

血管 microRNAs 的研究进展

刘晓萃 何守志[△]

(中国人民解放军总医院眼科 北京 100853)

摘要 血管再生在血管发展和内环境的稳定中起重要作用。错乱的血管再生导致多种疾病,如肿瘤和缺血性疾病。近年来研究证实, MicroRNAs 在血管再生及调控内皮细胞功能中起重要作用, 如 miR-126 在内皮细胞中特异性表达并调控血管生成; miR-210 在缺氧导致的血管生成及内皮细胞存活中发挥重要作用; miR-17~92 簇在体外可以抑制内皮细胞的增殖及在基质胶中抑制血管管腔的形成; miR-378、miR-296、miR-21 和 miR-31 可促进肿瘤血管发生等。深入研究血管 microRNAs 的体内功能,将为有效抑制血管再生,改变血管病理发展提供一种新的治疗策略。

关键词 血管 microRNA 血管再生 治疗

中图分类号 R54,R543 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 13-2597-04

Progress on Research of AngiomiRs

LIU Xiao-cui, HE Shou-zhi[△]

(Department of Ophthalmology, Chinese PLA (People's Liberation Army) General Hospital, Beijing 100853, China)

ABSTRACT: Angiogenesis is critical in vascular development and homeostasis. Aberrant angiogenesis leads to a variety of diseases, such as cancer and ischemia. Recent studies have revealed important roles of microRNAs in angiogenesis and endothelial cell (EC) function. For example, miRNA-126 shows EC-specific expression and regulates angiogenesis; miR-210 is a crucial regulator of angiogenesis and EC survival in response to hypoxia; inhibition of miR-17~92 in vitro represses EC sprouting and tube formation in matrigel; miR-378, miR-296, miR-21 and miR-31 contribute to tumor angiogenesis and so on. The further study of angiomiRs function in vivo will support a new therapeutic approach in the active suppression of angiogenesis and the settings of pathological vascularization.

Key words: AngiomiRs; Angiogenesis; Treatment

Chinese Library Classification(CLC): R54, R543 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2011) 13-2597-04

MicroRNAs (MiRNAs)是一组包含 21~25 核苷酸单链的保守的、非编码小 RNA,通过碱基配对与 mRNA 分子的 3' 端非翻译区相结合来抑制靶基因转录后表达。目前,人类已鉴定出将近 700 个 MiRNAs 并预测能调控三分之一的蛋白编码基因^[1]。一种 MiRNA 可以调控多种 mRNAs,而一种 mRNA 也可以受多种 MiRNAs 调控,这导致基因表达的多重调控。越来越多的证据表明, MiRNAs 是心血管疾病和肿瘤发生的重要调节器^[2,4]。MiRNAs 的异常表达与眼部疾病的发生、发展及预后也可能存在着密切联系^[5]。目前已有许多特异性 miRNAs (血管 miRs) 在体内被证实可以调控血管的再生,本文主要介绍 MicroRNAs 在血管发生及调控内皮细胞功能中的最新进展。

1 MicroRNAs 的表达和调节

miR-221/222、miR-21、let-7 家族、miR-17~92 簇、miRNA-23~24 簇和 miR-126 在人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) 中高表达^[6,8],其中 miRNA-126 是目前唯一已知的在内皮细胞系和定向造血干细胞 (HPCs) 中特异性表达的 MiRNA^[9-14]。

缺氧可以刺激血管再生,但也会抑制内皮细胞增殖和导致细胞死亡。许多研究小组已经在肿瘤细胞系以及内皮细胞中鉴定出缺氧调节性 MiRNAs(Hypoxia-regulatedmiRNAs,HRMs)^[6,15,16]。在 HRMs 中,miR-210 在所有的细胞实验中均被验证与缺氧密切相关^[6,15-19],并且缺氧诱导因子 -1α 参与 miR-210 的活化。miR-296 在人脑肿瘤分离出来的原代细胞中的表达比在正常的脑内皮细胞中显著增高^[20]。VEGF、EGF 或肿瘤细胞的条件培养基可以正调节 miR-296 在内皮细胞中的表达。除此之外,血清可以正向调节 miR-130a 的表达^[21],原癌基因可以直接激活 miR-17~92 簇^[22],病毒蛋白 K15 可以诱导 miR-21 和 miR-31 在内皮细胞的表达^[23],糖尿病大鼠心肌微血管内皮细胞正调节 miR-320 的表达^[24]。

MicroRNA 对内皮细胞的另一个调节作用是通过微泡的分泌来实现在细胞间穿梭运动的^[25]。微泡来源于肿瘤细胞、血小板、单核细胞、内皮细胞或其它类型细胞。在高血压病人中,来源于内皮细胞的微泡显著增多^[26]。因此,微泡中的 MiRNA 如何调节血管性疾病将是一个新的研究方向。

2 血管 microRNAs 的功能和靶标

特异性 miRNAs 在血管再生和肿瘤血管发生中的功能研究才刚刚开始。目前认为,血管 miRNAs 在血管生成的信号通路中结合负调节蛋白从而促进血管生成,而抗血管 miRNAs 结

作者简介 刘晓萃 (1984),女,博士研究生,电话:13522117799,

E-mail: wendy8441@gmail.com

△通讯作者 何守志,主任医师,博士生导师,

E-mail: heshouzhi@sina.com

(收稿日期:2011-01-10 接受日期:2011-01-31)

合正调节蛋白进而抑制血管发生。

miR-126

miR-126 是至今为止唯一被鉴定出在内皮细胞中特异性表达而且实现了在小鼠模型中可以缺失的血管 miRNA。在小鼠和斑马鱼的模型中发现,miR-126 在维持血管的完整性及血管生成方面有重要作用^[9,14,27]。在大鼠试验中,miR-126 的定向缺失可以导致血管渗漏、出血和部分胚芽坏死,从而导致血管完整性丧失和血管生成障碍^[14,27]。miR-126 的缺失可明显延缓头颅和视网膜发育过程中血管化的发生。此外,采用体外主动脉环法及体内基质胶塞和角膜微囊法的研究表明,内皮细胞 miR-126 的缺失导致血管生成因子缺陷进而引起血管生成障碍^[14,27]。在斑马鱼研究中发现,敲除 miR-126 可引起出血及背主动脉和主静脉萎缩^[9]。

miR-126 是由表皮生长因子样结构域 7 (EGF-like-domain, Multiple 7, Egfl7) 的内含子编码,Egfl7 也编码内皮细胞衍生的分泌肽,这种分泌肽具有抑制平滑肌细胞移行的作用^[28,29]。小鼠和斑马鱼的体内研究表明,Egfl7 在内皮细胞移行和血管生成中发挥重要作用^[30,32]。有趣的是,miR-126 缺失的小鼠和 Egfl7 敲除的小鼠均出现相同的血管异常表现,如水肿,颅内血管缺陷和视网膜血管化^[14,32],而 miR-126 可下调人脐静脉内皮细胞中 Egfl7 蛋白水平的表达^[33],因此,究竟是哪个分子在起作用目前仍存在争议。

miR-126 可以通过调控血管细胞粘附蛋白 1 (VCAM-1),调节粒细胞与内皮细胞的粘附^[7],提示 miR-126 在血管炎症方面也起作用。研究显示,miR-126 能够抑制肿瘤发生并且在许多癌细胞系中被下调表达^[34,36]。在癌细胞中,CT10 激酶调节因子和 PIK3R2 也是 miR-126 作用的靶标^[34,35]。目前,PIK3R2 在内皮细胞中抑制 PI3K-AKT 信号通路,但在肿瘤细胞中促进 PI3K-AKT 信号通路的机制还不明确。无论如何,上述研究表明 miR-126 是一种多功能 miRNA,在血管发生、肿瘤生长以及血管炎症方面起重要作用。

miR-210

miR-210,一种缺氧诱导的 MiRNA,在缺氧导致的血管生成及内皮细胞存活中发挥重要作用。在含氧量正常的内皮细胞中过表达 miR-210 会刺激血管生成及 VEGF 诱导的细胞迁移。反之,阻断 miR-210 表达可以抑制 VEGF 诱导的缺氧和细胞迁移所致的血管管腔形成。在常氧和缺氧状态下,敲除 miR-210 都可以抑制细胞生长及引起细胞凋亡。

miR-17~92 簇

miR-17~92 簇,是第一个被鉴定出来的促肿瘤 miRNA。这个基因簇编码 miR-17、miR-18、miR-19a、20a、miR-19b-1 和 miR-92-1。miR-17~92 簇的两个相似基因 miR-106a-363 和 miR-106b-25 也存在于哺乳动物中。miR-17~92 簇已被证明能在小鼠中联合 c-原癌基因诱发 B 细胞淋巴瘤^[37],并且在肾素—血管紧张素系统细胞中过表达进而促进体内肿瘤血管发

生^[38],然而 miR-17~92 簇在体外也可以抑制内皮细胞的增殖及在基质胶中抑制血管管腔的形成,如 miR-92a 可负性调节血管再生,抑制 miR-17、-18a 及 -20a 可促进内皮细胞增殖^[39]。虽然 miR-17~92 簇在肿瘤及肿瘤血管发生中的作用研究已很成熟,但其在发育过程中的生理功能的研究才刚刚起步。miR-106a-363 和 miR-106b-25 簇分别或同时缺失并没有引起任何明显的表型变化,但 miR-17~92 簇敲除的小鼠的个头比较小并且生后不久就可能由于肺部发育不全和先天性室间隔缺损而死亡^[40]。miR-17~92 簇的缺失也会阻碍前体 B 细胞发育为前 B 细胞,表明 miR-17~92 簇在 B 细胞发育过程中必不可少。但 miR-17~92 簇成员在血管发生的确切作用仍不明确。

miR-378

miR-378 在 CD34+ 的 HPCs 中含量丰富^[41],并且在癌细胞系中过表达 miR-378 可提高细胞存活及降低细胞死亡^[42]。有研究显示,裸鼠在注射 miR-378 转染的癌细胞后,其生成的肿瘤血管直径远比注射 GFP 转染的癌细胞大的多,这可能与 miR-378 可以促进 VEGF 的表达有关。研究表明,Shh 能够诱导促血管生成因子,如 VEGF、血管生成素 -1 及 -2 的表达促进特殊的大直径血管的生成^[43],而 Fused 抑制因子 Sufu 是 Shh 信号通路的负调节因子,并且和 Fus-1 基因同为抑癌基因,也是 miR-378 作用的靶标^[42],因此,miR-378 通过作用靶基因 Sufu 和 Fus-1 促进细胞存活,并且间接上调血管生成因子促进肿瘤血管生成。

miR-296

miR-296 在体外和划痕伤口愈合试验中被证明是一种血管 miRNA 前体^[20]。通过静脉注射 miR-296 的抑制剂可以抑制神经胶质瘤的血管再生。miR-296 发挥的功能是通过调控其靶基因—肝细胞生长因子调节酪氨酸激酶底物 (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate,HGS) 来实现的,而且 HGS 能够降解 VEGF 和 PDGF 的受体。神经胶质瘤的肿瘤内皮细胞中 miR-296 表达上调,胶质瘤血管中 HGS 表达下降,VEGFR2 和 PDGFR β 表达上调。这些结果表明 miR-296 在肿瘤的血管发生中发挥重要作用。

miR-21 和 miR-31

miR-21 和 miR-31 可能是血管 miRNAs 前体。miR-21 和 miR-31 在各种肿瘤中均表达上调,而且 miR-21 还可以促进肿瘤的发生和转移^[44]。敲除 miR-21 和 miR-31 可阻断病毒蛋白 K15M 在内皮细胞中诱导的细胞增殖,提示 miR-21 和 miR-31 表达上调可以促进 K15M 介导的 Kaposi's 肉瘤的发生^[23]。Yin 等^[45]研究发现心肌缺血预处理 (IPC) 时 miR-21 表达上调,注射 IPC-mi21 于缺血心肌区能减少心肌缺血再灌注损伤。

3 血管 miRNAs 治疗

研究血管生成的重要调节器—血管 miRNAs 为血管性疾病的治疗提供了新的思路。血管 miRNAs 治疗提供了一种自然

地方式使致病基因表达正常化,潜在地避免了针对单一基因引起的毒性和药物耐药性。血管 miRNAs 前体的增强剂或抗血管 miRNAs 的抑制剂,能够在缺血性疾病的病理发展中促进血管的发生,如心肌梗塞和局部缺血。miR-143 和 miR-145 在血管平滑肌细胞的增殖和分化中的作用,为动脉粥样硬化等心血管疾病研究提供了新思路^[46]。miR-1 和 miR-21 用于治疗心肌梗死、心肌缺血再灌注损伤等缺血性心脏病,前景可观^[47]。相反,抗血管 miRNAs 的增强剂,或血管 miRNAs 前体的拮抗剂也可能在病理性血管化的情况下有效,如肿瘤血管发生和视网膜新生血管疾病。miR-126 和 miR-378 促进肿瘤等血管生成,为肿瘤的治疗开辟了新的方法。目前,血管 miRNAs 治疗仍面临挑战,如递药系统是否有效以及对特异性 miRNAs 生物学功能的理解还不全面等。

4 展望

未来的研究将关注血管 miRNAs 家族成员的体内功能,特别在 MicroRNA 靶标的鉴定、细胞 MiRNAs 特殊功能和相关 MiRNAs 的联合效应等方面。同时,对不同血管性疾病的特异性 miRNA 的鉴定也非常重要^[48]。这些研究将进一步指导血管 miRNAs 在血管性疾病中的治疗。

参考文献(References)

- [1] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120(1):15-20
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4):259-269
- [3] Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4):581-588
- [4] van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense [J]. Circ Res, 2008, 103(9):919-928
- [5] 岳岩, 何守志. MicroRNA 及其在眼科领域的研究进展 [J]. 中华眼科杂志, 2009, 45(3): 280-284
Yeu Yan, He Shou-zhi. MicroRNA and progresses in the region of ophthalmology [J]. Chinese Journal Of Ophthalmology, 2009, 45(3): 280-284
- [6] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15878-15883
- [7] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5):1516-1521
- [8] Polisenio L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs [J]. Blood, 2006, 108(9): 3068-3071
- [9] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15(2):272-284
- [10] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12):580-587
- [11] Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(3):219-229
- [12] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. Cell, 2007, 129(7):1401-1414
- [13] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells [J]. J Mol Med, 2008, 86(3):313-322
- [14] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008, 15(2):261-271
- [15] Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia [J]. PLoS One, 2006, 27,1: e116
- [16] Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(5):1859-1867
- [17] Camps C, Buffa FM, Colella S, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5):1340-1348
- [18] Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(2):255-264
- [19] Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, et al. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210 [J]. FEBS Lett, 2008, 582(16): 2397-2401
- [20] Wurdinger T, Tannous BA, Saydam O, et al. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells [J]. Cancer Cell, 2008, 14(5):382-393
- [21] Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5 [J]. Blood, 2008, 111(3):1217-1226
- [22] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. Nature, 2005, 435(7043): 839 - 843
- [23] Tsai YH, Wu MF, Wu YH, et al. The M type K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulates microRNA expression via its SH2-binding motif to induce cell migration and invasion [J]. J Virol, 2009, 83(2):622-632
- [24] Wang XH, Qian RZ, Zhang W, et al. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cell and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats [J]. Clin Exp

- Pharmacol Physiol, 2009, 36(2):181-188
- [25] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6):654-659
- [26] Bakouboula B, Morel O, Faure A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(5):536-543
- [27] Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126 [J]. Development, 2008, 135(24):3989-3993
- [28] Campagnolo L, Leahy A, Chitnis S, et al. EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury [J]. Am J Pathol, 2005, 167(1):275-284
- [29] Soncin F, Mattot V, Lionneton F, et al. VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration [J]. EMBO J, 2003, 22(21):5700-5711
- [30] De Maziere A, Parker L, Van Dijk S, et al. Egfl7 knockdown causes defects in the extension and junctional arrangements of endothelial cells during zebrafish vasculogenesis [J]. Dev Dyn, 2008, 237(3):580-591
- [31] Parker LH, Schmidt M, Jin SW, et al. The endothelial-cell derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation [J]. Nature, 2004, 428(6984):754-758
- [32] Schmidt M, Paes K, De Maziere A, et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution [J]. Development, 2007, 134(16):2913-2923
- [33] 孙艳芹, 张帆, 白义凤等. MiR-126 体外调控人脐静脉内皮细胞中表皮生长因子-7 基因的表达 [J]. 南方医科大学学报, 2010, (4):767-770
- Sun Yan-qin, Zhang Fan, Bai Yi-feng, et al. miR-126 modulates the expression of epidermal growth factor-like domain 7 in human umbilical vein endothelial cells in vitro [J]. Journal of Southern Medical University, 2010, (4):767-770
- [34] Crawford M, Brawner E, Batte K, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(4):607-612
- [35] Guo C, Sah JF, Beard L, et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47(11):939-946
- [36] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152
- [37] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. Nature, 2005, 435(7043):828-833
- [38] Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster [J]. Nat Genet, 2006, 38(9):1060-1065
- [39] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells [J]. Blood, 2010, 115(23):4944-4950
- [40] Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of microRNA clusters [J]. Cell, 2008, 132(5):875-886
- [41] Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis [J]. Exp Hematol, 2007, 35(11):1657-1667
- [42] Lee DY, Deng Z, Wang CH, et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(51):20350-20355
- [43] Pola R, Ling LE, Silver M, et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors [J]. Nat Med, 2001, 7(6):706-711
- [44] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(15):2128-2136
- [45] Yin C, Salloum FN, Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning: up regulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70 [J]. Circ Res, 2009, 104(5):572-575
- [46] 俞巧, 刘振华, 刘俊文. 特异性 microRNAs 在心血管系统中的功能研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(3):588-589
- Yu Qiao, Liu Zhen-hua, Liu Jun-wen. Functions of Specific MicroRNAs in Cardiovascular System [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(3):588-589
- [47] 文通, 魏云峰, 李宾公. MicroRNAs 与心血管疾病研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2010, 31(2):301-305
- Wen Tong, Wei Yun-feng, Li Bing-gong. Using MicroRNA in Cardiovascular Diseases [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2010, 31(2):301-305
- [48] Wang S, Olson EN. AngiomiRs-Key regulators of angiogenesis [J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(3):205-211