

内含子源性 microRNA 对内皮型一氧化氮合酶表达及血管内皮细胞增殖的作用*

严丽梅 吴建勇 于潇华 徐竞鸥 欧和生**

(南华大学药物药理研究所, 衡阳 421001)

摘要 前期工作表明, 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)第4内含子中的27碱基(nucleotide, nt)重复序列是27-nt microRNA的来源, 并对eNOS具有重要的调节作用。为进一步探讨该内含子源性27-nt microRNA参与调节eNOS表达的分子机制及其在内皮细胞增殖中的可能作用, 通过构建27-nt microRNA高表达质粒, 用脂质体将该质粒转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), Western blot和RT-PCR检测该细胞系中eNOS蛋白和mRNA表达情况以及胞核转录因子的表达改变, 并观察HUVEC增殖的变化情况。结果发现: 27-nt microRNA高表达能降低eNOSmRNA的水平和蛋白质表达; 同时对转录因子Sp1、Ap1的蛋白质表达也产生了不同程度的抑制作用; 转染后细胞的生长速度比未转染的细胞明显减慢, 尤其转染了27-nt microRNA的双倍长度突变体(pEGP-mut-54nt-mi)质粒的HUVEC, 其生长倍增时间比正常对照组明显延长达49.4%。结果表明, 27-nt microRNA明显抑制eNOS蛋白及其mRNA表达, 同时HUVEC增殖受到明显抑制, 转录因子Sp1和Ap1在27-nt microRNA对eNOS的表达调节中起重要作用。实验提示, 内含子源性microRNA与转录因子共同参与对内皮细胞增殖及其相关性基因的表达调节, 可能是众多真核细胞中某些疾病相关性基因表达自我调节的重要机制之一。

关键词 microRNA, 内皮型一氧化氮合酶, 内皮细胞, 转录因子

学科分类号 Q7, R33

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00755

microRNA是一类长约22个核苷酸左右、进化保守的内源性非编码单链小分子RNA, 通过降解mRNA或抑制蛋白质翻译的方式调节特异性基因表达。近年来的研究发现, 在病理性心脏和血管组织中microRNA的表达出现异常^[1], 心血管疾病的发生伴随着microRNA功能的失调^[2]。进一步的研究资料提示, microRNA在心血管细胞的分化、生长、增殖及凋亡中可能具有重要的调节作用^[3-4]。

内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)主要存在于血管内皮细胞、血小板、肾小管上皮细胞等细胞中^[5], 其通过介导体内L-精氨酸降解产生NO。在心血管系统中, 具有维持血管的正常舒张功能、促进血管内皮细胞损伤后的功能修复以及抑制血小板的聚集等功能^[6]。最近资料表明, eNOS通过某些细胞因子的激活诱导血管内皮细胞增殖^[7]; 我们的前期工作发现, eNOS第4内含子中的27-nt重复序列是其相应序列内含

子源性microRNA(27-nt microRNA)的来源, 参与调控eNOS的表达^[8]。为进一步研究该内含子源性27-nt microRNA参与调节eNOS表达的分子机制及其在内皮细胞增殖中的可能作用, 本实验通过构建27-nt microRNA高表达质粒, 用脂质体将该质粒转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 检测该细胞系中eNOS蛋白和mRNA表达情况以及胞核转录因子的表达改变, 并观察HUVEC增殖的变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(美国标准生物制品收藏

* 国家自然科学基金资助项目(30670834, 30871186)和湖南省高等学校科研资助项目(06A060)。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281795, E-mail: hsou01@yahoo.com

收稿日期: 2009-12-20, 接受日期: 2010-03-08

中心(ATCC)); *E. coli* DH5 α (本室保藏); 载体 miRNASelect™ pEGP-miR(美国 Cell Biolabs 公司); 质粒提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司公司); 总 RNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司); RT 试剂盒(美国 MBI 公司); PCR 试剂盒(天根生化科技有限公司); Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司); puromycin(Sigma 公司); eNOS 兔源单克隆抗体(Cell signaling 公司); 1640 细胞培养基(Invitrogen 公司); 胎牛血清(天津灏洋生物有限公司).

1.2 方法

1.2.1 27-nt microRNA 高表达质粒的构建及鉴定.

按照 eNOS 第 4 内含子中 27-nt 重复序列 5' GAA-GTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG 3' 设计发夹 microRNA, 为了检测该 microRNA 是否具有多态性, 我们设计了 4 种不同的变体形式. 从萤光素酶基因中选取 eNOS 基因的表达没有任何影响的 27-nt 序列作为对照. 首先用 DNA 合成技术得到第一链 DNA, 接着通过 DNA 连接反应合成双链 DNA, 之后经过 PCR 扩增后进行体外重组, 插入载体 miRNASelect™ pEGP-miR, 构建的 5 种质粒分别为 pEGP-27nt-mi、pEGP-mut-27nt、pEGP-54nt-mi、pEGP-mut-54nt、pEGP control. 随后转化 *E. coli* DH5 α 宿主菌. 挑取经酶切初步证实插入正确的单克隆菌落, 将阳性菌液 1.5 ml 寄至上海生工公司进行 DNA 序列测定.

1.2.2 重组质粒转染 HUVEC. HUVECs 用 10% 胎牛血清 1640 培养基培养 24 h, 换为优化培养基, 并加入配好的脂质复合体, 5 h 后换成 10% 胎牛血清 1640 培养基. 待转染 48 h 后加 puromycin 筛选阳性克隆, 观察转染情况.

1.2.3 稳定转染细胞中 27-nt microRNA 的表达鉴定. 提取经初步筛选的细胞总 RNA 以及 microRNA, 用 12.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶室温进行电泳(130 V, 2 h). 之后电转移至尼龙膜上, 用合成的 27-nt 重复子反义寡核苷酸探针进行检测, 该探针在 5' 端带有 [γ - 32 P] ATP 标记物, 其他步骤与标准的 RNA 印迹方法相同.

1.2.4 Western blot 检测蛋白质表达水平. 裂解转染有目的基因的 HUVECs, 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 BAC 法进行蛋白质定量. 取 50 μ g 蛋白质在 8% SDS-PAGE 上电泳, 后电转至 PVDF 膜上. 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入 eNOS 等一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 15 min,

每 5 min 换液 1 次. 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗, 37℃ 孵育 45 min, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 然后滴加化学发光试剂 A、B 的混合溶液激发荧光, 在暗室中压片, 显影、定影后进行图像分析.

1.2.5 RT-PCR 检测 eNOS mRNA 表达水平. 细胞总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂盒说明书进行. 运用 Beacon Designer 2.0 软件进行人 eNOS 和 GAPDH 引物合成. 检测 eNOS 基因表达的上游引物序列为 5' ACGAGGAGTGGGAAGTTGGTTC 3', 下游引物 5' GGTAAGATGGTCAAGTTGGGA 3'; GAPDH 基因表达的上游引物序列为 5' AGCCTTC-TCCATGGTGGTGAAGAC 3', 下游引物 5' CGG-AGTCAACGGATTTGGTCGTAT 3'. 1 μ g HUVEC 细胞总 RNA 加入 1.0 μ l(0.5 g/L) oligo(dT) 18 引物, 70℃ 变性 5 min, 迅速至于冰上冷却. 加入 4 μ l 5 $\times$ 反应缓冲液, 1 μ l RiboLock™ 核酸酶抑制剂 (20 U/ μ l), 2 μ l 10 mmol/L dNTP, 37℃ 温育 5 min, 加入 1 μ l 逆转录酶, 42℃ 1 h, 之后 70℃ 10 min 终止反应, 合成 cDNA 第一条链. PCR 扩增反应: 94℃ 预变性 5 min 后, 开始 30 个循环: 94℃ 变性 30 s、56℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 1 min; 最后 72℃ 延伸 5 min, 终止反应. 取 5 μ l PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳.

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖. 取对数生长期的 HUVECs, 以每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中. 待细胞长到 50% 融合时更换无血清的 1640 培养基同步化 24 h, 后加 10% 胎牛血清, 在不同时间段测 A 值时往培养板中加入 10 $\times$ MTT, 继续培养 4 h, 用 Elx-800 酶联免疫检测仪测定 A_{570} 值. 计算细胞生长抑制率, 生长抑制率 = $(1 - \text{实验组 } A_{570} \text{ 值} / \text{对照组 } A_{570} \text{ 值}) \times 100\%$.

1.2.7 统计学处理. 所有实验重复 3 次, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS12.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结 果

2.1 27-nt microRNA 对 eNOS 蛋白表达的影响

细胞接触后继续培养 24 h, Western blot 检测 HUVECs 中 eNOS 蛋白表达水平. 结果显示(图 1): 与对照组(pEGP control, 图 1-3)相比, 转染了 pEGP-27nt-mi(图 1-4)、pEGP-mut-27nt-mi(图 1-5)、pEGP-54nt-mi(图 1-6)、pEGP-mut-54nt-mi(图 1-7) 4 种高表达质粒 HUVEC 的 eNOS 蛋白受到了抑

制, 分别降低了 94.9% (0.012 ± 0.005 vs 0.237 ± 0.010 , $P < 0.01$)、94.5% (0.013 ± 0.003 vs 0.237 ± 0.010 , $P < 0.01$)、95.3% (0.011 ± 0.005 vs 0.237 ± 0.010 , $P < 0.01$)和 95.8% (0.010 ± 0.005 vs 0.237 ± 0.010 , $P < 0.01$); 而正常细胞组(图 1-1)、空质粒组(图 1-2)以及转染了 pEGP control(图 1-3)的对照组间的差别不明显, 经过统计处理无统计学意义。表明 27-nt microRNA 高表达质粒的转入抑制了 HUVEC 的 eNOS 蛋白的表达。

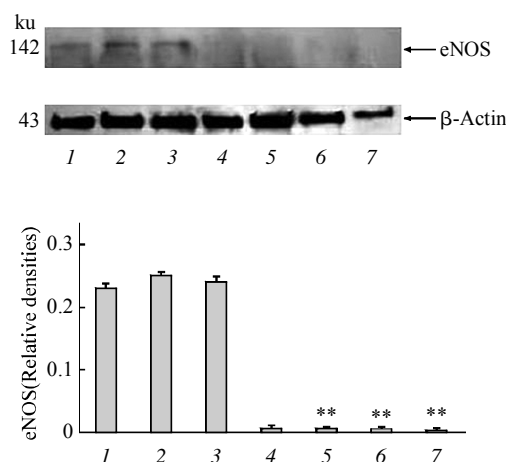


Fig. 1 Effect of the 27-nt microRNA on eNOS protein expression

Endothelial cells were cultured to 90% confluence and then transfected with: 1, HUVEC; 2, vacant plasmid; 3, pEGP control; 4, pEGP-27nt-mi; 5, pEGP-mut-27nt-mi; 6, pEGP-54nt-mi; 7, pEGP-mut-54nt-mi. The protein of all stable cell lines was isolated and performed to Western blotting for eNOS protein assay. $**P < 0.01$ compared with the control.

2.2 27-nt microRNA 对 eNOS mRNA 表达的影响

收集细胞总 RNA, 用 eNOS 基因特异引物进行 RT-PCR 检测, 结果显示如图 2. 与对照组(pEGP control, 图 2-3)相比, 转染了 pEGP-27nt-mi (图 2-4)、pEGP-mut-27nt-mi(图 2-5)、pEGP-54nt-mi (图 2-6)、pEGP-mut-54nt-mi(图 2-7) 4 种高表达质粒的 HUVEC 的 eNOS mRNA 水平明显减少, 分别降低了 94.6% (0.015 ± 0.006 vs 0.277 ± 0.012 , $P < 0.01$)、94.9% (0.014 ± 0.005 vs 0.277 ± 0.012 , $P < 0.01$)、96.4% (0.010 ± 0.004 vs 0.277 ± 0.012 , $P < 0.01$)和 96.8% (0.009 ± 0.004 vs 0.277 ± 0.012 , $P < 0.01$); 而正常细胞组(图 2-1)、空质粒组(图 2-2)以及转染了 pEGP control(图 2-3)的对照组间的差别不明显, 经过统计处理无统计学意义($P > 0.05$). 表明 27-nt microRNA 高表达质粒的转入明显抑制了

HUVEC 中 eNOS mRNA 的表达。

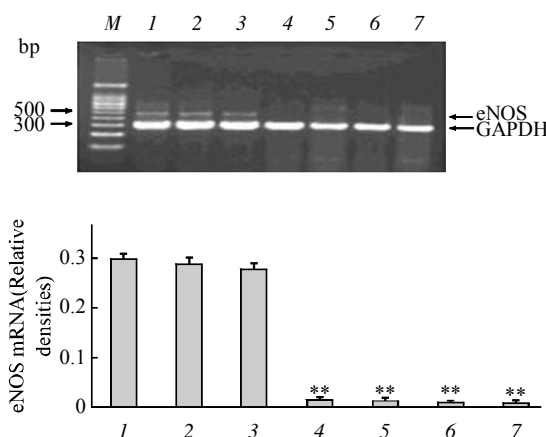


Fig. 2 Effect of the 27-nt microRNA on eNOS mRNA expression

Endothelial cells were cultured to 90% confluence and then transfected with: 1, HUVEC; 2, vacant plasmid; 3, pEGP control; 4, pEGP-27nt-mi; 5, pEGP-mut-27nt-mi; 6, pEGP-54nt-mi; 7, pEGP-mut-54nt-mi. The total RNA of all stable cell lines was isolated and performed to RT-PCR for eNOS mRNA level assay. $**P < 0.01$ compared with the control.

2.3 27-nt microRNA 对转录因子的表达影响

2.3.1 对 Sp1 蛋白的影响。 提取细胞总蛋白, 定量后进行 Western blot 分析 SP-1 蛋白表达, 结果显示(图 3), 与对照组(pEGP control, 图 3-1)相比, 转染了 pEGP-27nt-mi (图 3-2)、pEGP-mut-27nt-mi (图 3-3)、pEGP-54nt-mi(图 3-4)、pEGP-mut-54nt-mi

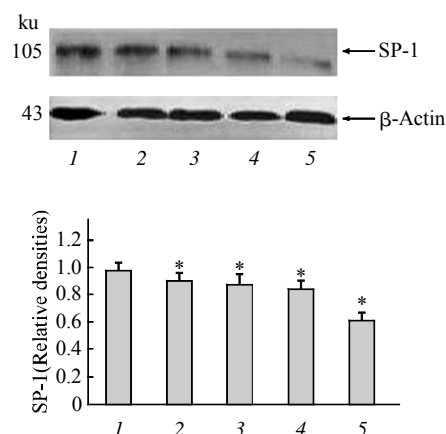


Fig. 3 Changes of SP-1 protein expression by 27-nt microRNA

Endothelial cells were cultured to 90% confluence and then transfected with: 1, pEGP control; 2, pEGP-27nt-mi; 3, pEGP-mut-27nt-mi; 4, pEGP-54nt-mi; 5, pEGP-mut-54nt-mi. The protein of all stable cell lines was isolated and performed to Western blotting for SP-1 protein assay. $*P < 0.05$ compared with the control.

(图 3-5) 4 种高表达质粒 HUVEC 的 SP-1 蛋白表达受到了不同程度的抑制, 分别降低了 14.0% (0.860 ± 0.013 vs 1.000 ± 0.015 , $P < 0.05$)、17.0% (0.830 ± 0.012 vs 1.000 ± 0.015 , $P < 0.05$)、18.0% (0.820 ± 0.014 vs 1.000 ± 0.015 , $P < 0.05$)和 40.0% (0.600 ± 0.012 vs 1.000 ± 0.015 , $P < 0.05$).

2.3.2 对 AP-1 蛋白的影响. 用 Western blot 方法检测另一个转录因子 AP-1 的表达情况. 结果显示(图 4), 与对照组(pEGP control, 图 4-1)相比, 转染了 pEGP-27nt-mi (图 4-2)、pEGP-mut-27nt-mi (图 4-3)、pEGP-54nt-mi(图 4-4)、pEGP-mut-54nt-mi (图 4-5) 4 种高表达质粒 HUVEC 的 AP-1 蛋白表达受到了不同程度的抑制, 分别降低了 22.0% (0.780 ± 0.033 vs 1.000 ± 0.052 , $P < 0.05$)、36.0% (0.640 ± 0.032 vs 1.000 ± 0.052 , $P < 0.05$)、37.0% (0.630 ± 0.024 vs 1.000 ± 0.052 , $P < 0.05$)和 23.0% (0.770 ± 0.032 vs 1.000 ± 0.052 , $P < 0.05$).

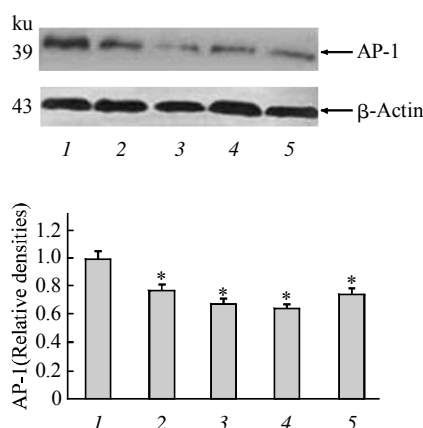


Fig. 4 Alterations of AP-1 protein expression by 27-nt microRNA

Endothelial cells were cultured to 90% confluence and then transfected with: 1, pEGP control; 2, pEGP-27nt-mi; 3, pEGP-mut-27nt-mi; 4, pEGP-54nt-mi; 5, pEGP-mut-54nt-mi. The protein of all stable cell lines was isolated and performed to Western blotting for AP-1 protein assay. * $P < 0.05$ compared with the control.

2.4 27-nt microRNA 对 HUVECs 增殖的影响

2.4.1 对生长曲线和倍增时间的影响. 选取处于对数生长期的细胞, 以每孔 3×10^3 个细胞接种于 24 孔培养板中, 在 12、24、48、96 h 4 个时间用血球计数板计数并记录, 绘制细胞生长曲线(图 5). 根据公式: $DT = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$, 其中 DT 为细胞倍增时间, t 为细胞培养时间, N_t 为终止时细胞数, N_0 为起始时细胞数. 结果显示, 在 96 h

后, 与对照组(图 5 中 $\bullet-\bullet$ 组)相比, 转染了 27-nt microRNA(图 5 中 $\blacktriangle-\blacktriangle$ 组)及其突变体(图 5 中 $\blacklozenge-\blacklozenge$, $\blacksquare-\blacksquare$ 和 $\triangle-\triangle$ 组)高表达质粒后, HUVEC 的数目明显降低, 分别降低了 20.3% (75.60 ± 1.23 vs 94.86 ± 1.82 , $P < 0.05$)、38.14% (58.68 ± 1.02 vs 94.86 ± 1.82 , $P < 0.05$)、48.96% (45.72 ± 1.37 vs 94.86 ± 1.82 , $P < 0.05$)、51.61% (38.94 ± 1.03 vs 94.86 ± 1.82 , $P < 0.05$); 与上述细胞数目变化相对应, 细胞增殖的倍增时间明显延长, 以小时(h)计, 分别增加了 27.4% (24.92 ± 0.22 vs 19.55 ± 0.19 , $P < 0.05$), 39.6% (27.29 ± 0.17 vs 19.55 ± 0.19 , $P < 0.05$), 20.7% (23.60 ± 0.20 vs 19.55 ± 0.19 , $P < 0.05$)和 49.4% (29.22 ± 0.25 vs 19.55 ± 0.19 , $P < 0.05$); 提示 27-nt microRNA 及其突变体对细胞增殖产生了明显的抑制作用.

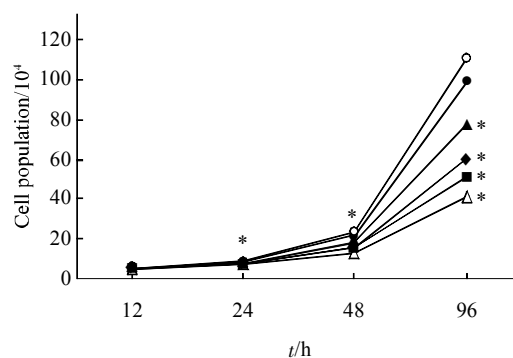


Fig. 5 Effect of 27-nt microRNA on the endothelial cell growth

Endothelial cells were transferred with: normal cell without plasmid ($\circ-\circ$); pEGP control ($\bullet-\bullet$); pEGP-27nt-mi ($\blacktriangle-\blacktriangle$); pEGP-mut-27nt-mi ($\blacklozenge-\blacklozenge$); pEGP-54nt-mi ($\blacksquare-\blacksquare$); and pEGP-mut-54nt-mi ($\triangle-\triangle$). Cell number was obtained by blood cell counting chamber. * $P < 0.05$ compared with the control.

2.4.2 27-nt microRNA 对 HUVEC 增殖的影响. 对筛选得到的细胞系进行 MTT 试验, 对所得数据进行统计分析, 结果显示(图 6), 转染了 pEGP-27nt-mi (图 6-2)、pEGP-mut-27nt-mi(图 6-3)、pEGP-54nt-mi (图 6-4)、pEGP-mut-54nt-mi(图 6-5)高表达质粒的 HUVEC 的增殖受到明显抑制, 在 24 h 后, 其中对转染 pEGP-mut-54nt-mi 的细胞增殖抑制效果最强, 与对照组(图 6-1)比较分别降低了 25.0% (0.39 ± 0.05 vs 0.52 ± 0.03 , $P < 0.05$), 28.9% (0.37 ± 0.07 vs 0.52 ± 0.03 , $P < 0.05$), 15.4% (0.44 ± 0.03 vs 0.52 ± 0.03 , $P < 0.05$)和 42.3% (0.30 ± 0.04 vs 0.52 ± 0.03 , $P < 0.05$).

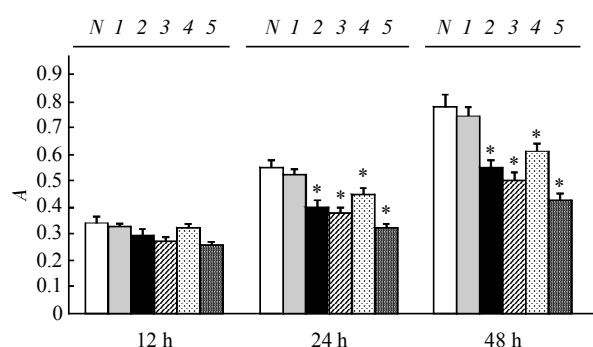


Fig. 6 Effect of 27-nt microRNA on the proliferation of endothelial cells

Endothelial stable cell lines transfected with: N, no vector; 1, pEGP control; 2, pEGP-27nt-mi; 3, pEGP-mut-27nt-mi; 4, pEGP-54nt-mi; 5, pEGP-mut-54nt-mi. The proliferation of cells was measured by MTT at different time-point of 12, 24 and 48 h. * $P < 0.05$ vs pEGP control.

3 讨 论

eNOS 广泛分布于心血管系统中, 通过催化 L-精氨酸产生 NO, 降低动物体内 eNOS 基因的表达, 表现为血管内皮损伤和血压升高^[9]. 在本文中, 我们研究了 27-nt microRNA 参与调节 HUVEC 中 eNOS 表达的分子机制及其在 HUVEC 增殖中的可能作用. 主要发现之一是, 27-nt microRNA 对 eNOS 的表达有明显的调节作用. 并且在 27-nt microRNA 高表达时, 转录因子 Sp1、Ap1 的蛋白质表达也产生了不同程度的抑制作用. 进一步研究还发现, 转录因子 Sp1、Ap1 和 27-nt microRNA 协同作用于 eNOS 的表达和 HUVEC 增殖.

eNOS 基因存在多态性^[10], 包括某些点突变或片段缺失, 如 eNOS 基因启动子中的 T-786→C 点突变和第 4 内含子中缺失一个长度为 27-nt 的重复子. 第 4 内含子中的 27-nt 的重复子序列为 5' AAATGTTACCTACATCTGCAACCACA 3', 通常含 5 个该重复子基因型被称为 a/a 型, 而含 4 个该重复子的基因型则被称为 b/b 型. eNOS 基因无论是点突变还是重复子序列片段缺失, 都已被视为心血管疾病的重要危险因素^[11-12]. 前期研究发现^[13-14], eNOS 基因第 4 内含子中的 27-nt 重复序列以加强子的方式对 eNOS 基因的转录效率进行调节. 本研究设计了这一 27-nt microRNA 及其不同的变体形式, 经过分析发现, 不管是重复序列的加

倍还是某些核苷酸的突变都引起了 eNOS 基因转录受阻, 影响了相应 mRNA 的表达, 进而抑制了 eNOS 蛋白质翻译, 提示该内含子源性的 microRNA 存在基因多态性, 即不管是该 27-nt 重复序列的增减还是个别碱基的突变都可能是造成 eNOS 功能障碍的危险因素. 本研究中内含子源性 27-nt microRNA 对 eNOS 蛋白以及 mRNA 表达影响的实验结果都强烈地提示, 在 eNOS mRNA 剪切、成熟等阶段可能存在一种内含子源性 microRNA 参与的分子调控机制, 并通过这种机制对 mRNA 的表达进行有效的自我调节.

需要指出, 已知的大多数动物体内 microRNA 抑制靶基因 mRNA 的翻译, 而对 mRNA 的转录影响程度不大^[15]; 本试验的结果提示, 内含子源性的 microRNA 可能更有效地影响核内 mRNA 的转录. 为了证实这一推测, 我们对内含子源性 microRNA 高表达背景下 eNOS 相关的某些转录因子蛋白表达进行了研究. 目前 eNOS 基因结构已经比较清楚^[16], 其启动子中含有 SP1 和 “GATA” 序列, 5' 端含有 AP1、AP2、NF1、重金属应答元件、急相反应切变压应答元件和类固醇调节的顺式元件等序列. 有资料证实, SP1 和 AP1 都是核转录因子, 并且参与细胞的转化、增殖、分化、凋亡等多种生物学功能^[17-18]. 因此我们选取 SP1 和 AP1 进行检测, 结果发现, 含有 27-nt 重复序列 microRNA 的 HUVEC 中 SP1、AP1 的表达量受到不同程度的影响, 进而影响 eNOS 的表达. 这一结果提示内含子源性的 microRNA 可能是 SP1、AP1 等转录因子的一类新的活性调节子. 增加 27-nt 重复序列的数目或者使该重复序列中的特定位点的核苷酸发生突变, 对 SP1 和 AP1 的影响程度略有加深, 说明不管是序列数目的增减还是点突变都可能是造成 SP1 和 AP1 表达受阻的危险因素; 从另一角度分析, 在对 eNOS 基因转录环节上, 内含子源性 microRNA 与转录因子 AP-1 和 SP-1 存在一种协调性调控机制, 即内含子源性的 microRNA 表达改变可以影响转录因子的表达从而调控其本位基因的转录和表达, 这可能是众多真核细胞中某些疾病相关性基因表达自我调节的重要机制之一.

一系列研究证实, microRNA 可以调控细胞的增殖和凋亡. 例如, miR-290 家族可以改善 *Dgcr8* 敲除后胚胎干细胞增殖的缺陷^[19]. miR-24a 负调控细胞凋亡因子 caspase9 和 apaf1 的表达, 过表达 miR-24a 可以明显抑制视网膜细胞的凋亡^[20]. 过表

达 miR-145 明显抑制 MCF - 7 细胞增殖, 并且诱导细胞凋亡^[21]. 我们的试验结果显示, 含有 27-nt microRNA 高表达质粒的 HUVEC 增殖速率受到了不同程度的抑制, 特别是转染了 pEGP-mut-54nt-mi 的 HUVEC 受到抑制的效果极为明显, 而转染了 pEGP-54nt-mi 的 HUVEC 增殖影响程度并不十分明显. 这些内含子源性的 microRNA 是通过抑制了 eNOS 的表达进而抑制了 HUVEC 的增殖, 还是通过影响与细胞增殖有关的生长因子从而调节细胞增殖? 还有待进一步的研究.

综上所述, 本文首次提出 microRNAs 与某些转录因子协同作用调控真核基因表达的分子作用机制, 通过调节内含子源性 27-nt microRNA 实现对 eNOS 基因的调控, 这不仅对心血管关键基因及其重要基因功能学研究提供重大的理论依据, 而且对揭示 microRNA 与人类重大疾病关键基因之间的内在关联及其潜在的临床应用也具有重要的现实意义.

参 考 文 献

- [1] Cheng Y, Ji R, Yue J, *et al.* MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy. *Am J Pathol*, 2007, **170**(6): 1831-1840
- [2] Zhao Y, Ransom J F, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, **129**(2): 303-317
- [3] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, **436**(7084): 214-220
- [4] Williams A H, Liu N, van Rooij E, *et al.* MicroRNA control of muscle development and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, **21**(3): 461-469
- [5] Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 1993, **268**(23): 17478-17488
- [6] Huang P L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, **20**(6): 295-302
- [7] Mehta V B, Zhou Y, Radulescu A, *et al.* HB-EGF stimulates eNOS expression and nitric oxide production and promotes eNOS dependent angiogenesis. *Growth Factors*, 2008, **26**(6): 301-315
- [8] Wang J, Dudley D, Wang X L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**(5): e1-4
- [9] Mahn K, Borrás C, Knock G A, *et al.* Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure *in vivo*. *FASEB J*, 2005, **19**(12): 1755-1757
- [10] Sandrim V C, Coelho E B, Nobre F, *et al.* Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis*, 2006, **186**(2): 428-432
- [11] Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, *et al.* T-786—C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 1999, **99**(22): 2864-2870
- [12] Wang X L, Sim A S, Badenhop R F, *et al.* A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 1996, **2**(1): 41-45
- [13] Ou H, Shen Y H, Utama B, *et al.* Effect of nuclear actin on endothelial nitric oxide synthase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(12): 2509-2514
- [14] Zhang M X, Ou H, Shen Y H, *et al.* Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(47): 16967-16972
- [15] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [16] Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 1993, **268**(23): 17478-17488
- [17] Chu S, Ferro T J. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene*, 2005, **348**(28): 1-11
- [18] Raivich G, Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol*, 2006, **78**(6): 347-363
- [19] Wang Y M, Baskerville S, Shenoy A, *et al.* Embryonic stem cell specific microRNAs regulate the G1/S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, **40**(12): 1478-1483
- [20] Walker J C, Harland R M. MicroRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. *Genes Dev*, 2009, **23**(9): 1046-1051
- [21] Wang S, Bian C, Yang Z, *et al.* miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol*, 2009, **34**(5): 1461-1466

Role of Intronic MicroRNA in The Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and The Proliferation of Endothelial Cells*

YAN Li-Mei, WU Jian-Yong, YU Xiao-Hua, XU Jing-Ou, OU He-Sheng**

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Previously it was reported that the 27-nucleotide(nt) repeats in intron 4 of endothelial nitric syanthase (eNOS) were the source of 27-nt microRNA, which play an important role in regulation of eNOS expression. In order to further study the molecular mechanisms in regulation of eNOS gene expression and endothelial cell proliferation by the 27-nt microRNA, it was constructed the 27-nt microRNA highly expression plasmid, which was transferred into HUVEC with lipofectamine. The level of eNOS protein and mRNA, as well as Sp1 and Ap-1, were measured by Western blot and RT-PCR, respectively. The proliferation of the HUVEC was analyzed by MTT. The results showed that the 27-nt microRNA can significantly decrease eNOS mRNA level by 94.6% (0.015 ± 0.006 vs 0.277 ± 0.012 , $P < 0.01$) and inhibit its protein expression by 94.9% (0.012 ± 0.005 vs 0.237 ± 0.010 , $P < 0.01$); Sp1 and Ap1 protein were significantly decreased by 14.0% (0.860 ± 0.013 vs 1.000 ± 0.015 , $P < 0.05$) and by 22.0% (0.780 ± 0.033 vs 1.000 ± 0.052 , $P < 0.05$), compared with control, respectively. The growth rate of HUVEC treated with the 27-nt microRNA high expression was significantly decreased, particularly the inhibition in the cell lines transfected with double-length and mutant of the 27-nt microRNA plasmid, by which the doubling-time of growth was increased by 49.4% (29.22 ± 0.25 vs 19.55 ± 0.19 , $P < 0.05$), compared with control. The data suggested that intronic 27-nt microRNA significantly inhibit the eNOS expression and the proliferation of HUVEC, by the time the expression of transcription factors Sp-1 and Ap-1 were altered, strongly suggesting that 27-nt microRNA and transcription factors cooperatively regulate the expression of related genes, consequently the proliferation of HUVEC. Data from the present study may serve as one model of the critical mechanisms through which the intronic microRNA and transcription factor synergistically were involved in the auto-regulation of disease-related gene expression.

Key words microRNA, eNOS, endothelial cell, transcription factor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00755

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30670834, 30871186) and Science Foundation of Hunan Universities (06A060).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281795, E-mail: hsou01@yahoo.com

Received: December 20, 2009 Accepted: March 8, 2010