

miR-155 通过调控 CaSR 表达影响 VSMC 生长的机制研究

金子函, 张家宁, 冯璐, 张凤香

(锦州医科大学重症医学教研室, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] miR-155; 血管平滑肌细胞; 钙感受受体

[摘要] **目的** miR-155 可以通过干扰血管平滑肌细胞(VSMC)生物活性来抑制动脉粥样硬化斑块的形成,但具体机制不十分清楚。本研究主要观察 miR-155 对 VSMC 中钙感受受体(CaSR)表达的影响,同时探讨 CaSR 在 miR-155 调控 VSMC 生物活性过程中的作用。**方法** 培养 VSMC,将 miR-155 mimic、Ad-CaSR 转染到 VSMC 中,Western blot 检测相关基因的表达,MTT 测定 VSMC 生长情况,流式细胞术检测 VSMC 的凋亡情况,Transwell 检测 VSMC 迁移情况。**结果** miR-155 mimic 组 CaSR 的表达水平明显受抑制,VSMC 凋亡明显减少,而 VSMC 的增殖和迁移能力明显增强;Ad-CaSR 组和 miR-155+Ad-CaSR 组 VSMC 凋亡明显增加,而 VSMC 的增殖和迁移能力明显下降。**结论** miR-155 可以调控 VSMC 的生长,该作用可能是通过影响 VSMC 中 CaSR 的活性得以实现。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Study on the mechanism of miR-155 regulating CaSR expression and affecting the growth of vascular smooth muscle cells

JIN Zihan, ZHANG Jianing, FENG Lu, ZHANG Fengxiang

(Department of Critical Care Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] miR-155; vascular smooth muscle cells; calcium sensing receptor

[ABSTRACT] **Aim** miR-155 can inhibit the formation of atherosclerotic plaques by interfering with the biological activity of vascular smooth muscle cells, but the specific mechanism is not very clear. The purpose of this study was to observe the effects of miR-155 on calcium sensing receptor(CaSR) expression in vascular smooth muscle cells, and to explore the role of CaSR in miR-155 in regulating the biological activity of vascular smooth muscle cells. **Methods** Vascular smooth muscle cells were cultured, and miR-155 mimic and Ad-CaSR were transfected into vascular smooth muscle cells. Western blot was used to detect the expression of related genes. MTT was used to determine the growth of vascular smooth muscle cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of vascular smooth muscle cells. Transwell was used to detect the migration of vascular smooth muscle cell. **Results** The expression level of CaSR in miR-155 mimic group was significantly inhibited, the apoptosis of vascular smooth muscle cells was significantly reduced, and the proliferation and migration capabilities of vascular smooth muscle cells were significantly enhanced. Apoptosis of the cells was significantly increased, while the proliferation and migration capacity of vascular smooth muscle cells was significantly reduced. **Conclusion** miR-155 can regulate the growth of vascular smooth muscle cells, but this effect may be achieved by affecting the activity of CaSR in vascular smooth muscle cells.

miR-155 是 microRNA 家族中的重要成员之一。miR-155 可以通过多种方式参与细胞生长发育过程的调节。miR-155 可以通过发挥类激素样作用来影响血管重塑和动脉粥样硬化斑块的形成^[1-2]。研究已经证实,miR-155 在动脉血管中存在高表达,且

miR-155 主要来源于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)^[3-4]。当降低 miR-155 的表达时,受损血管内膜增生减少,动脉粥样硬化斑块形成减慢。虽然上述研究表明 miR-155 在 VSMC 增殖引起的动脉粥样硬化斑块形成过程中起到重

[收稿日期] 2020-08-21

[修回日期] 2020-12-23

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20180550601、2019-ZD-0833、201910160065)

[作者简介] 金子函,硕士,E-mail 为 canghaiguanri@126.com。通信作者张凤香,博士后,副主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向为动脉粥样硬化,E-mail 为 zhangfengxiang64@163.com。

要作用,但机制仍不十分清楚。

钙感受受体(calcium sensing receptor, CaSR)在人体各大组织器官中均有表达。近年来研究发现,在巨噬细胞中也存在 CaSR 的表达,当增强 CaSR 的表达时 IP3 的分泌明显增加,生成的 IP3 又能促进 Ca^{2+} 释放,使细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高,抑制泡沫细胞生成,进而延缓动脉粥样硬化斑块的发展^[5-6]。但 CaSR 影响动脉粥样硬化斑块形成的具体机制尚不十分清楚。

本研究主要探讨 miR-155 是否通过干扰 VSMC 内 CaSR 的活性来影响 VSMC 增殖和凋亡及其相关机制,进而为动脉粥样硬化斑块的防治提供新靶点和新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

miR-155 激动剂(上海生物科技有限公司);鼠抗人 CaSR 抗体、兔抗人 PI3K 抗体、小鼠抗 β -actin 抗体、山羊抗鼠 IgG(中杉金桥生物技术有限公司);MTT(欣博盛生物科技有限公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(Abcam 公司);ECL 发光试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 VSMC 的培养

取 7~8 周龄雄性 SD 大鼠的胸主动脉,PBS 清洗 2~3 次,剥离内膜、外膜,剪成 1 mm×1 mm 大小的组织块,置于培养瓶内,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育。3~5 天换液 1 次,0.25% 胰蛋白酶消化传代,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养。

1.3 转染实验

miR-155 mimic、Ad-CaSR 在 37 °C 下转染 VSMC 24 h。将 VSMC 接种于 6 孔板中,培养至 50% 汇合,用 5 mL Lipofectamine2000 转染,于 10% 胎牛血清中培养 24 h。然后换含有 100 kU/L 青霉素和 100 μ g/L 链霉素的新培养基。

1.4 细胞增殖的测定

胰酶消化细胞,制成细胞悬液,接种于 96 孔板,随机分组,每组设 4~6 个平行孔。培养箱中培养,然后用 40 nmol/L miR-155 mimic 或 Ad-CaSR 构建体转染,并孵育 48 h,向各孔中加入 MTT 溶液,培养 4 h 后吸弃孔内培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L,

37 °C 温箱孵育 15 min 后震荡混匀,用酶联免疫检测仪测定光密度值(OD 值,检测波长 570 nm)。

1.5 Transwell 检测 VSMC 的迁移能力

在 Transwell 上室中加入 40 mL Matrigel 稀释液,37 °C 孵育 12 h。各组细胞用含 0.1% BSA 的无血清培养基重悬,使细胞数为 2×10^5 个/mL。取 100 μ L 细胞加入上室,500 μ L 含 10% 血清培养基加入下室,每组设 3 个复孔,培养 48 h,取出小室,小室以甲醇固定 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;结晶紫染色 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。镜下观察,每个滤膜随机取 5 个视野(100 \times),取均值计数,并照相分析。

1.6 Annexin V-FITC/PI 检测 VSMC 凋亡

培养 48 h 后收集细胞,调细胞数至 1×10^6 ,以 PBS 洗 2 次,用 1 \times Binding Buffer 重悬,每组分别取 100 μ L 移至新管,加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI,振荡后于室温下避光静置 15 min,每管加入 400 μ L 1 \times Binding Buffer,染色后上流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测 VSMC 相关蛋白表达

收集细胞,PBS 洗 2 次,提取细胞总蛋白。每孔 40 μ g 含量加样,电泳分离。转至 PVDF 膜上,37 °C 封闭 2 h。分别与 1:300 鼠抗人 CaSR、1:600 兔抗人 PI3K 抗体 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(1:500),4 °C 孵育 2 h。洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 发光试剂盒发光显影,凝胶成像。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件进行处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据进行正态性和方差齐性检验,样本的均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155 mimic 和/或 Ad-CaSR 对 VSMC 内 CaSR 表达的影响

Western blot 检测结果显示,miR-155 mimic 组 VSMC 内 CaSR 的表达明显受抑制($P < 0.05$),miR-155 mimic + Ad-CaSR 组和 Ad-CaSR 组 VSMC 内 CaSR 的表达则明显增强($P < 0.05$),而 miR-155 mimic+Ad-CaSR 组与 Ad-CaSR 组 VSMC 内 CaSR 的表达无明显差异(图 1)。

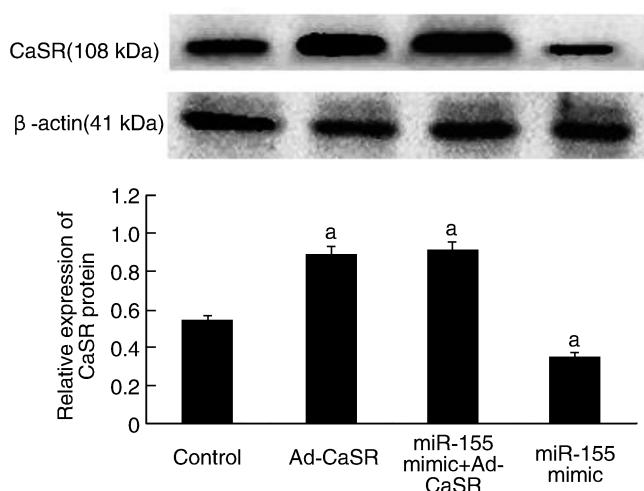


图 1. Western blot 检测 VSMC 内 CaSR 的表达

a 为 $P < 0.05$, 空白对照组比较。

Figure 1. Western blot was used to detect the expression of CaSR in VSMC

2.2 miR-155 mimic 和/或 Ad-CaSR 对 VSMC 增殖能力的影响

MTT 检测结果显示, miR-155 mimic 组 VSMC 的增殖能力明显提高 ($P < 0.05$), miR-155 mimic + Ad-CaSR 组和 Ad-CaSR 组 VSMC 的增殖能力则明显受抑制 ($P < 0.05$), miR-155 mimic + Ad-CaSR 组与 Ad-CaSR 组 VSMC 的增殖能力无明显差异。该结果说明高表达的 miR-155 可以促进 VSMC 增殖, 但 CaSR

的表达增强时, miR-155 促进 VSMC 增殖的作用明显受抑制 (图 2)。

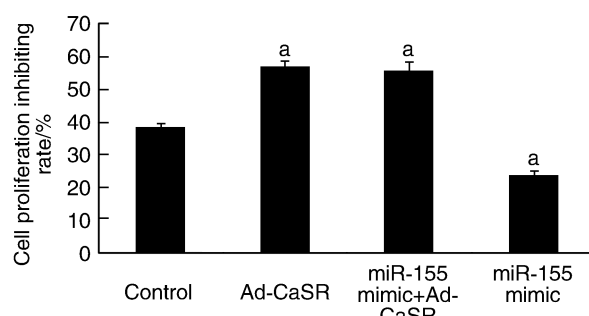


图 2. MTT 实验观察各组 VSMC 增殖情况

a 为 $P < 0.05$, 空白对照组比较。

Figure 2. MTT experiment was used to observe the proliferation of vascular smooth muscle cells in each group

2.3 miR-155 mimic 和/或 Ad-CaSR 对 VSMC 凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, miR-155 mimic 组 VSMC 凋亡明显减少 ($P < 0.05$), miR-155 mimic + Ad-CaSR 组和 Ad-CaSR 组 VSMC 凋亡则明显增加 ($P < 0.05$), 而 miR-155 mimic + Ad-CaSR 组与 Ad-CaSR 组 VSMC 凋亡无明显差异。该结果说明高表达的 miR-155 可以抑制 VSMC 凋亡, 但 CaSR 表达增强时, miR-155 抑制 VSMC 凋亡的作用明显降低 (图 3)。

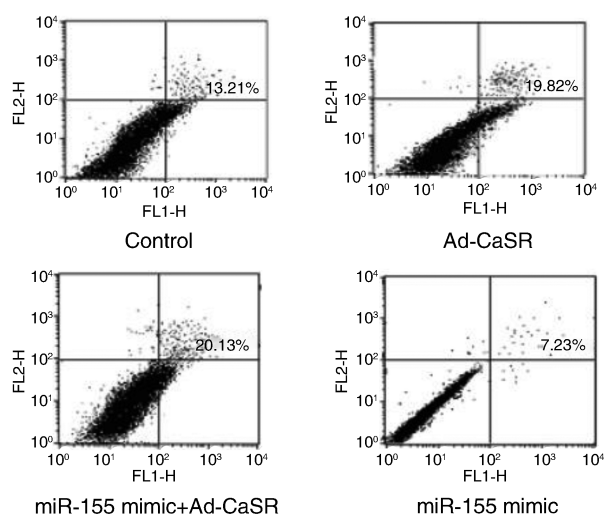


图 3. 流式细胞术观察各组 VSMC 凋亡情况

a 为 $P < 0.05$, 空白对照组比较。

Figure 3. Flow cytometry was used to observe the apoptosis of vascular smooth muscle cells in each group

2.4 miR-155 mimic 和/或 Ad-CaSR 对 VSMC 迁移能力的影响

Transwell 检测结果显示, miR-155 mimic 组

VSMC 的迁移能力明显增强 ($P < 0.05$), miR-155 mimic + Ad-CaSR 组和 Ad-CaSR 组 VSMC 的迁移能力则明显减弱 ($P < 0.05$), 而 miR-155 mimic + Ad-

CaSR 组与 Ad-CaSR 组 VSMC 的迁移能力无明显差异。该结果说明高表达的 miR-155 可以促进 VSMC 的迁移能力,但 CaSR 的表达增强时,miR-155 促进 VSMC 迁移的作用明显降低(图 4)。

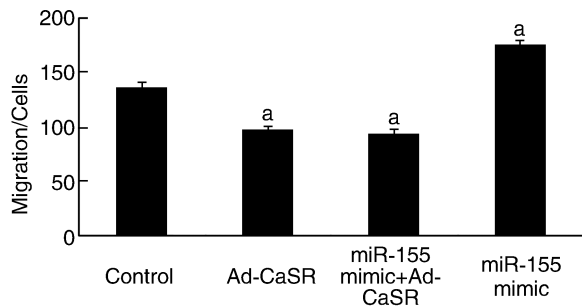


图 4. Transwell 实验观察各组 VSMC 的迁移情况
a 为 $P < 0.05$, 空白对照组比较。

Figure 4. Transwell experiment was used to observe the migration of vascular smooth muscle cells in each group

2.5 miR-155 mimic 和/或 Ad-CaSR 对 VSMC 内 PI3K 蛋白表达的影响

作用 VSMC 48 h 后,过表达 miR-155 显著增强 VSMC 内 PI3K 的表达 ($P < 0.05$),而增强 miR-155 表达同时增强 CaSR 表达时,VSMC 内 PI3K 表达的能力被抑制 ($P < 0.05$)。表明 miR-155 可能是通过干扰 VSMC 内 CaSR 活性来影响 PI3K 基因的表达(图 5)。

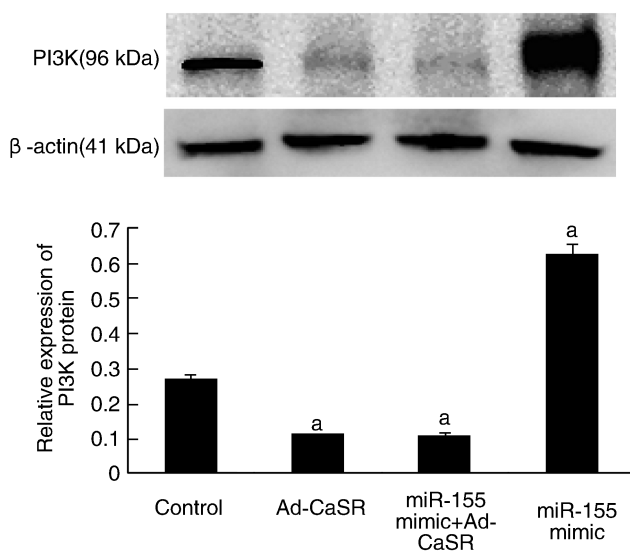


图 5. Western blot 检测各组 VSMC 内 PI3K 的表达
a 为 $P < 0.05$, 空白对照组比较。

Figure 5. Western blot was used to detect the expression of PI3K in VSMC in each group

3 讨论

CaSR 参与人体动脉粥样硬化斑块形成和血管重塑等病理性疾病的发生、发展,它主要是通过 Ca^{2+} /CaSR 信号通路对上述病理过程进行相应的调节^[7-9]。miR-155 在心血管疾病发生、发展过程中也起到了十分重要的作用,miR-155 可以促进 VSMC 增殖、迁移及血管形成^[10-11]。

本研究在 VSMC 内转染 miR-155 mimic,观察 miR-155 mimic 对 VSMC 内 CaSR 表达的影响,结果发现,过表达的 miR-155 可以明显抑制 VSMC 内 CaSR 的表达,但当 CaSR 的表达增强时 miR-155 抑制 CaSR 表达的作用明显减弱。该结果初步证实,过表达的 miR-155 可以降低 VSMC 内 CaSR 的表达。在转染 miR-155 mimic 的 VSMC 中发现细胞的增殖能力和迁移能力明显增强,同时细胞的凋亡能力明显下降,而单独转染 Ad-CaSR 和联合转染 miR-155 mimic+Ad-CaSR 的 VSMC 的生物学活性均出现相反的结果,该研究结果证实高表达的 miR-155 可以促进 VSMC 增殖和迁移,同时抑制细胞凋亡,但当增强 CaSR 的表达时,miR-155 的上述作用明显受抑制。

上述研究结果不但证实 miR-155 与 CaSR 在调节 VSMC 生物学活性过程中起到十分重要的作用,同时还提示 miR-155 的这种调控作用很可能是通过调节 CaSR 的活性来得以实现的。

PI3K/Akt 是人体生命活动中十分重要的信号通路。PI3K/Akt 可以通过调节下游一系列底物的表达来影响细胞的生物活性。研究发现,PI3K/Akt 信号通路在 VSMC 中存在广泛表达,是调节 VSMC 生物学活性的重要信号通路^[12-13]。

本研究结果发现,miR-155 能明显促进 PI3K 的表达,但当 CaSR 表达增强时 miR-155 促进 PI3K 表达的作用被明显降低。该研究结果说明,过表达的 miR-155 可能是通过抑制 CaSR 表达来增强 PI3K 的活性,进而影响 VSMC 的生物学活性,但 miR-155 又是通过何种途径对 VSMC 内 CaSR 进行调控还不得而知。

综上,根据本研究结果可得出,miR-155 可能是通过调节 CaSR 表达来影响 VSMC 活性,最终干扰动脉粥样硬化斑块的形成。本研究不仅阐述了 miR-155 调控 VSMC 内 CaSR 表达的作用机制,而且为动脉粥样硬化斑块的防治提供了新靶点。

[参考文献]

- [1] Du F, Yu F, Wang Y, et al. miR-155 deficiency results in decreased macrophage inflammation and attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 759-767.
- [2] Bonilla MG, Hernández ON, Gonzalez JA, et al. EsxA mainly contributes to the miR-155 overexpression in human monocyte-derived macrophages and potentially affect the immune mechanism of macrophages through miRNA dysregulation [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2019, 1182(18): 30085-30089.
- [3] Yong QC, Jun PR, Juan Z, et al. miR-155 regulates interferon- γ production in natural killer cells via Tim-3 signalling in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Immunology*, 2015, 145: 485-497.
- [4] 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]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2015, 1852(7): 1477-1489.
- [5] Diaz-Soto G, Rocher A, Garcia-Rodriguez C, et al. The calcium-sensing receptor in health and disease[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 327: 321-369.
- [6] Yamamura A. Calcium-sensing receptor[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2016, 148(5): 278-280.
- [7] DEspessailles A, Santillana N, Sanhueza S, et al. Calcium sensing receptor activation in THP-1 macrophages triggers NLRP3 inflammasome and human preadipose cell inflammation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 501: 110654.
- [8] García-Castaño A, Madariaga L, Pérez de Nanclares G, et al. Novel mutations associated with inherited human calcium-sensing receptor disorders: A clinical genetic study [J]. *Eur J Endocrinol*, 2019, 180(1): 59-70.
- [9] Wang Y, Wang A, Zhang M, et al. Artesunate attenuates airway resistance in vivo and relaxes airway smooth muscle cells in vitro via bitter taste receptor-dependent calcium signalling[J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(2): 231-243.
- [10] Zuo WN, Zhu H, Li LP, et al. miR-155 promotes proliferation and inhibits apoptosis of nasopharyngeal CaSR cinoma cells through targeting PTEN-PI3K/Akt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(18): 7935-7942.
- [11] Huang RS, Hu GQ, Lin B, et al. miR-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages[J]. *J Investig Med*, 2010, 58(8): 961-967.
- [12] Tan P, Wang YJ, Li S, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway regulates the replicative senescence of human VSMCs[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1-2): 1-10.
- [13] Gong D, Cheng HP, Xie W, et al. Cystathionine γ -lyase (CSE)/hydrogen sulfide system is regulated by miR-216a and influences cholesterol efflux in macrophages via the PI3K/Akt/ABCA1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(1): 107-116.

(此文编辑 文玉珊)