

# microRNA-133b 在低切应力诱导血管内皮细胞影响血管平滑肌细胞增殖中的作用

马英英, 王璐, 包晗, 韩悦, 齐颖新

(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学研究所, 上海 200240)

**摘要:** **目的** 研究血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)直接感受低切应力刺激后分泌类胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)影响血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖这一过程中 microRNAs(miRs)的作用。**方法** 用平行平板流动腔系统对 ECs 施加 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS)和 0.5 Pa 低切应力(low shear stress, LowSS), Real-time PCR 检测 VSMCs 的 miRs 变化。用 miRs 预测网站预测 miR-133b 靶基因并验证。Western blotting 检测核糖核酸结合蛋白 1(polypyrimidine tract binding protein 1, Ptbp1)和 N-myc 下游调节基因 1(N-myc downstream regulated 1, Ndr1)的蛋白水平变化。EdU 流式检测 miR-133b 对 VSMCs 增殖的影响。**结果** IGF-1 静态刺激后, VSMCs 的 miR-133b 和 miR-378a 表达上升。LowSS 条件下, VSMCs 的 miR-133b 表达显著上升, miR-378a 表达无明显变化。下调 VSMCs 的 miR-133b 表达, Ptbp1、Ndr1 的 mRNA 水平均显著升高, 上调 VSMCs 的 miR-133b 的表达, Ptbp1、Ndr1 的 mRNA 和蛋白水平显著降低, 并且显著促进 VSMCs 增殖。**结论** 在 LowSS 条件下 ECs 分泌 IGF-1 可能通过调控联合培养 VSMCs 的 miR-133b 和靶基因 Ptbp1 和 Ndr1 促进 VSMCs 增殖。研究结果为心血管疾病治疗提供了一个新的潜在靶标。

**关键词:** 切应力; 内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 类胰岛素生长因子-1; 细胞增殖

**中图分类号:** R 318.01 **文献标志码:** A

**DOI:** 10.3871/j.1004-7220.2016.05.408

## The role of microRNA-133b in proliferation of vascular smooth muscle cells induced by endothelial cells under low shear stress

MA Ying-ying, WANG Lu, BAO Han, HAN Yue, QI Ying-xin (*Institute of Mechanobiology & Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the role of microRNAs (miRs) in the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by endothelial insulin-like growth factor-1 (IGF-1) under low shear stress (LowSS). **Methods** Endothelial cells (ECs) and VSMCs were co-cultured and exposed to normal shear stress (NSS, 1.5 Pa) and LowSS (0.5 Pa) for 12 h with parallel plate flow chamber system, respectively. Real-time PCR was used to examine the expression levels of miRs. The target genes of miR-133b were predicted by multiple algorithms. The expression of polypyrimidine tract binding protein 1 (Ptbp1) and N-myc downstream regulated 1 (Ndr1) in VSMCs was detected by Western blotting. The VSMC proliferation was detected by EdU flow cytometry assay. **Results** After treated with recombinant IGF-1, the expression of both miR-133b and miR-378a in VSMCs was increased. Compared with NSS, LowSS significantly induced the expression of miR-133b in the co-cultured VSMCs, but had no obvious effect on miR-378a. In VSMCs, the protein and mRNA levels of Ptbp1 and Ndr1 were down-regulated by miR-133b mimics. miR-133b inhibitor up-regulated the mRNA levels of Ptbp1 and

收稿日期: 2015-11-27; 修回日期: 2016-01-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(11002091, 11222223, 11232010)。

通信作者: 齐颖新, 研究员, Tel: (021) 34204863, E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn;

韩悦, 助理研究员, Tel: (021) 34204863, E-mail: hanyue625@sjtu.edu.cn。

Ndrgr1. miR-133b overexpression promoted the proliferation of VSMCs significantly. **Conclusions** IGF-1 secreted by ECs in response to LowSS can upregulate the expression of miR-133b in the co-cultured VSMCs, which subsequently depresses the expression of Ptpb1 and Ndrgr1, and induces the proliferation of VSMCs eventually. The research findings provide a potential new target for cardiovascular disease therapy.

**Key words:** Shear stress; Endothelial cells (ECs); Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Insulin-like growth factor-1 (IGF-1); Proliferation

血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)衬于血管腔内壁单层有序紧密排列,直接与血液的各种成分相互接触,是血液、血流、血管三者相互联系的界面和环节。研究表明,ECs 细胞膜上存在多种机械应力感受器<sup>[1-2]</sup>,可感受切应力的变化。ECs 感受应力刺激后 ECs 表面和细胞膜发生形变,离子转换引起生化反应,激活下游的胞内信号通路,进而调控细胞核内相关基因和蛋白表达,改变 ECs 的结构和功能<sup>[3]</sup>。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)位于血管壁中膜,一般认为它并不直接承载切应力的变化,但切应力条件下 ECs 分泌的信号分子,如生长因子、细胞因子等可以通过旁分泌途径作用于 VSMCs,引起细胞的功能发生变化<sup>[4-5]</sup>。VSMCs 增殖、分化和迁移等功能的改变在血管重建中有重要的意义。

microRNAs(miRs)是一类长约 22 nt 的内源性单链非编码小分子 RNA,它由单链前体 RNA 加工而来,能够与与其互补或部分互补的靶 mRNA 的 3' UTR 末端非翻译区结合,使靶 mRNA 降解或抑制其转录、翻译<sup>[6]</sup>。研究发现,miRs 参与心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压等疾病的发生、发展过程<sup>[7-9]</sup>。力敏感的 miRs 对血管细胞的功能有重要影响<sup>[10]</sup>,例如:miR-34a 参与切应力诱导的内皮祖细胞向 ECs 分化<sup>[11]</sup>及低切力诱导的 VSMCs 增殖<sup>[12]</sup>,miR-145 通过 ERK1/2 信号通路调控机械牵拉的 VSMCs 表型变化<sup>[13]</sup>,miR-663 参与震荡剪切力诱导人脐静脉内皮细胞炎症反应等<sup>[14]</sup>。类胰岛素生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是一类促进细胞生长、具有与胰岛素代谢效应相似的因子,包括 IGF-1 和 IGF-2 两种,它们与胰岛素原有高度同源的序列<sup>[15]</sup>。IGF 信号通路比胰岛素信号通路更直接地控制细胞的增殖、凋亡和分化。本课题组前期研究表明,在低应力条件下,与 VSMCs 联合培养 ECs 通过 IGF-1 旁分泌的形式调控 VSMCs 功能<sup>[16]</sup>。然而,

在这一过程中,miRs 是否参与并起到何作用尚不清楚。

本研究通过 IPA 软件<sup>[4]</sup>预测受 IGF-1 调控的 miRs,并探讨 miR-133b 在 IGF-1 影响 VSMCs 增殖这一过程中的作用,为进一步阐明动脉粥样硬化等心血管疾病的发病机制以及寻找更为有效的治疗靶标提供力学生物学的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞原代培养与鉴定

在无菌条件下,取 200 ~ 250 g 雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠的胸主动脉,采用胶原酶消化法培养原代 ECs<sup>[4,16]</sup>。将血管纵行剖开,内侧朝下铺于细胞培养皿中,用 0.2% 的 I 型胶原酶(Worthington 公司,美国)消化 ECs 后,加入 ECs 培养液(Lonza 公司,瑞士)。之后,将去内皮的血管放置于含 10% 小牛血清(Gibco 公司,美国)DMEM 培养液(Gibco 公司,美国)中,在新培养皿内剪碎铺匀,以组织贴块法培养原代 VSMCs<sup>[4,16]</sup>。将两培养皿放置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。第 2 d 换新鲜培养液,并在以后每隔 2 d 换 1 次液。ECs 在 3 ~ 5 d 长出并在 8 ~ 10 d 长至融合状态;VSMCs 在 3 ~ 5 d 从组织边缘爬出并在 6 ~ 8 d 长至融合状态,可进行传代。

vWf 和  $\alpha$ -actin 分别是 ECs 和 VSMCs 特异的表型标志,应用抗原免疫荧光检测可对细胞进行鉴定<sup>[4,16]</sup>,细胞纯度大于 95% 可用于后续实验。

### 1.2 ECs 与 VSMCs 联合培养及流体切应力加载

**1.2.1 ECs 与 VSMCs 联合培养** 通过联合培养杯(Falcon 公司,美国)实现 VSMCs 与 ECs 的联合培养<sup>[4,16]</sup>。将联合培养杯倒置,取第 2 ~ 4 代的 ECs 细胞消化后重悬计数,以  $1.2 \times 10^5$  个/孔密度种于联合培养杯底膜的外侧面。6 ~ 8 h 后将培养杯翻转,置于含 ECs 培养液的六孔板中,以同样的密度接种第 3 ~ 7 代的 VSMCs,进行联合培养。

**1.2.2 流体切应力加载** 联合培养杯上 ECs 和 VSMCs 均长至 80% 融合时,分别用含有 1% 胎牛血清(Gibco 公司,美国) M199 和含有 1% 小牛血清 DMEM 培养液进行同步化 12 h,使细胞处于同一生长周期,再将联合培养杯置于平行平板流动腔系统,对 ECs 侧施加流体切应力<sup>[4,16]</sup>。加载条件分别为 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS)和 0.5 Pa 低切应力(low shear stress, LowSS),加载时间均为 12 h。加载结束后,分别收取培养杯两侧细胞,用于后续实验。

### 1.3 IGF-1 重组蛋白刺激实验

取第 3~7 代 VSMCs 消化后重悬,以  $2 \times 10^5$  个/孔密度种于六孔板中,待细胞长至 50%~80% 融合状态时,采用血清饥饿法对细胞进行同步化 12 h。同步化结束后,实验组加入 25  $\mu\text{g/L}$  终浓度的 IGF-1 重组蛋白(Abcam 公司,英国)刺激,对照组加入等体积无菌水,12 h 后收取细胞样品。

### 1.4 细胞转染

用 lipofectemine<sup>TM</sup> 2000(Life technologies 公司,美国)进行 miR-133b 模拟体(mimics)和抑制剂(inhibitor)转染,实验分组为 mimics NC、mimics、inhibitor NC、inhibitor,转染片段(上海吉玛生物制药公司)序列信息见表 1。步骤如下:取 5  $\mu\text{L}$  转染片段加入 250  $\mu\text{L}$  opti-MEM(Life technologies 公司,美国)中混匀(mix1 溶液);取 5  $\mu\text{L}$  lipofectemine 2000 加入 250  $\mu\text{L}$  opti-MEM 中混匀(mix2 溶液);取 250  $\mu\text{L}$  mix1 溶液与 250  $\mu\text{L}$  mix2 溶液轻轻混匀(mix3 溶液),室温静置 5 min;每孔加入 500  $\mu\text{L}$  mix3 溶液,500  $\mu\text{L}$  DMEM 基础培养液,终体积为 1 mL;转染

表 1 大鼠 miR-133b 的 mimics 和 inhibitor 序列以及对照片段

Tab.1 Sequence of rno-miR-133b mimics, inhibitor and their NC fragment

片段	序列
mimics NC	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
mo-miR-133b	正义链 5'-UUUGUCCCUUCAACCAGCUA-3'
	反义链 5'-GCUGGUUGAAGGGACCAAUU-3'
mimics	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
inhibitor NC	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
mo-miR-133b	正义链 5'-UUUGUCCCUUCAACCAGCUA-3'
	反义链 5'-GCUGGUUGAAGGGACCAAUU-3'
inhibitor	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

6~8 h 后补加完全培养液,总转染时间为 24 h。

### 1.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)

**1.5.1 细胞总 RNA 抽提** 采用 TRIzol 法,用分光光度计测提取的 RNA 含量,OD A260/A280 值在 1.7~2.0 之间。

**1.5.2 miRNA 逆转录与 Real-time PCR** 根据 miRNAs RT-PCR 试剂盒说明书(上海吉玛生物制药公司)进行。U6 作为内参。① 逆转录。20  $\mu\text{L}$  反应体系:5  $\times$  反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 0.75  $\mu\text{L}$ , miRNA/U6 逆转录引物 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.2  $\mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂 (40 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , MMLV 逆转录酶 (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 1~3  $\mu\text{g}$ , 加无 RNA 酶水至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序:25  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min; 42  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min; 85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。② Real-time PCR。20  $\mu\text{L}$  反应体系:2  $\times$  Real-time PCR 混合液 10  $\mu\text{L}$ , miRNA/U6 特异性引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , miRNA/U6 逆转录产物 2  $\mu\text{L}$ , 加无菌水至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、12 s; 62  $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 40 个循环。

**1.2.3 mRNA 逆转录与 Real-time PCR** ① 逆转录。20  $\mu\text{L}$  反应体系:RNA 模板 0.1~5  $\mu\text{g}$ , Oligo (dT)<sub>18</sub> 引物 1  $\mu\text{L}$ , 加无 RNA 酶水至 12  $\mu\text{L}$ 。混好后 65  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 取出置于冰上, 加入 5  $\times$  反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂 (20 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , MMLV 逆转录酶 (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 。反应程序:42  $^{\circ}\text{C}$ 、60 min; 70  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。② Real-time PCR。引物序列信息见表 2(生工生物工程有限公司合成)。引物退火温度根据 Tm 值设定。20  $\mu\text{L}$  反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu\text{L}$ , 前引物 0.4  $\mu\text{L}$ , 后引物 0.4  $\mu\text{L}$ , mRNA 逆转录产物 2  $\mu\text{L}$ , 加无菌水至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 62  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 40 个循环。

表 2 大鼠 Ptpb1、Ndr1 和 GAPDH 的引物序列

Tab.2 Sequences of primers for rat Ptpb1, Ndr1 and GAPDH

基因	引物序列
Ptpb1	正义链 5'-GACTACACACGCCCTGACCT-3'
	反义链 5'-GCATACGGAGAGGCTGACAT-3'
Ndr1	正义链 5'-TGTGAATCCCTGTGCTGAAG-3'
	反义链 5'-TGCTGTGTATCTCCTCCTTGC-3'
GAPDH	正义链 5'-CAAGTTCACGGCAGAGTCAA-3'
	反义链 5'-CGCCAGTAGACTCCACGACA-3'

## 1.6 蛋白免疫印迹 (Western blotting)

用 2 × 蛋白上样缓冲液提取细胞蛋白样品,沸水浴 10 min;配制 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶,上样,100 V 恒压跑电泳。一抗稀释比例为: Ptp1 (1: 1 000, Proteintech 公司, 美国), Ndr1 (1: 500, Cell Signaling Technology 公司, 美国), GAPDH (1: 1 000, Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国), 4 °C 孵育过夜;敷碱性磷酸酶 (AP) 标记的二抗 (北京中杉生物技术公司, 1: 1 000), 室温孵育 2 h;加入新鲜配制的 NBT/BCIP 显色液 (KPL 公司, 美国), 避光显色;扫描后用软件 Quantity One 进行图像灰度分析。

## 1.7 EdU 流式检测细胞增殖

根据 Click-iT® Plus EdU 细胞增殖流式分析试剂盒说明书 (Life Technologies 公司, 美国) 进行。转染 VSMCs 24 h 后,在培养液中加入 EdU (终浓度 10 μmol/L), 孵育 3 h。结束后,消化细胞至 EP 管,加入 100 μL Click-iT® 固定液避光室温孵育 15 min, 100 μL 1 × Click-iT® 透膜和清洗液孵育 15 min;按照说明书配制 Click-iT® Plus 反应混合物,加入 500 μL/孔 Click-iT® Plus 反应混合物至 EP 管,避光室温孵育 30 min;最后吸入试管,流式检测。

## 1.8 miRs 靶基因预测

通过 miRanda、miRDB、miRWalk、PITA 和 TargetScan 网站进行靶基因预测。

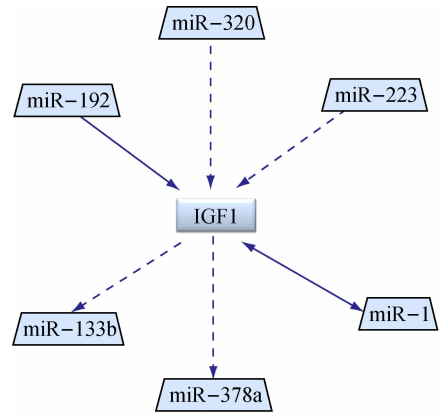
## 1.9 数据分析

所有实验至少独立重复 3 次。各组间实验数据以均值 + 标准差的形式表示。两组数据间的差异采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有显著性, $P < 0.01$  表示差异具有高度显著性。

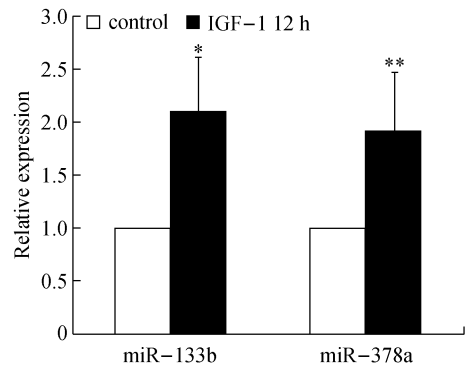
# 2 结果

## 2.1 静态条件下 IGF-1 刺激 VSMCs 后 miR-133b 和 miR-378a 表达变化

应用 IPA 软件预测与 IGF-1 相关的 miRs,并选择可能受 IGF-1 调控的 miR-133b 和 miR-378a 进行研究 [见图 1(a)]。静态条件下,IGF-1 刺激 VSMCs 12 h 后,Real-time PCR 检测 VSMCs 的 miR-133b 和 miR-378a 表达变化。结果显示,静态条件下 IGF-1 刺激 VSMCs 12 h 后,其 miR-133b 和 miR-378a 的表达显著升高,说明 miR-133b 和 miR-378a 是受 IGF-1 调控的下游 miRs [见图 1(b)]。



(a) IPA 分析得到的与 IGF-1 相关的 miRs



(b) IGF-1 促进 VSMCs 的 miR-133b 和 miR-378a 表达

图 1 IGF-1 对 VSMCs 的 miR-133b 和 miR-378a 表达的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 1 Influence of IGF-1 on expression of miR-133b and miR-378a in VSMCs (a) IGF-1 related-miRs by IPA analysis, (b) IGF promoted the expression of miR miR-133b and miR-378a in VSMCs

## 2.2 LowSS 条件下联合培养的 miR-133b 和 miR-378a 表达变化

为了验证 miR-133b 和 miR-378a 是否参与力学条件下 ECs 对 VSMCs 功能的调控,应用平行平板流动腔系统对与 VSMCs 联合培养的 ECs 施加流体切应力,分为 NSS 组和 LowSS 组,加载时间均为 12 h。然后,Real-time PCR 检测联合培养的 VSMCs 的 miR-133b 和 miR-378a 表达变化。结果显示,与 NSS 组相比,LowSS 组 VSMCs 的 miR-133b 表达显著升高,miR-378a 表达无显著变化,说明 miR-133b 参与 LowSS 诱导的 IGF-1 对 VSMCs 功能的调控 (见图 2)。

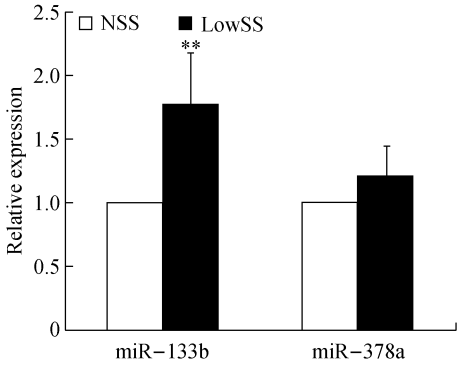
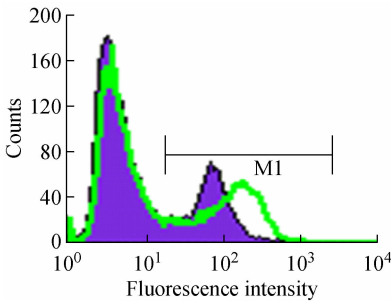


图2 LowSS对联合培养VSMCs的miR-133b和miR-378a表达的影响(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

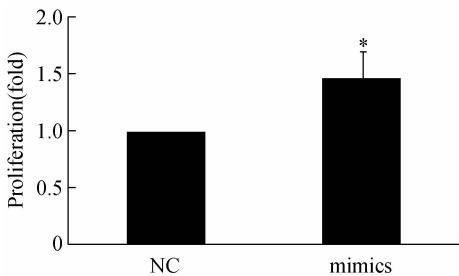
Fig. 2 Influence of LowSS on expression of miR-133b and miR-378a in co-cultured VSMCs

### 2.3 miR-133b对VSMCs增殖的影响

为了研究miR-133b是否参与调控VSMCs增殖,在静态条件下,用miR-133b mimics及其对照片段转染VSMCs 24 h后,EdU流式分析检测VSMCs增殖能力变化[见图3(a)]。结果显示,与对照组相比,转染miR-133b mimics组的VSMCs增殖能力显著升高,说明miR-133b能够促进VSMCs的增殖[见图3(b)]。



(a) 流式检测图(蓝色为NC组,绿色为mimics组)



(b) miR-133b mimics促进VSMCs增殖

图3 转染miR-133b mimics对VSMCs增殖的影响(\* $P < 0.05$ )

Fig. 3 Influence of miR-133b mimics on proliferation of the co-cultured VSMCs (a) Flow chart, (b) miR-133b promoted proliferation of VSMCs

### 2.4 miR-133b靶基因的预测

通过miRanda、miRDB、miRWalk、PITA和TargetScan等5个miRs预测网站,预测rno-miR-133b的下游靶基因。选择5个网站共有的50个靶基因进行分析,得到与细胞增殖相关的文献报道较少且排名靠前的5个预测靶基因,包括Ptpb1、蛋白磷酸酶2催化亚基 $\alpha$ 同工酶(protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme, Ppp2ca)、血管紧张素原(angiotensinogen, Agt)、Ndrgr1和岩藻糖基转移酶4(fucosyltransferase 4, Fut4)进行进一步研究(见图4)。

MicroRNA	Gene	miRanda	miRDB	miRWalk	PITA	TargetScan	SNP
rno-miR-133b	Dhrs8	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Tlsm17a	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Ptpb1	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Cltc	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Gpna	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Glxr2	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Ppp2cb	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Agt	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Whsc2	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Cdkk	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Ynf54	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Ndrgr1	1	1	1	1	1	5
rno-miR-133b	Dncl12	1	0	1	1	1	4
rno-miR-133b	Fut4	1	0	1	1	1	4
rno-miR-133b	Trip26	1	0	1	1	1	4
rno-miR-133b	Gpca1	1	0	1	1	1	4
rno-miR-133b	Ppp2ca	1	1	1	0	1	4
rno-miR-133b	Slc2a2	1	0	1	1	1	4

图4 miRanda、miRDB、miRWalk、PITA和TargetScan网站预测与miR-133b有关的靶基因

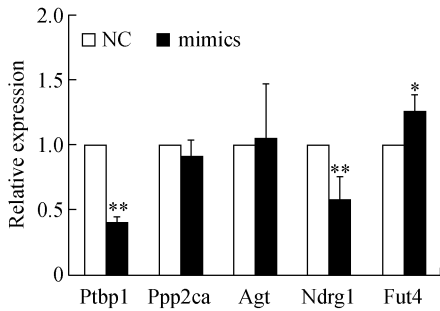
Fig. 4 Target genes of miR-133b predicted by miRanda, miRDB, miRWalk, PITA and TargetScan.

### 2.5 miR-133b预测靶基因的验证

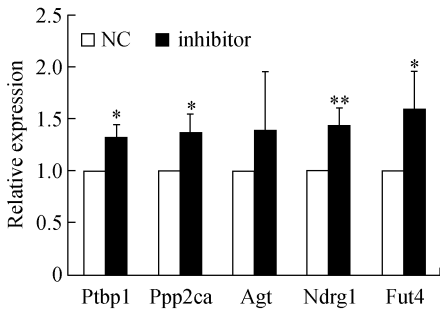
用miR-133b mimics和inhibitor及各自的对照片段转染VSMCs 24 h后,Real-time PCR检测VSMCs的Ptpb1、Ppp2ca、Agt、Ndrgr1和Fut4基因的表达变化。结果显示,转染miR-133b mimics上调miR-133b的表达,Ptpb1和Ndrgr1的表达显著下降,Ppp2ca、Agt表达无明显变化,Fut4的表达显著上升[见图5(a)];转染miR-133b inhibitor下调miR-133b的表达,Ptpb1、Ppp2ca、Ndrgr1和Fut4的表达显著上升,Agt表达无明显变化[见图5(b)],说明根据miRs与靶基因负调控的关系,Ptpb1和Ndrgr1可能为miR-133b的靶基因。

### 2.6 miR-133b mimics对Ptpb1和Ndrgr1蛋白表达的影响

为了进一步确认Ptpb1和Ndrgr1是否为miR-133b的靶基因,利用miR-133b mimics及其对照



(a) 转染 miR-133b mimics



(b) 转染 miR-133b inhibitor

图5 转染 miR-133b mimics 和 inhibitor 对预测靶基因 mRNA 的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 5 Influence of miR-133b mimics and inhibitor transfection on the expression of putative targets (a) miR-133b mimics transfection, (b) Inhibitor transfection

片段转染 VSMCs 24 h 后, Western blotting 检测 Ptpb1 和 Ndrgl 的蛋白表达变化。结果显示, 转染 miR-133b mimics 上调 miR-133b 的表达, 同时, Ptpb1 和 Ndrgl 的蛋白表达水平显著降低, 说明 Ptpb1 和 Ndrgl 为 miR-133b 的靶基因(见图 6)。

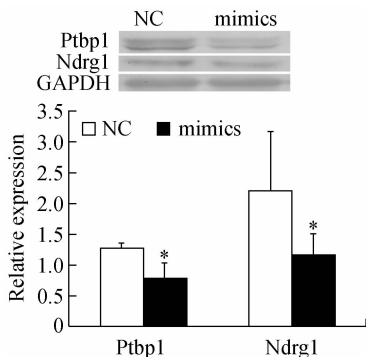


图6 转染 miR-133b mimics 抑制 VSMCs 的 Ptpb1 和 Ndrgl 表达 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 6 miR-133b mimics depressed the expression of Ptpb1 and Ndrgl in VSMCs

### 3 讨论

血流动力学因素是改变血管稳态、诱导血管重建、促使动脉粥样硬化发生的重要因素。ECs 和 VSMCs 是血管壁的主要组成细胞, 在功能上相互影响, 以维持血管结构和功能的稳定。ECs 可视为力学因素与 VSMCs 之间的中介之一, 随着力学环境的改变, ECs 和 VSMCs 之间的相互作用也会相应地变化, 从而影响血管壁的结构和功能, 最终导致血管重建。

本课题组前期研究发现, ECs 感受切应力变化, 将力学信号转导为胞内信号, LowSS 条件下 ECs 感受 LowSS 刺激, 分泌 PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 等生长因子, 进而促进 ECs、VSMCs 的增殖和迁移<sup>[4]</sup>。ECs 感受 LowSS 刺激后, 其 IGF-1 表达显著高于 NSS 条件, ECs 高表达的 IGF-1 促进了联合培养 VSMCs 增殖<sup>[16]</sup>。这些研究表明, 在力学条件下, ECs 与 VSMCs 之间存在信息交流, ECs 响应 LowSS 的刺激, 释放某种生长因子, 通过旁分泌途径作用于 VSMCs, 进而引起细胞功能的改变及血管重建。IGF 相关信号转导网络在调控 ECs 和 VSMCs 的功能过程中发挥十分重要的作用。动脉 VSMCs 作为 IGF 的靶器官存在着多种 IGF 受体, 在感受 IGF 刺激后能够激活多种细胞内信号转导网络<sup>[17-18]</sup>。在血管损伤中去分化的 VSMCs, IGF 通过与膜受体结合后引起其构象发生改变, 结合一系列与 Ras 激活相关的蛋白, Ras 被激活后进而以磷酸化的方式激活 MAPK/ERK 信号通路, 导致细胞增殖和迁移<sup>[19-20]</sup>。IGF 还可以通过 PI3K/Akt 信号通路激活内皮一氧化氮合酶(eNOS)的活性, 使 NO 生成增加, NO 刺激血管舒张, 阻止血小板凝集, 确保 ECs 处于稳态, 并抑制 VSMCs 生长, 起到抗动脉粥样硬化的作用<sup>[21-22]</sup>。阻断 PI3K 信号通路, 可以调控 IGF 刺激的 ECs 迁移, 但阻断 MAPK 信号通路却没有这种效应<sup>[23]</sup>。然而, IGF-1 作为一种重要的力学响应因子参与 LowSS 对细胞信息交流及细胞功能的调控, 其作用机制并不十分清楚。

本文研究基于 ECs 感受 LowSS 刺激后, 其 IGF-1 表达显著高于 NSS 的结果, 在 miRs 层面进一步探讨 LowSS 条件下 IGF-1 对细胞功能的影响。通过 IPA 预测了受 IGF-1 调控的 miRs, 并关注了 miR-133b 和 miR-378a。miR-133b 在癌症中的调控

机制已有众多报道,miR-133b 可以调控癌细胞的增殖、迁移、凋亡等。如在胃癌中 miR-133b 通过抑制一种促进细胞活性和癌细胞转移的靶基因 FSCN1,抑制胃癌的发生<sup>[24]</sup>。miR-133b 通过抑制 Bcl-w 和 Akt1 的表达抑制膀胱癌细胞的增殖和凋亡<sup>[25]</sup>。在其他疾病中,miR-133b 可以抑制其靶基因 TAGLN2 的表达促进卵母细胞的成熟,为不孕不育的治疗提供潜在靶标<sup>[26]</sup>。miR-378 在多种细胞中具有重要的调控功能。有研究发现,miR-378 以 IGF-1 受体为靶基因促进了心肌细胞的凋亡<sup>[27]</sup>。本研究通过静态条件下 IGF-1 刺激 VSMCs 实验发现,IGF-1 可以上调 mir-133b、miR-378a 的表达,证实 IGF-1 与 miR-133b 和 miR-378a 存在调控关系。

在力学条件下,miR-133b 与 miR-378a 在 ECs 和 VSMCs 之间的相互交流中的作用鲜有报道,并且其对 VSMCs 的功能影响也不清楚。本研究通过细胞联合培养的平行平板流动腔切应力加载系统发现,miR-133b 参与 LowSS 诱导的 IGF-1 对联合培养 VSMCs 增殖的调控,而 LowSS 对 miR-378a 表达无显著影响,表明 miR-378a 可能不参与 LowSS 对 VSMCs 功能的调控。miR-133b 的靶基因 Ndr1 在细胞中含量非常丰富,能够响应多种信号如 DNA 损伤<sup>[28]</sup>、组织缺氧<sup>[29]</sup>等。Ptp1 是与 RNA 代谢相关的蛋白,可参与 RNA 选择性剪切及蛋白质降解等过程<sup>[30-31]</sup>。它们与细胞功能关系十分密切。如在 U87 MG 神经胶质瘤细胞中,过表达 Ndr1 可以抑制细胞增殖和迁移,并诱导其凋亡;在体内实验中,U87 MG 神经胶质瘤细胞的 Ndr1 的过表达可减弱其致癌性<sup>[32]</sup>。在卵巢癌中 Ptp1 通过调控 CDC42 的选择性剪切促进肿瘤发生,CDC42 可被选择性剪切为 CDC42-v1、CDC42-v2,并且 CDC42-v2 有抑癌作用<sup>[33]</sup>。

本课题组应用 Real-time PCR 及细胞转染技术,验证 miR-133b 以 Ptp1 和 Ndr1 为靶蛋白调控了 LowSS 诱导的联合培养 VSMCs 增殖。然而,深入探讨 miR-133b 在 LowSS 条件下对 VSMCs 功能的影响仍需要后续的一些实验。例如:是否有与 miR-133b 相关的转录因子参与到此调控机制中;miR-133b 在 LowSS 条件下对 VSMCs 功能的影响,除增殖外是否还有其他功能的影响(如迁移、凋亡、分化等);Ptp1 和 Ndr1 对 VSMCs 功能的影响等,这些都是有意义

的可进一步研究的科学问题。本文研究结果为 LowSS 诱导与 ECs 联合培养 VSMCs 增殖的力学生物学机制增添了一个新的实验证据。

## 参考文献:

- [1] CHEN KD, LI YS, KIM M, *et al.* Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (26): 18393-18400.
- [2] JALALI S, DEL POZO MA, CHEN K, *et al.* Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific ECM ligands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3): 1042-1046.
- [3] CHIU JJ, USAMI S, CHIEN S. Vascular endothelial responses to altered shear stress; Pathologic implications for atherosclerosis [J]. *Ann Med*, 2009, 41(1): 19-28.
- [4] QI YX, JIANG J, JIANG XH, *et al.* PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [5] 任长辉, 刘肖, 康红燕, 等. 剪切力条件下血管内皮细胞与平滑肌细胞的相互作用[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(2): 185-191.
- [6] REN CH, LIU X, KANG HY, *et al.* Interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(2): 185-191.
- [7] GUO H, INGOLIA NT, WEISSMAN JS, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 835-840.
- [8] NAZARI-JAHANTIGH M, EGEE V, SCHOBBER A, *et al.* MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt A): 35-41.
- [9] HERGENREIDER E, HEYDT S, TRÉGUER K, *et al.* Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3): 249-256.
- [10] 沈宝荣, 姚庆苹, 吴广亮, 等. 在高血压动脉重建中 microRNA-21 对血管平滑肌细胞外基质表达的调控作用 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 1-7.
- [11] SHEN BR, YAO QP, WU GL, *et al.* Regulating effect of microRNA-21 on the expression of extracellular matrix of vascular smooth muscle cells under vascular remodeling of hypertension [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 1-7.
- [12] MARIN T, GONGOL B, CHEN Z, *et al.* Mechanosensitive microRNAs-role in endothelial responses to shear stress and redox state [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64: 61-68.

- [11] CHENG BB, QU MJ, WU LL, *et al.* MicroRNA-34a targets Forkhead box  $\beta 2$  to modulate differentiation of endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74: 4-12.
- [12] 王聪聪,姚庆莘,马英英,等. microRNA-34a 在低切应力诱导血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(4): 339-345.
- WANG CC, YAO QP, MA YY, *et al.* The role of microRNA-34a in low shear stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(4): 339-345.
- [13] HU B, SONG JT, QU HY, *et al.* Mechanical stretch suppresses microRNA-145 expression by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and upregulating angiotensin-converting enzyme to alter vascular smooth muscle cell phenotype [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96338.
- [14] NI CW, QIU H, JO H. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(5): H1762-1769.
- [15] BACH L A. Endothelial cells and the IGF system [J]. *J Mol Endocrinol*, 2015, 54(1): R1-13.
- [16] WANG L, HAN Y, SHEN Y, *et al.* Endothelial insulin-like growth factor-1 modulates proliferation and phenotype of smooth muscle cells induced by low shear stress [J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(4): 776-786.
- [17] VINTERS HV, BERLINER JA. The blood vessel wall as an insulin target tissue [J]. *Diabete Metab*, 1987, 13(3): 294-300.
- [18] ZECCHIN HG, BESERRA RMN, CARVALHEIRA JBC, *et al.* Insulin signaling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance—The obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats [J]. *Diabetologia*, 2003, 46(4): 479-491.
- [19] SCHULMAN IH, ZHOU MS. Vascular insulin resistance: A potential link between cardiovascular and metabolic diseases [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2009, 11(1): 48-55.
- [20] HAYASHI K, SHIBATA K, MORITA T, *et al.* Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(39): 40807-40818.
- [21] HERMANN C, ASSMUS B, URBICH C, *et al.* Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2): 402-409.
- [22] KUBOKI K, JIANG ZY, TAKAHARA N, *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo*: A specific vascular action of insulin [J]. *Circulation*, 2000, 101(6): 676-681.
- [23] LIU W, LIU Y, LOWE JR WL. The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(55): 1710-1719.
- [24] GUO L, BAI H, ZOU D, *et al.* The role of microRNA-133b and its target gene FSCN1 in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 99.
- [25] CHEN XN, WANG KF, XU ZQ, *et al.* MiR-133b regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis by targeting Bcl-w and Akt1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14: 70.
- [26] XIAO G, XIA C, YANG J, *et al.* MiR-133b regulates the expression of the actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation: A potential target for infertility therapy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100751.
- [27] KNEZEVIC I, PATEL A, SUNDARESAN NR, *et al.* A novel cardiomyocyte-enriched microRNA, miR-378, targets insulin-like growth factor 1 receptor: Implications in postnatal cardiac remodeling and cell survival [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(16): 12913-12926.
- [28] KURDISTANI SK, ARIZTI P, REIMER CL, *et al.* Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19): 4439-4444.
- [29] SALNIKOW K, SU W, BLAGOSKLONNY MV, *et al.* Metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3375-3378.
- [30] DAVID CJ, CHEN M, ASSANAH M, *et al.* HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 364-368.
- [31] TAKAHASHI H, NISHIMURA J, KAGAWA Y, *et al.* Significance of polypyrimidine tract-binding protein 1 expression in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(7): 1705-1716.
- [32] MA W, NA M, TANG C, *et al.* Overexpression of N-myc downstream-regulated gene 1 inhibits human glioma proliferation and invasion via phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1050-1058.
- [33] HE X, YUAN C, YANG J. Regulation and functional significance of CDC42 alternative splicing in ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29651-29663.