

· 文献综述 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-02-0210-07

microRNA 在动脉硬化闭塞症中调控血管平滑肌的作用机制

王雪琴, 何雪梅, 周翔宇, 何延政

(西南医科大学附属第一医院血管甲状腺外科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 动脉硬化闭塞症; microRNA; 细胞模型; 动物模型; 动脉硬化闭塞症

[摘要] 动脉硬化闭塞症已成为周围血管疾病的首要病症, 严重危害人们身心健康, 早期诊断及治疗尤为迫切和必要。近年来, 随着非蛋白机制和转录后机制研究的逐渐清晰, 部分研究聚焦于探索 microRNA 与动脉硬化闭塞症之间的关系。文章依据 microRNA 在动脉硬化闭塞症细胞模型、动物模型和患者水平中调控血管平滑肌细胞的增殖、迁移、分化、表型转换和凋亡等方面来进行学习和研究。microRNA 的研究从基因调控方面更好地解释了动脉硬化闭塞症的发生与发展, 但由于其中复杂的调控机制以及缺乏药代学和药效学研究数据、作用靶基因众多等因素, 其临床应用仍然受到制约。展望未来, 应用 microRNA 治疗药剂治疗血管疾病特别是下肢动脉硬化闭塞症将有效减少其带来的损害。

[中图分类号] R4

[文献标识码] A

MicroRNA in the regulation of vascular smooth muscle mechanism of arteriosclerosis obliterans

WANG Xue-Qin, HE Xue-Mei, ZHOU Xiang-Yu, HE Yan-Zheng

(Department of Vascular and Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Arteriosclerosis obliterans; MicroRNA; Cell model; Animal model; Arteriosclerosis obliterans

[ABSTRACT] Arteriosclerosis obliterans (ASO) has become a serious threat to people's physical and mental health of primary peripheral vascular disease, and early diagnosis and treatment is urgent and necessary. In recent years, as the research on the non-protein mechanism of post-transcriptional mechanism become clear, part of the research focused on exploring the relationship between microRNA and ASO. Therefore, this paper based on the regulation of microRNA in atherosclerosis model, animal model and patients with vascular smooth muscle cells proliferation, migration, differentiation, phenotypic transformation, apoptosis, senescence, inflammation and oxidative stress related to learning and research. From the aspects of gene regulation, microRNA research could better explain the occurrence and development of hardening of the ASO, but because of the many factors, such as complicated regulatory mechanism and the lack of the pharmacokinetics and pharmacodynamics research data, many target genes and so on, its clinical application is still restricted. In the future, the microRNA healing potion applied to the treatment of vascular diseases, especially in lower limb arteriosclerosis occlusion disorder will reduce the damage effectively.

动脉硬化闭塞症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) 是指下肢动脉内膜或中膜发生的增生或退行性变, 特点是循环血炎症因子与血管壁细胞发生相互作用^[1], 从而造成血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖迁移, 炎症细胞累积, 胞外脂质和纤维组织沉淀, 进而引起内膜增厚

和下肢血管缺血阻塞等症状。其中, VSMC 的激活是病理发生的关键一步, 也是导致严重并发症的主要因素。microRNA (简称 miRNA) 是一种约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 主要通过结合信使 RNA (mRNA) 的 3' 非翻译区 (untranslated regions, UTR) 来对靶基因进行转录后调控, 完成一些生理学或信

[收稿日期] 2016-02-25

[修回日期] 2016-04-26

[基金项目] 四川省教育厅自然科学基金项目 (14TD0018); 四川省卫生计生委科研基金项目 (140035)

[作者简介] 王雪琴, 硕士研究生, 研究方向为动脉相关疾病治疗及静脉移植, E-mail 为 m15884784492@163.com。通讯作者周翔宇, 博士, 副教授, 研究方向为动脉相关疾病治疗及静脉移植, E-mail 为 xiangyuzhou971@vip.126.com。

号通路调节,最终降解 mRNA 或抑制特定蛋白质的翻译。已有确定研究证实 miRNA 参与调节 VSMC 的增殖、迁移、凋亡和表型转换,例如 miR-21、miR-26a、miR-133a、miR-365 和 miR-4463 等,并发现 miRNA 在正常和病变的 VSMC 上具有差异性表达^[2],为其参与 ASO 的病理生理进程研究提供了佐证。

1 miRNA 在动脉硬化闭塞症细胞模型中调控血管平滑肌细胞的作用机制

1.1 miRNA 影响动脉硬化闭塞症细胞模型中血管平滑肌细胞增殖和迁移

VSMC 是血管结构的主要成分,并且在正常情况下保持静止和非迁移状态,其增殖和迁移响应于各种生长因子和细胞因子,例如血小板源生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)^[3]、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)^[4]、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 3(interleukin-3, IL-3)^[5]和白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)等。ASO 疾病的共同特点便是 VSMC 在损伤后重新进入细胞周期,发生异常增殖和迁移而造成动脉粥样硬化和形成新生内膜。故体外实验常利用 FBS、PDGF-BB、ox-LDL 等因子模拟刺激 VSMC 生长。

已知 FBS 和 PDGF-BB 可促进细胞增殖,用不同浓度作用 VSMC 后发现 miR-146a 和 miR-146b^[6]在增殖越强的细胞中表达越高,这表明 miR-146a 可能促进 VSMC 增殖。Dong 等^[7]证实 miR-146a 可能通过靶基因 Krüppel 样因子 4(krüppel-like factor 4, KLF4)成为促进 VSMC 增殖和迁移的基本调节器;大量文献报道抗癌基因 p27 主要在 G1 期抑制细胞周期依赖激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)1 和 2 的复合物,对许多细胞类型的增殖起关键性调控作用。Castagnino 等^[8]发现载脂蛋白 E(apolipoprotein E, ApoE)和 miR-221/222 通过 Cox2-PGI2-IP 通路来调节 p27 以限制 VSMC 增殖,不仅在 G1 期调节 p27 而且 S 期激酶相关蛋白(S phase kinase associated protein 2, Skp2)在 S 期阶段调节 p27。因此,两条途径的互相弥补对 VSMC 在 G1/S 期有连续性调节 p27 的作用;目前的研究中, Kim 等^[4]发现在 PDGF-

BB 诱导下 miR-365 表达的下降是在和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)3' UTR 的 mRNA 相互作用后发生的,并且最终抑制了 VSMC 的增殖^[4,9],Zhang 等^[10]在关于主动脉球囊损伤的研究中也得到了相同的结论。不仅如此,在 FBS 诱导下,miR-365 也在增殖的 VSMC 中表达下降。可见,miR-365 在治疗 ASO 疾病中的重要性不言而喻。

其它影响 ASO 细胞模型中 VSMC 增殖和迁移的 miRNA 有 miR-15a、miR-24-3p、miR-125b、miR-155、miR-638 等。Zheng 等^[11]发现 KLF4 使得 VSMC miR-15a 增加但抑制了 cyclin D1 的表达,因而产生了抗增殖和抗血管的作用。Zhu 等^[2]研究证实 miR-24-3p 类似物显著抑制了 PDGF-BB 诱导下的 VSMC 迁移和增殖,促进了饥饿血清诱导下的 VSMC 凋亡,说明 miR-24-3p 有治疗 ASO 疾病的潜力;已有研究表明足糖萼蛋白样蛋白(podocalyxin-like protein, PODXL)与细胞黏附和迁移相关联,表明它可能对动脉粥样硬化十分重要。Li 等^[12]研究显示,PDGF-BB 诱导 miR-125b 的表达减少以及 IL-6 和单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的上调,抑制 VSMC 的增殖和迁移,并且有效上调人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)和 VSMC 中 miR-125b 的 mRNA 和蛋白表达,同时具有抑制 PODXL 的作用,这可能是 miR-125b 调节了 ox-LDL 的受体,即血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)和分化标记基因 SM22 α 的表达,从而抑制了泡沫细胞的形成;Zhang 等^[13]研究确定 miR-155 在 VSMC 的表达显著上调,并对其增殖产生抑制作用,而内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达可恢复 VSMC 的增殖和迁移。研究发现,miR-221/222 可通过抑制 CDKs、p27 和 p53 来减少 VSMC 增殖和迁移^[14];Li 等^[3]发现 miR-638 在正常 VSMC 中高表达,但在 PDGF-BB 诱导下的 VSMC 随着剂量和时间的增加而下调。随后证实 miR-638 调控靶基因 NOR1/cyclin D 通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/ERK1/2 通路成为调节 VSMC 增殖和迁移的关键分子。

1.2 miRNA 影响动脉硬化闭塞症细胞模型中血管平滑肌细胞分化、表型转换和凋亡

VSMC 是血管壁中层唯一的细胞类型,分为收

缩型和分泌型两种:收缩型分化的 VSMC 在正常血管中占绝大部分;分泌型去分化 VSMC 增殖迁移快,是新生内膜的主要组成部分。当血管发生硬化时,原本静止的平滑肌从血管壁中层逐渐进入内膜并形成新生内膜,并且分泌型 VSMC 更易促进病理脂质的吸收和泡沫细胞的形成。

Wang 等^[15-16]利用细胞研究发现 miR-195 影响 VSMC 的增殖、迁移,并减少 IL-1、IL-6 和 IL-8 的合成。后续实验发现,miR-195 通过核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和 p38/MAPK 抑制 Cdc42、CCND1 和 FGF1 蛋白的表达;Li 等^[17]发现 miR-663 在 PDGF-BB 刺激下的 VSMC 中表达下调,但在分化的 VSMC 中表达增加。此外,过表达 miR-663 伴随 SM α -actin、SM22 α 和钙调节蛋白、肌球蛋白重链表达增强,并抑制 PDGF-BB 诱导 VSMC 增殖和迁移。并且,过表达 miR-663 显著抑制 JunB 基因及其下游肌球蛋白轻链 9 (myosin light chain 9, MYL9) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9),所以 Li 等认为它们可能是 miR-663 关于 VSMC 的下游目标。这些结果表明,miR-663 是针对 JunB/MYL9 关于 VSMC 表型转换的一种新型调制器。可见,针对 miR-663 或其具体下游目标可能成为治疗 ASO 的一个新颖方法^[18]。

正常生理条件下,miR-92a 在内皮细胞 (endothelial cells, EC) 表达高而在 VSMC 表达低,Iaconetti 等^[19]首先发现 miR-92a 通过 c-Jun 氨基末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路在损伤 EC 和新生内膜中调控靶基因 KLF4 和促分裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase4, MKK4),对球囊损伤动脉起保护作用。在此基础上,Zhang 等^[20]提供的证据证实 miR-92a 在 FBS 刺激的 VSMC 中表达上调,其表达被 H₂O₂ 诱导氧化应激反应所抑制。进一步证实 miR-92a 最可能通过抑制 MKK4/JNK 信号途径对 H₂O₂ 诱导 VSMC 凋亡起保护作用。这些结果指出了 miR-92a 可作为保护 VSMC 氧化应激的瞄准基因。影响 VSMC 凋亡的 miRNA 包括 miR-22、miR-221 等。miR-22 通过靶向甲基-CpG 来结合外来体蛋白 2 (Mecp2),以减少其凋亡;miR-221 通过抑制 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族的 p53 来上调 PUMA,显示出 Bcl-xL 和 p53 的相互作用后激活了促凋亡蛋白,抑制抗凋亡

蛋白,进而影响 VSMC 生存能力^[21]。细胞凋亡和增殖都是生命的基本现象,因此,维持体内细胞数量动态平衡是治疗临床疾病的基本措施。

2 miRNA 在动脉硬化闭塞症动物模型中调控血管平滑肌细胞的作用机制

通过血管自身的适应性生长在 ASO 疾病中是一个重要的慢性保护机制。逐渐闭塞的动脉导致血流动力的变化和下游组织缺血,从而诱发缺血组织周围的毛细血管发芽和侧枝循环的建立。构建 ASO 动物模型,无论哪一种都是从其发病机制出发,如根据脂质代谢紊乱学说,采用高脂饲料喂养法;根据内皮损伤学说,采用机械损伤法;根据炎症反应损伤学说,采用免疫损伤法等^[22]。

2.1 miRNA 影响动脉硬化闭塞症动物模型中血管平滑肌细胞增殖和迁移

髓细胞白血病 1 (myeloid cell leukemia-1, MCL-1) 属于 Bcl-2 家族一个重要的抗凋亡蛋白,MMP 直接参与了 VSMC 迁移和增殖实验。Lee 等^[5]发现 miR-29b 能显著降低 IL-3 诱导 MCL-1 和 MMP-2 的水平并减少 VSMC 增殖和迁移。

miR-133a 在骨骼肌和心肌的发展和功能上担任重要的角色^[23-24],Gao 等^[25]发现其在 VSMC 也有相关作用,他利用 ApoE^{-/-}小鼠的动脉组织做细胞培养,在经过 anti-miR-133a、pre-miR-133a、scrambled miRNA 对照处理后观察可得,ApoE^{-/-}小鼠在经过 anti-miR-133a 处理后较对照组的 SM α -actin 表达明显降低,胰岛素样 IGF-1R 的 mRNA 及蛋白水平也明显降低,但 pre-miR-133a 处理后表现相反。miR-133a-IGF-1R 通路的发现为动脉粥样硬化的治疗提供了新的方法,Kee 等^[26]发现 miR-142-5p 在动脉损伤模型中对细胞增殖和细胞周期的表达具有调节作用,cyclin D1、cyclin E 和 cyclin D3 均在颈动脉损伤模型中表达增加。所以 Kee 验证了 BTG3、DLG1、GAS7、KLF10 和 KLF11 这 5 个下游蛋白与细胞周期阻滞有关,并最终证实了 PDGF-BB/miR-142-5p/BTG3/cyclin D3 的调制信号是一种影响 VSMC 增殖的新通路。

其它影响 ASO 动物模型中 VSMC 增殖和迁移的 miRNA 有 miR-100、miR-146a、miR-155 等。Grundmann 等^[27]用下肢缺血模型证实 miR-100 作为一个调节细胞增殖和血管新生的内源性 mTOR 调制器,对 VSMC 的迁移、增殖和成管能力有促进作用;Sun

等^[28]发现转染反义 miR-146a 核苷酸可以通过减少 KLF4 的表达来减少球囊损伤后新生内膜的增生; Yang 等^[29]观察到血管损伤后的新生内膜厚度与 miR-155 的表达量相对应,而哺乳动物 Ste20 样激酶 2(mammalian sterile 20-like kinase2, MST2)在 miR-155^{-/-}小鼠新生内膜中表达增加,结果也证实在血管损伤时,miR-155 直接抑制 MST2 以促进 VSMC 增殖,并且通过 Raf-1-MEK-ERK1/2 协调炎症和氧化应激通路。

2.2 miRNA 影响动脉硬化闭塞症动物模型中血管平滑肌细胞分化、表型转换和凋亡

Kee 等^[30]发现 miR-18a-5p 在球囊损伤的早期阶段表达上调,同时肌动蛋白 SM α -actin 和 SM22 α 也表达上调。后续实验证实,虽然蛋白多糖 4(syndecan-4)没有直接影响 VSMC 的分化,但 miR-18a-5p 可抑制 syndecan-4,从而激活原本受抑的下游 Smad2,导致 VSMC 分化增加。因此,miR-18a-5p 极有可能是一种新型 VSMC 的表型调节开关; Lovren 等^[1]利用慢病毒转染 miR-145 入高脂饮食大鼠后,发现其动脉损伤面积较对照组缩小, KLF5 表达也下降;而纤维帽面积和胶原纤维增加, SM α -actin 和钙调节蛋白含量增高。随后证实 miR-145 有限制 VSMC 去分化和促新生内膜形成的能力^[31-32],并且可调节硬化斑块的形态和成分,平衡和对抗斑块的稳定性破裂。由此可见,miR-145 与 VSMC 的分化关系十分密切。Liu 等^[33]在此基础上发现 VSMC 在 PDGF-BB 和球囊损伤刺激后, pre-miR-145 下降幅度较 pri-miR-145 大,说明它们之间的转变可能是导致 miR-145 下降的关键。

Iaconetti 等^[34]证明了 miR-23b 可以促进 VSMC 标记基因,如主动脉平滑肌肌动蛋白基因(actin, aortic smooth muscle gene2, ACTA2)和肌球蛋白重链基因(myosin heavy chain gene11, MYH11)的表达。转入 Ad-miR-23b 能降低球囊损伤动脉的内膜增生,且 miR-23b 的特异性抑制尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)、SMAD3 和调控 VSMC 表型的转录因子 O 家族(class O of forkhead box transcription factor, FOXO4)表达。表明 miR-23b 是 VSMC 表型调节的关键,并在体外和体内血管损伤后抑制新内膜的形成。此外, Leeper 等^[35]研究发现 miR-26a 在 ASO 小鼠模型中显著下降,下降的 miR-26a 通过 TGF- β /BMP 信号通路上调促分化蛋白 SMAD-1 和 SMAD-4,减少增殖和迁移的同时也显著增加在 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡的速率。进一步研究发现,miR-26a 有三个显著诱

导凋亡的靶基因:Bcl-2 的抑制剂 BAK1、p21 的蛋白激酶 2(PAK2)和硫酸酯酶 1(SULF1)。miR-26a 更详细的研究均证实其在 ASO 疾病担任非常重要的角色。

2.3 miRNA 影响动脉硬化闭塞症动物模型中血管平滑肌细胞衰老

Qian 等^[36]最初利用年轻和年老大鼠血管组织的实验表明:miR-542-3p 在年轻大鼠 VSMC,即 yVSMC 中高表达,且 yVSMC 的 miR-542-3p 表达显著上调 PCNA 和 Rb 蛋白而下调 p21 蛋白的表达,年老大鼠 VSMC,即 oVSMC 与之相反。后续实验证实 miR-542-3p 通过酪氨酸激酶 Syk/STAT3-STAT5 对体内和体外 VSMC 的生长产生作用,miR-542-3p 对衰老过程起到一定的保护作用。尽管许多安全以及技术方面的问题仍有待解决,但可以发现 miR-542-3p 和 Syk 能够构成一个新的治疗工具,用于治疗血管方面的疾病。

2.4 miRNA 参与动脉硬化闭塞症动物模型中血管平滑肌细胞炎症与氧化应激调节

ASO 疾病可增加促炎介质的表达,炎症介质可促进细胞增殖、氧化应激、迁移以及单核细胞与 VSMC 的结合,从而导致 VSMC 的功能产生障碍,并进一步加速血管相关并发症的发生。当然,炎症基因的表达受到多种信号转导途径的活化和调节。ox-LDL 在疾病早期是一个诱导和促进血管损伤的关键因素,其通过受伤内皮渗入皮下层而引发一系列病理事件。

现如今,许多研究关注动脉粥样硬化在 ox-LDL 诱导下 VSMC 由正常向异常的变化。Wei 等^[37]首先发现 miR-155 在人类 ASO 疾病中表达上调,并定位于血管损伤部位的巨噬细胞和平滑肌细胞。在 LDLR^{-/-}合并 miR-155^{-/-}的 ASO 模型小鼠中,急性扰流引起的血管损伤和高胆固醇的发生急剧减少,而 ApoE^{-/-}合并 miR-155^{-/-}时其减少的速度相对缓慢,在 ASO 中对 Bcl-6 的沉默可对遗传性 miR-155 缺乏症产生有益的效果,这样便清楚地表明了 ASO 疾病中 miR-155 靶基因为 Bcl-6 转录因子。由此可见,至少在 ASO 疾病的晚期,抑制 miR-155 是对治疗有意义的;先前的很多研究证实 miR-146a、708、451、98 在 EC 和 VSMC 作为主要的抗炎 miRNA,分别通过白细胞介素 1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK)、蛋白激酶 IKK- γ 、IL-6 受体(IL-6R)和一种丝/苏氨酸蛋白激酶-CHUK 来负面调控 NF- κ B 通路。Chen 等^[38]证实 miR-146a 还通过 Nrf-2 在转录水平对抗流引起的血

管损伤具有回应。

其它影响 ASO 动物模型中 VSMC 炎症与氧化应激调节的 miRNA 还包括 miR-125-5p、miR-181a、miR-342-5p 等。然而, miR-125-5-p 在 ox-LDL 时上调,可以减少脂质和细胞因子分泌的积累,并在血管新生内膜中发挥作用^[15];骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种多功能蛋白,在骨和各种细胞类型中高表达,包括 VSMC,并参与了动脉粥样硬化的发生。在 VSMC 实验中观察得到,人血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)可以降低 miR-181a 的表达,并且 miR-181a 的过表达可以抑制 Ang II 诱导性 OPN 表达和 VSMC 胶原的黏附^[39]。这表明 miR-181a 可能是通过 OPN 调控 VSMC 的功能去调制和参与动脉粥样硬化的病理生理过程;在动脉粥样硬化病变, miR-342-5-p 抑制剂调节蛋白激酶 Akt1 表达并且抑制 miR-55 和一氧化氮合酶 2(NOS2) 的表达。此外, miR-342-5-p 抑制剂进行的全身治疗可以降低 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化进展。因此, miR-342-5-p 是治疗动脉粥样硬化血管疾病很有潜力的靶点^[15]。长期高浓度 ox-LDL 下可以诱导 VSMC 的增殖和凋亡, ox-LDL 可能使 miR-29b 表达上调,而阻碍目标基因 DNMT3b 在 VSMC 的表达和外向性调节 VSMC 的迁移。JE 等研究发现 ox-LDL 还可以调节 let-7g 的表达而抑制 LOX-1 和转录因子 OCT-1 蛋白在 VSMC 的表达^[25]。此外, miR-490-3p 能够通过影响 PAPP-A mRNA 和蛋白表达的变化来抑制 ox-LDL 条件下引起的 VSMC 增殖和分泌^[2]。

3 miRNA 在动脉硬化闭塞症患者中调控血管平滑肌细胞的作用机制

3.1 miRNA 影响动脉硬化闭塞症患者中血管平滑肌细胞增殖和迁移

VSMC 的迁移和表型转换发生在 ASO 病理过程中,如在细胞结构、斑块坏死核心区域和纤维帽的稳定中扮演了重要角色^[40]。在许多疾病的负荷条件下, miR-21 上调作为促生存、侵袭的调节。Wang 等^[41]利用 HE 染色和原位杂交定位 miR-21 和 SM α -actin,发现其都位于 ASO 患者的平滑肌层。在培养 VSMC 时,通过加 PDGF-BB、二氯化钴和 ox-LDL 等干预因素,其结果是低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 含量增加, miR-21 的表达与这些培养因素呈时间性正相关。去除 HIF-1 α ,在相同条件下培养 VSMC, miR-21 表达水平下降。免疫组织化学分析表明,原肌球蛋白

(Tropomyosin, TPM1)在 ASO 动脉各部分染色比在正常动脉部分明显较弱。由此看来, HIF-1 α 上调 miR-21 而抑制 TPM1 来促进 VSMC 的增殖和迁移;抑制 miR-21 则出现相反现象^[15,41];在 ASO 中, miR-1298 是一个较正常动脉显著下降的 miRNA,其下降率接近 64%。Hu 等^[42]发现 miR-1298 在 CpG 位点甲基化下调的条件下表达反而增强,然后增强的 miR-1298 下调 PDGF-BB 诱导的间隙连接蛋白 43 (Cx43)的 mRNA 水平,抑制 ERK、PKC δ 、 β -catenin、Src 和 PKC 信号通路,从而下调细胞内 Ca²⁺水平,进而影响 VSMC 的增殖和迁移,而对凋亡影响较小。且免疫荧光标记发现, SM α -actin、miR-1298 共同位于动脉中层。这些结果都提示, miR-1298 在 ASO 患者的动脉中层表达降低,在 ASO 的诊断和治疗上具有良好的前景。

3.2 miRNA 影响动脉硬化闭塞症患者中血管平滑肌细胞分化、表型转换和凋亡

Choe 等^[43]发现 miR-132 在 ASO 疾病早期阶段表达降低,在后期阶段表达增加;而富亮氨酸相互作用蛋白 1 (leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1, Lrrfp1) 表达是相反的。功能研究表明 miR-132 在动脉损伤晚期可诱导 VSMC 的分化和凋亡。在此基础上研究证实 miR-132 在 ASO 患者体内表达降低,是通过上调 Lrrfp1 的 3' UTR 区域,进而诱导 ERK 的磷酸化和 VSMC 增殖。随后检测 ERK1/2 的磷酸化水平发现,转染 pcDNA6-Lrrfp1 后,尽管 ERK1/2 的总量没有改变,但磷酸化 ERK1/2 显著增加。这些结果表明 Lrrfp1 通过 ERK1/2 信号通路诱导 VSMC 的增殖^[44]。He 等^[45]发现 ASO 患者与正常人的血浆 miRNA 表达有差异,较为显著的有 miR-221-3p、miR-4306、miR-4284 和 miR-4463,并且 miR-4284 在 ASO 疾病的早期阶段便有明显而稳定的上升, miR-4463 有明显而稳定的下降,这些研究都清楚表明: miR-4284 和 miR-4463 的作用机制对 ASO 疾病的诊断和治疗有重要意义。

4 结 论

由此可以发现, miRNA 对 VSMC 不管是在细胞、动物还是患者水平来看,都发挥其重要作用。miRNA 的研究使我们从基因调控方面更好地认识了 ASO 的发生与发展。但由于其中复杂的调控机制,如 miRNA 靶向性的针对多个功能相关基因或单个基因等,其作用机制目前还没有完全清楚。同时,由于缺乏药代学和药效学研究数据、调控机制

复杂、作用靶基因众多等因素,虽然有研究致力于开发相应的 miRNA 治疗药剂,但其临床应用仍然受到制约。可以预见,随着技术进步和发展,miRNA 的功能逐渐明确,靶点可以通过生物信息学的方法预测并验证,相关治疗试剂的应用将更为广泛。因此,如何将 miRNA 治疗药剂应用于血管疾病特别是下肢动脉硬化闭塞症的治疗,减少其带来的损害,将成为未来众多研究关注的焦点。

[参考文献]

- [1] Lovren F, Pan Y, Quan A, et al. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 81-90.
- [2] Zhu XF, Shan Z, Ma JY, et al. Investigating the role of the post-transcriptional gene regulator miR-24-3p in the proliferation, migration and apoptosis of human arterial smooth muscle cells in arteriosclerosis obliterans[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1 359-370.
- [3] Li P, Liu Y, Yi B, et al. MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(1): 185-193.
- [4] Kim MH, Ham O, Lee SY, et al. MicroRNA-365 inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting cyclin D1[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(10): 1 752-761.
- [5] Lee JY, Lim S, Song BW, et al. MicroRNA-29b inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in neointimal formation [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(4): 598-608.
- [6] Wang HR, Jiang M, Xu ZX, et al. miR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12 901-907.
- [7] Dong SH, Xiong W, Yuan JH, et al. MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF- κ B expression [J]. *Mol Med Report*, 2013, 8(2): 407-412.
- [8] Castagnino P, Kothapalli D, Hawthorne EA, et al. miR-221/222 compensates for Skp2-mediated p27 degradation and is a primary target of cell cycle regulation by prostacyclin and cAMP[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): 711-715.
- [9] Kang S, Lee HJ, Cho JY, et al. MicroRNA-365 regulates NKX2-1, a key mediator of lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(2): 487-494.
- [10] Zhang P, Zheng CY, Ye H, et al. MicroRNA-365 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through targeting cyclin D1[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(8): 765-770.
- [11] Zheng XM, Li AQ, Zhao L, et al. Key role of microRNA-15a in the KLF4 suppressions of proliferation and angiogenesis in endothelial and vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(4): 625-631.
- [12] Li XB, Yao N, Zhang J, et al. MicroRNA-125b is involved in atherosclerosis obliterans in vitro by targeting podocalyxin[J]. *Mol Med Report*, 2015, 12(1): 561-568.
- [13] Zhang J, Zhao F, Yu XL. MicroRNA-155 modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting endothelial nitric oxide synthase [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1 708-714.
- [14] Zhang XH, Shao SS, Geng HF, et al. Expression profiles of six circulating microRNAs critical to atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(5): 766-774.
- [15] Lu XJ, Kakkar V. The Roles of microRNAs in atherosclerosis[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(13): 1 531-543.
- [16] Wang YS, Wang HYJ, Liao YC. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(4): 517-526.
- [17] 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): 1 117-127.
- [18] Thomas Korff, Larissa Pfisterer, Marina Schorpp-Kistner et al. miR-663 and the miRaculous vascular smooth muscle phenotypic switch[J]. *Circ Res*, 2013, 113(10): 1 102-105.
- [19] Iaconetti C, Polimeni A, Sorrentino S, et al. Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(5): 1-14.
- [20] Zhang L, Zhou M, Wang YJ, et al. miR-92a inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis: role of the MKK4 - JNK pathway[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(6): 1-9.
- [21] Huang LN, Ma WY, Ma YD, et al. Exosomes in mesenchymal stem cells, a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases? [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(2): 238-245.
- [22] 陈臻毅, 徐强, 梁自豪, 等. 动脉粥样硬化发病机制及其动物模型研究进展[J]. *实验动物科学*, 2015, 32(4): 54-55.
- [23] Wang F, Long GW, Zhao CX, et al. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 1-9.
- [24] Kontaraki J E, Marketou M E, Zacharis E A, et al. Dif-

- ferential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2014, 28(8): 510-516.
- [25] Gao S, Wasse M, Zhang LL, et al. MicroRNA-133a regulates insulin-like growth factor-1 receptor expression and vascular smooth muscle cell proliferation in murine atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(1): 171-179.
- [26] Kee HJ, Park S, Kwon JS, et al. B cell translocation gene, a direct target of miR-142-5p, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by down-regulating cell cycle progression[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(15): 2385-392.
- [27] Grundmann S, Hans FP, BSc SK, et al. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2011, 123(7): 999-1009.
- [28] Sun SG, Zheng B, Han M, et al. miR-146a and Krüppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(1): 56-62.
- [29] Yang Z, Zheng B, Zhang Y, et al. miR-155-dependent regulation of mammalian sterile 20-like kinase 2 (MST2) coordinates inflammation, oxidative stress and proliferation in vascular smooth muscle cells[J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2015, 1852(7): 1477-489.
- [30] Kee HJ, Kim GR, Cho S N, et al. miR-18a-5p microRNA increases vascular smooth muscle cell differentiation by downregulating syndecan4[J]. *Korean Circ J*, 2014, 44(4): 255-263.
- [31] Sala F, Franda J, Rotllan N, et al. MiR-143/145 deficiency protects against progression of atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(4): 796-802.
- [32] Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, et al. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2014, 28(8): 510-516.
- [33] Liu XJ, Cheng YH, Yang J, et al. Flank sequences of miR-145/143 and their aberrant expression in vascular disease: mechanism and therapeutic application[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(6): 407.
- [34] Iaconetti C, Rosa SD, Polimeni A, et al. Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(4): 522-533.
- [35] Leeper N J, Raiesdana A, Kojima Y, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(4): 1035-043.
- [36] Qian DH, Gao P, Feng H, et al. Down-regulation of miR-542-3p promotes neointimal formation in the aging rat[J]. *Vasc Pharmacol*, 2015, 120(3): 6-9.
- [37] Wei YY, Nazari M, Jahantigh, et al. MicroRNA-126, -145, and -155 A therapeutic triad in atherosclerosis? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc*, 2013, 33(3): 449-454.
- [38] Chen LJ, Li C, Huang YH, et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1157-169.
- [39] Sun XH, Sit A, Feinberg MW, et al. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(3): 105-112.
- [40] Patrick Lacolley, Ve'ronique Regnault, Antonino Nicoletti, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 194-204.
- [41] Wang M, Li W, Chang GQ, et al. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities[J]. *Arterioscler Thromb Vasc*, 2011, 31(9): 2044-053.
- [42] Hu W, Wang M, Yin HH, et al. MicroRNA-1298 is regulated by DNA methylation and affects vascular smooth muscle cell function by targeting connexin[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(4): 534.
- [43] Choe N, Kwon JS, Kim JR, et al. The microRNA miR-132 targets Lrrfip1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 229(2): 348-355.
- [44] Hansen KF, Karelina K, Sakamoto K, et al. miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity[J]. *Brain Struct Funct*, 2013, 218(3): 817-831.
- [45] He XM, Zheng YQ, Liu SZ, et al. Altered plasma microRNAs as novel biomarkers for arteriosclerosis obliterans [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(2): 196-206.

(此文编辑 许雪梅)