

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.017

文章编号: 1005-8982(2016)15-0091-07

论著

MicroRNA-599 对静脉曲张中血管平滑肌细胞去分化的影响及其机制研究

赵松峰, 胡灵, 杜丽苹

(郑州大学附属洛阳中心医院 血管外科, 河南 洛阳 471009)

摘要:目的 研究 microRNA-599(miR-599)在曲张静脉中的表达,探讨 miR-599 是否通过下调血小板源性生长因子 B(PDGF-BB),抑制曲张静脉中血管平滑肌细胞(VSMCs)去分化。**方法** 收集大隐静脉移植术患者中曲张静脉和正常静脉标本,通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 42 例曲张静脉组织及 39 例正常静脉组织中 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达;Western blot 检测两组标本中 SM-actin、SM-22、SM-MCH、OPN 的表达;在细胞实验中,转染 miR-599mimic 和 miR-NC 至离体培养的 VSMCs 中,Western blot 检测 VSMCs 中 SM-actin、SM-22、SM-MCH、OPN、PDGF-BB 的表达,噻唑蓝法测细胞增殖、划痕实验观察细胞迁移,利用荧光素酶试验验证 PDGF 是 miR-599 的靶基因。**结果** 相比于正常静脉组织,miR-599 在曲张静脉中的表达降低($F=73.012, P=0.001$)。两组 miR-146b、miR-200、miR-30、miR-155 的表达量比较,差异无统计学意义。相比于正常静脉组织,曲张静脉组织中 SM-actin、SM-22、SM-MCH 的表达降低($P<0.05$),OPN 的表达升高($F=56.414, P=0.009$);在细胞实验中,相比于对照组,miR-599 组 VSMCs 中 SM-actin、SM-22、SM-MCH 的表达升高($P<0.05$),OPN 的表达降低($F=27.353, P=0.022$),细胞增殖减少($F=37.824, P=0.016$),迁移减少($F=69.365, P=0.001$),PDGF 表达量减少($F=55.345, P=0.004$)。荧光素酶试验结果显示,miR-599 能够降低 PDGF-3'-UTR 质粒的荧光素活性($F=21.429, P=0.036$)。**结论** 在曲张静脉组织中,miR-599 低表达。在 VSMCs 中,miR-599 可以通过下调 PDGF-BB 而抑制 VSMCs 去分化。

关键词: 下肢静脉曲张;microRNA-599;血管平滑肌细胞;细胞分化

中图分类号: R654.4

文献标识码: A

MicroRNA-599 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation and its mechanism in varicose veins

Song-feng Zhao, Ling Hu, Li-ping Du

(Department of Vascular Surgery, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471009, China)

Abstract: Objective To verify whether microRNA-599 (miR-599) could inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) dedifferentiation by targeting platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in varicose veins. **Methods** Varicose veins and normal samples were collected from patients undergoing great saphenous vein transplantation surgery. qRT-PCR was used to test the expressions of miR-599, miR-200, miR-145, miR-146b and miR-155 in the varicose veins. Western blot was used to test the expressions of SM-actin, SM-22, SM-MCH and OPN. For *in vitro* experiment, after miR-599 was transfected into VSMCs, MTT was used to investigate the proliferation ability of VSMCs, wound healing was employed to test the migratory ability of VSMCs, Western blot was used to investigate the expressions of SM-actin, SM-22, SM-MHC, OPN and PDGF-BB in VSMCs. Luciferase assay was used to confirm whether PDGF-3'-UTR was the target gene of miR-599. **Results** Compared with the healthy control tissue, the expressions of miR-599, SM-actin, SM-22

and SM-MHC in the varicose veins were significantly decreased ($P < 0.05$); meanwhile the expression of OPN increased ($P < 0.01$). The result of the *in vitro* experiment showed that compared with the control group, the expressions of SM-actin, SM-22 and SM-MHC were increased in the miR-599 group ($P < 0.05$), and the expression of OPN and PDGF-BB decreased ($P < 0.05$). The luciferase activity of the PDGF-3'-UTR plasmid was suppressed by miR-599 ($P < 0.05$). **Conclusions** In varicose veins, the expression of miR-599 decreases. miR-599 inhibits VSMC dedifferentiation by targeting PDGF-3'-UTR.

Keywords: varicose vein; miR-599; VSMC; dedifferentiation

下肢静脉曲张是指下肢浅静脉系统过分迂曲、伸长和扩张,一般发生在大隐静脉,是血管外科常见病之一,其发病机制尚不清楚^[1-2]。相关文献报道显示,静脉曲张的病理生理基础为血管重塑,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)去分化在血管重塑过程中发挥重要作用^[3-6]。

MicroRNA(以下简称 miR)是一类长度为 18 ~ 25 个核苷酸的普遍存在于细胞中的非编码 RNA。miR 为单链 RNA 分子,来源于内源转录本,主要作用于靶基因 3' 非翻译区(3'-untranslated regions,3' UTR),引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译,从而调节靶基因的表达^[7]。研究证实,miR 还可以通过与靶基因的 5'-UTR 或开放读框序列结合发挥同样的作用^[8]。大量研究所证实,miR 在血管平滑肌细胞去分化中具有重要的调控作用,其中以 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的研究最为热门^[9-12]。但是上述 5 个 miR 在静脉曲张中的作用尚未阐明。

血小板源性生长因子 B(platelet derived growth factor-BB,PDGF-BB)是目前公认的,可以诱导 VSMCs 表型转化的一种生长因子^[13]。MARTIN^[14-15]和 WAGNER 等^[16]的研究发现,瑞舒伐他汀可以通过抑制 PDGF-BB 的表达从而抑制 VSMCs 的表型转化。

本实验拟通过实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测静脉曲张组织及对应正常静脉组织中 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达,筛选出与静脉曲张相关的 miRNA,并通过细胞离体实验进一步验证 miR-599 是否可以抑制 VSMCs 去分化及其作用机制是否为通过下调 PDGF-BB。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 8 月 -2015 年 6 月在郑州大学附属洛阳中心医院行大隐静脉移植术患者曲张静脉

(42 例)和正常静脉标本(39 例)。其中,男性 23 例,女性 19 例;年龄 45 ~ 76 岁,平均(54.0 ± 5.6)岁,样品采集后立即置入 -80℃冰箱冷冻保存,并经病理诊断证实。本研究中患者均签署知情同意书,并由郑州大学附属洛阳中心医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂 人血管平滑肌细胞 T/G HA-VSMC(上海钰博生物科技有限公司),达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium,DMEM)胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司),TaKaRa 逆转录试剂盒(大连宝生生物工程有限公司),限制性内切酶 BamHI、Xho I、T4 DNA 连接酶,无内毒素质粒小、大提取试剂盒,SYBR Green 荧光染料试剂盒(瑞士 Roche 公司),脂质体 2000(上海英骏公司),4,6-联脒-2-苯基吡啶(瑞士 Roche 公司),噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide,MTT](美国 Emresco 公司),兔或鼠抗人 SM-actin、SM-22、SM-MCH、OPN、PDGF-BB、肌动蛋白 β 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)、红色异硫氰酸荧光素(red fluorescein isothiocyanate,FRITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(美国 Jackson 公司),Western blot 检测相关试剂(江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.2.2 qRT-PCR 反应检测基因表达 提取曲张静脉和正常静脉组织中总 RNA,将提取的 RNA 进行逆转录成 cDNA,反应体系为 20 μl,反应条件为:16℃ 预变性 30 min,45℃ 变性 30 min,85℃ 退火 5 min。运用 SYBR Green 法检测 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达,反应条件为:94℃ 预变性 15 min,94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环,72℃ 继续延伸 8 min。每组样品重复 3 次,实验重复 3 次,统计分析曲张静脉和正常静脉组织中 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、

miR-155 的表达。其次,在质粒转染后将 VSMCs 分成空白对照组、过表达 miR-599 组和无效处理组 3 组,提取总 RNA,反转录 cDNA,用 SYBR Green 法,用 ABI PRISM 7500 自动荧光 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应检查 miR-599 mRNA 表达水平,每组样品重复 3 次,实验重复 3 次,设定阈值,测定平均的 Ct 值。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达量 提取曲张静脉和正常静脉组织中总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法定量蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳胶每孔加入 30 μ l 样品,70 V 30 min 进行蛋白浓缩,110 V 2 h 进行凝胶电泳,并用孔径 0.45 μ m 聚偏氟乙烯膜 250 mA 100 min 进行转膜。转膜后经常温下三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20,TBST)洗膜 3 次、封闭 1 h 后,以 1:1 000 浓度加入兔(鼠)抗人 SM-actin 一抗(或抗 SM-22、SM-MHC、OPN、PDGF-BB、肌动蛋白 β 一抗),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,常温下 TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记羊抗兔(鼠)二抗孵育后增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)检测。柯达胶片暗室显影,Quantity one 软件分析。其次,在质粒转染后将 VSMCs 分成空白对照组、过表达 miR-599 组和无效处理组 3 组,提取总蛋白,检测各组中 SM-actin、SM-22、SM-MHC、OPN、PDGF-BB、肌动蛋白 β 的表达。

1.2.4 转染细胞株 miR-599-mimic 由上海吉玛公司设计合成,miR-599-mimic 序列为,正向引物:5'-GUUGUGUCAGUUUVUCAAC-3',反向引物:5'-GUUGAUAAACUGACACAAC-3'。对照序列为,正向引物:5'-GUUGUGUCAGAUUVUCAAC-3',反向引物:5'-GAUUGAUAAUCUGACACAAC-3' 将 VSMC 细胞接种至 6 孔板,生长至 50%~70%密度时,以脂质体 2 000 分别转染 miR-599 mimic 或 mimic- 对照各 100 pmol 24 h 后,提取总 RNA 后 PCR 鉴定转染效率,进行后续实验。

1.2.5 MTT 法测 VSMCs 增殖 在质粒转染后将 VSMCs 分成空白对照组、过表达 miR-599 组和无效处理组 3 组,每组设 3 个复孔,2 个不加细胞的空白孔。细胞在各自条件下培养 24、48 和 72 h。培养结束后,每孔加入 MTT 液 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 下继续孵育 4~6 h,小心弃去培养上清液,每孔加入 150 μ l 改良 Eagle 培养基溶液,震荡 10 min,选择 492 nm 波长在酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值并记录。以时间

为横轴,吸光值为纵轴绘制各组 VSMCs 细胞生长曲线。

1.2.6 细胞划痕实验测 VSMCs 迁移 在质粒转染后将 VSMCs 分成空白对照组、过表达 miR-599 组和无效处理组 3 组。1.8 mmol/L 羟基脲作用 12 h 抑制细胞增殖,100 μ l 黄色枪头垂直孔板制造细胞划痕,吸掉细胞培养液,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)冲洗孔板 3 次。在相应的培养条件下培养细胞,拍照记录 0、12、24、48 和 72 h 图片,用 Image pro plus 6.0 软件分析计算细胞迁移面积,并以迁移面积和原划痕面积比值来表示各组 VSMCs 迁移的多少。

1.2.7 细胞免疫荧光法检测各组中 SM-actin 在细胞中的分布及表达 在质粒转染后将 VSMCs 分成空白对照组、过表达 miR-599 组和无效处理组 3 组。PBS 洗 3 遍,用 4%多聚甲醛固定,0.25% Triton X 100 穿破细胞膜,山羊血清室温封闭 1 h,加入稀释 250 倍的 anti-SMA 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 清洗 3 遍,加入结合有异硫氰酸荧光素的山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 遍,荧光显微镜拍照后图片用 Image pro plus 6.0 分析。

1.2.8 荧光素酶试验 设计合成 PDGF-BB-3'-UTR 的序列及突变序列,以 PDGF-BB 质粒为载体,分别构建能够表达荧光素酶的包含 PDGF-BB-3'-UTR 和 PDGF-BB-3'-UTR 突变序列的质粒,然后将 VSMCs 按每孔 1×10^5 接种至 24 孔板,24 h 后以脂质体 2 000 共转染 200 ng 包含 PDGF-BB-3'-UTR 或 PDGF-BB-3'-UTR 突变序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒,以及 60 pmol miR-599-mimic 或对照,48 h 后用荧光检测仪检测荧光强度,海肾荧光作为内参照,每组实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSMC 去分化相关的 miRNAs 和蛋白质在曲张静脉和正常静脉组织中的表达

qRT-PCR 反应检测曲张静脉和正常静脉组织中 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达,结果发现,曲张静脉组织中 miR-599 的表

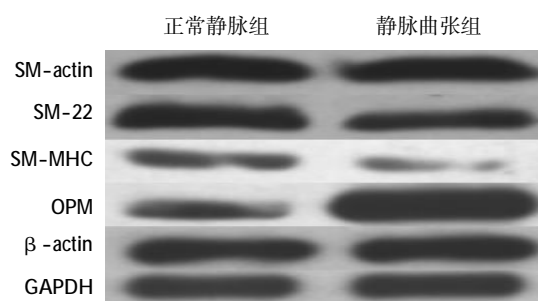
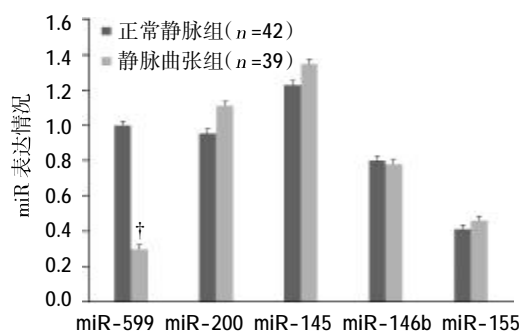
达低于正常静脉组织 ($F=73.012, P=0.001$) (见图 1A)。两组 miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达量比较, 差异无统计学意义。Western blot 检测曲张静脉和正常静脉组织中 SM-actin、SM-22、SM-MCH、OPN 的表达, 相对正常静脉组织, 曲张静脉组织中 SM-22、SM-MCH 表达减少, OPN 表达增多 ($F=56.414, P=0.009$); 两组 SM-actin 表达比较, 差异无统计学意义 (见图 1B)。

2.2 miR-599 对 VSMCs 增殖和迁移的影响

miR-599minic 转染 VSMCs 后, Real-time qPCR

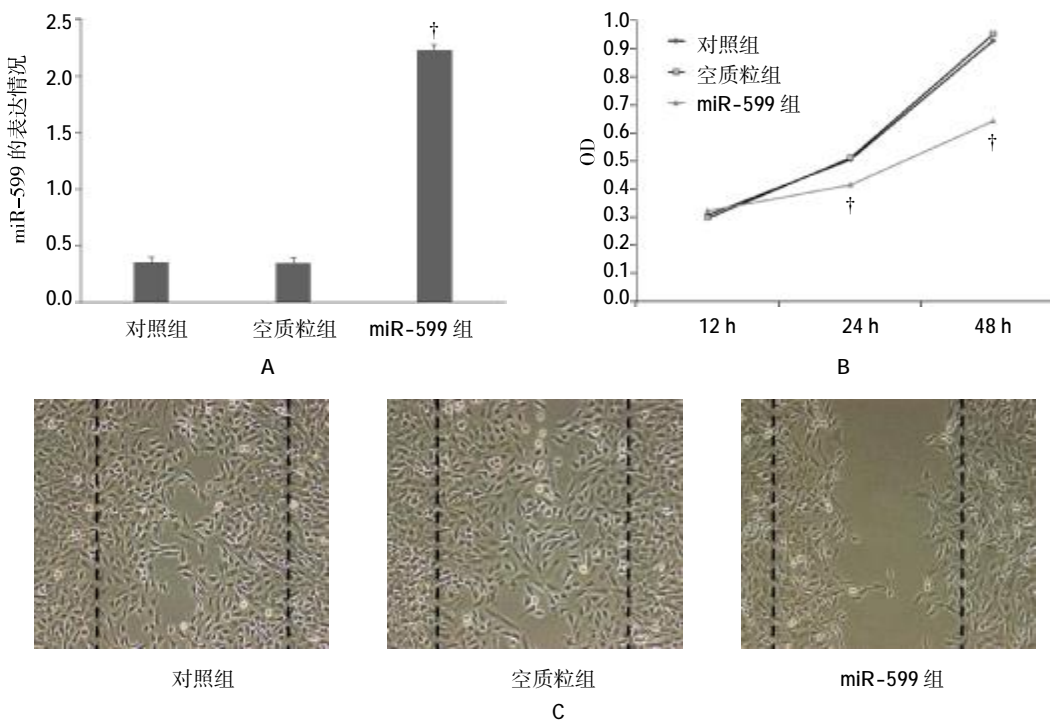
反应检测发现, 过表达 miR-599 组中 miR-599 的表达较对照组和空质粒升高 ($F=65.753, P=0.001$) (见图 2A)。12 h 时 3 组 VSMCs 的增殖比较, 差异无统计学意义; 干预 24 h 后, 相比于对照组和空质粒组, miR-599 组中 VSMCs 增殖减少 ($F=37.824, P=0.0161$) (见图 2B)。干预 48 h 后, 相比于对照组和空质粒组, miR-599 组中 VSMCs 迁移减少, 差异有统计学意义 ($F=69.365, P=0.001$) (见图 2C)。

2.3 miR-599 对 VSMCs 中 SM-actin、SM-22、SM-MCH、OPN、PDGF-BB 表达的影响



A: 曲张静脉和正常静脉组织中 VSMC 去分化相关的 5 种 miRNAs 表达; B: 曲张静脉和正常静脉组织中 VSMC 去分化相关标志蛋白的表达; † 与正常静脉组比较, $P < 0.01$

图 1 曲张静脉和正常静脉组织中 VSMC 去分化相关的 miRNAs 以及蛋白质表达



A: 转染 miR-599minic 后, VSMCs 中 miR-599 表达增多; B: MTT 法显示, miR-599 抑制 VSMCs 增殖; C: 划痕实验显示, 加入 miR-599minic 48 h 后各组 VSMCs 的迁移; † 与空质粒组比较, $P < 0.01$

图 2 MiR-599 抑制 VSMCs 的增殖和迁移

miR-599mimic 转染 VSMCs 后,Western blot 检测发现,相比于对照组和空质粒组,miR-599 组 VSMCs 中 SM-22、SM-MHC 表达增多,OPN 表达减少($F=27.353, P=0.022$)。3 组 SM-actin 表达比较,差异无统计学意义。见图 3。

2.4 miR-599 对 VSMCs 形态的影响

MiR-599mimic 转染 VSMCs 后,免疫荧光结果显示,miR-599 组 VSMCs 形态细长,呈典型的血管平滑肌细胞形态,对照组和空质粒组中平滑肌细变圆变宽,失去原有的细胞形态。见图 4。

2.5 miR-599 通过识别 3'-UTR 抑制 PDGF-BB 的表达

分别构建包含 PDGF-BB-3'-UTR 和其突变序列的荧光素酶质粒(见图 5A),与 miR-599-mimic 对照共转 VSMCs 细胞,培养 24 h 后,检测各组细胞荧光素酶活性,结果显示,miR-599-mimic+WT-PDGF-

BB-3'-UTR 组荧光素酶活性低于空质粒 +WT-PDGF-BB-3'-UTR 组($F=21.429, P=0.036$)(见图 5B)。Western blot 检测结果显示,相比于对照组和空质粒组,miR-599 组 VSMCs 中 PDGF-BB 表达降低($F=55.345, P=0.004$)(见图 5C)。

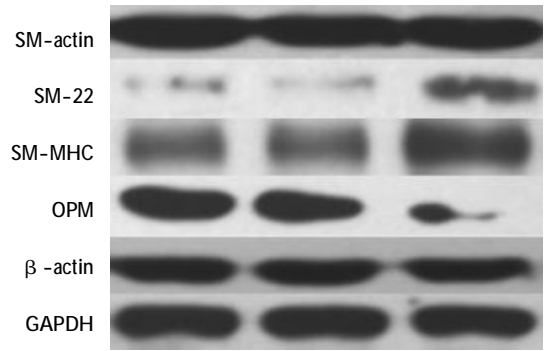
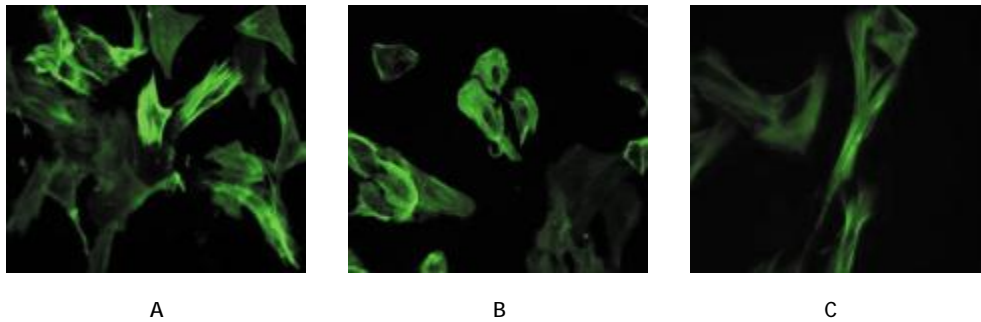
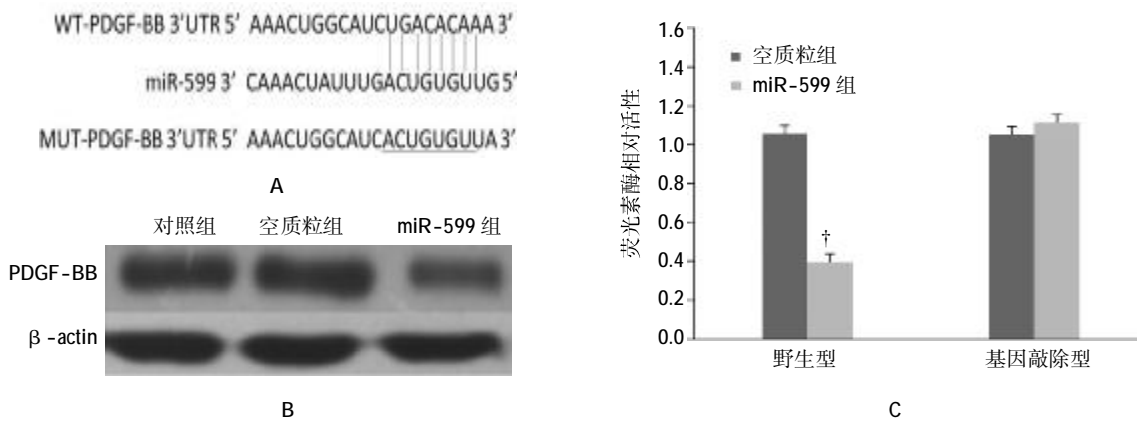


图 3 MiR-599 对 VSMCs 中细胞分化状态标志蛋白表达的影响



A: 对照组; B: 空质粒组; C: miR-599 组

图 4 细胞免疫荧光法观察各组的细胞形态 (× 200)



A: miR-599 结合 PDGF-BB mRNA 的机制; B: 荧光素酶实验结果显示, miR-599 可以靶向结合 PDGF-BB; C: miR-599 下调 PDGF-BB 的表达; † 与空质粒组比较, $P < 0.01$

图 5 miR-599 通过识别 3'-UTR 抑制 PDGF-BB 的表达

3 讨论

在不同的外界因素影响下, VSMCs 处于不同的

分化状态, 具有很强的可塑性。在正常血管膜中的 VSMCs 是一种高分化的细胞, 细胞形态呈梭形, 主要起维持血管形状和收缩血管的作用, 具有低增殖、

低迁移、低蛋白分泌等特征^[17-18]。当发生动脉粥样硬化、静脉扩张、动脉瘤等血管疾病时,VSMCs 可以去分化为未分化成熟的细胞,形态变圆,细胞收缩性能下降,表现出高增殖、高迁移、高蛋白分泌等特征^[19-22]。

静脉曲张时静脉管腔明显扩张,局部管壁厚薄不均,管壁硬度增加而顺应性减低,目前认为血管重塑是静脉曲张的基本病理生理过程^[23]。VSMCs 去分化作为血管重塑的关键和始动环节,在静脉曲张的发生、发展发挥重要的调节作用。JIANG 等^[21]发现在静脉曲张发生时,位于静脉管壁的收缩型 VSMCs 去分化为合成型细胞。本实验结果显示,静脉曲张组织中 SM-22、SM-MCH 等 VSMCs 分化状态标志性蛋白表达减少,而合成型细胞标志蛋白 OPN 表达增多,同样证实静脉曲张的病理机制中有 VSMCs 去分化的参与。

miR 是一类进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA,越来越多的证据显示,miR 参与对细胞增殖、迁移和细胞表型的调控^[24]。目前经证实的与 VSMCs 去分化相关的 miR 主要包括:miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155、miR-146a、miR-133、miR-221、miR-222、miR-21 和 miR-143^[13]。在大鼠 VSMCs 离体实验中,miR-143 和 miR-145 表达量较高,加入 PDGF-BB 后,这两种 miR 表达量骤减。在用球囊损伤血管后,miR-143 和 miR-145 基因敲除的小鼠 VSMCs 分化受阻,说明上述 miR 在血管损伤后的修复过程中发挥重要作用^[25]。CHENG 等^[26]的实验进一步探明 miR-145 是通过抑制 KLF5 的表达,从而减少球囊损伤后血管中 VSMCs 的增殖和迁移。最近 XIE 等^[9]的研究在细胞和动物两个层面证实 miR-599 是通过靶向结合 TGF- β II 受体基因,从而抑制 VSMCs 的增殖。本实验结果显示,miR-599 在静脉曲张组织中表达减少,并进一步在离体实验中证实 miR-599 可以抑制 VSMCs 的增殖、迁移及去分化。

PDGF-BB 是最早发现的一种可以促进 VSMCs 去分化的因素,是一种较强的促有丝分裂因子,具有促增殖和迁移的生物活性,能引起 VSMCs 的合成及分泌功能增强^[27]。PDGF-BB 通过诱导特定 DNA 的表达或沉默,最终导致 VSMCs 去分化。分化成熟的 VSMC 合成和分泌 PDGF-BB 的能力很弱。目前已知 PDGF-BB 主要通过 MKK6/p38 和 MAPKMEK1/ERK 两条途径发挥促 VSMCs 去分化的作用^[28]。笔者用荧

光素酶实验进一步发现,miR-599 是通过与 PDGF-BB-3'-UTR 靶向结合,减少 PDGF-BB 的表达,从而发挥其抑制 VSMCs 去分化的作用。

本实验通过 qRT-PCR 反应检测静脉曲张组织及正常静脉组织中 miR-599、miR-200、miR-145、miR-146b、miR-155 的表达,发现 miR-599 在静脉曲张组织中表达减少,同时发现静脉曲张组织中 PDGF-BB 的表达增加,VSMCs 分化表型的标志性蛋白表达减少。在离体实验中证实 miR-599 可以抑制 VSMCs 增殖、迁移、去分化,并进一步通过荧光素酶实验发现其机制是通过靶向抑制 PDGF-BB 的表达,为阐明静脉曲张的发病机制提供新的思路。

参 考 文 献:

- [1] HAMDAN A, LIVINGSTON E H, LYNN C. JAMA patient page. treatment of varicose veins[J]. *Jama*, 2013, 309(12): 1306.
- [2] 田庆刚,刘瑞,张生彬.大隐静脉曲张腔内激光治疗与传统手术的对比研究[J].*中国现代医学杂志*,2012,1:77-79.
- [3] XIAO Y, HUANG Z, YIN H, et al. Desmuslin gene knockdown causes altered expression of phenotype markers and differentiation of saphenous vein smooth muscle cells[J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(3): 684-690.
- [4] PFISTERER L, MEYER R, FELDNER A, et al. Bortezomib protects from varicose-like venous remodeling[J]. *Faseb J*, 2014, 28(8): 3518-3527.
- [5] JIANG H, LUN Y, WU X, et al. Association between the hypomethylation of osteopontin and integrin beta3 promoters and vascular smooth muscle cell phenotype switching in great saphenous varicose veins[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18747-18761.
- [6] HUANG X, JIN Y, ZHOU D, et al. IQGAP1 promotes the phenotypic switch of vascular smooth muscle by myocardin pathway: a potential target for varicose vein[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6475-6485.
- [7] IWAKAWA H O, TOMARI Y. The Functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(11): 651-665.
- [8] LITTLE J R, YARIO T A, STEITZ J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3'-UTR[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(23): 9667-9672.
- [9] XIE B, ZHANG C, KANG K, et al. MiR-599 inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and migration by targeting TGF-B2[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0141512.
- [10] ZHENG B, BERNIER M, ZHANG X H, et al. MiR-200c-SUMOylated KLF4 feedback loop acts as a switch in transcriptional programs that control VSMC proliferation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 82: 201-212.

- [11] WANG H, JIANG M, XU Z, et al. MiR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12901-12907.
- [12] CSAK T, BALA S, LIPPAI D, et al. MicroRNA-155 deficiency attenuates liver steatosis and fibrosis without reducing inflammation in a mouse model of steatohepatitis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): DOI: 10.1371/journal.pone.0129251.
- [13] LI P, ZHU N, YI B, et al. MicroRNA-663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation[J]. *Circ Res*, 2013, 113(10): 1117-1127.
- [14] MARTIN K A, MERENICK B L, DING M, et al. Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 36112-36120.
- [15] MARTIN K A, RZUCIDLO E M, MERENICK B L, et al. The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(3): 507-517.
- [16] WAGNER R J, MARTIN K A, POWELL R J, et al. Lovastatin induces VSMC differentiation through inhibition of Rheb and mTOR[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(1): 119-127.
- [17] 魏兵, 刘亚丽, 张超, 等. 神经激肽 -1 受体拮抗剂 WIN62577 对哮喘气道重塑大鼠气管平滑肌细胞迁移的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 11: 1248-1252.
- [18] 季军, 潘一峰, 何霞, 等. 超声靶向转染 c-myc 基因的反义核酸抑制兔髂动脉平滑肌细胞增生的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 2: 32-36.
- [19] LIU R, LESLIE K L, MARTIN K A. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 4 (1849): 448-453.
- [20] CHISTIakov D A, OREKHOV A N, BOBRYshev Y V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 214(1): 33-50.
- [21] JIANG H, LUN Y, WU X, et al. Association between the Hy-pomethylation of osteopontin and integrin beta3 promoters and vascular smooth muscle cell differentiation in great saphenous varicose veins[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18747-18761.
- [22] AILAWADI G, MOEHLE C W, PEI H, et al. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(6): 1392-1399.
- [23] PIAZZA G. Varicose veins[J]. *Circulation*, 2014, 130(7): 582-587.
- [24] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-220.
- [25] CORDES K R, SHEEHY N T, WHITE M P, et al. MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 705-710.
- [26] CHENG Y, LIU X, YANG J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2009, 105(2): 158-166.
- [27] GOMEZ D, OWENS G K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 156-164.
- [28] AUSTIN K M, NGUYEN N, JAVID G, et al. Noncanonical matrix metalloprotease-1-protease-activated receptor-1 signaling triggers vascular smooth muscle cell dedifferentiation and arterial stenosis[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 23105-23115.

(童颖丹 编辑)