

MicroRNA-21 介导非对称性二甲基精氨酸诱导的内皮细胞衰老 *

廖清池¹ 胡艳丽² 周胜华^{1△}

(1 中南大学湘雅二医院 心血管内科 湖南 长沙 410011 2 湖南省马王堆医院 外科 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:观察非对称性二甲基精氨酸(ADMA)对内皮细胞中 microRNA-21(miR-21)表达的影响,探讨 microRNA-21 在 ADMA 诱导的内皮细胞衰老中的作用。方法:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)与 10 μM 的 ADMA 孵育 48 小时后收集细胞提取总 RNA 及蛋白,荧光定量实时 RT-PCR 检测 miR-21 表达,Western blot 检测超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 表达,衰老相关半乳糖苷酶 (SA-β-gal)染色鉴定衰老的内皮细胞,然后 HUVEC 与 miR-21 抑制剂转染 6 小时后继续与 10 μM 的 ADMA 孵育 48 小时留取细胞按上述方法检测相关指标。结果:HUVEC 与 ADMA 孵育后 miR-21 表达量明显增加($P<0.01$),同时衰老的内皮细胞数量增多($P<0.05$),而 SOD2 表达减少($P<0.01$),miR-21 抑制剂转染 HUVEC 后 ADMA 诱导的 miR-21 表达明显减少,同时衰老的内皮细胞减少,而 SOD2 表达明显增加(所有 $P<0.01$)。结论:ADMA 诱导了 HUVEC 中 miR-21 表达及细胞衰老,miR-21 介导了 ADMA 诱导的内皮细胞衰老作用,其机制可能与其抑制 SOD2 表达有关。

关键词 MicroRNA-21;ADMA;内皮细胞衰老

中图分类号:R543.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)13-2405-04

Effects of Asymmetric Dimethylarginine on Expression of microRNA-21 in Endothelial Cells*

LIAO Qing-chi¹, HU Yan-li², ZHOU Sheng-hua^{1△}

(1 Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital Affiliated with Central South University 410011 Changsha, China;

2 Surgical Department, Hunan Mawangdui Hospital, 410011, Changsha, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the expression of microRNA-21 (miR-21) in endothelial cells in order to explore the role of miR-21 in ADMA-induced endothelial cell senescence. **Methods:** After human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated with 10 μM ADMA for 48 hours, the cells were collected for extraction of total RNA and protein. Fluorescence quantitative real-time PCR was applied to determine the expression of miR-21 in HUVECs. Western Blot was used to detect the expression of superoxide dismutase 2 (SOD2) in HUVECs, and senescence associated galactosidase (SA-β-gal) staining was employed to identify the senescent endothelial cells. Then after the transfection of miR-21 inhibitors for 6 hours, HUVEC were incubated with 10 μM ADMA for 48 hours, and then the cells were collected for the determination of miR-21 and SOD2 expression and senescent endothelial cells according to the above-mentioned methods. **Results:** After HUVECs were incubated with ADMA, the expression of miR-21 was increased significantly ($P<0.01$) and meanwhile the number of SA-β-gal positive endothelial cells were elevated ($P<0.05$), while the SOD2 expression decreased ($P<0.01$); After the transfection of miR-21 inhibitors the ADMA-induced miR-21 expression in HUVECs was significantly reduced and meanwhile the number of SA-β-gal positive endothelial cells decreased while the SOD2 expression was significantly increased (all $P<0.01$). **Conclusions:** ADMA induced the expression of miR-21 in HUVECs and endothelial cell senescence, further miR-21 mediated the endothelial cell senescence induced by ADMA. This mechanism might be related to the inhibition of miR-21 on SOD2 expression.

Key words: MicroRNA-21; Asymmetric dimethylarginine; Endothelial cell senescence

Chinese Library Classification(CLC): R543.3 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)13-2405-04

前言

内皮衰老是动脉粥样硬化及冠状动脉疾病进展的重要危险因素。研究表明非对称性二甲基精氨酸(ADMA)可通过增加活性氧族(ROS)等机制促进内皮细胞衰老^[1],目前已成为预测

心血管疾病的独立危险因素。MicroRNA 是一类非编码的单链微小 RNA,在控制早期胚胎发育、细胞分化、细胞增值、细胞衰老等各种生物过程中起重要作用。最近研究显示 microRNA-21 (miR-21)可通过抑制内皮祖细胞中超氧化物歧化酶 2(SOD2)表达而增加 ROS 水平,进一步研究发现 ADMA 可诱导内皮祖

* 基金项目:国家自然科学基金 资助项目(30871053)

作者简介:廖清池(1977-)男,博士研究生,主治医师,主要研究方向: microRNA 与血管内皮功能失调,

电话:13507451650 E-mail: lqchyl@gmail.com.

△通讯作者:周胜华 E-mail: zxccllenthyl@gmail.com.

(收稿日期:2011-03-03 接受日期:2011-03-27)

细胞中 miR-21 的表达^[2]。此外研究证实衰老的内皮细胞中存在 miR-21 的高度表达^[3]。因此我们推测 ADMA 可能通过促进 miR-21 表达, 进一步增加 ROS 水平而诱导内皮细胞衰老。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

ADMA、X-Gal 及胎牛血清购于 Sigma 公司, DMEM 购于 Gibco 公司, 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购于 ATCC (CRL-1730) miR-21 抑制剂购于上海吉玛有限公司, 鼠抗人 SOD2 及 GAPDH 抗体购于 Santa Cruz 生物技术公司, ECL 化学发光检测试剂盒购于碧云天生物技术公司, TRIZOL 试剂购于 Invitrogen 公司, Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit、TaqMan MiR-21 Assays 以及 TaqMan U6 snRNA assay 均购于 ABI 公司。

1.2 细胞培养

HUVEC 用含 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基, 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 隔天换液, 生长至 80% 融合时接种于 6 孔板, 接种密度为 1×10⁶/孔。待细胞贴壁生长占 50-60% 孔板底面积时, 随机分为对照组及 ADMA 处理组 (10 μM), 处理 48 小时检测各项指标, 每组重复 3 孔, 共进行 3 次实验。

1.3 MiR-21 抑制剂转染细胞

参照脂质体 2000 转染试剂说明书转染 HUVEC, 简要步骤如下: 将生长良好的 HUVEC 种植在 6 孔板中 (约 4×10⁴ 细胞/孔), 加入不含血清的 DMEM 培养基培养 24 小时, 待细胞融合达 50% 进行细胞转染; 用适量低血清培养基稀释适量的 miR-21 抑制剂, 轻轻混匀室温下孵育 5 分钟; 将稀释后的 miR-21 抑制剂和转染试剂按比例混匀, 室温下孵育 20 分钟; 吸尽培养板中原有细胞培养基, 加入终浓度为 50 nM 的 miR-21 抑制剂及阴性对照转染 6 小时; 吸去细胞上清, 无菌 PBS 洗 2 遍后每孔加入终浓度为 10 μM 的 ADMA 在 DMEM (含 10% 血清) 完全培养基中继续培养 48 小时。

1.4 细胞总 RNA 的提取及完整性检测

参照 TRIZOL 说明书提取细胞总 RNA。应用紫外分光光度计在 260nm 及 280nm 波长下检测总 RNA 的 OD 值, 若 OD 260/280 比值在 1.8-2.0 则提示所提总 RNA 纯度较好, 并计算 RNA 的含量。然后应用 2% 的琼脂糖电泳检测总 RNA 完整性, 若可见 28s 及 18s 条带, 表示 RNA 完整。经检测 RNA 符合要求后用于后续实验。

1.5 MiR-21 及内参 U6 cDNA 的制备

遵照 ABI 公司的 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 试剂说明书进行操作, 在同一管中进行 miRNA-21 及 U6 逆转录反应, 采用无菌无酶耗材, 严格无酶操作, 所有操作在冰上完成。15 μl 逆转录反应体系包括: 100 mM dNTP 0.15 μl, 50 U/μl MultiScribe 逆转录酶 1 μl, 10×RT Buffer 1.5 μl, 20 U/μl RNA 酶抑制剂 0.19 μl, 总 RNA 及无 RNA 酶水共 6.16 μl, miRNA-21 及 U6 的 RT 特异性逆转录引物各 3 μl。逆转录条件为 16℃ 30 分钟, 42℃ 30 分钟, 85℃ 5 分钟, 4℃ 5 分钟。

1.6 MiR-21 及内参 U6 的荧光定量 RT-PCR 检测

采用 ABI 公司相关检测试剂盒在荧光定量 PCR 仪 (ABI 7300) 上进行 miRNA-21 及 U6 的定量检测, 每个样本重复三

次。20 μl 反应体系包括: TaqMan MicroRNA Assays (20×) 1 μl, cDNA 1.33 μl, TaqMan 2×Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) 10 μl, Nuclease-free water 7.67 μl。PCR 反应条件: 95℃ 10 分钟, 40 个 PCR 循环 (95℃ 15 秒, 60℃ 60 秒)。分析扩增曲线及溶解曲线, 剔除不合适的扩增样本, 将符合要求的 miR-21 及 U6 原始数据 (采用系统自动分析软件获取 Ct 值) 取 3 次重复的平均值, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 miR-21 的相对表达量。

1.7 SOD2 及内参 GAPDH 的 Western-blot 检测

按常规方法提取细胞总蛋白, 然后进行蛋白定量。根据 SOD2 分子量配置 12% 的凝胶进行电泳, 然后转膜。室温封闭 2 小时, 然后与一抗 (1:1000) 在 37℃ 孵育 2 小时, 弃去一抗, 加入二抗在 37℃ 孵育 2 小时。然后置于暗室中应用 ECL 化学发光法显影, 定影, 晾干, 拍照, 在成像分析仪下使用 BandsScan 图像分析软件分析结果。

1.8 衰老相关 β-半乳糖酐酶 (SA-β-gal) 染色

按 Dimri GP 等^[4]的方法进行 SA-β-gal 活性检测, 步骤如下: (1) 配制 SA-β-gal 染色液: 首先配制 50 mmol/L 的铁氰化钾、亚铁氰化钾、1.5 mol/L 的氯化钠、400 mmol/L 的枸橼酸钠和 1 mol/L 的氯化镁, 然后分别取上述液体 10 ml、10 ml、10 ml、10 ml、0.2 ml, 加双蒸水至 100 ml 并以 1 mol/L 的磷酸二氢钠调整 pH 值至 6.0, 取 100 mg 半乳糖苷 (X-Gal) 溶于盛有 5 ml 二甲亚砜 (DMSO) 的聚丙烯容器中, 配成 20 mg/ml 的 X-Gal 溶液, 将第一步所配溶液的 95 ml 与 5 ml 20 mg/ml 的 X-Gal 溶液充分混匀即得 SA-β-gal 染色液; (2) 每孔培养板中细胞用磷酸缓冲液冲洗后加入 2% 多聚甲醛固定 5 分钟, 然后再用缓冲液冲洗, 再加入适量上述染色液于 37℃ 烤箱中染色 24 小时; (3) 数码相机拍照; (4) 图像分析系统分析, 根据 1000 个细胞中染成蓝色细胞的个数计算衰老内皮细胞的百分比。

1.9 统计学分析

所有实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对计量资料进行正态性检验。组间比较采用 one-way ANOVA 分析法 (分析前先进行方差齐性检测), 两两比较应用 LSD-t 检验, 双侧 $P < 0.05$ 有统计学意义。所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 MiR-21 抑制剂阴性对照转染效率

为使 miR-21 稳定转染 HUVEC, 实验中我们将 miR-21 抑制剂阴性对照稀释成 10, 30, 50, 100 nM 分别转染细胞, 结果发现 30 nM 以上浓度的 miR-21 抑制剂阴性对照均能稳定转染内皮细胞 (转染效率大于 80%), 因此, 在后续实验中我们应用 50 nM 的 miR-21 抑制剂转染细胞。

2.2 荧光定量 RT-PCR 扩增效率及溶解曲线分析

MiR-21 及内参 U6 的荧光定量 RT-PCR 扩增效率相似, 其溶解曲线均为单峰, 表明相关 PCR 扩增产物特异性好, 无杂带及引物二聚体等影响实验结果, 可以应用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算 miR-21 的相对表达量。

2.3 ADMA 对 HUVEC 中 miR-21 表达的影响

HUVEC 与 10 μM 的 ADMA 孵育后 miR-21 表达量明显高于对照组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

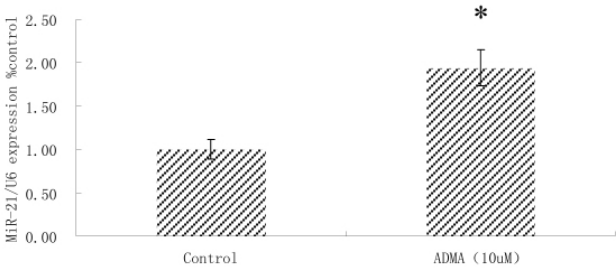


图 1 ADMA 对 HUVEC 中 miR-21 表达的影响

Fig. 1 Effects of ADMA on the expression of miR-21 in HUVECs

*P<0.01 ,与对照组比较

*P<0.01 compared with control group

2.4 ADMA 对 HUVEC 中 SOD2 表达的影响

HUVEC 与 10 μ M 的 ADMA 孵育后 SOD2 蛋白表达量明显低于对照组 ,其差异有统计学意义(P<0.01)(图 2)。

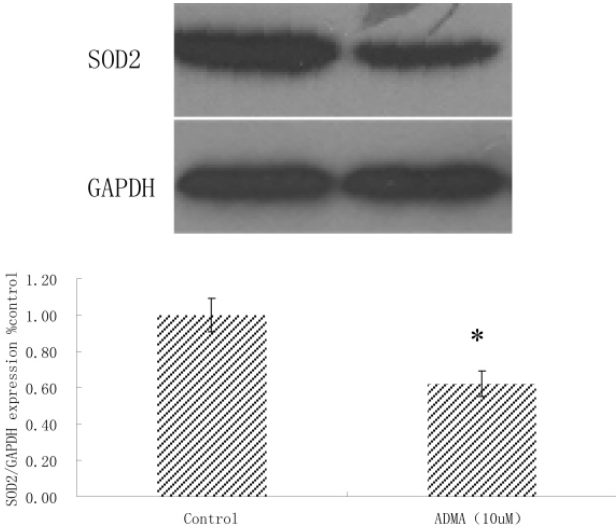


图 2 ADMA 对 HUVEC 中 SOD2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of ADMA on the expression of SOD2 protein in HUVECs

*P<0.01 ,与对照组比较

*P<0.01 compared with control group

2.5 ADMA 对 HUVEC 衰老的影响

HUVEC 与 10 μ M 的 ADMA 孵育后衰老的内皮细胞数量明显高于对照组 ,其差异有统计学意义(P<0.05)(图 3)。

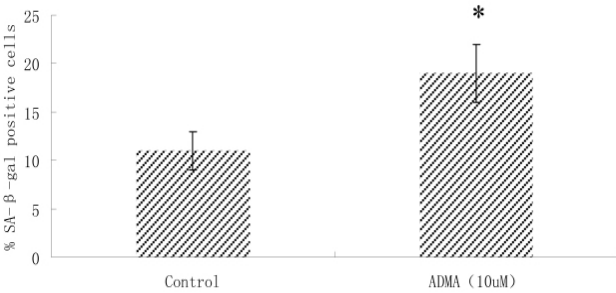


图 3 ADMA 对 HUVEC 衰老的影响

Fig. 3 Effects of ADMA on the senescence of HUVECs

*P<0.05 ,与对照组比较

*P<0.05 compared with control group

2.6 MiR-21 抑制剂转染对 HUVEC 中 miR-21 表达的影响

MiR-21 抑制剂转染后 HUVEC 中 miR-21 表达量明显低于阴性对照组 ,其差异有统计学意义(P<0.01)(图 4)。

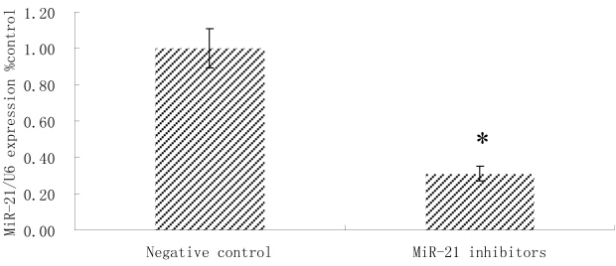


图 4 MiR-21 抑制剂转染对 ADMA 诱导的 HUVEC 中 miR-21 表达的影响

Fig. 4 Effects of transferring miR-21 inhibitors on ADMA-induced miR-21 expression in HUVECs

*P<0.01 ,与阴性对照组比较

*P<0.01 compared with negative control group

2.7 MiR-21 抑制剂转染对 HUVEC 中 SOD2 表达的影响

MiR-21 抑制剂转染后 HUVEC 中 SOD2 表达量明显高于阴性对照组 ,其差异有统计学意义(P<0.01)(图 5)。

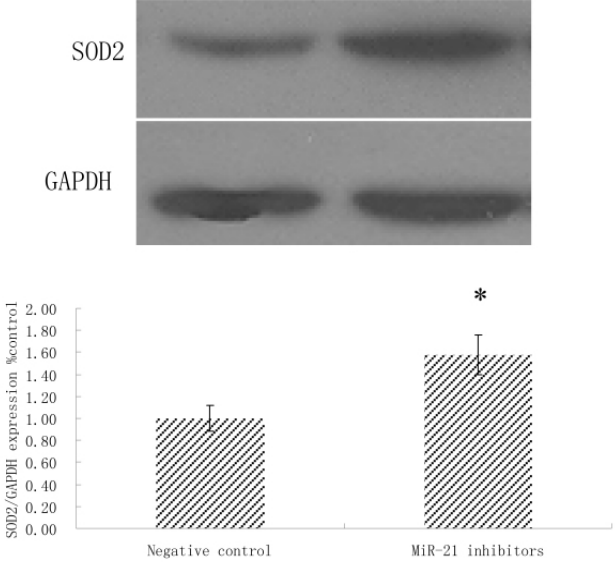


图 5 MiR-21 抑制剂转染对 ADMA 诱导的 HUVEC 中 SOD2 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of transferring miR-21 inhibitors on ADMA-induced SOD2 protein expression in HUVECs

*P<0.01 ,与阴性对照组比较

*P<0.01 compared with negative control group

2.8 MiR-21 抑制剂转染对 HUVEC 衰老的影响

MiR-21 抑制剂转染后衰老的 HUVEC 数量明显低于阴性对照组 ,其差异有统计学意义(P<0.01)(图 6)。

3 讨论

内皮衰老即内皮的增龄性变化 ,是内皮功能失调的独立危险因素之一[5]。细胞衰老的特征之一是在 Ph 值为 6.0 的条件下 SA-β-G-al 染色阳性 ,该特征是少数已被广为接受的细胞衰老的

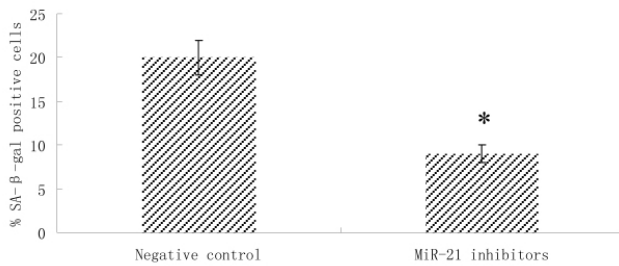


图 6 MiR-21 抑制剂转染对 ADMA 诱导的 HUVEC 衰老的影响

Fig. 6 Effects of transferring miR-21 inhibitors on ADMA-induced senescence of HUVECs

* $P < 0.01$ 与阴性对照组比较

* $P < 0.01$ compared with negative control group

生物学标志物之一。ADMA 是一氧化氮合酶最主要的内源性抑制剂^[6], 研究表明它可加速内皮细胞衰老^[7]。我们目前的研究亦表明 ADMA 可增加 SA-β-Gal 染色阳性内皮细胞数目, 即促进了内皮细胞衰老。因此 ADMA 可能通过促进内皮细胞衰老导致内皮功能失调。

目前 ROS 介导血管内皮细胞衰老已成为较为公认的学说^[8], 而 ADMA 可增加内皮细胞内 ROS 水平, 因此 ADMA 可能通过增加 ROS 水平促进了血管内皮细胞衰老。SOD2 是抵御氧化应激损害的关键酶, 它能促进超氧阴离子代谢, 抑制氧化应激, 减少细胞内 ROS 水平。我们目前的实验发现 ADMA 可显著抑制 HUVEC 中 SOD2 表达, 推测进一步增加了 ROS 水平。然而 ADMA 如何增加 ROS 水平的具体机制仍未完全阐明。

MiR-21 是一类非编码的单链微小 RNA, 已成为肿瘤研究领域的热点^[9, 10]。近来研究表明 miR-21 与心脏多种病理生理过程有关, 参与了心肌肥大增殖、氧化应激、缺血预适应等过程的调控^[11, 12]。最近 Menghini R 等研究发现 miR-21 与内皮细胞衰老关系密切, 衰老的 HUVEC 中 miR-21 表达明显升高^[3]。我们目前的实验结果亦显示 ADMA 在促进 HUVEC 衰老的同时升高了 miR-21 水平, 推测 ADMA 可能通过增加 miR-21 表达而促进血管内皮细胞衰老。我们进一步研究发现, 应用抑制剂沉默 HUVEC 中 miR-21 表达可显著抑制内皮细胞衰老, 首次证实 miR-21 介导了 ADMA 诱导的内皮细胞衰老。为进一步探讨 miR-21 介导 ADMA 诱导的内皮细胞衰老的机制, 我们检测了内皮细胞中 SOD2 的表达, 结果发现 miR-21 抑制剂转染逆转了 ADMA 诱导的 SOD2 表达减少, 而 SOD2 表达增加可导致细胞内 ROS 水平下降, 进一步抑制内皮细胞衰老。因此 ADMA 可能通过增加 miR-21 水平, 进一步抑制 SOD2 表达而诱导内皮细胞衰老。

综上所述, 我们目前的实验表明 ADMA 诱导了 HUVEC 中 miR-21 的表达及内皮细胞衰老, 并首次发现 miR-21 介导了 ADMA 诱导的内皮细胞衰老作用, 其机制可能与其抑制 SOD2 表达有关。

参考文献(References)

- [1] Liao Q, Li X, Zhou S, et al. Estrogen Treatment Inhibits Vascular Endothelial Senescence and Asymmetrical Dimethylarginine(ADMA) in Ovariectomized Rabbits [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 57(2): 174-182
- [2] Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, et al. Asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism [J]. Circ Res, 2010, 107(1): 138-143
- [3] Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1 [J]. Circulation, 2009, 120(15): 1524-1532
- [4] Dimri G P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367
- [5] Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis [J]. Circ Res, 2007, 100(1): 15-26
- [6] De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule [J]. Med Sci Monit, 2009, 15(4): RA91-101
- [7] Bode-Boger S M, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence [J]. Vasc Med, 2005, 10 Suppl 1S65-S71
- [8] Kurz D J, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 11): 2417-2426
- [9] Selcuklu S D, Donoghue M T, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4): 918-925
- [10] Walter B A, Gomez-Macias G, Valera V A, et al. miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis [J]. J Cancer, 2011, 2: 67-75
- [11] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1): 5-14
- [12] Cheng Y, Zhu P, Yang J, et al. Ischaemic preconditioning regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4 [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(3): 431-439

(上接第 2450 页)

- [17] Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection [J]. Arthritis Rheum. 2000, 43(9): 2121-131
- [18] Tsai SH, Sheu MT, Liang YC, et al. TGF-beta inhibits IL-1beta-activated PAR-2 expression through multiple pathways in human primary

synovial cells. J Biomed Sci. 2009;23;16:97

- [19] Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2007, 15(6):597-604
- [20] Yang X, Chen L, Xu X, et al. TGF-beta/Smad-3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage [J]. J Cell Biol, 2001, 153(1):35-46