

微小 RNA-381 靶向调控 HMGB1 基因对人主动脉血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响^{*}

襄阳市中心医院 陈鹏 刘永胜^{*} 周登明 王萍, 襄阳 441000

摘要 目的:探讨微小 RNA-381(miR-381)对人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMCs)增殖和迁移的影响及其机制。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miR-381 的表达水平,采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)和 Transwell 小室实验检测 HA-VSMCs 细胞增殖和迁移能力,采用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-381 与高迁移率族蛋白(HMGB1)的靶向关系,采用 Western blot 检测 HMGB1 蛋白表达水平。结果:血小板衍生生长因子(PDGF)能够促进 HA-VSMCs 增殖和迁移,下调 miR-381 表达水平;上调 miR-381 表达可抑制 PDGF 诱导的 HA-VSMCs 增殖和迁移;双荧光素酶报告基因实验证实 HMGB1 是 miR-381 的靶基因;上调 HMGB1 表达能够逆转 miR-381 对 HA-VSMCs 增殖和迁移的抑制作用。结论:miR-381 可通过靶向 HMGB1 抑制 HA-VSMCs 细胞增殖和迁移。

关键词 miR-381; 人主动脉血管平滑肌细胞; 高迁移率族蛋白; 增殖; 迁移

中图分类号 R541.4 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20200419

Effect of miR-381 on proliferation and migration of human aortic vascular smooth muscle cells by targeting HMGB1

CHEN Peng, LIU Yong-sheng^{*}, ZHOU Deng-ming, WANG Ping. Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441000, China

Abstract Objective: To investigate the effects of miR-381 on proliferation and migration of human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMCs) and its mechanism. Methods: The expression level of miR-381 was detected by RT-PCR, cell proliferation and migration were detected by MTT and Transwell assay, the targeting relationship between miR-381 and HMGB1 was detected by double luciferase reporter gene assay, and the expression level of HMGB1 protein was detected by Western blotting. Results: The proliferation and migration of HA-VSMCs could be promoted by platelet-derived growth factor (PDGF), and the expression of miR-381 could be down-regulated by PDGF. The proliferation and migration of HA-VSMCs induced by PDGF could be inhibited by miR-381 up-regulation. Double luciferase reporter gene assay confirmed that HMGB1 was the target gene of miR-381. The inhibition of miR-381 on the proliferation and migration of HA-VSMCs could be reversed by HMGB1 up-regulation. Conclusion: MiR-381 can inhibit the proliferation and migration of HA-VSMCs by targeting HMGB1.

Key words miR-381; Human aortic vascular smooth muscle cells; HMGB1; Proliferation; Migration

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是血管壁的主要组成细胞之一,其异常增殖和迁移是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、支架后再狭窄和高血压等共同的病理特征^[1,2]。微小 RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类长约 21nt 的单链非编码短 RNA,可通过与靶基因 mRNA 3'非编码区域(untranslated region, UTR)结合,参与 mRNA 转录后的调控,影响细胞增殖、分化和转移等生物学过程,与心血管疾病的发生发展关系密切^[3]。研究证实,miRNAs 如 miR-362、miR-148b 和 miR-147b 等在

VSMCs 增殖和迁移过程中发挥着重要的调控作用^[4-6]。miR-381 较多出现在肿瘤研究中,发挥着抑癌基因的作用,在癌组织和细胞中异常低表达^[7,8]。在 AS 发生过程中,血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)的释放可刺激动脉的 VSMCs 从原来所处的位置逐步向内膜的移行、增生, PDGF-BB 是 PDGF 的一种二聚体形式,可通过激活细胞内的信号转导通路在 VSMCs 增殖和迁移过程中发挥重要的促进作用^[2]。本研究以 PDGF-BB 作为一种诱导剂,探讨 miR-381 在人主动脉血管平滑肌细胞(human aortic vascular smooth muscle cells, HA-VSMCs)增殖和迁移中的作用及其机制。

^{*}基金项目:湖北省自然科学基金青年项目(No:2016CFB344)

^{*}通信作者:刘永胜, E-mail:752098406@qq.com

材料与方法

主要试剂 HA-VSMCs 购于美国 ATCC 公司, DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶购于美国 Gibco™ Invitrogen 公司, 青链霉素和胎牛血清购于美国 HyClone™ Invitrogen 公司, 二甲基亚砜购于美国 Amresco 公司, MTT 试剂、PDGF-BB 购于美国 Sigma 公司, Lipofectamine 2000 和 Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司, PCR 相关引物由上海生工生物合成。miR-381 模拟物及其阴性对照购于广州锐博公司, 萤光素酶 pGL3 载体和双萤光素酶试剂盒购于美国 Promega 公司, Transwell 小室购于美国 Corning 公司, ECL 发光液、BCA 定量试剂盒购于美国 Thermo 公司, RIPA 裂解液和逆转录试剂盒购于上海碧云天公司, PVDF 膜购于美国 Millipore 公司, 鼠单克隆抗体 GAPDH 和高迁移率蛋白 1 (high mobility group box-1, HMGB1) 购于美国 Santa Cruz 公司。pcDNA 3.1-HMGB1 过表达载体质粒购于 BioVector 质粒载体菌种细胞基因保藏中心 NTCC 典型培养物保藏中心。

细胞培养、PDGF-BB 处理与转染 在 37℃、5% CO₂ 的条件下, 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 HA-VSMCs。采用浓度为 20 nmol/L PDGF-BB 处理 HA-VSMCs, 并以未经任何处理正常培养的细胞作为空白(对照)组, 每组设置 3 个重复。48 h 后, 收集 2 组细胞, 分别采用 MTT 法、Transwell 小室实验和 RT-PCR 检测细胞增殖、迁移情况以及细胞中 miR-381 的表达水平。参照转染试剂 Lipofectamine 2000 说明书步骤将浓度为 20 nM miR-381 模拟物及其阴性对照分别转染至 HA-VSMCs, 转染 48 h 后再以 20 ng/mL PDGF-BB 处理 48 h, 分别记为 PDGF + miR-381 组、PDGF + miR-NC 组, 以未转染只给予 PDGF-BB 处理的细胞作为 PDGF 组。处理结束后, 收集各组细胞采用 RT-PCR、MTT 法和 Transwell 小室实验分别检测 miR-381 的表达水平以及细胞增殖、迁移情况。后期另设 PDGF + miR-381 + pcDNA 组和 PDGF + miR-381 + HMGB1 组, 前者共转染。

miR-381 模拟物和 pcDNA3.1 空载体质粒后给予 PDGF 处理 48 h, 后者共转染 miR-381 模拟物和 pcDNA3.1-HMGB1 过表达载体质粒后给予 PDGF 处理 48 h。处理结束后, 分别收集 PDGF 组、PDGF + miR-NC 组、PDGF + miR-381 组、PDGF + miR-381 + pcDNA 组和 PDGF + miR-381 + HMGB1 组, 采用 Western blot、MTT 法和 Transwell 小室实验分别检测

各组细胞中 HMGB1 蛋白的表达以及细胞增殖和迁移情况。

RT-PCR 测定 miR-381 的表达 采用 Trizol 法提取 HA-VSMCs 总 RNA, 按照说明书步骤进行逆转录。取 4 μL 稀释 10 倍的逆转录产物作为模板, 分别加入各 0.4 μL 浓度为 10 nmol/L 上下游引物、10 μL Master Mix 和 5.2 μL ddH₂O 配成 20 μL 的 PCR 反应体系; 并按照如下条件进行 PCR 扩增: 95℃、5 min; 95℃、30 s, 58℃、30 s, 共 38 个循环。以 U6 为内参, 2-ΔΔCt 法定量 miR-381 的表达水平。

MTT 法测定细胞增殖 将处理后的各组 HA-VSMCs 以适当密度种植至 96 孔细胞板上, 于 5% CO₂ 和 37℃ 细胞培养箱内培养 48 h 后, 弃上清, 每孔加入 20 μL MTT 试剂(浓度为 5 g/L)。孵育 4 h 后, 加入 150 μL 二甲基亚砜震荡反应至 MTT 结晶溶解。上酶标仪机于 570 nm 处检测细胞的光密度(OD)值, 并根据公式: 细胞增殖率(%) = 100% × (药物孔 OD - 空白调零孔 OD / 对照孔 OD - 空白调零孔 OD) 计算细胞增殖率。

Transwell 小室测定细胞迁移 将待测的各组 HA-VSMCs 制成浓度为 10⁴ 个/mL 的细胞悬液。取 200 μL 悬液加入 Transwell 小室(孔径 8 nm)上室中, 并将 600 μL 含血清的培养液加入下室中。放入 5% CO₂ 和 37℃ 培养箱中培养过夜。取出小室, 以棉签小心擦去上室内残留的细胞, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后, 0.5% 结晶紫染色 10 min。洗去结晶紫后, 使用倒置显微镜下观察迁移细胞数, 结果以随机选取 6 个视野内的细胞数均值表示。

细胞划痕实验细胞迁移 首先, 使用记号笔在 6 孔板背面以 0.5 cm 间距划横线(过孔, 每孔 5 条)。将对数生长期的 HA-VSMCs 以每孔 104 个接种至 6 孔细胞板上, 置于细胞培养箱内常规培养过夜后, 分组处理细胞, 每组 3 个重复。待细胞贴壁 80% 左右时, 以 20 μL 移液器枪头垂直于背后的横线划痕。经磷酸缓冲液洗涤细胞 3 次后, 加无血清培养基继续培养, 以显微镜分别在 0 和 24 h 作用时间下随机选取 5 个视野观察各组细胞的迁移情况, 并按照细胞迁移率 = (0 h 划痕距离 - 24 h 划痕距离) / 0 h 划痕距离 × 100% 的公式计算各组细胞的迁移率。

Western blot 测定 HMGB1 蛋白的表达 加入 RIPA 细胞裂解液提取 HA-VSMCs 总蛋白后, 以 BCA 法检测总蛋白的浓度与纯度。采用 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 电转至 PVDF 膜上。室温

下,以含 50 g/L 脱脂奶粉封闭处理 1 h。再将膜与鼠单克隆抗体 HMGB1 (1:500) 以及 GAPDH (1:1000) 在 4℃ 下孵育 24 h。次日,室温下将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)孵育 2 h。ECL 发光剂显影后,将 GAPDH 作为内参,凝胶成像系统扫描分析 HMGB1 蛋白的表达量。

荧光素酶报告基因实验测定 miR-381 与 HMGB1 的关系 构建突变型 HMGB1-MUT 和野生型 HMGB1-WT 的 HMGB1 3'-UTR 荧光素酶报告载体。将对数生长期的 HA-VSMCs 培养至 70% 汇合度时,参照 Lipofectamine 2000 说明书行 miR-381 + HMGB1-MUT(共转染 miR-381 模拟物和 HMGB1-MUT)、miR-NC + HMGB1-MUT(共转染 miR-381 模拟物阴性对照和 HMGB1-MUT)、miR-381 + HMGB1-WT(共转染 miR-381 模拟物和 HMGB1-WT)、和 miR-NC + HMGB1-WT(共转染 miR-381 模拟物阴性对照和 HMGB1-WT)4 组共转染,转染 48 h 后,根据荧光素酶试剂盒说明书步骤检测各组细胞的荧光素酶活性。

统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-q,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

PDGF 诱导 HA-VSMCs 增殖、迁移并下调 miR-381 表达 以 20 ng/mL 的 PDGF 处理 48 h 后 HA-

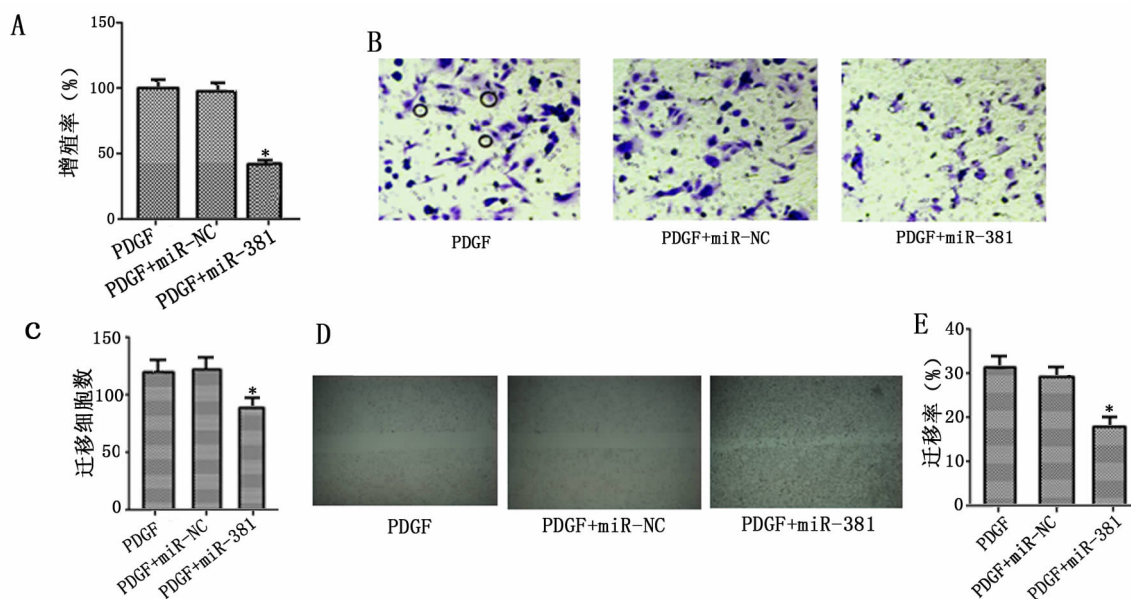
VSMCs 增殖率和迁移细胞数较空白组显著升高 [(142.38 ± 11.25)% vs (98.58 ± 7.35)%, (126.55 ± 8.96)% vs (64.82 ± 5.76)],均 $P < 0.05$];同时 PDGF 处理后 HA-VSMCs 中 miR-381 表达水平较空白组显著降低 [(0.36 ± 0.03) vs (1.01 ± 0.06), $P < 0.05$]。

PDGF 转染后上调 HA-VSMCs 中 miR-381 表达 PDGF 组、PDGF + miR-NC 组和 PDGF + miR-381 组细胞中 miR-381 的表达量分别为 0.99 ± 0.06、0.96 ± 0.05 和 3.83 ± 0.15,与 PDGF 组比较,PDGF + miR-NC 组细胞中 miR-381 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),PDGF + miR-381 组中 miR-381 表达水平显著升高($P < 0.05$)。

上调 miR-381 抑制 PDGF 诱导的 HA-VSMCs 增殖和迁移 与 PDGF 组比较,PDGF + miR-381 组细胞增殖率、迁移细胞数和迁移率均显著降低($P < 0.05$),见图 1。

miR-381 靶基因的预测及验证 采用 TargetScan、miRanda 及 miRBase 三大数据库软件预测发现,miR-381 与 HMGB1 3'-UTR 存在互补核苷酸序列,见图 2A。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 miR-NC + HMGB1-WT 组相比,miR-381 + HMGB1-WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低($t = 18.623, P < 0.05$),而 miR-NC + HMGB1-MUT 组与 miR-381 + HMGB1-MUT 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义($t = 0.604, P > 0.05$),见图 2B。

HMGB1 过表达逆转 miR-381 对 HA-VSMCs 增



注:A)MTT 检测结果;B)Transwell 小室检测结果;C)3 组细胞迁移细胞数;D)划痕 24 h 后的检测结果;E)3 组细胞迁移率;与 PDGF 组比较,* $P < 0.05$

图 1 上调 miR-381 对 PDGF 诱导的 HA-VSMCs 迁移的影响

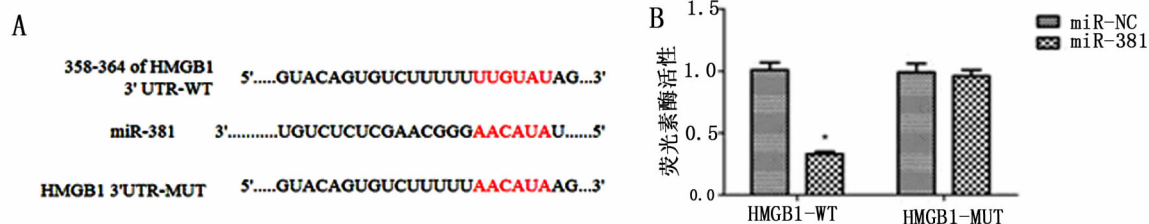
殖和侵袭的抑制作用 与 PDGF 组相比,PDGF + miR-NC 组中 HMGB1 蛋白的表达水平、细胞增殖率和迁移细胞数差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),而 PDGF + miR-381 组中三者均显著降低(均 $P < 0.05$)。与 PDGF + miR-381 组相比,PDGF + miR-381 + pcDNA 组中 HMGB1 蛋白的表达水平、细胞增殖率和迁移细胞数无统计学差异($P > 0.05$),但 PDGF + miR-381 + HMGB1 组中三者均显著升高(均 $P < 0.05$),见图 3。

讨 论

AS 是一种慢性炎症性疾病^[9]。VSMCs 功能异常是 AS 的发生发展的重要机制之一,在细胞因子和生长因子等影响下,血管内膜功能出现障碍,受损

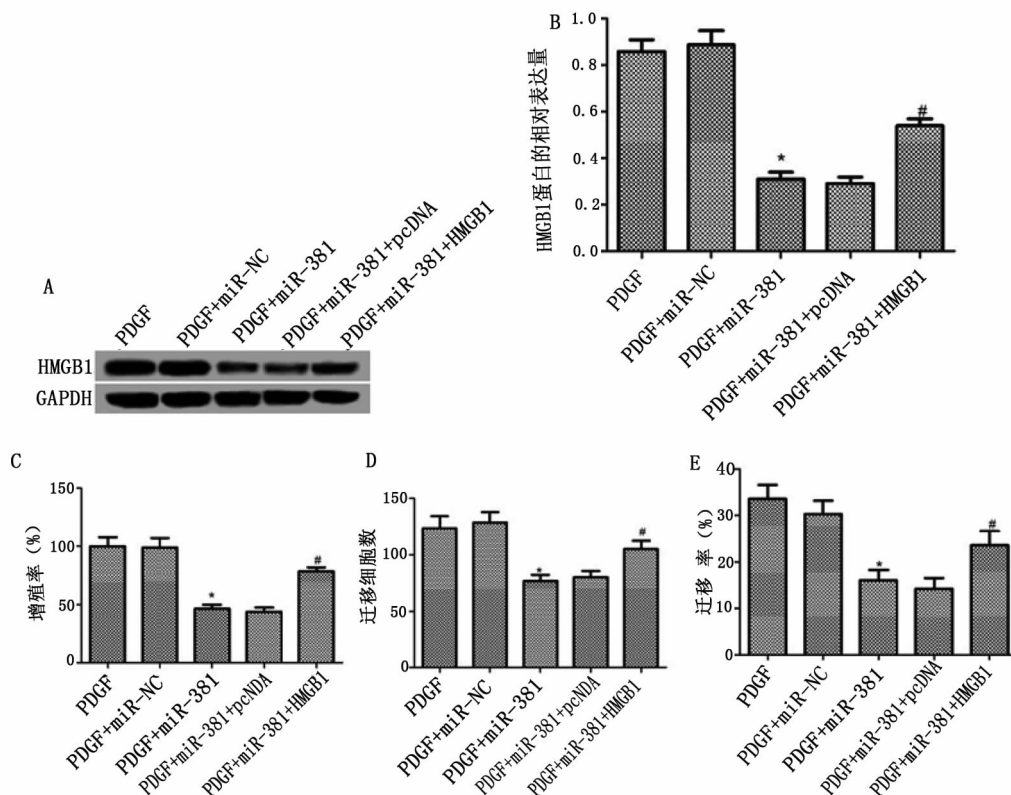
的内皮细胞可刺激 VSMCs 功能发生改变,使其移行、增殖并朝着内膜移动,导致血管壁斑块的形成。

诱导剂 PDGF-BB 可通过介导多种 miRNAs 如 miR-612、miR-365b 和 miR-638 的表达引起 VSMCs 增殖和迁移^[10-12]。本研究以 PDGF-BB 处理 HA-VSMCs 后发现,细胞增殖和迁移能力显著升高,细胞中 miR-381 表达水平也显著降低。这提示 miR-381 可能在 PDGF-BB 诱导的 HA-VSMCs 增殖和迁移过程中发挥着重要作用。研究证实,miR-381 在 AS 患者斑块组织、外周血单个核细胞和血清中异常低表达,且可靶向调控慢性炎症因子 COX-2 的表达,在炎症反应和组织损伤过程中发挥着重要作用^[13]。本研究发现上调 miR-381 表达后,PDGF-BB



注:A)miR-381 与 HMGB1 3'UTR 的结合位点;B)2 组细胞荧光素酶活性;与 miR-NC 组比较,* $P < 0.05$

图 2 miR-381 与 HMGB1 靶向关系的验证结果



注:A)Western blot 检测转染结果;B)各组细胞中 HMGB1 蛋白的表达水平;C)MTT 检测结果;D)各组的迁移细胞数;E)各组细胞迁移率;与 PDGF 组相比,* $P < 0.05$;与 PDGF + miR-381 组比较,# $P < 0.05$

图 3 HMGB1 过表达对 HA-VSMCs 细胞增殖和迁移的影响

诱导的 HA-VSMCs 增殖和迁移能力明显受到抑制。这提示 miR-381 对 HA-VSMCs 增殖和迁移起到了抑制作用。

采用生物信息学软件进一步预测 miR-381 靶基因,最终将 HMGB1 作为研究对象。HMGB1 是一种高度保守的核内蛋白,可与具有免疫原性的 DNA 和 RNA 结合,在 DNA 的复制、转录、修复、免疫调节以及细胞运动中发挥着重要作用。研究证实, HMGB1 在动脉粥样斑块中高表达,通过促进炎症反应、促进 VSMC 增殖和迁移,加快 AS 进程^[14,15]。预测软件显示, HMGB1 3'UTR 存在能够与 miR-381 互补结合的核苷酸序列,双荧光素酶报告基因实验进一步证实 miR-381 可与 HMGB1 3'UTR 靶向结合。同时,在成功上调 miR-381 表达的 HA-VSMCs 中发现 HMGB1 蛋白表达水平显著降低。表明 HMGB1 是 miR-381 的靶基因。这与文献^[16]中得到的 miR-381 可靶向调控 HMGB1 的结果相似。本研究通过进一步转染 HMGB1 过表达载体质粒成功上调 HMGB1 表达后发现, miR-381 对 HA-VSMCs 增殖和迁移的抑制作用明显减弱。这提示 miR-381 可能通过靶向调控 HMGB1 表达抑制 HA-VSMCs 增殖和迁移。

参考文献

- 毛晓东,程卓安,郑建普.糖尿病中血管平滑肌细胞表型转化机制及中医药干预[J].中国中药杂志,2014,39(24):4723-4727.
- 冒慧敏,史大卓,刘秀华.血小板源性生长因子对血管平滑肌细胞效应的机制研究进展[J].生理科学进展,2015,46(5):359-364.
- Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease - clinical application[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(5): 687-704.
- Li M, Liu Q, Lei J, et al. MiR-362-3p inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by targeting ADAMTS1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 270-276.
- Zhang X, Shi H, Wang Y, et al. Down-regulation of hsa-miR-148b inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and migration by directly targeting HSP90 in atherosclerosis[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(2): 629-637.
- Yue Y, Lv W, Zhang L, et al. MiR-147b influences vascular smooth muscle cell proliferation and migration via targeting YY1 and modulating Wnt/ β -catenin activities[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(9): 905-913.
- Xie Y, Qi J, Zhu C, et al. MiR-381 functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting ROCK2[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(1): 164-172.
- Tu C, Wang F, Wan J. MicroRNA-381 inhibits cell proliferation and invasion in endometrial carcinoma by targeting the IGF-1R[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 4090-4098.
- 王晓菲,张俊峰.脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与动脉粥样硬化斑块形成、稳定型及病变程度关系的探讨[J].内科急危重症杂志, 2017, 23(4): 28-31.
- Chen C, Yan Y, Liu X. microRNA 612 is downregulated by platelet derived growth factor BB treatment and has inhibitory effects on vascular smooth muscle cell proliferation and migration via directly targeting AKT2[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 159-165.
- Qu Y, Zhang N. miR 365b 3p inhibits the cell proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells by directly targeting ADAMTS1 in coronary atherosclerosis [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4239-4245.
- Wang H, Yao H, Yi B, et al. MicroRNA - 638 inhibits human airway smooth muscle cell proliferation and migration through targeting cyclin D1 and NOR1[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(1): 369-381.
- Song K, Li L, Sun G, et al. MicroRNA-381 regulates the occurrence and immune responses of coronary atherosclerosis via cyclooxygenase-2[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4557-4563.
- Huang SC, Wang M, Wu WB, et al. Mir-22-3p inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration and neointimal hyperplasia by targeting HMGB1 in arteriosclerosis obliterans [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2492-2506.
- 东波,钱民章.高迁移率族蛋白 1 及其受体促进人主动脉血管平滑肌细胞增殖及迁移的作用研究[J].中国动脉硬化杂志, 2018, 26(8): 761-766.
- Liu YT, Gao Y, Yang J, et al. MicroRNA-381 reduces inflammation and infiltration of macrophages in polymyositis via downregulating HMGB1 [J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1332-1342.

(2019-05-07 收稿 2020-03-15 修回)

(上接第 328 页)

- Chaudhury A, Noiret L, Higgins J M. White blood cell population dynamics for risk stratification of acute coronary syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(46): 12344-12349.
- 胡巍娜,周东晖,王琦,等.不同年龄段急性冠状动脉综合征患者临床及冠状动脉造影特点分析[J].中国医科大学学报, 2017, 46(6): 566-568.
- Ray KK, Colhoun HM, Szarek M, et al. Effects of alirocumab on cardiovascular and metabolic outcomes after acute coronary syndrome in patients with or without diabetes: a prespecified analysis of the ODYSSEY OUTCOMES randomised controlled trial[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019, 7(8): 618-628.
- 刘辉.老年非 ST 段抬高型急性心肌梗死患者临床特征及预后影响因素[J].山东医药, 2016, 56(11): 41-43.
- Yang L, Wang H, Han T, et al. The roles of high mobility group box1 and GRACE score in clinical prognosis of acute coronary syndrome patients undergoing selective percutaneous coronary intervention[J].

J Pract Med, 2018, 34(2): 254-258.

- Cetin MS, Cetin EHO, Kalender E, et al. Monocyte to HDL cholesterol ratio predicts coronary artery disease severity and future major cardiovascular adverse events in acute coronary syndrome [J]. Heart Lung Circ, 2016, 25(11): 1077-1086.
- 樊泽元,李汉华,李阳.非 ST 段抬高型急性冠状动脉综合征患者 MLR 变化及其与冠脉病变程度的关系[J].山东医药, 2017, 57(28): 77-79.
- Wei T, Wang L, Yin J, et al. Relationship between red blood cell distribution width, bilirubin, and clinical characteristics of patients with gastric cancer [J]. Int J Lab Hematol, 2017, 39(5): 497-501.
- 周韵,李东泽,罗俊一,等.红细胞分布宽度对急性冠状动脉综合征患者预后预测价值的 Meta 分析[J].中国循环杂志, 2015, 30(11): 1048-1052.

(2020-04-10 收稿 2020-04-27 修回)