

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.011

MicroRNA-495 对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达的影响 *

刘 丹 刘美丽 刘艳霞 田孝祥 齐艳萍

(沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:探讨 MicroRNA-495(miR495)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响。**方法:**体外分离培养 HUVECs, 将 HUVECs 铺至 6 孔板中, 待细胞融合至 80 % 时, 将 miR495 模拟物(miR495 mimics)、miR495 抑制剂(miR495 inhibitor)及其相应的对照 negative control(NC)、inhibitor NC 分别转染到 6 孔板的 HUVECs 中, 于转染后不同时间点(12 h、24 h 和 48 h)收集细胞进行 RNA 及蛋白提取。荧光定量 PCR 方法检测 HUVECs 中 miR495 及 ICAM-1 基因 mRNA 表达。Western blotting 检测 HUVECs 中 ICAM-1 蛋白表达。**结果:**(1)与 NC 组比较, miR495 mimics 组中 miR495 水平显著升高;与 inhibitor NC 组比较, miR495 inhibitor 组中 miR495 表达明显下降。(2)与 NC 组比, miR495 mimics 组明显降低 HUVECs 中 ICAM-1 的 mRNA 及蛋白表达;与 inhibitor NC 组比, 而 miR495 inhibitor 组能显著增加 HUVECs 中 ICAM-1 的 mRNA 及蛋白表达。**结论:**miR495 能降低 HUVECs 中 ICAM-1 基因 mRNA 和蛋白表达。

关键词:MicroRNA-495;人脐静脉内皮细胞;细胞间粘附分子-1;动脉粥样硬化

中图分类号:R-33;R543.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)12-2253-04

Effect of MicroRNA-495 on the Expression of ICAM-1 in the HUVECs*

LIU Dan, LIU Mei-li, LIU Yan-xia, TIAN Xiao-xiang, QI Yan-ping

(Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Command, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA-495 (miR495) on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** HUVECs cells cultured in vitro were plated into 6-well plate, when cells were grown to 80 %, miR495 mimics, miR495 inhibitor or negative control (NC), inhibitor NC was transfected into HUVECs. At different time points after transfection (12 h, 24 h and 48 h), HUVECs were collected for RNA and protein extraction. The mRNA expressions of miR495 and ICAM-1 were examined using quantitative real time RT-PCR. ICAM-1 protein expression was examined using western blotting. **Results:** (1) Compared with NC group, miR495 expression was significantly higher in miR495 mimics group; Compared with inhibitor NC group, miR495 expression was significantly decreased in miR495 inhibitor group. (2) Compared with NC, miR495 significantly inhibited the mRNA and protein expressions of ICAM-1 in HUVECs; Compared with inhibitor NC, miR495 inhibitor significantly increased the mRNA and protein expressions of ICAM-1 in HUVECs. **Conclusions:** MiR495 could affect ICAM-1 expression in HUVECs.

Key words: MicroRNA-495 (miR495); Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1); Atherosclerosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2253-04

前言

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是遗传因素和环境因素相互作用、相互影响的一种复杂病理过程, 是许多心血管疾病的发病基础^[1-4]。血管内皮细胞功能障碍在 AS 发病中具有重要作用, 当血管内皮细胞功能障碍时, 单核细胞和内皮细胞发生粘附, 这些变化是 AS 形成的始动环节^[5,6]。细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)在淋巴细胞迁移和活化中起重要作用, 其表达异常是内皮细胞功能障碍的标志之一, 提示 ICAM-1 在 AS 的发病机制中起重要作用^[7,8]。因此,

研究影响 ICAM-1 表达的分子及相关机制, 对于 AS 的防治至关重要。

MicroRNAs 是一类序列保守的非编码 RNA, 在 AS 等心血管疾病中发挥重要作用^[9-12]。MicroRNA-495(miR495)在肿瘤性疾病中研究的较为广泛, 在胃癌及白血病的患者中 miR495 表达下调^[13]。在胃癌细胞株中, 过表达 miR495 可以抑制胃癌细胞株的增殖并促进其凋亡^[14], 提示 miR-495 在肿瘤细胞增殖和凋亡中发挥重要作用。本室前期研究显示 miR495 可通过抑制靶基因 CCL2 表达促进内皮细胞增殖并抑制内皮细胞凋亡, 提示 miR495 在 AS 发生发展中可能有重要作用^[15], 然而, miR495

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81500282); 辽宁省自然科学基金项目(20170540929)

作者简介: 刘丹(1986-), 女, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 冠心病的防治研究, 电话: 024-83951988, E-mail: ljmuier@sina.com

(收稿日期: 2017-10-24 接受日期: 2017-11-18)

对内皮细胞 ICAM-1 表达的影响目前还尚不明确。本实验主要探讨了 miR495 过表达和低表达对内皮细胞 ICAM-1 基因 mRNA 和蛋白表达的影响, 以期为深入阐明 AS 发病机制提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的培养

从新生儿脐带中分离并提取 HUVECs, 具体分离方法如文献所述^[16]。用含有 10% 胎牛血清和生长因子的内皮细胞专用培养基进行培养, 显微镜下观察细胞状态。根据情况每隔 2-3 天更换新鲜培养液。本研究所用标本家属均签署知情同意书, 并得到本院伦理委员会同意和批准。

1.2 HUVECs 转染

将 HUVECs 铺至 6 孔板中, 待细胞融合至 80% 左右时, 应

用 HiPerFect transfection reagent 转染试剂(Qiagen, 德国)将不同浓度(25、50 和 100 pmol)的 miR495 模拟物(miR495 mimics), miR495 抑制剂(miR495 inhibitor)及其相应的阴性对照 negative control (NC)及 inhibitor NC 分别转染至 HUVECs 中。MiR495 mimics, miR495 inhibitor, NC 及 inhibitor NC 均购买于上海吉玛公司。每组设置 5 个附孔, 重复 3 次。转染后不同时间点(12 h, 24 h 和 48 h)收集细胞并提取 RNA 和蛋白。

1.3 荧光定量 PCR 检测 miR495 及 ICAM-1 基因表达

应用 Trizol 方法提取 HUVECs 总 RNA, 并对其浓度和纯度进行检测。下载人 ICAM-1 基因的 mRNA 序列(NM_000201)和 β -actin 的序列, 利用 NCBI primer blast 网站设计 ICAM-1 基因荧光定量 PCR 引物, 序列送至北京华大公司合成, 具体序列见表 1。MiR495 及其对照 U6 基因引物购买于复能基因公司。荧光定量 PCR 法检测 HUVECs 中 miR495 及 ICAM-1 基因 mRNA 表达, 基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来表示^[17]。

表 1 人 ICAM-1 及 β -actin 基因荧光定量 PCR 引物
Table 1 The primer sequences for human ICAM-1 and β -actin gene

Gene	Forward primer	Reverse primer
ICAM-1	CCGGAAGGTGTATGAAGT	TCCATGGTGATCTCTCCT
β -actin	AGCGAGCATCCCCAAAGTT	GGGCACGAAGGCTCATCATT

1.4 Western blotting 检测 HUVEC 中 ICAM-1 蛋白表达

应用蛋白裂解液(Thermo)裂解细胞 20 min, 期间用漩涡振荡器震荡 2-3 次。将裂解物置于低温离心机中离心 15 min(4℃、12000 rpm), 将上清转移至一新的 1.5 mL 离心管中, 为提取的蛋白。采用 BCA 法对其浓度进行检测。SDS-PAGE 胶对 40 μ g 蛋白进行电泳。半干法转膜。使用 5% 脱脂奶粉进行封闭 1 h。一抗使用 ICAM-1 和 β -actin 抗体(Abcam, 美国), 封闭过夜, 次日进行二抗孵育, 最后应用 ECL 对膜进行显影, 暗室中压胶片。对胶片进行扫描, 并应用 Image-Pro Plus 6.0 及 GraphPad Prism 5 软件进行灰度及统计学分析。

1.5 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5 软件对各组数据进行作图, 应用 SPSS 23.0 软件对各组数据进行统计处理, 采用独立样本 t 检验对组间差异进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVECs 中 miR495 的表达

将 miR495 mimics、miR495 inhibitor 及各自对照 NC、inhibitor NC 分别转染至 HUVECs 48 h 后, 提取 RNA 并通过荧光定量 PCR 法检测 miR495 表达。结果显示: 与 NC 组比较, 转染 miR495 mimics 组中 miR495 表达明显增加, 并随着 miR495 mimics 浓度的增加而增加, 当 miR495 mimics 浓度为 100 pmol 时, miR495 的表达量达到最大值, 约为对照组的 13 倍(图 1 A); 与 inhibitor NC 组相比较, miR495 inhibitor 组中 miR495 表达明显下降, 并随着 miR495 inhibitor 浓度的增加而降低, 当 miR495 inhibitor 浓度为 100 pmol 时, miR495 表达量达到最低值, 为对照组的 0.235 倍(图 1 B)。因此, 选择 100 pmol 作为 miR495 mimics 和 miR495 inhibitor 的后续实验浓度。

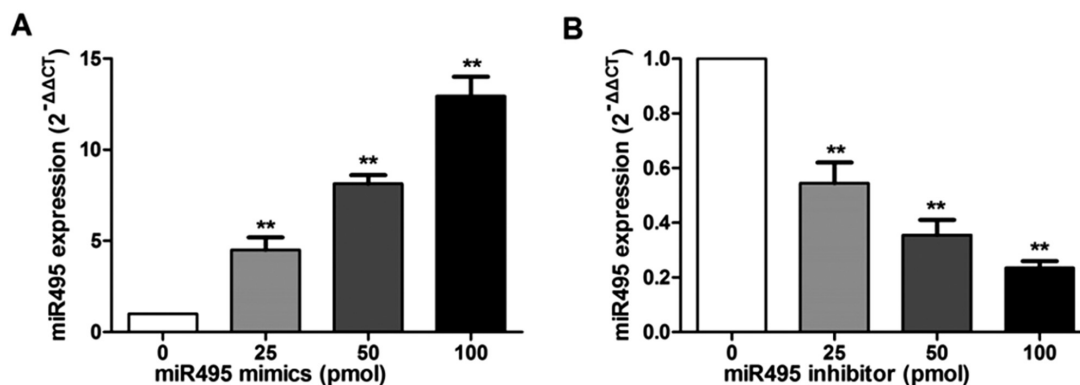


图 1 HUVECs 中 miR495 的表达

Fig.1 Expressions of miR495 in HUVECs

A indicates miR495 expression in HUVECs with miR495 mimics transfection. B indicates miR495 expression in HUVECs with miR495 inhibitor transfection. ** $P < 0.01$ (miR495 mimics vs. NC, miR495 inhibitor vs. inhibitor NC)

2.2 MiR495 对 HUVECs 中 ICAM-1 基因 mRNA 表达的影响

与 NC 组相比,miR495 mimics 转染后 12 h,HUVECs 中 ICAM-1 基因 mRNA 表达有降低的趋势,但无统计学差异。随转染时间的延长,ICAM-1 表达逐渐降低,转染 48 h 时,

ICAM-1 表达最低,为 NC 组的 0.36 倍(图 2 A);与 inhibitor NC 组相比,miR495 inhibitor 在转染 24 h 后能增加 ICAM-1 基因表达,转染 48 h 时 ICAM-1 基因 mRNA 表达最高,为 inhibitor NC 组的 2.1 倍(图 2 B)。

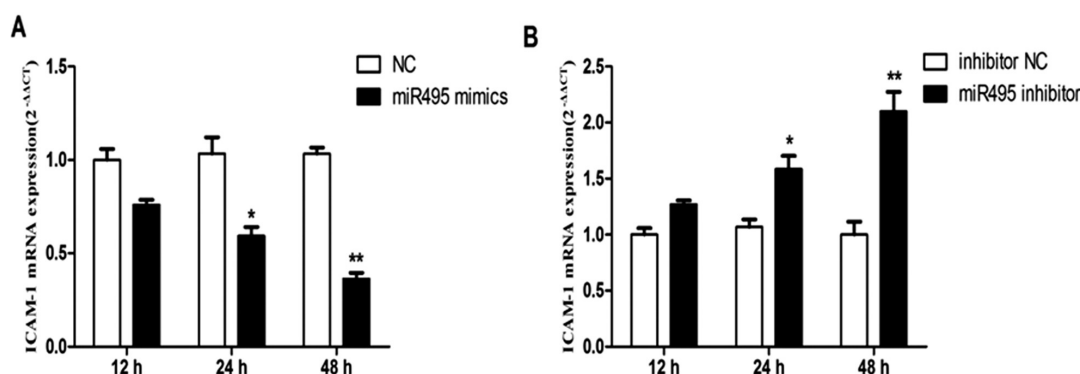


图 2 荧光定量 PCR 检测 HUVECs 中 ICAM-1 基因 mRNA 表达

Fig.2 Expression of ICAM-1 mRNA in HUVECs was examined by quantitative PCR

A indicates ICAM-1 expression in HUVECs with miR495 mimics transfection at different point time (12 h, 24 h and 48 h). B indicates ICAM-1 expression in HUVECs with miR495 inhibitor transfection at different point time (12 h, 24 h and 48 h). * $P<0.05$ (miR495 mimics vs. NC, miR495 inhibitor vs. inhibitor NC), ** $P<0.01$ (miR495 mimics vs. NC, miR495 inhibitor vs. inhibitor NC)

2.3 MiR495 对 HUVECs 中 ICAM-1 蛋白表达影响

为进一步明确 miR495 对 HUVECs 中 ICAM-1 表达水平的影响,应用 western blotting 方法检测 HUVECs 转染 miR495 mimics, miR495 inhibitor 后 48 h 时 ICAM-1 蛋白表达。结果发

现:与 NC 组相比,miR495 mimics 能明显抑制 HUVECs 中 ICAM-1 蛋白表达;相反,与 inhibitor NC 组相比,miR495 inhibitor 能显著增加 HUVECs 中 ICAM-1 蛋白表达(图 3)。

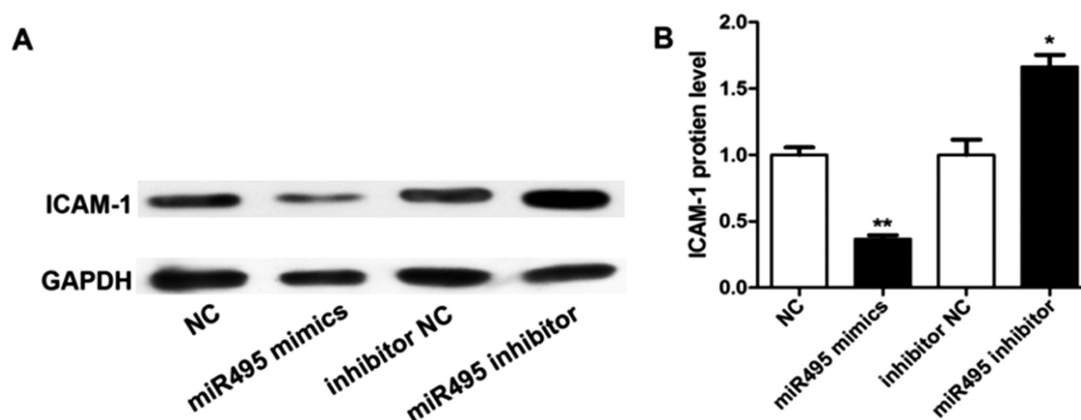


图 3 Western blotting 检测 HUVECs 中 ICAM-1 蛋白表达

Fig. 3 Expression of ICAM-1 protein in HUVECs with miR495 mimics or miR495 inhibitor transfection

A indicates the western blotting for ICAM-1, B indicates the protein levels of ICAM-1. * $P<0.05$ (miR495 inhibitor vs. inhibitor NC), ** $P<0.01$ (miR495 mimics vs. NC).

3 讨论

内皮细胞功能异常在 AS 等心血管疾病中具有重要作用。氧化应激、炎症反应、高脂、高糖等许多病理因素均可引起内皮细胞功能障碍及脂质代谢异常,引起粘附分子 ICAM-1、趋化因子单核细胞趋化蛋白-1 及其他促炎因子等表达增加,进而导致单核细胞浸润、脂质沉积,最终导致 AS^[18-20]。在经高脂喂养的 ApoE^{-/-} 动物模型中,粘附分子 ICAM-1 在斑块部位明显高表达,并且主要在内皮细胞中表达。可溶性 ICAM-1 在冠心病患者血浆中表达较正常对照组明显增加,同时 ICAM-1 表达的高

低程度可作为评价冠状动脉病变程度的一个指标^[21]。上述研究结果均表明 ICAM-1 在 AS 发生发展中发挥重要作用。因此,寻找能影响内皮细胞中 ICAM-1 表达的因素,对于 AS 的防治至关重要。

MiRNAs 是一大类序列保守的小分子非编码 RNA,通过调控靶基因的表达参与许多病理生理过程,包括心血管疾病、肿瘤、炎症性疾病等^[22-24]。MiR495 在肿瘤性疾病中研究的较多,miR495 可以通过抑制靶基因表达参与对肿瘤细胞的增殖和凋亡^[25-27]。我们前期实验提示冠心病患者血浆中 miR495 的表达较正常对照人群明显降低,提示 miR495 在 AS 中可能具有重

要作用。

本研究以 HUVECs 作为内皮细胞模型, 将 miR495 mimics、miR495 inhibitor 及各自的对照转染至 HUVECs 中, 荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测检测各组 ICAM-1 基因 mRNA 和蛋白表达以明确 miR495 对 ICAM-1 表达的影响。结果显示 miR495 可显著抑制 HUVECs 中 ICAM-1 表达, 表明 miR495 可能通过调控 HUVECs 中 ICAM-1 表达来参与 AS 等心血管疾病的发病, 但具体机制尚不明确。前期我们通过双荧光素酶报告基因实验以及细胞水平过表达和低表达实验证实 CCL2 是 miR495 的直接下游靶基因, 并且 miR495 可通过抑制 CCL2 表达来促进 HUVECs 增殖和抑制 HUVECs 凋亡^[15]; 此外, 我们还发现过表达 CCL2 后能显著增加 HUVECs 中 ICAM-1 的表达^[28], 然而 miR495 是否通过抑制 CCL2 的表达来影响 HUVECs 中 ICAM-1 表达还不明确。因此, 我们拟在细胞水平进一步证实 miR495 是否通过调控 CCL2 表达来抑制 ICAM-1 表达。同时, 由于 miR495 下游靶基因有很多个, 我们还将继续利用生物信息学预测和筛选 miR495 的其他下游靶基因, 并进一步证实两者对 HUVECs 中 ICAM-1 表达的影响。

综上所述, 本研究证实 miR495 可显著抑制 HUVECs 中 ICAM-1 表达, 可能为防治 AS 提供理论依据和新的思路策略。

参考文献(References)

- [1] Luscher TF. Atherosclerosis, neoatherosclerosis, and vascular disease [J]. Eur Heart J, 2015, 36(32): 2121-2123
- [2] Jones Buie JN, Goodwin AJ, Cook JA, et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors [J]. Atherosclerosis, 2016, 254: 271-281
- [3] Loyer X, Mallat Z, Boulanger CM, et al. MicroRNAs as therapeutic targets in atherosclerosis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(4): 489-496
- [4] Oesterle A, Bowman MA. S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(12): 2496-2507
- [5] Otsuka F, Finn AV, Yazdani SK, et al. The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting [J]. Nat Rev Cardiol, 2012, 9(8): 439-453
- [6] Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis[J]. Circ Res, 2011, 109(5): 593-606
- [7] Zhao W, Wu C, Chen X. Cryptotanshinone Inhibits oxidized LDL-Induced Adhesion Molecule Expression via ROS Dependent NF-kappaB Pathways[J]. Cell Adh Migr, 2016, 10(3): 248-258
- [8] Kim MH, Kang HM, Kim CE, et al. Ramipril Inhibits High Glucose-Stimulated Up-Regulation of Adhesion Molecules Via the Erk1/2 MAPK Signaling Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. Cell Mol Biol Lett, 2015, 20(5): 937-947
- [9] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 703-720
- [10] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14
- [11] Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology[J]. Semin Liver Dis, 2015, 35(1): 3-11
- [12] Hartmann P, Schober A, Weber C. Chemokines and microRNAs in atherosclerosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(17): 3253-3266
- [13] Jiang X, Huang H, Li Z, et al. MiR-495 is tumor-suppressor microRNA down-regulated in MLL-rearranged leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(47): 19397-19402
- [14] Li Z, Cao Y, Jie Z, et al. MiR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3[J]. Cancer Lett, 2012, 323(1): 41-47
- [15] Liu D, Zhang XL, Yan CH, et al. MicroRNA-495 regulates the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by targeting chemokine CCL2[J]. Thromb Res, 2015, 135(1): 146-154
- [16] Lei J, Peng S, Samuel SB, et al. A simple and biosafe method for isolation of human umbilical vein endothelial cells [J]. Anal Biochem, 2016, 508: 15-18
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [18] Zakkar M, Angelini GD, Emanueli C. Regulation of Vascular Endothelium Inflammatory Signalling by Shear Stress [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2016, 14(2): 181-186
- [19] Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(3): 485-491
- [20] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation[J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193
- [21] Postadzhiyan AS, Tzontcheva AV, Kehayov I, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes [J]. Clin Biochem, 2008, 41 (3): 126-133
- [22] Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, et al. MiRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15(11): 1444-1455
- [23] Navickas R, Gal D, Laucevičius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review[J]. Cardiovasc Res, 2016, 111(4): 322-337
- [24] Zhao Y, Song Y, Yao L, et al. Circulating microRNAs: Promising Biomarkers Involved in Several Cancers and Other Diseases[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(2): 77-94
- [25] Wang C, Yun Z, Zhao T, et al. MiR-495 is a Predictive Biomarker that Downregulates GFII Expression in Medulloblastoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(4): 1430-1439
- [26] Wang L, Liu JL, Yu L, et al. Downregulated miR-495 [Corrected] Inhibits the G1-S Phase Transition by Targeting Bmi-1 in Breast Cancer [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(21): e718
- [27] Nie S, Li K, Huang Y, et al. miR-495 mediates metabolic shift in glioma cells via targeting Glut1 [J]. J Craniofac Surg, 2015, 26(2): e155-e158
- [28] 刘丹, 田孝祥, 张效林, 等. 趋化因子 CCL2 对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 26(4): 5024-5027

Liu Dan, Tian Xiao-xiang, Zhang Xiao-lin. Effects of C-C motif ligand 2 on the expression of ICAM-1 of human umbilical vein endothelial cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 26 (4): 5024-5027