

miR-19a 靶向胰岛素样生长因子 2 受体 抑制血管瘤干细胞的增殖和迁移

汪帆¹, 吴瑶², 方林森¹, 曹东升²

摘要 目的 探讨婴儿血管瘤(IHs)中 miR-19a 是否与胰岛素样生长因子 2 受体(IGF-2R)相互作用,影响血管瘤干细胞(HemSCs)的增殖、迁移和脂肪生成。方法 从 IHs 标本中分离、筛选和培养 HemSCs,免疫组织化学鉴定 IGF-2R 在 HemSCs 中表达。用 miR-19a 模拟物和抑制剂对 HemSCs 进行转染,通过 CCK-8、划痕实验、Transwell、qRT-PCR 和免疫印迹相关实验验证 miR-19a 对于 HemSCs 增殖与迁移的影响。结果 与对照组相比,用 miR-19a 抑制剂处理的 HemSCs 增殖与迁移速度显著增加,miR-19a 过表达显著抑制 IGF-2 诱导的细胞迁移和增殖($P < 0.05$)。结论 miR-19a 可能通过靶向 IGF-2R 抑制 HemSCs 的增殖、迁移和脂肪生成。

关键词 血管瘤干细胞;微小 RNA;IGF-2R;增殖;迁移

中图分类号 R 732.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1029-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.018

婴儿血管瘤(infantile hemangiomas, IHs)具有独特的生物学特征^[1],在出生后 1 至 5 个月内进入增殖期,快速生长,在 6 至 9 个月生长缓慢,一岁后,肿瘤的生长速度进一步减慢,并进入消退期,大多数在 5~7 岁时自行消失,通常留下色素沉着过度、毛细血管扩张和纤维脂肪团等问题^[2]。一些部位的 IHs 会影响人和器官的外观和健康,在这种情况下,积极干预以限制其生长是必要的^[3]。通过与胰岛素样生长因子 2 受体(insulin-like growth factor 2 receptors, IGF-2R)结合,胰岛素样生长因子 2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)在细胞分化、增殖和个人生长发育中发挥重要作用^[4],是控制脂肪转化和生成的

重要因素^[5-6]。此外,miRNA 是一种长度为 22 nt 的非编码 RNA,调节参与细胞凋亡、增殖、分化和信号转导的几个基因^[7-8],miR-19a 可以靶向肺癌中的 IGF-2R 诱导细胞凋亡并抑制细胞增殖^[9]。该研究中,miR-19a 通过靶向 IGF-2R,在体外抑制血管瘤干细胞(hemangioma stem cells, HemSCs)的增殖和迁移,并且抑制 HemSCs 向脂肪分化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 本实验所用的增殖期的血管瘤标本均来自 2017 年至 2019 年间就诊于安徽医科大学第二附属医院整形外科的患者。采集的 20 例血管瘤标本已征得患者知情同意并经医院伦理委员会审查批准(批准号为 PJ-bb2017-026)。纳入标准为年龄小于或等于 1 岁,病理科确诊为增殖期血管瘤,术前未接受任何治疗。

1.1.2 主要试剂和仪器 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;1% 青霉素-链霉素(penicillin streptomycin, PS)购自上海碧云天生物科技公司;0.2% 胶原酶购自德国海德堡 Electrophoresis GmbH;CD133 磁珠套盒购自德国 Miltenyi 公司;ECM 内皮细胞培养基购自美国 ScienCell Research Laboratories;间充质干细胞成脂诱导分化培养基购自苏州赛业生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)购自日本 Dojindo Molecular Technologies 公司。miR-19a mimics、miR-19a mimics FAM-dN-CTL、miR-19a inhibitor、miR-19a inhibitor FAM-N-CTL 购自江苏凯基生物技术股份有限公司;lipo2000 美国赛默飞世尔科技公司;外源性 IGF-2 购自美国 Peprotech。逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;SYBR[®] Premix Ex Taq II 购自大连宝生物工程有限公司;4% 多聚甲醛、蛋白酶抑制剂及 RIPA 裂解液购自上海碧云天生物科技公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司;封口膜购自美国 Parafilm 公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Advansta。主要抗

2024-03-01 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1808085mh282);安徽医科大学科研基金项目(编号:2019xkj062)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院北区(安徽省公共临床中心)创面修复与整形美容外科,合肥 230001

²安徽医科大学第二附属医院创面修复与整形美容外科,合肥 230001

作者简介:汪帆,女,硕士研究生;

曹东升,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: dscao1966@126.com

体:一抗(抗 β -actin, 抗 IGF-2R, 抗 PPAR- γ , 抗 C / EBP- α , 抗 C / EBP- β) 均购自美国 Affinity Biosciences;二抗(过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG) 购自北京傲锐东源生物科技有限公司。Transwell 小室购自美国康宁公司;倒置光学显微镜购自日本奥林巴斯公司;倒置荧光显微镜 BF41 购自南京瞭望光电技术有限公司;电泳仪购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 血管瘤干细胞的分离和培养

收集增殖期血管瘤组织,去除脂肪和皮肤组织,用 PBS 冲洗样品 3 次后将样本放入含有 0.2% 胶原酶中酶解直到组织变成糜烂状。用 100 μ m 细胞过滤器反复过滤后得到细胞悬浮液,再用磁珠分选法筛选出 CD133 表达阳性的细胞。将获得的细胞加入含有 20% 血清和 1% 双抗的 EBM-2 培养基中,然后在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下培养。

1.2.2 细胞免疫组化

将消毒过的 20 mm 盖玻片置于 90 mm 培养皿上,以 2×10^4 个/ml 的细胞密度接种细胞进行细胞爬行,5 d 后用 PBS 冲洗。然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 风干 5 min。用 0.5% Triton X-100 孵育 20 min, 3% H₂O₂ 孵育 15 min, 10% FBS 封闭 20 min。与一抗(抗-IGF-2、抗-IGF-2R 和抗-肌动蛋白)在载玻片上 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,阴性对照组用 PBS 代替抗体。在 37 $^{\circ}$ C 下用二抗孵育 10~15 min。注入 DAB 溶液 3~10 min 后,用明视野显微镜($\times 400$)检查细胞。室温下用苏木精染色 5 min, 烘干后取材,用明视野照明($\times 400$)拍摄。

1.2.3 细胞培养和转染

在 6 孔板中加入 2 ml 含有 1×10^6 血管瘤干细胞的培养液,以 40%~60% 的密度培养 1 d。转染前用 PBS 冲洗细胞 2 次,然后加入 2 ml 无血清培养基。在 250 μ l 无血清培养基中溶解 100 pmol miR-19a mimic 或抑制剂,然后在 250 μ l 无血清培养基中加入 5 μ l lipo2000, 混匀后室温静置 5 min。两管混合后放入 6 孔板中 20 min, 培养箱中放置 6 h 后更换为含血清的 EBM-2 培养基。24 h 后,在相应的孔中加入 100 μ l 100 ng/ml IGF-2, 48 h 后进行相关实验。

1.2.4 CCK-8 测定

转染后的血管瘤干细胞在 96 孔板中孵育,将培养基更换为含有 5% FBS 的 EBM-2 培养基并在相应的孔中添加 100 ng/ml 的 IGF-2。在第 0、1、3、5、7 天,用含 CCK-8 试剂的培养基孵育细胞,1 h 后用酶标志物测量 450 nm 处的吸光度。

1.2.5 划痕测定和细胞迁移

将转染后的血管瘤

干细胞接种在 6 孔板中,并在 24 h 后用 200 μ l 移液管尖端刮擦。用 PBS 洗涤后,加入无血清培养基,并向相应的孔中加入 100 μ l 的 100 ng/ml IGF-2。24 h 后,在显微镜下进行照片比较,并使用 ImageJ 测量。将转染后的血管瘤干细胞,用 IGF-2 处理后置于 Transwell 小室中,将 600 μ l 含有 30% FBS 的 EBM-2 培养基添加到下腔中。孵育 24 h 后进行固定和染色。用 100 倍光学显微镜对细胞成像并使用 ImageJ 软件计数。

1.2.6 RT-qPCR

使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。使用 PrimeScriptTM RT 试剂,逆转录总 RNA 以产生 cDNA。RT-qPCR 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq I, 见表 1。

表 1 qPCR 引物名称与序列

引物名称	序列
IGF-2- Forward Primer	5'-GATGCTGCTGCTTCTCACCT-3'
IGF-2- Reverse Primer	5'-CAGACGAAGTGGAGGCTGTC-3'
IGF-2R- Forward Primer	5'-TTCACAGCTGCTTACAGCGA-3'
IGF-2R- Reverse Primer	5'-GGATTGGAGGACAAGGGG-3'
GAPDH- Forward Primer	5'-GGCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
GAPDH- Reverse Primer	5'-GGTGGCAGTATGGCATGGAC-3'
PPAR γ - Forward Primer	5'-GGCAATGAATGTCGTCTGTGG-3'
PPAR γ - Reverse Primer	5'-CCGCCAACAGTCTCTCTCTC-3'
C/EBP α - Forward Primer	5'-GCCAGGAGATGAAGCCAAGC-3'
C/EBP α - Reverse Primer	5'-TTGTGTTCTTGTCCACCGACTTC-3'
C/EBP β - Forward Primer	5'-TACTACGAGGCGGACTGCTTGG-3'
C/EBP β - Reverse Primer	5'-CGGAGAAGAGCTCGGAGAGGAAG-3'

1.2.7 Western blot

收集血管瘤干细胞并用 RIPA 提取总细胞蛋白,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度后利用 SDS-PAGE 分离蛋白并转移到 PVDF 膜上,脱脂牛奶室温封闭后与下述稀释的一抗孵育。抗- β -actin(1:1 000)、抗 IGF-2R(1:500)、抗 PPAR γ (1:500)、抗 C/EBP β (1:500)和抗 C/EBP α (1:500),加入对应山羊抗兔二抗(1:2 000)室温封闭 1 h,最后滴 ECL 曝光。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 26.0 (IBM Corp.) 进行统计分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示(每个实验 $n = 3$)。单因素方差分析(ANOVA)用于分析各组之间的差异。当方差分析具有统计学意义时,使用 Tukey 方法进行多组比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-2 和 IGF-2R 在 HemSCs 中的表达

在免疫组织化学实验中,在显微镜下可以观察到其显

著的阳性表达,见图1,IGF-2主要定位于细胞质,IGF-2R主要定位于细胞质和细胞膜。

2.2 转染后 HemSCs 中 miR-19a 的表达 与对照组相比,转染 miR-19a 模拟物后,HemSCs 中 mRNA 的表达水平升高,转染 miR-19a 抑制物后,HemSCs 中 mRNA 的表达水平降低。见图2。

2.3 miR-19a 通过 IGF-2/IGF-2R 对 HemSC 增殖的影响 CCK-8 实验中,用 miR-19a 抑制剂转染的

HemSCs 显著增殖,通过添加 IGF-2 进一步刺激它们的增殖。与对照组相比,用 miR-19a 模拟物转染的 HemSCs 的增殖没有被显著抑制,并且在添加 IGF-2 处理后细胞开始增殖,见图3A。在第7天时,miR-19a 抑制剂转染且添加 IGF-2 处理的 HemSCs 增殖最强,而 miR-19a 模拟物转染的 HemSCs 增殖最低,见图3b。这些结果表明,miR-19a 可以影响 IGF-2R 与 IGF-2 的结合,从而影响 HemSCs 的增殖。



图1 IGF-2 及其受体在 HemSCs 中的表达 ×400
棕色:特异性抗体结合阳性

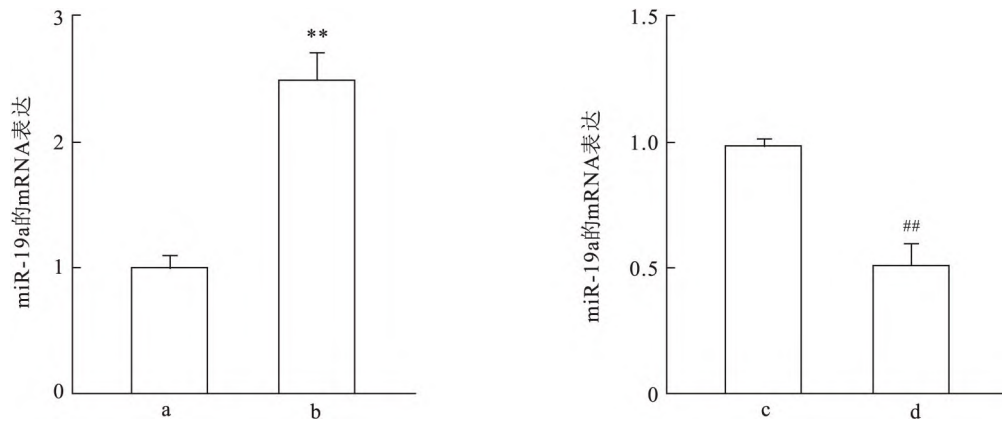


图2 转染后 HemSCs 中 miR-19a 的表达水平

a: miR-19a mimic nc; b: miR-19a mimic; c: miR-19a inhibitor nc; d: miR-19a inhibitor; 与 miR-19a mimic nc 比较: ** $P < 0.01$; 与 miR-19a inhibitor nc 比较: ## $P < 0.01$

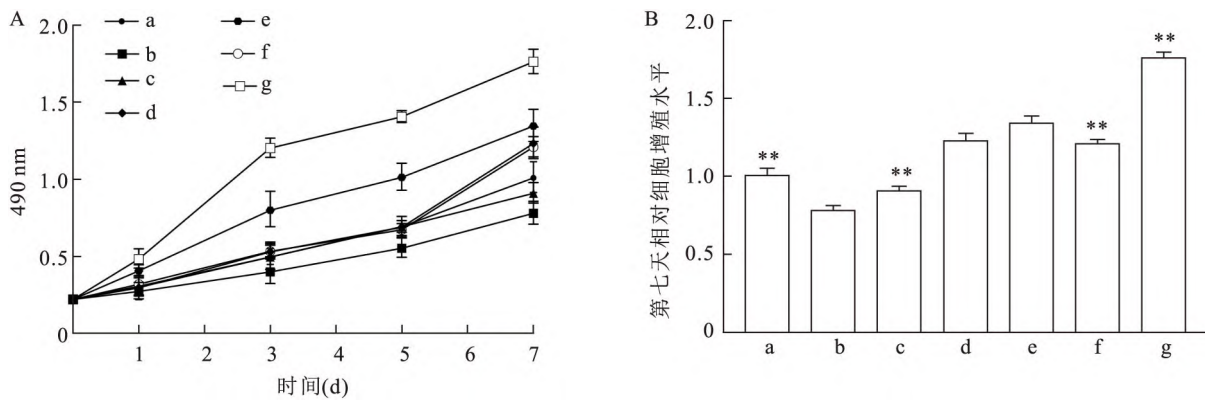


图3 miR-19a 通过 IGF-2/IGF-2R 调节 HemSCs 增殖

A: 用 CCK-8 测定在 1、3、5 和 7 天 HemSCs 的增殖情况; B: 在第 7 天时不同组 HemSCs 增殖情况; a: miR-19a mimic nc; b: miR-19a mimic; c: miR-19a inhibitor nc; d: miR-19a inhibitor; e: IGF-2; f: IGF-2 + miR-19a mimic; g: IGF-2 + miR-19a inhibitor; 与 IGF-2 比较: ** $P < 0.01$

2.4 miR-19a 通过 IGF-2/IGF-2R 对 HemSC 迁移的影响 在细胞功能实验中,miR-19a 抑制剂可以促进 HemSCs 的迁移和增殖,特别是在添加 IGF-2 刺激后,见图 4A、D。由此可见,与单独添加 IGF-2 相比,miR-19a 过表达显著抑制 IGF-2 诱导的细胞迁移和增殖($F = 1.918、1.036, P < 0.05、0.05$),并且 miR-19a 抑制显著增加 IGF-2 诱导细胞迁移和增生

的能力($F = 5.392、7.233, P < 0.01、0.05$),见图 4B、C。

2.5 miR-19a 通过靶向 IGF-2R 影响 HemSCs 向脂肪细胞的分化 RT-qPCR 和 Western blot 实验结果显示 IGF-2 促进 HemSCs 中脂肪相关转录因子 PPAR α /C/EBP 和 C/EBP 的 mRNA 和蛋白表达,见图 5A - D。在用 miR-19a 抑制剂转染后,这些转录

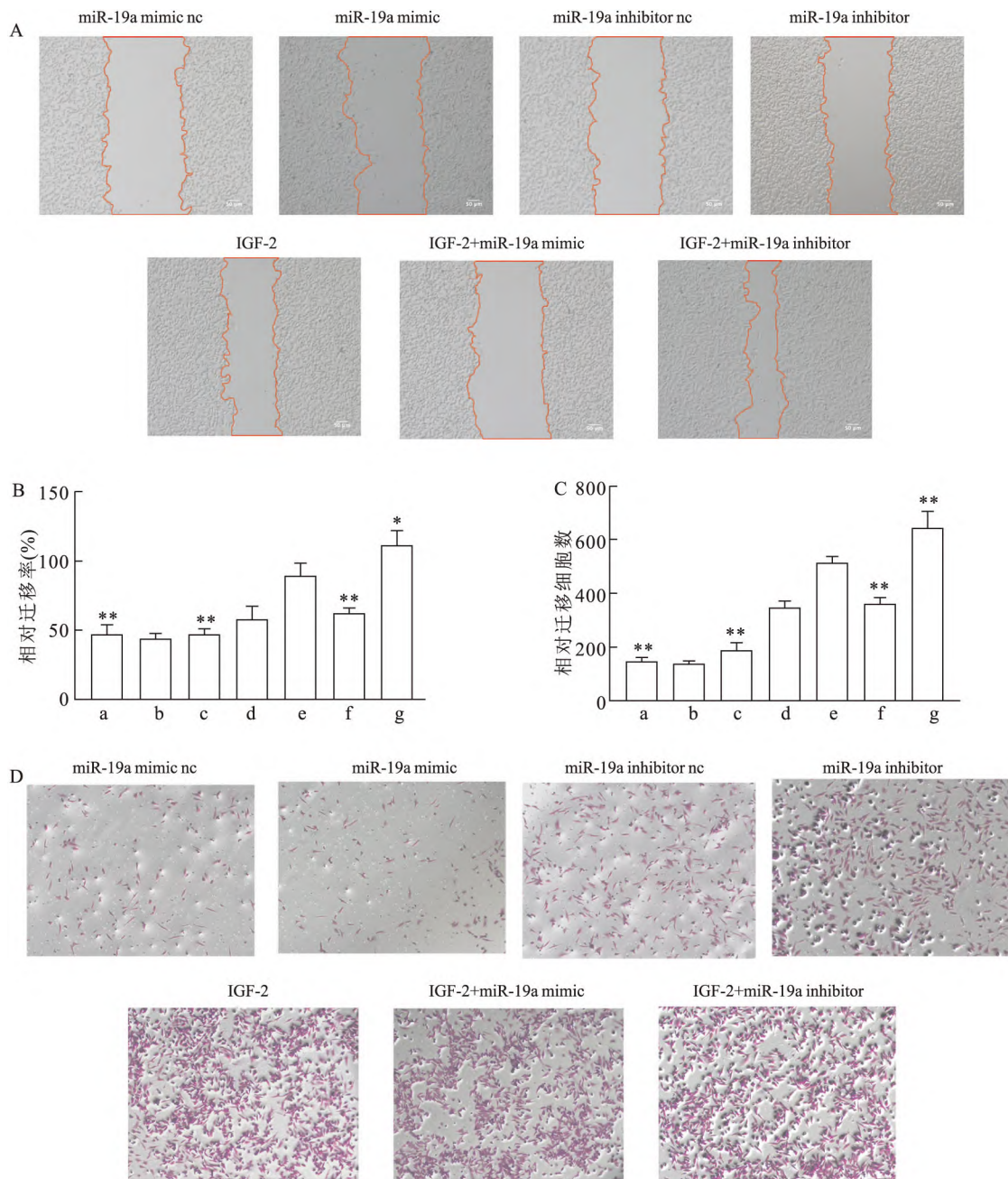


图 4 miR-19a 通过 IGF-2/IGF-2R 调节 HemSCs 的迁移 ×100

A、B:通过划痕实验分析等剂量的 miR-19a 对照模拟物、miR-19a 模拟物、miR-19a 对照抑制剂、miR-19a 抑制剂、IGF-2、IGF-2 与 miR-19a 模拟物和 IGF-2 与 miR-19a 抑制剂对 HemSCs 迁移的影响;C、D:通过 Transwell 实验分析等剂量的 miR-19a 对照模拟物、miR-19a 模拟物、miR-19a 对照抑制剂、miR-19a 抑制剂、IGF-2、IGF-2 与 miR-19a 模拟物和 IGF-2 与 miR-19a 抑制剂侵袭的影响;a:miR-19a mimic nc;b:miR-19a mimic;c:miR-19a inhibitor nc;d:miR-19a inhibitor;e:IGF-2;f:IGF-2 + miR-19a mimic;g:IGF-2 + miR-19a inhibitor;与 IGF-2 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

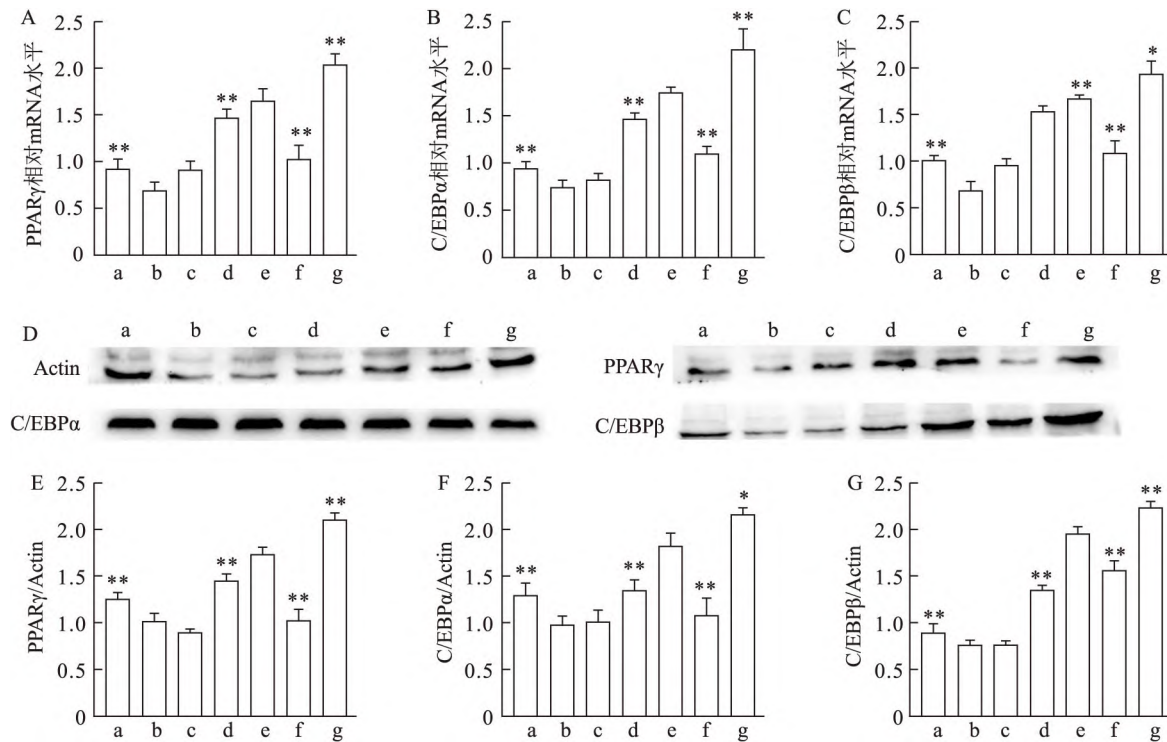


图5 miR-19a通过IGF-2/IGF-2R调节HemSCs的脂肪生成

A - C:通过qRT-PCR分析等剂量的miR-19a对照模拟物、miR-19a模拟物、miR-19a对照抑制剂、miR-19a抑制剂、IGF-2、IGF-2与miR-19a模拟物和IGF-2与miR-19a抑制剂对HemEC中脂肪生成的mRNA表达的影响,肌动蛋白是一种内部控制;D - G:通过Western blot分析等剂量的miR-19a对照模拟物、miR-19a模拟物、miR-19a对照抑制剂、miR-19a抑制剂、IGF-2、IGF-2与miR-19a模拟物和IGF-2与miR-19a抑制剂对脂肪生成的蛋白质水平的影响;a:miR-19a mimic nc;b:miR-19a mimic;c:miR-19a inhibitor nc;d:miR-19a inhibitor;e:IGF-2;f:IGF-2 + miR-19a mimic;g:IGF-2 + miR-19a inhibitor;与IGF-2比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

因子的表达也显著更高,而miR-19a过表达降低了这些转录因子,见图5E - G,PPAR、C/EBP和C/EBP。

3 讨论

IHs是婴儿期和儿童期常见的良性肿瘤,其确切发病机制尚不清楚,尽管它们有独特的生命周期^[1-2]。以前的大多数研究都集中在婴儿血管瘤内皮细胞(HemEC)上,HemECs是IHs中微观疾病的表现,而不是疾病发生的原因^[10]。相关研究^[11-12]已经证明HemSCs在IHs的发病机制中发挥着重要作用。

越来越多的研究^[13]确定了miRNA在肿瘤中的重要作用,它们在IHs中的作用受到了研究人员的高度关注。miR-19a是miR-17-92基因簇的重要成员,可抑制PTEN/PI3K/Akt信号通路并阻断肿瘤生长^[8]。IGF是一种由3个配体(IGF1、IGF2、IGF3)和3个受体(IGF1R、IGF2R、胰岛素受体)组成的肽蛋白,配体及其各自受体的结合可以触发一系列细胞内通路,这些通路在多种功能中发挥重要作用,包

括细胞生产、发育和代谢^[5]。根据相关研究^[9]结果,miR-19a与IGF-2R呈负相关。推测miR-19a可以作为靶点调节HemSCs的迁移和增殖。本研究证实IGF-2R在HemSCs中表达。CCK-8、划痕和Transwell实验结果说明,miR-19a通过IGF-2/IGF-2R途径影响HemSCs的迁移和增殖。

IHs最终会变成纤维脂肪组织,推测如果加速HemSCs向脂肪细胞的转化,IHs在增殖期花费的时间可以减少,从而减小IHs对机体的影响。相关研究^[14]表明,晚期转录因子PPAR γ 2的过表达促进血管瘤性间质干细胞向脂肪细胞分化,并可能促进HemSCs向脂肪细胞的分化。同时,IGF-2R在调节细胞外蛋白水解酶和生长因子的生物利用度方面发挥着关键作用^[15]。IGF-2通过调节IGF-2R-PI3K信号通路上调AKT磷酸化,这不仅加速HemSCs的增殖,还刺激HemSCs分化为脂肪细胞^[10]。进行油红O染色时,IGF2刺激HemSCs中的脂肪生成和脂质积累^[10]。IGF2R与IGF2的结合受到miR-19a对IGF2R表达水平的调节的影响,进而影响HemSCs向脂肪细胞的分化。本研究通过Western blot和

RT-qPCR 分析 PPAR γ 、C/EBP α 和 C/EBP β 的表达来验证这一结果。

课题组推测 miR-19a 通过 IGF-2R/PI3K 信号通路影响 HemSCs 的脂肪生成,这一点尚未得到证实,将成为未来研究方向。综上所述,本研究表明 miR-19a 通过靶向 IGF-2R 影响 HemSCs 的增殖、迁移和脂肪分化,miR-19a 可能作为血管瘤治疗的靶点,在血管瘤快速增殖之前抑制其生长并促进其消退。为进一步研究 miR-19a 对 PI3K/AKT 通路的影响以及随后的动物模型奠定了基础。

参考文献

- [1] Ginguerra M A, Saito O, Fernandes J B V D, et al. Clinical and radiological evaluation of periocular infantile hemangioma treated with oral propranolol: a case series[J]. *Am J Ophthalmol*, 2018, 185:48–55.
- [2] Tognetti L, Pianigiani E, Ierardi F, et al. A new clinical and dermoscopic monitoring of infantile hemangiomas treated with oral propranolol[J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33(6):e14283.
- [3] Hasbani D J, Hamie L. Infantile Hemangiomas [J]. *Dermatol Clin*, 2022, 40(4): 383–92.
- [4] Holly J M P, Biernacka K, Perks C M. The neglected insulin: IGF-II, a metabolic regulator with implications for diabetes, obesity, and cancer[J]. *Cells*, 2019, 8(10):1207.
- [5] Paglia D N, Wey A, Breitbart E A, et al. Effects of local insulin delivery on subperiosteal angiogenesis and mineralized tissue formation during fracture healing[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5): 783–91.
- [6] Acosta-Martinez M, Cabail M Z. The PI3K/Akt pathway in meta-

- inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23):15330.
- [7] Wang Z, Zhang W. The crosstalk between hypoxia-inducible factor-1 α and microRNAs in acute kidney injury[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2020, 245(5): 427–36.
- [8] Dou L, Wang S, Huang X, et al. MiR-19a mediates gluconeogenesis by targeting PTEN in hepatocytes[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3967–71.
- [9] Mao J T, Xue B, Smoake J, et al. MicroRNA-19a/b mediates grape seed procyanidin extract-induced anti-neoplastic effects against lung cancer[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 34: 118–25.
- [10] Rodríguez Bandera A I, Sebaratnam D F, Wargon O, et al. Infantile hemangioma. Part 1: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and assessment[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2021, 85(6): 1379–92.
- [11] Zhang K, Wang F, Huang J, et al. Insulin-like growth factor 2 promotes the adipogenesis of hemangioma-derived stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3):1663–9.
- [12] Wang F, Li H, Lou Y, et al. Insulinlike growth factor I promotes adipogenesis in hemangioma stem cells from infantile hemangiomas [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2825–30.
- [13] Lu S, Chen L, Tang L. Upregulation of AKT1 and downregulation of AKT3 caused by dysregulation of microRNAs contributes to pathogenesis of hemangioma by promoting proliferation of endothelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 21342–51.
- [14] Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR- γ and Wnt regulate the differentiation of MSCs into adipocytes and osteoblasts respectively[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(3): 185–92.
- [15] Yang L, Zhu Y, Kong D, et al. EGF suppresses the expression of miR-124a in pancreatic β cell lines *via* ETS2 activation through the MEK and PI3K signaling pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12):2561–75.

MiR-19a affects hemangioma stem cells proliferation and migration by targeting insulin-like growth factor 2 receptor

Wang Fan¹, Wu Yao², Fang Linsen¹, Cao Dongsheng²

[¹Dept of Wound Repair&Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Anhui Public Health Clinical Center), Hefei 230001; ²Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001]

Abstract *Objective* To investigate whether miR-19a interacts with insulin-like growth factor 2 receptors (IGF-2R) in infantile hemangiomas (IHs) and affects the proliferation, migration, and adipogenesis of hemangioma stem cells (HemSCs). *Methods* HemSCs were isolated, screened and cultured from IH specimens. IGF-2R expression in HemSCs was identified using immunohistochemistry. HemSCs transfected with miR-19a mimics and inhibitors were subjected to CCK-8, wound healing, Transwell, qRT-PCR, and Western blot analyses. *Results* Compared with the control, the proliferation and migration rate of HemSCs treated with miR-19a inhibitors were significantly increased, and overexpression of miR-19a significantly inhibited IGF-2 induced cell migration and proliferation ($P < 0.05$). *Conclusion* MiR-19a may inhibit HemSCs proliferation, migration, and adipogenesis by targeting IGF-2R.

Key words hemangioma stem cells; microRNA; IGF-2R; proliferation; migration