

miR-181a-5p 对人主动脉平滑肌细胞成骨样分化的影响

张帆¹, 程乃萱², 韩迎春², 张海波¹, 杜杰², 张聪聪²

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院心外科, 2. 北京市心肺血管疾病研究所, 北京市 100029)

[关键词] 人主动脉平滑肌细胞; 成骨样分化; miR-181a-5p; 血管钙化

[摘要] **目的** 观察 miR-181a-5p 对动脉钙化细胞模型的影响, 探讨其可能的作用机制。**方法** 培养人主动脉平滑肌细胞 (HASMC), 经成骨样分化诱导后使用茜红素染色检测细胞成骨样分化的程度, 采用 real-time PCR 检测成骨样分化标志基因骨钙素 (OCN)、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 和碱性磷酸酶 (ALP) 的 mRNA 表达变化, 以及 miR-181a-5p 的表达变化, 分析 miR-181a-5p 与成骨样分化相关基因表达水平的相关性。miR-181a-5p mimic 转染用于上调 HASMC 内 miR-181a-5p 的表达。使用 TargetScan 数据库预测 miR-181a-5p 发挥作用的靶基因。使用 real-time PCR 检测 miR-181a-5p 过表达后对靶基因表达的影响。**结果** HASMC 经诱导成骨样分化后, 茜红素染色阳性区域和细胞内钙含量逐渐增加, 细胞中成骨样分化相关基因 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达随时间延长逐渐升高, 而 miR-181a-5p 的表达逐渐下降 ($P < 0.05$)。相关性分析显示 miR-181a-5p 的表达与 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达均呈负相关 ($P < 0.05$)。使用 miR-181a-5p mimic 转染 HASMC 后细胞内 miR-181a-5p 的表达高于对照 mimic 组, 细胞内钙含量及 RUNX2 和 OCN 的表达均低于对照 mimic 组 ($P < 0.05$)。TargetScan 数据库预测结果显示 miR-181a-5p 可与促成骨样分化基因丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 和丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8) 的 3' UTR 区结合, miR-181a-5p mimic 组 HASMC 中靶基因 MAPK1 和 MAPK8 的表达显著下调 ($P < 0.05$)。**结论** 血管平滑肌细胞成骨样分化时下降的 miR-181a-5p 可抑制成骨样分化, 其可能的机制是抑制促成钙化信号转导分子 MAPK1 和 MAPK8 的表达。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Effects of miR-181a-5p on the osteogenic differentiation of human aortic smooth muscle cells

ZHANG Fan¹, CHENG Naixuan², HAN Yingchun², ZHANG Haibo¹, DU Jie², ZHANG Congcong²

(1. Department of Cardiac Surgery, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China; 2. Beijing Institute of Heart, Lung and Vascular Diseases, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] human aortic smooth muscle cells; osteogenic differentiation; miR-181a-5p; vascular calcification

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of the miR-181a-5p on osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and explore its possible mechanism. **Methods** Human aortic smooth muscle cells (HASMC) were cultured and induced by osteogenic differentiation medium. Alizarin staining was used to detect the degree of osteogenic differentiation, and real-time PCR was used to detect the expression levels of miR-181a-5p and osteogenic differentiation associated genes, including osteocalcin (OCN), Runt related transcription factor 2 (RUNX2), and alkaline phosphatase (ALP). miR-181a-5p mimic transfection was used to overexpress miR-181a-5p in human aortic smooth muscle cells. TargetScan database was used to predict the target genes of miR-181a-5p, and real-time PCR was used to detect the effect of miR-181a-5p overexpression on target genes expression. **Results** The positive area of Alizarin staining and the intracellular calcium content in human aortic smooth muscle cells gradually increased after osteogenic differentiation induction, and the expression of OCN, RUNX2 and ALP in human aortic smooth muscle cells increased gradually, while the expression of miR-181a-5p decreased ($P < 0.05$). The expression of miR-181a-5p was negatively correlated with the expression of OCN, RUNX2 and ALP ($P < 0.05$). After human aortic smooth muscle cells were transfected with miR-

[收稿日期] 2020-10-28

[修回日期] 2020-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81871758);北京市“青苗”计划项目(QML20190604)

[作者简介] 张帆, 博士, 主治医师, 研究方向为心胸血管外科学, E-mail 为 z185715@163.com。通信作者张聪聪, 副研究员, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail 为 zcc_anzhen@163.com。

181a-5p mimic, the expression of miR-181a-5p in the cells was significantly up-regulated compared with the control mimic group ($P < 0.05$). At the same time, the calcium content and the expression of RUNX2 and OCN in human aortic smooth muscle cells was lower in the miR-181a-5p mimic group than that in the control mimic group ($P < 0.05$). MAPK1 and MAPK8, which could promote osteogenic differentiation, were predicted as the target genes of miR-181a-5p by TargetScan database. Real-time PCR results showed that the expression of mitogen activated protein kinase 1 (MAPK1) and mitogen activated protein kinase 8 (MAPK8) in the human aortic smooth muscle cells of miR-181a-5p mimic group was significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-181a-5p, which was declined during the osteogenic differentiation of vascular smooth muscle, can attenuate osteogenic differentiation. The possible mechanism is inhibiting the expression of pro-calcification signal transduction molecules MAPK1 and MAPK8.

动脉钙化尤其是冠状动脉钙化是冠心病、糖尿病、慢性肾病等多种疾病的常见血管病理改变,是急性心肌梗死、脑梗死、截肢等发生的独立危险因素^[1-2]。动脉钙化也会影响冠状动脉支架介入时病变扩张和器械通过,或引起支架贴壁不良,为未来主要心血管不良事件和缺血后心衰的发生埋下了巨大隐患^[3]。血管钙化的主要病理过程是血管平滑肌细胞转分化为成骨样表型,分泌钙化基质囊泡沉积在血管壁的中膜层和内膜层^[4]。平滑肌细胞成骨样分化的标志为肌钙蛋白、SM22 等收缩表型基因表达的下调和骨钙素 (osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2 (Runt related transcription factor 2, RUNX2) 及碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等成骨相关基因表达的上调^[5]。但该过程确切的分子调控机制尚不完全明确。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度在 22 个碱基左右的小分子 RNA,以序列匹配的方式与细胞质中靶基因 mRNA 的 3'UTR 区结合,抑制靶 mRNA 的翻译或引起靶 mRNA 的降解,从而对多种生理功能发挥调控作用^[6]。miRNA 参与血管钙化的病理发展过程^[7]。有研究显示血管钙化的主要危险因素之一的高龄人群的血清 miR-181a-5p 水平显著降低^[8]。在血管钙化另一致病因素的糖尿病患者血清和脂肪组织中 miR-181a-5p 水平也显著下调^[9]。但 miR-181a-5p 是否影响血管平滑肌细胞的成骨样分化从而参与血管钙化过程尚不清楚。因此,本研究在诱导人动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cells, HASMC) 成骨样分化过程中分析 miR-181a-5p 的表达变化,并通过模拟物过表达 miR-181a-5p 观察其对成骨样分化的影响,从而为血管钙化提供新的干预靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

HASMC 购自美国 ScienCell 公司 (#6110); β -甘

油磷酸、维生素 C、地塞米松购自美国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素双抗、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;总 RNA 提取试剂 Trizol、OPTI-MEMI 培养基、Lipofectamine iMax 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;mRNA 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司;2 \times SYBR Green qPCR Mix 购自日本 TaKaRa 公司;PCR 引物由北京诺赛基因有限公司合成;miR-181a-5p mimic 和对照 mimic、Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;茜红素染色液购自北京索莱宝科技有限公司;细胞内钙含量检测试剂盒购自中生北控生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

HASMC 在生长培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基) 中呈贴壁生长,置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养至 80% 汇合状态时,以胰蛋白酶消化细胞并传代。诱导成骨样分化:细胞生长至 90% 汇合程度,将生长培养基更换为钙化诱导培养基 (10% 胎牛血清的 DMEM 培养基含 10 mmol/L β -甘油磷酸盐、50 mg/L 抗坏血酸、10 nmol/L 地塞米松及 1 $\mu\text{g/L}$ 重组 IL-1 β)。每 2~3 天更换一次分化诱导培养基至 20 天。

1.3 茜素红染色

将诱导成骨样分化不同时间点的细胞使用 4% 多聚甲醛固定 10 min 后,使用双蒸水洗涤 3 次,每孔中加入配置好的茜红素染色工作液 500 μL ,室温孵育 5 min 后,使用双蒸水洗涤至无浮色,晾干后观察培养孔中的茜红素阳性染色程度。

1.4 real-time PCR 检测

取 1~2 μg 各样本 RNA 按 mRNA 或 miRNA 反转录试剂盒说明书的步骤反转录为 cDNA。将 cDNA、酶、缓冲液等按照 real-time PCR 试剂盒说明书混匀后,使用 Bio-RAD CFX Connect PCR 仪按照说明书进行扩增条件设置。以 U6 作为 miRNA 的内参,以 GAPDH 作为 mRNA 的内参。基因的表达

水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。扩增引物序列见表 1。

表 1. Real-time PCR 引物序列

Table 1. Primer sequence for real-time PCR

| 基因名称 | 上游 | 下游 |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|
| OCN | 5'-GGCGCTACCTGTATCAATGG-3' | 5'-GTGGTCAGCCAACTCGTCA-3' |
| RUNX2 | 5'-TGGTACTGTTCATGGCGGTA-3' | 5'-TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA-3' |
| ALP | 5'-GTGAACCGCAACTGGTACTC-3' | 5'-GAGCTGCCGTAGCGATGTCC-3' |
| MAPK1 | 5'-TCTGGAGCAGTATTACGACCC-3' | 5'-CTGGCTGGAATCTAGCAGTCT-3' |
| MAPK8 | 5'-TCTGGTATGATCCTTCTGAAGCA-3' | 5'-TCCTCCAAGTCCATAACTTCCTT-3' |
| GAPDH | 5'-GGAGCGAGATCCCCTCCAAAAT-3' | 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3' |

1.5 miRNA 模拟物转染细胞

将 12 孔板中的细胞加 800 μL 培养基,然后配制转染体系,将 3 μL Lipofectamine iMAX 转染试剂和 2.5 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ mimic (终浓度为 50 nmol/L) 分别用 100 μL 无血清 Opti-MEM 培养基进行稀释,两者轻轻混匀后室温静置 10 min,缓慢加入培养孔中。混匀后将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h ~ 72 h。转染效率通过提取细胞 RNA 后 real-time PCR 检测 miRNA 表达水平进行验证。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组之间比较采用非配对 t 检验,多组之间比较采用 One-Way ANOVA 分析,相关性分析使用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞诱导成骨样表型分化

HASMC 换成成骨样分化诱导培养基后,分别于第 0 天、10 天、15 天和 20 天进行茜红素染色、钙含量测定和细胞内 OCN、RUNX2 和 ALP 的 mRNA 表达水平检测,结果显示血管平滑肌细胞内的红色矿化结节随时间延长逐渐增加(图 1A),细胞内钙含量逐渐增加(图 1B),诱导分化 20 天后细胞内 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达水平显著增加(图 1C、1D 和 1E)。以上结果提示诱导血管平滑肌细胞成骨样分化成功。

2.2 血管平滑肌细胞内 miR-181a-5p 水平与成骨样分化相关基因的表达负相关

在 HASMC 诱导成骨样分化的第 0 天、10 天、15 天和 20 天分别检测细胞内 miR-181a-5p 的表达水

平,结果显示随着诱导分化时间的延长血管平滑肌细胞内 miR-181a-5p 的表达水平逐渐下降(图 2A)。为了初步明确 miR-181a-5p 与成骨样分化的关系,将 HASMC 内 miR-181a-5p 的表达水平分别与 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达水平进行相关性分析,结果显示 miR-181a-5p 与 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达水平呈负相关(图 2B、2C 和 2D),提示 miR-181a-5p 可能具有抑制血管平滑肌细胞成骨样表型分化的作用。

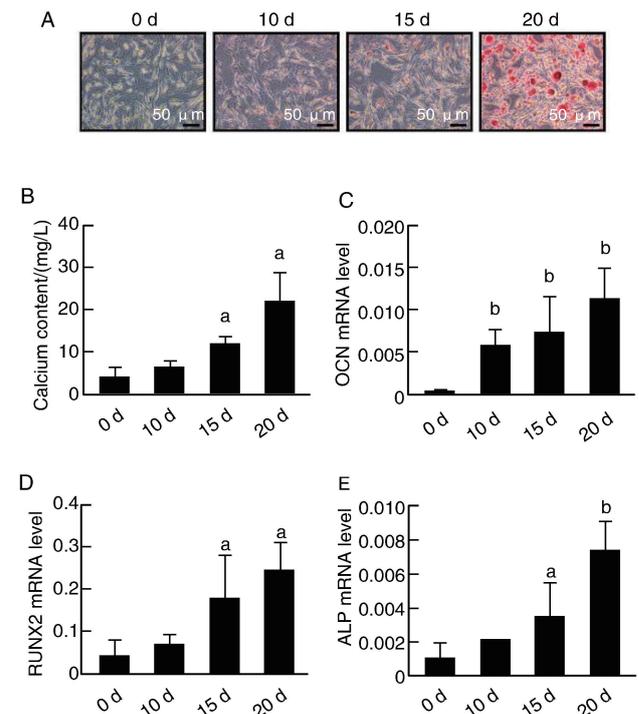


图 1. 血管平滑肌细胞诱导成骨样表型分化

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 天相比。

Figure 1. Osteogenic differentiation in vascular smooth muscle cells

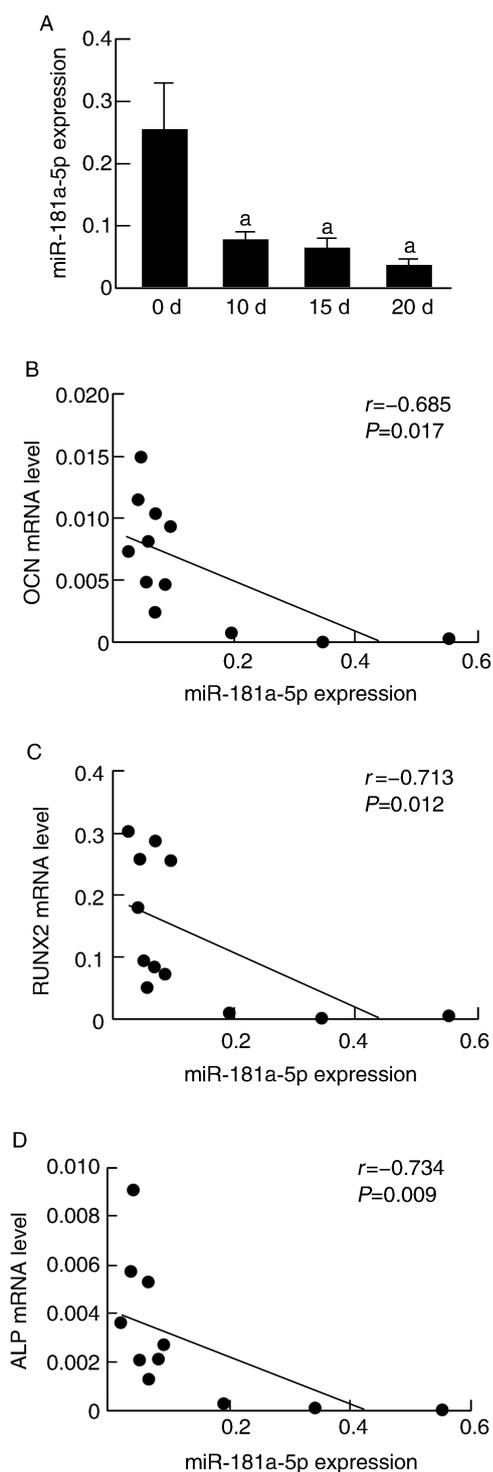


图 2. miR-181a-5p 与成骨样分化相关基因的表达水平呈负相关
a 为 $P < 0.01$, 与 0 天相比。

Figure 2. Negative correlation between miR-181a-5p and osteogenic genes

2.3 过表达 miR-181a-5p 可抑制血管平滑肌细胞成骨样分化

为了进一步明确 miR-181a-5p 在血管平滑肌细

胞成骨样分化中的作用,在诱导血管平滑肌细胞成骨样分化期间使用 miR-181a-5p mimic 转染细胞以过表达 miR-181a-5p,以转染 normal control mimic (NC mimic) 作为对照组。real-time PCR 检测结果显示 miR-181a-5p mimic 组细胞内 miR-181a-5p 的表达显著高于 NC mimic 组,表明细胞过表达 miR-181a-5p 成功(图 3A)。诱导成骨样分化 20 天后,茜红素染色结果显示 miR-181a-5p mimic 组细胞内红色钙化结节量较 NC mimic 组显著减少(图 3B)。细胞内钙含量检测结果显示 miR-181a-5p mimic 组细胞内钙含量较 NC mimic 组显著减少(图 3C)。real-time PCR 结果显示 miR-181a-5p mimic 组细胞内 OCN、RUNX2 和 ALP 的 mRNA 表达水平也较 NC mimic 组显著降低(图 3D、3E 和 3F)。以上结果提示过表达 miR-181a-5p 可减缓血管平滑肌细胞成骨样分化。

2.4 促成骨样分化激酶 MAPK1 和 MAPK8 是 miR-181a-5p 的靶基因

为了寻找 miR-181a-5p 抑制血管平滑肌细胞成骨样分化的作用机制,首先使用 TargetScan 数据库预测 miR-181a-5p 的靶基因,发现编码介导细胞成骨样分化的关键激酶 MAPK1 和 MAPK8 的 3'UTR 区均含有 miR-181a-5p 的结合位点(图 4A)。使用 real-time PCR 在 miR-181a-5p mimic 和 NC mimic 转染后的血管平滑肌细胞中检测 MAPK1 和 MAPK8 的 mRNA 表达水平,结果显示,与 NC mimic 组相比,miR-181a-5p mimic 组 MAPK1 和 MAPK8 的表达显著下降(图 4B 和 4C)。以上结果提示,在血管平滑肌细胞中 MAPK1 和 MAPK8 是 miR-181a-5p 的靶基因。

3 讨论

血管钙化是衰老、动脉粥样硬化、糖尿病和慢性肾病的常见病理改变,对各类心血管疾病的不良预后直接相关。既往研究显示血管平滑肌细胞的成骨样分化是血管钙化的关键细胞学事件^[4]。但是在促钙化条件下,血管平滑肌细胞成骨样分化的分子调控机制不清楚。本研究发现 miR-181a-5p 是一个在血管平滑肌细胞成骨样分化过程中显著下调的 miRNA,在该过程中使用模拟物在血管平滑肌细胞中过表达 miR-181a-5p 可以延缓其成骨样分化,从而提示 miR-181a-5p 可能在血管钙化中发挥保护作用。

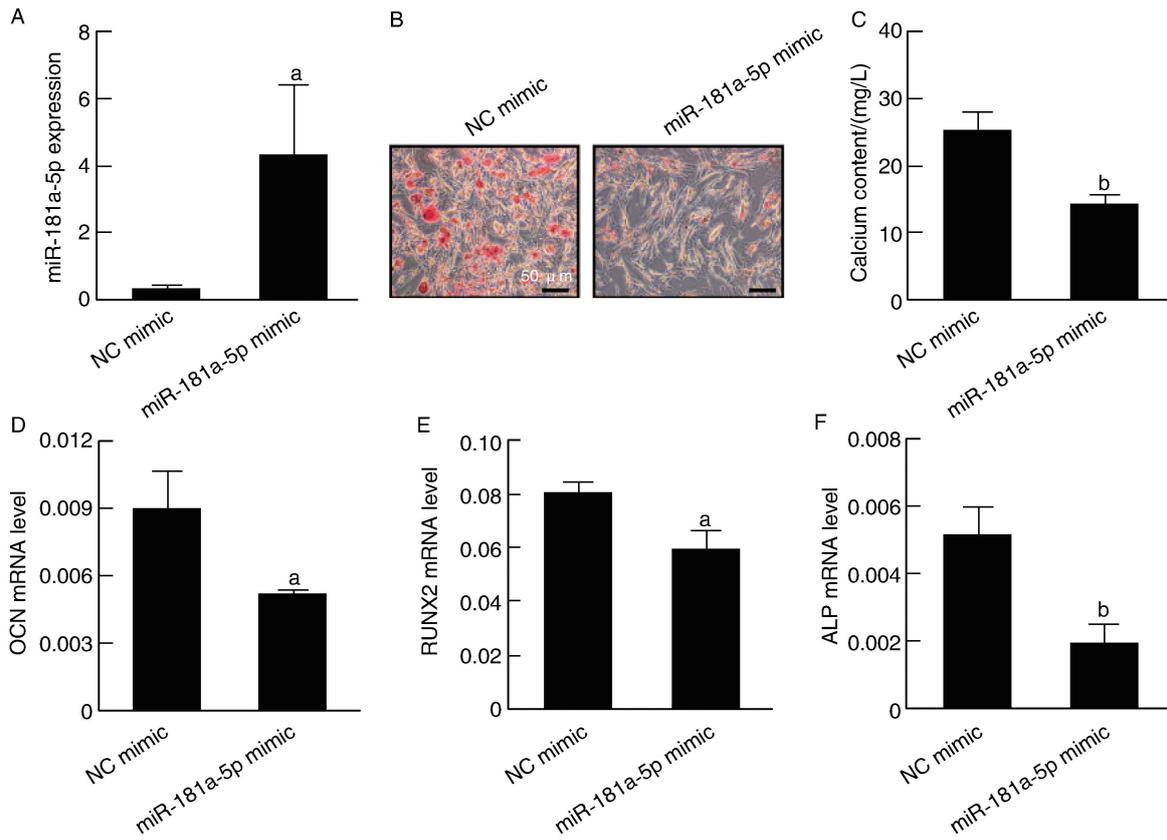


图 3. 过表达 miR-181a-5p 抑制血管平滑肌细胞成骨样分化

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 NC mimic 组相比。

Figure 3. miR-181a-5p overexpression inhibits the osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells

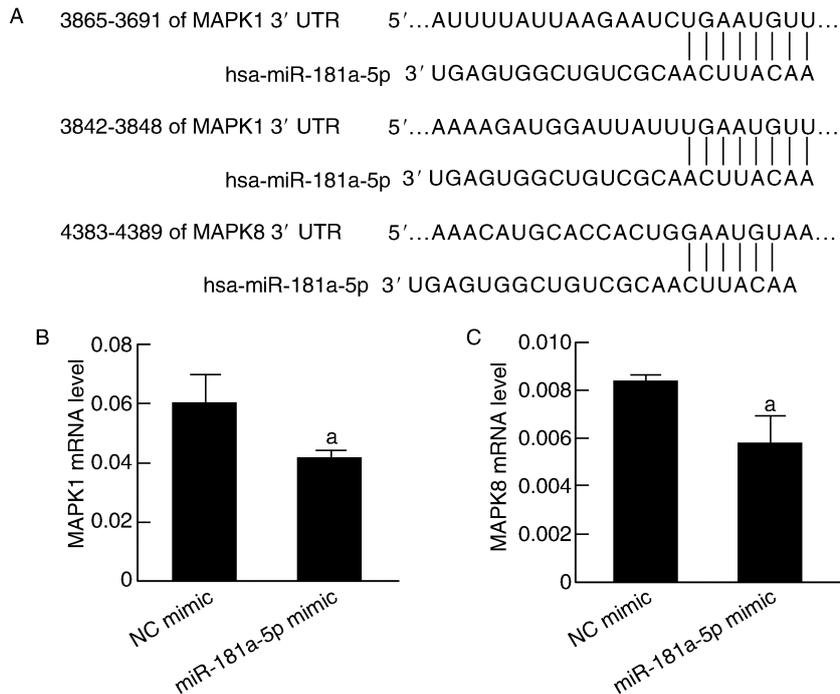


图 4. miR-181a-5p 的靶基因寻找和验证

a 为 $P < 0.05$, 与 NC mimic 组相比。

Figure 4. Target genes prediction and verification for miR-181a-5p

miR-181a-5p 在多种细胞中表达较丰富,可通过抑制 NF- κ B 信号通路的活化发挥抑制内皮细胞凋亡、血管新生以及炎症相关基因表达等作用^[10]。高脂饮食的 ApoE 基因敲除小鼠的主动脉组织中 miR-181a 的表达显著下调,深入的机制研究显示 miR-181a-5p 可通过抑制靶基因 TAB2 的表达降低肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的 NF- κ B 活化,从而减轻血管炎症反应,抑制 ApoE 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化程度^[11]。本研究发现,在诱导血管平滑肌细胞成骨样分化过程中 miR-181a-5p 的表达水平逐渐下降,在血管平滑肌细胞中过表达 miR-181a-5p 可抑制平滑肌细胞成骨样表型分化以及成骨样分化标志基因 OCN、RUNX2 和 ALP 的表达,证明 miR-181a-5p 在血管钙化过程中发挥保护性作用。

miRNA 通过碱基配对的方式抑制靶基因的表达来发挥作用,为了明确 miR-181a-5p 的下游靶基因,本研究通过生物信息学分析发现 miR-181a-5p 与成骨样分化标志蛋白 OCN、RUNX2 和 ALP 的 3' UTR 区无直接的结合位点,提示 miR-181a-5p 是通过其他靶基因间接影响了这几个分子的表达。但 miR-181a-5p 可与在成骨样分化中发挥信号传导作用的 MAPK 家族的 MAPK1 和 MAPK8 的 3' UTR 区结合,而且在平滑肌细胞内过表达 miR-181a-5p 可抑制 MAPK1 和 MAPK8 的表达,证明 MAPK1 和 MAPK8 是 miR-181a-5p 的靶基因。MAPK1 编码的蛋白为细胞外信号调节激酶 1 (extracellular signal regulated kinase 1, ERK1),其与 ERK2 形成二聚体后,经磷酸化可以进入细胞核并调控基因转录。研究显示炎症信号(如 LPS、Notch1 等)可激活平滑肌细胞表面 TLR3/4 受体及胞内下游的 ERK1/2 信号通路促进 BMP-2 和 ALP 的表达,进而促进细胞的成骨样分化^[12-13]。MAPK8 编码 MAPK 家族的另一个亚基 JNK1,其与 JNK2 形成二聚体 JNK1/2 参与基因的调控。促成骨样分化的 Wnt3a 分子可以通过激活 JNK 信号通路促进血管钙化的发生^[14]。研究显示抑制 MAPK1 或 MAPK8 的表达均可减缓血管平滑肌细胞中成骨样分化标志基因 RUNX2 和 ALP 的表达以及钙质的细胞内沉积过程^[15-16]。因此明确 miR-181a-5p 是通过抑制促成骨样分化的靶基因 MAPK1 和 MAPK8 来发挥抑制成骨样分化的作用的。

综上所述,miR-181a-5p 抑制主动脉平滑肌细胞成骨样分化,可能是通过靶向抑制介导成骨样分化的 MAPK 信号通路发挥作用的。本研究为动脉钙化的发病机制的研究提供了新的思路,为动脉钙化的治疗提供了新靶点。

[参考文献]

- [1] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: Review and perspectives[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(23): 1515-1525.
- [2] Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, et al. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2009, 5(1): 185-197.
- [3] Lehmann N, Erbel R, Mahabadi AA, et al. Value of progression of coronary artery calcification for risk prediction of coronary and cardiovascular events: Result of the HNR study (Heinz Nixdorf Recall) [J]. *Circulation*, 2018, 137(7): 665-679.
- [4] Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(9): 528-536.
- [5] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers [J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1147-1154.
- [6] Sun K, Lai EC. Adult-specific functions of animal microRNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(8): 535-548.
- [7] 裴昱强, 葛海龙, 刘放, 等. microRNA 调节血管钙化的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 738-743.
- [8] Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH 3rd, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum [J]. *Aging (Albany NY)*, 2013, 5(10): 725-740.
- [9] Lozano-Bartolome J, Llauro G, Portero-Otin M, et al. Altered expression of miR-181a-5p and miR-23a-3p is associated with obesity and TNF α -induced insulin resistance[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(4): 1447-1458.
- [10] Sindi HA, Russomanno G, Satta S, et al. Therapeutic potential of KLF2-induced exosomal microRNAs in pulmonary hypertension[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1185.
- [11] Su Y, Yuan J, Zhang F, et al. MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 365.
- [12] Zhan Q, Song R, Zeng Q, et al. Activation of TLR3 induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells through the NF- κ B and ERK1/2 pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(4): 482-493.
- [13] Zeng Q, Song R, Ao L, et al. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1580-1590.
- [14] Oh YJ, Kim H, Kim AJ, et al. Reduction of secreted frizzled-related protein 5 drives vascular calcification through Wnt3a-mediated Rho/ROCK/JNK signaling in chronic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3539.
- [15] Zhou Y, Wang JY, Feng H, et al. Overexpression of cIq/tumor necrosis factor-related protein-3 promotes phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification both in vivo and in vitro[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(5): 1002-1010.
- [16] Hao Q, Liu Z, Lu L, et al. Both JNK1 and JNK2 are indispensable for sensitized extracellular matrix mineralization in IKK β -deficient osteoblasts[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 13.

(此文编辑 文玉珊)