

文章编号 1006-8147(2017)02-0121-03

论 著

miR-185 通过靶向调控 MRTF-A 抑制 VEGF 引起的 HUVECs 迁移和血管形成

张蕊,李玉明,赵明峰

(天津市第一中心医院血液科实验室,天津 300457)

摘要 目的:探究过表达 miR-185 是否会抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)迁移及血管形成。方法:在 HUVECs 中过表达 miR-185 并利用 50 ng/mL 的 VEGF 处理,划痕实验和 transwell 实验检测 HUVECs 的迁移情况;Matrigel 血管形成实验检测其血管形成情况。结果:划痕实验和 transwell 实验表明过表达 miR-185 后,抑制了 VEGF 引起的 HUVECs 迁移,并降低迁移标志基因 MYL9(MYL9)、CYR61(CYR61)的表达;Matrigel 血管形成实验表明过表达 miR-185 抑制了 VEGF 引起的 HUVECs 血管形成。结论:过表达 miR-185 可以抑制 VEGF 引起的 HUVECs 迁移和血管形成。

关键词 人脐静脉内皮细胞;迁移;血管形成;血管内皮生长因子;miR-185

中图分类号 R730

文献标志码 A

miR-185 inhibits the migration and angiogenesis of HUVECs induced by VEGF by targeting MRTF-A

ZHANG Rui, LI Yu-ming, ZHAO Ming-feng

(Laboratory of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300457, China)

Abstract Objective: To investigate whether the migration and angiogenesis of HUVECs treated by VEGF could be inhibited by overexpression miR-185. **Methods:** HUVECs were transfected with miR-185 mimics and treated with 50 ng/mL of VEGF. HUVECs migration ability was tested by wound heal assay and transwell assay. Angiogenesis was tested by Matrigel assay. **Results:** Wound heal assay and transwell assay confirmed that miR-185 mimics inhibited VEGF-induced HUVECs migration and reduced the expression of migration marker genes MYL9 and CYR61. Meanwhile, Matrigel assay showed that miR-185 mimics inhibited VEGF-induced HUVECs angiogenesis. **Conclusion:** Overexpression miR-185 could inhibit the migration and angiogenesis of HUVECs induced by VEGF.

Key words HUVECs; migration; angiogenesis; VEGF; miR-185

血管内皮生长因子(VEGF)对血管内皮细胞的迁移、侵袭和血管形成有明显的促进作用。VEGFA可促进内皮的迁移和丝状伪足的形成^[1-2],有文献探究了 VEGFA 如何调控内皮 tip 细胞伪足的形成及侵袭^[3-4]。miR-185 可以和多个靶基因结合,在肿瘤中发挥不同的作用^[5-6]。相比正常组织,miR-185 在相对肿瘤组织中表达下调,如结肠癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等^[7-10]。在肺腺癌中,miRNA-185 在转录后水平调控 HMGA2 和 CCNE1 的表达,进而抑制肺癌细胞的增殖和迁移。miR-185 可通过靶向调控 CDC42 来抑制结肠癌细胞的增殖与迁移。miR-185 可改变卵巢癌细胞对顺铂的敏感性^[11]。但是 miR-185 在 VEGF 引起的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)迁移与血管生成作用机制还不明确。因此,在本研究中,首先用 VEGF 诱导 HUVECs 迁移

与血管生成,再采用 miR-185 mimics 来抑制 MRTF-A 的表达,进一步研究 miR-185 在 VEGF 促进 HUVECs 迁移与血管生成的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 F12 培养基, Gibco 公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;VEGF, Peprotech 公司;miR-185 mimics, 瑞博生物有限公司;MRTF-A 抗体、GAPDH、My19、Cyr61 抗体, Abcam 公司;DAPI, 北京索莱宝科技有限公司;IRDye® 800CW 山羊抗鼠抗体, LI-COR 公司;Matrigel 基质胶, BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞加药处理 将 HUVECs 以 2×10^5 /mL 的密度接种 6 孔板,分为 3 组:对照组:2%血清 F12/DMEM 培养 24 h;VEGF 组:加 VEGF(终质量浓度 50 ng/mL)于 2%血清的 F12/DMEM 中处理细胞 24 h;miR-185 mimics 组:转染 miR-185 mimics(终浓度 0.1 μ mol/L)6 h 后,利用含 VEGF(终质量浓度 50 ng/mL)的 2%血清的 F12/DMEM 换液。分别处理 24 h 后,收集上述细胞进行后续实验。

基金项目 天津市卫计委科技基金项目重点项目(2015K215)

作者简介 张蕊(1988-),女,博士,研究方向:间充质干细胞向内皮细胞分化及血管形成、肿瘤干细胞、肿瘤机制研究;通信作者:赵明峰, E-mail: mingfengzhao@sina.com。

1.2.2 蛋白质印迹实验 (Western blot) 收集各组细胞,利用 SDS 细胞裂解液冰上裂解 10 min,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干转法将蛋白转至 NC 膜。5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,分别用 GAPDH 抗体(1:500)、MRTF-A 抗体(1:1 000)、Cyr61 抗体(1:1 000)、My19 抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,PBS 洗 3 次,IRDye® 800CW 山羊抗鼠抗体(1:5 000)室温孵育 1 h 后,PBS 洗 3 次,Odyssey 成像系统进行扫描成像。

1.2.3 细胞划痕实验 将 HUVECs 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种 6 孔板,12 h 后用 10 μL 枪头在细胞间按“十”字型划出痕迹,在转染 miR-185 mimics 6 h 后用 VEGF 处理,24 h 后在倒置显微镜下进行观察拍照,观察细胞的弥合修复能力。

1.2.4 Transwell 实验 在 24 孔板中加入 500 μL 10%血清 F12/DMEM,然后在小孔内放入小室。在小室的上室中加入 5×10^4 个细胞,16 h 后,将 Transwell 的小室取出,用棉签轻轻擦去上室的细胞,PBS 洗 2 次。4%多聚甲醛室温固定下室细胞 20 min,PBS 洗 2 次。无水甲醇浸泡下室膜,室温 20 min,PBS 洗 2 次。用 DAPI 染细胞核,室温放置 15 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min。共聚焦显微镜下照相。

1.2.5 Matrigel 成血管实验 将处理好的细胞悬液(5×10^4 个细胞)接种到 300 μL 0.5~0.7 mg/mL 的基质胶中,置于 37℃细胞培养箱孵育 4 h 后,每孔补加 300 μL 含 50 ng/mL VEGF 的细胞培养基,继续置于细胞培养箱中培养。12 h 后用激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学分析 所有实验数据均用 SPSS 13.0 统计软件计算,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 t 检验显著性,*表示统计学上有显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 过表达 miR-185 抑制了 MRTF-A 的表达 利用 miRNA 预测网站 miRanda 证实 miR-185 可靶向结合到 MRTF-A。

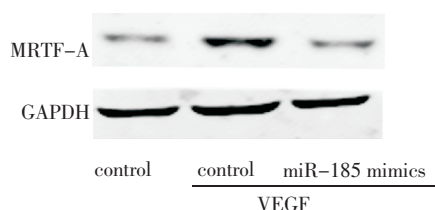


图 1 过表达 miR-185 抑制 VEGF 引起的 MRTF-A 的表达

Fig 1 miR-185 mimics inhibits MRTF-A expression by VEGF

图 1 示,利用 Western blot 证实过表达 miR-185 并利用 VEGF 刺激 24 h 后,MRTF-A 的表达被抑制。

2.2 细胞划痕实验检测了加入 miR-185 mimics 后对 VEGF 诱导 HUVECs 迁移作用的影响 利用划痕实验检测了细胞的迁移能力,结果见图 2。转染 miR-185 mimics 后的 HUVECs 的愈合程度小于没有处理的 HUVECs 的愈合程度,证明过表达 miR-185 可以抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 的迁移。

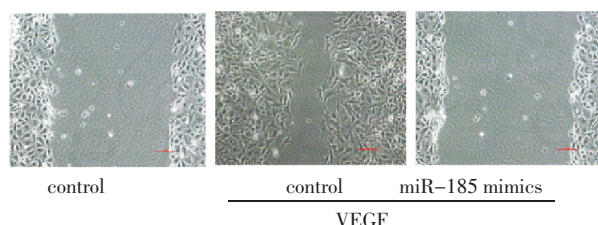


图 2 过表达 miR-185 抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移能力

Fig 2 miR-185 mimics inhibits HUVECs migration induced by VEGF

2.3 Transwell 检测过表达 miR-185 mimics 后对 VEGF 诱导 HUVECs 的侵袭作用的影响 利用 Transwell 实验检测了细胞的侵袭能力,结果见图 3。过表达 miR-185 mimics 的 HUVECs 的侵袭能力小于没有处理的 HUVECs 的侵袭能力,证明 miR-185 mimics 可以抑制 VEGF 诱导 HUVECs 的侵袭作用。

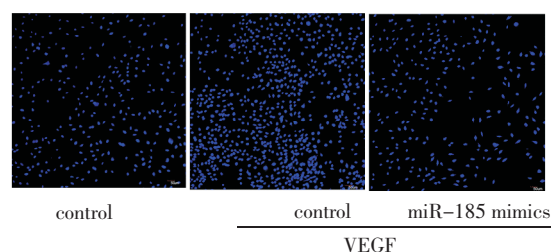


图 3 过表达 miR-185 抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 的侵袭

Fig 3 miR-185 mimics inhibits HUVECs invasion induced by VEGF

2.4 检测迁移 marker 的表达变化 进一步利用 Western blot 的方法检测迁移 maker MYL9、CYR61 蛋白水平的变化,结果见图 4。过表达 miR-185 显著抑制了 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移过程中 MYL9、CYR61 的表达。

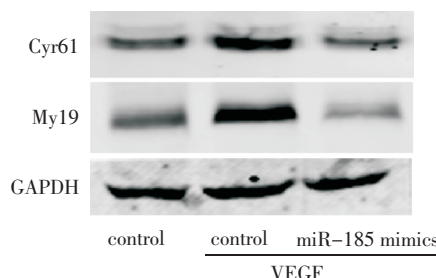


图 4 miR-185 mimics 抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移 maker 蛋白表达水平

Fig 4 miR-185 mimics inhibits the protein levels of migration markers induced by VEGF in HUVECs

2.5 Matrigel 检测过表达 miR-185 mimics 后对 VEGF 诱导 HUVECs 血管形成作用的影响 Matrigel 检测了细胞的血管生成能力,结果见图 5。过表达 miR-185 mimics 的 HUVECs 的血管形成明显受到抑制,不能形成完整的血管网状结构,证明 miR-185 mimics 可以抑制 VEGF 诱导 HUVECs 的血管形成。

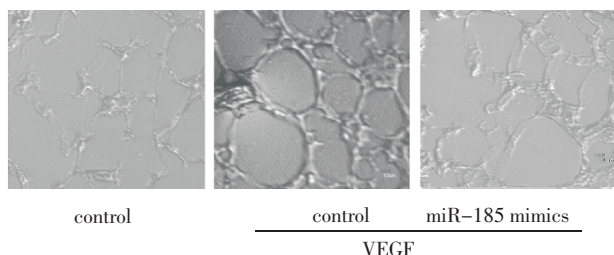


图5 过表达 miR-185 抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 的血管形成

Fig 5 miR-185 mimics inhibits HUVECs angiogenesis induced by VEGF

3 讨论

参与 VEGF 引起的 HUVECs 迁移和血管形成过程的调控机制有很多。有文献报道 IKCa1 通道特异性阻断剂 TRAM-34 通过影响 Ca^{2+} 和 K^{+} 的活动,最终抑制 HUVECs 的增殖^[12-13];另有文献显示黏着斑激酶(FAK)特异性抑制剂 TAE226 处理或 siRNA 沉默 FAK 基因可以抑制 HUVECs 增殖、迁移和诱导细胞凋亡,说明 FAK 通路激活可参与调控 VEGF 诱导的血管内皮细胞生长、迁移和脉管形成^[14-16];据报道 Avastin 和 Lucentis 两种药物能阻断 VEGF 受体或通过拮抗 VEGF 进而抑制内皮细胞的增殖、迁移与成血管,提示 Avastin 和 Lucentis 可作为靶向药物抑制新生血管形成^[17]。而我们探究的是 miR-185 通过靶向抑制 MRTF-A 进而抑制 VEGF 引起的 HUVECs 的迁移和血管形成。

有文献报道了 VEGF 引起 MRTF-SRF 通路的激活,进而上调 Myl9 等迁移 markers 的表达,从而刺激了 HUVECs 的迁移及侵袭^[18],提示 MRTF-A 在 VEGF 诱导的 HUVECs 迁移中起到重要的作用。研究证实一些特定的 miRNA 能调节内皮功能和成血管过程^[19]。例如 microRNAs 99b、181a 和 181b 在人胚胎干细胞分化成血管内皮细胞过程起到关键作用^[20]。在肿瘤血管生成中,miR-148a/152 和 DNMT1 相互调控起作用^[21]。而相关 miR-185 在内皮细胞迁移与成血管过程中的作用机制尚不清楚。本文发现 miR-185 能够靶向抑制 MRTF-A 的表达,在 VEGF 诱导的 HUVECs 的迁移和血管形成过程中,过表达 miR-185 可显著降低 MRTF-A 的表达,进而阻断了

VEGF 诱导的 HUVECs 的迁移和血管形成过程。

参考文献:

- [1] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(6): 1163
- [2] Lamallice L, Houle F, Jourdan G, et al. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 434
- [3] Lamallice L, Le Boeu F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 782
- [4] Franco C A, Blanc J, Parlakian A, et al. SRF selectively controls tip cell invasive behavior in angiogenesis[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2321
- [5] Liu M, Lang N, Chen X Z, et al. miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells[J]. *Cancer Lett*, 2011, 301(2): 151
- [6] Akcakaya P, Ekelund S, Kolosenko I, et al. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(2): 311
- [7] 赵梓彤,周卫,刘玲燕,等.微小RNA-185对食管癌细胞增殖、迁移的影响及其分子机制[J].*中华医学杂志*, 2013, 93(18):1425
- [8] 唐海林,邓敏,廖前进,等.结肠癌组织中 miR-185 的表达及其临床意义[J].*中南医学科学杂志*, 2011, 39(5):491
- [9] Tan Z, Jiang H, Wu Y, et al. miR-185 is an independent prognosis factor and suppresses tumor metastasis in gastric cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1/2): 223
- [10] Takahashi Y, Forrest A R, Maeno E, et al. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6677
- [11] Qu F J, Cui X G, Hong Yi, et al. MicroRNA-185 suppresses proliferation, invasion, migration, and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 377(1/2): 121
- [12] Millership J E, Devor D C, Hamilton K L, et al. Calcium-activated K^{+} channels increase cell proliferation Independent of K^{+} conductance[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(4): C792
- [13] Abdullaev I F, Rudkouskays A, Mongin A A, et al. Calcium-activated Potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8):e12304
- [14] Tong B, Lu D, Wei Z F, et al. Gleditsioside B, a triterpene saponin isolated from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis* Lam., abrogates bFGF-induced endothelial cell migration through preventing the activation of MMP-2 and FAK via inhibiting ERK and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58(1/2): 118
- [15] Chen X L, Nam J O, Jean C, et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK[J]. *Dev Cell*, 2012, 22(1): 146
- [16] 蒲盛蓝,刘代顺,龚玲,等.黏着斑激酶在 HUVEC 的增殖、迁移、凋亡和毛细血管样结构形成中的作用[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5):558
- [17] 金鑫,陈兵,刘铁城,等. Avastin 与 Lucentis 对 HUVEC 增殖和迁移的抑制作用研究[J]. *国际眼科杂志*, 2013, 13(6):1096

(下转第 127 页)

有效剂量。

替米沙坦与吡格列酮不同,替米沙坦选择性地激活 PPAR- γ ,能够改善脂肪和糖代谢,但由于替米沙坦对受体激动和基因表达的不同效果以及对 RAS 系统的阻断作用,使其避免了 PPAR- γ 完全激动剂造成的水钠潴留和致肥胖等不良反应^[19],极大地减少心力衰竭等心血管事件的发生,因此发掘替米沙坦同时抗糖尿病、抗高血压及改善 IR 的功能,进一步研究其具体机制具有极大临床价值。本实验因未研究 PPAR- γ mRNA 转录变化而没能从基因水平探讨替米沙坦对 PPAR- γ 激活的影响是本实验的遗憾。总之,从本实验可看出替米沙坦可以激活 PPAR- γ ,上调肝脏、骨骼肌及肾周脂肪组织中 PPAR- γ 蛋白的表达而改善 IR,但各组织表达对药物影响的敏感性是否有差异,以及改善程度是否存在替米沙坦剂量依赖也值得我们深究,从而为寻找改善胰岛素抵抗有效药物提供新思路和新进展,为代谢综合征的预防和治疗提供新突破。

参考文献:

- [1] Esposito K, Chiodini P, Colao A, et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(11): 2402
- [2] Sartorius B, Sartorius K, Aldous C, et al. Carbohydrate intake, obesity, metabolic syndrome and cancer risk? A two-part systematic review and meta-analysis protocol to estimate attributability[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(1): e009301
- [3] Geng D, Jin D, Wu W, et al. Angiotensin receptor blockers for prevention of new-onset type 2 diabetes: a meta-analysis of 59,862 patients[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 155(2): 236
- [4] Chen Y, Luo Q, Xiong Z, et al. Telmisartan counteracts TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition via PPAR- γ in human proximal tubule epithelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(6): 522
- [5] 赵姜,田凤石,雒璐.替米沙坦对改善 OLETF 大鼠胰岛素抵抗作用的探讨[J].*天津医药*,2012,40(6):605
- [6] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 645
- [7] Vergotine Z, Yako Y, Kengne A, et al. Proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala interacts with the insulin receptor substrate 1 Gly972Arg and increase the risk of insulin resistance and diabetes in the mixed ancestry population from South Africa [J]. *BMC Genet*, 2014, 15(21): 10
- [8] Sukumaran V, Veeraveedu P, Gurusamy N, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis[J]. *Life Sci*, 2012, 90(7/8): 289
- [9] 张秋璇,王艳荣,刘应莉,等.替米沙坦对非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗及抵抗素的影响[J].*中华肝脏病杂志*,2015,23(4):281
- [10] Zhao Z, Luo R, Li L, et al. Angiotensin II receptor blocker telmisartan prevents new-onset diabetes in pre-diabetes OLETF rats on a high-fat diet: evidence of anti-diabetes action [J]. *Can J Diabetes*, 2013, 37(3): 156
- [11] 李波,刘微微.替米沙坦在代谢综合征中的应用价值[J].*中国医药*,2015,10(9):1318
- [12] Kubik M, Chudek J, Adamczak M, et al. Telmisartan improves cardiometabolic profile in obese patients with arterial hypertension[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 35(4): 281
- [13] 陈正迪,孙静,杨杰书.替米沙坦改善高血压患者的胰岛素抵抗[J].*中华高血压杂志*,2012(20):78
- [14] Chen H, Xu Z, Chen L, et al. Valsartan and telmisartan abrogate angiotensin II-induced downregulation of ABCA1 expression via AT1 receptor, rather than AT2 receptor or PPAR γ activation[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(6): 570
- [15] Guan Y. Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in kidney and urologic disease[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2002, 54(2): 65
- [16] Hulsmans M, Geeraert B, Arnould T, et al. PPAR agonist-induced reduction of Mcp1 in atherosclerotic plaques of obese, insulin-resistant mice depends on adiponectin-induced Irak3 expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62253
- [17] Mohammadi A, Gholamhoseinian A, Fallah H. Zataria multiflora increases insulin sensitivity and PPAR γ gene expression in high fructose fed insulin resistant rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(4): 263
- [18] Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, et al. An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. *FEBS Lett*, 2004, 576(3): 492
- [19] 李婉宁,董雁逊.替米沙坦治疗老年高血压合并 2 型糖尿病患者代谢因素的影响[J].*世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊*, 2016, 16(13): 117

(2016-09-02 收稿)

(上接第 123 页)

- [18] Franco C A, Blanc J, Parlakian A, et al. SRF selectively controls tip cell invasive behavior in angiogenesis[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2321
- [19] Kane N M, Thrasher A J, Angelini G D. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(5): 1059
- [20] Wu F S, Yang Z, Li G H. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(4): 549
- [21] Xu Q, Jiang Y E, Yin Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1[J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(1): 3

(2016-11-17 收稿)