

# 血瘀证相关的 microRNA-520b 对白介素-8 的影响及丹参酮 II<sub>A</sub> 的干预作用

熊婷婷, 周健华, 朱丹丹, 许清芸, 陈利国\*  
(暨南大学医学院, 广州 510619)

**[摘要]** 目的: 研究血瘀证相关的 microRNA-520b (miR-520b) 对白介素-8 (IL-8) 的影响及丹参酮 II<sub>A</sub> (Tan II<sub>A</sub>) 的干预作用。方法: 采用脂质体介导的转染方法将 microRNA-520b 模拟物 (50 nmol·L<sup>-1</sup>) 或抑制物 (100 nmol·L<sup>-1</sup>) 转染进入含 1.6 × 10<sup>4</sup> cells/well 人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) 的 6 孔板中 24, 36, 48 h, 采用 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> Tan II<sub>A</sub> 干预 24, 48 h。荧光显微镜观察转染情况, MTT 法检测细胞活性 (n = 5), 硝酸还原酶法、酶联免疫法 (ELISA) 测定培养液中一氧化氮 (NO), 内皮素 (ET), 蛋白 C 受体 (EPCR), 血管内假性血友病因子 (vWF) 和血栓调节蛋白 (TM) 含量 (n = 3)。半定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR), 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 检测细胞 IL-8 信使核糖核酸 (mRNA) 和蛋白表达水平 (n = 3)。结果: 与对照组比较, 模型组 (miR-520b 组) 细胞有荧光, 48 h 荧光最强。细胞活性降低 (P < 0.01) 且 48 h 最显著, NO 含量下降 (P < 0.01), EPCR, vWF, ET 含量升高 (P < 0.01), 转染 48 h 后 IL-8 mRNA 和蛋白质表达下调 (P < 0.01)。与模型 (miR-520b) 组比较, 给药组 (Tan II<sub>A</sub> 组) 细胞活性升高 (P < 0.01), Tan II<sub>A</sub> (10 mg·L<sup>-1</sup>, 48 h) 干预效果最佳; NO 含量升高 (P < 0.01); EPCR, vWF, TM, ET 含量降低 (P < 0.01), IL-8 mRNA 和蛋白质表达上调 (P < 0.01)。结论: miR-520b 调节 IL-8 在血瘀证中发挥作用, 可能为 Tan II<sub>A</sub> 作用靶点。

**[关键词]** microRNA-520b; 血瘀证; 白介素-8; 丹参酮 II<sub>A</sub>

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0113-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100113

**Effects of MicroRNA-520b Associated with Blood Stasis Syndrome on Interleukin-8 and Intervention of Tanshinone II<sub>A</sub>** XIONG Ting-ting, ZHOU Jian-hua, ZHU Dan-dan, XU Qing-yun, CHEN Li-guo\* (School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510619, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of microRNA-520b (miR-520b) associated with blood stasis syndrome on interleukin-8 (IL-8) and the intervention of tanshinone II<sub>A</sub> (Tan II<sub>A</sub>). **Method:** Synthetic miR-520b mimic (50 nmol·L<sup>-1</sup>) or inhibitor (100 nmol·L<sup>-1</sup>) were transfected into 1.6 × 10<sup>4</sup> cells/well human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) 24, 36, 48 h by lipofectamine™ 2000 and then, 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> Tan II<sub>A</sub> intervened miR520b-transfected HUVECs 24, 48 h. The proliferation (n = 5) and nitric oxide (NO), endothelial protein C receptor (EPCR), Von Willebrand factor (vWF), thrombomodulin (TM) and endothelin (ET)'s concentration of HUVECs were analyzed by MTT assay, nitrate reduction assay and ELISA assay respectively (n = 3). Transfection efficiency of miR-520b was detected by the fluorescence microscope and IL-8 mRNA and protein were also detected (n = 3). **Result:** Compared with normal group, miR-520b inhibited the proliferation and NO concentration, and promoted the EPCR, vWF, and ET concentration of HUVECs in the miR-520b group. After 48 hours, the expression of IL-8 mRNA and protein were significantly decreased in miR-520b group. Tan II<sub>A</sub> increased significantly the proliferation and NO concentration, and decreased significantly the EPCR, vWF, TM and ET concentration of HUVECs. Additionally, the expression of IL-8 mRNA and protein were significantly increased in the Tan II<sub>A</sub> group, in comparison to the miR-520b group. **Conclusion:** MicroRNA-520b may promote the development of blood stasis syndrome in HUVECs by inhibiting the expression of IL-8. This

**[收稿日期]** 20150101(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173157);广东省自然科学基金项目(10151063201000045)

**[第一作者]** 熊婷婷, 硕士, 从事心血管与 microRNAs 相关研究, Tel: 15625153824, E-mail: vicki200835@163.com

**[通讯作者]** \* 陈利国, 博士, 博士生导师, 从事心血管疾病研究, Tel: 020 - 85223532, E-mail: tchenly@jnu.edu.cn

process may be reversed by Tan II<sub>A</sub>.

[Key words] microRNA-520b; blood stasis syndrome; interleukin-8; tanshinone II<sub>A</sub>

血瘀证,是由多个病理变化综合所致的“血行失度”、“血脉瘀阻”的病理过程。有许多学者认为血瘀证的病理改变与血管内皮损伤密切相关,活血化瘀可以通过影响血管内皮细胞而发挥作用<sup>[1]</sup>。血管内皮细胞损伤是一个复杂的病理过程,多种因素参与其中,如糖尿病,高血压等多种疾病<sup>[2-3]</sup>。

microRNAs(miRNAs)是一种长约 22 个核苷酸的小分子单链 RNA,可以在转录后水平调控基因表达,具有组织特异性<sup>[4]</sup>,其在心血管系统生理和病理状态下均发挥作用。已有报道干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )下调 microRNA-520b(miR-520b),导致在自然杀伤细胞(NK 细胞)中主要组织相容性复合体相关链 A(MICA)表面蛋白水平的降低,这说明 miR-520b 与免疫调节有关<sup>[5]</sup>。抗内皮细胞抗体(AECA)等的发现和研究对于血管内皮细胞受损机制的研究有重要意义。有文献报道称,miR-520b 可以通过靶基因白介素(IL)-8 来调节乳腺癌细胞的迁移<sup>[6]</sup>。IL-8 是由巨噬细胞、血管内皮细胞等多种细胞产生的一种多肽因子,不仅可作为血瘀证心肌缺血的新的生物标记物,也参与免疫反应的调节过程<sup>[7]</sup>。但是 miR-520b 在血瘀证发生过程中对 IL-8 的作用尚不清楚。

丹参酮 II<sub>A</sub>(Tan II<sub>A</sub>)为丹参的脂溶性活性成分,有保护 HUVECs 及调节免疫反应等作用<sup>[8]</sup>。目前比较关注 Tan II<sub>A</sub> 如何预防和修复血管内皮功能的损伤<sup>[9-10]</sup>。而 Tan II<sub>A</sub> 对血瘀证相关的 miR-520b 调控 IL-8 的表达的影响仍然未见报道。故研究与血瘀证相关的 miR-520b 对 IL-8 的影响,并观察 Tan II<sub>A</sub> 的干预作用。从细胞水平探讨血瘀证的 miR-520b 作为药物 Tan II<sub>A</sub> 的作用靶点的可能,为中医药防治血瘀证提供新的治疗靶点。

## 1 材料

**1.1 细胞及试剂** 人脐静脉内皮细胞株(HUVECs, 武汉大学“中国典型培养物保藏中心”)。丹参酮 II<sub>A</sub>(Tan II<sub>A</sub>, 批号 MFCD00238692,  $\geq 97\%$ ), MTT(批号 MFCD00011964,  $\geq 97.5\%$ )均为 Sigma 公司,新生胎牛血清(批号 16000-077), DMEM(批号 12491-015),胰蛋白酶(批号 15090-046)均为 Gibico 公司, Lipo-fectamine 2000(批号 11668-019, Invitrogen), Real-time PCR 试剂盒(批号 DRR420A, Takara), 兔抗人 IL-8 抗体(批号 11010-01, Southern Biotech), NO 检测试剂盒(批号 A013-2, 南京建成生物工程研

究所), ELESA 检测试剂盒(批号 BSA11462, 上海瑶韵生物科技有限公司)。

**1.2 药物配制** Tan II<sub>A</sub> 和 MTT 的药物配置:取 Tan II<sub>A</sub> 2 mg, 溶于 50  $\mu\text{L}$  的 DMSO, 制成母液质量浓度为 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存;取 MTT 0.5 g, 溶于 100 mL 的 PBS 中, 在电磁力搅拌器上搅拌 30 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔过滤器除菌, 分装, 4  $^{\circ}\text{C}$  下避光保存。

**1.3 仪器** 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Forma 公司), ST16R 型台式移液器(Thermo 公司), 9600PCR 型扩增仪(PE 公司), 5415R/5415D 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司), 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 获取与血瘀证相关的 miR-520b** 借鉴陈利国等<sup>[11]</sup>提出的内皮细胞损伤模型的建立方法, 采用高血压病患者血清损伤培养的 HUVECs, 获取与血瘀证各型(气虚血瘀证, 气滞血瘀证, 寒凝血瘀证, 热结血瘀证)相关, 具有明显的血瘀特异性的 miR-520b, 预测并获取其靶基因。

**2.2 细胞培养及转染**<sup>[6]</sup> 实验将对数生长期的 HUVECs 细胞接种于含体积分数 10% 新生胎牛血清、无抗生素的 DMEM 高糖培养基的 6 孔板中, 采用 Lipo-fectamine 2000 脂质体转染 miR-520b(模拟物或抑制物)和无序对照(NC), 按照试剂说明书转染, 先需配制 miR-520b mimic(模拟物)-Lipo 2000 混合液或 miR-520b inhibitor(抑制物)-Lipo 2000 混合液:用 250  $\mu\text{L}$  Opi-MEMI 培养液(转染专用的无血清、无抗生素培养液)稀释 1  $\mu\text{L}$  50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  miR-520b, NC(无序) mimic 储存液或用 250  $\mu\text{L}$  Opi-MEMI 培养液(转染专用的无血清、无抗生素培养液)稀释 10  $\mu\text{L}$  100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  miR-520b inhibitor, NC(无序) inhibitor 储存液, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min, 为 A 液; 250  $\mu\text{L}$  Opi-MEMI 培养液稀释 5  $\mu\text{L}$  50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  lipo2000 储存液, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min, 为 B 液。将 A 和 B 轻轻混匀, 室温孵育 20 min 后, miR-520b 模拟物置于含 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 24, 36, 48 h, 并在荧光显微镜下观察转染效果。miR-520b 抑制物置于含 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 48 h。进行后续检测(miRNA 模拟物是运用化学方法合成的双链 RNA, 能模拟细胞中内源性成熟 miRNA 的高水平表

达,以增强内源性 miRNA 的调控作用,进行功能获得性研究,miRNA 抑制物是化学合成的,经过特殊修饰的 miRNA 抑制剂,通过特异性与成熟 miRNA 分子结合而抑制其作用,可以削弱细胞中 miRNA 导致的基因沉默效应,进行 miRNA 功能缺失性研究)。

**2.3 HUVECs 细胞活性的检测**<sup>[12]</sup> 采用 MTT 法检测转染后细胞活性:设正常组(即无处理组),对照组(NC 组,即阴性对照组),模型组(miR-520b)。各实验组以  $1.6 \times 10^4$ /孔重悬于 200  $\mu\text{L}$  培养基中,接种于 96 孔板,每组 6 个复孔,转染 24,36,48 h 后,经 MTT 法多功能酶标仪测定吸光度  $A_{570\text{nm}}$ 。转染 48 h 后,药物 Tan II<sub>A</sub> 干预细胞活性检测,设 Tan II<sub>A</sub> 低、中、高质量浓度组,分别按照 5,10,20,40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tan II<sub>A</sub> 组(转染,miR-520b 48 h 后,药物处理)以及模型组(miR-520b)和正常组<sup>[12]</sup>。溶液配制(每组以 10 mL 计算),40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tan II<sub>A</sub> 组:8 990  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清 + 10  $\mu\text{L}$  Tan II<sub>A</sub> 母液,20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tan II<sub>A</sub> 组:8 990  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清 + 5  $\mu\text{L}$  Tan II<sub>A</sub> 母液 + 5  $\mu\text{L}$  DMSO,10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tan II<sub>A</sub> 组:8 990  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清 + 2.5  $\mu\text{L}$  Tan II<sub>A</sub> 母液 + 7.5  $\mu\text{L}$  DMSO,5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Tan II<sub>A</sub> 组:8 990  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清 + 1.25  $\mu\text{L}$  Tan II<sub>A</sub> 母液 + 8.75  $\mu\text{L}$  DMSO,模型(miR-520b)组:8 990  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清 + 10  $\mu\text{L}$  DMSO,正常组:9 000  $\mu\text{L}$  DMEM + 1 000  $\mu\text{L}$  胎牛血清。处理 24,48 h 后,测定  $A_{570\text{nm}}$ 。

**2.4 血瘀证标记物 NO,ET,EPCR,vWF,TM 的测定**<sup>[13]</sup> 取各组细胞上清培养液按照 NO 和 ELISA 试剂盒说明操作,经多功能酶标仪测定吸光度  $A_{550\text{nm}}$  或  $A_{450\text{nm}}$ ,计算 NO,ET,EPCR,vWF 和 TM 的分泌量。

**2.5 检测 IL-8 mRNA 表达**<sup>[6]</sup> 收集各组细胞。Trizol 法提取各组总细胞 RNA,逆转录 cDNA 的反应条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min,85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s;60  $^{\circ}\text{C}$  30 s;40 个循环,循环延伸末端收集荧光信号。基因的引物序列是 IL-8 F: 5'-GCTGGCCGTGGCTCTCTCTTG-3', IL-8R: 5'-TGGGGTGGAAAGGTTTGGAGTAT-3'; 内参照 GAPDH F: 5'-GAAGTCCGAGTCAACGGATTT-3'; GAPDH R: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGCTGA-3'。Real-time PCR 数值分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析法。

**2.6 IL-8 蛋白表达的检测**<sup>[14]</sup> 采用脂质体介导的转染方法将 miR-520b 模拟物转染 HUVECs,收集各组细胞,经提取蛋白,按照常规方法进行 Western

blotting,分析 IL-8 蛋白的表达。

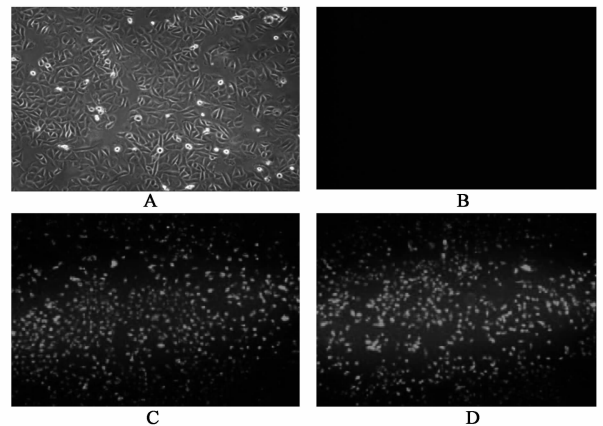
**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析,组之间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 获取与内皮细胞血瘀证相关的 miR-520b 及其靶基因 IL-8** 抽提模型细胞 miRNAs,利用 Solexa 芯片技术初步检测分析,比较各型内皮细胞中 miRNA 表达差异,初步获得与血瘀证各型相关的特征性 miR-520b,把 miR-520b 作为实验对象。以正常人内皮细胞和加入健康人血清培养及非血瘀证患者血清干预的内皮细胞为对照。利用 Targetscan,miRanda 2 种软件,根据 miRNAs 负调控基因表达的原理并参照文献 miR-520b 在乳腺癌细胞中与 IL-8 有关<sup>[6]</sup>,最终预测 miR-520b 的靶基因为 IL-8。

**3.2 miR-520b 对 HUVECs 细胞的影响及 Tan II<sub>A</sub> 的干扰**

**3.2.1 检测转染效果** 转染 miR-520b mimic 进入 HUVECs,24,48 h 后在荧光显微镜下观察转染效果,可见白光底的图像(图 1A),对照组的图像(图 1B),转染 24 h 后的荧光图像(图 1C),转染 48 h 后的荧光图像(图 1D)。结果显示,HUVECs 可检测到荧光,即细胞已转入 miR-520b mimic,且 48 h 效果最佳。



A. 白光底的图像;B. 对照组的图像;C. 24 h 后的荧光图像;D. 48 h 后的荧光图像

图 1 MicroRNA-520b mimic 进入 HUVECs 24,48 h 的转染效果(荧光显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 Transfection efficiency of miR-520b detected by the fluorescence microscope for 24,48 h ( $\times 100$ )

**3.2.2 miR-520b 对 HUVECs 细胞活性的影响及 Tan II<sub>A</sub> 的干预作用** HUVECs 受到 miR-520 干扰后细胞受到损伤,细胞活性下降,与 NC 组比较差异有

统计意义  $P < 0.01$ ), 见表 1。而  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Tan II}_A$  能够拮抗这种损伤, 减少细胞的死亡, 见表 2。

表 1 转染 miR-520b 不同时间后 HUVECs 细胞活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	HUVECs 细胞活性/A		
	24 h	36 h	48 h
正常	$1.75 \pm 0.07$	$1.93 \pm 0.05$	$2.00 \pm 0.04$
对照	$1.55 \pm 0.07$	$1.73 \pm 0.06$	$1.97 \pm 0.06$
miR-520b	$1.26 \pm 0.12^{1)}$	$1.14 \pm 0.14^{1)}$	$0.92 \pm 0.12^{1)}$

注: 与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

**3.2.3 miR-520b 可促进血瘀证的形成及  $\text{Tan II}_A$  的干预作用** 由表 3 和表 4 可知, 与 NC 组相比, miR-520b 组细胞 NO, ET, vWF, EPCR 的分泌量均有明显差异 ( $P < 0.01$ ), 与模型 (miR-520b) 组相比,  $\text{Tan II}_A$  组细胞 NO, ET, vWF, TM, EPCR 的分泌量

表 3 miR-520b 转染后, 各组细胞释放的 NO, ET, vWF, TM, EPCR 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	NO	ET	vWF	TM	EPCR
	$/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\%$	$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	$97.5 \pm 1.1$	$120.6 \pm 5.0$	$83.7 \pm 2.0$	$109.3 \pm 7.7$	$133.9 \pm 1.6$
对照 (NC)	$70.3 \pm 3.3$	$123.6 \pm 5.6$	$90.0 \pm 2.5$	$114.2 \pm 8.3$	$138.7 \pm 11.5$
模型 (miR-520b)	$62.4 \pm 1.5^{1)}$	$139.3 \pm 4.2^{1)}$	$104.0 \pm 2.3^{1)}$	$127.2 \pm 2.5$	$158.0 \pm 5.4^{1)}$

表 4  $\text{Tan II}_A$  干预后, 各组细胞释放的 NO, ET, vWF, TM, EPCR 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

各组	剂量	NO	ET	vWF	TM	EPCR
	$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\%$	$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
模型 (miR-520b)	-	$64.5 \pm 2.9$	$140.7 \pm 3.91$	$105.7 \pm 1.2$	$130.0 \pm 3.6$	$161.1 \pm 5.2$
$\text{Tan II}_A$	10	$81.4 \pm 2.6^{1)}$	$124.9 \pm 4.5^{1)}$	$86.0 \pm 1.7^{1)}$	$113.9 \pm 2.1^{1)}$	$140.8 \pm 0.5^{1)}$

**3.3 miR-520b 可调节 IL-8 mRNA 和蛋白及  $\text{Tan II}_A$  的干预作用** 上调的 miR-520b 不仅调节 HUVECs 中 IL-8 mRNA 的表达随时间的增加而降低 ( $P < 0.01$ ), 48 h 差异最显著 (图 2A), 而且使 IL-8 蛋白的表达也降低 ( $P < 0.01$ ) (图 2C-D), 而下调的 miR-520b 则使 IL-8 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ) (图 2B), 故可得出 miR-520 的靶基因是 IL-8, 且 48 h 为最佳转染时间。  $\text{Tan II}_A$  ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 48 h) 干预后, IL-8 mRNA 和蛋白的表达显著增加 ( $P < 0.01$ )。最终可认为 miR-520b 可以调节 IL-8 mRNA 和蛋白的表达, 而  $\text{Tan II}_A$  可干预 miR-520b 对 IL-8 的影响。

#### 4 讨论

中医认为高血压病、血瘀证、血管内皮细胞损失三者息息相关。前面提出在血瘀证高血压病患者中高表达的 miR-520b 与其靶基因 IL-8 以及  $\text{Tan II}_A$  均可能与免疫调节有关, 而免疫机制在血管内皮细胞受

表 2  $\text{Tan II}_A$  对 miR-520b 转染 HUVECs 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 2 Intervention effects of  $\text{Tan II}_A$  on miR-520b injury of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	HUVECs 细胞活性/A	
		24 h	48 h
正常	-	$1.10 \pm 0.06^{1)}$	$1.40 \pm 0.07^{1)}$
模型 (miR-520b)	-	$1.03 \pm 0.03$	$0.99 \pm 0.04$
$\text{Tan II}_A$	5	$1.25 \pm 0.53^{1)}$	$1.62 \pm 0.09^{1)}$
	10	$1.38 \pm 0.13^{1)}$	$2.11 \pm 0.11^{1)}$
	20	$1.20 \pm 0.10^{1)}$	$1.36 \pm 0.09^{1)}$
	40	$1.13 \pm 0.08^{1)}$	$1.13 \pm 0.08^{1)}$

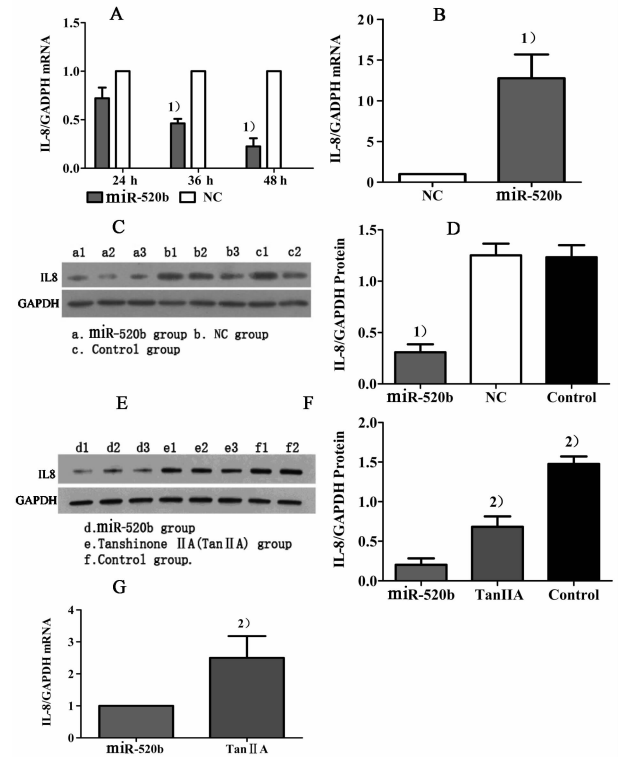
注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

差异显著 ( $P < 0.01$ ), 这说明 miR-520b 造成 HUVECs 的损伤, 且  $\text{Tan II}_A$  能减少血管内皮细胞的损伤, 而内皮细胞损伤与我们中医认为的血瘀证关联性很大<sup>[13]</sup>, 故我们暂时可以认为 miR-520b 与血瘀证相关, 有可能作为药物  $\text{Tan II}_A$  的靶点 (表 3, 4)。

损过程中具有重要作用。故本课题探讨血瘀证相关的 miR-520b 对 IL-8 的影响及  $\text{Tan II}_A$  的干预作用。

在本研究中, 采用 MTT 法检测细胞活性, 硝酸还原酶法, ELISA 法检测 NO, EPCR, vWF, TM 和 ET 的分泌量来鉴定血管内皮细胞损伤以及血瘀证的重要指标, 与此同时,  $\text{Tan II}_A$  可以通过增加细胞活性, 增加 NO 的含量, 降低 EPCR, vWF, TM, ET 分泌量, 来减少血管内皮细胞损伤<sup>[12, 15-16]</sup>。结合本实验结果, 可知, miR-520b 可促进血瘀证的形成, 而  $\text{Tan II}_A$  则可以起到抑制血瘀证形成的作用。

同时本研究结果也显示, 与血瘀证相关的 miR-520 与 IL-8 存在靶标关系, miR-520b 可使 HUVECs 细胞中 IL-8 mRNA 和蛋白质表达明显下调, 转染最佳时间为 48 h, 同时  $\text{Tan II}_A$  可以抑制 miR-520b 对 IL-8 的影响。最终可推测, miR-520b 可能是通过抑制 IL-8 的表达来促进血瘀证的形成, 并有可能作为



A. 不同时间下, miR-520b 对 IL-8 mRNA 的影响; B. miR-520b inhibitor 对 IL-8 mRNA 的影响; C-D. miR-520b 对 IL-8 蛋白的影响; E-G. Tan II<sub>A</sub> 对 IL-8 mRNA 和蛋白的影响  
与对照组 (NC) 相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 miR-520b 组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 2 miR-520b 对 IL-8 mRNA 及蛋白表达的影响及 Tan II<sub>A</sub> 的干预作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 2 Effects of miR-520b associated with blood stasis syndrome on IL-8 and intervention of Tan II<sub>A</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

药物 Tan II<sub>A</sub> 的作用靶点。

综上所述,本研究具有重要的理论意义和临床应用价值。但所得结论仍需在动物实验上做进一步的研究,同时筛选出血瘀证高表达的 miR -520c-3p, miR -520f, miR -520g, miR -520h 是否也是与血瘀证相关的 miRs, 还需进一步研究。

[参考文献]

[ 1 ] 高冬, 吴立娅, 焦雨欢, 等. 血府逐瘀汤影响内皮祖细胞分化的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(12): 917-919.  
[ 2 ] Maria G, Modar K, Philip J, et al. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction [J]. BBA - Molecular Cell Research, 2014, 1843(6): 1063-1075.  
[ 3 ] Li X, Xing W J, Wang Y, et al. Upregulation of caveolin-1 contributes to aggravated high-salt diet-induced endothelial dysfunction and hypertension in type 1 diabetic rats [J]. Life Sciences, 2014, 113(1/2): 31-39.

[ 4 ] Mariana L Q, Reinhard R, Abdullah Y, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. Curr Biochem, 2002, 12(9): 735-739.  
[ 5 ] Yadav D, Ngolab J, Lim R S H, et al. Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA [J]. J Immunol, 2008, 182(1): 39-43.  
[ 6 ] Hu N, Zhang J, Ye L, et al. MiR-520b regulates migration of breast cancer cells by targeting hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8 [J]. J Biol Chem, 2011, 286(15): 13714-13722.  
[ 7 ] Méndez S P, García E B, Vázquez A, et al. Regulation of interleukin-8 by interleukin-10 and transforming growth factor beta in human monocytes infected with mycobacterium bovis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 802-807.  
[ 8 ] Li H Z, Lu Y H, Huang G S, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> inhibits dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role in anti-atherosclerotic activity [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(10): 764-769.  
[ 9 ] Zhang M, Zhang B L, Gao X M, et al. Effect of different proportions of salvianolic acid B and tanshinone II<sub>A</sub> on rat cardiac microvascular endothelial cells injured by tumor necrosis factor alpha *in vitro* [J]. Chin Tradit Her Drugs, 2004, 35(1): 63-65.  
[ 10 ] Lin R, Wang W R, Liu J T, et al. Protective effect of tanshinone II<sub>A</sub> on human umbilical vein endothelial cell injured by hydrogen peroxide and its mechanism [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108(2): 217-222.  
[ 11 ] Chen L G, Hu X Q. On establishment of vascular endothelial cell injury model of blood stasis syndrome based on integration of disease identification and syndrome differentiation [J]. Chin J integr Tradit West Med, 2007, 27(3): 271-273.  
[ 12 ] 胡小勤. 高血压病血瘀证血管内皮细胞损伤模型的研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2007.  
[ 13 ] Tong H, Wan P, Zhang X Q, et al. Vascular endothelial cell injury partly induced by mesenteric lymph in heat stroke [J]. Inflammation, 2014, 37(1): 27-34.  
[ 14 ] Guo Y, Chen W, Wang W, et al. Simultaneous diagnosis and gene therapy of immuno-rejection in rat allogeneic heart transplantation model using a T-cell-targeted theranostic nanosystem [J]. ACS Nano, 2012, 6(12): 10646-10657.  
[ 15 ] 胡小勤, 陈利国, 曾学文, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对高血压病血瘀证患者血清损伤血管内皮细胞形态结构的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(11): 2130-2132.  
[ 16 ] 郑美琴, 林燕, 李宝清, 等. 脑梗死患者血浆 vWF, PLG, D-D 含量变化与临床意义 [J]. 现代实用医学, 2006, 18(9): 618-620.

[责任编辑 聂淑琴]