

高尿酸通过 miR-663 下调转化生长因子 β_1 抑制内皮细胞迁移

于善栋, 洪 权, 傅 博, 陈香美, 吴 镝

解放军总医院 肾脏病科暨肾脏疾病国家重点实验室, 北京 100853

摘要: 目的 探讨高尿酸通过 miR-663 影响内皮细胞迁移功能的机制。方法 培养人脐静脉内皮细胞系 (EA.hy926), 用 $600 \mu\text{mol/L}$ 尿酸孵育 48 h, 实时定量 PCR 检测 miR-663 的水平, 并检测高尿酸患者血清中 miR-663 水平; 利用双荧光素酶试验预测并验证 miR-663 的靶基因; 检测高尿酸条件下内皮细胞中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 的表达水平, 利用 miR-663 抑制物、TGF β_1 siRNA 转染及划痕实验观察高尿酸如何通过 miR-663 及其靶基因影响内皮细胞的迁移功能。结果 高尿酸培养条件下内皮细胞中 miR-663 表达水平明显升高, 高尿酸血症患者血清中 miR-663 的水平也高于正常人; 双荧光素酶试验结果表明 TGF β_1 的翻译水平受 miR-663 直接调控; 高尿酸能明显抑制细胞的迁移能力, 而高尿酸条件下 TGF- β_1 的表达水平也明显下降, 转染 miR-663 抑制物后, TGF- β_1 表达水平升高, 内皮细胞迁移能力也明显改善, 但是利用 siRNA 抑制 TGF- β_1 的表达后, miR-663 抑制物不能再促进内皮细胞的迁移。结论 高尿酸通过 miRNA-663 下调 TGF- β_1 而抑制细胞迁移。

关键词: 高尿酸; 内皮细胞迁移; miRNA-663; 转化生长因子 β_1

中图分类号: R 543 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2014)07-0733-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2014.07.024

网络出版时间: 2014-04-11 17:25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20140411.1725.007.html>

High uric acid concentration inhibits endothelial cell migration by down-regulating TGF- β_1 expression via miRNA-663

YU Shan-dong, HONG Quan, FU Bo, CHEN Xiang-mei, WU Di

Department of Nephrology, State Key Laboratory of Kidney Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: WU Di. Email: wudi@301hospital.com.cn

Abstract: Objective To study the mechanism of high uric acid (UA) concentration underlying endothelial cell migration via miRNA-663. **Methods** EA.hy926 cells were incubated in $600 \mu\text{mol/L}$ uric acid for 48 h. Serum miRNA-663 level in patients with high UA concentration was measured by RT-PCR. The miRNA-663 target gene was identified by dual luciferase assay. TGF- β_1 expression level in endothelial cells was measured. Effect of high UA concentration on endothelial cell migration via miRNA-663 was detected by miR-663 inhibitor and TGF- β_1 siRNA transfection and scratch test, respectively. **Results** The expression level of miRNA-663 was significantly higher in endothelial cells after cultured with high UA concentration than before cultured with high UA concentration. The serum miRNA-663 level was significantly higher in hyperuricemia patients than in normal subjects. Dual luciferase assay showed that miRNA-663 directly regulated the TGF β_1 translation level. Scratch test revealed that high UA concentration significantly inhibited the endothelial cell migration and down-regulated the TGF- β_1 expression level. The TGF- β_1 expression level elevated and the endothelial cell migration increased after the miRNA-663 inhibitors were transfected. However, the miRNA-663 inhibitors could not promote endothelial cell migration when the TGF- β_1 expression was inhibited by siRNA. **Conclusion** High UA concentration inhibits endothelial cell migration by down-regulating TGF- β_1 expression via miRNA-663

Key words: hyperuricemia; endothelial cell migration; miRNA-663; TGF- β_1

大量研究表明高尿酸血症是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 与心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的独立危险因素^[1-4]。而目前关于高尿酸血症引起心血管和肾损伤的机制研究还处于初步阶段, 内皮细胞功能受损可能是其中的重

要环节。microRNA(miR) 是一类小的非编码 RNA, 长度为 18 ~ 22 nt, 其参与了众多生理和病理生理活动的调控^[5]。已有一些研究显示高尿酸能够引起内皮功能损伤^[6-7]。有研究表明 miRNAs 在某些情况下参与了内皮细胞损伤的过程, 但在高尿酸条件下是否有 miRNAs 参与内皮细胞损伤过程尚不清楚^[8]。我们前期的 miRNA 芯片结果显示在高尿酸条件下, 内皮细胞中有多个 miRNA 出现表达差异, 其中 miR-663 表达差异最明显, 在高尿酸条件下, miR-663 表达水平明显高于正常水平。Neth 等^[9]报道 miR-663 的高表达可以引起内皮细胞一系列病

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31170810; 81102673); 北京科技新星计划 (Z121107002512078)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31170810; 81102673)

作者简介: 于善栋, 男, 在读硕士。Email: alexyu_0507@163.com

通信作者: 吴镝, 主任医师。Email: wudi@301hospital.com.cn

理生理改变。我们利用 Targetscan 查找 miR-663 的靶基因,其中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) 与细胞迁移功能有关,其表达产物 TGF- β_1 能够促进内皮细胞迁移^[10-11]。本研究对高尿酸通过 miR-663 调控 TGFB1 影响内皮细胞迁移的假说进行验证,并为未来预防和治疗高尿酸血症引起的内皮功能损伤提供依据。

材料和方法

1 主要材料 人脐静脉内皮细胞系(EA.hy926)(购自美国 ATCC, No.CRL-2922); 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000、Trizol 试剂盒、M-MLV 逆转录试剂盒(购于美国 Invitrogen 公司); miR-663 抑制剂(miR-663 inhibitor)(购于美国 Life Technologies 公司)(Cat. # 4464084), TGFB1 siRNA(购于美国 Santa Cruz 公司)(sc-44146), miR-663 模拟物(miR-663 mimics, 序列 AGGCGGGCGCCGCGGACCGC), U6 和 cel-mir-39 的 Real time PCR 引物、siRNA(购自上海吉玛制药技术有限公司); 定量 PCR 试剂盒(购自日本 Toyobo 公司); TGF- β_1 多克隆抗体(购自美国 Abcam 公司); 细胞培养试剂(购自美国 GIBCO 公司); 双荧光素酶报告质粒(购于美国 Promega 公司); QuickChange 定点突变试剂盒(购自美国 Agilent Technologies 公司)。

2 细胞培养 人脐静脉内皮细胞系(EA.hy926)用含 10% FBS 的低糖 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养。

3 实时定量 PCR 检测 miR-663 的表达 细胞接种到 10 cm 的培养皿中,分为对照组和高尿酸组(600 μ mol/L)。培养 48 h 后,提取细胞及患者总 RNA,用 miR-663 特异性的反转录引物(5' → 3' 引物序列 AGGCGGGCGCCGCGGACCGC), U6 作为细胞内 RNA 定量的参照物, cel-mir-39 作为血清 RNA 定量的参照物,参照 M-MLV 逆转录试剂盒说明书进行反转录,条件为: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 95℃ 10 min。标本置于 -20℃ 保存备用。采用 Rotor Gene3000 荧光定量 PCR 仪行 Real time PCR 检测 miR-663 表达情况。反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 4 s, 57℃ 30 s, 共 40 个循环。每组设 3 个复孔。以 Δ CT 值作为 MicroRNA-663 的相对表达量, Δ CT=CT663-CTU6, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行差异比较。

4 双荧光素酶报告质粒的构建与检测 利用 PCR 将 TGFB1(NM_000660.5)3' -UTR 区包含的 miR-

663 的结合序列(CCCCGCC Position 13-19 和 18-24 of TGFB1 3' UTR)克隆到双荧光素酶报告质粒 psiCHECKTM-2 中,得到 psiCHECK-WT-TGFB1 质粒,然后利用 QuikChange[®] 定点突变试剂盒将 TGFB1 3' -UTR 区的与 miR-663 结合的核心序列突变为 TTTTATT,克隆到 psiCHECKTM-2 质粒中,得到 psiCHECK-MT-TGFB1 质粒。psiCHECK-WT-TGFB1、psiCHECK-MT-TGFB1 分别与 miR-663 模拟物或 miRNA control 共转染内皮细胞。每组设 3 个复孔。转染 48 h 后,PBS 液洗涤细胞 2 次。吸尽残液,加入 100 μ l 1×PLB 裂解液室温裂解细胞 15 min。取 20 μ l 裂解上清加入 96 孔白板,然后加入 30 μ l LAR II,混匀后立即在荧光/化学发光仪上检测 Firefly 荧光素酶活性(F 值);再加入 30 μ l 1×Stop&Glo 溶液检测 Renilla 荧光素酶活性(R 值),Renilla 活性与 Firefly 活性的比值即为报告基因的相对表达水平。实验共重复 3 次。

5 患者选择和血清中 RNA 的提取 选择 2010-2013 年本院 30 例高尿酸血症男性患者和 30 例健康男性,检测血清中的 miR-663 水平。所有患者及健康者均签署知情同意书。取静脉血分离血清后,用 TRIzol 试剂盒提取血清中的 RNA。

6 Western blot 用 RIPA 裂解液提取 EA.hy926 细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白变性后取 40 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳。50 mA 恒流半干转至纤维素膜,室温封闭 1 h。按照抗体说明书分别加抗 TGF- β_1 抗体、抗 β -actin 抗体 4℃ 过夜孵育。用 TBST 洗膜,加二抗室温孵育 1 h。洗膜后显影,用 Image J 软件分析并计算各组吸光度与 β -actin 吸光度的比值,获取蛋白表达水平。

7 划痕实验 EA.hy926 细胞接种至 6 孔板中,待每孔中细胞铺满后用白枪头在沿着孔的直径划一直线。细胞分为 2 组,每组 3 个复孔,对照组用无血清的低糖 DMEM 培养基培养,实验组在无血清的低糖 DMEM 培养基中加入尿酸,终浓度为 600 μ mol/L,培养 12 h 后在显微镜下观察并用 OLYMPUS DP2-BSW 测量划痕两侧细胞的距离。

8 小 RNA 转染 细胞长至 50%~70% 时进行转染,用无血清的低糖 DMEM 稀释待转染的 RNA,将待转染的 RNA 与 Lipofectamine 2000 混匀,放置 15 min 后转染细胞,在细胞培养箱中培养 5 h 后,更换含血清的低糖 DMEM 培养基继续培养。

9 统计学处理 利用 SPSS17.0.2 进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析比较多组间

差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 miR-663 表达情况 利用荧光定量 PCR 检测高尿酸刺激的内皮细胞和正常培养条件下的内皮细胞中 miR-663 的表达水平, 结果显示高尿酸刺激的内皮细胞中 miR-663 表达水平明显高于正常培养条件下的内皮细胞 ($P < 0.05$) (图 1A), 与 miRNA 芯片结果一致。高尿酸血症病人血清中 miR-663 的水平明显高于正常人 ($P < 0.05$) (图 1B)。

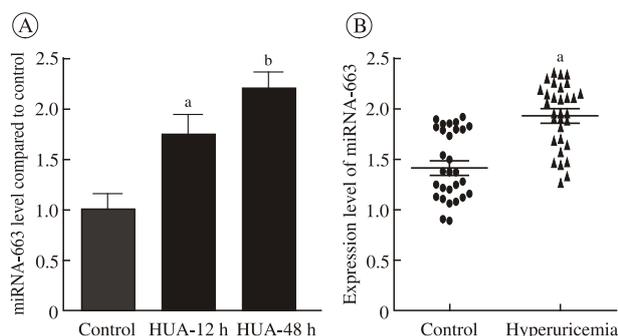


图 1 高尿酸刺激的内皮细胞(A)和高尿酸血症患者血清(B)中 miR-663 的表达水平 ^a $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b $P < 0.05$, 与对照组比较(单因素方差分析)

Fig.1 Expression level of miRNA-663 in high UA concentration-stimulated endothelial cells (A) and hyperuricemia patients (B) ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$, vs control group (ANOVA)

2 miR-663 靶基因验证 高表达 miR-663 能够引起内皮细胞一系列的病理生理变化, 因此我们推测 miR-663 在高尿酸导致的内皮细胞功能紊乱中发挥了重要作用^[9]。利用 miRNA 靶基因预测软件 Targetscan(version 6.2) 预测 miR-663 的靶基因, 其中 TGF β_1 与内皮细胞的迁移功能有关, 其表达产物 TGF- β_1 能够促进内皮细胞迁移^[10-11]。为了验证 TGF β_1 是否为 miR-663 的靶基因, 我们进行了双荧光素酶试验。实验结果显示 miR-663 模拟物可以显著下调 psiCHECK-WT-TGF β_1 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$), 而 miR-663 抑制物可以显著上调内皮细胞 psiCHECK-WT-TGF β_1 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$), 但 miR-663 模拟物和 miR-663 抑制物对突变质粒 psiCHECK-MT-TGF β_1 荧光素酶活性影响不明显 (图 2)。这表明 miR-663 能够特异性地与 TGF β_1 mRNA 作用并在转录后水平抑制 TGF β_1 的表达。

3 高尿酸通过 miR-663 调控内皮细胞迁移的机制

在高尿酸条件下, 内皮细胞的迁移能力明显低于正常培养条件下内皮细胞的迁移能力 ($P < 0.05$), 而高尿酸条件下内皮细胞 TGF- β_1 表达水平明显下

降 ($P < 0.05$)。当我们用 miR-663 抑制物抑制 miR-663 的表达后, TGF- β_1 的表达水平明显升高, 内皮细胞的迁移能力也明显增强 ($P < 0.05$) (图 3A)。然而, 利用 siRNA 抑制 TGF β_1 的表达后, miR-663 抑制物无法再明显促进内皮细胞的迁移 ($P > 0.05$) (图 3B)。这些结果说明, 高尿酸通过 miR-663 下调 TGF β_1 而抑制内皮细胞迁移。

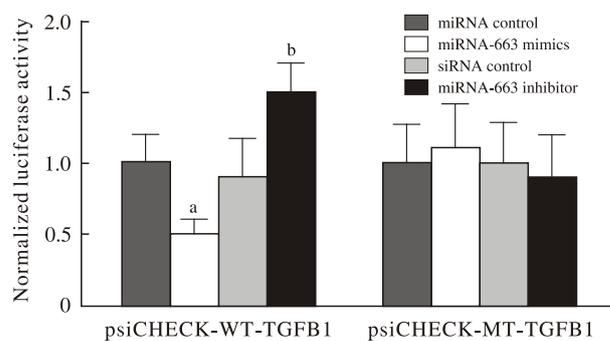


图 2 双荧光素酶试验 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$, 与 miRNA 对照组比较)
Fig.2 Dual luciferase assay (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$, vs miRNA control group)

讨论

许多研究显示, 血尿酸水平与多种疾病, 如冠心病、高血压、糖尿病的预后呈负相关关系^[12-15]。尽管已经有研究表明高尿酸能够引起内皮功能紊乱, 但是 miRNAs 在这个过程中是否发挥作用仍不是很清楚^[6]。miR-663 是高尿酸条件下内皮细胞中表达差异最显著的 miRNA, 因此我们推测 miR-663 在高尿酸导致内皮功能紊乱过程中发挥了重要作用。本实验利用 qRT-PCR 证实了内皮细胞中的 miR-663 在高尿酸条件下表达水平明显高于正常培养条件下内皮细胞中 miR-663 的水平。通过双荧光素酶实验及划痕实验, 我们证实了高尿酸通过上调 miR-663 调控 TGF β_1 从而抑制内皮细胞迁移的猜测。高尿酸血症患者血清中的 miR-663 水平也明显高于正常人, 这说明在高尿酸患者体内可能也存在这种现象。内皮细胞迁移在损伤修复和血管新生中发挥重要作用, 根据我们的实验结果, 我们认为高尿酸血症患者体内可能会出现血管新生受抑制和损伤修复的延迟, 这种情况会导致心血管疾病及其他疾病的发生。在 TGF- β_1 的下游, 还有许多分子参与内皮细胞的迁移, PTEN 是 TGF- β_1 调控的磷酸化酶, 其能够激活一系列下游分子影响内皮细胞迁移。Choorapoikayil 等^[16], Bhattacharya 等^[17]、Huang 和 Kontos^[18] 报道了抑制 PTEN 能够激活 VEGF 通路促进内皮细胞迁移, 而 Wang 等^[11] 和 Ma 等^[19] 报道了 PTEN 通过抑制

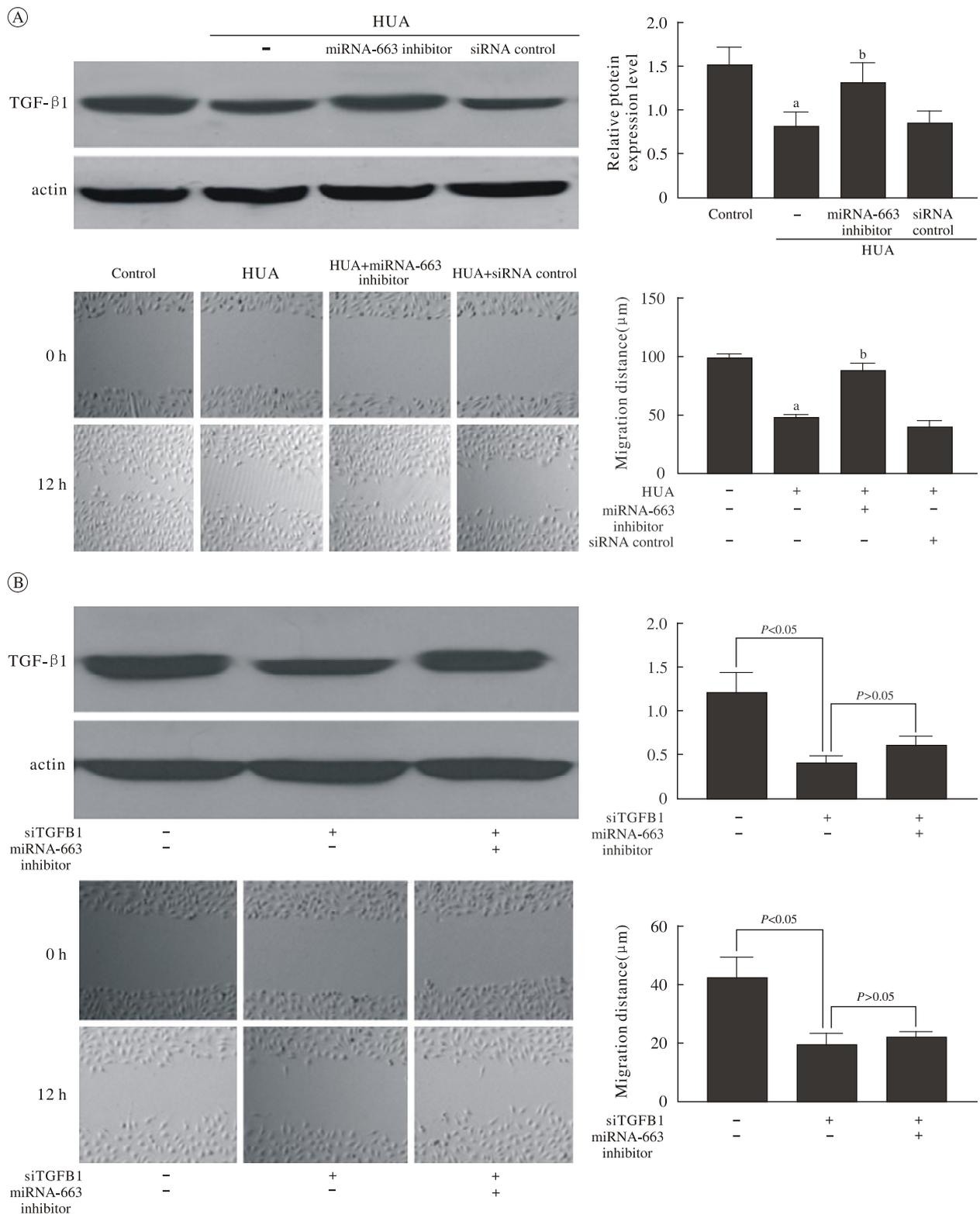


图 3 高尿酸影响内皮细胞迁移功能的机制(划痕实验与蛋白印迹法) A: 高尿酸通过 miR-663 影响 TGF-β₁ 的表达和内皮细胞迁移 ($P < 0.05$, $^bP < 0.05$, 与对照组比较); B: 高尿酸条件下, miR-663 通过 TGF-β₁ 调控内皮细胞迁移(单因素方差分析)

Fig.3 Scratch test and Western blot showing mechanism of high UA concentration underlying endothelial cell migration A: Effect of high UA concentration on TGF-β₁ expression and endothelial cell migration via miR-663 ($P < 0.05$, $^bP < 0.05$, vs control group); B: Effect of miR-663 on migration of endothelial cells cultured with high UA concentration via regulation of TGF-β₁ expression (ANOVA)

AKT 通路抑制细胞迁移, 在高尿酸条件下 TGF-β₁ 通过何种通路影响细胞迁移还需要进一步的研

究。总之, 我们的研究结果阐明了高尿酸影响内皮功能的新机制, 为将来预防和治疗高尿酸血症

引起的内皮功能紊乱提供了新的治疗思路和靶点。

参考文献

- 1 Weng SC, Shu KH, Wu MJ, et al. Hyperuricemia predicts kidney disease progression after acute allograft dysfunction [J]. *Transplant Proc*, 2014, 46 (2): 499-504.
- 2 Viazzi F, Garneri D, Leoncini G, et al. Serum uric acid and its relationship with metabolic syndrome and cardiovascular risk profile in patients with hypertension: Insights from the I-DEMAND study [J/OL]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475314000519>.
- 3 Grassi D, Desideri G, Di Giacomantonio AV, et al. Hyperuricemia and cardiovascular risk [J/OL]. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40292-014-0046-3>.
- 4 Grassi D, Ferri L, Desideri G, et al. Chronic hyperuricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19 (13): 2432-2438.
- 5 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 281-297.
- 6 Hong Q, Qi K, Feng Z, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction via mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated mitochondrial Calcium overload [J]. *Cell Calcium*, 2012, 51 (5): 402-410.
- 7 Choi YJ, Yoon Y, Lee KY, et al. Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis [J/OL]. <http://www.fasebj.org/content/early/2014/03/20/fj.13-247148.1.long>.
- 8 Palmieri D, Capponi S, Geroldi A, et al. TNF α induces the expression of genes associated with endothelial dysfunction through p38MAPK-mediated down-regulation of miR-149 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443 (1): 246-251.
- 9 Neth P, Nazari-Jahanigh M, Schober A, et al. MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99 (2): 294-303.
- 10 Petzelbauer E, Springhorn JP, Tucker AM, et al. Role of plasminogen activator inhibitor in the reciprocal regulation of bovine aortic endothelial and smooth muscle cell migration by TGF- β 1 [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149 (3): 923-931.
- 11 Wang J, Wang Y, Wang Y, et al. Transforming growth factor β -regulated microRNA-29a promotes angiogenesis through targeting the phosphatase and tensin homolog in endothelium [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (15): 10418-10426.
- 12 Ficociello LH, Rosolowsky ET, Niewczas MA, et al. High-normal serum uric acid increases risk of early progressive renal function loss in type 1 diabetes: results of a 6-year follow-up [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 (6): 1337-1343.
- 13 Causevic A, Semiz S, Macic D, Zankovic A, et al. Relevance of uric acid in progression of type 2 diabetes mellitus [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2010, 10 (1): 54-59.
- 14 Puig JG, Torres RJ, Ruilope LM, et al. The pathophysiology of hyperuricemia in essential hypertension: a pilot study [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004, 23 (8/9): 1197-1199.
- 15 Wiik BP, Larstorp AC, Høieggen A, et al. Serum uric acid is associated with new-onset diabetes in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: The Life Study [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23 (8): 845-851.
- 16 Choorapoikayil S, Weijts B, Kers R, et al. Loss of Pten promotes angiogenesis and enhanced vegfaa expression in zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6 (5): 1159-1166.
- 17 Bhattacharya D, Singh MK, Chaudhuri S, et al. T11TS impedes glioma angiogenesis by inhibiting VEGF signaling and pro-survival PI3K/Akt/eNOS pathway with concomitant upregulation of PTEN in brain endothelial cells [J]. *J Neurooncol*, 2013, 113 (1): 13-25.
- 18 Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (13): 10760-10766.
- 19 Ma J, Sawai H, Ochi N, et al. PTEN regulates angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic Cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 331 (1/2): 161-171.