



· 基础研究 ·

# 微小 RNA34a 下调沉默信息调节因子 1 抑制内皮祖细胞功能的机制研究

马璐 王玉强 何青 杨秀红 李明 魏延津

261000 潍坊医学院(马璐、杨秀红); 276000 临沂市人民医院心内科(王玉强、魏延津);  
266000 青岛大学(何青、李明)

通信作者:魏延津, 电子信箱:weiyanjin1968@126.com

DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2019.03.013

**【摘要】** 目的 分析氧化应激过程中微小 RNA34a(miR-34a)下调沉默信息调节因子 1(SIRT1)在内皮祖细胞功能障碍中的机制。方法 本实验采用不同浓度的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理内皮祖细胞,通过 CCK-8 检测细胞的存活率;运用化学合成的方法合成 miR-34a 模拟物、miR-34a 抑制物及其各自对照组转染至内皮祖细胞后,并用 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激,用 RT-PCR 验证 miR-34a 表达水平,利用流式细胞仪检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 miR-34a 诱导细胞凋亡情况,通过 qRT-PCR 方法和 Western blot 技术检测 SIRT1 中 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 CCK-8 检测发现,细胞存活率随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加而逐渐降低,呈现浓度依赖性;与不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比,加入 100、200、500 和 800 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 细胞存活率分别为 94% ± 2%、85% ± 2%、78% ± 2% 和 32% ± 1%,差异具有统计学意义( $F = 16.3, P < 0.001$ )。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激内皮祖细胞后,转染 miR-34a 模拟物的表达水平高于其对照组( $t = 16.0, P = 0.003$ ),转染 miR-34a 抑制物的表达水平低于其对照组( $t = 53.0, P = 0.000$ )。通过细胞凋亡检测 miR-34a 模拟物组细胞凋亡率明显升高( $t = 30.4, P < 0.001$ ),miR-34a 抑制物组细胞凋亡率明显降低( $t = 8.7, P < 0.001$ )。qRT-PCR 结果显示,miR-34a 模拟物组中的靶基因 SIRT1 相对表达量低于其对照组( $t = 87.7, P < 0.001$ ),miR-34a 抑制物组中的靶基因 SIRT1 相对表达量高于其对照组( $t = 125.0, P < 0.001$ )。Western blot 结果显示 miR-34a 的模拟物与其对照组相比,SIRT1 蛋白表达量明显下降( $t = 4.1, P = 0.014$ ),而 miR-34a 的抑制物与其对照组相比,SIRT1 蛋白表达量明显增高( $t = 7.1, P = 0.002$ )。结论 在氧化应激状态下,使用 miR-34a 的模拟物及抑制物可以调节 miR-34a 的表达,改变 SIRT1 中蛋白的表达。内皮祖细胞功能障碍可能与 miR-34a 水平升高及其靶蛋白 SIRT1 的表达下降相关。

**【关键词】** 内皮祖细胞; 氧化应激; 微小 RNA34a; 沉默信息调节因子 1

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2018H032)

**Down-regulation of SIRT1 by microRNA34a miR-34a down-regulates the mechanism by which SIRT1 inhibits the function of endothelial progenitor cells** Ma Lu, Wang Yuqiang, He Qing, Yang Xiuhong, Li Ming, Wei Yanjin.

Weifang Medical College, Weifang 261000, China (Ma L, Yang XH); Department of Cardiology, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China (Wang YQ, Wei YJ); Qingdao University, Qingdao 266000, China (He Q, Li M)

Corresponding author: Wei Yanjin, Email: weiyanjin1968@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism of microRNA34a (miR-34a) down-regulating silencing of information regulator 1 (SIRT1) in dysfunction of endothelial progenitor cells during oxidative stress, and provide a new explanation for the dysregulation of miRNA expression during dysfunction of endothelial progenitor cells, so as to find new treatment target for atherosclerosis. **Methods** In this experiment, endothelial progenitor cells were treated with different concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and the survival rate of the cells was detected by CCK-8. The miR-34a mimics, miR-34a



inhibitors and their respective control groups were synthesized by chemical synthesis and transfected into endothelial progenitor cells. After the endothelial progenitor cells were stimulated with 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , the expression level of miR-34a was verified by RT-PCR. The apoptosis of miR-34a induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  was detected by flow cytometry. Furthermore, qRT-PCR and Western blotting were used to detect expression levels of mRNA and protein in SIRT1. **Results** The cell viability decreased with the increase of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration by CCK-8, which was concentration-dependent. Compared with control groups, the survival rate of cells added with 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  and 800  $\mu\text{M}$  was respectively  $(94 \pm 2)\%$ ,  $(85 \pm 2)\%$ ,  $(78 \pm 2)\%$ ,  $(32 \pm 1)\%$ . The difference was statistically significant ( $F = 16.3$ ,  $P < 0.001$ ). After endothelial progenitor cells were stimulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the expression level of miR-34a mimics was higher than that of the control group ( $t = 16$ ,  $P = 0.003$ ), and the expression level of miR-34a inhibitors was lower than that of the control group ( $t = 53$ ,  $P < 0.001$ ). The apoptosis rate of miR-34a mimics group was significantly increased ( $t = 30.4$ ,  $P < 0.001$ ), and the apoptosis rate of miR-34a inhibitors group was significantly decreased ( $t = 8.7$ ,  $P < 0.001$ ). The qRT-PCR results showed that the relative expression level of the target gene SIRT1 in the miR-34a mimics group was significantly lower than that of control group ( $t = 87.7$ ,  $P < 0.001$ ), while the miR-34a inhibitors group was significantly higher than that of control group ( $t = 125$ ,  $P < 0.001$ ). Western Blot results showed that the expression of SIRT1 protein was significantly decreased in miR-34a mimics group ( $t = 4.1$ ,  $P = 0.014$ ), while that was significantly increased in miR-34a inhibitors group ( $t = 7.1$ ,  $P = 0.002$ ), compared with control group. **Conclusions** Under oxidative stress, the miR-34a mimics and inhibitor can modulate the expression of miR-34a, thereby altering the expression of the protein in SIRT1. Endothelial progenitor cell dysfunction may be associated with increased levels of miR-34a and decreased expression of its target protein SIRT1.

**【Key words】** Endothelial progenitor cells; Oxidative stress; miR-34a; Silent information regulator 1

**Fund program:** Shandong Natural Science Foundation (ZR2018H032)

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是引起冠心病等心血管疾病的主要因素之一。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)损伤及功能紊乱是AS形成过程中的起始点,并参与AS形成的全过程。研究发现,氧化应激能通过多种途径诱导细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加,导致EPC功能损伤<sup>[1-2]</sup>。ROS包括超氧负离子( $\text{O}_2^-$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )等氧自由基,具有高度反应活性<sup>[3]</sup>。微小RNA(micro RNAs, miRNAs)是一类长度约18~24个核苷酸的非编码小RNA,在转录后水平调控基因的表达,近年来,研究发现多种内皮相关性miRNAs<sup>[4]</sup>,参与调控EPC功能,其中miR-34a是调节EPC功能的一个关键靶点。本课题组前期研究发现,沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)为miR-34a作用的靶基因之一,但未阐明具体机制。本研究应用miR-34a模拟物(miR-34a mimics)、抑制物(miR-34a inhibitors)转染至EPC,并用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激,改变SIRT1表达水平,分析在氧化应激状态下miR-34a通过调节SIRT1导致EPC功能障碍的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

EGM-2培养基(包括EBM-2培养基和EGM-2MV Single Quots生长因子, FBS, hFGF-B, HYDROCORTISONE, R3-IGF-1, VEGF, hEGF, ASCORBIC ACID)购自美国Lonza公司; $\text{H}_2\text{O}_2$ 购自美国Sigma公司,CCK-8试剂盒、细胞凋亡试剂盒购自日本同仁公司;EndoFectin<sup>TM</sup>-Max转染试剂、qRT-PCR试剂盒购自GeneCopoeia公司;miR-34a mimics、miR-34a inhibitors及对照购自上海吉玛公司;SIRT1抗体购自CST公司。

### 1.2 方法

1.2.1 EPC分离培养和鉴定 选取年龄约25岁足月顺产健康产妇脐静脉血,采自临沂市人民医院产科,经过产妇及其家属、临沂市人民医院医学伦理委员会的同意。用密度梯度离心法从人脐血中提取内皮祖细胞。通过人脐血EPCs表面特异性抗原以及摄取乙酰化低密度脂蛋白和结合荆豆凝集素1,鉴定为EPC<sup>[5]</sup>。将细胞置于EGM-2培养基中,置于



37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内饱和湿度培养。待细胞生长融合约 80% ~ 90%，根据实验要求传代。

1.2.2 CCK-8 检测细胞存活率 用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与不含胎牛血清的培养基分别配制终浓度为 0 μM、100 μM、200 μM、500 μM、800 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。将 100 μl 培养基中含 2.0 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 96 孔板中，并置于培养箱内孵育一段时间后，分别选取不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞 24 h，用酶联免疫测定波长在 450 nm 处的吸光度值。重复三次实验，取平均值。

1.2.3 细胞转染 将对数生长期的细胞以 2.0 × 10<sup>5</sup>/孔的密度铺种于 6 孔板中，待细胞密度达到 70% ~ 80% 时转染。转染时分 miR-34a mimics 组、miR-34a inhibitors 组及各自对照组 (mimics control、inhibitors control)。miR-34a mimic 或 inhibitor 被转染至细胞以模拟过表达 miR-34a 或抑制 miR-34a 表达。整个转染过程按照 EndoFectin™-Max 转染试剂说明操作。

1.2.4 qRT-PCR 检测 miR-34a 的表达水平 转染 24 h 后用 500 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞 24 h。提取总 RNA，将 miRNA 逆转录合成 cDNA；以 RNU6B 作为内参基因，检测 miR-34a 的相对表达量。miRNA-34a 及内参基因 RNU6B 的 RT 引物、特异性上、下游引物由 GeneCopoeia 公司合成。用  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-34a 中 miRNA 的相对表达量。每个样本独立重复实验 3 次。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡 2.0 × 10<sup>5</sup> 个细胞转染并用 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激，收集细胞后，胰酶消化制成单细胞悬液，分别加入 Annexin V，FITC 结合物及 PI Solution；离心后室温避光孵育 15 min，流式细胞仪检测，重复 3 次，取平均值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 SIRT1 中 mRNA 的表达水平 按照 1.2.4 中方法检测 SIRT1 中 mRNA 的表达。以 β-actin 作为内参基因，检测 SIRT1 的相对表达量。内参 β-actin、SIRT1 上、下游特异性引物由上海生物工程公司合成。用  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 SIRT1 中 mRNA 的相对表达量。独立重复实验 3 次。

1.2.7 Western blot 检测 SIRT1 中蛋白的表达 收集转染并用 500 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h 后的 EPC，加入细胞裂解液充分裂解后提取细胞总蛋白。取等量的蛋白样品进行电泳 (SDS-PAGE)，电泳结束后转

印至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，一抗 4 ℃ 孵育过夜，二抗置于摇床上室温孵育 1 h，采用 ECL 化学发光试剂显色，用曝光系统检测目的蛋白，最后采用 Image Lab 软件进行分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析，正态分布计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间数据采用单因素方差分析，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 EPC 存活率

CCK-8 检测发现，细胞存活率随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度增加而逐渐降低，呈现浓度依赖性。与不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比，加入 100 μM、200 μM、500 μM、800 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 细胞存活率分别为 94% ± 2%、85% ± 2%、78% ± 2% 和 32% ± 1%，差异有统计学意义 (*F* = 16.3, *P* < 0.001)。

### 2.2 EPC 的 miR-34a 表达水平

qRT-PCR 检测转染效率，发现转染 miR-34a mimics 的细胞中 miR-34a 表达水平明显高于其对照组 (*t* = 16, *P* = 0.003)，转染 miR-34a inhibitors 的细胞中 miR-34a 表达水平明显低于其对照组 (*t* = 53, *P* < 0.001)。

### 2.3 miR-34a 对 EPC 凋亡影响

通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平，结果显示 (图 1)，miR-34a mimics 组与其对照组相比，细胞凋亡率明显升高 (*t* = 30.4, *P* < 0.001)；miR-34a inhibitors 组与其对照组相比，细胞凋亡率明显降低 (*t* = 8.7, *P* < 0.001)。

### 2.4 miR-34a 在 mRNA 水平下调 SIRT1

转染 miR-34a 并用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后，通过 qRT-PCR 技术检测 EPCs 中 SIRT1 的 mRNA 表达水平。结果显示，miR-34a mimics 组中的靶基因 SIRT1 相对表达量低于其对照组 (*t* = 87.7, *P* < 0.001)；miR-34a inhibitors 组中的靶基因 SIRT1 相对表达量高于其对照组 (*t* = 125.0, *P* < 0.001)。

### 2.5 miR-34a 在蛋白水平下调 SIRT1

通过 Western blot 技术检测 miR-34a 对靶基因 SIRT1 的蛋白表达水平。结果显示 (图 2)，miR-34a mimics 组与其对照组相比较，SIRT1 蛋白表达量明显下降 (*t* = 4.1, *P* = 0.014)；而 miR-34a 的 inhibitors 与

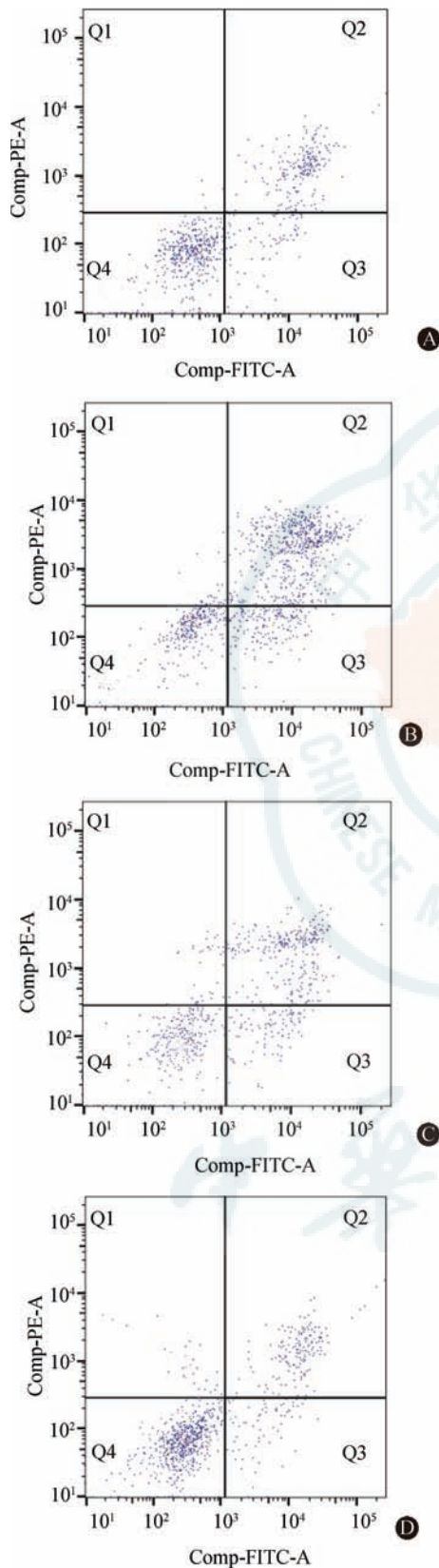


图1 流式细胞术检测细胞凋亡率  
A:模拟物对照组;B:miR-34a 模拟物组;C:抑制物对照组;D:miR-34a 抑制物组;右下象限表示早期凋亡细胞,右上象限表示晚期凋亡和坏死的细胞

图1 流式细胞术检测细胞凋亡率

其对照组相比, SIRT1 蛋白表达明显增高 ( $t = 7.1$ ,  $P = 0.002$ )。

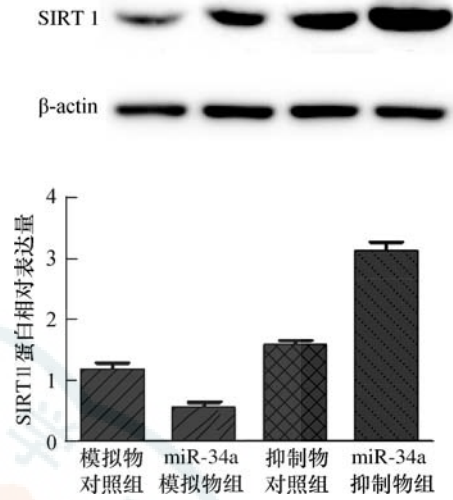


图2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激下 miR-34a 对 SIRT1 中蛋白表达水平的影响

### 3 讨论

近年来,对 EPC 的功能调节一直是研究 AS 的热点和治疗靶点。研究发现,细胞内活性氧,尤其是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 是一个重要的细胞内信号分子,通过对敏感性蛋白质半胱氨酸的巯基氧化修饰,调节转录因子活性和细胞信号转导,从而影响 EPC 功能<sup>[6]</sup>。

miRNA 是一类高度保守的非编码内源性单链小 RNA 分子<sup>[7]</sup>。研究发现, AS 发生发展过程中, miRNA 表达失调,一些恶性生物学表型常和某种 miRNA 有着紧密联系<sup>[8-9]</sup>。miR-34a 是一种具有多种功能的 miRNA,在许多病理生理过程中都发挥着重要作用。因此,miR-34a 在 EPC 损伤过程中具有重要作用。SIRT1 是 miR-34a 作用的靶基因之一,在抑制 EPC 功能障碍中发挥着重要作用,它与细胞分化、衰老、增殖与凋亡密切相关,在延长生物寿命及延缓多种与年龄相关疾病的发展有重要作用<sup>[10]</sup>。研究表明, SIRT1 与多种细胞功能的调节有关,包括 AS 发展<sup>[11]</sup>。

在本实验研究中,利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立一个氧化应激的模型,在随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度增加时,会逐渐降低 EPCs 存活率,800 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导时仅有 32% 的 EPC 存在;当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度为 500 μM,有着较高生存的细胞,能够作为在氧化应激的状态下损伤细胞,这就对我们以后在延缓 EPC 功能损伤及障碍产生重要理论指导和临床意义。

通过脂质体转染将 miR-34a 转染到 EPCs 中,



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后 RT-PCR 的反应,转染 miR-34a mimics, miR-34a 的表达水平明显升高,而转染 miR-34a inhibitors 时 miR-34a 表达水平明显下降。因此, miR-34a 在 EPCs 功能调节控制中是一个关键靶点。RT-PCR 和 Western blot 检测发现,氧化应激状态下,miR-34a 过表达时其靶基因 SIRT1 在 mRNA 及蛋白水平均降低,而抑制 miR-34a 的表达时,其靶基因 SIRT1 在 mRNA 及蛋白水平表达均明显升高。因此,miR-34a 增加与 SIRT1 减少之间可能存在直接因果关系。

综上所述,氧化应激状态下可使 miR-34a 的过表达或抑制,改变 SIRT1 中蛋白的表达,表明 miR-34a 是 AS 的一种促使基因,可作为治疗 AS 新的靶点。

利益冲突:无

### 参 考 文 献

[ 1 ] Wu H, Li R, Wei ZH, et al. Diabetes-Induced Oxidative Stress in Endothelial Progenitor Cells May Be Sustained by a Positive Feedback Loop Involving High Mobility Group Box-1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1943918. DOI: 10.1155/2016/1943918.

[ 2 ] Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(11):1895-1907. DOI:10.1089/ars.2008.2118.

[ 3 ] Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, et al. Atherosclerosis and oxidative stress [J]. Histol Histopathol, 2008, 23(3): 381-390. DOI:10.14670/HH-23.381.

[ 4 ] Staszal T, Zapadka B, Polus A, et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology [J]. Pol Arch Med Wewn, 2011, 121(10): 361-366.

[ 5 ] 王玉强, 黄黎亚, 王飞, 等. 人脐血内皮祖细胞的体外分离和培养[J]. 中国心血管杂志, 2014, 19(5): 359-363. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5410.2014.05.12. Wang YQ, Huang LY, Wang F, et al. Isolation and culture of human umbilical cord blood endothelial progenitor cells in vitro [J]. Chin J Cardiol. 2014, 19(5): 359-363. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2014.05.12.

[ 6 ] de Keizer PL, Burgering BM, Dansen TB. Forkhead Box O as a Sensor, Mediator, and Regulator of Redox Signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(6): 1093-1106. DOI: 10.1089/ars.2010.3403.

[ 7 ] Urbich C, Kuehbacher A. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4): 581-588. DOI:10.1093/cvr/cvn156.

[ 8 ] Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the tampere vascular study [J]. Atherosclerosis, 2011, 219(1): 211-217. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.020.

[ 9 ] Vickers KC, Remaley AT. MicroRNAs in atherosclerosis and lipoprotein metabolism [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010, 17(2): 150-155. DOI: 10.1097/MED.0b013e32833727a1.

[ 10 ] Longo VD, Kennedy BK. Sirtuins in aging and age-related disease [J]. Cell, 2006, 126(2): 257-268. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.002.

[ 11 ] Kedenko L, Lamina C, Kedenko I, et al. Genetic polymorphisms at SIRT1 and FOXO1 are associated with carotid atherosclerosis in the SAPHIR cohort [J]. BMC Med Genet, 2014, 15(1): 112. DOI:10.1186/s12881-014-0112-7.

(收稿日期:2019-03-24)  
(本文编辑:李鹏)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 审稿时经常见到的“低级错误”

### 1 引用诊断标准错误

例如,在高血压研究中引用 1999 年 WHO 高血压诊断标准,这一标准对于高血压的诊断与定义均与现行指南不同;在糖尿病研究中引用美国 ADA 诊断标准,这一指南中将 HbA1C 也作为诊断糖尿病的依据之一,而我国并未采用这一标准;又如关于代谢综合征的诊断,引用其他国家和地区的诊断标准,这与我国标准也有很大差别;还有一些关于顽固性高血压的研究,所纳入患者不符合现行指南关于顽固性高血压的定义。

诊断标准选择不当,会导致研究结论的不可靠。在我国开展的临床研究应该引用我国现行指南所推荐的标准。

### 2 研究数据前后不一致

有些文稿的摘要、正文以及附表中对于同一指标所提供的数值不一致,前后矛盾。例如某文稿的摘要中提及纳入 230 例患者,平均年龄 62.1 岁,但正文中却称纳入 235 例患者,平均年龄 63.2 岁。这种情况表明两个问题:或者计算失误,或者伪造数据。

(河北省人民医院 郭艺芳)