

广东医学  
Guangdong Medical Journal  
ISSN 1001-9448, CN 44-1192/R

## 《广东医学》网络首发论文

题目: microRNA-24 对自噬的调节及血管内皮细胞管腔形成的影响  
作者: 杨鹏, 欧和生, 莫国君, 罗雪兰, 沈凤, 陶晓静, 吕冬宁  
DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.20180809.008  
收稿日期: 2017-10-18  
网络首发日期: 2018-08-17  
引用格式: 杨鹏, 欧和生, 莫国君, 罗雪兰, 沈凤, 陶晓静, 吕冬宁. microRNA-24 对自噬的调节及血管内皮细胞管腔形成的影响. 广东医学.  
<https://doi.org/10.13820/j.cnki.gdyx.20180809.008>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# microRNA - 24 对自噬的调节及血管内皮细胞管腔形成的影响\*

杨鹏<sup>▲</sup>, 欧和生, 莫国君, 罗雪兰, 沈凤, 陶晓静, 吕冬宁<sup>△</sup>

广西医科大学药学院(广西南宁 530021)

**【摘要】** 目的 探讨 microRNA - 24(miR - 24) 对自噬相关基因 LC3 II 和 Beclin - 1 的调节及其对血管内皮细胞管腔形成能力的影响。方法 将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)随机分为空白对照组、雷帕霉素 + miR - 24 高表达组以及雷帕霉素组。其中空白对照组的细胞不作任何处理;雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的细胞先转染 miR - 24 高表达质粒,再用 1 000 nmol/L 的雷帕霉素干预 6 h 建立自噬模型;雷帕霉素组的细胞同样用 1 000 nmol/L 的雷帕霉素干预 6 h 建立自噬模型;然后分别用 MTT 法检测 HUVECs 的增殖能力、细胞划痕实验检测 HUVECs 迁移能力及 Matrigel 实验检测 HUVECs 管腔形成能力,进一步用蛋白免疫印迹法(Western blot)和逆转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)分别检测 LC3II 和 Beclin - 1 的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** (1)与空白对照组相比,雷帕霉素组、雷帕霉素 + miR - 24 高表达组细胞增殖能力和迁移比例降低( $P < 0.05$ ),雷帕霉素组的管腔形成数量、长度与空白对照组相近,而雷帕霉素 + miR - 24 高表达组则基本没有形成明显管腔样结构。(2)与空白对照组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组和雷帕霉素组的 LC3II 和 Beclin - 1 mRNA 和蛋白表达量均不同程度增加( $P < 0.05$ )。(3)在雷帕霉素 + miR - 24 高表达组中,上述指标较雷帕霉素组均降低( $P < 0.05$ ),特别是管腔形成数目明显减少。**结论** miR - 24 可在转录后水平调控自噬相关基因 LC3II 和 Beclin - 1 的表达,进而下调细胞自噬水平。这很有可能是 miR - 24 抑制 HUVECs 增殖、迁移和管腔形成的机制之一。

**【关键词】** miR - 24; 管腔; 自噬; LC3II; Beclin - 1

**The effects of microRNA - 24 on autophagy regulation and cavity formation of vascular endothelial cells.** YANG Peng, OU He - sheng, MO Guo - jun, LUO Xue - lan, SHEN Feng, TAO Xiao - jing, LÜ Dong - ning. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China  
Corresponding author: LÜ Dong - ning. E - mail: tsj757700@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether microRNA - 24 (miR - 24) is involved in the regulation of autophagy - related LC3II and Beclin - 1 gene expression and its effect on the lumen formation of vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were randomly divided into 3 groups: blank control group, rapamycin group and rapamycin + miR - 24 group. Blank control group was received no intervention. Apoptosis model was established by using rapamycin (1000 nmol/L) intervention in HUVECs of rapamycin group and rapamycin + miR - 24 overexpression group. The miR - 24 high expression plasmid was constructed and transfected into HUVECs of rapamycin + miR - 24 overexpression group. The proliferation, migration and lumen formation of HUVECs were detected by MTT assay, cell scratch test and Matrigel assay, respectively. The expression of LC3II and Beclin - 1 was assessed by Western blotting and reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). **Results** Compared with the blank control group, the cell proliferation and migration ratio in rapamycin group and the rapamycin + miR - 24 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the number and length of lumen formation between the rapamycin group and blank control group, while there was no lumen - like structure observed in rapamycin + miR - 24 group. Compared with the blank control group, the mRNA and protein expression of LC3II and Beclin - 1 in rapamycin group and rapamycin + miR - 24 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). In the rapamycin + miR - 24 group,

\* 国家自然科学基金资助项目(编号:81373403)

▲在读硕士研究生

△通信作者。副主任医师;E - mail: tsj757700@163.com

the above indicators were significantly lower than rapamycin group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** miR-24 can regulate the expression of autophagy-related genes LC3II and Beclin-1 at the post-transcriptional level, and then down-regulate the level of autophagy. This is probably one of the mechanisms by which miR-24 inhibits the proliferation, migration and lumen formation of HUVECs.

**【Key words】** miR-24; lumen; autophagy; LC3II; Beclin-1

血管新生的生物学过程包括内皮细胞增殖、迁移、出芽、管腔形成等<sup>[1-2]</sup>。近年来研究显示,在血管内皮细胞特异性表达的 miRNAs 对血管新生有重要的调控作用<sup>[3-6]</sup>,而且,这些 miRNAs 的异常表达伴随着心血管系统疾病的发生、发展过程<sup>[7-8]</sup>。同时,许多心血管疾病的病理过程都伴随着血管内皮细胞自噬程度的改变。Sachdev 等<sup>[9]</sup>发现,在缺血缺氧情况下,高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 能诱发细胞自噬进而促进血管新生。microRNA-24 (miR-24) 在多个组织中均有表达,特别在血管组织中表达最高。有研究表明,miR-24 能显著抑制血管新生<sup>[10]</sup>,但对于 miR-24 抑制血管新生的机制研究却鲜有报道。我们前期研究发现,miR-24 能显著抑制与自噬相关的 LC3II 和 Beclin-1 蛋白的表达,进而下调血管内皮细胞的自噬水平<sup>[11]</sup>。然而,miR-24 调控血管生成的机制是否与其抑制 LC3II 和 Beclin-1 的表达有关目前尚不清楚。因此,在 2016 年 7 月至 2017 年 7 月之间,我们重点探究了 miR-24 对自噬的调控及其对血管内皮细胞管腔形成的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和试剂** 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, 中国 Procell 公司); 澳洲南美胎牛血清 (上海栢鹏生物科技有限公司); 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); MTT (四甲基偶氮唑盐) (北京索莱宝科技有限公司); 载体 miRNAselect™ pEGP-miR (美国 Cell Biolabs 公司); Matrigel (人工基底膜) (美国 Corning 公司); 逆转录试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); X-tremeGENE HP DNA 转染试剂盒 (德国 Roche 公司); RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司); LC3II 和 Beclin-1 抗体 (美国 Cell Signaling 公司); Taq 酶 (SinoBio 公司); 内参  $\beta$ -actin 抗体 (广州晶欣生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 miR-24 高表达质粒的构建** miR-24 的序列为 5'-UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG-3' (来自 <http://www.miRbase.org>)。miR-24 高表达质粒的构建主要分为 3 个步骤: (1) 利用 DNA 合成技术合成第一链 DNA。(2) 通过 DNA 连接反应合

成相应的双链 DNA。(3) 通过 PCR 扩增以及体外重组,最终插入 pEGPmiRNA-24 载体,然后再将载体转化入 *E. coli* DH 5 $\alpha$  宿主菌中,取 2 mL 菌液,提取质粒 DNA 并测定 DNA 序列。

**1.2.2 HUVECs 的培养、转染** HUVECs 用含有 10% 胎牛血清及 1% 链霉素/青霉素的 1640 培养液进行培养,放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中。选用 X-tremeGENE HP DNA 作为介质,将 miR-24 高表达质粒转染 HUVECs,转染 24 h 后弃掉原培养液,然后更换新的培养液,继续培养 24 h 后通过免疫荧光观察质粒的转染情况。

**1.2.3 HUVECs 的分组以及自噬模型的建立** 根据不同的处理条件将实验细胞随机分为空白对照组、雷帕霉素 + miR-24 高表达组及雷帕霉素组。空白对照组的细胞不作任何处理;雷帕霉素 + miR-24 高表达组的细胞先转染 miR-24 高表达质粒,再用 1 000 nmol/L 的雷帕霉素干预 6 h 建立自噬模型;雷帕霉素组的细胞同样用 1 000 nmol/L 的雷帕霉素干预 6 h 建立自噬模型;根据文献[12],HUVECs 先换无血清培养基饥饿 6 h 使细胞同步,然后弃掉旧培养基,再采用 1 000 nmol/L 雷帕霉素干预 HUVECs 6 h 即可建立自噬模型。

**1.2.4 MTT 法检测细胞增殖** 各组实验组均以每孔  $5 \times 10^3$  个的细胞数目接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后更换无血清培养基,继续培养使细胞同步生长。按设定的条件分别处理各组细胞后,在避光的条件下分别向每孔加入 10  $\mu$ L MTT 试剂,用锡箔纸将 96 孔板包住并置于细胞培养箱孵育,4 h 后弃掉培养液,然后在每孔中加入 150  $\mu$ L DMSO 并震荡 15 s,用酶联免疫检测仪检测在 570 nm 波长处各孔的光密度值 (OD 值),实验重复 3 次。

**1.2.5 划痕实验检测 HUVECs 的迁移能力** 各实验组均以  $5 \times 10^4$  个的细胞数目接种于 24 孔板中,待细胞完全贴壁后,用 200  $\mu$ L 枪头垂直于培养板底部划“一”字痕,然后用 PBS 冲洗 2~3 遍后加入无血清培养基继续培养。于 0 h 和 24 h 时分别在显微镜下观察细胞迁移情况,然后拍照并测量划痕宽度,迁移比率 = (划痕 0 h 后划痕宽度 - 划痕 24 h 后划痕宽度) / 划痕 0 h 后划痕宽度,实验重复 3 次。

1.2.6 Matrigel 检测 HUVECs 的成管能力 实验前一晚将 Matrigel 预先放于 4℃ 冰箱过夜解冻,待基质胶解冻后,将 96 孔板置于冰上,在每孔上铺 20 μL Matrigel。铺好胶后将 96 孔板放到 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 40 min。将各组细胞消化然后用无血清培养基重悬细胞并以每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个的细胞数目分别种于铺好的 Matrigel 基质胶上,将 96 孔板放回培养箱继续培养,12 h 时在显微镜下观察管腔形成情况。

1.2.7 Western blot 法检测 HUVECs 内 Beclin - 1 和 LC3 II 蛋白的表达 Western blot 实验主要分为以下几个步骤:(1)各组细胞蛋白的提取:加入裂解液将各组细胞裂解,将细胞刮下并转移至 1.5 mL 离心管,在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 15 min 后取上清,上清即为细胞总蛋白。(2)电泳及转膜:各组蛋白上样质量均为 50 μg,样品在浓缩胶中电泳 0.6 ~ 1 h,电压 70 ~ 90 V。在分离胶中电泳 1.5 ~ 2 h,电压 100 ~ 120 V。当溴酚蓝到达底部时即结束电泳。小心取下凝胶并切割成合适大小进行电转。恒定电流 100 mA,Beclin - 1 转移 100 min,LC3 转移 70 min。(3)封闭:将 PVDF 膜洗净并转移至含有 5% 脱脂奶粉封闭液的玻璃皿中,将玻璃皿置于摇床上,常温条件下摇动封闭 1 ~ 2 h。(4)与一、二抗反应:加入 Beclin - 1 和 LC3 II I 抗敷过夜(4℃

环境下)。次日弃反应液,用 TBST 冲洗 3 次(每次 15 min),加入 II 抗孵育 1 h,然后用 TBST 避光冲洗 3 次(每次 5 min)。(5)利用 LICOR 公司的 Odyssey 红外荧光扫描成像系统对 PVDF 膜进行定量检测,并计算 Beclin - 1 和 LC3 II 的蛋白表达量。β - actin 作为内参照,计算目标蛋白的相对表达量。Beclin - 1/LC3 II 的相对表达量 = (Beclin - 1/LC3 II 灰度值)/β - actin 灰度值。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.8 逆转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)检测 Beclin - 1 和 LC3 II mRNA 的表达 先提取各实验组的细胞总 RNA。Beclin - 1、LC3 II 以及 β - actin 的引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成(序列见表 1)。反应主要分为两步:(1)以提取的细胞总 RNA 为模板,进行逆转录合成 cDNA。(2)以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。该反应体系为:上下游引物各 1 μL,Taq 酶 12.5 μL,cDNA 2.5 μL,加灭菌蒸馏水至 25 μL 补足体积。Beclin1 基因的反应条件:94℃ 预变性 3 min 后,开始 35 个循环:94℃ 30 s,56℃ 45 s,72℃ 45 s;最后 72℃ 再延伸 5 min,终止反应。LC3 II 基因的反应条件:94℃ 预变性 3 min 后,开始 35 个循环:94℃ 30 s,56℃ 45 s,72℃ 45 s;最后 72℃ 再延伸 5 min,终止反应。取 5 μL PCR 产物经进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 引物序列

名称	引物序列	长度(bp)
Beclin - 1	正向: 5' - GGTGGCTTTCCTGGACTGTGTGC - 3'	465
	反向: 5' - TCAAAACTGACCAGGGCTGGCA - 3'	
LC3 II	正向: 5' - TCCCACACCAAGTGCATGTCAG - 3'	390
	反向: 5' - GCCAAGTGGACAGACGCATGC - 3'	
β - actin	正向: 5' - CCGCCAGCTCACCATGGATGAT - 3'	199
	反向: 5' - TCTCTFGCTCTGGGCTCTG - 3'	

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较采用方差分析,进一步采用 LSD - t 检验进行组间的两两比较,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组 HUVECs 的增殖情况 MTT 结果显示,与空白对照组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组和雷帕霉素组的 HUVECs 的增殖都受到了不同程度的抑制(P < 0.01)。而与雷帕霉素组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的细胞增殖受到明显抑制(P < 0.01)。见表 2。miR - 24 能明显抑制雷帕霉

素刺激下的 HUVECs 的增殖能力。

表 2 MTT 法检测各组细胞 OD 值及相对增殖抑制率  $\bar{x} \pm s$

组别	n	OD 值	增殖率(%)
空白对照组	3	1.26 ± 0.03	100.00 ± 2.5
雷帕霉素组	3	0.89 ± 0.01	70.63 ± 5.09 <sup>#</sup>
雷帕霉素 + miR - 24 高表达组	3	0.45 ± 0.01	35.71 ± 3.48 <sup>##</sup>

<sup>#</sup>与空白对照组比较 P < 0.01; \* 与雷帕霉素组比较 P < 0.01

2.2 各组 HUVECs 迁移情况 细胞划痕实验显示,24 h 后空白对照组的 HUVECs 迁移比率最大,覆盖面积最广,雷帕霉素组则次之,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的细胞迁移速率相对缓慢(P < 0.05)。miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的迁移

能力。见表3。

2.3 各组 HUVECs 的管腔形成情况 Matrigel 试验结果显示,与空白对照组相比,雷帕霉素组的管腔形成数目相对较少,大部分管腔的大小不及空白对

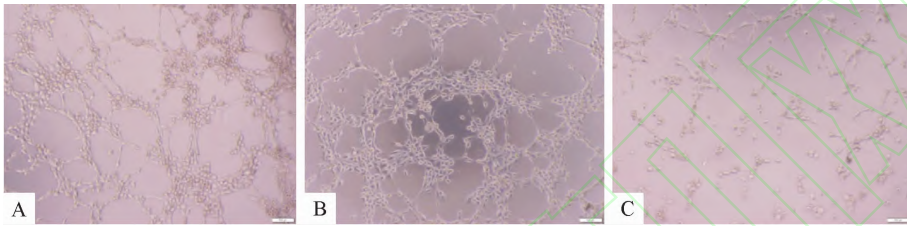
照组的大。而雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 HUVECs 虽然有聚集倾向,但并没有能形成明显的管腔样网状结构。见图1。miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的管腔形成能力。

表3 各实验组的 HUVECs 迁移情况

$\bar{x} \pm s$

组别	n	0 h	24 h	迁移比率 (%)
空白对照组	3	281 ± 20.05	181 ± 18.02	35.58 ± 0.40
雷帕霉素组	3	275 ± 28.03	210 ± 19.00	23.63 ± 0.15 <sup>#</sup>
雷帕霉素 + miR - 24 高表达组	3	235 ± 25.01	212 ± 23.08	9.78 ± 0.32 <sup>#*</sup>

#与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; \*与雷帕霉素组比较  $P < 0.05$



A:空白对照组;B:雷帕霉素组;C:雷帕霉素 + miR - 24 高表达组

图1 各组 24 h 管腔形成情况 ( $\times 100, n = 3$ )

2.4 各组 HUVECs Beclin - 1 和 LC3II 的蛋白表达情况

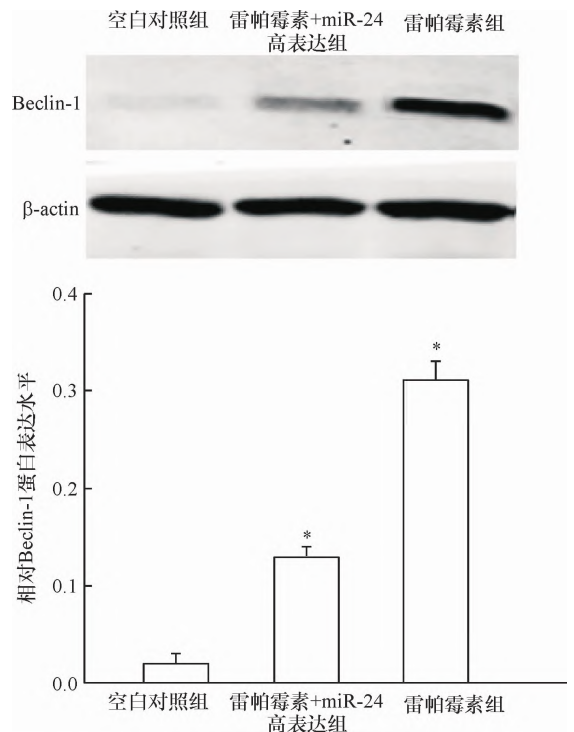
2.4.1 HUVECs Beclin - 1 结果 与空白对照组比较,雷帕霉素组的 Beclin - 1 蛋白表达量升高了 1 450.00% ( $0.31 \pm 0.02$  vs  $0.02 \pm 0.01, P < 0.05$ ),雷帕霉素 + miR - 24 高表达组上升了 550.00% ( $0.13 \pm 0.01$  vs  $0.02 \pm 0.01, P < 0.05$ );而与雷帕霉素组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 Beclin - 1 蛋白表达量下降了 58.06% ( $0.13 \pm 0.01$  vs  $0.31 \pm 0.02, P < 0.05$ )。miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的 Beclin - 1 蛋白表达水平。见图2。

2.4.2 LC3II 蛋白表达的测定结果 雷帕霉素组的 LC3II 蛋白表达量比空白对照组上调了 1 633.33% ( $0.52 \pm 0.01$  vs  $0.03 \pm 0.01, P < 0.05$ ),雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 LC3II 蛋白表达量较空白对照组上调了 600.00% ( $0.21 \pm 0.02$  vs  $0.03 \pm 0.01, P < 0.05$ )。与雷帕霉素组比较,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 LC3II 蛋白表达量下调了 59.62% ( $0.21 \pm 0.02$  vs  $0.52 \pm 0.01, P < 0.05$ )。miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的 LC3II 蛋白表达水平。见图3。

2.5 各组 HUVECs Beclin - 1 和 LC3II 的 mRNA 表达情况

2.5.1 HUVECs Beclin - 1 表达结果 RT - PCR 结果显示,与空白对照组比较,雷帕霉素组的 Beclin - 1 mRNA 表达量升高了 708.33% ( $0.97 \pm 0.01$  vs

$0.12 \pm 0.02, P < 0.05$ ),雷帕霉素 + miR - 24 高表达组上升了 200.00% ( $0.36 \pm 0.01$  vs  $0.12 \pm 0.02, P < 0.05$ )。而与雷帕霉素组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 Beclin - 1 mRNA 表达量下降了 62.88% ( $0.36 \pm 0.01$  vs  $0.97 \pm 0.01, P < 0.05$ )。表明 miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的 Beclin - 1 mRNA 表达水平。见图4。



\*与空白对照组比较  $P < 0.05$

图2 Western blot 检测各组 Beclin - 1 蛋白表达的情况

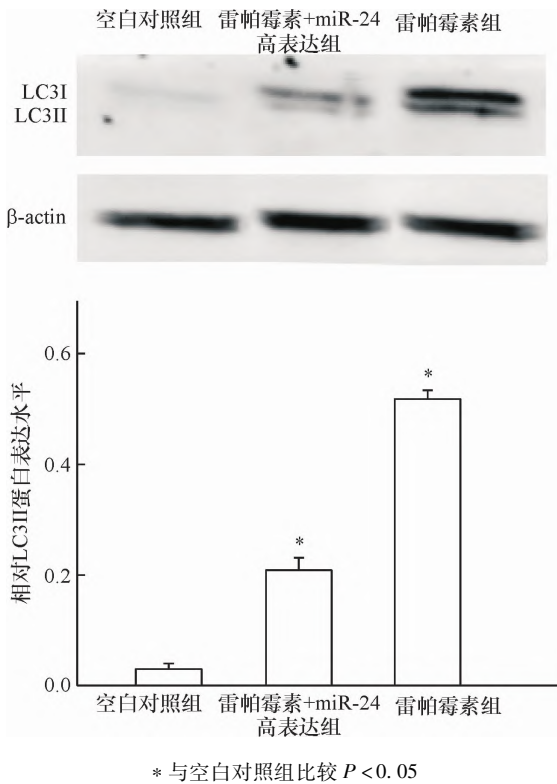


图3 Western blot 检测各组 LC3II 蛋白表达的情况

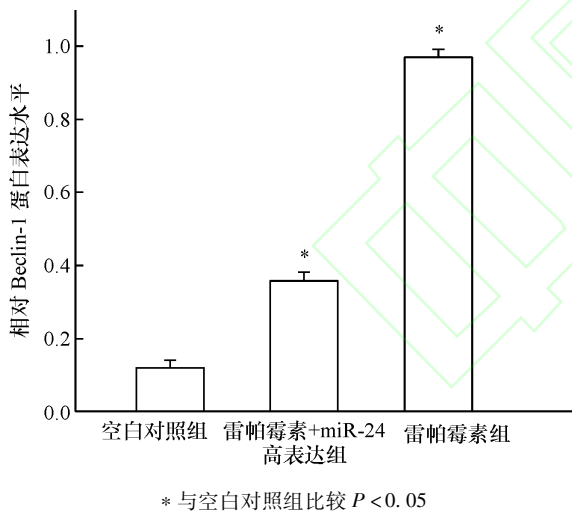


图4 RT-PCR 结果显示各组 Beclin-1 mRNA 水平

2.5.2 LC3II mRNA 表达结果 与空白对照组相比,雷帕霉素组的 LC3II mRNA 表达量增加了 790.00% ( $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.10 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),雷帕霉素 + miR - 24 高表达组也增加了 220.00% ( $0.32 \pm 0.02$  vs  $0.10 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。而与雷帕霉素组相比,雷帕霉素 + miR - 24 高表达组的 LC3II mRNA 表达量下降了 64.04% ( $0.32 \pm 0.02$  vs  $0.89 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。miR - 24 能明显抑制雷帕霉素刺激下的 HUVECs 的 LC3II mRNA 表达水平。见图 5。

### 3 讨论

本研究发现,miR - 24 可在转录后水平抑制 LC3II

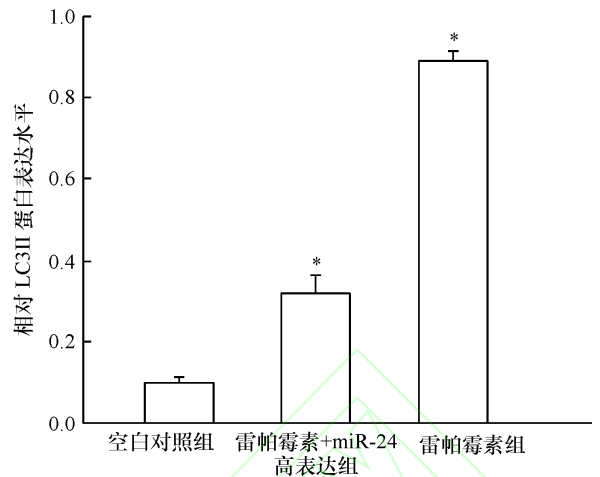


图5 RT-PCR 结果显示各组 LC3II mRNA 水平

和 Beclin - 1 蛋白的表达,下调细胞的自噬水平。我们进一步研究发现,miR - 24 在抑制 LC3II 和 Beclin - 1 表达的同时,也抑制 HUVECs 的管腔形成。另外,我们又一次验证了 miR - 24 能明显抑制 HUVECs 的增殖和迁移能力,而 HUVECs 管腔形成能力又与 HUVECs 增殖、迁移程度密切相关,因此我们推测,miR - 24 抑制 HUVECs 管腔形成的机制很可能与其抑制 LC3II 和 Beclin - 1 的表达有关。

血管新生是指在原有的血管结构上形成新血管的生物学过程,该过程在机体的多种生理病理过程中(如恶性肿瘤、动脉粥样硬化等多种心血管疾病)起着重要作用。血管新生虽然是一个受多种分子和信号通路调控的复杂过程,但其中关键的环节是内皮细胞功能发生了变化,内皮细胞的增殖、迁移与血管新生密切相关,因此一些能调节内皮功能的小分子 RNAs 越来越受到重视。近年来众多研究表明,一些 miRNAs 与血管内皮细胞功能密切相关。Dicer 是 miRNAs 形成的关键酶,Yang 等<sup>[13]</sup>通过敲除小鼠 Dicer 基因使血管发生异常,证明了 miRNAs 在血管新生中的作用。敲除 Dicer 会使整体 miRNAs 生成受到抑制,不利于研究某一 miRNA 在血管新生中的作用。因此如果要研究某种特定 miRNA 的作用只有通过上调或者下调其表达。miRNAs - 126 在血管内皮细胞中特异性表达,在血管发育中起着重要作用,通过上调 miRNAs - 126 的表达可以促进血管新生、维持血管完整性<sup>[14-15]</sup>。miRNA - 24 在血管组织中表达最高<sup>[16]</sup>,在高血压患者血浆中 miR - 24 表达明显上调,而且上调程度与高血压严重程度呈正相关。

自噬在维持细胞内环境和组织稳态过程中发挥

着重要作用,适度的自噬有修复细胞功能并对细胞有保护作用<sup>[17]</sup>,血管内皮细胞是血管的主要成分,因此其自噬程度的改变会对血管功能产生影响,并且与一些心血管疾病的生理病理进程密切相关。Gurusamy等<sup>[18]</sup>通过研究发现,给予缺氧再灌注的大鼠心肌注射低剂量的白藜芦醇后,大鼠心肌细胞自噬体含量增加,心肌细胞诱发保护性自噬从而减少了凋亡。莱菔硫烷(sulforaphane)是一种对肿瘤血管内皮细胞具有强促凋亡作用的异硫氰酸盐。研究发现,莱菔硫烷可诱发 HUVECs 产生自噬,进而促进血管新生,而在抑制自噬后,莱菔硫烷却表现出了相反效应,提示自噬对细胞具有保护,可缓解莱菔硫烷诱导的细胞凋亡<sup>[19]</sup>。但另有研究报道,促胃液素释放肽可以抑制血管内皮细胞自噬,促进内皮细胞增殖,进而促进血管新生<sup>[20]</sup>。所以关于自噬对血管新生的影响还有待进一步研究。本研究中的 RT-PCR 和 Western blot 结果显示, HUVECs 经雷帕霉素干预后 LC3II 和 Beclin-1 的 mRNA 和蛋白表达量明显增多,而转染了 miR-24 高表达质粒后, HUVECs 中 LC3II 和 Beclin-1 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低。提示 miR-24 在转录后水平显著降低了 LC3II 和 Beclin-1 的表达。此外,MTT 法、划痕实验及 Matrigel 实验结果显示,miR-24 对 HUVECs 的增殖、迁移及管腔形成能力有明显的抑制作用。

综上所述,我们推测 miR-24 很可能是通过抑制自噬的相关基因 LC3II 和 Beclin-1 的表达,使得 HUVECs 的自噬水平下调,进而影响 HUVECs 的增殖、迁移和管腔形成能力。但是血管新生是一个复杂的过程,涉及多种机制共同调控,所以该调控机制是否对血管生成具有调控作用,仍需进一步研究。

#### 参考文献

[1] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. Nature, 2011, 473(7347): 298-307.

[2] Ribatti D. Novel angiogenesis inhibitors: addressing the issue of redundancy in the angiogenic signaling pathway[J]. Cancer Treat Rev, 2011, 37(5): 344-352.

[3] Liu D, Krueger J, Le Noble F. The role of blood flow and microRNAs in blood vessel development[J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(4-5): 419-429.

[4] van Solingen C, de Boer HC, Bijkerk R, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+) /Lin(-) progenitor cells in ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 449-455.

[5] Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis

[J]. Vascul Pharmacol, 2011, 55(4): 79-86.

[6] Anand S, Cheresch DA. MicroRNA-mediated regulation of the angiogenic Switch[J]. Curr Opin Hematol, 2011, 18(3): 171-176.

[7] Zhou Q, Anderson C, Zhang H, et al. Repression of choroidal neovascularization through actin cytoskeleton pathways by microRNA-24[J]. Mol Ther, 2014, 22(2): 378-389.

[8] Lorenzen JM, Kaucsar T, Schauerte C, et al. MicroRNA-24 Antagonism Prevents Renal Ischemia Reperfusion Injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(12): 2717-2729.

[9] Sachdev U, Cui X, Hong G, et al. High mobility group box 1 promotes endothelial cell angiogenic behavior in vitro and improves muscle perfusion in vivo in response to ischemic injury[J]. J Vasc Surg, 2012, 55(1): 180-191.

[10] Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction[J]. Circulation, 2011, 124(6): 720-730.

[11] 杨鹏, 罗雪兰, 莫国君, 等. miR-24 对人脐静脉内皮细胞增殖、转移及自噬的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(13): 24-27.

[12] Urbanek T, Kuczmik W, Basta-Kaim A, et al. Rapamycin induces protective autophagy in vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. Brain Research, 2014, 1553(6): 1-11.

[13] Yang WJ, Yang DD, Na S, et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development[J]. J Biol Chem, 2005, 280(10): 9330-9335.

[14] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126\*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells[J]. J Mol Med, 2008, 86(3): 313-322.

[15] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261-271.

[16] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(20): 8287-8292.

[17] Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(6): 439-448.

[18] Gurusamy N, Lekli IJ, Mukherjee SJ, et al. CardioProtection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(1): 103-112.

[19] Nishikawa T, Tsuno NH, Okaji Y, et al. The inhibition of autophagy potentiates anti-angiogenic effects of sulforaphane by inducing apoptosis[J]. Angiogenesis, 2010, 13(3): 227-238.

[20] Kim KW, Paul P, Qiao J, et al. Autophagy mediates paracrine regulation of vascular endothelial cells[J]. Lab Invest, 2013, 93(6): 639-645.