

Dicer 及其 miRNAs 是血管平滑肌细胞分化和增殖所必需的基因和调节因子*

潘耀谦^{1, 2)**}, *** 潘博^{2)**} 刘兴友^{1, 2)} 李瑞珍^{1, 2)} 岳军明³⁾

⁽¹⁾ 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003; ⁽²⁾ 河南省高校工程技术研究中心, 新乡 453003;

⁽³⁾ Department of Physiology, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN 38163, USA)

摘要 为了研究 Dicer 及其所产生的 miRNAs 在血管平滑肌细胞 (VSMC) 中的作用, 本研究采用条件性基因打靶法敲除了小鼠 VSMC 中的 Dicer 外显子 23, 通过采用连续性剖检妊娠小鼠法、病理组织学、免疫荧光、PCR、Western blot 和实时 PCR 等技术对条件性敲除 Dicer(Dicer cKO)胚胎的血管病变和 VSMC 中的 Dicer、miRNAs 和信号转导通路蛋白变化进行了详细研究。结果发现, 在培育条件性敲除 Dicer 小鼠的过程可产生三种不同基因型小鼠, 即野生型、杂合型和纯合型(Dicer cKO)小鼠。其中野生型和杂合型小鼠出生后无明显临床异常, 而 Dicer cKO 小鼠却死于腹中而不能出生。Dicer cKO 胚胎在胚胎发育的第 12.5 天(E12.5)就出现发育迟滞变化, 在 E14.5, 皮肤、骨骼肌和肝脏的血管极度扩张、血液淤滞和广泛的弥漫性出血, 在 E15.5 死亡。Dicer cKO 胚胎血管壁的病变于 E13.5 即出现, 主要表现为血管中膜的 VSMC 排列不整, 增生减少; E14.5 血管壁变薄、塌陷, 管腔不规则, 细胞增生明显减少; E15.5 血管壁的结构完全破坏, 细胞增生停止, 血管壁的屏障作用破坏, 通透性增强, 向外渗血。在胚胎发育的 E14.5, VSMC 标志性基因的表达明显下调, VSMC 中大部分受检 miRNAs 的表达也明显降低, 磷酸化的信号转导通路蛋白, 即细胞外信号调节激酶和蛋白激酶明显衰减。研究证明, Dicer 是血管发育所必需的基因, 它可通过控制 miRNA 产生和成熟来调节 VSMC 标志性基因的表达, 借以促进 VSMC 的增殖与分化, 保障血管壁结构的完整。

关键词 Dicer, 微小 RNA, 血管平滑肌细胞, 条件性敲除, 胚胎

学科分类号 Q7, R36, S85

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00115

血管平滑肌细胞(VSMC)是大中血管的重要组成部分, 在保障血管壁的结构完整和舒缩能力、维持和调节全身性血液循环, 特别是保证生命活动的重要器官——心脏和大脑的血液供应方面起着重要作用。据大量研究报道^[1-4], 心脑血管系统的疾病目前依然是引起人类死亡的最主要疾病。这与 VSMC 的异常增生和退变有着密切的关系。近年来一些研究表明^[5-6], Dicer 及其产生的微小 RNA (miRNAs)在维持血管平滑肌的结构与功能方面起着关键性作用。众所周知^[7-8], Dicer 是 RNase III 家族的一种核酸内切酶, 它能将双股 RNA 和前体 miRNA(pre-miRNA)裂解为小的调节性 RNA, 即 miRNA。miRNA 作为诱导 RNA 沉默复合体(RISC)的组成部分, 通过降解 mRNA 或抑制蛋白质翻译来调节基因的表达。miRNA 可调节细胞的增殖、

凋亡和分化。因此, Dicer 通过产生功能性 miRNA 对生命活动发挥着双重调节作用。miRNA 不仅在发育方面, 而且在人类的许多疾病, 如病毒病、癌症和心脑血管疾病等方面也起着重要的作用。

大量研究表明^[9-12], Dicer 及其所生成的 miRNA 在细胞的增殖、凋亡和分化过程中起着重要的作用, 但其对血管及其平滑肌的影响还不清楚, 报道较少。为了深入研究 Dicer 基因及其所生成的 miRNAs 对 VSMC 的影响, 本研究采用条件

* 国家自然科学基金资助项目(31372407)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 13223756880, E-mail: panyaoqian@163.com

收稿日期: 2014-04-24, 接受日期: 2014-08-11

性敲除法删除 VSMC 的 Dicer 外显子 23 等位基因, 通过对条件性敲除 Dicer 所生的纯合子型(Dicer cKO)和野生型胚胎 VSMC 的病变观察、基因分型检测、miRNA 功能检测和信号传导通路检测等比较研究发现, 从 VSMC 中敲除 Dicer 基因, 可导致胚胎血管壁的 VSMC 分化和增殖障碍, 血管壁的结构破坏和退变, 引起 Dicer cKO 胚胎死亡。

1 材料与方法

1.1 Dicer cKO 小鼠的育成和胚胎的基因分型

本研究通过核酸测序, 设计出条件性基因打靶技术, 敲除了小鼠 VSMC 中 Dicer RNase III b 结构的等位基因外显子 23(图 1), 通过用 SM22-cre 小鼠与 Dicer^{loxP/loxP} 小鼠杂交成功培育出 VSMC 的 Dicer cKO 小鼠, 即纯合子小鼠(Dicer^{loxP/loxP}-SM22-cre 小鼠)。实验中用同窝出生的野生型小鼠, 即 Dicer^{loxP/loxP} 小鼠用做对照小鼠。

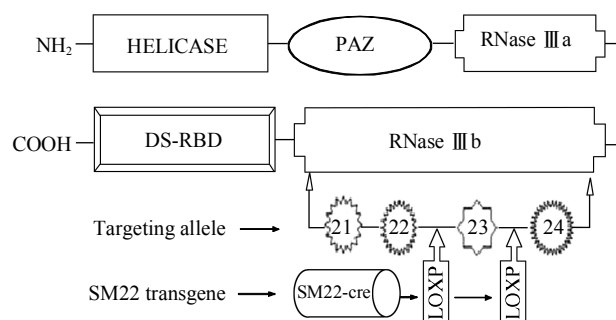


Fig. 1 Knockout of Dicer in VSMC of mouse by conditional gene targeting

The RNase III b domain is encoded by exon23, Targeting allele situate in RNase III b and contains loxP sites flanking exon 23. VSMC specific Cre transgenic mouse line is SM22-Cre, in which Cre recombinase was driven by VSMC specific promoter SM22. The Dicer is knocked out through destroying the exon 23 by conditional Dicer gene targeting.

基因分型的方法: 将收集的小鼠尾巴或胎儿组织放入 200 μ l 50 mmol/L 氢氧化钠溶液中, 95 $^{\circ}$ C 加热 50 min, 随之加入 20 μ l 1 mol/L Tris-HCl, 离心 5 min, 用 2 μ l 上清做 PCR. Cre 特异性引物是 5' GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG(上游引物), 5' GTAGTTATTCGG ATCATCAGCTACAC(下游引物). Dicer 的特异性引物是 5' CCT GAC AGT GAC GGT CCA AAG(上游引物), 5' CAT GACTCT TCA ACT CAA ACT(下游引物).

PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离. 野生型 Dicer 的特异性产物是 350 bp, 而 Dicer cKO 型的特异性产物是 420 bp.

1.2 胚胎的病理学检查

为了分析 Dicer cKO 胚胎的基因表型、胚胎的发育和 Dicer cKO 胚胎所呈现的病理变化, 按怀孕的时间顺序剖检妊娠母鼠, 观察胎盘与胚胎的发育情况, 并收集胚胎, 逐一进行病理学观察、描述记录和摄影, 分别称重和造表登记. 检查完毕后, 将胚胎用 4% 的多聚甲醛液固定 48 h, 石蜡包埋切片, HE 染色和 Masson 三色染色检查.

1.3 实时 PCR 对 miRNA 和 mRNA 表达的检测

由于胚胎的样品很少, 所以, 每个样品的总 RNA 从 2 个胚胎中提取. 这样, 检测的 3 个样品分别从 6 个 Dicer cKO 胚胎和 6 个同窝的对照胚胎中收集. 本实验采用已报道的特异性方法对样品进行了处理^[13]. 为了检测抗平滑肌抗体(aSMA)、碱性调宁蛋白(CNN1)、平滑肌 22 mRNA(SM22)和肌球蛋白重链 22 mRNA(Myh22)等血管平滑肌分化的标志性基因的表达, 按照以前发表的引物序列^[14]进行了检测. 通过双杂交探针 4800 实时 PCR 仪做了 SYBR 绿色荧光法实时 PCR(Roche Applied Science; Indianapolis, IN). 为了检测特异性 PCR 产物, 绘制了熔解曲线. 所获数据用 $\bar{x} \pm s (n = 3)$ 来表示.

1.4 免疫荧光法检测 VSMC 的增生变化

将脱蜡的切片还水, 然后浸入 95 $^{\circ}$ C ~ 100 $^{\circ}$ C 10 mmol/L 柠檬酸钠和 0.05% 吐温 20 (pH 6.0) 溶液中孵育 30 min, 进行抗原修复. 用封闭液(5% 正常山羊血清、3% 牛血清白蛋白和 0.1% Triton-X 100 的 PBS)处理切片 1 h. 用增殖性细胞核抗体检测 VSMC 的增生, 方法是一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 0.05% 吐温 20 PBS 液(TPBS)洗 3 次, 每次 5 min. 之后, 切片用偶联有 Alexa 488 或 Alexa 594 山羊抗兔或小鼠的二抗(Vitrogen, 用 TPBS 1:200 稀释)在室温中孵育 1 h, 洗涤 3 次. 之后, 用含有 DAPI or PI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)封片剂封片, 用尼康倒置荧光显微镜拍摄, 图像分析程序软件进行处理.

1.5 免疫染色和免疫印迹技术检测信号转导通路蛋白

用免疫荧光染色的特异性抗磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK)和抗磷酸化蛋白激酶(pAKT)抗体, 对 E14.5 天胚胎的腹主动脉进行免疫染色, 借以了解这些具有活性的信号转导通路蛋白在 VSMC 中

的表达. 免疫印迹技术检测样品的处理方法为: 收集 E14.5 天胚胎的脐带, 在裂解液 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 中超声处理. 取 40 μg 等量蛋白加入 8% SDS-PAGE 凝胶, 进行电泳, 之后, 将分离的蛋白转染到硝酸纤维素膜上. 转染膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 充分洗涤后滴加特异性抗 Dicer (Santa Cruz, CA)、 β -actin (Sigma St. Louis, MO), 抗磷酸化蛋白激酶 (pAKT)、抗蛋白激酶 (AKT)、pERK 和抗细胞外信号调节激酶 (ERK) (Cell Signaling, Danvers, MA) 一抗, 覆盖全部组织, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育. 弃一抗充分洗涤, 再加辣根过氧化物酶偶联的二抗, 室温孵育 2 h, 弃二抗充分洗涤后, 加入显色液避光显色.

以上 PCR、Western blot 和实时 PCR 技术等机能性实验均重复 3 次以上, 结果稳定, 数据确实; 切片的 HE 染色, Masson 三色染色和免疫荧光染色均进行了 3 次 15 组研究, 所获得的形态结构病变较一致.

2 结 果

2.1 敲除血管平滑肌中的 Dicer 导致胚胎死亡

为了研究 Dicer 在 VSMC 中的作用, 通过

Dicer^{loxP/loxP} 小鼠与 SM22-cre 转基因小鼠杂交, 成功地识别出外显子 23 编码的 Dicer RNase III b 结构, 通过删除外显子 23 而敲除了 Dicer, 培育出 Dicer^{loxP/loxP}-SM22-cre 小鼠, 即纯合子型的 Dicer cKO 小鼠. 在此过程中还培育出携带 Dicer 的 Dicer^{loxP/loxP} 小鼠 (野生型) 和 Dicer^{loxP/+}-SM22-cre 小鼠 (杂合子型).

通过杂交而产生的野生型和杂合型小鼠能够生存, 出生后没有任何明显的临床异常. 在出生的十数窝小鼠中, 通过 DNA 的 PCR 扩增分析, 没有检测出 Dicer cKO 小鼠, 即 Dicer^{loxP/loxP}-SM22-cre 小鼠 (图 2a). 这说明后者在胚胎发育过程已死亡. 因此, 为了研究 Dicer cKO 胚胎的血管变化、器官病变和死亡时间, 我们建立了定时交配按时剖检的方法, 从妊娠母鼠子宫内取出胚胎, 通过 PCR 鉴定不同发育阶段的基因型, 终于发现 Dicer cKO 胚胎 (图 2b). 为了检测 Dicer cKO 胚胎 VSMC 的 Dicer 表达, 用收集到的 14.5 天胚胎 (E14.5) 的脐动脉进行蛋白质提取, 并通过蛋白质印迹检测 Dicer. 与野生型胚胎小鼠相比, Dicer cKO 胚胎的 Dicer 水平很低 (图 2c), 通过大量剖检观察, 发现 Dicer cKO 胚胎在 E15.5 天后全部死亡 (图 2d).

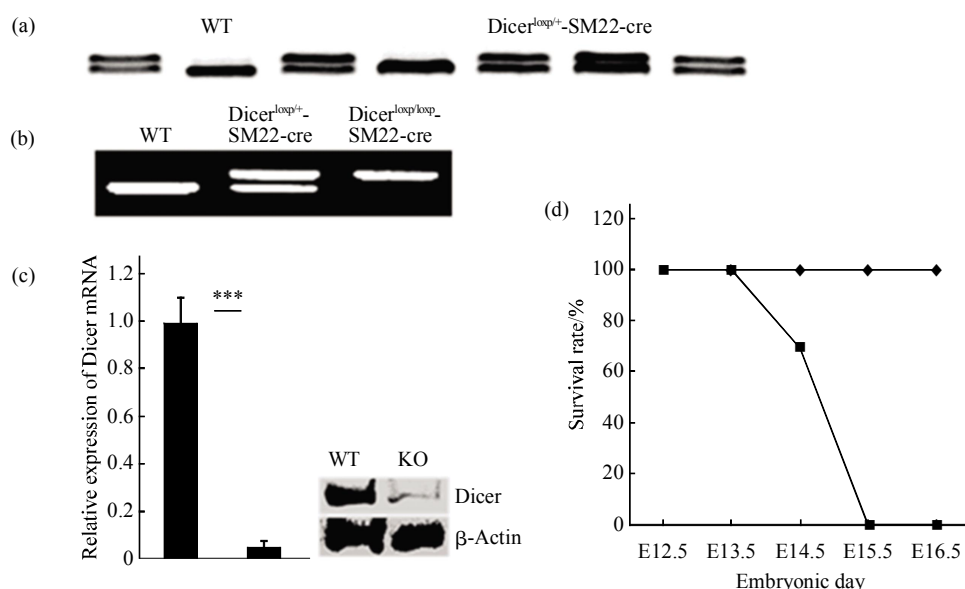


Fig. 2 Dicer cKO embryos and death time are found, Dicer knocked out is proved by PCR

(a) Only type two genotypes that was wild type (WT) and heterozygote (Dicer^{loxP/+} SM22-Cre) were detected in all of newborn mouse by PCR. (b) Genotypes of Dicer cKO embryos by PCR showed three type, that was wild type (WT), heterozygote (Dicer^{loxP/+} SM22-Cre) and homozygote (Dicer^{loxP/loxP} SM22-Cre). (c) The mRNA and protein expressions of Dicer in Dicer cKO embryos' umbilical cord were significant reduced at E14.5 embryos respectively by Real time PCR and Western blot. (d) All Dicer cKO embryos died at E15.5. $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$: WT; $\blacksquare$ - $\blacksquare$: cKO.

研究发现, *Dicer* cKO 胚胎在 E14.5 天全部存活, 虽然体形正常, 但通过 E12.5~E16.5 天不同发育时间段的体重统计, 与同窝的野生型和杂合子型小鼠相比, 体重增长缓慢甚至停滞(图 3a), 而且外形明显变小(图 3c). 这说明 *Dicer* cKO 胚胎在死亡前就发生了严重的发育障碍. 血管变化于 E14.5 天时表现得很明显. 眼观, 胎儿胎盘和胚胎色泽发

白, 呈贫血状; E15.5 天后胎儿胎盘及胚胎体表的血管消失, 且发生出血(图 3b). 在胚胎发育的 E15.5~E16.5 天, *Dicer* cKO 胚胎则全部死亡. 死亡的胚胎头部和躯干部皮肤出血, 全身呈红色. cKO *Dicer* 胚胎在 E17.5 天后开始自溶(图 3c), 逐渐地被母体胎盘完全吸收, 以致母鼠产仔时无任何痕迹.

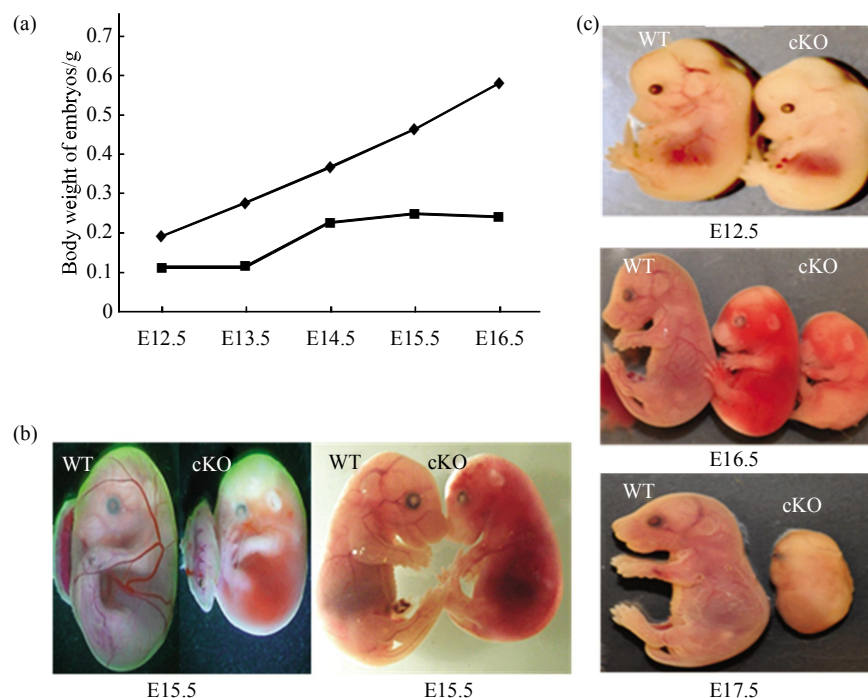


Fig. 3 *Dicer* cKO embryos showed development delay and death

(a) There were significant differences of body weight from E12.5 to E16.5 between *Dicer* cKO embryos and control ones, indicating the developmental delay in *Dicer* cKO embryos. ◆◆: Control; ■■: cKO. (b) Vessels were not observed on foetal placenta and body of *Dicer* cKO embryos at E15.5. (c) Comparing with the control embryos the morphology of *Dicer* cKO embryos in embryonic different developmental stages showed growth delay as early as E12.5; became more distinct at E13.5 and E14.5; displayed extensive hemorrhage on the surface of body and death at E15.5 and E16.5 and had an isophagy at E17.5.

2.2 *Dicer* cKO 胚胎的血管退变、出血和增殖障碍

研究发现, 早在 E12.5 天, *Dicer* cKO 胚胎和胎儿胎盘的血管壁已出现发育障碍. 为了进一步检查血管的病理学变化, 本实验在胚胎发育的不同阶段解剖了 *Dicer* cKO 胚胎和同窝对照胚胎, 采取血管和器官进行了病理组织学检查. 结果显示: *Dicer* cKO 胚胎在 E13.5 天, 血管扩张、血管中膜较疏松; E14.5 天, VSMC 变性、细胞数量减少、血管壁变薄、内陷而呈不规则状; E15.5 天, 对照组 VSMC 随着其收缩功能的增强而管腔扩大、管壁致密; *Dicer* cKO 胚胎的血管壁随着 VSMC 的变性、坏死而结构破坏, 内膜、中膜和外膜排列紊

乱, 血管屏障的完整性严重地受损而出现渗血现象(图 4a).

虽然在 E14.5 天已发现 *Dicer* cKO 胚胎血管扩张, 但胚胎依然存活. 妊娠 15~16 天后, *Dicer* cKO 胚胎出现广范性出血, 血液蓄积于皮下, 全身呈红色. 为了观察 *Dicer* cKO 胚胎出血的病理变化, 我们解剖了 E15.5 天的胚胎, 发现出血主要发生在皮肤、肝脏和骨骼肌, 而其他部位较少. 皮肤出血主要发生在真皮和皮下组织, 表皮发育不良而变薄, 毛囊发育受抑, 真皮内血管极度扩张, 血液淤滞, 大量红细胞弥散在真皮和皮下组织, 引起弥漫性出血(图 4b, S). 在大多数胚胎中, 肝脏的出血

多呈局灶性, 靠近膈肌部的肝组织常见大面积出血灶。有的胚胎, 肝脏的出血呈弥漫性, 肝细胞变性、坏死, 红细胞充满肝窦及坏死灶, 肝组织结构

完全破坏(图 4b, L)。全身骨骼肌也发生大面积出血, 严重的部位见骨骼肌纤维变性、坏死, 断裂成碎块状, 大量红细胞弥散在肌组织(图 4b, M)。

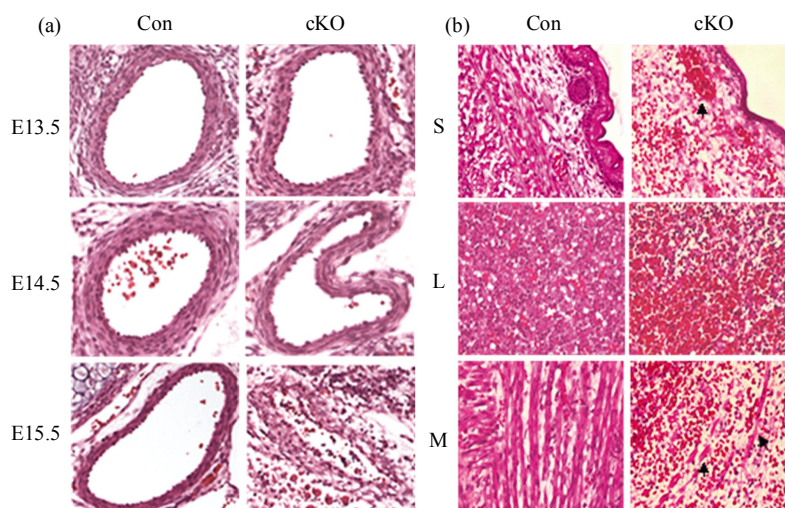


Fig. 4 Structural damage in vessels and hemorrhage in organs of Dicer cKO embryos

(a) Comparing with control embryos the degenerative injuries of abdominal aorta in Dicer cKO embryos were revealed and tunica media became thinner at E13.5; the vascular wall invaginated and blood vessel changed in shape at E14.5; architecture of blood vessel was destroyed and red blood cells leaked out through injury blood vessel at E15.5. HE staining $\times 400$. (b) Severe hemorrhage of several organs occurred E15.5 in Dicer cKO embryos. In the skin (S) the epidermis became thinner, blood vessels were dilated, filled of lots of red blood cells and occurred blood stasis (arrow), a number of red blood cells diffused in the dermis. In the liver (L) hepatic cells were in degeneration and necrosis, construction of the liver was damaged and a mass of red blood cells distributed in hepatic tissues. In skeletal muscle (M) myofibers were in degeneration and necrosis and became fragments (arrow). A lot of red blood cells filled in muscular tissues. HE staining $\times 400$.

病理组织学结果表明, Dicer cKO 胚胎的动脉在 E13.5 和 E14.5 天扩张, 而 E15.5 天发生严重的损伤。为了检查 Dicer cKO 胚胎的动脉结构破坏是否与血管平滑肌增殖障碍有关, 本实验检测了胸主动脉平滑肌细胞(SMC)的增殖性细胞核抗体(PCNA)。结果发现, 在 E13.5~14.5 天时, 对照胚胎的主动脉壁很厚, 在血管壁的中膜, 即 SMC 层有大量增生的细胞核, 细胞排列整齐、致密, 而 Dicer cKO 胚胎的主动脉壁较薄, 血管壁的中膜虽也见较多的细胞核增生, 但细胞排列较疏松, 血管的外形不规则。E15.5 天时, 对照胚胎主动脉的管腔增大, 血管壁变薄而致密, 但仍见有较多的增生性细胞核, Dicer cKO 胚胎的主动脉结构则完全破坏, 几乎未见增生的细胞核(图 5), 两者的差异非常明显。

2.3 Dicer cKO 胚胎 VSMC 的标志性基因表达下降且 miRNA 表达谱不规则

VSMC 的收缩表型是通过标志性基因的表达来

调节的。为了探寻 Dicer 在 VSMC 分化中所起的作用, 本研究使用实时 PCR 技术, 检测了 E14.5 天脐动脉中一组 VSMC 标志基因。这些基因包括 aSMA、CNN1、SM22 和 Myh22。与对照胚胎相比, Dicer cKO 胚胎的 aSMA、SM22、CNN1 和 Myh22 的表达均明显下调(图 6a)。用 SMA 荧光免疫染色法对 E14.5 天胚胎的腹主动脉进行检测, 发现对照胚胎的血管壁呈强阳性反应, 而 Dicer cKO 胚胎呈微弱的阳性反应(图 6b)。两者的差异非常明显。这表明 Dicer 对 VSMC 表型的调节起着重要的作用。

Dicer 是一种重要的 miRNA 成熟调节因子。因此, 从 VSMC 中删除 Dicer 可以导致 miRNA 表达的调节异常。为了检验这一假设, 本研究检测了 E14.5 天 Dicer cKO 胚胎和对照胚胎脐动脉中 miRNA 的表达。根据 Dicer 在血管生物学方面作用的有关报道, 我们挑选了几种 miRNAs 进行研究。这些 miRNAs 包括 miR-143/145 族和 miR-17/92

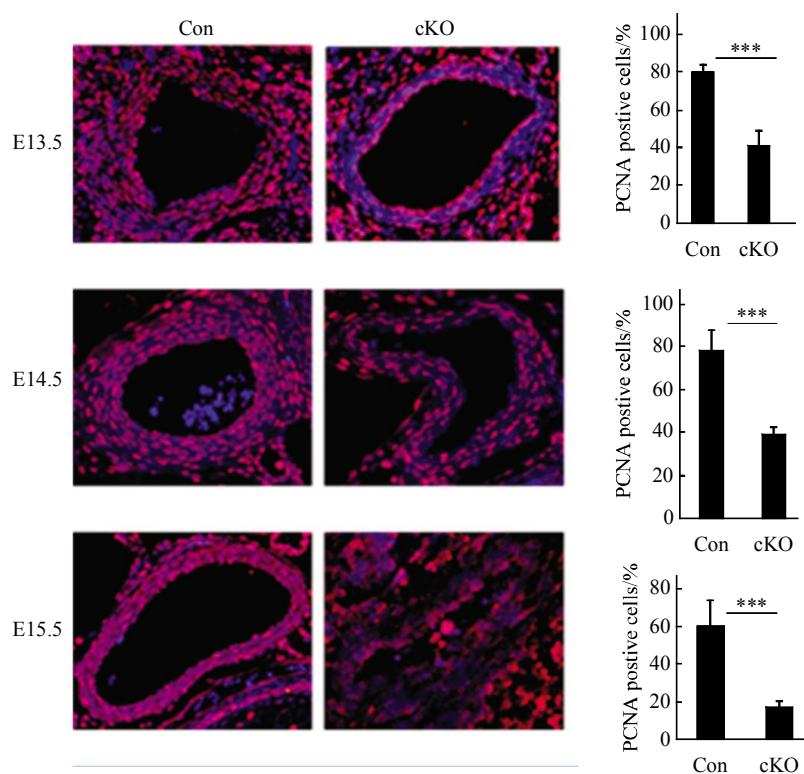


Fig. 5 Proliferative obstacle of VSMC in Dicer cKO embryos

SMC of abdominal aorta was in lower proliferation at E13.5 and E14.5, and was in little proliferation at E15.5 by immunofluorescence staining (IS) with proliferating cell nuclear marker gene antibody (PCNA). The cell nuclei were counterstained with DAPI. The proliferating cells were counted and divided by total number of nuclei as the proliferating index. Five different embryos were analyzed. Error bar indicates standard deviation (***) $P < 0.001$). IS $\times 400$

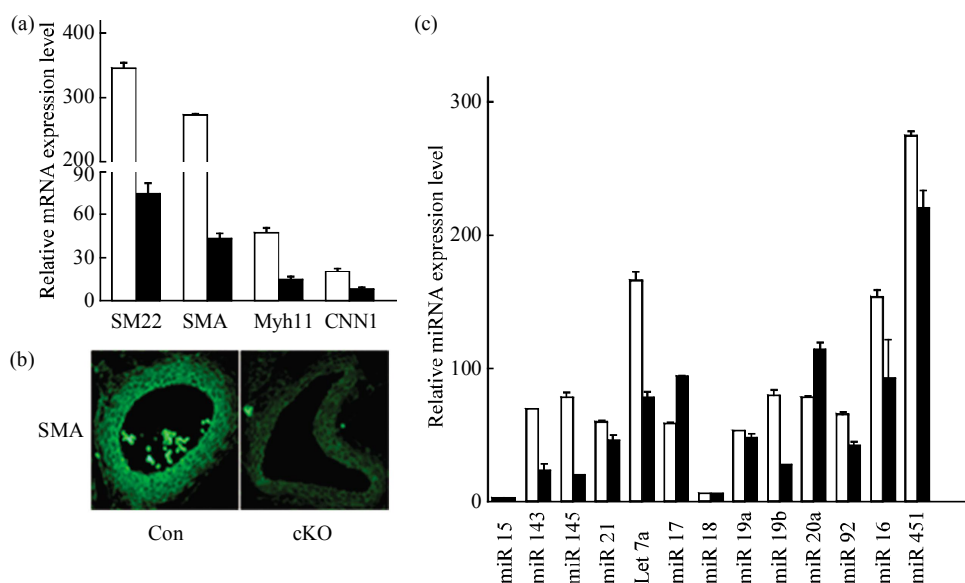


Fig. 6 Expressions of VSMC marker genes and miRNA were down regulated or irregular in Dicer cKO embryos

(a) The expressions of marker genes including Myh11, CNN1, SM22 and aSMA in VSMC of Dicer cKO embryos' umbilical cords at E14.5 were obvious lower by Real time PCR. □ : WT; ■ : cKO. (b) The reaction of SMA in Dicer cKO embryos' abdominal aorta at E14.5 was almost negative by immunofluorescence staining. IS $\times 400$. (c) The expressions of miRNA genes in Dicer cKO embryos' umbilical cords at E14.5 were mainly in lower, but miRNA17 and miRNA20a were in higher, miRNA15 and miRNA18 were not in obvious change by Real-time PCR. □ : WT; ■ : cKO.

族. 为了对比, 还挑选了 Dicer 独特调节的 miR-451. 结果发现, 特异性 VSMC 的 miR-143 和 miR-145 明显下调, 而对 Dicer 有特异性的 miR-451 也显著地下调. 有趣的是其他几种 miRNAs, 例如 Let-7a、miR-16、miR-21、miR-19a、miR-19b 和 miR-92b 的表达也明显降低, 而 miR-15 和 miR-18 无论在 Dicer cKO 胚胎还是在对照胚胎均未见明显改变. 另外, 有 2 种 miRNAs, 即 miR-17 和 miR-20a 则明显上调. 这与 Dicer cKO 胚胎的 VSMC 中大多数 miRNAs 形成了明显的对比(图 6c). 研究表明, Dicer 对 VSMC 中的绝大多数 miRNAs 具有重要的调节作用, 但并非所有的 miRNAs 均受致于 Dicer 的调节.

2.4 Dicer cKO 胚胎的细胞生存信号转导通路受损

本研究发现 Dicer cKO 胚胎伴随着血管平滑肌增殖障碍而出现发育迟滞现象. 为了搞清这一表型的分子机制, 检测了磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 (PI3K/AKT) 和细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 的信号通路, 因为该通路在血管平滑肌增殖过程中起主要作用. 使用蛋白质印迹技术对 E14.5 天胚胎的脐带提取物进行检测, 发现 Dicer cKO 胚胎与对照胚胎相比, 总 AKT 和 ERK 的表达水平没有明显差异,

但磷酸化的 AKT (pAKT) 和磷酸化的 ERK (pERK) 水平明显降低(图 7).

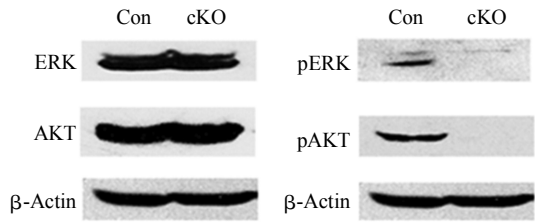


Fig. 7 The expression of signal transduction pathway protein
Comparing with control embryos, the expressions of ERK and AKT in Dicer cKO embryos were similar, but phosphorylated ERK (pERK) and phosphorylated AKT (pAKT) disappeared nearly in the umbilical artery at E14.5 by Western blot.

用免疫荧光对腹主动脉染色, 发现对照胚胎的腹主动脉壁厚, pERK 和 pAKT 均成强阳性反应, 胞核和胞浆分别染色并重合后, 阳性反应增强, 而 Dicer cKO 胚胎的阳性反应微弱(图 8). 这些结果表明 Dicer 对信号转导的 ERK1/2 和 PI3K/AKT 通路有明显的调控作用, 在 VSMC 生长和生存中起着重要作用.

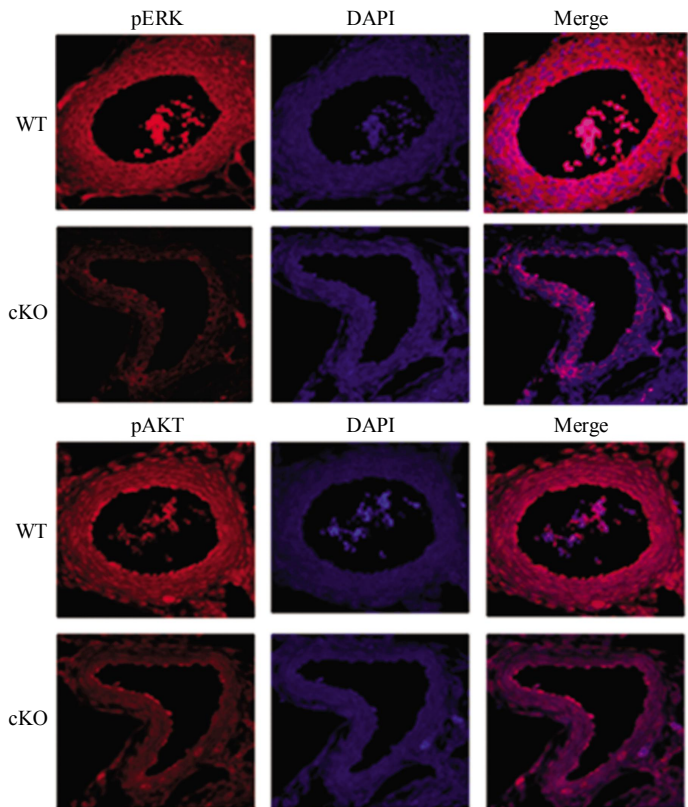


Fig. 8 The expression of phosphorylated signal transduction pathway protein

The expressions of pERK and pAKT in Dicer cKO embryos were very low in abdominal aorta at E14.5 by immunofluorescence staining. IS×400

3 讨 论

近年来, Dicer 对血管系统的作用也有少量报道. Suarez 等^[15]通过删除内皮细胞中的 Dicer, 发现 Dicer 是出生后血管再生所必需的. 最近, Albinsson 等^[16]报道了敲除 VSMC 的 Dicer 外显子 21 和 22(Dicer KO)可引起胚胎死亡, 但其所报道的 Dicer KO 胚胎的病理发生、病理变化和表型与本研究有较大差异. Albinsson 等通过基因打靶法敲除了 VSMC 中的 Dicer 外显子 21 和 22, 发现 Dicer KO 胚胎死于妊娠的 E16.5 天和 E17.5 天, Dicer KO 胚胎与对照胚胎的大小没有明显区别, 机体的出血仅发生在肝脏. 认为胚胎的死亡与 SMC 中的肌动蛋白骨架破坏和 miRNA 成熟障碍所致. 本研究通过条件性敲除血管平滑肌中的 Dicer 外显子 23, 揭示 Dicer 的缺失可明显抑制 VSMC 的增殖和分化, 进而引起胚胎发育迟滞, 最终导致死亡. 本研究发现的 Dicer cKO 胚胎的表型比 Albinsson 等报道的要严重得多. Dicer cKO 胚胎在 E12.5 天就出现明显的发育迟滞现象, 直到胚胎死亡的 E15.5 天, 个体差异相当明显, 与同窝的对照胚胎相比, 所有的器官均较小; Dicer cKO 胚胎的死亡时间也比较早, 是 E14.5 天和 E15.5 天; 全身多器官性出血, 特别是皮肤、骨骼肌和肝脏尤为明显, 而且出血程度严重. 这可能与这些器官在胚胎发育的这一时间段内增长较快, 需要大量血液供应而增加了血管的负荷有关. 此时, 病理组织学检查见血管壁结构完全破坏, 血管的通透性增大, 免疫荧光检查 VSMC 的增生变化几乎完全停止. Albinsson 等的研究与本研究的差别可能与敲除 Dicer 基因的外显子不同有关. Albinsson 等敲除了 Dicer 外显子 21 和 22, 而本实验只敲除了 Dicer 外显子 23. 外显子 21/22 编码第一个 RNAase III a 结构, 而外显子 23 则编码第二个 RNase III b 结构. 虽然目前还不清楚 RNase III a 和 b 结构域有何不同的功能, 但本研究证明在裂解双股 RNA 和产生特异性的 miRNA 方面, RNase III b 的功能可能比 RNase III a 更重要.

Dicer 的一个主要功能是裂解双链 RNA, 产生 siRNA 和 miRNA. Dicer 通过控制 miRNA 的成熟来调节细胞的生殖、凋亡和分化. 目前, 几种 miRNAs 在血管生物学方面的作用也有少量报道. miR-126^[17-18]在维持血管完整性和再生方面起着重

要作用; miR-143/145 族通过调节血管平滑肌标志性基因的表达来调控血管平滑肌的表型; 敲除 miR-143/145 族导致血管的紧张性减弱, 血压降低. 本研究也检测到了在 Dicer cKO 胚胎中 VSMC 相关 miRNAs 的一些变化, 证明 Dicer 缺失可导致 miRNA 调节异常. 本研究发现 2 个 VSMC 特异性 miRNAs, 即 miR-143 和 miR-145 在 Dicer cKO 胚胎中的表达明显降低. 研究认为^[19-21] miR-145 能调节血管平滑肌的弹性, 在维持血管平滑肌收缩性表型方面起关键性作用. 另外, 本研究还发现, 敲除 Dicer 严重影响大部分 miRNA 的表达, 而 miRNA 调节异常在某种程度上是由于 Dicer 缺失所致. 但并不是所有 VSMC 中的 miRNA 均受制于 Dicer 的调节, 因为当 Dicer 从 VSMC 中删除后, miRNA15 和 miRNA18 均未发生明显变化. 这表明还有其他的作用机制参与了 VSMC 中的 miRNA 调节.

据报道, Dicer 在小鼠的发育过程中发挥着重要作用. 据 Yang 等^[22]报道, Dicer 外显子 1 和 2 敲除后, 可引起胚胎的血管发育障碍, 导致胚胎在 E12.5 天和 E14.5 天死亡. 又据 Bernstein 等^[23]报道, 从小鼠组织中全部敲除 Dicer 外显子 21, 可导致胚胎在 E7.5 天发生死亡. 在以上两者的研究中虽然 VSMC 的增殖和分化均受到影响, 但 AKT 和 ERK 生存通路没有变化. 本研究的 Dicer cKO 胚胎中不仅 VSMC 的增殖和分化受到影响, 而且 AKT 和 ERK 两条生存通路均被抑制. 据报道^[24-26] AKT 和 ERK 通路在 VSMC 的增殖过程中起着关键性作用. 上述研究表明, 全身性敲除 Dicer 比条件性仅从 VSMC 中删除 Dicer 对胚胎的影响更为严重, 可引起胚胎过早地死亡, 而 AKT 和 ERK 生存通路对 VSMC 的影响可能发生较晚一些, 所以在过早死亡的胚胎中未能检测到.

总之, 通过条件性敲除小鼠血管平滑肌中 Dicer 外显子 23, 破坏了 Dicer RNAase III b 的结构, 抑制了 VSMC 的 miRNA 的成熟和机能, 妨碍了 VSMC 生存的信号转导通路的正常运行, 严重影响了 VSMC 的增殖和分化, 结果导致 Dicer cKO 胚胎的 VSMC 变性、坏死和再生障碍, 血管壁的屏障功能破坏, 通透性增强, 引起皮肤、肝脏和骨骼肌等组织发生大面积的弥漫性出血, 最终使胚胎发育障碍而死亡. 由此可见, Dicer 在 VSMC 的分化、增殖和成熟的过程中是一种关键性调节基因, 是血管进行正常舒缩活动不可缺少的基因, 但不是

唯一的基因, 可能还有其他基因参与了 VSMC 中 miRNA 生成的调节, 因为 Dicer cKO 胚胎中 miRNA15 和 miRNA18 均未发生明显变化。

参 考 文 献

- [1] Jocelyn M B, Tomislav M, Lars G S, *et al.* Coronary artery disease and outcomes of aortic valve replacement for severe aortic stenosis. *J Am Coll Card*, 2013, **61**(8): 837-848
- [2] Kavita S, Martha G. Coronary artery disease in women. *Global Heart*, 2013, **8**(2): 105-112
- [3] Xu W H, Li M L, Gao S, *et al.* Middle cerebral artery intraplaque hemorrhage: prevalence and clinical relevance. *Ann Neurol*, 2012, **71**(2): 195-198
- [4] Kim J M, Jung K H, Sohn C H, *et al.* Middle cerebral artery plaque and prediction of the infarction pattern. *Arch Neurol*, 2012, **69**(11): 1470-1475
- [5] Wei Q, Bhatt K, He H Z, *et al.* Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 2010, **21**(5): 756-761
- [6] Saxena C, Tabin J. MiRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(2): 87-91
- [7] Macrae I, Zhou K, Li F, *et al.* Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 2006, **311**(5758): 195-198
- [8] Lee Y S, Nakahara K, Pham J W, *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004, **117**(1): 69-81
- [9] Zehir L L, Hua E L, Maska Y, *et al.* Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Dev Biol*, 2010, **340**(10): 459-467
- [10] Zheng K, Li H, Zhu Y, *et al.* MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord. *J Neurosci*, 2010, **30**(24): 8245-8250
- [11] Mudhasani R, Imbalzano A N, Jones S N. An essential role for Dicer in adipocyte differentiation. *J Cell Biochem*, 2010, **110**(4): 812-816
- [12] Huang T, Liu Y, Huang M, *et al.* Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *J Mol Cell Biol*, 2010, **2**(3): 152-163
- [13] Yue J, Sheng Y, Ren A, *et al.* A miR-21 hairpin structure-based gene knockdown vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **394**(3): 667-672
- [14] Long X, Tharp D L, Georger M A, *et al.* The smooth muscle cell-restricted KCNMB1 ion channel subunit is a direct transcriptional target of serum response factor and myocardin. *J Biol Chem*, 2009, **284**(48): 33671-33682
- [15] Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, *et al.* Dicer dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(37): 14082-14087
- [16] Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, *et al.* MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, **30**(8): 1118-1126
- [17] Fish J E, Santoro M M, Morton S U, *et al.* MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, 2008, **15**(2): 272-284
- [18] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, *et al.* The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, 2008, **15**(2): 261-271
- [19] Xin M, Small E M, Sutherland L B, *et al.* MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev*, 2009, **23**(8): 2166-2178
- [20] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, *et al.* The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice, correlate with human disease. *Cell Death Differ*, 2009, **16**(5): 1590-1598
- [21] Cordes K R, Sheehy N T, White M P, *et al.* MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 2009, **460**(8): 705-710
- [22] Yang W J, Yang D D, Na S, *et al.* Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*, 2005, **280**(10): 9330-9335
- [23] Bernstein E, Kim S Y, Carmell M A, *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, **35**(10): 215-217
- [24] Blanc A, Pandey N R, Srivastava A K. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med*, 2003, **11**(2): 229-234
- [25] Izawa Y, Yoshizumi M, Fujita Y, *et al.* ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*, 2005, **308**(2): 291-299
- [26] Li X A, Bianchi C, Sellke F W. Rat aortic smooth muscle cell density affects activation of MAP kinase and Akt by menadione and PDGF homodimer BB. *J Surg Res*, 2001, **100**(2): 197-204

Dicer and Its miRNAs are Necessary Gene and Regulatory Factors for Differentiation and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell*

PAN Yao-Qian^{1,2)**}, PAN Bo^{2)**}, LIU Xing-You^{1,2)}, LI Rui-Zhen^{1,2)}, YUE Jun-Ming³⁾

(¹⁾ College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

²⁾ Henan Higher Education Engineering Technology Research Center, Xinxiang 453003, China;

³⁾ Department of Physiology, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN 38163, USA)

Abstract To research the role of the Dicer and miRNA in vascular smooth muscle cell (VSMC), the conditional gene targeting method, sequential biopsy pregnancy mice, histopathology, immunofluorescence, PCR, Western blot and Real time PCR were used to examine carefully the vasculopathy, the changes of Dicer, miRNAs and proteins of signal transduction pathway in conditional knock out the Dicer (Dicer cKO) embryos. Results indicated that three types of mice with different genotype that was wild type mice, heterozygotic type mice and homozygotic type mice were generated during breeding Dicer cKO mice. In them, wild type mice and heterozygotic mice were able to born, and no evident clinical abnormal showed when they were born, but homozygotic mice was not able to born and died in mother's abdomen. The development delay of Dicer cKO embryos was found in embryonic growth 12.5days (E12.5), the obvious vessels expansion, blood stasis and far-ranging diffuse hemorrhage in E14.5 and death in E15.5. The lesions of Dicer cKO embryos' vessel walls appeared as early as at E13.5, mainly showed irregular arrangement and lower proliferative cells; the pathologic changes of vessel walls thinning, collapse and irregular lumen appeared at E14.5. All destroyed structure of vessel wall, few cell proliferation, damaged barrier function of vessel wall, permeability enhancement and exudation of red blood cell occurred at E15.5. The expression of VSMC marker genes, most detected miRNAs and phosphorylated signal transduction pathway proteins that were extracellular signal-regulated kinase and protein kinase showed distinct down regulation at E14.5. This experiment proves that the Dicer is necessary gene for vessel development. The Dicer regulates the expression of VSMC marker genes through commanding miRNA generation and maturation, so as to promote proliferation and differentiation of VSMC and guarantee the integrity of vessel wall structure.

Key words Dicer, microRNA, vascular smooth muscle cell, conditional knockout, embryos

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00115

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31372407).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-13223756880, E-mail: panyaoqian@163.com

Received: April 24, 2014 Accepted: August 11, 2014