

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.02.010

microRNA-151-5p 在肾血管性高血压大鼠血管内皮细胞中的表达及意义*

冯月¹ 陈珍珍¹ 胡海² 于慧³ 王占黎^{3Δ}

(1 包头医学院研究生学院 内蒙古 包头 014030; 2 包头医学院病理生理学教研室 内蒙古 包头 014030;

3 内蒙古自治区疾病相关生物标志物重点实验室, 包头医学院分子医学研究所, 包头医学院第二附属医院 内蒙古 包头 014030)

摘要 目的:研究 microRNA-151-5p(miR-151-5p)在两肾一夹(2K1C)肾血管性高血压大鼠中的表达,并为 miR-151-5p 参与调节血管内皮细胞功能提供理论依据。**方法:**建立 2K1C 大鼠模型,获得胸主动脉血管内皮,采用荧光定量 PCR 技术检测血管内皮细胞中 miR-151-5p 的表达,通过数据库及生物信息学软件预测 miR-151-5p 的靶基因,并对靶基因进行 GO 富集和 KEGG pathway 分析。**结果:**与假手术组大鼠相比较,实验组大鼠胸主动脉血管内皮细胞 miR-151-5p 的表达量显著升高 ($P<0.05$)。GO 分析显示 miR-151-5p 的靶基因参与蛋白加工水解、Notch 受体加工等多种生物学功能 ($P<0.01$);KEGG pathway 分析显示 miR-151-5p 的靶基因参与 Notch 信号通路、血管平滑肌收缩、代谢途径、细菌感染和 RNA 转运等信号通路。**结论:**2K1C 大鼠血管内皮细胞中 miR-151-5p 表达升高,可能通过对其靶基因 APM1A 的调控参与血管内皮细胞功能调节。

关键词:肾血管性高血压;miR-151-5p;靶基因

中图分类号:R-33; R544.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)02-239-04

Expression and Significance of MicroRNA-151-5p in the Vascular Endothelial Cells of Renovascular Hypertensive Rats*

FENG Yue¹, CHEN Zhen-zhen¹, HU Hai², YU Hui³, WANG Zhan-li^{3Δ}

(1 Graduate School; 2 Department of Pathophysiology; 3 The Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of disease-related biomarkers, Institute of Molecular Medicine of Baotou Medical College,

The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia, 014030, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of microRNA-151-5p (miR-151-5p) in two kidney one clip (2K1C) renovascular hypertensive rats, and provide a theoretical guidance for miR-151-5p to participate in the regulation of vascular endothelial cell function. **Methods:** 2K1C rat model was established to obtain the endothelium of thoracic aorta. The expression of miR-151-5p in vascular endothelial cells was detected by fluorescent quantitative PCR. We also predicted target genes of miR-151-5p by database and bioinformatics software. Furthermore, we analyzed the function of target gene by KEGG and GO pathways. **Results:** Compared with the sham group, the expression of miR-151-5p in thoracic aorta endothelial cells in experimental group was significantly higher ($P<0.05$). In GO analysis, the target genes of miR-151-5p were enriched in many biological process, such as regulation of protein processing and regulation of Notch receptor processing ($P<0.01$). In KEGG pathway, the target genes of miR-151-5p were involved in Notch signaling pathway, vascular smooth muscle contraction, metabolic pathway, bacterial infection and RNA transport pathway. **Conclusion:** MiR-151-5p expression increased in 2K1C rats, it may regulate the function of vascular endothelial cell by its target gene APM1A.

Key words: Renovascular hypertension; MiR-151-5p; Target gene

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R544.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)02-239-04

前言

MicroRNA (miRNA) 是一种小分子非编码 RNA, 长度约 18-25 个核苷酸, 在转录后水平作用于靶基因, 进而调控基因表达, 参与多种病理生理过程, 包括细胞分化、增殖、生长和凋亡等, 并参与细胞信号转导及机体微环境的调节^[1,2]。鉴于 miRNA

具有较好的稳定性和组织特异性, 其可应用于疾病的诊断、预后评估和治疗。

miR-151 是由 FAK 基因产生, 而后者是编码细胞移动关键信号蛋白的基因^[3]。miR-151 包括 miR-151-3p 和 miR-151-5p, 两者可作用不同的靶基因, 进而发挥不同的生物学作用。研究显示 miR-151 与癌细胞转移和浸润有关, 如肝癌

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81460049; 81560057)

作者简介: 冯月(1992-), 硕士研究生, 主要研究方向: 感染与免疫, E-mail: 245782007@qq.com

陈珍珍(1989-), 硕士研究生, 主要研究方向: 疾病防控, E-mail: 359438056@qq.com

Δ 通讯作者: 王占黎, 博士, 教授, 主要研究方向: 感染与免疫, E-mail: wang.zhanli@hotmail.com

(收稿日期: 2017-08-04 接受日期: 2017-08-26)

细胞中 miR-151-5p 表达上调,并且与癌细胞的转移显著相关^[4];而 miR-151-3p 与癌症预后有关^[5]。miR-151-5p 在膀胱癌发生发展过程中起到显著调控通路的作用^[6],乳腺癌中 miR-151-5p 表达上调,可通过激活 AKT 通路使细胞增殖扩散^[7]。

目前,有关 miR-151-5p 在心血管方面的研究鲜见报道。本研究通过构建 2K1C 大鼠模型,采用荧光定量 PCR 技术检测血管内皮细胞中 miR-151-5p 的表达,通过生物信息学软件预测 miR-151-5p 的靶基因,探讨其对血管内皮细胞功能的影响,以期为高血压血管内皮损伤研究提供理论依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 8 周龄雄性 SD 大鼠,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心(许可证号:SCXK-(军)2012-0004)。

1.1.2 试剂与仪器 MirVANA miRNA 提取试剂盒、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription 逆转录试剂盒、TaqMan Universal PCR Master Mix II 扩增试剂盒及 miR-151-5p、U6 snRNA 引物购自美国 Applied Biosystems 公司。ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及肾性高血压大鼠模型制备 健康清洁级 8 周龄雄性 SD 大鼠,体重 150-170 g,根据体重随机分为 2 组,每组 8 只:假手术组(对照组)和 2K1C 模型组。常规适应性饲养大鼠 1 周后,模型组大鼠左肾动脉中段套上内径为 0.2 mm 的银夹,对照组仅分离大鼠左肾动脉但不进行钳夹。术后 3 天内,给予其青霉素 V 钾片 0.5 万单位/天,预防感染。动态关注大鼠状态,每周采用无创鼠尾套管血压仪测定尾动脉收缩压(Systolic blood pressure, SBP),每次测量重复 3 次,取平均值。术后 4 周,2K1C 模型组大鼠血压值较术前血压升高值 ≥ 30 mmHg,提示高血压模型制备成功。

1.2.2 取材 手术干预 4 周后处死两组大鼠共 16 只,取其胸主动脉血管,置于保存液中, -80℃ 保存备用。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测主动脉血管内皮中 miR-151-5p 表达量 采用 MirVANA miRNA 提取试剂盒提取总 miRNAs,以 TU1900 紫外分光光度计检测其纯度和浓度。采用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription 逆转录试剂盒将 miRNAs 逆转录为 cDNA,反应体系为(15 μ L):dNTP mix 0.15 μ L; Multi-scribe™ RT enzyme 1.00 μ L; 10 $\times$ RT buffer 1.5 μ L; RNase Inhibitor 0.19 μ L; Nuclease free water 4.16 μ L; RT primer 3 μ L; miRNA 样品 5 μ L (10 ng)。逆转录产物的实时荧光定量扩增采用 TaqMan Universal PCR Master Mix II 试剂盒,以 U6 snRNA 为内参。反应条件按产品说明书步骤操作,每个反应设三个复孔。相对定量反应结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析。

1.2.4 靶基因预测及功能分析 采用 MiRanda、TargetScan 和 miRDB 三个在线数据库对 miR-151-5p 进行靶基因预测。将两个在线数据库预测到的 miR-151-5p 靶基因,采用 DAVID 生物信息数据库中的软件进行 GO 富集分析和 KEGG Pathway 富集分析。在 DAVID 软件中设置 Fisher Exact Test 计算 P 值,GO 分析和 KEGG Pathway 分析分别以 $p < 0.01$ 和 $p < 0.05$ 为显著性阈值,说明得到的结果相对于背景具有统计学意义。

1.3 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血压变化的比较

鼠尾无创血压监测结果见表 1。与造模前相比较,假手术组大鼠血压未发生明显改变,差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组大鼠血压值较术前血压升高 ≥ 30 mmHg;与假手术组相比,模型组大鼠血压值显著上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 两组大鼠血压变化的比较

Table 1 Comparison of the changes of blood pressure between two groups of rats

	Blood pressure (mmHg)	
	Sham-operated group	2K1C model group
At Eight weeks	120.12 $\pm$ 11.95	121.89 $\pm$ 11.11
At Ten weeks	119.69 $\pm$ 18.35	136.35 $\pm$ 16.59
At Twelve weeks	122.08 $\pm$ 7.66	164.77 $\pm$ 27.26**

Note: compared with the sham operation group,* $P < 0.05$; with the same group before modeling (8 weeks),# $P < 0.05$.

2.2 两组主动脉血管内皮细胞中 miR-151-5p 的表达比较

模型组大鼠主动脉血管内皮细胞中 miR-151-5p 的表达量较假手术组显著上调($P < 0.05$),平均为假手术组的 1.937 倍(图 1)。

2.3 miR-151-5p 的靶基因预测及功能分析

采用 miRanda、TargetScan、miRDB 预测 miR-151-5p 靶基因,获得的靶基因数分别为 453、459、44。其中,TargetScan、miRDB 预测获得 26 个相同靶基因,分别为 AHP1A、SLC24A2、RALGAP1、N4BP1、MTCH1、CFI、EBP、CORO1B、

PPP1R12B、MOB3B、SLC35F1、POGLUT1、FCER1G、SIPA1L3、TJP2、MAPRE2、GOLPH3L、SPRYD3、USP39、AP3B1、AGFG1、DSG2、SLC12A5、COL4A3BP、EIF1AX、CLEC16A。GO 分析显示,上述 26 个靶基因的生物功能主要富集在细胞膜、细胞质等细胞组件($P < 0.01$),参与蛋白加工水解、Notch 受体加工等多种生物学功能($P < 0.01$)。KEGG pathway 分析显示 miR-151-5p 的靶基因参与 Notch 信号通路、血管平滑肌收缩、代谢途径、细菌感染和 RNA 转运等信号通路。miR-151-5p 预测的靶基因 AHP1A 参与 Notch 信号通路,见图 2。

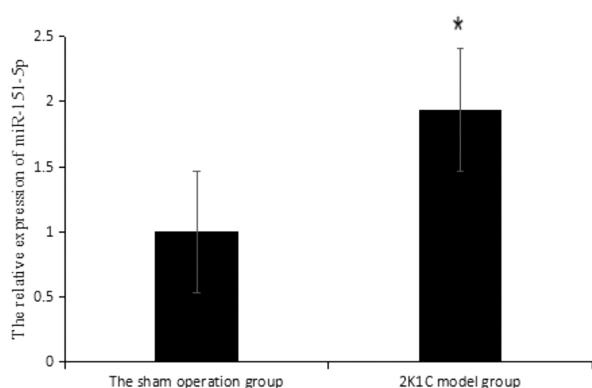


Fig. 1 The relative expression of miR-151-5p in the two groups of rats

Note: compared with the sham operation group, * $P < 0.05$.

3 讨论

肾性高血压是一种常见的继发性高血压,其病理生理机制十分复杂,免疫-炎症反应在其发生和发展中发挥重要作用^[8],较原发性高血压更难控制,需进行综合性治疗^[9]。高血压是很多心脑血管疾病的主要诱因,往往造成靶器官严重受损^[10]。在中国,每年死于心血管疾病的人数达 300 多万,并且其发病率和病死率呈现出逐年上升的趋势^[11]。

本研究制备 2K1C 肾性高血压大鼠模型,与术前相比,大鼠术后血压升高显著,与高添^[12]的结果一致,提示 2K1C 模型制备成功。运用 Real-time PCR 方法检测其胸主动脉内皮细胞中 miR-151-5p 的表达,模型组大鼠主动脉内皮细胞中

miR-151-5p 的表达较假手术组显著升高($P < 0.05$),提示其可能参与了肾性高血压血管内皮损伤的调节。近几年研究显示 miRNA 可通过调控其靶基因的表达参与多种疾病的病理生理过程^[13,14]。

确定 miRNA 靶基因的方法主要是生物信息学软件预测和生物学实验,两种方法相辅相成,从而进一步研究其功能及意义^[15]。生物信息学预测靶基因结果数量多且假阳性率较高^[15],因此需实验方法进行验证。靶基因预测软件的基本原理和特征各不相同预测针对部分物种^[16]。本研究通过生物信息学方法进行靶基因预测,选取三个筛选工具,再将两种工具相结合进行联合筛选。无论哪种筛选方法都存在不足,联合筛选将组合求交集,有学者认为这部分基因最有可能是靶基因,也有学者对其持保留意见,认为缩小了筛选范围但不能否定其他结果^[17]。软件预测 miR-151-5p 的靶基因为 APL1A、SLC24A2、RALGAP1 及 N4BP1 等,并未对靶基因进行实验验证。GO 分析进一步显示上述 26 个靶基因的生物功能主要富集在细胞膜、细胞质等细胞组件,参与蛋白加工水解、Notch 受体加工、酶催化活性、肾发育等多种生物学功能。值得注意的是,KEGG pathway 分析提示上述靶基因参与 Notch 信号通路、血管平滑肌收缩、代谢途径、细菌感染和 RNA 转运等信号通路。有研究显示诱导炎症反应可损伤血管内皮功能,促进高血压的发生发展^[18]。miR-151-5p 预测的靶基因参与细菌感染信号通路,可引起炎症反应,并且参与调控血管平滑肌细胞收缩,从而参与高血压发病机制^[19]。结合 GO 富集和 KEGG pathway 分析,miR-151-5p 预测的靶基因 APL1A 参与 Notch 信号通路调节,从而影响血

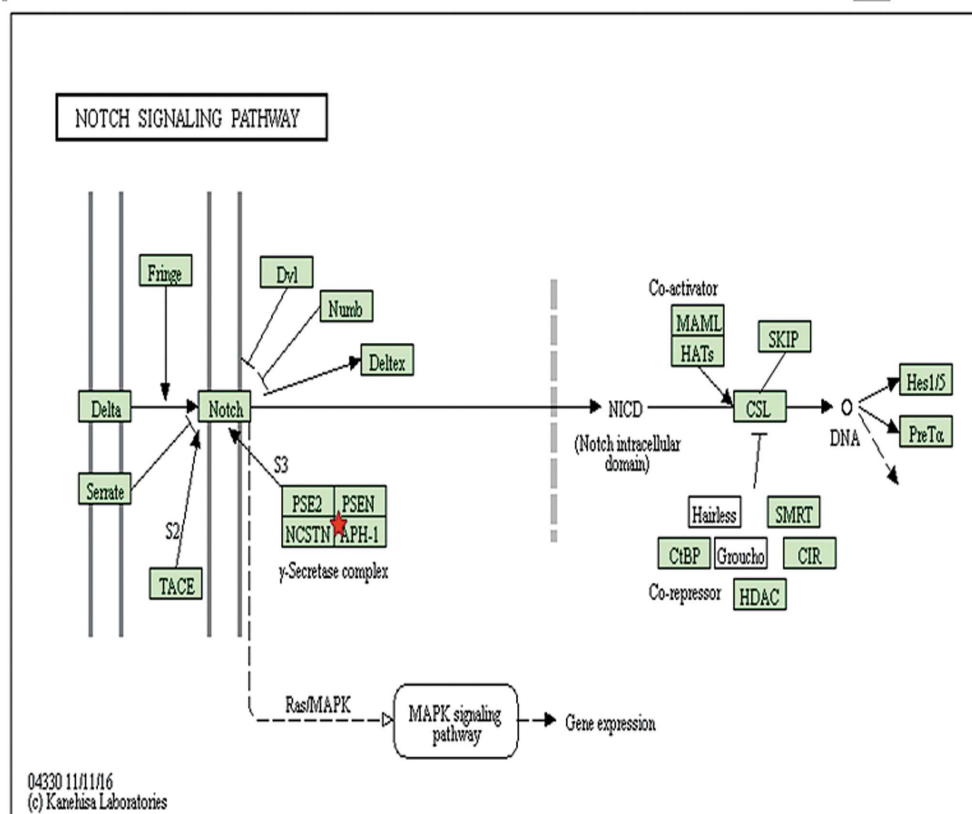


图 2 miR-151-5p 靶基因参与调节 Notch 信号通路

Fig. 2 MiR-151-5p target genes are involved in regulating the Notch signaling pathway

Note: target gene; green: Notch signaling pathway.

管内皮功能。已知 Notch 信号通路是进化中高度保守的信号转导通路,可调控血管内皮细胞增殖、分化和凋亡等功能。血管损伤后,Notch 信号通路分子表达变化,引起血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖、迁移、抗凋亡等能力发生变化,从而参与血管功能调节^[20]。有研究显示 Notch 信号通路对脂肪间充质干细胞分化为心肌细胞起到正向调控作用^[21],而心肌细胞可以分泌外泌体,在一定条件下,将乳鼠或大鼠心肌细胞系 H9C2 释放外泌体与血管内皮细胞共培养,可发现这些外泌体能诱导内皮细胞增殖和血管生成,还可促进内皮细胞的糖吸收和分解活动^[22]。越来越多证据表明 Notch 信号通路参与炎症和氧化应激,在心脑血管病重影响血管生成、细胞凋亡和疾病进展^[23]。因此,Notch 信号通路可直接或间接地影响血管内皮细胞功能。

综上所述,miR-151-5p 在肾性高血压大鼠血管内皮中表达升高,并可能通过调节 APH1A、SLC24A2、RALGAP1 及 N4BP1 等靶基因的表达,经 Notch 信号通路参与血管内皮功能的调节。

参考文献(References)

- [1] Nouraei N, Mowla SJ. miRNA therapeutics in cardiovascular diseases: promises and problems[J]. *Front Genet*, 2015, 30(6): 232
- [2] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 835-840
- [3] Luedde T. MicroRNA-151 and its hosting gene FAK (focal adhesion kinase) regulate tumor cell migration and spreading of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 1164-1166
- [4] Ding J, Huang S, Wu S, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A [J]. *Nature cell biology*, 2010, 12 (4): 390-3399
- [5] McNally M E, Collins A, Wojcik S E, et al. Concomitant dysregulation of microRNAs miR-151-3p and miR-126 correlates with improved survival in resected cholangiocarcinoma [J]. *HPB:the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 2013, 15 (4): 260-264
- [6] Xi Hao. Bladder cancer-associated aberrant expression of microRNAs and DNA copy number changes and their biomedical significances [D]. *Peking Union Medical College*, 2015
- [7] Aure M R, Leivonen S K, Fleischer T, et al. Individual and combined effects of DNA methylation and copy number alterations on miRNA expression in breast tumors[J]. *Genome biology*, 2013, 14(11): R126
- [8] Caillon A, Schiffrin EL. Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2016, 18(3): 21
- [9] Cai Guang-yan. Treatment status and Countermeasures of renal hypertension in China [A]. *Chinese Medical Association, Chinese Medical Association Kidney Diseases Branch. Chinese Medical Association Kidney Disease Branch 2013 annual academic conference papers compilation* [C]. Chinese Medical Association, Chinese Medical Association nephrology branch, 2013: 2
- [10] Viazzi F, Piscitelli P, Giorda C, et al. Association of kidney disease measures with risk of renal function worsening in patients with hypertension and type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(2): 419-426
- [11] Liu J, Liu Y, Wang L, et al. The disease burden of cardiovascular and circulatory diseases in China, 1990 and 2010 [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2015, 49(4): 315-320
- [12] Gao T. Chrysanthemum morifolium extract improves renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy and its possible mechanisms in rats[D]. *Suzhou University*, 2016
- [13] Dangwal S, Thum T. MicroRNAs in platelet physiology and pathology[J]. *Hamostaseologie*, 2013, 33(1): 17-20
- [14] Tutar L, Tutar E, Tutar Y. MicroRNAs and cancer;an overview[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(5): 430-437
- [15] Chen L F, Zhang J P, Wang M X. High-throughput assays for MicroRNA target genes [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(03): 207-212
- [16] Wang Z P, Chen H K, Zhang X N, et al. Prediction and functional Analysis of microRNA target genes (review)[J]. *Bulletin of Biology*, 2016, 51(01): 5-9
- [17] Liu Z Q, Wan F S, Luo D Y. Methods and their online resources for miRNA targets screening [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 31(2): 121-127
- [18] Kossman S, Lagrange J, Jackel S, et al. Platelet-localized FXI promotes a vascular coagulation-inflammatory circuit in arterial hypertension[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 1(9): 375
- [19] Li M, Zhang J. Circulating microRNAs: potential and emerging biomarkers for diagnosis of cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 730535
- [20] Yang Hui, Liu Yu, Li Hui-hu. The relationship between Notch signaling pathway and hypertension [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2011, 19(03): 288
- [21] Ma Ling, Chen Li-yuan, Wang Fei, et al. Effects of Notch signaling pathway on differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte [J]. *Chinese Journal of Medicine*, 2017, 52 (03): 32-35
- [22] Garcia NA, Moncayo-Arlandi J, Sepulveda P, et al. Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109(3): 397-408
- [23] Cai Z, Zhao B, Deng Y, et al. Notch signaling in cerebrovascular diseases[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 2883-2898