

MiR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 在 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC 表型转化和增殖中的作用

沈菊连¹, 魏伟², 王夏蕾¹, 杨景达¹, 薛偕华^{2,3}

(1. 福建中医药大学康复医学院, 福建省福州市 350122; 2. 福建中医药大学附属康复医院神经康复科, 福建省福州市 350003; 3. 福建省康复技术重点实验室, 福建省福州市 350003)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 表型转化; 增殖; ERK1/2; MicroRNA

[摘要] 目的 探讨 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)表型转化和增殖中的作用及其与 ERK1/2 信号通路的相关性。方法 分离、培养大鼠 VSMC, 以 ox-LDL (50 mg/L) 诱导 VSMC, 采用 ERK1/2 特异性抑制剂 U0126 (10 μ mol/L) 阻断 ox-LDL (50 mg/L) 诱导 VSMC 的 ERK1/2 信号激活, MicroRNA 微阵列分析 VSMC 的 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 表达, CCK-8 法和 Brdu 流式细胞术检测细胞增殖; 免疫荧光法检测 VSMC 收缩表型标志蛋白 SM22 α 的变化; Western blot 检测 VSMC 的 ERK1/2 通路信号激活情况(ERK、p-ERK)、表型标志蛋白 SM22 α 、细胞周期相关蛋白(PCNA、cyclin D1、p21、p27)的表达情况。结果 ox-LDL 诱导下, VSMC 的 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 表达明显上调, VSMC 的 ERK1/2 磷酸化水平明显增加, SM22 α 的表达降低, 同时细胞周期相关蛋白 PCNA、cyclin D1 高表达, p21、p27 低表达; ERK1/2 通路特异性抑制剂 U0126 干预后, ERK1/2 磷酸化水平受抑制, 相应的 VSMC miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 表达明显下调($P < 0.05$), VSMC 增殖显著下降, SM22 α 的表达上调($P < 0.05$), 提示 VSMC 由合成表型转化为收缩表型, 并下调 PCNA、cyclin D1 的表达, 上调 p21、p27 蛋白的表达($P < 0.05$), 说明其表型转化和增殖明显受抑制。结论 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 在 ox-LDL 诱导 VSMC 表型转化和增殖中起重要作用, 并与 ERK1/2 信号通路密切相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of miR-92a-3p_R+1 and miR-92a-1-5 in ERK signaling pathway of ox-LDL induced phenotypic transformation and proliferation of VSMC in rats

SHEN Julian¹, WEI Wei², WANG Xialei¹, YANG Jingda¹, XUE Xiehua^{2,3}

(1. College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122; 2. Department of Neurological Rehabilitation, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003; 3. Fujian Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Technology, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] ox-LDL; VSMC; phenotypic modulation; proliferation; ERK1/2; microRNA

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of miR-92a-3p_R+1 and miR-92a-1-5p on phenotypic transformation and proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) in the ERK 1/2 signaling pathway. **Methods** VSMC isolated from rats, and ox-LDL (50 mg/L) was used to induce VSMC. ERK1/2 inhibitors U0126 (10 μ mol/L) was used for intervention. The miRNA microarray profiling was performed using small RNA sequencing analysis. CCK-8 method and Brdu flow cytometry were used to detect VSMC proliferation. Immunofluorescence assay was performed to detect the expression of SM22 α protein in VSMC. Western blot was used to detect the expression changes of ERK1/2 pathway signal molecules (ERK, p-ERK), phenotype marker protein SM22 α and proliferation associated proteins such as PCNA, cyclin D1, p21 and p27. **Results** Under ox-LDL induction, the ex-

[收稿日期] 2019-03-08

[修回日期] 2019-04-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473744, 81774380)

[作者简介] 沈菊连, 硕士研究生, 研究方向为神经康复与认知科学, E-mail 为 1940832356@qq.com。通信作者薛偕华, 博士, 主任医师, 研究方向为神经康复与认知科学, E-mail 为 465356738@qq.com。

pressions of miR-92a-3p_R + 1 and miR-92a-1-5p in VSMC were significantly up-regulated. After the intervention of ERK1/2 inhibitors U0126, the phosphorylation level of ERK1/2 was inhibited, the corresponding VSMC miR-92a-3p_R + 1 and miR-92a-1-5p expression significantly lowered ($P < 0.05$). Therefore, the study speculated that ERK1/2 signaling pathway may affect the phenotypic transformation and proliferation of VSMC by regulating the expression of miR-92a. After inhibiting the ERK1/2 signaling pathway, the proliferation of VSMC was significantly reduced, and the expression of SM22 α was up-regulated ($P < 0.05$). The expression of PCNA and cyclin D1 was down-regulated and the expression of p21 and p27 proteins were up-regulated ($P < 0.05$). This indicated that the phenotypic transformation and proliferation were significantly inhibited. **Conclusion** Mir-92a-3p_R + 1 and miR-92a-1-5p play important roles in the ERK1/2 signaling pathway that ox-LDL induces phenotypic transformation and proliferation of VSMC.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是威胁人类健康的主要疾病之一,是心脑血管疾病的重要危险因素^[1],其病理变化主要包括内皮细胞功能紊乱、泡沫细胞的形成和平滑肌细胞的增殖^[2]。当血管受损或血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)在体外受到生长因子刺激时,VSMC由收缩表型转化为合成表型并异常增殖,进一步促进As斑块形成、血管狭窄和内膜增生等^[3-4]。近年来,越来越多的研究表明,微小RNA(microRNAs, miRNAs)与As形成过程密切相关^[5-7],在As的病理生理及分子信号通路中起着重要的调控作用^[5]。其中miRNAs在调控VSMC增殖和表型转化等方面有重要的作用^[8-9],但与ERK1/2信号通路的相关性尚未见报道。本实验以ERK1/2信号通路抑制剂U0126干预氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的大鼠VSMC,探讨miR-92a-3p_R+1和miR-92a-1-5p在VSMC的表型转化和增殖中的作用及其与ERK1/2信号通路的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基(Hyclone公司);胎牛血清(Excell Bio公司);清洁级SD雄性大鼠(福建医科大学动物实验中心[许可证号:SCXK(闽)2012-0001]);胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(Gibco公司);氧化型低密度脂蛋白(北京协生生物科技公司);ERK1/2信号通路抑制剂U0126(上海伟寰生物科技有限公司);TruSeq Small RNA样品制备试剂盒(Illumina, San Diego, USA);BrdU(美国APEX BIO公司);细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(CCK-8)和DAB显色试剂盒(博士德生物公司);FITC-BrdU细胞增殖检测试剂盒(ICF/FACS法)(凯基生物公司);SM22 α 抗体

(Proteintech公司);细胞周期蛋白PCNA抗体、cyclin D1抗体、p21抗体、p27抗体(Cell Signaling Technology公司);一抗二抗稀释液、ECL显色试剂盒(博士德生物公司)、Western blot电泳设备(Bio-RAD公司);细胞培养箱(Therom公司),倒置显微镜(Leica公司)。

1.2 VSMC的提取与体外培养

取1只150~180 g大鼠以颈椎脱臼法处死,浸泡于75%乙醇10 min,分离出胸主动脉,置于预冷的PBS中去除血污,再放于含20%胎牛血清的DMEM/F12培养液中,剥离外膜和内膜后,剪成1 mm²的组织块并加入II型胶原酶,37℃培养箱消化14 h,加入5 mL含20% FBS和1%双抗的DMEM/F12培养液,孵育于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞数量增加并生长融合至70%~80%时,用含EDTA的0.25%胰酶进行消化传代。采用 α -SMA抗体免疫荧光鉴定VSMC。

1.3 U0126的制备、干预及分组

以 1×10^8 /L接种于六孔板中培养24 h后,换含0.1%胎牛血清的培养基饥饿24 h。将细胞分为3组:(1)空白对照组:含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养,24 h后收集细胞;(2)ox-LDL组:加50 mg/L ox-LDL于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养,24 h后收集细胞;(3)U0126组:加10 μ mol/L U0126(将U0126 1 mg溶于DMSO中,配制成20 g/L的母液,取母液加入DMEM/F12培养基稀释)和50 mg/L ox-LDL于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液中,24 h后收集细胞。每组实验重复3次。

1.4 MicroRNA微阵列分析

VSMC干预结束后,提取总RNA,联川生物小RNA测序分析(2018E23pm A21, Lianchuan Bio, China)进行miRNA微阵列分析。小RNA测序文库制备使用TruSeq Small RNA样品制备试剂盒检测后,采用Illumina Hiseq2000/2500对构建的文库进

行测序,测序阅读长度为单端1×50 bp。

1.5 CCK-8 检测 VSMC 增殖

按 $1 \times 10^8/L$ 接种于96孔板中孵育24 h后,按上述进行饥饿和干预,每组设6个复孔。干预24 h后,更换无血清培养基后,每孔加入10 μ L CCK-8 溶液,在细胞培养箱内继续孵育1 h,450 nm 测定吸光度值(optical density, OD)。

1.6 Brdu 流式细胞术检测 VSMC 增殖

分组和处理方法同上。培养 VSMC 12 h 后,加入 Brdu (终浓度 30 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后,终止培养,按 FITC-Brdu 细胞增殖检测试剂盒说明书操作,上流式仪检测,488 nm 激发波长,520 nm 发射波长。

1.7 免疫荧光法检测 SM22 α 的表达

细胞培养 24 h 后,终止培养,按以下步骤操作:4% 多聚甲醛固定 15 min,0.3% TritonX-100 破膜 15 min,5% BSA 室温封闭 30 min,实验组加 SM22 α 一抗(1:200 稀释)(阴性对照组以 PBS 代替一抗)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,FITC 标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min;DAPI 复染细胞核,中性树脂封片。以上操作每一步之间均由 PBS 清洗 2 次,3 min/次。在荧光显微镜下随机取 5 个视野拍照,Image J 分析软件进行光密度值分析。

1.8 Western blot 检测 ERK、p-ERK、SM22 α 、PCNA、cyclin D1、p21、p27 蛋白表达

收集上述干预结束的细胞,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 20 min,去沉淀取上清。采用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度,金属浴煮沸变性 5 min。取 20 μ g 蛋白以 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,室温下 5% BSA 摇床封闭 1 h 后,分别按 1:1 000 稀释的 ERK、SM22 α 、PCNA、cyclinE、p21、p27、 β -actin 和 1:2 000 稀释的 p-ERK、cyclinD1 加入一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。TBST 洗 3 次,加入按 1:5 000 稀释 HRP 标记的二抗,室温摇床孵育 1 h,TBST 洗 3 次,加入 ECL 显色剂后在凝胶成像系统扫描成像。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSMC 的培养与免疫荧光鉴定

倒置显微镜下观察 VSMC 呈梭形,有多个细胞

突起,相互交织融合后呈“谷峰状”生长(图 1A)。 α -SMA 免疫荧光染色呈阳性,呈丝状分布在胞质内,因此可鉴定为 VSMC(图 1B)。

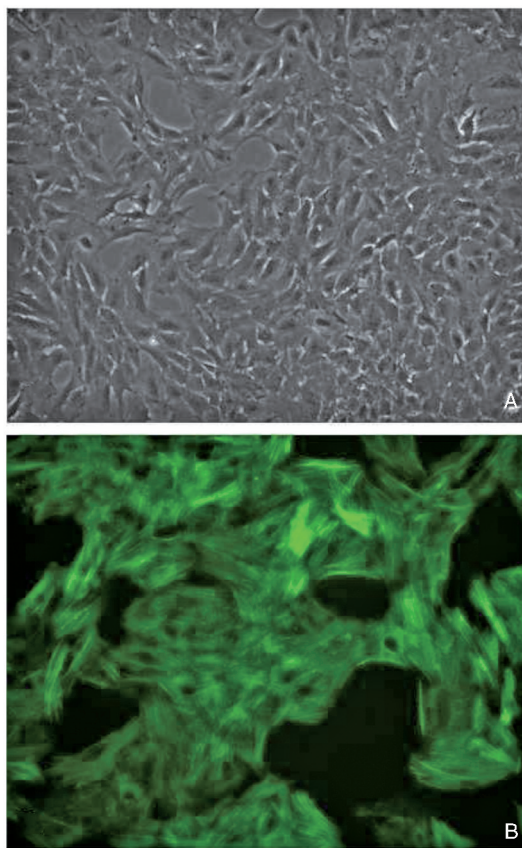


图 1. 原代大鼠平滑肌细胞形态学与免疫荧光鉴定 A 为普通显微镜下细胞交织融合成“谷峰状”(100 \times);B 为荧光显微镜下 α -SMA 阳性表达(200 \times)。

Figure 1. Identification of primary cultured rat VSMC

2.2 ox-LDL 对 VSMC miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 表达的影响及其与 ERK1/2 通路的关系

miRNA 微阵列分析 ox-LDL 诱导 VSMC miRNA 表达,Western blot 检测 VSMC 细胞的 p-ERK/ERK 的表达。在 ox-LDL 诱导下 VSMC 的 ERK 磷酸化增加,p-ERK 水平显著升高($P < 0.05$),miR-92a-3p-R+1(miR_seq-TAT TGC ACT TGT CCC GGC CTG T)过表达($P < 0.05$;表 1);U0126(10 μ mol/L)可以明显阻断该通路,显著降低 p-ERK 的表达水平($P < 0.05$;图 2),miR-92a-3p_R+1 表达明显下调($P < 0.01$;表 1)。同时亦发现 ox-LDL 诱导 VSMC 的 miR-92a-1-5p(miR_seq-AGG TTG GGA TTT GTC GCA ATG CT)表达上调,但差异无显著性,ERK1/2 通路抑制则导致其表达明显下调($P < 0.05$;表 1)。采用 Targetscan 7.2 预测 miR-92a-3p-R+1 和 miR-

92a-1-5p 的调控靶基因,发现它们与细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs)、Kruppel 样因子(KLFs)等密切相关(图3),但其相关机制有待进一步研究。

表 1. 各组 VSMC miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的表达

Table 1. Comparison of VSMC miR-92a-3p_R+1 and miR-92a-1-5p expression in each group

分组	miR-92a-3p_R+1	miR-92a-1-5p
空白对照组	4893.00±169.03	2.00±0.58
ox-LDL 组	6182.00±306.56 ^a	3.33±0.84
U0126 组	3326.00±197.84 ^b	0.67±0.73 ^b

a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ox-LDL 组比较。

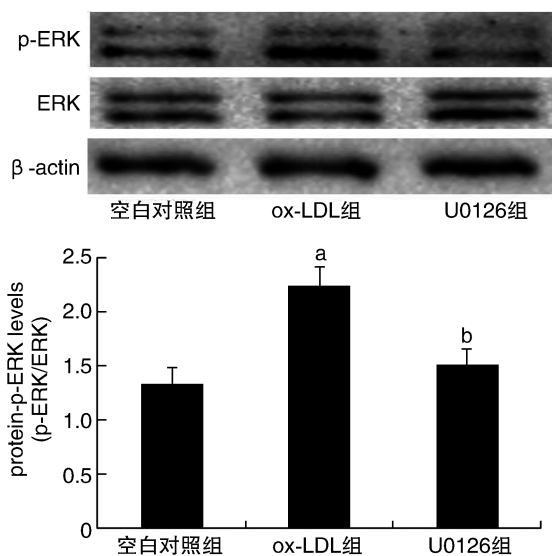


图 2. 各组 VSMC 的 p-ERK 的表达水平 a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. Expression of p-ERK in VSMC of each group

2.3 ox-LDL 对 VSMC 增殖的影响及其与 ERK1/2 通路的关系

CCK-8 法和 Brdu 流式细胞术测定细胞增殖(图4、图5)。与空白对照组比较,ox-LDL 诱导促进 VSMC 细胞的增殖($P<0.05$),PCNA、cyclin D1 蛋白表达上调($P<0.05$),p21 和 p27 蛋白表达减少($P<0.05$);ERK1/2 通路阻断后明显抑制 VSMC 细胞的增殖,PCNA、cyclin D1 蛋白表达降低($P<0.05$),p21 和 p27 蛋白表达上调($P<0.05$)差异有显著性($P<0.05$;图6)。

2.4 U0126 对 VSMC 表型转化标记蛋白 SM22 α 表达的影响

采用 SM22 α 免疫荧光染色和 WB 检测发现,

SM22 α 蛋白表达水平较空白对照组下降($P<0.05$);U0126 阻断 ERK 信号通路后,SM22 α 蛋白表达水平升高($P<0.05$,图7)。

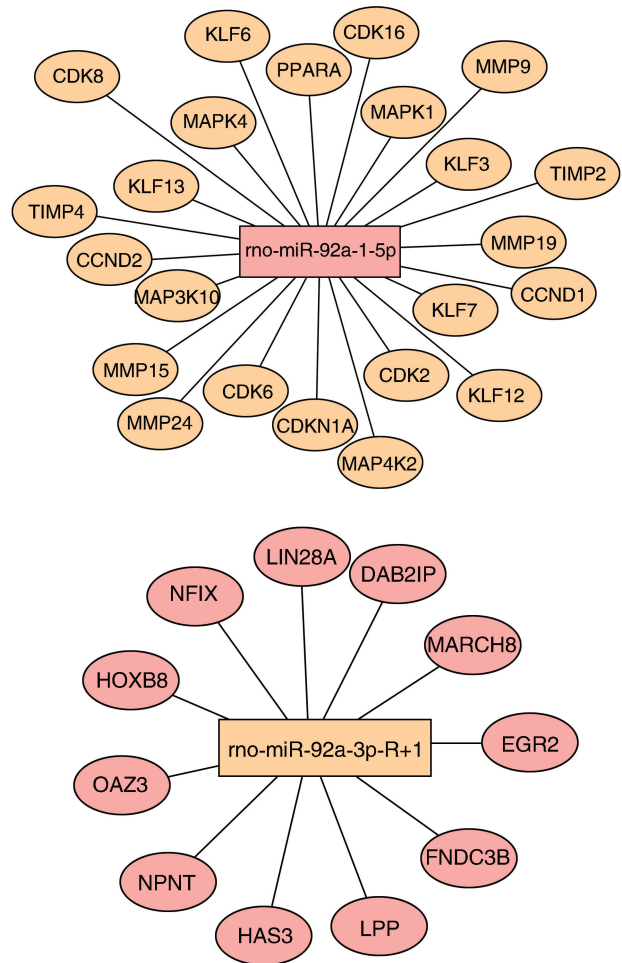


图 3. 靶基因预测 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 与 VSMC 表型转化和增殖相关

Figure 3. Target genes of miR-92a-3p_R+1 and miR-92a-1-5p were found to be related to phenotypic transformation and cell proliferation through Targetscan 7.2 database

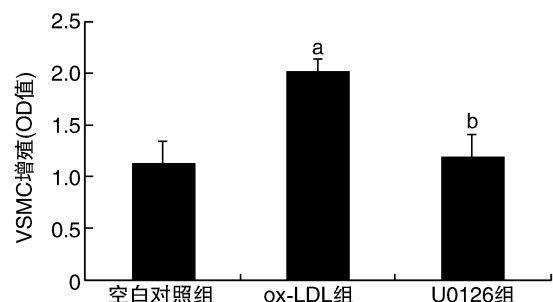


图 4. CCK-8 法检测 VSMC 增殖 a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. Proliferation of VSMC was detected by CCK-8 assay

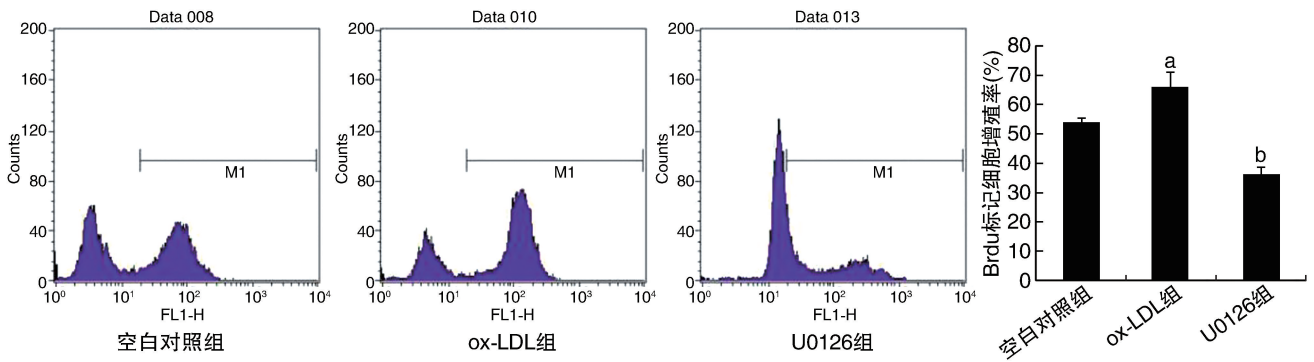


图 5. 流式细胞术检测 Brdu 标记 VSMC 增殖细胞 a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Proliferation of VSMC was detected by Brdu flow cytometry

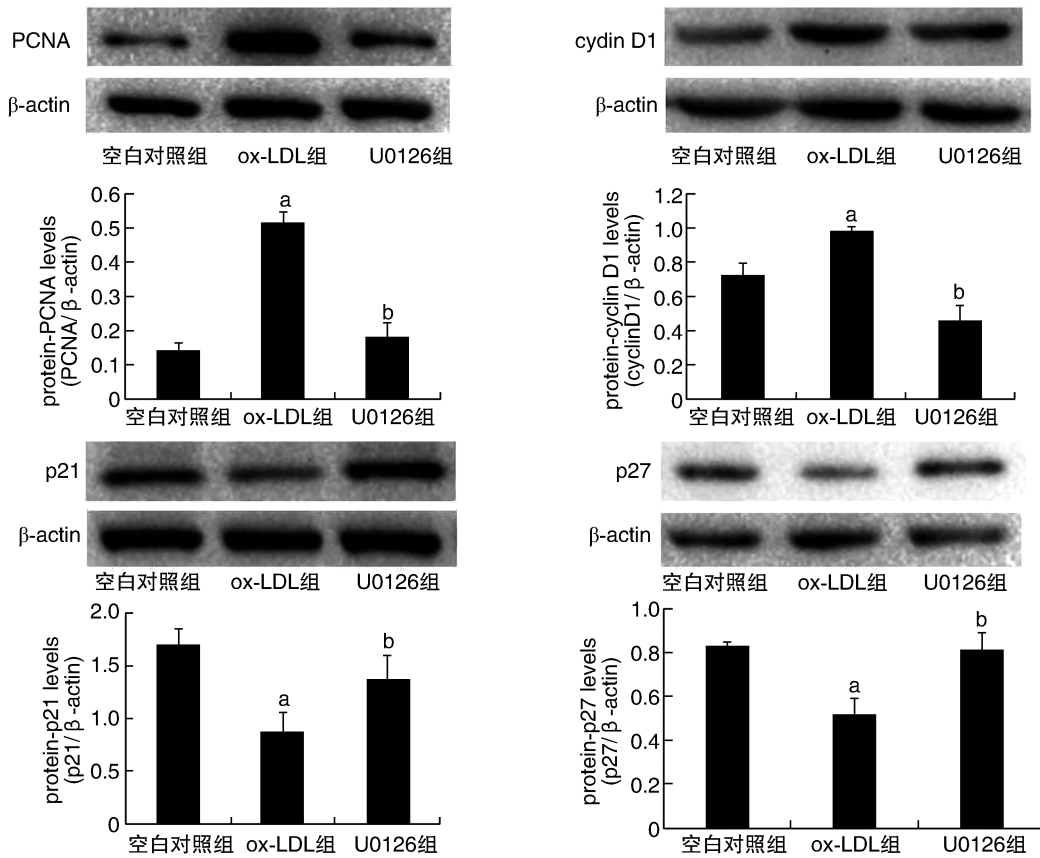


图 6. VSMC 细胞周期相关蛋白的表达水平 a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 6. Expression of proliferation-related protein in VSMC

3 讨论

As 是心脑血管疾病的主要病理基础,严重危害人类健康。As 是一种由巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等长期共同作用的脂代谢异常的慢性炎症性疾病^[10]。其中 VSMC 在 As 发生发展过程中发挥重要作用。在正常条件下,VSMC 处于非增殖性的收缩表型,增殖与凋亡保持平衡,VSMC 在血管壁中层

处于静止状态,增殖活性很低,但当血管壁受到多种因素的刺激后,VSMC 转化成合成型,促进细胞大量增殖^[11-12],最终引起 As 的发生。因此对 VSMC 的表型转化及增殖进行研究,对 As 的防治具有重要意义。通常高剂量的 ox-LDL 促使细胞凋亡,因实验条件的差异及试剂厂家的不同,课题组前期摸索发现 50 mg/L ox-LDL 能够诱导 VSMC 炎症反应和迁移作用,促进细胞增殖。

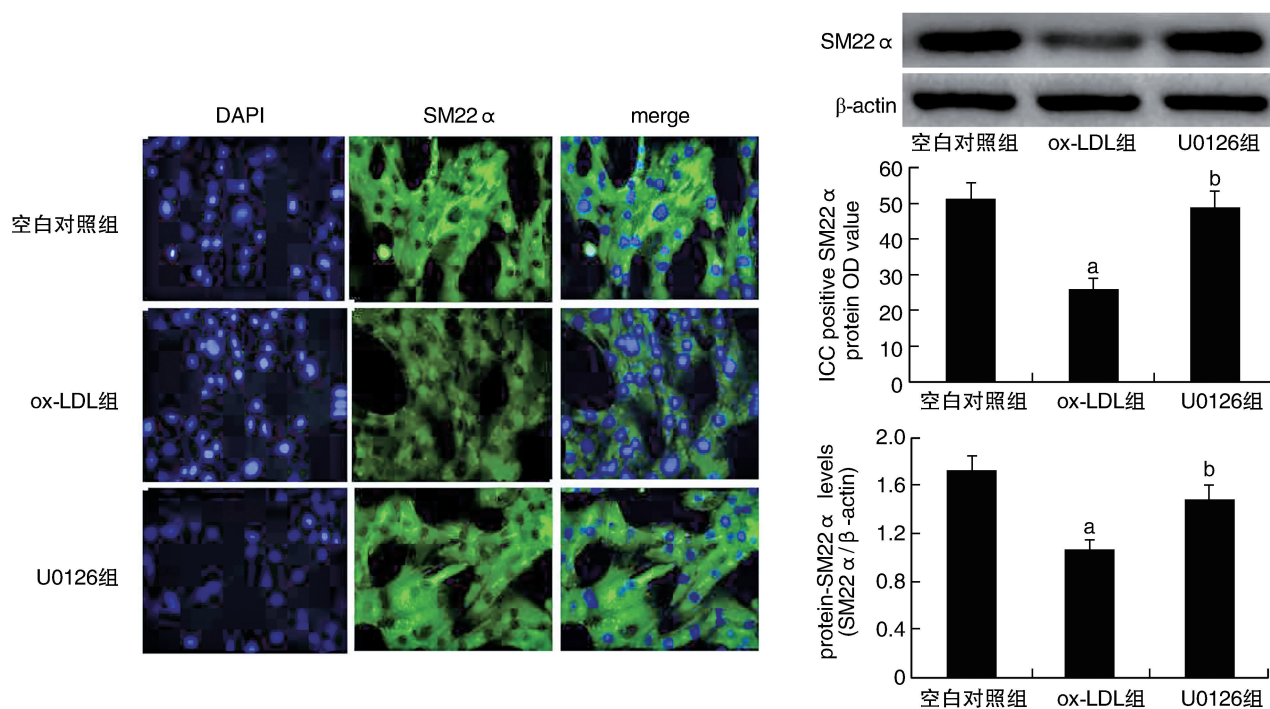


图 7. VSMC SM22 α 蛋白的表达 a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 7. Expression of SM22 α protein in VSMC

miRNA 是一类小非编码 RNA 序列, 大约 22 个核苷酸组成, 其在转录后调节基因表达。超过三分之一的蛋白编码基因受 miRNA 翻译调控, 单个 miRNA 可调控数百个蛋白编码基因, 而且 miRNAs 与多种疾病相关。有研究表明 miRNA 参与血管病变中 VSMC 细胞的增殖和血管重塑的调节^[13]。miR-17 ~ 92a 簇在调节细胞增殖中发挥关键作用^[14], 包括有 miR-17-5p、miR-18a、miRNA-92a 等。Yang 等^[15]研究发现 miR-17-5p 在缺氧诱导的肺血管平滑肌细胞增殖中发挥重要作用。多个研究发现 miR-18a 及 miR-18a-5p 通过调节细胞周期蛋白 cyclin D1 和 SM22 α (VSMC 的收缩表型特异性标志蛋白) 的活性参与 VSMC 的增殖^[16-18]。最近研究发现 miRNA-92a 是 miR-17 ~ 92a 簇的重要一员, 在调控 VSMC 凋亡、增殖等方面有重要的作用^[8-9]。Loyer 等^[16]发现 ox-LDL 可上调 miR-92a 的表达, 促进内皮细胞的损伤, 抑制 miR-92a 的表达可以加速血管再内皮化从而减弱新生内膜损伤的形成, 进而抗动脉粥样硬化。赵曦雯等^[19]研究结果提示 miR-92a 可通过靶向抑制 PTEN 的表达从而促进血管平滑肌细胞的增殖以及迁移。miR-92a 在 VSMC 静止期时低表达^[15], ox-LDL 诱导后上调 miR-92a 促进内皮细胞活化和 As 病变的发展^[16-20], 同时 miR-92a 上调促进 VSMC 的增殖^[8]。miR-92-1 是 miR-92a 基因

家族的主要成员^[21], 能够产生 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 两种不同的成熟 miRNA^[22], 在调节细胞增殖和凋亡中发挥重要作用^[23-24]。研究表明, miR-92a-3p 可通过抑制 p21 促进细胞增殖和细胞周期进展^[25]。Liu 等^[26]利用 ox-LDL 干预内皮细胞, 使 miR-92a-3p 表达上调, 促进细胞迁移和增殖。鉴于 miR-92a 的重要生物学活性, 推测 miRNA-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 在 VSMC 的表型转化和增殖中具有重要的作用。本研究结果提示 ox-LDL 明显诱导 VSMC 的 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的表达, ERK1/2 通路阻断后 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的表达明显下调, 并通过靶基因预测发现 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 与表型转化和增殖相关。因此认为 ERK1/2 信号通路可能通过调控 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的表达, 对 VSMC 的表型转化和增殖等生物活性产生影响。

SM22 α 是 VSMC 的特异性标志蛋白, 在收缩型 VSMC 中大量表达, 主要参与细胞骨架构成和收缩调节^[27]。研究表明, ox-LDL 作用于 VSMC, 结果显示 SM22 α 表达减少, 说明 ox-LDL 会促进 VSMC 由收缩型向合成型转化^[28], 进而促进细胞大量增殖^[29-30], 并受 miR-17 ~ 92a 簇的 miR-18a 调控。细胞周期主要由周期蛋白 (cyclins) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin dependent kinase inhibitor,

CKI)控制调节^[31-32]。细胞周期蛋白包括 PCNA、Cyclin D1 等与依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)结合,引起底物 Rb 磷酸化,促进 DNA 合成,细胞由 G1 期向 S 期转变^[33]。增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)是 DNA 聚合酶的辅助因子,在核酸代谢中起重要作用^[34],是细胞增殖的重要标志物^[35],也被认为是合成型 VSMC 的重要标志^[36]。CKI 的主要作用是阻滞细胞周期,其主要包括 p21 和 p27,当异常表达时可促进细胞增殖和分化^[37]。丝裂原活化蛋白激酶家系(mitogen activated protein kinases, MAPK)家族包括 ERK1/2、P38、JNK,在生长发育和疾病发生过程中发挥重要作用^[38]。其中细胞外信号调节蛋白激酶(extra cellular regulated kinase, ERK1/2)信号通路是经典的 MAPK 信号转导途径,广泛调控细胞的增殖、分化和凋亡^[39-40]。ERK1/2 途径参与多种细胞增殖与细胞周期的调节^[41]。本研究结果显示,ox-LDL 促进 VSMC 的 ERK1/2 通路的激活,诱导 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的表达,上调 PCNA、cyclinD1 蛋白的表达,抑制 p21、p27 的表达,促进 VSMC 细胞增殖和合成型转化;ERK1/2 通路阻断后,miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 受抑制,VSMC 收缩表型转化,细胞增殖受抑制,提示 ERK1/2 信号通路与 miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 的密切相关。

综上所述,miR-92a-3p_R+1 和 miR-92a-1-5p 在 ox-LDL 诱导的 VSMC 表型转化和增殖有着重要作用,并与 ERK1/2 信号通路密切相关。

[参考文献]

- [1] Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability[J]. *J Intern Med*, 2015, 278(5): 483-493.
- [2] Li M, Qian M, Kyler K, et al. Endothelial-vascular smooth muscle cells interactions in atherosclerosis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 151.
- [3] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410-1422.
- [4] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 692-702.
- [5] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703-720.
- [6] Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30(5): 665-676.
- [7] Jones BJ, Goodwin AJ, Cook JA, et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 254: 271-281.
- [8] Zhang L, Zhou M, Wang Y, et al. miR-92a inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis: role of the MKK4-JNK pathway[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(6): 975-983.
- [9] 张晨旭. MLCK 通过 miRNA-92a 调控血管平滑肌细胞增殖与迁移[D]. 大连: 大连医科大学, 2016: 28-29.
- [10] Taleb S. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016, 109(12): 708-715.
- [11] Song SH, Kim K, Jo EK, et al. Fibroblast growth factor 12 is a novel regulator of vascular smooth muscle cell plasticity and fate[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(9): 1928-1936.
- [12] Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation[J]. *J Biomed Res*, 2014, 28(1): 40-46.
- [13] Lei W, Li G, Zheng J, et al. Roles of microRNA in vascular diseases in cardiac and pulmonary systems[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(9): 643-647.
- [14] Chen J, Huang ZP, Seok HY, et al. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts[J]. *Circ Res*, 2013, 112(12): 1557-1566.
- [15] Liu G, Hao P, Xu J, et al. Upregulation of microRNA-17-5p contributes to hypoxia-induced proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells through modulation of p21 and PTEN[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 200.
- [16] Loyer X, Potteaux S, Vion AC, et al. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice[J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 434-443.
- [17] Zhang W, Lei C, Fan J, et al. miR-18a promotes cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells by increasing cyclin D1 via regulating PTEN-PI3K-AKT-mTOR signaling axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(1): 144-149.
- [18] Kee HJ, Kim GR, Cho SN, et al. miR-18a-5p MicroRNA increases vascular smooth muscle cell differentiation by downregulating syndecan4[J]. *Korean Circ J*, 2014, 44(4): 255-263.
- [19] 赵曦雯, 张玉梅. MiR-92a 通过靶向抑制 PTEN 的表达促进血管平滑肌细胞的增殖以及迁移[J]. *成都医学院学报*, 2019, 14(2): 163-168.
- [20] Chamorro-Jorganes A, Lee MY, Araldi E, et al. VEGF-induced expression of miR-17-92 cluster in endothelial cells is mediated by ERK/ELK1 activation and regulates angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(1): 38-47.
- [21] Santoro MM, Nicoli S. miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319

- (9): 1324-1330.
- [22] Singh N, Heggermont W, Fieuws S, et al. Endothelium-enriched microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiac allograft vasculopathy [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2015, 34(11): 1376-1384.
- [23] Li T, Guo H, Li H, et al. MicroRNA-92a-1-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia[J]. *Gut*, 2019, 68(10): 1751-1763.
- [24] Zhu S, Zhang L, Zhao Z, et al. MicroRNA92a3p inhibits the cell proliferation, migration and invasion of Wilms tumor by targeting NOTCH1 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 571-578.
- [25] Su Z, Yang H, Zhao M, et al. MicroRNA-92a promotes cell proliferation in cervical cancer via inhibiting p21 expression and promoting cell cycle progression[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(1): 137-145.
- [26] Liu Y, Li Q, Hosen MR, et al. Atherosclerotic conditions promote the packaging of functional MicroRNA-92a-3p into endothelial microvesicles [J]. *Circ Res*, 2019, 124(4): 575-587.
- [27] 周晓茂, 魏伟, 陈彤, 等. 24-乙酰泽泻醇 A 对 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC 表型转化的影响及其与 ERK1/2 通路的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(4): 342-346.
- [28] Jiao L, Wang MC, Yang YA, et al. Norepinephrine reversibly regulates the proliferation and phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 85(3): 196-200.
- [29] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [30] Feil S, Hofmann F, Feil R. SM22 alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis [J]. *Circ Res*, 2004, 94(7): 863-865.
- [31] Kim TJ, Lim Y, Kim DW, et al. Etoposide D, a microtubule-stabilizing compound, inhibits neointimal hyperplasia after rat carotid artery injury by cell cycle arrest via regulation of G1-checkpoint proteins [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(4): 229-237.
- [32] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? [J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(2): 65-70.
- [33] 李峰, 陈临溪. 细胞周期蛋白 D 与细胞周期调控研究进展[J]. *国外医学(生理、病理科学与临床分册)*, 2005, 25(3): 270-273.
- [34] Liu X, Cheng Y, Chen X, et al. MicroRNA-31 regulated by the extracellular regulated kinase is involved in vascular smooth muscle cell growth via large tumor suppressor homolog 2[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(49): 42371-42380.
- [35] 韩雅玲, 王效增, 康建, 等. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(1): 53-58.
- [36] Ma L, Liu Y, Geng C, et al. Estrogen receptor beta inhibits estradiol-induced proliferation and migration of MCF-7 cells through regulation of mitofusin 2 [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(6): 1993-2000.
- [37] Diez-Juan A, Andres V. Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts [J]. *Circ Res*, 2003, 92(4): 402-410.
- [38] 王园园, 郑梦晓, 赵美平, 等. ERK1/2 对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv1.5 通道表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2015, 31(5): 418-421.
- [39] Roskoski RJ. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143.
- [40] Mutlak M, Kehat I. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 149.
- [41] Bergeron C, Boulet L P. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation [J]. *Chest*, 2006, 129(4): 1068-1087.
- (此文编辑 朱雯霞)