

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.19.003

不同低氧时间诱导的肺动脉平滑肌细胞 miR-214 表达的动态变化*

杨 姣¹, 吴绪伟², 张力燕¹, 肖 谊², 张钰璇², 李艳丽², 邢西迁^{2△}

(1. 昆明医科大学第一附属医院呼吸内一科 650032; 2. 昆明医科大学附属延安医院呼吸内一科 650051)

[摘要] 目的 观察不同低氧时间诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)微小 RNAs(miRNA)-214 表达的变化。方法 将原代培养的大鼠 PASMCs 分别于低氧下培养 0、6、12、24 和 48 h, 采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组细胞 miR-214 的表达情况。**结果** 大鼠 PASMCs 的 miR-214 表达随低氧时间的延长呈持续升高趋势, 除低氧 6 h 组与低氧 0 h 组相比较, miR-214 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)外, 其余各组之间 miR-214 的表达差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 低氧诱导后, miR-214 在 PASMCs 中的表达上调, 且随着低氧时间的延长, miR-214 的表达有逐渐增加的趋势。

[关键词] 微 RNAs-214; 缺氧; 肺动脉平滑肌细胞

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)19-2600-02

The expression changes of miR-214 in hypoxic induced pulmonary artery smooth muscle cells of rats*

Yang Jiao¹, Wu Xuwei², Zhang Liyan¹, Xiao Yi², Zhang Yuxuan², Li Yanli², Xing Xiqian^{2△}

(1. First Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. First Department of Respiratory, the Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To observe the changes of microRNA-214 (miR-214) expression in rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced by different hypoxia time, and lay the foundation to explore the effect and mechanism of regulation of miR-214 on PASMCs proliferation. **Methods** The primary cultured PASMCs were cultured under hypoxic 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, respectively. The real time quantitative PCR was used to detect miR-214 expression in each group PASMCs. **Results** The expression of miR-214 in hypoxia group PASMCs was sustained as time increased, apart from hypoxic hypoxia 6h group and 0h group, the expression of miR-214 was no significant difference ($P>0.05$); the expression of miR-214 among other groups PASMCs was significantly different ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-214 in PASMCs increased after induction of hypoxia. We speculated that miR-214 may be involved in the regulation of hypoxia induced PASMCs proliferation.

[Key words] MiRNA-214; anoxia; pulmonary artery smooth muscle cells

微小 RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类长度约 22 个核苷酸大小的内源性非编码 RNA, 它可通过识别靶基因 mRNA 的 3'端非编码区, 并与之结合阻止翻译或导致 mRNA 降解, 从而抑制靶基因的表达^[1]。研究表明, 一些 miRNAs 参与了肺动脉高压的发生、发展, 可能在肺动脉高压的防治方面起到重要作用^[2-3]。肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖、迁移是肺动脉高压形成的重要因素, 但 miR-214 是否参与低氧诱导的 PASMCs 增殖、迁移, 尚不明确。本研究选取大鼠 PASMCs 作为研究对象, 观察不同低氧时间诱导的 PASMCs miR-214 的动态表达变化, 为进一步研究 miR-214 对 PASMCs 的调控作用及机制奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠, 4 周龄, 体质量约 180~200 g, 购自昆明医科大学动物实验部。

1.1.2 仪器与试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素和 D⁻Hanks 缓冲液(GIBCO, 进口分装), 二甲基亚砷(DMSO)购于 Sigma 公司, 小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白

抗体、山羊抗小鼠 IgG、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于 Santa Cruz 公司, 磷酸盐缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司), TRIzol(Invitrogen, 美国); miR-Neasy Mini Kit(Qiagen, 德国), miRNA Q-PCR Detection Kit(Gene Copoeia, 美国)。Realtime-PCR 仪(ABI 7500 型), DG-III 双稳数显电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心), 高速离心机(SIGMA, 1-13), 二氧化碳培养箱(德国 Hereus), 倒置相差显微镜(日本 Olympus)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肺动脉平滑肌细胞原代培养及鉴定 肺动脉平滑肌提取、培养参照文献。在立体显微镜下分离大鼠肺动脉, 采用 II 型胶原酶法提取原代平滑肌细胞, 按每瓶 3×10^4 活细胞数接种在 25 mL 培养瓶里, 放入 37 °C 孵箱里静置培养。细胞免疫荧光鉴定: 使用 α -SM-actin 单克隆抗体, 滴加 cy3 标记的荧光二抗 Anti-Mouse IgG, 用 DAPI 染核, 荧光显微镜下拍片。鉴定为平滑肌细胞, 且比例占 97% 以上, 取 3~5 代的细胞做实验研究。

1.2.2 细胞处理及分组 细胞生长达 50% 融合后, 加入无血

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81100037, 81360049); 云南省应用基础研究计划项目(2011FB154, 2013FZ231, 2013FZ230)。

作者简介: 杨姣(1980-), 主治医师, 硕士, 主要从事呼吸系统疾病的基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel: 15911743143; E-mail: xingxiqianmd@yahoo.com。

清的 DMEM/F12 培养基,在 37 °C 培养箱中放置 24 h,使细胞周期同步化。传代培养后,分组设计:细胞置于 3% O₂、92% N₂、5% CO₂ 的混合气体的低氧条件下培养,分为 H0 h 组、H6 h 组、H12 h 组、H24 h 组、H48 h 组,分别培养 0、6、12、24、48 h。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 miR-214 的表达 分别收集各组细胞,采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,异丙醇法浓缩 RNA,琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性。采用 ABI 公司 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 和特异 miRNA 的茎环引物逆转录合成 cDNA。采用 Gene Co-poeia miRNA 检测试剂盒,在 RT-PCR 仪上扩增和检测,反应条件:95 °C 5 min,40 个扩增循环(95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 10 s)。选取 GAPDH 作为内参,miR-214 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞免疫荧光鉴定结果 细胞免疫荧光显示,细胞质中有较强的红色荧光,呈与细胞纵轴平行的丝状排列,而细胞核未着色,表明为 PSMCs,见图 1。

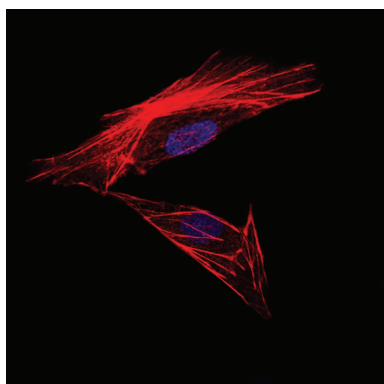
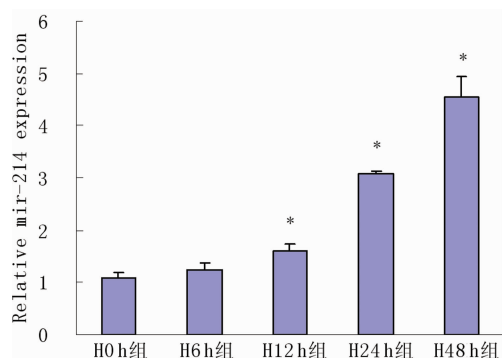


图 1 PSMCs 的细胞免疫荧光鉴定结果(IF×400)

2.2 各组 PSMCs miR-214 表达情况 RT-PCR 结果显示: PSMCs 的 miR-214 表达随着低氧时间的延长呈逐渐上升趋势。除 H6 h 组与 H0 h 组比较,miR-214 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)外,H12 h 组、H24 h 组、H48 h 组分别与 H0 h 组比较,PSMCs miR-214 的表达差异均有统计学意义($P<0.05$);另外除 H0 h 组与 H6 h 组外,其余各组之间 PSMCs miR-214 的表达差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



*: $P<0.05$,与其他各组比较。

图 2 各组 PSMCs miR-214 表达情况

3 讨 论

慢性阻塞性肺疾病患者在长期慢性低氧条件下,PSMCs 出现增殖、迁移,引起肺血管重建,最终导致低氧性肺动脉高压的发生、发展^[4]。本实验进行原代提取和培养大鼠 PSMCs,细胞荧光免疫方法鉴定发现,第 5 代 PSMCs 的纯度可达 97% 以上,说明组织贴壁法培养的原代 PSMCs 的纯度较高,可以满足实验的要求。

miRNAs 是一种小分子非编码单链 RNA,它可通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区,并与其结合阻止翻译或导致 mRNA 降解,介导靶基因 mRNA 水平的降低或者抑制其蛋白的翻译而发挥功能^[5]。近年来研究表明,miRNAs 与肺动脉高压发生、发展密切相关。miR-21、miR-30、miR-204、miR-322、miR-451 等在肺动脉高压发生中异常表达,其中过表达 miR-204 可抑制肺动脉高压的发生、发展^[2-3,6]。

miR-214 在多种肿瘤中的作用已经得到了较深入研究,在乳腺癌细胞、食管鳞状细胞癌、肝癌中 miR-214 呈低表达,过表达 miR-214 显著抑制食管鳞状细胞癌细胞、乳腺癌细胞及肝癌细胞增殖和迁移^[7-9]。近来有研究表明,大鼠心肌梗死后心室重塑过程中心肌组织中 miR-214 的表达上调^[10],另外 miR-214 在成肌细胞分化中高表达,且调控成肌细胞增殖和分化^[11],这些研究表明 miR-214 在肌细胞中亦存在异常表达,可调控肌细胞的生物学行为。

本实验明确了 miR-214 在低氧诱导的大鼠 PSMCs 中的动态表达变化,表明随着低氧时间的延长,miR-214 的表达呈逐渐增加的趋势。Sarkar 等^[6]的实验表明,低氧 24 h 后 PSMCs 的 miR-214 表达较常氧状态培养的 PSMCs 增加 2 倍,与本实验结果一致。因此,笔者推测 miR-214 可能参与了低氧诱导的 PSMCs 增殖、迁移过程,提示 miR-214 可能对 PSMCs 的生物学行为调控有重要作用。本实验为后续深入研究 miR-214 在 PSMCs 中的作用及机制,探讨其在肺动脉高压发生中的分子机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
- [2] Caruso P, MacLean MR, Khanin R, et al. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(4): 716-723.
- [3] Chan YC, Khanna S, Roy S, et al. miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 2047-2056.
- [4] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Clin Invest, 2012, 122(12): 4306-4313.
- [5] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(2): 126-139.
- [6] Sarkar J, Gou D, Turaka P, et al. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Am(下转第 2605 页)

者本身就存在高凝状态。因此,建议术前 D-二聚体值可用作排除 DVT 而不能用作诊断 TKR 或 THR 术后 DVT 发生,关于术前增高的 D-二聚体的判定值上欧洲和北美认为小于 500 $\mu\text{g/L}$ 就可以排除 DVT/PTE^[17],但是我国目前现在应用广泛的 D-二聚体工具包其临界值与欧洲和北美还是有些不同,因此本研究分析结果只能当做建议。

在围术期中依靠识别可控的危险因素来预防 DVT 的形成,或者判断是否需要对患者采取相应的监控措施防止过度医疗对临床中治疗决策有着相当的帮助。本研究以此为立足点得出相应结果,达到了预期。与国内大多研究进行单纯危险因素分析不同,本研究不仅对相关危险因素进行了分析,同时对术前血浆 D-二聚体值与术后 DVT 的发生进行了 ROC 截断值的判定,结果更有实际参考意义。

本研究在设计上还是存在一定不足,ACCP 指南及我国《预防骨科大手术深静脉血栓形成指南》推荐的抗凝应该在术后超过 10 d 直到 35 d,相应的双下肢血管彩超检查也应在相应的时间段多次检测,这样可以提高对血栓发生的准确度。有必要增加大样本量,进行多中心、涵盖各档次医疗条件的机构的分析来明确。

参考文献

- [1] Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3):370-372.
- [2] Falck-Ytter Y, Francis CW, Johanson NA, et al. Prevention of VTE in orthopedic surgery patients: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed; american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines[J]. *Chest*, 2012, 141(2 Suppl):e278S-325S.
- [3] Memtsoudis SG, Besculides MC, Gaber L, et al. Risk factors for pulmonary embolism after hip and knee arthroplasty: a population-based study[J]. *Int Orthop*, 2009, 33(6):1739-1745.
- [4] Kerbauy MN, Moraes FY, Kerbauy LN, et al. Venous thromboprophylaxis in medical patients: an application review[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2013, 59(3):258-264.
- [5] Galeandro AI, Quistelli G, Scicchitano P, et al. Doppler ultrasound venous mapping of the lower limbs[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2012, 3(8):59-64.

- [6] Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy: american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition) [J]. *Chest*, 2008, 133(6 Suppl):110S-112S.
- [7] White RH. The epidemiology of venous thromboembolism [J]. *Circulation*, 2003, 107(23 Suppl 1):I4-8.
- [8] 谢一伟, 朱炳伟. 急性脑梗死患者血栓弹力图与常规凝血试验相关性分析[J]. *检验医学*, 2012, 27(2):88-90.
- [9] Zöller B, Li X, Sundquist J, et al. Autoimmune diseases and venous thromboembolism; a review of the literature [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012, 2(3):171-183.
- [10] Mauermann WJ, Shilling AM, Zuo ZA comparison of neuraxial block versus general anesthesia for elective total hip replacement: a meta-analysis[J]. *Anesth Analg*, 2006, 103(4):1018-1025.
- [11] 王雨, 王爱民. 与骨水泥相关的肺栓塞[J]. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13(8):615-616.
- [12] Smith TO, Hing CB. Is a tourniquet beneficial in total knee replacement surgery? A meta-analysis and systematic review[J]. *The Knee*, 2010, 17(2):141-147.
- [13] Reikeras O, Clementsen T. Time course of thrombosis and fibrinolysis in total knee arthroplasty with tourniquet application. Local versus systemic activations [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2009, 28(4):425-428.
- [14] Clark MT, Green JS, Harper W, et al. Cement as a risk factor for deep-vein thrombosis. Comparison of cemented TKR, uncemented TKR and cemented THR[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1998, 80(4):611-613.
- [15] 王焕, 雷星, 宋扬, 等. 术前血浆 D 二聚体水平对全膝关节置换术后下肢深静脉血栓形成的预测[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 22(11):4301-4303.
- [16] Caprini JA, Glase CJ, Anderson CB, et al. Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism [J]. *Circulation*, 2004, 109(12 Suppl 1):I4-8.
- [17] Nomura H, Wada H, Mizuno T, et al. Negative predictive value of D-dimer for diagnosis of venous thromboembolism[J]. *Int J Hematol*, 2008, 87(3):250-255.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-02-10)

(上接第 2601 页)

- J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(6):L861-871.
- [7] Huang SD, Yuan Y, Zhuang CW, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2012(11):51.
- [8] Derfoul A, Juan AH, Difilippantonio MJ, et al. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(11):1607-1614.

- [9] Shih TC, Tien YJ, Wen CJ, et al. MicroRNA-214 down-regulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3):584-591.
- [10] 施冰, 米林, 于海弈, 等. 大鼠急性心肌梗死后心肌组织中 miR-214 的表达变化[J]. *中国临床保健杂志*, 2010, 13(6):626-628.
- [11] Feng Y, Cao JH, Li XY, et al. Inhibition of miR-214 expression represses proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts[J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29(5):378-383.

(收稿日期:2014-10-18 修回日期:2015-03-11)