

## miR-372 调控血管生成因子 AGGF1 的表达并抑制血管生成

戴 运,周必胜\*

(南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究 miR-372(miR-372)对新血管生成因子 AGGF1 基因的表达调控。方法:通过生物信息学预测找到可能靶向调控 AGGF1 基因的候选 miRNA;通过荧光素酶报告基因实验、荧光定量聚合酶链反应(qPCR)和 Western blot 检测等实验证实 miR-372 对 AGGF1 基因表达的靶向调控;通过体外血管内皮细胞成管实验检测 miR-372 对血管生成的影响。结果:生物信息学预测显示 miR-372 靶向 AGGF1; 荧光素酶报告基因实验证实 miR-372 可通过结合 AGGF1 基因 3'-非翻译区(3'-untranslational region, 3'-UTR) 而抑制其表达;qPCR 和 Western blot 实验分别表明 miR-372 在 mRNA 水平和蛋白水平下调 AGGF1 表达;体外血管生成实验表明 miR-372 所介导的 AGGF1 表达下调可明显抑制血管生成。结论:miR-372 可通过靶向结合 AGGF1 基因的 3'-UTR 下调其表达,并抑制内皮细胞血管生成能力。

**[关键词]** 血管生成;miR-372;AGGF1;基因表达调控

**[中图分类号]** R394

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)07-933-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150707

## miR-372 regulates angiogenic gene AGGF1 expression and inhibits angiogenesis

Dai Yun, Zhou Bisheng\*

(Department of Developmental Genetics, School of Basic Medical Sciences of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To explore the regulation of angiogenic gene AGGF1 expression by miR-372. **Methods:** Bioinformatic prediction was performed to find the candidate microRNAs that may target AGGF1. Luciferase assays using AGGF1 3'-untranslational region (3'-UTR) reporters were performed to verify the binding of miR-372 to the AGGF1 3'-UTR; Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western Blot assays were performed to measure the endogenous AGGF1 expression in 293T cells and HUVEC cells at mRNA and protein levels affected by overexpression of miR-372. *In vitro* angiogenesis assay was performed to verify the effects of miR-372 mediated downregulation of AGGF1 on angiogenesis. **Results:** Bioinformatic assays indicated that miR-372 targeted AGGF1. Luciferase assays confirmed that miR-372 downregulated AGGF1 expression directly through the miR-372 binding sites on 3'-UTR of AGGF1. qPCR and Western Blot assays revealed overexpression of miR-372 by mimic reduced AGGF1 expression at both mRNA and protein levels. *In vitro* matrigel based angiogenesis assay showed that overexpression of miR-372 reduced angiogenesis by downregulation of AGGF1. **Conclusion:** miR-372 downregulates AGGF1 expression and reduces angiogenesis.

**[Key words]** angiogenesis; microRNA-372; AGGF1; regulation of gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):933-937]

血管生成因子对于血管形成、发育及维护都起着关键作用。有 70 多种人类疾病与血管生成异常

紧密相关,血管缺陷或异常可以引起冠心病、外周动脉疾病、脑缺血、脑卒中等重大疾病,而血管生成过量与肿瘤发生发展、老年性黄斑变性等有密切关系。在临床上,针对血管生成的治疗手段已成为一类崭新的疗法,如对于缺血性疾病可采用促血管生成疗法,对于肿瘤等血管生成过量疾病可采取抗血管生成疗法<sup>[1-2]</sup>。血管生成因子的表达调控紊乱是血管生成异常的分子基础,因此研究血管生成因子的表达调控有着重要意义。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81402550);江苏省自然科学基金(BK20140906);江苏省高校自然科学基金(14KJB310007);南京医科大学科技发展基金(2013NJ-MU015);江苏高校优势学科建设工程资助项目(13JC009);江苏省大学生创新训练计划项目(201410312042Y)

\*通信作者 (Corresponding author),E-mail:zhoubisheng@njmu.edu.cn

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为19~25个核苷酸的内源性非编码RNA,在基因表达调控中起到重要作用,已有研究表明,miRNA几乎参与所有生命活动过程,包括胚胎发育、免疫调节、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡等<sup>[3-9]</sup>。

本研究通过生物信息学分析、荧光素酶报告基因活性实验、荧光定量聚合酶链反应(qPCR)及Western blot实验发现,miR-372可靶向调控新血管生成因子AGGF1的表达,同时,通过体外血管生成实验也表明,miR-372所介导的AGGF1表达下调可显著削弱血管生成能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

293T细胞株和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自武汉中国典型培养物保藏中心。胎牛血清及DMEM培养基购自美国Gibco公司。成熟miR-372序列模拟物(miR-372 mimic)及阴性对照物(miR-NC mimic)在广州锐博生物科技公司订购。AGGF1及 $\beta$ -actin抗体订购于武汉三鹰生物工程公司。基质胶(matrigel)购自美国BD公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及基因转染

细胞在37℃含10% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,用DMEM培养基加10%体积的胎牛血清培养;质粒及miRNA mimic使用Lipofectamine 2000试剂(Gibco公司,美国)转染。

#### 1.2.2 生物信息学分析

使用在线预测工具miRWalk([www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/](http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/)),集合了miRanda、miRDB、miRwalk、RNA22和Targetsan等miRNA靶标预测软件)对可靶向结合AGGF1基因3'-UTR的miRNA进行预测。

#### 1.2.3 质粒构建

野生型AGGF1 3'-UTR报告基因质粒pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR的构建:以人的基因组DNA为模板扩增出AGGF1基因(Gene ID:55109)的3'-UTR片段,酶切后经琼脂糖凝胶电泳分离并纯化回收后插入pMIR-REPORT(Applied Biosystem公司,美国)载体,转化大肠杆菌感受态细胞,在含氨苄抗生素的LB固体培养基上培养筛选得到单克隆,提取质粒并测序验证,筛选得到正确的质粒并命名为pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR。突变型AGGF1 3'-UTR报

告基因质粒的构建:以pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR为模板,采用PCR定点诱变技术将miR-372的结合区域关键碱基改变,同上述过程一样,筛选得到正确克隆,命名为pMIR-AGGF1-mut-3'-UTR。

#### 1.2.4 荧光素酶报告基因活性分析实验

用高纯无内毒素质粒抽提试剂盒(Omega公司,美国)制备适合细胞转染的高纯度质粒,包括野生型或突变型AGGF1 3'-UTR报告基因质粒及作为内参(用于指示转染效率)的海肾荧光素酶(renilla luciferase)质粒pRL-TK(Cat.#. E2241, Promega公司,美国)等。所有制备好的质粒均用Nanodrop 2000微量紫外分光光度计(Thermo Scientific公司,美国)测定浓度。用于双荧光素酶报告基因活性分析实验的293T细胞和HUVEC细胞在转染的前1 d以 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板,置于细胞培养箱中培养24 h后进行转染。转染时,将3'-UTR报告质粒与内参质粒pRL-TK按照每孔200 ng:10 ng混合,与100 nmol/L的miR-372或miR-NC mimic共转染细胞,每组样品设置3个重复孔,转染步骤严格按照Lipofectamine 2000说明书进行。转染5 h后更换为DMEM完全培养基,置于细胞培养箱继续培养48 h后收取细胞样品。对所获得的细胞裂解液样品用Dual-Glo luciferase assay试剂盒(Promega公司,美国)在Glomax20/20化学发光检测仪测定荧光素酶活性。

#### 1.2.5 实时荧光定量PCR

使用基于SYBRGreen I的qPCR法检测基因表达。所用引物序列如下:AGGF1-F:5'-TGGTC-CAACACTAAGTAAGGAGG-3', AGGF1-R:5'-CCC-TACGTTTTCCAGCTCTATCT-3'; GAPDH-F:5'-GGA-GCGAGATCCCTCCAAAAT-3', GAPDH-R:5'-GGCT-GTTGTCATACTTCTCATGG-3'。qPCR反应使用FastStart Universal Green Master试剂盒(Roche公司,美国),按照说明书操作,并在ABI 7900 Genome Analyzer System仪器上按照标准程序运行。产物用热溶解曲线和凝胶电泳两种方式检测核准,基因表达水平计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.6 Western blot检测蛋白表达

细胞中AGGF1蛋白的表达量用Western blot进行检测。过程如下:6孔板中的细胞每孔加250  $\mu$ L细胞裂解液(Cat.#. P0013,南通碧云天生物)在4℃下裂解30 min后收样,离心后弃沉淀留上清,加5 $\times$  SDS-PAGE上样缓冲液煮样;制备12%的SDS-PAGE凝胶,按照每孔50  $\mu$ g的总蛋白量上样,在

Bio-Rad 蛋白电泳及转印装置上分离蛋白后将其转移到 PVDF 膜上;PVDF 膜经封闭液封闭后,在室温下与一抗工作液孵育 2 h;AGGF1 抗体按照 1:2 000 稀释, $\beta$ -actin 抗体按照 1:5 000 稀释;TBST 缓冲液清洗膜 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h,TBST 清洗,过程同上。采用 West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce 公司,美国)试剂盒显影,并用 Chemi-Doc XRS(Bio-Rad 公司,美国)装置捕捉检测信号,用 Quantity One 软件(Bio-Rad 公司,美国)分析图片。

### 1.2.7 体外血管生成实验

在 48 孔细胞培养板中,每孔加入 150  $\mu$ L matrigel 基质胶,置于细胞培养箱中在 37 $^{\circ}$ C 下凝固 30 min,使其平整地包被孔底部,按照每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的数量接种 HUVEC 细胞,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养。待细胞贴壁后进行相应实验处理(基因转染等)并继续培养 24 h 后在倒置显微镜下观察管状结构形成状况,拍照并统计管网形成数量,具体过程参照已发表文献<sup>[10]</sup>。

### 1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次,数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用 SPSS16.0 统计软件对实验结果进行 *t* 检验分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析揭示 miR-372 等可靶向调节 AGGF1

生物信息学分析表明,miR-372、miR-20b、miR-20a 和 miR-106b 等 4 种 miRNA 均被 5 种基于不同算法的 miRNA-target 分析软件(miRanda、miRDB、miRwalk、RNA22 和 Targetsan) 预测可结合 AGGF1 基因的 3'-UTR,它们是潜在的可靶向调控 AGGF1 表达的 miRNA(图 1)。因此,本研究首先选择 miR-372 进入下一步实验研究。

### 2.2 荧光素酶报告基因活性分析实验证实 miR-

StemLoop ID	miRanda	miRDE	miRWalk	RNA22	Targetscan	SUM
hsa-mir-372	1	1	1	1	1	5
hsa-mir-20b	1	1	1	1	1	5
hsa-mir-20a	1	1	1	1	1	5
hsa-mir-106b	1	1	1	1	1	5
hsa-mir-369	1	1	1	0	1	4
hsa-mir-568	1	1	1	0	1	4
hsa-mir-302e	1	1	1	0	1	4

图 1 生物信息学预测可靶向 AGGF1 基因的 microRNA

Figure 1 Identification of candidate microRNAs that may target to AGGF1

### 372 对 AGGF1 的靶向调控

为进一步验证 miR-372 是否靶向调节 AGGF1,本研究构建了 AGGF1 基因 3'-UTR 的萤火虫荧光素酶(Luc+)报告基因质粒 pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR 和突变型的 AGGF1 3'-UTR 报告基因质粒(不含 miR-372 结合位点)pMIR-AGGF1-mut-3'-UTR。AGGF1 的 3'-UTR 的报告基因质粒构建的示意图见图 2A。将 miR-372 mimic 或 miR-NC mimic 和 AGGF1 的 3'-UTR 报告基因质粒共转染 293T 细胞,培养 48 h 后收取细胞,用细胞蛋白裂解液进行双荧光素酶活性分析,结果显示,共转染 pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR 的 miR-372 组比 miR-NC 组荧光素酶活性下降约 5 倍多 ( $P < 0.001$ );而共转染 pMIR-AGGF1-mut-3'-UTR 的 miR-372 组与 miR-NC 组的荧光素酶活性无差别( $P=0.99$ ,图 2B)。在人脐静脉内皮细胞 HUVEC 中进行相同的实验,也发现 miR-372 显著抑制 pMIR-AGGF1-wt-3'-UTR 的荧光素酶活性(下降约 4 倍, $P < 0.001$ ),但对 pMIR-AGGF1-mut-3'-UTR 的荧光素酶活性无影响(图 2C)。上述 3'-UTR 报告基因双荧光素酶活性实验结果表明,miR-372 可通过直接结合 AGGF1 基因 3'-UTR 上的靶序列而抑制 AGGF1 基因的表达。

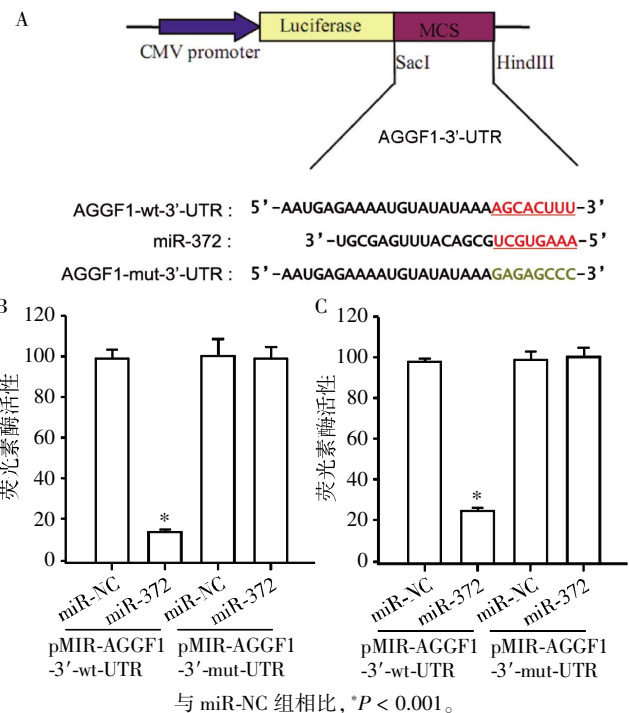


图 2 荧光素酶报告基因实验显示 miR-372 可通过结合 AGGF1 的 3'-UTR 而抑制其表达

Figure 2 Luciferase-based reporter gene assay revealed that miR-372 inhibits AGGF1 expression by directly binding to its 3'-untranslational region

### 2.3 miR-372对细胞内源AGGF1 mRNA和蛋白表达水平的影响

上述3'-UTR报告基因荧光素酶活性分析实验证实了miR-372靶向抑制AGGF1的表达。为进一步证实miR-372对AGGF1的调控,本研究检测了miR-372对293T细胞和HUVEC细胞中内源AGGF1表达水平的影响。首先,用qPCR检测了miR-372对AGGF1 mRNA水平的影响。在293T细胞中,通过转染miR-372 mimic过表达miR-372,相比对照组,如

图3A所示,AGGF1的mRNA水平下调4倍( $P < 0.001$ )。同样地,在HUVEC细胞中,过表达miR-372也显著抑制HUVEC中AGGF1的mRNA水平(约3倍, $P < 0.001$ ,图3B)。此结果说明,miR-372可在mRNA水平下调AGGF1的表达。接下来,本研究进一步用Western blot检测了miR-372在蛋白水平对AGGF1表达的影响,结果显示,无论在293T细胞中还是HUVEC细胞中,miR-372均可显著下调AGGF1蛋白水平(图3C)。

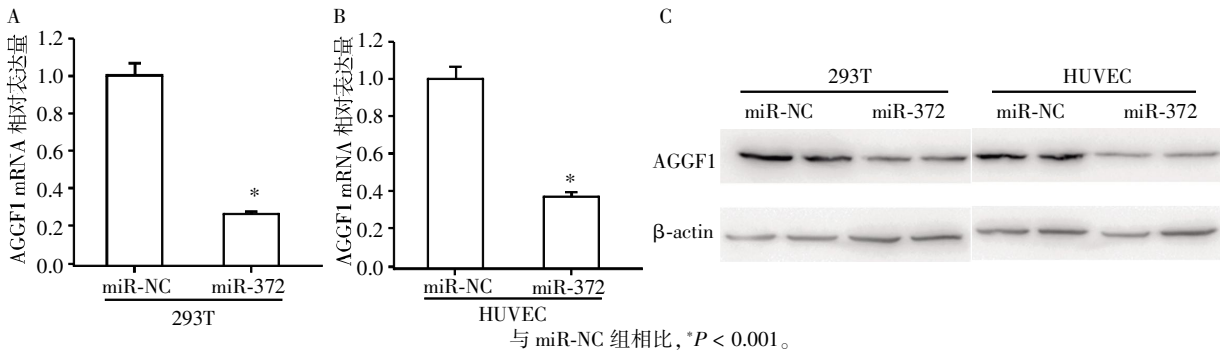


图3 过表达miR-372对细胞内源AGGF1 mRNA和蛋白水平的影响

Figure 3 Effects of overexpression of miR-372 on expression of endogenous AGGF1 at mRNA and protein levels

### 2.4 体外血管生成实验揭示miR-372介导的AGGF1的表达抑制对血管生成能力的影响

如图4所示,miR-372过表达组较对照组HUVEC形成管状结构数量显著减少,但若转染miR-372 mimic时同时额外添加体外表达纯化的重组AGGF1蛋白(rAGGF1),HUVEC形成的小管状结构数量与对照组无差别。这说明miR-372可抑制血管内皮细胞HUVEC的血管新生能力,而外源性AGGF1则不受影响,证明其机制便是通过靶向抑制细胞内AGGF1的表达。

要作用,血管生成异常会导致许多人类疾病,因而血管生成的稳态对于人类健康至关重要,而血管生成的稳态取决于各种促血管生成因子和抗血管生成因子的平衡。因此,对血管生成因子表达调控的研究有着重要意义。

AGGF1是美国克利夫兰医学中心王擎教授带领的科研团队于2004年在Nature杂志上报道的一个全新基因,该基因是在对先天性静脉畸形骨肥大综合征(Klippel-Trenaunay syndrome, KTS)的分子遗传学研究中发现的,是首个被克隆的KTS致病基因<sup>[11]</sup>。KTS是一种先天性血管疾病,其典型症状有毛细血管异常、静脉畸形、淋巴管增生和软骨组织肥大等,已证实AGGF1表达异常所导致的血管生成过度是

## 3 讨论

血管生成在维持人体正常生理功能中起到重

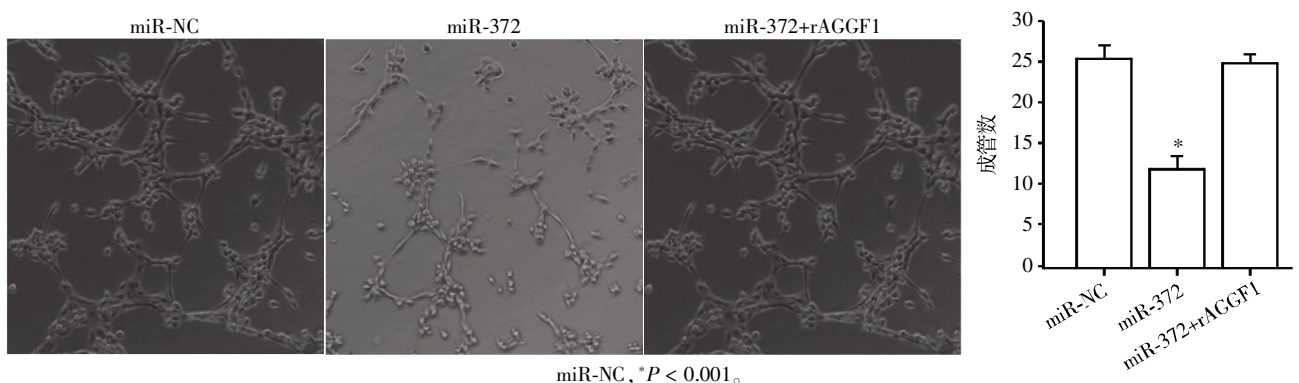


图4 miR-372对HUVEC成管能力的影响

Figure 4 Effects of overexpression of miR-372 on the angiogenic potential of HUVEC cells

KTS 发生的重要原因。AGGF1 最初发现在血管组织中高表达,鸡胚尿囊绒毛膜毛细血管生成实验显示,原核表达纯化的 AGGF1 蛋白可同血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)一样,展现出强烈的促血管新生能力<sup>[11]</sup>;利用模式生物斑马鱼进行体内血管生成分析,也发现过表达 AGGF1 促进斑马鱼血管发育与形成,敲低 AGGF1 表达导致斑马鱼血管发育缺陷<sup>[11-13]</sup>。因而,AGGF1 被鉴定为一个新的血管生成因子<sup>[14]</sup>,在血管生成治疗领域有着巨大的应用潜力,但 AGGF1 自身表达调控相关背景尚不清晰<sup>[15]</sup>。

miRNA 是一类长度约为 19~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA,在基因表达调控方面发挥着重要作用。本研究通过生物信息学分析预测到 miR-372 可靶向 AGGF1 基因,并进一步通过荧光素酶报告基因活性分析实验、qPCR 和 Western blot 等实验证实了 miR-372 可靶向抑制 AGGF1 基因的表达,同时通过体外血管生成实验表明 miR-372 介导的 AGGF1 基因表达下调可抑制血管生成。本研究首次发现 miR-372 可调控新血管生成因子 AGGF1 的表达,这一研究拓展了对 AGGF1 这一新血管生成因子的认识,丰富了对 AGGF1 自身表达调控的了解,为将来开发以 AGGF1 作为治疗靶点的促血管生成或抗血管生成疾病治疗手段奠定了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. *Nature*, 2000, 407(3): 249-257
- [2] Young RJ, Reed MW. Anti-angiogenic therapy: concept to clinic[J]. *Microcirculation*, 2012, 19(8): 115-125
- [3] Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(12): 239-250
- [4] Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease[J]. *Cell*, 2012, 148(4): 1172-1187
- [5] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(6): 827-887
- [6] Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases[J]. *FEBS J*, 2011, 278(4): 1619-1633
- [7] Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease[J]. *Physiol Genomics*, 2007, 31(9): 367-373
- [8] Bushati N, Cohen SM. MicroRNAs in neurodegeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(10): 292-296
- [9] Hebert SS, De Strooper B. Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration[J]. *Science*, 2007, 317(41): 1179-1180
- [10] Zhou B, Ma R, Si W, et al. MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth [J]. *Cancer Lett*, 2013, 333(13): 159-169
- [11] Tian XL, Kadaba R, You SA, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to Klippel-Trenaunay syndrome [J]. *Nature*, 2004, 427(12): 640-645
- [12] Chen D, Li L, Tu X, et al. Functional characterization of Klippel-Trenaunay syndrome gene AGGF1 identifies a novel angiogenic signaling pathway for specification of vein differentiation and angiogenesis during embryogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(5): 963-769
- [13] Li L, Chen D, Li J, et al. Aggf1 acts at the top of the genetic regulatory hierarchy in specification of heman-gioblasts in zebrafish[J]. *Blood*, 2014, 123(4): 501-508
- [14] Lu Q, Yao Y, Yao Y, et al. Angiogenic factor AGGF1 promotes therapeutic angiogenesis in a mouse limb ischemia model[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46998
- [15] Fan C, Ouyang P, Timur AA, et al. Novel roles of GATA1 in regulation of angiogenic factor AGGF1 and endothelial cell function[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 23331-23343

[收稿日期] 2015-03-06