

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.14.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 14-0036-10

实验研究·论著

内含子源性27nt-microRNA对大鼠血管平滑肌细胞表型转换的影响及其机制研究*

周炜潜¹, 罗雪兰¹, 王光耀², 黄凤¹, 欧和生¹

(广西中医药大学附属国际壮医医院 1. 壮瑶医药研究实验室, 2. 心血管内科, 广西南宁 530201)

摘要: 目的 探讨内含子源性27nt-miRNA(27nt-miR)对血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)表型转换的影响及其分子机制。**方法** 用27nt-miR表达慢病毒转染培养的VSMCs,观察其对PDGF-BB诱导的VSMCs表型转换的影响;将细胞分为对照组、PDGF-BB诱导组、27nt-miR组、27nt-miR-sponge组及27nt-miR NC组(27nt-miR NC组)。雷帕霉素(100 nmol/L)与MHY-1485(10 μ mol/L)作用于27nt-miR组、27nt-miR-sponge组及27nt-miR NC组,以验证27nt-miR是否参与mTOR与p70S6k通路的调控。用生物信息学预测27nt-miR与mTOR的靶向结合位点,用CCK-8法与EdU法分别测定VSMCs活力与增殖情况,划痕试验测定VSMCs迁移能力,实时荧光聚合酶链反应检测 α -SMA、SM22 α 及OPN mRNA表达,Western blotting检测 α -SMA、SM22 α 、OPN、mTOR、p-mTOR、p70S6k与p-p70S6k蛋白表达。**结果** CCK-8法结果显示,PDGF-BB诱导组细胞增殖率较正常值高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);27nt-miR组细胞增殖率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。PDGF-BB诱导组细胞迁移率较对照组高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);27nt-miR组细胞迁移率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组细胞迁移率与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。EdU法结果显示,PDGF-BB诱导组细胞增殖率较对照组高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组细胞增殖率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);27nt-miR组细胞增殖率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。PDGF-BB诱导组 α -SMA mRNA相对表达量较对照组低($P < 0.05$),两组SM22 α 与OPN mRNA相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组 α -SMA、SM22 α 、OPN mRNA相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);27nt-miR组 α -SMA、SM22 α mRNA相对表达量较27nt-miR NC组高($P < 0.05$),OPN mRNA相对表达量较27nt-miR NC组低($P < 0.05$);27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组 α -SMA、SM22 α mRNA相对表达量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),27nt-miR-sponge组OPN mRNA相对表达量较27nt-miR NC组高($P < 0.05$)。PDGF-BB诱导组 α -SMA、SM22 α 蛋白相对表达量较对照组低($P < 0.05$);27nt-miR NC组、PDGF-BB诱导组OPN蛋白相对表达量较27nt-miR组高($P < 0.05$);27nt-miR组 α -SMA、SM22 α 蛋白相对表达量较27nt-miR NC组高($P < 0.05$),OPN蛋白相对表达量较27nt-miR NC组低($P < 0.05$);27nt-miR组p70S6k、p-p70S6k与p-mTOR蛋白相对表达量较27nt-miR NC组低($P < 0.05$);各组经雷帕霉素处理后,27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组各蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。27nt-miR组p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR蛋白相对表达量较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组p-p70S6k、mTOR、p-mTOR蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组经MHY-1485处理后,27nt-miR组p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR蛋白相对表达量较27nt-miR NC组低($P < 0.05$);27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组各蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

收稿日期: 2023-07-13

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82060655)

[通信作者] 欧和生, E-mail: 2676611767@qq.com, Tel: 19977107668

意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 27nt-miR 可能通过靶向 mTOR/p70S6k 信号通路从而调节大鼠血管平滑肌细胞增殖活力、增殖、迁移与表型转换。

关键词 : 27nt-microRNA ; 血管平滑肌细胞 ; mTOR/p70S6k 信号通路 ; 表型转换

中图分类号 : R543

文献标识码 : A

Effect and mechanism of intron-derived 27-nt microRNA on phenotypic switch of rat vascular smooth muscle cells*

Zhou Wei-qian¹, Luo Xue-lan¹, Wang Guang-yao², Huang Feng¹, Ou He-sheng¹

(1. Zhuang and Yao Medical Research Laboratory, 2. Department of Cardiovascular Medicine, International Zhuang Medical Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530201, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of intron-derived 27-nt microRNA (27nt-miR) on the phenotypic switch of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). **Methods** VSMCs were transduced with 27nt-miR-expressing lentiviruses and their effects on phenotypic switch of VSMCs induced by PDGF-BB was observed. The cells were divided into control group, PDGF-BB induction group, 27nt-miR group, 27nt-miR-sponge group and 27nt-miR negative control (27nt-miR NC) group. The 27nt-miR group, 27nt-miR-sponge group and 27nt-miR NC group were subjected to rapamycin (100 nmol/L) and MHY1485 (10 μ mol/L) to verify the involvement of 27nt-miR in the regulation of mTOR and p70S6k pathways. The target binding sites of 27nt-miRNA and mTOR were predicted by bioinformatics. The viability and proliferation of VSMCs were determined by CCK-8 and EdU cell proliferation assays. The migration ability of VSMCs was determined by the scratch assay. The relative mRNA expressions of α -SMA, SM22 α and OPN were detected by qRT-PCR. The relative protein expressions of α -SMA, SM22 α , OPN, mTOR, p-mTOR, p70S6k and p-p70S6k were detected by Western blotting. **Results** The CCK-8 assay revealed that the cell proliferation rate in the PDGF-BB induction group was higher than normal ($P < 0.05$), while there was no difference in the cell proliferation rate between the 27nt-miR NC group and the PDGF-BB induction group ($P > 0.05$). The cell proliferation rate in the 27nt-miR group was lower than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$), while there was no difference in the cell proliferation rate between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC group ($P > 0.05$). The cell migration rate in the 27nt-miR group was lower than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$), while there was no difference in the cell migration rate between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC group ($P > 0.05$). The EdU cell proliferation assay demonstrated that the cell proliferation rate in the PDGF-BB induction group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), while there was no difference in the cell proliferation rate between the 27nt-miR NC group and the PDGF-BB induction group ($P > 0.05$). The cell proliferation rate in the 27nt-miR group was lower than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$), while there was no difference in the cell proliferation rate between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC group ($P > 0.05$). The relative mRNA expression of α -SMA in the PDGF-BB induction group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), whereas there was no difference in the relative mRNA expressions of SM22 α and OPN between the two groups ($P > 0.05$). The relative mRNA expressions of α -SMA, SM22 α and OPN were not different between the 27nt-miR NC group and the PDGF-BB induction group ($P > 0.05$). The relative mRNA expressions of α -SMA and SM22 α in the 27nt-miR group were higher than those in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$), while the relative mRNA expression of OPN in the 27nt-miR group was lower than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). There was no difference in the relative mRNA expressions of α -SMA and SM22 α between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC group ($P > 0.05$). The relative mRNA expression of OPN in the 27nt-miR-sponge group was higher than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of α -SMA and SM22 α in the PDGF-BB induction group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The relative protein expression of OPN in the 27nt-miR NC group and the PDGF-BB induction group was higher than that in the 27nt-miR group ($P < 0.05$). The relative protein expressions

of α -SMA and SM22 α in the 27nt-miR group were higher than those in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). The relative protein expression of OPN in the 27nt-miR group was lower than that in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of p70S6k, p-p70S6k and p-mTOR in the 27nt-miR group were lower than those in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). After treatment with rapamycin, the relative expressions of all the proteins were different among the groups ($P < 0.05$). The relative protein expressions of p70S6k, p-p70S6k, mTOR and p-mTOR in the 27nt-miR group were lower than those in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). There were differences in the relative protein expressions of p-p70S6k, mTOR and p-mTOR between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). After treatment with MHY-1485, the relative protein expressions of p70S6k, p-p70S6k, mTOR and p-mTOR in the 27nt-miR group were lower than those in the 27nt-miR NC group ($P < 0.05$). The relative expressions of all the proteins were different between the 27nt-miR-sponge group and the 27nt-miR NC ($P < 0.05$).

Conclusion The 27nt-miR may regulate the viability, proliferation, migration and phenotypic switch of rat VSMCs by targeting the mTOR/p70S6k signaling pathway.

Keywords: 27nt-miRNA; vascular smooth muscle cells; mTOR/p70S6k signaling pathway; phenotype switch

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 是血管壁中层的主要构成细胞之一, 在生理状态下对维持血管稳态起着重要作用。正常且成熟的血管中, VSMCs 处于一种高度静止的舒缩表型, 其与收缩标志蛋白如 α -平滑肌肌动蛋白 (smooth muscle actin α , α -SMA) 和平滑肌 22 α (transgelin/smooth muscle 22 α , SM22 α) 升高相关。但 VSMCs 在受到损伤刺激时发生表型变化, 通过下调 VSMCs 收缩标志物的基因表达并上调骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 合成蛋白表达, 可从收缩表型变为高度增殖与迁移的合成表型, 而细胞表型转换是 VSMCs 增殖和迁移的基础步骤, 后者长期过多反应可引起血管壁发生病理改变, 是多种心血管疾病如动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS)、高血压等发生、发展的关键性环节^[1-3]。

近来资料显示, microRNA (miRNA) 是一类长度约 22 nt 的小分子单链核糖核酸, 在后生动物中高度保守且不翻译成蛋白质, 但发挥调控基因转录后翻译表达的重要作用, 其功能之一是通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号途径的调控, 参与血管壁细胞增殖活力、增殖及迁移等表型转换的过程, 而 mTOR 是诸如生长、迁移与分化等细胞生理、过程的重要调控因子^[3-5]。相关研究发现, 在血管损伤反应中活化的炎症细胞、血小板和 VSMCs 释放生长因子, 尤其是血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 在 VSMCs 表型改变中扮演必要的角色, 其中 PDGF-BB 被认为是 VSMC 增殖和迁移最有效的刺激因素之一^[4]。令人感兴趣的是, 本课题组前期研究

发现, 一种源自内皮型一氧化氮合酶基因第 4 内含子中 27 碱基长度重复序列片段的的内含子源性 miRNA (命名为 27nt-miRNA), 对其本位基因表达具有反馈性调节作用, 并对血管壁细胞 (如 VSMCs) 的生理功能与病理改变有明显的调节作用^[6-10]。然而 27nt-miRNA 参与调控 PDGF-BB 诱导 VSMCs 细胞增殖、迁移等表型转换的分子机制尚未明确。本文探究内含子源性 27nt-miRNA 对 VSMCs 特异性基因表达的调控、细胞表型转换及其与 mTOR/70 道尔顿核糖体蛋白 S6 激酶 (70kDa ribosomal protein S6 kinase, p70S6k) 信号通路的关联。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂与仪器

大鼠胸主动脉平滑肌细胞 (A7r5 细胞株) (武汉普诺赛生命科技有限公司)。DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 0.25% 胰蛋白酶-EDTA、青链霉素混合液 (100X)、PMSF、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、TBST 缓冲液 (北京索莱宝生物科技有限公司), 胎牛血清 (广州赛业生物科技有限公司), 慢病毒载体 (上海恒生物科技有限公司), 重组 PDGF-BB (北京 Perprotech 公司), 雷帕霉素与 MHY-1485 (美国 GLPbio 公司), CCK-8 试剂盒 (美国 MCE 公司), Apollo 567 (EdU) 体外成像试剂盒 (广州锐博公司), 兔抗 p70S6k、SM22 α 、OPN 与 GAPDH 内参 (武汉三鹰公司), 兔抗 mTOR 与 p-mTOR (Ser2448) (美国 CST 公司), 兔抗 α -SMA (武汉 ABclonal 公司), 兔抗 p-p70S6k (Thr389) (美国赛默飞公司), 山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Affinity 公司), Monzol RNA 提取试剂盒、逆

转录试剂盒、高特异性化学热修饰 qPCR mix、预染蛋白 Marker (10 ~ 250 KDa)、Any-KD PAGE Gel 制备试剂盒、High sensitive ECL 显影液均购自武汉莫纳生物科技有限公司, RIPA 裂解液 (北京 Invent 公司), 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、Quick Block WB 一抗稀释液、Quick Block WB 二抗稀释液、Quick block 快速封闭液、SDS-PAGE 快速电泳液、Western 快速转膜液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯公司), 倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司), A300 型 PCR 梯度仪 (杭州朗基科学仪器有限公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司), Bio-Rad 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), 迷你转印槽 (北京韦克斯公司), 恒温细胞培养箱 (日本三洋公司), Multiskan SkyHigh 酶标仪 (美国赛默飞公司), Image Quant 800 超灵敏凝胶成像仪 (美国 AMERSHAM 公司), 所用引物由上海生工生物工程股份有限公司根据设计合成。

1.2 方法

1.2.1 27nt-miRNA 慢病毒载体的构建 以内含子源性 27nt-miR 序列 (5'-GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGTGAG-3') 构建 27nt-miR 前体过表达慢病毒载体, 并以该序列构建 miRNA-sponge 封闭慢病毒载体, 阴性对照随机序列构建 27nt-miR NC 慢病毒载体。根据试剂盒说明书应用 PCR 技术获取目的基因片段, 通过基因重组技术以 pHBLV-CMV-ZsGreen-T2A-Puro 为目的载体, 经 XhoI/Miui 双酶切后转染 293T 细胞, 浓缩得到目标慢病毒载体。病毒载体上含有绿色荧光蛋白和嘌呤霉素抗性蛋白, 在倒置相差荧光显微镜下可观察绿色荧光表达并用嘌呤霉素筛选得到稳定转染株。

1.2.2 细胞培养、感染与实验分组 将 A7r5 细胞株在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基中培养, 在 37 °C、5% 二氧化碳的湿润空气中生长至 80% ~ 90% 合流的细胞, 以 1:2 比例传代。选择传代数较低且生长情况较好的 VSMC 进行慢病毒转染, 将细胞以每孔 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁生长后选择最适病毒感染复数=10 转染 VSMCs, 采用半体积转染法 4 h 后补满培养基, 24 h 后更换新鲜完全培养基。使用 2 nmol/L 嘌呤霉素筛选转染细胞 48 h。将细胞分为

对照组、PDGF-BB 诱导组、27nt-miR 组、27nt-miR-sponge 组、阴性对照组 (27nt-miR NC 组)。对照组给予普通培养, PDGF-BB 诱导组给予 20 ng/mL PDGF-BB 处理 VSMCs 24 h, 其余各组细胞均先转染相应慢病毒载体后, 再给予 PDGF-BB 处理细胞 24 h。另外, 27nt-miR 组、27nt-miR-sponge 组和 27nt-miR NC 组在给予 PDGF-BB 处理细胞 24 h 后分别使用 100 nmol/L 雷帕霉素 (mTOR 特异性抑制剂) 和 10 μmol/L MHY-1485 (mTOR 特异性激活剂) 恒温培养处理 24 h, 抑制/促进通路活化。

1.2.3 CCK-8 法检测 VSMCs 细胞增殖 将细胞以每孔 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中, 设 5 个复孔, 待细胞贴壁后, 使用 CCK-8 试剂盒, 按照制造商的说明进行 VSMCs 增殖检测, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值。细胞增殖率 (%) = (实验组 A450 值 - 调零组 A450 值) / (对照组 A450 值 - 调零组 A450 值) × 100%。

1.2.4 EdU 法检测 VSMCs 细胞增殖 按照试剂盒说明进行操作, 用 EdU 掺入法评估 VSMCs 增殖, 使用 Apollo 567 体外成像试剂盒检测 DNA 合成。核 DNA 用 Hoechst 33342 反染色, 镜下为蓝色荧光。EdU 阳性图像用荧光显微镜采集, 镜下为红色荧光。增殖率 (%) = EdU 阳性数 / 核 DNA 染色数 × 100%。

1.2.5 划痕试验检测 VSMCs 细胞迁移 使用划痕试验测定细胞迁移能力, 将细胞以每孔 1×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板中。培养细胞至融合状态后用吸头垂直划出一条竖直横线, PBS 洗 1 ~ 2 次, 将其加入低血清培养基 (1% FBS)、5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h。分别于 0、24 h 在显微镜下观察细胞迁移情况。迁移率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 × 100%。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 α-SMA、SM22α、OPN mRNA 表达 将细胞以每孔 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后按照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组 VSMCs 总 RNA, 并进行逆转录和 qRT-PCR 检测。mRNA 表达测定以 GAPDH 为内参。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火并延伸 30 s, 共 40 个循环。使用仪器默认程序采集溶解曲线, 随后终止反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
α-SMA	正向: 5'-TTGAGAAGAGTTACGAGTTG-3'	20
	反向: 5'-AGGACATTGTTAGCATAGAG-3'	20
SM22α	正向: 5'-ACCCACCCTCCATGGTCTTC-3'	20
	反向: 5'-CTTATGCTCCTGCGCTTCT-3'	20
OPN	正向: 5'-GACGATGATGACGACGACGATGAC-3'	24
	反向: 5'-GTGTGCTGGCACTGAAGGACTC-3'	22
GAPDH	正向: 5'-GATGACATCAAGAAGGTGCTGA-3'	22
	反向: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'	23

1.2.7 Western blotting检测蛋白表达 收集并裂解6孔板中的各组细胞,加入适量PMSF及蛋白磷酸酶抑制剂混合物裂解液于冰上裂解30 min。以4℃、8 500 r/min离心10 min,取上清液,应用BCA法测定各组蛋白浓度并配平浓度后,加入上样缓冲液100℃煮沸5 min变性。分别取各组30 μg蛋白量上样进行SDS-PAGE电泳、PVDF转膜,快速封闭液封闭15 min,分别加入相应一抗稀释液(1:1 000),4℃孵育过夜。翌日使用TBST缓冲液洗2次,7 min/次。加入二抗(1:5 000),室温避光孵育1 h, TBST缓冲液洗2次,7 min/次。以GAPDH为内参,用超灵敏凝胶成像仪分析蛋白电泳条带的灰度值,结果使用Image J图像分析软件分析蛋白的表达量。

1.2.8 生物信息学分析靶mRNA 基于碱基互配对原则与热力学原则,使用RNAhybrid 2.2软件对27nt-miR与mTOR mRNA 3'-UTR非翻译区进行自由能结合进行分析,大鼠mTOR的mRNA 3'-UTR序列来源于Target Scan数据库。

1.3 统计学方法

数据分析采用GraphPad Prism 8.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,两两比较用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组采用CCK-8法检测的细胞增殖率比较

CCK-8法结果显示,对照组、PDGF-BB诱导组、27nt-miR组、27nt-miR-sponge组、27nt-miR NC组细胞增殖率分别为(100.0±11.2)%、(123.6±5.8)%、(82.1±9.6)%、(110.3±2.1)%、(110.4±19.6)% ,经

单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 8.483, P = 0.000$)。PDGF-BB诱导组细胞增殖率较正常值高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示慢病毒转染对细胞增殖活力无影响或影响甚微;27nt-miR组细胞增殖率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示27nt-miR过表达对PDGF-BB诱导的VSMCs活力上升有显著抑制作用。

2.2 各组细胞迁移率比较

对照组、PDGF-BB诱导组、27nt-miR组、27nt-miR-sponge组、27nt-miR NC组细胞迁移率分别为(22.0±5.0)%、(30.9±1.6)%、(11.4±1.3)%、(27.7±1.2)%、(34.9±2.1)% ,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 35.610, P = 0.000$)。PDGF-BB诱导组细胞迁移率较对照组高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示慢病毒转染对细胞迁移能力无影响或影响甚微;27nt-miR组细胞迁移率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组细胞迁移率与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示27nt-miR过表达有助于抑制PDGF-BB诱导VSMCs的细胞迁移能力。见图1。

2.3 各组采用EdU法检测的细胞增殖率比较

EdU法结果显示,对照组、PDGF-BB诱导组、27nt-miR组、27nt-miR-sponge组、27nt-miR NC组细胞增殖率分别为(16.9±7.1)%、(29.5±8.9)%、(10.4±1.4)%、(29.5±1.3)%、(32.1±2.6)% ,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F = 9.667, P = 0.002$)。PDGF-BB诱导组细胞增殖率较对照组细胞高($P < 0.05$),27nt-miR NC组与PDGF-BB诱导组细胞增殖率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示慢病毒转染对细胞增殖能力无影响或影响甚微;27nt-miR组细胞增殖率较27nt-miR NC组低($P < 0.05$),27nt-miR-sponge组与27nt-miR NC组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示27nt-miR过表达能够显著抑制PDGF-BB诱导VSMCs的细胞增殖能力。见图2。

2.4 生物信息学验证27nt-miR靶mRNA

27nt-miR在大鼠VSMCs中可靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白mRNA的3'非翻译区。miRNA序列5'

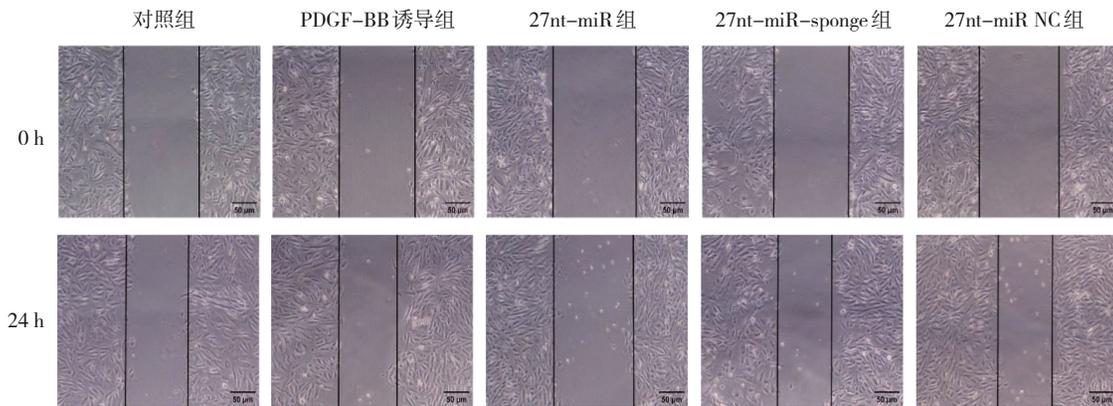


图 1 各组细胞不同时间点划痕试验结果

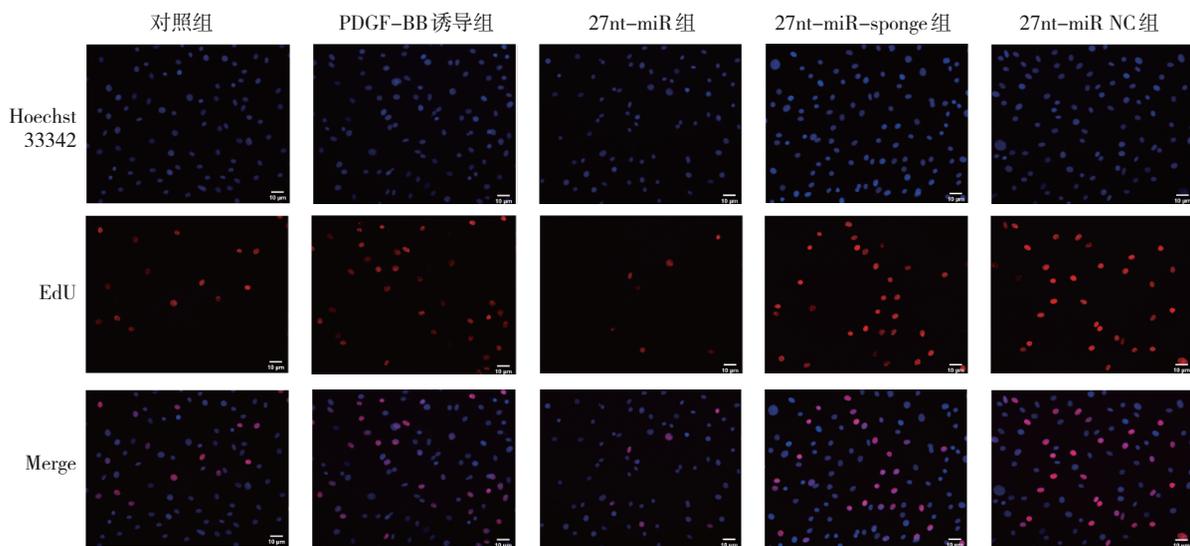


图 2 各组 Hoechst 33342、EdU、Merge 染色图

端第 2~8 位为其种子区序列,以灰色底纹标出。最小自由能预测:设置输出 5 个结果,取用最小自由能绝对值 >20 。获得的 4 个结果分别以黄色、绿色、蓝色和紫色底纹标出,分别在 3'-UTR 的第 24 碱基、第 422 碱基、第 558 碱基、第 607 碱基位置,其自由能分别为 -30.3 kcal/mol、 -30.3 kcal/mol、 -29.7 kcal/mol、 -26.7 kcal/mol。见图 3。

2.5 各组 α -SMA、SM22 α 、OPN mRNA 相对表达量比较

各组 α -SMA、SM22 α 、OPN mRNA 相对表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PDGF-BB 诱导组 α -SMA mRNA 相对表达量较对照组低($P<0.05$),两组 SM22 α 、OPN mRNA 相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。27nt-miR NC 组与 PDGF-BB 诱导组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示慢病毒转染对 VSMCs 表型标志基因表达无影响或影响

甚微。27nt-miR 组 α -SMA、SM22 α mRNA 相对表达量较 27nt-miR NC 组高($P<0.05$),OPN mRNA 相对表达量较 27nt-miR NC 组低($P<0.05$),27nt-miR-sponge 组与 27nt-miR NC 组 α -SMA、SM22 α mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),27nt-miR-sponge 组 OPN mRNA 相对表达量较 27nt-miR NC 组高($P<0.05$),提示 27nt-miR 过表达能够显著影响 PDGF-BB 诱导 VSMCs 的细胞表型标志基因表达水平,抑制其从舒缩表型向合成表型的转换。见表 2。

2.6 各组 α -SMA、SM22 α 、OPN、p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较

各组 α -SMA、SM22 α 、OPN、p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PDGF-BB 诱导组 α -SMA、SM22 α 蛋白相对表达量较对照组低($P<0.05$),提示

Gene source: NOS3

Gene ID: 4846

miRNA sequence: 5' - GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG - 3'

Seed regions: 3'-TAGACTT-5'

Mammalian target of rapamycin [Rattus norvegicus (Norway rat)]

Gene ID: 56718, NM_019906.2

ccaaggcctggcaagaaaatcatcctcctccgatgctttttgaccttggctctgcttccagtgactgaaacatgggcataaagt
ggactttgtaataatgaaatgtatataaaaagaactgtatattcaaatggccttaccacccctctagctgctgtgaaaag
acactgtcagaacaacaaggcttgattcagttccaggacagtgaaacacagtaatctacagaaccaagccttgattttggga
gaacagaagatgagtaactgactaagaatacgggtttgacttaactacagaagaactcatcatacgcatttctgaccgaata
atctagtgtatcctcaaccagggtcctcaacgacagacagatgtcagcactccaccatcctgttacctcaccggtccctg
gagcagtgaggcaacatctcaggatgggcaccgtgtgtgaagaagatctgttccacctgatccatgatgctgaacctac
agagccggcctccaggaaggagctttgctcagacgctggccaccgaggatgacaggtgtgccagatctcagtcagggg
tccacgctggcctgctgtgtcagtgagggagatgtgtgttgcagcaggactcagaacacaatgctttttggaa
gtgctgatctcagaggacactagcgcaggtgtgtaaltaagagcaaaataataccaactaacacaagaatgataagtgagc
cacatctagaccattgtatctgagtaattttgtgccaataatgacatcagaattttaaagta

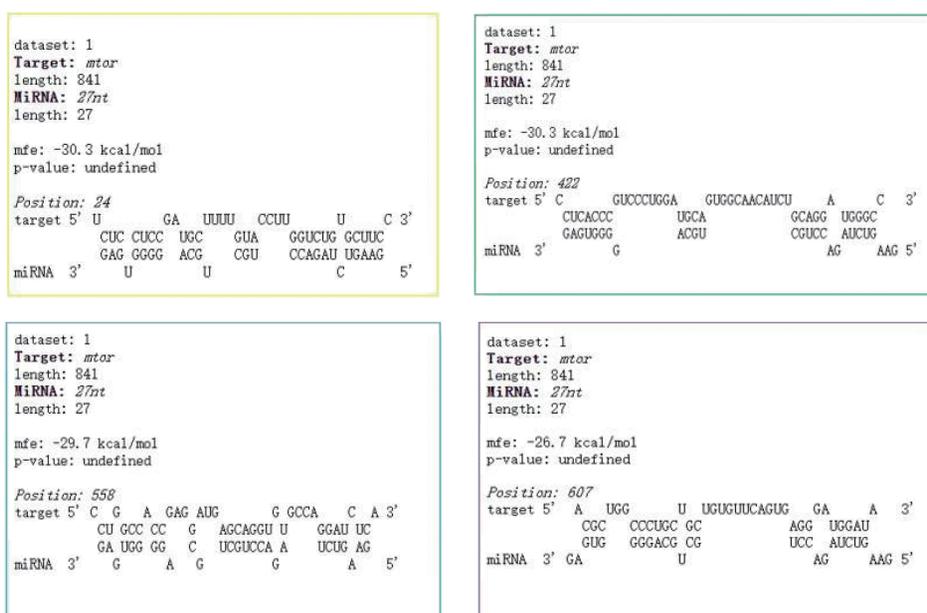


图 3 生物信息学分析 27nt-miRNA 与目的 mRNA 3'-非翻译区靶向结合情况

表 2 各组 α -SMA、SM22 α 、OPN mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	SM22 α	OPN
对照组	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.03
PDGF-BB 诱导组	0.62 \pm 0.02	0.78 \pm 0.05	1.16 \pm 0.31
27nt-miR 组	2.54 \pm 0.28	1.42 \pm 0.54	0.90 \pm 0.07
27nt-miR-sponge 组	0.59 \pm 0.03	0.66 \pm 0.00	2.06 \pm 0.19
27nt-miR NC 组	0.68 \pm 0.01	0.68 \pm 0.04	1.82 \pm 0.11
F 值	134.700	4.932	27.490
P 值	0.000	0.019	0.000

PDGF-BB 能够促进 VSMCs 的表型转换; 27nt-miR NC 组与 PDGF-BB 诱导组 OPN 蛋白相对表达量较 27nt-miR 组高 ($P < 0.05$); 27nt-miR 组 α -SMA、

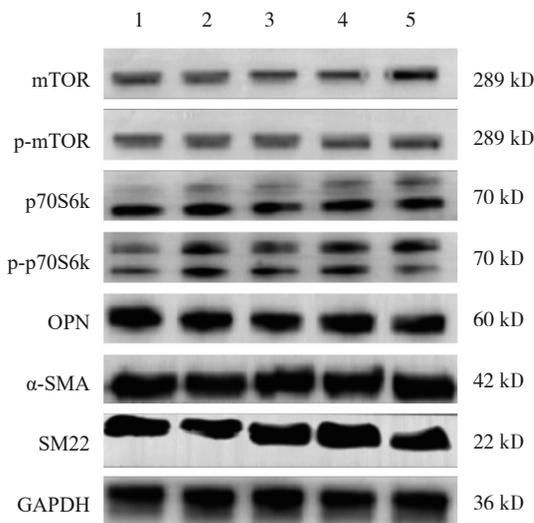
SM22 α 蛋白相对表达量较 27nt-miR NC 组高 ($P < 0.05$), OPN 蛋白相对表达量较 27nt-miR NC 组低 ($P < 0.05$), 提示 27nt-miR 过表达能够显著逆转 VSMCs 由 PDGF-BB 诱导发生的表型转换; 27nt-miR 组 p70S6k、p-p70S6k 与 p-mTOR 蛋白相对表达量较 27nt-miR NC 组低 ($P < 0.05$), 提示过表达 27nt-miR 对 MHY-1485 促进 mTOR/p70S6k 信号通路活化有抑制作用; 27nt-miR-sponge 组与 27nt-miR NC 组各蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 4。

2.7 过表达 27nt-miR 调控 PDGF-BB 诱导 VSMCs 的 mTOR/p70S6k 通路蛋白相对表达水平

27nt-miR 组、27nt-miR-sponge 组、27nt-miR NC 组经雷帕霉素处理后, 各组 p70S6k、p-p70S6k、

表 3 各组 α -SMA、SM22 α 、OPN、p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	SM22 α	OPN	p70S6k	p-p70S6k	mTOR	p-mTOR
对照组	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01
PDGF-BB 诱导组	0.86 \pm 0.01	0.86 \pm 0.01	0.93 \pm 0.00	1.18 \pm 0.02	1.18 \pm 0.02	1.04 \pm 0.03	1.08 \pm 0.01
27nt-miR 组	1.09 \pm 0.02	1.05 \pm 0.01	0.88 \pm 0.01	1.02 \pm 0.02	1.01 \pm 0.01	1.04 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01
27nt-miR-sponge 组	1.00 \pm 0.03	1.20 \pm 0.01	0.81 \pm 0.01	1.06 \pm 0.02	1.05 \pm 0.02	0.83 \pm 0.03	1.03 \pm 0.01
27nt-miR NC 组	0.89 \pm 0.02	0.85 \pm 0.01	1.17 \pm 0.00	1.16 \pm 0.02	1.15 \pm 0.02	1.10 \pm 0.04	1.07 \pm 0.01
F 值	81.460	835.000	848.800	46.730	83.390	34.200	33.530
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 对照组; 2: PDGF-BB 诱导组; 3: 27nt-miR 组; 4: 27nt-miR-sponge 组; 5: 27nt-miR NC 组。

图 4 各组 α -SMA、SM22 α 、OPN、p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白条带

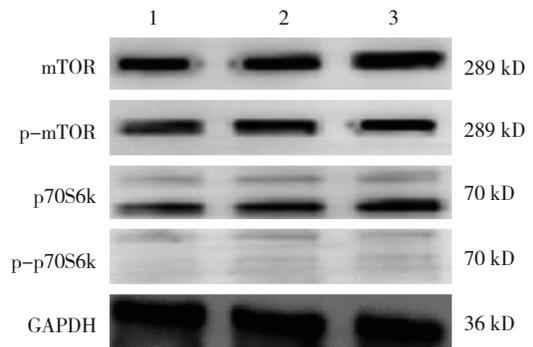
mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。27nt-miR 组较 27nt-miR NC 组低 ($P < 0.05$), 27nt-miR-sponge 组与 27nt-miR NC 组 p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示过表达 27nt-miR 可进一步促进雷帕霉素对 mTOR/p70S6k 信号通路的抑制作用。见表 4 和图 5。

27nt-miR 组、27nt-miR-sponge 组、27nt-miR NC 组经 MHY-1485 处理后, 各组 p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。27nt-miR 组较 27nt-miR NC 组低 ($P < 0.05$), 提示过表达 27nt-miR 可阻止 MHY-1485 对 mTOR/p70S6k 信号通路的促进作用; 27nt-miR-sponge 组与 27nt-miR NC 组各蛋白相对表达量比较,

表 4 各组经雷帕霉素处理后 p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p70S6k	p-p70S6k	mTOR	p-mTOR
27nt-miR 组	0.77 \pm 0.07	0.81 \pm 0.01	0.73 \pm 0.03	0.81 \pm 0.02
27nt-miR-sponge 组	0.96 \pm 0.04	1.06 \pm 0.02	0.82 \pm 0.04	1.07 \pm 0.02
27nt-miR NC 组	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.02
F 值	17.030	109.200	40.260	115.600
P 值	0.003	0.000	0.000	0.000

差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 6。

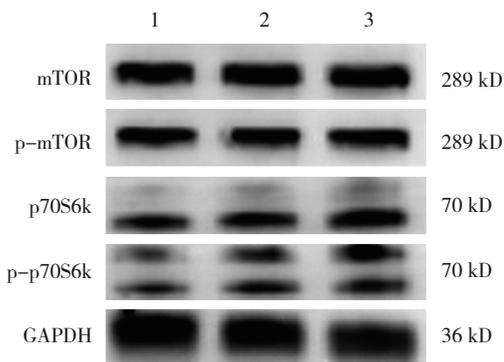


1: 27nt-miR 组; 2: 27nt-miR-sponge 组; 3: 27nt-miR NC 组。

图 5 各组经雷帕霉素处理后 p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白条带

表 5 各组经 MHY-1485 处理后 p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p70S6k	p-p70S6k	mTOR	p-mTOR
27nt-miR 组	0.76 \pm 0.03	0.60 \pm 0.08	0.82 \pm 0.01	0.86 \pm 0.03
27nt-miR-sponge 组	0.81 \pm 0.03	0.81 \pm 0.08	0.87 \pm 0.01	0.84 \pm 0.02
27nt-miR NC 组	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
F 值	36.430	25.450	512.600	26.440
P 值	0.000	0.001	0.000	0.001



1:27nt-miR组; 2:27nt-miR-sponge组; 3:27nt-miR NC组。

图6 各组经MHY-1485处理后p70S6k、p-p70S6k、mTOR、p-mTOR蛋白条带

3 讨论

本研究结果显示, 内含子源性 27nt-miR 能够调控 PDGF-BB 诱导 VSMCs 细胞活力、增殖与迁移等表型转换的发生, 探讨其可能的相关分子机制主要有: 27nt-miR 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 细胞活力、增殖与迁移等表型转换; 27nt-miR 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 中 OPN mRNA 的表达, 同时恢复 α -SMA 与 SM22 α 的表达; 27nt-miR 通过靶向 mTOR/p70S6K 信号通路激活来抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMC 细胞活力、增殖与迁移等表型转换。本研究首次报道内含子源性 27nt-miR 通过靶向 mTOR/p70S6k 信号通路参与调控 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 表型转换过程。在本研究体外实验中采用 PDGF-BB 作为促进 VSMCs 增殖与迁移的诱导剂, 观察到在 PDGF-BB 处理 VSMCs 后细胞增殖与迁移率显著上升; qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示, VSMCs 中 α -SMA 与 SM22 α mRNA 与蛋白表达显著下调而 OPN mRNA 与蛋白相对表达水平显著升高。表明 PDGF-BB 具有促进 VSMCs 表型转换的作用, 可诱导 VSMCs 的增殖和迁移。

有研究发现, miRNA 在体内的调节作用参与 VSMCs 细胞增殖、迁移及表型改变相关疾病发生发展的过程, 如 miR-181b 和 miR-204 被发现可通过抑制 β -ARR2/p-ERK1/2 信号通路阻止 VSMCs 细胞增殖、迁移的发生, 遏制粥样斑块的生长, 缓解 AS 的病理发展; 机体中的 miR-145 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 从而阻遏同型半胱氨酸诱导 VSMC 增殖、迁移与表型转换的发生^[11-12]。课题组前期研究证实, 高表达的 27nt-miR 能够促进 VSMCs 舒缩表型特异

性蛋白 SM22 α 的表达, 并抑制由 PDGF-BB 诱导 VSMCs 细胞活力、迁移与表型转换^[7]。本研究结果显示, 27nt-miR 组 VSMCs 增殖与迁移率显著降低, 细胞中 α -SMA 与 SM22 α 蛋白表达水平显著提升, 而 OPN 蛋白表达水平显著降低。进一步提示, 27nt-miR 可以抑制 VSMCs 细胞增殖、迁移与表型转换的发生, 且此抑制作用可能与 27nt-miR 影响表型标志蛋白表达有关。

需要进一步指出的是, 27nt-miR 抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 活力、增殖及迁移等表型转换的作用是通过何种途径实现的? 这有助于阐明内含子源性 miRNA 对机体细胞的调节机制, 以求更有效的方法治疗心血管疾病。现今研究认为复杂的生理信号转导途径作为机体响应外界刺激的有效方式, 是细胞生命活动必不可少的环节之一; 各不同信号通路之间的相互交联所构成的信号转导网络更是扮演细胞中诸多生命活动的必要角色。具体而言, 其通过调控下游靶蛋白 p70S6k 信号通路在 VSMCs 细胞增殖、迁移中发挥调控作用; 而 p70S6k 则是 mTOR 重要的下游靶蛋白, 磷酸化激活后可调节蛋白合成、细胞周期及细胞迁移等细胞活动^[3,13-14]。本课题组前期研究发现, 27nt-miR 可以通过靶向调控 mTOR 蛋白表达, 降低促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3, 并升高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平来对抗 VSMCs 凋亡过程^[8-9]; 高表达 27nt-miR 也能抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路激活, 促进细胞自噬而引起 VSMCs 过度增殖。在使用雷帕霉素处理各组 VSMCs 后, EdU 增殖实验、CCK-8 实验和划痕实验结果表明, 过表达 27nt-miR 能够进一步抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 细胞活力、增殖和迁移能力。更为重要的是, qRT-PCR 与 Western blotting 检测结果显示, 过表达 27nt-miR 可进一步促进雷帕霉素对 mTOR/p70S6k 信号通路的抑制作用, α -SMA、SM22 α mRNA 与蛋白相对表达量显著升高, OPNmRNA 与蛋白相对表达量显著减少。另一方面, 各组在使用 MHY-1485 处理后, 过表达 27nt-miR 似乎依然能够抑制 mTOR/p70S6k 信号通路的激活水平。上述结果表明, 过表达 27nt-miR 对 PDGF-BB 诱导 VSMCs 表型转换可能是通过参与调控 mTOR/p70S6k 信号通路发挥作用的。此外, 对 27nt-miR 与大鼠 mTOR 3'-UTR 序列与自由能靶向结合分析也证实了这一观点。出乎意料的是, 在 Western

blotting 检测结果中, 27nt-miR-sponge 组各蛋白相对表达水平与 27nt-miR NC 组比较, 差异均有统计学意义, 但在前述细胞表型实验结果中 27nt-miR-sponge 与 27nt-miR NC 组比较, 差异无统计学意义。笔者推测出现此结果的原因可能是 27nt-miR-sponge 组存在的固有局限性。虽然 miRNA sponge 与反义核苷酸有同样的抑制效果, 且具有比后者更持久的抑制作用, 但由于其在细胞内的高丰度引发与其他分子非特异性互作, 也可能会出现调控其他 mRNA 或蛋白表达的情况。而这种非特异性互作涉及其他蛋白和通路的调节, 进而改变 27nt-miR 对 mTOR/p70S6k 信号通路细胞表型的调控作用, 其具体机制有待进一步探究。另外, 27nt-miR-sponge 对细胞内 27nt-miR 的吸附量以及吸附能力也会影响对通路的调控作用, 但目前受限于技术水平尚无法直接验证。

综上所述, 本研究观察到内含子源性 27nt-miR 能够抑制 PDGF-BB 诱导 VSMCs 增殖、迁移与表型转换的发生, 并探讨了其潜在分子机制, 其与 mTOR/p70S6k 信号通路相关。本研究在前期研究的基础上进一步探讨 27nt-miR 对 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖、迁移与表型转换抑制作用的分子机制, 为后续阐释其他心血管疾病的病理分子机制提供新启示。

参 考 文 献 :

- [1] HO C C, CHEN Y C, TSAI M H, et al. Ambient particulate matter induces vascular smooth muscle cell phenotype changes via NOX1/ROS/NF-kappaB dependent and independent pathways: protective effects of polyphenols[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5): 782.
- [2] BASATEMUR G L, JORGENSEN H F, CLARKE M, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12):727-744.
- [3] LU Q B, WAN M Y, WANG P Y, et al. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFkappaB/mTOR/P70S6K signaling cascade[J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 656-668.
- [4] SHAWKY N M, SEGAR L. Sulforaphane inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation by targeting mTOR/p70S6kinase signaling independent of Nrf2 activation[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 119: 251-264.
- [5] BARTEL D P. Metazoan MicroRNAs[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51.
- [6] ZHANG M X, OU H, SHEN Y H, et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 16967-16972.
- [7] 沈凤, 杨鹏, 陶晓静, 等. 27nt-miRNA 对血管平滑肌细胞 SM22 α 表达的调节及其对细胞增殖活力、迁移和表型改变的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(02): 200-205.
- [8] 李丹, 杨鹏, 滕红丽, 等. 27nt-miRNA 通过靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白调控血管平滑肌细胞凋亡及其分子机制研究[J]. *中国循环杂志*, 2020, 35(04): 401-407.
- [9] 李丹, 滕红丽, 覃裕旺, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨 27nt-miRNA 对血管平滑肌细胞自噬的调控作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(2): 137-141.
- [10] 周福隆, 周炜潜, 杨鹏, 等. 27nt-miRNA 对过氧化氢诱导血管平滑肌细胞凋亡的影响及分子机制[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(5): 781-786.
- [11] GHASEMPOUR G, MOHAMMADI A, ZAMANI-GARMSIRI F, et al. MiRNAs through beta-ARR2/p-ERK1/2 pathway regulate the VSMC proliferation and migration[J]. *Life Sci*, 2021, 279: 119703.
- [12] ZHANG M, LI F, WANG X, et al. MiR-145 alleviates Hcy-induced VSMC proliferation, migration, and phenotype switch through repression of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153(5): 357-366.
- [13] PAN S, LIN H, LUO H, et al. Folic acid inhibits dedifferentiation of PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cells by suppressing mTOR/P70S6K signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 1307-1316.
- [14] 李欣. p70S6K 结构与功能研究进展[J]. *安庆师范学院学报(自然科学版)*, 2015, 21(3): 85-89.

(李科 编辑)

本文引用格式: 周炜潜, 罗雪兰, 王光耀, 等. 内含子源性 27nt-microRNA 对大鼠血管平滑肌细胞表型转换的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(14): 36-45.

Cite this article as: ZHOU W Q, LUO X L, WANG G Y, et al. Effect and mechanism of intron-derived 27-nt microRNA on phenotypic switch of rat vascular smooth muscle cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(14): 36-45.