

• 论 著 •

# miRNA-146a 调控血管平滑肌细胞增殖和凋亡的作用及机制

杨云山

(广东省惠州市第一人民医院检验科 516003)

**摘要:**目的 探究 miRNA-146a 调控血管平滑肌细胞增殖、凋亡的作用及相关机制。方法 取 SDP 级健康雄性 SD 大鼠作为实验对象,取血管平滑肌细胞(VSMC)消化离心后,转染 50 nmol/L miRNA-146a 反义寡核苷酸、错义链和同等剂量磷酸盐缓冲液(PBS),进行对照比较。结果 实验组细胞在转染后 48 h 内 VSMC 的数目和吸光度值均低于其他两组,细胞凋亡率明显高于其他两组,核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 的表达水平低于其他两组,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 miRNA-146a 可促进 VSMC 的增殖,抑制细胞凋亡的进行,这一作用机制与核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 表达水平增高有关。

**关键词:** RNA-146a; 血管平滑肌细胞; 增殖; 凋亡; 机制

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.024

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2017)01-0063-03

## Effect and mechanism of miRNA-146a on the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells

YANG Yunshan

(The First People's Hospital of Huizhou City, Huizhou, Guangdong 516003, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of miRNA-146a on the proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells and its mechanism. **Methods** Taking the SDP grade healthy male SD rats as the experimental subjects, After the digestion of vascular smooth muscle cells(VSMC), 50 nmol/L transfected miRNA-146a antisense oligonucleotides, missense chain and the same dose of phosphate buffer(PBS) were compared. **Results** The number and absorbance value of VSMC in the experimental group were lower than those in the other two groups after transfection with 48 h, the apoptosis rate was significantly higher than that of the other two groups, the expression level of nuclear factor  $\kappa$ Bp65 and PCNA was lower than the other two groups, and the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). **Conclusion** miRNA-146a can promote the proliferation of VSMC, inhibiting the apoptosis of the cells, the mechanism of action is related to the increase of nuclear factor  $\kappa$ Bp65 and PCNA expression.

**Key words:** RNA-146a; vascular smooth muscle cell; proliferation; apoptosis; mechanism

小分子 RNA(miRNA)是一类进化保守的非编码单链小 RNA 分子,因其表达具有组织特异性和时序性,能够识别特定的目标 miRNA,可参与到细胞增殖、分化等活动中,目前已知 miRNA 近 700 个,30%以上基因表达可由其调控<sup>[1-2]</sup>。血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖、凋亡直接影响到动脉粥样硬化病变的发展,而炎症和免疫反应是发生这一病变的核心机制。相关研究显示,miRNA 会影响到内源性免疫系统内部平衡,其中 miRNA-146a 与病变、免疫之间的关系更为显著,miRNA-146a 在调控炎症和免疫反应的过程中发挥重要的作用,在自身免疫性疾病和肿瘤疾病中,核因子- $\kappa$ B 信号通路由 miRNA-146a 进行负反馈调控,miRNA-146a 对炎症和免疫反应的平衡起到维持作用<sup>[3]</sup>。有研究发现,miRNA-146a 的表达水平在颈动脉球囊损伤后显著上调,提示 miRNA-146a 可能参与了动脉粥样硬化和再狭窄的发生<sup>[4]</sup>。因此,明确 miRNA-146a 调控 VSMC 增殖、凋亡的作用机制,对 RNA 靶向药物的研发具有重要的指导意义。本实验旨在对 miRNA-146a 调控血管平滑肌细胞增殖、凋亡的作用及相关机制进行相关研究。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 本次实验所有仪器包括培养基过滤器、高压灭菌器、超纯水系统装置、高速冷冻离心机、颗粒制冰机、超低温冰箱、二氧化碳培养箱、倒置生物显微镜、紫外分光光度计等;所用试剂有 Opti-MEM 培养基、DMEM 培养基干粉、FBS 胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青霉素氯霉素双抗、HEPES、抗大鼠  $\alpha$ -actin 抗体、核因子  $\kappa$ Bp65 多克隆抗体、增殖细胞核抗原(PCNA)

以及相关试剂盒。实验动物为 SDP 级健康雄性 SD 大鼠共 20 只,均为 8 周龄,体质量为 $(125.5 \pm 10.2)$ g,均购自辽宁省实验动物中心,实验过程符合《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[5]</sup>中的相关规定。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠 VSMC 分离培养** 取健康雄性大鼠,断椎处死,置于 75%酒精中浸泡,时间为 5 min,将胸主动脉取出,并剥离内外膜,整个过程严格执行无菌操作;将组织块剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小,铺在培养瓶中,留置至少 5 h,对大鼠 VSMC 进行分离培养,DMEM 培养基含 20%胎牛血清,培养箱内条件设置为:温度 37 ℃、5%CO<sub>2</sub>,1 周后进行传代和差速纯化,采用免疫荧光法对 VSMC 进行鉴定,培养成功后,再以 10%胎牛血清进行培养。VSMC 消化离心后,转染 50 nmol/L miRNA-146a 反义寡核苷酸、错义链和同等剂量 PBS,分别列入实验组、对照组和正常组,5 h 后转为完全培养基,在荧光显微镜下观察转染效率,检测各组细胞 miRNA-146a 的表达,采用紫外分光光度计测定提取 RNA 的浓度<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 大鼠 VSMC 增殖、凋亡的检测** 采用常规细胞计数和 CCK-8 方法,细胞计数先对大鼠 VSMC 增殖情况进行检测,细胞消化离心,选用 1×10<sup>4</sup>/孔,接种到 96 孔板,均设 6 个复孔,分别在 24 h 和之后 5 h 转染并记录分时间点检测结果,给予 2.5 g/L 胰酶,将细胞完全消化后,在显微镜下计数;CCK-8 试验最终结果由酶联免疫检测仪测定。采用流式细胞仪及 Western blot 对 VSMC 凋亡及其核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 的表达

进行检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件包对获取数据进行统计分析,各项数据均重复测定 3 次以上,以  $\bar{x} \pm s$  表示,行  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 miRNA-146a 与 VSMC 增殖的关系** 镜下观察 7 d 后组

织块细胞达到 80% 以上融合,免疫荧光法鉴定细胞中  $\alpha$ -actin 表达呈阳性反应,VSMC 胞浆内可见大量颗粒状荧光,实验组 miRNA-146a 水平下降明显,表明 RNA 干扰成功。VSMC 增殖检测结果显示,实验组细胞在转染后 48 h 内 VSMC 的数目和吸光度值均低于其他两组,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同时间点 VSMC 的数目及吸光度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	VSMC 数目( $\times 10^3$ )			吸光度值(A)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
实验组	21.2 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	23.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	25.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
对照组	24.3 $\pm$ 1.7	30.3 $\pm$ 0.9	33.3 $\pm$ 1.0	0.55 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.08
正常组	25.5 $\pm$ 2.0	28.9 $\pm$ 2.0	31.5 $\pm$ 1.1	0.54 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.04

注:与其他两组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 miRNA-146a 与 VSMC 凋亡的关系** 干扰后 48 h, VSMC 凋亡检测结果显示,实验组的细胞凋亡率明显高于其他两组,核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 的表达水平低于其他两组,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 干扰后 48 h 3 组 VSMC 凋亡核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 的表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡(%)	$\kappa$ Bp65 表达水平	PCNA 水平
实验组	15.8 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
对照组	6.3 $\pm$ 1.4	0.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
正常组	7.7 $\pm$ 1.8	0.4 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1

注:与其他两组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨 论

首先对 miRNA 与内源性免疫系统的关系开展研究的是美国著名科学家 Baltimore,2006 年,他们用基因芯片技术检测了体外培养的人单核细胞系 THP-1 中的脂多糖刺激后的 miRNA 表达谱,对其差异进行研究。研究显示,miR-146a 水平在 200 多个 miRNA 中升高最为显著。除了脂多糖之外,单核细胞中的 miR-146a 的表达也能够通过 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  进行上调。调控免疫反应和炎症的重要信号通路是 TLR/NF- $\kappa$ B。他们对单核细胞应用 TLR3、TLR7、TLR9 的配体进行刺激,虽然在此过程中 miR-146a 没有明显变化,但 TLR2、TLR4、TLR5 的配体对 miR-146a 的表达有显著上调作用,该过程是 NF- $\kappa$ B 依赖性的。为了对 miR-146a 的靶基因进行进一步的研究,他们将 TLR 信号通路的 2 个重要的下游蛋白 TRAF6 和 IRAK1 的 3'UTR 报告载体系统与 miR-146a 的表达载体共同转染 293T 细胞,发现 TRAF6 和 IRAK1 的荧光素酶的活性下降明显,说明 miR-146a 的靶基因是 TRAF6 和 IRAK1,TRAF6 和 IRAK1 的表达被转录后的 miR-146a 水平所抑制<sup>[7]</sup>。此次研究是对 miR-146a 以 NF- $\kappa$ B 依赖的方式对 TLR 信号通路进行负调控的首次揭示,也是首次关于 miR-146a 调控炎症与免疫反应的研究,随后 miR-146a 在疾病发生、发展以及基因表达调控中的作用被陆续研究。

miRNA-145 是 miRNA 之一,其在正常血管壁和 VSMC 中表达较高,大鼠颈动脉球囊损伤后,新生内膜的形成可通过体内过表达 miRNA-145 予以抑制,从而有效减轻血管再狭窄的程度。miRNA-221 与 miRNA-145 的作用相反,在体外将外源性的 miRNA-221 转染人 VSMC,导致 VSMC 的分化标志减

少,进而使 VSMC 的增殖和迁移能力显著增加<sup>[8]</sup>。miRNA-221 和 miRNA-222 水平在大鼠颈动脉再狭窄模型中也发现有所升高,敲除 miRNA-221 和 miRNA-222 基因在体内外都会出现 VSMC 增殖减少,减轻血管再狭窄情况<sup>[9]</sup>。miRNA-146 是第一个被发现具有免疫系统调节作用的 miRNA,在炎症反应和固有免疫中发挥着重要作用,与自身免疫性疾病、脓毒血症、肿瘤等多种疾病的发生发展均有关联<sup>[10]</sup>。miRNA-146a 和 miRNA-146b 均为 miRNA-146 家族成员,两者具有大致相同的作用,目前研究大多数以 miRNA-146a 为主。miRNA-146a 是通过作用于 Toll 样受体信号通路来发挥对免疫和炎症反应的调节作用。炎症递质脂多糖和白细胞介素 1、肿瘤坏死因子  $\alpha$  等通过核因子  $\kappa$ B 依赖的途径可以促进 miRNA-146a 生成,miRNA-146a 结合靶细胞表面的肿瘤坏死因子  $\alpha$  相关因子 6 和白细胞介素 1 受体相关激酶 1,对核因子  $\kappa$ B 表达起到下调作用,参与炎症与免疫反应<sup>[11]</sup>。miR-146a 在心血管领域也发挥着重要的作用。相关研究发现外周血单个核细胞中 miRNA-146a 水平在急性冠脉综合征患者中显著升高;可以通过 T-bet 信号通路促进 Th1 细胞的分化来给予 miRNA-146a,并能对肿瘤坏死因子  $\alpha$  和核因子  $\kappa$ Bp65 的合成起到促进作用<sup>[12]</sup>。目前研究已经发现多个 miRNA 在 VSMC 中特异表达,并通过对 VSMC 的表型转化、增殖的调节参与动脉粥样硬化斑块和血管再狭窄的形成。相关研究显示,VSMC 在经皮冠状动脉介入后 24 h 开始增殖,整个增殖过程将持续 1 个月以上,增殖后会发生迁移,在 VSMC 增殖减弱后,新生内膜仍在继续增厚,细胞外基质的合成可持续到 12 周左右,表明细胞外基质的合成可应影响到血管介入治疗后再狭窄的形成<sup>[13]</sup>。在 VSMC 表型调控中,miRNA 起到重要作用,其中 miRNA-146a inhibitor 可呈剂量依赖的方式下调 VSMC 中的 miRNA-146a<sup>[14-15]</sup>。本次实验中,首先建立体外敲除 VSMC miRNA-146a 方法,将大鼠 VSMC 消化离心后,成功转染 50 nmol/L miRNA-146a 反义寡核苷酸、错义链和同等剂量 PBS,分别列为实验组、对照组和正常组,对照结果显示,实验组细胞在转染后 48 h 内 VSMC 的数目和吸光度值均明显低于其他两组,提示 miRNA-146a 对 VSMC 增殖有促进作用;干扰后 48 h,实验组的细胞凋亡率明显高于其他两组,核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 的表达水平低于其他两组,提示 miRNA-146a 对 VSMC 凋亡有抑制作用,分析认为可能与核因子  $\kappa$ Bp65 表达增加有关,至于其具体作用于哪些靶基因,目前尚不十分明确,有待进一步

研究。

综上所述,miRNA-146a 可促进 VSMC 的增殖,对细胞凋亡进行抑制,这一作用机制与核因子  $\kappa$ Bp65、PCNA 表达水平增高有关。miRNA-146a 通过对核因子  $\kappa$ Bp65 的上调作用,同时增殖细胞核抗原表达,促进 VSMC 的增殖和迁移,下调 Bax 表达来对 VSMC 的凋亡进行有效抑制,同时 miRNA-146a 可能对 NF- $\kappa$ B 表达的方式起到正反馈调控的作用,参与了动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄的病理过程。

参考文献

[1] 熊玮,董少红,袁建辉,等.微小 RNA-146a 影响血管平滑肌细胞增殖和凋亡的机制[J].中国组织工程研究,2012,20(20):3715-3719.

[2] 白雪玲,毛霞,张冰,等.CML28 在 K562 细胞增殖与凋亡调控中的作用研究[J].武警医学,2012,21(8):678-681.

[3] 汪靖,熊蓓.人  $\beta$ -珠蛋白小分子 RNAs 调控  $\gamma$ -珠蛋白基因表达及开关机制研究[J].新乡医学院学报,2015,10(1):19-23.

[4] 宋维文,安铁洙,王春生. microRNAs 在多能干细胞向心肌细胞分化中的作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2015,10(3):244-250.

[5] 刘立群,郭微,余文丹,等.漆黄素通过调节 Apaf-1,ERK 和 COX-2 信号通路诱导人宫颈癌细胞凋亡[J].中山大学学报(医学科学版),2013,1(1):75-82.

[6] 张志禹,冯娜,郭海涛,等. MicroRNAs 与心肌缺血/再灌注损伤关系的研究进展[J].心脏杂志,2013,25(2):234-237.

[7] Taganov KD,Boldin MP,Chang KJ,et al. NF- $\kappa$ B dependent induction of microRNA miR-146a,an inhibitor target-

ted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(33):12481-12486.

[8] Sayed D,Abdellatif M. Micrnas in development and disease[J]. Physiol Rev,2011,91(3):827-887.

[9] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet,2011,12(12):861-874.

[10] Kaikkonen MU,Lam MT,Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics[J]. Cardiovasc Res,2011,90(3):430-440.

[11] Curcio A,Torella D,Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting:approach to therapy[J]. Circ J,2011,75(6):1287-1296.

[12] 魏婷,曾迪,欧东波,等. Integrin  $\beta$ 1 在维生素 C 诱导小鼠诱导性多能干细胞向心肌样细胞分化中的作用[J].心脏杂志,2013,25(2):151-157.

[13] 王帅,朱建华. microRNA 在急性心肌梗死诊治中的研究进展[J].心脏杂志,2013,25(5):592-594.

[14] Duan LJ,Qi J,Kong XJ,et al. miR-133 modulates TGF-beta 1-induced bladder smooth muscle cell hypertrophic and fibrotic response:implication for a role of microRNA in bladder wall remodeling caused by bladder outlet obstruction[J]. Cell Signal,2015,27(2):215-227.

[15] 丁璐,李晓莉,曾迪,等. microRNA-1 和 microRNA-133 参与小鼠诱导多能干细胞向心肌的分化[J].心脏杂志,2015,27(6):634-638.

(收稿日期:2016-08-07 修回日期:2016-10-26)

(上接第 62 页)

染产生炎症,刺激机体分泌大量的 IL-6。大量的 IL-6 作用于肝脏,合成 CRP。本研究比较了脓毒血症患者和健康人群血清 IL-6 水平,脓毒血症患者 IL-6 水平显著高于健康人群,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),对脓毒血症的早期识别具有临床意义。

从实验结果分析,针对脓毒症患者,PCT、IL-6、CRP 3 种实验室检测项目,PCT 的敏感性和特异性最佳,为 83.2%和 82.1%,IL-6 和 CRP 相近,分别为 75.3%、72.4%和 41.3%、43.7%。联合应用的敏感性和特异性均明显高于单独检测,但 PCT+IL-6、PCT+CRP、PCT+IL-6+CRP 3 种联合检测组合的敏感性和特异性没有明显差异。所以,在应用中可以选

参考文献

[1] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.脓毒症定义及诊断的新认识[J].中国危重病急救医学,2004,16(6):321-324.

[2] Goodman RH,Jacobs JW,Habener JF. Cell-free translation of messenger RNA coding for a precursor of human

calcitonin[J]. Biochem Biophys Res Commun,1979,91(3):932-938.

[3] 彭伟波,付林.降钙素原在感染中的研究进展[J].医学临床研究,2012,29(4):748-751.

[4] 李志华,刘宣,葛勤敏,等. suPAR 及 PCT 对脓毒症患者病情严重程度及预后的评判价值[J].中华急诊医学杂志,2015,24(6):629-633.

[5] 宋崇明,鹿琼,李向东,等.感染性休克患者血清降钙素原的变化及临床干预[J].中华急诊医学杂志,2010,19(4):429-430.

[6] 贾向东.降钙素原及 C 反应蛋白在高龄慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者中的诊断价值[J].国际医药卫生导报,2015,21(17):2622-2623.

[7] 王佐岩,尚晓霞,李佳,等.血清降钙素原和 C 反应蛋白测定在心功能不全合并肺部感染患者中的临床价值[J].中国伤残医学,2015,23(20):22-24.

[8] 梁玉江.早期诊断新生儿败血症的实验室检测项目评价[J].现代检验医学杂志,2014,29(6):94-95.

(收稿日期:2016-08-16 修回日期:2016-11-05)