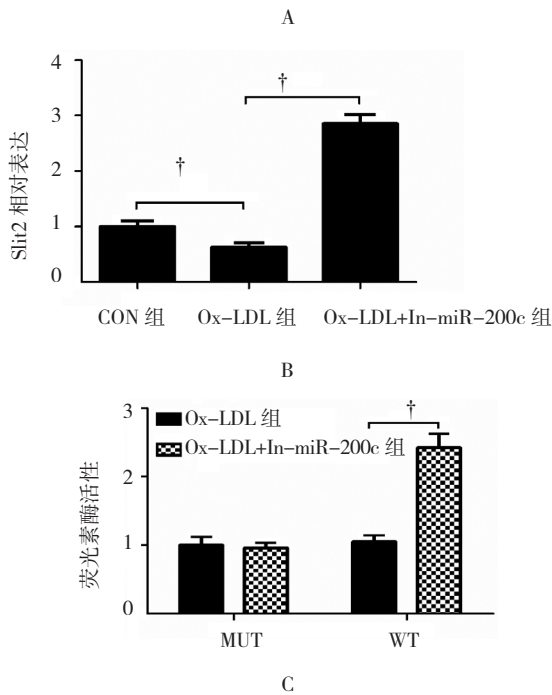


†与 CON 组比较,  $P < 0.05$

图 3 miR-200c 对 Ox-LDL 诱导的 HAEC 凋亡的影响

表达水平与 Ox-LDL 组比较, 差异有统计学意义 ( $t = -21.592, P = 0.000$ ), Ox-LDL+In-miR-200c 组升高 (见图 4B)。进一步通过荧光素酶基因报告实验发现, Slit2 3'-UTR (MUT) 5'...CUAAACAGCCCUAUAGU/GUAUUC...3'

Slit2 3'-UTR (WT) 5'...CUAAACAGCCCUAUACAGUUAUUC...3'  
hsa-miR-200c 5'...AGGUAGUAAUGGGCCGUCUAAU...3'



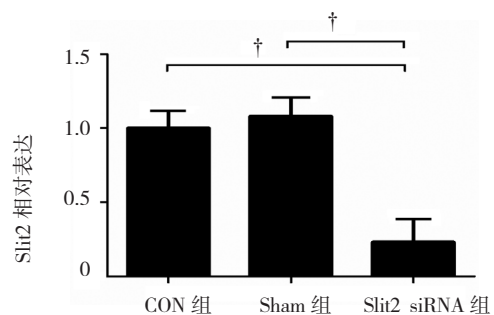
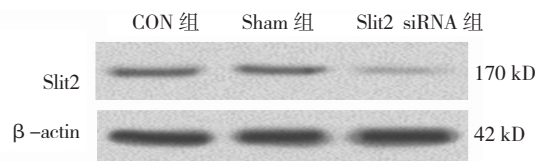
†组间比较,  $P < 0.05$

图 4 荧光素酶基因报告

Ox-LDL+In-miR-200c 转染使携带野生型报告基因的 Slit2 3'-UTR (WT) 组荧光素酶活性高于 Ox-LDL 组 ( $t = -11.253, P = 0.000$ ) (见图 4C)。

### 2.5 干扰 Slit2 对细胞凋亡的影响

利用干扰小 RNA (siRNA) 干扰 Slit2 的表达, 对转染效率的检测发现 Slit2 siRNA 可抑制 Slit2 表达水平 (见图 5A)。与 In-miR-200c 组比较, Slit2 siRNA 组吸光度值升高 ( $t = 8.601, P = 0.001$ , 见图 5B)。此外, Slit2 siRNA 组细胞凋亡水平高于 In-miR-200c 组, 且差异有统计学意义 ( $t = -4.527, P = 0.011$ , 见图 5C)。



A

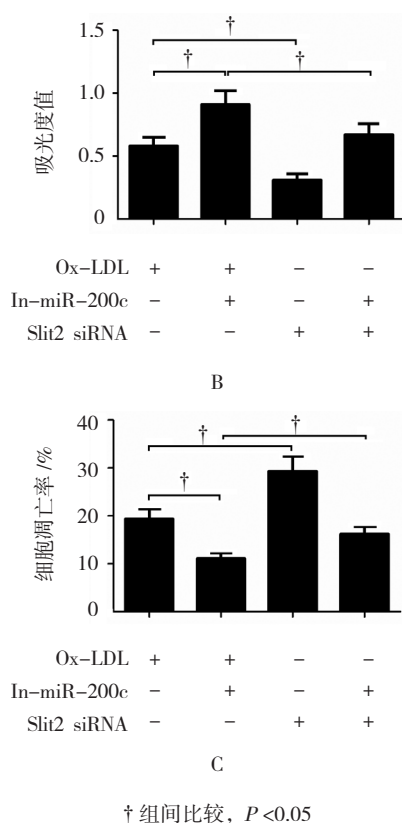


图 5 Slit2 沉默对 Ox-LDL 诱导 HAEC 凋亡的影响

### 3 讨论

Ox-LDL 在动脉粥样硬化及其并发症的发生和发展中起着重要作用<sup>[4-5]</sup>。Ox-LDL 促进平滑肌细胞、单核/巨噬细胞和成纤维细胞的生长和迁移,引起内皮细胞的氧化应激和细胞损伤,并进一步促进形成动脉粥样硬化斑块<sup>[6-7]</sup>。Ox-LDL 通过结合并激活凝集素样 ox-LDL 受体 1 (LOX-1) 诱导血管内皮细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究发现, Ox-LDL 诱导 miR-200c 在 HAEC 中高表达,预示 miR-200c 可能在 Ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤中具有一定的调控作用。ZHANG 等<sup>[9]</sup>对糖尿病小鼠和患者的研究发现, miR-200c 在糖尿病小鼠和患者动脉中的表达水平上调,并指出 miR-200c 可能是糖尿病血管病治疗的重要靶点。MAGENTA 等<sup>[3]</sup>的研究指出氧化应激损伤上调人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) miR-200c 的表达水平,并通过进一步研究发现抑制 miR-200c 可促进 HUVEC 的增殖且抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞凋亡。本研究也发现,抑制 miR-200c 的表达可促进 HAEC 细胞增殖并减弱 Ox-LDL 对 HAEC 凋亡的诱导作用。凋亡是清除有害刺激如 Ox-LDL 损伤细胞的过程,一定程度上代表着 Ox-LDL 对细胞的损伤程度<sup>[10]</sup>。

动脉粥样硬化发生过程中凋亡细胞数量增多,细胞凋亡可通过调控病变细胞进而产生血管阻塞<sup>[11-12]</sup>。结合本研究结果, miR-200c 对于 Ox-LDL 诱导的心血管损伤具有重要的调控作用。

为进一步探讨 miR-200c 调控 Ox-LDL 损伤 HAEC 的可能机制,本研究通过 miRNA 靶基因预测网站对比发现 Slit2 为 miR-200c 的潜在靶点,并通过荧光实验证实该猜想。Slit2 是 Slit 家族成员之一,参与血管形成等大部分器官系统的发育<sup>[13]</sup>。Slit2 在癌症、子痫惊厥以及增生性视网膜病变等人类疾病中的血管再生过程中均具有十分重要的作用。它与 Robo1 的结合可诱导肿瘤血管生成与淋巴管生成,并参与血管的发育<sup>[14]</sup>。LI 等<sup>[15]</sup>的研究发现, Slit2 可促进 HUVEC 的增殖、迁移和小管形成。本研究发现,抑制 Slit2 表达可部分逆转 miR-200c 沉默对 Ox-LDL 损伤 HAEC 的保护作用,表明 miR-200c 可能部分通过靶向作用于 Slit2 调控 Ox-LDL 损伤 HAEC 的增殖和凋亡,进而起到保护 HAEC 免受 Ox-LDL 损伤的作用。

综上所述,本研究结果表明 miR-200c 在 Ox-LDL 损伤 HAEC 表达上调;抑制 miR-200c 表达可促进 HAEC 细胞增殖并抑制细胞凋亡,由此可见 miR-200c 在 Ox-LDL 损伤 HAEC 中起着负调控的作用。此外,本研究还发现, miR-200c 对 HAEC 的调控作用是部分通过靶向作用于 Slit2 实现。这将为动脉粥样硬化等类似心血管疾病的分子治疗靶标提供新的实验依据,但其相关分子机制还有待于进一步的探索。

### 参 考 文 献:

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] DORNII G W. MicroRNAs in cardiac disease[J]. Transl Res, 2011, 157(4): 226-235.
- [3] MAGENTA A, CENCIONI C, FASANARO P, et al. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(10): 1628-1639.
- [4] WANG B, GE Z, CHENG Z, et al. Tanshinone IIA suppresses the progression of atherosclerosis by inhibiting the apoptosis of vascular smooth muscle cells and the proliferation and migration of macrophages induced by ox-LDL[J]. Biol Open, 2017, 6(4): 489-495.
- [5] LI S, GUO Y, ZHU P, et al. Role of Ox-LDL/LOX-1/NF-kappaB signaling pathway in regulation of atherosclerotic plaque growth by testosterone in male rabbits[J]. Vascul Pharmacol, 2013, 59(5/6): 131-137.

- [6] PIRILLO A, UBOLDI P, FERRI N, et al. Upregulation of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human endothelial cells by modified high density lipoproteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(2): 230-233.
- [7] CHEN X P, XUN K L, WU Q, et al. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(1): 1-9.
- [8] HONG D, BAI Y P, GAO H C, et al. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2): 310-317.
- [9] ZHANG H, LIU J, QU D, et al. Inhibition of miR-200c restores endothelial function in diabetic mice through suppression of COX-2[J]. *Diabetes*, 2016, 65(5): 1196-1207.
- [10] 陈为, 张葵, 张宸豪, 等. Ox-LDL 介导内皮细胞损伤及其对 TLR-4 和 EpCAM 表达的影响 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2015, 41(6): 1144-1149.
- [11] WANG P, XU T Y, GUAN Y F, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis is an early trigger for hypothyroid atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 448-459.
- [12] TUCKA J, YU H, GRAY K, et al. Akt1 regulates vascular smooth muscle cell apoptosis through FoxO3a and Apaf1 and protects against arterial remodeling and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(11): 2421-2428.
- [13] YUEN D A, ROBINSON L A. Slit2-Robo signaling: a novel regulator of vascular injury[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22(4): 445-451.
- [14] YANG Y C, CHEN P N, WANG S Y, et al. The differential roles of Slit2-exon 15 splicing variants in angiogenesis and HUVEC permeability[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(3): 301-312.
- [15] LI Y, FU S, CHEN H, et al. Inhibition of endothelial Slit2/Robo1 signaling by thalidomide restrains angiogenesis by blocking the PI3K/Akt pathway[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(12): 2958-2966.

(张蕾 编辑)