

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.016.html>

## miR-200a 通过调控 HIF-1 $\alpha$ 与 VEGF 通路调节 鼻息肉上皮细胞增殖及凋亡作用研究

雍 军 哈再古丽·贾汉 李林格 张 华 冯 娟 赵 琦 尼力帕尔·阿力木

**摘要** 目的 探讨 miR-200a 通过调控低氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 与血管内皮生长因子(VEGF) 通路调节鼻息肉上皮细胞的增殖及凋亡作用。方法 鼻息肉上皮 CNE 细胞分别转染 miR-200a 模拟物及对照模拟物,采用 qRT-PCR 法检测 miR-200a 表达水平,采用 MTT 法与 Tunel 试验测定细胞增殖及凋亡作用,采用 Western blot 法测定 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 表达水平。结果 qRT-PCR 检测显示经过转染,在 miR-200a 表达水平上,实验组较对照组、空白组升高约 37.82 倍。转染 48 h 后,实验组的活细胞显著低于对照组与空白组;细胞凋亡率方面,实验组和对照组以及空白组对比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );转染 48 h 后,经过 Western blot 检测得出,在 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达水平方面,实验组比对照组、空白组明显降低( $P < 0.05$ )。结论 miR-200a 可通过激活 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 通路,限制鼻息肉上皮细胞的增殖能力,提

升凋亡能力,进而影响鼻息肉细胞生物行为。

**关键词** miR-200a; 低氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子; 鼻息肉; 细胞增殖

中图分类号 R 765

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0740-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.016

鼻息肉(nasal polyps, NP)是在鼻腔中形成的一种良性肿物,尽管不是致命性疾病,可是发病率极高,表现出的症状为头痛、鼻塞等,能够对患者的生活与工作造成严重困扰<sup>[1-2]</sup>。这几年,研究<sup>[3]</sup>显示,鼻息肉是不同细胞因子共同参与、具有延续性的炎症反应产物,通过在患者鼻腔内使用糖皮质激素,能够减少分泌的炎性细胞因子;其中鼻息肉上皮细胞不断增殖,对组织损伤进行修复,确保上皮细胞保持完整的屏障结构,并且让鼻息肉组织的环境保持稳态<sup>[4-5]</sup>。微小 RNA(microRNA, miR) 作为一类新型基因调控分子,与鼻息肉的发生发展密切相关。微小 RNA(miR)-200 家族包括 5 个成员,即 miR-141、

2019-01-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81460094); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号: 2015211C076)

作者单位: 新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 乌鲁木齐 830054

作者简介: 雍 军,男,硕士,主任医师,责任作者, E-mail: yongjun6501@163.com

female BALB/c mice were randomly divided into blank control group, model group, dexamethasone group(2 mg/kg), low dose schisandrin B group(20 mg/kg) and high dose group(40 mg/kg), with 12 rats in each group. Except for the blank control group, mice in each group were intraperitoneal and hypodermic injected with 0.1 ml sensitizing fluid( includes ovalbumin OVA 0.1 ml, Al(OH)<sub>3</sub> 0.02 mg) on day 1 and day 8. On day 15-28, the mice were given nebulization with 5% OVA for 20 minutes each time to duplicate the asthma model in mice. With dexamethasone as the positive control, while Sch B was used 30 minutes early before the nebulization, the blank control group was given equal volume of normal saline, then observe the amount of eosinophil(EOS) in mice blood, the activity of superoxide dismutase(SOD) and the level of malondialdehyde(MDA) in serum, ELISA assay was employed to detect the expression of inflammatory cytokines(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in serum and lung tissues at the same time, HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissues, Western blot was used to examine the expression of HMGB1, TLR4 and NF- $\kappa$ B expression in mice lung tissues. **Results** This experiment showed that schisandrin B could reduce the eosinophil count(EOS) in blood, reserve the activity of superoxide dismutase(SOD) in serum, reduce the level of malondialdehyde(MDA), improve the expression of inflammatory cytokines(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in serum and lung tissue. Moreover, the result of HE staining showed that schisandrin B effectively improved the pathological damage of lung tissues, and its mechanism may be related to regulating HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signal pathway. **Conclusion** Schisandrin B can effectively reduce lung inflammation level and improve lung pathological damage in asthmatic mice.

**Key words** Schisandrin B; asthma; lung inflammation

miR-200a、miR-200b、miR-200c 以及 miR-429, 其中, miR-200a 在 1 号染色体, 当 miR-200a 过度表达会让恶性肿瘤细胞得到侵袭能力, 然而 miR-200a 在鼻息肉中的功能和作用机制不是很确定<sup>[6-8]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是在牛垂体形状细胞体外细胞培养分离并纯化的糖蛋白, 能够增强内皮细胞具有的分裂增生能力, 还可以提升毛细血管通透性<sup>[9]</sup>。低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 是哺乳动物和人体内的核转录因子, HIF-1 $\alpha$  在肿瘤细胞中可获得大量表达, 可以激活 PI3K/AKT/FRAP 途径, 从而调整细胞增殖与凋亡<sup>[10]</sup>。该研究采取多种分子生物学方法, 探讨了 miR-200a 通过调控 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 通路调节鼻息肉上皮细胞的增殖及凋亡作用, 从而揭示 miR-200a 在鼻息肉中的分子作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 通过伦理审核, 取人体鼻息肉上皮 CNE 细胞经伦理审核备案, 鼻息肉上皮 CNE 细胞来源于新疆医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科鼻息肉手术患者, 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱; miR-200a 模拟物和对照模拟物购自美国 Ambion 公司; ECL 系统购自美国 Syngene 公司; 兔抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 脂质体转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; MTT 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司。

**1.2 细胞增殖实验** CNE 细胞分为 3 组, 实验组与对照组选用脂质体转染试剂将 CNE 细胞瞬间转染 miR-200a 模拟物、对照模拟物, 空白组不转染任何试剂, 采用 PCR 检测仪验证其转染的效率。把已转染的细胞株分别接种在密度为 5 000 个/孔的真空培养板, 经过 48 h 培养, 使用 MTT 试剂盒对细胞的增殖性进行测定, 每个实验均重复接种至 3 个孔。

**1.3 细胞凋亡实验** 使用 TUNEL 试验进行细胞凋亡检测, 这是原位细胞凋亡检测技术, 可以利用 DAB 显色来表达凋亡细胞, 并结合光学显微镜来检测凋亡细胞。CNE 细胞经过 96 孔 48 h 培养, 吸取培养液, 以 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀取出, 添加 PBS 重悬, 再离心后提取, 加入 300  $\mu$ l 凋亡检测缓冲液, 以单个象限的细胞数对细胞凋亡率进行测算, 每个实验均重复接种至 3 个孔。

**1.4 Western blot 实验** 在 miR-200a 转染 48 h

后, 提取细胞总蛋白, 以 BCA 法检测蛋白浓度, 接着分离蛋白, 将其转移到 PVDF 膜, 封闭并添加一抗  $\beta$ -actin、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF, 4 °C 过夜。通过 TBST 对膜进行 30 min 清洗, 添加二抗在室温下孵育 1 h, 再次用 TBST 洗膜 30 min, 添加 ECL 发光剂, 最后使用电脑对发光进行扫描。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 19.00 软件进行分析, 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间对比采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组转染效果、细胞增殖和细胞凋亡情况比较

qRT-PCR 检测结果显示, miR-200a 转染后, 实验组与对照组及空白组比较, miR-200a 的表达水平升高 37.82 倍, 表明 miRNAs mimics 转染成功; 转染 48 h, 实验组的活细胞比例显著低于对照组与空白组, 细胞凋亡率显著高于对照组与空白组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 表达对比** 转染 48 h 后 Western blot 检测显示, 实验组的 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 表达水平均显著高于对照组与空白组 ( $P < 0.05$ )。见图 1、2 和表 2。

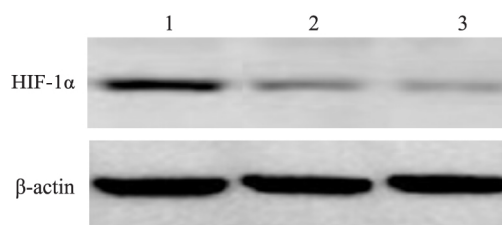


图1 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达情况对比

1: 实验组; 2: 对照组; 3: 空白组

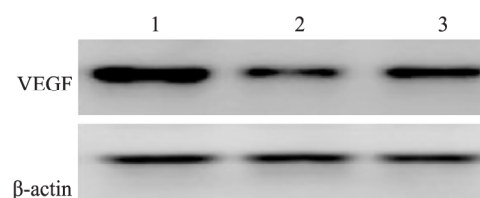


图2 VEGF 蛋白的表达情况对比

1: 实验组; 2: 对照组; 3: 空白组

## 3 讨论

在临床上, 鼻息肉是发病率极高的炎性疾病, 属于非瘤样肿物, 一般是从筛骨脱落进入鼻腔, 进而阻塞鼻腔, 以及副鼻窦出现引流障碍<sup>[11]</sup>。其病理特征

表1 3组转染效果、细胞增殖和细胞凋亡情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

指标	空白组	对照组	实验组	F 值	P 值
$\Delta Ct$	16.44 ± 0.01	16.53 ± 0.02	11.45 ± 0.06* #	185.541	<0.001
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1.00	1.09	37.82		
活细胞比例(%)	75.22 ± 3.19	98.29 ± 2.11*	100.00 ± 0.00*	117.843	<0.001
细胞凋亡率(%)	0.52 ± 0.11	4.29 ± 1.44*	17.20 ± 2.49* #	83.111	<0.001

与空白组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与对照组比较: #  $P < 0.05$

表2 3组 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 蛋白相对表达量对比( $\bar{x} \pm s$ )

指标	空白组	对照组	实验组	F 值	P 值
HIF-1 $\alpha$	0.43 ± 0.10	0.48 ± 0.11* #	1.76 ± 0.22* #	9.822	<0.001
VEGF	0.89 ± 0.21	0.93 ± 0.18* #	5.79 ± 0.22* #	10.883	<0.001

与空白组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与对照组比较: #  $P < 0.05$

是水肿基质中出现大量炎性细胞浸润,绝大多数鼻息肉主要为嗜酸性粒细胞,当前发病机制尚不确定,学术界普遍认同多因素发病这一观点<sup>[12]</sup>。研究者总结出鼻息肉的主要形成过程:受各因素影响,鼻黏膜上皮发生断裂,使得纤维组织脱离;脱离的纤维组织出现表面皮化,进而形成小息肉;随后小息肉形成了中腺体;息肉进一步增生以及增长,最后完全形成息肉。在鼻息肉形成及发展方面,上皮细胞发挥关键作用,通过持续增殖,从而修复组织损伤,使上皮细胞的屏障结构保持完整,并且让鼻息肉组织的环境保持稳态。而且,上皮细胞效应进一步发展,还会导致上皮细胞对调节功能具有免疫作用,这种免疫作用跟炎症的刺激时间存在一定关联<sup>[13]</sup>。

microRNA 是内源基因编码的非编码小分子 RNA,长度约 22 个核苷酸,通过跟靶 mRNA 的 3'-UTR、编码区部分配对或完全配对,对蛋白质翻译进行抑制,或使 mRNA 降解,经过转录,负向调控的靶基因表达。现代研究<sup>[14]</sup>表明 miRNA 与疾病发生和发展关系密切,特异的 miRNA 表达谱可作为疾病预防和诊断的标志物。miR-200 家族在上皮细胞的形成过程中发挥重要作用,miR-200 家族成员可以抑制上皮细胞形成过程,可抑制 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达。本研究显示,在转染 48 h 后,实验组的活细胞显著低于对照组与空白组;细胞凋亡率方面,实验组和对照组以及空白组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。这说明 miR-200a 的表达水平与鼻息肉细胞增殖能力呈负相关性,与凋亡能力呈正相关性,表明 miR-200a 可能参与鼻息肉细胞的调控。

在鼻息肉组织当中,上皮基底细胞存在多向分化的潜能,属于多能干细胞。Fas-L 在鼻息肉上皮基底细胞中表现为过度表达,而鼻息肉组织当中,淋巴细胞主要为 T 细胞<sup>[15]</sup>。HIF-1 由  $\alpha$  亚单位和  $\beta$  亚

单位组成, $\alpha$  亚单位受氧调控,具有特异性,对 HIF-1 活性有着决定性作用。当癌基因激活时或抑癌基因失活时,肿瘤细胞中的 HIF-1 $\alpha$  活性就会升高。并且 PI3K/AKT 可因 PTEN 的负调控作用丧失而呈现高活化状态,从而诱导 HIF-1 表达上调<sup>[16]</sup>。VEGF 是一种同型二聚体糖蛋白,广泛分布于人的脑、眼、血浆、腹腔、肾、脾、肝、肺等组织中,对维持血管的正常形态和功能有积极作用。VEGF 与受体结合能够对内皮细胞的生长及增殖起到诱导作用,有利于内皮细胞的迁移,促使新生血管产生<sup>[17]</sup>。本研究中,转染 48 h 后,Western blot 检测显示,实验组 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达水平比对照组和空白组明显降低( $P < 0.05$ )。表明 miR-200a 有可能在 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号转导通路中发挥作用,进而对鼻息肉的凋亡和增殖产生影响。下一步需通过验证 miR-200a 下游靶基因,继续阐明 miR-200a 参与鼻息肉细胞增殖与凋亡的分子机制,为开发新的治疗手段和方法提供理论基础和实验依据。

综上所述,miR-200a 可通过激活 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 通路,对鼻息肉上皮细胞的增殖能力加以限制,使凋亡能力得到提升,进而影响鼻息肉细胞生物行为。

### 参考文献

- [1] Tsai H C, Tzeng H E, Huang C Y, et al. WISP-1 positively regulates angiogenesis by controlling VEGF-A expression in human osteosarcoma[J]. Cell Death Dis 2017 8(4): e2750.
- [2] Li Y, Su J, Li F, et al. miR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1 $\alpha$  and VEGFA: Implications for psoriasis treatment[J]. PLoS One 2017, 12(4): e0175459.
- [3] 陈建文,孙敬武,汪银凤. 变应性因素与慢性鼻窦炎及鼻息肉的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(1): 122

- 4.
- [4] Li Y , Cai B , Shen L , et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3 [J]. *Cancer Lett* 2017 ,29( 397) : 111 - 9.
- [5] Zhang J , Ma J , Long K , et al. Overexpression of exosomal cardio-protective miRNAs mitigates hypoxia-induced H9c2 cells apoptosis [J]. *Int J Mol Sci* 2017 ,18( 4) : E711.
- [6] Wu W , Hu Q , Nie E , et al. Hypoxia induces H19 expression through direct and indirect HIF-1 $\alpha$  activity ,promoting oncogenic effects in glioblastoma [J]. *Sci Rep* 2017 ,22( 7) :45029.
- [7] Yang W , Ma J , Zhou W , et al. Biological implications and clinical value of miR-210 in gastrointestinal cancer [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017 ,27( 2) : 1 - 10.
- [8] Lin Y , Shen J , Li D , et al. miR-34a contributes to diabetes-related cochlear hair cell apoptosis *via* SIRT1/HIF-1 $\alpha$  signaling [J]. *Gen Comp Endocrinol* 2017 ,2( 246) : 63 - 70.
- [9] Liu W , Chen H , Wong N , et al. Pseudohypoxia induced by miR-126 deactivation promotes migration and therapeutic resistance in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett* 2017 ,28( 394) : 65 - 75.
- [10] Costales M G , Haga C L , Velagapudi S P , et al. Small molecule inhibition of microRNA-210 reprograms an oncogenic hypoxic circuit [J]. *J Am Chem Soc* 2017 ,139( 9) : 3446 - 55.
- [11] Szebeni G J , Vizler C , Kitajka K , et al. Inflammation and cancer: extra-and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters [J]. *Mediators Inflamm* ,2017 ,2017: 9294018.
- [12] Shi J , Dong B , Cao J , et al. Long non-coding RNA in glioma: signaling pathways [J]. *Oncotarget* 2017 ,2( 7) : 113 - 9.
- [13] He C , Wang L , Zhang J , et al. Hypoxia-inducible microRNA-224 promotes the cell growth , migration and invasion by directly targeting RASSF8 in gastric cancer [J]. *Mol Cancer* 2017 ,16( 1) : 35.
- [14] Yan L , Gao H , Li C , et al. Effect of miR-23a on anoxia-induced phenotypic transformation of smooth muscle cells of rat pulmonary arteries and regulatory mechanism [J]. *Oncol Lett* ,2017 ,13( 1) : 89 - 98.
- [15] Huang T , Liu H W , Chen J Q , et al. The long noncoding RNA PVT1 functions as a competing endogenous RNA by sponging miR-186 in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother* 2017 ,4( 88) : 302 - 8.
- [16] Spinetti G , Sangalli E , Specchia C , et al. The expression of the BPIFB4 and CXCR4 associates with sustained health in long-living individuals from Cilento-Italy [J]. *Aging ( Albany NY)* ,2017 ,9( 2) : 370 - 80.
- [17] Conde E , Giménez-Moyano S , Martín-Gómez L , et al. HIF-1 $\alpha$  induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p [J]. *Sci Rep* ,2017 ,20( 7) : 41099.

## MiR-200a regulates the proliferation and apoptosis of nasal epithelial cells by regulating HIF-1 $\alpha$ and VEGF pathway

Yong Jun , Hazaiguli • Jiahan , Li Linge , et al

( Dept of Otorhinolaryngology , The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University , Urumchi 830054)

**Abstract Objective** To investigate the effects of miR-200a regulates the proliferation and apoptosis of nasal epithelial cells by regulating hypoxia inducible factor -1 $\alpha$ ( HIF - 1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor ( VEGF) pathway. **Methods** Nasal polyps epithelial CNE cells were transfected miR-200a mimic and control , qRT-PCR method was used to detect the expression level of miR-200a , MTT method and Tunel test were used to detect the cell proliferation and apoptosis , the level of HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression were determined by Western blot. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression level of miR-200a in the experimental group were higher than that in the blank group and the negative control group. After transfection of 48 h , the proportion of live cells in the experimental group were lower than the negative control group and blank group , there was statistically significant difference compared among the groups (  $P < 0.05$  ) . Western blot assay showed that transfection after 48 h , the expression level of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in the experimental group were significantly lower than the negative control group and blank control group (  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** miR-200a can inhibit the proliferation of nasal polyps epithelial cells by increasing HIF-1 and VEGF pathway , and improve the ability of apoptosis.

**Key words** miR-200a; HIF-1; VEGF; nasal polyps; cell proliferation