

# 微小 RNA-21 对缺氧人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

许耀文 孙国通 刘双梅

作者单位: 266011 山东青岛, 青岛市市立医院本部心内一科(许耀文)

262700 山东寿光, 寿光市中医医院心血管病科(孙国通)

266071 山东青岛, 青岛市市立医院东院区干部保健科(刘双梅)

通信作者: 刘双梅, Email: shuangmei2008@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.01.020

**【摘要】** 目的 研究微小 RNA (miR)-21 在缺氧环境中人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 凋亡中的作用。方法 取原代 HUVEC 随机分为 6 组, 包括正常对照组 (在正常培养环境中培养, 不进行任何处理)、缺氧处理 6 h 组、12 h 组、24 h 组 (将细胞置于厌氧盒中进行缺氧培养 6 h、12 h、24 h)、转染 miR-21 抑制剂 + 缺氧 24 h 组 (转染 miR-21 抑制剂 24 h 后, 给予缺氧处理 24 h)、阴性转染 + 缺氧 24 h 组 (转染 miR-21 抑制剂阴性对照 24 h 后, 给予缺氧处理 24 h)。处理完毕后收集各组细胞, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测正常对照组和单纯缺氧各组细胞中 miR-21 的表达量; 采用流式细胞术检测正常对照组和各处理组细胞的凋亡率; 比较各组上述指标的差异。结果 ① 缺氧处理 6 h、12 h、24 h 组 miR-21 的表达量均明显低于正常对照组 [缺氧 6 h:  $0.75 \pm 0.07$  比 1, 缺氧 12 h:  $0.71 \pm 0.07$  比 1, 缺氧 24 h:  $0.66 \pm 0.06$  比 1, 均  $P < 0.05$ ]。② 缺氧处理 6 h、12 h、24 h 组的细胞凋亡率均明显高于正常对照组 [缺氧 6 h (%):  $8.80 \pm 1.69$  比  $3.02 \pm 0.40$ , 缺氧 12 h (%):  $9.84 \pm 1.55$  比  $3.02 \pm 0.40$ , 缺氧 24 h (%):  $11.50 \pm 2.00$  比  $3.02 \pm 0.40$ , 均  $P < 0.05$ ]。转染 miR-21 抑制剂 + 缺氧 24 h 组的细胞凋亡率明显高于单纯缺氧 24 h 组 (%:  $16.10 \pm 1.34$  比  $11.50 \pm 2.00$ ,  $P < 0.05$ ); 阴性转染 + 缺氧 24 h 组的凋亡率与单纯缺氧 24 h 组比较差异无统计学意义。结论 HUVEC 在缺氧刺激后 miR-21 表达水平降低, 且缺氧时间不同, miR-21 表达量不同; 转染 miR-21 抑制剂后细胞凋亡率明显升高。因此, miR-21 在细胞缺氧刺激过程中可能发挥抗细胞凋亡的作用。

**【关键词】** 微小 RNA-21; 缺氧; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡

基金项目: 山东省青岛市公共领域科技支撑计划项目 (2012-1-3-1-3)

## Effects of microRNA-21 on apoptosis of hypoxic human umbilical vein endothelial cells

Xu Yaowen, Sun Guotong, Liu Shuangmei. Department of Cardiology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China (Xu YW); Department of Cardiovascular Diseases, Shouguang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shouguang 262700, Shandong, China (Sun GT); Department of Cadre Health Care, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, Shandong, China (Liu SM)

Corresponding author: Liu Shuangmei, Email: shuangmei2008@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of microRNA (miR)-21 in the apoptosis of hypoxic human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** The primary HUVEC were replaced and randomly divided into 6 groups, including normal control group (cultured in normal environment without any treatment), hypoxia stimulation for 6 hours, 12 hours and 24 hours groups (the cells were placed in an anaerobic box for hypoxia culture for 6 hours, 12 hours and 24 hours), transfection with miR-21 inhibitor + hypoxia for 24 hours group (24 hours after transfection with miR-21 inhibitor, hypoxia treatment for 24 hours) and negative transfection + hypoxia for 24 hours group (24 hours after transfection with miR-21 inhibitor negative control, hypoxia treatment for 24 hours). After stimulation, the cells in each group were collected, and the expression of miR-21 in normal control and hypoxia groups was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR); the apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry. The differences of the above indexes in each group were compared. **Results** ① The expression levels of miR-21 in hypoxia for 6 hours, 12 hours and 24 hours groups were lower than that in normal control group [hypoxia for 6 hours:  $0.75 \pm 0.07$  vs. 1, hypoxia for 12 hours:  $0.71 \pm 0.07$  vs. 1, hypoxia for 24 hours:  $0.66 \pm 0.06$  vs. 1, all  $P < 0.05$ ]. ② The cell apoptosis rates in hypoxia for 6 hours, 12 hours and 24 hours groups were higher than that in

normal control group [hypoxia for 6 hours (%):  $8.80 \pm 1.69$  vs.  $3.02 \pm 0.40$ , hypoxia for 12 hours (%):  $9.84 \pm 1.55$  vs.  $3.02 \pm 0.40$ , hypoxia for 24 hours (%):  $11.50 \pm 2.00$  vs.  $3.02 \pm 0.40$ , all  $P < 0.05$ ]. The apoptosis rate of transfection with miR-21 inhibitor + hypoxia for 24 hours group was higher than that of hypoxia for 24 hours group (%:  $16.10 \pm 1.34$  vs.  $11.50 \pm 2.00$ ,  $P < 0.05$ ); there was no significant difference in apoptosis rate between negative transfection + hypoxia for 24 hours group and hypoxia for 24 hours group. **Conclusions** After hypoxia stimulation, the expression of miR-21 in HUVEC decreased, and the amount was different in different hypoxia time. At the same time, the apoptosis rate increased significantly after transfection with miR-21 inhibitor. Therefore, miR-21 may play an anti apoptotic role in the process of cell hypoxia stimulation.

**【Key words】** MicroRNA-21; Hypoxia; Human umbilical vein endothelial cell; Cell apoptosis

**Fund Program:** Public Science and Technology Support Program of Qingdao City, Shandong Province (2012-1-3-1-3)

微小 RNA (microRNA, miR) 是一类长度为 18 ~ 25 个碱基的小分子单链非编码 RNA, 在生物体内高度保守, 具有基因调节作用, 可通过特异性识别靶 mRNA 的 3' 非编码区 (3'-untranslation region, 3'-UTR) 抑制靶 mRNA 的蛋白表达或直接降解靶 mRNA, 调节机体蛋白质水平, 人类约 30% 的基因受到 miR 的调节<sup>[1]</sup>。有研究表明, miR-21 在心血管系统中存在高表达, 可参与调节血管平滑肌、心肌细胞等的增殖、分化和凋亡<sup>[2]</sup>。心肌缺氧缺血导致的细胞凋亡是心脏缺血性疾病的本质, 因此减少心肌细胞的凋亡与坏死, 增加细胞存活数量, 是降低冠心病病死率的根本。其中心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 对心肌细胞的损伤最严重, 其病死率逐年上升, 患者预后较差<sup>[3]</sup>。因此在心肌缺血后及早通畅血流, 对心肌组织的恢复有关键作用。近年来, 缺氧缺血性疾病的发病机制需要进一步探讨, miR-21 是否参与调控缺氧过程尚未清楚, 明确其发病机制后, 才能进一步减少由缺血损伤导致的心肌细胞死亡。本研究在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 缺氧后, 以及转染 miR-21 抑制剂后观察细胞凋亡情况, 进一步探讨 miR-21 在缺氧细胞凋亡中的作用, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** HUVEC 购自江苏省江阴齐氏生物科技有限公司, Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 反转录和实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 引物设计合成于广州复能基因有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司, 青霉素和链霉素双抗购自默克 Sigma

公司。MGC AnaeroPack 系列缺氧试剂盒及指示剂均购自日本三菱瓦斯化学株式会社, miR-21 抑制剂和阴性对照品均购自上海吉玛公司, 流式细胞术凋亡试剂盒购于上海七海复泰生物科技有限公司。

**1.2 细胞培养** 使用 DMEM 高糖培养基 (含 10% FBS 和双抗) 培养原代细胞, 当细胞融合 80% ~ 90% 时进行胰酶消化传代培养, 隔日换液。传代细胞数量足够多且培养至细胞融合 80% ~ 90% 时, 将细胞按相同浓度接种到 6 孔培养板上, 每瓶细胞数量约  $5 \times 10^5$  个 / 孔。正常环境下培养细胞 1 d, 至细胞稳定并贴壁后, 进行后续实验。

**1.3 缺氧处理** 使用厌氧盒及厌氧产气袋进行缺氧处理。模型建立前先进行细胞培养, 待细胞贴壁后换液, 立刻放入缺氧盒内, 缺氧盒内加入一次性缺氧料和缺氧指示条 (缺氧料可吸收  $O_2$ , 产生  $CO_2$ ), 并立即密闭盒盖, 置于细胞培养箱进行缺氧培养。厌氧指示条为粉色时提示盒中为无氧状态, 此刻开始计时。分别给予细胞不同时间的缺氧刺激, 到时间后取细胞进行后续实验。

**1.4 研究分组** 将培养的 HUVEC 分为 6 组, 分别为正常对照组、缺氧 6 h、12 h、24 h 组、转染 miR-21 抑制剂 + 缺氧 24 h 组、阴性转染 + 缺氧 24 h 组, 每组 3 个复孔。实验结束后收集各组细胞进行相应检测。本研究方案通过青岛市市立医院伦理学委员会批准 (审批号: 2021-032)。

**1.5 检测各组细胞 miR-21 表达** 收集各组细胞, 采用离心柱法提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA 后保存于  $-20^\circ C$  冰箱, 检测 miR-21 水平, 以内参基因 U6 作为标准。PCR 反应条件为  $95^\circ C$  预变性 30 s,  $95^\circ C$  变性 5 s,  $60^\circ C$  34 s, 40 个循环。采用  $\Delta$  循环阈值法, 计算相对表达量即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**1.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集各组细胞, 重

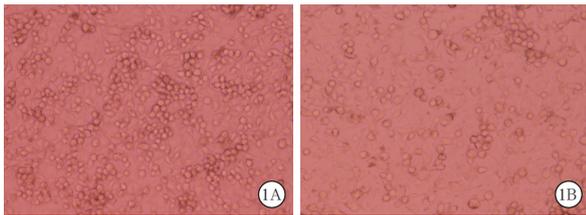
新悬浮于结合缓冲液,加入荧光标记的 Annexin V 和 PI 试剂,避光孵育 15 min, 30 min 内通过流式细胞仪检测细胞凋亡率,实验重复 3 次。

**1.7 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 统计软件录入和分析数据,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 正常 HUVEC 和缺氧 HUVEC 的形态学观察

正常 HUVEC 可见细胞贴壁生长,为扁平多角形,边界清楚,细胞质丰富;细胞核为圆形或椭圆形,核内染色质稀疏空亮。缺氧状态下 HUVEC 呈长梭形改变,并出现水肿及破裂。见图 1。



注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞; 1A 可见正常细胞贴壁生长,边界清楚,细胞质丰富; 1B 可见缺氧细胞呈长梭形改变,水肿及破裂

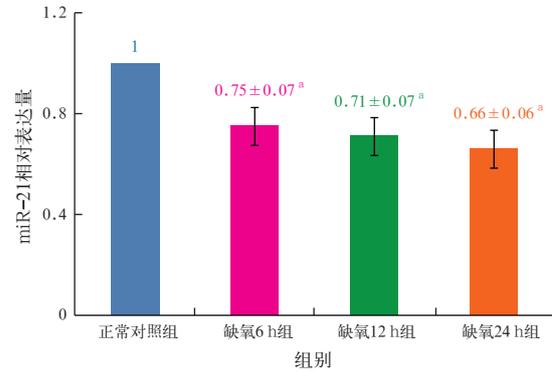
**图 1 正常 HUVEC (1A) 和缺氧 HUVEC (2B) 的细胞形态学观察**

**2.2 细胞 miR-21 表达分析** 以正常对照组 miR-21 表达量为 1,缺氧处理 6 h、12 h、24 h 组细胞的相对表达量均明显低于正常对照组(均  $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率** 缺氧 6 h、12 h、24 h 组的细胞凋亡率均明显高于正常对照组(均  $P < 0.05$ )。转染 miR-21 抑制剂 + 缺氧 24 h 组的细胞凋亡率最高,为  $(16.1 \pm 1.34)\%$ ,明显高于缺氧 24 h 组( $P < 0.05$ ); 阴性转染 + 缺氧 24 h 组的细胞凋亡率与缺氧 24 h 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3~4。

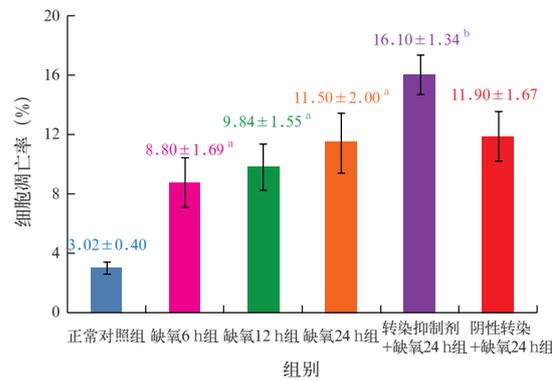
### 3 讨论

miR 是一类具有调控作用的内源性非编码小分子 RNA,在人类 30%~40% 的



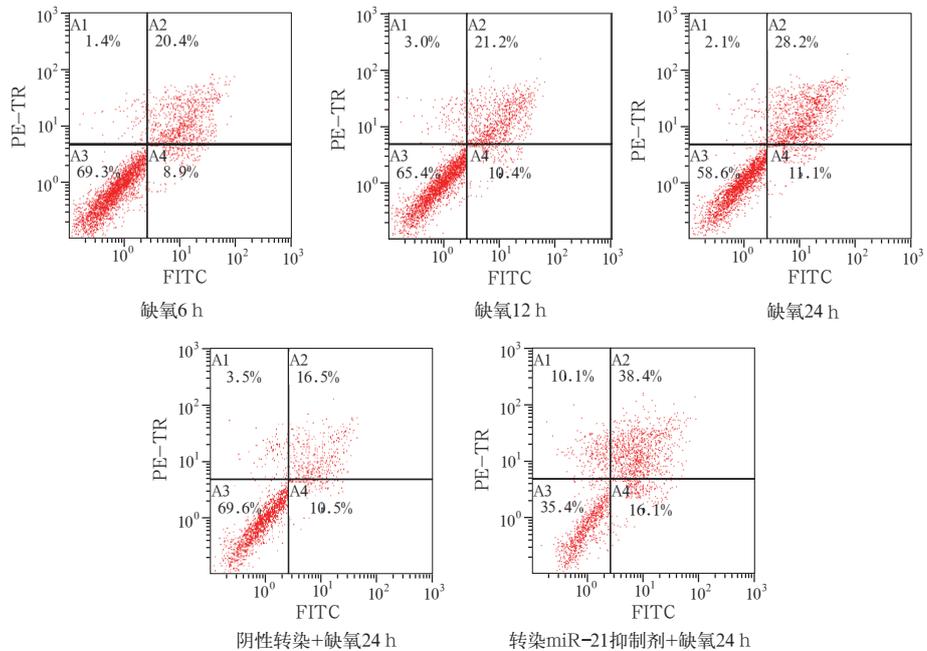
注: miR-21 为微小 RNA-21; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

**图 2 正常对照组与缺氧不同时间组的 miR-21 相对表达量**



注: miR-21 为微小 RNA-21; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与缺氧 24 h 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

**图 4 各组细胞凋亡率比较**



注: miR-21 为微小 RNA-21, FITC 为异硫氰酸荧光素, PE-TR 为藻红蛋白-德克萨斯红; 左下象限显示活细胞, 右下象限显示凋亡早期细胞, 右上象限显示晚期凋亡细胞, 左上象限显示损伤细胞

**图 3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率**

蛋白表达过程中都参与调节<sup>[2]</sup>。其中, miR-21 在心血管系统中广泛表达,尤其在缺血性疾病(如冠心病、缺血性肾病、肺动脉高压等)患者体内的表达水平有明显变化<sup>[4]</sup>。然而,关于 miR-21 在 HUVEC 缺氧损伤过程中的表达变化尚未有报道。

近年来研究表明, miR-21 是一种具有抗凋亡作用的 RNA。在多种肿瘤细胞中, miR-21 都发挥了明显的抗凋亡作用。Kulshreshtha 等<sup>[5]</sup>研究表明, miR-21 表达在部分乳腺癌患者中上调。赵守香等<sup>[6]</sup>也发现 miR-21 通过负性调控人乳腺癌细胞中 STAT3 基因的表达,抑制癌细胞侵袭。Mace 等<sup>[7]</sup>研究表明,胰腺癌患者癌细胞内缺氧可介导 miR-21 的表达,通过缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的表达上调,使细胞避免了由于缺氧环境导致的凋亡。Cheng 等<sup>[8]</sup>在缺血再灌注实验中发现, miR-21 的表达降低可增加心肌细胞的凋亡。Yin 等<sup>[9]</sup>向大鼠体内注入化学合成的 miR-21 类似物,结果显示大鼠的心肌细胞凋亡数量减少。然而,如果注入 miR-21 抑制物,则 miR-21 介导的保护作用消失。在大鼠心肌缺血后,随着再灌注时间延长,凋亡细胞数量增多,因此过表达 miR-21 可减少细胞凋亡数量,提示 miR-21 可抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

本研究对体外培养的 HUVEC 以及转染 miR-21 抑制剂的 HUVEC 分别给予缺氧 6 h、12 h、24 h 的刺激,记录各组 miR-21 表达水平的变化,并用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。本研究结果显示,缺氧 6 h、12 h、24 h 的 HUVEC 中 miR-21 表达均下调,表明 miR-21 参与缺氧过程中内皮细胞的凋亡过程。流式细胞术结果也显示,随着缺氧时间延长,细胞凋亡率明显升高。转染 miR-21 抑制剂的细胞凋亡率明显增高,与阴性转染组比较有明显差异,这都表明 miR-21 参与缺氧对内皮细胞损伤的过程,降低 miR-21 可能是缺氧促进细胞凋亡的机制之一,因此 miR-21 具有抗凋亡的作用。

miR-21 在缺氧性心肌细胞损伤过程中可能通过抑制靶基因介导细胞凋亡的关键因子〔程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4)〕发挥抗细胞凋亡的作用<sup>[11]</sup>。PDCD4 在细胞凋亡启动后表达上调,是介导细胞凋亡的关键因子<sup>[12]</sup>。Bcl-2 是另一种与缺血性心脏疾病导致凋亡有关的基因,可发挥抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2/Bax 决定细胞是否进入凋亡途径,当其比值降低时,细胞发生凋亡, caspase-3 是此过程的执行者<sup>[13-14]</sup>。

综上所述,本研究结果显示, miR-21 在 HUVEC 凋亡中发挥重要的抗凋亡作用,且对内皮细胞具有调控作用,也为改善内皮细胞功能,控制动脉硬化性疾病提供了新的治疗方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- 1 CANNELL I G, KONG Y W, BUSHELL M. How do microRNAs regulate gene expression? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36 (Pt 6): 1224-1231. DOI: 10.1042/BST0361224.
- 2 CHENG Y H, ZHANG C C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3 (3): 251-255. DOI: 10.1007/s12265-010-9169-7.
- 3 苏彤, 张晓璞, 韩志君, 等. 循环微小 RNA-1 对胸痛患者发生急性心肌梗死的早期诊断价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (7): 607-611. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2016.07.007.
- 4 FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009, 19 (1): 92-105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- 5 KULSHRESHTHA R, FERRACIN M, WOJCIK S E, et al. A microRNA signature of hypoxia [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27 (5): 1859-1867. DOI: 10.1128/MCB.01395-06.
- 6 赵守香, 王涛, 李玉军. miR-21 靶向调控 STAT3 基因抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭 [J]. *实用检验医师杂志*, 2016, 8 (1): 5-9. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.01.002.
- 7 MACE T A, COLLINS A L, WOJCIK S E, et al. Hypoxia induces the overexpression of microRNA-21 in pancreatic cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2013, 184 (2): 855-860. DOI: 10.1016/j.jss.2013.04.061.
- 8 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. DOI: 10.1093/cvr/cvq082.
- 9 YIN C, WANG X, KUKREJA R C. Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582 (30): 4137-4142. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.11.014.
- 10 杨琼, 杨侃, 李安莹, 等. MicroRNA-21 在缺血再灌注损伤早期大鼠心肌的表达及抗细胞凋亡作用 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2013, 38 (5): 483-489. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2013.05.006.
- 11 CHENG Y, LIU X, ZHANG S, et al. MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47 (1): 5-14. DOI: 10.1016/j.jmcc.2009.01.008.
- 12 LANKAT-BUTTGEREIT B, GOKE R. The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation [J]. *Biol Cell*, 2009, 101 (6): 309-317. DOI: 10.1042/BC20080191.
- 13 KILBRIDE S M, PREHN J H. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (22): 2703-2711. DOI: 10.1038/onc.2012.348.
- 14 SYKES M C, MOWBRAY A L, JO H. Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (2): 152-154. DOI: 10.1161/01.RES.0000258171.08020.72.

(收稿日期: 2022-02-18)

(本文编辑: 邵文)