

文章编号:1004-7220(2019)01-0069-08

microRNA-214-3p 在周期性张应变诱导内皮祖细胞分化和增殖中的作用

李娜, 汪文斌, 阎靖, 齐颖新, 韩悦
(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 探讨 microRNA-214-3p (miR-214-3p) 在周期性张应变诱导内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 分化和增殖中的作用。方法 采用 FX-5000T 细胞周期性张应变加载装置对 EPCs 施加生理水平的周期性张应变 (5% 幅度, 1.25 Hz 频率), 加载时间 24 h。应用 miRNAs 芯片筛选周期性张应变调控下差异表达的 miRNAs, 并挑选 miR-214-3p 进行深入研究。实时荧光定量 PCR 方法检测 EPCs 内平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 相标志分子的表达, BrdU 结合酶联免疫吸附 ELISA 法检测 EPCs 增殖功能。之后, 使用 miR-214-3p 抑制剂抑制 miR-214-3p 的表达, 检测 EPC 内 VSMC 相标志分子表达及 EPCs 增殖。结果 周期性张应变显著抑制 miR-214-3p 表达, 并抑制 EPCs 向 VSMC 相分化, 同时显著促进 EPCs 增殖。在静态条件下, 使用 miR-214-3p 抑制剂干扰 miR-214-3p 的表达, miR-214-3p 水平下降同样会抑制 EPCs 向 VSMC 相分化, 并且诱导 EPCs 增殖能力显著上升。结论 生理水平的周期性张应变能够抑制 EPCs 内 miR-214-3p 表达, 从而抑制 EPCs 向 VSMC 相分化, 并且促进 EPCs 增殖。研究结果为血管损伤的治疗提供新的治疗靶点。

关键词: 周期性张应变; 内皮祖细胞; 细胞增殖; 细胞分化

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.01.011

The Role of MicroRNA-214-3p in Differentiation and Proliferation of Endothelial Progenitor Cells in Response to Cyclic Stretch

LI Na, WANG Wenbin, YAN Jing, QI Yingxin, HAN Yue

(Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective To investigate the role of microRNA-214-3p (miR-214-3p) in differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) induced by cyclic stretch. **Methods** EPCs were exposed to cyclic stretch at physiological level (with the magnitude of 5%, at a constant frequency of 1.25 Hz) for 24 h by FX-5000T Strain Unit. miRNAs array was performed to identify the expression profiling of miRNAs. Real-time PCR was used to examine the expression levels of miRs. The expression of vascular smooth muscle cells (VSMCs) markers in EPCs was detected by real-time PCR. EPC proliferation was detected by BrdU ELISA assay. After EPCs were transfected with miR-214-3p inhibitor (IN) to knockdown expression of miR-214-3p, the level of VSMC markers expression and EPC proliferation was detected. **Results** Cyclic stretch significantly decreased miR-214-3p expression, depressed EPC differentiation toward VSMCs, and increased EPCs proliferation. Similarly,

收稿日期:2018-04-16; 修回日期:2018-07-05

基金项目:国家自然科学基金项目(11572198, 11625209, 11572199)

通信作者:韩悦, 副研究员, E-mail: hanyue625@sjtu.edu.cn

transfection with the miR-214-3p inhibitor led to the decreased expression of VSMC markers under static station. Meanwhile, miR-214-3p down-regulation promoted EPC proliferation significantly. **Conclusions** Physiological cyclic stretch could down-regulate the expression of miR-214-3p in EPCs, depress EPC differentiation towards VSMC and promote EPC proliferation eventually. Therefore, the research findings provide a potential therapeutic strategy for treating vessel injuries.

Key words: cyclic stretch; endothelial progenitor cells; cell proliferation; cell differentiation

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一类具有自我更新和定向分化能力的前体细胞,亦称成血管细胞,在内源性组织修复、损伤内膜修复以及血管再生过程中起重要作用^[1]。EPCs 主要存在于骨髓和外周血中,脐带血、脂肪组织、脾脏、心肌、及骨骼肌等也有少量 EPCs^[2]。在生理状态下,它们在骨髓中处于休眠状态,当内皮功能发生障碍、血管损伤或烧伤等情况发生时,EPCs 被激活,活化的细胞由骨髓动员到外周血中进入循环系统,并趋化归巢至损伤区域定向分化为成熟内皮细胞(endothelial cells, ECs),取代损伤 ECs,进而内源性修复、抑制内膜异常增生并参与新生血管的形成,保持血管完整性^[3-4]。目前研究表明,EPCs 与人类心血管疾病密切相关,如循环 EPCs 的数量减少会诱导多种相关危险因素,如高血压、糖尿病等^[5-7]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)位于血管中膜层,VSMCs 的异常增生与动脉粥样硬化斑块形成等密切相关^[8],一旦血管内膜受损严重,黏附在血管壁损伤部位的 EPCs 因局部血流产生的力学环境发生变化,导致了 EPCs 向 VSMC 相分化,在内膜层堆积增厚,使血管处于病理状态^[9]。因此,抑制 EPCs 向 VSMC 相分化,对抑制血管新生内膜增厚至关重要。通过移植 EPCs,使 EPCs 动员、归巢到受损区域,定向分化为成熟 ECs,同时抑制其向 VSMC 相分化,修复血管内皮,促进局部血管新生,从而治疗心血管相关疾病。

MicroRNAs(miRNAs, miRs)是一类长为 20~24 个核苷酸,并可参与转录后水平调节基因表达的非编码单链 RNA 分子,成熟后的 miRNAs 能通过特异性结合同源信使 RNAs(mRNAs)的 3' 非编码区域(3' untranslated region,3' UTR),从而使靶 mRNA 降解或抑制其蛋白质的翻译,最终调控多个靶基因表达^[10-12]。目前越来越多的证据表明,miRNAs 在心血管疾病的发生发展过程中也扮演了重要的角色。

低切应力条件下的 ECs 分泌 IGF-1,调控联合培养 VSMCs 的 miR-133b 及其靶基因,对 VSMCs 的增殖产生影响^[13]。有报道称多种 miRNAs 参与 EPC 增殖、分化和血管生成等过程,是一种重要的调控因子,例如 miR-19a、miR-452 和 miR-107 等^[14-16]。在 miRNAs 参与新血管形成和修复损伤血管的过程中,力学因素起着重要作用^[17]。周期性张应变促进 VSMCs 分泌 miR-27a,从而调控 ECs 增殖^[18]。层流切应力能够诱导 miR-126 水平,通过上调或下调多种基因水平,对动脉粥样硬化产生影响^[19]。层流切应力诱导 miR-34a 水平升高促进 EPCs 向 ECs 分化^[20]。上述结果提示,研究力学响应的 miRNAs 在心血管疾病中的作用,对寻找有效的治疗手段有重要意义。

目前的研究主要关注切应力对 EPC 功能的影响,而周期性张应变同样是 EPCs 参与修复血管内膜的重要力学因素。当内膜受损后,骨髓中储藏的 EPCs 归巢至损伤区域,黏附在血管壁上,受到血流脉动产生的周期性张应变的刺激,使 EPCs 功能发生变化,对保持血管完整性和抑制内膜过度增生发挥了重要作用。然而,目前周期性张应变对 EPCs 功能的调控及其参与的分子机制仍不清楚。本文主要探讨周期性张应变对 EPC 分化功能的影响,利用周期性张应变加载装置,对 EPCs 施加生理性周期性张应变(幅度 5%、频率 1.25 Hz),研究其对 EPCs 增殖及分化的影响。通过 miRNAs 芯片筛选出受周期性张应变调控的 miRs,并探讨 miR-214-3p 对 EPCs 增殖和分化这一过程的作用,提示生理水平的周期性张应变对损伤血管修复具有重要作用,为寻找血管内皮修复的重要分子及相关调节机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 EPCs 分离及原代培养

EPCs 分离自 180~220 g 雄性 Sprague-Dawley

(SD)大鼠的股骨和胫骨骨髓^[21];在超净工作台,将骨浸于含有抗生素的冰 PBS 中,剔除其周围的肌肉和组织,切断股骨和胫骨连接的关节处,用 PBS 将骨髓冲洗出。通过密度梯度离心法,使用淋巴细胞分离液(Histopaque-1083, Sigma 公司,美国)分离出骨髓中的单核细胞(白膜层),加入含有胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子-B、表皮生长因子、皮质醇、r3 胰岛素样生长因子-1(r3-insulin-like growth factor-1, R3-IGF-1)、维生素 C、庆大霉素、两性霉素-B(amphotericin B)的 ECs 培养液(endothelial cell growth medium-2, EGM-2, Lonza 公司,美国)中,重悬细胞培养到 0.1% 明胶包被的 6 孔板中。再将 6 孔板放入 5% CO₂、37 °C 培养箱中,4 d 之后,弃去未附着的细胞,换入新鲜的培养液,之后每 3 d 更换 1 次培养液,培养贴壁细胞。

1.2 EPC 鉴定

使用经典方式鉴定 EPCs^[22]。贴壁的细胞培养 8 d 之后,与乙酰低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL, Molecular Probes 公司,美国)孵育 4 h 后,加入 4% 多聚甲醛固定,加 10 μg/mL 荆豆凝集素(FITC-UEA-lectin, Sigma 公司,美国)培养,使用荧光倒置显微镜(IX-71, Olympus 公司,日本)观察,呈双阳性则是正在分化的 EPCs。

1.3 周期性张应变加载

使用 FX-5000T 细胞周期性张应变加载装置(Flexcell 公司,美国),对体外培养的细胞施加周期性张应变,模拟体内动脉血管细胞受到的力学刺激。其基本工作原理为:细胞种在硅胶膜制成的柔性 6 孔 Flexcell 细胞板中,置于 Flexcell 真空基板上,构造一个封闭空间,使用计算机设置真空阀开闭的频率和幅度等参数,使真空进行抽吸进而使 6 孔板底部的柔性硅胶膜产生形变,对种植在膜上的 EPCs 施加一定的周期性张应变^[23-24]。

张应变加载条件:将同步化处理后的 EPCs 的 Flexcell 板放置于真空的基座上,使橡胶条造成全封闭的环境,应用 FX-5000T 周期性张应变加载装置对 EPCs 进行牵拉,按照下列力学加载参数:①模拟动脉应力条件,幅度为 5%,②频率为 1.25 Hz,③加载时间为 24 h。对照组为相同培养条件但没有施

加张应变的 EPCs。

1.4 miRNA inhibitor 转染

miR-214-3p inhibitors(IN)由上海吉玛公司设计并合成的,序列信息如下:mo-miR-214-3p 抑制剂序列由 5'-3'为 CUGCCUGUCUGUGCCUGCUGU;对照组片段序列由 5'-3'为 CAGUACUUUUGU-GUAGUACAA。

miRNA 干粉经高速离心之后,轻轻打开管盖,加入所需体积的 DEPC 水,配成终浓度为 20 mol/L 溶液,分装保存防止多次冻融。

种在 6 孔板中的细胞生长密度为 70%~80% 时进行转染,取 Lipofectamine™ 2000 和 opti-MEM 按 1:50 混匀,同样地,转染片段和 opti-MEM 按 1:50 混匀,将上述两种混合液室温静置 5 min 后等比例混匀,室温静置 15 min。用无血清 M199 基础培养液洗两次细胞,加入 500 μL M199 基础培养液和 500 μL 混合液,配制成浓度为 100 nmol/L 的混合液,轻柔混匀,放置在 5% CO₂、37 °C 培养箱中,转染 8 h 后补充 1 mL 完全培养液,共转染 24 h 后收样。

1.5 实时 qPCR

使用 TRIzol 提细胞总 RNA。分光光度计检测 RNA 样品的纯度和浓度。实验过程中使用的 EP 管及枪头均无 RNA 酶,以防 RNA 降解。

1.5.1 mRNA 逆转录及实时 PCR 冰上操作,20 μL 逆转录反应体系需要的试剂有:RNA 样品加入 1 μL Oligo(dT)₁₈ primer,补 DEPC 水至 12 μL,65 °C,5 min,5×反应缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTP 混合物 2 μL,RevertAid M-MuLV 逆转录酶(200 U/μL)1 μL,RNA 酶抑制剂(20 U/μL)1 μL;42 °C 孵育 60 min;70 °C 孵育 5 min;后将样品放置在冰上。cDNA 放入 -20 °C 保存。内参为 GAPDH。实时 PCR 的反应程序如下:95 °C,30 s;95 °C,5 s;60 °C,45 s。

1.5.2 miRNA 逆转录及实时 PCR 冰上操作,计算所得 RNA 体积加 20 μL 逆转录反应体系所需要的试剂:5×反应缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTP 混合物 0.75 μL,RNA 酶抑制剂(20 U/μL)0.25 μL,RevertAid M-MuLV 逆转录酶(200 U/μL)0.2 μL,miRNA 逆转录酶引物(1 μmol/L)1.2 μL,U6 逆转录酶引物(1 μmol/L)1.2 μL,混匀,25 °C 孵育 30 min;42 °C 孵育 30 min;85 °C 孵育 5 min,所得

cDNA 放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。内参为 U6。实时 PCR 反应程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 s。配制反应体系的所有操作均在冰上进行,每个反应体系有 3 个复孔。扩增产物通过溶解曲线来判断其特异性,各基因相对表达量对照各自内参通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算得到。

1.6 BrdU ELISA 检测细胞增殖

细胞准备:将选取好的细胞接种于 6 孔板中,密度为 $1.5\times 10^5/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养,分别施加周期性张应变和 miR-214-3p 抑制剂干扰,在培养结束之前 8 h,将溴脱氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 按照 1:1 000 比例稀释(终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 孵育细胞,之后将细胞按密度 $1\times 10^4/\text{孔}$ 种于 96 孔板中,8~10 h 后吸干培养液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。

ELISA 方法:① 加入 FixDenat 溶液, $200\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,室温固定 30 min;② 弃固定液,将 anti-BrdU 用 anti-BrdU-POD 溶液按照 1:100 稀释, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,室温 90 min;③ 弃去抗 BrdU-POD 溶液,PBS 洗酶标板, $200\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,洗 3 次;④ 加入底物溶液, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,避光显色,当溶液变蓝时加入 $1\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, $25\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$;⑤ 放入酶标仪检测吸光值(吸收波长 450 nm ,参考波长 630 nm)。

1.7 统计学方法

所有实验独立重复至少 3 次。每组实验数据均由均数 \pm 标准差形式表示。两组数据之间差异采用 t 检验,数据用 one-way ANOVA 分析是否有显著性差异。 $P<0.05$ 表示组间具有显著性差异。

2 结果

2.1 双荧光标记法鉴定 EPCs

SD 大鼠骨髓分离出的 EPCs 定向诱导培养至第 8 d,使用双荧光标记法鉴定 EPCs。结果表明,EPCs 开始发育形成鹅卵石状。EPCs 吞噬 Dil 标记的乙酰低密度脂蛋白 (DiI-acLDL) 后,激光共聚焦显微镜下观察,呈现红色荧光,当 EPCs 结合了 FITC 标记的荆豆凝集素 (FITC-UEA-lectin) 后,呈现绿色荧光,发出黄色荧光则是既吞噬了 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白,又结合了 FITC 标记的荆豆凝集素,染色呈双阳性,为正在分化的 EPCs(见图 1)。由此可知,密度梯度离心法得到的大鼠单核细胞,经诱导培养后形成了典型的 EPCs 形态,可以吞噬 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白,并结合 FITC 标记的荆豆凝集素。本实验使用这一方法得到了正在分化中的 EPCs。

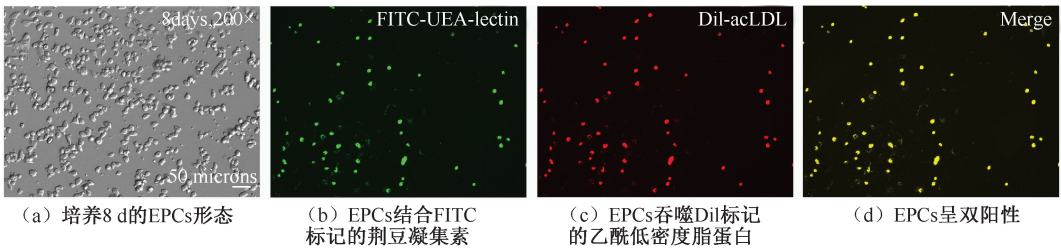


图 1 大鼠骨髓来源 EPCs 鉴定

Fig.1 Identification of rat bone marrow mononuclear cell-derived EPCs (a) Morphology of EPCs in culture after 8 days, (b) EPCs were stained with FITC-UEA-lectin, (c) EPCs were stained with DiI-acLDL, (d) EPCs revealed dual-positive

2.2 周期性张应变对 EPCs 功能的影响

为研究周期性张应变是否参与调控 EPC 功能,应用 FX-5000T 周期性张应变加载装置,对体外培养 EPCs 施加 5% 幅度、1.25 Hz 频率的周期性张应变(模拟生理条件下体内动脉受到的周向张应变),加载 24 h,然后用 BrdU ELISA 方法和实时 PCR 分别检测细胞增殖以及 VSMC 相分化相关分子 calponin 和 α -SMA 的表达(见图 2)。结果显示,与静态组细胞比较,施加了周期性张应变的 EPCs 增殖能

力显著升高,提示 5% 幅度、1.25 Hz 周期性张应变促进 EPCs 的增殖。同时,EPCs 的 VSMC 相标志分子表达水平显著下降,说明周期性张应变可以抑制 EPCs 向 VSMC 相分化。

2.3 周期性张应变抑制 miR-214-3p 表达

根据 miRNAs 芯片结果挑选出 5 个周期性张应变调控下差异表达的 miRNAs,利用实时 PCR 确定 EPCs 中 miRNAs 表达是否有显著性差异,对静态组以及周期性张应变加载 24 h 组 EPCs 的 miRNAs 表

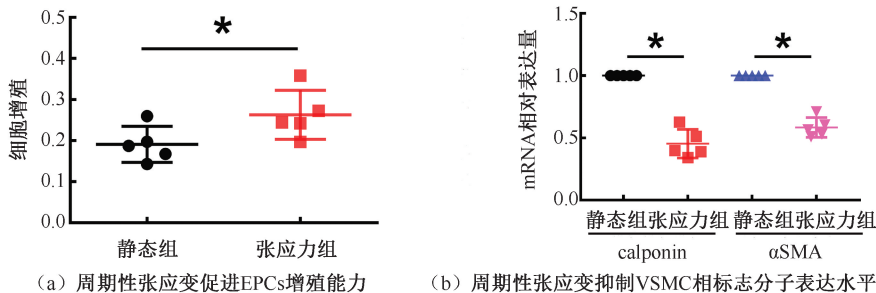


图2 周期性张应变对 EPCs 功能的影响 ($n=5$, $^*P<0.05$)

Fig.2 Impact of cyclic stretch on EPCs function (a) Cyclic stretch promoted the proliferation of EPCs, (b) Cyclic stretch inhibited the expression level of VSMC marker in EPCs

达情况进行检测。结果显示,相较于静态组,生理性张应变抑制 EPCs 内 miR-214-3p 的表达水平(见图3)。以上结果说明,miR-214-3p 能够响应力学刺激,可能参与了周期性张应变调控 EPCs 功能这一过程。

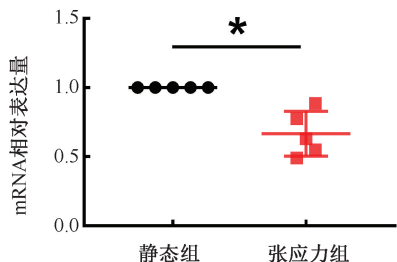


图3 周期性张应变条件下 miR-214-3p 的表达水平下降 ($n=5$, $^*P<0.05$)

Fig.3 Expression of miR-214-3p was depressed in response to cyclic stretch

2.4 miR-214-3p 调控 EPCs 功能

上述结果提示,周期性张应变可能是通过 miR-214-3p 参与对 EPCs 的功能调控,故通过下调 miR-214-3p 的表达进一步验证它对 EPCs 功能的影响。

为证实 miR-214-3p 对 EPCs 功能的调控作用,用 miR-214-3p inhibitor 及对照组片段各 100 nmol/L 转染 EPCs 24 h,之后 BrdU ELISA 检测细胞增殖情况及实时 PCR 检测 VSMC 标志分子 calponin 和 α -SMA 的表达变化情况。结果显示,转染了 miR-214-3p inhibitor 后,EPCs 的 VSMC 相标志分子 calponin 和 α -SMA 均有显著下降,而 EPCs 增殖能力显著上升(见图4)。

3 讨论

内膜损伤是多种心血管疾病的起始因素,目前

众多研究发现,通过 EPCs 修复内皮层功能,维护血管内膜稳定,是应用最广泛的治疗方式^[25]。EPCs 是一类具有自我更新能力,并可以定向分化多功能干细胞,在生理条件下,EPCs 在骨髓中是静止状态,缺血、损伤或药物等的刺激下,可动员骨髓中 EPCs 进入体循环,归巢至损伤处分化为成熟的 ECs 发挥其作用,EPCs 的这一发现为实现损伤血管处再内皮化,修复损伤或缺血组织及器官提供了更多的可能^[26-27]。血管内膜层的 ECs 位于循环血和 VSMCs 之间,一旦 ECs 受损严重,暴露出的 VSMCs 过度增殖,最终导致血管内发生狭窄甚至完全堵塞^[28]。因此,促进血管损伤部位的内皮修复并且抑制 VSMCs 异常增殖,对于动脉粥样硬化和血管再狭窄的预防作用十分关键。研究发现,生理状态下脉管内血流产生的切应力抑制 EPCs 向 VSMC 相分化^[29],对抑制内膜过度增生发挥了重要的作用。

当 EPCs 黏附到损伤部位后,受到来自血流通过血管壁主要产生两种生理性机械应力:层流切应力以及周期性张应变^[30]。越来越多的研究认为,切应力对修复血管内膜具有重要的作用,有大量报道了切应力对 EPCs 功能的影响。例如,切应力可以改善老年人 EPCs 的功能,通过促进 CXCR4/JAK-2 信号通路增加 EPCs 再内皮化的能力^[31]。而周期性张应变对调控 ECs 的功能同样起到十分重要的作用,并且可以调控 VSMCs 增殖、表型改变和重建^[32-33]。由此可见,力学因素对于维持血管的完整性十分关键。现有研究更多关注了切应力对 EPC 功能的影响,而周期性张应变对 EPCs 产生的作用及其参与的分子机制鲜有报道。本文主要探讨了周期性张应变对 EPC 产生的影响,通过在体外

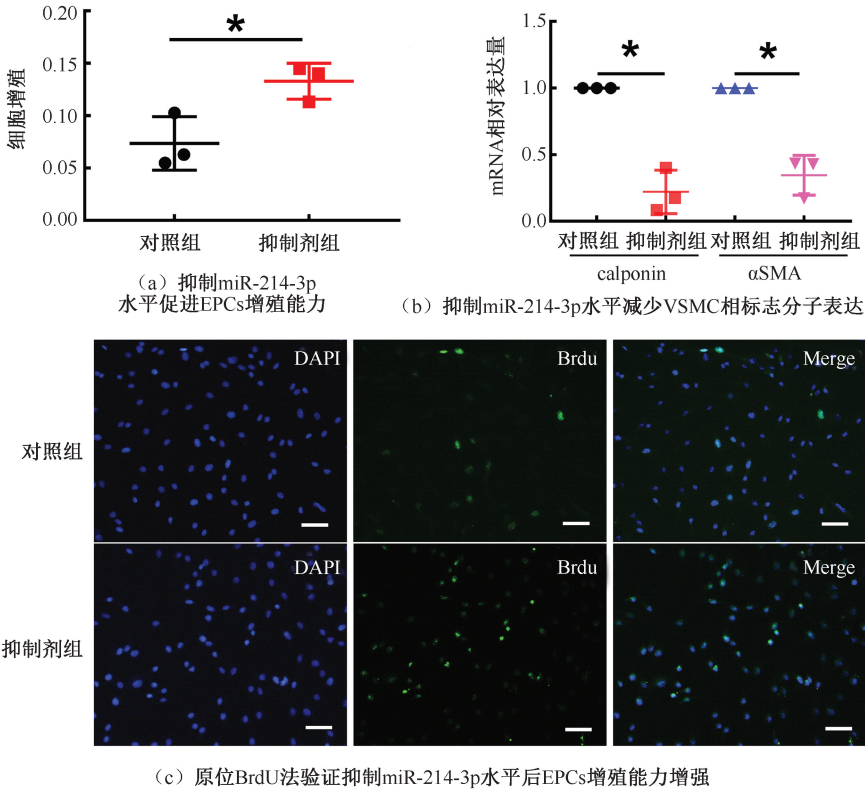


图4 抑制 miR-214-3p 对 EPCs 功能的影响 ($n=3$, $^*P<0.05$)

Fig.4 Effects of miR-214-3p knockdown on the EPC function (a) Inhibition of mir-214-3p level promoted the proliferation of EPCs, (b) Inhibition of mir-214-3p level reduced the expression of VSMC marker, (c) The proliferation capacity of EPCs was enhanced after inhibition of mir-214-3p by *in-situ* BrdU

利用周期性张应变加载装置,研究 EPCs 是否受到周期性张应变的调控以及在这一过程中参与发挥作用的关键分子。

为模拟 EPCs 体内黏附在血管上的所受的力学作用,选择 Flexcell 5000T 细胞周期性张应变的加载装置,通过将细胞种在底部是弹性硅胶膜的 Flexcell 6 孔板上,利用计算机调节细胞加载的不同频率、幅度以及作用时间。根据体内血管受到的力学环境,在体外对细胞加载 5% 幅度、1.25 Hz 频率模拟正常生理条件下的周期性张应变。对 EPCs 施加周期性张应变后,首先检测 EPCs 功能,发现周期性张应变加载的 EPCs 比静态细胞有更强的增殖能力,而且显著抑制其向 VSMC 相分化。这些结果证实,周期性张应变可以使黏附在血管壁上的 EPCs 大量增殖,同时抑制其向 VSMCs 分化,对参与损伤处内膜修复具有重要作用。

近年来,大量研究发现,miRNAs 是 EPCs 增殖、

分化及血管新生等过程的重要调控因子。例如:miR-26a 过表达可以显著抑制 EPCs 增殖和血管生成的能力^[34]; miR-130a 表达水平下降或是 MAP3K12 mRNA 表达上升都将显著减弱 EPCs 迁移和集落形成而促进其凋亡^[35]。而且 miRNAs 在许多心血管相关疾病的发展过程中都发挥了关键作用,可能会成为心血管疾病新的诊断和治疗靶标。miR-155 能够通过调节 ECs 和 VSMCs 的炎症反应的基因表达,影响动脉粥样硬化斑块的形成^[36];动脉粥样硬化患者的 EPCs 中 miR-221 表达显著增加,并抑制 EPCs 增殖^[37]。miRNAs 调节了人类约 30% 基因,是多个生物过程的重要调控因子^[38],因此,本文旨在探讨 miRNAs 在周期性张应变调控 EPCs 功能改变这一过程中发挥的作用。

首先,基于 miRNAs 芯片结果,挑选出周期性张应变调控下表达差异较大的 5 个 miRNAs: miR-214-3p、miR-465-5p、miR-29a-3p、miR-199a-5p 和 miR-382-

5p。并用实时 PCR 进行验证,结果显示,与静态组相比,5%幅度、1.25 Hz 周期性张应变条件下 EPCs 中的 miR-214-3p 显著下调,而其他 4 种 miRNAs 变化不显著。因此,推测 miR-214-3p 可能参与了周期性张应变调控 EPCs 增殖以及抑制向 VSMCs 分化的过程。目前有关 miR-214-3p 与 EPC 相关的研究鲜有报道,故本文提出 miR-214-3p 可能参与周期性张应变调控 EPCs 功能的分子机制,从而对血管内皮层修复产生影响。

当前研究发现,miR-214-3p 与多种癌症相关。基因敲入 miR-214-3p 可以通过破骨细胞活性显著增加骨吸收^[39],miR-214-3p 也可以有效阻碍原发性肝癌细胞增殖,并通过靶向 MELK 诱导细胞凋亡^[40]。但 miR-214-3p 在 EPCs 增殖和分化中的作用鲜有研究,为了探讨 miR-214-3p 是否响应力学刺激并在调控 EPC 功能中发挥的作用,本文对施加了周期性张应变的 EPCs 中 miR-214-3p 的表达情况进行研究,并且运用 miR-214-3p 抑制剂下调 miR-214-3p 水平,模拟力学状态,并利用实时 PCR 和 BrdU ELISA 方法检测 EPCs 向 VSMC 相分化的分子指标以及细胞增殖情况。结果发现,周期性张应变下调 miR-214-3p 的表达,增加 EPCs 的增殖能力,并抑制 EPCs 向 VSMC 相分化。由此可知,miR-214-3p 可响应力学刺激,从而调控 EPCs 功能,该结果为研究血管内皮修复提供新的参考。

4 结语

本文利用体外实验发现,生理性的周期性张应变通过抑制 miR-214-3p 的表达水平,进而促进 EPCs 的增殖能力,并且抑制其向 VSMC 相分化。本文主要揭示了 miR-214-3p 在 EPCs 增殖和分化中的重要作用,为研究周期性张应变调控 EPCs 的增殖和分化,促进损伤血管修复提供新的分子机制和潜在靶标。研究结果对探讨基于调控 miR-214-3p 维持血管完整性的有效治疗具有重要意义。

参考文献:

[1] KULISZEWSKI MA, KOBULNIK J, LINDNER JR, et al. Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(5): 895-902.

[2] DOYLE B, METHAROM P, CAPLICE NM. Endothelial pro-

genitor cells [J]. *Endothelium*, 2006, 13(6): 403-410.

[3] ANTÓNIO N, FERNANDES R, SOARES A, et al. Reduced levels of circulating endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction patients with diabetes or pre-diabetes: Accompanying the glycemic continuum [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13(1): 101.

[4] WERNER N, KOSIOL S, SCHIEGL T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(10): 999-1007.

[5] VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, 89(1): e1-e7.

[6] HILL JM, ZALOS G, HALCOX JPJ, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *New Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.

[7] CHEN MC, CHEN CJ, YANG CH, et al. Relationship of the percentage of circulating endothelial progenitor cell to the severity of coronary artery disease [J]. *Heart Vessels*, 2008, 23(1): 47-52.

[8] ZARGHAM R. Preventing restenosis after angioplasty: A multistage approach [J]. *Clin Sci*, 2008, 114(4): 257-264.

[9] ZHANG C, ZENG L, EMANUELI C, et al. Blood flow and stem cells in vascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(2): 251-259.

[10] INUI M, MARTELLO G, PICCOLO S. MicroRNA control of signal transduction [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2010, 11(4): 252-263.

[11] FABIAN MR, SONENBERG N, FILIPOWICZ W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 351-379.

[12] GAO Y, FENG B, HAN S, et al. MicroRNA-129 in human cancers: From tumorigenesis to clinical treatment [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(6): 2186-2202.

[13] 马英英,王璐,包晗,等. 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[J]. *医用生物力学*, 2016, 31(5): 408-415.

MA YY, WANG L, BAO H, et al. The role of microRNA-133b in proliferation of vascular smooth muscle cells induced by endothelial cells under low shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(5): 408-415.

[14] KANE NM, THRASHER AJ, ANGELINI GD, et al. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(5): 1059-1066.

[15] LIN CY, TZENG HE, LI TM, et al. WISP-3 inhibition of miR-452 promotes VEGF-A expression in chondrosarcoma cells and induces endothelial progenitor cells angiogenesis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39571-39581.

[16] MENG S, CAO JT, WANG LS, et al. MicroRNA 107 partly in-

- hibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 β [J]. PloS One, 2012, 7(7): e40323.
- [17] LEI Z, MIL A, BRANDT MM, *et al.* MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(8): 1994-2005.
- [18] WANG L, BAO H, WANG KX, *et al.* Secreted miR-27a induced by cyclic stretch modulates the proliferation of endothelial cells in hypertension via GRK6 [J]. Sci Rep, 2017, doi: 10.1038/srep41058.
- [19] MONDADORI DOS SANTOS A, METZINGER L, HADDAD O, *et al.* miR-126 is involved in vascular remodeling under laminar shear stress [J]. Biomed Res Int, 2015, doi: 10.1155/2015/497280.
- [20] CHENG BB, QU MJ, WU LL, *et al.* MicroRNA-34a targets Forkhead box j2 to modulate differentiation of endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.016.
- [21] CUI X, ZHANG X, GUAN X, *et al.* Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins [J]. Biochem Bioph Res Co, 2012, 425(2): 419-425.
- [22] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-966.
- [23] LI R, LIANG L, DOU Y, *et al.* Mechanical strain regulates osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Biomed Res Int, 2015, doi: 10.1155/2015/873251.
- [24] LOHBERGER B, KALTENEGGER H, STUENDL N, *et al.* Effect of cyclic mechanical stimulation on the expression of osteogenesis genes in human intraoral mesenchymal stromal and progenitor cells [J]. Biomed Res Int, 2014, doi: 10.1155/2014/189516.
- [25] BERGER S, LAVIE L. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and hypoxia-potential implications to obstructive sleep apnea [J]. Transl Res, 2011, 158(1): 1-13.
- [26] GEORGE AL, BANGALORE-PRAKASH P, RAJORIA S, *et al.* Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration [J]. J Hematol Oncol, 2011, doi: 10.1186/1756-8722-4-24.
- [27] BADR G, HOZZEIN WN, BADR BM, *et al.* Bee venom accelerates wound healing in diabetic mice by suppressing activating transcription factor-3 (ATF-3) and inducible nitric oxide synthase (iNOS)-mediated oxidative stress and recruiting bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 2016, 231(10): 2159-2171.
- [28] LERMAN A. Restenosis [J]. Circulation, 2005, 111: 8-10.
- [29] CHENG BB, YAN ZQ, YAO QP, *et al.* Association of SIRT1 expression with shear stress induced endothelial progenitor cell differentiation [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(12): 3663-3671.
- [30] BRIASOULIS A, TOUSOULIS D, ANTONIADES C, *et al.* The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development [J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29(2): 125-139.
- [31] XIA WH, YANG Z, XU SY, *et al.* Age-related decline in reendothelialization capacity of human endothelial progenitor cells is restored by shear stress [J]. Hypertension, 2012, 59(6): 1225-1231.
- [32] ABIKO H, FUJIWARA S, OHASHI K, *et al.* Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2015, 128(9): 1683-1695.
- [33] MANTELLA LE, SINGH KK, SANDHU P, *et al.* Fingerprint of long non-coding RNA regulated by cyclic mechanical stretch in human aortic smooth muscle cells; Implications for hypertension [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 435(1-2): 163-173.
- [34] ZUO K, ZHI K, ZHANG X, *et al.* A dysregulated microRNA-26a/EphA2 axis impairs endothelial progenitor cell function via the p38 MAPK/VEGF pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 477-488.
- [35] YE M, LI D, YANG J, *et al.* MicroRNA-130a targets MAP3K12 to modulate diabetic endothelial progenitor cell function [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(2): 712-726.
- [36] WEI Y, NAZARI-JAHANTIGH M, NETH P, *et al.* MicroRNA-126, -145, and -155 [J]. Arterioscl Throm Vas, 2013, 33(3): 449-454.
- [37] SPINETTI G, FORTUNATO O, CAPORALI A, *et al.* MicroRNA-15a and MicroRNA-16 impair human circulating pro-angiogenic cell (PAC) functions and are increased in the PACs and serum of patients with critical limb ischemia [J]. Circ Res, 2013, 112(2): 335-346.
- [38] SYED DN, LALL RK, MUKHTAR H. MicroRNAs and photocarcinogenesis [J]. Photochem Photobiol, 2015, 91(1): 173-187.
- [39] LIU J, LI D, DANG L, *et al.* Osteoclastic miR-214 targets TRAF3 to contribute to osteolytic bone metastasis of breast cancer [J]. Sci Rep, 2017, doi: 10.1038/srep40487.
- [40] LI Y, LI Y, CHEN Y, *et al.* MicroRNA-214-3p inhibits proliferation and cell cycle progression by targeting MELK in hepatocellular carcinoma and correlates cancer prognosis [J]. Cancer Cell Int, 2017, doi: 10.1186/s12935-017-0471-1.