

## 层流切应力诱导microRNA-101下调EZH2抑制血管新生

方 烨<sup>1</sup>, 陈思奇<sup>2</sup>, 陈国军<sup>3</sup> (1. 中山大学附属第七医院肿瘤科, 广东深圳 518000; 2. 广州市花都区人民医院肾内科, 广东广州 510800; 3. 南方医科大学南方医院心血管内科, 广东广州 510515)

**摘要:** 目的 探讨层流切应力调控microRNA-101(miR-101)及蛋白Zeste增强同源物2(EZH2)表达的机制, 及其对血管内皮细胞功能的影响。方法 以人脐静脉内皮细胞(ECs)为研究对象, 使用层流切应力处理细胞, 检测miR-101及EZH2的表达水平, 并通过抑制或过表达miR-101和EZH2进一步研究其对内皮细胞血管新生的影响。结果 层流切应力处理的内皮细胞与对照组相比, miR-101表达上调, EZH2表达下调, 血管新生减少( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。抑制内皮细胞中miR-101的表达可使EZH2蛋白水平升高( $P<0.05$ )。在层流切应力处理的细胞中, 抑制miR-101后EZH2表达未见下调, 层流切应力无明显抑制血管新生作用( $P>0.05$ )。结论 层流切应力或可通过诱导miR-101下调EZH2的表达水平, 抑制血管新生。

**关键词:** 层流切应力; microRNA-101; 血管内皮细胞

中图分类号: R 331.3<sup>+2</sup>

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)04-0395-05

### Down-regulation of EZH2 for antiangiogenesis by microRNA-101 as induced by laminar shear stress

FANG Shuo<sup>1</sup>, CHEN Si-qi<sup>2</sup>, CHEN Guo-jun<sup>3</sup> (1. Department of Oncology , the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, China; 2. Department of Nephrology, Huadu People's Hospital, Guangzhou 510800, China;  
3. Department of Vasculocardiology , Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Objective To investigate the mechanism by which laminar flow shear stress regulates the expression of microRNA-101 (miR-101) and the protein Zeste-enhanced homologue 2 (EZH2), as well as the effect on the function of vascular endothelial cells. Methods Human umbilical vein endothelial cells (ECs) were selected as the study objects and treated flow shear stress to detect the expression levels of miR-101 and EZH2, and its effect on endothelial cell angiogenesis is further studied by inhibiting or overexpressing miR-101 and EZH2. Results Compared with the Control Group, the endothelial cells treated with laminar flow shear stress had upregulated miR-101 expression, downregulated EZH2 Expression, and reduced angiogenesis ( $P<0.05$  or 0.01). Inhibition of miR-101 expression in endothelial cells increased the EZH2 protein level ( $P<0.05$ ). In the endothelial cells treated with laminar flow shear stress, EZH2 expression was not downregulated after inhibition of miR-101 in endothelial cells, and laminar flow shear stress showed no significant antiangiogenesis effect ( $P>0.05$ ). Conclusion Laminar flow shear stress may induce miR-101 to downregulate the EZH2 expression level, and thereby inhibiting angiogenesis.

**Key words:** laminar shear stress; microRNA-101; endothelial cells

动脉粥样硬化(As)是一种可严重影响人类生活水平的疾病, 其发病机制目前尚未完全明了, 但As发生的始动因素得到了国内外研究学者的普遍认同, 即血管内皮损伤。而血流切应力对血管内皮屏障功能的影响至关重要<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 层流剪切应

力可通过microRNA-101(miR-101)作为传递载体, 抑制目标mTOR基因表达, 阻碍内皮细胞增殖进程<sup>[3]</sup>。因miR-101的其中一个重要作用靶点就是与EZH2表达相关的mRNA<sup>[4]</sup>, 因此我们推测EZH2有可能在调控内皮细胞增殖中起着重要作用。本研究拟在miR-101抑制血管内皮细胞增殖的基础上, 进一步研究层流切应力通过miR-101调控EZH2表达而抑制内皮细胞血管新生, 完善血管内层流剪切应力在转录后水平上抑制血管内皮细胞增殖的机制, 进一步证实血管层流剪切应力对内皮细胞功能的影响, 为预测心血管疾病的发生、发展及治疗提供理论依据。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No. 2017A020215151),

广东省自然基金区域联合基金(No.2019A151511

0155), 广东省医学科研基金(No.A2019529)

收稿日期: 2020-05-04; 修订日期: 2020-07-15

作者简介: 方 烨(1984-), 女, 博士, 主治医师

## 1 材料和方法

1.1 人脐静脉内皮细胞(Huvec)  
由南方医科大学心内科实验室提供。

### 1.2 药品与试剂

内皮细胞培养基(ECM)购自Scicell，感受态细胞购自Takara，miR-101、miR-101抑制剂、对照miRNA(NC)、对照抑制性miRNA(INC)均购自锐博生物，脂质体(Lipofectamine)购自Invitrogen，基底胶(Matrigel)购自美国BD公司，12孔、24孔细胞培养板购自Costar公司，RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司，PVDF膜购自Millipore公司， $\beta$ -actin抗体、EZH2抗体均购自Cell Signaling Technology。

### 1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

Huvec细胞生长于ECM培养基中，添加ECGS和5%胎牛血清，在37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下培养。

### 1.4 细胞转染

配置转染混合液：在48孔板上，每孔滴入每孔250 μL M199培养液，加入miR-101 50 μmol，加入RNAlMAX 250 nmol，使转染miRNA浓度为50 mol/L，室温孵育30 min；12孔细胞培养板内ECs转染前换液，换液时近加入培养基750 μL/孔，加入转染混合液；7 h后，吸出每孔的转染混合液及培养基，然后每孔加入ECs培养液1 000 μL，继续置于含5%CO<sub>2</sub>的37℃细胞培养箱培养；24 h后更换ECs培养液；24~48 h后提蛋白或RNA。

### 1.5 血管新生Matrigel胶制法

将4℃备用的Matrigel胶取出后迅速用枪头吸到24孔板中，200 μL/孔。37℃培养30 min后将细胞悬液种到胶上。12 h观察成管效果并拍照。采用5级评分法对新生血管进行评分<sup>[5]</sup>：0分，单个细胞，细胞呈分离状态；1分，细胞可有迁移、聚集，但无明显毛细管道形成；2分，可见毛细管，单独毛细血管管道，无发芽；3分，多根血管管道形成，有发芽；4分，封闭多边形形成；5分，复杂的血管网状结构结构。

### 1.6 切应力施加方法

使用切应力加载系统对ECs加载切应力，其中切应力组予15 dyn/cm<sup>2</sup>(流量单位为16.47 mL/min)切应力强度处理。将ECs种于流动腔下板(即载玻片上)，做相对应转染或处理；灌流系统及连接硅胶管高压蒸汽灭菌，组装前流动腔上板、中层硅胶酒精浸泡30 s；先用75%酒精对流动腔各个组成部件进

行灭菌后，将流动腔上板、中层硅胶膜及下板组装在一起，并用胶布捆绑，然后连接到灌流系统。对ECs施加梯度切应力12 h后，提取细胞蛋白或用于观察血管新生等后续实验。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件分析数据。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用t检验、单因素方差分析及q检验， $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 层流切应力对miR-101表达的影响

层流切应力可诱导miR-101上调，且随着切应力处理时间的延长，miR-101表达水平升高( $P<0.05$ 或0.01)，见图1。

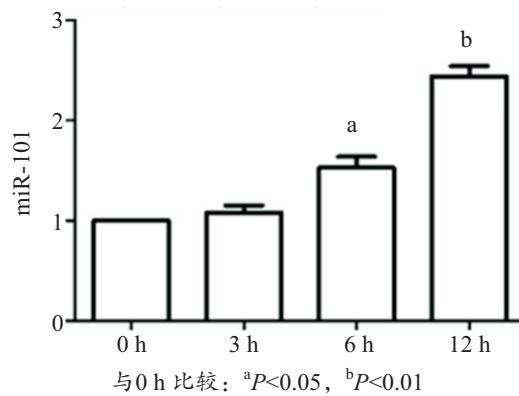
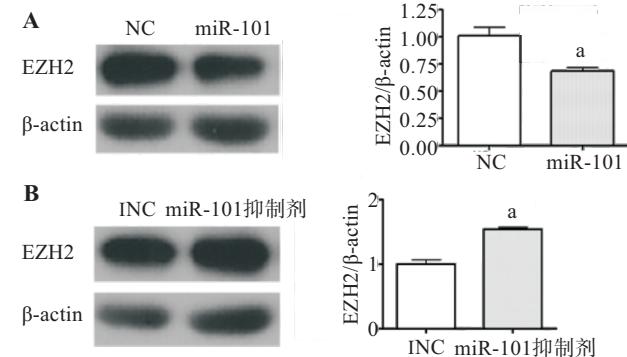


图1 层流切应力对miR-101表达的影响

### 2.2 miR-101对蛋白EZH2表达的影响

miR-101能够下调EZH2的表达( $P<0.01$ )，见图2A；抑制miR-101后，EZH2表达上调( $P<0.01$ )，见图2B。



A. miR-101组和NC组EZH2表达的比较；B. miR-101抑制剂组和INC组EZH2表达的比较；与NC或INC组比较：<sup>a</sup> $P<0.01$

图2 miR-101对蛋白EZH2表达的影响

### 2.3 层流切应力通过上调miR-101抑制EZH2的表达 转染INC后，切应力组的EZH2表达低于对照组

( $P<0.01$ )；转染miR-101抑制剂后，切应力组与对照组的EZH2表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )，见图3。

#### 2.4 miR-101对内皮细胞血管新生的影响

如图4所示，NC组内皮细胞血管生成明显多于miR-101组，差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

#### 2.5 miR-101通过下调EZH2表达抑制内皮细胞血管新生

ECs转染INC后，EZH2 siRNA组血管新生少于siRNA NC组( $P<0.05$ )。ECs转染miR-101抑制剂后，EZH2 siRNA组与siRNA NC组血管新生差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图5。

#### 2.6 miR-101介导层流切应力下调EZH2抑制血管新生

ECs转染INC后，切应力组较对照组血管新生减少( $P<0.05$ )；ECs转染miR-101抑制剂24 h后，切应力组与对照组血管新生差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图6。

### 3 讨论

As的发病机制尚未完善清楚，目前普遍认为As的发生与血管内皮损伤相关，其中，血管层流切应力对血管内皮的损伤具有重要的作用<sup>[6-7]</sup>。因此进

一步了解层流切应力调控内皮细胞的形态、功能及其与动脉血管损伤等作用机制，对于从分子水平探索预防和治疗心血管疾病具有重要意义。生理性层流剪切应力对内皮细胞具有保护作用，其机制复杂，国内外研究表明其主要是通过维持内皮细胞代谢稳态、保持细胞增殖平衡、减少炎症反应、调节内皮细胞血管新生等方面综合作用的结果<sup>[8-12]</sup>。层流切应力还可通过miRNA在转录后水平调节内皮细胞内目标基因表达而发挥作用，表明miRNAs在层流切应力对血管内皮细胞功能调节上起着关键的介导作用<sup>[13-15]</sup>。目前切应力通过miRNAs影响内皮细胞功能的部分靶标已得到证实，但是miRNAs对内皮细胞功能调控的机制仍有待进一步完善。近年来，随着对细胞功能调控的进一步了解，越来越多的学者开始重视层流切应力在基因转录后对内皮细胞血管新生的影响<sup>[16]</sup>。在结合国内外相关研究后，血管内层流切应力可诱导miR-101上调得到证实<sup>[15]</sup>。miR-101在转录后与目的蛋白mRNA的非编码区结合，促使或者抑制基因的翻译，使目的蛋白表达下调或上调。研究表明miR-101的其中一个作用靶点就是与EZH2表达相关的mRNA<sup>[17-18]</sup>。EZH2作为内皮细胞内一种重要蛋白，也是miR-101的一个目的蛋白。

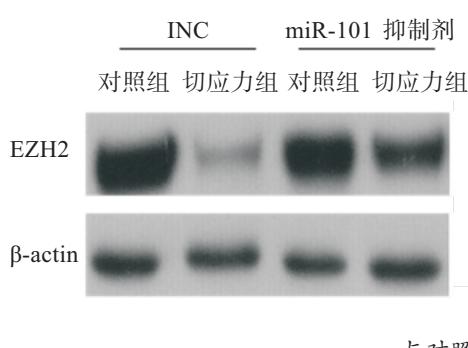
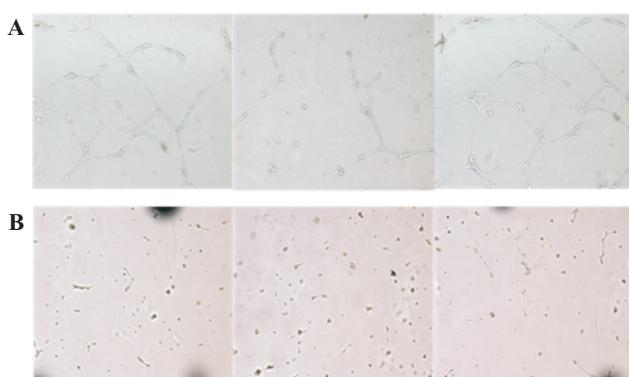
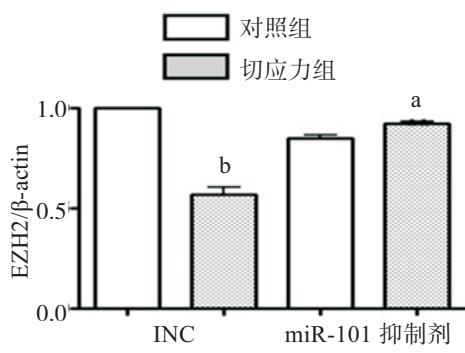
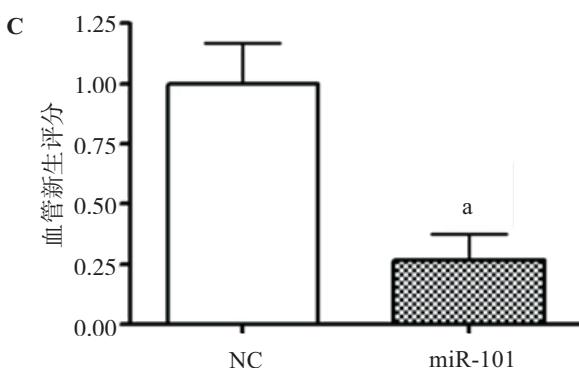


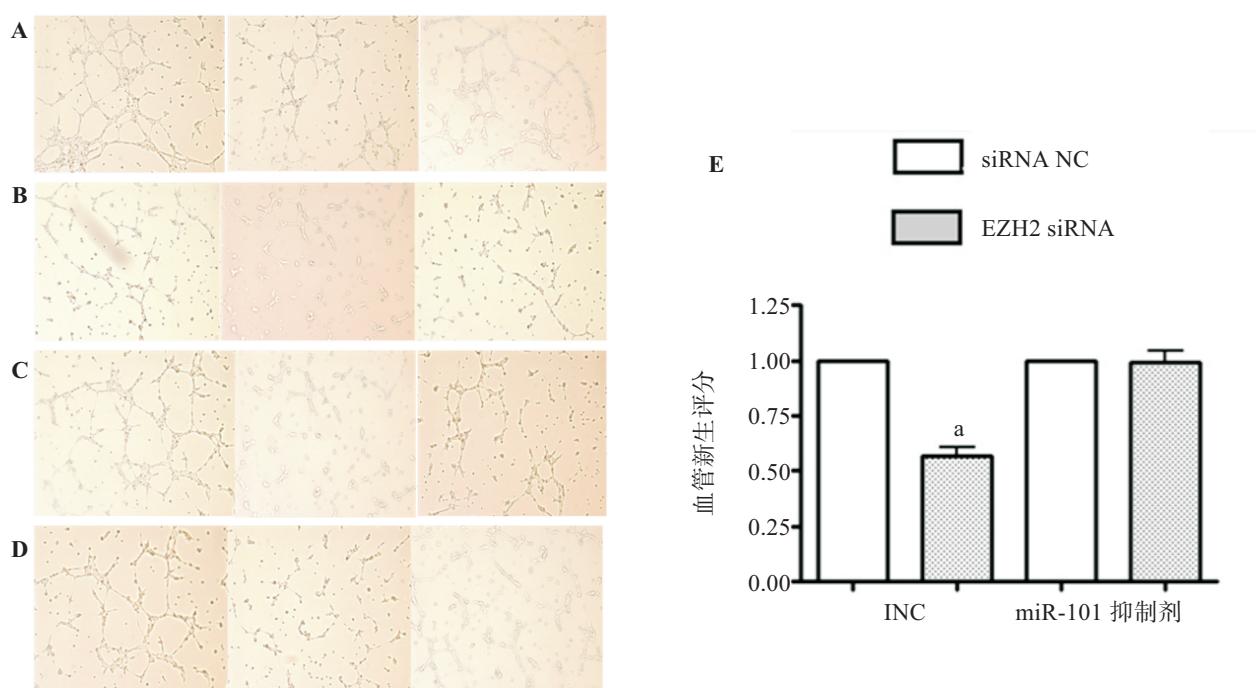
图3 层流应切力通过上调miR-101抑制EZH2的表达



A. NC组内皮细胞血管生成；B. miR-101组内皮细胞血管生成；C. 两组血管新生评分的比较；与NC组比较：<sup>a</sup> $P<0.05$

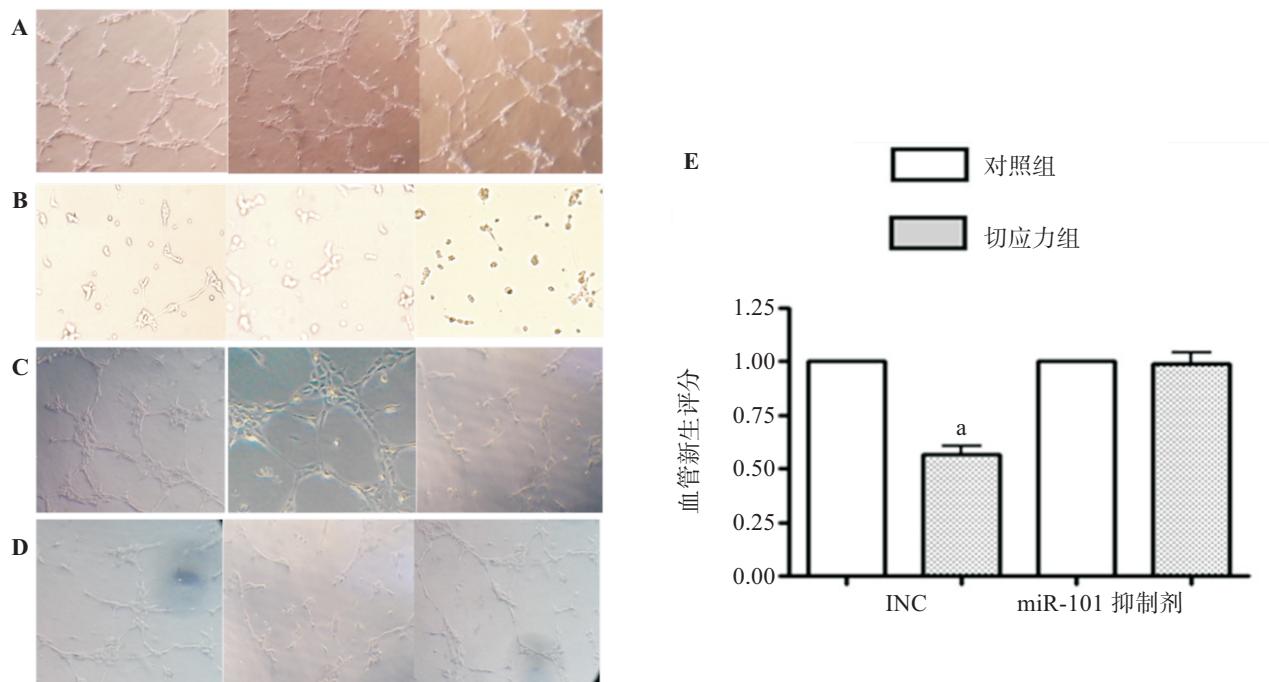
图4 miR-101对内皮细胞血管新生的影响





A. ECs转染INC 24 h后再转染siRNA NC；B. ECs转染INC 24 h后再转染EZH2 siRNA；C. ECs转染miR-101 抑制剂24 h后再转染siRNA NC；D. ECs转染miR-101 抑制剂24 h后再转染EZH2 siRNA；E. 血管新生评分的比较；与siRNA NC组比较：<sup>a</sup> $P<0.05$

图5 miR-101通过下调EZH2的表达抑制内皮细胞血管新生



A. ECs转染INC 24 h后无切应力处理；B. ECs转染INC 24 h后再予切应力处理；C. ECs转染miR-101 抑制剂 24 h后无切应力处理；D. ECs转染miR-101 抑制剂 24 h后再予切应力处理；E. 血管新生评分的比较；与对照组比较：<sup>a</sup> $P<0.05$

图6 miR-101介导层流切应力下调EZH2抑制血管新生

miR-101通过与EZH2 mRNA的3'-非编码区结合影响EZH2的翻译，使其在细胞中的含量降低。因此有理由相信作为miR-101的一个目标基因，EZH2可能在调控内皮细胞血管新生方面起着重要作用。但层流

切应力是否通过miR-101调控EZH2表达而抑制内皮细胞血管新生机制的研究尚欠缺。本文进一步明确了层流切应力调控内皮细胞功能机制的必要性及可行性。

本研究显示,层流切应力能够使miR-101表达上调,而miR-101可抑制EZH2表达,通过对转染和未转染miR-101抑制剂的Ecs细胞在施加层流切应力后EZH2表达水平的变化,发现层流切应力可通过miR-101抑制蛋白EZH2的表达。在血管新生方面,我们的研究表明,miR-101可抑制内皮细胞血管新生,在Ecs细胞转染EZH2 siRNA后,这种抑制作用消失,表明miR-101通过调控EZH2的表达水平影响内皮细胞血管新生。超出生理范围的血流切应力使血管新生受阻,在抑制miR101的表达后,这种影响消失,表明层流切应力可通过miR-101影响EZH2的表达从而抑制血管新生。

综上所述,miR-101在层流切应力作用下可在转录后抑制EZH2的表达,进而抑制内皮细胞血管新生,调控内皮细胞血管新生平衡。该过程似可作为层流切应力在转录后调控内皮细胞功能机制的一个通路的补充。

#### 参考文献:

- [1] CHIEN S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3): H1209-H1224.
- [2] CHIU J J, CHEN L J, CHEN C N, et al. A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells[J]. J Biomech, 2004, 37(4): 531-539.
- [3] HERGENREIDER E, HEYDT S, TREGUER K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(3): 249-256.
- [4] XIE X, LU J, KULBOKAS E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals[J]. Nature, 2005, 434 (7031): 338-345.
- [5] SMALL E M, FROST R J, OLSON E N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease[J]. Circulation, 2010, 121(8): 1022-1032.
- [6] CHISTIAKOV D A, OREKHOV A N, BOBRYSHCHEV Y V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow[J]. Acta Physiol (Oxf), 2017, 219(2): 382-408.
- [7] 罗成,庄明华. 血流剪切力在动脉粥样硬化中所起的作用 [J]. 中国现代医生, 2010, 48(9): 13-14.
- [8] HASHIMOTO-KOMATSU A, HIRASE T, ASAKA M, et al. Angiotensin, induces microtubule reorganization mediated by a deacetylase SIRT2 in endothelial cells[J]. Hypertens Res, 2011, 34(8): 949-956.
- [9] KUTIKHIN A G, SINITSKY M Y, YUZHANIN A E, et al. Shear stress: An essential driver of endothelial progenitor cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 118: 46-69.
- [10] 卢晴. 流体剪切力相关lncRNA AF131217.1在动脉粥样硬化中的作用及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [11] LU D, KASSAB G S. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology[J]. J R Soc Interface, 2011, 8(63): 1379-1385.
- [12] WANG K C, GARMIRE L X, YOUNG A, et al. Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 3234-3239.
- [13] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [14] LEWIS B P, SHIH I H, JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.
- [15] KUI C, WEN D, XING W, et al. Animal microRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 12(6): 138-142.
- [16] BONAUER A, CARMONA G, IWASAKI M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice[J]. Science, 2009, 324 (5935): 1710-1713.
- [17] FISSLTHALER B, BOENGLER K, FLEMING I, et al. Identification of a cis-element regulating transcriptional activity in response to fluid shear stress in bovine aortic endothelial cells[J]. Endothelium, 2003, 10(4/5): 267-275.
- [18] ZHOU Q, GALLAGHER R, UFRET-VINCEN R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23 clusters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8287-8292.